



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας
Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Διδακτορική Διατριβή

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΕΣΤΑΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΙΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
(SIAE)**

**ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ
ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ IgA ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ"**

Ανδρέας Δ. Ζησιμάτος BSc (Hons), MSc

Βιοχημικός

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων
για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

© 2018 Ανδρέας Ζησιμάτος

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας (Επιβλέπων)

Ματθαίος Σπελέτας

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Ευθυμία Πετεινάκη

Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας- Κλινικής Μικροβιολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας (Επιβλέπων)

Ματθαίος Σπελέτας

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Ευθυμία Πετεινάκη

Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας- Κλινικής Μικροβιολογίας

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Γεώργιος Κουκούλης

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Χρυσή Χατζόγλου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας

Σωτήριος Ζαρογιάννης

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

Περί Ανοσίας και λοιμού της αρχαίας Αθήνας..

Ακόμη όμως περισσότερον εοσπλαχνίζοντο τους θνήσκοντας και τους ασθενείς όσοι είχαν θεραπευθεί από την νόσον, διότι και εγνώριζαν αυτήν εξ ιδίας πείρας και ήσαν του λοιπού οι ίδιοι πλήρεις θάρρους, καθόσον η νόσος δεν προσέβαλλε δις τον ίδιον άνθρωπον, μετά κακής τουλάχιστον εκβάσεως.

Θουκιδίδης (460-400 π.χ.)

Η ιστορία του Πελοποννησιακού Πολέμου

*Στους γονείς μου Διονύση και Μαρία,
και στον αδελφό μου Παναγιώτη*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Βιογραφικό σημείωμα.....	10
Πρόλογος.....	13
Συνοπτομογραφίες.....	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
1.0 ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ.....	22
1.1 Ταξινόμηση Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών.....	22
1.2 Συχνότητα Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών.....	23
2.0 ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ.....	25
2.1 Επιδημιολογία.....	26
2.2 Κλινικά συμπτώματα της CVID.....	27
2.2.1 Λοιμώξεις.....	27
2.2.2 Αυτοάνοσα νοσήματα.....	27
2.2.3 Γαστρεντερικά νοσήματα.....	28
2.2.4 Κοκκιωματώδης νόσος.....	29
2.2.5 Νεοπλασίες.....	30
2.3 Ανοσοπαθολογία της CVID.....	30
2.3.1 Διαταραχές των Β-κυττάρων.....	30
2.3.2 Διαταραχές των Τ-κυττάρων.....	30
2.3.3 Διαταραχές της φυσικής ανοσίας.....	32
2.4 Γενετική της CVID.....	32
2.4.1 Ανεπάρκεια ICOS.....	32
2.4.2 Ανεπάρκεια CD19.....	33
2.4.3 Ανεπάρκεια TACI.....	34
2.4.4 Ανεπάρκεια BAFFR.....	35
2.4.5 Πολυμορφισμοί του γονιδίου Msh5.....	35
3.0 Εκλεκτική IgA ανεπάρκεια.....	36
3.1 Κλινικά συμπτώματα της sIgAD.....	36
3.1.1 Λοιμώξεις.....	36

3.1.2	Αλλεργίες.....	36
3.1.3	Αυτοάνοσα νοσήματα.....	37
3.2	Ανοσοπαθολογία της IgAD.....	37
3.3	Γενετική της sIgAD.....	37
4.0	Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης σε ασθενείς με CVID και sIgAD.....	38
5.0	Σιαλικά Οξέα.....	38
5.1	Χημική Δομή.....	38
5.2	Τα Σιαλικά Οξέα στη φύση.....	39
5.3	Βιολογικός ρόλος των Σιαλικών Οξέων.....	39
5.3.1	Τα σιαλικά οξέα ως «βιολογικές μάσκες».....	40
5.3.2	Ο ρόλος των σιαλικών οξέων στη μικροβιολογία και στα λοιμώδη νοσήματα.....	40
5.3.3	Παράδειγμα ρόλου των σιαλικών οξέων στην ανοσολογία – Σιγκλεκίνες (Siglecs).....	41
5.4	Μεταβολισμός των σιαλικών οξέων και ο ρόλος της ακετυλεστεράσης του οξέος στο μεταβολισμό τους.....	42
5.4.1	Βιοσύνθεση και ενεργοποίηση σιαλικού οξέος.....	43
5.4.2	Μεταφορά και τροποποίηση σιαλικού οξέος στη συσκευή Golgi.....	43
5.4.3	Καταβολισμός των σιαλικών οξέων και ο ρόλος της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος.....	44
6.0	Η οδός της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος και ο ρόλος της στη ρύθμιση της περιφερικής ανοχής των Β-κυττάρων.....	45
6.1	Μηχανισμοί ανοσιακής ανοχής των Β-κυττάρων που εξαρτώνται από την επαγωγή της σηματοδότησης του BCR (υποδοχέας Β-κυττάρου, B cell receptor).....	47
6.2	Περιφερική ανοσιακή ανοχή των Β-κυττάρων που επιτυγχάνεται από την καταστολή της BCR σηματοδότησης από το μονοπάτι της SIAE-Siglec-SHP-1.....	48
6.2.1	Μόριο CD22 (αλλιώς και σιγκλεκίνη-2).....	48
6.2.2	Ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος.....	49

6.2.3	Πρωτεΐνη Lyn και μόριο SHP-1.....	50
6.2.4	Το μονοπάτι της SIAE-Siglec-SHP-1 (SIAE-Σιγκλεκίνης).....	51
7.0	Μεταλλάξεις του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος και αυτοανοσία στον άνθρωπο.....	54
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
1.0	Σκοπός της μελέτης.....	60
2.0	Ασθενείς της μελέτης.....	60
3.0	Υλικά.....	62
3.1	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA.....	62
3.2	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) των εξονίων του γονιδίου SIAE.....	63
3.3	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) των εξονίων του γονιδίου SIAE.....	64
3.4	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	65
3.5	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR με τη μέθοδο καθαρισμού QIAquick PCR purification kit.....	66
3.6	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR με τη μέθοδο εξαγωγής QIAquick gel extraction.....	67
3.7	Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός.....	68
3.8	Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη.....	69
4.0	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	70
4.1	Απομόνωση DNA.....	70
4.2	PCR των 10 Εξονίων του SIAE.....	71
4.3	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	78
4.4	Καθαρισμός DNA έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας το QIAquick PCR Purification kit της Qiagen.....	80

4.5 Καθαρισμός DNA έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας το QIAquick Gel Extraction kit της Qiagen.....	81
4.6 Αυτόματος προσδιορισμός ακολουθίας DNA(Sequencing).....	82
4.7 Επεξεργασία δεδομένων με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων.....	83
Αποτελέσματα.....	84
1.0 PCR των υπό μελέτη τμημάτων του γονιδίου της SIAE.....	85
2.0 Αποτελέσματα αλληλούχισης Sequencing.....	86
2.1 Οικογένειες που μελετήθηκαν με CVID (5 οικογένειες).....	86
2.2 Οικογένεια που μελετήθηκε με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (οικογένεια No 6)...	89
2.3 Ασθενείς με IgA ανεπάρκεια που όλοι ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες.....	90
3.0 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.....	92
Συζήτηση.....	97
1.0 Μεταλλάξεις του γονιδίου SIAE που εντοπίστηκαν στη μελέτη.....	98
2.0 Άλλες παρατηρήσεις και γενικότερα σχόλια.....	99
Περίληψη.....	101
Abstarct.....	103
Βιβλιογραφία.....	105

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Ανδρέας Ζησιμάτος
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Μελβούρνη, Αυστραλία
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Ζακύνθου 75,
Βούλα, Αττική 166 73
Τηλ: 210-8950852 Κιν: 6972-856696
E-MAIL: andreaszisimatos@gmail.com
ΟΙΚΟΓΕΝΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμος
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (άριστα)
ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ: Εκπληρωμένες

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

1997-1999:

M.Sc. Clinical Biochemistry with Molecular Biology,

Department of Biological Sciences, University of Surrey, U.K. (Μάστερ Κλινικής Βιοχημείας με Μοριακή Βιολογία.)

Διπλωματική Εργασία: "Measurement of specific immunoglobulins in patients with wasp sting allergy", Immunology Department, Royal Surrey County Hospital

1990-1994:

B.Sc. Honours in Biochemistry,

Department of Biological Sciences, University of Heriot-Watt, Edinburgh, U.K.

Βαθμός: Second class honours (πτυχίο Βιοχημείας με βαθμό 7,5 σε αντιστοιχία της κλίμακας του Δικατσά.)

Διπλωματική Εργασία: "Digestion and digestive enzymes in the Atlantic Salmon *Salmo salar*"

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2/2011-σήμερα:

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα: Μελέτη του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος (SIAE), σε ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια και εκλεκτική IgA ανεπάρκεια.

9/2009-1/2011:

Εκπαίδευση και πρακτική άσκηση σε κυτταρικές τεχνικές και σε τεχνικές μοριακής βιολογίας, στο εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

9/2007-8/2009:

Εργαζόμενος ως εξωτερικός συνεργάτης επιστημονικού προγράμματος, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, για το εργαστήριο φυσιολογίας θρέψεως και διατροφής. Συγκεκριμένα, έκανα εκτεταμένη έρευνα βιβλιογραφίας προκειμένου να μελετηθούν οι επιπτώσεις της χορήγησης γλουταμίνης, αργινίνης και ω-3 λιπαρών οξέων στο ανοσιακό σύστημα θηλαστικών ζώων αλλά και του ανθρώπου. Πραγματοποίησα ανασκόπηση στο συγκεκριμένο θέμα που μπορεί να αποτελέσει τη βάση μίας δημοσίευσης (review).

9/2005-8/2007:

Εργαζόμενος ως καθηγητής Αγγλικής γλώσσας. Συγκεκριμένα, έκανα ιδιαίτερα μαθήματα Αγγλικών σε αρχάριους μαθητές αλλά και σε μέσο επίπεδο (lower).

9/2004-8/2005:

Εργαζόμενος ως CRA (Clinical Research Associate) στην εταιρεία CRO, MEK consulting Hellas. Συγκεκριμένα ήμουν υπεύθυνος για την έναρξη και τη διασφάλιση ποιότητας για κλινική μελέτη στην φάση III. Η μελέτη αυτή αφορούσε φάρμακο της θεραπείας της νόσου του Crohn και στην Ελλάδα συμμετείχαν 2 κέντρα.

4/2001-1/2003:

Δίχως να έχω διοριστεί από το νοσοκομείο, με χρηματοδοτούμενο πρωτόκολλο, εργάσθηκα ως Βιοχημικός στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό κέντρο και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Πήξης και Αιμόστασης. Παραδείγματα από εργαστηριακές εξετάσεις που έκανα είναι η λειτουργικότητα αιμοπεταλίων, μέτρηση πρωτεΐνης C, μέτρηση πρωτεΐνης S, και μέτρηση αιμοσιδερίνης ούρων.

6/1995-7/1996:

Κατά τη διάρκεια της στρατιωτικής μου θητείας, απασχολήθηκα ως κλινικός βιοχημικός, στο εργαστήριο Βιοχημείας του 401 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αθηνών. Έκανα εξετάσεις όπως ουρία και κρεατινίνη (νεφρικό έλεγχο) και ALT, AST (ηπατικό έλεγχο) σε εσωτερικούς και εξωτερικούς ασθενείς του νοσοκομείου.

7/1994-12/1994:

Απασχολήθηκα εθελοντικά στο τμήμα Ιστοσυμβατότητας-Ανοσολογίας Μεταμοσχεύσεων του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Γ. Γεννηματάς.

Στο συγκεκριμένο εργαστήριο όπου απασχολήθηκα, γίνεται ο προ-μεταμοσχευτικός έλεγχος υποψήφιων για μεταμόσχευση νεφρού ασθενών από ζώντα και μη ζώντα δότη με τεχνικές μοριακής βιολογίας.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗΣ

SPELETAS M, SEVDALI E, **ZISIMATOS A**, PAPADOPOULOU-ALATAKI E, GERMENIS AE. Sialic acid acetylcetylesterase (SIAE) mutations are not associated with autoimmune disease risk in patients with antibody deficiencies. *Journal of Clinical Immunology* 32(Suppl. 1):403-404, 2012.

15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies, Florence, Italy. October 3-6, 2012.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (sIgAD) είναι η πιο συνήθης πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια με συχνότητα περίπου 1:600 στο καυκάσιο πληθυσμό. Διεθνώς, η sIgAD ορίζεται ως η συγκέντρωση στον ορό ίση ή μικρότερη από 0.07 g/l, με φυσιολογικά επίπεδα IgG και IgM, σε άτομα άνω των 4 ετών. Σε περίπου 10% των ασθενών η sIgAD συνδυάζεται με ανεπάρκεια υποτάξεων IgG κυρίως της IgG₂ και της IgG₄.

Η πλειοψηφία από τα προσβεβλημένα άτομα με sIgAD είναι ασυμπτωματικά, ενώ το 1/3 από αυτά παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων κυρίως του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος, αλλεργίες ή αυτοάνοσα νοσήματα.

Η βασική φαινοτυπική διαταραχή στην sIgAD, είναι η αδυναμία των B-κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνεια τους IgA, να μη μπορούν να διαφοροποιηθούν σε εκκρίνοντα IgA πλασματοκύτταρα, όμως η αιτία της νόσου, δεν είναι ακριβώς γνωστή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η sIgAD είναι σποραδική όμως σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει οικογενές ιστορικό, με όχι σαφή χαρακτήρα κληρονομικότητας.

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) είναι η δεύτερη σε συχνότητα πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια με συχνότητα περίπου 1:25000 στο καυκάσιο πληθυσμό. Χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα IgG, IgA και/ή IgM στον ορό και αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων, κυρίως από το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Επίσης συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσων και νεοπλαστικών διαταραχών.

Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης της νόσου είναι περίπου τα 23 έτη για τους άνδρες και 28 για τις γυναίκες. Η CVID φαίνεται να προσβάλλει και τα δύο φύλλα με την ίδια συχνότητα. Είναι συνήθως σποραδική στο 75-90% των περιπτώσεων ενώ στο 10-25% υπάρχει οικογενές ιστορικό, με όχι σαφή χαρακτήρα κληρονομικότητας.

Μελέτες των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος σε ασθενείς με CVID, έχουν αποκαλύψει φαινοτυπικές και λειτουργικές διαταραχές στα κύτταρα B, στα κύτταρα T, αλλά και πιο πρόσφατα στην φυσική ανοσία, των ασθενών αυτών. Η συχνότερη διαταραχή αφορά ενδογενή ανωμαλία των κυττάρων B, όπου ενώ ο απόλυτος αριθμός τους είναι συχνά φυσιολογικός (σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς), ωστόσο δεν ωριμάζουν σε πλασματοκύτταρα, ικανά για την παραγωγή αντισωμάτων.

Τα τελευταία χρόνια, μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων έχουν συνδεθεί με την CVID, για ένα ποσοστό 5-20% των ασθενών.

Σε περιπτώσεις όπου η CVID έχει οικογενή κληρονομικότητα, και κάποιος από τους γονείς πάσχει από CVID υπάρχει πιθανότητα οι απόγονοι να έχουν και αυτοί CVID ή sIgAD. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε ασθενείς με sIgAD, η sIgAD μπορεί να εξελιχθεί σε CVID.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με CVID εκδηλώνει αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Επίσης στους ασθενείς που εκδηλώνουν τη sIgAD επίσης μπορούν να έχουν αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει στενή συσχέτιση μεταξύ αυτοάνοσων νοσημάτων και CVID, και στενή συσχέτιση μεταξύ αυτοάνοσων νοσημάτων και sIgAD.

