



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Π. ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ



Διδακτορική Διατριβή

**«ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΝΟΣΟΕΙΔΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΡΕΥΜΑΤΙΚΑ
ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ»**

Υπό

Αθανασίου Γκουτζουρέλα

Ιατρός, Ειδικευόμενος Παιδιατρικής

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2024

© 2024 ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΓΚΟΥΤΖΟΥΡΕΛΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Αφιερωμένο στην οικογένειά μου!

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. **Λάζαρος Σακκάς**, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Δημήτριος Μπόγδανος**, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων
Νοσημάτων Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Χριστίνα Κατσιάρη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
4. **Ειρήνη Ρηγοπούλου**, Καθηγήτρια Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. **Ζωή Δανιήλ**, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Τμήματος Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας
6. **Ευθύμιος Δαρδιώτης**, Καθηγητής Νευρολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. **Μαρία Γραμματικοπούλου**, Λέκτορας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας σε άμεση συνεργασία με την Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής αυτής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση των Καθηγητών και την άριστη συνεργασία με όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου και της ομώνυμης κλινικής.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. Λάζαρο Σακκά που ως επιβλέπων, μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη Διδακτορική Διατριβή μου. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθ. Δημήτριο Μπόγδανο για όλη την υποστήριξη και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής μου. Η εμπιστοσύνη και οι συμβουλές που μου έδινε σε όλη τη διάρκεια της μακροχρόνιας παρουσίας μου στο Εργαστήριο και την κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, ήταν για εμένα ιδιαίτερα σημαντικές και απαραίτητες για να μπορέσω να συνεχίσω. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Αν. Καθ. Χριστίνα Κατσιάρη, η βοήθεια και η υποστήριξη της οποίας ήταν μεγάλης σημασίας για την ολοκλήρωση της παρούσας Διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χρήστο Λιάσκο, η παρουσία του οποίου στο Εργαστήριο και την Κλινική ήταν για εμένα πολύ σημαντική και απαραίτητη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γεώργιο Ευθυμίου και την Ελένη Πατρικίου με τους οποίους συνεργαστήκαμε άψογα και ευχάριστο κλίμα κατά τη διάρκεια εκπόνησης των διατριβών μας. Ευχαριστώ τους Ιατρούς Ρευματολόγους της κλινικής, κα Θεοδώρα Σιμοπούλου και κο Ιωάννη Αλεξίου για την άψογη συνεργασία και τη

βοήθεια τους. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Σοφία Χουτεσιώτη για τη βοήθεια και υποστήριξή της όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς και τον αδερφό μου, καθώς και τους φίλους μου για την υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόησή τους όλα αυτά τα χρόνια!

Σύντομο Βιογραφικό

Εκπαίδευση

Νοέ 2016 – Σήμερα: Υποψήφιος Διδάκτωρ (Ph.D.), Εργαστήριο Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Τίτλος διδακτορικής εργασίας: «Χαρτογράφηση Επιτόπων Νοσοειδικών Αντιπυρηνικών Αντισωμάτων σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς με Αυτοάνοσα Ρευματικά Νοσήματα με έμφαση στη Συστηματική Σκλήρυνση»

Σεπ 2010 – Ιούλ 2016: Πτυχίο Ιατρικής [Βαθμός: 7,18/10, *Λίαν Καλώς*], Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Σεπ 2009 – Σεπ 2010: Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Πολυτεχνική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

Σεπ 2006 – Ιουν 2009: Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου [Βαθμός: 19,8/20, *Άριστα*– 1ο βραβείο καλύτερης επίδοσης στις Πανελλαδικές εξετάσεις], 2^ο Ενιαίο Λύκειο Λάρισας, Λάρισα

Επαγγελματική Εμπειρία

Δεκ 2022 – Δεκ 2023: Εκπλήρωση Υποχρεωτικής Υπηρεσίας Υπαίθρου ως παρατασιακός Ειδικευόμενος Ιατρός Παιδιατρικής στην Παιδιατρική Κλινική Π.Γ.Ν. Λάρισας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Αύγ 2019 – Δεκ 2022: Ειδικευόμενος Ιατρός Παιδιατρικής στην Παιδιατρική Κλινική Π.Γ.Ν. Λάρισας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Δεκ 2018 – Αύγ 2019: Ειδικευόμενος Ιατρός Παιδιατρικής στην Παιδιατρική Κλινική Γ.Ν. Καρδίτσας, Καρδίτσα

Ιούν 2017 – Οκτ 2017: Ιδιωτική απασχόληση στην Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας Π.Γ.Ν. Λάρισας στο πλαίσιο προγράμματος "Υποβοήθηση στη δημιουργία ηλεκτρονικής πλατφόρμας για την Ψωριασική αρθρίτιδα"

Ιούν 2017 – Δεκ 2017: Ιατρός, Έμμισθη απασχόληση στην ιδιωτική κλινική "Animus-Κυανούς Σταυρός, Κέντρο Αποκατάστασης", Λάρισα

Αύγ 2016 – Σήμερα: Επισκέπτης – Ερευνητής, Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας και Εργαστήριο Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Οκτ 2014 – Ιούλ 2016: Προπτυχιακός ερευνητής στο Εργαστήριο Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Υποτροφίες

- Χρηματοδότηση στα πλαίσια του προγράμματος ΕΣΠΑ ΕΔΒΜ34 «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές» για το ερευνητικό έργο με τίτλο: Ο ρόλος της μοριακής μίμησης στην αυτοανοσία: η συστηματική σκλήρυνση ως πρότυπο» (ΜΑΙΟΣ 2017)

Δημοσιεύσεις

- Bogdanos DP, Gkoutzourelas A, Papadopoulos V, Liaskos C, Patrikiou E, Tsigalou C, Saratziotis A, Hajioannou J, Scheper T, Meyer W, Sakkas LI, Papandreou C. *Anti-Ro52 antibody is highly prevalent and a marker of better prognosis in patients with ovarian cancer*. Clin Chim Acta. 2021 Oct; 521:199-205. doi: 10.1016/j.cca.2021.07.006. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34245687.
- Patrikiou E, Liaskos C, Mavropoulos A, Ntavari N, Gkoutzourelas A, Simopoulou T, Fechner K, Scheper T, Meyer W, Katsiari CG, Roussaki-Schulze A, Zafiriou E, Sakkas LI, Bogdanos DP. *Autoantibodies against specific nuclear antigens are present in psoriatic disease and are diminished by secukinumab*. Clin Chim Acta. 2020 Nov; 510:400-407. doi: 10.1016/j.cca.2020.07.037. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32710943.
- Gkoutzourelas A, Liaskos C, Simopoulou T, Katsiari C, Efthymiou G, Scheper T, Meyer W, Tsirogianni A, Tsigalou C, Dardiotis E, Daoussis D, Sakkas LI, Bogdanos DP. *A study of antigen-specific anti-cytomegalovirus antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and concomitant anti-Ro52 antibodies*. Rheumatol Int. 2020 Oct;40(10):1689-1699. doi: 10.1007/s00296-020-04643-z. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32681396.
- Liaskos C, Gkoutzourelas A, Spyrou V, Koutsoumpas A, Athanasiou LV, Amiridis GS, Billinis C, Bogdanos DP. *Pancreatic anti-GP2 and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in ruminants with paratuberculosis: A better understanding of the immunopathogenesis of Crohn's disease*. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2020 Oct;44(5):778-785. doi: 10.1016/j.clinre.2019.12.013. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32035824.
- Vranou P, Gkoutzourelas A, Athanatoi D, Zafiriou E, Grammatikopoulou MG, Bogdanos DP. *Let Food Be Thy Medicine: The Case of The Mediterranean Diet in Rheumatoid Arthritis*. Mediterr J Rheumatol. 2020 Sep 30;31(3):325-329. doi: 10.31138/mjr.31.3.325. PMID: 33163865; PMCID: PMC7641021.
- Gkoutzourelas A, Bogdanos DP, Sakkas LI. *Kawasaki Disease and COVID-19*. Mediterr J Rheumatol. 2020 Sep 21;31(Suppl 2):268-274. doi: 10.31138/mjr.31.3.268. PMID: 33196004; PMCID: PMC7656130.
- Gkoutzourelas A, Barmakoudi M, Bogdanos DP. *A Bioinformatics Analysis Reveals Novel Pathogens as Molecular Mimicry Triggers of Systemic Sclerosis*. Mediterr J Rheumatol. 2020 Mar 31;31(1):50-70. doi: 10.31138/mjr.31.1.50. PMID: 32411933; PMCID: PMC7219639.
- Liaskos C, Rentouli S, Simopoulou T, Gkoutzourelas A, Norman GL, Brotis A, Alexiou I, Katsiari C, Bogdanos DP, Sakkas LI. *Anti-Clq autoantibodies are frequently detected in patients with systemic sclerosis associated with pulmonary fibrosis*. Br J Dermatol. 2019 Jul;181(1):138-146. doi: 10.1111/bjd.17886. Epub 2019 May 6. PMID: 30875084.

- Sakkas LI, Bogdanos DP, Boumpas D, Mamouris Z, Gkoutzourelas A, Mavropoulos A, Tsouris Z, Liossis SN, Daoussis D, Vasilopoulos D, Tektonidou M, Tzioufas A, Efthymiou G, Dardiotis E, Kitas G, Sharif K, Blank M, Karussis D, Rimar D, Slobodin G, Porat-Katz BS, Vadasz Z, Amital H, Toubi E, Shoenfeld Y. *The Second Greek-Israeli Symposium on Autoimmunity and Rheumatology: Success Through Synergy*. Isr Med Assoc J. 2019 Apr;21(4):292-297. PMID: 31032578.
- Gkoutzourelas A, Liaskos C, Mytilinaiou MG, Simopoulou T, Katsiari C, Tsirogianni A, Daoussis D, Scheper T, Meyer W, Bogdanos DP, Sakkas LI. *Anti-Ro60 Seropositivity Determines Anti-Ro52 Epitope Mapping in Patients with Systemic Sclerosis*. Front Immunol. 2018 Dec 7; 9:2835. doi: 10.3389/fimmu.2018.02835. PMID: 30581434; PMCID: PMC6293197.
- Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Gkoutzourelas A, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, Meyer W, Katsiari CG, Bogdanos DP, Sakkas LI. *Multiparametric autoantibody profiling of patients with systemic sclerosis in Greece*. Mediterr J Rheumatol. 2018 Sep 27;29(3):120-126. doi: 10.31138/mjr.29.3.120. PMID: 32185313; PMCID: PMC7046048.
- Asteriou E, Gkoutzourelas A, Mavropoulos A, Katsiari C, Sakkas LI, Bogdanos DP. *Curcumin for the Management of Periodontitis and Early ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis: Killing Two Birds with One Stone*. Nutrients. 2018 Jul 16;10(7):908. doi: 10.3390/nu10070908. PMID: 30012973; PMCID: PMC6073415.

Συμμετοχή σε συγγραφή βιβλίων

- Συμμετοχή στη μετάφραση της Ελληνικής 5ης Έκδοσης (2020) του συγγράμματος «Βασική Παιδιατρική - Nelson», Εκδόσεις Πασχαλίδη

Ομιλίες σε συνέδρια

- “Anti-ro52 antibody is highly prevalent and a marker of better prognosis in patients with ovarian cancer”, 3rd Panhellenic Congress of Autoimmune Diseases, Rheumatology and Clinical Immunology, September 24-26, 2021, Nafplio, Greece
- “Anti-ro52 antibody is highly prevalent and a marker of better prognosis in patients with ovarian cancer”, #54 FRIDAY AUTOIMMUNITY INTERNATIONAL MEETING, Shoenfeld Fridays’ Mosaic of Autoimmunity e-Meetings, FRIDAY MAY 7, 2021
- “A study of antigen-specific anti-cytomegalovirus antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and concomitant anti-Ro52 antibodies”, 2nd Panhellenic Congress of Autoimmune Diseases, Rheumatology and Clinical Immunology, September 25-27, 2020, Plastiras Lake, Greece
- “Human cytomegalovirus as a viral trigger of anti-ro52 antibodies in patients with autoimmune rheumatic diseases”, 1st Panhellenic Congress of Autoimmune Diseases, Rheumatology and Clinical Immunology, April 5-7, 2019, Portaria Pelion, Greece
- “Is Human Cytomegalovirus a viral trigger of anti-Ro52 antibodies in patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus?”, 11th International Congress

of Autoimmunity, Session: Infection and Autoimmunity, 16-20 May 2018, Lisbon, Portugal

- “Epitope mapping of anti-Ro52 antibody responses in patients with systemic sclerosis and other rheumatic diseases”, 8th Panhellenic Congress of Rheumatic and Autoimmune diseases, Central Greece, 14-16 September 2018, Larissa, Greece
- “Anti-Ro60 seropositivity determines anti-Ro52 epitope mapping outcome in patients with autoimmune rheumatic diseases”, 11th International Congress of Autoimmunity, Session: Dilemmas in the diagnosis of autoimmune diseases, detection and standardization, 16-20 May 2018, Lisbon, Portugal
- “Epitope mapping of anti-Ro52 antibody responses in patients with autoimmune rheumatic diseases reveals differential epitope recognition”, 13th Dresden Symposium on Autoantibodies, Session: Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases, September 27-30, 2017, Dresden, Germany

Ξένες Γλώσσες

- Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΝΟΣΟΕΙΔΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΡΕΥΜΑΤΙΚΑ
ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ**

ΓΚΟΥΤΖΟΥΡΕΛΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Λάζαρος Σακκάς**, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
- 2. Δημήτριος Μπόγδανος**, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων
Νοσημάτων Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 3. Χριστίνα Κατσιάρη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτησε πλήρως τους επιτόπους των anti-Ro52 αντισωμάτων σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc). Η χαρτογράφηση επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων έχει μελετηθεί εκτενώς σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren (SjS) και συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE). Ωστόσο, δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία ολοκληρωμένη μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), όπου επίσης η συχνότητα ανίχνευσης των anti-Ro52 αντισωμάτων είναι αυξημένη. Πέντε ανασυνδυασμένα τμήματα του Ro52, που επικαλύπτουν ολόκληρο το αντιγόνο χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιδραστικότητας με τη χρήση ειδικής γραμμική ανοσομεθόδου και *in house* ELISA. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση την ταυτόχρονη παρουσία ή όχι anti-Ro60 αντισωμάτων. Όλοι οι anti-Ro52 θετικοί οροί ασθενών αποδείχθηκαν αντιδραστικοί έναντι του τμήματος Ro52-2, ενώ κανείς έναντι του Ro52-3. Αντισώματα κατά του Ro52-1 βρέθηκαν λιγότερο συχνά σε ασθενείς με SSc από ότι με SjS ή/και SLE, καθώς επίσης σε μικρότερο βαθμό και έναντι του Ro52-4. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε το γεγονός ότι ασθενείς με SSc και διπλή αντιδραστικότητα anti-Ro52+/anti-Ro60+ παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 σε σχέση με ασθενείς anti-Ro52+/anti-Ro60-. Σε αυτήν την περιεκτική ανάλυση της χαρτογράφησης επιτόπων του Ro52 στη SSc, η περιοχή περιελιγμένης σπείρας παραμένει ο κυρίαρχος επίτοπος στο Ro52. Σε αντίθεση με το SjS και τον SLE, οι ασθενείς με SSc αποτυγχάνουν να αναγνωρίσουν επιτοπικές περιοχές εντός του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης, ειδικά εάν δεν έχουν ταυτόχρονη αντιδραστικότητα έναντι του Ro60.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η παρουσία πιθανών αντιγονοειδικών anti-HCMV συσχετίσεων με τα anti-Ro52 αντισώματα. Ιικοί παράγοντες, όπως ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV), έχουν θεωρηθεί ότι μπορεί να αποτελέσουν το έναυσμα για την εκδήλωση SSc. Αξιολογήθηκαν συνεπώς οι κυρίαρχες anti-HCMV αντισωματικές αποκρίσεις σε θετικούς και αρνητικούς για το anti-Ro52 ασθενείς με SSc και έγινε σύγκριση αυτών με εκείνες ασθενών με SLE και SjS. Η παρουσία αντισωμάτων έναντι των ειδικών αντιγόνων του HCMV pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44, p38 και pp28/UL99 ελέγχθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Το κυριότερο εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι οι ασθενείς με SSc και θετικά anti-Ro52 αντισώματα αντέδρασαν πιο συχνά έναντι των αντιγόνων pp52/UL44 και p38 του HCMV σε σύγκριση με τους anti-Ro52(-), συσχέτιση η οποία δεν ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με SLE ή SjS. Επίσης, οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV pp65/UL83, pp52/UL44 και p38 ήταν υψηλότεροι στους anti-Ro52(+) από ότι στους anti-Ro52(-) ασθενείς με SSc. Συνεπώς, οι αντισωματικές αποκρίσεις έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του HCMV διαφέρουν μεταξύ των anti-Ro52 θετικών και αρνητικών ασθενών με SSC (καθώς και μεταξύ SSc και SLE ή SjS), αλλά το εάν αυτές οι διαφορές είναι επιφαινόμενες μένει να εξακριβωθεί.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη χαρτογράφησης των β-κυτταρικών επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων σε παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Η μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων σε anti-Ro52 θετικούς παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της ειδικής γραμμική ανοσομεθόδου που αναφέρθηκε και παραπάνω. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση σε σχέση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τη μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων στους ενήλικες ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Ωστόσο, ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν ήταν μικρός και επομένως κρίνεται

σημαντική η μελλοντική πραγματοποίηση παρόμοιων πειραμάτων σε μεγαλύτερο αριθμό παιδιατρικών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα που παρουσιάζουν anti-Ro52 θετικά αντισώματα.

Abstract

This PhD thesis has studied the epitopes of anti-Ro52 antibodies in patients with systemic sclerosis (SSc). Epitope mapping of anti-Ro52 antibodies has been extensively studied in patients with Sjögren's syndrome (SjS) and systemic lupus erythematosus (SLE). However, no comprehensive epitope mapping study has been performed in patients with systemic sclerosis (SSc), a disease where also the frequency of anti-Ro52 antibodies is increased. Five recombinant fragments of Ro52, covering the full antigen were used to test reactivity using a specifically designed line immunoassay and *in house* ELISA. In addition, further analysis of the results was performed based on the simultaneous presence or not of anti-Ro60 antibodies. All sera of anti-Ro52 positive patient proved reactive against the Ro52-2 fragment, whereas none against Ro52-3. Antibodies against Ro52-1 were found less frequently in patients with SSc than with SjS and/or SLE. This was also the case, to a lesser extent, against Ro52-4. A particularly interesting finding was the fact that patients with SSc and double anti-Ro52+/anti-Ro60+ reactivity showed greater reactivity against Ro52-1 than anti-Ro52+/anti-Ro60- patients. In this comprehensive analysis of the epitope mapping of Ro52 in SSc, the coiled-coil domain remains the dominant epitope in Ro52. In contrast to SjS and SLE, patients with SSc fail to recognize epitopic regions within the N-terminus of the protein, especially if they lack concomitant Ro60 reactivity.

The next step was to study the presence of possible antigen-specific anti-HCMV associations with anti-Ro52 antibodies. Viral agents, such as human cytomegalovirus (HCMV), have been suggested to be the trigger for the onset of SSc. We therefore evaluated the predominant anti-HCMV antibody responses in anti-Ro52 positive and anti-Ro52 negative SSc patients, comparing them with those of SLE and SjS patients.

The presence of antibodies against HCMV specific antigens pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44, p38 and pp28/UL99 was checked by immunoblotting. The main finding of this study was that patients with SSc and positive anti-Ro52 antibodies reacted more frequently against HCMV pp52/UL44 and p38 antigens compared to anti-Ro52(-), an association that was not detected in patients with SLE or SjS. Also, antibody titers against HCMV antigens pp65/UL83, pp52/UL44, and p38 were higher in anti-Ro52(+) than anti-Ro52(-) SSc patients. Therefore, antibody responses against specific HCMV antigens differ between anti-Ro52 positive and negative patients with SSc (as well as between SSc and SLE or SjS), but whether these differences are epiphenomenal remains to be determined.

Finally, an epitope mapping study of the B-cell epitopes of anti-Ro52 antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis (AIH) was performed. The epitope mapping study in anti-Ro52 positive pediatric patients with autoimmune hepatitis was performed using the same specific line immunoassay, mentioned above. The results of this study did not differ from the corresponding results from the epitope mapping study in adult patients with autoimmune diseases. However, the number of patients studied was small, and therefore it is important to perform similar experiments in the future in a larger number of pediatric patients with autoimmune diseases presenting with anti-Ro52 positive antibodies.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	12
ABSTRACT.....	15
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	17
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	20
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
1.1 Η ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	22
1.1.1 Εισαγωγή στη Συστηματική σκλήρυνση	22
1.1.2 Ταξινόμηση της Συστηματικής Σκλήρυνσης	24
1.1.3 Ορολογικές εξετάσεις σχετικές με τη συστηματική σκλήρυνση.....	28
1.1.4 Βιοδείκτες στη Συστηματική Σκλήρυνση.....	32
1.1.5 Παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης.....	34
1.1.6 Κλινικές εκδηλώσεις της συστηματικής σκλήρυνσης.....	45
1.1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	54
1.2 Το Ro52 (TRIM21) ΩΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟ.....	60
1.2.1 Η οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών.....	61
1.2.2 Η δομή του TRIM21/Ro52	61
1.2.3 Ο βιολογικός ρόλος του TRIM21/Ro52.....	67
1.2.4 TRIM21/Ro52 και το μονοπάτι των ιντερφερονών.....	71
1.2.5 Έλλειψη του TRIM21/Ro52 και αυτοάνοσα Β λεμφοκύτταρα	74
1.2.6 Αυτοαντισώματα έναντι του ενδοκυττάριου TRIM21/Ro52.....	76
1.2.7 Παραγωγή anti-TRIM21/Ro52 αντισωμάτων σε ασθενείς και ζωικά πειραματικά μοντέλα	79
1.2.8 Anti-TRIM21/Ro52 αυτοαντισώματα σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα	82
1.3 ANTI-RO52/TRIM21 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	100
1.3.1 Ο ρόλος της μοριακής μίμησης.....	100
1.3.1 Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) και αυτοάνοσα νοσήματα.....	102
1.3.2 Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) και anti-Ro αντισώματα.....	108
1.4 ΣΤΟΧΟΙ	109
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	110
2.1 ΥΛΙΚΑ	110
2.1.1 Πλαστικά και αναλώσιμα	110
2.1.2 Μηχανήματα και εργαλεία.....	111
2.1.3 Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες (kit)	112
2.1.4 Υλικά για την πραγματοποίηση in house ELISA	112
2.1.5 Πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση επιτόπων.....	113
2.1.6 Βιολογικό Υλικό.....	114
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	123
2.2.1 Ανοσοπροσροφητική δοκιμασία στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)	123
2.2.2 Μελέτη Χαρτογράφησης επιτόπων	123

2.2.3 In house ELISA έναντι των επιμέρους τμημάτων του Ro52.....	124
2.2.4 Έλεγχος αντισωμάτων έναντι του HCMV με τη χρήση της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western (Western blot)	129
2.2.5 Έλεγχος Αυτοαντισωμάτων.....	129
2.2.6 Στατιστική Ανάλυση	131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-RO60 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-RO52 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (SSC)	133
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	133
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	135
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	136
3.3.1 Συχνότητα αντιδραστικότητας του καθενός τμήματος του Ro52 σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου.....	136
3.3.2 Τίτλοι αντιδραστικότητας των αντισωμάτων έναντι τμημάτων του Ro52	142
3.3.3 Αναγνώριση επιτόπων του Ro52 σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ (διπλά θετικούς) και anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενείς.....	148
3.3.4 Συχνότητα αντιδραστικότητας του καθενός τμήματος του Ro52 σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου, με διαφορετικό όριο θετικότητας	156
3.3.5 Αναγνώριση επιτόπων του Ro52 σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ (διπλά θετικούς) και anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενείς.....	157
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	162
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΝΤΙ-RO52 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	166
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	166
4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	167
4.2.1 Υλικά.....	167
4.2.2 Μέθοδοι	167
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	168
4.3.1 Χορμική απάντηση έναντι αντιγόνων του HCMV σε anti-Ro52 θετικούς έναντι anti-Ro52 αρνητικούς ασθενείς	171
4.3.2 Χορμική απάντηση έναντι αντιγόνων του HCMV σε anti-Ro60 θετικούς έναντι anti-Ro60 αρνητικούς ασθενείς	172
4.3.3 Τίτλοι αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του HCMV.....	180
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	186
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-RO52 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ.....	190
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	190
5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	192
5.2.1 Υλικά.....	192
5.2.2 Μέθοδοι	192
5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	193
5.3.1 Συχνότητα αντιδραστικότητας του καθενός τμήματος του Ro52 σε παιδιατρικούς ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα	193
5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	196
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	198

Συντομογραφίες

AIH	autoimmune hepatitis, αυτοάνοση ηπατίτιδα
ANA	anti-nuclear antibodies, αντιπυρηνικά αντισώματα
APCs	antigen-presenting cells, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
ASS	antisynthetase syndrome, σύνδρομο αντισυνθετάσης
CENPA	centromeric protein A, κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη A
CENPB	centromeric protein B, κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη B
CRP	C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
DAMPs	danger-associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον κίνδυνο
dcSSc	diffuse cutaneous Systemic Sclerosis, διάχυτη δερματική σκλήρυνση
DLCO	diffusing capacity for carbon dioxide, δυνατότητα διάχυσης του μονοξειδίου του άνθρακα
DM	dermatomyositis, δερματομυοσίτιδα
EBV	Epstein-Barr virus, ιός Epstein-Barr
ECs	endothelial cells, ενδοθηλιακά κύτταρα
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ανοσοπροσροφητική δοκιμασία στερεάς φάσεως συνδεδεμένη με ένζυμο
FVC	Forced Vital Capacity, βίαιη ζωτική χωρητικότητα
GWAS	genome wide association studies, μελέτες συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος
HCMV	human cytomegalovirus, ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός
HRCT	high-resolution computed tomography, αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας
IBM	inclusion body myositis, μυοσίτιδα εγκλείστων σωματίων
IFNs	Interferons, Ιντερφερόνες
IgG	Immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη G
IgM	Immunoglobulin M, ανοσοσφαιρίνη M
IL	interleukine, ιντερλευκίνη
ILD	Interstitial Lung Disease, διάμεση πνευμονοπάθεια
IM	inflammatory myositis, φλεγμονώδης μυοσίτιδα
IRF	Interferon Regulatory Factor, ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης
lcSSc	limited cutaneous Systemic Sclerosis, περιορισμένη δερματική σκλήρυνση
LPS	lipopolysaccharides, λιποπολυσακχαρίδες
MAA	myositis associated autoantibody, σχετιζόμενο με μυοσίτιδες αυτοαντίσωμα
MCTD	Mixed connective tissue disease, μικτή νόσος του συνδετικού ιστού
mg	milligram, χιλιοστογραμμάριο
MHC	Major Histocompatibility Complex, Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας
ml	milliliter, χιλιοστόλιτρο

mRSS	modified Rodnan Skin Score, τροποποιημένο δερματικό σύστημα βαθμολόγησης του Rodnan
MSA	myositis specific autoantibody, ειδικό για μυοσίτιδες αυτοαντίσωμα
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLE	neonatal lupus erythematosus, νεογνικός ερυθηματώδης λύκος
Nt-proBNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
ORFs	open reading frames, ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνο
PBC	primary biliary cholangitis, πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells, μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος
PBS	phosphate buffer saline
pDCs	plasmotoid dendritic cells, πλασματοειδή δένδριτικά κύτταρα
PDGF-A	platelet-derived growth factor subunit A, αυξητικός παράγοντας A που προέρχεται από αιμοπετάλια
PFT	pulmonary function testing, έλεγχος πνευμονικής λειτουργίας
PM	polymyositis, πολυμυοσίτιδα
PRR	pattern recognition receptor, υποδοχέας αναγνώρισης επιφανειακών προτύπων ή ενδοσωμικών υποδοχέων
RA	Rheumatoid Arthritis, Ρευματοειδής αρθρίτιδα
RNApol	RNA polymerase, RNA πολυμεράση
RNP	ribonucleoprotein, ριβονουκλεοπρωτεΐνη
SjS	Sjögren Syndrome, Σύνδρομο Sjogren
SLA	soluble liver antigen, διαλυτό ηπατικό αντιγόνο
SLE	Systemic Lupus Erythematosus, Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
SNPs	single-nucleotide polymorphisms, πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου
SSc	Systemic Sclerosis, Συστηματική Σκλήρυνση
TGF-β	transforming growth factor β, τροποποιητικός αυξητικός παράγων βήτα
Th	T helper lymphocytes, T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα
TLRs	Toll-like receptors, υποδοχείς τύπου Toll
TNF	tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
μg	microgram, μικρογραμμάριο
μL	microliter, μικρόλιτρο
ΠΑΥ	πνευμονική αρτηριακή υπέρταση

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Η Συστηματική Σκλήρυνση

Η συστηματική σκλήρυνση (SSc, Systemic Sclerosis) επίσης γνωστή ως σκληρόδερμα, αποτελεί ένα σπάνιο και πολύπλοκο αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού [1]. Αν και κάποτε θεωρούνταν μια μη θεραπεύσιμη ασθένεια, η πρόοδος της έρευνας έχει βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου και των κλινικών εκδηλώσεών της και έχει επεκτείνει τις θεραπευτικές επιλογές [1]. Η πρόωπη και ακριβής διάγνωση της SSc είναι καίριας σημασίας, ενώ κεντρικό ρόλο παίζουν και οι συνεχείς προσπάθειες στρωματοποίησης του κινδύνου που διατρέχουν οι ασθενείς όσον αφορά στην προσβολή των διαφόρων οργάνων και στην πρόοδο της νόσου [1]. Όταν πρόκειται να αποφασιστεί η κατάλληλη θεραπεία είναι σημαντική η ολιστική προσέγγιση του ασθενούς, εξισορροπώντας μεταξύ της εμφάνισης των πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών και την αποτελεσματικότητα της κάθε θεραπείας, σύμφωνα πάντα με τα επιθυμητά αποτελέσματα-στόχους για τον κάθε ασθενή [1].

1.1.1 Εισαγωγή στη Συστηματική σκλήρυνση

Η SSc αποτελεί ασθένεια που ανήκει στα λεγόμενα «ορφανά νοσήματα» και χαρακτηρίζεται από μηχανισμούς αυτοανοσίας, ίνωση του δέρματος και των εσωτερικών οργάνων και αγγειοπάθεια. Αν και ο επιπολασμός της SSc είναι σχετικά χαμηλός, η επιβάρυνση από το νόσημα αυτό είναι σημαντική [2, 3]. Η SSc έχει την υψηλότερη θνητότητα μεταξύ όλων των αυτοάνοσων ρευματικών νοσημάτων [4, 5]. Η ετερογένεια στην κλινική εκδήλωση του συγκεκριμένου νοσήματος αποτελεί πρόκληση τόσο για τον ασθενή όσο και τον κλινικό ιατρό, ειδικά όσον αφορά στη

δυνατότητα πρόβλεψης της εμφάνισης σοβαρών επιπλοκών από την προσβολή εσωτερικών οργάνων. Οι κλινικοί ιατροί συχνά δυσκολεύονται να θέσουν με σαφήνεια τη διάγνωση της SSc στα πρώιμα στάδια αυτής. Η καθυστερημένη παραπομπή των ασθενών σε ειδικούς και εξειδικευμένα κέντρα και η έλλειψη βέλτιστης διεπιστημονικής περίθαλψης μπορούν να εμποδίσουν τη σωστή φροντίδα των ασθενών. Επιπλέον, ελλείπουν καθολικά αποδεκτές κατευθυντήριες οδηγίες κλινικής πρακτικής σχετικά με τη θεραπεία ορισμένων επιπλοκών μετά από προσβολή διαφόρων οργάνων, όπως του γαστρεντερικού και του καρδιαγγειακού συστήματος [6].

Οι ασθενείς με SSc αντιμετωπίζουν συχνά προβλήματα όσων αφορά την διαχείριση της νόσου τους, ενώ αρκετοί έχουν περιορισμένη προσβασιμότητα σε εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό και εγκαταστάσεις, ενώ πολλοί από αυτούς θα αναγκαστούν να εγκαταλείψουν την εργασία τους κάποια στιγμή στην εξέλιξη της νόσου [7, 8]. Συνεπώς, η εμφάνιση SSc μπορεί να επιφέρει δραματικές αλλαγές στην ποιότητα ζωής και το προσδόκιμο επιβίωσης των προσβεβλημένων ατόμων.

1.1.2 Ταξινόμηση της Συστηματικής Σκλήρυνσης

Από τις πιο πρώιμες κλινικές εκδηλώσεις της SSc αποτελούν το φαινόμενο Raynaud και το αίσθημα κόπωσης, οι οποίες είναι μη ειδικές για την SSc [9]. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την πρόβλεψη των ασθενών που παρουσιάζουν το φαινόμενο Raynaud και έχουν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση SSc στο μέλλον. Υπάρχουν δύο επικυρωμένες ομάδες κριτηρίων για την ανίχνευση αυτού του πρώιμου σταδίου ασθενών με SSc. Το 2001, οι LeRoy και Medsger [10] πρότειναν τα κριτήρια για την πρώιμη ανίχνευση ασθενών με SSc τα οποία περιλάμβαναν το φαινόμενο Raynaud, την παρουσία θετικών ειδικών για τη νόσο αυτοαντισωμάτων και την παρουσία διαταραχών στην τριχοειδοσκόπηση συμβατών με αυτών που συχνά ανευρίσκονται σε ασθενείς με SSc [10]. Μια πρόσφατη προοπτική μελέτη ανέδειξε ότι βέβαιη διάγνωση της SSc προέκυψε στο 65,9% των ασθενών στα 5 χρόνια και στο 72,7% των ασθενών στα 10 χρόνια παρακολούθησης αυτών, οι οποίοι είχαν σαν αρχική εκδήλωση το φαινόμενο Raynaud καθώς και κάποιο ειδικό για τη νόσο αυτοαντίσωμα και συμβατά με τη νόσο ευρήματα από την τριχοειδοσκόπηση [11-13]. Το 2011, προτάθηκαν νέα κριτήρια για την πρώιμη διάγνωση της SSc, τα οποία ήταν όμοια με αυτά των LeRoy και Medsger με μόνη διαφορά την προσθήκη σε αυτά των διογκωμένων δακτύλων (*“puffy fingers”*) [14].

Ο ρυθμός εμφάνισης της πλήρους νόσου της SSc ποικίλει ανάλογα με την υποκατηγορία της νόσου που θα εκδηλώσει ο κάθε ασθενής. Χαρακτηριστικά, οι ασθενείς με διάχυτη δερματική σκλήρυνση (diffuse cutaneous SSc, dcSSc) παρουσιάζουν το πρώτο ειδικό για τη νόσο σύμπτωμα (μετά την εμφάνιση του Raynaud) περίπου ένα με δύο έτη μετά την εμφάνιση του φαινομένου Raynaud, αν και μερικοί ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα μπορεί να εμφανίσουν τις πρώτες εκδηλώσεις της νόσου παράλληλα ή και λίγες εβδομάδες μετά την πρώτη εμφάνιση

του Raynaud's. Αντίθετα, ασθενείς με περιορισμένη δερματική σκλήρυνση (limited cutaneous SSc, lcSSc) παρουσιάζουν συνήθως την πρώτη ειδική για τη νόσο κλινική εκδήλωση 5 με 10 έτη μετά την πρώτη εμφάνιση του Raynaud's [15]. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων, αν και δεν είναι απόλυτη, μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη κατηγοριοποίηση των φαινοτύπων της νόσου και στη βελτίωση της εκτίμησης της πρόγνωσης. Κάθε υποκατηγορία της SSc παρουσιάζει διαφορετική φυσική ιστορία, βαρύτητα προσβολής ζωτικών οργάνων και θνητότητα [5, 16]. Αν και δεν υπάρχουν συγκεκριμένα διαγνωστικά κριτήρια, οι κλινικοί ιατροί συνήθως χρησιμοποιούν τα κριτήρια ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται για την κλινική έρευνα και τις κλινικές μελέτες κατηγοριοποίησης για τη διάγνωση της SSc [17], τα οποία συνήθως δεν είναι απαραίτητα για να τεθεί η διάγνωση της SSc. Πρέπει να τονιστεί ότι τα κριτήρια ταξινόμησης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά φαίνονται στον Πίνακα 1.1 [17].

Πίνακας 1.1. Κριτήρια ταξινόμησης της συστηματική σκλήρυνση σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ρευματολογίας (2013) [17]

Κριτήριο	Επεξήγηση	Βαθμός
Πάχυνση του δέρματος των δακτύλων και των δύο άκρων χειρών που εκτείνεται εγγύτερα των μετακαρποφαλαγγικών αρθρώσεων		9
(Επαρκές κριτήριο)	“Puffy fingers”	2
Πάχυνση του δέρματος των δακτύλων (Μετρήστε μόνο την υψηλότερη βαθμολογία)	Σκληροδακτυλία	4
Βλάβες των άκρων των δακτύλων (Μετρήστε μόνο την υψηλότερη βαθμολογία)	Έλκη των ακροδαχτύλων	2
	“Fingertip pitting scars”	3
Τηλαγγειεκτασίες		2
Αλλοιώσεις στην τριχοειδοσκόπηση		2
Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση, Διάμεση πνευμονοπάθεια ή και τα δύο		2
Φαινόμενο Raynaud		3
Σχετιζόμενα με την SSc αυτοαντισώματα (μέγιστη βαθμολογία το 3)	Αντικεντρομεριδικά Έναντι τοποϊσομεράσης I Έναντι RNA polymerase III	3

Αυτά τα κριτήρια ισχύουν για κάθε ασθενή που εξετάζεται για συμπερίληψη σε μελέτη συστηματικής σκλήρυνσης. Τα κριτήρια δεν ισχύουν για ασθενείς με πάχυνση του δέρματος χωρίς προσβολή των δακτύλων ή σε ασθενείς που έχουν μια διαταραχή που μοιάζει με σκληρόδερμα αλλά εξηγεί καλύτερα τις εκδηλώσεις τους (π.χ. νεφρογενής σκληρυντική ίνωση, γενικευμένο μορφέα, ηωσινοφιλική απονευρωσίτιδα, σκληρομυξοίδημα, σκληροίδημα, ερυθρομυαλγία, πορφυρία, σκληρυντικός λειχήνας, νόσος αντίδρασης μοσχεύματος έναντι ξενιστή, διαβητική χειροαρθροπάθεια).

Η συνολική βαθμολογία προσδιορίζεται προσθέτοντας το μέγιστο βαθμό σε κάθε κατηγορία. Οι ασθενείς με συνολική βαθμολογία ≥ 9 ταξινομούνται ως πάσχοντες από συστηματική σκλήρυνση.

1.1.3 Ορολογικές εξετάσεις σχετικές με τη συστηματική σκλήρυνση

Στο 95% των ασθενών με SSc ανευρίσκονται θετικά αντιπυρηνικά αντισώματα (anti-nuclear antibodies, ANA) με τη μέθοδο το έμμεσου ανοσοφθορισμού, ενώ πιο ειδικά για την SSc αυτοαντισώματα ανευρίσκονται στις επιμέρους υποκατηγορίες της νόσου και είναι χρήσιμα όσον αφορά στην πρόγνωση και στην εκτίμηση του κινδύνου προσβολής συγκεκριμένων οργάνων-στόχων της νόσου (Πίνακας 1.2) [18-21]. Μια ομάδα ασθενών μπορεί να παρουσιάζει θετικά ANA, χωρίς ωστόσο να ανευρίσκονται στον ορό νοσοειδικά αυτοαντισώματα. Οι ασθενείς αυτοί μπορεί να εκδηλώσουν ταχέως εξελισσόμενη νόσο και να έχουν ένα σχετικά υψηλό ποσοστό θνητότητας [22]. Οι ασθενείς με SSc μπορεί να παρουσιάζουν συνυπάρχοντα συμπτώματα αλληλεπικαλυπτόμενα με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως το σύνδρομο Sjögren, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η μυοσίτιδα και η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα. Αν και τα λεγόμενα σύνδρομα επικάλυψης παραμένουν μερικώς χαρακτηρισμένα από κλινικής απόψεως, η διεύρυνση του ανοσολογικού ελέγχου πέραν των ειδικών για τη SSc αυτοαντισωμάτων είναι απαραίτητη όταν συνυπάρχουν συμπτώματα και άλλου αυτοάνοσου νοσήματος.

Πίνακας 1.2. Αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, η κλινική σημασία και η συχνότητά τους [20, 21]

Αντιγόνο στόχος	Σχόλια	Συχνότητα[21]	Συχνότητα στην Κεντρική Ελλάδα[20]
Scl-70 (topo I)	Διαγνωστικό κριτήριο, σχετίζεται με την dcSSc	20-30%	40,5%
Πρωτεΐνες του κεντρομεριδίου	Διαγνωστικό κριτήριο, σχετίζεται με την lcSSc	20-40%	32,9%
Ro52/TRIM21	Μη ειδικό για την SSc, αλλά κλινικά σημαντικό. Έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διάμεσης πνευμονοπάθειας	15-25%	21,5%
RNA Pol III	Διαγνωστικό κριτήριο, σχετίζεται με την εμφάνιση νεφρικής κρίσης και κακοήθειας	10-20%	13,9%
U1-RNP	Κλινικά χρήσιμο. Διαγνωστικό κριτήριο για την μικτή νόσο του συνδετικού ιστού	5–15%	Δ/Α
PM/Scl	Μη ειδικό αλλά χρήσιμο για την SSc, καθώς σχετίζεται με το σύνδρομο επικάλυψης με μυοσίτιδα	5–10%	4,4%

Th/To	Υψηλή ειδικότητα για την SSc, σχετίζεται με παρουσία διάμεσης πνευμονοπάθειας	3–10%	1,3%
U3/RNP Fibrillarin	Ισχυρή συσχέτιση με την εθνικότητα (π.χ. Αφρο-αμερικανοί). Δεν υπάρχει ευρέως διαθέσιμη αξιόπιστη ανοσοδοκιμασία	3–20%	1,3%
NOR90/hUBF	Η κλινική χρησιμότητα δεν έχει αποδειχθεί	<5%	4,4%
Ku	Μη ειδικό για την SSc, αλλά κλινικά χρήσιμο – σχετίζεται με παρουσία συνδρόμου επικάλυψης	3–10%	3,8%
RuvBL1/2	Μη ειδικό για την SSc, δυνητικά χρήσιμο (απαιτούνται περισσότερες μελέτες), σχετίζεται με σύνδρομο επικάλυψης SSc/μυοσίτιδας	1–3%	Δ/Α
RNPC-3 (U11/U12)	Υψηλή ειδικότητα για την SSc, σπάνια χρησιμοποιείται	3–5%	Δ/Α
PDGFR	Η κλινική χρησιμότητα δεν έχει αποδειχθεί	<1%	0

hUBF=human upstream binding factor; NOR = nucleolar organizer; PDGFR = Platelet-Derived Growth Factor receptor, RNAP = RNA polymerase; RNP =

ribonucleoprotein; SSc = systemic sclerosis; topo = topoisomerase; TRIM = tripartite motif; U, uridine rich.

1.1.4 Βιοδείκτες στη Συστηματική Σκλήρυνση

Αρκετοί υποψήφιοι βιοδείκτες έχουν κατά καιρούς μελετηθεί για την SSc, από τους οποίους ορισμένοι μόνο είναι διαθέσιμοι και εφικτό να μετρηθούν στην καθημέρα κλινική πρακτική. Μεταξύ αυτών, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP, C-reactive protein) η οποία όταν ανευρίσκεται αυξημένη σε ορισμένους ασθενείς με SSc μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο παρουσίας προϊούσας ίνωσης, πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και θνησιμότητας [23-25]. Η αύξηση της CRP μεσολαβεί από την ιντερλευκίνη-6 (IL-6, interleukine-6), και οι τιμές της IL-6 στον ορό συσχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με διάμεση πνευμονική νόσο [26]. Η CRP και η IL-6 έχουν χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτες σε αρκετές μελέτες προκειμένου να κατηγοριοποιηθούν οι συμμετέχοντες ασθενείς, συνεπώς είναι και χρήσιμοι δείκτες στην κλινική πρακτική, αν και η IL-6 δεν χρησιμοποιείται στην πρακτική [27]. Οι βιοδείκτες γλυκοπρωτεΐνη-6 του Krebs von den Lungen και ο συνδέτης χημειοκινών 18, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την πρόγνωση της βαρύτητας και της εξέλιξης της διάμεσης πνευμονοπάθειας [28, 29]. Παροδική αύξηση των τιμών αυτών των δεικτών ή επίμονα αυξημένη τιμή αυτών παρά τη χορήγηση της ενδεδειγμένης θεραπείας, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής εναλλακτικής στο μέλλον.

Το Nt-proBNP (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide) αποτελεί χρήσιμο βιοδείκτη για την πρώιμη ανίχνευση παρουσίας πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα χαρακτηριστικά της νόσου, ώστε να γίνει η καταλληλότερη επιλογή των υποψήφιων ασθενών για καθετηριασμό της δεξιάς κοιλίας [30].

Η αλληλούχιση του RNA φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο όσον αφορά τη μελλοντική έρευνα στην SSc, με δυνατότητα ανακάλυψης νέων βιοδεικτών,

τον καλύτερο χαρακτηρισμό των υποκατηγοριών της SSc και την εξατομικευμένη
θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών αυτών.

1.1.5 Παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης

1.1.5.1 Ο ρόλος της έμφυτης ανοσίας

Η έμφυτη ανοσία παραμένει στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, προστατεύοντάς τον από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η έμφυτη ανοσία είναι, ωστόσο, επιφορτισμένη με τη διεργασία της αναγνώρισης αντιγόνων και στη συνέχεια σε συνεργασία με την προσαρμοστική ανοσία, είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία μιας επαρκούς ανοσολογικής απόκρισης. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η SSc αναγνωρίστηκε ως ασθένεια με μειωμένη προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση. Πρόσφατες εξελίξεις στην κατανόηση του παθοφυσιολογικού υποβάθρου των διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων τόνισαν τον ρόλο της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας ως μεσολαβητή για τη δημιουργία της ίνωσης, την ενεργοποίηση της οδού των ιντερφερονών, της σύνθεσης αυτοαντισωμάτων, την παραγωγή κυτοκινών, και της ανοσολογικής απόκρισης των B- και T-κυττάρων [31]. Το πρώτο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι η ενεργοποίηση μιας ομάδας ειδικών υποδοχέων αναγνώρισης επιφανειακών προτύπων ή ενδοσωμικών υποδοχέων (pattern recognition receptor, PRR) που είναι σε θέση να αναγνωρίσουν διατηρημένες μοριακές δομές σε μικρόβια, οι οποίες ονομάζονται μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνο (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [32]. Οι παραπάνω υποδοχείς μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν πολλά αυτοαντιγόνα και μόρια που ονομάζονται μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον κίνδυνο (danger-associated molecular patterns, DAMPs), τα οποία παράγονται εκτεταμένα σε διεργασίες όπως η φλεγμονή, η ιστική νέκρωση, η απόπτωση, το τραύμα και ο κυτταρικός τραυματισμός. Οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll like receptors, TLRs) είναι μια ομάδα PRR που έχουν σχεδιαστεί για να αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροβίων ή μοτίβα των DAMPs. Αν και ο ρόλος της έμφυτης ανοσίας στην SSc είναι μόνο εν μέρει κατανοητός, υπάρχουν αυξανόμενες

ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της ενεργοποίησης των TLRs σχετίζεται στενά με κάποια λοιμώδη διεργασία ή εξαρτάται από την ενεργοποίηση αυτού μέσω των DAMPs [33, 34]. Πρόσφατα, υπογραμμίστηκε ο ρόλος του ιού Epstein-Barr (EBV) στην πυροδότηση της ανοσολογικής απόκρισης. Ο EBV είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του TLR9 που είναι σε θέση να αναγνωρίζει μη μεθυλιωμένο ιικό γονιδίωμα του EBV [35]. Επιπλέον, οι ασθενείς με SSc εμφάνισαν παθολογική αντισωματική απόκριση έναντι των λυτικών αντιγόνων του EBV, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λυτικού mRNA και πρωτεϊνών στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) και στο δέρμα [36]. Ορολογικά δεδομένα σε ασθενείς με SSc υπογραμμίζουν τον πιθανό ρόλο άλλων λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένων αυτών από το *Toxoplasma gondii*, τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV), τον παρβοϊό B19 κ.α.. [37-39]. Σημαντικό επίσης ρόλο στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παίζουν και οι DAMPs—ενδογενείς συνδέτες των TLRs που απελευθερώνονται από τραυματισμένους ιστούς, νεκρωτικά ή αποπτωτικά κύτταρα ή δημιουργούνται από ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη και συνεπώς επάγουν τη σηματοδότηση μέσω των TLRs για να προκαλέσουν φλεγμονή και άμεση ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού [40]. Μεταξύ των διαφορετικών TLRs που έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο μέχρι στιγμής, ο TLR4 φαίνεται να παίζει έναν ιδιαίτερο ρόλο στους μηχανισμούς της αυτοανοσίας. Ο TLR4 αναγνωρίστηκε αρχικά ως υποδοχέας για τις βακτηριακές λιποπολυσακχαρίδες (lipopolysaccharides, LPS) και εμπλέκεται άμεσα στην αναγνώριση των DAMPs που απελευθερώνονται από τραυματισμένους ιστούς σε ασθενείς με SSc. Οι ενδογενείς συνδέτες για τον TLR4 περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP22, HSP60, HSP70, HSP72 και GP96, την ινοδονεκτίνη, τενασκίνη, πλαίσιο ομάδας 1 υψηλής κινητικότητας (HMGB1), το υαλουρονικό οξύ χαμηλού

μοριακού βάρους (LMWHA) και άλλα. Πολλοί συνδέτες των TLRs έχουν ταυτοποιηθεί στη SSc, και χαρακτηρίζονται τόσο από ενδογενή όσο και από μικροβιακή προέλευση. Έχει προταθεί ότι ορισμένα DAMPs απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells, ECs) ως αποτέλεσμα πρωτογενούς τραυματισμού, διεργασία που αποτελεί το κύριο ερέθισμα για την πρόκληση φλεγμονής και στη συνέχεια επούλωση των τραυματισμένων ιστών με αποτέλεσμα την ίνωση που χαρακτηρίζει τελικά την SSc [41-43]. Προφανώς η αλληλεπίδραση με τους TLRs είναι μόνο το πρώτο βήμα για τη δημιουργία μιας ανοσολογικής απόκρισης. Τα ακόλουθα σήματα ενεργοποίησης από τους TLRs μπορούν να μεταδοθούν μέσω δύο ξεχωριστών οδών—την εξαρτώμενη από τον παράγοντα διαφοροποίησης μυελοειδούς 88 (MyD88) ή την ανεξάρτητη από το MyD88 οδό. Η ενεργοποίηση και των δύο οδών έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης-1 που ενεργοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής (AP-1). Το AP-1 και ο NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NFκB) που συνεργάζονται ενεργοποιούν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και συνδιεγερτικών μορίων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Η δεύτερη οδός είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των ιντερφερονών και την καθυστερημένη σύνθεση των κυτοκινών [31]. Η έμφυτη ανοσολογική απόκριση φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην παθογένεση της SSc, με την ενεργοποίηση των TLRs να παίζει κεντρικό ρόλο. Υπάρχει ακόμη ένα ανοιχτό ερώτημα εάν υπάρχει συσχέτιση που λείπει μεταξύ της ανοσοαπόκρισης του ενδοθηλιακού τραυματισμού και της ίνωσης.

1.1.5.2 Ο ρόλος των Ιντερφερονών (Interferons, IFNs)

Η ρύθμιση της σύνθεσης ιντερφερονών τύπου I εξαρτάται από τη μεσολαβούμενη από TLRs σηματοδότηση και συνδέεται στενά με την έμφυτη ανοσολογική απόκριση [44, 45]. Πρόσφατα, πολλά δεδομένα έχουν συλλεχθεί που υποδηλώνουν ότι όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (systemic lupus erythematosus, SLE), στην SSc οι ιντερφερόνες μπορεί να διαδραματίσουν έναν ρόλο δημιουργώντας μια σύνδεση μεταξύ τραυματισμένου ιστού και μη αποδοτικής ιστικής επούλωσης με αποτέλεσμα τη μαζική και ανεξέλεγκτη ίνωση [46, 47]. Η ενεργοποίηση της οδού των IFNs στη SSc επιφέρει πολλές παθοφυσιολογικές συνέπειες. Πρώτον, οι IFNs είναι υπεύθυνες για την ενίσχυση της έκφρασης των TLRs. Δεύτερον, οι IFNs συμβάλλουν στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων που με τη σειρά τους αυξάνουν την αναγνώριση των αντιγόνων και ακολούθως την παρουσίασή τους στα T λεμφοκύτταρα. Οι IFNs είναι ισχυροί αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες, επομένως σε περιπτώσεις υπερπαραγωγής IFNs η αγγειογένεση είτε διακόπτεται είτε τουλάχιστον εξασθενεί όπως παρατηρείται ότι συμβαίνει στη SSc. Ο CXCL4 που παράγεται από τα πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs) σχηματίζει σύμπλεγμα με DNA/RNA και προκαλεί στα pDCs την παραγωγή IFN α [48]. Οι βιολογικές δραστηριότητες των IFNs συνδέονται με την ενεργοποίηση αρκετών πρωτεϊνών με τον NF κ B να αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς. Ο NF κ B είναι ένας ισχυρός προ-ινωτικός παράγοντας που σε συνεργασία με τον αυξητικό παράγοντα του συνδετικού ιστού, δημιουργεί ένα ισχυρό περιβάλλον που προάγει την ίνωση (το οποίο συχνά αναφέρεται ως προ-ινωτικό) [49]. Η σηματοδότηση γίνεται μέσω επαυξημένης προϊνωτικής δραστηριότητας του TGF- β που υποβοηθείται από τον NF κ B μέσω αναστολής της έκφρασης του ψευδοϋποδοχέα του TGF- β , BAMBI (μορφογενετική πρωτεΐνη οστών και αναστολέας δεσμευμένου στη μεμβράνη ακτιβίνης), και

δημιουργεί μια σύνδεση μεταξύ της σηματοδότησης και της δραστηριότητας του TGF- β [49]. Από την άλλη πλευρά, ο NF κ B παίζει τον βασικό ρόλο ως κύριος ρυθμιστής των ανοσολογικών αποκρίσεων, ενώ τα συστατικά του NF κ B αλληλοεπιδρούν με διάφορα κύτταρα που ρυθμίζουν την κεντρική και περιφερική ανοσοανοχή [50]. Η δραστηριότητα του NF κ B είναι υπεύθυνη για διαδικασίες όπως η σύνθεση κυτοκινών (όπως ο TNF, η IL-1 και IL-6) και η θετική ρύθμιση των μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, προάγοντας τη μετανάστευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού στους ιστούς.

