

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ΡΟΛΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΚΛΙΝΙΚΟ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ IgA ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ.

ΝΤΕΝΤΓΚΙΟΝΑΙ ΓΚΕΡΤΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Φανή Καλαλά, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Διευθυντής του ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ανοσολογία.

Λάρισα, Οκτώβριος 2024

UNIVERSITY OF THESSALY

**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
"CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE"
MASTER THESIS**

**The Role of Immunogene Polymorphisms in the Clinical and Laboratory Phenotype of
Patients with IgA Deficiency**

DEDGJONAJ GERTA

Examining Committee:

- Matthaïos Speletas, Professor of Medical Immunology (Supervisor)
- Fani Kalala, assistant professor of Medical Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases, Director of Master Program «Clinical Applications of Molecular Medicine»

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Immunology.

Larissa, October 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην τριμελή επιτροπή για την υποστήριξη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σπελέτα Ματθαίο, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξή του, στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Καλαλά Φανή, επίκουρη καθηγήτρια Ανοσολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές της και βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας για την άμεση βοήθεια κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας. Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω τον κ. Καθηγητή Μπόγδανο Δημήτριο, Καθηγητή Ιατρικής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων που μου έδωσε την ευκαιρία να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και να διευρύνω τις γνώσεις μου σε θεωρητικό και εργαστηριακό επίπεδο. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς η στήριξη τους υπήρξε καθοριστική για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Πίνακας περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1. Πρωτοπαθείς Ανοσοανεπάρκειες (Immunodeficiency Disorders, Inborn Errors of Immunity, IEI)	10
2. IgA Ανοσοσφαιρίνη	12
2.1 Δράση IgA ανοσοσφαιρίνης.	13
3. Εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (Selective Immunoglobulin A Deficiency, sIgAD).....	14
3.1 Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια και IgA ανοσοανεπάρκεια	14
3.2 Επιδημιολογία της sIgAD	15
3.3 Κλινικά συμπτώματα της IgAD ανεπάρκειας	15
3.4 Διάγνωση IgAD.	19
4. Γενετική της IgAD.	21
4.1 Συσχέτιση SIgAD με το σύστημα μείζονος ιστοσυμβατότητας.	21
4.2 Συσχέτιση SIgAD με μη-MHC γονίδια.....	22
4.3 Κυτταρικός υποδοχέας TACI.....	23
4.4 Ο κυτταρικός υποδοχέας BAFFR	25
4.4.1 Οι πολυμορφισμοί rs77874543 και rs61756766 του γονιδίου <i>TNFRSF13C</i>	26
4.5 Η MBL πρωτεΐνη	27
4.6 Το γονίδιο <i>CTLA4</i>	29
5. ΣΚΟΠΟΣ	32
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
1. Ασθενείς και Μάρτυρες	34
2. Μεθοδολογία Έρευνας.....	36
2.1 Απομόνωση DNA.	36
2.2 Μοριακή μελέτη γονιδίου <i>TNFRSF13B/TACI</i>	36
2.2.2 Καθαρισμός PCR προϊόντος των εξονίων του <i>TNFRSF13B</i>	40
2.3 Μοριακή μελέτη γονιδίου <i>CTLA4</i>	40
2.4 Μοριακή μελέτη γονιδίου <i>TNFRSF13C/BAFFR</i>	43
2.5 Μοριακή μελέτη γονιδίου <i>MBL2</i>	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
3.1 Περιγραφική ανάλυση και στατιστική εξέταση δεδομένων.....	54
3.2 Συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών του γονιδίου <i>TACI</i>	55
3.3 Συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού rs231775 του γονιδίου <i>CTLA4</i>	63
3.4 Συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών rs77874543 και rs61756766 του γονιδίου <i>BAFFR</i>	65
3.5 Συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών του γονιδίου <i>MBL2</i>	66

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
Βιβλιογραφία	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η IgA ανεπάρκεια (IgA deficiency, IgAD) αποτελεί την πιο συχνή πρωτοπαθή αντισωματική ανεπάρκεια και χαρακτηρίζεται από μειωμένα ή ανύπαρκτα επίπεδα IgA ανοσοσφαιρίνης στον ορό. Οι ασθενείς με IgAD εκδηλώνουν συχνές λοιμώξεις του αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος, ατοπία αλλά και αυτοάνοσα νοσήματα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε τον ρόλο γενετικών βλαβών του γονιδίου *TNFRSF13B* και πολυμορφισμών των γονιδίων *TNFRSF13C*, *CTLA4* και *MBL2* στον κλινικό και εργαστηριακό φαινότυπο ασθενών με IgAD. Όλα τα παραπάνω γονίδια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις ανοσολογικές απαντήσεις, όπου τα πρώτα τρία παραπάνω γονίδια είναι βασικοί ρυθμιστές ενεργοποίησης και ρύθμισης των B και T λεμφοκυττάρων, ενώ η MBL πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MBL2* είναι σημαντικό μόριο της φυσικής ανοσίας.

Στην μελέτη, αναλύθηκαν 101 ασθενείς με IgAD (άνδρες/γυναίκες:50/51, μέση ηλικία:28 έτη, εύρος: 2-78), για τους οποίους υπήρξε καταγραφή των κλινικών και εργαστηριακών τους δεδομένων. Για την γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε PCR-senquencing (PCR και αλληλούχιση κατά Sanger) για όλα τα εξόνια του γονιδίου *TNFRSF13B* και για το εξόνιο 1 του γονιδίου *CTLA4*. Η μελέτη γνωστών πολυμορφισμών των ανοσογονιδίων *TNFRSF13C* και *MBL2* πραγματοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP. Στα δεδομένα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση υποθέσεων για την εμφάνιση στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων.

Η μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13B* αποκάλυψε την συσχέτιση των πολυμορφισμών rs2274892, rs11078355, rs56063729 με την εκδήλωση θυροειδοπάθειας (P-value = 0.024), λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού (P-value = 0.025) και εκδήλωση λεύκης (P-value = 0.04) αντίστοιχα. Ο πολυμορφισμός rs11078355 συσχετίστηκε και με υψηλότερα επίπεδα IgM ανοσοσφαιρίνης (P-value = 0.03). Τέλος οι πολυμορφισμοί rs11652843, rs1165281, συσχετίστηκαν με την εκδήλωση θυροειδοπάθειας (P-value = 0.014 και για του δυο πολυμορφισμούς) καθώς και με αυξημένα επίπεδα της IgG3 ανοσοσφαιρίνης. (P-value = 0.002 για τον πολυμορφισμό rs11652843 και 0.014 για τον rs1165281). Ο πολυμορφισμός rs231775 του γονιδίου *CTLA4* φαίνεται να σχετίζεται με την εκδήλωση λεύκης (P-value = 0.031), ενώ κανένας από του πολυμορφισμούς rs77874543 και rs61756766 του γονιδίου *TNFRSF13C* δεν θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικός σε σχέση με κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών. Διαπιστώθηκε τέλος, συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1800450 του γονιδίου *MBL2* με

την εκδήλωση ατοπίας (P-value = 0.024) αλλά και με την εμφάνιση αυξημένων τιμών των IgG (P-value = 0.011) και IgG2 (P-value = 0.017) ανοσοσφαιρινών.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ύπαρξη των παραπάνω ανοσογονιδίων στους ασθενείς με IgAD εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ορισμένων κλινικών εκδηλώσεων, καθώς φαίνεται να επηρεάζει και τις τιμές των ανοσοσφαιρινών τους.

ABSTRACT

Immunoglobulin A deficiency (IgAD) is the most common primary antibody deficiency and is characterized by reduced or absent levels of IgA immunoglobulin in serum. Patients with IgAD frequently exhibit respiratory and gastrointestinal infections, atopy, and autoimmune diseases. In this thesis, we investigated the role of genetic defects in the *TNFRSF13B* gene and polymorphisms in the *TNFRSF13C*, *CTLA4*, and *MBL2* genes in the clinical and laboratory phenotype of patients with IgAD. All these genes play a crucial role in immune responses, with the first three acting as key regulators of B and T lymphocyte activation and regulation, while the MBL protein encoded by the *MBL2* gene is an important component of innate immunity.

In the study, we analyzed 101 patients with IgAD (male/female: 50/51, mean age: 28 years, range: 2-78), for whom clinical and laboratory data were recorded. For genetic analysis, PCR-sequencing (PCR and Sanger sequencing) was performed on all exons of the *TNFRSF13B* gene and on exon 1 of the *CTLA4* gene. The study of known polymorphisms in the immune genes *TNFRSF13C* and *MBL2* was conducted using the PCR-RFLP method. Statistical hypothesis testing was performed on the collected data to identify statistically significant associations.

The study of the *TNFRSF13B* gene revealed an association between polymorphisms rs2274892, rs11078355, and rs56063729 with the manifestation of thyroiditis (P-value = 0.024), upper respiratory infections (P-value = 0.025), and vitiligo (P-value = 0.04), respectively. The polymorphism rs11078355 was also associated with higher levels of IgM immunoglobulin (P-value = 0.03). Finally, polymorphisms rs11652843 and rs1165281 were associated with the manifestation of thyroiditis (P-value = 0.014 for both polymorphisms) as well as with increased levels of IgG3 immunoglobulin (P-value = 0.002 for rs11652843 and 0.014 for rs1165281). The polymorphism rs231775 of the *CTLA4* gene appears to be related to the development of vitiligo (P-value = 0.031), while none of the polymorphisms rs77874543 and rs61756766 of the *TNFRSF13C* gene were considered statistically significant in relation to the clinical and laboratory findings of the patients. Lastly, an association was found between the polymorphism rs1800450 of the *MBL2* gene and the manifestation of atopy (P-value = 0.024), as well as with the occurrence of elevated levels of IgG (P-value = 0.011) and IgG2 (P-value = 0.017) immunoglobulins.

In conclusion, it appears that the presence of the aforementioned immunogenes in patients with IgAD is statistically significantly associated with the manifestation of certain clinical manifestations and seems to influence their immunoglobulin levels.

1

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Πρωτοπαθείς Ανοσοανεπάρκειες (Immunodeficiency Disorders, Inborn Errors of Immunity, IEI)

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (Primary Immunodeficiencies, PIDs) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων που επηρεάζουν βασικά στοιχεία της φυσικής και επίκτητης ανοσίας. (1) (2) Ασθενείς με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια παρουσιάζουν συχνές υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, συνήθως με αυξημένη διάρκεια, αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης αυτοανοσίας, καθώς και κακοήθων νοσημάτων. (3) (4)

Οι περισσότερες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες κληρονομούνται με μεντελική κληρονομικότητα και οφείλονται σε βλάβες ενός γονιδίου. (2) Υπάρχουν ωστόσο και πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες(ΠΑΑ) όπου η εμφάνιση τους σχετίζεται με βλάβες σε περισσότερα του ενός γονίδια (πολυγονιδιακές) γεγονός που δυσχεραίνει την εύρεση των ακριβών αιτιών της νόσου καθώς και την κατανόηση της βαρύτητας των συμπτωμάτων. (2) (5) Αυτό που χαρακτηρίζει τις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι η συνδυαστική ή μη παρουσία λειτουργικής και ποσοτικής ανεπάρκειας σε στοιχεία του ανοσιακού συστήματος. Αυτά αποτελούν τα κύτταρα της λεμφικής σειράς (Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα, ΝΚ-κύτταρα), τα ουδετερόφιλα, καθώς και μόρια που συνδέονται με αυτά όπως τα αντιγόνα του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex- MHC). (2) (6)

ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ	
1.	ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ
2.	ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
3.	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ
4.	ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ (Η ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ) ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
5.	ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΤΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
6.	ΒΛΑΒΕΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ
7.	ΑΥΤΟΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ
8.	ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ
9.	ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
10.	ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ (PHENOCOPIES) ΤΩΝ ΕΓΓΕΝΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Εικόνα1: Διάκριση πρωτοπαθών ανεπαρκειών.(Tangye et al., 2020)

2. IgA Ανοσοσφαιρίνη

Η ανοσοσφαιρίνη IgA είναι μια από τους πέντε διακριτούς τύπους ανοσοσφαιρινών του οργανισμού (IgA, IgG, IgM, IgE, IgD) και αποτελεί το αντίσωμα που κυριαρχεί στους βλεννογόνους. (7) (8) Η IgA ανοσοσφαιρίνη είναι η δεύτερη κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη στον ορό, μετά την IgG, σε ποσοστό 15% έναντι των υπολοίπων ανοσοσφαιρινών. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι, ότι συναντάται σε δύο μορφές στον ανθρώπινο οργανισμό οι οποίες συμμετέχουν στην διατήρηση της ανοσίας των βλεννογόνων. (7) Στον άνθρωπο η IgA ανοσοσφαιρίνη εκφράζεται σε δυο υπότυπους, την IgA₁, και την IgA₂, οι οποίες διαφέρουν κυρίως στο τρόπο σύνδεσης των βαρέων και των ελαφρών αλυσίδων καθώς και στις θέσεις γλυκοζυλίωσης. (7) (9)

Στον ορό, η IgA ανοσοσφαιρίνη προέρχεται από τον μυελό των οστών και το μεγαλύτερο μέρος της καταλαμβάνεται από το μονομερές IgA₁ σε αναλογία 9:1 με το μονομερές IgA₂. (7) (9) Στους βλεννογόνους κυριαρχεί η ύπαρξη διμερών μορίων IgA₁, IgA₂ σε ίση σχεδόν αναλογία, με τον υπότυπο IgA₂ να κυριαρχεί ελαφρώς καθώς διαθέτει πιο σταθερή δομή και δεν είναι τόσο ευαίσθητος στην δράση των βακτηριακών πρωτεασών συγκριτικά με τον υπότυπο IgA₁. (7)

Στις εκκρίσεις συναντάται η εκκριτική IgA ένα διμερές ή τετραμερές μόριο με το οποίο προσδένεται στην επιφάνεια ιικών και βακτηριακών αντιγόνων εμποδίζοντας την προσκόλληση τους σε βλεννώδη κύτταρα καθώς και την δημιουργία αποικιών. (10) Η εκκριτική IgA συντίθεται τοπικά στον υποεπιθηλιακό ιστό από πλασματοκύτταρα που παράγουν IgA και την συνέχεια μόρια IgA δεσμεύονται στον υποδοχέα poly-Ig, ο οποίος βρίσκεται στους περισσότερους βλεννώδεις επιθηλιακούς ιστούς. Το σύμπλοκο που δημιουργείται ενδοκυτταρώνεται στα επιθηλιακά κύτταρα όπου ακολουθεί ενζυμική διάσπαση του poly-Ig υποδοχέα και μετατροπή του σε εκκριτικό παράγοντα. Ακολουθεί εξωκυττάρωση του μορίου IgA-εκκριτικού παράγοντα από τα επιθηλιακά κύτταρα στις εκκρίσεις των βλεννογόνων. Δομικά η εκκριτική IgA αποτελείται από τουλάχιστον δύο μονομερή μόρια IgA, μια αλυσίδα J και τον εκκριτικό παράγοντα. Η σύνδεση αυτών των μορίων πραγματοποιείται μέσω ομοιοπολικών δεσμών. (8) (10)

2.1 Δράση IgA ανοσοσφαιρίνης.

Η δράση της IgA ανοσοσφαιρίνης, δεν περιορίζεται μόνο στην διατήρηση της ανοσίας των βλεννογόνων, μέσω της εκκριτικής IgA. Μελέτες έχουν δείξει πως η IgA ανοσοσφαιρίνη του ορού, μέσω των υποδοχέων της Fc περιοχής της, διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση και είναι υπεύθυνη για την ομοιοστάση αρκετών οδών που ενεργοποιούν ανοσιακούς μηχανισμούς. (11) Η μη μεταβλητή Fc περιοχή κάθε ανοσοσφαιρίνης αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς FcR (Fc Receptors) οι οποίοι εκφράζονται σε αρκετά κύτταρα και με την σύνδεσή τους, ενεργοποιούνται διάφορα ανοσιακά μονοπάτια (π.χ φαγοκυττάρωση, οψωνοποίηση κ.α). (11) (12) Η IgA ανοσοσφαιρίνη διαθέτει 5 υποδοχείς, με τον κυριότερο να αποτελεί τον FcαRI (CD89) υποδοχέα. Το γονίδιο του FcαRI υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της μυελικής σειράς, αλλά όχι στα κύτταρα των βλεννογόνων καθώς και στα μακροφάγα του εντέρου. (13) Το επίπεδο έκφρασης του υποδοχέα FcαRI σε κάθε κύτταρο διαφέρει ανάλογα με το είδος του κυττάρου και το επίπεδο ωρίμανσης του. Η σύνδεση ενός IgA ανοσοσυμπλέγματος με τον υποδοχέα FcαRI απαιτεί την μεσολάβηση της FcRγ υπομονάδας, η οποία φέρει μια αλυσίδα ITAM. Η FcRγ αλυσίδα ITAM αποτελείται από τυροσίνες και λευκίνες οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια αλληλουχία 7 αμινοξέων. Η αλληλεπίδραση του FcαRI- FcRγ- FcRγ αλυσίδας ITAM επάγει την φωσφορυλίωση της FcRγ αλυσίδας ITAM και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Src κινασών, οι οποίες διασπούν τις τυροσίνες της αλυσίδας ITAM. (12) (14) Η διαδικασία αυτή επάγει την ενεργοποίηση διάφορων ανοσιακών μονοπατιών, όπως της φαγοκυττάρωσης, της παραγωγής κυταροκινών κ.α. (12)

3. Εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (Selective Immunoglobulin A Deficiency, sIgAD)

Ως εκλεκτική IgA ανεπάρκεια ορίζεται η πρωτοπαθής αντισωματική ανεπάρκεια κατά την οποία η συγκέντρωση της IgA στον ορό είναι μικρότερη ή ίση 7mg/dl σε άτομα μεγαλύτερα των 4 ετών. (15) Αντίστοιχα, ως μερική IgA ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται όταν η συγκέντρωση της IgA του ορού είναι δύο λόγους κάτω από την μέση τιμή των φυσιολογικών τιμών του πληθυσμού, της ίδιας ηλικίας και φύλου. (16) Παρατηρούνται και στις δυο περιπτώσεις φυσιολογικές τιμές στις IgM και IgG ανοσοσφαιρίνες αν και σε περίπου 10% των ασθενών με sIgAD παρατηρείται και ανεπάρκεια στην IgG ανοσοσφαιρίνη και κυρίως στις υποτάξεις IgG₂ και IgG₄. (17) (16) Ακόμη, έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ασθενών όπου η IgAD εξελίχτηκε σε κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (common variable immunodeficiency, CVID), κυρίως σε άτομα της ίδιας οικογένειας. (18)

Ο τρόπος κληρονόμησης της IgAD είναι ακόμα άγνωστος, ωστόσο συγγενείς πρώτου βαθμού ατόμων με IgAD έχουν 38 φορές μεγαλύτερες πιθανότητες να εκδηλώσουν την νόσο σε σύγκριση με άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό και η πιθανότητα κληρονόμησης της νόσου ανάμεσα σε συγγενείς είναι σχεδόν 20% (19)

3.1 Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια και IgA ανοσοανεπάρκεια

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (Common Variable Immunodeficiency, CVID) καθώς και η IgA ανοσοανεπάρκεια αποτελούν τις συχνότερες πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες οι οποίες αν και διαφέρουν σαν ασθένειες, μοιράζονται αρκετά κοινά στοιχεία. Αρχικά, ως CVID ορίζεται η ανεπάρκεια κατά την οποία παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα τόσο της ανοσοσφαιρίνης IgG (<3g/l) όσο και της IgA ανοσοσφαιρίνης (<0,05g/l), ενώ σε ορισμένους ασθενείς σημειώνεται και μείωση των επιπέδων της IgM ανοσοσφαιρίνης κάτω του 0,3g/l. Ασθενείς με CVID αλλά και με sIgAD εμφανίζουν κοινή κλινική εικόνα που χαρακτηρίζεται από συχνές λοιμώξεις του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού. Η CVID όσο και η sIgAD σε ορισμένους ασθενείς, εμφανίζουν κληρονομικό χαρακτήρα, αλλά μπορούν να εμφανιστούν και σποραδικά χωρίς κάποια κληρονομική συσχέτιση. Συγκεκριμένα, περίπου 20% των ασθενών με CVID αλλά και sIgAD εμφανίζουν κληρονομικό ιστορικό της νόσου, που μπορεί να είναι είτε αυτοσωμικός επικρατής είτε αυτοσωμικός υπολειπόμενος. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τόσο η CVID όσο και η sIgA μπορούν να εμφανιστούν σε διαφορετικά μέλη της ίδιας οικογένειας. Τέλος, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω,

έχουν περιγραφεί ασθενείς με sIgAD που εκδήλωσαν στην πορεία CVID, γεγονός που υποδηλώνει το πιθανώς γενετικό υπόστρωμα των δύο νόσων. Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν γενετικές βλάβες γονιδίων που έχουν συσχετιστεί τόσο με τη CVID, όσο και τη sIgAD, όπως των *TNFRSF13B*, *TNFSF13C*, *Msh5* κ.α χωρίς ωστόσο να έχει εξακριβωθεί η γενετική βάση ή οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εκδήλωση και στον τελικό κλινικό φαινότυπο της νόσου. (20) (21) (22) (23)

3.2 Επιδημιολογία της sIgAD

Η εκλεκτική IgA ανεπάρκεια αποτελεί την συχνότερη πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια με τον επιπολασμό της νόσου να κυμαίνεται από 1:143 έως 1:965 στις περιοχές της Ευρώπης και της Αμερικής. (24) Στην Ασία η συχνότητα εκδήλωσης της νόσου μειώνεται, με τον επιπολασμό να φτάνει έως και 1:14.840 στην περιοχή της Ιαπωνίας. (18) (19) Παράγοντες που επηρεάζουν τον επιπολασμό της IgAD αποτελεί η γεωγραφική περιοχή, η φυλή καθώς και το ποσοστό των ασθενών που έχει διαγνωστεί. (18) Καθώς η IgA αποτελεί κατά κύριο λόγο μια ασυμπτωματική νόσο, τα ποσοστά επιπολασμού υπολογίζονται να είναι ακόμη πιο υψηλά. Ακόμη, σημαντικό ρόλο στην πιθανότητα εκδήλωσης IgAD διαδραματίζει και το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών. (24) (19)

3.3 Κλινικά συμπτώματα της IgAD ανεπάρκειας

Το μεγαλύτερο μέρος των ασθενών με IgAD (~60%) δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα γεγονός που αποτελεί τον κύριο λόγο που η νόσος είναι υποδιαγνωσμένη. Οι κλινικές εκδηλώσεις της IgAD περιλαμβάνουν την εμφάνιση λοιμώξεων από το ανώτερο αναπνευστικό, το γαστρεντερικό σύστημα, και την εκδήλωση αλλεργιών, αυτοάνοσων νοσημάτων, ακόμη και αυξημένη επίπτωση νεοπλασιών. (15)

- Αναπνευστικό σύστημα

Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος αποτελούν το κυριότερο χαρακτηριστικό των ασθενών με IgAD. Τα πιο κοινά παθογόνα που προσβάλουν τόσο το ανώτερο όσο και κατώτερο αναπνευστικό, είναι ο *Haemophilus influenzae*, λόγω της απουσίας κάψας στο συγκεκριμένο βακτήριο, και ο *Streptococcus pneumoniae*. (25) Ασθενείς που εμφανίζουν συνδυαστική ανεπάρκεια στην IgA ανοσοσφαιρίνης και στις υποτάξεις της IgG ανοσοσφαιρίνης εμφανίζουν βαρύτερα κλινικά συμπτώματα και μεγαλύτερη πιθανότητα επιπλοκών συγκριτικά με ασθενείς που έχουν μόνο sIgAD.