Πολύ πρόσφατα, οι Surolija και συν διαπίστωσαν ότι ασθενείς με αυτοάνοσα σύνδρομα εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεις της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος (SIAE) συγκριτικά με φυσιολογικούς. Η SIAE είναι ένα ένζυμο που ρυθμίζει αρνητικά (αναστέλλει) τη σηματοδότηση του υποδοχέα του Β-κυττάρου (BcR) συμμετέχοντας έτσι στην ανοσιακή ανοχή. Ωστόσο, η ακριβής βιολογική σημασία τόσο του SIAE, όσων και των μεταλλάξεων του, δεν είναι μέχρι σήμερα απόλυτα διευκρινισμένη. Από την άλλη, η συμμετοχή του SIAE τόσο στην παθογένεση, όσο και στο φαινότυπο της CVID και της sIgAD (π.χ. στην εκδήλωση αυτοανοσίας) είναι τελείως άγνωστα.

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το γονίδιο της SIAE και οι μεταλλάξεις του σε ασθενείς με CVID και sIgAD όπως επίσης η πιθανή συμμετοχή του γονιδίου αυτού στην παθογένεση και φαινότυπο (π.χ. εκδήλωση αυτοανοσίας) των δύο αυτών νόσων. Συμμετείχαν συνολικά σαράντα (40) ασθενείς. Μεταξύ αυτών, 26 ασθενείς έπασχαν από sIgAD. Δώδεκα (12) από αυτούς τους έπασχαν από αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν 5 οικογένειες με CVID [6 ασθενείς με CVID και 8 συγγενείς τους] κάποιιοι εκ των οποίων είχαν ιστορικό αυτοάνοσων ασθενειών. Αρχικά απομονώθηκε γενωμικό DNA από όλα τα δείγματα. Για όλα τα δείγματα και τα δέκα εξόνια του γονιδίου SIAE ενισχύθηκαν συμπεριλαμβανομένων των ορίων εξονίων-ιντρονίων κάνοντας χρήση συμβατικών PCR. Ύστερα από τον καθαρισμό προϊόντων, αυτόματος προσδιορισμός DNA ακολούθησε.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς του Ανοσολογικού Τμήματος του

Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και ασθενείς του Παιδιατρικού Τμήματος του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου, του Αριστοτελείου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής αποτέλεσε έναν από τους πιο σημαντικούς σταθμούς στη ζωή μου. Μέσα από όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της μελέτης μπόρεσα να αποκτήσω πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες, σε ένα υψηλότερο επιστημονικό επίπεδο. Εκτός όμως αυτών είχα την τύχη και τη τιμή να συνεργαστώ με κάποιους ανθρώπους, οι οποίοι, ο καθένας με το δικό του τρόπο, μου προσέφερε σημαντική αρωγή σε αυτή μου τη προσπάθεια. Θεωρώ λοιπόν υποχρέωση μου να ευχαριστήσω δημοσίως και συγκεκριμένα:

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Ιδιαίτερα, και πιο πολύ από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Αναστάσιο Γερμενή, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, για την εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου, την πολύτιμη συμπαράσταση, καθοδήγηση, κατανόηση αλλά και υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που στάθηκε δίπλα μου σε δύσκολες στιγμές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα, για την επιλογή του θέματος της διατριβής (ένα θέμα που μου άρεσε και βρήκα εξαιρετικά ενδιαφέρον), αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε. Στο σημείο αυτό, επίσης ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας κα. Ευθυμία Πετεινάκη, για την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόταν η συνεισφορά της σε θέματα της διατριβής.

Θερμά ευχαριστώ τον Καθηγητή Πνευμονολογίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Γεώργιο Κουκούλη, την Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας κα. Χρυσή Χατζόγλου, και τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη, για τη συμμετοχή τους στην Επταμελή Επιτροπή της διατριβής μου.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ανοσολογίας κα. Ευφημία Παπαδοπούλου-Αλατάκη του Παιδιατρικού Τμήματος του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου, του Αριστοτελείου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για τη συλλογή δειγμάτων που αποτέλεσαν μέρος από το πολύτιμο υλικό της μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ειρήνη Σεβδαλή για τη σημαντική συνεισφορά της στο πειραματικό μέρος της διατριβής και για τη συναδελφικότητα της. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τη Λίτσα Καραμούτη, τη Φωτεινή Μπαρδάκα, το Γιώργο Χατσίδη, το Στέφανο Τσόχα, την Αγγελική Μπάρδα, το Θέμη Δαρδιώτη, το Βαγγέλη Γιαμούρη και το Ζήση Τσούρη για τη καλή συνεργασία που είχαμε, και για τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο και εύχομαι σε όλους καλή σταδιοδρομία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το φίλο μου Δρ. Γιώργο Λαλιώτη, Μοριακό Βιολόγο για τις συμβουλές του και την υποστήριξη του κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα εγκάρδια να ευχαριστήσω τα ξαδέλφια μου Ανδρέα και Πάνο και επίσης τους φίλους μου Χρήστο Δ., Νίκο Δ. και Αλέξη Α που με στήριξαν και δίνουν ποιότητα στη ζωή μου.

Τέλος ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου, τους γονείς μου Διονύση και Μαρία και τον αδελφό μου Παναγιώτη. Τα λόγια βέβαια είναι φτωχά και ένα ευχαριστώ δεν αρκεί για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς αυτούς. Τους ευχαριστώ για την τόσο πολύτιμη ηθική και υλική συμπαράσταση τους.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A.

AIHA (Autoimmune haemolytic anemia) = Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία

APRIL (A proliferation inducing ligand) = Συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό

B.

BAFF (B-cell activating factor) = Παράγοντας ενεργοποίησης των B-κυττάρων

BAFFR (B-cell activating factor receptor) = Υποδοχέας του BAFF

BcR (B cell receptor) = Υποδοχέας του B-κυττάρου

bp (base pairs) = Ζεύγη βάσεων

C.

CAML (Calcium modulating ligand) = Συνδέτης που συμμετέχει στη ρύθμιση του ασβεστίου

CMP (Cytidine monophosphate) = Μονοφωσφορική κυτιδίνη

CMV (Cytomegalovirus) = Κυτταρομεγαλοϊός

CTP (Cytidine triphosphate) = Τριφωσφορική κυτιδίνη

CVID (Common variable immunodeficiency) = Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια

D.

DMSO (Dimethyl sulphoxide) = Διμέθυλο σουλφοξείδιο

DNA (Deoxyribonucleic acid) = Δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

E.

EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid)

F.

FMF (Familial mediterranean fever)= Οικογενής μεσογειακός πυρετός)

G.

GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) = Αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων)

H.

HLA (Human Leukocyte Antigen) = Ανθρώπινα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας

I.

Icos (Inducible T-cell co-stimulator) = Επαγόμενος συνδιεγέρτης των T-κυττάρων

IFN (Interferon)= Ιντερφερόνη

IgG₄D (selective IgG₄ subclass deficiency) = Εκλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων IgG₄

IL (Interleukin) = Ιντερλευκίνη

Ile (Isoleucine) = Ισολευκίνη

ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition motifs)

ITP (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura) = Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα

L.

Leu (Leucine) = Λευκίνη

M.

MAG (myelin associated glycoprotein)

MHC (major histocompatibility complex) = μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

mRNA (messenger RNA) = Αγγελιαφόρο RNA

N.

Neu5Ac = (N-acetylneuraminic acid) = N-ακετυλονευραμινικό οξύ

Neu5Gc = (N-glycolylneuraminic acid) = N-γλυκολυλο-νευραμινικό οξύ

NK-κύτταρα = (Natural Killer cells) = Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα

P.

PCR = (Polymerase chain reaction) = Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PIDs = (Primary Immunodeficiency diseases) = Πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες

R.

RNA (Ribonucleic acid) = Ριβονουκλεϊκό οξύ

rpm (rounds per minute) = Στροφές ανά λεπτό

S.

Ser (Serine) = Σερίνη

SIAE (Sialic acid acetylsterase) = Ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος

SIAT (Sialic acid acetyltransferase) = Ακετυλοτρανσφεράση του σιαλικού οξέος

sigAD (selective IgA deficiency) = Εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA

SLE (Systemic lupus erythematosus) = Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

T.

TAC1 (Transmembrane activator and CAML interactor) = Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το συνδέτη CAML

TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA buffer) = Ρυθμιστικό διάλυμα TAE

TBE buffer (Tris-Borate-EDTA buffer) = Ρυθμιστικό διάλυμα TBE

TCR (T cell receptor) = Υποδοχέας των T-κυττάρων

TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) = Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α

Tyr (Tyrosine) = Τυροσίνη

U.

U Units=Μονάδες ενζύμου

V.

Val (Valine) = Βαλίνη

W.

Wt (Wildtype) = Άγριου τύπου

1

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (PIDs) είναι μία εξαιρετικά ετερογενής ομάδα άνω των 150 γενετικών νοσημάτων [1,2]. Τα άτομα που πάσχουν από τα νοσήματα αυτά παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων, όπως επίσης και αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσων και κακοήθων νοσημάτων [3,4,5,6].

Οι περισσότερες (PIDs) είναι μονογονιδιακές και κληρονομούνται με απλή Μενδέλια κληρονομικότητα. Μερικές όμως ακολουθούν σύνθετη πολυγονιδιακή κληρονομικότητα [7,8]. Στα νοσήματα αυτά παρατηρείται ποσοτική ή λειτουργική ανεπάρκεια ή και τα δύο ενός ή περισσότερων κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, π.χ. των Β, των Τ, ή των ΝΚ-κυττάρων, των φαγοκυττάρων, των ουδετεροφίλων, ή και μορίων που συνδέονται με αυτά, όπως των αντιγόνων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), τάξης Ι ή ΙΙ. Υπάρχουν επίσης PIDs που εμπλέκουν ανεπάρκειες του συμπληρώματος [7,9,10].

1.1 Ταξινόμηση Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών

Στο σχετικά πρόσφατο συνέδριο που έγινε στην Νέα Υόρκη το 2011, 31 νέες PIDs προστέθηκαν. Οι PIDs ταξινομήθηκαν (κατηγοριοποιήθηκαν) σε 8 βασικές ομάδες [11,12]:

Ομάδα Ι: Συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες Τ και Β κυττάρων (Combined Immunodeficiencies)

Ομάδα ΙΙ: Σαφώς καθορισμένα σύνδρομα πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας (Well-defined syndromes with immunodeficiency)

Ομάδα ΙΙΙ: Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (Predominantly antibody defects)

Ομάδα ΙV: Νοσήματα ανοσιακής δυσλειτουργίας (Diseases of immune dysregulation)

Ομάδα V: Συγγενή ελλείμματα φαγοκυττάρων (ως προς τον αριθμό, ή/και τη λειτουργία (Congenital defects of phagocyte number, function, or both)

Ομάδα VI: Ελλείμματα της φυσικής ανοσίας (Defects in innate immunity)

Ομάδα VII: Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα (Autoinflammatory disorders)

Ομάδα IIX: Ανεπάρκειες παραγόντων του συμπληρώματος (Complement deficiencies)

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) και η εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA (sIgAD) είναι και οι δύο πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (ομάδα III).

1.2 Συχνότητα Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών

Η συχνότητα των νοσημάτων αυτών κυμαίνεται. Η πιο συνήθης PID είναι η εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (sIgAD), με συχνότητα περίπου 1:600 στο καυκάσιο πληθυσμό [13, 14]. Η πλειοψηφία των ασθενών με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια είναι χωρίς κλινικά συμπτώματα [13,15]. Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) έχει περίπου συχνότητα 1:25000 στους Καυκάσιους [16,17] και είναι η δεύτερη σε συχνότητα πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια [18]. Για τις πιο σπάνιες μορφές πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών η συχνότητα τους είναι και 1:1000 000 [9].

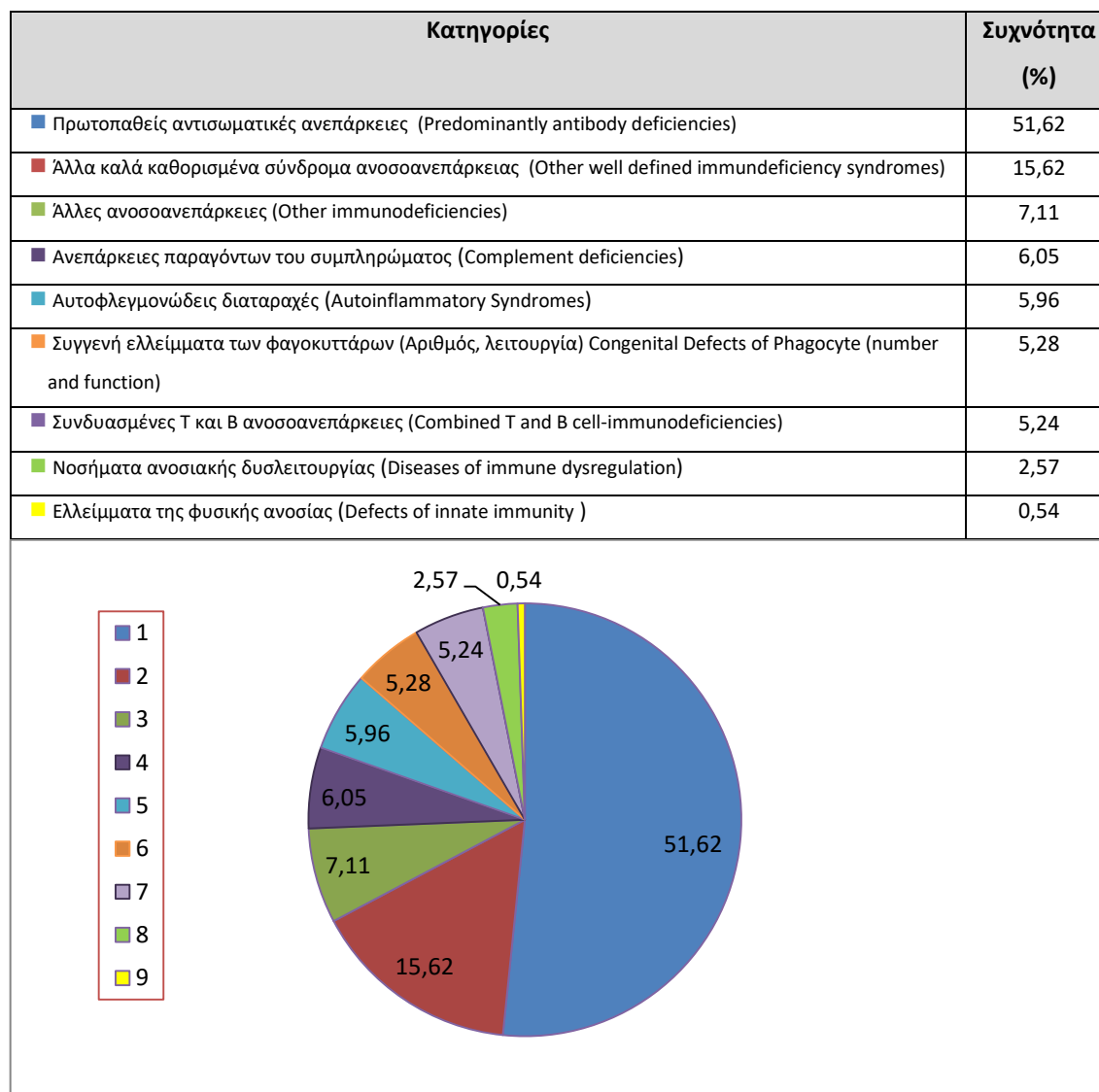
Ένας αυξανόμενος αριθμός ενηλίκων διαγιγνώσκονται με PID. Πρόσφατες μελέτες εκτιμούν ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες, μέχρι 1:1200 άνθρωποι διαγιγνώσκονται με κάποια μορφή πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας [19] .