1.1.5.3 Ο ρόλος των Κυτταροκινών

Η οικογένεια της ιντερλευκίνης 1 (IL-1) παρουσιάζει την τυπική προφλεγμονώδη και προϋνωτική δραστηριότητα που εμπλέκεται στη μη ειδική – έμφυτη ανοσολογική απόκριση κατά των λοιμώξεων. Ο ρόλος των κυτταροκινών της οικογένειας της IL-1, ιδιαίτερα της IL-1 και του υποδοχέα της, έχει εξεταστεί από πολλές μελέτες [51]. Υπάρχουν άμεσοι δεσμοί μεταξύ των εκφράσεων της IL-1α και της IL-1β σε ινοβλάστες ατόμων με SSc και η μη φυσιολογική έκφρασή τους μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία της ίνωσης που χαρακτηρίζει τους ασθενείς αυτούς. Η IL-1α είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της IL-6 και του αυξητικού παράγοντα Α που προέρχεται από αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor subunit A, PDGF-A), οι οποίοι είναι ισχυροί διεγέρτες της παραγωγής και του πολλαπλασιασμού του κολλαγόνου σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, και οι οποίοι με τη σειρά τους μπορούν να ανασταλούν μέσω της αναστολής της ενδογενούς IL-1α [52].

Από την ανακάλυψή της και έπειτα, το δεύτερο μέλος της οικογένειας της IL-1, η IL-33 έχει προσελκύσει ιδιαίτερα την προσοχή των ερευνητών και πολλές μελέτες για το ρόλο αυτής της ιντερλευκίνης έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής. Η συγκέντρωση της IL-33 μειώνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στην επιδερμίδα σε βιοψίες δέρματος από ασθενείς με SSc. Από την άλλη πλευρά, παρατηρείται υπερέκφραση του ST2 (ο υποδοχέας της IL-33) σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μαστοκύτταρα, μακροφάγα, Τ κύτταρα, Β κύτταρα και ινοβλάστες/μυοϊνοβλάστες [53]. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να απελευθερώσουν υψηλές ποσότητες IL-33 που μπορεί να εξηγήσουν τη σχετικά χαμηλή συγκέντρωση της IL-33 στα κύτταρα αυτά [53]. Η IL-33 μπορεί να επάγει ισχυρά προϋνωτικά και προφλεγμονώδη σήματα μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον υποδοχέα της ST2 σε σημαντικά προϋνωτικά κύτταρα, όπως τα φλεγμονώδη κύτταρα και οι ινοβλάστες/μυοϊνοβλάστες [53]. Επιπλέον, η IL-

33 του ορού ήταν σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με SSc και συσχετίστηκε με πρώιμο στάδιο της νόσου και πρώιμες τριχοειδικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, μια μελέτη από τη Γερμανία δεν αποκάλυψε καμία συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της IL-33 στον ορό, του τύπου της SSc, τη δραστηριότητα της νόσου που μετρήθηκε με τη χρήση του Rodnan σκορ, της νεφρικής ανεπάρκειας, της γαστροοισοφαγικής συμμετοχής και της θεραπείας που χορηγήθηκε. Εντούτοις, βρέθηκε σημαντική σχέση μεταξύ της IL-33 και των αγγειακών βλαβών—δακτυλικών ελκών που μπορεί να υποδεικνύουν μια περισσότερο αγγειακή παρά συστηματική δράση της IL-33 στη SSc [54].

Λιγότερα είναι γνωστά για τον ρόλο της τρίτης κύριας ιντερλευκίνης από την οικογένεια της IL-1, της IL-18. Τα επίπεδα της IL-18 στον ορό ανευρίσκονται συχνά αυξημένα σε ασθενείς με SSc και συσχετίζονται ισχυρά με τα κλινικά στάδια της νόσου και την παρουσία θετικών ANA [55]. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι στην πραγματικότητα η IL-18 μπορεί να ασκεί αντι-ινωτική δραστηριότητα, καθώς μειώνει τη σύνθεση κολλαγόνου σε ινοβλάστες του δέρματος ασθενών με SSc [56]. Η πιθανή εξήγηση αυτών των αντιφατικών αποτελεσμάτων είναι ο ρόλος της ισομορφής της πρωτεΐνης που δεσμεύει την IL-18 (IL-18BPa), ενός διαλυτού υποδοχέα της IL-18 που μπορεί να ρυθμίζει τη βιολογική δραστηριότητα της IL-18, οδηγώντας στην εμφάνιση προ- ή αντι-ινωτικής δράσης [57]. Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι τα επίπεδα της IL-18BPa στον ορό συσχετίζονται θετικά με αγγειακές ανωμαλίες και φλεγμονώδη κατάσταση, αλλά όχι με συμπτώματα δερματικής και οργανοειδικής προσβολής σε ασθενείς με SSc [58].

1.1.5.4 Η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η Ιντερλευκίνη 17 (IL-17)

Η IL-6 είναι μια τυπική προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που απελευθερώνεται από μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων και ο ρόλος της στην ανάπτυξη πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων έχει τονιστεί σε πολλές μελέτες [59, 60]. Οι ασθενείς με SSc εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της IL-6 σε ινοβλάστες, μονοκύτταρα, περιλαμβανομένων Β λεμφοκυττάρων, και ενδοθηλιακά κύτταρα. Ορισμένες μελέτες συνδέουν τα επίπεδα της IL-6 στον ορό με την έκταση της προσβολής του δέρματος, η οποία μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης ενεργότητας της νόσου και ως προγνωστικός παράγοντας [61, 62]. Ως πλειοτροπική κυτταροκίνη, η IL-6 επηρεάζει βασικά στάδια της ανοσολογικής απόκρισης που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ανοσορύθμιση, η διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός των Β λεμφοκυττάρων, η αγγειογένεση και ο σχηματισμός οστεοκλαστών. Αν και οι ινοβλάστες ασθενών με διάχυτη SSc εκφράζουν χαμηλά επίπεδα υποδοχέα IL-6 στην επιφάνειά τους, η αύξηση της σύνθεσης ινωδογόνου μπορεί να μεσολαβεί από το λεγόμενο *trans-signaling* που αναφέρεται σε κύτταρα που κανονικά δεν εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-6, IL-6R [63]. Μετά την αλληλεπίδραση με τον IL-6R, η σηματοδότηση λαμβάνει χώρα με την ενεργοποίηση των *Janus* κινασών (JAK) και επακόλουθη ενεργοποίηση των μετατροπών σήματος και των ενεργοποιητών της μεταγραφής 1 και 3 (STATs1/3), του RAS/Raf/MAPK μονοπατιού και επίσης των οδών κίνησης PI-3 που μπορεί να ρυθμίζουν τέτοιες παθοφυσιολογικές διεργασίες όπως η διασταυρούμενη ωρίμανση ανοσοεπαρκών κυττάρων και η ίνωση [64].

Αυτό το παθοφυσιολογικό εύρημα καθιστά την IL-6 ως έναν ενδιαφέροντα στόχο για θεραπευτικούς χειρισμούς. Πράγματι, κλινικά δεδομένα της χρήσης της τοσιλιζουμάμπης έδειξαν βελτίωση στην έκβαση των ασθενών καθώς και βελτίωση

όσων αφορά στη σχετιζόμενη με την SSc αρθρίτιδα και στη βαθμολογία που αφορά στην προσβολή των αρθρώσεων και λιγότερο του δέρματος [65-67].

Η IL-17 είναι μια οικογένεια κυτοκινών (IL-17A-F), από τις οποίες η περισσότερη μελετημένη είναι η IL-17A. Ο παθοφυσιολογικός ρόλος της IL-17 είναι η προστασία έναντι εξωκυττάρων βακτηρίων στις θέσεις εισβολών αυτών στον οργανισμό και φλεγμονώδης απόκριση σε εξαρτώμενα από την IL-17 κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Πολλές μελέτες, αλλά όχι όλες, επιβεβαίωσαν την αύξηση των επιπέδων IL-17 στους ορούς ασθενών με SSc και παρουσίασαν μια σύνδεση μεταξύ των επιπέδων της κυτταροκίνης αυτής και των κλινικών χαρακτηριστικών όπως η πάχυνση του δέρματος, η δραστηριότητα της νόσου και η πνευμονική ίνωση [68, 69]. Ωστόσο άλλη μελέτη σε ανθρώπους έδειξε ότι η IL-17 άσκησε αντι-ινωτική δραστηριότητα και συσχετίστηκε αρνητικά με το mRSS, αλλά όχι με τη δραστηριότητα της νόσου (Valentini score) [70].

1.1.5.5 Th1/Th2 κυτοκίνες

Ο ρόλος των Th1/Th2 αποκρίσεων αναφέρεται στη λογική ότι τα Th1 κύτταρα που εκκρίνουν IFN- γ , TNF- α και IL-2 αναγνωρίζονται ως κυρίως προφλεγμονώδη κύτταρα και εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση. Η πόλωση των Th κυττάρων προς την Th2 διαφοροποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όχι μόνο των IL-4, IL-10 και IL-13 αλλά και της IL-6 (με ισχυρή πλειοτροπική δράση). Παλιές in vitro και in vivo μελέτες σε ποντίκια έδειξαν αντι-ινωτικό ρόλο της IFN γ . Η Th1 ανοσιακή απόκριση μπορεί να παίζει ρόλο στην πρώιμη φάση της νόσου (φλεγμονή) ακολουθούμενη από την Th2 απόκριση που έχει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση ίνωσης, την επούλωση ιστικής βλάβης και την ενεργοποίηση της χυμικής ανοσιακής απόκρισης [71].

1.1.5.6 Ο ρόλος των B-κυττάρων

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες υπογράμμισαν τον ρόλο των B κυττάρων στην παθογένεση της SSc [72-75]. Η στροφή των μελετών προς αυτή την κατεύθυνση δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς η σύνθεση αυτοαντισωμάτων παρατηρείται σχεδόν στο 90% των ασθενών με SSc. Από την άλλη πλευρά, τα B κύτταρα μπορούν να προάγουν την ίνωση με κυτταροκίνες, αυτοαντισώματα, και άμεση επαφή κυττάρου με κύτταρο ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [74]. Διηθήσεις B-λεμφοκυττάρων στο προσβεβλημένο δέρμα παρατηρούνται συνήθως στη SSc. Μπορούν επίσης να δράσουν με παρακρινικό τρόπο απελευθερώνοντας προϊνωτικές κυτοκίνες στους περιβάλλοντες ιστούς, προάγοντας έτσι την ίνωση [76]. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι τα B κύτταρα στη SSc είναι υπερενεργοποιημένα. Υπερεκφράζουν το μόριο CD19, έναν κρίσιμο ρυθμιστή της ενεργοποίησης των B-κυττάρων. Δεδομένα από μελέτες κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι η επιφανειακή πυκνότητα των B-κυττάρων σε CD19 είναι υψηλότερη σε ασθενείς με SSc κατά 20%

από ότι σε υγιή άτομα [77]. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η υπερέκφραση CD19 μειώνει την περιφερική ανοσοανοχή στα Β κύτταρα και διευκολύνει τη σύνθεση αυτοαντισωμάτων και την αυτοανοσία, είναι μάλλον σαφές το γιατί οι ασθενείς με SSc αναπτύσσουν αυτοανοσία, με την υπερπαραγωγή αυτοαντισωμάτων να είναι χαρακτηριστικό της νόσου. Υπάρχουν ανασταλτικά μόρια, τα CD22 και CD35 που εκφράζονται στην επιφάνεια των Β κυττάρων και εξουδετερώνουν τη διέγερση που προκαλείται μέσω των CD19 και CD21 αλλά στη SSc η λειτουργία και των δύο αυτών μορίων φαίνεται να είναι εξασθενημένη [78]. Οι Odaka et al. πρότειναν έναν λειτουργικό ρόλο των αντισωμάτων κατά του CD22 ως αρνητικού ρυθμιστή της δραστηριότητας του CD22 με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της ανασταλτικής τους λειτουργίας [79]. Η ανασταλτική δραστηριότητα του αντι-CD22 μπορεί να υπερισχύει πιθανών λειτουργικών ανωμαλιών στη δομή/λειτουργία των CD22, CD35, καθώς και να αντανakλά ενδοκυτταρικές ανωμαλίες των ενδοκυτταρικών οδών που σηματοδοτούνται από υποδοχείς Β-κυττάρων [80, 81].

1.1.6 Κλινικές εκδηλώσεις της συστηματικής σκλήρυνσης

Είναι σημαντικό να γίνεται τακτικός προσυμπτωματικός έλεγχος προσβολής των οργάνων σε ασθενείς με SSc τόσο κατά την έναρξη της νόσου όσο και στην πορεία αυτής στο χρόνο.

1.1.6.1 Συμμετογή του δέρματος στη συστηματική σκλήρυνση

Παρατηρείται ευρεία ετερογένεια όσον αφορά στην έκταση της δερματικής προσβολής τόσο μεταξύ των διαφορετικών ασθενών με SSc όσο και στον κάθε ασθενή ξεχωριστά σε βάθος χρόνου [14]. Η δερματική ίνωση στη SSc ξεκινά από τα άκρα των δακτύλων των χεριών και των ποδιών και επεκτείνεται εγγύτερα. Στα αρχικά στάδια της νόσου τα δάκτυλα των χεριών παρουσιάζονται διογκωμένα (“*puffy fingers*”) ως αποτέλεσμα μικροαγγειακών αλλαγών και φλεγμονής. Με τον καιρό η εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου έχει σαν αποτέλεσμα την πάχυνση του δέρματος, τον περιορισμό της κινητικότητας των υποκείμενων αρθρώσεων των δακτύλων και τελικά τη δημιουργία συγκάμψεων μικρών και μεγάλων αρθρώσεων σε ορισμένους ασθενείς. Με την περαιτέρω πρόοδο της νόσου το δέρμα των ασθενών αυτών μπορεί να γίνει σκληρό/σφιχτό και σε μερικές περιπτώσεις ατροφικό.

Το τροποποιημένο δερματικό σύστημα βαθμολόγησης του Rodnan (modified Rodnan Skin Score, mRSS) αποτελεί έναν τρόπο αξιολόγησης από τον θεράποντα ιατρό του βαθμού της δερματικής ίνωσης με την πάροδο του χρόνου. Αν και αυτό το σύστημα βαθμολόγησης έχει αποδεκτή αξιοπιστία όσον αφορά τους ασθενείς με διάχυτη σκληροδερμία, δεν μπορεί να διαφοροποιήσει τα αρχικά στάδια του ινωτικού δέρματος από την περισσότερο προχωρημένη ίνωση [82].

Υπάρχουν αρκετά εναλλακτικά συστήματα αξιολόγησης της ίνωσης του δέρματος σε ασθενείς με SSc, συμπεριλαμβανομένων των υπερηχογραφικών τεχνικών και της

σκληρομετρίας [83-86]. Η ελαστογραφία οπτικής συνοχής σε συνδυασμό με την τομογραφία οπτικής συνοχής αποτελεί ένα ακόμα πολλά υποσχόμενο εργαλείο το οποίο χρειάζεται περαιτέρω μελέτη της εφαρμογής του στη SSc [87]. Επιπλέον, η αυτο-αξιολόγηση από τους ίδιους τους ασθενείς της πάχυνσης του δέρματός τους έχει λάβει σημαντική θέση στην παρακολούθηση των ασθενών με SSc κατά τη διάρκεια της COVID-19 πανδημίας [88]. Με αυτό τον τρόπο ενθαρρύνονται οι ασθενείς να παρακολουθούν από μόνοι τους την πορεία της νόσου τους, με τέτοιο τρόπο ώστε να αναζητούν ιατρική βοήθεια νωρίτερα από τον προγραμματισμένο επανέλεγχο, όταν οι ίδιοι αντιλαμβάνονται ότι υπάρχει εξέλιξη της νόσου [89]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ένα πολύ μικρό ποσοστό των ασθενών με SSc (<5%) μπορεί να μην έχουν εμφανώς κλινικά ανιχνεύσιμη δερματική ίνωση. Οι ασθενείς αυτοί ταξινομούνται ως μια υποκατηγορία της SSc γνωστή ως *sine scleroderma* [90].

Στις δερματικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται τα δακτυλικά έλκη και οι ασβεστώσεις δέρματος.

- Δακτυλικά έλκη

Τα δακτυλικά έλκη απαντούν στο 50-70% ασθενών με SSc. Οφείλονται κυρίως σε μικροαγγειοπάθεια, μολονότι μικροτραύματα και σκλήρυνση του δέρματος συμβάλλουν. Τα δακτυλικά έλκη προκαλούν πόνο, λειτουργική έκπτωση χεριών και οδηγούν σε λοιμώξεις και γάγγραινα [91].

- Ασβεστώσεις δέρματος

Αυτή η εκδήλωση είναι αρκετά συχνή (25% των ασθενών) και μπορεί να επεκταθεί τόσο σε εν τω βάθει ιστούς όσο και προς την επιφάνεια του δέρματος προκαλώντας τη δημιουργία δερματικών ελκών, και επιμολύνσεις. Οι ασβεστώσεις είναι δυσίατες, συχνά επώδυνες, και μπορεί να είναι εκτεταμένες προκαλώντας μεγάλο περιορισμό της λειτουργικότητας και καθημερινότητας των ασθενών [89].

1.1.6.2 Πνευμονική συμμετοχή

Περίπου 50-65% των ασθενών με SSc θα παρουσιάσουν ευρήματα διάμεσης πνευμονικής νόσου στην αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (high-resolution computed tomography, HRCT) [92]. Από τους ασθενείς με SSc και διάμεση πνευμονοπάθεια, μερικοί μπορεί να εμφανίσουν σταθερή πορεία, ενώ άλλοι μπορεί να παρουσιάσουν προοδευτική επιδείνωση της νόσου σε άλλοτε διαφορετικούς ρυθμούς [93]. Επί του παρόντος η διάμεση πνευμονοπάθεια και η εξέλιξή της αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου σε ασθενείς με SSc [93-95]. Μελέτες παρατήρησης περιγράφουν πως ασθενείς με SSc που παρουσιάζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως ανδρικό φύλο, Αφρο-Αμερικανοί και θετικότητα έναντι του Scl70, είναι πιο πιθανό να παρουσιάσουν εξελισσόμενη διάμεση πνευμονική νόσο [15, 96, 97]. Ωστόσο, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι Αφρο-Αμερικανοί και μη Αφρο-Αμερικανοί ασθενείς με SSc και διάμεση πνευμονική νόσο παρουσίαζαν παρόμοια αποτελέσματα στην εξέλιξη της νόσου, γεγονός που αποδεικνύει ότι και άλλοι παράγοντες (όπως η πρόσβαση στην ιατρική φροντίδα) θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη [98].

Η μη ειδική διάμεση πνευμονία αποτελεί το συχνότερα ανευρισκόμενο ιστοπαθολογικό εύρημα σε ασθενείς με SSc και το οποίο παρατηρείται στο 10-25% περίπου των περιπτώσεων [99-101]. Η HRCT αποτελεί την πιο ευαίσθητη μέθοδο και μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση των πρώιμων σταδίων SSc που σχετίζονται με τη συνύπαρξη διάμεσης πνευμονικής νόσου, ενώ μπορεί παράλληλα να ανιχνεύσει και άλλα χαρακτηριστικά ευρήματα της SSc όπως είναι ο βλατοειδής οισοφάγος, η διάταση της πνευμονικής αρτηρίας και συννοσηρότητες, όπως πνευμονική κακοήθεια [91].

Ο έλεγχος της πνευμονικής λειτουργίας (pulmonary function testing, PFT) αποτελεί σημαντικό στοιχείο κατά την αρχική αξιολόγηση του ασθενούς με SSc και θα πρέπει να περιλαμβάνει τον έλεγχο της δυνατότητας διάχυσης του μονοξειδίου του άνθρακα

(diffusing capacity for carbon dioxide, DLCO) και της βίαιης ζωτικής χωρητικότητας (Forced Vital Capacity, FVC). Αν και οι περισσότερες δοκιμασίες ελέγχου της πνευμονικής λειτουργίας έχουν χαμηλή ειδικότητα στη διάγνωση της διάμεσης πνευμονοπάθειας, έχουν κεντρικό ρόλο στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου [102]. Οι προτεινόμενοι πλέον ορισμοί της εξελισσόμενης διάμεσης πνευμονοπάθειας βασισμένοι σε ευρήματα των δοκιμασιών ελέγχου της πνευμονικής λειτουργίας και σε ευρήματα της υψηλής ευκρίνειας αξονικής τομογραφίας (HRCT) μπορούν πλέον να βοηθήσουν στην ανίχνευση των ασθενών με φαινότυπο συμβατό με εξελισσόμενη μορφή ίνωσης και οι οποίοι ενδεχομένως να έχουν μεγαλύτερο όφελος μετά από εφαρμογή πιο επιθετικής ή εναλλακτικής θεραπευτικής αντιμετώπισης [103]. Σύμφωνα με κατευθυντήριες οδηγίες κλινικής πρακτικής, η εξελισσόμενη πνευμονική ίνωση ορίζεται από την παρουσία δύο από τα εξής τρία κριτήρια: συμπτώματα επιδείνωσης της κλινικής εικόνας, ακτινολογική εξέλιξη της νόσου και επιδείνωση των δοκιμασιών πνευμονικής λειτουργίας, κατά το τελευταίο ένα έτος και χωρίς την συνύπαρξη άλλου αιτιολογικού παράγοντα πέραν της διάμεσης πνευμονοπάθειας [104]. Επεμβατικές διαγνωστικές μέθοδοι, όπως βρογχοκυψελιδική έκπλυση και βιοψία πνευμόνων, πραγματοποιούνται μόνο σε περίπτωση που υπάρχει διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα.

1.1.6.3 Νεφρική κρίση σκληροδερμίας

Η προσβολή των νεφρών (νεφρική κρίση σκληροδερμίας) στην SSc εμφανίζεται στα 4 πρώτα έτη της νόσου και η συχνότητα κυμαίνεται από 1% έως 14% ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, με τις ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Αυστραλία να αναφέρουν τα υψηλότερα ποσοστά ασθενών με SSc και νεφρική κρίση [105]. Η νεφρική κρίση χαρακτηρίζεται από κακοήγη υπέρταση με ταχεία επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας [106]. Τα ποσοστά θνησιμότητας ενός έτους έχουν μειωθεί

σημαντικά από την εισαγωγή στη θεραπευτική αντιμετώπιση των νεφρικών κρίσεων των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης [107].

Η τακτική μέτρηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης στους ασθενείς με SSc είναι πρωταρχικής σημασίας για την έγκαιρη ανίχνευση αυτής της επιπλοκής. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση νεφρικής κρίσης αποτελούν η διάχυτη δερματική SSc, η πρόωπη εμφάνιση της νόσου, η αφροαμερικανική φυλή, η παρουσία περικαρδιακής συλλογής, η πρόσφατη χρήση πρεδνιζολόνης σε δόση υψηλότερη από 15 mg/ημέρα και η παρουσία θετικών αυτοαντισωμάτων έναντι της RNA πολυμεράσης 3 [108]. Συχνή και σημαντική εκδήλωση της νεφρικής κρίσης σκληροδερμίας είναι η μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία με θρομβοπενία, οπότε γίνεται σαφής και η σημασία της εκτίμησης επιχρίσματος περιφερικού αίματος. Η βιοψία νεφρού, μολονότι μπορεί να διακρίνει συγκεκριμένες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σε αυτούς τους ασθενείς, αποτελεί μια διαγνωστική μέθοδο που θα πρέπει να εφαρμόζεται μόνο σε ασθενείς με διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα [108]. Σε ένα ποσοστό ασθενών με SSc η νεφρική κρίση μπορεί να εκδηλώνεται με φυσιολογικές τιμές αρτηριακής πίεσης, αλλά με μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία [109].

1.1.6.4 Καρδιαγγειακή συμμετοχή

Τα τελευταία χρόνια η πρόοδος στην εφαρμογή της μαγνητικής τομογραφίας της καρδιάς έχει βελτιώσει την κατανόησή μας για τη συμμετοχή της καρδιάς σε ασθενείς με SSc, χωρίς ωστόσο ακόμα να υπάρχει σαφής ορισμός της καρδιακής συμμετοχής στην SSc. Η SSc έχει συσχετιστεί με σοβαρές καρδιακές ανωμαλίες, όπως μυοκαρδίτιδα, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμία, ασυμπτωματική εστιακή ίνωση και μειωμένη κοιλιακή διασταλτική ικανότητα [1]. Η καρδιακή προσβολή σε ασθενείς με SSc φαίνεται να ευθύνεται για ένα σημαντικό ποσοστό θανάτων που σχετίζονται με την SSc [5]. Ανεξάρτητα από τα συμπτώματα, οι ασθενείς με SSc θα πρέπει να παρακολουθούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με ηλεκτροκαρδιογράφημα και υπερηχοκαρδιογράφημα. Η μαγνητική τομογραφία θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν τα ευρήματα των προαναφερθέντων δοκιμασιών υποδηλώνουν καρδιακή συμμετοχή [110].

1.1.6.5 Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) είναι μια σοβαρή επιπλοκή της SSc που έχει αναφερόμενη θνησιμότητα 3 ετών μεταξύ 21% και 48% [111-113]. Η πρόοδος τόσο στη θεραπεία όσο και στην έγκαιρη διάγνωση αυτής της επιπλοκής έχει βελτιώσει σημαντικά την πρόγνυσή της. Παράγοντες κινδύνου ΠΑΥ είναι η παρουσία αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων, η παρουσία εκτεταμένων τελαγγειεκτασιών, η μεγαλύτερη διάρκεια της νόσου, και τα αυτοαντισώματα έναντι Th/To [114]. Σε σύγκριση με ασθενείς με ιδιοπαθή ΠΑΥ, οι ασθενείς με SSc και επακόλουθη πνευμονική αρτηριακή υπέρταση φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση, ακόμη και με ασθενείς με παρόμοιο αιμοδυναμικό προφίλ [115].

Εκτός από την ΠΑΥ, οι ασθενείς με SSc μπορεί να παρουσιάσουν αυξημένη πίεση στην πνευμονική αρτηρία λόγω άλλων αιτιών (π.χ. δυσλειτουργία της αριστερής καρδιάς, διάμεση πνευμονοπάθεια και, λιγότερο συχνά, πνευμονική φλεβική αποφρακτική νόσο) [116]. Ο καθετηριασμός των δεξιών καρδιακών κοιλοτήτων είναι η εξέταση εκλογής για τη διάγνωση της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, αν και το υπερηχοκαρδιογράφημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με PFT στο πλαίσιο του προληπτικού ελέγχου. Μια μείωση του DLCO δυσανάλογη με μια μείωση του FVC ή μια μεμονωμένη μείωση του DLCO μπορεί επίσης να υποδηλώνει πνευμονική υπέρταση [117].

1.1.6.6 Γαστρεντερική συμμετοχή

Τουλάχιστον το 90% των ασθενών με SSc παρουσιάζουν προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος [118]. Οι γαστρεντερικές εκδηλώσεις στους ασθενείς αυτούς παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και μπορεί να εμφανιστούν οποιαδήποτε στιγμή στην πορεία της νόσου. Η οισοφαγική δυσλειτουργία είναι συχνή και μπορεί να εκδηλωθεί με παλινδρόμηση με ή χωρίς οισοφαγίτιδα και δυσφαγία. Η οισοφαγίτιδα μπορεί να είναι ασυμπτωματική και η διάγνωση απαιτεί ενδοσκοπική εξέταση [119]. Η δυσφαγία εμφανίζεται συνήθως λόγω της οισοφαγικής δυσκινησίας. Η μανομετρία βοηθά στην εκτίμηση της προσβολής του οισοφάγου.

Οι αγγειακές εκτασίες του άντρου του στομάχου μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία ή αργή απώλεια αίματος. Η ενδοσκόπηση του ανώτερου γαστρεντερικού είναι συνεπώς πρωταρχικής σημασίας σε ασθενείς με SSc που εμφανίζουν αναιμία [120]. Επιπλέον, οι ασθενείς μπορεί να έχουν καθυστερημένη γαστρική κένωση, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν κοιλιακή διάταση και μετεωρισμό, ιδιαίτερα μετά τα γεύματα.

Η προσβολή του κατώτερου γαστρεντερικού σωλήνα εμφανίζεται σε έως και 50% των ασθενών με SSc και σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα [121]. Οι εκδηλώσεις περιλαμβάνουν βακτηριακή υπερανάπτυξη του λεπτού εντέρου, δυσαπορρόφηση, δυσκοιλιότητα, διάρροια, υποτροπιάζουσα ψευδοαπόφραξη και απώλεια κοπράνων [122-125]. Η ψευδοαπόφραξη του εντέρου είναι μια σοβαρή κλινική εκδήλωση της SSc, επηρεάζοντας μεταξύ 4% και 10% των ασθενών [125, 126]. Αυτή η κατάσταση είναι επώδυνη, συχνά υποτροπιάζουσα και, μερικές φορές, απειλητική για τη ζωή [127].

Η ανεπάρκεια του πρωκτικού σφιγκτήρα με ακράτεια κοπράνων εμφανίζεται στο 22-77% των ασθενών με SSc [128, 129]. Πρόπτωση του ορθού μπορεί επίσης να εμφανιστεί και εκδηλώνεται με αίσθημα διόγκωσης στον πρωκτό και χρόνια ακούσια εκροή κοπράνων.

Σε σοβαρές περιπτώσεις προσβολής του κατώτερου γαστρεντερικού, οι ασθενείς μπορεί να χρειαστούν ολική παρεντερική διατροφή. Εκτός από τον γενικό υποσιτισμό, μπορεί επίσης να εμφανιστεί ανεπάρκεια μικροθρεπτικών συστατικών [130, 131].

1.1.6.7 Συμμετογή του μυοσκελετικού συστήματος

Η προσβολή μυοσκελετικού συστήματος στην SSc είναι αρκετά συχνή, αλλά πολλές φορές μπορεί να υποτιμάται όταν υπάρχει προσβολή ζωτικών οργάνων. Αν και οι αρθραλγίες αποτελούν συχνή εκδήλωση, ορισμένοι ασθενείς με SSc θα αναπτύξουν διαβρωτική αρθρίτιδα. Η κλινική αξιολόγηση του οιδήματος μιας άρθρωσης και του εύρους κίνησης αυτής μπορεί να είναι δύσκολη λόγω της συνυπάρχουσας ίνωσης του δέρματος ή του υποδόριου οιδήματος. Το αίσθημα τριβής των τενόντων (δηλαδή, κριγμός που προέρχεται από τον κινούμενο τένοντα μέσα στο έλυτρο του τένοντα)

εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς με διάχυτη δερματική νόσο πρώιμα στην πορεία της νόσου και είναι δυσμενές προγνωστικό σημείο [132].

Οι ασθενείς με SSc μπορεί να έχουν μυοπάθεια ποικίλης προέλευσης. Στην αρχή της πορείας της διάχυτης δερματικής SSc, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν ηπίως αυξημένη τιμή της κινάσης της κρεατίνης λόγω μυοπάθειας σχετιζόμενης με την SSc [133]. Αυτές οι ανωμαλίες τυπικά υποχωρούν μόλις ο ασθενής ξεκινήσει ανοσοτροποποιητική θεραπεία για τη διάχυτη δερματική σκλήρυνση. Ωστόσο, μια υποομάδα ασθενών μπορεί να παρουσιάζει το αποκαλούμενο σύνδρομο επικάλυψης με μυοσίτιδα, που χαρακτηρίζεται από μεγάλη αύξηση των μυϊκών ενζύμων στον ορό των ασθενών αυτών.

1.1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Το διακριτικό παθολογικό χαρακτηριστικό της SSc είναι η ανώμαλη και η υπερβολική εναπόθεση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας, με αποτέλεσμα ίνωση σε διάφορα συστήματα οργάνων [134]. Διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στην υπερβολική συσσώρευση θεμέλιας ουσίας στην ίνωση, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ενεργοποίησης των μυοϊνοβλαστών, της ανώμαλης ινωτικής σηματοδότησης και της αυξημένης παραγωγής και διασταυρούμενης σύνδεσης με μόρια της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας [135-137]. Ειδικές κυτταροκίνες, χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν διαφοροποίηση και απορρύθμιση των μυοϊνοβλαστών. Για παράδειγμα, ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) είναι ένας ισχυρός προϊνωτικός μεσολαβητής [138]. Ιστορικά, οι θεραπευτικοί παράγοντες για την SSc στόχευαν στον περιορισμό της φλεγμονής, τόσο μέσω του έμφυτου όσο του προσαρμοστικού ανοσιακού συστήματος. Αν και ο όρος ανοσοκατασταλτικό χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει αυτούς τους παράγοντες, αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει μια υπεραπλούστευση του μηχανισμού δράσης των διαφόρων διαθέσιμων φαρμάκων, δεδομένου ότι ορισμένοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες (π.χ. μυκοφαινολάτη και τοσιλιζουμάμπη) μπορούν να ασκήσουν αντι-ινωτικές επιδράσεις, ενώ οι αντι-ινωτικοί παράγοντες, όπως η νιντεδανίμπη, μπορεί να έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα φάρμακα για την αντιμετώπιση της SSc με τον αντίστοιχο μηχανισμό δράσης τους φαίνονται στον Πίνακα 3 [1].

Πίνακας 1.3. Θεραπευτικές επιλογές για τη συστηματική σκλήρυνση, μηχανισμός δράσης και το αντίστοιχο βιολογικό όφελος στη νόσο.

Θεραπευτική επιλογή	Μηχανισμός Δράσης	Βιολογικό όφελος στη συστηματική σκλήρυνση
Διάχυτη δερματική SSc		
Μυκοφαινολάτη	Αναστέλλει την de-novo παραγωγή νουκλεοτιδίων γουανοσίνης, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και των B-κυττάρων	Κλινικά σημαντική μείωση του mRSS
Κυκλοφωσφαμίδη	Ρυθμίζει τα ρυθμιστικά T κύτταρα, οδηγώντας σε μειωμένη έκκριση ιντερφερόνης γ και IL-12	Χρησιμοποιείται για την πνευμονική ίνωση. Κλινικά σημαντική μείωση του mRSS. Σταθεροποιεί την πνευμονική λειτουργία
ΡΙτουξιμάμπη	Αντι-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα που μειώνει τα περιφερικά B κύτταρα	Μείωση του mRSS. Σταθεροποιεί την πνευμονική λειτουργία
Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	Αφαίρεση βλαστοκυττάρων και χημειοθεραπεία, ακολουθούμενη από μεταμόσχευση πολυδύναμων	Χρησιμοποιείται για την πνευμονική ίνωση. Μεγαλύτερη μείωση του mRSS σε σύγκριση με

	αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων για την ανασύσταση του ανοσοποιητικού συστήματος	την κυκλοφωσφαμίδη. Σταθεροποιεί την πνευμονική λειτουργία.
Διάμεση πνευμονοπάθεια		
Μυκοφαινόλη	Αναστέλλει την de-novo παραγωγή νουκλεοτιδίων γουανωσίνης, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και των B-κυττάρων	Επιβραδύνει την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας
Κυκλοφωσφαμίδη	Ρυθμίζει επιλεκτικά τα ρυθμιστικά T κύτταρα, οδηγώντας σε μειωμένη έκκριση ιντερφερόνης γ και IL-12	Επιβραδύνει την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας
Νιντεδανίλη	Αναστέλλει αρκετές κινάσες τυροσίνης	Επιβραδύνει την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας
Ριτουξιμάλη	Αντι-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα που μειώνει τα περιφερικά B κύτταρα	Σταθεροποιεί την πνευμονική λειτουργία
Τοσιλιζουμάλη	Εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αποκλείει τον υποδοχέα της IL-6	Επιβραδύνει την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας

Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	Αφαίρεση βλαστοκυττάρων και χημειοθεραπεία, ακολουθούμενη από μεταμόσχευση πολυδύναμων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων για την ανασύσταση του ανοσοποιητικού συστήματος	Σταθεροποιεί την πνευμονική λειτουργία
Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση		
Σιλδεναφίλη ή ταδαλαφίλη	Αναστέλλουν την φωσφοδιεστεραση-5 Προάγει την αγγειοδιαστολή μέσω του μονοξειδίου του αζώτου και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης	Βελτιωμένη ικανότητα άσκησης, αιμοδυναμική και λειτουργική σταθερότητα
Βοσεντάνη και αμβρισεντάνη	Αναστέλλουν τους υποδοχείς της ενδοθηλίνης-A και ενδοθηλίνης-B	Βελτιωμένη ικανότητα άσκησης, αιμοδυναμική και λειτουργική σταθερότητα
Σελεξιπάκη	Εκλεκτικός από του στόματος αγωνιστής του υποδοχέα προστακυκλίνης που οδηγεί σε αγγειοδιαστολή	Μείωση του αριθμού των νοσηλειών και της εξέλιξης της νόσου
Ριοσιγουάτη	Επάγει τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση, ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις του μονοξειδίου του αζώτου, για την	Βελτιωμένη ικανότητα άσκησης, αιμοδυναμική και λειτουργική σταθερότητα

	παραγωγή περισσότερης κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης, με αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή	
Θεραπεία με προστακυκλίνη (π.χ. ρεπροστινίλη, εποπροστενόλη, ιλοπρόστη και μπεραπρόστη)	Αγωνιστής προστακυκλίνης που προάγει τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών, την αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και την αγγειοδιαστολή των πνευμονικών αρτηριών	Βελτιωμένη ικανότητα άσκησης, αιμοδυναμική και λειτουργική σταθερότητα
Φαινόμενο Raynaud και δακτυλικά έλκη		
Αναστολείς διαύλων ασβεστίου	Αναστέλλει την είσοδο ασβεστίου στα κύτταρα με αποτέλεσμα τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και τη μείωση της συστηματικής αγγειακής αντίστασης	Μείωση της συχνότητας και της σοβαρότητας του φαινομένου Raynaud
Φλουοξετίνη	Προάγει την αγγειοδιαστολή και τη διαταραχή της φυσιολογικής συσσώρευσης αιμοπεταλίων	Μείωση της συχνότητας και της σοβαρότητας του φαινομένου Raynaud

Σιλδεναφίλη ταδανφίλη	και Αναστέλλουν την φωσφοδιεστεραση-5 και προάγουν την αγγειοδιαστολή μέσω ενίσχυσης της αλληλεπίδρασης του μονοξειδίου του αζώτου και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης	θεραπεία και την πρόληψη του φαινομένου Raynaud και των δακτυλικών ελκών
Ιλοπρόστη	Προάγει την αγγειοδιαστολή μέσω της οδού της προστακυκλίνης	Πρόληψη εμφάνισης νέων και συμβολή στην επούλωση υφιστάμενων δακτυλικών ελκών
Βοσεντάνη	Αναστέλλει τους υποδοχείς της ενδοθηλίνης-A και ενδοθηλίνης-B	Μείωση εμφάνισης νέων δακτυλικών ελκών

FVC = Βίαιη ζωτική χωρητικότητα, IL=ιντερλευκίνη, mRSS=modified Rodnan skin score (τροποποιημένο σύστημα βαθμονόμησης του Rodnan

1.2 Το Ro52 (TRIM21) ως αντιγόνο

Αυτοαντισώματα έναντι του Ro52 (TRIM21) έχουν πλέον ανιχνευθεί σε μια πληθώρα αυτοάνοσων νοσημάτων, με ποικίλη συχνότητα ανάλογα με το νόσημα (5-95%) [139, 140]. Ιστορικά, η παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων χαρακτήριζε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren (SjS) και SLE και έχει συσχετιστεί με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις. Ωστόσο, αυξημένη συχνότητα anti-Ro52 αντισωμάτων έχει περιγραφεί επίσης σε ασθενείς με SSc, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοσίτιδες, σύνδρομο αντισυνθετάσης, μικτή νόσο του συνδετικού ιστού, πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα, νεογνά μητέρων θετικών για την παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων τα οποία παρουσιάζουν συγγενές καρδιακό μπλοκ και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Επιπλέον, anti-Ro52 αντισώματα έχουν ανιχνευθεί σε ορούς ασθενών με κακοήγη νοσήματα (καρκίνος ωοθηκών, καρκίνος παχέος εντέρου, λέμφωμα κ.ά.), καθώς και σε ορούς υγιούς πληθυσμού. Λόγω της χαμηλής ειδικότητας για κάποιο συγκεκριμένο νόσημα, η ανίχνευση anti-Ro52 αντισωμάτων δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης, η αυξημένη όμως συχνότητά τους σε ασθενείς με αυτοάνοσα, ρευματικά και όχι μόνο, νοσήματα υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανού ρόλου των αυτοαντισωμάτων αυτών στην παθογένεια ή και πιθανά στην κλινική πορεία των νοσημάτων αυτών [144].

1.2.1 Η οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών

Το Ro52 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 52-kDa η οποία αποτελείται από 475 αμινοξέα (αα). Η πρωτεΐνη αυτή διακρίνεται στις εξής περιοχές: την λεγόμενη περιοχή πραγματικά ενδιαφέροντος νέου γονιδίου (Really Interesting New Gene, RING) στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, μια B-box περιοχή, μια περιοχή περιελιγμένου πηνίου (coiled-coil) που μπορεί να συσχετίζεται με μια μεταβλητή C-τερματική περιοχή και μια τερματική B30,2 ή PRY/SPRY περιοχή [139]. Η παραπάνω αναγνωρισμένη τριμερής δομή (αποτελούμενη από μια N-τερματική RING, μια B-Box και μια κεντρική coiled-coil περιοχή) χαρακτηρίζει την οικογένεια πρωτεϊνών γνωστή ως TRIM οικογένεια (tripartite motif protein family, TRIM protein family), η οποία αποτελείται από περισσότερα από 80 μέλη. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής αποτελούν μια ομάδα E3 λιγκασών ουβικουιτίνης και έχει φανεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η αυτοφαγία και η έμφυτη ανοσία [145]. Συγκεκριμένες C-τερματικές περιοχές μεσολαβούν στην αναγνώριση του υποστρώματος, τον εντοπισμό εντός του κυττάρου και χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των πρωτεϊνών TRIM σε υποοικογένειες ανάλογα με την κυτταρική τους λειτουργία [146].

1.2.2 Η δομή του TRIM21/Ro52

Το TRIM21/Ro52 αποτελείται από μια N-τερματική RING, μια B-Box και μια κεντρική coiled-coil περιοχή (όπως είναι αναμενόμενο για κάθε πρωτεΐνη που ανήκει στην TRIM οικογένεια) και μια τερματική PRY/SPRY περιοχή. Η πλήρης κρυσταλλική δομή του TRIM21 δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, η δομή του

TRIM21/Ro52 μπορεί να προβλεφθεί με τον συνδυασμό επιβεβαιωμένων δομών, κινητικής δέσμευσης και ομολογίας. Η περιοχή περιελιγμένου πηνίου πιστεύεται ότι μεσολαβεί στον ομοδιμερισμό του TRIM21/Ro52. Αυτό επιτρέπει στις δύο περιοχές PRY/SPRY του διμερούς να σχηματίσουν έναν θύλακα σύνδεσης υψηλής συγγένειας για τις Fc περιοχές της IgG ανοσοσφαιρίνης [147, 148] (Εικόνα 1.1).

Περιοχή RING . Η RING περιοχή του TRIM21/Ro52 χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας σειράς διατηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης και ιστιδίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνδεση ατόμων ψευδαργύρου, επιτρέποντας έτσι την αναδίπλωση μιας περιοχής με δράση E3 λιγκάσης ουβικουιτίνης [144]. Τέτοιοι σχηματισμοί E3 δακτυλίων ψευδαργύρου είναι σημαντικοί για τις αλληλεπιδράσεις με E2 ένζυμα τα οποία με τη σειρά τους μεταφέρουν μόρια ουβικουιτίνης στις πρωτεΐνες στόχους [144]. Η μεταφορά ουβικουιτίνης περιλαμβάνει το σχηματισμό, ειδικών για τη λυσίνη, ομοιοπολικών αλυσίδων πολυουβικιτίνης, οι οποίες καθορίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές δραστηριότητες. Για παράδειγμα, πρωτεΐνες τροποποιημένες με ειδικές αλυσίδες ουβικουιτίνης λυσίνης 48 (K48) στοχεύουν στην πρωτεασωμική αποικοδόμηση, ενώ οι ειδικές για τις K63 αλυσίδες ρυθμίζουν μονοπάτια σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης του DNA και της φλεγμονώδους σηματοδότησης [149].

Περιοχή B-Box. Οι λειτουργίες αυτής της συγκεκριμένης περιοχής δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί πλήρως και φαίνεται να διαφέρουν για το κάθε μέλος της οικογένειας των TRIM πρωτεϊνών.

Συγκεκριμένα για το TRIM21/Ro52, η B-Box περιοχή έχει ρυθμιστικό ρόλο μέσω αλληλεπιδράσεων με την RING περιοχή [150]. Ενώ οι περισσότερες πρωτεΐνες TRIM είναι ιδιοσυστασιακά ενεργές, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X έδειξε ότι η περιοχή B-

box του TRIM21/Ro52 καταστέλλει τη δράση της ως λιγάσης ουβικουιτίνης καταλαμβάνοντας τη θέση δέσμευσης των E2 ενζύμων. Η υπερέκφραση των κινασών IKKb ή TBK1 οδήγησε σε φωσφορυλίωση ενός μοτίβου LxxIS στην περιοχή RING και ήταν επαρκής για να ακυρώσει την αναστολή της B-box περιοχής [151]. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να παρουσιάζουν ενδιαφέρον όσον αφορά στη μελέτη των μηχανισμών αυτοανοσίας, καθώς η διαταραχή αυτού του μηχανισμού αυτοαναστολής θα μπορούσε να συμβάλει στην εξέλιξη υπέρμετρης προφλεγμονώδους σηματοδότησης. Οι πολυμορφισμοί που βρίσκονται σε περιοχές που κωδικοποιούν το μοτίβο LxxIS του TRIM21/Ro52 δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί και γενικά, μελέτες GWAS (Genome Wide association Studies) που να συσχετίζουν το ρόλο του TRIM21/Ro52 στην αυτοανοσία είναι περιορισμένες. Ωστόσο, μια μελέτη ασθενών με SjS εντόπισε πολυμορφισμούς σε πολλαπλές κωδικοποιητικές περιοχές, με ορισμένους SNPs (single-nucleotide polymorphisms) να συσχετίζονται με την παρουσία αντισωμάτων έναντι του TRIM21/Ro52 [152].

Περιοχή Coiled-Coil. Η κεντρική *Coiled-coil* περιοχή περιελιγμένου πηνίου του TRIM21/Ro52 προβλέπεται ότι αποτελεί μια α-ελικοειδή, υπερπεριελιγμένη δομή που εμπλέκεται στον διμερισμό και την αυτο-συσχέτιση του TRIM21 [153]. Όλες οι πρωτεΐνες της TRIM οικογένειας που συνδέονται μέσω περιελιγμένων περιοχών ανευρίσκονται είτε ως μονομερή, ομοδιμερή ή σε κατάσταση ισορροπίας μεταξύ μονομερούς-ομοδιμερούς μορφής, με τον ετεροδιμερισμό να είναι πιο ασυνήθιστη μορφή [144, 153]. Τα ομοδιμερή των TRIM πρωτεϊνών (και πιθανώς ολιγομερή υψηλότερης τάξης) που σχηματίζονται από αντιπαράλληλες coiled-coil περιοχές επιτρέπουν επίσης το διμερισμό στην RING περιοχή [144].

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο διμερισμός των καταλυτικών RING περιοχών είναι απαραίτητος για τη δραστηριότητα ουβικουϊτινοποίησης στις περισσότερες TRIM

πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα [154]. Αυτό ισχύει και για το TRIM21/Ro52, με μια πρόσφατη μελέτη να αποδεικνύει ότι ο διμερισμός στην coiled-coil περιοχή του TRIM21/Ro52 επέτρεψε άμεσα την ενεργοποίηση της καταλυτικής του δραστηριότητας [155]. Η μετάλλαξη σε κατάλοιπα στις θέσεις αλληλεπίδρασης των αντιπράλληλων coiled-coil περιοχών ήταν επαρκής για την αναστολή της αυτο-ουβικουϊτινοποίησης της RING περιοχής, μετά από μόλυνση των κυττάρων HEK293T με επικαλυμμένο με αντίσωμα αδενοϊό. Επιπλέον, ο εξαναγκαστικός διμερισμός της RING περιοχής (μέσω RING-linker-RING δομών) αύξησε την αποδημητική δραστηριότητα της ουβικιτίνης. Ένα προτεινόμενο μοντέλο «ενεργοποίησης που προκαλείται από ομαδοποίηση» υποδηλώνει ότι ο διμερισμός των RING περιοχών καθιστά την εμπλοκή της E2-ουβικιτίνης με το TRIM21 και την επακόλουθη αποδημητική δράση της πολυουβικιτίνης περισσότερο ευνοϊκή ενεργειακά [155].

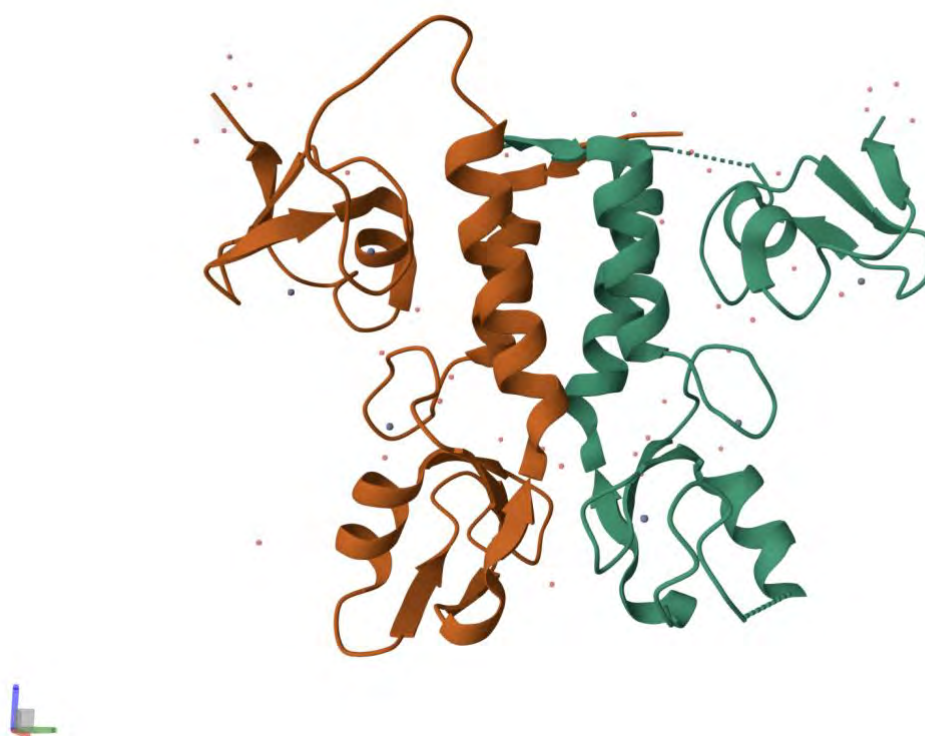
C-τελική PRY/SPRY περιοχή. Η μεταβλητή C-τελική περιοχή των πρωτεϊνών της οικογένειας TRIM εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και στον υποκυτταρικό εντοπισμό, με το TRIM21/Ro52 να περιέχει μια C-τερματική PRY/SPRY περιοχή [144].

Η ειδικότητα και οι ρόλοι των PRY/SPRY περιοχών των πρωτεϊνών της TRIM οικογένειας έχουν αναδειχθεί από διάφορες μελέτες [156]. Για το TRIM21/Ro52, η PRY/SPRY περιοχή περιέχει μια θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών, η δομή της οποίας έχει αποσαφηνιστεί [147]. Η PRY/SPRY περιοχή του TRIM21/Ro52 συνδέεται με την CH2-CH3 περιοχή του Fc τμήματος της ανοσοσφαιρίνης και δεν αλληλοεπικαλύπτεται με τις θέσεις δέσμευσης του Fc τμήματος με τον υποδοχέα FcγR και το C1q. Η CH2-CH3 περιοχή είναι εξαιρετικά συντηρητική, επιτρέποντας τη δέσμευση του TRIM21/Ro52 με το 98% των

κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών ανεξάρτητα από την αντιγονική ειδικότητά τους [156].