(24) Χαρακτηριστικά, ασθενείς με ανεπάρκεια IgA και ανεπάρκεια IgG₂ ή IgG₃, εμφανίζουν χρόνιες λοιμώξεις, με εντονότερη συμπτωματολογία, του αναπνευστικού που μπορούν να οδηγήσουν και σε βρογχεκτασίες. (24) (25)

- Γαστρεντερικό

Οι λοιμώξεις του γαστρεντερικού είναι συχνό φαινόμενο των ασθενών με IgAD και μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνιες διάρροιες και στεατόρροια. (25) Τα κύρια παθογόνα που εντοπίζονται αποτελούν το πρωτόζωο *Giardia lamblia*, τα βακτηριακά παθογόνα *Salmonella* και *Campylobacter* και ο ιός Rota. (15) (24) Καθώς η IgA ανοσοσφαιρίνη διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην άμυνα του γαστρεντερικού, μειωμένες τιμές της, επιτρέπουν την προσκόλληση παθογόνων και την δημιουργία λοιμώξεων. (25) Η κατάσταση αυτή εξισορροπείται με την δράση των IgM ανοσοσφαιρινών. Μελέτες σε ασθενείς με IgAD έδειξαν αύξηση των τιμών της IgM ανοσοσφαιρίνης στον γαστρεντερικό σωλήνα, γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί λόγω της ομοιότητας των δύο ανοσοσφαιρινών τόσο στην δομή, όσο και στην δράση τους. Ωστόσο, η δράση της IgM δεν μπορεί να αντικαταστήσει τη λειτουργία της IgA ανοσοσφαιρίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση γαστρεντερικών διαταραχών όπως, της ελκώδους κολίτιδας, της κοιλιοκάκης, της αντιδραστικής λεμφοϋπερπλασίας του εντέρου και της νόσου του Crohn. Έχουν ακόμη αναφερθεί και κακοήθειες του στομάχου καθώς και αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου σε αυξημένη συχνότητα σε αυτούς τους ασθενείς. Επίσης, ασθενείς με IgAD έχουν 10-15% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν κοιλιοκάκη έναντι των φυσιολογικών ατόμων γεγονός που προμηνύει κάποια πιθανή γενετική συσχέτιση των δύο ασθενειών ίσως μέσω κάποιων κοινών αλληλοτύπων του Human Leukocyte Antigen (HLA), όπως τα HLA-A1, HLA-Cw7, HLA-B8, HLA-DR3 και HLA-DQ2. (25) (26)

- Ατοπία

Ασθενείς με IgAD εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση ατοπίας, συγκεκριμένα ένα ποσοστό 30% των ασθενών παρουσιάζουν ποικίλες αλλεργικές εκδηλώσεις. (27) Οι συχνότερες καταγραφές περιλαμβάνουν το άσθμα, την κνίδωση, την αλλεργική ρινίτιδα, τροφικές αλλεργίες και αλλεργικές αντιδράσεις σε φάρμακα (κυρίως πενικιλίνη). (15) (28) Ωστόσο η συσχέτιση της IgAD με την εκδήλωση αλλεργικών φαινομένων ακόμη διχάζει καθώς δεν έχει διαγνωσθεί κάποια γενετική βλάβη που να την αιτιολογεί. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την ως άνω συσχέτιση και άλλες την

απορρίπτουν. (29) (30) Κάποιες από τις υποθέσεις που οδηγούν στην εκδήλωση αλλεργικών επεισοδίων σε ασθενείς με IgAD στηρίζονται στην δράση της IgA ανοσοσφαιρίνης. Η IgA ανοσοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για την παρεμπόδιση της απορρόφησης αλλεργιογόνων ουσιών από τον οργανισμό μέσω της δράσης της στο εντερικό επιθήλιο, έτσι τα μειωμένα επίπεδα IgA ανοσοσφαιρίνης συχνά οδηγούν στην αύξηση των υπολοίπων ανοσοσφαιρινών, άρα και της IgE ανοσοσφαιρίνης γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση αλλεργιών, χωρίς ωστόσο η υπόθεση αυτή να έχει μέχρι σήμερα τεκμηριωθεί. (21)

- Αυτοάνοσα νοσήματα

Η συσχέτιση αυτοάνοσων νοσημάτων σε ασθενείς με IgAD αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της νόσου. Αυτοάνοσα νοσήματα εμφανίζονται περίπου στο 20-30 % των ασθενών με IgAD, ανάλογα με το ηλικιακό εύρος που μελετάται.²⁶ Μελέτες σε ασθενείς με IgAD έδειξαν ότι έχουν πενταπλάσιες περίπου πιθανότητες να διαθέτουν κάποιο συγγενή πρώτου βαθμού με κάποιο αυτοάνοσο νόσημα σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό. (21)

Τα κύρια αυτοάνοσα νοσήματα που έχουν καταγραφεί σε ασθενείς με IgAD περιλαμβάνουν την ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ), την κοιλιοκάκη, τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ), τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, την ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura-ITP) και την νόσο του Graves. Η γενετική βάση που συσχετίζει την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων σε ασθενείς με IgAD παραμένει άγνωστη, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί έξι πιθανές υποθέσεις που αιτιολογούν την εκδήλωση τους. (21)

Μια βασική υπόθεση που αιτιολογεί την εκδήλωση αυτοανοσίας σε ασθενείς με IgAD αποτελεί η ύπαρξη κοινών HLA απλοτύπων που έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με IgAD και σε ασθενείς με κάποια αυτοάνοσα νοσήματα, όπως την κοιλιοκάκη, την νόσο του Graves κ.α. (26) (18) Εναλλακτικά, μια άλλη θεώρηση, υποστηρίζει πως η αυτοανοσία αλλά και η IgAD μπορεί να είναι αποτέλεσμα βλαβών των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Μελέτη των Borte, et al, έδειξε την αύξηση των τιμών της IgA ανοσοσφαιρίνης σε ασθενείς με sIgAD υστέρη από την διέγερση των Β κυττάρων τους με συγκεκριμένες κυτταροκίνες οι οποίες ενίσχυαν την ισοτυπική μεταστροφή των πλασματοκυττάρων που εκκρίνουν IgA ανοσοσφαιρίνες. (21)

Μια τρίτη υπόθεση περιγράφει ότι οι ασθενείς με IgAD λόγω της μειωμένης άμυνας που εμφανίζουν στα επιθήλια, επιτρέπουν την είσοδο περισσότερων αντιγόνων (μικροβίων, όσο και συστατικών των τροφών) στον οργανισμό. Αυτό οδηγεί στην ευαισθητοποίηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων σε περισσότερα αντιγόνα, μια κατάσταση η οποία σε συνδυασμό με την ικανότητα μοριακής μίμησης ορισμένων αντιγόνων δύναται να οδηγήσει στην εκδήλωση αυτοανοσίας. Τέτοιες περιπτώσεις εκδήλωσης αυτοάνοσου νοσήματος είναι ήδη γνωστές όπως στην περίπτωση του ρευματοειδούς πυρετού και του σύνδρομο Guillain-Barre κ.α. (31) (21)

Η τέταρτη θεωρία στηρίζεται στην αντιφλεγμονώδη δράση της IgA ανοσοσφαιρίνης. Ασθενείς με ανεπάρκεια IgA ανοσοσφαιρίνης όπως έχει επισημανθεί και παραπάνω, εμφανίζουν εκτός από περισσότερες πιθανότητες εκδήλωσης λοιμώξεων και μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων. Η αδυναμία του οργανισμού να εξαλείψει τα παθογόνα, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση χρόνιων λοιμώξεων και την παραγωγή ιντερλευκινών αλλά και του νεκρωτικού παράγοντα του όγκου (Tumor Necrosis Factor, TNF), γεγονός που μπορεί να «στρέψει» τα κύτταρα του ανοσοποιητικού έναντι κυττάρων του ίδιου του οργανισμού, και την εκδήλωση τελικά αυτοανοσίας. (32) (33)

Η πέμπτη θεωρία σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της IgA ανοσοσφαιρίνης με τους FcαRI υποδοχείς. Η έλλειψη μονομερούς IgA στον ορό, που εμφανίζεται σε ασθενείς με sIgAD, εμποδίζει αυτή την διαδικασία αναστολής της ενεργοποίησης ανοσιακών μονοπατιών και εκθέτει τους ασθενείς σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και στην εκδήλωση αυτοανοσίας. (34) (21)

Τέλος, υποστηρίζεται πως συγκεκριμένες, άγνωστες προς στιγμήν γενετικές βλάβες μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση IgAD αλλά και αυτοανοσίας. Κοινές γενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με IgAD, κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια αλλά και κοιλιοκάκη, υποστηρίζοντας πως μπορεί να υπάρχει κάποια γενετική συσχέτιση μεταξύ των ασθενειών αυτών. Έως τώρα δεν έχει αποδειχθεί κάποια συγκεκριμένη γενετική βλάβη που να οδηγεί στην IgAD ή να την συσχετίζει με την εκδήλωση κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος. Ωστόσο υποστηρίζεται ότι η IgAD μπορεί να είναι δευτερογενές αποτέλεσμα κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος, με το οποίο να μοιράζεται κοινές βλάβες. (35) (21)

3.4 Διάγνωση IgAD.

Ο έλεγχος για την εκδήλωση IgAD πρέπει να πραγματοποιείται σε ασθενείς που εμφανίζουν συχνές υποτροπιάζουσες λοιμώξεις (κυρίως του ανωτέρου αναπνευστικού και του γαστρεντερικού), αλλεργίες, αυτοάνοσα νοσήματα, οικογενειακό ιστορικό IgAD καθώς σε ασθενείς με κοιλιοκάκη. (15) (24) Κατά κύριο λόγο η διάγνωση της IgAD στηρίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό της IgA ανοσοσφαιρίνης στον ορό.

Με βάση τα κριτήρια της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ανοσοανεπαρκειών ESID (European Society of Immunodeficiencies) για την διάγνωση της IgAD απαιτείται εργαστηριακός έλεγχος ο οποίος περιλαμβάνει ποσοτικό προσδιορισμό ανοσοσφαιρινών καθώς και των υποτάξεών τους με την χρήση νεφελόμετρου, προσδιορισμό λεμφοκυττάρων, αλλά και έλεγχο αντισωματικών απαντήσεων του οργανισμού ενάντια σε ειδικά πρωτεϊνικά και πολυσακχαριδικά αντιγόνα. (24) (36)

Όπως τονίστηκε και παραπάνω, ασθενείς με IgAD εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα IgA (<7mg/dl) ενώ μπορεί να έχουν φυσιολογικές τιμές των υπολοίπων ανοσοσφαιρινών, φυσιολογικό αριθμό B λεμφοκυττάρων καθώς και φυσιολογική απάντηση σε εμβόλια.²³ Ο ποσοτικός προσδιορισμός της IgA των βλεννογόνων δεν συμπεριλαμβάνεται στον έλεγχο καθώς ασθενείς με IgAD μπορεί να παράγουν ποσότητες εκκριτικής IgA στους βλεννογόνους, αρκετές για να τους παρέχουν σημαντική προστασία από παθογόνα. (15) (25)

Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο έλεγχος των ασθενών με IgAD για την ύπαρξη anti-IgA αντισωμάτων. Ποσοστό της τάξεως του 10-44% των ασθενών με IgAD διαθέτει anti-IgA αντισώματα και οδηγείται στην εκδήλωση αναφυλακτικού σοκ με την χορήγηση IgA σε μεταγγίσεις αίματος, πλάσματος, αλλά και από την χορήγηση ενδοφλέβιας ή υποδόριας γ-σφαιρίνης. (37)

Η διάγνωση της IgAD πραγματοποιείται από το 4 έτος της ζωής καθώς χαμηλά επίπεδα IgA αντισωμάτων σε βρέφη και παιδιά δε σχετίζονται πάντα με την εκδήλωση IgAD. Παιδιά ηλικιών από 6 μηνών έως 4-5 ετών με μειωμένα επίπεδα IgA ανοσοσφαιρίνης ενδέχεται να εμφανίσουν sIgAD, να εκδηλώσουν CVID, ενώ μπορεί και να αποκαταστήσουν τις τιμές των ανοσοσφαιρινών σε φυσιολογικές στην πορεία του χρόνου. (37) Τέλος, απαραίτητη είναι η κλινική εξέταση καθώς και η λήψη

ιστορικού για τον αποκλεισμό δευτεροπαθών παραγόντων που μπορούν να οδηγήσουν σε λαθεμένη διάγνωση IgAD (π.χ φάρμακα, νεοπλάσματα, κ.λπ.). (36)

4. Γενετική της IgAD.

Το γεγονός ότι η IgAD αποτελεί κατά κύριο λόγο μια ασυμπτωματική νόσο, με τους ασθενείς να αγνοούν την ύπαρξή της μέχρι να διαπιστωθεί, ίσως και τυχαία εργαστηριακά, καθιστά δύσκολη την εύρεση της γενετικής βάσης που προκαλεί τη νόσο. Με το 40% των ασθενών μόνο να εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα και με ένα ακόμη μικρότερο ποσοστό να συμμετέχει σε έρευνες για την sIgAD, καθώς ο επιπολασμός της νόσου διεθνώς είναι διαφορετικός, δυσχεραίνεται η προσπάθεια καταγραφής των αιτιολογικών γενετικών βλαβών του νοσήματος. Μελέτες σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό IgAD καθώς και μελέτες σε ορισμένα γονίδια, έχουν παράσχει αρκετές πληροφορίες για την sIgAD, ωστόσο τα ακριβή αίτια της νόσου παραμένουν άγνωστα. Μέχρι στιγμής η νόσος φαίνεται να είναι πολυγονιδιακή με αρκετές μοριακούς οδούς να εμπλέκονται, ενώ δεν ακολουθείται και μεντελικός τρόπος κληρονόμησης της νόσου. (38) (39) (15)

4.1 Συσχέτιση SIgAD με το σύστημα μείζονος ιστοσυμβατότητας.

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major histocompatibility complex, MHC), αποτελεί ένα πολύπλοκο γενετικό σύμπλοκο με πολλαπλούς γενετικούς τόπους. Τα γονίδια του MHC κωδικοποιούν τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens, HLA), τα οποία αποτελούν ειδικές μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες επιτρέπουν την διάκριση μεταξύ εαυτού και μη εαυτού του οργανισμού. (40) Το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας οργανώνεται σε τρεις τάξεις ανάλογα με τα μόρια που κωδικοποιεί. Τα μόρια HLA τάξης I εκφράζονται σε όλα τα εμπύρρινα κύτταρα και κάνουν αντιγονοπαρουσίαση στα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, ενώ τα HLA μόρια τάξης II εκφράζονται στα B-λεμφοκύτταρα, στα δενδριτικά και στα μακροφάγα, δηλαδή στα κύτταρα που κάνουν αντιγονοπαρουσίαση στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια HLA της τάξης III, δεν συμμετέχουν στην αντιγονοπαρουσίαση, αλλά κωδικοποιούν κάποιες κυτταροκίνες και μόρια σημαντικά για την δράση του συμπληρώματος. (41) (42) Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια MHC βρίσκονται στο χρωμόσωμα 6 και κληρονομούνται με μεντελική κληρονομικότητα. (42)

Ο ρόλος των γονιδίων του MHC είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην λειτουργία του ανοσιακού συστήματος. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την συσχέτιση γονιδιακών πολυμορφισμών του γενετικού τύπου των MHC μορίων με την εκδήλωση

αυτοάνοσων νοσημάτων, πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, ακόμα και ψυχιατρικών ασθενειών. (43) (44)

Η συσχέτιση των γονιδίων MHC με πλήθος παθολογικών καταστάσεων καθώς και τα μη ακριβή (ή άγνωστα) γενετικά αίτια της SIgAD οδήγησαν σε μελέτες για την διαπίστωση, εάν πολυμορφισμοί των γονιδίων MHC μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση IgA ανοσοανεπάρκειας. Αποδείχθηκε πως τρεις απλότυποι είναι επικρατέστεροι σε άτομα που πάσχουν από IgAD σε σύγκριση με το φυσιολογικό πληθυσμό. (45) (46) Συγκεκριμένα, ο απλότυπος HLA-B*0801/DRB1*03/DQB1*0201 έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση IgAD σε ασθενείς της βορείου Ευρώπης (Σουηδία, Φιλανδία κ.α). (47) Σε μελέτη των Schroeder et al, φαίνεται ότι το 12% των ομόζυγων ως προς τον απλότυπο HLA B8/DR3 είχαν εκδηλώσει sIgAD γεγονός που υποδεικνύει ότι αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης της νόσου, ωστόσο άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι αυτά τα ποσοστά είναι μικρότερα. (48) Ο απλότυπος HLA-DRB1* 0701/DQB1*0202 έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση IgAD πάλι σε πληθυσμούς της βόρειας Ευρώπης, ενώ ο απλότυπος HLA-DRB1* 0102, DQB1*0501 έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση sIgAD σε πληθυσμούς της νότιας Ευρώπης (Ιταλία, Ισπανία κ.α) καθώς και της νοτιοδυτικής Ασίας (κυρίως του Ιράν). (49) Ακόμη, μια μελέτη σε πληθυσμό της Κίνας συσχέτισε τον απλότυπο HLA-B*08-DRB1*0301-DQB1*02 για την εκδήλωση της νόσου. (38) Τέλος, ο απλότυπος HLA-DRB1*1501-DQB1*06, φαίνεται να λειτουργεί προστατευτικά ως προς την εκδήλωση IgAD, με τα ομόζυγα άτομα να μην εκδηλώνουν sIgAD. (45)

Οι παραπάνω απλότυποι είναι οι συχνότεροι που έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με sIgAD, ωστόσο όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν πως η εκδήλωση IgAD σχετίζεται περισσότερο με μη-MHC γονίδια καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες και όχι τόσο με τους προαναφερθέντες απλοτύπους. (45) (50)

4.2 Συσχέτιση SIgAD με μη-MHC γονίδια.

Εκτός από γονίδια που συνδέονται με την έκφραση HLA μορίων, μελέτες έχουν συσχετίσει την εκδήλωση IgAD με πολυμορφισμούς των γονιδίων *IFIH1*, *CLEC16A*, *PVT1*, *AHII* και *ATG13-AMBRA1*. Πολυμορφισμοί των γονιδίων *IFIH1* και *CLEC16A*, έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση διαφόρων νοσημάτων όπως τον διαβήτη τύπου 1, την κοιλιοκάκη και τον συστηματικό ερυθρεματοειδή λύκο, ενώ τα γονίδια *PVT1*, *AHII*

και *ATG13-AMBRA1* είναι υπεύθυνα για 21 ρυθμιστικές παραλλαγές όπως την δημιουργία υπεραισθησίας των FOXP3⁺ T ρυθμιστικών κυττάρων σε DNases. (51) (52) (53)

Πρόσφατες μελέτες, έχουν συσχετίσει την εκδήλωση IgAD με τα γονίδια *STXBP6* και *B3GNT6*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σε ασθενείς με IgAD που έφεραν έναν από τους απλότυπους MHC που έχουν συσχετιστεί με sIgAD, η ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο *STXBP6*. Αντίθετα σε ασθενείς που δεν έφεραν MHC απλότυπους σχετικούς με την εκδήλωση sIgAD παρατηρήθηκε η συσχέτιση εκδήλωσης sIgAD με το γονίδιο *B3GNT6*. (54)

4.3 Κυτταρικός υποδοχέας TACI.

Ο κυτταρικός υποδοχέας TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor) ανήκει στην οικογένεια των TNF (Tumor Necrosis Factor) υποδοχέων και είναι υπεύθυνος για την διατήρηση της ομοιόστασης των B κυττάρων. Ο υποδοχέας TACI κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFRSF13B*, το οποίο βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 στην θέση 17p11.2 και διαθέτει 5 εξόνια. (55) (56) (57) Ο υποδοχέας TACI αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III που συντίθεται από 293 αμινοξέα. Εξωκυτταρικά, εντοπίζεται το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, αποτελούμενο από 166 αμινοξέα, διαμεμβρανικά εντοπίζονται 20 αμινοξέα της πρωτεΐνης TACI, ενώ ενδοκυτταρικά εντοπίζονται 107 αμινοξέα. Το εξωκυτταρικό τμήμα χαρακτηρίζεται από 2 περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες (CRDs), χαρακτηριστικές των TNF υποδοχέων. Η πρώτη περιοχή CRD1 είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό του υποδοχέα, ενώ στη δεύτερη περιοχή CRD2 προσδένονται συνδέτες υψηλής συγγένειας με τον υποδοχέα TACI, όπως ο υποδοχέας BAFF και APRIL. Το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα TACI διαθέτει θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών TRAF (TNF Receptor Associated Factors) και CALM (Calcium Modulating Ligand). (58) (59) (60)

4.3.1 Ο υποδοχέας TACI και οι συνδέτες του.