Μολονότι, οι περισσότερες PIDs είναι σχετικά σπάνιες, είναι συχνότερες από ό,τι γενικά πιστεύονταν [20,21,22]. Υπάρχει έλλειψη ενημέρωσης του κοινού αλλά και των Ιατρών σχετικά με αυτά τα νοσήματα, που έχει ως αποτέλεσμα την χρονική καθυστέρηση στη διάγνωση τους [20,21]. Η έγκυρη διάγνωση και θεραπεία των PIDs σώζει ζωές, εμποδίζει τη νοσηρότητα και βελτιώνει τη ποιότητα ζωής των ασθενών που πάσχουν από αυτές τις ασθένειες [20].

Σε μία πρόσφατη μελέτη όπου μετείχαν συνολικά 60364 ασθενείς, με διαγνωσμένη κάποια πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια, από 64 συνολικά χώρες, από

τους 5 ηπείρους της γης βρέθηκε ότι από άποψη συχνότητας, οι ανοσοανεπάρκειες των Β-κυττάρων (ανεπάρκεια παραγωγής αντισωμάτων – χυμικής ανοσίας), ήταν οι πιο συχνές, με συχνότητα 51,62%. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει αναλυτικά τη συχνότητα [ποσοστά(%)] για όλες τις κατηγορίες των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, παγκοσμίως [21].

Πίνακας 1. Βασικές κατηγορίες Πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών και η συχνότητα τους παγκοσμίως (από Modell V et al., με τροποποιήσεις [21]).



2.0 ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Η CVID χαρακτηρίζεται από αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων, κυρίως από το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Επίσης, συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσων και νεοπλαστικών διαταραχών [23,24,25].

Το 2014 το ESID (European society of immune diseases) δημοσίευσε αναθεωρημένα κριτήρια όσο αφορά τη διάγνωση της CVID (πίνακας 2) [26].

Πίνακας 2. Αναθεωρημένα ESID (2014) διαγνωστικά κριτήρια για την CVID. (από Ameratunga R et al. [26]).

Τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω:

- Αυξημένη ευπάθεια σε λοιμώξεις
- Αυτοάνοσες εκδηλώσεις
- Κοκκιωματώδης νόσος
- Ανεξήγητη πολυκλωνική λεμφοϋπερπλασία
- Μέλος της οικογένειας προσβαλλόμενο με αντισωματική ανεπάρκεια

Και μειωμένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών IgG και IgA με ή χωρίς μειωμένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης IgM (που έχουν μετρηθεί τουλάχιστον δύο φορές < 2 SD (τυπική απόκλιση) των φυσιολογικών επιπέδων για την ηλικία τους)

Και τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα:

- Φτωχή απόκριση αντισωμάτων στον εμβολιασμό (και/ή απουσία ισοαιμοσυγκολλητινών) δηλ. απουσία προστατευτικών επιπέδων παρόλο ότι έγινε εμβολιασμός
- Μειωμένος αριθμός μνημονικών B-κυττάρων που έχουν υποστεί μεταστροφή ($<70\%$ σχετιζόμενη με την ηλικία φυσιολογική τιμή)

Και δευτεροπαθείς αιτίες υπογαμμασφαιριναιμίας έχουν εξαιρεθεί (υπάρχει ξεχωριστή λίστα στο <http://esid.org/Working-Parties/Registry/Diagnosis-criteria>)

Και η διάγνωση να έχει γίνει μετά από το τέταρτο έτος της ζωής (αλλά τα συμπτώματα μπορεί να προϋπάρχουν)

Και να μην υπάρχει ένδειξη προφανής ανεπάρκειας T-κυττάρων, που ορίζεται ως δύο από τα παρακάτω (όπου γ= ηλικία):

- Αριθμός CD4 κυττάρων/μL: 2-6 γ <300 , 6-12 γ <250 , >12 γ <200
- % Παρθένων CD4 κυττάρων : 2-6 γ $< 25\%$, 6-12 γ $< 20\%$, >16 γ $<10\%$
- Απουσία πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων

Η CVID περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Janeway και τους συνεργάτες του το 1953 [27].

2.1 Επιδημιολογία

Η CVID έχει συχνότητα περίπου 1:25000 στο καυκάσιο πληθυσμό, και είναι αρκετά πιο σπάνια στην Ασία και στην Αφρική [16,28]. Η νόσος προσβάλλει και τα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα [29,30]. Η CVID συνήθως είναι σποραδική στο 75-90% των περιπτώσεων ενώ στο 10-25% υπάρχει οικογενειακό ιστορικό [29]. Όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό, η CVID κληρονομείται με σωματικό επικρατούντα χαρακτήρα στις 80% των περιπτώσεων [28].

Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός, ότι σε αντίθεση με το σύνολο σχεδόν των PIDs, άνω του 50% των ασθενών με CVID πρωτοεκδηλώνει τη νόσο κατά την ενήλικη ζωή. Έτσι σε μία αναδρομική μελέτη σε 248 ασθενείς με CVID από τις Ηνωμένες Πολιτείες, ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης των συμπτωμάτων της νόσου ήταν τα 23 έτη για τους άνδρες και τα 28 έτη για τις γυναίκες, ενώ ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης ήταν τα 29 έτη για τους άνδρες και τα 33 χρόνια για τις γυναίκες [31].

Σε μία μελέτη με Ιταλούς ασθενείς οι Quinti *et al.* παρατήρησαν ότι η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν 26,6 με μέση καθυστέρηση διάγνωσης τα 8,9 χρόνια [24], ενώ σε μία άλλη μελέτη, οι Chapel *et al.* σε ασθενείς από πέντε διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες, παρατήρησαν ότι η μέση καθυστέρηση διάγνωσης ήταν τα 7,46 χρόνια [32].

Το γεγονός της καθυστερημένης διάγνωσης των ασθενών αυτών είναι ένα σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας, μιας και αρκετοί ασθενείς διαγιγνώσκονται όταν έχουν ήδη εγκατασταθεί σοβαρές και μη αναστρέψιμες επιπλοκές, κύρια από το αναπνευστικό σύστημα, όπως χρόνια ατελεκτασία, βρογχεκτασία, πνευμονική ίνωση και σε μερικούς ασθενείς αναπνευστική ανεπάρκεια [33].

2.2 Κλινικά συμπτώματα της CVID

2.2.1 Λοιμώξεις

Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος όπως ιγμορίτιδα, βρογχίτιδα, και πνευμονία είναι το πιο σύνηθες κλινικό χαρακτηριστικό σε ασθενείς με CVID. Επίσης, υποτροπιάζουσες ωτίτιδες είναι συχνές [29,34,35]. Οι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με CVID, είναι τα βακτήρια *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae*, που συνήθως είναι η αιτία των παραπάνω παθήσεων [29,34,35].

Επίσης, λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος, δεν είναι ασυνήθιστες και αποτελούν μέρος του κλινικά ετερογενούς κλινικού φαινοτύπου της νόσου [28]. Στη πρόσφατη μελέτη των Oksenhendler *et al.*, 47% των ασθενών με CVID υπέφεραν από χρόνιες ή υποτροπιάζουσες διάρροιες, όπου το πρωτόζωο *Giardia* και βακτήρια της οικογένειας *Salmonella* και *Campylobacter* ήταν συχνά ευρήματα [36].

Οι ασθενείς με CVID είναι πιο επιρρεπείς σε μηνιγγίτιδες σχετικά με το γενικό πληθυσμό [36,37]. Στην προαναφερόμενη μελέτη των Oksenhendler *et al.*, διάρκειας 35 μηνών, σε ένα σύνολο 252 ασθενών με CVID, σε 20 από τους 252 ασθενείς αναφέρθηκε μηνιγγίτιδα. Σε 8/20 το παθογόνο μικρόβιο ήταν *Streptococcus pneumoniae*, σε 2/20 ήταν *Neisseria meningitis*, σε 3/20 ήταν *Haemophilus influenzae*, σε 1/10 από τον ιό Coxsackie, ενώ 6/20 είχαν λεμφοκυτταρική μηνιγγίτιδα [36].

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ασθενείς με CVID, συνήθως, καταπολεμούν τις ιογενείς λοιμώξεις φυσιολογικά, με εξαίρεση τις λοιμώξεις από εντεροϊούς, τον ιό του απλού έρπητα, τον έρπητα ζωστήρα, και λοιμώξεις από κυτταρομεγαλοϊό [38].

2.2.2 Αυτοάνοσα νοσήματα

Αυτοάνοσες εκδηλώσεις, παρουσιάζονται σε περίπου 30% των ασθενών με CVID [28]. Αυτοάνοσες κυτταροπενίες, και ειδικότερα αυτοάνοση (ιδιοπαθής) πορφύρα (ITP), και αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (AIHA) είναι τα πιο συχνά

αυτοάνοσα νοσήματα που διαγνώσκονται σε ασθενείς με CVID [39]. Η αυτοάνοση ουδετεροπενία εμφανίζεται πιο σπάνια από ότι η ITP ή η AIHA [40].

Οι ασθενείς με CVID παρουσιάζουν ITP σε ποσοστό περίπου 10-12% ενώ AIHA σε ποσοστό περίπου 5-7% [28]. Περίπου το 1/3 των ασθενών με CVID παρουσιάζουν σπληνομεγαλία [29].

Πληθώρα άλλων αυτοάνοσων νόσων, όπως αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, λεύκη, κακοήγη αναιμία, ψωρίαση, ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθηματώδη λύκος, σύνδρομο Sjorgen, και πρωτοπαθής χολική κίρρωση έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με CVID, σε υψηλότερα ποσοστά από το γενικό πληθυσμό [41,42,43].

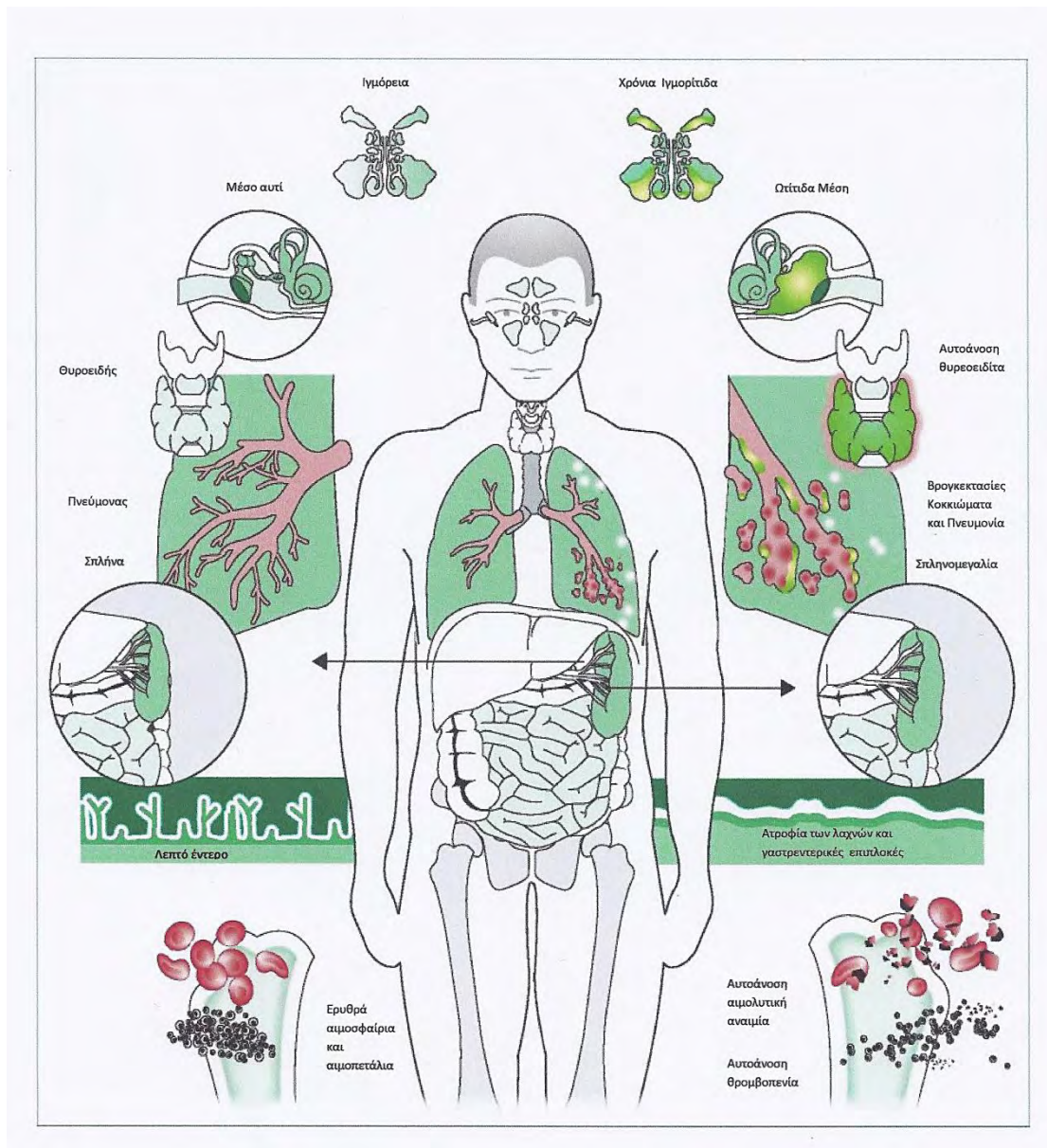
2.2.3 Γαστρεντερικά νοσήματα

Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανοσιακού συστήματος και παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες της ανοσοσφαιρίνης A (IgA). Για το λόγο αυτό είναι φυσικό επακόλουθο, ένα ποσοστό από ασθενείς που πάσχουν από CVID ή sIgAD, να εμφανίζουν γαστρεντερικά νοσήματα [44]. Γενικά παθολογικά συμπτώματα ασθενών με CVID, με γαστρεντερικά νοσήματα περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, ναυτία, διάρροια και απώλεια βάρους.

Ένα ποσοστό 20-60% των ασθενών με CVID παρουσιάζουν γαστρεντερικά νοσήματα [41,45]. Αυτές μπορεί να είναι μικροβιακής αιτιολογίας όπως έχει προαναφερθεί, είτε άλλης αιτίας [41,44].

Αρκετά είναι τα γαστρεντερικά συμπτώματα που έχουν περιγραφεί στη CVID, όπως χρόνια διάρροια, φλεγμονή του λεπτού και του παχέος εντέρου, που έχουν κοινά γνωρίσματα με τη νόσο του Crohn, ή την ελκώδη κολίτιδα [44,45].

Μία άλλη συχνή γαστρεντερική εκδήλωση στους ασθενείς με CVID είναι οι βλάβες που παρατηρούνται στις λάχνες του λεπτού εντέρου επίπεδες, και συσχετίζονται με διάρροια και δυσαπορρόφηση λίπους, πάθηση που μοιάζει πολύ με την κλασσική κοιλιοκάκη [44,46].



Εικόνα1: Όργανα συστημάτων που εμπλέκονται στην παθογένεση της CVID.

Αριστερά: Υγιή όργανα. **Δεξιά:** Όργανα που εμπλέκονται στην παθογένεση της CVID. Οι ασθενείς με CVID επίσης έχουν αυξημένη πιθανότητα νεοπλασιών, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, λεύκης, και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (από Park MA et al. με τροποποιήσεις [29]).