Το ανθρώπινο TRIM21/Ro52 εμφανίζει ασυνήθιστες αλληλεπιδράσεις με αντισώματα, έχοντας την ιδιότητα να δεσμεύει και τις τέσσερις υποτάξεις της ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης, ενώ επίσης δεσμεύει IgG ανοσοσφαιρίνες από διαφορετικά είδη θηλαστικών σε αναλογία δέσμευσης 2:1 (TRIM21: Fc τμήμα αντισώματος) [157]. Το TRIM21/Ro52 δεσμεύει επίσης την IgA (Kd: 54 μ M) και την IgM (Kd: 17 μ M) ανοσοσφαιρίνη [144], και την IgG, με Kd: 37 nM [147]. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι εκτός από τη δέσμευση της κάθε IgG με τον αντίστοιχο της υψηλής συγγένειας υποδοχέα Fc γ RI (Kd: 4,2 nm), οι περισσότεροι FcR δεσμεύουν Fc τμήματα της IgG με χαμηλότερη συγγένεια στο μικρογραμμομοριακό εύρος. Το εάν το TRIM21/Ro52 μπορεί να συνδεθεί με IgE ή IgD ανοσοσφαιρίνες παραμένει προς διερεύνηση [147].

Η PRY/SPRY περιοχή του TRIM21/Ro52 υπόκειται επίσης σε ρύθμιση μέσω ακετυλίωσης. Η αποακετυλάση ιστόνης 6 (HDAC6) αλληλεπιδρά με το TRIM21/Ro52 μέσω της περιοχής PRY/SPRY, όπου αποακετυλιώνει το TRIM21 στα K385 και K387, προάγοντας τον ομοδιμερισμό του TRIM21/Ro52. Όταν η HDAC6 αναστέλλεται, το TRIM21/Ro52 παραμένει υπερακετυλιωμένο, αποτρέποντας τον διμερισμό του, μειώνοντας έτσι την ενζυματική του δραστηριότητα [158].



Εικόνα 1.1 Τρισδιάστατη δομή του TRIM21/Ro52

[Ανακτήθηκε μέσω της ιστοσελίδας: <https://www.rcsb.org/structure/5olm>, PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb5OLM/pdb>, D. Sehnal, S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, A.S. Rose (2021) Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures (2021) *Nucleic Acids Research* 49:W431-W437 <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>].

1.2.3 Ο βιολογικός ρόλος του TRIM21/Ro52

Τα διάφορα κυκλοφορούντα αντισώματα εξουδετερώνουν τα εξωκυττάρια αντιγόνα, εμποδίζοντας συγκεκριμένα παθογόνα να διεισδύσουν μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, ενδοκυττάρια. Αυτό συμβαίνει είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της οψωνοποίησης και/ή της ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος, ενώ η εξουδετέρωση με τη μεσολάβηση αντισώματος εντός των ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων θεωρήθηκε απίθανη λόγω του αποκλεισμού τους από την κυτταρική μεμβράνη [159]. Η εξωκυττάρια εξουδετέρωση ωστόσο δεν είναι πάντα δυνατή, καθώς πολλοί επίτοποι που δύνανται να εξουδετεροποιηθούν προστατεύονται, για παράδειγμα από γλυκάνες [160].

In vivo μελέτες έχουν αποδείξει ότι ακόμη και με την παρουσία κορεσμένων συγκεντρώσεων του κατάλληλου αντισώματος, ποντίκια με έλλειψη του TRIM21 είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη λοίμωξη από τον αδενοϊό 1 μύος. Αντίθετα, οι επιμύες άγριου τύπου φαίνεται να αυξάνουν την ενεργοποίηση του TRIM21, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την ιαιμία. Ετερόζυγα ποντίκια *Trim21*^{+/-} εμφανίζουν έναν ενδιάμεσο φαινότυπο, που οδηγεί σε αυξημένο ιικό φορτίο αλλά χαμηλότερο από αυτό των ποντικών *Trim21*^{-/-}, υποδηλώνοντας ότι τα επίπεδα του TRIM21 επηρεάζουν άμεσα την αποτελεσματικότητα της αντιϊκής του λειτουργίας [161].

Όταν δεσμεύονται σε μη εξουδετερωτικά αντισώματα, τα ενδοκυτταρικά παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων των ιών, των βακτηρίων και των παρασίτων, μπορούν να ανιχνευθούν γρήγορα από το κυτταροπλασματικό TRIM21/Ro52 [144]. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα συνδεδεμένα με αντίσωμα παθογόνα έχουν πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα ποικίλλουν και είναι ειδικοί για το κάθε παθογόνο [144]. Ορισμένοι ιοί με περίβλημα, όπως ο α-ερπητοϊός HSV, μεταφέρουν το καψίδιό τους απευθείας στο κυτταρόπλασμα συντήκοντας το περίβλημά τους με την κυτταροπλασματική

μεμβράνη [144]. Άλλοι ιοί χρησιμοποιούν μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, όπως ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης, μικροπινोकύτωση ή ενδοκυττάρωση που προκαλείται από λιπιδική σχεδία [162]. Πολλά είδη βακτηρίων χρησιμοποιούν την ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της καβεολίνης για να εισέλθουν στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των *E. coli*, *C. jejuni*, *S. typhimurium* και *P. aeruginosa*, όπως και ένας αριθμός ιών, όπως ο SV40 [163]. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να προτιμάται για παθογόνα, καθώς σε αντίθεση με την είσοδο σε κοιλότητα επικαλυμμένη με κλαθρίνη, τα εσωτερικοποιημένα βακτήρια των κοίλων μπορεί να αποφύγουν τη λυσοσωμική αποικοδόμηση [164].

Το TRIM21 δεσμεύει εσωτερικευμένα επικαλυμμένα με αντίσωμα παθογόνα εντός του κυττάρου μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PRY/SPRY περιοχής του και του Fc τμήματος των αντισωμάτων. Ωστόσο, το γιατί και πώς τα επικαλυμμένα με αντίσωμα παθογόνα είναι διαθέσιμα για δέσμευση στο κυτταρόπλασμα, παραμένει σε μεγάλο βαθμό άλυτο ερώτημα. Η επιστράτευση του TRIM21/Ro52 μπορεί να περιοριστεί σε ιούς DNA και RNA χωρίς περίβλημα που εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα με συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες. Οι McEwan et al. έδειξαν ότι ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός με περίβλημα απέρριψε τα προσκολλημένα αντισώματα κατά την είσοδό του στο κύτταρο και συνεπώς δεν ενεργοποίησε το TRIM21/Ro52, ενώ ο καλκοϊός χωρίς περίβλημα το ενεργοποίησε [165]. Επιπλέον, το TRIM21/Ro52 μπορεί να ανιχνεύσει τον πικορναϊό HRV14, ο οποίος προάγει τη λύση των ενδοσωματικών μεμβρανών για την απελευθέρωση κυτταροσωματικού ιού, ενώ δεν μπορεί να ανιχνεύσει τον HRV2, ο οποίος μεταφέρει το γονιδίωμά του στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός πόρου [166].

Το TRIM21 διευκολύνει την εξαρτώμενη από αντισώματα ενδοκυτταρική εξουδετέρωση του ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 (Ad5). Ο Ad5 δεσμευμένος σε μόλις

1,6 μόρια αντισώματος επιστρατεύει το TRIM21 στο κυτταρόπλασμα και αποικοδομείται με τρόπο που εξαρτάται από το TRIM21. Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει την αυτο-ουβικουιτίνωση από το TRIM21 και πιθανώς μεταφορά ουβικουιτίνης επίσης στο ιικό σωματίο που σχετίζεται με το TRIM21 πριν από την πρωτεασωμική αποικοδόμησή του [165]. Τα καψίδια του αδενοϊού μπορούν να απελευθερωθούν από τα πρώιμα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της «ενδοσωματικής διαφυγής» [167]. Αυτή η σταδιακή διαδικασία ενδοσωματικής ρήξης προωθείται μετά την αρχική δέσμευση του Ad5 με τον υποδοχέα αδενοϊού - ιού coxsackie (CAR) και τον συνυποδοχέα ιντεγκρίνη α_v στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή [168]. Η αλληλεπίδραση με αυτούς τους υποδοχείς μπορεί να προάγει την πρώιμη αποσυναρμολόγηση του καψιδίου, που συμβαίνει ακριβώς όταν ο Ad5 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη [169]. Η αποσυναρμολόγηση αυτή οδηγεί στην έκθεση της πρωτεΐνης VI, ενός λυτικού παράγοντα που διαταράσσει την ενδοσωμική μεμβράνη, απελευθερώνοντας το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα προκειμένου για την επακόλουθη εμπλοκή του με το TRIM21/Ro52 [170, 171].

Με τη δέσμευση IgM ανοσοσφαιρινών, το TRIM21/Ro52 παρέχει προστασία από πρωτογενείς λοιμώξεις, ενώ δεσμεύοντας IgG ανοσοσφαιρίνες μπορεί να προστατεύσει από δευτερογενείς λοιμώξεις. Η *in vivo* πρόκληση προστασίας έχει αποδειχθεί χρησιμοποιώντας αντισώματα που στοχεύουν την ιική νουκλεοπρωτεΐνη διαφόρων ιών, συμπεριλαμβανομένων της γρίπης, των κοροναϊών και του ιού της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας (LCMV) [144, 172]. Τα ειδικά για νουκλεοπρωτεΐνες αντισώματα δεν είναι εξουδετερωτικά, καθώς η ιική νουκλεοπρωτεΐνη είναι ένα εσωτερικό ιικό αντιγόνο και η προστασία από αυτό δεν απαιτεί την παρουσία FcγR [173, 174]. Το TRIM21 και τα αντισώματα κατά της ιικής νουκλεοπρωτεΐνης διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διέγερση των ειδικών για την

νουκλεοπρωτεΐνη κυτταροτοξικών T κυττάρων κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τον LCMV [172].

Μόλις συνδεθεί με παθογόνα επικαλυμμένα με αντίσωμα εντός του κυτταροπλάσματος, το TRIM21/Ro52 επάγει συντονισμένες αποκρίσεις ενεργοποίησης και σηματοδότησης, και οι δύο εξαρτώμενες από τη δραστηριότητά του ως E3 λιγάσης ουβικιτίνης. Κατά την κυτταρική μόλυνση με σύμπλοκα Ad5-αντισώματος, εμφανίζονται δύο ανεξάρτητες, ταυτόχρονες δραστηριότητες. Πρώτον, η απόκριση του τελεστή οδηγεί σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση του ιού. Δεύτερον, μια ενδοκυτταρική αντική απόκριση προκαλείται μέσω των μορίων σηματοδότησης της έμφυτης ανοσίας, όπως η IFN-I [175, 176]. Επιπλέον, το TRIM21/Ro52 εκκινεί καταρράκτες σηματοδότησης, ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB, ρυθμίζοντας θετικά περισσότερες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και επάγοντας μια επιπλέον αντική δραστηριότητα [165].

Το TRIM21/Ro52 έχει επίσης έμμεσες επιδράσεις στην έμφυτη ανοσία προάγοντας την ανίχνευση του υποδοχέα αναγνώρισης προτύπων (PRR), εκτεθειμένων ανοσοδιεγερτικών προσδετών, που κατά τα άλλα θωρακίζονται από ιικά καψίδια. Αυτό προκαλεί δύο κύματα μεταγραφής που εξαρτώνται από το TRIM21/Ro52, το πρώτο που προκαλείται από την αναγνώριση αντιγόνου από το TRIM21/Ro52 μέσω δέσμευσης με το Fc τμήμα αντισώματος και ένα μεταγενέστερο σήμα μετά την αναγνώριση των ικών PAMPs από το cGAS και το STING [166]. Το TRIM21 αλληλεπιδρά επίσης μέσω της PRY/SPRY περιοχής με ένα άλλο PRR, το MAVS. Το TRIM21 ρυθμίζεται θετικά μετά την έγκαιρη ανίχνευση της ικής εισβολής στο κύτταρο ξενιστή από τον ιό της ηπατίτιδας C, τον ιό της νόσου του Newcastle ή τον ιό Sendai (SEV) [144].

Οι επιδράσεις του TRIM21/Ro52 στις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από κάποιον ιό είναι λιγότερο κατανοητές από εκείνες της οδού των IFN. Το TRIM21/Ro52 φέρεται να αλληλεπιδρά με τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) για να αποτρέψει την αντιγραφή του DNA του HBV, προάγοντας τη συνδεδεμένη με το K48 ουβικουϊτίνωση και αποικοδόμηση της DNA πολυμεράσης του HBV [177].

Τέλος, η ταυτόχρονη ανοσοκατακρήμνιση έδειξε ότι το TRIM21/Ro52 αλληλεπιδρά με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τις αντικές αποκρίσεις. Αυτό περιλαμβάνει άμεσες αλληλεπιδράσεις με την επαγόμενη από την IFN πρωτεΐνη 35 (IFI35) και έμμεσα, με τον αλληλεπιδρώντα N-Myc και STAT (NMI). Η επακόλουθη ουβικουϊτινοποίηση του NMI που συνδέεται με το K63 σταθεροποιεί το σύμπλεγμα TRIM21/IFI35/NMI και ρυθμίζει αρνητικά τις ενδογενείς οδούς σηματοδότησης κατά των ιών αναστέλλοντας την παραγωγή IFN-I [178].

1.2.4 TRIM21/Ro52 και το μονοπάτι των ιντερφερονών

Οι ιντερφερόνες (IFN) δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, πυροδοτώντας καταρράκτες σηματοδότησης για την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία. Η IFN-α και η IFN-β αποτελούν τις IFN τύπου I (IFN-I) και η IFN-γ, τύπου II (IFN-II) [179]. Τις πρώτες ενδείξεις ρύθμισης του TRIM21 μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης των IFNs απέδειξαν οι Rhodes et al. Σε μη διεγερμένα HeLa κύτταρα, το TRIM21 ανιχνεύθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ παρατηρήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις του TRIM21 mRNA ως απόκριση στην IFN-II [180]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση του TRIM21 σε καλλιέργειες μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων (DCs), ως απόκριση είτε σε λοίμωξη από τον ιό της γρίπης είτε σε αγωνιστές CpG ολιγονουκλεοτιδίου

TLR9. Η επαγωγή του TRIM21 φάνηκε να σχετίζεται με την IFN-I, καθώς ελαττώθηκε σε IFNAR-/- κύτταρα [181].

Η διέγερση της IFN-I προκαλεί φωσφορυλίωση των κινασών JAK1 και TYK2, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τα STAT1 και STAT2. Τα pSTAT1 και pSTAT2 συνδέονται με τον IRF9 (Interferon Regulatory Factor 9), σχηματίζοντας το σύμπλοκο του διεγερμένου από την IFN γονίδιο του παράγοντα 3 (ISGF3) που μετατοπίζεται στον πυρήνα. Ο ISGF3 ενεργοποιεί τη μεταγραφή δεσμεύοντας ISRE σε προαγωγείς διεγερμένων από την IFN γονιδίων [182]. Η σηματοδότηση μέσω της IFN-Π προκαλεί φωσφορυλίωση των JAK1 και JAK2 κινασών, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση του STAT1 και σχηματισμό ομοδιμερών pSTAT1, που αναφέρεται ως σύμπλοκο ενεργοποιημένου παράγοντα γάμμα (GAF). Το GAF μετατοπίζεται στον πυρήνα, δεσμεύεται σε θέσεις ενεργοποίησης IFN γάμμα (GAS) για να ενεργοποιήσει με τη σειρά του τη μεταγραφή [182]. Τόσο η IRF1 όσο και η IRF2 συνδέονται σε ένα ISRE του γονιδίου του TRIM21 προκειμένου να επάγουν την έκφραση του TRIM21 [183, 184].

Αρνητική ρύθμιση: Το TRIM21 συμμετέχει σε έναν μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης για τη μείωση της παραγωγής IFN-I, ρυθμίζοντας την απόκριση της IFN και αναστέλλοντας την περαιτέρω έκφραση του TRIM21. Η μείωση της IFN-I προκύπτει από την ουβικουϊτινοποίηση του IRF7 με τη μεσολάβηση του TRIM21 και την επακόλουθη πρωτεασωματική αποικοδόμησή του. Σε κύτταρα με έλλειψη του TRIM21, αυτές οι ανασταλτικές επιδράσεις καταργήθηκαν και ο προαγωγέας IFN-α4 υπερδιεγέρθηκε από το IRF7 [185, 186]. Παρομοίως, το TRIM21 ουβικουϊτινοποιεί το IRF5 για να μεσολαβήσει στην αποικοδόμησή του και να αποτρέψει την έκφραση της IFN-α που βασίζεται στον IRF5 [187].

Η σημασία της ρύθμισης: Η επαγωγή της σηματοδότησης μέσω της IFN-I βοηθά στην εξάλειψη του ιού και αποτρέπει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα του ξενιστή [188-190]. Ωστόσο, θα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία στα επίπεδα της IFN. Υπερβολική έκφραση των ιντερφερονών μπορεί να υπερδιεγείρει την έμφυτη ανοσία και τη φλεγμονή, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα συμπεριλαμβανομένης της αυτοανοσίας. Επομένως, ο τερματισμός της σηματοδότησης είναι απαραίτητος για την αποφυγή υπερβολικής έκφρασης της IFN. Το TRIM21 ελέγχει τις εγγενείς αντικές αποκρίσεις αναστέλλοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες IRF7 και IRF3 [185, 191, 192].

Η αυτοανοσία ως το αποτέλεσμα παρεκτόπισης από αυτές τις βελτιστοποιημένες οδούς σηματοδότησης, έχει αποδειχθεί για το SjS χρησιμοποιώντας ανάλυση συστοιχίας γονιδιακής έκφρασης. Σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, τα PBMC που απομονώθηκαν από ασθενείς με SjS εμφάνισαν αυξημένη έκφραση μεταγραφής του TRIM21, που συσχετίζεται με αυξημένη παρουσία mRNA των IRF1 και IRF2 [183]. Θα μπορούσε κανείς να αναμένει ενισχυμένη ουβικουιτινοποίηση των IRF που ρυθμίζονται από το TRIM21, με αποτέλεσμα την επακόλουθη μεγαλύτερη μείωση της απόκρισης στις IFNs, ωστόσο αυτό δεν φάνηκε να συμβαίνει. Αντίθετα, τα επίπεδα των IRF3 και IRF5 παρέμειναν υψηλά ακόμη και με την παρουσία αυξημένου TRIM21. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι άλλα μονοπάτια σηματοδότησης συμβάλλουν στην εξασθενημένη πρωτεασωμική αποικοδόμηση και στην διαταραχή της ομοιόστασης στα μονοπάτια σηματοδότησης της IFN σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα [193].

1.2.5 Έλλειψη του TRIM21/Ro52 και αυτοάνοσα Β λεμφοκύτταρα

Η διαταραχή της λειτουργίας των Β κυττάρων έχει ενοχοποιηθεί ως μηχανισμός που συμμετέχει στην εμφάνιση αυτοανοσίας τόσο σε ασθενείς με SjS όσο και σε ασθενείς με SLE. Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων ενεργοποιημένων Β κυττάρων που εκφράζουν συνδιεγερτικούς δείκτες και αυτοαντισώματα, οδηγώντας σε φλεγμονή και την παθογένεση της αυτοανοσίας [139]. Η ανεπάρκεια του TRIM21 έχει μελετηθεί και ως πιθανός μηχανισμός στην παθογένεια του SLE, με μηχανισμούς που αφορούσαν στη ρύθμιση των Β κυττάρων. Έχουν αναπαραχθεί TRIM21-/- ποντίκια τα οποία παρουσιάζουν ποικιλία φαινοτύπων, πιθανότατα λόγω των διαφορετικών στρατηγικών γονιδιακής διαταραχής [194]. Μια συγκεκριμένη γενιά TRIM21-/- ποντικών δεν παρουσίασε φαινοτυπικές ανωμαλίες, ενώ σε διαφορετικές μελέτες ποντίκια TRIM21-/- όταν υπεβλήθησαν σε ελαφρύ τραυματισμό στο αυτί [195], ανέπτυξαν σοβαρή δερματίτιδα και εμφάνισαν αυτοάνοσα χαρακτηριστικά ειδικά για τον SLE, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών [196]. Αυτή η διαφορά στους φαινοτύπους μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή μιας κολοβωμένης πρωτεΐνης TRIM21 (RING, B-box και μερικώς περιελιγμένη coiled-coil περιοχή) στη δεύτερη στρατηγική, η οποία επέτρεψε και προώθησε την παραγωγή αυτοαντισωμάτων.

Μια άλλη μελέτη έδειξε πώς η διαταραχή του γονιδίου του TRIM21 σε ένα μοντέλο ποντικού με επιρρέπεια στην εμφάνιση λύκου (TRIM21-/-MRL/lpr) άλλαξε την παθολογία του SLE. Σε σύγκριση με ποντίκια επιρρεπή στον λύκο (MRL/lpr) που διατηρούν τη λειτουργική δραστηριότητα του TRIM21, οι σπλήνες των ποντικών TRIM21-/-MRL/lpr είχαν σημαντικά αυξημένο αριθμό ώριμων Β κυττάρων. Μόλις απομονώθηκαν, αυτά τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε πλασματοκύτταρα που παρήγαγαν αντισώματα σε υψηλότερους ρυθμούς *in vitro*, σε σύγκριση με κύτταρα από

τους σπλήνες MRL/lpr ποντικών [197]. Ένα μοντέλο που προτείνεται είναι ότι το TRIM21 μπορεί να ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων με ουβικουιτινοποίηση του IRF5, εμποδίζοντας έτσι την επαγόμενη από τον IRF5 ρύθμιση προς τα πάνω του IRF4 και την επακόλουθη έκφραση του Blimp-1 mRNA, [197, 198]. Ωστόσο, το πώς ο IRF5 αλλάζει την έκφραση του IRF4 και εάν το TRIM21 έχει καθοριστικό ρόλο σε αυτόν τον άξονα IRF4/5, απαιτεί περαιτέρω διευκρίνιση.

Εναλλακτικά προς την αδυναμία έκφρασης, η εξασθενημένη λειτουργία του TRIM21 μπορεί να περιλαμβάνει μηχανισμούς που εξαρτώνται από τα αντισώματα. Για παράδειγμα, η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι του TRIM21/Ro52 σε ασθενείς με SLE συσχετίζεται με μειωμένη ουβικουιτινοποιητική δραστηριότητα του TRIM21/Ro52. Τα PBMCs που απομονώνονται από ασθενείς με θετικά αντισώματα κατά του TRIM21 εμφανίζουν ενισχυμένη έκφραση του γονιδίου της IFN- γ , υποδηλώνοντας συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας αυτοαντισωμάτων TRIM21 και της εξασθενημένης αρνητικής ρύθμισης των πρωτεϊνών της οδού IFN από το TRIM21 [193].

Ο τρόπος με τον οποίο τα αυτοαντισώματα μπορούν να μειώσουν τη λειτουργία του TRIM21 έχει διερευνηθεί *in vitro*. Σε ένα σύστημα χωρίς κύτταρα, τα αντισώματα έναντι του TRIM21/Ro52 από ασθενείς με SjS παρεμπόδισαν την αλληλεπίδραση του TRIM21 με το E2 ένζυμο σύζευξης της ουβικιτίνης, αποτρέποντας την αυτο-ουβικουιτινοποίηση της E3 λιγάσης μέσω της περιοχής RING [199]. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την επακόλουθη ουβικουιτινοποίηση πρωτεϊνών-στόχων όπως του IRF5, αν και το εάν τα αντισώματα έναντι του TRIM21/Ro52 μπορούν πράγματι να έχουν πρόσβαση και να αναστέλλουν το TRIM21 *in vivo* δεν έχει επιβεβαιωθεί.

1.2.6 Αυτοαντισώματα έναντι του ενδοκυττάριου TRIM21/Ro52

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το TRIM21 κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλο το κυτταρόπλασμα, με μικρές ποσότητες να ανιχνεύονται εντός του κυτταρικού πυρήνα [200]. Έτσι, το εάν και πώς τα αυτοαντισώματα έχουν πρόσβαση σε αυτή την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη παραμένει ένα βασικό ερώτημα για την κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης των αυτοάνοσων παθήσεων που σχετίζονται με το TRIM21/Ro52. Έχουν προταθεί τρεις πιθανοί μηχανισμοί που να εξηγούν αυτή την αλληλεπίδραση.

A. Έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια

Πρόσφατα, το TRIM21 ανιχνεύθηκε στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με SjS [201]. Τα anti-TRIM21/Ro52 αντισώματα σχετίζονται με την παθογένεση του πρωτοπαθούς SjS, προκαλώντας ιστική βλάβη και φλεγμονή. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην αναγνώριση των Fc τμημάτων των anti-TRIM21/Ro52 αντισωμάτων από τα λεμφοκύτταρα, ενεργοποιώντας τα φλεγμονώδη μονοπάτια όπως η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρική κυτταροτοξικότητα [202, 203]. Επομένως, το TRIM21 της κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών μονοπατιών σε αυτοάνοσα νοσήματα.

Η IFN-β, ο πιο ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης του TRIM21, προκαλεί αλλαγές στην έκφραση και την κυτταρική θέση του TRIM21 στα PBMCs [201, 204]. Το TRIM21 φάνηκε να εκφράζεται έντονα τόσο ενδοκυτταρικά όσο και σε κυτταρικές επιφάνειες μονοκυττάρων, με μέτρια αύξηση που παρατηρήθηκε στα πλασματοκυτταροειδή DCs [201]. Αν και αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η IFN ρυθμίζει θετικά την έκφραση

του TRIM21, παραμένει ασαφές πώς το TRIM21 μπορεί να μεταφερθεί και να εκφραστεί στην επιφάνεια του κυττάρου.

B. Έκθεση μετά από απόπτωση

Αυτά τα πρόσφατα νέα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες δημοσιεύσεις που υποδηλώνουν ότι το TRIM21 εκτίθεται μόνο στην κυτταρική επιφάνεια κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου, με τα αντισώματα anti-TRIM21 να καθοδηγούν πιθανώς την απόπτωση [200-202]. Η έκθεση του TRIM21/Ro52 μετά από απόπτωση έχει αποδειχθεί στις περιπτώσεις του εμβρυϊκού συγγενούς καρδιακού μπλοκ (CHB), το οποίο σχετίζεται ισχυρά με την παρουσία μητρικού SLE και SjS [205]. Υψηλοί τίτλοι διασταυρούμενων μητρικών αντισωμάτων αντι-TRIM21/Ro52 προκάλεσαν απόπτωση εμβρυϊκών μυοκαρδιακών κυττάρων *in vitro* [143].

Αν και η παθογένεση του CHB παραμένει ασαφής, ένας προτεινόμενος μηχανισμός περιλαμβάνει τη διασταυρούμενη, ανασταλτική δέσμευση μητρικών αντισωμάτων anti-Ro52/60 και anti-La σε υπομονάδες α1 των διαύλων ασβεστίου των εμβρυϊκών μυοκαρδιακών κυττάρων τύπου L [206]. Η αναστολή των διαύλων αυτών μπορεί στη συνέχεια να απορυθμίσει τη σηματοδότηση του ασβεστίου, οδηγώντας σε ανώμαλη κολποκοιλιακή αγωγιμότητα και τελικά σε απόπτωση [207]. Η απόπτωση καλλιεργημένων, μη διαπερατών ανθρώπινων εμβρυϊκών μυοκαρδιακών κυττάρων οδήγησε στην ανακατανομή των αντιγόνων Ro52/60 και La σε αποπτωτικά συγκρίματα και στην ανάδυσή τους στην κυτταρική επιφάνεια [208]. Επιπλέον, σε ένα σύστημα συν-καλλιέργειας, τα αποπτωτικά εμβρυϊκά μυοκαρδιακά κύτταρα που υπεβλήθησαν σε αγωγή με αντισώματα anti-Ro/La διέγειραν τα μακροφάγα να εκκρίνουν TNF-α [209]. Τα αποπτωτικά συγκρίματα πλούσια σε αυτοαντιγόνα όπως το TRIM21 μπορεί να καθαριστούν ανεπαρκώς, διευκολύνοντας τις αλληλεπιδράσεις

αντιγόνου-αυτοαντισώματος ή επιτρέποντας την ενδοκύττωση και την παρουσίασή του από δενδριτικά κύτταρα σε T κύτταρα και σε αυτοδραστικά B κύτταρα [210-212].

Γ. Έκθεση μετά από μετακίνησή του επαγόμενη από το κυτταρικό στρες

Το TRIM21/Ro52 μπορεί επίσης να εκτεθεί σε μη αποπτωτικά κύτταρα μετά από έκθεση σε UV-B/C ακτινοβολία ή σε οξειδωτικό στρες [213, 214]. Για παράδειγμα, κερατινοκύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία παρουσίασαν TRIM21/Ro52 στην κυτταρικής τους επιφάνεια, ένα φαινόμενο το οποίο φάνηκε να αναστέλλεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο από τον καθαριστή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), N-ακετυλ-L-κυστεΐνη [215, 216]. Η επιφανειακή έκθεση του TRIM21/Ro52 προκλήθηκε επίσης σε κερατινοκύτταρα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαμίδιο, έναν παράγοντα οξείδωσης θειόλης [215]. Το διαμίδιο διαταράσσει τις ενδοκυτταρικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις της γλουταθειόνης, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και προάγοντας τις οδούς απόπτωσης που προκαλούνται από τα μιτοχόνδρια [217]. Μαζί, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες και η αλλοιωμένη οξειδοαναγωγική ομοιόσταση μπορεί να προκαλέσουν έκθεση στην κυτταρική επιφάνεια του TRIM21/Ro52 [215].

Έχει εντοπιστεί οξειδωτική βλάβη στους σιελογόνους αδένες ασθενών με SjS, με αυξημένη ανίχνευση σε σίελο του βιοδείκτη οξειδωτικού στρες 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνη, που δημιουργήθηκε μετά από οξείδωση υπολειμμάτων γουανίνης του DNA, προκαλούμενο με τη σειρά του από τις ROS [218, 219]. Τα ευρήματα των Saegusa et al., υποδηλώνουν ότι οι ROS μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη έκθεση του TRIM21/Ro52 κατά τη διάρκεια της παθογένεσης του SjS [215]. Άλλες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την μετατόπιση των αυτοαντιγόνων σε ασθενείς με SLE στις επιφάνειες των κερατινοκυττάρων μετά από διέγερση από UV-B, θερμικό σοκ ή

ορισμένες φλεγμονώδεις κυτταροτοκίνες [203]. Ωστόσο, η βέλτιστη δόση ακτινοβολίας (200 mJ/cm²) που χρησιμοποιείται σε μία μελέτη υπερβαίνει κατά πολύ τα επίπεδα που απαιτούνται για την πρόκληση σημαντικού θανάτου κερατινοκυττάρων [220, 221]. Έτσι, η ανακατανομή του αυτοαντιγόνου που παρατηρήθηκε σε αυτές τις μελέτες μπορεί να συνέβη κατά τη διάρκεια πρώιμων αποπτωτικών συμβάντων.

1.2.7 Παραγωγή anti-TRIM21/Ro52 αντισωμάτων σε ασθενείς και ζωικά πειραματικά μοντέλα

1.2.7.1 Ο ρόλος του BAFF στις anti-TRIM21/Ro52 ανοσολογικές αποκρίσεις

Οι διαταραγμένοι μηχανισμοί ανοχής, η αυξημένη παρουσίαση αντιγόνου και η έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών πιστεύεται ότι οδηγούν την αυτοαντιδραστική ενεργοποίηση των B κυττάρων, οδηγώντας σε παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Ως εκ τούτου, είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης TRIM21/Ro52 είναι σημαντικά αυξημένα στο επιθήλιο του πόρου των σιελογόνων αδένων ασθενών με SjS, συσχετιζόμενο με τη φλεγμονή και τη διήθηση λεμφοκυττάρων [222]. Διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει άμεσα τα επίπεδα αντισωμάτων anti-TRIM21/Ro52 στον ορό με τη σοβαρότητα της νόσου. Οι υψηλότεροι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων αυτών στο πρωτοπαθές SjS σχετίζονται με μεγαλύτερες εντοπισμένες και συστηματικές εκδηλώσεις της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της διόγκωσης των παρωτίδων, των αιματολογικών διαταραχών και της συμμετοχής του κεντρικού νευρικού συστήματος [223].

Μελέτες σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων υποδηλώνουν σύνδεση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης BAFF και των αυτοαντισωμάτων anti-TRIM21/Ro52 [224].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που οδηγεί την παραγωγή των anti-TRIM21/Ro52 είναι η επέκταση επιτόπων, όπου κατά τη διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής, η έκθεση φυσιολογικά απομονωμένων αυτοαντιγόνων προκαλεί δευτερογενή ανοσοαπόκριση έναντι ενδογενών επιτόπων [225]. Αυτός ο μηχανισμός επέκτασης επιτόπου αποδείχθηκε σε ποντίκια ανοσοποιημένα με το αυτοαντιγόνο Ro60 συν το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund. Μετά από επαναλαμβανόμενες αναμνηστικές ανοσοποιήσεις με Ro60, τα ποντίκια ανέπτυξαν μια νέα ανοσολογική απόκριση με παραγωγή αντισωμάτων έναντι του μη σχετιζόμενου αυτοαντιγόνου TRIM21/Ro52 [226]. Αυτό συμφωνεί με δεδομένα ασθενών με SjS, σύμφωνα με τα οποία τα άτομα μπορούν να εμφανίζουν αντισώματα έναντι του Ro60 μόνα τους ή σε συνδυασμό με αντισώματα έναντι του TRIM21/Ro52 [226, 227].

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα TRIM21 και Ro60 είναι δομικά και λειτουργικά διακριτές πρωτεΐνες που καταλαμβάνουν διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Το Ro60 (TROVE2) είναι μια πρωτεΐνη σε σχήμα δακτυλίου που σχηματίζει σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών με μη κωδικοποιητικό (Y) RNA. Με τη σύνδεση των λανθασμένα αναδιπλωμένων Y-RNA, το Ro60 μπορεί να βοηθήσει στην αποδόμησή τους [228]. Άμεσες αλληλεπιδράσεις και σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ Ro60 και TRIM21/Ro52 δεν έχουν τεκμηριωθεί, αν και μπορεί να είναι δυνατές παροδικές αλληλεπιδράσεις [228]. Μια υπόθεση για το πώς ο μηχανισμός επέκτασης του επιτόπου θα μπορούσε να προκαλέσει διπλή θετική αυτοαντιδραστικότητα έναντι των Ro52/Ro60, είναι ότι εάν ένας ασθενής με αυτοάνοσο νόσημα εμφανίσει αντιδραστικότητα έναντι ενός από αυτά τα αντιγόνα (Ro60 ή Ro52), οι παροδικές αλληλεπιδράσεις αντιγόνου μπορεί να εκθέσουν επιτόπους από το άλλο αντιγόνο, οδηγώντας σε δευτερεύουσα αυτοάνοση απόκριση [229].

1.2.7.2 Επίτοποι στόχοι του anti-TRIM21/Ro52

Η ανοσοποίηση ποντικών NZM2758 με πρωτεΐνες σύντηξης MBP που αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιοχές του TRIM21 ποντικού, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιτόπων-στόχων αντισωμάτων αντι-TRIM21/Ro52 και του τρόπου με τον οποίο σχετίζονται με τις διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις. Δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων που δημιουργήθηκαν έναντι των διαφορετικών περιοχών του TRIM21/Ro52, ωστόσο ορισμένοι επίτοποι συσχετίστηκαν με διαταραχή των σιελογόνων αδένων σε αυτά τα ποντίκια. Συγκεκριμένα, τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν έναντι της περιοχής περιελιγμένης σπείρας του TRIM21/Ro52 μείωσαν την παραγωγή σιέλου, υποδηλώνοντας μια σύνδεση μεταξύ συγκεκριμένων στόχων αντισωμάτων και της παθογένειας του SjS [230]. Τα ευρήματα αυτά αντικατοπτρίζουν και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, επιβεβαιώνοντας ότι η περιοχή περιελιγμένης σπείρας είναι ο πιο αντιγονικός επίτοπος. Για παράδειγμα, το 97% των ασθενών με αυτοάνοσες ρευματικές ασθένειες, και οι οποίοι είναι επίσης θετικοί κατά του αντισώματος TRIM21/Ro52, παράγουν αντισώματα που στοχεύουν την περιοχή περιελιγμένης σπείρας [231].

Εκτεταμένες μελέτες χαρτογράφησης επιτόπων σε ασθενείς με SjS έχουν αναδείξει την παρουσία αυτοαντισωμάτων που στρέφονται εναντίον άλλων περιοχών του TRIM21/Ro52, συμπεριλαμβανομένης της C-τερματικής περιοχής (PRY/SPRY) που δεσμεύει την ανοσοσφαιρίνη. Ωστόσο, το κατά πόσον τα αυτοαντισώματα που στρέφονται κατά της C-τερματικής περιοχής συμμετέχουν ή όχι στην παθογένεια και σχετίζονται ενεργά με τις διάφορες κλινικές εκδηλώσεις του SjS (π.χ. δυσλειτουργία των αδένων), μένει να διευκρινιστεί.

1.2.8 Anti-TRIM21/Ro52 αυτοαντισώματα σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα

Τα αυτοαντισώματα είναι σημαντικά εργαλεία για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων αποτελούν σημαντικούς διαγνωστικούς δείκτες, με ποικίλη ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να αντικατοπτρίζουν και τη δραστηριότητα της νόσου (όπως τα αντισώματα anti-dsDNA σε ασθενείς με SLE και τα anti-HMGCR ή αντισώματα anti-SRP σε νεκρωτικές μυοπάθειες) [232-236].

Τα anti-Ro52 (ή anti-TRIM21) αυτοαντισώματα αποτελούν από τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα αυτοαντισώματα σε ορούς ασθενών με νοσήματα του συνδετικού ιστού και συχνά συσχετίζονται με την παρουσία και άλλων αυτοαντισωμάτων [237]. Λόγω αυτής της χαμηλής ειδικότητάς τους για τα διάφορα νοσήματα, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλοί διαγνωστικοί δείκτες.

1.2.8.1 Ιστορικά στοιχεία των anti-Ro/SSA αντισωμάτων

Το 1958 περιεγράφηκε για πρώτη φορά η παρουσία αντισωμάτων που στρέφονται έναντι εκχυλισμάτων των σιελογόνων και των δακρυϊκών αδένων σε ορούς ασθενών με SjS, χρησιμοποιώντας μια δοκιμή ιζηματοποίησης-διάχυσης άγαρ-γέλης [238]. Όταν ορός ασθενών με SjS επωάστηκε σε εκχυλίσματα δακρυϊκών και υπογνάθιων σιελογόνων αδένων, διαπιστώθηκε η παρουσία μιας μάντας ιζηματίνης. Χρησιμοποιώντας μια διαφορετική δοκιμασία κατακρήμνισης (τεχνική Outcherlony), οι Anderson et al. διαπίστωσαν την παρουσία δύο διακριτών αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με SjS, που στρέφονται εναντίον δύο διακριτών ενδοκυτταρικών αντιγόνων και ανιχνεύονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών ιστών (και ονομάστηκαν SjD και SjT) [239]. Ο εντοπισμός των αντιγόνων SjD και SjT ενδοκυττάρια αποδείχθηκε σε δοκιμές

που διεξήχθησαν σε εκχυλίσματα κυττάρων λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Αντισώματα anti-SjD και anti-SjT ανιχνεύθηκαν επίσης σε ορούς ασθενών με SLE, RA και SSc. Η ανίχνευση των αντιγόνων SjD και SjT σε εκχυλίσματα σπληνός νεκρού ασθενούς με RA και του οποίου ο ορός περιείχε και τα δύο αντίστοιχα αντισώματα υπέδειξε την αυτοάνοση φύση αυτών των αντισωμάτων. Λίγα χρόνια αργότερα, αυτά τα δύο αντιγόνα ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες Ro/SSA και La/SSB, που σχετίζονται με μικρές κυτταροπλασματικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (ή scRNP) [240, 241]. Το 1983, οι Wolin et al. έδειξαν ότι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 60 kDa (Ro60) ήταν ο κύριος αντιγονικός στόχος των αντισωμάτων anti-Ro/SSA - που απομονώθηκαν από ορούς ασθενών με SLE ή άλλα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα - χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοαποτύπωσης σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa [242]. Το 1988, οι Ben-Chetrit et al. προσδιόρισαν την παρουσία μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 52-kDa (Ro52) ως δεύτερο αντιγονικό στόχο των anti-Ro/SSA αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με SjS, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης [243]. Κεκαθαρμένα αντισώματα anti-Ro60 και anti-Ro52 αντέδρασαν αποκλειστικά με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Τα αντισώματα anti-Ro60 και anti-Ro52 είχαν παρόμοιες κατανομές στις κυτταρικές δομές σε έμμεσο ανοσοφθορισμό στα κύτταρα HeLa, υποδηλώνοντας τον εντοπισμό των πρωτεϊνών Ro60 και Ro52 στο ίδιο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα. Το 1991, οι Itoh et al. απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Ro60 και Ro52 κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια χωρίς ομολογία αλληλουχίας [244].

1.2.8.2 Anti-Ro/SSA αντισώματα

Τα anti-Ro52/TRIM21 αυτοαντισώματα συχνά ανιχνεύονται σε συνδυασμό με τα αυτοαντισώματα anti-Ro60 και/ή anti-La. Το Ro60 είναι μια πρωτεΐνη περίπου 60 kDa που δεσμεύει τα μη κωδικοποιητικά RNA και συμμετέχει στον ποιοτικό έλεγχο του RNA εντός των κυττάρων [245]. Το anti-Ro60 IgG αντίσωμα ανιχνεύεται σε αρκετά ρευματικά αυτοάνοσα νοσήματα συμπεριλαμβανομένου του SjS και αποτελεί ένα συχνά ανιχνεύόμενο αυτοαντίσωμα στο διαγνωστικό εργαστήριο. Το La είναι ένα αυτοαντιγόνο 48 kDa που δεσμεύει τα νεοδημιουργηθέντα RNA για να διευκολύνει την επεξεργασία και την ωρίμανσή τους [246]. Τα αυτοαντιγόνα Ro60 και La σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών που συνδέεται παροδικά με το Ro52/TRIM21 [247], γεγονός που μπορεί να εξηγήσει γιατί συνυπάρχουν συνήθως αυτοαντισώματα έναντι και των τριών αυτών πρωτεϊνών. Η διαμοριακή επέκταση επιτόπων έχει αποδειχθεί σε ποντίκια ανοσοποιημένα με πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 που στη συνέχεια αναπτύσσουν αυτοαντισώματα έναντι των αυτοαντιγόνων Ro60 και La [248]. Ωστόσο, ορισμένοι ασθενείς φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν την λεγόμενη επέκταση επιτόπου (epitope spreading) και αναπτύσσουν μόνο anti-Ro52/TRIM21 αυτοαντισώματα. Η απουσία αυτοαντισωμάτων anti-Ro60/La σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί να σχετίζεται με ανοσογενετικούς παράγοντες, τάσεις (ή όχι) για αυτοανοσία ή/και τη φύση του πρωταρχικού αντιγόνου. Ωστόσο, η παρουσία των anti-Ro52/TRIM21 αντισωμάτων χαρακτηρίζει ένα μεγάλο φάσμα νοσημάτων.

Το αυτοαντιγόνο Ro52/TRIM21 βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των εμπύρηνων κυττάρων, αν και το υπόστρωμα αντιπυρηνικού αντισώματος HEp-2 (ANA) δεν αναγνωρίζει αξιόπιστα το IgG αυτοαντίσωμα. Επιπλέον, το anti-Ro52/TRIM21 δεν κατακρημνίζεται πάντα με τη χρήση δοκιμών ανοσοκατακρήμνισης, γεγονός που καθιστά πρόκληση την ταυτοποίηση του

αυτοαντισώματος στο διαγνωστικό εργαστήριο [249]. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλύσεις για την ταυτοποίηση των anti-Ro52/TRIM21 αυτοαντισωμάτων είναι η γραμμική ανοσομέθοδος (LIA) και η ανοσοπροσροφητική δοκιμασία συνδεδεμένη με ένζυμο (ELISA). Οι παλαιότερες μελέτες δεν διαχώριζαν την παρουσία του anti-Ro52/TRIM21 από το anti-Ro60 και, αντ' αυτού, το ομαδοποίησαν στο κοινό αυτοαντίσωμα «anti-Ro» ή «SSA» [250]. Ωστόσο, το anti-Ro52/TRIM21 συνυπάρχει με το anti-Ro60 στο 50% των περιπτώσεων ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του anti-Ro52/TRIM21 IgG και των αυτοαντιγόνων Ro60 ή La [250].

1.2.8.3 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα στο σύνδρομο Sjögren

Όπως περιεγράφηκε παραπάνω, η παρουσία των αυτοαντισωμάτων anti-Ro/SSA ιστορικά χαρακτηρίζουν το SjS. Σε ασθενείς με πρωτοπαθές SjS, αντισώματα anti-Ro52 ανιχνεύονται στο 60% των περιπτώσεων [250]. Τα anti-Ro52 αντισώματα συνδέονται τις περισσότερες φορές με την παρουσία των anti-Ro60 αντισωμάτων, αλλά μεμονωμένη αντιδραστικότητα έναντι του αντιγόνου Ro52 βρίσκεται στο 20-30% των ασθενών [223, 251]. Σε ασθενείς με δευτεροπαθές SjS σε έδαφος άλλων συστηματικών αυτοάνοσων ασθενειών, αντισώματα anti-Ro52 ανιχνεύονται στο 40% των περιπτώσεων [252]. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι οι ασθενείς με SjS και anti-Ro/anti-La αντισώματα φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη ενεργότητα της νόσου σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς αυτά τα αυτοαντισώματα. Τα αντισώματα anti-Ro/anti-La έχουν συσχετιστεί με αδενική δυσλειτουργία, διόγκωση παρωτίδων, κλινικά συστηματικά χαρακτηριστικά (φαινόμενο Raynaud, αρθραλγίες/αρθρίτιδα, αγγειίτιδα, νεφρική προσβολή και περιφερική νευροπάθεια), κυτταροπενία (λευκοπενία, θρομβοπενία) και ανοσολογικά χαρακτηριστικά (υπεργαμμασφαιριναιμία, θετικό ρευματοειδή παράγοντα, κρυοσφαιριναιμία) σε ασθενείς με SjS [232]. Τα anti-Ro/anti-La αντισώματα σχετίζονται επίσης με την προσβολή των πνευμόνων, ιδιαίτερα τη διάμεση πνευμονοπάθεια (ILD) [232]. Την περασμένη δεκαετία, αρκετοί συγγραφείς ανέφεραν ότι τα αντισώματα anti-Ro52 συσχετίστηκαν με κλινικά χαρακτηριστικά του SjS. Οι Retamozo et al. έδειξαν ότι οι υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων anti-Ro52 συσχετίστηκαν με σοβαρή δυσλειτουργία των σιελογόνων αδένων, θετική βιοψία σιελογόνων αδένων, διόγκωση παρωτίδας, αναιμία, λευκοπενία και παρουσία θετικού ρευματοειδούς παράγοντα [223]. Σε αυτή τη μελέτη κοόρτης, οι τίτλοι αντισωμάτων anti-Ro52 συσχετίστηκαν με τα επίπεδα της γ-σφαιρίνης. Σε μια πιο πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη από την Κίνα 527 ασθενών με πρωτοπαθές SjS (pSS), τα

αντισώματα anti-Ro52 συσχετίστηκαν με την παρουσία ILD (ανίχνευση αντισωμάτων anti-Ro52 στο 36% των ασθενών με ILD έναντι 24% των ασθενών χωρίς ILD , $p = 0,003$) [253]. Σε μια ομάδα ασθενών από την Κορέα με πρωτοπαθή SjS, οι Song et al. διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με μεμονωμένη θετικότητα για αντισώματα anti-Ro52 (χωρίς ταυτόχρονη αντιδραστικότητα έναντι anti-Ro60) είχαν μεγαλύτερη κλινική συμμετοχή του ήπατος και των μυών [254]. Οι προκλινικές μελέτες έδειξαν υψηλή έκφραση του αντιγόνου Ro52 στο επιθήλιο του πόρου σε σιελογόνους αδένες ασθενών με πρωτοπαθές SjS, που συσχετίζεται με τοπική διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων [222]. Οι Aqrawi et al. έδειξαν ότι τα ειδικά B-λεμφοκύτταρα για Ro/SSA στους σιελογόνους αδένες ασθενών με πρωτοπαθή SjS ήταν αποκλειστικά πλασματοκύτταρα [255]. Πρόσφατα, οι Hillen et al. έδειξαν την υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης Ro52 στην επιφάνεια των κυκλοφορούντων πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων, αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που εμπλέκονται ιδιαίτερα στις αντικές αποκρίσεις – που σχετίζονται με την υπερδραστηριότητα των B κυττάρων και τη δραστηριότητα ιντερφερόνης τύπου 1 σε ασθενείς με πρωτοπαθές SjS [201]. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση του αντιγόνου Ro52 εμπλέκεται στη δημιουργία ειδικών αντισωμάτων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με πρωτοπαθές SjS.

1.2.8.4 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο

Στον SLE, anti-Ro52 αντισώματα ανιχνεύονται στο 40-50% των ασθενών, κυρίως σε συνδυασμό με anti-Ro60 και anti-La αντισώματα [232]. Η παρουσία μεμονωμένων anti-Ro52 αντισωμάτων στον SLE είναι σπάνια, σε λιγότερο από το 5% των ασθενών [232]. Τα anti-Ro/SSA αντισώματα σχετίζονται με παρουσία υποξείας δερματικής βλάβης και φωτοευαισθησία σε ασθενείς με δερματικό ερυθηματώδη λύκο (CLE) [256]. Οι Popovic et al. ανέφεραν ότι τα επίπεδα των anti-Ro52 αντισωμάτων ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα anti-Ro60 και anti-La αντισωμάτων σε ασθενείς με CLE και ότι οι ασθενείς με CLE και συστηματική νόσο εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα anti-Ro52 αντισωμάτων σε σύγκριση με ασθενείς με περιορισμένη δερματική νόσο [257]. Οι Oke et al. ανέδειξαν ότι η έκφραση του Ro52 αυξήθηκε στα επιδερμικά κύτταρα (κερατινοκύτταρα) σε ασθενείς με φλεγμονώδεις δερματικές παθήσεις – συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με CLE – μετά από έκθεση in vitro σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία [258]. Σε μια σουηδική κοόρτη 232 ασθενών με SLE, τα αντισώματα anti-Ro52 συσχετίστηκαν με υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης και μειωμένο αριθμό λευκοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, όπως συμβαίνει και σε ασθενείς SjS [259]. Επίσης, τα επίπεδα των anti-Ro52 αντισωμάτων συσχετίστηκαν θετικά με τη δραστηριότητα της νόσου [260].

1.2.8.5 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα στη συστηματική σκλήρυνση

Τα αντισώματα anti-Ro52 είναι από τα πιο συχνά ανιχνευόμενα αυτοαντισώματα στην SSc. Ο επιπολασμός τους εκτιμάται περίπου στο 20%, τόσο σε περιορισμένες όσο και σε διάχυτες μορφές της νόσου [232]. Τα anti-Ro52 αντισώματα όπως έχει ήδη αναφερθεί σχετίζονται με την παρουσία anti-Ro60 αντισωμάτων σε περισσότερο από το 80% των ασθενών με SSc και συχνά ανιχνεύονται σε συνδυασμό με ειδικά αυτοαντισώματα για την SSc (αντικεντρομεριδιακά αντισώματα, αντισώματα έναντι RNA πολυμεράσης III και αντι-DNA τοποϊσομεράσης I) [261]. Σε ένα ποσοστό 5% των ασθενών με SSc τα anti-Ro52 αντισώματα είναι τα μόνα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται [232]. Σε μια πολυκεντρική κοόρτη 963 ασθενών, οι Hudson et al. διαπίστωσαν ότι η παρουσία αντισωμάτων anti-Ro52 συσχετίστηκε με την παρουσία ILD (OR 1,53, 95% CI 1,11–2,12, $p = 0,009$) και συνδρόμου επικάλυψης (OR 2,70, 95% CI 1,01–4,19, $p = 0,006$) [252]. Σε αυτή τη μελέτη, η σοβαρότητα της ILD – που μετρήθηκε με την Κλίμακα σοβαρότητας της νόσου Medsger – ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με θετικά anti-Ro52 αντισώματα (OR 1,19, 95% CI 1,04–1,37, $p = 0,008$) [252]. Οι Wodkowski et al. ανέφεραν υψηλότερο επιπολασμό της ILD (OR 2,70, 95% CI 1,75–4,14, $p < 0,0001$) και σημαντικό κίνδυνο θανάτου (HR 1,87, 95% CI 1,24–2,82, $p = 0,003$) σε ασθενείς με SSc και μεμονωμένη θετικότητα για anti-Ro52 αντισώματα σε σύγκριση με ασθενείς με SSc αρνητικούς για την παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων [262]. Σε μια μελέτη κοόρτης από την Αυστραλία σε ασθενείς με SSc, η παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων συνδέθηκε ανεξάρτητα με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ), το φαινόμενο Raynaud, την παρουσία τηλαγγειεκτασιών και τη θνησιμότητα αλλά όχι με την ILD [263]. Οι Tangri et al. παρατήρησαν μια τάση για υψηλότερη συχνότητα ΠΑΥ σε ασθενείς με SSc με θετικά anti-Ro52 αντισώματα [264]. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων σχετικά με τους επιπολασμούς της ILD και της ΠΑΥ

σε ασθενείς με SSc με ή χωρίς αντισώματα anti-Ro52 θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την ετερογένεια των υποτύπων της SSc και τους ορισμούς μεταξύ των μελετών (χρήση CT θώρακος υψηλής ανάλυσης ή όχι για τον προσδιορισμό της ILD και εκτιμώμενη συστολική πνευμονική αρτηριακή πίεση σε υπερηχοκαρδιογραφία για την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση) [232].