Ο υποδοχέας TACI ως μέλος την οικογενείας των TNF υποδοχέων, επάγει μονοπάτια ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στην διαφοροποίηση των B- λεμφοκυττάρων, την ομοιόσταση και την ισοτοπική μεταστροφή των λεμφοκυττάρων. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της

αλληλεπίδρασης του με τις πρωτεΐνες της TNF οικογένειας, BAFF και APRIL. (61)
(62)

Η πρωτεΐνη BAFF αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II και εμφανίζει ισχυρή σύνδεση και ειδικότητα με την CRD2 περιοχή του υποδοχέα TACI. Η πρωτεΐνη BAFF είναι σημαντική για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων και εμφανίζεται σε δύο μορφές την διαλυτή και την συνδεδεμένη με μεμβράνη. Εκτός από τον υποδοχέα TACI, η πρωτεΐνη BAFF συνδέεται και με τον υποδοχέα BAFF-R (ειδικός προς τον BAFF) και τον υποδοχέα BCMA οι οποίοι εκφράζονται κυρίως στα ώριμα B κύτταρα. Η σύνδεση του υποδοχέα TACI με την πρωτεΐνη BAFF, συμβάλει στον τριμερισμό του υποδοχέα και επιτρέπει την πρόσδεση των μορίων TRAF- και της πρωτεΐνης CALM για την ενεργοποίηση του NF-κB.

Η πρωτεΐνη APRIL αποτελεί επίσης μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, η οποία παράγεται από κύτταρα της μυελικής σειράς και είναι υπεύθυνη για την ισοτοπική μεταστροφή των B-κυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η σύνδεση του υποδοχέα TACI με την πρωτεΐνη APRIL, σε συνδυασμό και με την παρουσία πρωτεογλυκανών, ενεργοποιεί τον υποδοχέα και επάγεται η μεταστροφή πλασματοκυττάρων σε IgA ανοσοσφαιρίνη. Η πρωτεΐνη APRIL μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα TACI, τον υποδοχέα BCMA, τις πρωτεογλυκάνες ενώ δεν μπορεί να συνδεθεί με τον BAFF-R.

Ο υποδοχέας TACI εκφράζεται κυρίως στα ώριμα B κύτταρα και κυρίως στα CD27+ κύτταρα, τα B-κύτταρα μνήμης καθώς και στα πλασματοκύτταρα. Η έκφραση του TACI επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και εμφανίζει αρκετές διακυμάνσεις κατά την διάρκεια της ζωής. Κατά την νεογνική περίοδο τα επίπεδα έκφρασης του TACI είναι χαμηλά, όπως και των πρωτεϊνών APRIL, BCMA καθώς ο αριθμός των πλασματοκυττάρων είναι χαμηλός. Στην συνέχεια, η έκφραση του TACI αυξάνεται έως και την περίοδο της ενηλικίωσης. (62) (63) (64) (65) (66)

Σε αντίθεση με την επαγωγική δράση των BAFF και BAFFR στην ενεργοποίηση των B κυττάρων, η δράση του TACI φαίνεται να είναι ανασταλτική. Ο υποδοχέας TACI και ο υποδοχέας BAFFR μοιράζονται τον κοινό συνδέτη BAFF καθιστώντας την σχέση τους ανταγωνιστική ως προς την δέσμευση τους. Η ανεπάρκεια του συνδέτη TACI οδηγεί στον αυξημένο καταβολισμό του BAFF από το BAFFR επάγοντας τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό των B κυττάρων. Την σχέση αυτή, την επιβεβαιώνουν μελέτες σε TACI^{-/-} ποντίκια, τα οποία παρουσίαζαν αυξημένο αριθμό B κυττάρων, σπληνομεγαλία, διογκωμένους λεμφαδένες, καθώς και την εμφάνιση αυτοανοσίας και λεμφωμάτων, υποδηλώνοντας την αναχαιτιστική δράση του TACI στην κυτταρική ανάπτυξη των B κυττάρων συμβάλλοντας στην διατήρηση φυσιολογικού πληθυσμού B κυττάρων. (67) (68) (69)

4.4 Ο κυτταρικός υποδοχέας BAFFR

Όπως προαναφέρθηκε οι υποδοχείς TACI και BCMA μοιράζονται δύο κοινούς προσδέτες, τις πρωτεΐνες BAFF και APRIL, οι σύνδεση των οποίων σηματοδοτεί την ενεργοποίηση διάφορων μονοπατιών των B λεμφοκυττάρων. Ωστόσο ο υποδοχέας BAFF-R είναι ειδικός προς την πρωτεΐνη BAFF, με την σύνδεσή τους να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των B-κυττάρων. (70) (71)

Ο κυτταρικός υποδοχέας BAFF-R κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFRSF13C* το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22 στην θέση 22q13.2 και διαθέτει 3 εξόνια. Όπως και ο υποδοχέας TACI αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III αποτελούμενη από 184 αμινοξέα. (72) Το εξωκυττάριο τμήμα του κυτταρικού υποδοχέα BAFF-R αποτελείται από 63 αμινοξέα και περιέχει μια μη τυπική περιοχή CRD, η οποία επιτρέπει την πρόσδεση του συνδέτη BAFF. Το ενδοκυττάριο τμήμα περιέχει θέσεις αναγνώρισης της κινάσης TRAF3, η οποία σηματοδοτεί την ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού NF-κΒ. (73) Η ενεργοποίηση του BCR υποδοχέα επάγει την ενεργοποίηση του υποδοχέα BAFF. Η έκφραση του γίνεται στα ανώριμα B-λεμφοκύτταρα, την περίοδο που τα B-κύτταρα διαφοροποιούνται είτε σε κυκλοφορούντα B-κύτταρα οριακής ζώνης είτε σε λεμφοζιδιακά B-κύτταρα. Κατά την περίοδο αυτή ο υποδοχέας BAFF-R παράγει σήματα που εξασφαλίζουν την επιβίωση των B-κυττάρων. (70) (71) (73)

Ο συνδέτης BAFF κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFSF13B* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13 και αποτελείται από 7 εξόνια. (74) (75) (76) Η πρωτεΐνη BAFF αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II η οποία εμφανίζεται αρχικά συνδεδεμένη σε κυτταρική επιφάνεια. Ύστερα από την πρωτεολυτική της διάσπαση μετατρέπεται σε διαλυτή μορφή γεγονός που επιτρέπει την σύνδεσή της στους

υποδοχείς υψηλής συγγένειας. Η κυτταροκίνη BAFF εκφράζεται στα κύτταρα της λευκής σειράς και κυρίως στα μακροφάγα, στα μονοκύτταρα. (77)

Η σύνδεση BAFF-BAFFR επιτρέπει την αλληλεπίδραση του BAFF-R με το TRAF3 μόριο, σηματοδοτώντας την έναρξη ανοσολογικών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, επιτρέπει την φωσφορυλίωση της NIK κινάσης, την μετέπειτα ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού NF-κΒ, καθώς και την ενεργοποίηση του PI3K μονοπατιού. Τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζουν βασικές λειτουργίες που εξασφαλίζουν την επιβίωση, προγονικών, μεταβατικών αλλά και ώριμων B-κυττάρων. Η αλληλεπίδραση BAFF-BAFFR είναι λοιπόν καθοριστική για την επιβίωση των B-κυττάρων γεγονός που αποδεικνύεται και από μελέτες *in vivo* σε ποντίκια, όπου η έλλειψη των γονιδίων *BAFF* και *BAFFR* οδηγούσε σε πρόωρη απόπτωση των B-κυττάρων και στην εμφάνιση μειωμένων επιπέδων ώριμων B-κυττάρων καθώς και των ειδικών αντισωμάτων. Η υπερ έκφραση του BAFF ωστόσο, οδηγεί στην αύξηση των ώριμων B-κυττάρων γεγονός που έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση αυτοανοσίας,, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος καθώς και το σύνδρομο Sjogren. (70) (71)

4.4.1 Οι πολυμορφισμοί rs77874543 και rs61756766 του γονιδίου *TNFRSF13C*.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *TNFRSF13C* έδειξε την ύπαρξη μεταλλάξεων αλλά και πολυμορφισμών. Μελέτες του γονιδίου του *BAFFR* σε ασθενείς με COVID απέδειξε την ύπαρξη πολυμορφισμών και μεταλλάξεων με τις σημαντικότερες να είναι οι πολυμορφισμοί rs77874543 (p.P21R) και rs61756766 (p.H159Y). Συγκεκριμένα η παραλλαγή rs77874543 αποτελεί μια σημειακή μετάλλαξη στην θέση 62 του εξονίου 1 του γονιδίου *BAFFR* που οδηγεί στην αντικατάσταση της γουανίνης σε κυτοσίνη και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του κωδικονίου 21 και την έκφραση του αμινοξέος αργινίνης αντί για προλίνης (WT). Η αλλαγή αυτή, επηρεάζει την CRD1 περιοχή του BAFFR και τον από τον σχηματισμό ομοτριμερών, που είναι απαραίτητοι για την σύνδεση του με τον BAFF, έχοντας ως αποτέλεσμα την αδυναμία σηματοδότησης που προκύπτει από την σύνδεση του. Ασθενείς ομόζυγοι αλλά και ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό εμφανίζουν αδυναμία σύνδεσης BAFF-BAFFR σε σύγκριση με υγιή άτομα, ενώ η ύπαρξη του πολυμορφισμού δεν επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα BAFFR. Ο πολυμορφισμός rs61756766 αποτελεί μια σημειακή μετάλλαξη στην θέση 475 του τρίτου εξονίου του γονιδίου *TNFRSF13C* και οδηγεί στην αντικατάσταση της θυμίνης σε κυτοσίνη οδηγώντας στην αλλαγή του κωδικονίου

159 και την έκφραση του αμινοξέος τυροσίνης αντί για ιστιδίνης (WT). (75) (76) Η παραλλαγή rs61756766 επηρεάζει μια κυτταροπλασματική περιοχή του BAFFR που συνορεύει με την ενδοκυττάρια περιοχή του PVPAT υποδοχέα που είναι υπεύθυνος για την στρατολόγηση του μορίου TRAF3. Επομένως, η παραλλαγή αυτή οδηγεί σε ενισχυμένη δράση του υποδοχέα PVTAP και ενισχυμένη ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κΒ. (76) Ο πολυμορφισμός rs61756766 έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση non-Hodgkin λεμφωμάτων καθώς και με πολλαπλή σκλήρυνση. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι οι πολυμορφισμοί rs77874543, και rs61756766 βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης. Ασθενείς που εμφανίζουν τον πολυμορφισμό rs77874543 και χαρακτηρίζονται από αδυναμία σύνδεσης BAFF-BAFFR, άρα και από μειωμένη σηματοδότηση του NF-κΒ, μέσω του πολυμορφισμού rs61756766 και της ενισχυμένης ενεργοποίησης του NF-κΒ, αντισταθμίζοντας την δράση του πολυμορφισμού rs77874543 (76) (78)

4.5 Η MBL πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη MBL ανήκει στην οικογένεια των κολλεκτινών οι οποίες αποτελούν εκκριτικές γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν δομές όμοιες του κολλαγόνου ενωμένη με μια CRD περιοχή. Η MBL πρωτεΐνη είναι συμμετέχει όχι μόνο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος αλλά και σε άλλα ανοσιακά μονοπάτια. Δομικά η MBL πρωτεΐνη παρουσιάζει την N- αμινοτελική περιοχή που είναι πλούσια σε κυστεΐνες σε κολλαγόνο και συμβάλλει στην διατήρηση της σταθερότητας του μορίου. Στην συνεχεια εμφανίζεται η δομή σαν κολλαγόνο όπου χαρακτηρίζεται από επαναλήψεις της Gly-X-Y (X: οποιοδήποτε αμινοξύ, Y: υδροξυπρολίνη) και παίζει σημαντικό ρόλο στον πολυμερισμό της πρωτεΐνης. Στο τέλος εμφανίζεται το καρβοξυλικό άκρο. (79) (80)

Το ανθρώπινο γονιδίωμα διαθέτει δύο γονίδια που εκφράζουν την πρωτεΐνη MBL, το γονίδιο *MBL1* και το γονίδιο *MBL2*, ωστόσο το *MBL1* οδηγεί στην έκφραση ενός ψευδογονιδίου, καθιστώντας το *MBL2* το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της MBL πρωτεΐνης. (80) Το γονίδιο *MBL2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 στην θέση 10q11.2-q21 και αποτελείται από 4 εξόνια. (81) Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την N-αμινοτελική περιοχή της MBL και ενός μέρους της περιοχής που ομοιάζει με κολλαγόνο. Το δεύτερο εξόνιο κωδικοποιεί την υπόλοιπη περιοχή που ομοιάζει με το κολλαγόνο, το τρίτο εξόνιο κωδικοποιεί την περιοχή του λαιμού (coiled-coil-neck region) και τέλος το τέταρτο εξόνιο κωδικοποιεί στην CRD περιοχή. (79) (80) (82) (83)

Η ενεργή μορφή της MBL συντίθεται ύστερα από την ένωση με δισουλφιδικούς δεσμούς τριών αλυσίδων MBL και μετέπειτα ολιγομερισμό τους σε δομές 2-6 ολιγομερών. Η δομή αυτή επιτρέπει την σύνδεση της με σάκχαρα στην επιφάνεια παθογόνων μικροοργανισμών (μαννόζη, φουκτόζη κ.α) διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανοσία του οργανισμού. (80)

4.5.1 Ο ρόλος της MBL πρωτεΐνης.

Η MBL πρωτεΐνη ενεργοποιεί μία από τις τρεις οδούς ενεργοποίησης του συμπληρώματος, αυτή της οδού της λεκτίνης καθώς αποτελεί μια από τις πέντε (MBL, CL-11, φικόλη 1, φικόλη 2, φικόλη 3) σημαντικές PRRs (pattern recognition proteins) οι οποίες διαθέτουν θέσεις αναγνώρισης σακχάρων στα κυτταρικά τοιχώματα παθογόνων.^{94-96,99-100} Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ξεκινά με την σύνδεση της MBL στα βακτήρια-στόχος με την βοήθεια της IgA ανοσοσφαιρίνης. (84) Μετά την σύνδεση της MBL με το παθογόνο, καλούνται οι πρωτεάσες MASPs (MBL-associated serine proteases), των οποίων η λειτουργία είναι η διάσπαση της C4 και C2 πρωτεΐνης του ορού για την δημιουργία της C4b2a, κονβερτάσης. Η C4b2a κονβερτάση διασπά το C3 σε C3a και C3b οδηγώντας στο σύμπλοκο C4bC2aC3b που αποτελεί την C5 κονβερτάση. Η C5 κονβερτάση οδηγεί στον εδραίωση του συμπλόκου MAC (membrane attack complex) στην κυτταρική μεμβράνη των παθογόνων και σε περαιτέρω λύση τους. (79) (80) (84) (83)

Η MBL πρωτεΐνη, εκτός από την συμμετοχή της στην ενεργοποίηση της οδού της λεκτίνης, φαίνεται να εμπλέκεται και στην οψωνινοποίηση ξένων κυττάρων καθώς και στην διαδικασία της φλεγμονής και της απόπτωσης κυττάρων. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η δράση της στην επαγωγή των παραπάνω διαδικασιών. (83)

4.5.2 Πολυμορφισμοί του *MBL2* γονιδίου

Αλληλούχηση του γονιδίου *MBL2* σε ασθενείς με MBL ανεπάρκεια ανέδειξε την ύπαρξη τριών σημαντικών σημειακών μεταλλάξεων στα κωδικόνια 54, 57 και 52 του πρώτου εξονίου του γονιδίου. Αρχικά, η σημειακή μετάλλαξη του κωδικονίου 54, οδηγεί στην αντικατάσταση μιας γουανίνης σε αδενίνη και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του κωδικονίου και την έκφραση του αμινοξέος ασπαρτικού έναντι της γλυκίνης (WT). Αντίστοιχα, στο κωδικόνιο 57, μια αντικατάσταση γουανίνης σε αδενίνη οδηγεί στην έκφραση του αμινοξέος γλυκίνης έναντι του γλουταμινικού οξέος

(WT). Τέλος στο κωδικόνιο 52 πραγματοποιείται αντικατάσταση μιας κυτοσίνης σε θυμίνη και μετέπειτα έκφραση του αμινοξέος αργινίνης έναντι της κυστεΐνης (WT). Η αλλαγή σε γλυκίνη των ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέων των κωδικονίων 54 και 57 επηρεάζει την δομή όμοια με του κολλαγόνου της πρωτεΐνης και εμποδίζει την σύνθεση του ενεργού μόριού της. Αντίστοιχα η αλλαγή στο κωδικόνιο 57 επηρεάζει την περιοχή που είναι πλούσια σε κυστεΐνες, εμποδίζοντας πάλι την σύνθεση ολιγομερών από την MBL πρωτεΐνη. Οι μεταλλάξεις των κωδικονίων 54, 57, 52 αναφέρονται ως αλλήλια B (rs1800450), C (rs1800451), D (rs5030737) αντίστοιχα ενώ το αλλήλιο A αντιστοιχεί στο φυσιολογικό αλλήλιο (WT). (85) (84) (83)

Η αλληλούχηση του γονιδίου ανέδειξε την ύπαρξη πολυμορφισμών και στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Οι πολυμορφισμοί που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση της MBL πρωτεΐνης στους φορείς τους, είναι οι rs11003125 στην θέση -550 του γονιδίου και rs7096206 στην περιοχή -221, με τον δεύτερο να έχει συσχετιστεί άμεσα με χαμηλά επίπεδα MBL στον ορό. Οι παραλλαγές αυτές είναι γνωστές και ως πολυμορφισμοί H/L και X/Y αντίστοιχα. (80) Από τον ανασυνδυασμό των πολυμορφισμών του πρώτου εξονίου και του πολυμορφισμού rs7096206 της περιοχής του υποκινητή προκύπτουν έξι γονότυποι που έχουν συσχετιστεί με υψηλή συγκέντρωση MBL στον ορό (YA/YA, YA/XA), μεσαία συγκέντρωση (XA/XA, YA/O) και πολύ χαμηλή συγκέντρωση (XA/O, O/O) ή αλλιώς MBL ανεπάρκεια. (83) (85) (86) (87)

4.6 Το γονίδιο *CTLA4*

Το **CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)** αποτελεί, γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων T-Λεμφοκυττάρων και ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών. (88) Μαζί με το ομόλογό του, CD28, που εκφράζεται στην επιφάνεια των CD4⁺ και CD8⁺ T Λεμφοκυττάρων, διαδραματίζουν ανασταλτική ή επαγωγική δράση στην λειτουργία των T-κυττάρων. Το CTLA4 κωδικοποιείται από το γονίδιο *CTLA4*, το οποίο βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα στην θέση 2q33.2 και αποτελείται από 4 εξόνια. (89) (90) (91) (92) Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του CTLA4, το εξόνιο 2 κωδικοποιεί την εξωκυττάρια περιοχή του CTLA4 που είναι υπεύθυνη για την σύνδεσή του με τους συνδέτες του, ενώ τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν την διαμεμβρανική και ενδοκυττάρια περιοχή του γονιδίου

αντίστοιχα. Το μόριο CTLA4 εμφανίζεται σε 2 ισομορφές, την διαλυτή που εμφανίζεται στον ορό και αποτελεί μονομερές και την συνδεδεμένη σε κυτταρική επιφάνεια η οποία δέχεται διμερισμό, με τα επιτόπους διμερή να ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. (90)

Όταν τα T-Λεμφοκύτταρα είναι ανενεργά, το CTLA4 μπορεί να αποθηκεύεται ενδοκυτταρικά με την μορφή κυστιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται μετά από την αλληλεπίδραση του με την υπομονάδα $\mu 2$ της πρωτεΐνης-συνδέτη της κλαθρίνης AP2. Με την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων το CTLA4 έχει την δυνατότητα εντός 24-36 ωρών να μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια όπου είναι δυνατή η αλληλεπίδραση με τους συνδέτες του. Ταυτόχρονα, όμως μόρια CTLA4 ενδοκυτταρόνονται συνεχώς και ανακυκλώνονται στην πλασματική μεμβράνη ή καταστρέφονται στα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα μόνο το 10% των μορίων CTLA4 να εντοπίζεται στην επιφάνεια των T-κυττάρων. (93)

Για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων απαιτείται τόσο η σύνδεση του του TCR υποδοχέα σε MHC κύτταρα όσο και η σηματοδότηση από την σύνδεση των μορίων B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86) που βρίσκονται στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με το μόριο CD28. Η αλληλεπίδραση του CD28 με πρωτεΐνες σηματοδότησης, οδηγούν στην ενεργοποίηση μονοπατιών όπως αυτών της PI3 κινάσης, του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, καθώς και της πρωτεΐνης AP-1. Οι μηχανισμοί αυτοί οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, καθώς και στην διαφοροποίηση τους μέσω της παραγωγής ιντερλευκινών. Με την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων ξεκινά και η έκφραση του *CTLA4* στην επιφάνεια των T κυττάρων. Οι συνδέτες του CTLA4 είναι ίδιοι με του μορίου CD28, με την διαφορά ότι τα μόρια CD80 και CD86 εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τον συνδέτη CTLA4. Συγκεκριμένα η ικανότητα σύνδεσης του CD80 στο CTLA4 είναι από τις πιο ισχυρές που έχουν περιγραφεί. Κατά αυτό τον τρόπο αν και τα επίπεδα CTLA4 που ανευρίσκονται στην επιφάνεια των T Λεμφοκυττάρων είναι μικρά, η υψηλή συγγένεια που διαθέτει με τους συνδέτες του οδηγεί σε πλήρη «στρατολόγηση» του CD80 από το CTLA4, γεγονός που τον καθιστά από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές της λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων. (90) (91) (92) (88) (93)

Ο ρόλος του CTLA4 είναι να αντισταθμίζει την δράση του CD28. Η σηματοδότηση του CD28 είναι υπεύθυνη για την επιβίωση, την διαφοροποίηση καθώς και την

ισοτοπικής μεταστροφής των T λεμφοκυττάρων. Σε αντίθεση, το CTLA4 εμποδίζει την έκφραση σημαντικών μορίων για την κυτταρική διαίρεση (D3,Cdk4, Cdk6) και αναστέλλει την δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT, γεγονός που τον καθιστά ένα από τους σημαντικότερους αναστολής της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων.
(94) (95)

5. ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*, καθώς και λειτουργικούς πολυμορφισμούς των γονιδίων *CTLA4*, *MBL2* και *BAFFR*. Σκοπός της μελέτης είναι η συσχέτιση των παραπάνω παραλλαγών με την κλινική εκδήλωση ασθενών με IgAD καθώς και με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη μελέτη διεθνώς που εξετάζει αυτή την συσχέτιση.