2.2.4 Κοκκιωματώδης νόσος

Περίπου 8-20% των ασθενών με CVID εκδηλώνει μη νεκρωτική κοκκιωματώδη νόσο, παρόμοια με τη σαρκοείδωση. Τα κοκκιώματα στις περισσότερες περιπτώσεις βρίσκονται στον πνεύμονα, τους λεμφαδένες, το ήπαρ και το δέρμα αλλά μπορούν να βρεθούν και σε οποιοδήποτε άλλο ιστό [48,49].

Σε μερικές περιπτώσεις τα κοκκιώματα μπορεί να συνοδεύονται με μια έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση, των προσβεβλημένων οργάνων (π.χ. πνευμόνων, λεμφαδένων, σπληνός), με άγνωστο μέχρι τώρα παθογενετικό μηχανισμό [50].

Ασθενείς με CVID και κοκκιωματώδη νόσο, είναι πιθανότερο να αναπτύξουν αυτοανοσία από ασθενείς με CVID χωρίς κοκκιωματώδη νόσο, γεγονός που υποδηλώνει μια σχετιζόμενη παθογένεια [48].

2.2.5 Νεοπλασίες

Οι ασθενείς με CVID εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου, κυρίως λεμφωμάτων non-Hodgkin και αδενοκαρκινώματος του στομάχου [41,51].

2.3 Ανοσοπαθολογία της CVID

Μελέτες των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος σε ασθενείς με CVID, έχουν αποκαλύψει φαινοτυπικές και λειτουργικές διαταραχές στα κύτταρα Β, στα κύτταρα Τ, αλλά και πιο πρόσφατα στην φυσική ανοσία [28].

2.3.1 Διαταραχές των Β-κυττάρων

Η συχνότερη διαταραχή αφορά ενδογενή ανωμαλία των Β-κύτταρων, όπου ενώ ο απόλυτος αριθμός τους είναι συχνά φυσιολογικός (σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς), ωστόσο δεν ωριμάζουν σε πλασματοκύτταρα, ικανά για την παραγωγή αντισωμάτων [18,52,53].

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι ασθενείς με CVID έχουν χαμηλότερο αριθμό λειτουργικών Β-μνημονικών κυττάρων (εκφράζουν το μόριο CD27) [54]. Η παρουσία χαμηλού αριθμού μνημονικών Β-κυττάρων στο αίμα των ασθενών, έχει συσχετιστεί με συχνότερη εμφάνιση συγκεκριμένων επιπλοκών της νόσου, όπως βρογχεκτασιών, κοκκιωματώδους νόσου, αυτοανοσίας και σπληνομεγαλίας [54,55].

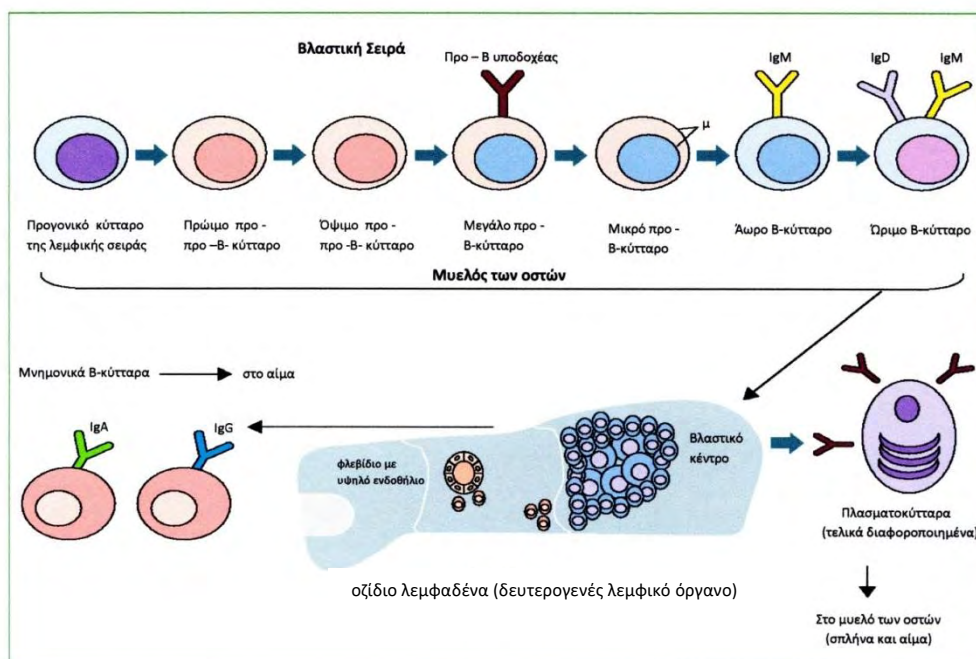
2.3.2 Διαταραχές των Τ-κυττάρων

Διαταραχές τόσο ποσοτικές όσο και λειτουργικές, των Τ-κυττάρων έχουν παρατηρηθεί σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με CVID [53].

Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με CVID, έχει μειωμένο τον υποπληθυσμό των CD4⁺ βοηθητικών T-κυττάρων, ειδικά των παρθένων (CD4⁺ CD45RA⁺) [57,58]. Επίσης, σε μία υποομάδα ασθενών με CVID με αυτοανοσία και κοκκιώματα ο αριθμός των ρυθμιστικών T-κυττάρων είναι ελαττωμένος, αλλά επίσης και η λειτουργία τους [59,60].

Μελέτες των T-κυττάρων σε ασθενείς με CVID, έχουν αποκαλύψει αρκετές διαταραχές στα T-κύτταρα όπως μειωμένη έκκριση των κυτταροκινών IL-2, IL-5, και IL-10, σε σύγκριση με υγιείς δότες. Οι τρεις αυτές κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των B-κυττάρων [61-65].

Άλλες διαταραχές των T-κυττάρων σε ασθενείς με CVID περιλαμβάνουν την αυξημένη απόπτωση των T-κυττάρων λόγω αυξημένης έκφρασης CD95 (Fas) [66] και τη μειωμένη παραγωγή αντιγόνου-ειδικών T-κυττάρων μνήμης [67].



Εικόνα 2 : Η Ωρίμανση και διαφοροποίηση του B-κυττάρου. Τα B-κύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών από πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, ύστερα από αναδιάταξη των γονιδίων της βαρικής αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης και της ελαφριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης, και αρχική επιλογή του ρεπερτορίου έναντι αυτοαντιδραστικών B-κυττάρων. Τα ώριμα B-κύτταρα που εκφράζουν IgM και IgD μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο αίμα και εισέρχονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Σε μερικά από τα ώριμα B-κύτταρα, πριν την ενεργοποίησή τους επισυμβαίνει ισοτοπική μεταστροφή και αρχίζουν να εκφράζουν και να παράγουν ανοσοσφαιρίνες άλλου ισότοπου, εκτός των IgM και IgD. Μερικά από τα ώριμα ενεργοποιημένα B-κύτταρα ωριμάζουν σε πλασματοκύτταρα και παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Άλλα ενεργοποιημένα B-κύτταρα δεν εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη αλλά μετατρέπονται σε μνημονικά B-κύτταρα, τα οποία, απουσία αντιγονικού ερεθίσματος επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα επανακυκλοφορούμενα μεταξύ αίματος, λέμφου και λεμφικών οργάνων. (από Park MA et al. με τροποποιήσεις [29]).

2.3.3. Διαταραχές της φυσικής ανοσίας

Τα τελευταία χρόνια, διαταραχές της φυσικής ανοσίας έχουν επίσης ενοχοποιηθεί ως αιτία για CVID φαινότυπο [68,69,70].

2.4 Γενετική της CVID

Όπως έχει προαναφερθεί, η CVID συνήθως είναι σποραδική στο 75-90% των περιπτώσεων ενώ μόνο στο 10-25% υπάρχει οικογενειακό ιστορικό. Όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό η CVID κληρονομείται με σωματικό επικρατούντα χαρακτήρα στις 80% των περιπτώσεων. Η νόσος προσβάλλει και τα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα [27-29].

Σε περιπτώσεις όπου η CVID έχει οικογενή κατανομή, και κάποιος από τους γονείς πάσχει από CVID υπάρχει πιθανότητα οι απόγονοι να έχουν και αυτοί CVID ή εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (sIgAD) ή ακόμα και εκλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων IgG (selective IgG subclass deficiency) [16,71]. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε ασθενείς με sIgAD, η διαταραχή αυτή μπορεί να εξελιχθεί σε CVID [72-74].

Αρχικά, αρκετές μελέτες γενετικής σύνδεσης είχαν επικεντρωθεί στην περιοχή του HLA και έδειξαν κάποια συσχέτιση της CVID με την sIgAD [74-76].

Το 2003 οι μεταλλάξεις του γονιδίου ICOS ταυτοποιήθηκαν ως η πρώτη γενετική βλάβη που προκαλεί CVID φαινότυπο [78].

Μεταγενέστερα, ανακαλύφθηκαν και άλλες μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων που έχουν συνδεθεί με το φαινότυπο CVID. Παραδείγματα είναι βλάβες στα γονίδια που κωδικοποιούν για το μόριο CD19, την πρωτεΐνη TACI, την πρωτεΐνη BAFFR κ.α. [79]. Το σύνολο των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί τα τελευταία χρόνια έχουν συνδεθεί με τη CVID σε ένα ποσοστό περίπου 5-20%.

2.4.1 Ανεπάρκεια ICOS

Η ανεπάρκεια ICOS έχει συχνότητα < 1% ως αιτία για CVID. Κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Μεταλλάξεις του γονιδίου ICOS έχουν περιγραφεί ως ομόζυγες ή διπλά ετερόζυγες ελλείψεις (deletions) σε άτομα με

καταγωγή από τη περιοχή του Μέλανα Δρυμού (δάσος στη περιοχή Νοτιοδυτικής Γερμανίας) [78,80].

Οι γενετικές αυτές βλάβες οδηγούν σε ανεπάρκεια έκφρασης του συνδιεργετικού μορίου ICOS από τα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, με αποτέλεσμα την σημαντικά ελαττωμένη έκκριση των κυτταροκινών IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ και κυρίως της IL-10. Η IL-10 παίζει σημαντικό ρόλο στο πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα και μνημονικά Β-κύτταρα [81,82].

Το μόριο ICOS εκφράζεται αποκλειστικά στα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, και είναι επίσης σημαντικό για το σχηματισμό βλαστικών κέντρων, την ιστοπική μεταστροφή και την ανάπτυξη των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων [81-83].

2.4.2 Ανεπάρκεια CD19

Η ανεπάρκεια CD19 έχει συχνότητα < 1% ως αίτιο CVID. Κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί το μόριο CD19. Μεταλλάξεις στο γονίδιο CD19 έχουν ως αποτέλεσμα είτε την ολική απουσία του μορίου CD19 στα κύτταρα Β, ή την σημαντικά ελαττωμένη έκφραση του μορίου CD19 στα Β-κύτταρα [84].

Φυσιολογικά, το μόριο CD19, εκφράζεται στα Β-κύτταρα σε κάθε στάδιο ωρίμανσης τους, έκτος από το στάδιο του τελικά διαφοροποιημένου πλασματοκύτταρου. Το μόριο CD19 εκφράζεται μόνο στα Β-κύτταρα [85].

Τα μόρια CD19, CD21 (CR2), CD81 και CD225 σχηματίζουν μαζί ένα σύμπλεγμα στην επιφάνεια του Β-κυττάρου που είναι γνωστό ως συνυποδοχέας του Β-κυττάρου (B-cell coreceptor). Ο συνυποδοχέας του Β-κυττάρου λαμβάνει και επεξεργάζεται σήματα από τον υποδοχέα του Β-κυττάρου (B-cell receptor) όταν αυτός έρχεται σε επαφή με αντιγόνο, και είναι πολύ σημαντικός για την ενεργοποίηση του Β-κυττάρου [84,86,87].

Οι ασθενείς με CVID, λόγω CD19 ανεπάρκειας παρουσιάζουν φυσιολογικούς απόλυτους αριθμούς Β-κυττάρων αλλά μειωμένες σε μεγάλο βαθμό συγκεντρώσεις

των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA και IgM. Τα μνημονικά B-κύτταρα είναι επίσης μειωμένα. Οι ασθενείς επίσης αναπτύσσουν θρομβοκυτταροπενία [80, 84].

Η νόσος εργαστηριακά διαγιγνώσκεται εύκολα με την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των B-κυττάρων του αίματος και επιβεβαιώνεται με γενετικό έλεγχο του γονιδίου *CD19* [84].

2.4.3 Ανεπάρκεια TACI

Περίπου 8-10% των ασθενών με CVID έχει ανεπάρκεια TACI (TNFRSF13B) [88,89]. Κληρονομείται με επικρατούντα ετερόζυγο χαρακτήρα, ή υπολειπόμενο ομόζυγο χαρακτήρα, ή σύνθετο ετερόζυγο (compound heterozygous) χαρακτήρα [90,91].

Η πρωτεΐνη TACI ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων TNF και βρίσκεται στα B-Κύτταρα. Είναι κυτταροπλασματικός υποδοχέας των πρωτεϊνών BAFF (TNFSF13B) και APRIL (TNFSF13) και παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, διαφοροποίηση και ομοίωση των B-κυττάρων [88,92,93].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI είναι το TNFRSF13B. Έως σήμερα περισσότερες από 20 TNFRSF13B/TACI μεταλλάξεις έχουν ανακαλυφθεί σε ασθενείς με CVID, που βρίσκονται σε διάφορα σημεία της πρωτεΐνης TACI [95].

Οι συχνότερες αναφερόμενες μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με CVID είναι οι ετερόζυγες (επικρατείς) μεταλλάξεις Cys104Arg και Ala181Glu. Οι 2 μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται σε 6,9% των ασθενών με CVID, αλλά και στο 2% του υγιούς πληθυσμού [40,94]. Μέχρι σήμερα, η ακριβής βιολογική σημασία των μεταλλάξεων του γονιδίου TNFRSF13B δεν είναι απόλυτη ξεκαθαρισμένη [95,96].

Ποντίκια που έχουν εξουδετερωμένο το γονίδιο TNFRSF13B/TACI (TACI^{-/-} knockout mice) αναπτύσσουν ασύμβατη με τη ζωή λεμφοϋπερπλασία, αυτοάνοσες σπειραματονεφρίτιδες, και αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων [97,98].

Οι ασθενείς με CVID συνήθως φέρουν ετερόζυγες TACI μεταλλάξεις που κλινικά συχνά συνοδεύεται με αυτοανοσία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι

η παρουσία 2 μεταλλάξεων TACI, σε ασθενείς με CVID, μία σε κάθε αλληλόμορφο φαίνεται πως παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι παραγωγής μη φυσιολογικών αντισωμάτων από τα Β-κύτταρα και την ανάπτυξη αυτοανοσίας [99].

Το μόριο TACI παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ιστοπική μεταστροφή [100].

2.4.4 Ανεπάρκεια BAFFR

Η ανεπάρκεια BAFFR έχει συχνότητα <1% ως αιτία για CVID. Κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Έχει περιγραφεί σχετικά πρόσφατα σε μία οικογένεια στη Γερμανία, σε 2 ασθενείς αδέρφια. Χαρακτηρίζεται από ομοζυγωτική έλλειψη του γονιδίου TNFRSF13C που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BAFFR (υποδοχέας BAFF). Και οι δύο ασθενείς με ανεπάρκεια BAFFR είχαν μειωμένα επίπεδα IgG και IgM αλλά φυσιολογικά επίπεδα IgA, και εκδήλωσαν CVID σε ενήλικη ηλικία. Όταν εκδηλώθηκε η CVID οι ασθενείς έπασχαν από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις (κυρίως του αναπνευστικού) [41,101].