1.2.8.6 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα στις φλεγμονώδεις μυοσίτιδες

Οι φλεγμονώδεις μυοσίτιδες είναι μια ετερογενής ομάδα φλεγμονωδών νοσημάτων των μυών που περιλάμβαναν ιστορικά την πολυμυοσίτιδα (polymyositis, PM), τη δερματομυοσίτιδα (dermatomyositis, DM) και τη μυοσίτιδα εγκλείστων σωματίων (inclusion body myositis, IBM). Πρόσφατα, αυτή η ταξινόμηση επανεξετάστηκε σύμφωνα με την ανάδειξη νέων ιδιοτήτων των σχετιζόμενων αυτοαντιγόνων [265]. Οι PMs υποδιαιρούνται πλέον σε νεκρωτικές μυοπάθειες που προκαλούνται από διαταραχή του ανοσοποιητικού και σε επικαλυπτόμενες μυοσίτιδες όπως το σύνδρομο αντισυνθετάσης (ASS). Τα anti-Ro52 αντισώματα είναι τα πιο συχνά αυτοαντισώματα που εντοπίζονται σε ασθενείς με φλεγμονώδη μυοσίτιδα, σχεδόν στο 30% των περιπτώσεων [266]. Τα anti-Ro52 αντισώματα ανιχνεύονται ακόμη πιο συχνά σε ασθενείς με ASS, σχεδόν στο 40-60% των περιπτώσεων [232]. Το ASS είναι ένα σύνδρομο επικάλυψης νοσημάτων του συνδετικού ιστού που χαρακτηρίζεται από μυϊκές, πνευμονικές, αρθρικές, δερματικές εκδηλώσεις και την ανίχνευση ειδικών αυτοαντισωμάτων (αντισώματα anti-αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης) σε ορούς ασθενών [267]. Σε αντίθεση με άλλες συστηματικές αυτοάνοσες διαταραχές, στους ασθενείς αυτούς τα anti-Ro52 αντισώματα εμφανίζονται συχνά χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία των anti-Ro60 αντισωμάτων [232]. Η παρουσία αντισωμάτων anti-Ro52 σε ασθενείς με ASS φαίνεται να σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, ιδιαίτερα τον επιπολασμό και τη σοβαρότητα της ILD. Σε μια Γαλλική κοόρτη 89 ασθενών με ASS και θετικά anti-Jo1 αντισώματα, τα anti-Ro52 αντισώματα συσχετίστηκαν με περισσότερο συμπτωματικές μορφές της ILD, σοβαρότερη μυϊκή προσβολή καθώς και συχνότερη συμμετοχή των αρθρώσεων κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης [268]. Οι συγγραφείς παρατήρησαν επίσης την παρουσία μιας τάσης για μειωμένη επιβίωση σε ασθενείς με ASS και θετικά anti-Ro52 αντισώματα. Οι Bauhammer et al. ανέφεραν

ότι τα anti-Ro52 αντισώματα συσχετίστηκαν με πιο οξείας έναρξης ILD, με ανάγκες σε O2-θεραπεία σε ασθενείς με ASS και επίσης ασθενείς με υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων φάνηκε να διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο σοβαρής ILD [269]. Σε μια πιο πρόσφατα δημοσιευμένη ομάδα ασθενών με ASS, οι Shi et al. έδειξαν ότι τα anti-Ro52 αντισώματα συσχετίστηκαν σημαντικά με ILD και οι θετικοί σε anti-PL7 ασθενείς και anti-Ro52 αντισώματα εμφάνισαν ταχεία, προοδευτικά εξελισσόμενη ILD [270]. Σε μια κοόρτη ασθενών, που περιελάμβανε ασθενείς με σύνδρομο αντισυνθετάσης και ασθενείς με DM με θετικά anti-MDA5 αντισώματα, οι Xing et al. ανέφεραν υψηλότερη συχνότητα ILD σε ασθενείς με αντισώματα anti-Ro52 [271]. Σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς με DM και θετικά anti-MDA5 και anti-Ro52 αντισώματα είχαν πιο σοβαρής μορφής ILD και μειωμένη επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς με μεμονωμένα anti-MDA5 θετικά αντισώματα. Στη νεανική μυοσίτιδα, μετά τον έλεγχο της παρουσίας ειδικών για τις μυοσίτιδες αυτοαντισωμάτων, τα αντισώματα anti-Ro52 συσχετίστηκαν επίσης με υψηλότερο επιπολασμό της ILD (36% των θετικών σε anti-Ro52 ασθενών έναντι 4% των αρνητικών σε anti-Ro52 ασθενών, $p < 0,001$), συχνότερη εξέλιξη σε χρόνια νόσο, λιγότερο συχνή ύφεση και αυξημένο αριθμό διαφορετικών φαρμάκων που ελήφθησαν κατά την παρακολούθηση [280]. Η συσχέτιση των anti-Ro52 αντισωμάτων με τον καρκίνο εξακολουθεί να είναι θέμα συζήτησης, καθώς μόνο μία μελέτη ανέφερε θετική συσχέτιση σε ενήλικες ασθενείς με ASS [268], ενώ άλλες δεν ανέφεραν καμία συσχέτιση [269,270]. Είναι ενδιαφέρον ότι οι Gomez-Martin et al. έδειξαν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Ro52 που σχετίζεται με μειωμένο προφίλ ουβικουΐτινοποίησης σε περιφερειακά CD4⁺ T κύτταρα και μονοκύτταρα ασθενών με φλεγμονώδεις μυοσίτιδες σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [281]. Μετά από μη ειδική διέγερση, παρατήρησαν υψηλότερη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα T κύτταρα (IL-17A, TNF- α) και μονοκύτταρα (IL-6, IFN- α) σε ασθενείς με

φλεγμονώδεις μυοσίτιδες [281]. Σε βιοψίες μυών ασθενών με μυοσίτιδα, οι Krystufona et al. έδειξαν την παρουσία αυξημένης έκφρασης του υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των B-κυττάρων (BAFF-R), του αντιγόνου ωρίμανσης των B-κυττάρων (BCMA) και του διαμεμβρανικού ενεργοποιητή και ρυθμιστή ασβεστίου και του διαμεσολαβητή συνδέτη της κυκλοφιλίνης (TACI) - υποδοχείς του BAFF, μιας κύριας κυτοκίνης που εμπλέκεται στην ωρίμανση και επιβίωση των B κυττάρων – σε ασθενείς με θετικά σε σύγκριση με ασθενείς με αρνητικά anti-Ro52 αντισώματα [282]. Στους μυϊκούς ιστούς ασθενών με θετική στα anti-Ro52 μυοσίτιδα, τα πλασματοκύτταρα συσχετίστηκαν θετικά με την παρουσία πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων(pDCs), BAFF-R, BCMA και TACI. Αυτά τα προκλινικά δεδομένα υποστηρίζουν έναν πιθανό ρόλο των αντισωμάτων anti-Ro52 στην παθογένεση της μυοσίτιδας.

1.2.8.7 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα στη μικτή νόσο του συνδετικού ιστού

Η Μικτή νόσος του συνδετικού ιστού (Mixed Connective Tissue Disease -MCTD) είναι μια αμφιλεγόμενη νοσολογική οντότητα προσβολής του συνδετικού ιστού, που περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Sharp et al., και μοιράζεται τα κλινικά χαρακτηριστικά της SSc, του SLE και της μυοσίτιδας ενώ χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της RNP σε ορούς ασθενών [283]. Σε μια νορβηγική κοόρτη με ασθενείς με MCTD, anti-Ro52 αντισώματα βρέθηκαν στο 30% των ασθενών [284]. Αντισώματα anti-Ro52 ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα με αντισώματα anti-Ro60 στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών. Τα αντισώματα anti-Ro52 συσχετίστηκαν με πιο συχνή παρουσία ILD σε ασθενείς με MCTD (58% των θετικών σε anti-Ro52 έναντι 24% των αρνητικών σε anti-Ro52 ασθενών, $p = 0,001$) [284] και με την εξέλιξη της ILD (OR 3,5, 95% CI 1,2–10,2, $p = 0,02$) [285].

1.2.8.8 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα

Τα αντισώματα anti-Ro52 συχνά ανιχνεύονται και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (σχεδόν στο 40% των ασθενών) [232]. Ορισμένοι ασθενείς με μη αυτοάνοσες διαταραχές, όπως κακοήθειες και λοιμώξεις, έχουν επίσης βρεθεί θετικοί για την παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων [251,286,287].

1.2.8.9 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα σε νοσήματα του ήπατος και των χοληφόρων

Στην αυτοάνοση ηπατίτιδα (autoimmune hepatitis, AIH), τα anti-Ro52 αντισώματα ανιχνεύονται κατά μέσο όρο στο 40% (34,7–45,5%) των περιπτώσεων (124/310) [288-290]. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα πολύ λίγες (ή μελετημένες) κλινικές συσχετίσεις. Οι Zachou et al. [290] διαπίστωσαν ότι εκτός από τους υψηλούς τίτλους IgG ανοσοσφαιρίνης στον ορό και τη συσχέτιση με το HLA-DR3, το anti-Ro52 δεν προβλέπει άλλες διαφορές στα εργαστηριακά χαρακτηριστικά, το προφίλ αυτοαντισωμάτων, την κλινική πορεία, την ανταπόκριση στη θεραπεία ή τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα [290]. Οι Montano-Loza et al. [291] διαπίστωσαν ότι το anti-Ro52 συσχετίστηκε με την παρουσία αντισωμάτων έναντι του διαλυτού ηπατικού αντιγόνου (SLA), ανάπτυξη κίρρωσης και χειρότερη πρόγνωση (θάνατο ή ανάγκη μεταμόσχευσης ήπατος). Επίσης, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσων αφορά στην ταυτόχρονη παρουσία άλλων συστηματικών αυτοάνοσων παθήσεων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παραπάνω συσχετίσεις είναι λιγότερο πιθανό να είναι αποτέλεσμα άλλων συνυπαρχουσών υποκείμενων παθήσεων [291]. Οι Li et al. [288] διαπίστωσαν ότι ο συνολικός

επιπολασμός του anti-Ro52 ήταν υψηλότερος σε ασθενείς με ΑΙΗ σε σύγκριση με ασθενείς με χρόνιες λοιμώξεις από ηπατίτιδα Β ή C, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία του αυτοαντισώματος αυτού σχετίζεται με διεργασίες οι οποίες είναι κατά κύριο λόγο αυτοανόσου φύσεως [288].

Η πρωτοπαθής χολική χολαγγειΐτιδα (primary biliary cholangitis, PBC), φαίνεται επίσης να παρουσιάζει μια ανάλογη συχνότητα ανίχνευσης anti-Ro52 αντισωμάτων με αυτή της ΑΙΗ, στο 40,2% (35,1–45,6%) (132/328) των περιπτώσεων [288, 29-296]. Το anti-Ro52 είναι, στην πραγματικότητα, ένα από τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα αντισώματα της οικογένειας των anti-ENA αντισωμάτων σε ασθενείς με PBC και σημαντικά περισσότερο ανιχνεύσιμο από τα anti-Ro60 (2,8%) και anti-La (4,7%) σε μία μελέτη [295]. Οι ασθενείς με PBC και ταυτόχρονη παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων φάνηκε να είναι πιο πιθανό να έχουν υψηλότερη χολερυθρίνη ορού, IgM ορού, υψηλότερο ιστολογικό βαθμό και δευτεροπαθές σύνδρομο Sjogren από ότι οι ασθενείς αρνητικοί για anti-Ro52 [295]. Οι ασθενείς με σύνδρομο επικάλυψης PBC-ΑΙΗ έχουν υψηλότερο επιπολασμό του αντισώματος από ό,τι ασθενείς είτε μόνο με PBC είτε μόνο με ΑΙΗ σε 13/16 ασθενείς (81,3%) [296].

1.2.8.10 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα σε παιδιατρικούς ασθενείς

Οι προηγούμενες μελέτες επικεντρώνονται σε ενήλικες ή μεικτούς πληθυσμούς. Δεδομένου ότι οι μηχανισμοί αυτοανοσίας στους παιδιατρικούς ασθενείς μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από τους αντίστοιχους των ενηλίκων, ειδικές μελέτες είναι χρήσιμες για τη διερεύνηση βιολογικών και κλινικών εκδηλώσεων στα παιδιά με αυτοάνοσα νοσήματα. Σχεδόν όλοι οι παιδιατρικοί ασθενείς οι θετικοί για anti-Ro/SSA, είναι επίσης θετικοί για anti-La/SSB [297, 298]. Αν και μία από αυτές τις μελέτες [297] δεν εξέτασε ειδικά τα anti-Ro52, οι συγγραφείς εντούτοις διαπίστωσαν ότι οι θετικοί ασθενείς για anti-Ro/La (έναντι των αρνητικών για anti-Ro/La) έτειναν να διαγνωστούν συχνότερα με SLE και κατά συνέπεια να έχουν αναλογικά πιο συχνά δερματικές εκδηλώσεις και αιματολογικές διαταραχές [297].

Η καλύτερα αναγνωρισμένη παιδιατρική πάθηση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία των anti-Ro52 αντισωμάτων είναι ο νεογνικός ερυθρηματώδης λύκος (neonatal lupus erythematosus, NLE) - μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από δερματικά, καρδιακά, αιματολογικά και άλλα συστηματικά χαρακτηριστικά που προκαλούνται από τη διαπλακουντιακή μεταφορά μητρικών αυτοαντισωμάτων συμπεριλαμβανομένου του anti-Ro52 [299]. Ενώ ο NLE συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με το κυκλοφορούν μητρικό anti-Ro52, μόνο ένα μικρό ποσοστό μητέρων anti-Ro52 θετικών γεννούν βρέφη με NLE [300]. Λιγότερο από το ένα τρίτο των anti-Ro52 θετικών μητέρων έχουν διαγνωσμένη νόσο του συνδετικού ιστού [298]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυτό το αυτοαντίσωμα φαίνεται να είναι άμεσα παθογόνο και η παρουσία του μητρικού anti-Ro/SSA σε υψηλούς τίτλους (Ro52/60) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιακών εκδηλώσεων (συγγενής καρδιακός αποκλεισμός, περικαρδιακή συλλογή, ενδοκαρδιακή ινοελάστωση) σε ασθενείς με NLE [301]. Τα

παιδιά ωστόσο μπορεί να συνεχίσουν να έχουν μακροχρόνιες επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένων νευροψυχιατρικών εκδηλώσεων [298].

Όσον αφορά τις περιπτώσεις παιδιατρικού και ενηλίκου SLE, οι επιπολασμοί των αυτοαντισωμάτων είναι σύμφωνα με αναφορές παρόμοιοι [302]. Σε παιδιατρικούς ασθενείς με SLE τα anti-Ro αυτοαντισώματα συσχετίζονται στενά με θετικά anti-La και anti-dsDNA αυτοαντισώματα, ιδιαίτερα στο γυναικείο φύλο, ασιατικής καταγωγή, και συνύπαρξη SjS. Σε σύγκριση με άλλες ομάδες αυτοαντισωμάτων, τα παιδιά φάνηκε να προσβάλλονται συχνότερα από νεφρική νόσο, αιματολογικές και δερματικές εκδηλώσεις, αλλά λιγότερο συχνά από θρομβωτικά επεισόδια [303].

Αν και αρκετά σπάνιο, το παιδιατρικό SjS με θετικά anti-Ro52 αντισώματα μπορεί να εμφανιστεί σε υποκλινική μορφή και να εκδηλωθεί κυρίως ως μη ειδική συμπτωματολογία με αίσθημα κόπωσης και χαμηλό πυρετό [304]. Το αυτοαντίσωμα αυτό ανιχνεύθηκε σε 7/15 ασθενείς σε μια μικρή μελέτη [305]. Σε μια μελέτη παιδιατρικών ασθενών που συνέκριναν πρωτοπαθές έναντι δευτεροπαθούς SjS, υπήρχε μια τάση συσχέτισης του anti-Ro με την πρωτοπαθή νόσο. Ωστόσο, αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό λόγω του μικρού αριθμού ασθενών [306].

Στη νεανική IM, το anti-Ro52 αποτελούσε το 6,3% όλων των ασθενών (μικρότερο ποσοστό από ό,τι στους ενήλικες) και ήταν το πιο συχνό σχετιζόμενο με μυοσίτιδες αυτοαντίσωμα (myositis associated autoantibody – MAA) [307]. Τα αυτοαντισώματα anti-Ro52 συσχετίστηκαν επίσης με μια πιο χρόνια πορεία μυοσίτιδας σε σύγκριση με μια μονοφασική πορεία [OR 10 (1,3–76,9)] [308]. Στους ενήλικες, το anti-Ro52 έχει συσχετιστεί με την παρουσία ενός νέου ειδικού για μυοσίτιδες αυτοαντισώματος (myositis specific autoantibody – MSA), του anti-MDA-5. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι στα παιδιά, κανένας από τους 21 από τους 285 ασθενείς που ήταν θετικοί στο anti-

MDA-5 δεν ήταν θετικός για το anti-Ro52 [309]. Το γεγονός αυτό μπορεί εν μέρει να σχετίζεται με τις διαφορές στις κλινικές εκδηλώσεις της μυοσίτιδας μεταξύ παιδιών και ενηλίκων.

Αν και μεγάλο ποσοστό της ΑΙΗ διαγιγνώσκεται στον παιδιατρικό πληθυσμό [310], μια διεξοδική αναζήτηση της βιβλιογραφίας απέτυχε να βρει μελέτες που εξέταζαν ειδικά παιδιατρικές περιπτώσεις ΑΙΗ και παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων. Ομοίως, δεν βρέθηκαν ειδικές μελέτες για την SSc και την παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων σε παιδιατρικούς πληθυσμούς.

1.3 Anti-Ro52/TRIM21 αντισώματα και ιογενείς λοιμώξεις

1.3.1 Ο ρόλος της μοριακής μίμησης

Αν και οι αιτιολογίες αρκετών αυτοάνοσων νοσημάτων παραμένουν πλήρως κατανοητές, πολλοί παράγοντες έχουν συνδεθεί με τις αυτοάνοσες αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένων της γενετικής προδιάθεσης, της ηλικίας, του περιβάλλοντος, καθώς και των λοιμώξεων. Οι ιοί έχουν θεωρηθεί ως κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που πυροδοτούν τα αυτοάνοσα φαινόμενα σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα [311, 312]. Πολλαπλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγηθεί η διάσπαση της αυτοανοχής μέσω ιογενών λοιμώξεων.

Παραδοσιακά, πιστευόταν ότι οι ιοί φέρουν δομικά παρόμοια αντιγόνα με αυτο-αντιγόνα, τα οποία ενεργοποιούν τα Β και Τ κύτταρα και οδηγούν σε μια διασταυρούμενη αντιδραστική απόκριση τόσο έναντι των εαυτών και μη-αντιγόνων, ένας μηχανισμός γνωστός ως «μοριακή μίμηση» [313]. Η μοριακή μίμηση έχει περιγραφεί για τη στρωματική κερατίτιδα που προκαλείται από τον ιό του απλού έρπητα, τον διαβήτη που προκαλείται από ιό, την αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα που προκαλείται από λοίμωξη από τον ιό Coxsackie, την απομυελινωτική νόσο που προκαλείται από τον ιό της εγκεφαλομυελίτιδας ποντικού (Theiler, TMEV-IDD), και πολλά άλλα [312].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που εμπλέκεται στην εμφάνιση αυτοανοσίας είναι ο τύπου «παράπλευρης ενεργοποίησης» (bystander activation), όπου μια μη ειδική και μια υπερ-αντιδραστική αντική ανοσολογική απόκριση δημιουργεί ένα εντοπισμένο προφλεγμονώδες περιβάλλον μαζί με την απελευθέρωση αυτο-αντιγόνων από τον κατεστραμμένο ιστό. Αυτά τα αυτο-αντιγόνα στη συνέχεια προσλαμβάνονται και παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) για να διεγείρουν τα

προηγούμενως μη ανταποκρινόμενα, αλλά αυτοαντιδραστικά T κύτταρα στην περιοχή, πυροδοτώντας την εμφάνιση αυτοανοσίας [314]. Ένας άλλος μηχανισμός ονομάζεται «εξάπλωση του επιτόπου» (epitope spreading), σύμφωνα με τον οποίο μία ιογενής λοίμωξη πυροδοτεί την απελευθέρωση περισσότερων αυτο-αντιγόνων και την de novo ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών κυττάρων, τα οποία κατά συνέπεια εξαπλώνονται για να στοχεύσουν επιπλέον εαυτούς επιτόπους [315]. Τόσο ο μοριακός μιμητισμός όσο και η παράπλευρη ενεργοποίηση έχουν παρατηρηθεί στο πειραματικό μοντέλο της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE) για τη σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), της μυασθένειας gravis (MG) που προκαλείται από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV), και άλλες αυτοάνοσες παθήσεις [312].

Επιπλέον, οι ιοί μπορεί να καταστήσουν μη αποπτωτικά αυτοαντιδραστικά κύτταρα, όπως παρατηρήθηκε σε B κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό Epstein-Barr (EBV) [316]. Ενώ έχουν προταθεί αρκετές υποθέσεις για την κατανόηση των μηχανισμών που κρύβονται πίσω από την επαγόμενη από τους ιούς αυτοανοσία, η ακριβής συμβολή αυτών των μηχανισμών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή [313, 317].

1.3.1 Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) και αυτοάνοσα νοσήματα

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) είναι ένας πολύ συχνός λοιμογόνος παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των Herpesviridae. Ο HCMV αποτελεί έναν DNA ιό διπλής αλυσού (ds), ενώ χαρακτηρίζεται από μια τεράστια χωρητικότητα γονιδιώματος. Εκτιμάται ότι περιλαμβάνει περισσότερα από 200 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames - ORFs), παρόλο που το προφίλ ριβοσώματος και η ανάλυση μεταγραφής ανίχνευσαν επιπλέον προηγουμένως μη αναγνωρισμένα ORFs (~751 μεταφρασμένα ORFs) [318]. Η λοίμωξη από HCMV παραμένει εφόρου ζωής στον ξενιστή, λόγω της ικανότητας του ιού να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Παρόλο που μια καλά χαρακτηρισμένη ιική δεξαμενή είναι τα αιμοποιητικά κύτταρα, η ακριβής θέση λανθάνουσας κατάστασης παραμένει ακόμα άγνωστη. Είναι ενδιαφέρον, και σε αντίθεση με την κλασική άποψη, το γεγονός ότι η γονιδιακή έκφραση που σχετίζεται με την λανθάνουσα κατάσταση του ιού αντικατοπτρίζει τα λυτικά ιικά μοτίβα, αν και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης [319]. Στις μέρες μας, επίσης επιγενετικές τροποποιήσεις εμφανίστηκαν ως κρίσιμοι παράγοντες στη ρύθμιση της ενεργού/λανθάνουσας λοίμωξης από τον HCMV [320].

Πληθώρα δεδομένων παρουσιάζουν πώς ο HCMV μπορεί να χρησιμοποιήσει αρκετά από τα γονίδιά του για να προκαλέσει τροποποιήσεις τόσο στο έμφυτο όσο και στο προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου [321]. Αυτό το χαρακτηριστικό μαζί με πολλά άλλα, όπως ο εκτεταμένος τροπισμός του ιού, η ικανότητά του να παραμένει στον ξενιστή κατά τις φάσεις λανθάνουσας κατάστασης και η επανενεργοποίησή του, καθιστά τον HCMV υποψήφιο αιτιολογικό παράγοντα για την πρόκληση αυτοανοσίας [321]. Μια αιτιολογική σχέση μεταξύ της λοίμωξης από HCMV και των αυτοάνοσων νοσημάτων δεν μπορεί εύκολα να τεκμηριωθεί επιδημιολογικά, δεδομένου του εκτεταμένου επιπολασμού του HCMV και της

παράλληλης σπανιότητας των αυτοάνοσων νοσημάτων. Όλο και περισσότερα επιστημονικά δεδομένα συσχετίζουν πλέον τη λοίμωξη από HCMV με ρευματικές ασθένειες, όπως τον SLE, την SSc και την RA, αλλά και νευρολογικές διαταραχές, όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, γαστρεντερικές και μεταβολικές διαταραχές, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (T1D).

Το κατά πόσο ο HCMV αυτός καθαυτός αποτελεί το αίτιο εμφάνισης αυτοανοσίας ή παρουσία του ως λοιμογόνος παράγοντας αποτελεί ένα επιφανόμενο που μπορεί απλώς να επιδεινώσει την πορεία των αυτοάνοσων νοσημάτων, δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Από αυτή την άποψη, έχουν προταθεί πολλαπλοί πιθανοί μηχανισμοί που προσπαθούν να εξηγήσουν την επαγόμενη από τον HCMV αυτοανοσία. Ο κυριότερος εξ' αυτών είναι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο μηχανισμός του «μοριακού μιμητισμού», όπου ιικοί επίτοποι με μεγάλη δομική ομοιότητα με τους καθοριστικούς παράγοντες του ξενιστή μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη εαυτών αντισωμάτων σε επίπεδο συγκεκριμένων ιστών, όπως έχει υποτεθεί για την ιική πρωτεΐνη pp65 σε ασθενείς με SLE [322]. Είναι ενδιαφέρον ότι κατά τη λοίμωξη από HCMV, οι ανοσοεπαρκείς ξενιστές τείνουν να αναπτύσσουν μια αυτοάνοση αντίδραση μέσω της δημιουργίας αυτοαντισωμάτων, η οποία εμφανίζεται πιο συχνά στα άτομα με συστηματική συμμετοχή [321]. Οι λήπτες μοσχεύματος μυελού των οστών που έχουν μολυνθεί από τον HCMV συχνά αναπτύσσουν οργανοειδικά αυτοαντισώματα κατά της ανθρώπινης αμινοπεπτιδάσης CD13 ή του κοινού φωσφολιπιδίου, ενώ οι λήπτες μοσχεύματος συμπαγών οργάνων αναπτύσσουν μη οργανοειδικά αυτοαντισώματα [321]. Κατά συνέπεια, η υπεργαμμοσφαιριναιμία, η κρυοσφαιριναιμία και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων είναι κοινά χαρακτηριστικά της μονοκυρήνωσης που προκαλείται από τον HCMV [321]. Αυτή η μη ειδική υπερενεργοποίηση της χυμικής ανοσίας πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει έναν μηχανισμό ιικής ανοσοδιαφυγής, καθώς περιορίζει

τις αποκρίσεις των B-κυττάρων του ξενιστή. Μόλις μολυνθεί ο ιστός, τα ενεργοποιημένα APCs έλκονται στη θέση λοίμωξης και απελευθερώνουν υψηλά επίπεδα κυτοκινών και χημειοκινών που ενεργοποιούν αυτοαντιδραστικά T- ή B-κύτταρα, οδηγώντας σε απώλεια της ανοσιακής ανοχής, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «παράπλευρη ενεργοποίηση». Αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν έναν ρόλο της λοίμωξης από HCMV στην αγγειακή βλάβη και στένωση, ένα συμβάν που είναι αρκετά συχνό και θανατηφόρο σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα [321].

1.3.1.1 Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) και συστηματική σκλήρυνση

Μεταξύ των διαφόρων λοιμογόνων παραγόντων, οι ερπητοϊοί έχουν προταθεί ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες στην ανοσοπαθогένεση της SSc [323,324]. Πράγματι, αντισώματα έναντι του HCMV και του EBV έχει φανεί να ανιχνεύονται συχνότερα σε ασθενείς με SSc παρά σε υγιείς μάρτυρες [325-327].

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με SSc σε μία μελέτη από την Ελβετία (59% θετικότητα για αντισώματα έναντι του HCMV σε ασθενείς με SSc σε σύγκριση με 12-2% στην ομάδα ελέγχου) [328] δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες μέχρι στιγμής [321, 327], παρόλο που υψηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων έναντι του HCMV έχουν βρεθεί σε ασθενείς με SSc [321]. Από αυτή την άποψη, μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να διευκρινίσουν γιατί ένας πανταχού παρών ιός όπως ο HCMV προκαλεί μια αυτοάνοση απόκριση σε ορισμένα άτομα, ενώ σε άλλα δεν έχει καμία επίδραση.

Ο HCMV μπορεί να διατηρήσει την ικανότητα ενεργού, επίμονου πολλαπλασιασμού για όλη τη διάρκεια ζωής ενός ανοσοεπαρκούς ξενιστή, ιδιαίτερα χάρη στον τροπισμό του απέναντι στα μακροφάγα και το ενδοθήλιο [329]. Ξεκινώντας από την παρατήρηση

ότι τα αντισώματα έναντι του HCMV φαίνεται να επικρατούν σε ασθενείς με SSc [328] και ότι η ιική πρωτεΐνη UL70 μπορεί να αναγνωριστεί από το αντίσωμα έναντι της τοποϊσομεράσης I, οι Lunardi et al. [330] πρότειναν έναν νέο μηχανισμό παθογένεσης της SSc με βάση το μηχανισμό της μοριακής μίμησης του HCMV με την κυτταρική πρωτεΐνη NAG-2 που εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, με τους τελευταίους να εμπλέκονται στον λεγόμενο «φαινότυπο που μοιάζει με σκληρόδερμα» που συνδέεται με την παθογένεση της SSc [321, 330].

Μια πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου της Κλινικής Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας [331] αξιολόγησε τη σχέση μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης ασθενών με SSc σε έξι κύρια αντιγόνα του HCMV (και συγκεκριμένα τα UL57, UL83, UL55, UL44, p38 και UL99) και συγκεκριμένα κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Φάνηκε λοιπόν ότι η παρουσία αντισωμάτων anti-UL44 συσχετίζεται με την παρουσία αρθρίτιδας, που αποτελεί ένα κλινικό χαρακτηριστικό των ασθενών με SSc [331]. Αυτό το εύρημα υποστηρίζει την άποψη ότι τα αντισώματα κατά του HCMV μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διακοπή της ανοχής και στην ενεργοποίηση της παθογένεσης της SSc.

1.3.1.2 Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) και συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

Ο SLE είναι ένα χρόνια αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του συνδετικού ιστού και ετερογενείς κλινικές εκδηλώσεις, που κυμαίνονται από απλά δερματικά και μυοσκελετικά χαρακτηριστικά έως προσβολή των νεφρών και/ή του κεντρικού νευρικού συστήματος, που συχνά σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Αν και τα αίτια που προκαλούν την εμφάνιση SLE δεν είναι σαφώς

κατανοητά, το νόσημα αυτό οφείλεται σε συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, λοιμώδεις παράγοντες και στρες) [321].

Όλοι οι ασθενείς με SLE εμφανίζουν διαταραχές στα αρχέγονα κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια Τ-κυττάρων, ενεργοποίηση πολυκλωνικών Β-κυττάρων, σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων και παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Από αυτή την άποψη, η ικανότητα του HCMV να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στον ξενιστή και να μετατοπίζεται περιοδικά μεταξύ του λυτικού και του λανθάνοντος σταδίου έχει συνδεθεί με την ανώμαλη χυμική απόκριση στον SLE [321]. Ο αυξημένος τίτλος anti-HCMV IgM/IgG αντισωμάτων τείνει να συσχετίζεται με κλινικές και ανοσολογικές εκδηλώσεις του SLE [332]. Διάφορες μελέτες που βρήκαν συσχέτιση μεταξύ του HCMV και του SLE έχουν πραγματοποιηθεί [321]. Επιπρόσθετα, διαφορές στον επιπολασμό της λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με SLE αναφέρθηκαν από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Για παράδειγμα, οι Takizawa et al. [333] διαπίστωσαν ότι 149 από τους 151 ασθενείς με ρευματολογική νόσο είχαν μολυνθεί από HCMV, ενώ και οι 74 ασθενείς με SLE ήταν θετικοί για λοίμωξη από HCMV. Οι Newkirk et al. [334] διαπίστωσαν ότι ο επιπολασμός της λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με SLE ήταν 60% χρησιμοποιώντας ειδικό κιτ ELISA για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων για τον HCMV. Μετά την προσαρμογή για τον ρευματοειδή παράγοντα, οι Su et al. [335] διαπίστωσαν ότι 84 από τους 87 ασθενείς με SLE (96,55%) ήταν θετικοί για HCMV IgG αντισώματα και ότι εννέα από αυτούς (10,34%) ήταν θετικοί για HCMV IgM αντισώματα. Από την άλλη πλευρά, αρκετές άλλες μελέτες δεν παρατήρησαν άμεση συσχέτιση μεταξύ της θετικότητας αντισωμάτων έναντι του HCMV και του SLE [336-338].

Ένας πιθανός ρόλος του HCMV στην παθογένεση του SLE προτάθηκε αρχικά από διάφορες ομάδες μετά τον εντοπισμό συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων που προκαλούνται από λοίμωξη από τον HCMV [321]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί αυτό της πρωτεΐνης LA, όπου ο HCMV μπορεί άμεσα - ή έμμεσα, μέσω μοριακής μίμησης - να προκαλέσει έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια αυτής της μικρής πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα [334]. Στη συνέχεια, δύο ανεξάρτητες ομάδες [322,339] έδειξαν ότι η ανοσοποίηση προηγουμένως μη-αυτοάνοσων ποντικών με πεπτίδια που περιλάμβαναν τον επίτοπο pp65₄₂₂₋₄₃₉ του HCMV οδήγησε στην εμφάνιση αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών συστατικών ενώ προκάλεσε πρώιμα σημάδια νεφρίτιδας που μοιάζουν με τον ανθρώπινο SLE. Επίσης φάνηκε ότι υψηλά επίπεδα αντισωμάτων ορού έναντι της pp65₄₂₂₋₄₃₉ βρέθηκαν σε ασθενείς με SLE, υποδηλώνοντας ότι το pp65 περιείχε B-κυτταρικό επίτοπο ή επιτόπους που θα μπορούσαν να πυροδοτήσουν αυτοανοσία σε άτομα με γενετική προδιάθεση [322]. Πιο πρόσφατα, οι Neo et al. [340] περιέγραψαν μια πιθανή εναλλακτική διεργασία που περιλαμβάνει το UL44, μια φωσφοπρωτεΐνη που δεσμεύει το DNA και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του DNA του HCMV [340]. Κατάφεραν να απομονώσουν ένα ανθρώπινο αντίσωμα UL44 από τους ορούς ασθενών με SLE/HCMV+ IgG, δείχνοντας ότι αυτό θα μπορούσε να συνδεθεί με το UL44 το οποίο βρισκόταν σε συμπλέγματα με αυτοαντιγόνα του SLE εντοπισμένα στην επιφάνεια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής απόπτωσης που προκαλείται από τον ιό. Με βάση αυτά τα ευρήματα, είναι κατανοητό ότι ο HCMV μπορεί να προκαλέσει ή/και να ενισχύσει τη χυμική ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στα πυρηνικά αυτο-αντιγόνα, προδιαθέτοντας τα άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό στην εμφάνιση SLE [340].

1.3.2 Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) και anti-Ro αντισώματα

Ήδη από το 1995 ο Zhu [341] μελέτησε την πιθανή επίδραση του HCMV στην επαγωγή εμφάνισης Ro αυτοαντιγόνων (anti-Ro52/anti-Ro60) σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, ενώ στη συνέχεια κατέγραψε την σύνδεση αυτών των αυτοαντιγόνων με τα αντίστοιχα αυτοαντισώματα. Παρατήρησε λοιπόν ότι μετά την μόλυνση των κερατινοκυττάρων με τον HCMV υπήρξε σημαντική αύξηση της σύνδεσης των anti-Ro60 αυτοαντισωμάτων, αλλά όχι και των anti-Ro52, στην κυτταρική επιφάνεια των κερατινοκυττάρων που είχαν μολυνθεί με τον ιό σε σχέση με αυτά που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου (71,2% έναντι 26,2%, αντίστοιχα, $p < 0,05$) [341]. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ερμηνεία ενός πιθανού παθογενετικού μηχανισμού στην εμφάνιση δερματικών βλαβών χαρακτηριστικών σε ασθενείς με SLE, σε άτομα που έχουν μολυνθεί από τον HCMV [341]. Ο ίδιος ερευνητής ένα χρόνο αργότερα απέδειξε πως η ταυτόχρονη έκθεση ανθρώπινων ινοβλαστών (MRC-5) στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV-B) και στη μόλυνση με τον HCMV είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του αντιγόνου Ro52 (και όχι και του Ro60) στην κυτταρική επιφάνεια των κυττάρων αυτών και κατά συνέπεια αναγνώρισή του από τα αντίστοιχα anti-Ro52 αντισώματα [342]. Το εύρημα αυτό δεν ίσχυε για τους ινοβλάστες που αποτελούσαν ομάδα ελέγχου ή είχαν μόνο μολυνθεί με τον HCMV ή μόνο εκτεθεί στην UV-B. Δεδομένου ότι η παρουσία των anti-Ro αντισωμάτων είχε συσχετιστεί με την εμφάνιση καταστάσεων δερματικού λύκου, τα παραπάνω ευρήματα θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν στην ερμηνεία της παθογένειας του SLE και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων στα οποία τα αυτοαντισώματα αυτά συναντώνται [342].

1.4 Στόχοι

Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

- 1) Η πλήρης χαρτογράφηση των β-κυτταρικών επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc και η αναζήτηση πιθανών διαφοροποιήσεων σε σχέση με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και η αναζήτηση πιθανών συσχετίσεων των όποιων διαφορών με κλινικοεργαστηριακά ευρήματα χαρακτηριστικά των ασθενών με SSc. Απώτερος σκοπός αυτών είναι η καλύτερη κατανόηση των αυτοάνοσων μηχανισμών που συμμετέχουν στην παθογένεση της SSc.
- 2) Όπως έχει περιγραφεί παραπάνω ο HCMV μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων. Ο επόμενος λοιπόν στόχος μας ήταν να εντοπίσουμε ένα ιικό αντιγόνο, το οποίο μπορεί πράγματι να συσχετίζεται ειδικά με anti-Ro52 αντισωματικές αποκρίσεις, καθώς αυτό θα μπορούσε να αποκαλύψει την ενδιαφέρουσα σχέση του HCMV και του Ro52 στη SSc.
- 3) Η μελέτη χαρτογράφησης των β-κυτταρικών επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων σε παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα (χωρίς συνοδό αυτοάνοσο ρευματικό νόσημα), με σκοπό την αναζήτηση της ύπαρξης ή και όχι διαφορών σε σχέση με τους ενήλικες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλαστικά και αναλώσιμα

Υλικό	Εταιρία
Ακρορύγχια πιπετών	Gilson Inc., Γουινσκόνσιν, ΗΠΑ
Απορροφητικό χαρτί τύπου Whatman	Bio-Rad Laboratories Inc., Καλιφόρνια, ΗΠΑ
Πιπέτες τύπου Pasteur 3 ml	Greiner Bio-One GmbH, Γερμανία
Πλακίδια 24 φρεατίων (24-well plate)	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Φορέας επώσης ταινιών δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης 30 καναλιών	Euroimmun AG, Γερμανία
Σύριγγα 20 ml με βελόνα 21 gauge	Webest Medical Product Co., Ltd., Κίνα
Σωληνάρια κρυοαποθήκευσης (cryovials) 1.5 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 ml	FL medical, Ιταλία
Σωληνάρια τύπου Falcon 15 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Σωληνάρια τύπου Falcon 50 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Ταινία εργαστηρίου «Parafilm»	Pechiney Plastic Packaging, Ιλινόι, ΗΠΑ

2.1.2 Μηχανήματα και εργαλεία

Μηχάνημα/εργαλείο	Εταιρία
Αναδευτήρας τύπου Rocker	Heidolph Instruments, Γερμανία
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp Scientifica, Ιταλία
Αυτόκαυστο αποστείρωσης	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Επιτραπέζια φυγόκεντρος Z400 (με ρότορες για σωληνάρια τύπου Falcon 15 ml και 50 ml)	HERMLE Labortechnik GmbH, Γερμανία
Εργαστηριακός απαγωγός αερίων	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Ηλεκτρονικό χρονόμετρο	QIAGEN, Γερμανία
Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας	Velp Scientifica, Ιταλία
Καταψύκτης -20° C	Whirlpool, Μίσιγκαν, ΗΠΑ
Καταψύκτης -74° C	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Πιπέτες Finnpiettes	ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Σύστημα καθαρισμού νερού Dirext Q3	Merck Millipore Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Φωτόμετρο Multimode Plate Reader EnSpire	PerkinElmer Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Ψυγείο 4° C	Whirlpool, Μίσιγκαν, ΗΠΑ

2.1.3 Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες (kit)

Δοκιμασία	Εταιρία
Anti-Ro52 ELISA (IgG)	Inova Diagnostics/Werfen, San Diego, CA
Anti-Ro60 ELISA (IgG)	Inova Diagnostics/Werfen, San Diego, CA
Anti-Ro52 Full antigen and constructs EUROLINE	Euroimmun AG, Γερμανία
ANA Profile EUROLINE	Euroimmun AG, Γερμανία
Systemic Sclerosis Profile EUROLINE	Euroimmun AG, Γερμανία
Anti-CMV WESTERNBLOT (IgG)	Euroimmun AG, Γερμανία

2.1.4 Υλικά για την πραγματοποίηση *in house* ELISA

Υλικό	Εταιρία
Blocking buffer, 2% BSA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Washing buffer 0,1% Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sodium azide 10%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TMB (3,3', 5,5;-τετραμεθυλοβενζιδίνη)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
H2SO4 solution	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.1.5 Πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση επιτόπων

Πεπτίδιο	
Ro52-1 (aa 1-127)	
Ro52-2 (aa 125-268)	
Ro52-3 (aa 268-475)	
Ro52-4 (aa 57-180)	
Ro52-5 (aa 181-320)	

2.1.6 Βιολογικό Υλικό

2.1.6.1 Μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων

Αναλύθηκαν συνολικά 121 ασθενείς με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα και θετικά anti-Ro52 αντισώματα, συμπεριλαμβανομένων 43 ασθενών με SSc (41 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD: 57,83 $\pm$ 12,58 έτη, διάρκεια νόσου: 9,72 $\pm$ 7,4 έτη, 41 ANA θετικοί - διάμεσος τίτλος: 1 /160, εύρος 1/80 έως 1/5.120) ως η ομάδα μελέτης (Πίνακας 2.1), 20 ασθενείς με SjS (18 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD: 52 $\pm$ 11,2 έτη), 28 ασθενείς με SLE (όλοι γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD: 45 $\pm$ 14,3 έτη), 15 ασθενείς με DM (9 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD: 62,13 $\pm$ 11,3 έτη) και 15 ασθενείς με PBC (13 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD: 47,2 $\pm$ 13,4 έτη) (342), ως παθολογικοί μάρτυρες. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν τακτικά στα Εξωτερικά Ιατρεία του Τμήματος Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (344-346). Συμπεριλήφθηκε επίσης μια ομάδα 10 επιπρόσθετων ασθενών με SSc και θετικά anti-Ro52 αντισώματα, οι οποίοι παρακολουθήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Ευαγγελισμός» και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών. Η διάγνωση της SSc βασίστηκε στα Κριτήρια ACR/EULAR του 2013 για την SSc (17), η διάγνωση του SjS στα κριτήρια ACR/EULAR 2016 (347), η διάγνωση του SLE στα Κριτήρια SLICC του 2012 (348), η διάγνωση της DM στα κριτήρια Bohan και Peter για την πολυμυοσίτιδα και δερματομυοσίτιδα (349 , 350). Η διάγνωση της PBC βασίστηκε στα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια για την PBC (342, 351).

Πενήντα (50) ασθενείς anti-Ro52 αρνητικοί με διάφορα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα καθώς και άλλες αυτοάνοσες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων 12 ασθενών με SSc, 10 με SjS, 12 με SLE, 5 με DM και 11 με PBC, συμμετείχαν στη μελέτη ως ομάδα ελέγχου.

Είκοσι υγιή άτομα (όλα anti-Ro52 αρνητικά) μελετήθηκαν επίσης ως φυσιολογικοί μάρτυρες (NCs) (18 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD: 52,8 $\pm$ 10,9 έτη).

Ελήφθη γραπτή συγκατάθεση κατόπιν πλήρους ενημέρωσης από όλους τους ασθενείς καθώς και των εθελοντών της ομάδας ελέγχου. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τροποποιημένη δήλωση του Ελσίνκι. Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες συμμετείχαν στη μελέτη μετά από έγκριση του ερευνητικού πρωτοκόλλου από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1. Κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ασθενών με Συστηματική Σκλήρυνση.

	Ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση n=32
Τύπος SSc	
lcSSc (n,%)	20 (62.5)
dcSSc (n,%)	12 (37.5)
Modified Rodnan Skin Score (mean±SD)	7.84 ± 8.4
Πνευμονική Ίνωση (n,%)	11 (34.4)
Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (n,%)	4 (12.5)
Έλκη (n,%)	12 (37.5)
Γαστρεντερική συμμετοχή	
Ανώτερο (n,%)	18 (56.2)
Κατώτερο (n,%)	0
Ανώτερο και κατώτερο (n,%)	1 (3.1)
Αρθρίτιδα (n,%)	12 (37.5)
Ορογονίτιδα (n,%)	3 (9.4)
Τηλαγγειεκτασίες (n,%)	16 (50.0)
Ασβεστώσεις (n,%)	2 (6.3)
Νεφρική κρίση (n,%)	0
Σύνδρομο επικάλυψης/Μικτή νόσος συνδετικού ιστού (n,%)	8 (25.0)
Ξηροστομία (n,%)	12 (37.5)

Ξηροφθαλμία (n,%)	7 (21.9)
Εξάνθημα (n,%)	7 (21.9)
Ακροοστεόλυση (n,%)	5 (15.6)

Αυτοαντισώματα	
-Scl-70 (n, %)	5 (15.6)
-CENPA (n, %)	12 (37.5)
-CENPB (n, %)	12 (37.5)
-RP11 (n, %)	1 (3.1)
-RP155 (n, %)	3 (9.4)
-Fibrillarin (n, %)	1 (3.1)
-NOR90 (n, %)	3 (9.4)
-Th/To (n, %)	0 (0)
-PM-Scl 100 (n, %)	0 (0)
-PM-Scl 75 (n, %)	2 (6.3)
-Ku (n, %)	4 (12.5)
-PDGFR (n, %)	0 (0)
-Ro52 (n, %)	32 (100)
-Ro60 (n, %)	13 (40.6)
-La (n, %)	5 (15.6)

*Συντομογραφίες: dcSSc = διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση, lcSSc= περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση

2.1.6.2 Μελέτη anti-HCMV αντισωμάτων

Δείγματα ορών από ασθενείς με SSc, SLE και SjS, που είχαν προηγουμένως ανιχνευτεί ως θετικά για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του Ro52 και για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του HCMV με ELISA, αξιολογήθηκαν περαιτέρω. Αυτοί περιλάμβαναν 58 ασθενείς με SSc (54 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [57,2 $\pm$ 12,9] έτη, διάρκεια νόσου 8,65 $\pm$ 7,5 έτη), συμπεριλαμβανομένων 29 anti-Ro52(+) (28 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [56 $\pm$ 12,5], εύρος 31–78 ετών) και ίσος αριθμός 29 ασθενών anti-Ro52(–) (26 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [58,5 $\pm$ 13,5] έτη). 32 ασθενείς με SLE (31 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [52,1 $\pm$ 13,5] έτη, διάρκεια νόσου 7,8 $\pm$ 6,1 έτη), συμπεριλαμβανομένων 23 anti-Ro52(+) (22 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [52 $\pm$ 14,4] έτη) και 9 ασθενείς anti-Ro52(–) (9 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [51,4 $\pm$ 11,6] έτη) εξετάστηκαν επίσης ως ομάδα ελέγχου. Μια επιπλέον ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 26 ασθενείς με SjS (22 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [46,1 $\pm$ 9,5] έτη, διάρκεια νόσου 4,2 $\pm$ 3,5 έτη), συμπεριλαμβανομένων 18 anti-Ro52(+) [15 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [48,1 $\pm$ 9,2] έτη) και 8 ασθενείς anti-Ro52(–) (7 γυναίκες, μέση ηλικία $\pm$ SD [43,2 $\pm$ 8,1] έτη)]. Όλοι οι ασθενείς είχαν θετικά ANA προσδιορισμένα με έμμεσο ανοσοφθορισμό και παρακολουθούνταν στα Εξωτερικά Ιατρεία του Τμήματος Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, Ελλάδα [141, 346, 352].

Τα κύρια κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 2.2 (για τη SSc) και στον Πίνακα 2.3 (για τον SLE).

Ελήφθησαν δείγματα ορού από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες μετά από γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση. Η μελέτη διεξήχθη μετά από έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, Σχολή

Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα (ECA #2406/18-06-2015 και ECA 59844/13-12-2016).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2. Κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των 29 anti-Ro52(+) και των 29 anti-Ro52(-) ασθενών με SSc.

	Ασθενείς με SSC (n=58)	Anti- Ro52(+) (n=29)	Anti- Ro52(-) (n=29)	P
Κλινικά Χαρακτηριστικά				
<i>Τύπος SSc</i>				NS
- <i>lcSSc (n,%)</i>	29 (50.0)	17 (58.6)	12 (41.4)	
- <i>dcSSc (n,%)</i>	29 (50.0)	12 (41.4)	17 (58.6)	
<i>Δακτυλικά Έλκη (n,%)</i>	17 (27.6)	11 (37.9)	6 (20.7)	NS
<i>Γαστρεντερική συμμετοχή (n,%)</i>	37 (63.8)	18 (62.1)	19 (65.5)	NS
<i>Αρθρίτιδα (n,%)</i>	14 (24.1)	11 (37.9)	3 (10.4)	<u>0.029</u>
<i>Ορογονίτιδα (n,%)</i>	5 (8.6)	3 (10.4)	2 (6.9)	NS
<i>Τηλαγγειεκτασίες (n,%)</i>	40 (69.0)	15 (51.7)	25 (86.2)	<i>0.01</i>
<i>Ασβετώσεις (n,%)</i>	8 (13.8)	2 (6.9)	6 (20.7)	NS
<i>Πνευμονική Τνωση (n,%)</i>	25 (43.1)	11 (37.9)	14 (48.3)	NS
<i>Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (n,%)</i>	21 (36.2)	4 (13.8)	17 (58.6)	<i>0.001</i>
<i>Νεφρική κρίση (n,%)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
<i>Σύνδρομο Επικάλυψης (n,%)</i>	10 (17.2)	8 (27.6)	2 (6.9)	NS
Αυτοαντισώματα				
<i>-Scl-70 (n,%)</i>	18 (31.0)	5 (17.2)	13 (44.8)	<i>0.023</i>
<i>-CENPA (n,%)</i>	17 (29.3)	10 (34.5)	7 (24.1)	NS
<i>-CENPB (n,%)</i>	17 (29.3)	10 (34.5)	7 (24.1)	NS
<i>-RP11 (n,%)</i>	2 (3.4)	1 (3.5)	1 (3.5)	NS
<i>-RP155 (n,%)</i>	4 (6.9)	3 (10.4)	1 (3.5)	NS
<i>Ro60 θετικοί (n, %)</i>	17 (29.3)	13 (44.8)	4 (13.8)	<u>0.02</u>

* οι υπογραμμισμένες τιμές *p* υποδηλώνουν ότι το χαρακτηριστικό ήταν συχνότερο σε anti-Ro52(+) ασθενείς με SSc και

**οι τιμές *p* με πλάγια γράμματα υποδηλώνουν ότι το χαρακτηριστικό ήταν λιγότερο συχνό σε anti-Ro52(+) ασθενείς με SSc

Συντομογραφίες: SSc= Συστηματική σκλήρυνση, dcSSc = διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση, lcSSc= περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση, CPK, creatine phosphokinase (φωσφοκινάση της κρεατίνης); Scl-70, anti-Topoisomerase I antibodies; CENPA, anti-centromere-A antibodies; CENPB, anti-centromere-B antibodies; RPII, anti-RNA polymerase III (subunit 11) antibodies; RPI55, anti-RNA polymerase III (subunit 155) antibodies.

Πίνακας 2.3. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE).

	Ασθενείς με SLE (n=32)
Κλινικά χαρακτηριστικά	
-Ηλικία (<i>mean</i> ± <i>SD</i>)	52.1±13.5
-Φύλο (Γ/Α)	31/1
-Διάρκεια νόσου (<i>mean</i> ± <i>SD</i>)	9.13±7.09
-ACL/CCL (n, %)	15 (46.9)
-Raynaud's (n, %)	11 (34.4)
-Έλκη βλεννογόνων (n, %)	2 (6.3)
-Λεμφοδενοπάθεια (n, %)	5 (15.6)
-Φωτοευσθησία (n, %)	10 (31.3)
-Ξηροστομία (n, %)	9 (28.1)
-Ξηροφθαλμία (n, %)	8 (25)
-Αλωπεκία (n, %)	4 (12.5)
-Αρθρίτιδα/αρθραλγίες (n, %)	16 (50.0)
-Ορογονίτιδα (n, %)	9 (28.1)
-Νεφρική προσβολή (n, %)	7 (21.9)
-Νευρολογική προσβολή (n, %)	7 (21.9)
-Ψυχιατρική προσβολή (n, %)	4 (12.5)
-Αποβολές (n, %)	2 (6.3)
-Πνευμονική ίνωση (n, %)	2 (6.3)
-Αιμολυτική αναιμία (n, %)	10 (31.3)
-Λευκοπενία (n, %)	14 (43.8)
-Θρομβοπενία (n, %)	5 (15.6)

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ανοσοπροσροφητική δοκιμασία στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

Η παρουσία anti-Ro52 αυτοαντισωμάτων προσδιορίστηκε αρχικά με τη χρήση ειδικής γραμμικής ανοσομεθόδου (Euroimmun, Lübeck, Γερμανία) και επιβεβαιώθηκε με ειδική εμπορικά διαθέσιμη ELISA έναντι του Ro52 (Inova Diagnostics/ Werfen, San Diego, CA). Για τον προσδιορισμό της παρουσίας anti-Ro60 αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε ειδική εμπορικά διαθέσιμη ELISA έναντι του Ro60 (Inova Diagnostics/ Werfen, San Diego, CA).