2

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ασθενείς και Μάρτυρες

Η παρούσα μελέτη στοχεύει να διερευνήσει τον ρόλο των ανοσογονιδίων *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C*, *MBL2* και *CTLA4* σε ασθενείς με IgAD. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, στην παρούσα διπλωματική συμμετείχαν 101 ασθενείς με IgAD εκ των οποίων οι 50 είναι άνδρες και οι 51 γυναίκες (αναλογία 1/1). Οι περισσότεροι ασθενείς παρακολουθούνται από το εργαστήριο Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ συμμετείχαν και ασθενείς που παρακολουθούνται από άλλα εργαστήρια νοσοκομείων της επικράτειας. Από όλους τους ασθενείς, λήφθηκε ατομικό ιστορικό το οποίο περιλάμβανε την ηλικία, το φύλο, το οικογενειακό ιστορικό αυτοανοσίας, ατομικό ιστορικό αυτοανοσίας, θυρεοειδοπάθειας, και καρκίνου. Ακόμη, λήφθηκαν οι τιμές των ανοσοσφαιρινών καθώς και των υποτάξεων της IgG ανοσοσφαιρίνης. Από τους 101 ασθενείς οι 45 ήταν ασυμπτωματικοί και δεν διέθεταν ιστορικό λοιμώξεων, ενώ οι 56 εμφάνιζαν λοιμώξεις (ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, γαστρεντερικού, ουροποιητικού κ.α). Το σύνολο των ασθενών, η αναλογία σε άνδρες και γυναίκες, καθώς τα ποσοστά εκδήλωσης λοιμώξεων και αυτοανοσίας περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με IgAD.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ IgAD. ΣΥΝΟΛΟ:101 ασθενείς	
ΦΥΛΟ Άνδρες/Γυναίκες	50/51
Ηλικία Διάγνωσης (Μέση τιμή, Εύρος)	28, 2-78
Οικογενειακό Ιστορικό Αυτοανοσίας (αρ,%)	24 (23.8)
Λοιμώξεις Γενικά (αρ,%)	56 (55.4%)
Λοιμώξεις Ανώτερου Αναπνευστικού(αρ,%)	40 (39.6%)
Λοιμώξεις Κατώτερου Αναπνευστικού (αρ,%)	15 (14.9%)
Λοιμώξεις Γαστρεντερικού (αρ,%)	7 (6.9%)
Λοιμώξεις Ουροποιητικού (αρ,%)	9 (8.9%)
Λοιμώξεις (Άλλο) (αρ,%)	14 (13.9%)
Αυτοανοσία (αρ,%)	21 (20.8%)
Θυρεοειδοπάθεια(αρ,%)	10 (9.9%)
Κοιλιακή (αρ,%)	2 (2.0%)
Ατοπία (αρ,%)	8 (7.9%)
Καρκίνος (αρ,%)	1 (1.0%)

2. Μεθοδολογία Έρευνας

2.1 Απομόνωση DNA.

Σε όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος σε φιαλίδιο γενικής αίματος με αντιπηκτικό EDTA (4-6mL) και διατήρηση δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την περαιτέρω απομόνωση γενετικού υλικού. Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε το εργοστασιακό kit απομόνωσης DNA, GRS Genomic DNA Kit της εταιρείας Grisp το οποίο στηρίζεται στην δέσμευση του DNA σε μεμβράνη πυριτίου και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το DNA που απομονώθηκε αποθηκεύτηκε απευθείας στους -20 °C.

2.2 Μοριακή μελέτη γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων καθώς και πολυμορφισμών του γονιδίου *TNFRSF13B* εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η επιλογή των εκκινητών στηρίχθηκε στα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας και παρατίθενται παρακάτω. (96) Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 50-200ng γενωμικού DNA, ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.01% ζελατίνη), 2.5mM από κάθε dNTP, 100mM MgCl₂, και 50pmol/μL από κάθε εκκινητή (πρόσθιο και οπίσθιο) (Invitrogen), 0.8u/μL του ενζύμου DFS Taq πολυμεράση, 100-200ng DNA καθώς και απεσταγμένο-αποστειρωμένο H₂O. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανήλθε στα 30μL με τις ακριβείς ποσότητες του κάθε αντιδραστηρίου να αναφέρονται στον πίνακα 2. Για το έλεγχο επιμολύνσεων και καθαρότητας των αντιδραστηρίων σε κάθε PCR συμπεριλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας που περιείχε αντί για γενετικό υλικό, ddH₂O. Οι θερμοκυκλοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση των PCR όλων των γονιδίων της παρούσας διπλωματικής είναι οι Veriti 96 Well (Thermacycler) και ProFlex PCR Pro 3 x 32-well System (Applied Biosystems). Το παραγόμενο PCR προϊόν, ηλεκτροφορήθηκε σε γέλη αгарόζης 2% για 30min και φωτογραφήθηκε υπό έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR όλων των εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B*.

Reagents	Volume (μl)
dH ₂ O	232.5μL
10xPCR Buffer	50μL
MgCl ₂	7.5μL
dNTPS	40μL
F'primer (50pmol)	10μL
R'primer (50pmol)	10μL

Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR όλων των εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B*.

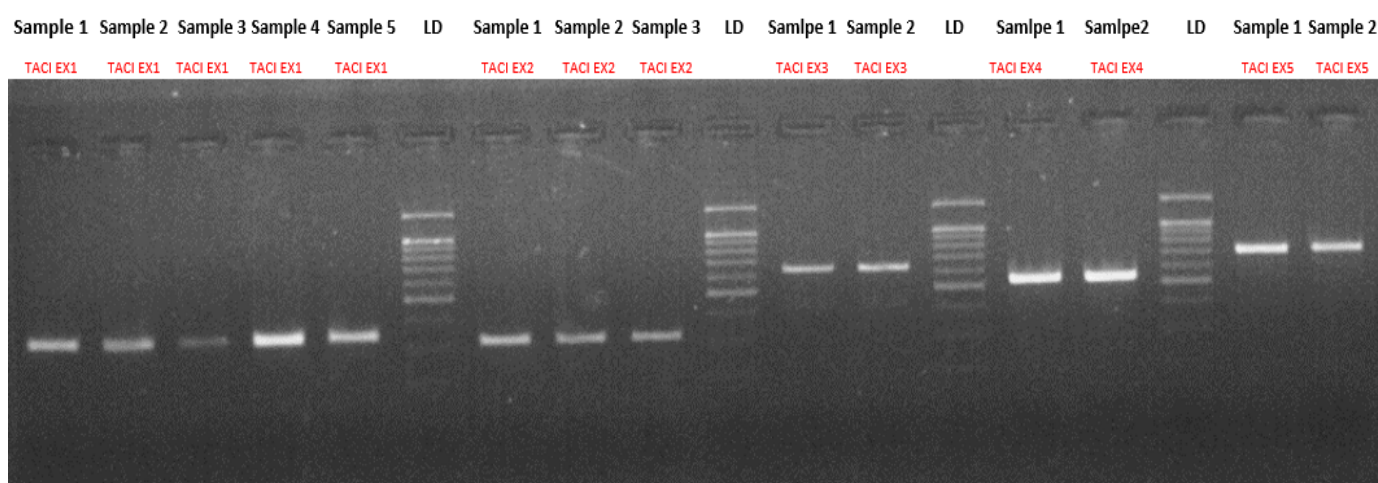
<u>ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ (5'-3')</u>	<u>ΜΗΚΟΣ (bp)</u>	<u>ΜΗΚΟΣ PCR PRODUCT (bp)</u>
Εξόνιο 1	5'-GGGTGTGGCTGATTACATCC-3'	21	340
	5'-CCAGAGGCATCCAGACTCG-3'	19	
Εξόνιο 2	5'-AAAGGTTGTCTGTGCGAATGT-3'	21	319
	5'-CCAGAGGGTGCTCTAGGGAG-3'	20	
Εξόνιο 3	5'ATCAAAATGCAATGCAGCTAAA-3'	22	635
	5'-AGACTTCTGGAAATGTTGCCTA-3'	22	
Εξόνιο 4	5'-GGGGGAGTGGATCAAC-3'	16	540
	5'- GTCTGCCAGGATGTCTTAACC-3'	21	
Εξόνιο 5	5'- TGGCAGACAGATAACT-3'	16	717
	5'- CTCTCTCCTCATATCTCTC-3'	19	

Πίνακας 4: Συνθήκες PCR για τα εξόνια του *TNFRSF13B*.

<u>ΣΤΑΔΙΟ</u>		<u>ΕΞΟΝΙΑ <i>TNFRSF13B</i> ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ</u>				
		1	2	3	4	5
Αρχική αποδιάταξη- First denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94	94	94	94	94
	Διάρκεια	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min
Αποδιάταξη- Denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94	94	94	94	94
	Διάρκεια	30sec	30sec	30sec	30sec	30sec
Υβριδισμός- Annealing	Θερμοκρασία (°C)	62	64	62	62	55
	Διάρκεια	30sec	30sec	30sec	30sec	30sec
Επέκταση- Extension	Θερμοκρασία (°C)	72	72	72	72	72
	Διάρκεια	30sec	30sec	30sec	30sec	30sec
Τελική επέκταση- Final extension	Θερμοκρασία (°C)	72	72	72	72	72
	Διάρκεια	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
Κύκλοι- Cycles		x 31	x 31	x 31	x 36	x 32

2.2.1 Ηλεκτροφόρηση παραγόμενου PCR προϊόντος.

Για τον έλεγχο του μεγέθους του παραγόμενου PCR προϊόντος πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης [2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE] σε τελικό όγκο 100mL εμπλουτισμένη με 5μL βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί μια ουσία που έχει την δυνατότητα να παρεμβάλλεται στο γενετικό υλικό και να φθορίζει όταν αυτό εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για την μεταφορά του PCR προϊόντος στην πηκτή αгарόζης διαλύουμε ίση ποσότητα PCR προϊόντος και ίση ποσότητας διαλύματος χρωστικής (loading dye) με στόχο να μεταφερθεί επιτυχώς το PCR προϊόν στις οπές της πηκτής. Για τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους του παραγόμενου PCR προϊόντος χρησιμοποιήθηκε μοριακός μάρτυρας μήκους 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V, 400mA για 30 min. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία με την χρήση του μηχανήματος UVITEC, SerialNo. M031308 και σε συνδυασμό με του λογισμικού gel capture (DNR Bioimaging Systems) είναι δυνατή η επεξεργασία και η αποθήκευση της εικόνας της ηλεκτροφόρησης. Ενδεικτικά στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η εικόνα ηλεκτροφόρησης όλων των εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B*.



Εικόνα 2. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης καθαρισμένων PCR προϊόντων όλων των εξονίων του *TNFRSF13B* γονιδίου.

2.2.2 Καθαρισμός PCR προϊόντος των εξονίων του *TNFRSF13B*.

Η αλληλουχία των εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B* πραγματοποιείται με την αλληλούχιση κατά Sanger των παραγόμενων PCR προϊόντων. Ωστόσο βασική προϋπόθεση για την αλληλούχιση αποτελεί ο καθαρισμός των προϊόντων PCR με κατάλληλα εργοστασιακά kit. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση νουκλεοτιδίων, αλάτων και παραπροϊόντων, στοιχείων που δρουν ανασταλτικά στην αλληλούχιση κατά Sanger και μπορούν να δώσουν μη αληθή αποτελέσματα. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το Kit GRS PCR & Gel Band Purification Kit της εταιρείας GRISP το οποίο βασίζεται στην δέσμευση του δίκλωνου DNA με την χρήση στηλών πυριτίου. Για την εργαστηριακή υλοποίηση αυτής της διαδικασίας ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του εργοστασιακού πρωτοκόλλου που περιέχονται στο Kit. Το καθαρισμένο PCR προϊόν που προκύπτει αποθηκεύεται στους -20oC μέχρι να αναλυθεί η αλληλουχία κατά Sanger. Για την αξιολόγηση του παραγόμενου καθαρού PCR προϊόντος και την επιβεβαίωση δέσμευσης του DNA επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, όπως περιγράφηκε και στην ενότητα 2.

2.2.3 Αλληλούχιση κατά Sanger του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*.

Η αλληλούχιση των βάσεων (sequencing) των εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B* πραγματοποιήθηκε με την χρήση του γενετικού αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Για τα εξόνια 2,3,5 του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι οπίσθιοι εκκινητές, ενώ για τα εξόνια 1,4 οι πρόσθιοι. Για την ανίχνευση μεταλλάξεων και την μελέτη πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Snapgene.

2.3 Μοριακή μελέτη γονιδίου *CTLA4*

Το γονίδιο του *CTLA4* αποτελείται από τέσσερα εξόνια, όμως στην παρούσα διπλωματική ενισχύθηκε μόνο το εξόνιο 1 με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, όπως περιγράφηκε και στην ενότητα 2. Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν βασίστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία και αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 6 . (97)

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR του εξονίου 1 του γονιδίου *CTLA4*.

Reagents	Volume (μl)
dH ₂ O	232.5μL
10xPCR Buffer	50μL
MgCl ₂	7.5μL
dNTPS	40μL
F'primer (50pmol)	10μL
R'primer (50pmol)	10μL

Πίνακας 6: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR του πρώτου εξονίου του *CTLA4*.

<u>ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ (5'-3')</u>	<u>ΜΗΚΟΣ (bp)</u>	<u>ΜΗΚΟΣ PCR PRODUCT (bp)</u>
Εξόνιο 1	5' -TGCCTTTCATATAGCCATTG-3'	21	359
	5'-AATCACTGCCTTTGACTGCT-3	20	

Πίνακας 7: Συνθήκες PCR για το εξόνιο 1 *CTLA4*.

<u>ΣΤΑΔΙΟ</u>		<u>ΣΥΝΘΗΚΕΣ</u> <u>ΕΞΟΝΙΟΥ 1 ΤΟΥ</u> <u><i>CTLA4</i></u>
		1
Αρχική αποδιάταξη- First denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94
	Διάρκεια	2 min
Αποδιάταξη- Denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94
	Διάρκεια	30sec
Υβριδισμός- Annealing	Θερμοκρασία (°C)	59
	Διάρκεια	30sec
Επέκταση- Extension	Θερμοκρασία (°C)	72
	Διάρκεια	1min
Τελική επέκταση- Final extension	Θερμοκρασία (°C)	72
	Διάρκεια	5 min
Κύκλοι- Cycles		x 32

Στην συνέχεια, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση του παραγόμενου PCR προϊόντος, ο καθαρισμός του και η ανάλυση του πρώτου εξονίου κατά Sanger με τρόπο ίδιο όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2. Για την διαδικασία της αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκε ο πρόσθιος εκκινητής.

2.4 Μοριακή μελέτη γονιδίου *TNFRSF13C/BAFFR*

Για την μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13C* εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας εκκινητές της διεθνούς βιβλιογραφίας. (73) Για την ανίχνευση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών rs77874543 και rs61756766 που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την αλληλεπίδραση BAFF-BAFFR έγινε ενίσχυση δυο εκ των 3 εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13C* (εξόνιο 1 και 3), με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, με τρόπο όμοιο με αυτόν που περιγράφηκε στην ενότητα 2. Στην συνέχεια ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πηκτή αгарόζης και η έκθεση του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 8 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR των εξονίων 1 και 3 του γονιδίου *TNFRSF13C*. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες ποσότητες και στις 2 περιπτώσεις, προσθέτοντας τους αντίστοιχους εκκινητές

Reagents	Volume (μl)
dH ₂ O	192.5
10xPCR Buffer	50μL
MgCl ₂	7.5μL
dNTPS	40μL
F'primer (50pmol)	10μL
R'primer (50pmol)	10μL
DMSO	50μL

Πίνακας 9 : Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR όλων των εξόνων του γονιδίου *TNFRSF13B*.

<u>ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ (5'-3')</u>	<u>ΜΗΚΟΣ (bp)</u>	<u>ΜΗΚΟΣ PCR PRODUCT (bp)</u>
Εξόνιο 1	5'-AGCCTCAGTCCCCGCAGCT-3'	19	223
	5'-GTTCTCCCCGCAGCTGCCG-3'	19	
Εξόνιο 3	5'-CCTCCAGAGGAGTCTTCTAG-3'	20	323
	5'-TCCAAGCCCCTGGCTGGG-3'	18	

Πίνακας 10: Συνθήκες PCR για τα εξόνια του *TNFRSF13C*.

<u>ΣΤΑΔΙΟ</u>		<u>ΕΞΟΝΙΑ <i>TNFRSF13C</i> ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ</u>	
		1	3
Αρχική αποδιάταξη- First denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94	94
	Διάρκεια	2 min	2 min
Αποδιάταξη- Denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94	94
	Διάρκεια	30sec	15sec
Υβριδισμός- Annealing	Θερμοκρασία (°C)	60	51
	Διάρκεια	30sec	15sec
Επέκταση-Extension	Θερμοκρασία (°C)	72	72
	Διάρκεια	30sec	40sec
Τελική επέκταση- Final extension	Θερμοκρασία (°C)	72	72
	Διάρκεια	5 min	5 min
Κύκλοι- Cycles		x 35	x 40

2.4.1 Δράση Περιοριστικών ενδονουκλεασών για την ανίχνευση των πολυμορφισμών rs77874543, rs61756766.

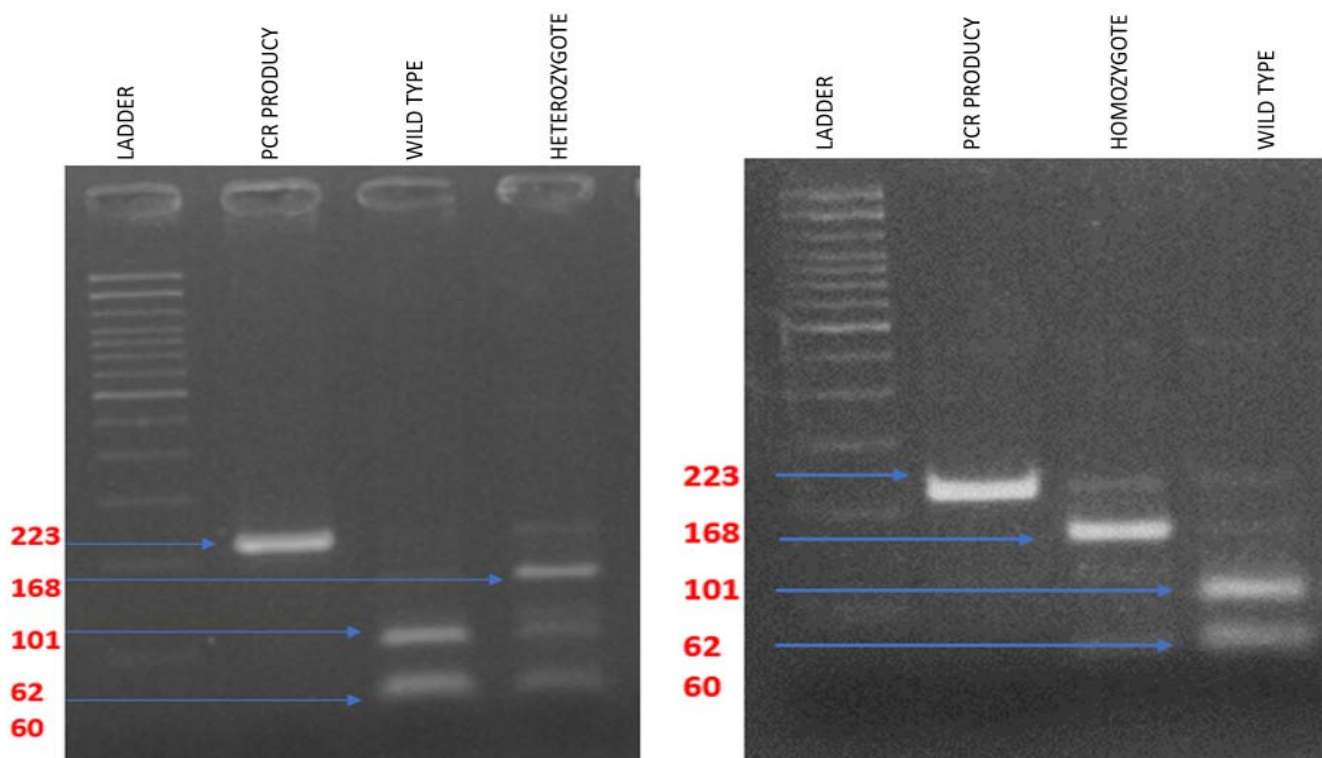
Η ανίχνευση των πολυμορφισμών rs77874543 και rs61756766 του γονιδίου TNFRSF13C πραγματοποιήθηκε με την δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs77874543 του 1^{ου} εξονίου χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο EagI, το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο E.coli, το οποίο φέρει το γονίδιο EagI από τον μικροοργανισμό *Enterobacter agglomerans*. (98) Για την πέψη του PCR προϊόντος, χρησιμοποιήθηκαν 9μL μείγματος ενζύμου βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή όπως περιγράφεται και στον πίνακα 11 σε συνδυασμό με 6μl PCR προϊόντος. Στην συνέχεια ακολούθησε ολονύκτια επώαση του μείγματος στους 37°C μέσα σε υδατόλουτρο. Στην αλληλουχία αγρίου τύπου (Wild Type, WT) του εξονίου 1, το ένζυμο EagI αναγνωρίζει 2 θέσεις κοπής όπως εμφανίζεται και στην εικόνα 4, οπότε ύστερα από την δράση του προκύπτουν 3 τμήματα (101,62,60 bp). Σε περίπτωση εμφάνισης του πολυμορφισμού rs77874543 στην αλληλουχία, καταργείται η μια θέση κοπής του ενζύμου. Οπότε σε περίπτωση ομοζυγωτίας για τον πολυμορφισμό rs77874543 προκύπτουν 2 τμήματα(168, 60 bp), ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν 4 τμήματα (168, 101, 62, 60 bp). Τα προϊόντα που προέκυψαν ύστερα από την δράση του περιοριστικού ενζύμου EagI ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 3% για 45 λεπτά με τις συνθήκες που περιγράφονται στην ενότητα 2. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που δεν περιείχαν τον πολυμορφισμό.