2.4.5. Πολυμορφισμοί του γονιδίου Msh5

Η πρωτεΐνη Msh5 αποτελεί μέλος μίας οικογένειας πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της μείωσης (πολλαπλασιασμός κυττάρου), στην επιδιόρθωση των αναντιστοιχιών του DNA, π.χ. κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του (DNA mismatch repair), αλλά επίσης στη διαδικασία της ιστοπικής μεταστροφής των αντισωμάτων [41,102].

Πρόσφατα, έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί του γονιδίου Msh5, που έχουν συσχετιστεί με την CVID και την sIgAD. Το γονίδιο Msh5 βρίσκεται στη τρίτη τάξη του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC III) και σχετίζεται με τον απλότυπο A1-B8-DR3. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί όμως έχουν βρεθεί σε μικρότερη συχνότητα και σε υγιή άτομα [80, 102].

Πιθανότατα, οι πολυμορφισμοί του Msh5 προδιαθέτουν σε CVID και sIgAD, αλλά χωρίς τη παρουσία συγκεκριμένων περιβαλλοντολογικών παραγόντων να μην γίνεται εκδήλωση CVID ή sIgAD.

3.0 ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ IgA ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Διεθνώς, η εκλεκτική IgA ανεπάρκεια ορίζεται ως η συγκέντρωση IgA στον ορό ίση ή μικρότερη από 0.07 g/l, με φυσιολογικά επίπεδα IgG και IgM, σε άτομα άνω των 4 ετών [13]. Σε περίπου 10% των ασθενών η sIgAD συνδυάζεται με ανεπάρκεια υποτάξεων IgG κυρίως της IgG₂ και της IgG₄ [103].

Όπως έχει προαναφερθεί παραπάνω, η εκλεκτική IgA ανεπάρκεια είναι η πιο συνήθης PID, με συχνότητα περίπου 1:600 στο καυκάσιο πληθυσμό, και όπως η CVID, είναι αρκετά πιο σπάνια στην Ασία και στην Αφρική [13,14,18].

3.1 Κλινικά συμπτώματα της sIgAD

Η πλειοψηφία από τα προσβεβλημένα άτομα με sIgAD είναι ασυμπτωματικά, ενώ το 1/3 από αυτά παρουσιάζει λοιμώξεις κυρίως του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος, αλλεργίες ή αυτοάνοσα νοσήματα [104,105,106].

3.1.1 Λοιμώξεις

Όπως και στη CVID, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, είναι το πιο σύνηθες κλινικό χαρακτηριστικό σε ασθενείς με sIgAD. Τα βακτήρια που φέρουν κάψα *Haemophilus influenzae*, και *Streptococcus pneumoniae* είναι η κύρια αιτία των παραπάνω λοιμώξεων. Οι ασθενείς που έχουν sIgAD και IgG₂ ανεπάρκεια έχουν πιο συχνές λοιμώξεις και επιπλοκές, συγκριτικά με τους ασθενείς που έχουν μόνο sIgAD [104,107,108].

3.1.2 Αλλεργίες

Αλλεργικές εκδηλώσεις παρατηρούνται πιο συχνά σε ασθενείς με sIgAD από ό,τι στο γενικό πληθυσμό. Οι πιο συνήθεις από αυτές είναι άσθμα, ατοπική δερματίτιδα, αλλεργική ρινίτιδα, αλλεργική επιπεφυκίτιδα, κνίδωση, και αλλεργίες σε κάποια φάρμακα και κάποιες τροφές [104,107]. Υπολογίζεται ότι 25% των ασθενών με sIgAD διαγιγνώσκεται με sIgAD, κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης για αλλεργικές παθήσεις [104].

3.1.3 Αυτοάνοσα νοσήματα

Στη sIgAD, όπως και στη CVID, παρατηρείται επίσης αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η νόσος του Graves, η νόσος του συστηματικού ερυθματώδη λύκου, διαβήτης τύπου Ι, κολιοκάκη και νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα [109,110].

3.2 Ανοσοπαθολογία της sIgAD

Η βασική φαινοτυπική διαταραχή στην sIgAD, είναι η αδυναμία των Β-κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνεια τους IgA, να μη μπορούν να διαφοροποιηθούν σε εκκρίνοντα IgA πλασματοκύτταρα. Όμως η αιτία της νόσου, δεν είναι ακριβώς γνωστή [18,111].

3.3 Γενετική της sIgAD

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η sIgAD είναι σποραδική όμως σε αρκετές περιπτώσεις, υπάρχει οικογενές ιστορικό, με όχι σαφή χαρακτήρα κληρονομικότητας [111]. Όπως έχει προαναφερθεί, η sIgAD μπορεί να εξελιχθεί σε CVID, και έχει παρατηρηθεί ότι σε μία οικογένεια κάποιο μέλος μπορεί να έχει sIgAD και ένα άλλο CVID, γεγονός που προδίδει κάποια γενετική συσχέτιση.

Παρότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων σχετικά με τη γενετική της sIgAD, η γενετική βάση της νόσου παραμένει ασαφής. Ωστόσο, έχουν βρεθεί MHC και μη-MHC γονίδια που συνδέονται με την ανάπτυξη της sIgAD [13,112].

Όσο αφορά το MHC, ο HLA-A1, B8, DR3, DQ2 (8.1) απλότυπος έχει συσχετιστεί με γενετικό κίνδυνο για την sIgAD [13]. Για τα μη-MHC γονίδια, πολυμορφισμοί (variants) στα γονίδια IFIH1 και CLEC16A έχουν συσχετιστεί με γενετικό κίνδυνο για τη νόσο [13,112].

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω κάποιοι πολυμορφισμοί του MSH5 προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της sIgAD [71].

Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά μεταλλάξεις του γονιδίου TAC1 είχαν αναφερθεί σε ασθενείς με sIgAD [113]. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες με

μεγαλύτερο αριθμό ασθενών δείχνουν πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων του TACI με την sIgAD [114,115,116].

4.0 Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης σε ασθενείς με CVID και sIgAD

Σε ασθενείς με CVID, η διά βίου χορήγηση ανοσοσφαιρινών, είτε με ενδοφλέβιο είτε με υποδόριο τρόπο έχει μειώσει θεαματικά την συχνότητα των λοιμώξεων και έχει βελτιώσει τη ποιότητα ζωής των ασθενών αυτών [41,105]. Η συνήθης δοσολογία είναι 400-600 mg/Kg ανά μήνα, χορηγούμενη σε 2-8 δόσεις υποδορίως, ή σε μία δόση ανά 3-4 εβδομάδες ενδοφλεβίως [105, 117]. Σε ασθενείς με CVID που έχουν βρογχεκτασία, η αρχική συνιστούμενη δόση χορήγησης είναι 600mg/kg ανά μήνα [118]. Ο χρόνος ημισείας ζωής των ενδοφλεβίων χορηγούμενων ανοσοσφαιρινών είναι περίπου 35 ημέρες [119].

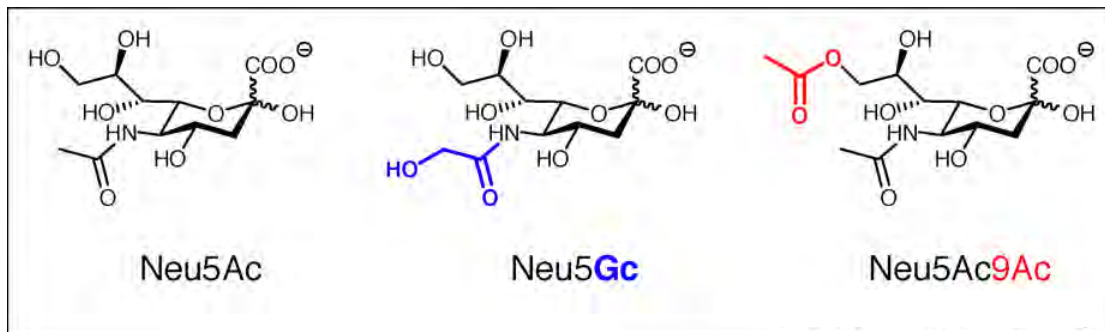
Στους ασθενείς με sIgA σπάνια τίθεται θέμα θεραπείας υποκατάστασης. Η πλειοψηφία των ασθενών που εμφανίζουν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις θεραπεύονται αποτελεσματικά με τη χορήγηση αντιβιοτικών. Στις εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις που οι λοιμώξεις δεν μπορούν να ελεγχθούν από τα αντιβιοτικά, μπορεί να δοκιμαστεί η ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρινών [105].

5.0 Σιαλικά Οξέα

5.1 Χημική δομή

Τα σιαλικά οξέα είναι μια οικογένεια α-κετο-οξέων, που έχουν 9 άτομα άνθρακα. Είναι επίσης μονοσακχαρίτες και παράγωγα του νευραμινικού οξέος [120,121]. Το νευραμινικό οξύ, δεν απαντάται ελεύθερο στη φύση παρά μόνο με τη μορφή των N και O παραγώγων του, τα οποία ονομάστηκαν σιαλικά οξέα. Περισσότερα από 50 σιαλικά οξέα έχουν βρεθεί στη φύση συμπεριλαμβάνοντας το πιο άφθονο το N-ακετυλονευραμινικό οξύ (Neu5Ac) [122,123].

Τα σιαλικά οξέα έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα και φέρουν ηλεκτροαρνητικό φορτίο όταν βρίσκονται σε κύτταρα, ιδιότητες σημαντικές για το βιολογικό τους ρόλο [121,124].



Σχήμα 3: Τα τρία πιο συχνά σιαλικά οξέα : (Neu5Ac) *N*-ακετυλονευραμινικό οξύ, (Neu5Gc) *N*-γλυκοκυλο-νευραμινικό οξύ και (Neu5,9Ac₂) *N*-ακετυλο-9-*O*-ακετυλονευραμινικό οξύ (από Schauer R, [120]).

5.2 Τα Σιαλικά Οξέα στη φύση

Τα σιαλικά οξέα βρίσκονται στη φύση στα σπονδυλωτά, σε μερικά ανώτερα ασπόνδυλα π.χ. όπως αστερίες, αλλά και σε ορισμένους τύπους βακτηριδίων [124].

Στον άνθρωπο, ο εγκέφαλος είναι το όργανο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σιαλικών οξέων στο σώμα, ένα μεγάλο μέρος υπό τη μορφή σιαλυλιωμένων γλυκολιπιδίων (γαγγλιοσίδες) [124,125].

5.3 Βιολογικός ρόλος των Σιαλικών Οξέων

Τα σιαλικά οξέα βρίσκονται στις κυτταρικές εκκρίσεις αλλά και στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων ως επί το πλείστον ως τερματική ομάδα των γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων (γαγγλιοσίδες), εκτίθενται στο κυτταρικό περιβάλλον και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδογενή και εξωγενή επικοινωνία/αναγνώριση του κυττάρου [121,127]

Είναι δύσκολο κάποιος να περιγράψει ένα γενικό ρόλο για τα σιαλικά οξέα επειδή αυτοί οι μονοσακχαρίτες συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα σε πολλαπλά και ποικίλα κυτταρικά γεγονότα [121].

Τα σιαλικά οξέα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, όπως η εμβρυογένεση του νευρικού συστήματος, η μετάσταση του καρκίνου, η ανοσολογική ρύθμιση, και οι λοιμώξεις από ιούς και βακτήρια κ.λπ. [120]. Αξίζει να γίνει αναφορά σε λίγα παραδείγματα του βιολογικού ρόλου των σιαλικών οξέων πιο αναλυτικά.

5.3.1 Τα σιαλικά οξέα ως «βιολογικές μάσκες»

Τα σιαλικά οξέα λειτουργούν πολλές φορές ως «βιολογικές μάσκες» (biological masks), με άλλα λόγια ως παράγοντες «αντι-αναγνώρισης» (antirecognition agents) θωρακίζοντας θέσεις μορίων ή κυττάρων, καταστέλλοντας την αντιγονικότητα τους. Με αυτό τον τρόπο τα σιαλικά οξέα συμβάλλουν σε κύτταρα του οργανισμού να μην αναγνωρίζονται ως «ξένα» από το ανοσιακό σύστημα, και κατά συνέπεια να μην καταπολεμούνται από αυτό [121,128]. Η μερική απώλεια αυτών των σακχάρων έχει προταθεί ως μία αιτία πρόκλησης αυτοανοσίας [128].

Συχνά τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να προστατεύονται αποτελεσματικά από το ανοσιακό σύστημα έχοντας υπέρ-σιαλυλιωμένες επιφάνειες. Αυτό συντελεί στην αύξηση των πιθανοτήτων εξάπλωσης του όγκου (μετάστασης) [128].

5.3.2 Ο ρόλος των σιαλικών οξέων στη μικροβιολογία και στα λοιμώδη νοσήματα

Πολλαπλοί παθογόνοι παράγοντες όπως τοξίνες (π.χ. η τοξίνη της χολέρας), υιοί (π.χ. ινφλουένζα Α, ινφλουένζα Β, ινφλουένζα C), βακτήρια (π.χ. *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*) και πρωτόζωα (π.χ. *Trypanosoma cruzi*) αναγνωρίζουν και προσδέονται στα κύτταρα του ξενιστή, μέσω υποδοχέων του ξενιστή που περιέχουν σιαλικά οξέα [122,129,130].

Για παράδειγμα, ο υιός της γρίπης (influenza virus), στην επιφάνεια του, έχει δυο αντιγονικές γλυκοπρωτεΐνες, το ένζυμο που καταστρέφει τον υποδοχέα του ξενιστή γνωστή ως νευραμινιδάση (σιαλιδάση), και τη λεκτίνη αιμοσυγκολλητίνη. Παρόλο που η αιμοσυγκολλητίνη και η νευραμινιδάση (σιαλιδάση) παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη διαδικασία της μόλυνσης από τον υιό της γρίπης, και οι δύο αυτές πρωτεΐνες αναγνωρίζουν ένα κοινό υποδοχέα σιαλικού οξέος [129,130].

5.3.3 Παράδειγμα ρόλου των σιαλικών οξέων στην ανοσολογία - Σιγκλεκίνες

(Siglecs)

Οι Σιγκλεκίνες (Siglecs)- (Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins), είναι λεκτίνες μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικώς σιαλικά οξέα που προσδένονται με τις τερματικές περιοχές γλυκοσυζευγμάτων της κυτταρικής επιφάνειας. Οι σιγκλεκίνες στον άνθρωπο είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, 14 στο σύνολο [131, 132].

Δύο ομάδες από σιγκλεκίνες έχουν ταυτοποιηθεί. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει σιγκλεκίνες οι οποίες εξελικτικά είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες στα θηλαστικά, και περιλαμβάνει τις σιαλοαντχεσίνη (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), τη γλυκοπρωτεΐνη MAG (Siglec-4) και τη Siglec-15. Η δεύτερη ομάδα από τις σιγκλεκίνες, ονομάζεται CD33-related siglecs (δηλαδή σιγκλεκίνες συγγενείς της CD33), είναι ταχέως εξελισσόμενες και περιλαμβάνουν τις σιγκλεκίνες CD33 και τις σιγκλεκίνες -5,-6,-7,-8,-9,-10,-11,-14 και -16 [131]. Με την εξαίρεση της MAG (Siglec-4), που βρίσκεται στα νευρογλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος, όλες οι άλλες σιγκλεκίνες εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσιακού συστήματος [132].