2.2.2 Μελέτη Χαρτογράφησης επιτόπων

Η μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια ειδικά σχεδιασμένη γραμμική ανοσομέθοδο που περιείχε πέντε ανασυνδυασμένα τμήματα του Ro52, εκφρασμένα σε *E. coli*, τα οποία αντιστοιχούν στις εξής αλληλουχίες αμινοξέων: Ro52-1 (aa 1-127), Ro52-2 (aa 125-268), Ro52-3 (aa 268-475) , Ro52-4 (aa 57-180) και Ro52-5 (aa 181-320) (**Εικόνα 2.1**) (21). Για την επιβεβαίωση της αντιδραστικότητας χρησιμοποιήθηκε το πλήρες Ro-52 αντιγόνο, εκφραζόμενο με το σύστημα βακιλοϊού σε κύτταρα εντόμων.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοποίησης για τη δημιουργία των βέλτιστων συνθηκών των πειραμάτων. Η τελική συγκέντρωση κάθε τμήματος καθορίστηκε με βάση τις καμπύλες ROC χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 5, 25, 100μg/ml) που δοκιμάστηκαν σε 20 anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με SSc και 20 anti-Ro52 αρνητικούς υγιείς μάρτυρες. Η τελική συγκέντρωση κάθε τμήματος που

έδωσε ειδικότητα έως και 94% ήταν η εξής: 100μg/ml για το Ro52-1 και 25μg/ml για όλα τα άλλα τμήματα.

Οι ειδικά σχεδιασμένες γραμμικές λωρίδες επώαστηκαν με ορούς (αραίωση 1:100) σε ταλαντευόμενη πλατφόρμα, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά (231). Μετά την αναρρόφηση του υγρού οι λωρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (Euroimmun) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, οι λωρίδες επώαστηκαν σε αλκαλικό σημασμένο με φωσφορικό anti-ανθρώπινο IgG σύμπλοκο (Euroimmun) για 30 λεπτά, ακολουθούμενα από τρεις πλύσεις των 5 λεπτών (231). Τέλος, οι λωρίδες επώαστηκαν σε διάλυμα υποστρώματος 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-φωσφορικού/νιτροκυανού τετραζολίου (Euroimmun) για 10 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό. Αφού στέγνωσαν, οι λωρίδες αξιολογήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού EUROLinScan (Euroimmun) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε αυθαίρετες μονάδες (AU/ml), όπως περιεγράφηκε προηγουμένως λεπτομερώς (20, 231, 344). Για να προσδιορίσουμε τα όρια των τιμών της *in house* γραμμικής ανοσομεθόδου, χρησιμοποιήσαμε ορούς από 70 άτομα αρνητικά για την παρουσία anti-Ro52 αυτοαντισωμάτων (39 με διάφορα AiRDs, 11 με PBC και 20 υγιών μαρτύρων, βλέπε παραπάνω). Για κάθε τμήμα η επιλεγμένη τιμή αναφοράς αντιστοιχούσε στη μέση τιμή + 2SD. Με βάση αυτό, η τιμή αναφοράς ήταν 8 AU/ml για το Ro52-1, 10 AU/ml για το Ro52-2, 4 AU/ml για το Ro52-3, 5 AU/ml για το Ro52-4 και 8 AU/ml για Ro52-5 (Πίνακας 2.4).

2.2.3 In house ELISA έναντι των επιμέρους τμημάτων του Ro52

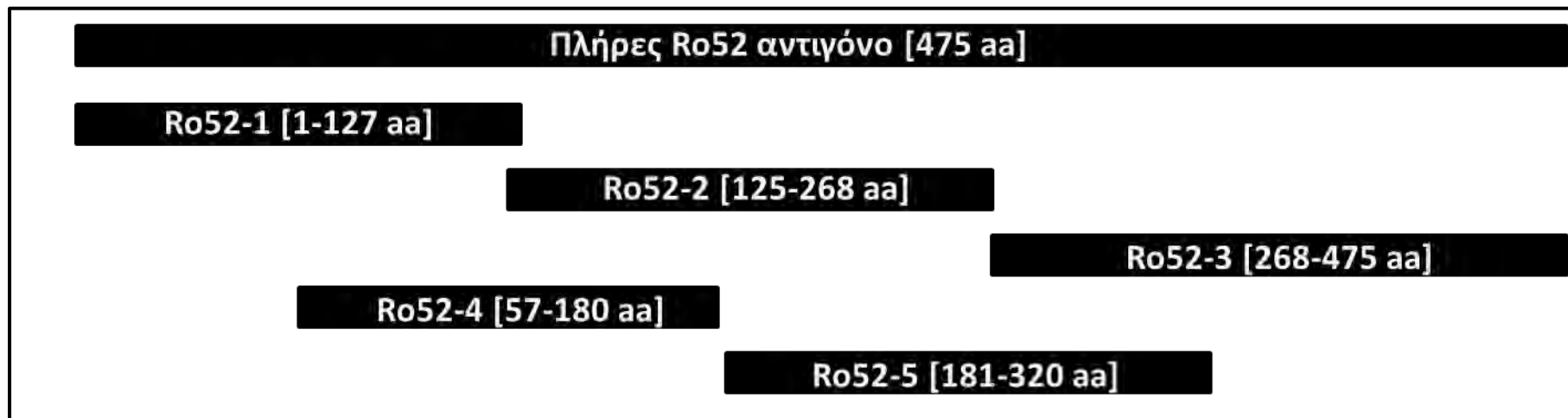
Η εγκυρότητα της αντιδραστικότητας του αντισώματος έναντι των επιμέρους τμημάτων που μελετήθηκαν με τη γραμμική ανοσομέθοδο που περιγράφεται

παραπάνω, αξιολογήθηκε επίσης με την εφαρμογή ειδικά σχεδιασμένης *in house* ELISA για την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια τμήματα του Ro52, ενώ ελέγχθηκαν 32 οροί ασθενών (12 τυχαία επιλεγμένοι ασθενείς με SSc θετικοί για τα anti-Ro52 και 20 ασθενείς με SSc anti-Ro52 αρνητικοί), όπως περιεγράφηκε προηγουμένως με μικρές τροποποιήσεις (353–355). Πειράματα τιτλοποίησης πραγματοποιήθηκαν για να δημιουργηθούν οι βέλτιστες συνθήκες των πειραμάτων.

Όσον αφορά το πρωτόκολλο της *in house* ELISA, κάθε φρεάτιο επώαστηκε στους 20°C για 1 ώρα με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος αποκλεισμού (blocking buffer, 2% BSA σε PBS), για να αποκλειστεί η μη ειδική δέσμευση. Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τη Sigma Aldrich. Μετά από ένα στάδιο πλύσης (5 φορές με PBS-0,1% Tween-20), 100 ml από κάθε τμήμα του Ro52 (τελική συγκέντρωση: 25 μg/ml) προστέθηκαν στα φρεάτια (αραιωμένα σε PBS που περιείχε 0,1% BSA και 0,1% αζίδιο νατρίου) και επώαστηκε στους 20°C σε αναδευτήρα για 1 ώρα. Η πλύση επαναλήφθηκε (5 φορές) και στη συνέχεια, 100 μl από κάθε ορό σε αραιώση 1/200 (σε 2% BSA/PBS που περιείχε 0,1% αζίδιο του νατρίου) προστέθηκαν και επώαστηκαν στους 20°C σε αναδευτήρα για 1 ώρα. Για να εξασφαλιστεί η συνοχή της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν δύο οροί ως μάρτυρες αναφοράς, συμπεριλαμβανομένου ενός ορού με υψηλό τίτλο anti-Ro52 αντισωμάτων από ασθενή με SLE, ο οποίος ήταν γνωστό ότι αντιδρά έντονα με την πλήρη πρωτεΐνη του Ro52 και τα τμήματα Ro52-1, Ro52-2, Ro52-4, και Ro52-5, καθώς και ένας ορός υγιούς μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, απολύτως μη αντιδραστικός έναντι της πλήρους πρωτεΐνης του Ro52 και των τμημάτων αυτής. Το στάδιο της πλύσης επαναλήφθηκε και 100 μl συζευγμένου με υπεροξειδάση 1/1000 anti-ανθρώπινο (IgG) από ορό goat αραιωμένο σε 2% BSA/PBS προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο και επώαστηκε στους 20°C για 1 ώρα. Μετά τα βήματα πλύσης (5x), προστέθηκαν 100 μl υποστρώματος TMB (3,3', 5,5'-

τετραμεθυλοβενζιδίνη) και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 50 μ l H_2SO_4 . Η απορρόφηση φωτός (οπτική πυκνότητα, OD) εκτιμήθηκε συγκρινόμενη με αυτή του τυφλού-κενού φρεατίου στα 450 nm (620 nm ως μήκος κύματος αναφοράς).

Για να προσδιοριστεί το κατώτερο όριο, 20 ασθενείς anti-Ro52 αρνητικοί (10 με SSc και 10 τυχαία επιλεγμένοι, με άλλα AIRDs), ελέγχθηκαν σε μεμονωμένα τμήματα του Ro52. Η αντιδραστικότητα για ένα δεδομένο τμήμα του Ro52 θεωρήθηκε θετική όταν η απορρόφηση του ορού έναντι του εκάστοτε τμήματος υπερέβη τη μέση τιμή + 2 SD των τιμών απορρόφησης των 32 μαρτύρων αρνητικών για anti-Ro52. Για να χρησιμοποιηθεί μια ομοιόμορφη αναπαράσταση των τιμών της απορρόφησης, η απορρόφηση που αντιστοιχεί στην τιμή αναφοράς ορίστηκε ως 1 RU/ml.



ΕΙΚΟΝΑ 2.1. Σχηματική απεικόνιση ολόκληρου του Ro52 αντιγόνου και των 5 τμημάτων αυτού.

Πίνακας 2.4. Παρουσίαση του εναλλακτικού τρόπου υπολογισμού του ορίου θετικότητας (cut off), μέσω της μέσης τιμής + 2 τυπικές αποκλίσεις των τιμών αντιδραστικότητας των anti-Ro52 αρνητικών ασθενών με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα.

	Ro52-1	Ro52-2	Ro52-3	Ro52-4	Ro52-5
mean + 2sd (AU/ml)	$3.05 + 2 \times 2.23 = 7.51$	$3.45 + 2 \times 3.03 = 9.51$	$1.3 + 2 \times 1.01 = 3.32$	$2.1 + 2 \times 1.3 = 4.7$	$2.4 + 2 \times 2.37 = 7.14$
Cut off (AU/ml)	8	10	4	5	8

2.2.4 Έλεγχος αντισωμάτων έναντι του HCMV με τη χρήση της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western (Western blot)

Οι χυμικές αποκρίσεις έναντι των ειδικών για τον HCMV αντιγόνων δοκιμάστηκαν με τη χρήση της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western [344, 356]. Ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένο εκχύλισμα CMV (CMV στέλεχος A169) κομμένο σε λωρίδες στυπώματος (Euroimmun) επώαστηκε για 1 ώρα σε αραιώση ορού 1/51. Μετά από συμβατικές τρεις πλύσεις 5 λεπτών, οι μεμβράνες επώαστηκαν με συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (ALP) anti-ανθρώπινο IgG ab (EUROIMMUN).

Έτοιμο NBT/BCIP (Euroimmun) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για συζευγμένα αντισώματα ALP. Οι λωρίδες της μεμβράνης αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό EUROLinScan (Euroimmun) για τη λήψη πυκνομετρικών, ποσοτικών δεδομένων, όπως περιεγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες [344, 356]. Για αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ως όριο θετικότητας, που ορίστηκε από τον κατασκευαστή, οι 11 AUs.

Όλες οι εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο του Τμήματος Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ένα εργαστήριο αναφοράς για τον έλεγχο αυτοαντισωμάτων στην Ελλάδα και επίσημα αναγνωρισμένο μέλος της Ομάδας EASI (European Autoantibody Standardization Initiative).

2.2.5 Έλεγχος Αυτοαντισωμάτων

Όλοι οι οροί των ασθενών με SSc που ελέγχθηκαν κατά τη διάγνωση για την παρουσία ANA με έμμεσο ανοσοφθορισμό αξιολογήθηκαν για το πρότυπο ανοσοφθορισμού τους. Ο τίτλος των θετικών δειγμάτων αξιολογήθηκε μέχρι εξαφάνισης του φθορισμού. Τα αυτοαντισώματα που σχετίζονται με την SSc, ιδιαίτερα τα anti-Topoisomerase I

(anti-Topo I)), τα anti-CEN και τα anti-RNA πολυμεράσης III (anti-RNA pol III), δοκιμάστηκαν επίσης με μια τεχνική γραμμικής ανοσομεθόδου - προφίλ σκληροδέρματος (Euroimmun), όπως περιεγράφηκε προηγουμένως [344, 356]. Αυτή η δοκιμασία θα επέτρεπε την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των ειδικών anti-HCMV αντισωμάτων και των κοινών αυτοαντισωμάτων των ειδικών για τη SSc. Η αντιδραστικότητα έναντι των Ro52 και Ro60 δοκιμάστηκε επίσης με ειδικά σχεδιασμένες γραμμικές ανοσοδοκιμασίες (Euroimmun), όπως περιεγράφηκε προηγουμένως [14]. Τα δεδομένα των IgG SSc-ειδικών αυτοαντισωμάτων (Scl-70, CENPA, CENPB, RNAPol11, RNAPol155) είναι αποτέλεσμα γραμμικής ανοσοαποτύπωσης.

2.2.6 Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά (%). Για τον προσδιορισμό των τιμών αναφοράς όσον αφορά στη γραμμική ανοσομέθοδο πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ROC και για κάθε τμήμα του Ro52 επιλέχθηκε η συγκέντρωση που αντιστοιχούσε σε ειδικότητα έως και 94%. Ο μέσος όρος + 2SD των τιμών των αρνητικών ασθενών χρησιμοποιήθηκε ως τιμή αναφοράς για κάθε δοκιμασία (γραμμική ανοσομέθοδος, ELISA). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν με την εφαρμογή χ^2 τεστ (chi-square), two tailed t-test και τη μη παραμετρική δοκιμή Mann-Whitney. Τιμές p μικρότερες ή ίσες με 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 22.

Υπολογισμός μεγέθους δείγματος : Το μέγεθος του δείγματος των anti-Ro52(+) και anti-Ro52(-) ασθενών με SSc καθώς και το αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου (ασθενείς μάρτυρες) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση ισχύος (ορίστηκε σε 5% alpha-error και 90% ισχύ). Προκαταρκτικά αποτελέσματα από 10 anti-Ro52(+) και 10 anti-Ro52(-) ασθενείς με SSc έδειξαν διαφορά ανίχνευσης αντισωμάτων anti-pp52/UL44 σε ασθενείς anti-Ro52(+) (5/10, 50%) σε σύγκριση με ασθενείς με anti-Ro52(-) (1/10, 10%). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η ανάλυση ισχύος έδειξε ότι η μελέτη μας απαιτούσε τουλάχιστον 25 ασθενείς με SSc και anti-Ro52(+) και ίσο αριθμό ασθενών με SSc και anti-Ro52(-).

Οι τίτλοι των αντισωμάτων εκφράζονται ως μέσες τιμές της απορρόφησης σε AU και οι διακυμάνσεις ορίζονται με τυπική απόκλιση (SD). Η κανονικότητα της κατανομής δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Shapiro-Wilk. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% CI) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο $P = p \pm 1,96 (pq/n)^{1/2}$ όπου p η συχνότητα, $q = 1 - p$ και n ο αριθμός ατόμων που δοκιμάστηκαν. Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών δοκιμάστηκαν με two-tailed Pearson's chi-square και Fisher's Exact Test,

two-tailed t-test, μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και τη μη παραμετρική δοκιμή Mann-Whitney. Τιμές p μικρότερες ή ίσες με 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό IBM SPSS Statistics 22 και το Graph Pad Prism 6.

Κεφάλαιο 3: Η αντιδρατικότητα έναντι των anti-Ro60 αυτοαντισωμάτων επηρεάζει την χαρτογράφηση των επιτόπων των anti-Ro52 αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc)

3.1 Εισαγωγή

Τα anti-Ro52 abs σε συνδυασμό με anti-Ro60 abs ή μεμονωμένα, συχνά ανιχνεύονται σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα (AiRDs) [227,357-359]. Όπως προαναφέρθηκε, αυτά τα αυτοαντισώματα, που αρχικά περιεγράφηκαν σε ασθενείς με SjS και SLE, ανιχνεύονται και σε άλλα AiRDs, καθώς και σε άλλα οργανοειδικά ή μη-οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα [141,227,231,290,357,358]. Πολλές δημοσιευμένες μελέτες έχουν περιγράψει την παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων σε περίπου 20-30% των ασθενών με SSc, καθιστώντας το τρίτο πιο συχνό αντίσωμα στη νόσο αυτή [252,262,344]. Το Ro52, που αρχικά θεωρήθηκε ως πιθανό μέρος του συμπλέγματος ριβονουκλεοπρωτεϊνών, έχει πλέον καθιερωθεί ως μέλος της οικογένειας των TRIM πρωτεϊνών (TRIM21). Έχει αποδειχθεί ότι το Ro52 (TRIM21) είναι ένας κυτταροπλασματικός Fc υποδοχέας, που συνδέεται με υψηλή συγγένεια κατά προτίμηση με IgG ανοσοσφαιρίνες, αλλά και με IgA και IgM ενδοκυτταροπλασματικούς υποδοχείς της IgG [139,180]. Αυτή η ικανότητα του Ro52 (TRIM21), μαζί με τις πλειοτροπικές ανοσοτροποποιητικές του ιδιότητες, μας οδήγησαν στο να εκτιμήσουμε τον σημαντικό ρόλο αυτού του αντιγόνου στη ρύθμιση της ανοσοδιαμεσολαβούμενης φλεγμονής και τη ρύθμιση της αυτοαντιδραστικής ανοσίας [139,180].

Οι ακριβείς επιτοπικές περιοχές του Ro52 που στοχεύονται από αντιγονοειδικά αυτοαντισώματα έχουν μελετηθεί εκτενώς σε ασθενείς με SjS και SLE [352,360-365], αλλά ο χαρακτηρισμός τους σε ασθενείς με SSc υπολείπεται σε μεγάλο βαθμό. Στο SjS

και τον SLE, τα anti-Ro52 αυτοαντισώματα στοχεύουν κυρίως σε μεγάλες πολυπεπτιδυλικές αλληλουχίες στην περιοχή της περιελιγμένης έλικας της πρωτεΐνης [352,360-365]. Οι γραμμικές μικρότερες αλληλουχίες εντός των αντίστοιχων επιτόπων αναγνωρίζονται δευτερευόντως (366). Μια μελέτη από τους *Infantino et al* (231), χρησιμοποιώντας ένα σύνολο 5 επιτοπικών περιοχών που επικαλύπτουν ολόκληρη την αλληλουχία του Ro52, έδειξε αντιδραστικότητα κυρίως στην αμινοξική αλληλουχία (aa) 125-268. Θεωρήθηκε λοιπόν σκόπιμο να διερευνηθούν οι B-κυτταρικοί επίτοποι του Ro52 σε ασθενείς με SSc.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Υλικά

Η μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων πραγματοποιήθηκε σε 43 ασθενείς με θετικά anti-Ro52 αντισώματα. Εβδομήντα οκτώ anti-Ro52-θετικοί ασθενείς-μάρτυρες, συμπεριλαμβανομένων 20 ασθενών με SjS, 28 ασθενών με SLE, 15 ασθενών με DM και 15 ασθενών με PBC καθώς και 20 anti-Ro52-αρνητικών υγιών ατόμων, ως υγιείς μάρτυρες.

3.2.2 Μέθοδοι

Πέντε ανασυνδυασμένα τμήματα του Ro52 [Ro52-1 (aa 1-127), Ro52-2 (aa 125-268), Ro52-3 (aa 268-475), Ro52-4 (aa 57-180) και Ro52-5 (aa 181-320)] χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιδραστικότητας με τη χρήση ειδικής γραμμικής ανοσομεθόδου και *in house* ELISA, όπως περιγράφεται στις ενότητες 2.2.2 και 2.2.3.

Η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52 και του Ro60 μελετήθηκε με τη χρήση της ELISA όπως περιγράφεται από τον κατασκευαστή (Inova Diagnostics/ Werfen, San Diego, CA).

Η αντιδραστικότητα έναντι των διαφόρων αντισωμάτων που απαντώνται στη συστηματική σκλήρυνση ελέγχθηκε με τη χρήση ειδικής μεθόδου γραμμικής ανοσοαποτύπωσης (Systemic Sclerosis Profile, Euroimmun AG, Γερμανία).

3.3 Αποτελέσματα

Όλοι οι anti-Ro52 θετικοί ασθενείς αντέδρασαν έναντι του πλήρους αντιγόνου Ro52 με τη χρήση της γραμμικής ανοσομεθόδου, χωρίς την ανάδειξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς σε AU/ml μεταξύ των ασθενειών (μέση τιμή $\pm$ SD: 76,55 $\pm$ 23,13 AU/ml σε ασθενείς με SSc, σε σύγκριση με 79,8 $\pm$ 24,3 AU/ml σε ασθενείς με SjS, 80,39 $\pm$ 28,26 AU/ml σε SLE, 81,73 $\pm$ 16,93 AU/ml με DM και 83,6 $\pm$ 35,2 AU/ml με PBC, $p > 0,05$) (Εικόνα 3.1).

3.3.1 Συχνότητα αντιδραστικότητας του καθενός τμήματος του Ro52 σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου

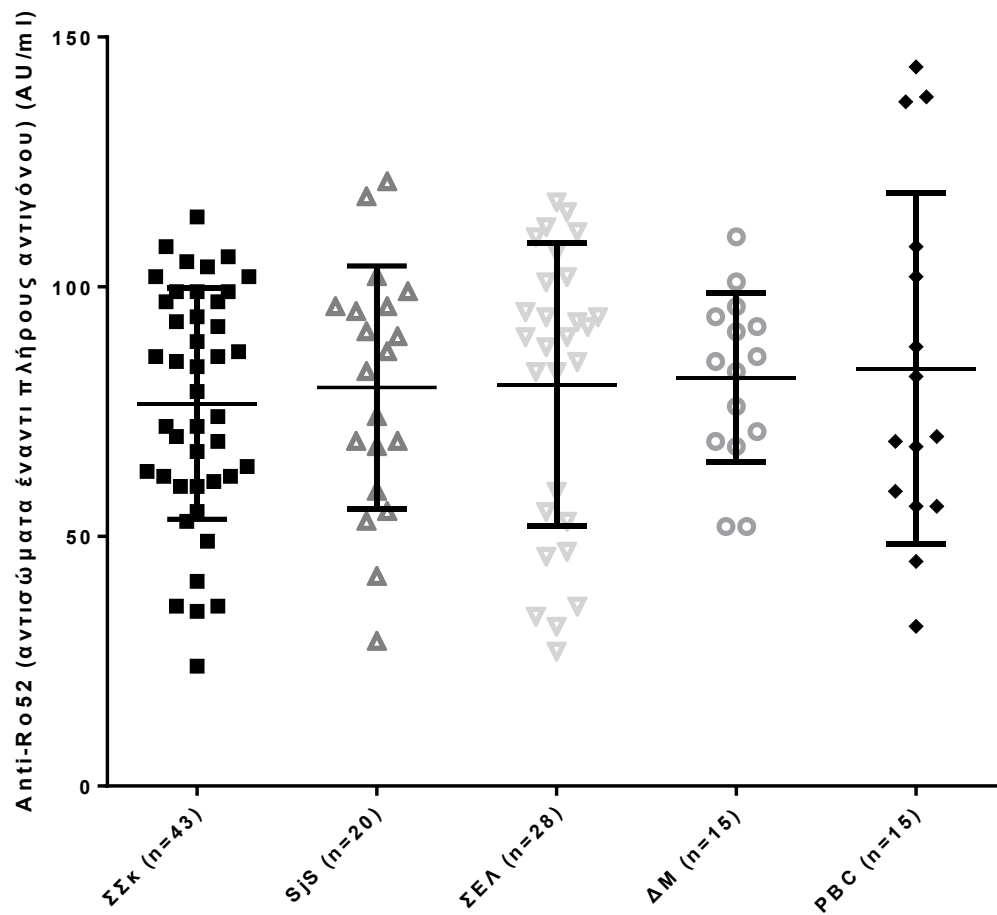
Τα αποτελέσματα της αντιδραστικότητας των υπό μελέτη ορών στα πέντε τμήματα του Ro52 συνοψίζονται στους Πίνακες 3.1 και 3.2. Συνολικά, η αντιδραστικότητα έναντι των τμημάτων Ro52-1, Ro52-2, Ro52-3, Ro52-4 και Ro52-5 σε ασθενείς με SSc ήταν 11,6%, 100%, 0%, 27,9% και 41,9%, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε ασθενείς με SjS ήταν 40%, 100%, 0%, 40% και 60%, σε ασθενείς με SLE ήταν 42,9%, 100%, 0%, 57,1% και 57,1%, σε ασθενείς με DM ήταν 20%, 100%, 0%, 33,3% και 40% και σε ασθενείς με PBC 6,7%, 100%, 0%, 6,7% και 40%.

Ανάλογα με την νόσο, η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι των τμημάτων Ro52-1, Ro52-4 και Ro52-5 ήταν ως εξής (οι ασθενείς με SjS και SLE αναλύονται εδώ ως μια ομάδα, καθώς οι αντιδραστικότητες τους ήταν παρόμοιες): η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 ήταν λιγότερο συχνή σε ασθενείς με SSc παρά με SjS-SLE (5/43 [11,6%] έναντι 20/48 [41,7%], $p = 0,001$), η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-4 ήταν επίσης λιγότερο συχνή στη SSc από ότι στο SjS-SLE (12/43 [27,9%] έναντι 24/48 [50%], $p = 0,03$). Επιπλέον, η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 ήταν πιο συχνή

στην ομάδα SjS-SLE από ότι στην PBC (20/48 [41,7%] έναντι 1/15 [6,7%], $p = 0,01$) και η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-4 ήταν πιο συχνή στην ομάδα SjS-SLE σε σχέση με την PBC (24/48 [50%] έναντι 1/15 [6,7%], $p = 0,002$) (Πίνακας 3.1).

Τα αποτελέσματα της αντιδραστικότητας έναντι των τμημάτων του Ro52 μεταξύ ασθενών με SSc και των ασθενών με SjS ή SLE παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Ειδικότερα, οι ασθενείς με SSc ήταν λιγότερο συχνά αντιδραστικοί έναντι του Ro52-1 από ότι οι ασθενείς με SjS (5/43 [11,6%] έναντι 8/20 [40,0%], $p = 0,0095$) και οι ασθενείς με SLE (5/43 [20,9%] έναντι 12/28 [42,9%], $p = 0,002$). Οι ασθενείς με PBC ήταν επίσης λιγότερο συχνά αντιδραστικοί έναντι του Ro52-1 σε σχέση με τους ασθενείς με SjS (1/15 [6,7%] έναντι 8/20 [40,0%], $p = 0,04$) και τους ασθενείς με SLE (1/15 [6,7%] έναντι 16/28 [57,1%], $p = 0,02$). Επιπλέον, οι ασθενείς με SSc ήταν λιγότερο συχνά αντιδραστικοί έναντι του Ro52-4 από ότι οι ασθενείς με SLE (12/43 [27,9%] έναντι 16/28 [57,1%], $p = 0,014$) και αυτό ίσχυε επίσης για την PBC σε σύγκριση με το SjS (1/15 [6,7%] έναντι 8/20 [40,0%], $p = 0,025$) και τον SLE (1/15 [6,7%] έναντι 16/28 [57,1%], $p = 0,001$) (Πίνακας 3.2).

Η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι μεμονωμένων τμημάτων του Ro52 μέσω της γραμμικής ανοσομεθόδου συσχετίστηκε με την αντιδραστικότητα αυτών όπως προέκυψε από την εφαρμογή ειδικά σχεδιασμένης *in house* ELISA ($r = 0,95$, $p < 0,001$ για το Ro52-1, $r = 0,783$, $p = 0,003$ για το Ro52-2, $r = 0,485$, $p = 0,11$ για το Ro52-3, $r = 0,729$, $p = 0,007$ για το Ro52-4, $r = 0,784$, $p = 0,003$ για το Ro52-5) (Εικόνα 3.2). Όλοι οι οροί οι οποίοι απέβησαν αρνητικοί (μη αντιδραστικοί) για τα διάφορα τμήματα του Ro52, αναδείχθηκαν επίσης αρνητικοί όταν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ELISA.



ΕΙΚΟΝΑ 3.1. Αντιδραστικότητα σε *AU/ml* έναντι του πλήρους Ro52 αντιγόνου σε 43 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 20 ασθενείς με σύνδρομο Sjogren (SjS), 28 ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE), 15 ασθενείς με δερματομυοσίτιδα (DM) και 15 ασθενείς με πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα (PBC). Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Οι τιμές αναδεικνύονται με σύμβολα. Η ενιαία μαύρη γραμμή στο κέντρο κάθε κάθετης γραμμής παρουσιάζει τη διάμεση τιμή. Τα άκρα κάθε κάθετης γραμμής αντιπροσωπεύουν το 10% και 90% των τιμών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1. Αντιδραστικότητα έναντι ολόκληρου του Ro52 αντιγόνου και τμήματα αυτού σε ασθενείς με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα.

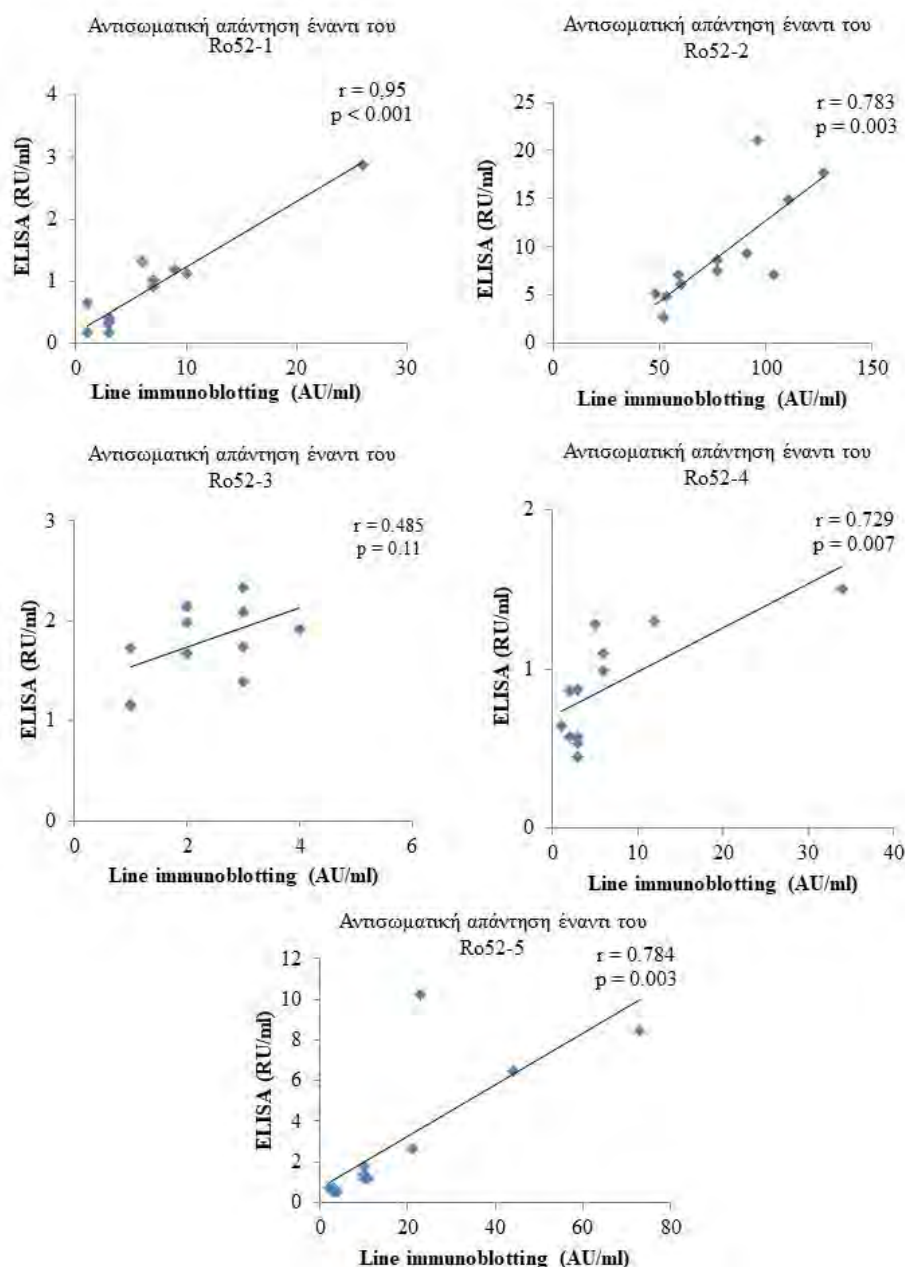
	SSc (n=43)	SjS/SLE (n=48)	DM (n=15)	PBC (n=15)	p (SSc vs SjS/SLE)	p (SSc vs DM)	p (SSc vs PBC)	p (SjS/SLE vs DM)	p (SjS/SLE vs PBC)	p (DM vs PBC)
Ro52	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-1	11.6%	41.7%	20%	6.7%	0.001	NS	NS	NS	0.01	NS
Ro52-2	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-3	0%	0%	0%	0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-4	27.9%	50.0%	33.3%	6.7%	0.03	NS	NS	NS	0.002	NS
Ro52-5	41.9%	58.3%	40%	40.0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögrens, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2. Αντισωματική αντιδραστικότητα έναντι ολόκληρου του αντιγόνου Ro52 και των πέντε συγκεκριμένων τμημάτων αυτού στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα.

	SSc (n=43)	SjS (n=20)	SLE (n=28)	DM (n=15)	PBC (n=15)	p (SSc vs SjS)	p (SSc vs SLE)	p (SSc vs DM)	p (SSc vs PBC)	p (SjS vs SLE)	p (SjS vs DM)	p (SjS vs PBC)	p (SLE vs PBC)	p (DM vs PBC)
Ro52	100%	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-1	11.6%	40.0%	42.9%	20%	6.7%	0.009	0.002	NS	NS	NS	NS	0.04	0.02	NS
Ro52-2	100%	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-3	0%	0%	0%	0%	0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-4	27.9%	40.0%	57.1%	33.3%	6.7%	NS	0.014	NS	NS	NS	NS	0.025	0.001	NS
Ro52-5	41.9%	60.0%	57.1%	40%	40.0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögrens, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα

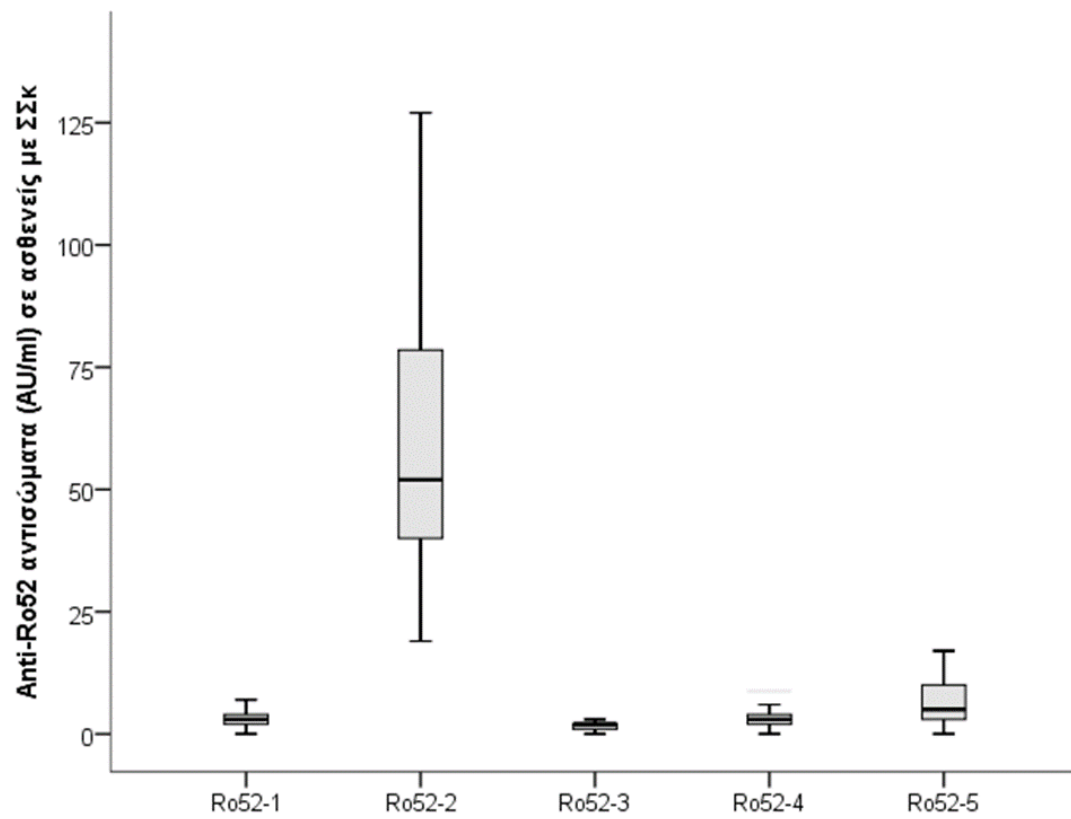


Εικόνα 3.2. Συσχέτιση μετρήσεων της μεθόδου γραμμικής ανοσοαποτύπωσης και των τιμών απορρόφησης της ELISA των μεμονωμένων anti-Ro52 τμημάτων από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση. Τα δεδομένα ανοσοαποτύπωσης επιβεβαιώθηκαν σε ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο ορών από 12 ασθενείς με SSc θετικούς σε anti-Ro52 αντισώματα και 20 αρνητικούς στο anti-Ro52 μάρτυρες. Σημειώνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση για όλα τα τμήματα του Ro52 μεταξύ των δύο μεθόδων.

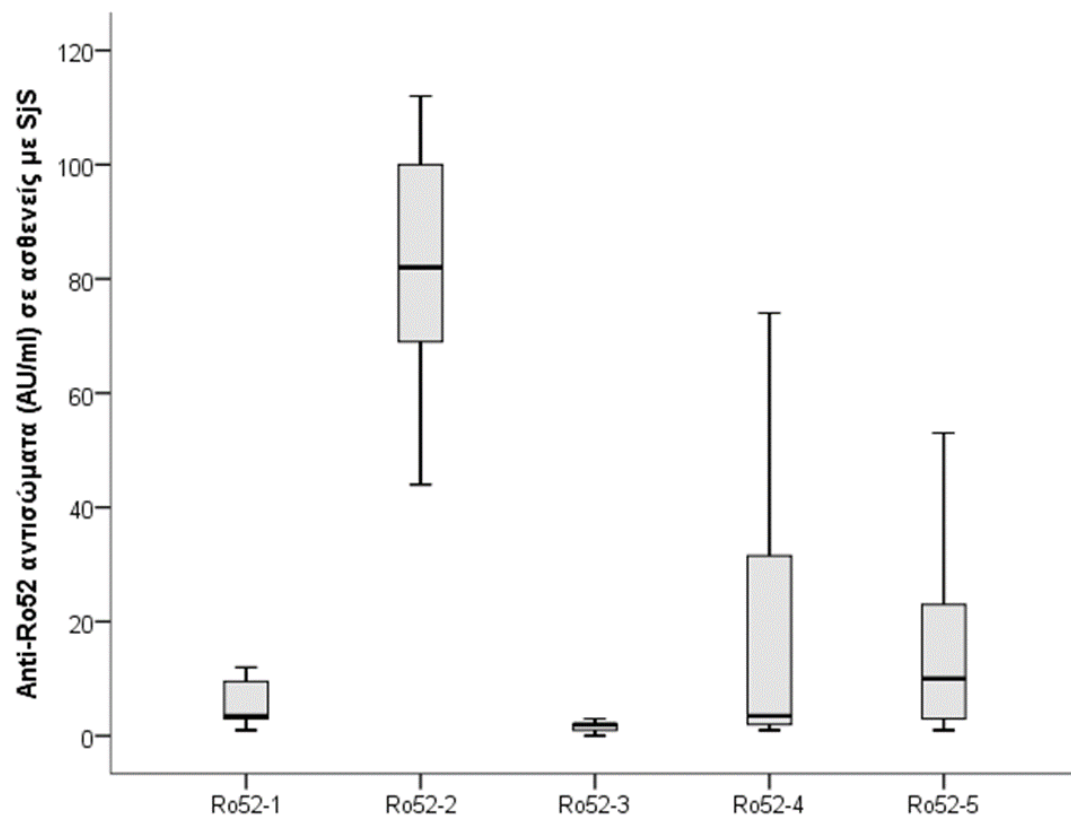
3.3.2 Τίτλοι αντιδραστικότητας των αντισωμάτων έναντι τμημάτων του Ro52

Οι τίτλοι της αντιδραστικότητας έναντι μεμονωμένων τμημάτων του Ro52 απεικονίζεται στην Εικόνα 3.3. Οι τίτλοι αντιδραστικότητας έναντι του Ro52-2 ήταν χαμηλότεροι στη SSc σε σύγκριση με το SjS ($59,62 \pm 26,21$ AU/ml έναντι $78,75 \pm 25,66$ AU/ml, $p = 0,009$), με το SLE ($79,46 \pm 30,92$ AU/ml, $p = 0,007$) και την PBC ($90,06 \pm 32,31$ AU/ml, $p = 0,004$). Η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-4 ήταν χαμηλότερη στη SSc ($4,88 \pm 5,75$ AU/ml) από ότι στην PBC ($1,26 \pm 2,15$ AU/ml, $p = 0,001$) (Εικόνα 3.3).

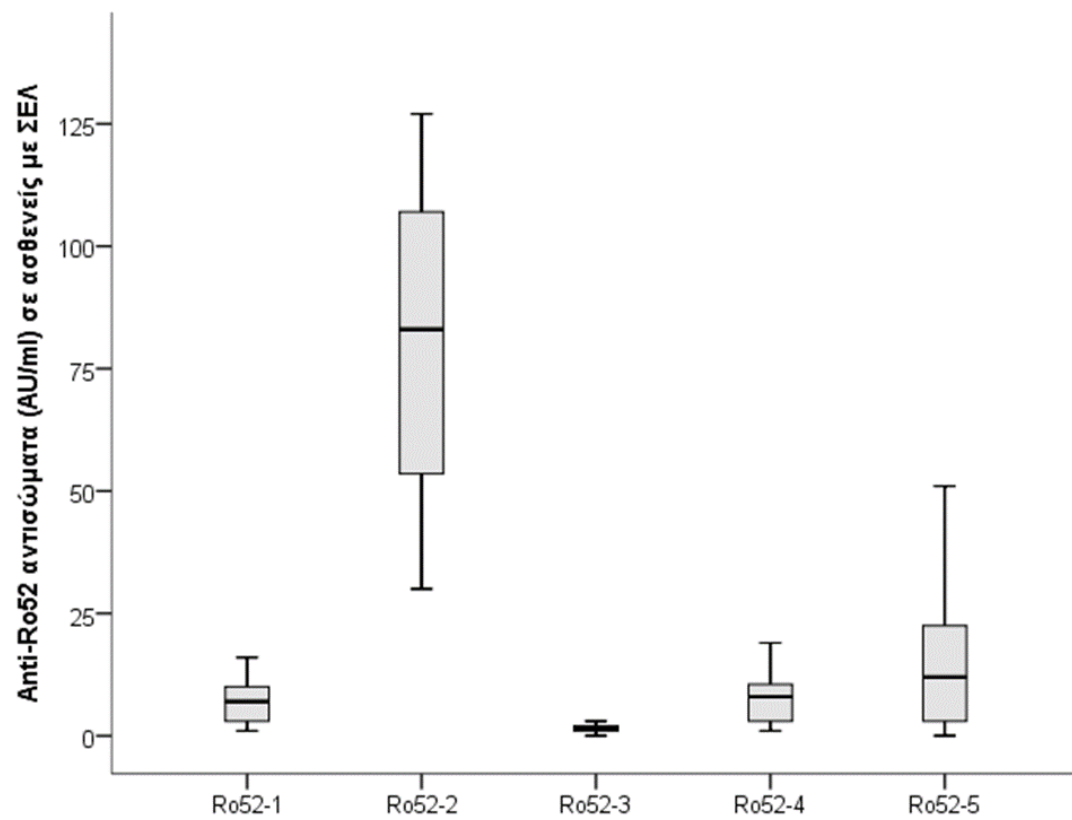
ΕΙΚΟΝΑ 3-Α



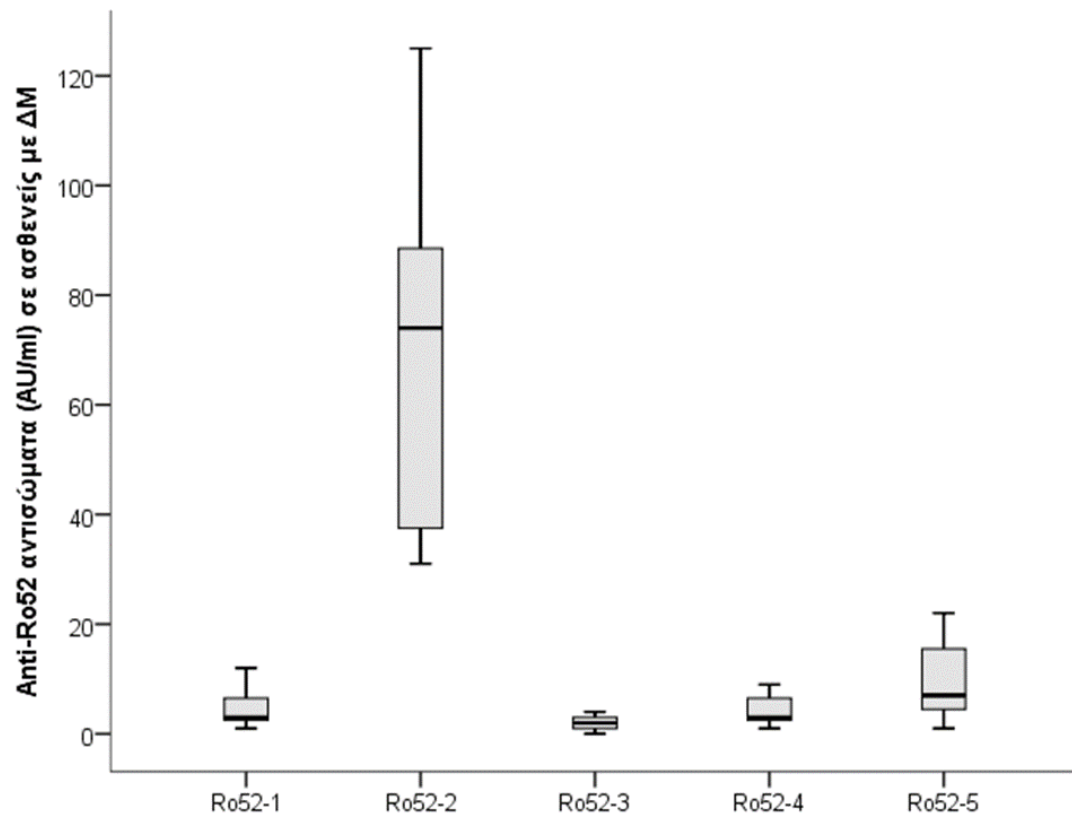
ΕΙΚΟΝΑ 3-B



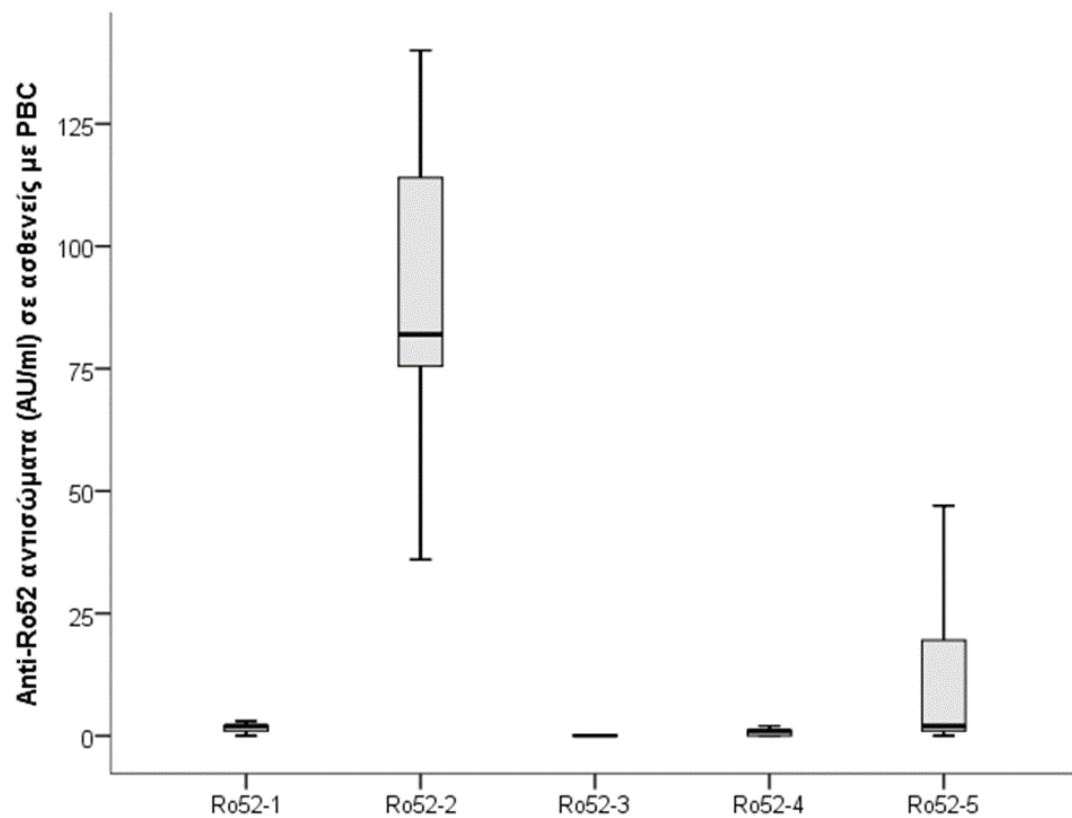
ΕΙΚΟΝΑ 3-Γ



ΕΙΚΟΝΑ 3-Α



ΕΙΚΟΝΑ 3-Ε



ΕΙΚΟΝΑ 3. Τίτλοι αντιδραστικότητας των anti-Ro52 θετικών ασθενών έναντι των πέντε διαφορετικών τμημάτων του Ro52 σε **A.** 43 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), **B.** 20 ασθενείς με σύνδρομο Sjogren (SjS), **Γ.** 28 ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE), **Δ.** 15 ασθενείς με δερματομυοσίτιδα (DM) και **Ε.** 15 ασθενείς με πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα (PBC).

3.3.3 Αναγνώριση επιτόπων του Ro52 σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ (διπλά θετικούς) και anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενείς

Όταν οι ασθενείς με θετικά anti-Ro52 αντισώματα μοιράστηκαν στις κατηγορίες anti-Ro52+/anti-CEN+ και anti-Ro52+/anti-CEN- δεν βρέθηκαν διαφορές στα πρότυπα αναγνώρισης των επιτόπων. Ομοίως, οι συγκρίσεις μεταξύ των υποομάδων anti-Ro52+/anti-Scl70+ και anti-Ro52+/anti-Scl70- δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Όταν οι θετικοί στο anti-Ro52 ασθενείς μοιράστηκαν σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ (διπλά θετικοί) και anti-Ro52+/anti-Ro60-, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων. Σε ασθενείς με SSc (n = 43), η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 ήταν πιο συχνή στους anti-Ro52+/anti-Ro60+ ασθενείς σε σχέση με τους anti-Ro52+/anti-Ro60- (5/15 [33,3%] έναντι 0/28 [0%], p = 0,003) (Πίνακας 3.3).

Συγκρίνοντας την αντιδραστικότητα έναντι διαφόρων τμημάτων του Ro52 σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ ασθενείς μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, η ίδια σύγκριση όσων αφορά στην ομάδα των anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενών, μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων ανέδειξε ότι η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 ήταν λιγότερο συχνή στη SSc σε σύγκριση με τον SLE (0/28 [0%] έναντι 6/10, [60%], p = 0,001). Ομοίως, η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-4 ήταν λιγότερο συχνή στη SSc από ό,τι στον SLE (5/28 [17,9%] έναντι 6/10 [60%], p = 0,019).

Σε anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με SSc, τα κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ των anti-Ro52+/anti-Ro60+ και anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενών δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 3.4). Ομοίως, τα κλινικά και

ανοσολογικά χαρακτηριστικά δεν παρουσίαζαν διαφορές όταν οι ασθενείς με SSc χωρίστηκαν ανάλογα με την αντιδραστικότητά τους σε συγκεκριμένα τμήματα του Ro52 (Ro52-1, Ro52-4, Ro52-5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3. Αντισωματική αντιδραστικότητα έναντι των πέντε τμημάτων του Ro52 σε ασθενείς κατηγοριοποιημένους βάσει της ταυτόχρονης παρουσίας ή όχι anti-Ro60 αντισωμάτων (anti-Ro52+/anti-Ro60+ και anti-Ro52+/anti-Ro60-).