Εικόνα 3: Η περιοχή αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου EagI καθώς και τα σημεία στα οποία κόβει.

REAGENTS	VOLUME (μL)
dH ₂ O	150
10xNEbuffer	30
EagI	5

Πίνακας 11: Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του μείγματος ενζύμου EagI.



Εικόνα 4: Απεικόνιση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων του προκύπτουν ύστερα από επώαση του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο EagI.

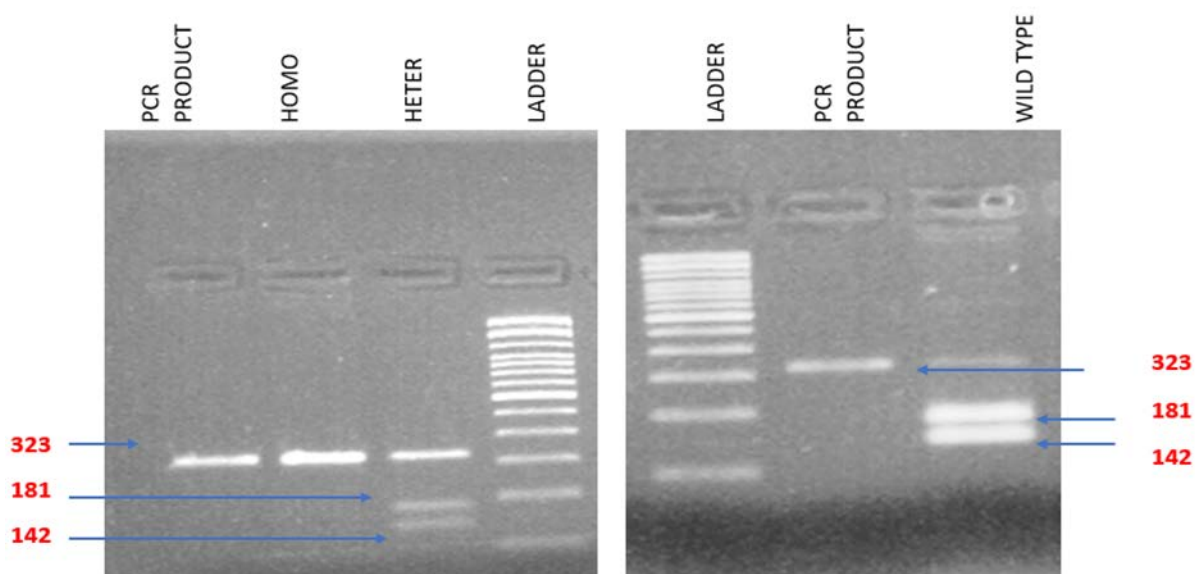
Η ανίχνευση του πολυμορφισμού rs61756766 πραγματοποιήθηκε με την χρήση του περιοριστικού ενζύμου MscI. Το MscI απομονώνεται από το βακτήριο E.coli το οποίο φέρει το γονίδιο MscI του μικροοργανισμού *Micrococcus species*. (99) Για την πέψη του PCR προϊόντος, χρησιμοποιήθηκαν 9μL μείγματος ενζύμου κατασκευασμένα με βάση τα πρότυπα του κατασκευαστή όπως περιγράφεται και στον πίνακα 12 σε συνδυασμό με 6μl PCR προϊόντος. Στην συνέχεια ακολούθησε ολονύκτια επώαση του μείγματος στους 37°C μέσα σε υδατόλουτρο. Για τον πολυμορφισμό rs61756766 μελετήθηκαν μόνο όσοι ασθενείς έφεραν την παραλλαγή rs77874543 και αυτό καθώς η παραλλαγή rs61756766 βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με την παραλλαγή rs77874543. Το ένζυμο MscI αναγνωρίζει μια περιοχή κοπής στην αργίου τύπου αλληλουχία του εξονίου 3 με αποτέλεσμα να προκύπτουν 2 τμήματα (181, 142 bp) μετά την δράση του. Η παρουσία του πολυμορφισμού rs61756766 αναιρεί την θέση κοπής τους ενζύμου με αποτέλεσμα σε περίπτωση ομοζυγωτίας εμφανίζεται ένα τμήμα στο ύψος του PCR προϊόντος (343 bp). Αντίστοιχα σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν 3 τμήματα (343, 181, 142 bp). Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 3% για 45 λεπτά με τις συνθήκες που αναγράφονται στην ενότητα 2. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό rs61756766.



Εικόνα 5: Η περιοχή αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου MscI καθώς και τα σημεία στα οποία κόβει.

REAGENTS	VOLUME (μL)
dH ₂ O	135
10x NEbuffer 4	30
MscI	20

Πίνακας 12: Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του μείγματος ενζύμου MscI.



Εικόνα 6: Απεικόνιση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων του προκύπτουν ύστερα από επώαση του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο MscI.

2.5 Μοριακή μελέτη γονιδίου *MBL2*

Στο γονίδιο *MBL2* μελετήθηκε η εμφάνιση των γενετικών παραλλαγών rs5030737, rs1800450 και rs1800451 του πρώτου εξονίου και του rs7096206 της περιοχής του υποκινητή. Για την ανίχνευση των παραλλαγών χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές από την διεθνή βιβλιογραφία, ενώ για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στην ενότητα 2. (87)

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR της περιοχής του υποκινητή και του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2*. Για το εξόνιο 1 χρησιμοποιήθηκε expert πολυμεράση (Grisp) σε συγκέντρωση 0.8u/μL.

Reagents PROMOTER	Volume (μl)
dH ₂ O	235μL
10xPCR Buffer	50μL
MgCl ₂	15μL
dNTPS	40μL
F'primer (50pmol)	10μL
R'primer (50pmol)	10μL
Reagents EX1	Volume (μl)
dH ₂ O	235μL
10xPCR Buffer	50μL
F'primer (20pmol)	17μL
R'primer (20pmol)	17μL

Πίνακας 14: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR όλων των περιοχών του γονιδίου *MBL2*.

<u>ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ (5'-3')</u>	<u>ΜΗΚΟΣ (bp)</u>	<u>ΜΗΚΟΣ PCR PRODUCT (bp)</u>
Περιοχή υποκινητή <i>MBL2</i>	5'-GAAAATGCTTACCCAGACAAGCCTGT-3'	26	410
	5'-TCATCTGTGCCTAGACACCTGGC-3'	23	
Εξόνιο 1	5'-CATCAACGGCTTCCCAGGGCAAGATGGG-3'	28	134
	5'-GTCTCCTCATATCCCCAGGC-3'	20	

Πίνακας 15: Συνθήκες PCR για την περιοχή του υποκινητή και του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2*.

PROMOTER ΚΑΙ ΕΞΟΝΙΟ 1		
Αρχική αποδιάταξη- First denaturation	Θερμοκρασία (°C)	95
	Διάρκεια	2 min
Αποδιάταξη- Denaturation	Θερμοκρασία (°C)	94
	Διάρκεια	30sec
Υβριδισμός- Annealing	Θερμοκρασία (°C)	60
	Διάρκεια	20sec
Επέκταση- Extension	Θερμοκρασία (°C)	72
	Διάρκεια	30sec
Τελική επέκταση- Final extension	Θερμοκρασία (°C)	72
	Διάρκεια	10 min
Κύκλοι- Cycles		x 35

2.5.1 Δράση Περιοριστικών ενδονουκλεασών για την ανίχνευση των παραλλαγών rs5030737, rs1800450 και rs1800451 του εξονίου 1 και του -550G>C της περιοχής του υποκινητή.

Η ανίχνευση των παραλλαγών rs5030737, rs1800450 και rs1800451 του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2* πραγματοποιήθηκε με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Συγκεκριμένα, για τον πολυμορφισμό rs5030737 χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *MwoI* το οποίο έχει απομονωθεί από το βακτήριο *E.coli* και φέρει το γονίδιο *MwoI* από τον *Methanobacterium wolfeii*. (100) Για τον πολυμορφισμό rs1800450, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *BanI*, το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο *E.coli* και φέρει το γονίδιο *BanI* από το βακτήριο *Bacillus aneurinoliticus*. (101) Αντίστοιχα στον πολυμορφισμό rs1800451, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *MboII*, το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο *E.coli* και φέρει το γονίδιο *MboII* το οποίο προέρχεται από το βακτήριο *Moraxella Bovis*. (102) Τέλος, για τον πολυμορφισμό του rs7096206 της περιοχής του υποκινητή χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *BtgI*, το οποίο

απομονώθηκε από στέλεχος *E.coli* που έφερε το γονίδιο *BtgI* του *Bacillus Thermoglucosidasius*. (103)

Πίνακας 16: Οι γενετικές παραλλαγές της περιοχής του εξονίου 1 και της περιοχής του υποκινητή καθώς και οι αλληλουχίες αναγνώρισης.

<i>MBL2</i>	ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ	ΕΝΖΥΜΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
ΕΞΟΝΙΟ 1	rs5030737	<i>MwoI</i>	5'...GCNNNNNN [▼] NNGC...3' 3'...CGNNNNNNNN [▲] CG...5'
	rs1800450	<i>BanI</i>	5'...G [▼] GYRCC...3' 3'...CCRYGG [▲] ...5'
	rs1800451	<i>MboII</i>	5'...GAAGA(N) ₈ [▼] ...3' 3'...CTTCT(N) ₇ [▲] ...5'
ΠΕΡΙΟΧΗ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ	rs7096206	<i>BtgI</i>	5'...C [▼] CRYGG...3' 3'...GGYRCC [▲] ...5'

Για την διαδικασία της πέψης αναμίχθηκαν 6μL PCR προϊόντος με 9μL μείγματος ενζύμου και ακολούθησε ολονύκτια επώαση του μείγματος στους 37°C σε υδατόλουτρο. Το μείγμα ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του *Pcr* προϊόντος έγινε με βάση τα πρότυπα του κατασκευαστή και οι όγκοι των αντιδραστηρίων αναγράφονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17. Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία μείγματος των ενζύμων *MwoI*, *BanI*, *MboII*, *BtgI*.

<i>MwoI</i>		<i>BanI</i>		<i>MboII</i>		<i>BtgI</i>	
REAGENTS	VOLUME(μL)	REAGENTS	VOLUME(μL)	REAGENTS	VOLUME(μL)	REAGENTS	VOLUME(μL)
dH ₂ O	150μl	dH ₂ O	150μl	dH ₂ O	145 μl	dH ₂ O	115 μl
10x NEBuffer3	30μl	10x NEBuffer4	30μl	10x NEBuffer2	30μl	Tango Buffer	60μl
<i>MwoI</i> enzyme	5μl	<i>BanI</i> enzyme	5μl	<i>DrdI</i> enzyme	10 μl	<i>BtgI</i> enzyme	10 μl

Τα προϊόντα που προέκυψαν υστέρα από την διαδικασία της πέψης των ενζύμων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 3% για 45 λεπτά με τις συνθήκες που αναγράφονται στην ενότητα 2.

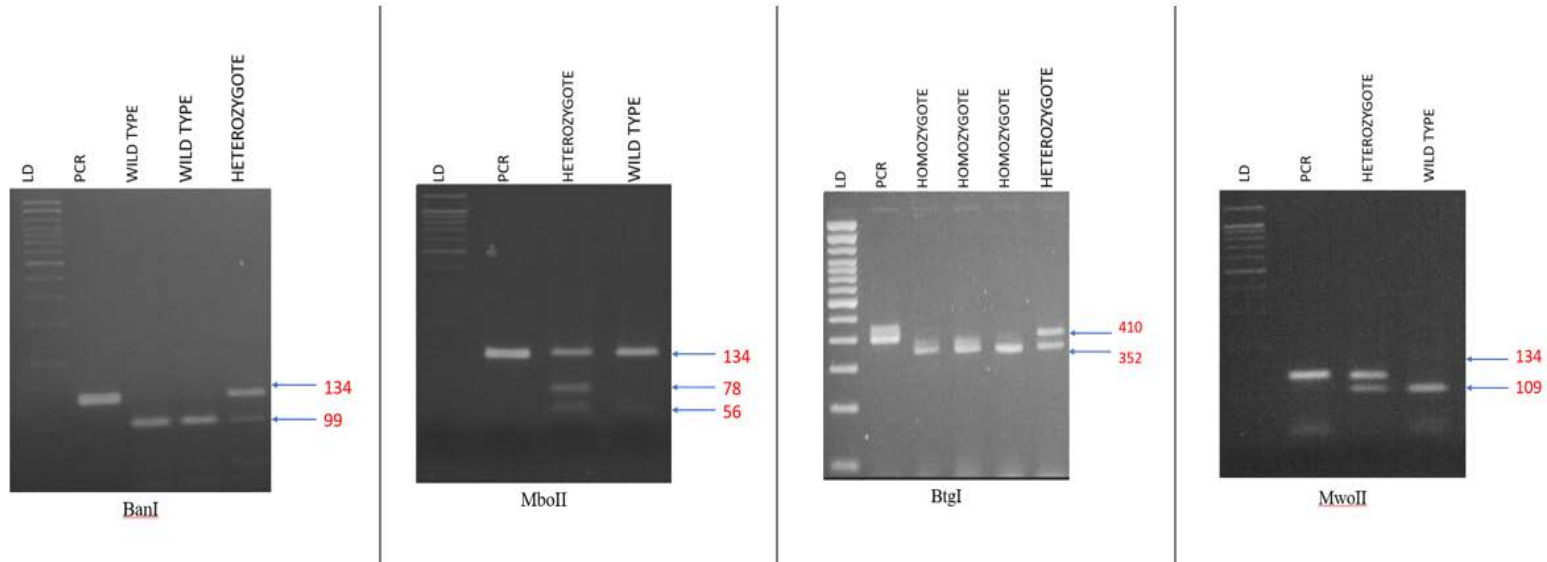
Στον πολυμορφισμό rs5030737, το ένζυμο MwoI αναγνωρίζει μια θέση κοπής στην αγρίου τύπου αλληλουχία του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2*, με αποτέλεσμα στην ηλεκτροφόρηση να εμφανίζονται δύο τμήματα (109,25bp). Η παρουσία του πολυμορφισμού αναιρεί την θέση κοπής του ενζύμου MwoI με αποτέλεσμα σε περίπτωση ετεροζυγωτίας να προκύπτουν τρία τμήματα (134bp, 109bp και 25bp) ενώ σε περίπτωση ομοζυγωτίας προκύπτει ένα τμήμα στο ύψος του Pcr προϊόντος (134 bp). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς που δεν διέθεταν την συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Στην παραλλαγή rs1800450, το ένζυμο BanI αναγνωρίζει μια θέση κοπής στην αγρίου τύπου αλληλουχία του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2*, με αποτέλεσμα στην ηλεκτροφόρηση να εμφανίζονται δύο τμήματα (99,35bp). Η παρουσία του πολυμορφισμού αναιρεί την θέση κοπής του ενζύμου MwoI με αποτέλεσμα σε περίπτωση ετεροζυγωτίας να προκύπτουν τρία τμήματα (134bp, 99bp και 35bp) ενώ σε περίπτωση ομοζυγωτίας προκύπτει ένα τμήμα στο ύψος του Pcr προϊόντος (134 bp). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς που δεν διέθεταν την συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Τέλος, στην παραλλαγή rs1800451 το ένζυμο MboII δεν αναγνωρίζει κάποια θέση κοπής στην αγρίου τύπου αλληλουχία του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2*, προκύπτοντας έτσι στην ηλεκτροφόρηση ένα τμήμα στο ύψος του Pcr προϊόντος (134bp). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρία τμήματα (134,78,56bp), ενώ σε περίπτωση ομοζυγωτίας προκύπτουν δύο τμήματα (78,56bp). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς ετερόζυγοι ως προς την παραλλαγή.

Για την παραλλαγή rs7096206 της περιοχής του υποκινητή, το ένζυμο BtgI δεν αναγνωρίζει κάποια θέση κοπής στην αγρίου τύπου αλληλουχία, με αποτέλεσμα με την ηλεκτροφόρηση να εμφανίζεται ένα τμήμα στο ύψος του Pcr προϊόντος (410bp). Η εμφάνιση της συγκεκριμένης παραλλαγής έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία 3 τμημάτων στην ηλεκτροφόρηση ετερόζυγων σθεμών (410, 352 και 58bp), ενώ σε περίπτωση ομοζυγωτίας προκύπτουν 2 τμήματα (352 και 58bp). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς ομόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό.

Εικόνα 7: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης του εξόνιου 1 και της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *MBL2* από τα ένζυμα MwoI, BanI, MboII και BtgI αντίστοιχα



3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Περιγραφική ανάλυση και στατιστική εξέταση δεδομένων

Για τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν πραγματοποιήθηκε περιγραφική ανάλυση κατά την οποία εξετάστηκαν τόσο συνεχείς μεταβλητές (π.χ τιμές ανοσοσφαιρινών και τιμές των υποτάξεων της IgG ανοσοσφαιρίνης), αλλά και οι κατηγορικές (κλινικά συμπτώματα, εκδήλωση αυτοανοσίας κ.α). Για τις συνεχείς τιμές υπολογίστηκαν η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, η διάμεσος καθώς και οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές. Για τις κατηγορικές υπολογίστηκαν, οι συχνότητες των μεταβλητών καθώς και τα αντίστοιχα ποσοστά τους. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος υποθέσεων με την χρήση του χ^2 για τις κατηγορικές μεταβλητές για να διερευνηθεί η σχέση των μεταβλητών. Για τις συνεχείς μεταβλητές πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικής κατανομής με την βοήθεια του Kolmogorov-Smirnov Test. Για την σύγκριση μεταβλητών δεδομένων που ακολουθούν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το t-test, ενώ για τα δεδομένα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U test. Για την σύγκριση δεδομένων από περισσότερες των 2 ομάδες χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση ANOVA για δεδομένα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή, ενώ για ομάδες των οποίων τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Kruskal-Wallis test.

Στις ομάδες που αναλύθηκαν με ANOVA και Kruskal-Wallis και εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους εφαρμόστηκε η διόρθωση Bonferroni, η οποία μειώνει τις πιθανότητες εμφάνισης ψευδώς θετικών συσχετίσεων όταν πραγματοποιούνται πολλαπλές συγκρίσεις.

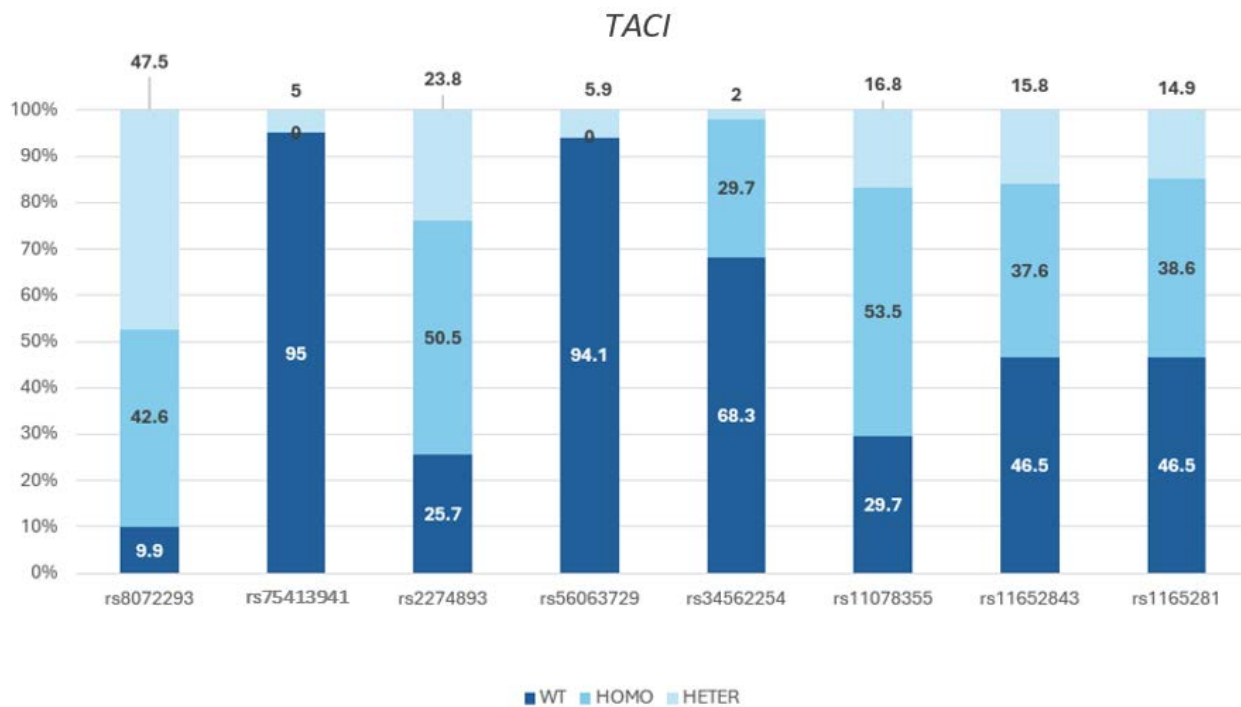
Για τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που εμφάνισε η εφαρμογή του χ^2 πραγματοποιήθηκε απλή λογιστική παλινδρόμηση κατά την οποία διερευνήθηκε η σχέση μια εξαρτημένης μεταβλητής με μια σειρά ανεξάρτητων για να διαπιστωθεί πως οι μεταβλητές επηρεάζονται και αν η σχέση αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

Η παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του στατιστικού λογισμικού R. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι μεταβλητές οι οποίες εμφάνιζαν επίπεδο σημαντικότητας (P-value) μικρότερο ή ίσο του 0.05. Ο στατιστικός έλεγχος που περιγράφηκε πραγματοποιήθηκε για την παροχή ολοκληρωμένης ανάλυσης των δεδομένων που συλλέχθηκαν και για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων.