Οι σιγκλεκίνες είναι σημαντικοί ρυθμιστές του ανοσιακού συστήματος [133]. Παίζουν ρόλο στην αρνητική και θετική ρύθμιση των άνοσων και φλεγμονωδών αποκρίσεων [131]. Επίσης, παίζουν ρόλο στη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής στα Β-λεμφοκύτταρα, περιορίζοντας τις αυτοάνοσες αντιδράσεις [134,135].

Οι σιγκλεκίνες έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με σιαλυλιωμένες συνδέτες στο ίδιο κύτταρο (*cis*), είτε σε γειτονικά κύτταρα (*trans*), έτσι με αυτό τον τρόπο ρυθμίζοντας τις δραστηριότητες τους, όσο αφορά στη σηματοδότηση των κυττάρων και αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου [121,132,135]. Με αυτό τον τρόπο οι σιγκλεκίνες μπορούν να γίνουν ρυθμιστές του ανοσιακού συστήματος [121,133]. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη CD22 (Siglec-2), είναι ανασταλτικός υποδοχέας των Β-κυττάρων, που ρυθμίζει πολλαπλές λειτουργίες των Β-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ορίων της κυτταρικής ενεργοποίησης και την επιβίωση [133]. Για τη πρωτεΐνη CD22 θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω.

5.4 Μεταβολισμός των σιαλικών οξέων και ο ρόλος της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος στο μεταβολισμό τους

Παρακάτω περιγράφεται συνοπτικά ο μεταβολισμός του σιαλικού οξέως και συγκεκριμένα του N-ακετυλονευραμινικού οξέος (Neu5Ac) στα ευκαρυωτικά κύτταρα και όχι στα προκαρυωτικά. Το *σχήμα 4* παρακάτω, απεικονίζει με περισσότερη λεπτομέρεια το μεταβολισμό του. Επίσης, γίνεται αναφορά στο ρόλο των σημαντικότερων ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των σιαλικών οξέων, συμπεριλαμβανομένης της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος.

Ακόμα και για το Neu5Ac (N-ακετυλονευραμινικό οξύ) που είναι το πιο άφθονο σιαλικό οξύ στη φύση, ο μεταβολισμός των βακτηριδίων και των ευκαρυωτικών κυττάρων διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως όσο αφορά τη βιοσύνθεση του σιαλικού οξέος. Επίσης, η εντόπιση των ενζύμων στο κύτταρο που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και μεταφορά του σιαλικού οξέος, καθώς και στην αποικοδόμηση σιαλυλιωμένων γλυκοσυζευγμάτων, είναι διαφορετικές για τα βακτηρίδια και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [120].

5.4.1 Βιοσύνθεση και ενεργοποίηση σιαλικού οξέος

Οι αντιδράσεις για τη σύνθεση και αποικοδόμηση του σιαλικού οξέος γίνονται σε διαφορετικά μέρη του κυττάρου (*σχήμα 4*) [122]. Συγκεκριμένα, η βιοσύνθεση του σιαλικού οξέος στα σπονδυλωτά και στα ανώτερα ασπόνδυλα γίνεται στο κυτταρόπλασμα [120,122]. Πολύ συνοπτικά, το σιαλικό οξύ Neu5Ac συντίθεται ως εξής: η 6-φωσφορική-N-ακετυλομαννοζαμίνη αντιδρά με φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ προς σχηματισμό 9-φωσφορικο-N-ακετυλονευραμινικού οξέος. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο 9-P-N-ακετυλονευραμινική συνθάση. Ύστερα ακολουθεί αποφωσφορυλίωση, και γίνεται η παραγωγή του N-ακετυλονευραμινικού οξέος (Neu5Ac), (*σχήμα 4*) [120,122].

Το Neu5Ac που συντίθεται στο κυτταρόπλασμα μεταφέρεται στο πυρήνα όπου ενεργοποιείται, ύστερα από αντίδραση με τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP). ($\text{Neu5Ac} + \text{CTP} \rightarrow \text{CMP-Neu5Ac} + \text{PPi}$). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο CMP-Neu5Ac-συνθετάση για το σχηματισμό CMP-Neu5Ac [122,136].

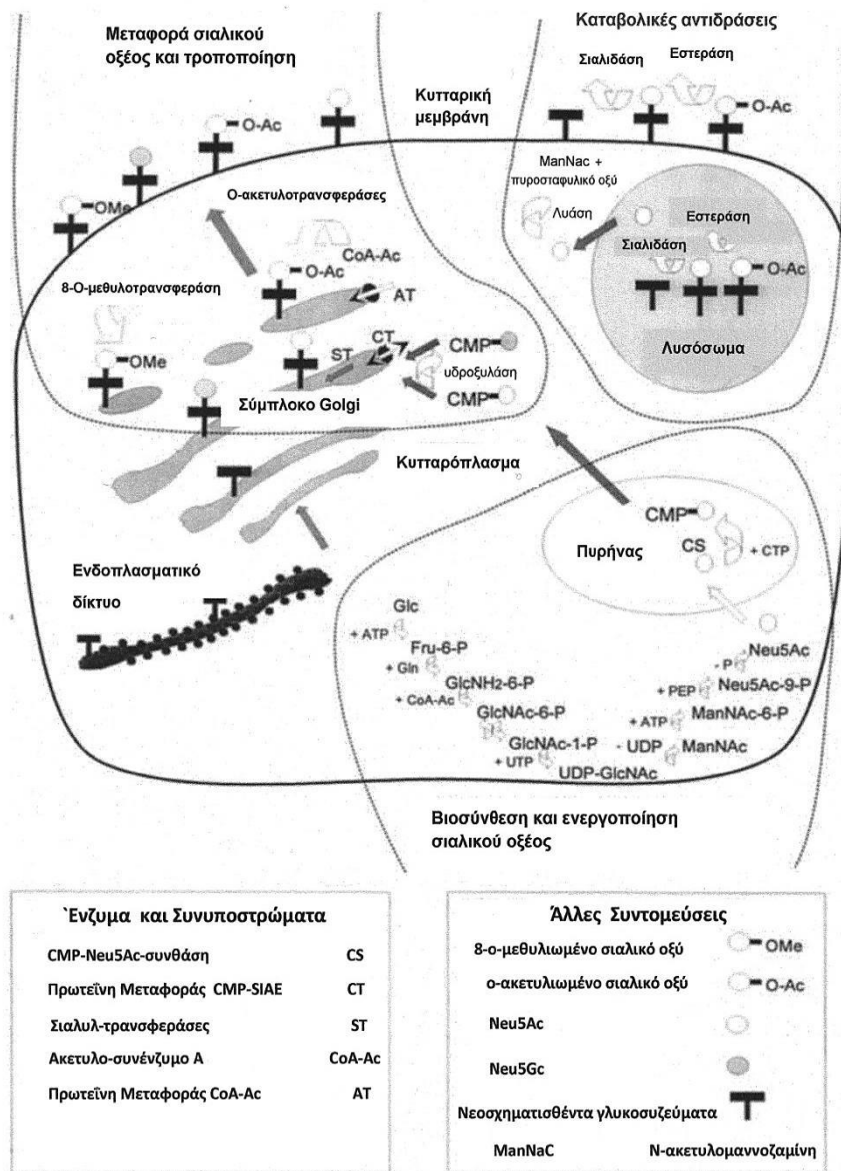
5.4.2 Μεταφορά και τροποποίηση σιαλικού οξέος στη συσκευή Golgi

Το CMP-Neu5Ac ακολούθως μετατοπίζεται στη συσκευή Golgi. Ένα μέρος του CMP-Neu5Ac μετατρέπεται σε CMP-Neu5Gc ύστερα από υδροξυλίωση στο κυτταρόπλασμα [122,137].

Στη συσκευή Golgi το ενεργοποιημένο σιαλικό οξύ μπορεί να μεταφερθεί από μία σιαλυλ-τρανσφεράση σε μία αλυσίδα ενός αρτιγενούς γλυκοσυζεύγματος. Το δεσμευμένο σιαλικό οξύ μπορεί στην συνέχεια να τροποποιηθεί με Ο-ακετυλίωση ή με Ο-μεθυλίωση πριν τη μεταφορά του ώριμου γλυκοσυζεύγματος στην επιφάνεια του κυττάρου [122].

Λεπτομερέστερα, όσο αφορά την ακετυλίωση του σιαλικού οξέος (Neu5Ac) αξίζει να αναφερθεί ότι η Ο-ακετυλίωση στη θέση C-9 είναι σχετικά μια πολύ συχνή τροποποίηση του. Ακετυλίωση του σιαλικού οξέος επίσης συμβαίνει στη θέση C-7 όπου υπό φυσιολογικές συνθήκες η ομάδα ακετυλίου μπορεί αυθόρμητα να μεταναστεύσει στη θέση 9-OH [127]. Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από την ακετυλοτρανσφεράση του 7(9)-Ο- του σιαλικού οξέος [138].

Επειδή η ακετυλ-ομάδα, στους Ο-ακετυλ εστέρες στη θέση 7 μπορεί να μεταναστεύσει αυθόρμητα στη θέση 9, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 9-Ο-ακετυλ-N-ακετυλνευραμινικό οξύ είναι η κυρίαρχη μορφή στα ακετυλιωμένα γλυκοσυζεύγματα στη κυτταρική επιφάνεια [138]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στον άνθρωπο δεν παράγονται 4-Ο ακετυλιωμένα σιαλικά οξέα π.χ. όπως στο άλογο [137,139].



Σχήμα 4: Μεταβολισμός Σιαλικών οξέων : (Από *Traving C et al.*, με τροποποιήσεις [122]).

5.4.3 Καταβολισμός των σιαλικών οξέων και ο ρόλος της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος

Πολύ σημαντικό ρόλο στο καταβολισμό των σιαλικών οξέων παίζουν οι σιαλιδάσες (sialidases) [122]. Σιαλικά οξέα σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια μεταφέρονται σε λυσόσωματα όπου εκεί γίνεται η αποικοδόμηση των γλυκοσυζευμάτων από τη λυσοσωματική σιαλιδάση NEU1 (στον άνθρωπο) [120]. Ελεύθερα μόρια σιαλικών οξέων Neu5Ac ή Neu5Gc που προκύπτουν από την

αποικοδόμηση των σιαλογλυκοσυζευγμάτων αντλούνται πίσω στο κυτταρόπλασμα [122].

Απαραίτητη όμως προϋπόθεση προκειμένου οι σιαλιδάσες να έχουν αποτελεσματική δράση είναι η απομάκρυνση των Ο-ακετυλο ομάδων στη θέση C-9, από τα 9-Ο ακετυλιωμένα μόρια του Neu5Ac, που βρίσκονται σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Η διαδικασία αυτή γίνεται από το ένζυμο ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος (αλλιώς γνωστή και ως ειδική ακετυλεστεράση του 9-Ο-σιαλικού οξέος) [122,139]. Αυτή η διαδικασία γίνεται στα λυσοσώματα [141]. Η SIAE βρίσκεται στα λυσοσώματα αλλά και στο κυτταρόπλασμα [138,141]. Ο ρόλος της SIAE που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα είναι επίσης η απομάκρυνση των Ο-ακετυλο ομάδων στη θέση C-9, αλλά σε μόρια που έχουν διαφύγει από την αρχική δράση της λυσοσωματικής SIAE [141]. Εκτενή αναφορά για την SIAE, ακολουθεί σε παρακάτω μέρος του κειμένου.

Τελικά, τα ελεύθερα μόρια σιαλικού οξέος (Neu5Ac ή Neu5Gc) μεταφέρονται μέσω της λυσοσωματικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα, από πού μπορούν να ανακυκλωθούν ύστερα από ενεργοποίηση και μεταφορά σε ένα άλλο εν τω γεννάσθαι γλυκο-συζυγές μόριο στη συσκευή Golgi. Εναλλακτικά, μπορούν να αποικοδομηθούν σε ακετυλο-μαννοζαμίνη και πυροσταφυλικό οξύ με τη δράση ενός ενζύμου που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα την αλδολάση του σιαλικού οξέος (N-ακετυλο-νευραμινική λυάση) [120,122].

6.0 Η οδός της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος και ο ρόλος της στη ρύθμιση της περιφερικής ανοχής των Β-κυττάρων

Η αλληλεπίδραση του αντιγόνου με τα ειδικά ανοσοϊκανά λεμφοκύτταρα είναι δυνατό να επάγει ανοσιακή απάντηση είτε αυτή είναι χυμική ή κυτταροεξαρτώμενη. Η ανοσιακή ανοχή ορίζεται ως μία κατάσταση μη ανοσιακής απάντησης σε συγκεκριμένα αντιγόνα ή μια σειρά αντιγόνων (immunologic tolerance). Το σύνηθες και φυσιολογικό είναι ένας οργανισμός να μην απαντά ή να δείχνει ανεκτικότητα στα αυτοαντιγόνα (self tolerance). Η ανοχή έναντι αυτών (self

tolerance) αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα του ανοσιακού συστήματος, η απώλεια της οποίας οδηγεί στην εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων [142, 143].

Όταν ένα B-κύτταρο είναι στο άωρο στάδιο της διαφοροποίησης του και εκφράζει IgM στη κυτταρική του επιφάνεια, σε αυτό το στάδιο για πρώτη φορά δοκιμάζεται ο υποδοχέας του αντιγόνου για δραστικότητα έναντι αυτοαντιγόνων (αυτοδραστικότητα). Το είδος αυτό της ανοχής που επάγεται στα άωρα B-κύτταρα και λαμβάνει χώρα σε ένα κεντρικό λεμφικό όργανο, στη περίπτωση αυτή το μυελό των οστών, ονομάζεται κεντρική ανοχή (central tolerance). Αυτοδραστικά B-κύτταρα που έχουν καταφέρει να ξεφύγουν από τους μηχανισμούς κεντρικής ανοχής και οδηγούνται προς ωρίμανση, μπορούν ακόμα να εξαλειφθούν από το ρεπερτόριο των B-κυττάρων, αφού έχουν φύγει από το μυελό των οστών, μία διαδικασία που ονομάζεται περιφερική ανοχή (peripheral tolerance) [144].

Οι πιο καλά μελετημένοι μηχανισμοί ανοσιακής ανοχής των B-κυττάρων είναι οι διαδικασίες της επιδιόρθωσης του υποδοχέα (receptor editing), της εξάλειψης του κλώνου (clonal deletion), και της ανεργίας των κλώνων (clonal anergy). Όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί της ανοσιακής ανοχής των B-κυττάρων εξαρτώνται από την επαγωγή της σηματοδότησης κατάντη του υποδοχέα των B-κυττάρων από αυτο-αντιγόνα [145].

Επίσης, υπάρχει ένας άλλος σημαντικός ξεχωριστός μηχανισμός της ανοσιακής ανοχής των B-κυττάρων όπου γίνεται καταστολή της σηματοδότησης του υποδοχέα του αντιγόνου των B-κυττάρων αντί της επαγωγής του. Ο μηχανισμός αυτός εμπλέκει την κινάση Lyn που ανήκει στην οικογένεια των κινάσεων Src, την τυροσινική φωσφατάση SHP-1, ανασταλτικά μέλη της οικογένειας των σιγλεκινών, και την ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος που έχει ικανότητα να ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των B-κυττάρων [145,146].

6.1 Μηχανισμοί ανοσιακής ανοχής των B-κυττάρων που εξαρτώνται από την επαγωγή της σηματοδότησης του BCR (υποδοχέα B-κυττάρου, B cell receptor).