Ro52	SSc Ro52+/ Ro60+ (n=15)	SSc Ro52+/ Ro60- (n=28)	p	SjS Ro52+/ Ro60+ (n=14)	SjS Ro52+/ Ro60- (n=6)	p	SLE Ro52+/Ro 60+ (n=18)	SLE Ro52+/ Ro60- (n=10)	p	DM Ro52+/ Ro60+ (n=3)	DM Ro52+/ Ro60- (n=12)	p	PBC Ro52+/ Ro60+ (n=2)	PBC Ro52+/ Ro60- (n=13)	p
Ro52	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--
Ro52-1	33.3%	0%	0.003	50.0%	16.7%	NS	33.3%	60.0%	NS	33.3%	16.7%	NS	0%	7.8%	NS
Ro52-2	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--
Ro52-3	0%	0%	--	0%	0%	--	0%	0%	--	0%	0%	--	0%	0%	--
Ro52-4	33.3%	25.0%	NS	50.0%	16.7%	NS	55.6%	60.0%	NS	33.3%	33.3%	NS	0%	7.8%	NS
Ro52-5	60.0%	57.1%	NS	71.4%	33.3%	NS	55.6%	60.0%	NS	33.3%	41.7%	NS	50.0%	38.5%	NS

*SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögrens, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα.

Πίνακας 3.4. Τα κύρια δημογραφικά, κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των anti- Ro52+/Ro60+ και Ro52+/Ro60- ασθενών με Συστηματική Σκλήρυνση

	Ro52+/Ro60- n=19	Ro52+/Ro60+ n=13	p
Φύλο			
- Γυναίκες	17 (89,5)	13 (100)	ns
- Άνδρες	2 (10,5)	0 (0)	ns
Ηλικία (mean±SD)	54.03 ± 13.53	57.43 ± 9.80	ns
Τύπος SSc			
lcSSc (n,%)	11 (57.9)	9 (69.2)	ns
dcSSc (n,%)	8 (42.1)	4 (30.8)	ns
Πνευμονική Ίνωση (n,%)	7 (36.8)	4 (30.8)	ns
Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (n,%)	2 (10.53)	2 (15.4)	ns
Έλκη (n,%)	5 (26.3)	7 (53.8)	ns
Διάρκεια Νόσου (mean±SD)	11.05 ± 9.6	14.23 ± 8.7	ns
Rodnan Skin Score (mean±SD)	9.52 ± 9.08	5.58 ± 7.29	ns
Γαστρεντερική συμμετοχή			
Ανώτερο (n,%)	10 (52.6)	8 (61.5)	ns
Κατώτερο (n,%)	0	0	na
Ανώτερο και κατώτερο (n,%)	1 (5.3)	0	ns
Αρθρίτιδα (n,%)	5 (26.3)	7 (53.8)	ns
Ορογονίτιδα (n,%)	0	3 (23.1)	ns

Τηλαγγειεκτασίες (n,%)	11 (57.9)	5 (38.5)	ns
CPK (n,%)	1 (5.3)	0	ns
Ασβεστώσεις (n,%)	2 (10.53)	0	ns
Νεφρική κρίση (n,%)	0	0	ns
Σύνδρομο επικάλυψης/Μικτή νόσος συνδετικού ιστού (n,%)	5 (26.3)	3 (23.1)	ns
Ξηροστομία (n,%)	6 (31.6)	6 (46.2)	ns
Ξηροφθαλμία (n,%)	4 (21.05)	3 (23.1)	ns
Εξάνθημα (n,%)	4 (21.05)	3 (23.1)	ns
Ακροοστεόλυση (n,%)	4 (21.05)	1 (7.7)	ns
<u>Αυτοαντισώματα</u>			
-Scl-70 (n, %)	3 (15.8)	2 (15.4)	ns
-CENPA (n, %)	8 (42.1)	4 (30.8)	ns
-CENPB (n, %)	8 (42.1)	4 (30.8)	ns
-RP11 (n, %)	1 (5.3)	0	ns
-RP155 (n, %)	3 (15.8)	0	ns
-Fibrillarin (n, %)	0	1 (7.7)	ns
-NOR90 (n, %)	2 (10.5)	1 (7.7)	ns
-Th/To (n, %)	0	0	na
-PM-Scl 100 (n, %)	0	0	na
-PM-Scl 75 (n, %)	1 (5.3)	1 (7.7)	ns
-Ku (n, %)	4 (21.1)	0	ns
-PDGFR (n, %)	0	0	ns

-Ro52 (n, %)	19 (100)	13 (100)	ns
-Ro60 (n, %)	0	13 (100)	ns
-La (n, %)	0	5 (38.5)	0.006

3.3.4 Συχνότητα αντιδραστικότητας του καθενός τμήματος του Ro52 σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου, με διαφορετικό όριο θετικότητας

Τα αποτελέσματα της αντιδραστικότητας των ορών των ασθενών έναντι των τμημάτων του Ro52 αναλύθηκαν επίσης λαμβάνοντας ως όριο θετικότητας τιμές αντιδραστικότητας υπολογιζόμενες από τη μέση τιμή συν δύο τυπικές αποκλίσεις ($\text{mean} + 2\text{sd}$) των τιμών αντιδραστικότητας των anti-Ro52 αρνητικών ασθενών με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα, για κάθε τμήμα του Ro52 χωριστά, όπως φαίνεται στους **Πίνακες 3.5** και **3.6**.

Συνολικά, η αντιδραστικότητα έναντι των τμημάτων Ro52-1, Ro52-2, Ro52-3, Ro52-4 και Ro52-5 σε ασθενείς με SSc ήταν 11,6%, 100%, 0%, 27,9% και 41,9%, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες αντιδραστικότητες για τους ασθενείς με SjS ήταν 40%, 100%, 0%, 40% και 60%, για τους ασθενείς με SLE ήταν 42,9%, 100%, 0%, 57,1% και 57,1%, για τους ασθενείς με DM ήταν 20%, 100%, 0%, 33,3% και 40% και τέλος για τους ασθενείς με PBC ήταν 6,7%, 100%, 0%, 6,7% and 40%.

Η σύγκριση της αντιδραστικότητας έναντι των τμημάτων του Ro52 μεταξύ των ασθενών με SSc και SLE ή SjS παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.5**. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με SSc ήταν λιγότερο συχνά αντιδραστικοί έναντι του Ro52-1 σε σχέση με τους ασθενείς με SjS (5/43 [11.6%] έναντι 8/20 [40.0%], $p=0.0095$) και τους ασθενείς με SLE (5/43 [20.9%] έναντι 12/28 [42.9%], $p=0.002$). Επίσης, οι ασθενείς με PBC ήταν λιγότερο συχνά αντιδραστικοί έναντι του Ro52-1 σε σχέση με τους ασθενείς με SjS (1/15 [6.7%] έναντι 8/20 [40.0%], $p=0.04$) και τους ασθενείς με SLE (1/15 [6.7%] έναντι 16/28 [57.1%], $p=0.02$). Τέλος, οι ασθενείς με SSc ήταν λιγότερο αντιδραστικοί για το Ro52-4 σε σχέση με τους ασθενείς με SLE (12/43 [27.9%] έναντι 16/28 [57.1%],

$p=0.014$), ενώ παρόμοια οι ασθενείς με PBC ήταν λιγότερο αντιδραστικοί για το Ro52-4 σε σχέση με τους ασθενείς με SjS (1/15 [6.7%] έναντι 8/20 [40.0%], $p=0.025$) και SLE (1/15 [6.7%] έναντι 16/28 [57.1%], $p=0.001$) (Πίνακας 3.6).

3.3.5 Αναγνώριση επιτόπων του Ro52 σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ (διπλά θετικούς) και anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενείς

Όταν οι ασθενείς με θετικά anti-Ro52 αντισώματα μοιράστηκαν στις κατηγορίες anti-Ro52+/anti-CEN+ και anti-Ro52+/anti-CEN- δεν βρέθηκαν διαφορές στα πρότυπα αναγνώρισης των επιτόπων. Ομοίως, οι συγκρίσεις μεταξύ των υποομάδων anti-Ro52+/anti-Scl70+ και anti-Ro52+/anti-Scl70- δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Όταν οι θετικοί στο anti-Ro52 ασθενείς μοιράστηκαν σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ (διπλά θετικοί) και anti-Ro52+/anti-Ro60-, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων. Σε ασθενείς με SSc ($n = 43$), η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 ήταν πιο συχνή στους anti-Ro52+/anti-Ro60+ ασθενείς σε σχέση με τους anti-Ro52+/anti-Ro60- (5/15 [33,3%] έναντι 0/28 [0%], $p = 0,003$) (Πίνακας 3.7).

Συγκρίνοντας την αντιδραστικότητα έναντι διαφόρων τμημάτων του Ro52 σε anti-Ro52+/anti-Ro60+ ασθενείς μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, η ίδια σύγκριση όσον αφορά στην ομάδα των anti-Ro52+/anti-Ro60- ασθενών, μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων ανέδειξε ότι η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-1 ήταν λιγότερο συχνή στην SSc σε σύγκριση με τον SLE (0/28 [0%] έναντι 6/10, [60%], $p = 0,001$). Ομοίως, η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52-4 ήταν λιγότερο συχνή στην SSc από ό,τι στον SLE (5/28 [17,9%] έναντι 6/10 [60%], $p = 0,019$).

Πίνακας 3.5. Αντισωματική αντιδραστικότητα έναντι ολόκληρου του αντιγόνου Ro52 και των πέντε συγκεκριμένων τμημάτων αυτού στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, θεωρώντας ως όριο θετικότητας (cut off) τιμές $\geq (\text{mean} + 2\text{sd})$ των τιμών αντιδραστικότητας των anti-Ro52 αρνητικών ασθενών, για καθένα από τα πέντε τμήματα του Ro52 χωριστά.

	SSc (n=43)	SjS/SLE (n=48)	DM (n=15)	PBC (n=15)	p (SSc vs SjS/SLE)	p (SSc vs DM)	p (SSc vs PBC)	p (SjS/SLE vs DM)	p (SjS/SLE vs PBC)	p (DM vs PBC)
Ro52	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-1	11.6%	41.7%	20%	6.7%	0.001	NS	NS	NS	0.01	NS
Ro52-2	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-3	0%	0%	0%	0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-4	27.9%	50.0%	33.3%	6.7%	0.03	NS	NS	NS	0.002	NS
Ro52-5	41.9%	58.3%	40%	40.0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögrens, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα

**Ro52-1: *cutoff* $\geq 8AU$, Ro52-2: *cutoff* $\geq 9AU$, Ro52-3: *cutoff* $\geq 3AU$, Ro52-4: *cutoff* $\geq 5AU$, Ro52-5: *cutoff* $\geq 8AU$

Πίνακας 3.6. Αντισωματική αντιδραστικότητα έναντι ολόκληρου του αντιγόνου Ro52 και των πέντε συγκεκριμένων τμημάτων αυτού στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, θεωρώντας ως όριο θετικότητας (cutoff) τιμές $\geq (\text{mean} + 2\text{sd})$ των τιμών αντιδραστικότητας των anti-Ro52 αρνητικών ασθενών, για καθένα από τα πέντε τμήματα του Ro52 χωριστά.

	SSc (n=43)	SjS (n=20)	SLE (n=28)	DM (n=15)	PBC (n=15)	p (SSc vs SjS)	p (SSc vs SLE)	p (SSc vs DM)	p (SSc vs PBC)	p (SjS vs SLE)	p (SjS vs DM)	p (SjS vs PBC)	p (SLE vs PBC)	p (DM vs PBC)
Ro52	100%	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-1	11.6%	40.0%	42.9%	20%	6.7%	0.009	0.002	NS	NS	NS	NS	0.04	0.02	NS
Ro52-2	100%	100%	100%	100%	100%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-3	0%	0%	0%	0%	0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ro52-4	27.9%	40.0%	57.1%	33.3%	6.7%	NS	0.014	NS	NS	NS	NS	0.025	0.001	NS
Ro52-5	41.9%	60.0%	57.1%	40%	40.0%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögrens, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα

**Ro52-1: $\text{cutoff} \geq 8\text{AU}$, Ro52-2: $\text{cutoff} \geq 9\text{AU}$, Ro52-3: $\text{cutoff} \geq 3\text{AU}$, Ro52-4: $\text{cutoff} \geq 5\text{AU}$, Ro52-5: $\text{cutoff} \geq 8\text{AU}$

Πίνακας 3.7. Αντισωματική αντιδραστικότητα έναντι των πέντε τμημάτων του Ro52 σε ασθενείς κατηγοριοποιημένους βάσει της ταυτόχρονης παρουσίας ή όχι anti-Ro60 αντισωμάτων (anti-Ro52+/anti-Ro60+ και anti-Ro52+/anti-Ro60-) και με όριο θετικότητας (cutoff) τιμές $\geq$ (mean + 2sd) των τιμών αντιδραστικότητας των anti-Ro52 αρνητικών ασθενών.

Ro52	SSc Ro52/ Ro60+ (n=15)	SSc Ro52+/ Ro60- (n=28)	p	SjS Ro52/ Ro60+ (n=14)	SjS Ro52/ Ro60- (n=6)	p	SLE Ro52+/ Ro60+ (n=18)	SLE Ro52+/ Ro60- (n=10)	p	DM Ro52+/ Ro60+ (n=3)	DM Ro52+/ Ro60- (n=12)	p	PBC Ro52+/ Ro60+ (n=2)	PBC Ro52+/ Ro60- (n=13)	p
Ro52	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--
Ro52-1	33.3%	0%	0.003	50.0%	16.7%	NS	33.3%	60.0%	NS	33.3%	16.7%	NS	0%	7.8%	NS
Ro52-2	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--	100%	100%	--
Ro52-3	0%	0%	--	0%	0%	--	0%	0%	--	0%	0%	--	0%	0%	--
Ro52-4	33.3%	25.0%	NS	50.0%	16.7%	NS	55.6%	60.0%	NS	33.3%	33.3%	NS	0%	7.8%	NS
Ro52-5	60.0%	57.1%	NS	71.4%	33.3%	NS	55.6%	60.0%	NS	33.3%	41.7%	NS	50.0%	38.5%	NS

*SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögrens, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα

***Ro52-1: cutoff $\geq 8AU$, Ro52-2: cutoff $\geq 9AU$, Ro52-3: cutoff $\geq 3AU$, Ro52-4: cutoff $\geq 5AU$, Ro52-5: cutoff $\geq 8AU$*

3.4 Συζήτηση

Αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη ολοκληρωμένη ανάλυση χαρτογράφησης των B-λεμφοκυτταρικών επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc χρησιμοποιώντας μεγάλα στερεοτακτικά πολυπεπτιδυλικά τμήματα, τα οποία επικαλύπτουν ολόκληρο το Ro52 αντιγόνο. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν δείχνουν ότι, όπως και σε άλλα AIRDs, όπως το SjS και ο SLE [352,360-365], η κυρίαρχη επιτοπική περιοχή που αναγνωρίζεται καθολικά από τα anti-Ro52 αντισώματα στη SSc είναι αυτή που βρίσκεται εντός του περιελιγμένου σπειρώματος της πρωτεΐνης (coiled coil domain, aa 125-268) [231,360]. Η απουσία αντισωματικής δέσμησης με μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία εκτείνεται στο C-τελικό άκρο του αντιγόνου, η οποία είχε ήδη περιγραφεί στο SjS και τον SLE, επιβεβαιώνεται επίσης στην παρούσα μελέτη [352,360-365,231]. Τα καινούρια ωστόσο ευρήματα που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή είναι ότι οι ασθενείς με SSc αναγνωρίζουν λιγότερο συχνά το Ro52-1 τμήμα του αντιγόνου σε σύγκριση με τους ασθενείς με SLE. Το πιο σημαντικό ίσως εύρημα είναι ότι οι ασθενείς με SSc και θετικά anti-Ro60 αντισώματα εμφάνισαν ένα διακριτό, προηγουμένως μη αναγνωρισμένο επιτοπικό πρότυπο, που χαρακτηρίζεται από ευρεία αναγνώριση συγκεκριμένων επιτόπων του Ro52 (συμπεριλαμβανομένων των Ro52-1, Ro52-2, Ro52-4 και Ro52-5) σε σύγκριση με τους ασθενείς με SSc και αρνητικά anti-Ro60 αντισώματα, όπου η αντιδραστικότητα περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στο τμήμα Ro52-2 χωρίς καθολική αναγνώριση άλλων επιτόπων.

Πιο συγκεκριμένα, οι οροί ασθενών με SSc ήταν λιγότερο συχνά αντιδραστικοί έναντι του Ro52-1, το οποίο αντιστοιχεί στο N-τελικό άκρο του Ro52 και αφορά στην αλληλουχία αμινοξέων aa 1-127, σε σχέση με τους ορούς ασθενών με SjS και SLE (11,6 έναντι 41,7%). Με παρόμοιο τρόπο, τα αντισώματα έναντι του Ro52-4 (aa 57-

180) — το οποίο αλληλοεπικαλύπτεται εν μέρει με το Ro52-1 βρέθηκαν λιγότερο συχνά στη SSc παρά στο SjS και τον SLE (27,9 έναντι 50%). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι, ενώ η επικαλυπτόμενη περιοχή περιέχει έναν επιτόπο (ή επιτόπους) του anti-Ro52 σε ασθενείς με SjS και SLE, μια τέτοια αναγνώριση επιτόπου απουσιάζει, τουλάχιστον εν μέρει, στη SSc. Το γιατί οι αντισωματικές αποκρίσεις έναντι συγκεκριμένων τμημάτων του Ro52 είναι διαφορετικές σε συχνότητα και ισχύ μεταξύ διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων δεν είναι εύκολο να απαντηθεί [226,248,360,367,368]. Μπορεί ωστόσο μόνο να υποθέσει κανείς ότι οι ακριβείς μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή αποκρίσεων των anti-Ro52 στη SSc διαφέρουν κάπως από εκείνους που ισχύουν για το SjS και τον SLE. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι σε ασθενείς με SSc τα anti-Ro52 συνυπάρχουν λιγότερο συχνά με τα anti-Ro60 αντισώματα, σε σύγκριση με αυτό που ισχύει για το SjS και τον SLE, τα οποία συνήθως παρουσιάζουν ταυτόχρονη θετικότητα και για τα δύο αυτοαντισώματα [252,262,369]. Ένα παρόμοιο πρότυπο αναγνώρισης επιτόπων με αυτό της SSc (της λιγότερο συχνής αναγνώρισης των Ro52-1 και Ro52-4), παρατηρήθηκε επίσης στην PBC, υποδηλώνοντας την πιθανή παρουσία ενός κοινού (ή παρόμοιου) μηχανισμού παραγωγής αυτοαντισωμάτων και για τις δύο αυτές ασθένειες [365].

Η αυξημένη συχνότητα αντιδραστικότητας έναντι των Ro52-1 και Ro52-5 σε ασθενείς με SSc διπλά θετικούς για τα anti-Ro52/anti-Ro60 σε σχέση με ασθενείς anti-Ro52+/anti-Ro60- είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Επί του παρόντος, δεν είναι γνωστό γιατί ορισμένοι ασθενείς έχουν αντιδραστικότητα μόνο στο Ro52, μόνο στο Ro60 ή και στα δύο [243]. Τα δύο αυτοαντιγόνα είναι δομικά μη σχετιζόμενα, αλλά ανοσολογικά αλληλένδετα καθώς οι ανοσοαποκρίσεις των anti-Ro52 και anti-Ro60 τείνουν να συνυπάρχουν [196, 370]. Ωστόσο, φαίνεται ότι σε αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα τα

anti-Ro52 αυτοαντισώματα μπορεί να ανιχνεύονται μεμονωμένα, χωρίς δηλαδή την παράλληλη παρουσία anti-Ro60 αυτοαντισωμάτων. Μηχανισμοί, όπως η επέκταση του επιτόπου και η έκθεση σε κρυπτικούς επιτόπους σε διπλά θετικούς ορούς σε πολύ πρώιμα στάδια της νόσου μπορεί να ευθύνονται για την ταυτόχρονη αντιδραστικότητα [74, 226, 248, 366, 367]. Η κλινική σημασία της επιτοπικής αναγνώρισης υπογραμμίζεται σε πειραματικά μοντέλα, όπου ο κλινικός φαινότυπος στα πειραματόζωα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το τμήμα του Ro52, που χρησιμοποιείται ως ανοσογόνο. Για παράδειγμα, οι *Sroka et al.* [230] έδειξαν ότι μόνο η ανοσοποίηση με την *coiled coil domain* του Ro52 και η επακόλουθη ανοσοαπόκρισή της έναντι της *coiled coil domain* του Ro52 μπορεί να προκαλέσει ανοσοεπαγόμενη δυσλειτουργία των σιελογόνων αδένων [230]. Ωστόσο, δεν μπορέσαμε να βρούμε συγκεκριμένες συσχετίσεις μεταξύ των κλινικών χαρακτηριστικών και του προφίλ αναγνώρισης των επιτόπων. Η σχετικά πρόσφατη επίδειξη της πραγματικής φύσης του αντιγόνου του Ro52 και του πλειοτροπικού ρόλου-κλειδιού του για τη μεταγωγή σήματος, στην προσαρμοστική και έμφυτη ανοσία ως μέλος της οικογένειας των TRIM πρωτεϊνών μπορεί να εξηγήσει (τουλάχιστον εν μέρει) μερικά από αυτά τα χαρακτηριστικά [371-374]. Το Ro52 (TRIM21) είναι ένας ενδοκυτταροπλασματικός IgG υποδοχέας και μηχανισμοί εξάπλωσης των επιτόπων που περιλαμβάνουν περιοχές που αντιστοιχούν σε κυρίαρχους ή υποκυρίαρχους επίτοπους των Ro52 και Ro60 μπορεί να ευθύνονται για την παρατηρούμενη διακριτή αντισωματική αναγνώριση έναντι των δύο αντιγόνων [139].

Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η χαρτογράφηση επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων στην SSc αποκαλύπτει έναν κοινό παρονομαστή, τον επίτοπο που σχετίζεται με την *coiled coil domain*, ο οποίος, όπως και στο SjS, τον SLE και σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις, παρουσιάζει καθολική αντιδραστικότητα. Η περιοχή του N-

τελικού άκρου που αφορά στην αλληλουχία aa 57-180 είναι ένας κυρίαρχος επίτοπος σε anti-Ro52+/Ro60+ ασθενείς με SSc αλλά όχι στους anti-Ro52+/Ro60-, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Ro60 εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στη διαμόρφωση του επιτοπικού ρεπερτορίου των anti-Ro52 αντισωμάτων, εύρημα που επιδέχεται περαιτέρω διερεύνησης [35, 36]. Η κατανόηση των μηχανισμών που ευθύνονται για τη διακοπή της ανοχής του Ro52 στην SSc μπορεί να ρίξει φως όχι μόνο στην κατανόηση της παθογένειας αυτής της ασθένειας αλλά και της παθογένειας του SjS και του SLE, λαμβάνοντας το Ro60 ως βασικό παράγοντα. Σε καμία περίπτωση η μελέτη αυτή ή άλλες μελέτες αυτού του είδους [231] δεν μπορούν να απαντήσουν στο βασικό ερώτημα που προκύπτει. Είναι αυτά τα δεδομένα επιφαινόμενα ή παίζουν όντως κάποιο ρόλο στην επαγωγή των anti-Ro52 ή anti-Ro60 σε ασθενείς με SSc, άλλα AiRDs ή όντως σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα; Ωστόσο, τα δεδομένα μας δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες που θα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε δείγματα ορού ασθενών σε μεγάλη κλίμακα, καθώς και σε πειραματικά μοντέλα της νόσου.

Κεφάλαιο 4: Μελέτη της αντιγονοειδικής αντιδραστικότητας αντισωμάτων έναντι του κυτταρομεγαλοϊού σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και η συσχέτιση αυτών με την ταυτόχρονη παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων

4.1 Εισαγωγή

Ο λόγος για τον οποίο τα anti-Ro52 αυτοαντισώματα είναι τόσο συχνά στη SSc, ιδιαίτερα απουσία του Ro60, παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος. Ιικοί παράγοντες, όπως ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) έχουν θεωρηθεί ως παράγοντες ενεργοποίησης αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με τη SSc, κυρίως με βάση τα ανοσολογικά δεδομένα, υποδηλώνοντας αυξημένο επιπολασμό και/ή τίτλους αντιγονο-ειδικών αντισωμάτων έναντι του HCMV σε ασθενείς με SSc σε σύγκριση με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις [39,321,328] και ορολογικές ενδείξεις ανοσολογικής διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ αντιγόνων του HCMV και ανθρώπινων αντιγόνων [374-376]. Ο HCMV σε συνέργεια με το υπεριώδες φως B έχει αποδειχθεί ότι επάγει την έκφραση του αντιγόνου Ro52 (αλλά όχι του Ro60) στην επιφάνεια των ινοβλαστών [342], ενώ ο HCMV θα μπορούσε να προκαλέσει την έκφραση του Ro60 (αλλά όχι του Ro52) στα κερατινοκύτταρα στον SLE [341].

Επομένως, στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την πιθανή ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των anti-Ro52 αντισωμάτων και των αντισωματικών αποκρίσεων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με SSc και SLE. Ο απώτερος στόχος μας ήταν να εντοπίσουμε ένα ιικό αντιγόνο, το οποίο μπορεί πράγματι να συσχετίζεται ειδικά με anti-Ro52 αντισωματικές αποκρίσεις, καθώς αυτό θα μπορούσε να αποκαλύψει την ενδιαφέρουσα σχέση του HCMV και του Ro52 στη SSc.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Υλικά

Αξιολογήθηκαν οι κυρίαρχες anti-HCMV αντισωματικές αποκρίσεις σε θετικούς και αρνητικούς για το anti-Ro52 ασθενείς με SSc και έγινε σύγκριση με εκείνες ασθενών με SLE και SjS. Αναλύθηκαν 116 anti-HCMV ab(+) οροί, συμπεριλαμβανομένων 70 ορών anti-Ro52(+) ασθενών (29 με SSc, 23 με SLE και 18 με SjS) και 46 οροί anti-Ro52(-) ασθενών (29 με SSc, 9 με SLE και 8 με SjS), ως αρνητικοί μάρτυρες.

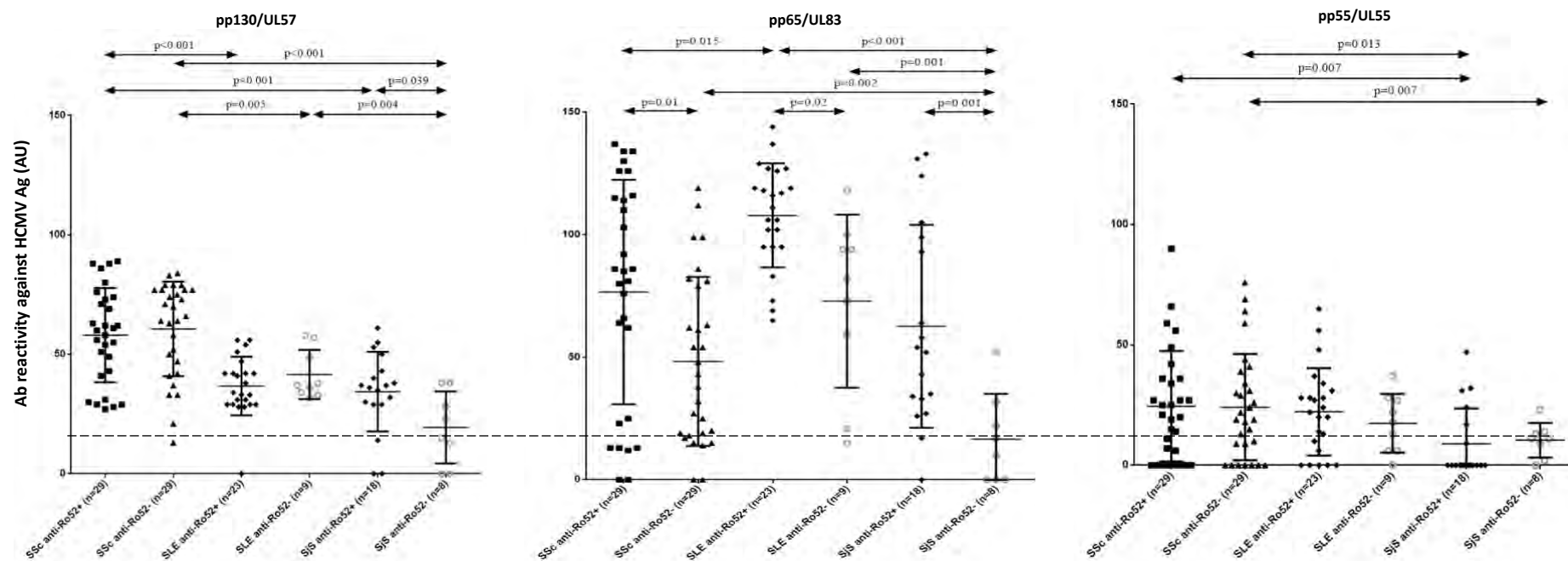
4.2.2 Μέθοδοι

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι των ειδικών αντιγόνων του HCMV pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44, p38 και pp28/UL99 ελέγχθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot (Anti-CMV IgG, Euroimmun AG, Γερμανία), όπως περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 2.1.5.2.

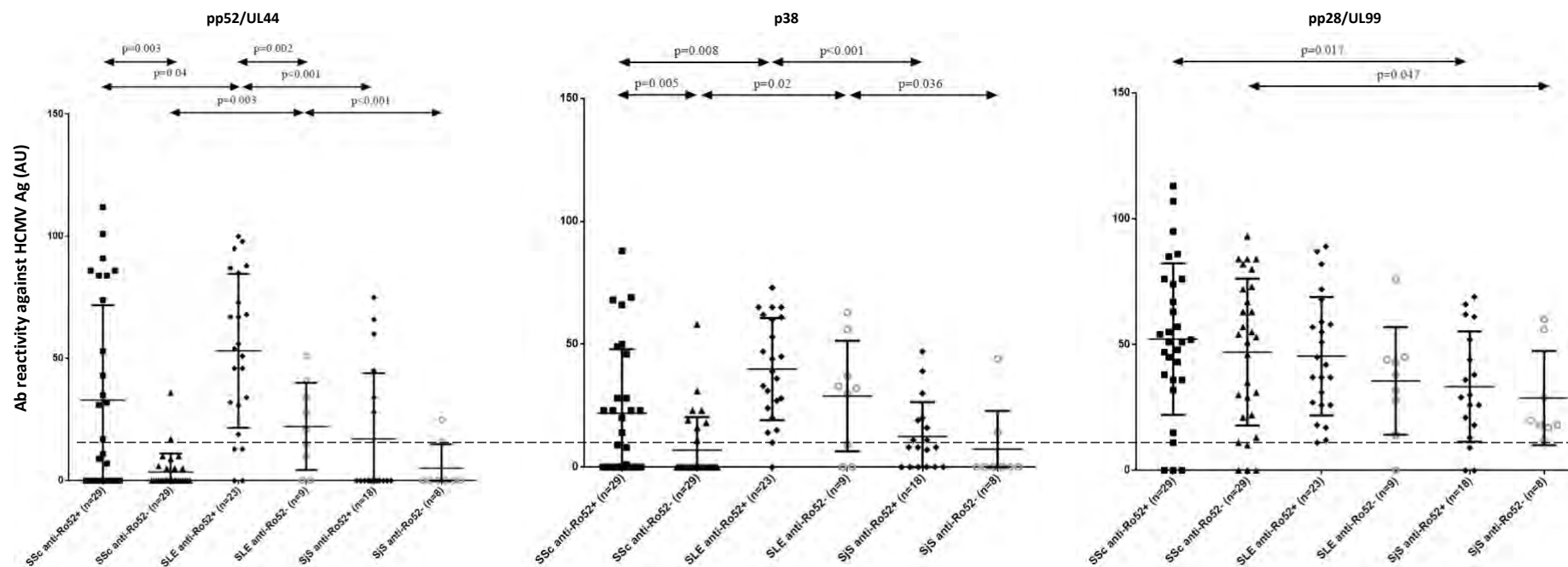
Η παρουσία των anti-Ro52 και anti-Ro60 αντισωμάτων ελέγχθηκε με εμπορικά διαθέσιμη ELISA (Inova Diagnostics/Werfen, San Diego, CA), καθώς και με γραμμική μέθοδο ανοσοαποτύπωσης (ANA profile, Euroimmun AG, Γερμανία).

4.3 Αποτελέσματα

Όλοι οι οροί των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη εξετάστηκαν αρχικά για την παρουσία anti-HCMV αντισωμάτων και την παρουσία αντισωμάτων έναντι των εξής συγκεκριμένων ειδικών αντιγόνων του HCMV: pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44, p38 και pp28/UL99 με ανοσοαποτύπωση κατά westernblot. Η αντιδραστικότητα έναντι μεμονωμένων αντιγόνων του HCMV απεικονίζεται στο Εικόνα 4.1.



(συνέχεια στην επόμενη σελίδα)



ΕΙΚΟΝΑ 4.1. Αντιδραστικότητες έναντι του κάθε αντιγόνου του HCMV σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE) και σύνδρομο Sjögren's (SjS).

4.3.1 Χυμική απάντηση έναντι αντιγόνων του HCMV σε anti-Ro52 θετικούς έναντι anti-Ro52 αρνητικούς ασθενείς

Οι χυμικές αποκρίσεις έναντι των αντιγόνων του HCMV pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44, p38 και pp28/UL99 σε anti-Ro52 θετικούς έναντι anti-Ro52 αρνητικούς ασθενείς με SSc, SLE και σύνδρομο Sjögren παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Όπως φαίνεται, οι anti-Ro52 θετικοί ασθενείς με SSc ήταν πιο συχνά θετικοί και για την παρουσία αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων pp52/UL44 και p38, σε σχέση με τους anti-Ro52 αρνητικούς (Πίνακας 4.1). Δεν αναδείχθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ anti-Ro52 θετικών και anti-Ro52 αρνητικών ασθενών με SLE και SjS. Ο Πίνακας 4.2 παρουσιάζει τις συχνότητες των αντισωμάτων έναντι των υπό έλεγχο αντιγόνων του HCMV στο σύνολο των anti-Ro52 θετικών και anti-Ro52 αρνητικών ασθενών (με SSc, SLE και SjS). Τα αντισώματα έναντι των pp52/UL44 και p38 ήταν πιο συχνά ανιχνεύσιμα στους anti-Ro52 θετικούς έναντι των anti-Ro52 αρνητικών ασθενών (Πίνακας 4.2). Στην Εικόνα 4.2 παρουσιάζονται τα διαγράμματα Venn τα οποία απεικονίζουν την ταυτόχρονη παρουσία αντισωμάτων έναντι του Ro52 και αντιπροσωπευτικών αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με SSc, SLE και SjS. Η εικόνα 4.3 παρουσιάζει αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις αντισωματικής απάντησης με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης έναντι των αντιγόνων του HCMV, ασθενών με SSc, SLE και SjS.

4.3.2 Χυμική απάντηση έναντι αντιγόνων του HCMV σε anti-Ro60 θετικούς έναντι anti-Ro60 αρνητικούς ασθενείς

Τα δεδομένα των αντισωματικών αποκρίσεων έναντι των αντιγόνων του HCMV pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44, p38 και pp28/UL99 σε anti-Ro60 θετικούς συγκρινόμενα με τους anti-Ro60 αρνητικούς ασθενείς με SSc, SLE και SjS παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 4.1. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν ανευρέθηκε σε όλες τις συγκρίσεις.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2, το σύνολο των anti-Ro60 θετικών ασθενών με SSc, SLE και SjS είχε πιο συχνά θετικά αντισώματα έναντι των αντιγόνων pp52/UL44 και pp28/UL99, σε σχέση με τους anti-Ro60 αρνητικούς ασθενείς. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται οι συχνότητες των αντισωμάτων έναντι των μεμονωμένων αντιγόνων του HCMV μετά την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε συνδυαστικές ομάδες ανάλογα με την αντιδραστικότητά τους έναντι του Ro52 και του Ro60 [anti-Ro52(+)/Ro60(+), Ro52(+)/Ro60(-), Ro52(-)/Ro60(+) and anti-Ro52(-)/Ro60(-)]. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν ανιχνεύθηκε σε αυτή την ανάλυση.

Στην Εικόνα 4.4 παρουσιάζονται η συχνότητα αντισωματικής αντιδραστικότητας έναντι αντιγόνων του HCMV ανάλογα με την αντιδραστικότητα έναντι του Ro52 και του Ro60. Στο σύνολο των ασθενών, καθώς σε χωριστά στους ασθενείς με SSc και SLE.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1. Συχνότητες των αντισωμάτων έναντι των υπό μελέτη αντιγόνων του HCMV σε σχέση με την παρουσία anti-Ro52 ή anti-Ro60 αυτοαντισωμάτων σε 116 ασθενείς (58 ασθενείς με SSc, 32 ασθενείς με SLE και 26 ασθενείς με SjS).

Ασθενείς με SSc (n=58)	Ro52(+) (n=29) (%;95%CI)	Ro52(-) (n=29) (%;95%CI)	p	Ro60(+) (n=17) (%;95%CI)	Ro60(-) (n=41) (%;95%CI)	p
pp130/UL57	29 (100%)	27 (93.1%; 83.9-100%)	0.15	17 (100%)	39(95.1%; 88.5-100%)	1
pp65/UL83	22 (75.9%; 60.3-90.9%)	19 (65.5%;48.2-82.8%)	0.387	14 (82.4%; 64.3-100%)	27(65.9%; 51.4-80.4%)	0.342
pp55/UL55	14 (48.3%; 30.2-66.4%)	12 (41.4%; 23.5-59.3%)	0.597	9 (52.9%; 29.2-76.6%)	17(41.5%; 26.4-56.6%)	0.424*
pp52/UL44	13 (44.8%; 26.7-62.9%)	1 (3.4%; 0-10%)	0.000*	5 (29.4%; 7.5-51.1%)	9(22.0%; 9.3-34.7%)	0.546
p38	9 (31.0%; 14.2-47.8%)	2 (6.9%; 0-16.1%)	0.041*	4 (23.5%;3.3-53.7%)	7 (17.1%; 5.6-28.6%)	0.715*
pp28/UL99	24 (82.8%;69.1-96.5%)	21 (72.4%; 56.1-88.7%)	0.345	16 (94.1%; 82.9-100%)	29(70.7%; 56.8-84.6%)	0.082
Ασθενείς με SLE (n=32)	Ro52(+) (n=23) (%;95%CI)	Ro52(-) (n=9) (%;95%CI)	p	Ro60(+) (n=17) (%;95%CI)	Ro60(-) (n=15) (%;95%CI)	p
pp130/UL57	22 (95.7%; 87.4-100%)	9 (100%)	1	17 (100%)	14 (93.3%; 80.6-100%)	0.469
pp65/UL83	23 (100%)	7 (77.8%; 50.7-100%)	0.073	17 (100%)	13 (86.7%; 69.5-100%)	0.212
pp55/UL55	11 (47.8%; 27.4-68.2%)	3 (33.3%; 2.5-64.1%)	0.694*	8 (47.1%; 23.4-70.8%)	6 (40.0%; 25.2-64.8%)	0.688
pp52/UL44	18 (78.3%; 61.5-95.1%)	4 (44.4%; 11.7-77.1%)	0.096*	12 (70.6%;47.9-92.3%)	10 (66.7%; 42.8-90.6%)	0.811
p38	18 (78.3%; 61.5-95.1%)	6 (66.7%; 35.9-97.5%)	0.654	13 (76.5%; 56.3-96.7%)	11 (73.3%; 50.9-95.7%)	1
pp28/UL99	19 (82.6%; 67.2-98%)	7 (77.8%; 50.7-100%)	1	15 (88.2%; 72.9-100%)	11 (173.3%; 50.9-95.7%)	0.383
Ασθενείς με SjS (n=26)	Ro52(+) (n=18) (%;95%CI)	Ro52(-) (n=8) (%;95%CI)	p	Ro60(+) (n=20) (%;95%CI)	Ro60(-) (n=6) (%;95%CI)	p
pp130/UL57	16 (88.9%;74.5-100%)	6 (75%;45-100%)	0.28	16 (80%;62.5-97.5%)	5 (83.3%;53.5-100%)	1
pp65/UL83	17 (94.6%;84.1-100%)	4 (50%;15.4-84.6%)	0.072*	17 (85%;69.4-100%)	5 (83.3%;53.5-100%)	1
pp55/UL55	5 (27.8%;7.1-48.5%)	3 (37.5%;4-61%)	1.0*	6 (30%;9.9-50.1%)	1 (16.7%;0-46.5%)	1.0*
pp52/UL44	6 (33.3%;11.5-55.1%)	2 (25%;0-55%)	1.0*	8 (40%;18.6-61.4%)	0 (0)	0.146*
p38	6 (33.3%;11.5-55.1%)	2 (25%;0-55%)	0.37*	6 (30%;9.9-50.1%)	1 (16.7%;0-46.5%)	1.0*
pp28/UL99	14 (77.8%;58.6-97%)	8 (100%)	1	17 (85%63.5-100%)	4 (66.7%;29-100%)	0.596*

-Οι συγκρίσεις που σημειώνονται με (*) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Fisher's exact test. Όλες οι συγκρίσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας χ^2 test.

-SSc= συστηματική σκλήρυνση, SLE= συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, SjS= σύνδρομο Sjögren's

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2. Αθροιστικές συχνότητες των αντισωματικών αποκρίσεων έναντι των αντιγόνων του HCMV σε 116 ασθενείς (58 με SSc, 32 με SLE και 26 με SjS) σε σχέση με την αντιδραστικότητά τους έναντι των Ro52 και Ro60.

Σύνολο ασθενών (n=116)	Ro52(+) (n=71) (%;95%CI)	Ro52(-) (n=45) (%;95%CI)	P	Ro60(+) (n=54) (%;95%CI)	Ro60(-) (n=62) (%;95%CI)	P
pp130/UL57	68 (95.8%;91.1-100%)	42 (93.3%;86-100%)	1.0	51 (94.4%;88.3-100%)	60 (96.8%;92.4-100%)	0.663
pp65/UL83	68 (95.8%;91.1-100%)	40 (88.9%;79.7-99.1%)	0.258	49 (90.7%;83-98.4%)	58 (93.5%;87.4-96.6%)	0.732
pp55/UL55	41 (57.7%;46.1-69.3%)	27 (60%;45.7-74.3%)	0.849	32 (59.3%;46.2-72.4%)	38 (61.3%;49.1-73.4%)	0.851
pp52/UL44	41 (57.7%;46.1-69.3%)	9 (20%;6.5-33.5%)	<0.001	29 (53.7%;40.4-67%)	22 (35.5%;23.6-55.4%)	0.049
p38	42 (59.2%;47.8-70.4%)	14 (31.1%;17.6-44.6%)	0.004	32 (59.3%;46.2-72.4%)	26 (41.9%;29.6-54.2%)	0.063
pp28/UL99	61 (85.9%;77.8-94%)	39 (86.7%;76.8-96.6%)	1.0	51 (94.4%;88.3-100%)	51 (82.3%;72.7-91.8%)	0.051

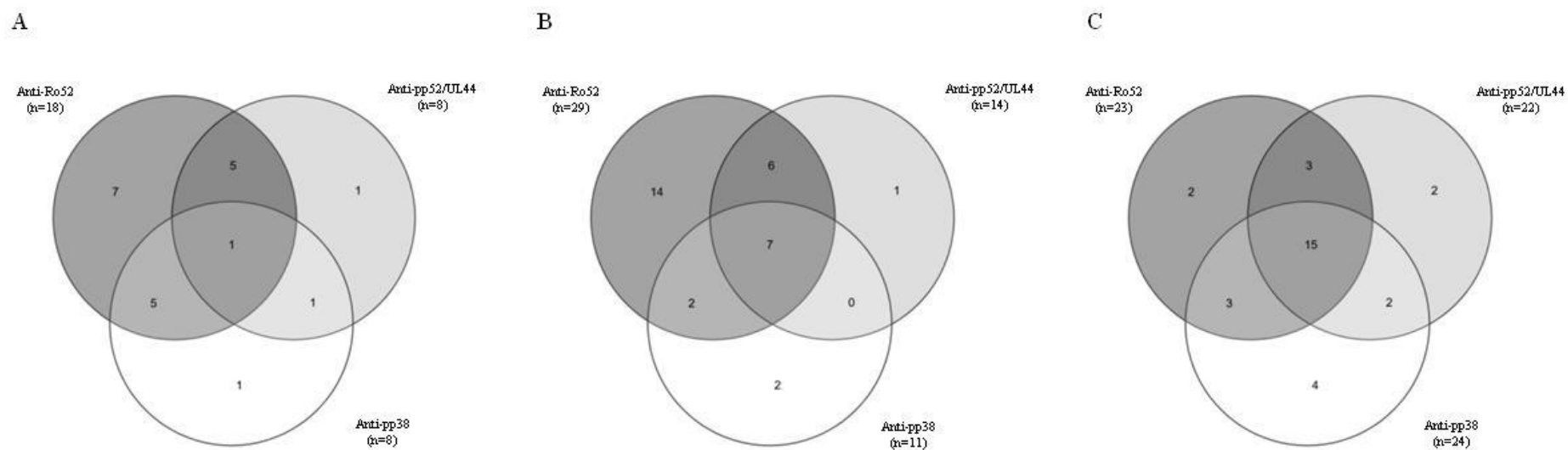
- Όλες οι συγκρίσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας χ^2 test.

-SSc= συστηματική σκλήρυνση, SLE= συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, SjS= σύνδρομο Sjögren's

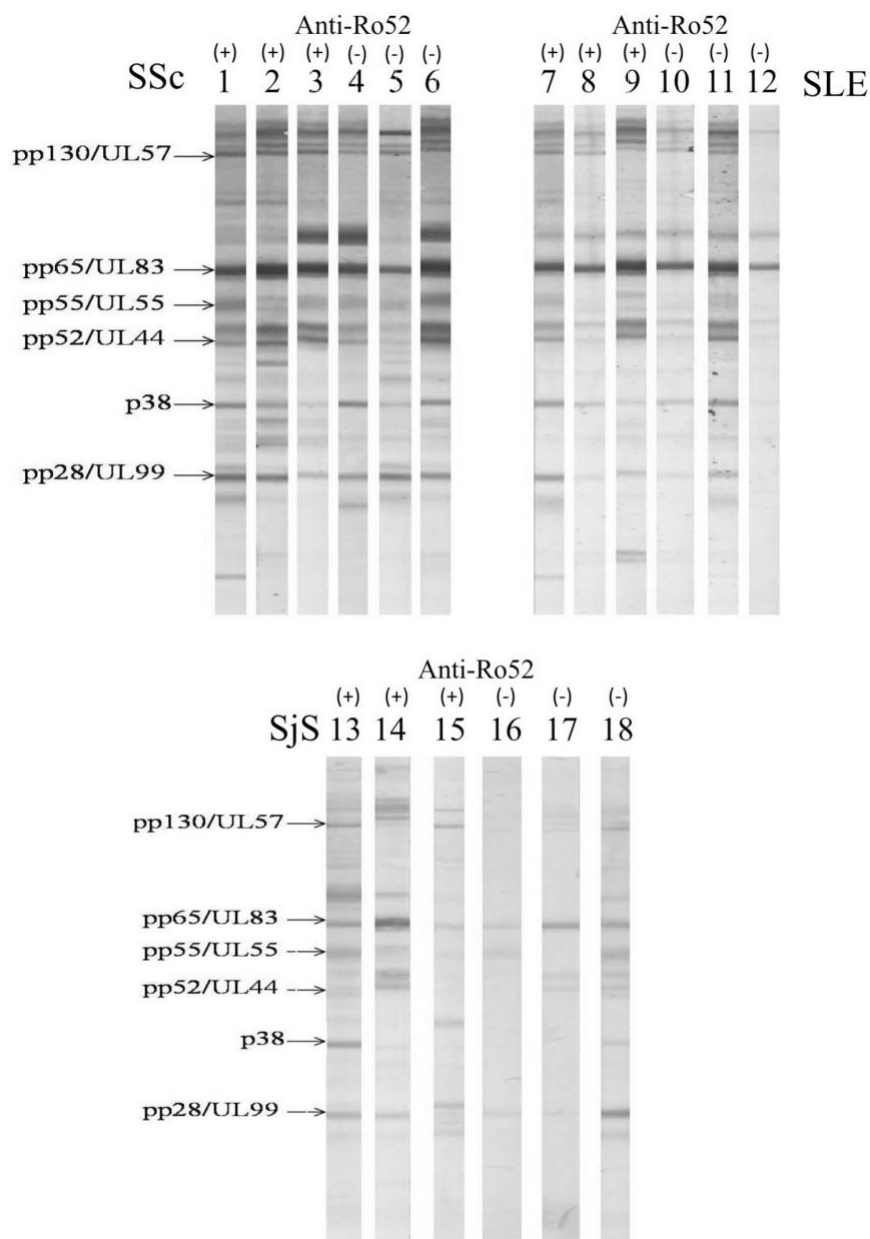
ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3. Αθροιστικές συχνότητες των αντισωματικών αποκρίσεων έναντι των αντιγόνων του HCMV σε 116 ασθενείς (58 με SSc, 32 με SLE και 26 με SjS) σε σχέση με την αντιδραστικότητά τους έναντι των Ro52 και Ro60.