3.2 Συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών του γονιδίου *TNFRSF13B*.

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *TNFRSF13B*, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη γνωστών πολυμορφισμών που έχουν περιγραφεί από την διεθνή βιβλιογραφία σε όλα τα εξόνια εκτός του εξονίου 1, στο οποίο δεν εμφανίστηκε καμία γενετική παραλλαγή. Στο εξόνιο 2 εντοπίστηκε ο σιωπηλός πολυμορφισμός rs8072293 σε 91 ασθενείς (ετερόζυγοι:43, ομόζυγοι:48) και η μετάλλαξη αλλαγής πλαισίου rs121908179 σε έναν ασθενή σε ετεροζυγωτία. Στο εξόνιο 3 εντοπίστηκαν ο σιωπηλός πολυμορφισμός rs35062843 και ο ιντρονικός πολυμορφισμός rs2274892, καθώς και η παρανοηματική μετάλλαξη rs34557412 (p.C104R, σε ετεροζυγωτία). Ο πολυμορφισμός rs75413941, εντοπίστηκε σε 5 ασθενείς και μόνο σε ετεροζυγωτία, ενώ ο πολυμορφισμός rs2274892 εντοπίστηκε σε 75 συνολικά ασθενείς (ετερόζυγοι:51, ομόζυγοι:24). Στο εξόνιο 4 παρουσιάστηκαν γενετικές παραλλαγές σε τρεις μόνο ασθενείς και αποτελούσαν την παρανοηματική μετάλλαξη rs200037919 (p.P151L, σε ετεροζυγωτία), την μη νοηματική μετάλλαξη rs72553885 (p.C193T, σε ετεροζυγωτία) καθώς και τον πολυμορφισμό rs754435124 (σε ετεροζυγωτία). Τέλος, στο εξόνιο 5 του γονιδίου παρατηρήθηκαν δύο παρανοηματικοί πολυμορφισμοί, ο rs34562254 σε 32 ασθενείς (ετερόζυγοι:30, ομόζυγοι:2) και ο rs56063729 σε 6 ασθενείς όπου όλοι ήταν ετερόζυγοι. Ακόμη, παρατηρήθηκε ο σιωπηλός rs11078355 σε 71 ασθενείς (ετερόζυγοι:54, ομόζυγοι:17) και δύο ιντρονικοί πολυμορφισμοί, ο rs11652843 σε 54 ασθενείς (ετερόζυγοι:38, ομόζυγοι:16) και ο rs1165281 σε 54 ασθενείς (ετερόζυγοι:39, ομόζυγοι:15). Οι συχνότητες των παραπάνω πολυμορφισμών αναγράφονται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18: Συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών του γονιδίου *TNFRSF13B* που μελετήθηκαν.



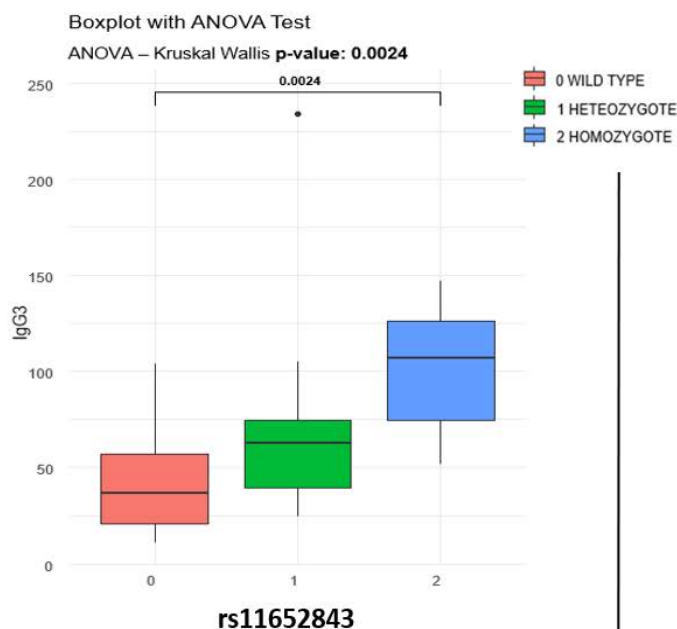
Για τους πολυμορφισμούς που ανιχνεύτηκαν πραγματοποιήθηκε έλεγχος υποθέσεων (χ^2) για την συσχέτιση των πολυμορφισμών με την κλινική εικόνα των ασθενών καθώς και με των τίτλο των αντισωμάτων τους. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που εντοπίστηκαν αναγράφονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις πολυμορφισμών του γονιδίου *TNFRSF13B* με κλινικά συμπτώματα ασθενών με IgAD καθώς και με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων τους.

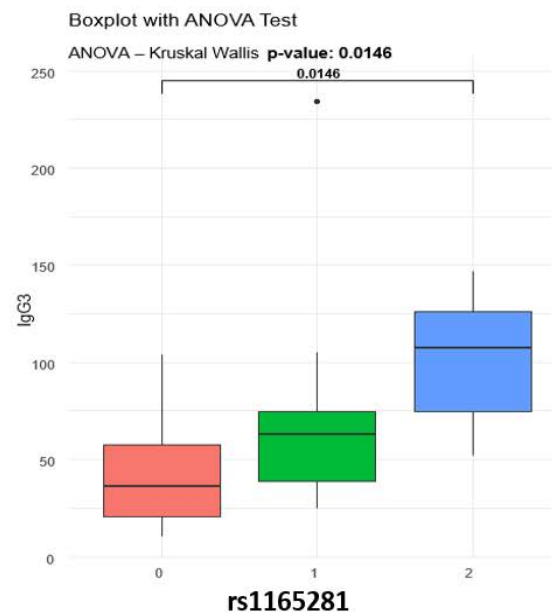
TACI/TNFRSF13B	WT	HETEROZYGOTE	HOMOZYGOTE	P-value
rs2274892	(N=26)	(N=51)	(N=24)	
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ				
OXI	10 (38.5%)	29 (56.9%)	6 (25.0%)	0.0269
NAI	16 (61.5%)	22 (43.1%)	18 (75.0%)	
ΘΥΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ				
OXI	19 (73.1%)	48 (94.1%)	24 (100%)	0.00247
NAI	7 (26.9%)	3 (5.9%)	0 (0%)	
rs56063729	(N=95)	(N=6)	(N=0)	
ΛΕΥΚΗ				
OXI	91 (95.8%)	4 (66.7%)		0.0417
NAI	4 (4.2%)	2 (33.3%)		
rs11078355	(N=30)	(N=54)	(N=17)	
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΩΤΕΡΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ				
OXI	28 (93.3%)	47 (87.0%)	11 (64.7%)	0.0252
NAI	2 (6.7%)	7 (13.0%)	6 (35.3%)	
IgM				
Mean (SD)	93.5 (46.9)	115 (54.5)	161 (119)	0.0339
Median [Min, Max]	85.4 [0, 174]	112 [0, 247]	114 [31.0, 375]	
Missing	10 (33.3%)	16 (29.6%)	7 (41.2%)	
rs11652843	(N=47)	(N=38)	(N=16)	
ΘΥΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ				
OXI	38 (80.9%)	37 (97.4%)	16 (100%)	0.0142
NAI	9 (19.1%)	1 (2.6%)	0 (0%)	
IgG3				
Mean (SD)	42.1 (26.6)	71.7 (48.9)	101 (35.3)	0.00244
Median [Min, Max]	36.5 [11.0, 104]	63.0 [25.0, 234]	107 [52.1, 147]	
Missing	27 (57.4%)	21 (55.3%)	9 (56.3%)	
rs1165281	(N=47)	(N=39)	(N=15)	
ΘΥΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ				
OXI	38 (80.9%)	38 (97.4%)	15 (100%)	0.0142
NAI	9 (19.1%)	1 (2.6%)	0 (0%)	
IgG3				
Mean (SD)	46.7 (30.1)	71.8 (50.5)	98.8 (38.1)	0.0146
Median [Min, Max]	38.5 [11.0, 115]	63.0 [25.0, 234]	93.7 [52.1, 147]	
Missing	25 (53.2%)	23 (59.0%)	9 (60.0%)	

Από την ανάλυση των παραπάνω πολυμορφισμών αποκαλύφθηκε η συσχέτιση ορισμένων από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TNFRSF13B* με τις κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών, καθώς και με τις τιμές ορισμένων ανοσοσφαιρινών. Από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2274893 του εξονίου 3 με την εκδήλωση λοιμώξεων(ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, ουροποιητικού, γαστρεντερικού) καθώς και με την θυρεοειδοπάθεια, με τις τιμές του P-value να είναι 0,0269 και 0,00247 αντίστοιχα (Πίνακας 19). Ακόμη, από τους πολυμορφισμούς του εξονίου 5, στατιστικά σημαντικοί θεωρήθηκαν οι rs56063729, rs11078355, rs11652843 και rs1165281. Ο πολυμορφισμός rs56063729 φαίνεται να συσχετίζεται με την εκδήλωση λεύκης σε ασθενείς με IgAD με την τιμή του P-value να είναι 0.0417. Ακόμη, στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε ο πολυμορφισμός rs11078355 με την εμφάνιση λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού καθώς και με την εμφάνιση υψηλότερων τιμών της IgM ανοσοσφαιρίνης, με τα P-value να είναι 0.0252 και 0.0339 αντίστοιχα. Τέλος, για τους ιντρονικούς πολυμορφισμούς rs11652843 και rs1165281, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εκδήλωση θυρεοειδοπάθειας καθώς και με την εμφάνιση υψηλότερων τιμών της IgG3 ανοσοσφαιρίνης. Στα ευρήματα που θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά πραγματοποιήθηκε απλή λογιστική παλινδρόμηση για την βαθύτερη κατανόηση της σχέσης των πολυμορφισμών με την εκδήλωση των αντίστοιχων κλινικών συμπτωμάτων (Πίνακας 21).

Πίνακας 19: Απεικόνιση της ANOVA ανάλυσης για τις τιμές των ανοσοσφαιρινών που είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση των πολυμορφισμών rs11652843 και rs1165281 του γονιδίου *TNFRSF13B*. Κάτω παρατίθεται η διόρθωση Bonferroni. Παρατηρείται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση στις τιμές της IgG3 ανοσοσφαιρίνης στους ασθενείς που είναι ομόζυγοι και ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό T33402G σε σχέση με τους ασθενείς που δεν φέρουν την παραλλαγή. Αντίστοιχα για τον πολυμορφισμό rs1165281, στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά στις τιμές της IgG3 ανάμεσα μόνο στους ομόζυγους για τον πολυμορφισμό ασθενείς και τους ασθενείς που δεν φέρουν την παραλλαγή.

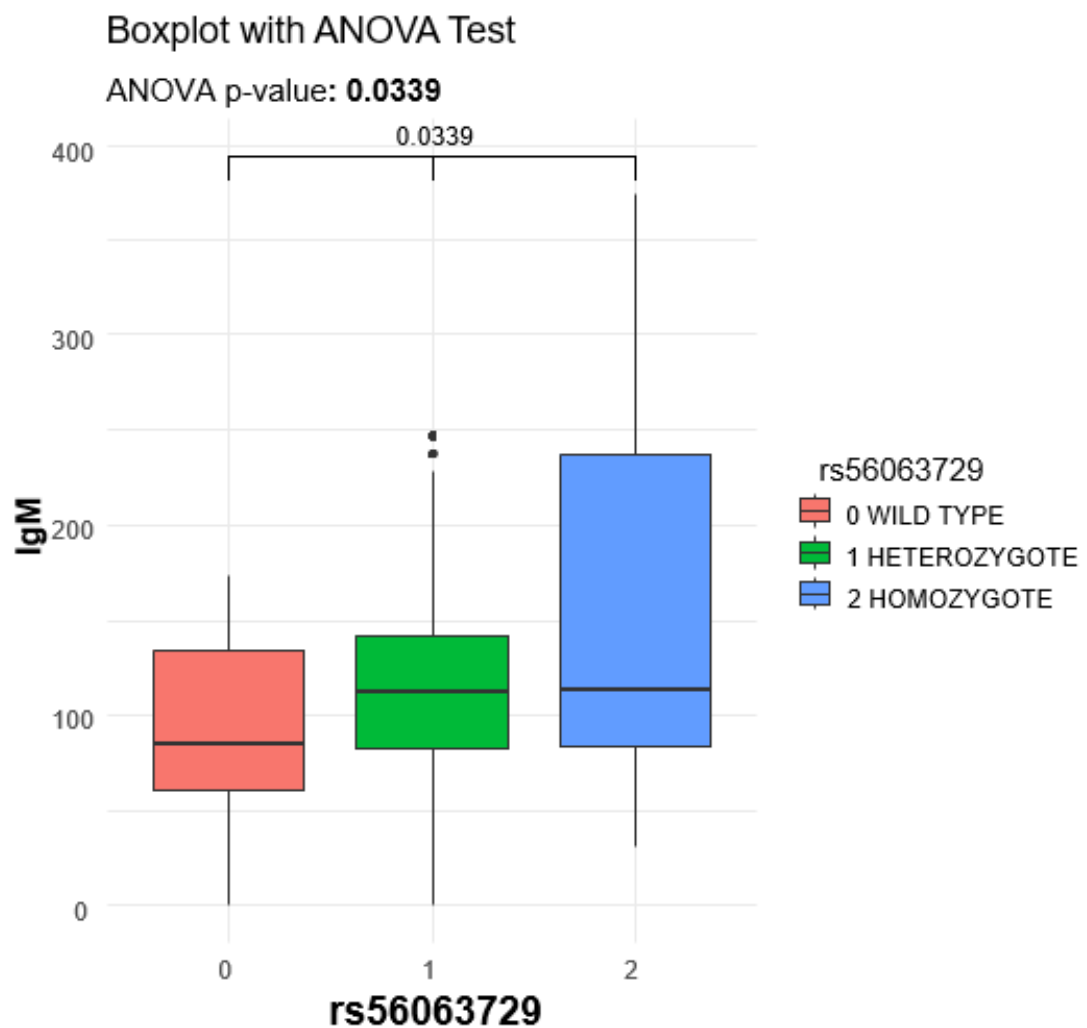


Πολυμορφισμός/ Ανοσοσφαιρίνη	Συγκριση	Διαφορά (diff)	Κατώτερο Όριο (lwr)	Ανώτερο Όριο (upr)	Προσαρμοσμένο p-value
rs11652843 /IgG3	1-0	29.6	-0.88	60.07	0.0585
	2-0	59	18.43	99.57	0.0029
	2-1	29.4	-12.09	70.89	0.2088



Πολυμορφισμός/ Ανοσοσφαιρίνη	Συγκριση	Διαφορά (diff)	Κατώτερο Όριο (lwr)	Ανώτερο Όριο (upr)	Προσαρμοσμένο p-value
rs1165281 /IgG3	1-0	25.12	-6.59	56.82	0.1442
	2-0	52.09	7.64	96.54	0.0183
	2-1	26.98	-19.22	73.17	0.3403

Πίνακας 20: Απεικόνιση της ANOVA ανάλυσης για τις τιμές της IgM ανοσοσφαιρίνης που είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση του πολυμορφισμού rs56063729 του γονιδίου *TNFRSF13B*. Κάτω παρατίθεται η διόρθωση Bonferroni. Φαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της IgM ανοσοσφαιρίνης ανάμεσα στους ασθενείς που είναι ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό και τους ασθενείς που δεν φέρουν την παραλλαγή.



Πολυμορφισμός/ Ανοσοσφαιρίνη	Συγκριση	Διαφορά (diff)	Κατώτερο Όριο (lwr)	Ανώτερο Όριο (upr)	Προσαρμοσμένο p-value
rs56063729 /IgM	1-0	21.35	-22.01	64.71	0.4686
	2-0	67.66	6.87	128.45	0.0256
	2-1	46.31	-9.47	102.09	0.1225

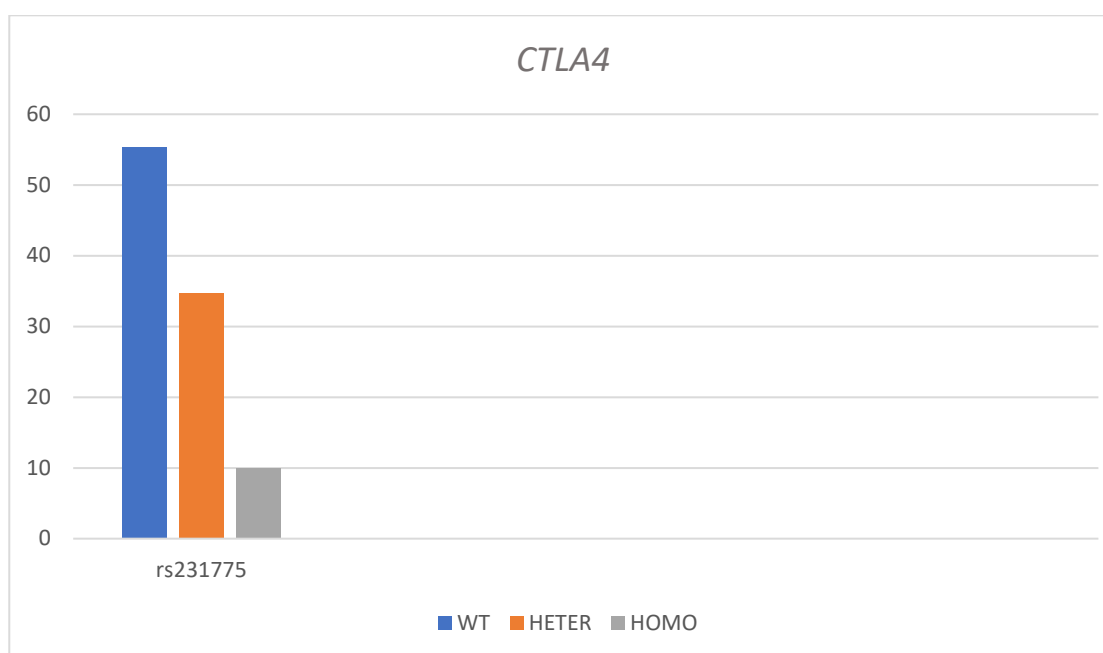
Μέσω της λογιστικής παλινδρόμησης είναι δυνατή η διαπίστωση της αλληλεπίδρασης των πληθυσμών στους οποίους εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Συγκεκριμένα, για τον πολυμορφισμό rs2274892 αποδεικνύεται ότι οι ασθενείς που είναι ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό έχουν λιγότερες πιθανότητες εμφάνισης θυρεοειδοπάθειας συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό και αυτό θεωρείται στατιστικά σημαντικό καθώς το P-value είναι ίσο με 0,02. Οι ομόζυγοι ασθενείς δεν υπολογίστηκαν καθώς δεν υπήρχαν περιπτώσεις ασθενών που φέρουν την μετάλλαξη σε ομοζυγωτία και έχουν και θυρεοειδοπάθεια. Ο ίδιος πολυμορφισμός σχετίστηκε και με την εκδήλωση λοιμώξεων, όπου μέσω της λογιστικής παλινδρόμησης φαίνεται ότι κανείς από τους ασθενείς που φέρει την παραλλαγή είτε σε ομοζυγωτία είτε σε ετεροζυγωτία είναι περισσότερο πιθανό να εκδηλώσει λοιμώξεις, ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό δεν θεωρείται στατιστικά σημαντικό καθώς το P-value είναι μεγαλύτερο του 0.05. Για την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs11078355 με τις λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, φαίνεται ότι οι ασθενείς ομόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό έχουν ~7 φορές μεγαλύτερες πιθανότητες εκδήλωσης λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν φέρουν την μετάλλαξη και αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (P-value=0.022). Ο πολυμορφισμός rs56063729 σχετίστηκε με την εκδήλωση λεύκης σε ασθενείς με IgAD και από την λογιστική παλινδρόμηση προκύπτει ότι ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία έχουν περίπου 2,4 περισσότερες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν φέρουν την μετάλλαξη και αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (P-value:0.015). Οι πολυμορφισμοί rs11652843 και rs1165281 σχετίστηκαν με την εμφάνιση θυρεοειδοπάθειας, και φαίνεται πως οι ετεροζυγώτες έχουν μειωμένες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό και αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (P-value=0,04 και για τους δύο πολυμορφισμούς). Για τους πολυμορφισμούς rs11652843, και rs1165281 δεν είχαμε ασθενείς που να φέρουν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία και να έχουν θυρεοειδοπάθεια, γι' αυτό και δεν υπολογίστηκαν στην ανάλυση.

Πίνακας 21: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Αναγράφονται ο πολυμορφισμός με την αντίστοιχη πάθηση που εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, το odds ratio, το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) καθώς και το P-value.