Στους μηχανισμούς ανοχής των B-κυττάρων της επιδιόρθωσης του υποδοχέα (receptor editing), της εξάλειψης του κλώνου (clonal deletion), και της ανεργίας του κλώνου (clonal anergy), η ενισχυμένη σηματοδότηση του BCR ή και η επαναλαμβανόμενη σηματοδότηση του BCR από ένα αυτο-αντιγόνο επάγει τη διαδικασία της ανοσιακής ανοχής. Η επιδιόρθωση του υποδοχέα (receptor editing), και η εξάλειψη του κλώνου (clonal deletion) αντιπροσωπεύουν μηχανισμούς κεντρικής ανοχής, ενώ της ανεργίας του κλώνου (clonal anergy) η διαδικασία μπορεί να αρχίσει σε ένα κεντρικό ή περιφερικό λεμφικό όργανο αλλά ολοκληρώνεται από περιφερικό λεμφικό όργανο [145].

Άωρα B-κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνεια IgM, και αλληλεπιδρούν ισχυρά με εαυτά αντιγόνα στο μυελό των οστών, αποίπτον στο μυελό των οστών (clonal deletion), ή υπόκεινται σε επιδιόρθωση του υποδοχέα (receptor editing) [147].

Όπως έχει προαναφερθεί, όλα τα λεμφοκύτταρα με έντονη αυτοδραστικότητα δεν υφίστανται κλωνική εξάλειψη. Υπάρχει ένα χρονικό διάστημα πριν το κυτταρικό θάνατο όπου τα αυτοδραστικά B-κύτταρα, μπορούν να διασωθούν κάνοντας περαιτέρω γονιδιακές αναδιατάξεις αντικαθιστώντας τον αυτοδραστικό (self reactive) υποδοχέα με ένα νέο υποδοχέα που δεν είναι αυτοδραστικός. Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται επιδιόρθωση του υποδοχέα (receptor editing) [144]. Στη παραπάνω διαδικασία ενεργοποιούνται το γονίδια RAG1 και RAG2 (recombinase activating genes), που κωδικοποιούν για τα ένζυμα RAG1 και RAG2 αντίστοιχα, που είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνει V(D)J ανασυνδυασμός και να δημιουργηθεί ένας νέος BCR με αλλαγμένη ειδικότητα αντιγόνου [148, 149].

Τα ανώριμα B-κύτταρα που αλληλεπιδρούν ασθενέστερα με αυτοαντιγόνα χαμηλότερου σθένους π.χ. όπως μικρές διαλυτές πρωτεΐνες αδρανοποιούνται και

εισέρχονται σε μία κατάσταση μόνιμης «απάθειας» ή ανεργίας. Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται ανεργία του κλώνου (clonal anergy) [145].

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα ανεργικά Β-κύτταρα έχουν ημίσεια ζωή σημαντικά μικρότερη από ότι μη αυτοδραστικά ώριμα Β-κύτταρα *in vivo* (1-5 ημέρες σε αντίθεση με 40 μέρες). Η μειωμένη διάρκεια ζωής πιστεύεται ότι απαλλάσσει το ρεπερτόριο των Β-κυττάρων από δυνητικά επιβλαβή Β-κύτταρα [150]

Έχει αποδειχθεί ότι τα ανεργικά Β-κύτταρα ανταγωνίζονται σε πολύ μικρότερο ποσοστό (βαθμό) τα μη ανεργικά Β-κύτταρα κατά την παρουσία περιορισμένης ποσότητας πρωτεΐνη BAFF (B-cell activating factor), μία σημαντική πρωτεΐνη για την επιβίωση των περιφερικών Β-κυττάρων [150,151].

Επίσης, έχει δειχθεί ότι υπό συνθήκες ανταγωνισμού, τα ανεργικά Β-κύτταρα αποτυγχάνουν να εισέλθουν στις Β-κυτταρικές λεμφοζιδιακές περιοχές. Αντίθετα, παραμένουν στα όρια μεταξύ Τ-κυτταρικών και Β-κυτταρικών περιοχών, με μια διαδικασία που φέρεται ως λεμφοζιακός αποκλεισμός [150].

6.2 Περιφερική ανοσιακή ανοχή των Β-κυττάρων που επιτυγχάνεται από την καταστολή της BCR σηματοδότησης από το μονοπάτι της SIAE-Siglec-SHP-1

Σε αυτό το μέρος του κειμένου θα γίνει περιγραφή της SIAE-Siglec-SHP-1 οδού, και μία σύντομη αναφορά στα βασικά μόρια που εμπλέκονται.

6.2.1 Μόριο CD22 (αλλιώς και σιγλεκίνη-2)

Το μόριο CD22 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη των Β-κυττάρων, μέλος της οικογένειας των σιγλεκινών που ονομάζεται αλλιώς και Σιγλεκίνη-2 (Siglec-2) [133,151]. Στον άνθρωπο, το μόριο CD22 εκφράζεται στο μέγιστο στην επιφάνεια των ωρίμων IgD⁺, IgM⁺ Β-κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό στην επιφάνεια των sIgM⁺ ανώριμων Β-κυττάρων. Τα τελικά διαφοροποιημένα Β-κύτταρα δεν εκφράζουν CD22 [152,153]. Ως σιγλεκίνη το μόριο CD22 προσδέεται ειδικά σε συνδέτες γλυκάνης που περιέχουν α-2,6-συνδεμένα σιαλικά οξέα [154].

Το μόριο CD22 είναι ένας σημαντικός ανασταλτικός συν-υποδοχέας των Β-κυττάρων [154,155]. Έχει 7 εξωκυτταρικές περιοχές που ομοιάζουν με αυτές των ανοσοσφαιρινών, και μία κυτταροπλασματική «ουρά» που περιέχει 6 μόρια τυροσίνης, τρεις από τις οποίες ανήκουν σε ακολουθίες ITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibition motif) [156]. Η ITIM είναι μία συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων (Ile/Val/Leu/Ser)-x-Tyr-x-x-(Leu/Val), όπου x= οποιοδήποτε αμινοξύ, που βρίσκεται στη κυτταροπλασματική περιοχή αρκετών ανασταλτικών υποδοχέων ανοσιακών κυττάρων [157,158].

Γενετικές μελέτες σε κάποια είδη ποντικών υποδηλώνουν, ότι χωρίς λειτουργικό CD22 τα Β-κύτταρα αναπτύσσουν χαρακτηριστικά «υπερενεργοποίησης» κάτι που είναι χαρακτηριστικό ενός αριθμού αυτοάνοσων νόσων [159]. Το μόριο CD22 έχει γίνει θεραπευτικός στόχος για την ίαση του συστημικού ερυθρηματώδη λύκου στον άνθρωπο [160].

6.2.2 Ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος (SIAE)

Σε προηγούμενη αναφορά στο κείμενο είχε αναφερθεί ότι η ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος είναι ένα ένζυμο που απομακρύνει τις Ο-ακετυλο ομάδες στη θέση C-9 από τα 9-Ο-ακετυλιωμένα μόρια του σιαλικού οξέος [122,141].

Το 2009, οι Cariappa *et al.*, ανακάλυψαν ότι η SIAE στα Β-κύτταρα λειτουργεί με ενδογενή τρόπο ώστε να επιτρέπει να γίνεται αναστολή της BCR σηματοδότησης μέσω του μορίου CD22 και πιθανόν άλλων σιγλεκινών [127]. Νωρίτερα μία άλλη ομάδα επιστημόνων είχε ανακαλύψει ότι το μόριο CD22 προσδέεται μόνο σε συνδέτες που περιέχουν α-2,6-συνδεμένα σιαλικά οξέα και στις οποίες το σιαλικό οξύ δεν είναι ακετυλιωμένο στην (υδρόξυλη) θέση 9-OH [161].

Μελέτες σε ποντίκια με εξουδετερωμένο το γονίδιο της SIAE^{Δ2/Δ2} (μέσω του εξονίου 2) έδειξαν αξιοσημείωτη ενισχυμένη ενεργοποίηση του υποδοχέα των Β-κυττάρων, και ελάττωση τόσο των Β-κυττάρων της οριακής ζώνης της σπληνός όσο και των περικοκολλοειδικών Β-κυττάρων του μυελού των οστών. Τα ποντίκια αυτά

επίσης ανέπτυξαν υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σχετικά νεαρή ηλικία και στα νεφρά σπειραματικές εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων [127].

6.2.3 Πρωτεΐνη Lyn και μόριο SHP-1

Η πρωτεΐνη Lyn είναι μέλος των της οικογένειας των Src κινασών τυροσίνης, η οποία έχει υψηλή έκφραση στα αιμοποιητικά κύτταρα [162].

Ο βασικός ρόλος της πρωτεΐνης Lyn στο μονοπάτι της SIAE-Siglec-SHP-1 είναι η φωσφορλίωση των ITIMS που βρίσκονται στο κυτταροπλασματικό πέρας του μορίου CD22, που είναι ένας σημαντικός ανασταλτικός συν-υποδοχέας των Β-κυττάρων [145]. Η πρωτεΐνη Lyn διευκολύνει την εμπλοκή του μορίου SHP-1 [163]. Το μόριο SHP-1 είναι μία πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης που παίζει κατασταλτικό ρόλο στη σηματοδότηση του BCR [164].

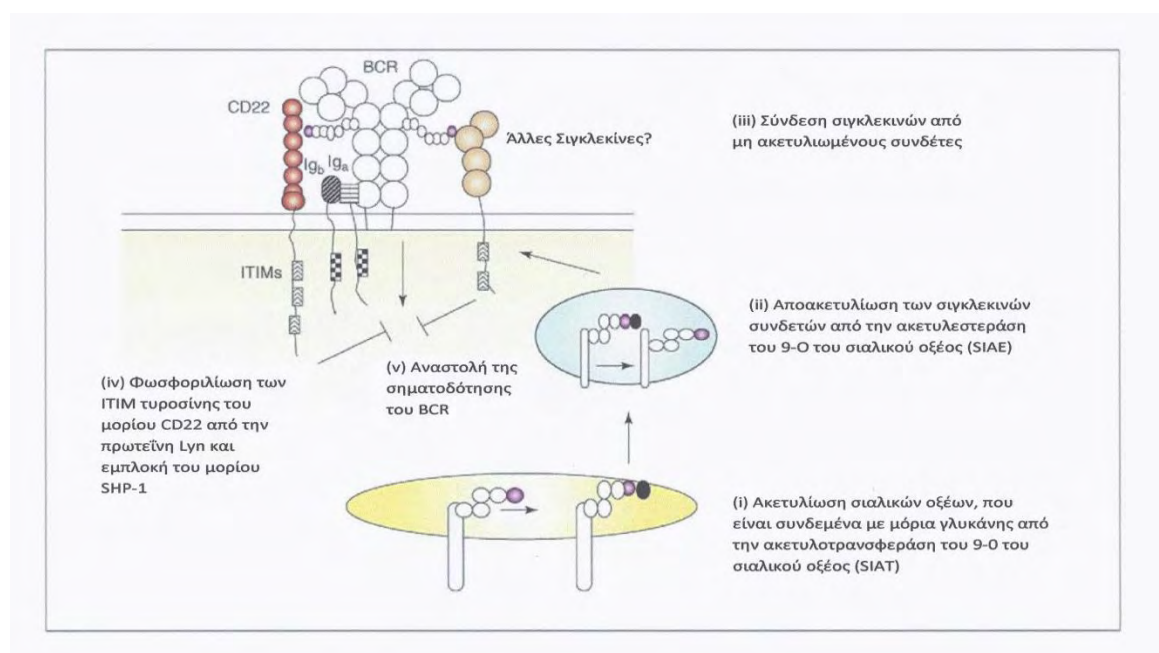
Ποντίκια $lyn^{-/-}$ (με αποσιωπημένο το γονίδιο *lyn*), έχουν μειωμένο πληθυσμό περιφερικών Β-κυττάρων, αλλά την ίδια στιγμή παρουσιάζουν συσσώρευση Β βλαστικών κυττάρων και αυτοαντισωμάτων στον ορό [165]. Ποντίκια $lyn^{-/-}$ που έχουν αυτοδραστικά αντισώματα, μπορεί να εμφανίζουν σοβαρή σπειραματονεφρίτιδα που προκαλείται από την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων IgG στο νεφρό, μία κατάσταση που θυμίζει συστηματικό ερυθματώδη λύκο [166]. Το αποτέλεσμα της ανεπάρκειας της πρωτεΐνης Lyn είναι η υπερενεργοποίηση του BCR σε παρουσία αντιγόνου, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την αυτοανοσία στα ποντίκια $lyn^{-/-}$ [167].

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ποντίκια όπου το γονίδιο του SHP-1 είχε εξουδετερωθεί μόνο στα Β-κύτταρα ($Ptprn6^{f/f}CD19\text{-cre}$) ποντίκια, τα νεαρά σε ηλικία $Ptprn6^{f/f}CD19\text{-cre}$ ποντίκια παρουσίασαν μειωμένη απόκριση αντισωμάτων ως προς τον εμβολιασμό τους, ενώ τα μεγαλύτερα σε ηλικία $Ptprn6^{f/f}CD19\text{-cre}$ ποντίκια παρουσίασαν αυτοαντισώματα και αυτοάνοση νόσο που ομοιάζει με συστηματικό ερυθματώδη λύκο [168].

6.2.4 Το μονοπάτι της SIAE-Siglec-SHP-1 (SIAE-Σιγκλεκίνης)

Το συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι μεσολαβεί στην ανοχή των Β-κυττάρων και εμπλέκει το ένζυμο SIAE, το μόριο CD22, τη πρωτεΐνη Lyn, και τη φωσφατάση SHP-1 (εικόνα 5). Πιθανότατα στο μονοπάτι να εμπλέκονται και άλλες σιγκλεκίνες εκτός της CD22 (βλ. εικόνα 5) [145].