Σύνολο ασθενών (n=116)	Ro52 ή/και Ro60-θετικοί (n=84)	Ro52 και Ro60 αρνητικοί (n=32)	p	Ro52 ή/και Ro60 θετικοί ασθενείς με SSc (n=33)	Ro52 και Ro60 αρνητικοί ασθενείς με SSc (n=25)	p	Ro52 ή/και Ro60 θετικοί ασθενείς με SLE (n=25)	Ro52 και Ro60 αρνητικοί ασθενείς με SLE (n=7)	p	Ro52 ή/και Ro60 θετικοί ασθενείς με SjS (n=26)	Ro52 και Ro60 αρνητικοί ασθενείς με SjS (n=0)
pp130/UL57	79 (94%)	32 (100%)	0.32	33 (100%)	23 (92.0%)	0.181	24 (96.0%)	7 (100%)	1.0	22 (84.6%)	-
pp65/UL83	77 (91.7%)	30 (93.8%)	1.0	25 (75.8%)	16 (64.0%)	0.33	25 (100%)	5 (71.4%)	0.042	21 (80.8%)	-
pp55/UL55	50 (59.5%)	20 (62.5%)	0.834	17 (51.5%)	9 (36.0%)	0.239	13 (52.0%)	1 (14.3%)	0.104	8 (30.8%)	-
pp52/UL44	45 (53.6%)	6 (18.8%)	0.001	13 (39.4%)	1 (4.0%)	0.002	18 (72.0%)	4 (57.1%)	0.648	8 (30.8%)	-
p38	50 (59.5%)	8 (25%)	0.002	10 (30.3%)	1 (4.0%)	0.016	20 (80.0%)	4 (57.1%)	0.327	8 (30.8%)	-
pp28/UL99	75 (89.3%)	27 (84.4%)	0.527	28 (84.8%)	17 (68.0%)	0.128	21 (84.0%)	5 (71.4%)	0.59	22 (84.6%)	-

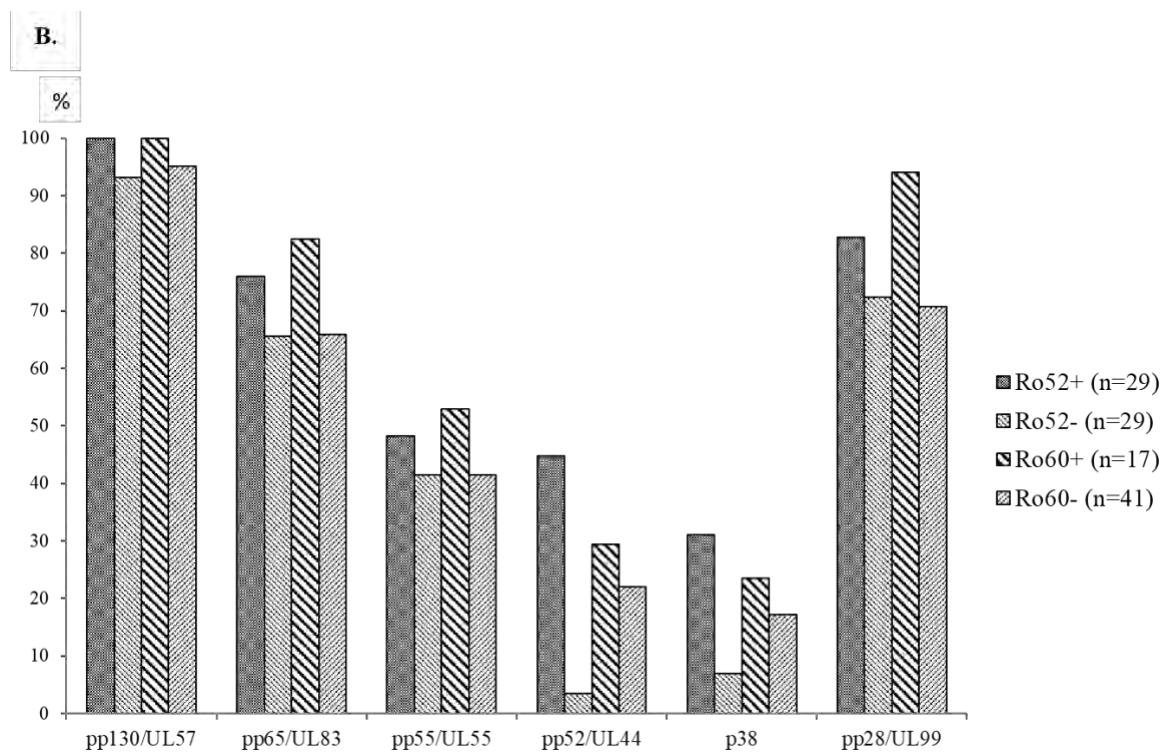
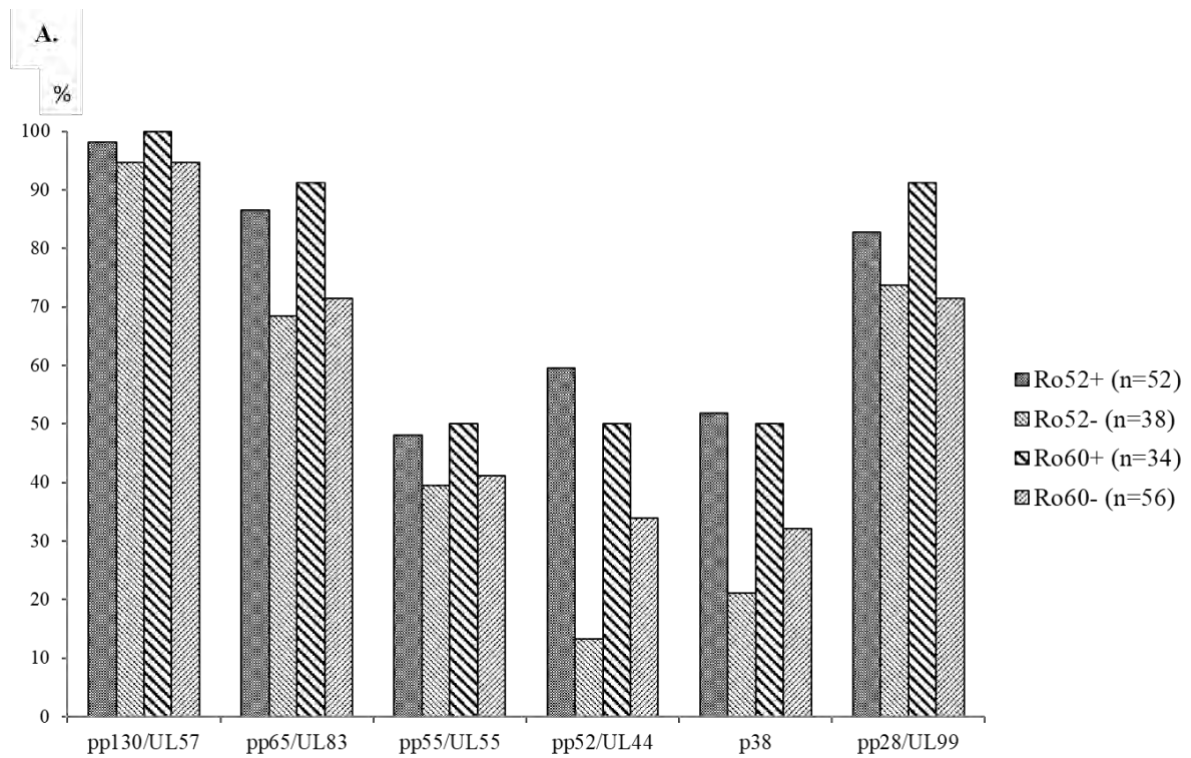
-SSc= συστηματική σκλήρυνση, SLE= συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, SjS= σύνδρομο Sjögren's

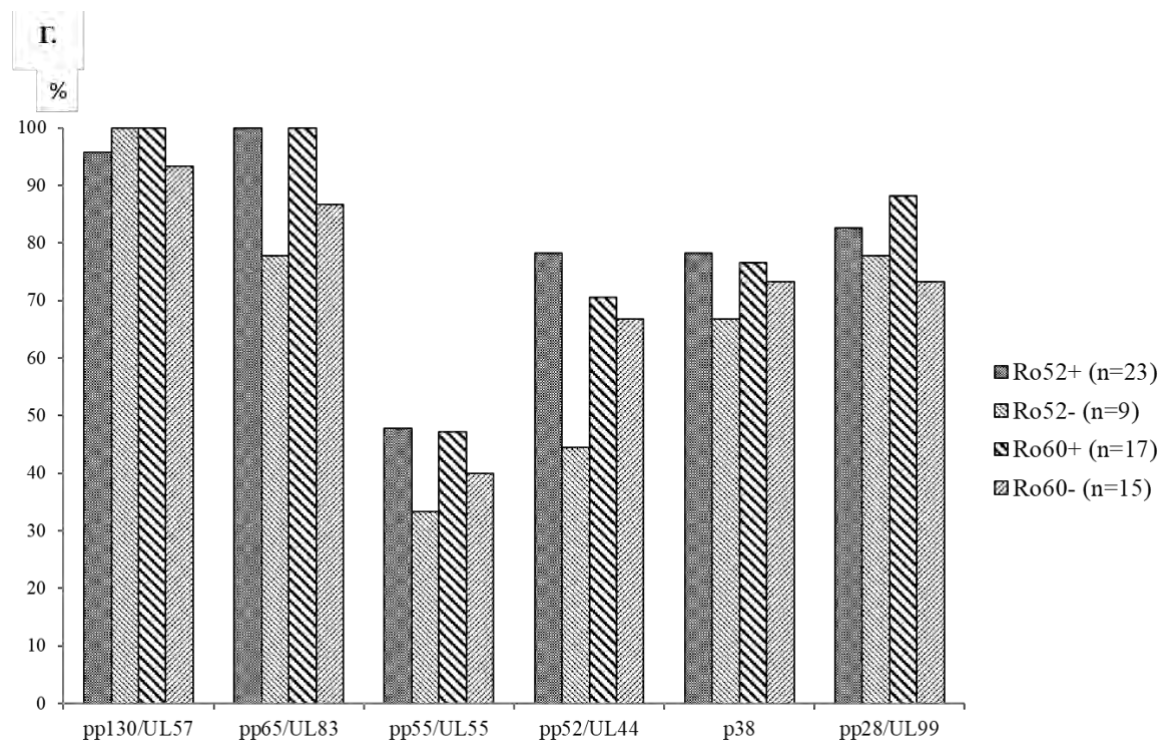


ΕΙΚΟΝΑ 4.2. Διαγράμματα Venn τα οποία απεικονίζουν την αντισωματική ανταδραστικότητα έναντι του Ro52, του pp52/UL44 και του p38 σε ασθενείς Α) με Συστηματική σκλήρυνση και Β) Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο και C) σύνδρομο Sjögren's.



ΕΙΚΟΝΑ 4.3. Αντιδραστικότητα αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αντιπροσωπευτικούς ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) (λωρίδες 1-6), συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE) (λωρίδες 7-12) και σύνδρομο Sjogren (SjS) (λωρίδες 13-18). Θετικοί (+) για anti-Ro52 ασθενείς: λωρίδες 1-3, 7-9 και 13-15. Αρνητικοί (-) για anti-Ro52 ασθενείς, λωρίδες (4-6, 10-12 και 16-18).





ΕΙΚΟΝΑ 4.4. Συχνότητα αντισωματικής αντιδραστικότητας έναντι αντιγόνων του HCMV ανάλογα με την αντιδραστικότητα έναντι του Ro52 και του Ro60, Α. στο σύνολο των ασθενών, Β. σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση και Γ. σε ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο.

4.3.3 Τίτλοι αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του HCMV

Οι διαφορές μεταξύ των τίτλων των αντισωμάτων των διαφόρων ασθενειών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4. Σε ασθενείς με SSc, οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι των αντισωμάτων anti-pp65/UL83, anti-pp52/UL44 και anti-p38 ήταν υψηλότεροι στους anti-Ro52 θετικούς σε σχέση με τους anti-Ro52 αρνητικούς ασθενείς. Στους ασθενείς με SLE, οι αντισωματικοί τίτλοι έναντι των anti-pp65/UL83 και anti-pp52/UL44 ήταν επίσης υψηλότεροι στους anti-Ro52 θετικούς σε σχέση με τους anti-Ro52 αρνητικούς (Πίνακας 4.4). Στους ασθενείς με SjS, οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι του pp130/UL57 και pp65/UL83 ήταν υψηλότεροι στους anti-Ro52 θετικούς σε σχέση με τους anti-Ro52 αρνητικούς.

Επιπρόσθετα, οι anti-Ro52 θετικοί ασθενείς με SSc συγκρινόμενοι με τους anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με SLE, παρουσίασαν υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου pp130/UL57 του HCMV και απεναντίας χαμηλότερους τίτλους έναντι των αντιγόνων pp65/UL83, pp52/UL44 και p38 (Πίνακας 4.4). Ακολούθως, συγκρίνοντας τους anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με SSc με τους anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με SjS, οι πρώτοι είχαν υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων pp130/UL57, pp55/UL55 και pp28/UL99 σε σχέση με τους δεύτερους (Πίνακας 4.4). Οι anti-Ro52 θετικοί ασθενείς με SLE συγκρινόμενοι με τους anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με σύνδρομο Sjögren παρουσίαζαν υψηλότερους τίτλους έναντι των αντιγόνων pp65/UL83, pp55/UL55, pp52/UL44 και p38.

Συγκρίνοντας τους anti-Ro52 αρνητικούς πλέον ασθενείς με SSc, SLE και SjS οι αντισωματικοί τίτλοι έναντι του pp130/UL57 ήταν υψηλότεροι στους ασθενείς με SSc σε σχέση με τους ασθενείς με SLE, ενώ το αντίθετό ίσχυε για τους αντισωματικούς τίτλους έναντι των αντιγόνων pp52/UL44 και p38 (Πίνακας 4.4). Επίσης, οι ασθενείς με SSc είχαν συνολικά υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων

pp130/UL57, pp65/UL83, pp55/UL55 και pp28/UL99 του HCMV σε σχέση με τους ασθενείς SjS (Πίνακας 4.4). Οι ασθενείς με SLE είχαν επίσης υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων pp6130/UL83, pp65/UL83, pp52/UL44 και p38 του HCMV σε σχέση με τους ασθενείς με SSc (Πίνακας 4.4).

Η συσχέτιση των αντισωματικών αποκρίσεων έναντι των υπό μελέτη αντιγόνων του κυτταρομεγαλοϊού με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με SSc δεν ανέδειξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά (Πίνακας 4.5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.4. Τίτλοι αντιδραστικότητας έναντι των αντιγόνων του HCMV, εκφραζόμενοι με τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD)

	SSc (n=58)	SSc Ro52(+) (n=29)	SSc Ro52(-) (n=29)	SLE (n=32)	SLE Ro52(+) (n=23)	SLE Ro52(-) (n=9)	SjS (n=26)	SjS Ro52(+) (n=18)	SjS Ro52(-) (n=8)
pp130/UL57	59.35 ± 19.64	58.03 ± 19.75	60.66 ± 19.78	38.1 ± 11.8	36.74 ± 12.29	41.56 ± 10.31	29.77 ± 17.39	34.39 ± 16.7	19.37 ± 15.08
pp65/UL83	62.47 ± 42.65	76.62 ± 45.82	48.31 ± 34.5	98.03 ± 29.96	107.8 ± 21.24	72.89 ± 35.32	48.5 ± 41.58	62.67 ± 41.38	16.62 ± 18.47
pp55/UL55	24.35 ± 22.33	24.55 ± 22.97	24.14 ± 22.1	20.88 ± 16.64	22.22 ± 18.14	17.44 ± 12.21	9.34 ± 19.79	8.88 ± 14.79	10.37 ± 7.17
pp52/UL44	18.26 ± 31.47	32.97 ± 38.87	3.55 ± 7.59	44.47 ± 31.38	53.17 ± 31.47	22.22 ± 17.83	13.42 ± 23.44	17.11 ± 26.87	5.12 ± 9.79
p38	14.4 ± 21.91	21.93 ± 26.04	6.86 ± 13.47	36.78 ± 21.48	39.87 ± 20.74	28.89 ± 22.52	10.84 ± 14.42	12.44 ± 14.02	7.25 ± 15.63
pp28/UL99	49.59 ± 29.46	52.17 ± 30.06	47.0 ± 29.14	42.63 ± 23.04	45.39 ± 23.52	35.56 ± 21.38	31.92 ± 20.72	33.33 ± 21.92	18.69 ± 6.6
	p SSc vs SLE	p SSc vs SjS	p SLE vs SjS	p SSc Ro52(+) vs Ro52(-)	p SLE Ro52(+) vs Ro52(-)	p SjS Ro52(+) vs Ro52(-)			
pp130/UL57	<0.001	<0.001	0.043	NS	NS	0.039			
pp65/UL83	<0.001	NS	<0.001	0.01	0.02	<0.001			
pp55/UL55	NS	<0.001	0.004	NS	NS	NS			
pp52/UL44	<0.001	NS	<0.001	0.003	0.002	NS			
p38	<0.001	NS	<0.001	0.005	NS	NS			
pp28/UL99	NS	0.002	NS	NS	NS	NS			

<i>(συνέχεια Πίνακα 4.4)</i>									
	P SSc Ro52(+) vs SLE Ro52(+)	P SSc Ro52(+) vs SjS Ro52(+)	P SLE Ro52(+) vs SjS Ro52(+)	P SScRo52(-) vs SLE Ro52(-)	P SScRo52(-) vsSjS Ro52(-))	P SLE Ro52(-) vs SjS Ro52(-)			
pp130/UL57	<0.001	<0.001	NS	0.005	<0.001	0.004			
pp65/UL83	0.015	NS	<0.001	NS	0.002	0.001			
pp55/UL55	NS	0.007	0.013	NS	0.007	NS			
pp52/UL44	0.04	NS	<0.001	0.003	NS	0.028			
p38	0.008	NS	<0.001	0.02	NS	0.036			
pp28/UL99	NS	0.017	NS	NS	0.047	NS			

-SSc= συστηματική σκλήρυνση, SLE= συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, SjS= σύνδρομο Sjögren's

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.5. Κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc) σε σχέση με τα αντισώματα έναντι των
υπό μελέτη αντιγόνων του HCMV.

	pp130/UL57 (n=56)	p	pp65/UL83 (n=41)	p	pp55/UL55 (n=26)	p	pp52/UL44 (n=14)	p	p38 (n=11)	p	pp28/ UL99 (n=45)	p
Κλινικά χαρακτηριστικά												
Τύπος SSc		0.491		0.248		1.0		0.358		0.504		0.53
-lcSSc (n,%)	29 (51.8)		23 (56.1)		13 (50.0)		9 (64.3)		7 (63.6)		24 (53.3)	
-dcSSc (n,%)	27 (48.2)		18 (43.9)		13 (50.0)		5 (35.7)		4 (36.4)		31 (46.7)	
Δακτυλικά έλκη (n,%)	16 (28.6)	0.504	14 (34.1)	0.342	7 (26.9)	0.778	5 (35.7)	0.737	3 (27.3)	1.0	15 (33.3)	0.307
Γαστρεντερική προσβολή (n,%)	36 (64.3)	1.0	27 (65.9)	0.765	17 (65.4)	1.0	10 (71.4)	0.544	7 (63.6)	1.0	32 (71.1)	0.031
Αρθρίτιδα (n,%)	14 (25.0)	1.0	11 (26.8)	0.523	8 (30.8)	0.361	5 (35.7)	0.245	4 (36.4)	0.433	13 (28.9)	0.155
Ορογονίτιδα (n,%)	5 (8.9)	1.0	5 (12.2)	0.308	2 (7.7)	1.0	2 (14.3)	0.585	2 (18.2)	0.237	4 (8.9)	1.0
Τηλαγγειεκτασίες (n,%)	38 (67.9)	1.0	27 (65.9)	0.54	17 (65.4)	0.776	6 (42.9)	<u>0.022</u>	7 (63.6)	0.724	30 (66.7)	0.735
Ασβεστώσεις (n,%)	7 (12.5)	0.259	5 (12.2)	0.681	3 (11.5)	0.72	1 (7.1)	0.665	2 (18.2)	0.639	6 (13.3)	1.0
Πνευμονική ίνωση (n,%)	23 (41.1)	0.181	20 (48.8)	0.247	12 (46.2)	0.791	7 (50.0)	0.758	5 (45.5)	1.0	20 (44.4)	0.76
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (n,%)	19 (33.9)	0.127	13 (31.7)	0.369	9 (34.6)	1.0	3 (21.4)	0.22	2 (18.2)	0.296	14 (31.1)	0.133
Νεφρική κρίση (n,%)	0 (0)	NA	0 (0)	NA	0 (0)	NA	0 (0)	NA	0 (0)	NA	0 (0)	NA
Σύνδρομο επικάλυψης (n,%)	10 (17.9)	1.0	10 (24.4)	0.025	6 (23.1)	0.319	7 (50.0)	0.001	7 (63.6)	<0.001	9 (20)	0.429
SS-A Ro60 θετικότητα (n, %)	17 (30.3)	1.0	14 (34.2)	0.342	9 (34.6)	0.424	5 (35.7)	0.546	4 (36.4)	0.715	16 (35.6)	0.082

<i>(συνέχεια Πίνακα 4.5)</i>	pp130/UL57 (n=56)	p	pp65/UL83 (n=41)	p	pp55/UL55 (n=26)	p	pp52/UL44 (n=14)	p	p38 (n=11)	p	pp28/ UL99 (n=45)	p
Αυτοαντισώματα σχετιζόμενα με τη SSc												
-Scl-70 (n,%)	17 (30.4)	0.528	11 (26.8)	0.354	9 (34.6)	0.776	2 (14.3)	0.187	3 (27.3)	1.0	14 (31.1)	1.0
-CENPA (n,%)	16 (28.6)	0.504	15 (36.9)	0.111	6 (23.1)	0.397	5 (35.7)	0.737	5 (45.5)	0.191	13 (28.9)	1.0
-CENPB (n,%)	16 (28.6)	0.504	15 (36.9)	0.111	6 (23.1)	0.397	5 (35.7)	0.737	5 (45.5)	0.191	13 (28.9)	1.0
-RPII (n,%)	2 (3.6)	1.0	0 (0)	0.082	1 (3.8)	1.0	0 (0)	1.0	0 (0)	1.0	1 (2.2)	0.401
-RPI55 (n,%)	4 (7.1)	1.0	2 (4.9)	0.573	2 (7.7)	1.0	1 (7.1)	1.0	1 (9.1)	1.0	2 (4.4)	0.214

4.4 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη εντόπισε ότι δύο βασικά αντιγόνα του HCMV είναι συχνότερα ανιχνεύσιμα σε anti-Ro52 θετικούς σε σχέση με anti-Ro52 αρνητικούς ασθενείς με SSc, χωρίς να παρατηρείται παρόμοια διαφορά μεταξύ anti-Ro52 θετικών και αρνητικών ασθενών με SLE. Τα ευρήματα αυτά ενδεχομένως υποδηλώνουν την παρουσία κάποιας συσχέτισης μεταξύ των αντισωμάτων έναντι των ιικών αντιγόνων και του Ro52. Ωστόσο, εάν το εύρημα αυτό είναι επιφανινόμενο ή έχει κάποια παθοφυσιολογική σημασία όσον αφορά την παρουσία των αυτοαντισωμάτων έναντι του Ro52, τα οποία αποτελούν τα τρίτα σε συχνότητα ανιχνεύσιμα αντισώματα σε ασθενείς με SSc, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Ο HCMV έχει συσχετιστεί με αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένων των αυτοάνοσων ρευματικών νοσημάτων και πιο συγκεκριμένα με το σκληρόδερμα. Ωστόσο, τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν έχουν οδηγήσει σε συγκεκριμένα συμπεράσματα, ως προς αυτή την κατεύθυνση. Ορολογικές μελέτες από διάφορα κέντρα, συμπεριλαμβανομένου και του δικού μας, έχουν αναδείξει την παρουσία αυξημένης συχνότητας ή/και αυξημένου τίτλου αντισωμάτων έναντι του HCMV ή συγκεκριμένων αντιγόνων αυτού σε ασθενείς με SSc, σε σχέση με άλλα νοσήματα (όπως η πολλαπλή σκλήρυνση) ή σε σχέση με υγιείς μάρτυρες [331, 377-379]. Παρόλα αυτά καμία από τις μελέτες αυτές δεν έχουν εστιάσει στον πιθανό παθοφυσιολογικό μηχανισμό. Ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης, για την παθογένεση διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων [314, 380-387], έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία της παρουσίας των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων ή των αντισωμάτων έναντι του Scl70 σε ασθενείς με SSc, ενώ αρκετοί ερευνητές παρουσίασαν δεδομένα ενδεικτικά παρουσίας διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των αυτοαντισωμάτων αυτών και αντιγόνων-μιμητών του ιού Epstein-Barr (EBV) [388]. Καμία από τις μελέτες αυτές

ωστόσο δεν έχουν παρουσιάσει της παρουσία κυρίαρχων ανοσολογικών μιμητών του HCMV. Ωστόσο, ο Lunardi και οι συνεργάτες του περιέγραψαν олиγοπεπτίδια με διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης UL94 του HCMV και του ομόλογού της μορίου της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης, tetraspanin transmembrane 4 superfamily member 7 (TM4SF7 ή NAG-2). Αυτά τα αντισώματα φάνηκε επίσης να έχουν τη δυνατότητα επαγωγής της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της ενεργοποίησης των ινοβλαστών σε ασθενείς με SSc [330].

Ενδιαφέρον προκαλεί επίσης το γεγονός ότι η SSc χαρακτηρίζεται από αυξημένη συχνότητα παρουσίας μόνο του anti-Ro52 αυτοαντισώματος, απουσία του anti-Ro60, το οποίο όπως έχει αναφερθεί συχνά συνοδεύει την παρουσία του anti-Ro52 σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει στον SLE και στο SjS [344, 252, 262]. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι πιθανώς κάποιος ιογενής παράγοντας, όπως για παράδειγμα ο HCMV, μπορεί να πυροδοτήσει και να επάγει την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων αυτών. Μια τέτοια υπόθεση, θα πρέπει θεωρητικά να εμπλέκει την παρουσία συγκεκριμένων αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του HCMV, ενώ η συχνότητα και ο τίτλος των αντισωμάτων αυτών θα πρέπει να αυξάνονται σε ασθενείς με SSc και θετικά anti-Ro52 αντισώματα [377-379], χωρίς να ισχύει απαραίτητα το ίδιο για τους anti-Ro52 θετικούς ασθενείς με SLE [341, 342]. Σύμφωνα λοιπόν με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, τα αντισώματα έναντι των pp52/UL44 και p38 ήταν πιο συχνά ανιχνεύσιμα σε anti-Ro52 θετικούς σε σχέση με anti-Ro52 αρνητικούς ασθενείς με SSc, χωρίς να ισχύει αυτό και για τους anti-Ro52 θετικούς και αρνητικούς ασθενείς με SLE. Τα ευρήματα αυτά πιθανώς υποδηλώνουν ότι τα δύο αυτά αντιγόνα του HCMV μπορεί να συμμετέχουν στην σχετιζόμενη με το Ro52 παθογένεια της SSc. Το UL44, αποτελεί μια συνδεδεμένη με το DNA φωσφο-πρωτεΐνη μεγέθους 52 kDa, απαραίτητη για την

αντιγραφή του DNA του HCMV [389] και έχει ισχυρές ανοσογονικές ιδιότητες. Πρόσφατα, ο Neo και οι συνεργάτες του [390] παρατήρησαν ότι τα αντισώματα έναντι του UL44 σχηματίζουν σύμπλοκα με το UL44 και άλλα πυρηνικά αυτοαντιγόνα που σχετίζονται με τον SLE, όπως το dsDNA, και κατά τη διάρκεια της επαγόμενης από ιό απόπτωσης, αυτά τα σύμπλοκα μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια όπου εκτίθενται στο ανοσοποιητικό σύστημα [390]. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί και την συχνή συνύπαρξη των anti-UL44 αντισωμάτων και των anti-dsDNA αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με SLE [390]. Δεν είναι ακόμα γνωστό το κατά πόσο το TRIM21 (Ro52) δημιουργεί σύμπλοκα με τα αντισώματα έναντι του UL44. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης, αντισώματα έναντι ιικών αντιγόνων τα οποία είναι συνδεδεμένα στον ιογενή παράγοντα διατηρούνται ενδοκυττάρια όπου και αναγνωρίζονται από το TRIM21/Ro52, το οποίο αποτελεί τον κατεξοχήν εκφραζόμενο κυτταροπλασματικό υποδοχέα αντισωμάτων και μέλος της οικογένειας TRIM των λιγασών της ουβικουτίνης [373, 391]. Η αναγνώριση αυτή οδηγεί σε εξουδετέρωση και σε επαγωγή anti-ιικών αντιδράσεων έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας [151, 165]. Επομένως, δεν είναι υπερβολή να υποθέσει κανείς ότι ανοσοσυμπλέγματα των anti-UL44 ή anti-p38 HCMV με το TRIM21 (Ro52) θα μπορούσαν να βρεθούν στην επιφάνεια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της επαγόμενης από τον ιό απόπτωσης αυτού, εξηγώντας έτσι την ταυτόχρονη εμφάνισή τους και την ορολογική τους σχέση με τη SSc [390]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το Ro60 δεν ανήκει στην οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών οπότε και δεν μπορεί να δεσμεύσει ιικά αντιγόνα συνδεδεμένα με αντισώματα που εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα.

Τα ανωτέρω αναφερόμενα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή καθώς δεν ανιχνεύθηκε κάποια κυρίαρχη συσχέτιση μεταξύ των anti-Ro52 αντισωμάτων και των αντισωμάτων έναντι των ειδικών αντιγόνων του HCMV, χωρίς

αυτό να υποβαθμίζει την αξία των ευρημάτων αυτών. Στην πραγματικότητα όλοι οι ασθενείς εκτός από τρεις με SSc και θετικά αντισώματα έναντι των αντιγόνων pp52/UL44 και p38 του HCMV, ήταν θετικοί και στα anti-Ro52, καθιστώντας τη μεταξύ τους συσχέτιση αρκετά πιθανή. Επιπλέον πειράματα θα πρέπει να διεξαχθούν μελλοντικά για τη μελέτη της σχέσης μεταξύ Ro52 και αντιγόνων του HCMV, αλλά μέχρι τότε η συσχέτιση αυτή δεν παρέχει ισχυρή επιβεβαίωση της υπόθεσης ότι ο HCMV επάγει την παραγωγή των anti-Ro52 αντισωμάτων. Μια πολυκλωνική αύξηση επαγόμενη από τον κυτταρομεγαλοϊό μπορεί στην πραγματικότητα να οδηγήσει στην παραγωγή νεοαντιγόνων, μεταξύ των οποίων θα μπορούσαν να είναι και τα anti-Ro52 αυτοαντισώματα. Μια άλλη πιθανότητα θα μπορούσε να είναι αυτή του ότι ο HCMV (σε συνδυασμό με την υπεριώδη ακτινοβολία B ή άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες) επάγει την υπερέκφραση του Ro52 και την απελευθέρωσή του σαν νεοαντιγόνο στην κυτταρική επιφάνεια κυττάρων που συμμετέχουν στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης και συγκεκριμένα των ινοβλαστών [342]. Ωστόσο, τα παραπάνω δεδομένα δεν μπορούν να υποστηρίξουν τις υποθέσεις αυτές.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή υποστηρίζει ότι η συχνότητα και οι τίτλοι έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού διαφέρουν μεταξύ anti-Ro52 θετικών και anti-Ro52 αρνητικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Αυτές οι διαφορές δε φάνηκε να ισχύουν και μεταξύ anti-Ro52 θετικών και anti-Ro52 αρνητικών ασθενών με SLE και SjS, υποδηλώνοντας την πιθανή συσχέτισή τους με το συγκεκριμένο νόσημα και όχι με την παρουσία του συγκεκριμένου αυτοαντισώματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Χαρτογράφηση επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων σε παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα

5.1 Εισαγωγή

Τα anti-Ro52 αντισώματα, όπως έχει αναφερθεί, ανιχνεύονται συχνά σε ασθενείς με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα [297]. Παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων έχει επίσης περιγραφεί σε παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Η καλύτερα αναγνωρισμένη παιδιατρική πάθηση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία των anti-Ro52 αντισωμάτων είναι ο νεογνικός ερυθματώδης λύκος (neonatal lupus erythematosus, NLE) [299]. Άλλα νοσήματα στα οποία απαντώνται τα αυτοαντισώματα αυτά είναι ο νεανικός SLE, το παιδιατρικό SjS, η νεανική IM και η αυτοάνοση ηπατίτιδα (autoimmune hepatitis, AIH) [297].

Στην AIH, τα anti-Ro52 αντισώματα ανιχνεύονται κατά μέσο όρο στο 40% (34,7–45,5%) των περιπτώσεων [288-290]. Η παρουσία των anti-Ro52 αντισωμάτων έχει συσχετιστεί με την ταυτόχρονη παρουσία αντισωμάτων έναντι του διαλυτού ηπατικού αντιγόνου (SLA), την ανάπτυξη κίρρωσης και χειρότερη πρόγνωση (θάνατο ή ανάγκη μεταμόσχευσης ήπατος) [291]. Αν και μεγάλο ποσοστό της AIH διαγιγνώσκεται στον παιδιατρικό πληθυσμό [310], μια διεξοδική αναζήτηση της βιβλιογραφίας απέτυχε να βρει μελέτες που εξετάζαν ειδικά παιδιατρικές περιπτώσεις AIH και παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων. Ομοίως, δεν βρέθηκαν ειδικές μελέτες για την SSc και την παρουσία anti-Ro52 αντισωμάτων σε παιδιατρικούς πληθυσμούς.

Ο χαρακτηρισμός των επιτοπικών περιοχών του Ro52 σε παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα υπολείπεται σε μεγάλο βαθμό. Όπως αναφέρθηκε εκτενώς σε προηγούμενα κεφάλαια, σε ενήλικες ασθενείς με SjS, SLE, αλλά και με SSc σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τα anti-Ro52 αυτοαντισώματα στοχεύουν κυρίως σε μεγάλες πολυπεπτιδικές αλληλουχίες στην περιοχή της

περιελιγμένης έλικας της πρωτεΐνης [352,360-365]. Θεωρήθηκε λοιπόν σκόπιμο να διερευνηθούν οι Β-κυτταρικοί επίτοποι του Ro52 και σε παιδιατρικούς ασθενείς με έμφαση στην ΑΙΗ λόγω της πρόσβασης σε βιολογικό υλικό.

5.2 Υλικά και μέθοδοι

5.2.1 Υλικά

Η μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων πραγματοποιήθηκε σε 10 παιδιατρικούς ασθενείς με ΑΙΗ και θετικά anti-Ro52 αντισώματα. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με βάση τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 3 της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

5.2.2 Μέθοδοι

Πέντε ανασυνδυασμένα τμήματα του Ro52 [Ro52-1 (aa 1-127), Ro52-2 (aa 125-268), Ro52-3 (aa 268-475), Ro52-4 (aa 57-180) και Ro52-5 (aa 181-320)] χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιδραστικότητας με τη χρήση ειδικής γραμμικής ανοσομεθόδου, όπως περιγράφεται στις ενότητες 2.2.2.

Η αντιδραστικότητα έναντι του Ro52 μελετήθηκε με τη χρήση της ELISA όπως περιγράφεται από τον κατασκευαστή (Inova Diagnostics/ Werfen, San Diego, CA).

5.3 Αποτελέσματα

Όλοι οι anti-Ro52 θετικοί παιδιατρικοί ασθενείς με ΑΙΗ αντέδρασαν έναντι του πλήρους αντιγόνου Ro52 με τη χρήση της γραμμικής ανοσομεθόδου, χωρίς την ανάδειξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς σε AU/ml σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ασθενείς στους οποίους πραγματοποιήθηκε μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων (μέση τιμή $\pm$ SD: 77,5 $\pm$ 15,48 AU/ml σε ασθενείς με ΑΙΗ, σε σύγκριση με 76,55 $\pm$ 23,13 AU/ml σε ασθενείς με SSc, 79,8 $\pm$ 24,3 AU/ml σε ασθενείς με SjS, 80,39 $\pm$ 28,26 AU/ml σε SLE, 81,73 $\pm$ 16,93 AU/ml με DM και 83,6 $\pm$ 35,2 AU/ml με PBC, $p > 0,05$).

5.3.1 Συχνότητα αντιδραστικότητας του καθενός τμήματος του Ro52 σε παιδιατρικούς ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα

Τα αποτελέσματα της αντιδραστικότητας των υπό μελέτη ορών στα πέντε τμήματα του Ro52 συνοψίζονται στον Πίνακες 5.1 και στην Εικόνα 5.1. Συνολικά, η αντιδραστικότητα έναντι των τμημάτων Ro52-1, Ro52-2, Ro52-3, Ro52-4 και Ro52-5 σε ασθενείς με ΑΙΗ ήταν 0%, 100%, 0%, 30% και 60%, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε ασθενείς με SSc ήταν 11,6%, 100%, 0%, 27,9% και 41,9%, σε ασθενείς με SjS ήταν 40%, 100%, 0%, 40% και 60%, σε ασθενείς με SLE ήταν 42,9%, 100%, 0%, 57,1% και 57,1%, σε ασθενείς με DM ήταν 20%, 100%, 0%, 33,3% και 40% και σε ασθενείς με PBC 6,7%, 100%, 0%, 6,7% και 40%.

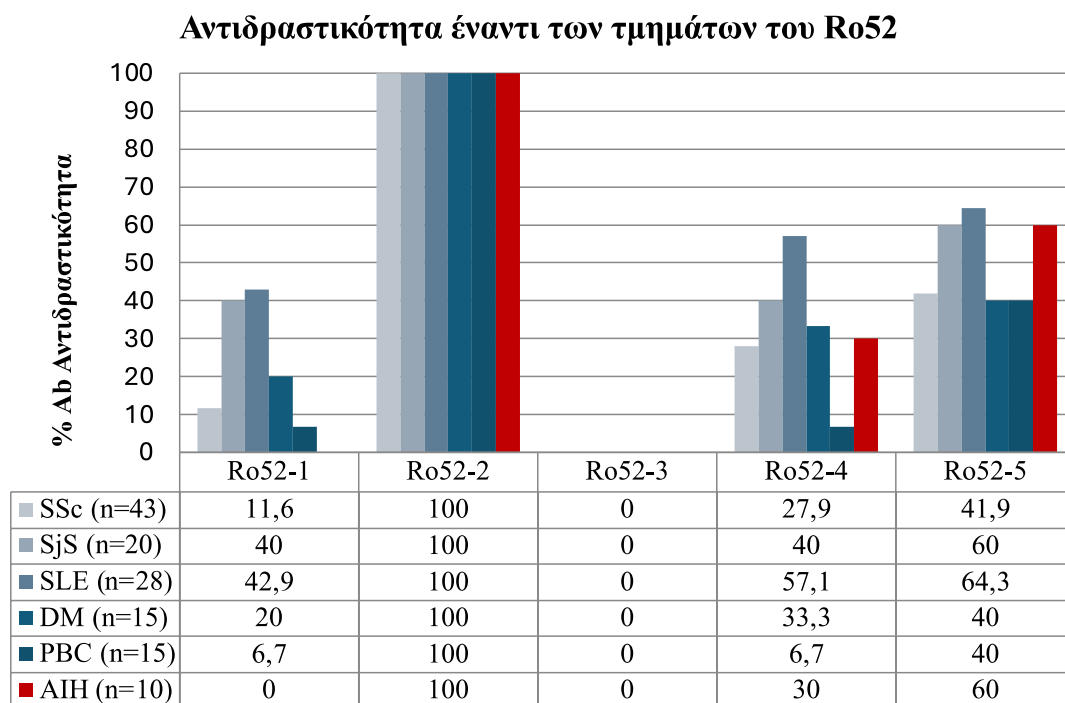
Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στην αντιδραστικότητα έναντι των τμημάτων του Ro52, μεταξύ των παιδιατρικών ασθενών με ΑΙΗ και θετικά anti-Ro52 αντισώματα σε σχέση με τα υπόλοιπα νοσήματα που έχουν μελετηθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1. Αντισωματική αντιδραστικότητα έναντι ολόκληρου του αντιγόνου Ro52 και των πέντε συγκεκριμένων τμημάτων αυτού στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα

	AIH (n=10)	SSc (n=43)	SjS (n=20)	SLE (n=28)	DM (n=15)	PBC (n=15)
Ro52	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ro52-1	0%	11.6%	40.0%	42.9%	20%	6.7%
Ro52-2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ro52-3	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ro52-4	30%	27.9%	40.0%	57.1%	33.3%	6.7%
Ro52-5	60%	41.9%	60.0%	57.1%	40%	40.0%

p (AIH vs SSc)	p (AIH vs SjS)	p (AIH vs SLE)	p (AIH vs DM)	p (AIH vs PBC)
NS	NS	NS	NS	NS
NS	NS	NS	NS	NS
NS	NS	NS	NS	NS
NS	NS	NS	NS	NS
NS	NS	NS	NS	NS
NS	NS	NS	NS	NS

*AIH: Αυτοάνοση Ηπατίτιδα, SSc: Συστηματική Σκλήρυνση, SjS: Σύνδρομο Sjögren's, SLE: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, DM: Δερματομυοσίτιδα, PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα



Εικόνα 5.1. Διάγραμμα απεικόνισης της αντισωματικής αντιδραστικότητας έναντι ολόκληρου του αντιγόνου Ro52 και των πέντε συγκεκριμένων τμημάτων αυτού στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα.

5.4 Συζήτηση

Αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη ολοκληρωμένη ανάλυση χαρτογράφησης των B-λεμφοκυτταρικών επιτόπων των anti-Ro52 αντισωμάτων σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΑΙΗ χρησιμοποιώντας μεγάλα στερεοτακτικά πολυπεπτιδυλικά τμήματα, τα οποία επικαλύπτουν ολόκληρο το Ro52 αντιγόνο. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν δείχνουν ότι, όπως και σε άλλα AIRDs, όπως το SjS και ο SLE [352,360-365] και τη SSc, η κυρίαρχη επιτοπική περιοχή που αναγνωρίζεται καθολικά από τα anti-Ro52 αντισώματα στη SSc είναι αυτή που βρίσκεται εντός του περιελιγμένου σπειρώματος της πρωτεΐνης (coiled coil domain, aa 125-268) [231,360]. Επίσης επιβεβαιώνεται η απουσία αντισωματικής δέσμησης με μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία εκτείνεται στο C-τελικό άκρο του αντιγόνου (Ro52-3, aa 268-475). Η μελέτη υστερεί σε ικανοποιητικό αριθμό ΑΙΗ ασθενών που μελετήθηκαν, αλλά ακόμη και σε αυτό το περιορισμένο αριθμό βρέθηκαν αποτελέσματα ανάλογα εκείνων σε άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα, που αναπτύχθηκαν επισταμένα.

Τα δεδομένα αυτά μπορεί να υποστηρίξουν παρόμοιο παθογενετικό ρόλο των anti-Ro52 αντισωμάτων και σε παιδιατρικούς ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα ανεξάρτητα αν πρόκειται για οργανοειδικά όπως αυτό της ΑΙΗ ή μη.. Ωστόσο, η λόγω του περιορισμένου αριθμού παιδιατρικών ασθενών, η εξαγωγή σχετικών συμπερασμάτων είναι επισφαλής. Κρίνεται λοιπόν σημαντική η μελλοντική πραγματοποίηση παρόμοιας μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό παιδιατρικών ασθενών με ΑΙΗ, καθώς και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (κυρίως ρευματικά όπως για παράδειγμα ο SLE) σε παιδιά, στα οποία ανιχνεύονται anti-Ro52 αντισώματα.

Βιβλιογραφία

1. Volkmann, E.R., K. Andréasson, and V. Smith, *Systemic sclerosis*. Lancet, 2023. **401**(10373): p. 304-318.
2. Bergamasco, A., et al., *Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease*. Clin Epidemiol, 2019. **11**: p. 257-273.
3. Morrisroe, K., et al., *The clinical and economic burden of systemic sclerosis related interstitial lung disease*. Rheumatology (Oxford), 2020. **59**(8): p. 1878-1888.
4. Steen, V.D. and T.A. Medsger, *Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 940-4.
5. Elhai, M., et al., *Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2017. **76**(11): p. 1897-1905.
6. Smith, V. and C.A. Scirè, *Systemic sclerosis: state of the art on clinical practice guidelines*. 2018. **4**(Suppl 1): p. e000782.
7. López-Bastida, J., et al., *Social/economic costs and health-related quality of life in patients with scleroderma in Europe*. Eur J Health Econ, 2016. **17** Suppl 1: p. 109-17.
8. Decuman, S., et al., *Work participation and work transition in patients with systemic sclerosis: a cross-sectional study*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(2): p. 297-304.
9. Assassi, S., et al., *Predictors of fatigue severity in early systemic sclerosis: a prospective longitudinal study of the GENISOS cohort*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26061.
10. LeRoy, E.C. and T.A. Medsger, Jr., *Criteria for the classification of early systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2001. **28**(7): p. 1573-6.
11. Koenig, M., et al., *Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(12): p. 3902-12.
12. Smith, V., et al., *Fast track algorithm: How to differentiate a "scleroderma pattern" from a "non-scleroderma pattern"*. Autoimmun Rev, 2019. **18**(11): p. 102394.
13. Smith, V., et al., *Standardisation of nailfold capillaroscopy for the assessment of patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2020. **19**(3): p. 102458.
14. Avouac, J., et al., *Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(3): p. 476-81.
15. LeRoy, E.C., et al., *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. J Rheumatol, 1988. **15**(2): p. 202-5.
16. Nihtyanova, S.I., et al., *Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(6): p. 1625-35.
17. van den Hoogen, F., et al., *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(11): p. 1747-55.

18. Homer, K.L., et al., *Performance of Anti-Topoisomerase I Antibody Testing by Multiple-Bead, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion in a University Setting*. J Clin Rheumatol, 2020. **26**(3): p. 115-118.
19. Hamaguchi, Y. and K. Takehara, *Anti-nuclear autoantibodies in systemic sclerosis : News and perspectives*. J Scleroderma Relat Disord, 2018. **3**(3): p. 201-213.
20. Liaskos, C., et al., *Multiparametric autoantibody profiling of patients with systemic sclerosis in Greece*. Mediterr J Rheumatol, 2018. **29**(3): p. 120-126.
21. Mahler, M., et al., *Autoantibodies to stratify systemic sclerosis patients into clinically actionable subsets*. Autoimmun Rev, 2020. **19**(8): p. 102583.
22. Nihtyanova, S.I., et al., *Using Autoantibodies and Cutaneous Subset to Develop Outcome-Based Disease Classification in Systemic Sclerosis*. 2020. **72**(3): p. 465-476.
23. Jha, M., et al., *NT-proBNP, hs-cTnT, and CRP predict the risk of cardiopulmonary outcomes in systemic sclerosis: Findings from the Canadian Scleroderma Research Group*. 2022. **7**(1): p. 62-70.
24. Liu, X., et al., *Does C-reactive protein predict the long-term progression of interstitial lung disease and survival in patients with early systemic sclerosis?* Arthritis Care Res (Hoboken), 2013. **65**(8): p. 1375-80.
25. Pokeerbux, M.R., et al., *Survival and prognosis factors in systemic sclerosis: data of a French multicenter cohort, systematic review, and meta-analysis of the literature*. Arthritis Res Ther, 2019. **21**(1): p. 86.
26. De Lauretis, A., et al., *Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2013. **40**(4): p. 435-46.
27. Khanna, D., et al., *Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet Respir Med, 2020. **8**(10): p. 963-974.
28. Volkmann, E.R., et al., *Progression of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis: The Importance of Pneumoproteins Krebs von den Lungen 6 and CCL18*. 2019. **71**(12): p. 2059-2067.
29. Elhai, M., et al., *Performance of Candidate Serum Biomarkers for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease*. Arthritis Rheumatol, 2019. **71**(6): p. 972-982.
30. Zhang, Y., et al., *Diagnostic value of cardiac natriuretic peptide on pulmonary hypertension in systemic sclerosis: A systematic review and meta-analysis*. Joint Bone Spine, 2022. **89**(2): p. 105287.
31. Jiménez-Dalmaroni, M.J., M.E. Gerswhin, and I.E. Adamopoulos, *The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(1): p. 1-8.
32. Giancchetti, E. and A. Fierabracci, *Gene/environment interactions in the pathogenesis of autoimmunity: new insights on the role of Toll-like receptors*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(11): p. 971-83.
33. Dowson, C., et al., *Innate Immunity in Systemic Sclerosis*. Curr Rheumatol Rep, 2017. **19**(1): p. 2.
34. Lafyatis, R. and A. Farina, *New insights into the mechanisms of innate immune receptor signalling in fibrosis*. Open Rheumatol J, 2012. **6**: p. 72-9.
35. Lünemann, A., M. Rowe, and D. Nadal, *Innate Immune Recognition of EBV*. Curr Top Microbiol Immunol, 2015. **391**: p. 265-87.

36. Farina, A., et al., *Epstein-Barr virus infection induces aberrant TLR activation pathway and fibroblast-myofibroblast conversion in scleroderma*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(4): p. 954-964.
37. Grossman, C., et al., *Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis?* Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 244-7.
38. Randone, S.B., S. Guiducci, and M.M. Cerinic, *Systemic sclerosis and infections*. Autoimmun Rev, 2008. **8**(1): p. 36-40.
39. Vaughan, J.H., et al., *Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis and normal skins*. J Rheumatol, 2000. **27**(3): p. 821-3.
40. Fullard, N. and S. O'Reilly, *Role of innate immune system in systemic sclerosis*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(5): p. 511-7.
41. Bhattacharyya, S., et al., *Toll-Like Receptor-4 Signaling Drives Persistent Fibroblast Activation and Prevents Fibrosis Resolution in Scleroderma*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2017. **6**(10): p. 356-369.
42. Bhattacharyya, S. and J. Varga, *Endogenous ligands of TLR4 promote unresolving tissue fibrosis: Implications for systemic sclerosis and its targeted therapy*. Immunol Lett, 2018. **195**: p. 9-17.
43. Kahaleh, B., *The microvascular endothelium in scleroderma*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47 Suppl 5**: p. v14-5.
44. Santana-de Anda, K., et al., *Interferon regulatory factors: beyond the antiviral response and their link to the development of autoimmune pathology*. Autoimmun Rev, 2011. **11**(2): p. 98-103.
45. Chen, K., J. Liu, and X. Cao, *Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2017. **83**: p. 1-11.
46. Dantas, A.T., et al., *Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29)*. Autoimmunity, 2015. **48**(7): p. 429-33.
47. Wu, M. and S. Assassi, *The role of type I interferon in systemic sclerosis*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 266.
48. Lande R., et al., *Anti-CXCL4 Antibody Reactivity Is Present in Systemic Sclerosis (SSc) and Correlates with the SSc Type I Interferon Signature*. Int J Mol Sci. 2020 Jul 19;21(14):5102. doi: 10.3390/ijms21145102. PMID: 32707718; PMCID: PMC7404208.
49. Sekiya, T., et al., *Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(3): p. 680-4.
50. Pai, S. and R. Thomas, *Immune deficiency or hyperactivity-Nf-kappab illuminates autoimmunity*. J Autoimmun, 2008. **31**(3): p. 245-51.
51. Zhang, L., et al., *Association of interleukin 1 family with systemic sclerosis*. Inflammation, 2014. **37**(4): p. 1213-20.
52. Kawaguchi, Y., M. Hara, and T.M. Wright, *Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1253-60.
53. Manetti, M., et al., *The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(3): p. 598-605.
54. Terras, S., et al., *Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(1): p. 144-5.

55. Mosaad, Y.M., et al., *Proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-18) in immune rheumatic diseases: relation with disease activity and autoantibodies production*. Egypt J Immunol, 2003. **10**(2): p. 19-26.
56. Kim, H.J., et al., *IL-18 downregulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(3): p. 706-15.
57. Dinarello, C.A., et al., *Interleukin-18 and IL-18 binding protein*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 289.
58. Nakamura, K., et al., *Serum levels of interleukin-18-binding protein isoform α : Clinical association with inflammation and pulmonary hypertension in systemic sclerosis*. J Dermatol, 2016. **43**(8): p. 912-8.
59. Ishihara, K. and T. Hirano, *IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 357-68.
60. Fonseca, J.E., et al., *Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(7): p. 538-42.
61. Khan, K., et al., *Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(7): p. 1235-42.
62. Sato, S., M. Hasegawa, and K. Takehara, *Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis*. J Dermatol Sci, 2001. **27**(2): p. 140-6.
63. Jones, S.A., J. Scheller, and S. Rose-John, *Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3375-83.
64. O'Reilly, S., et al., *Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis?* Clin Transl Immunology, 2013. **2**(4): p. e4.
65. Arnold, M.B., et al., *Patient acceptable symptom state in scleroderma: results from the tocilizumab compared with placebo trial in active diffuse cutaneous systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2018. **57**(1): p. 152-157.
66. Elhai, M., et al., *Outcomes of patients with systemic sclerosis-associated polyarthritis and myopathy treated with tocilizumab or abatacept: a EUSTAR observational study*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(7): p. 1217-20.
67. Khanna, D., et al., *Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10038): p. 2630-2640.
68. Rolla, G., et al., *Th-17 cytokines and interstitial lung involvement in systemic sclerosis*. J Breath Res, 2016. **10**(4): p. 046013.
69. Bălănescu, P., E. Bălănescu, and A. Bălănescu, *IL-17 and Th17 cells in systemic sclerosis: a comprehensive review*. Rom J Intern Med, 2017. **55**(4): p. 198-204.
70. Chizzolini, C., A.M. Dufour, and N.C. Brembilla, *Is there a role for IL-17 in the pathogenesis of systemic sclerosis?* Immunol Lett, 2018. **195**: p. 61-67.
71. Baraut, J., et al., *Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **10**(2): p. 65-73.
72. Sakkas, L.I. and D.P. Bogdanos, *The Role of B Cells in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis*. Isr Med Assoc J, 2016. **18**(9): p. 516-519.
73. Bogdanos, D.P., et al., *Pathogenetic Aspects of Systemic Sclerosis: A View Through the Prism of B Cells*. Rheumatology (Oxford), 2022. **13**: p. 925741.
74. Sakkas, L.I. and D.P. Bogdanos, *Systemic sclerosis: New evidence re-enforces the role of B cells*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(2): p. 155-61.
75. Sakkas, L.I., C.G. Katsiari, and D. Daoussis, *The role of B cells in the pathogenesis of systemic sclerosis: an update*. 2023. **62**(5): p. 1780-1786.

76. O'Reilly, S., et al., *Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor- β (TGF- β) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein.* J Biol Chem, 2014. **289**(14): p. 9952-60.
77. Sato, S., et al., *Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity.* J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6635-43.
78. Soto, L., et al., *Systemic Sclerosis Patients Present Alterations in the Expression of Molecules Involved in B-Cell Regulation.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 496.
79. Odaka, M., et al., *Autoantibody-mediated regulation of B cell responses by functional anti-CD22 autoantibodies in patients with systemic sclerosis.* Clin Exp Immunol, 2010. **159**(2): p. 176-84.
80. Dawidowicz, K., et al., *Association study of B-cell marker gene polymorphisms in European Caucasian patients with systemic sclerosis.* Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(5): p. 839-42.
81. Hitomi, Y., et al., *Association of CD22 gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis.* Tissue Antigens, 2007. **69**(3): p. 242-9.
82. Clements, P.J., et al., *Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies.* J Rheumatol, 1993. **20**(11): p. 1892-6.
83. Moore, T.L., et al., *Seventeen-point dermal ultrasound scoring system--a reliable measure of skin thickness in patients with systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(12): p. 1559-63.
84. Vanhaecke, A., et al., *High frequency ultrasonography: reliable tool to measure skin fibrosis in SSC? A systematic literature review and additional pilot study.* 2021. **61**(1): p. 42-52.
85. de Oliveira, M.F.C., et al., *Durometry as an alternative tool to the modified Rodnan's skin score in the assessment of diffuse systemic sclerosis patients: a cross-sectional study.* 2020. **60**(1): p. 48.
86. Vanhaecke, A., et al., *Durometry in SSC: The hard facts. A systematic literature review and additional pilot study.* 2021. **60**(5): p. 2099-2108.
87. Liu, C.H., et al., *Translational optical coherence elastography for assessment of systemic sclerosis.* 2019. **12**(12): p. e201900236.
88. Spierings, J., V. Ong, and C.P. Denton, *PASTUL questionnaire: a tool for self-assessment of scleroderma skin during the COVID-19 pandemic.* 2021. **80**(6): p. 819-820.
89. Valenzuela, A., P. Song, and L. Chung, *Calcinosis in scleroderma.* Curr Opin Rheumatol, 2018. **30**(6): p. 554-561.
90. De Almeida Chaves, S., et al., *Sine scleroderma, limited cutaneous, and diffused cutaneous systemic sclerosis survival and predictors of mortality.* Arthritis Res Ther, 2021. **23**(1): p. 295.
91. Hughes M, Herrick AL. *Digital ulcers in systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford). 2017 Jan;56(1):14-25. doi: 10.1093/rheumatology/kew047. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27094599.
92. Hoffmann-Vold, A.M., et al., *Tracking Impact of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis in a Complete Nationwide Cohort.* Am J Respir Crit Care Med, 2019. **200**(10): p. 1258-1266.
93. Volkmann, E.R., *Natural History of Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease: How to Identify a Progressive Fibrosing Phenotype.* J Scleroderma Relat Disord, 2020. **5**(2 Suppl): p. 31-40.