Πολυμορφισμός	Πάθηση	Γονότυπος	Odds Ratio (OR)	95% CI	p-value
rs2274892	Λοιμώξεις	(Intercept)	0.37	0.14 - 0.84	0.02
		Ετεροζυγωτία	0.17	0.03 - 0.68	0.02
		Ομοζυγωτία	0	NA	0.9933
	Θυρεοειδοπάθεια	(Intercept)	1.6	0.736 - 3.650	0.244
		Ετεροζυγωτία	0.474	0.176 - 1.229	0.13
		Ομοζυγωτία	1.875	0.565 - 6.626	0.311
rs56063729	Λεύκη	(Intercept)	0.043	0.013 - 0.105	<0.005
		Ετεροζυγωτία	11.375	1.311 - 81.393	0.0156
rs11078355	Λοιμώξεις Ανώτερου Αναπνευστικού	(Intercept)	0.071	0.011 - 0.237	0.000311
		Ετεροζυγωτία	2.085	0.464 - 14.655	0.3797
		Ομοζυγωτία	7.636	1.503 - 57.896	0.0224
rs11652843	Θυρεοειδοπάθεια	(Intercept)	0.24	0.11 - 0.47	<0.001
		Ετεροζυγωτία	0.11	0.01 - 0.65	0.0442
		Ομοζυγωτία	0	NA	0.993
rs1165281	Θυρεοειδοπάθεια	(Intercept)	0.24	0.11 - 0.47	<0.001
		Ετεροζυγωτία	0.11	0.01 - 0.65	0.0442
		Ομοζυγωτία	0	NA	0.993

3.3 Συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού rs231775 του γονιδίου *CTLA4*.

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 1 του γονιδίου *CTLA4*, η μόνη γενετική παραλλαγή που παρατηρήθηκε ήταν η παρανοηματική μετάλλαξη rs231775. Συγκεκριμένα η γενετική παραλλαγή εμφανίστηκε σε 45 εκ των 101 ασθενών (ετερόζυγοι:35, ομόζυγοι:10) και από την στατιστική του ανάλυση προέκυψε η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εκδήλωση λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (P-value: 0.0293) καθώς και με την εκδήλωση λεύκης (P-value: 0.0315) σε ασθενείς με IgAD. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών των ασθενών.



Πίνακας 22: Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού rs231775 στους ασθενείς με IgAD.

Από την λογιστική παλινδρόμηση των δεδομένων που θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά προέκυψε πως ο πολυμορφισμός P.17A όταν εμφανίζεται σε ομοζυγωτία, οι ασθενείς έχουν αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης λεύκης σε αντίθεση που δεν διαθέτουν τον πολυμορφισμό (P-value=0.01). Ωστόσο για την εμφάνιση λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, φαίνεται ότι είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία, η ύπαρξη του πολυμορφισμού δεν είναι στατιστικά σημαντική για την εμφάνιση λοιμώξεων του ουροποιητικού. Ωστόσο, οι ασθενείς ομόζυγοι του πολυμορφισμού, είναι κοντά στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας (P-value= 0.77).

Πίνακας 23: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs231775 του γονιδίου *CTLA4* με κλινικές εκδηλώσεις ασθενών με IgAD.

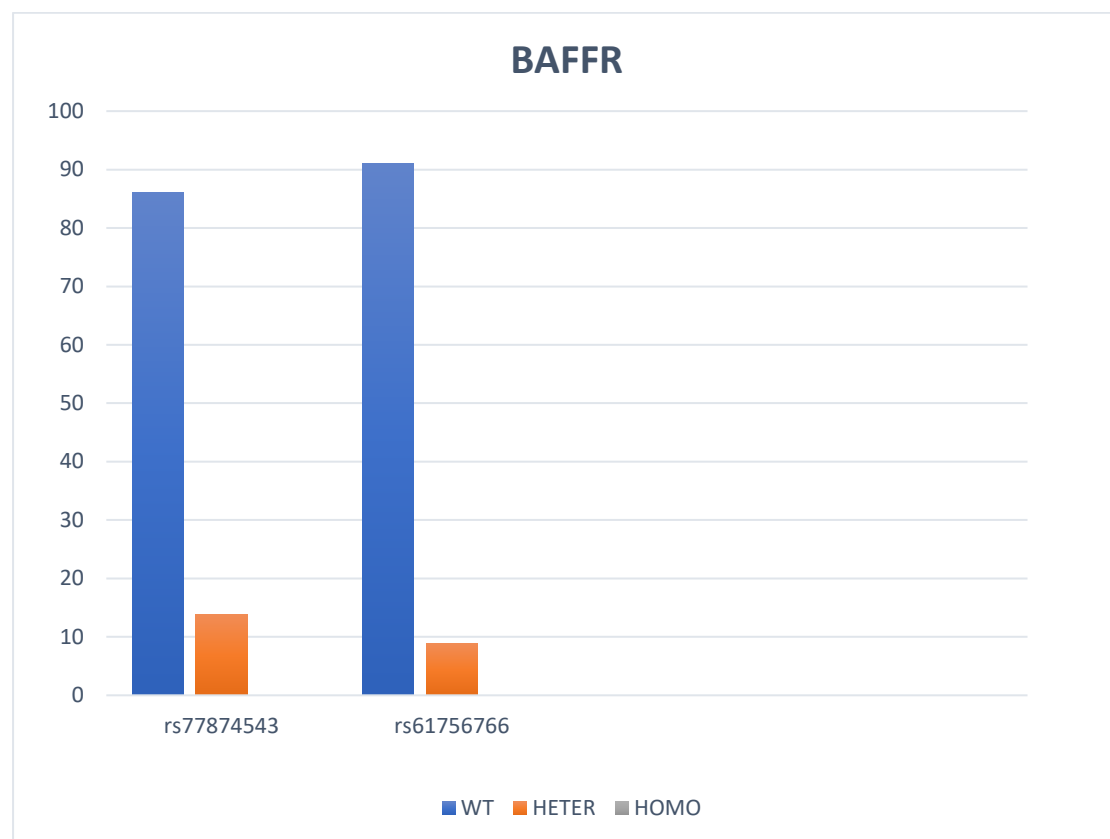
	WT	HETEROZYGOTE	HOMOZYGOTE	P-value
rs231775				
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ				
ΌΧΙ	51 (91.1%)	34 (97.1%)	7 (70.0%)	0.0293
ΝΑΙ	5 (8.9%)	1 (2.9%)	3 (30.0%)	
ΛΕΥΚΗ				
ΌΧΙ	54 (96.4%)	34 (97.1%)	7 (70.0%)	0.00315
ΝΑΙ	2 (3.6%)	1 (2.9%)	3 (30.0%)	

Πίνακας 24: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για τον πολυμορφισμό rs231775 του γονιδίου *CTLA4*.

Πολυμορφισμός	Πάθηση	Γονότυπος	Odds Ratio (OR)	95% CI	p-value
rs231775	ΛΕΥΚΗ	(Intercept)	0.037	0.006-0.119	<0.001
		Ετεροζυγωτία	0.794	0.036-8.58	0.853
		Ομοζυγωτία	11.571	1.657-100.663	0.0141
	ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	(Intercept)	0.098	0.034-223	<0.001
		Ετεροζυγωτία	0.3	0.015-1.968	0.281
		Ομοζυγωτία	4.371	0.768-22.344	0.077

3.4 Συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών rs77874543 και rs61756766 του γονιδίου BAFFR.

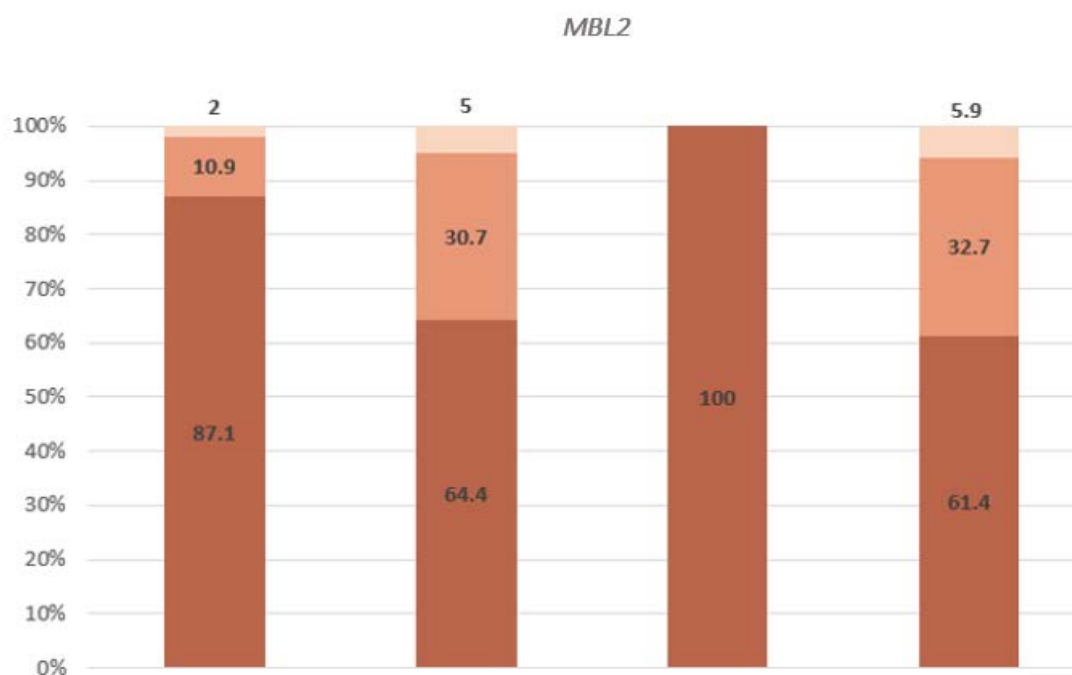
Από το γονίδιο *TNFRSF13C* μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί rs77874543 και rs61756766. Από τους ασθενείς που μελετήθηκαν οι 28 είχαν τον πολυμορφισμό rs77874543, ενώ 18 ήταν οι ασθενείς που έφεραν τον πολυμορφισμό rs61756766. Οι δυο πολυμορφισμοί εμφανίστηκαν αποκλειστικά σε ετεροζυγωτία σε όλους τους ασθενείς. Από τον έλεγχο υποθέσεων δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση από κανέναν από τους πολυμορφισμούς rs77874543, ή rs61756766 με τις κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών ή με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών τους.



Πίνακας 25: Συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών rs77874543 και rs61756766 στους ασθενείς που μελετήθηκαν.

3.5 Συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών του γονιδίου *MBL2*.

Στο γονίδιο *MBL2* μελετήθηκε η εμφάνιση των γενετικών παραλλαγών rs5030737, rs1800450 και rs1800451 του πρώτου εξονίου και του rs7096206 της περιοχής του υποκινητή. Η σημειακή μετάλλαξη rs5030737 εντοπίστηκε σε 13 ασθενείς εκ των οποίων οι 2 ήταν ομόζυγοι και οι 11 ετερόζυγοι προς την παραλλαγή. Ο πολυμορφισμός rs1800450 εμφανίστηκε σε 36 ασθενείς (ετερόζυγοι: 31, ομόζυγοι:5), ενώ ο πολυμορφισμός rs1800451 δεν εμφανίστηκε σε κανέναν από τους ασθενείς που μελετήθηκαν. Η ιντρονική παραλλαγή rs7096206 εντοπίστηκε σε 39 ασθενείς εκ των οποίων οι 33 ήταν ετερόζυγοι και οι 6 ομόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό. Από τους γονότυπους που προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των παραπάνω παραλλαγών και έχουν συσχετιστεί με MBL ανεπάρκεια, οι 19 ασθενείς έφεραν τον γονότυπο ΧΑ/ΧΑ ή ΥΑ/Ο και είχαν μερική MBL ανεπάρκεια, οι 14 είχαν τον γονότυπο ΧΑ/Ο ή Ο/Ο και είχαν MBL ανεπάρκεια, ενώ οι 54 διέθεταν τους γονότυπους ΥΑ/ΥΑ ή ΥΑ/ΧΑ και δεν διέθεταν MBL ανεπάρκεια.



Πίνακας 26: Συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών των κωδικονίων 52,54,57 (rs5030737,rs1800450, rs1800451) και του ιντρονικού πολυμορφισμού rs7096206 στο γονίδιο *MBL2*.

Από τον έλεγχο υποθέσεων των πολυμορφισμών του γονιδίου *MBL2* με τα κλινικά στοιχεία των ασθενών φανερώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1800450 με την εκδήλωση ατοπίας όπου το P-value=0,02. Από την λογιστική παλινδρόμηση φαίνεται πως οι ασθενείς που διαθέτουν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία, έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν λεύκη σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό γεγονός που θεωρείται στατιστικά σημαντικό καθώς το p-value=0.027. Αντίθετα, δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση εμφάνισης λεύκης για τους ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία καθώς το P-value>0.05.

Πίνακας 27: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs1800450 με την ατοπία και τα επίπεδα των IgG και IgG2 ανοσοσφαιρινών.

	WT	HETEROZYGOTE	HOMOZYGOTE	P-value
rs1800450				
ΑΤΟΠΙΑ				
OXI	61 (93.8%)	29 (93.5%)	3 (60.0%)	0.0244
NAI	4 (6.2%)	2 (6.5%)	2 (40.0%)	
IgG				
Mean (SD)	1210 (388)	1360 (441)	1770 (267)	0.0119
Median [Min, Max]	1220 [390, 2150]	1330 [655, 2170]	1820 [1450, 2000]	
Missing	1 (1.5%)	0 (0%)	1 (20.0%)	
IgG2				
Mean (SD)	352 (196)	348 (172)	617 (327)	0.0172
Median [Min, Max]	338 [72.9, 867]	333 [118, 714]	528 [288, 1150]	
Missing	13 (20.0%)	4 (12.9%)	0 (0%)	

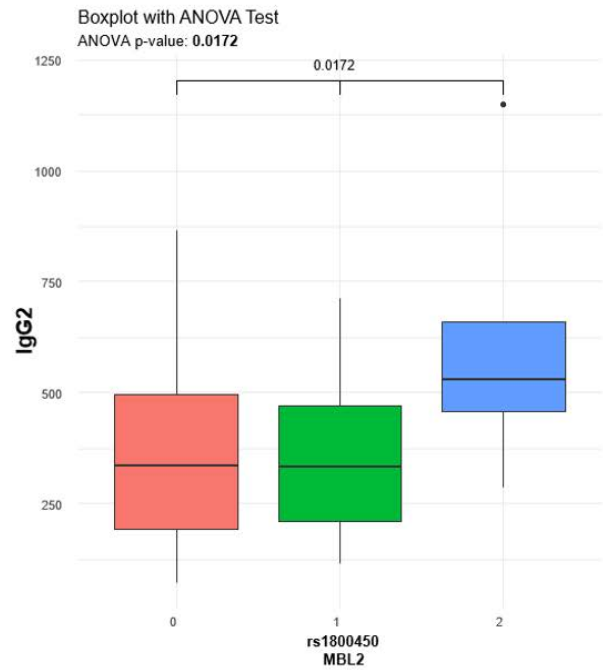
Από την συσχέτιση των πολυμορφισμών με τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών των ασθενών με IgAD προέκυψε η στατιστικά σημαντική σχέση του πολυμορφισμού rs1800450 με τα επίπεδα της IgG και IgG2 ανοσοσφαιρίνης. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως οι ασθενείς ομόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό εμφανίζουν υψηλότερες τιμές IgG ανοσοσφαιρίνης σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν διαθέτουν τον πολυμορφισμό, ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών των ασθενών που είναι ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό με τους ομόζυγους ή με τους ετερόζυγους ασθενείς με τους ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό.

Πίνακας 28: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Αναγράφονται ο πολυμορφισμός rs1800450 και η ατοπία με την οποία εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, το odds ratio, το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) καθώς και το P-value.

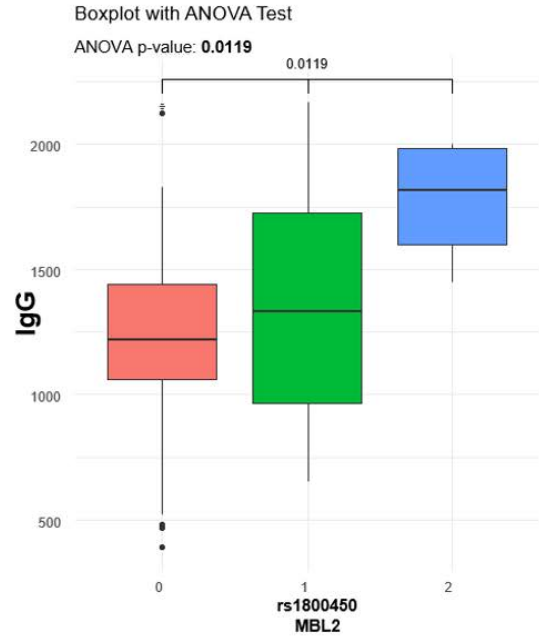
Πολυμορφισμός	Πάθηση	Γονότυπος	Odds Ratio (OR)	95% CI	p-value
rs1800450	ΑΤΟΠΙΑ				
		(Intercept)	0.0656	0.0199-0.159	<0.001
		Ετεροζυγωτία	1.0517	0.14-5.7148	0.955
		Ομοζυγωτία	10.1667	1.1103-82.5173	0.027

Σχετικά με τα επίπεδα της IgG2 ανοσοσφαιρίνης, υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ομόζυγους ασθενείς και τους ετερόζυγους, αλλά και ανάμεσα στους ομόζυγους ασθενείς με τους ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό. Συγκεκριμένα, φαίνεται οι ομόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό ασθενείς να εμφανίζουν αισθητά μεγαλύτερες τιμές IgG2 ανοσοσφαιρίνης σε σύγκριση με τους ετερόζυγους ή τους ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό.

Πίνακας 29: Απεικόνιση της ANOVA ανάλυσης των τιμών της IgG και IgG2 ανοσοσφαιρίνης σε σχέση με τον πολυμορφισμό rs1800450.



Πολυμορφισμός/ Ανοσοσφαιρίνη	Συγκριση	Διαφορά (diff)	Κατώτερο Όριο (lwr)	Ανώτερο Όριο (upr)	Προσαρμοσμένο p-value
MBL2	1-0	152.97	-56.69	362.63	0.1969
p.Gly54Arg/ IgG2	2-0	564.52	70.7	1058.33	0.0209
	2-1	411.55	-97.49	920.59	0.1373



Πολυμορφισμός/ Ανοσοσφαιρίνη	Συγκριση	Διαφορά (diff)	Κατώτερο Όριο (lwr)	Ανώτερο Όριο (upr)	Προσαρμοσμένο p-value
MBL2	1-0	-4.19	-116.02	107.65	0.9956
p.Gly54Arg/ IgG2	2-0	264.65	43.9	485.4	0.0146
	2-1	268.84	39.3	498.38	0.0176

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξέτασε πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* καθώς και οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων *CTLA4*, *BAFFR*, *MBL2* σε ασθενείς με *IgAD*

Από την ανάλυση του γονιδίου *TACI* παρατηρήθηκε η ύπαρξη γνωστών πολυμορφισμών και εντοπίστηκαν στατικά σημαντικές συσχετίσεις των πολυμορφισμών rs11078355, rs56063729 με την εμφάνιση λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού και με την εκδήλωση λεύκης αντίστοιχα. Στους ασθενείς που έφεραν τον πολυμορφισμό rs56063729 παρατηρήθηκε και σημαντική αύξηση των IgM ανοσοσφαιρινών. Στους ασθενείς που έφεραν τους πολυμορφισμούς rs11652843, rs1165281, είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία, παρατηρήθηκε πως διέθεταν στατιστικά σημαντικά πιο αυξημένες τις τιμές των IgG3 ανοσοσφαιρινών.

Με βάση την βιβλιογραφία ασθενείς με CVID και IgAD εμφανίζουν κοινούς πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* γεγονός μπορεί να υποδηλώνει ότι οι δύο ασθένειες μοιράζονται μια κοινή γενετική βάση. Οι πιο σημαντικές μεταλλάξεις φαίνεται να είναι αυτές των A181E και C104R, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση σπληνομεγαλίας σε ασθενείς με IgAD και CVID. Η μετάλλαξη C104R, εντοπίζεται στην CRD2 περιοχή, του εξονίου 3 του γονιδίου του υποδοχέα *TACI* και αποτρέπει την σύνδεση των *BAFF* και *APRIL* του υποδοχέα *TACI*. Αντίστοιχα, οι μετάλλαξη A181E βρίσκεται στο εξόνιο 4 του υποδοχέα και επηρεάζει την διαμεμβρανική αλληλουχία του υποδοχέα *TACI*, εμποδίζοντας την μεταγωγή σήματος μετά την πρόσδεση με τους συνδέτες του. Οι περισσότερες γενετικές παραλλαγές που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο του υποδοχέα *TACI* αποτελούν πολυμορφισμούς που δεν επηρεάζουν την λειτουργία του υποδοχέα. (104) (105) (106) (107) (108)

Η ανάλυση του γονιδίου *CTLA4* ανέδειξε την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs231775 με την εκδήλωση λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και λεύκης. Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εμφάνιση λοιμώξεων του ουροποιητικού αποδείχθηκε στατιστικά μη σημαντική, ενώ αντίθετα στην περίπτωση εκδήλωσης λεύκης, φαίνεται πως οι ασθενείς ομόζυγοι προς την μετάλλαξη είναι περισσότερο πιθανό να εκδηλώσουν την νόσο. Η συγκεκριμένη παραλλαγή εμποδίζει την μεταφορά των μορίων *CTLA4* από την ενδοκυττάρια περιοχή στην εξωκυττάρια μειώνοντας τα επίπεδα της στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. Η παραλλαγή αυτή έχει

συσχετιστεί με την θυρεοειδοπάθεια Hashimoto, τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο την κοιλιοκάκη, καθώς και άλλες αυτοάνοσες κυρίως εκδηλώσεις. (109) (110) (111) (112) Μελέτη από τους Santander et al εξετάζει την συσχέτιση του γονιδίου *CTLA4* με την εκδήλωση λεύκης σε Μεξικάνικο πληθυσμό και αναφέρει πως δεν υπάρχει συσχέτιση του γονιδίου με το νόσημα με τον εξεταζόμενο πληθυσμό. Το αποτέλεσμα αυτό ωστόσο, δεν θα έπρεπε να θεωρείται καθοριστικό καθώς τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες. (101)

Η μελέτη του γονιδίου *MBL2* φανέρωσε την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1800450 του κωδικονίου 54 με την εκδήλωση ατοπίας καθώς και με τα αυξημένα επίπεδα IgG ανοσοσφαιρινών και της IgG2 υπόταξης. Μέσω της στατιστικής ανάλυσης φαίνεται πως ασθενείς που φέρουν την παραλλαγή σε ομοζυγωτία είναι πιο πιθανό να εκδηλώσουν ατοπία σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν φέρουν την παραλλαγή. Με βάση την βιβλιογραφία, η MBL ανεπάρκεια, έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση επαναλαμβανόμενων λοιμώξεων αλλά και φλεγμονωδών νοσημάτων. (113) Σχετικά με την εκδήλωση ατοπίας, έχουν διεξαχθεί μελέτες που εξετάζουν αν η ανεπάρκεια της MBL μπορεί να συνδέεται με την ανάπτυξη της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανεπάρκειας της MBL και της ατοπίας. (114)

Από την μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου *BAFFR* δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs77874543 και rs61756766 με την κλινική εικόνα των ασθενών με sIgAD, αλλά ούτε με τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία δεν υπήρχαν ασθενείς που να φέρουν καμία από τις παραλλαγές rs77874543, rs61756766 σε ομοζυγωτία, ενώ ελάχιστοι ήταν οι ασθενείς που εμφάνιζαν τον πολυμορφισμό rs77874543 χωρίς την ύπαρξη του πολυμορφισμού rs61756766 που δρα αντισταθμιστικά ως προς την επίδραση του rs77874543 (2 ασθενείς).

Τα ευρήματα της παρούσας διπλωματικής συνάδουν με μελέτες και συσχετίσεις που έχουν πραγματοποιηθεί από την διεθνή βιβλιογραφία γεγονός που επισημαίνει την ανάγκη για βαθύτερη κατανόηση των παραπάνω ανοσογονιδίων. Με την IgAD να αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο, που είναι και σε μεγάλο βαθμό υποδιαγεγνώσμενη, η δυσκολία εξακρίβωσης τόσο των αιτίων που την προκαλούν αλλά και των μηχανισμών που μπορεί να την επιδεινώνουν, αυξάνεται. Καθίσταται

λοιπόν αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση ασθενών με IgAD κλινικά και εργαστηριακά για την συλλογή περισσότερων πληροφοριών που μπορούν να βοηθήσουν στην εξακρίβωση των αιτίων εκδήλωσης της.

Βιβλιογραφία

1. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;120(4).
2. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol*. 2010 May;71(5):317–28. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02386.x. PMID: 20500682.
3. Β., Σπελέτας Μ. Τσακρακλίδης. Παθολογία του λεμφικού συστήματος. Εκδόσεις Γβ Παρισιάνος; Αθήνα 2011. σελ. 53-62.
4. Azar AE, Ballas ZK. Evaluation of the adult with suspected immunodeficiency. *Am J Med*. 2007 Sep;120(9):764–8. doi:10.1016/j.amjmed.2006.12.013. PMID: 17765042.
5. E., Gambinieri. 9. Gambinieri E. New frontiers in primary immunodeficiency disorders: immunology and beyond. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:1–5.
6. Kumar A, Teuber SS, Gershwin ME. Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clin Dev Immunol*. 2006;13:223–59.
7. Lopez E, Shattock RJ, Kent SJ, Chung AW. The multifaceted nature of immunoglobulin A and its complex role in HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2018 Sep; doi:10.1089/aid.2018.0099.
8. A., Patel. Biochemistry, immunoglobulin A [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2023 [cited 2024 Feb 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551516/>.
9. Steffen U, Koeleman CA, Sokolova MV, et al. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nat Commun*. 2020;11:120. doi:10.1038/s41467-019-13992-8.
10. Kindt TJ, Osborne BA, Ric. Kuby Immunology: International Edition. 2nd ed.
11. Breedveld A, van Egmond M. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol*. 2019;10:553. doi:10.3389/fimmu.2019.00553.
12. Ben Mkaddem S, Rossato E, Heming N, Monteiro RC. . Anti-inflammatory role of the IgA FC Receptor (CD89): From autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun Rev*. 2013 Apr;12(6):666–9. doi:10.1016/j.autrev.2012.10.011.
13. De Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: Structure, function, and developability. *Antibodies*. 2019 Dec 5;8(4):57. doi:10.3390/antib8040057.
14. Kanamaru Y, Pfirsch S, Aloulou M, Vrtovsni F, Essig M, Loirat C, et al. Inhibitory ITAM signaling by FcαRI-FcRγ chain controls multiple activating responses and prevents renal inflammation. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2669–2678. doi:10.4049/jimmuno.
15. Pan-Hammarström R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol*. 2017 Jan;85(1):3-12. doi:10.1111/sji.12499. PMID: 27763681.

16. Germenis AE, Speletas M. Primary antibody deficiencies in adults: A contemporary clinical approach. *Arch Hellenic Med.* 2013;30(4).
17. Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIGAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000 May;120(2). doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01131.x.
18. Swain S, Selmi C, Gershwin ME, Teuber SS. The clinical implications of selective IgA deficiency. *J Transl Autoimmun.* 2019 Dec;2:100025. doi:10.1016/j.jtauto.2019.100025.
19. Rawla P, Killeen RB, Joseph NI. Selective IgA Deficiency. [Updated 2023 Jun .
20. Sircana MC, Vidili G, Gidaro A, Delitala AP, Filigheddu F, Castelli R, et al. Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency: Focus on Autoimmune Manifestations and Their Pathogenesis. *Int J Transl Med.* 2023;3:432-460. doi:10.3390/ijtm3.
21. Odineal DD, Gershwin ME. The Epidemiology and Clinical Manifestations of Autoimmunity in Selective IgA Deficiency. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58:107–133. doi:10.1007/s12016-019-08756-7.
22. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, et al. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet.* 2016 Sep;53(9):575-90. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103690. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27250108.
23. Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarstrom Q, et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(18):7193-8.
24. L., Yel. Selective IgA Deficiency. *J Clin Immunol.* 2010;30:10–16. doi:10.1007/s10875-009-9357-x.
25. Alkhairy O, Hammarström L. IgA Deficiency and Other Immunodeficiencies Causing Mucosal Immunity Dysfunction. *Mucosal Immunol.* 2015;1441–1459. doi:10.1016/b978-0-12-415847-4.00073-2.
26. Singh K, Chang C, Gershwin ME. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2014;13(2):163–177. doi:10.1016/j.autrev.2013.10.005.
27. Cinicola BL, Pulvirenti F, Capponi M, Bonetti M, Brindisi G, Gori A, et al. Selective IgA Deficiency and Allergy: A Fresh Look to an Old Story. *Medicina.* 2022;58(1):129. doi:10.3390/medicina58010129.
28. C., Cunningham-Rundles. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2001 Sep;21(5):303-9. doi:10.1023/a:1012241117984. PMID: 11720003.
29. Morawska I, Kurkowska S, Bebnowska D, Hryniewicz R, Becht R, Michalski A, et al. The Epidemiology and Clinical Presentations of Atopic Diseases in Selective IgA Deficiency. *J Clin Med.* 2021;10(17):3809. doi:10.3390/jcm10173809.
30. Burgio GR, Duse M, Monafo V, et al. . Selective IgA deficiency: Clinical and immunological evaluation of 50 pediatric patients. *Eur J Pediatr.* 1980;133:101–106. doi:10.1007/BF00441577.
31. A., Dosanjh. Autoimmunity and immunodeficiency. *Pediatrics Rev.* 2015;36(11). doi:10.1542/pir.36-11-489.

32. RC., Monteiro. Immunoglobulin A as an anti-inflammatory agent. *Clin Exp Immunol*. 2014;178. doi:10.1111/cei.12531.
33. F., Böhländer. A new hope? Possibilities of therapeutic IgA antibodies in the treatment of inflammatory lung diseases. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1127339.
34. Chevailler A, Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Immunofluorescence analysis of IgA binding by human mononuclear cells in blood and lymphoid tissue. *J Immunol*. 1989;142:2244–9.
35. Haimila K, Einarsdottir E, de Kauwe A, Koskinen LL, Pan-Hammarstrom Q, Kaartinen T, et al. The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Genes Immun*. 2009;10(2):151–161. doi:10.1038/gene.2008.
36. Ματ., Σπελέτας. Διαγνωστική Προσέγγιση Ασθενών με Πρωτοπαθή Ανοσοανεπάρκεια. 25ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο: Πρωτοπαθείς Ανοσοανεπάρκειες. 2014;5(4). 2014.
37. Marina Y, Dolina M. Immunoglobulin A deficiency clinical presentation [Internet]. Medscape; 2023 [cited 2024 Mar]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/136580-clinical?form=fpf>.
38. Lu P, Ling B, Wang N, Hammarstrom L. [Study on immunoglobulin A Deficiency (IgAD) in Chinese Shanghai Blood Donors]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2016 Aug;24(4):1216-20. doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.04.047. Chinese. PMID: 27531803.
39. Burrows PD, Cooper MD. IgA deficiency. *Adv Immunol*. 1997;65:245-76.
40. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. Major histocompatibility complex. Encyclopedia Britannica. 2024 Mar 13 [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://www.britannica.com/science/major-histocompatibility-complex>.
41. Waithman J, Moffat JM, Patterson NL, van Beek AE, Minter JD. Antigen presentation. *Ref Mod Biomed Sci*. 2014; doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.00118-5.
42. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th ed. New York: Garland Science; 2001. The major histocompatibility complex and its functions. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK>.
43. Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C, et al. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol*. 2017;18:76. doi:10.1186/s13059-017-1207-1.
44. Tsai S, Santamaria P. MHC class II polymorphisms, autoreactive T-cells, and autoimmunity. *Front Immunol*. 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00321.
45. Poddighe D, Capittini C. The role of HLA in the association between IgA deficiency and celiac disease. *Dis Markers*. 2021 Dec 13;2021:1–8. doi:10.1155/2021/8632861.
46. Wang N, Lu P, Ling B, Zhu Z, Hammarström L. . Caucasian origin of disease associated HLA haplotypes in Chinese blood donors with IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2014 Jan 9;34(2). doi:10.1007/s10875-013-9983-1.

47. Mac Hulla HK, Schönermarck U, Schaaf A, et al. HLA-A, B, Cw and DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DPB1 frequencies in German immunoglobulin A-deficient individuals. *Scand J Immunol.* 2000;52(2):207-11.
48. Schroeder HW Jr, Zhu ZB, March RE, Campbell RD, Berney SM, Nedospasov SA, Turetskaya RL, Atkinson TP, Go RC, Cooper MD, Volanakis JE. Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA-DR3, -B8, -A1 haplotypes. *Mol Med.*
49. Mohammadi J, Pourpak Z, Jarefors S, et al. 4. Human leukocyte antigens (HLA) associated with selective IgA deficiency in Iran and Sweden. *Iranian J Allergy Asthma Immunol.* 2008;7(4):209-1.
50. Diseases., Primary Immunodeficiency. Report of a WHO Scientific Group WHO. *Clin Exp Immunol.* 1997;159:6236–41.
51. Bronson PG, Chang D, Bhangale T, et al. . Common variants at PVT1, ATG13-AMBRA1, AHI1 and CLEC16A are associated with selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2016;48(11):1425-9. doi: 10.1038/ng.3675.
52. Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, et al. . Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2010 Sep;42(9):777-80. doi: 10.1038/ng.644. PMID: 20694011.
53. Bagheri Y, Sanaei R, Yazdani R, et al. The heterogeneous pathogenesis of selective immunoglobulin A deficiency. *Int Arch Allergy Immunol.* 2019;179(3). doi: 10.1159/000499044.
54. Lim CK, Li J, Santoso S, et al. STXBP6 and B3GNT6 genes are associated with selective IgA deficiency. *Front Genet.* 2021;12:736235. doi: 10.3389/fgene.2021.736235.
55. Shaw CJ, Lupski JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet.* 2005;116(12):17.
56. Γ., Τσιούμα. Ανίχνευση μεταλλάξεων του TNFRSF13B/TACI σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες. [Master's thesis]. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα; 2017. p.14-23.
57. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJA, et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem.* 2005 Feb;280(8):7218-27. doi: 10.1074/jbc.m411714200.
58. Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):401-9.
59. Tsuji S, Stein L, Kamada N, et al. TACI deficiency enhances antibody avidity and clearance of an intestinal pathogen. *J Clin Invest.* 2014 Nov;124(11):4857-66. doi: 10.1172/JCI74428. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25271628.
60. ΙΟ., Κάκκας. Ο ρόλος των μεταλλάξεων των γονιδίων TACI και CTLA4 στην παθογένεση της κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας. [PhD dissertation]. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα; 2022. p. 34-35.

61. Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA. TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2006 Sep;6(5):357-62. doi: 10.1007/s11882-996-0004-9. PMID: 16899196.
62. Eslami M, Schuepbach-Mallepell S, Diana D, et al. Unique and redundant roles of mouse BCMA, TACI, BAFF, APRIL, and IL-6 in supporting antibody-producing cells in different tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2024;121(29). doi: 10.1073/pnas.2404309121.
63. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJA, et al. Structures of APRIL-receptor complexes. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7218-27. doi: 10.1074/jbc.M411714200.
64. Xu S, Lam KP. Transmembrane Activator and CAML Interactor (TACI): another potential target for immunotherapy of multiple myeloma? *Cancers (Basel).* 2020;12(4):1045. doi: 10.3390/cancers12041045.
65. Castigli E, Geha RS. TACI, isotype switching, CVID and IgAD. *Immunol Res.* 2007;38(1-3):102-11. doi: 10.1007/s12026-007-8000-2. PMID: 17917015.
66. Schatorje EJ, Gemen EF, Driessen GJ, et al. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. *Scand J Immunol.* 2011;74(5):502-10.
67. Von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity.* 2001;14(5):573-82.
68. Yan M, Wang H, Chan B, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol.* 2001;2(7):638-43.
69. Lee JJ, Ozcan E, Rauter I, Geha RS. Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(6):520-6.
70. Schweighoffer E, Tybulewicz VL. BAFF signaling in health and disease. *Curr Opin Immunol.* 2021;71:124-31. doi:10.1016/j.coi.2021.06.008.
71. Losi CG, Lougaris V, Baronio M, Plebani A, et al. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2005;25(5):496-502. doi:10.1007/s10875-005-5984-3.
72. Medicine, TNFRSF13C TNF receptor superfamily member 13C [Homo sapiens (human)] - gene - NCBI. U.S. National Library of Medicine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/115650>, [cited 2024 Sept 1]. Available from:.
73. UniProt, 87. UniProt. PSMC3IP - PSMC3 interacting protein (Q9Y275) [Internet]. NCBI Library, [cited 2024 Aug 7]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y275/entry> TNFRSF13B TNF superfamily member 13b [Homo sapiens (human)] - gene - NCBI. U.S. National.
74. Block V, Sevdali E, Recher M, et al. CVID-associated B cell activating factor receptor variants change receptor oligomerization, ligand binding, and signaling responses. *J Clin Immunol.* 2023;43(2):391-405. doi:10.1007/s10875-022-01378-3.

75. Wang E, Konikoff M, Owen W, Maples K. P252 Association of P21R and H159Y polymorphism with common variable immunodeficiency and protein losing enteropathy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017;119(5). doi:10.1016/j.anai.2017.08.282.
76. Ntellas P, Dardiotis E, Sevdali E, Siokas V, Aloizou A-M, Tsinti G, et al. TNFRSF13C/BAFFR P21R and H159Y polymorphisms in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2020;37:101422. doi:10.1016/j.msard.2019.101422.
77. Lougaris V, Baronio M, Moratto D, et al. Monoallelic BAFFR P21R/H159Y mutations and familial primary antibody deficiencies. *J Clin Immunol.* 2016;36(1):1-3. doi:10.1007/s10875-015-0217-6.
78. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, et al. . Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 2006;7:85–94. doi:10.1038/sj.gene.6364283.
79. Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure.* 1994;2(12):1227-40. doi:10.1016/S0969-2126(94)00124-3.
80. Sheriff S, Chang CY, Ezekowitz RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol.* 1994;1(11):789-94. doi:10.1038/nsb1194-789.
81. Beltrame MH, Catarino SJ, Goeldner I, Boldt AB, de Messias-Reason IJ. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front Pediatr.* 2015;2:148. doi:10.3389/fped.2014.00148.
82. [Internet]., MBL2 mannose binding lectin 2 [Homo sapiens (human)] - gene - NCBI. U.S. National Library of Medicine; [cited 2024 Sept 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4153>.
83. Oguz R, Ciftci HS, Gokce M, Ogret Y, Karadeniz S, Pehlivan S, et al. The association of HLA-DRB1 alleles and MBL2 gene variants in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2023 Mar. doi:10.1016/j.htct.2023.02.002.
84. Nadkarni A, Pradhan V, Surve P, Rajadhyaksha A, Rajendran V, Patwardhan M, et al. Mannose-binding lectin (MBL) 2 gene polymorphisms & its association with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus (SLE) patients from Western India. *Indian J Med Res.* 2015;141(2):199-203. doi:10.4103/0971-5916.155558.
85. Speletas M, Gounaris A, Sevdali E, Kompoti M, Konstantinidi K, Sokou R, et al. MBL2 genotypes and their associations with MBL levels and NICU morbidity in a cohort of Greek neonates. *J Immunol Res.* 2015;2015:1–10. doi:10.1155/2015/478412.
86. NCBI, CTLA4 cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 [Homo sapiens (human)] - gene -. U.S. National Library of Medicine; [cited 2024 Sept 2]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1493>.
87. Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and cellular functions of CTLA-4. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1248:7-32. doi:10.1007/978-981-15-3266-5_2.
88. Gardner DH, Jeffery LE, Soskic B, et al. 1,25(OH)2D3 promotes the efficacy of CD28 costimulation blockade by abatacept. *J Immunol.* 2015;195(6):2657-65.

89. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: A moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58-67. doi:10.1182/blood-2017-06-741033.
90. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: Similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239.
91. Oyewole-Said D, Konduri V, Vazquez-Perez J, Weldon SA, Levitt JM, Decker WK. Beyond T-cells: Functional characterization of CTLA-4 expression in immune and non-immune cell types. *Front Immunol*. 2020;11:608024. doi:10.3389/fimmu.2020.608024.
92. Jago CB, Yates J, Câmara NO, Lechler RI, Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(3):463-71. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02478.x.
93. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol*. 1999;162(10):5813-20. PMID:1022981.
94. [Internet]., RS231775 RefSNP report - dbSNP - NCBI. U.S. National Library of Medicine; [cited 2024 Sept 5]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs231775#frequency_tab.
95. L N, R B, LE P, B V der A, C G, E B, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*. 1996;5(7):1075-80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8817351>.
96. i, Biolabs NE. MSCI [Internet]. [cited 2024 Sept 10]. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r0534-msc>.
97. Sept, 118. Biolabs NE. Mwoi [Internet]. [cited 2024]. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r0573-mwoi>.
98. Sept, Biolabs NE. Mboii [Internet]. [cited 2024]. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r0148-mbo>.
99. —. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r0148-mboii>.
100. Sept, Biolabs NE. Btgi [Internet]. [cited 2024]. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r0608-btgi>.
101. Nagy A, Hufnagl K, Bender G, et al. . Association of MBL2 polymorphisms with asthma in children after bronchiolitis. *Pediatrics International*. 2012;54(5):621-7. doi:10.1111/j.1442-200X.2012.03651.x.
102. Sept, Biolabs NE. Bani [Internet]. [cited 2024]. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r0118-bani>.
103. Gordon S, O'Neill LAJ. How the macrophage sees the world: a review of the innate immune system. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:979020. doi:10.3389/fimmu.2022.979020.
104. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. 2005;37(8):829-34.

105. Jacob CM, Pastorino AC, Fahl K, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC.. Autoimmunity in IgA deficiency: Revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *J Clin Immunol*. 2008 Jan 17;28(S1):56–61. doi:10.1007/s10875-007-9163-2.
106. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, Kanariou M, Germeris AE. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol*. 2011;31(4):550-9. doi:10.1007/s10875-011-9536-4.
107. Salzer U, Bacchelli C,. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood*. 2009;113(9):1967-76. doi:10.1182/blood-2008-09-178855.
108. Kakkas I, Tsinti G, Kalala F, Farmaki E, Kourakli A, Kapousouzi A, et al. TACI mutations in primary antibody deficiencies: A nationwide study in Greece. *Medicina*. 2021;57(827). doi:10.3390/medicina57080827.
109. YH L, JB H, SK N. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): A meta-analysis. *Hum Genet*. 2005;116(5):361-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15688186>.
110. H D, J B, C S, H R, R F, M V, et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):4130-2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/939>.
111. GG S, JH K, YH K, YH L. Association between CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to Celiac disease: A meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013;74(9):1214-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770251>.
112. Sic H, Speletas M, Cornacchione V, et al. An activating Janus Kinase-3 mutation is associated with Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent Immune Dysregulation Syndrome. *Front Immunol*. 2017;8(1824):1-14. doi:10.3389/fimmu.
113. Gupta, Anita. "MBL Deficiency as Risk of Infection and Autoimmunity." *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications* 933–953. 20 Mar. 2012, doi:10.1007/978-3-7091-1065-2_42 . [Ηλεκτρονικό]
114. Belfrage E, Jinnestål CL, Jönsen A, Bengtsson A, Åkesson A, Schmidtchen A, Sonesson A. Role of Mannose-binding Lectin and Association with Microbial Sensitization in a Cohort of Patients with Atopic Dermatitis. *Range*. doi:10.1111/j.1442-200X.2012.0365 . [Ηλεκτρονικό] 2012.
115. Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival. *Front Immunol*. 2018; doi:10.3389/fimmu.2018.02285.
116. Sept, Biolabs NE. Eagi-HF® [Internet]. [cited 2024. Available from: <https://www.neb.com/en/products/r3505-eagi-hf>.