94. Tyndall, A.J., et al., *Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(10): p. 1809-15.
95. Jaafar, S., et al., *Clinical characteristics, visceral involvement, and mortality in at-risk or early diffuse systemic sclerosis: a longitudinal analysis of an observational prospective multicenter US cohort*. 2021. **23**(1): p. 170.
96. Freitas, R., et al., *Gender differences in clinical features and outcomes of a Portuguese systemic sclerosis cohort*. Clin Rheumatol, 2022. **41**(4): p. 1139-1144.
97. Moore, D.F., et al., *Increased Morbidity and Mortality of Scleroderma in African Americans Compared to Non-African Americans*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2019. **71**(9): p. 1154-1163.
98. Volkmann, E.R., et al., *Racial Disparities in Systemic Sclerosis: Short- and Long-Term Outcomes Among African American Participants of SLS I and II*. 2021. **3**(1): p. 8-16.
99. Kim, D.S., et al., *The major histopathologic pattern of pulmonary fibrosis in scleroderma is nonspecific interstitial pneumonia*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2002. **19**(2): p. 121-7.
100. Fischer, A., et al., *Clinically significant interstitial lung disease in limited scleroderma: histopathology, clinical features, and survival*. Chest, 2008. **134**(3): p. 601-605.
101. Fujita, J., et al., *Non-specific interstitial pneumonia as pulmonary involvement of systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(3): p. 281-3.
102. Bernstein, E.J., et al., *Performance Characteristics of Pulmonary Function Tests for the Detection of Interstitial Lung Disease in Adults With Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis*. 2020. **72**(11): p. 1892-1896.
103. Distler, O., S. Assassi, and V. Cottin, *Predictors of progression in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease*. 2020. **55**(5).
104. Raghu, G., *Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline*. 2022. **205**(9): p. e18-e47.
105. Moinzadeh, P. and K. Kuhr, *Scleroderma Renal Crisis: Risk Factors for an Increasingly Rare Organ Complication*. 2020. **47**(2): p. 241-248.
106. Butler, E.A., et al., *Generation of a Core Set of Items to Develop Classification Criteria for Scleroderma Renal Crisis Using Consensus Methodology*. 2019. **71**(6): p. 964-971.
107. Kim, H. and F. Lefebvre, *Mortality and morbidity in scleroderma renal crisis: A systematic literature review*. 2021. **6**(1): p. 21-36.
108. Hudson, M., C. Ghossein, and V. Steen, *Scleroderma renal crisis*. Presse Med, 2021. **50**(1): p. 104063.
109. Penn, H., et al., *Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes*. Qjm, 2007. **100**(8): p. 485-94.
110. Ross, L., et al., *Sudden Cardiac Death in Systemic Sclerosis: Diagnostics to Assess Risk and Inform Management*. Diagnostics (Basel), 2021. **11**(10).
111. Lefèvre, G., et al., *Survival and prognostic factors in systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(9): p. 2412-23.
112. Chauvelot, L., et al., *Hemodynamic Response to Treatment and Outcomes in Pulmonary Hypertension Associated With Interstitial Lung Disease Versus Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis: Data From a Study*

- Identifying Prognostic Factors in Pulmonary Hypertension Associated With Interstitial Lung Disease*. 2021. **73**(2): p. 295-304.
113. Chung, L., et al., *Survival and predictors of mortality in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: outcomes from the pulmonary hypertension assessment and recognition of outcomes in scleroderma registry*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2014. **66**(3): p. 489-95.
 114. Suresh, S., et al., *Development of Pulmonary Hypertension in Over One-Third of Patients With Th/To Antibody-Positive Scleroderma in Long-Term Follow-Up*. 2022. **74**(9): p. 1580-1587.
 115. Ramjug, S., et al., *Idiopathic and Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension: A Comparison of Demographic, Hemodynamic, and MRI Characteristics and Outcomes*. Chest, 2017. **152**(1): p. 92-102.
 116. Haque, A. and D.G. Kiely, *Pulmonary hypertension phenotypes in patients with systemic sclerosis*. 2021. **30**(161).
 117. Steen, V.D., et al., *Isolated diffusing capacity reduction in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(7): p. 765-70.
 118. McMahan, Z.H., *Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: an update*. Curr Opin Rheumatol, 2019. **31**(6): p. 561-568.
 119. Zampatti, N., et al., *Performance of the UCLA Scleroderma Clinical Trials Consortium Gastrointestinal Tract 2.0 instrument as a clinical decision aid in the routine clinical care of patients with systemic sclerosis*. 2021. **23**(1): p. 125.
 120. Ghrénassia, E., et al., *Prevalence, correlates and outcomes of gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: a EUSTAR case-control study*. J Rheumatol, 2014. **41**(1): p. 99-105.
 121. Richard, N., et al., *Severe gastrointestinal disease in very early systemic sclerosis is associated with early mortality*. Rheumatology (Oxford), 2019. **58**(4): p. 636-644.
 122. McMahan, Z.H., et al., *Determining the Risk Factors and Clinical Features Associated With Severe Gastrointestinal Dysmotility in Systemic Sclerosis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2018. **70**(9): p. 1385-1392.
 123. Nagaraja, V., et al., *Management of gastrointestinal involvement in scleroderma*. Curr Treatm Opt Rheumatol, 2015. **1**(1): p. 82-105.
 124. Jaovisidha, K., et al., *Severe gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: report of five cases and review of the literature*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **34**(4): p. 689-702.
 125. Sakkas, L.I., et al., *Intestinal Involvement in Systemic Sclerosis: A Clinical Review*. Dig Dis Sci, 2018. **63**(4): p. 834-844.
 126. McMahan, Z.H. and A.E. Tucker, *Relationship Between Gastrointestinal Transit, Medsger Gastrointestinal Severity, and University of California-Los Angeles Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract 2.0 Symptoms in Patients With Systemic Sclerosis*. 2022. **74**(3): p. 442-450.
 127. Valenzuela, A., et al., *Intestinal pseudo-obstruction in patients with systemic sclerosis: an analysis of the Nationwide Inpatient Sample*. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(4): p. 654-8.
 128. Trezza, M., et al., *Bowel problems in patients with systemic sclerosis*. Scand J Gastroenterol, 1999. **34**(4): p. 409-13.
 129. Garros, A., et al., *Prevalence of fecal incontinence in a cohort of systemic sclerosis patients within a regional referral network*. United European Gastroenterol J, 2017. **5**(7): p. 1046-1050.

130. Paolino, S., et al., *Nutritional Status and Bone Microarchitecture in a Cohort of Systemic Sclerosis Patients*. 2020. **12**(6).
131. Nguyen, A.D., Z.H. McMahan, and E.R. Volkmann, *Micronutrient Deficiencies in Systemic Sclerosis: A Scoping Review*. 2022. **14**: p. 309-327.
132. Barbacki, A., et al., *Damage Trajectories in Systemic Sclerosis Using Group-Based Trajectory Modeling*. 2022.
133. Lefebvre, F., et al., *Histopathological features of systemic sclerosis-associated myopathy: A scoping review*. *Autoimmun Rev*, 2021. **20**(7): p. 102851.
134. Cutolo, M., S. Soldano, and V. Smith, *Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2019. **15**(7): p. 753-764.
135. Soldano, S., et al., *Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2018. **77**(12): p. 1842-1845.
136. Truchetet, M.E. and N.C. Brembilla, *Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis*. 2021.
137. Cutolo, M., et al., *Nintedanib downregulates the transition of cultured systemic sclerosis fibrocytes into myofibroblasts and their pro-fibrotic activity*. *Arthritis Res Ther*, 2021. **23**(1): p. 205.
138. Ayers, N.B., C.M. Sun, and S.Y. Chen, *Transforming growth factor- β signaling in systemic sclerosis*. *J Biomed Res*, 2018. **32**(1): p. 3-12.
139. Oke, V. and M. Wahren-Herlenius, *The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review*. *J Autoimmun*, 2012. **39**(1-2): p. 77-82.
140. Cavazzana, I., et al., *Anti-Ro/SSA antibodies in rheumatoid arthritis: clinical and immunologic associations*. *Clin Exp Rheumatol*, 2006. **24**(1): p. 59-64.
141. Granito, A., et al., *Antibodies to SS-A/Ro-52kD and centromere in autoimmune liver disease: a clue to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007. **26**(6): p. 831-8.
142. Infantino, M., et al., *An effective algorithm for the serological diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies: The key role of anti-Ro52 antibodies*. *Clin Chim Acta*, 2017. **475**: p. 15-19.
143. Salomonsson, S., et al., *Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block*. *J Exp Med*, 2005. **201**(1): p. 11-7.
144. Jones, E.L., S.M. Laidlaw, and L.B. Dustin, *TRIM21/Ro52 - Roles in Innate Immunity and Autoimmune Disease*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 738473.
145. Yang, W., et al., *To TRIM the Immunity: From Innate to Adaptive Immunity*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 02157.
146. Sardiello, M., et al., *Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties*. *BMC Evol Biol*, 2008. **8**: p. 225.
147. James, L.C., et al., *Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(15): p. 6200-5.
148. D'Cruz, A.A., et al., *Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity*. *Protein Sci*, 2013. **22**(1): p. 1-10.
149. Ohtake, F. and H. Tsuchiya, *The emerging complexity of ubiquitin architecture*. *J Biochem*, 2017. **161**(2): p. 125-133.
150. Wallenhammar, A., et al., *Solution NMR structure of the TRIM21 B-box2 and identification of residues involved in its interaction with the RING domain*. 2017. **12**(7): p. e0181551.

151. Dickson, C., et al., *Intracellular antibody signalling is regulated by phosphorylation of the Fc receptor TRIM21*. 2018. **7**.
152. Nakken, B., R. Jonsson, and A.I. Bolstad, *Polymorphisms of the Ro52 gene associated with anti-Ro 52-kd autoantibodies in patients with primary Sjögren's syndrome*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(3): p. 638-46.
153. Sanchez, J.G., et al., *The tripartite motif coiled-coil is an elongated antiparallel hairpin dimer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(7): p. 2494-9.
154. Fiorentini, F., D. Esposito, and K. Rittinger, *Does it take two to tango? RING domain self-association and activity in TRIM E3 ubiquitin ligases*. *Biochem Soc Trans*, 2020. **48**(6): p. 2615-2624.
155. Zeng, J. and A.F. Santos, *Target-induced clustering activates Trim-Away of pathogens and proteins*. 2021. **28**(3): p. 278-289.
156. Watanabe, M. and S. Hatakeyama, *TRIM proteins and diseases*. *J Biochem*, 2017. **161**(2): p. 135-144.
157. Keeble, A.H., et al., *TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(16): p. 6045-50.
158. Xie, S., L. Zhang, and D. Dong, *HDAC6 regulates antibody-dependent intracellular neutralization of viruses via deacetylation of TRIM21*. 2020. **295**(42): p. 14343-14351.
159. Forthal, D.N., *Functions of Antibodies*. *Microbiol Spectr*, 2014. **2**(4): p. Aid-0019-2014.
160. Walls, A.C., et al., *Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy*. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. **23**(10): p. 899-905.
161. Vaysburd, M., et al., *Intracellular antibody receptor TRIM21 prevents fatal viral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(30): p. 12397-401.
162. Mercer, J., M. Schelhaas, and A. Helenius, *Virus entry by endocytosis*. *Annu Rev Biochem*, 2010. **79**: p. 803-33.
163. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis via caveolae*. *Traffic*, 2002. **3**(5): p. 311-20.
164. O'Donoghue, E.J. and A.M. Krachler, *Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells*. *Cell Microbiol*, 2016. **18**(11): p. 1508-1517.
165. McEwan, W.A., et al., *Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(4): p. 327-36.
166. Watkinson, R.E., et al., *TRIM21 Promotes cGAS and RIG-I Sensing of Viral Genomes during Infection by Antibody-Opsonized Virus*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(10): p. e1005253.
167. Gastaldelli, M., et al., *Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes*. *Traffic*, 2008. **9**(12): p. 2265-78.
168. Burckhardt, C.J., et al., *Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure*. *Cell Host Microbe*, 2011. **10**(2): p. 105-17.
169. Maier, O., et al., *Spatiotemporal dynamics of adenovirus membrane rupture and endosomal escape*. *J Virol*, 2012. **86**(19): p. 10821-8.
170. Wiethoff, C.M., et al., *Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly*. *J Virol*, 2005. **79**(4): p. 1992-2000.

171. Mallery, D.L., et al., *Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 19985-90.
172. Caddy, S.L., et al., *Viral nucleoprotein antibodies activate TRIM21 and induce T cell immunity*. 2021. **40**(5): p. e106228.
173. Bergthaler, A., et al., *Impaired antibody response causes persistence of prototypic T cell-contained virus*. PLoS Biol, 2009. **7**(4): p. e1000080.
174. LaMere, M.W., et al., *Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4331-9.
175. McEwan, W.A., et al., *Regulation of virus neutralization and the persistent fraction by TRIM21*. J Virol, 2012. **86**(16): p. 8482-91.
176. Fletcher, A.J. and L.C. James, *Coordinated Neutralization and Immune Activation by the Cytosolic Antibody Receptor TRIM21*. J Virol, 2016. **90**(10): p. 4856-4859.
177. Mu, T., et al., *The E3 Ubiquitin Ligase TRIM21 Promotes HBV DNA Polymerase Degradation*. Viruses, 2020. **12**(3).
178. Das, A., P.X. Dinh, and A.K. Pattnaik, *Trim21 regulates Nmi-IFI35 complex-mediated inhibition of innate antiviral response*. Virology, 2015. **485**: p. 383-92.
179. Platanius, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
180. Rhodes, D.A., et al., *The 52 000 MW Ro/SS-A autoantigen in Sjögren's syndrome/systemic lupus erythematosus (Ro52) is an interferon-gamma inducible tripartite motif protein associated with membrane proximal structures*. Immunology, 2002. **106**(2): p. 246-56.
181. Rajsbaum, R., J.P. Stoye, and A. O'Garra, *Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells*. Eur J Immunol, 2008. **38**(3): p. 619-30.
182. Antonczyk, A., et al., *Direct Inhibition of IRF-Dependent Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated With Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1176.
183. Sjöstrand, M., et al., *Expression of the immune regulator tripartite-motif 21 is controlled by IFN regulatory factors*. J Immunol, 2013. **191**(7): p. 3753-63.
184. Michalska, A., et al., *A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1135.
185. Manocha, G.D., et al., *Regulatory role of TRIM21 in the type-I interferon pathway in Japanese encephalitis virus-infected human microglial cells*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 24.
186. Higgs, R., et al., *Self protection from anti-viral responses--Ro52 promotes degradation of the transcription factor IRF7 downstream of the viral Toll-Like receptors*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11776.
187. Jefferies, C.A., *Regulating IRFs in IFN Driven Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 325.
188. Ellermann-Eriksen, S., J. Justesen, and S.C. Mogensen, *Genetically determined difference in the antiviral action of alpha/beta interferon in cells from mice resistant or susceptible to herpes simplex virus type 2*. J Gen Virol, 1986. **67** (Pt 9): p. 1859-66.

189. Zawatzky, R., et al., *The role of interferon in the resistance of C57BL/6 mice to various doses of herpes simplex virus type 1*. J Infect Dis, 1982. **146**(3): p. 405-10.
190. Gresser, I., et al., *Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. VI. Polyoma virus infection*. Int J Cancer, 1979. **24**(2): p. 178-83.
191. Ouyang, W., et al., *NMI Facilitates Influenza A Virus Infection by Promoting Degradation of IRF7 through TRIM21*. 2021. **65**(1): p. 30-40.
192. Ma, Z., et al., *Forkhead box O1-mediated ubiquitination suppresses RIG-I-mediated antiviral immune responses*. Int Immunopharmacol, 2021. **90**: p. 107152.
193. Kamiyama, R. and R. Yoshimi, *Dysfunction of TRIM21 in interferon signature of systemic lupus erythematosus*. 2018. **28**(6): p. 993-1003.
194. Ozato, K., et al., *Comment on "Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappa B-dependent cytokine expression in fibroblasts"*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7619; author reply 720-1.
195. Yoshimi, R., et al., *Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7527-38.
196. Espinosa, A., et al., *Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1661-71.
197. Kunishita, Y., et al., *TRIM21 Dysfunction Enhances Aberrant B-Cell Differentiation in Autoimmune Pathogenesis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 98.
198. De, S., et al., *B Cell-Intrinsic Role for IRF5 in TLR9/BCR-Induced Human B Cell Activation, Proliferation, and Plasmablast Differentiation*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1938.
199. Espinosa, A., et al., *Anti-Ro52 autoantibodies from patients with Sjögren's syndrome inhibit the Ro52 E3 ligase activity by blocking the E3/E2 interface*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36478-91.
200. Ohlsson, M., R. Jonsson, and K.A. Brokstad, *Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome*. Scand J Immunol, 2002. **56**(5): p. 456-69.
201. Hillen, M.R., et al., *Autoantigen TRIM21/Ro52 is expressed on the surface of antigen-presenting cells and its enhanced expression in Sjögren's syndrome is associated with B cell hyperactivity and type I interferon activity*. 2020. **6**(2).
202. Yoshimi, R., Y. Ishigatsubo, and K. Ozato, *Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus*. Int J Rheumatol, 2012. **2012**: p. 718237.
203. Norris, D.A., *Pathomechanisms of photosensitive lupus erythematosus*. J Invest Dermatol, 1993. **100**(1): p. 58s-68s.
204. Lee, A.J. and A.A. Ashkar, *The Dual Nature of Type I and Type II Interferons*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2061.
205. Hardy, J.D., et al., *Congenital complete heart block in the newborn associated with maternal systemic lupus erythematosus and other connective tissue disorders*. Arch Dis Child, 1979. **54**(1): p. 7-13.
206. Xiao, G.Q., K. Hu, and M. Boutjdir, *Direct inhibition of expressed cardiac l- and t-type calcium channels by igg from mothers whose children have congenital heart block*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1599-604.

207. Capone, C., et al., *Cardiac manifestations of neonatal lupus: a review of autoantibody-associated congenital heart block and its impact in an adult population*. *Cardiol Rev*, 2012. **20**(2): p. 72-6.
208. Miranda, M.E., et al., *Accessibility of SSA/Ro and SSB/La antigens to maternal autoantibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes*. *J Immunol*, 1998. **161**(9): p. 5061-9.
209. Miranda-Carús, M.E., et al., *Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF-alpha by macrophages*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 5345-51.
210. Kazama, H., et al., *Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein*. *Immunity*, 2008. **29**(1): p. 21-32.
211. Fransen, J.H., et al., *Mouse dendritic cells matured by ingestion of apoptotic blebs induce T cells to produce interleukin-17*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(8): p. 2304-13.
212. Schaible, U.E., et al., *Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis*. *Nat Med*, 2003. **9**(8): p. 1039-46.
213. LeFeber, W.P., et al., *Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes*. *J Clin Invest*, 1984. **74**(4): p. 1545-51.
214. Lawley, W., et al., *Rapid lupus autoantigen relocation and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes*. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. **39**(3): p. 253-61.
215. Saegusa, J., et al., *Oxidative stress mediates cell surface expression of SS-A/Ro antigen on keratinocytes*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **32**(10): p. 1006-16.
216. Zhitkovich, A., *N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More*. *Chem Res Toxicol*, 2019. **32**(7): p. 1318-1319.
217. Aquilano, K., S. Baldelli, and M.R. Ciriolo, *Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant*. *Front Pharmacol*, 2014. **5**: p. 196.
218. Ryo, K., et al., *Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome*. *Pathobiology*, 2006. **73**(5): p. 252-60.
219. Kasai, H., et al., *Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair*. *Carcinogenesis*, 1986. **7**(11): p. 1849-51.
220. Furukawa, F., et al., *Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus*. *J Invest Dermatol*, 1990. **94**(1): p. 77-85.
221. Paz, M.L., et al., *Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2008. **24**(3): p. 115-22.
222. Aqrawi, L.A., et al., *Ductal epithelial expression of Ro52 correlates with inflammation in salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **177**(1): p. 244-52.
223. Retamozo, S., et al., *Anti-Ro52 antibody testing influences the classification and clinical characterisation of primary Sjögren's syndrome*. *Clin Exp Rheumatol*, 2012. **30**(5): p. 686-92.

224. Yang, K., et al., *Anti-Ro52 Autoantibodies Are Related to Chronic Graft-vs.-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1505.
225. Tong, L., V. Koh, and B.Y. Thong, *Review of autoantigens in Sjögren's syndrome: an update*. J Inflamm Res, 2017. **10**: p. 97-105.
226. Tseng, C.E., et al., *The 52-kd protein as a target of intermolecular spreading of the immune response to components of the SS-A/Ro-SS-B/La complex*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(5): p. 936-44.
227. Murng, S.H.K. and M. Thomas, *Clinical associations of the positive anti Ro52 without Ro60 autoantibodies: undifferentiated connective tissue diseases*. J Clin Pathol, 2018. **71**(1): p. 12-19.
228. Yoshimi, R., et al., *Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 606195.
229. Didona, D. and G. Di Zenzo, *Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 779.
230. Sroka, M., et al., *Immune response against the coiled coil domain of Sjögren's syndrome associated autoantigen Ro52 induces salivary gland dysfunction*. Clin Exp Rheumatol, 2018. **36 Suppl 112**(3): p. 41-46.
231. Infantino, M., et al., *Serological epitope profile of anti-Ro52-positive patients with systemic autoimmune rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 365.
232. Decker, P., et al., *An updated review of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies impact in connective tissue diseases clinical management*. Autoimmun Rev, 2022. **21**(3): p. 103013.
233. Goodnow, C.C., et al., *Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 590-7.
234. Horai, R., et al., *Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen*. J Autoimmun, 2013. **44**: p. 21-33.
235. ter Borg, E.J., et al., *Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(5): p. 634-43.
236. Bergua, C., et al., *In vivo pathogenicity of IgG from patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies in immune-mediated necrotising myopathy*. 2019. **78**(1): p. 131-139.
237. Lee, S.A., et al., *Comparative study of immunofluorescent antinuclear antibody test and line immunoassay detecting 15 specific autoantibodies in patients with systemic rheumatic disease*. J Clin Lab Anal, 2012. **26**(4): p. 307-14.
238. Jones, B.R., *Lacrimal and salivary precipitating antibodies in Sjögren's syndrome*. Lancet, 1958. **2**(7050): p. 773-6.
239. Anderson, J.R., et al., *Precipitating autoantibodies in Sjogren's disease*. Lancet, 1961. **2**(7200): p. 456-60.
240. Clark, G., M. Reichlin, and T.B. Tomasi, Jr., *Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 1969. **102**(1): p. 117-22.
241. Mattioli, M. and M. Reichlin, *Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen*. Arthritis Rheum, 1974. **17**(4): p. 421-9.

242. Wolin, S.L. and J.A. Steitz, *The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(7): p. 1996-2000.
243. Ben-Chetrit, E., et al., *A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1560-71.
244. Itoh, K., Y. Itoh, and M.B. Frank, *Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 177-86.
245. Hung, T., et al., *The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression*. Science, 2015. **350**(6259): p. 455-9.
246. Wolin, S.L. and T. Cedervall, *The La protein*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 375-403.
247. Fabini, G., et al., *Analysis of the molecular composition of Ro ribonucleoprotein complexes. Identification of novel Y RNA-binding proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(9): p. 2778-89.
248. Keech, C.L., T.P. Gordon, and J. McCluskey, *The immune response to 52-kDa Ro and 60-kDa Ro is linked in experimental autoimmunity*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3694-9.
249. Peene, I., et al., *Anti-Ro52 reactivity is an independent and additional serum marker in connective tissue disease*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(10): p. 929-33.
250. Lee, A.Y.S., M.W. Lin, and J.H. Reed, *Anti-Ro52/TRIM21 serological subsets identify differential clinical and laboratory parameters*. Clin Rheumatol, 2022. **41**(11): p. 3495-3501.
251. Menéndez, A., et al., *Common and specific associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies in systemic lupus erythematosus*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 832789.
252. Hudson, M., et al., *Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(2): p. R50.
253. Dong, X., et al., *A retrospective analysis of distinguishing features of chest HRCT and clinical manifestation in primary Sjögren's syndrome-related interstitial lung disease in a Chinese population*. Clin Rheumatol, 2018. **37**(11): p. 2981-2988.
254. Song, J.S., J.H. Do, and S.W. Lee, *The prevalence and the clinical relevance of anti-Ro52 in Korean patients with primary Sjögren's syndrome*. Rheumatol Int, 2012. **32**(2): p. 491-5.
255. Aqrawi, L.A., et al., *Ro52- and Ro60-specific B cell pattern in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome*. Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 228-37.
256. Vera-Recabarren MA, García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Herrero C. *Comparative analysis of subacute cutaneous lupus erythematosus and chronic cutaneous lupus erythematosus: clinical and immunological study of 270 patients*. Br J Dermatol. 2010 Jan;162(1):91-101. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09472.x. Epub 2009 Sep 28. PMID: 19785596.
257. Popovic K, Brauner S, Ek M, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. *Fine specificity of the Ro/SSA autoantibody response in relation to serological and clinical findings in 96 patients with self-reported cutaneous symptoms induced by the sun*. Lupus. 2007;16(1):10-7. doi: 10.1177/0961203306073135. PMID: 17283579.
258. Oke V, Vassilaki I, Espinosa A, Strandberg L, Kuchroo VK, Nyberg F, Wahren-Herlenius M. *High Ro52 expression in spontaneous and UV-induced cutaneous*

- inflammation*. J Invest Dermatol. 2009 Aug;129(8):2000-10. doi: 10.1038/jid.2008.453. Epub 2009 Feb 5. PMID: 19194477.
259. Kvarnström M, Dzikaite-Ottosson V, Ottosson L, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Svenungsson E, Wahren-Herlenius M. *Autoantibodies to the functionally active RING-domain of Ro52/SSA are associated with disease activity in patients with lupus*. Lupus. 2013 Apr;22(5):477-85. doi: 10.1177/0961203313479420. PMID: 23554036.
 260. Wang Y, Xie J, Liu Z, Fu H, Huo Q, Gu Y, Liu Y. *Association of calreticulin expression with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients*. Exp Ther Med. 2017 May;13(5):2577-2583. doi: 10.3892/etm.2017.4235. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28565882; PMCID: PMC5443210.
 261. Parker JC, Burlingame RW, Bunn CC. *Prevalence of antibodies to Ro-52 in a serologically defined population of patients with systemic sclerosis*. J Autoimmune Dis. 2009 Mar 6;6:2. doi: 10.1186/1740-2557-6-2. PMID: 19267890; PMCID: PMC2654555.
 262. Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, Assassi S, Mayes MD, Wang M, Baron M, Fritzler MJ; Canadian Scleroderma Research Group (CSRG); Australian Scleroderma Cohort Study (ASCS); Genetics versus Environment in Scleroderma Outcome Study (GENISOS). *Monospecific anti-Ro52/TRIM21 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects: evidence of an association with interstitial lung disease and worse survival*. Clin Exp Rheumatol. 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 91):S131-5. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26315678.
 263. Patterson KA, Roberts-Thomson PJ, Lester S, Tan JA, Hakendorf P, Rischmueller M, Zochling J, Sahhar J, Nash P, Roddy J, Hill C, Nikpour M, Stevens W, Proudman SM, Walker JG. *Interpretation of an Extended Autoantibody Profile in a Well-Characterized Australian Systemic Sclerosis (Scleroderma) Cohort Using Principal Components Analysis*. Arthritis Rheumatol. 2015 Dec;67(12):3234-44. doi: 10.1002/art.39316. PMID: 26246178.
 264. Tangri V, Hewson C, Baron M, Bonner A, Fritzler M, Pope JE. *Associations with organ involvement and autoantibodies in systemic sclerosis: results from the Canadian scleroderma research group (CSRG)*. Open J Rheumatol Autoimmune Dis 2013;3(2):113–8. 16.
 265. McHugh NJ, Tansley SL. *Autoantibodies in myositis*. Nat Rev Rheumatol 2018;14 (5):290–302. 20.
 266. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Sen'ecal J-L. *Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes*. Arthritis Res Ther 2007;9(4):R78.
 267. Selva-O'Callaghan A, Pinal-Fernandez I, Trallero-Aragu'as E, Milisenda JC, Grau-Junyent JM, Mammen AL. *Classification and management of adult inflammatory myopathies*. Lancet Neurol 2018;17(9):816–28.
 268. Marie I, Hatron PY, Dominique S, Cherin P, Mouthon L, Menard J-F, et al. *Shortterm*

- and long-term outcome of anti-Jo1-positive patients with anti-Ro52 antibody. *Semin Arthritis Rheum* 2012;41(6):890–9.
269. Bauhammer J, Blank N, Max R, Lorenz H-M, Wagner U, Krause D, et al. Rituximab in the treatment of Jo1 antibody-associated Antisynthetase syndrome: anti-Ro52 positivity as a marker for severity and treatment response. *J Rheumatol* 2016;43(8):1566–74.
 270. Shi J, Li S, Yang H, Zhang Y, Peng Q, Lu X, et al. Clinical profiles and prognosis of patients with distinct Antisynthetase autoantibodies. *J Rheumatol* 2017;44(7):1051–7.
 271. Xing X, Li A, Li C. Anti-Ro52 antibody is an independent risk factor for interstitial lung disease in dermatomyositis. *Respir Med* 2020;172:106134.
 280. Sabbagh S, Pinal-Fernandez I, Kishi T, Targoff IN, Miller FW, Rider LG, et al. Anti-Ro52 autoantibodies are associated with interstitial lung disease and more severe disease in patients with juvenile myositis. *Ann Rheum Dis* 2019;78(7):988–95.
 281. G'omez-Martín D, Galindo-Feria AS, Barrera-Vargas A, Merayo-Chalico J, Ju'arez-Vega G, Torres-Ruiz J, et al. Ro52/TRIM21-deficient expression and function in different subsets of peripheral blood mononuclear cells is associated with a proinflammatory cytokine response in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Immunol* 2017;188(1):154–62.
 282. Kryšťuková O, Barbasso Helmers S, Venalis P, Malmström V, Lindroos E, Vencovský J, et al. Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2014;16(5):454.
 283. Sharp G. Diagnostic criteria for classification of MCTD. In: *Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies*. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 23–32.
 284. Gunnarsson R, El-Hage F, Aaløkken TM, Reiseter S, Lund MB, Garen T, et al. Associations between anti-Ro52 antibodies and lung fibrosis in mixed connective tissue disease. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55(1):103–8.
 285. Reiseter S, Gunnarsson R, Mogens Aaløkken T, Lund MB, Mynarek G, Corander J, et al. Progression and mortality of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease: a long-term observational nationwide cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57(2):255–62. 01.
 286. Hervier B, Rimbert M, Colonna F, Hamidou MA, Audrain M. Clinical significance of anti-Ro/SSA-52 kDa antibodies: a retrospective monocentric study. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(8):964–7.

287. Ghillani P, Andr'e C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P, et al. Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study. *Autoimmun Rev* 2011;10(9):509–13.
288. Li BA, Liu J, Hou J, Tang J, Zhang J, Xu J, Song YJ, Liu AX, Zhao J, Guo JX, Chen L, Wang H, Yang LH, Lu J, Mao YL (2015) Autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis B: prevalence and clinical associations. *World J Gastroenterol* 21(1):283–291. doi:10.3748/wjg.v21.i1.283
289. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ (2012) Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int* 32(1):85–92. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02502.x
290. Zachou K, Gampeta S, Gatselis NK, Oikonomou K, Goulis J, Manoussakis MN, Renaudineau Y, Bogdanos DP, Dalekos GN (2015) Anti-SLA/LP alone or in combination with anti-Ro52 and fine specificity of anti-Ro52 antibodies in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int* 35(2):660–672. doi:10.1111/liv.12658
291. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ (2012) Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int* 32(1):85–92. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02502.x
292. Dugar M, Cox S, Limaye V, Gordon TP, Roberts-Thomson PJ (2010) Diagnostic utility of anti-Ro52 detection in systemic autoimmunity. *Postgrad Med J* 86(1012):79–82. doi:10.1136/pgmj.2009.089656
293. Chou MJ, Lee SL, Chen TY, Tsay GJ (1995) Specificity of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 54(2):148–151
294. Dörner T, Feist E, Held C, Conrad K, Burmester GR, Hiepe F (1996) Differential recognition of the 52-kd Ro(SS-A) antigen by sera from patients with primary biliary cirrhosis and primary Sjogren's syndrome. *Hepatology* 24(6):1404–1407. doi:10.1002/hep.510240616
295. Granito A, Muratori P, Muratori L, Pappas G, Cassani F, Worthington J, Ferri S, Quarneti C, Cipriano V, de Molo C, Lenzi M, Chapman RW, Bianchi FB (2007) Antibodies to SS-A/Ro-52kD and centromere in autoimmune liver disease: a clue to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 26(6):831–838. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03433.x
296. Saito H, Takahashi A, Abe K, Okai K, Katsushima F, Monoe K, Kanno Y, Ohira H (2012) Autoantibodies by line immunoassay in patients with primary biliary cirrhosis. *Fukushima J Med Sci* 58(2):107–116
297. Ovalles-Bonilla JG, Nieto JC, Martinez-Barrio J, Lopez-Longo FJ, Janta I, Naredo E, Gonzalez CM, Hinojosa MC, Bello N, Serrano B, Mata-Martinez C, Gonzalez R, Saenz C, Monteagudo I, Hernandez D, Valor L, Carreño L (2015) Clinical and serological profile of children with positive SSA-Ro/SSB-La antibodies. *Ann Rheum Dis* 74(Suppl 2):844–845. doi:10.1136/annrheumdis-2015-eular.4474
298. Skog A, Tingström J, Salomonsson S, Sonesson S-E, Wahren-Herlenius M (2013) Neurodevelopment in children with and without congenital heart block born to anti-Ro/SSA-positive mothers. *Acta Paediatr* 102(1):40–46. doi:10.1111/apa.12049

299. Hon KL, Leung AKC (2012) Neonatal lupus erythematosus. *Autoimmune Dis* 2012(301274):6. doi:10.1155/2012/301274
300. Shahian M, Khosravi A, Anbardar M-H (2011) Early cholestasis in neonatal lupus erythematosus. *Ann Saudi Med* 31(1):80–82
301. Jaeggi E, Laskin C, Hamilton R, Kingdom J, Silverman E (2010) The importance of the level of maternal anti-Ro/SSA antibodies as a prognostic marker of the development of cardiac neonatal lupus erythematosus a prospective study of 186 antibody-exposed fetuses and infants. *J Am Coll Cardiol* 55(24):2778–2784. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.042
302. Mina R, Brunner HI (2010) Pediatric lupus—are there differences in presentation, genetics, response to therapy, damage accrual compared to adult lupus? *Rheum Dis Clin North Am* 36(1):53–80. doi:10.1016/j.rdc.2009.12.012
303. To CH, Petri M (2005) Is antibody clustering predictive of clinical subsets and damage in systemic lupus erythematosus? *Arthr Rheum* 52(12):4003–4010. doi:10.1002/art.21414
304. Itoh Y, Imai T, Fujino O, Igarashi T, Fukunaga Y (2002) Subclinical Sjögren's syndrome and anti-Ro/SSA-positive autoimmune fatigue syndrome in children. *Mod Rheumatol* 12(3):201–205. doi:10.3109/s101650200035
305. Suresh L, Tomiita M, Hoshioka A, Shen L, Malyavantham K, Ambrus J (2014) Autoantibodies in pediatric Sjogren's patients. *Arthr Rheumatol* 66:S1110–S1111
306. Stiller M, Golder W, Döring E, Biedermann T (2000) Primary and secondary Sjögren's syndrome in children—a comparative study. *Clin Oral Investig* 4(3):176–182
307. Rider LG, Shah M, Mamyrova G, Huber AM, Rice MM, Targoff IN, Miller FW (2013) The myositis autoantibody phenotypes of the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Medicine (Baltimore)* 92(4):223–243. doi:10.1097/MD.0b013e31829d08f9
308. Habers GEA, Huber AM, Mamyrova G, Targoff IN, O'Hanlon TP, Adams S, Pandey JP, Boonacker C, van Brussel M, Miller FW, van Royen-Kerkhof A, Rider LG (2016) Myositis autoantibodies, clinical features, and environmental exposures at illness onset are associated with disease course in juvenile myositis. *Arthr Rheumatol (Hoboken, NJ)* 68(3):761–768. doi:10.1002/art.39466
309. Tansley SL, Betteridge ZE, Gunawardena H, Jacques TS, Owens CM, Pilkington C, Arnold K, Yasin S, Moraitis E, Wedderburn LR, McHugh NJ (2014) Anti-MDA5 autoantibodies in juvenile dermatomyositis identify a distinct clinical phenotype: a prospective cohort study. *Arthr Res Ther* 16(4):R138. doi:10.1186/ar4600
310. Kerkar N, Naon H (2015) Autoimmune liver disease in children. *Ann Pediatr Child Health* 3(2):1045
311. Ercolini, A.M.; Miller, S.D. The role of infections in autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2009, 155, 1–15.
312. Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO, Yassine HM. Viruses and Autoimmunity: A Review on the Potential Interaction and Molecular Mechanisms. *Viruses*. 2019 Aug 19;11(8):762. doi: 10.3390/v11080762. PMID: 31430946; PMCID: PMC6723519.
313. Bogdanos DP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Virus, liver and autoimmunity. *Dig Liver Dis*. 2000 Jun-Jul;32(5):440-6. doi: 10.1016/s1590-8658(00)80266-2. PMID: 11030191.

314. Fujinami, R.S.; Von Herrath, M.G.; Christen, U.; Whitton, J.L. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 80–94.
315. Getts, D.R.; Chastain, E.M.L.; Terry, R.L.; Miller, S.D. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 2013, 255, 197–209.
316. Nanbo, A.; Inoue, K.; Adachi-Takasawa, K.; Takada, K. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J.* 2002, 21, 954–965.
317. Bogdanos DP, Choudhuri K, Vergani D. Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences. *Liver.* 2001 Aug;21(4):225-32. doi: 10.1034/j.1600-0676.2001.021004225.x. PMID: 11454184.
318. Stern-Ginossar, N.; Weisburd, B.; Michalski, A.; Le, V.T.K.; Hein, M.Y.; Huang, S.-X.; Ma, M.; Shen, B.; Qian, S.-B.; Hengel, H.; et al. Decoding Human Cytomegalovirus. *Science* 2012, 338, 1088–1093.
319. Shnayder, M.; Nachshon, A.; Krishna, B.; Poole, E.; Boshkov, A.; Binyamin, A.; Maza, I.; Sinclair, J.; Schwartz, M.; Stern-Ginossar, N. Defining the Transcriptional Landscape during Cytomegalovirus Latency with Single-Cell RNA Sequencing. *mBio* 2018, 9.
320. DiNardo, A.R.; Netea, M.G.; Musher, D.M. Postinfectious Epigenetic Immune Modifications—A Double-Edged Sword. *N. Engl. J. Med.* 2021, 384, 261–270.
321. Gugliesi F, Pasquero S, Griffante G, Scutera S, Albano C, Pacheco SFC, Riva G, Dell'Oste V, Biolatti M. Human Cytomegalovirus and Autoimmune Diseases: Where Are We? *Viruses.* 2021 Feb 8;13(2):260. doi: 10.3390/v13020260. PMID: 33567734; PMCID: PMC7914970.
322. HoHsieh, A.; Wang, C.M.; Wu, Y.-J.J.; Chen, A.; Chang, M.-I.; Chen, J.-Y. B Cell Epitope of Human Cytomegalovirus Phosphoprotein 65 (HCMV Pp65) Induced Anti-DsDNA Antibody in BALB/c Mice. *Arthritis Res.* 2017, 19, 65.
323. Radić, M.; Martinović Kaliterna, D.; Radić, J. Infectious Disease as Aetiological Factor in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Neth. J. Med.* 2010, 68, 348–353.
324. Randone, S.B.; Guiducci, S.; Cerinic, M.M. Systemic Sclerosis and Infections. *Autoimmun. Rev.* 2008, 8, 36–40.
325. Bilgin, H.; Kocabaş, H.; Keşli, R. The Prevalence of Infectious Agents in Patients with Systemic Sclerosis. *Turk. J. Med. Sci.* 2015, 45, 1192–1197.
326. Trombetta, A.C.; Tomatis, V.; Alessandri, E.; Paolino, S.; Pizzorni, C.; Ghio, M.; Ruaro, B.; Patane, M.; Gotelli, E.; Goegan, F.; et al. AB0723 Seroprevalence of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus in Systemic Sclerosis Patients: Preliminary Results. *Ann. Rheum. Dis.* 2018, 77, 1500–1501.
327. Esen, B.A.; Yılmaz, G.; Uzun, S.; Ozdamar, M.; Aksözek, A.; Kamalı, S.; Türkoğlu, S.; Gül, A.; Ocal, L.; Aral, O.; et al. Serologic Response to Epstein-Barr Virus Antigens in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Controlled Study. *Rheumatol. Int.* 2012, 32, 79–83.
328. Neidhart, M.; Kuchen, S.; Distler, O.; Brühlmann, P.; Michel, B.A.; Gay, R.E.; Gay, S. Increased Serum Levels of Antibodies against Human Cytomegalovirus and Prevalence of Autoantibodies in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, 389–392.
329. Jarvis, M.A.; Nelson, J.A. Human Cytomegalovirus Persistence and Latency in Endothelial Cells and Macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002, 5, 403–407.

330. Lunardi, C.; Dolcino, M.; Peterlana, D.; Bason, C.; Navone, R.; Tamassia, N.; Beri, R.; Corrocher, R.; Puccetti, A. Antibodies against Human Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis: A Gene Array Approach. *PLoS Med.* 2006, 3, e2.
331. Efthymiou, G.; Dardiotis, E.; Liaskos, C.; Marou, E.; Scheper, T.; Meyer, W.; Daponte, A.; Daoussis, D.; Hadjigeorgiou, G.; Bogdanos, D.P.; et al. A Comprehensive Analysis of Antigen-Specific Antibody Responses against Human Cytomegalovirus in Patients with Systemic Sclerosis. *Clin. Immunol.* 2019, 207, 87–96.
332. Pérez-Mercado, A.E.; Vilá-Pérez, S. Cytomegalovirus as a Trigger for Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Rheumatol.* 2010, 16, 335–337.
333. Takizawa, Y.; Inokuma, S.; Tanaka, Y.; Saito, K.; Atsumi, T.; Hirakata, M.; Kameda, H.; Hirohata, S.; Kondo, H.; Kumagai, S.; et al. Clinical Characteristics of Cytomegalovirus Infection in Rheumatic Diseases: Multicentre Survey in a Large Patient Population. *Rheumatology* 2008, 47, 1373–1378.
334. Newkirk, M.M.; van Venrooij, W.J.; Marshall, G.S. Autoimmune Response to U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein (U1 SnRNP) Associated with Cytomegalovirus Infection. *Arthritis Res.* 2001, 3, 253–258.
335. Su, B.Y.-J.; Su, C.-Y.; Yu, S.-F.; Chen, C.-J. Incidental Discovery of High Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Associated with Cytomegalovirus Viral Activity. *Med. Microbiol. Immunol.* 2007, 196, 165–170.
336. McClain, M.T.; Poole, B.D.; Bruner, B.F.; Kaufman, K.M.; Harley, J.B.; James, J.A. An Altered Immune Response to Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, 360–368.
337. Parks, C.G.; Cooper, G.S.; Hudson, L.L.; Dooley, M.A.; Treadwell, E.L.; St.Clair, E.W.; Gilkeson, G.S.; Pandey, J.P. Association of Epstein-Barr Virus with Systemic Lupus Erythematosus: Effect Modification by Race, Age, and Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Genotype. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 1148–1159.
338. James, J.A.; Neas, B.R.; Moser, K.L.; Hall, T.; Bruner, G.R.; Sestak, A.L.; Harley, J.B. Systemic Lupus Erythematosus in Adults Is Associated with Previous Epstein-Barr Virus Exposure. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 1122–1126.
339. Hsieh, A.-H.; Jhou, Y.-J.; Liang, C.-T.; Chang, M.; Wang, S.-L. Fragment of Tegument Protein Pp65 of Human Cytomegalovirus Induces Autoantibodies in BALB/c Mice. *Arthritis Res.* 2011, 13, R162.
340. Neo, J.Y.J.; Wee, S.Y.K.; Bonne, I.; Tay, S.H.; Raida, M.; Jovanovic, V.; Fairhurst, A.-M.; Lu, J.; Hanson, B.J.; MacAry, P.A. Characterisation of a Human Antibody That Potentially Links Cytomegalovirus Infection with Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* 2019, 9, 9998.
341. Zhu J. Cytomegalovirus infection induces expression of 60 KD/Ro antigen on human keratinocytes. *Lupus.* 1995 Oct;4(5):396-406. doi: 10.1177/096120339500400511. PMID: 8563735
342. Zhu J. Ultraviolet B irradiation and cytomegalovirus infection synergize to induce the cell surface expression of 52-kD/Ro antigen. *Clin Exp Immunol.* 1996 Jan;103(1):47-53. doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.00912.x. PMID: 8565285; PMCID: PMC2200326

343. Beuers U, Gershwin ME, Gish RG, Invernizzi P, Jones DE, Lindor K, et al. Changing nomenclature for PBC: from 'cirrhosis' to 'cholangitis'. *Gastroenterology* (2015) 149:1627–9. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.031
344. Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, et al. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* (2017) 50:414–21. doi: 10.1080/08916934.2017.1357699
345. Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari CG, Bogdanos DP, et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* (2016) 68:494–504. doi: 10.1002/art.39437
346. Mavropoulos A, Liaskos C, Simopoulou T, Bogdanos DP, Sakkas LI. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells), IL-17+ T cells and autoantibodies in systemic sclerosis. *Clin Immunol.* (2017) 184:26–32. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.013
347. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 ACR-EULAR classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol.* (2017) 69:35–45. doi: 10.1002/art.39859
348. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* (2012) 64:2677–86. doi: 10.1002/art.34473
349. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *NEJM* (1975) 292:403–7. doi: 10.1056/nejm197502202920807
350. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *NEJM* (1975) 292:344–7. doi: 10.1056/nejm197502132920706
351. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *NEJM* (2005) 353:1261–73. doi: 10.1056/NEJMra043898
352. Bozic B, Pruijn GJ, Rozman B, van Venrooij WJ. Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitope regions on the 52-kD Ro/SS-A protein. *Clin Exp Immunol.* (1993) 94:227–35.
353. Bogdanos DP, Baum H, Sharma UC, Grasso A, Ma Y, Burroughs AK, et al. Antibodies against homologous microbial caseinolytic proteases P characterise primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* (2002) 36:14–21. doi: 10.1016/S0168-8278(01)00252-5
354. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Grant P, et al. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* (2003) 133:404–13. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02229.x
355. Polymeros D, Bogdanos DP, Day R, Arioli D, Vergani D, Forbes A. Does cross-reactivity between mycobacterium avium paratuberculosis and human intestinal antigens characterize Crohn's disease? *Gastroenterology* (2006) 131:85–96. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.021
356. Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Scheper T, Meyer W, Daponte A, Daoussis D, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP, Sakkas LI (2019) A comprehensive analysis of antigen-specific antibody responses against human cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 207:87–96. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.07.012>

357. Lee AYS. A review of the role and clinical utility of anti-Ro52/TRIM21 in systemic autoimmunity. *Rheumatol Int.* (2017) 37:1323–33. doi: 10.1007/s00296-017-3718-1
358. Menendez A, Gomez J, Escanlar E, Caminal-Montero L, Mozo L. Clinical associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies: Diagnostic utility of their separate detection. *Autoimmunity* (2013) 46:32–9. doi: 10.3109/08916934.2012.732131
359. Kvarnstrom M, Dzikaite-Ottosson V, Ottosson L, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Svenungsson E, et al. Autoantibodies to the functionally active RING- domain of Ro52/SSA are associated with disease activity in patients with lupus. *Lupus* (2013) 22:477–85. doi: 10.1177/0961203313479420
360. Wahren-Herlenius M, Muller S, Isenberg D. Analysis of B-cell epitopes of the Ro/SS-A autoantigen. *Immunol Today* (1999) 20:234–40.
361. Blange I, Ringertz NR, Pettersson I. Identification of antigenic regions of the human 52kD Ro/SS-A protein recognized by patient sera. *J Autoimmun.* (1994) 7:263–74. doi: 10.1006/jaut.1994.1020
362. Buyon JP, Slade SG, Reveille JD, Hamel JC, Chan EK. Autoantibody responses to the “native” 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndromes, systemic lupus erythematosus, and Sjogren’s syndrome. *J Immunol.* (1994) 152:3675–84.
363. McCauliffe DP, Yin H, Wang LX, Lucas L. Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro(SSA) proteins. *J Rheumatol.* (1994) 21:1073–80.
364. Kato T, Sasakawa H, Suzuki S, Shirako M, Tashiro F, Nishioka K, et al. Autoepitopes of the 52-kd SS-A/Ro molecule. *Arthritis Rheum.* (1995) 38:990–8.
365. Dorner T, Feist E, Wagenmann A, Kato T, Yamamoto K, Nishioka K, et al. Anti-52 kDa Ro(SSA) autoantibodies in different autoimmune diseases preferentially recognize epitopes on the central region of the antigen. *J Rheumatol.* (1996) 23:462–8.
366. Ricchiuti V, Briand JP, Meyer O, Isenberg DA, Pruijn G, Muller S. Epitope mapping with synthetic peptides of 52-kD SSA/Ro protein reveals heterogeneous antibody profiles in human autoimmune sera. *Clin Exp Immunol.* (1994) 95:397–407.
367. Topfer F, Gordon T, McCluskey J. Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La (SS-B) and Ro (SS-A). *Proc Natl Acad Sci USA.* (1995) 92:875–9.
368. Kinoshita G, Keech CL, Sontheimer RD, Purcell A, McCluskey J, Gordon TP. Spreading of the immune response from 52 kDaRo and 60 kDaRo to calreticulin in experimental autoimmunity. *Lupus* (1998) 7:7–11. doi: 10.1191/096120398678919606
369. Fujimoto M, Shimozuma M, Yazawa N, Kubo M, Ihn H, Sato S, et al. Prevalence and clinical relevance of 52-kDa and 60-kDa Ro/SS-A autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* (1997) 56:667–70.
370. Slobbe RL, Pruijn GJ, Damen WG, van der Kemp JW, van Venrooij WJ. Detection and occurrence of the 60- and 52-kD Ro (SS-A) antigens and of autoantibodies against these proteins. *Clin Exp Immunol.* (1991) 86:99–105.

371. Foss S, Watkinson R, Sandlie I, James LC, Andersen JT. TRIM21: a cytosolic Fc receptor with broad antibody isotype specificity. *Immunol Rev.* (2015) 268:328–39. doi: 10.1111/imr.12363
372. Yang Y, Eversole T, Lee DJ, Sontheimer RD, Capra JD. Protein-protein interactions between native Ro52 and immunoglobulin G heavy chain. *Scand J Immunol.* (1999) 49:620–8.
373. Rhodes DA, Trowsdale J. TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain. *Mol Immunol.* (2007) 44:2406–14. doi: 10.1016/j.molimm.2006.10.013
374. Halenius A, Hengel H (2014) Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/472978>
375. Sakkas LI, Bogdanos DP (2016) Infections as a cause of autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Highlights* 7(1):13. <https://doi.org/10.1007/s13317-016-0086-x>
376. Muryoi T, Kasturi KN, Kafina MJ, Cram DS, Harrison LC, Sasaki T, Bona CA (1992) Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J Exp Med* 175(4):1103–1109. <https://doi.org/10.1084/jem.175.4.1103>
377. Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Tsimourtou V, Scheper T, Meyer W, Daponte A, Sakkas LI, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP (2016) Anti-hsp60 antibody responses based on *Helicobacter pylori* in patients with multiple sclerosis: (ir) Relevance to disease pathogenesis. *J Neuroimmunol* 298:19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.06.009>
378. Marou E, Liaskos C, Efthymiou G, Dardiotis E, Daponte A, Scheper T, Meyer W, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP, Sakkas LI (2017) Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 35(4):31–34
379. Marou E, Liaskos C, Simopoulou T, Efthymiou G, Dardiotis E, Katsiari C, Scheper T, Meyer W, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP, Sakkas LI (2017) Human cytomegalovirus (HCMV) UL44 and UL57 specific antibody responses in anti-HCMV-positive patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 36(4):863–869. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3553-5>
380. Zhao G, Chen M, Liu T, Sun SY, Zhao J, Xie LX (2012) Association of HSV-1 antigen distribution in the cornea with clinical characteristics of herpetic stromal keratitis. *Eur J Ophthalmol* 22(Suppl 7):S40–S45. <https://doi.org/10.5301/ejo.5000064>
381. Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H (1998) Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science (New York, NY)* 279(5355):1344–1347. <https://doi.org/10.1126/science.279.5355.1344>
382. Bogdanos DP, Sakkas LI (2017) From microbiome to infectome in autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 29(4):369–373. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000394>
383. Polymeros D, Bogdanos DP, Day R, Arioli D, Vergani D, Forbes A (2006) Does cross-reactivity between *Mycobacterium avium paratuberculosis* and human intestinal antigens characterize Crohn's disease? *Gastroenterology* 131(1):85–96. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.021>
384. Polymeros D, Tsiamoulos ZP, Koutsoumpas AL, Smyk DS, Mytilinaiou MG, Triantafyllou K, Bogdanos DP, Ladas SD (2014) Bioinformatic and immunological analysis reveals lack of support for measles virus related

- mimicry in Crohn's disease. *BMC Med* 12:139. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0139-9>
385. Bogdanos DP, Baum H, Grasso A, Okamoto M, Butler P, Ma Y, Rigopoulou E, Montalto P, Davies ET, Burroughs AK, Vergani D (2004) Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 40(1):31–39
 386. Ehser J, Holdener M, Christen S, Bayer M, Pfeilschifter JM, Hintermann E, Bogdanos D, Christen U (2013) Molecular mimicry rather than identity breaks T-cell tolerance in the CYP2D6 mouse model for human autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 42:39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.11.001>
 387. Bogdanos DP, Lenzi M, Okamoto M, Rigopoulou EI, Muratori P, Ma Y, Muratori L, Tsantoulas D, Mieli-Vergani G, Bianchi FB, Vergani D (2004) Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51. *Int J Immunopathol Pharmacol* 17(1):83–92. <https://doi.org/10.1177/039463200401700112>
 388. Mahler M, Mierau R, Schlumberger W, Bluthner M (2001) A population of autoantibodies against a centromere-associated protein A major epitope motif cross-reacts with related cryptic epitopes on other nuclear autoantigens and on the Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Mol Med (Berlin, Germany)* 79(12):722–731. <https://doi.org/10.1007/s001090100258>
 389. Ripalti A, Boccuni MC, Campanini F, Landini MP (1995) Cytomegalovirus-mediated induction of antisense mRNA expression to UL44 inhibits virus replication in an astrocytoma cell line: identification of an essential gene. *J Virol* 69(4):2047–2057
 390. Neo JYJ, Wee SYK, Bonne I, Tay SH, Raida M, Jovanovic V, Fairhurst A-M, Lu J, Hanson BJ, MacAry PA (2019) Characterisation of a human antibody that potentially links cytomegalovirus infection with systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* 9(1):9998–9998. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46329-y>
 391. Yang YS, Yang MC, Wang B, Weissler JC (2000) Autoantigen Ro52 directly interacts with human IgG heavy chain in vivo in mammalian cells. *Mol Immunol* 37(10):591–602