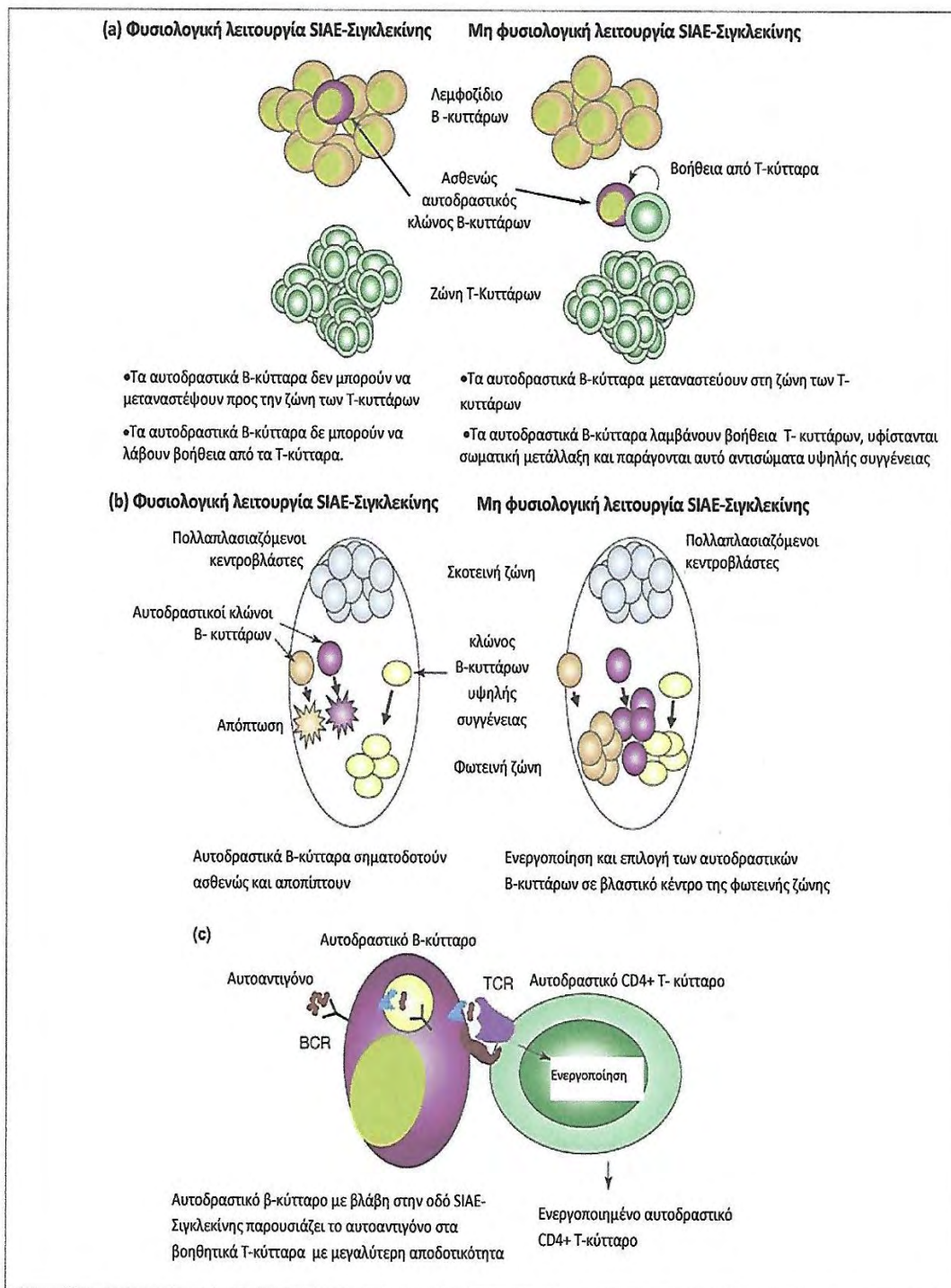
Το μονοπάτι μειώνει τη σηματοδότηση του BCR, και μεταλλάξεις σε αυτό κατά πάσα πιθανότητα συμβάλουν στην αυτοανοσία λόγω αυξημένης σηματοδότησης του BCR [145]. Τη δράση της ακετυλεστεράσης του 9-O του σιαλικού οξέος (SIAE) ανταγωνίζεται βιοχημικά η ακετυλοτρανσφεράση του 9-O του σιαλικού οξέος (SIAT) [134,145]. Το γονίδιο της SIAT στα ευκαρυωτικά κύτταρα ακόμα δεν έχει εντοπιστεί, αλλά ούτε και το ένζυμο [169,170]. Η εικόνα 5 παρακάτω επεξηγεί πως το μονοπάτι της SIAE διαμεσολαβεί στην αναστολή της σηματοδότησης του BCR.



Εικόνα 5: Το μονοπάτι της SIAE (ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος)-Σιγκλεκινών για την αναστολή της σηματοδότησης του BCR. (i) Ο υποδοχέας των κυττάρων Β (BCR) και άλλες μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες δύναται να έχουν ως τελικό άκρο σιαλικό οξύ στο οποίο βρίσκονται προσδεμένες Ν-γλυκάνες στην 9-υδροξύλο θέση ενός συνδεδεμένου 2,6 σιαλικού οξέος και οι οποίες έχουν υποστεί ακετυλίωση από την SIAT (ακετυλοτρανσφεράση του σιαλικού οξέος). (ii) Αυτές οι ομάδες ακετυλίου μπορούν να αφαιρεθούν (αποακετυλίωση) από τη SIAE είτε ενδοκυτταρικά σε ένα κυστίδιο, ή στην επιφάνεια του κυττάρου. (iii) Η αποακετυλίωση των σιαλικών οξέων στα οποία βρίσκονται προσδεμένες Ν-γλυκάνες επιτρέπει την αλληλεπίδραση με σιγκλεκίνες όπως η CD22, καθώς και άλλες. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει στην πρόσληψη και αντίδραση φωσφατάσεων όπως η SHP-1 με τις ITIMs (immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs) σιγκλεκινών (iv) και κατά συνέπεια την αναστολή σηματοδότησης του BCR (v). (Από Pillai S et al., με τροποποιήσεις, 2009 [145]).

Ενώ οι Pillai *et al.* (2009), μπόρεσαν και «ένωσαν κομμάτια του πάζλ» και δημοσίευσαν μία βιοχημική οδό που μεσολαβεί για την ανοσιακή ανοχή των Β-κυττάρων που εμπλέκει το μόριο CD22, την πρωτεΐνη Lyn τη φωσφατάση SHP-1 αλλά και την SIAE (σχήμα 5), αναφέρουν ότι κάποιος μηχανισμός για την επαγωγή της ανοσιακής ανοχής των Β-κυττάρων μέσω αυτής της οδού δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί. Έτσι λοιπόν στην ίδια δημοσίευση οι Pillai *et al.* (2009), προτείνουν τρία πιθανά σενάρια όπου η οδός της SIAE-Siglec-SHP-1 θα μπορούσε να είναι πολύ σημαντική για την ανοσιακή ανοχή σε επίπεδο Β-κυττάρων (σχήμα 6) [145].

Το 2012 οι Pillai *et al.* (2012), σε ένα γενικό άρθρο ανασκόπησης για το ρόλο των σιγκλεκινών στη ρύθμιση του ανοσιακού συστήματος, σε αναφορά τους στην οδό SIAE-Σιγκλεκίνης αναφέρουν τον όρο κλωνική αγνόηση (clonal ignorance), που είναι μηχανισμός περιφερικής ανοσιακής ανοχής, κάτι που δεν είχαν κάνει στη δημοσίευση τους το 2009. Οι Pillai *et al.* (2012), αναφέρουν ότι η οδός SIAE-Σιγκλεκίνης μπορεί και διατηρεί τη κλωνική αγνόηση στα Β-κύτταρα εμποδίζοντας την ενεργοποίηση ασθενώς αυτοδραστικών Β-κυττάρων. Η ενεργοποίηση ασθενώς αυτοδραστικών κυττάρων Β θα επέτρεπε την συνεργασία Τ-Β κυττάρων και την επακόλουθη σωματική μετάλλαξη του Β-κυττάρου, καθιστώντας το δυνητικά έντονα αυτοδραστικό [134].



Σχήμα 6. Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το μονοπάτι της SIAE-Σιγκλεκίνης μπορεί να μεσολαβεί στην ανοσιακή ανοχή στο επίπεδο των Β-κυττάρων. (α) Εντός των οζιδίων των Β-κυττάρων των λεμφαδένων, ανασταλτικά σήματα αποτρέπουν ασθενώς αυτοδραστικά Β-κύτταρα να μεταναστεύσουν στη ζώνη των Τ-κυττάρων και να λάβουν βοήθεια από τα Τ-κύτταρα σε μορφή σημάτων ενεργοποίησης. Σε αντίθεση, ελαττωματική ανασταλτική σηματοδότηση μέσω της SIAE-Siglec οδού έχει ως αποτέλεσμα αυτοδραστικά β-κύτταρα να μεταναστεύσουν στη ζώνη των Τ-κυττάρων όπου λαμβάνουν βοήθεια από τα Τ-βοηθητικά κύτταρα, υφίστανται σωματική μετάλλαξη και εκκρίνουν αυτοαντισώματα υψηλής συγγένειας. (b) Εντός του βλαστικού κέντρου, ανασταλτική σηματοδότηση αποτρέπει αυτοδραστικά Β-κύτταρα από θετική επιλογή (επιβίωση) στη φωτεινή ζώνη. Μείωση της ανασταλτικής σηματοδότησης της οδού SIAE-Σιγκλεκίνης, αυξάνει τις πιθανότερες θετικές επιλογής αυτοδραστικών Β-κυτταρικών κλώνων χαμηλής συγγένειας. (c) Ανασταλτικά σήματα που διαμεσολαβούν από την οδό της SIAE-Σιγκλεκίνης φυσιολογικά αποτρέπουν τα Β-κύτταρα να λειτουργούν ως αποτελεσματικά αυτό-αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ωστόσο, η διατάραξη αυτής της οδού, επιτρέπει την Β-κυτταρική παρουσίαση σε αυτοδραστικά Τ-κύτταρα. (Από Pillai S et al., 2009 [145]).

7.0 Μεταλλάξεις του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος και αυτοανοσία στον άνθρωπο.

Το γονίδιο της SIAE στον άνθρωπο αποτελείται από 10 Εξόνια και 10 Εσόνια [171]. Το 2004 οι Zhu *et al.* απομόνωσαν, ταυτοποίησαν και κλωνοποίησαν το γονίδιο της H-Lse (Human Lysosomal SIAE) που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 523 αμινοξέων. Η ίδια ομάδα επιστημόνων χαρτογράφησε το γονίδιο της SIAE στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στη τοποθεσία 11q24.2 [172].

Οι Zhu *et al.* επίσης πραγματοποίησαν Northern blot ανάλυση σε ανθρώπινους ιστούς, και έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου της SIAE είναι διάσπαρτη με μεγαλύτερη έκφραση στους όρχεις, το προστάτη και το παχύ έντερο [172].

Πολύ πρόσφατα οι Surolija *et al.* (2010) πρώτοι μελέτησαν τη συσχέτιση μεταλλάξεων, του γονιδίου της SIAE με σχετικά συχνά αυτοάνοσα νοσήματα στον άνθρωπο κάνοντας χρήση της τεχνικής της αλληλούχησης (sequencing) και διαπίστωσαν ότι ασθενείς με αυτοανοσία εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου σε σχέση με φυσιολογικούς. Συγκεκριμένα, 27/923 ασθενείς που μελετήθηκαν με αυτοάνοσα νοσήματα, είτε είχαν σπάνιες ετερόζυγες μη συνώνυμους SNPs (single nucleotide polymorphisms) αντικατάστασης βάσης (μη γνωστές μέχρι τότε) ή ένα συγκεκριμένο ομόζυγο πολυμορφισμό και συγκεκριμένα τον M89V (πίνακας 2) [173].

Στο σύνολο των ασθενών που μελέτησαν οι Surolija *et al.* διαπιστώθηκε στατιστικά υψηλότερη συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου της SIAE σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ($p=0.0056$) και σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I ($p=0.0075$) σε σχέση με φυσιολογικούς (πίνακας 3) [173].

Πίνακας 2. Μεταλλάξεις του γονιδίου της SIAE σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα με Ευρωπαϊκή καταγωγή και μάρτυρες (Αποτελέσματα μελέτης Suroliá I et al., 2010 [173])

SIAE change	Esterase activity	Secretion	Dom. neg.	Disease
Autoimmune patients (n = 923)				
T312M	Defective	Defective	Yes	RA
T312M	Defective	Defective	Yes	MS
Q309P	Defective	Defective	Yes	RA
C196F	Defective	Defective	Yes	RA
C196F	Defective	Defective	Yes	SJS
M89V/M89V	Normal	Defective	No	RA
M89V/M89V	Normal	Defective	No	RA
M89V/M89V	Normal	Defective	No	RA
M89V/M89V	Normal	Defective	No	SLE
M89V/M89V	Normal	Defective	No	MS
M89V/M89V	Normal	Defective	No	T1D
M89V/M89V	Normal	Defective	No	T1D
M89V/M89V	Normal	Defective	No	T1D
G212R	Defective	Defective	Yes	CD
F404S	Defective	Defective	Yes	JIA
F404S	Defective	Defective	Yes	SLE
F404S	Defective	Defective	Yes	UC
F404S	Defective	Defective	Yes	MS
Y349C	Defective	Reduced	Yes	SLE
R479C	Defective	Defective	Yes	CD
W48X	Truncated/NT	Truncated/NT	NT	T1D
C266G	Defective	Defective	NT	T1D
R230W	Defective	Defective	NT	T1D
R393H	Defective	Defective	NT	SLE
K400N	Normal	Doublet	No	CD
A3G	Normal	Normal	NT	CD
N33S	Normal	Normal	NT	RA
Ethnically matched controls (n = 648)				
R314H	Defective	Defective	NT	Control
T312M	Defective	Defective	Yes	Control
Q161K	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
G64S	Normal	Normal	NT	Control
Q462R	Normal	Normal	NT	Control
H447R	Normal	Normal	NT	Control
R62H	Normal	Normal	NT	Control
M456I	Normal	Normal	NT	Control

Συνομώσεις πίνακα 2

RA = Ρευματοειδής αρθρίτιδα
MS = Πολλαπλή σκλήρυνση
SJS = Σύνδρομο Sjogren
SLE = Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
T1D = Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου I
UC = Ελκώδης κολίτιδα
CD = Νόσος Crohn
JIA = Νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα
NT = Δεν έχει μελετηθεί (Not tested)

Πίνακας 3. Στατιστική συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου της SIAE σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, και το σύνολο αυτοάνοσων ασθενειών συγκριτικά με φυσιολογικούς* (Αποτελέσματα μελέτης Suroliá I et al., 2010 [173])

Ασθένεια	Αριθμός Ασθενών	Odds ratio (95%CI**)	Two-tailed P-value
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	234	8,31 (1,69-40,87)	0,0056
Διαβήτης τύπου I	252	7,89 (1,58-39,30)	0,0075
Σύνολο αυτοάνοσων νοσημάτων	923	8,62 (2,03 – 36,62)	0,0002

* Όλοι οι ασθενείς και οι φυσιολογικοί ήταν Ευρωπαϊκής καταγωγής, ενώ άτομα εβραϊκής καταγωγής δεν συμπεριλήφθησαν στη μελέτη

** 95% CI=95% Διάστημα Εμπιστοσύνης (Confidence interval)

Πίνακας 4. Οι 10 πιο συχνές μεταλλάξεις εξωνίων του γονιδίου της SIAE και η συχνότητά τους σε άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα n=923 και φυσιολογικούς n=648 (Αποτελέσματα μελέτης Surolia I et al., 2010 [173])

No	Sequence Variant	Αντικατάσταση Αμινοξέος	Rs No	No ασθενών	Γονοτυπική συχνότητα ασθενών	Συχνότητα αλληλίων ασθενών	Αριθμ. φυσιολ.	Γονοτυπ. συχνότ. φυσιολ.	Συχνότητα αλληλίων φυσιολ.	Εξόνιο
1	c.265>G	M89V	78778622	70	0.076	0.047	63	0.097	0.049	3
2	c.468T>C	S156S	1942633	60	0.065	0.032	58	0.090	0.045	4
3	c.1452A>G	T484T		57	0.062	0.032	53	0.082	0.041	10
4	c.573>T	Y191Y	7757510	6	0.006	0.03	5	0.008	0.004	5
5	c.1400C>T	A467V	7941523	5	0.005	0.003	6	0.009	0.005	10
6	c.212A>G	K71R	12282107	4	0.004	0.003	21	0.032	0.016	2
7	c.1020T>C	R340R	354551312	4	0.004	0.002	6	0.009	0.005	8
8	c.1211T>C	F404S		4	0.004	0.002	0	0.000	0.000	9
9	c.587G>T	C196F		3	0.003	0.002	0	0.000	0.000	5
10	c.1041C>T	F347F	78879979	3	0.003	0.002	0	0.000	0.000	8

Στις μεταγενέστερες μελέτες που ακολούθησαν κάποιες επιβεβαίωναν τη συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου της SIAE με σχετικά συχνά αυτοάνοσα νοσήματα στον άνθρωπο, άλλες όμως όχι.

Στη μεγαλύτερη μελέτη που έχει γίνει ως τώρα, και συγκεκριμένα το 2012 από τους Hunt *et al.*, δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση της μετάλλαξης M89V με 12 σχετικά συχνές αυτοάνοσες ασθένειες. Συγκεκριμένα έλαβαν μέρος 66924 άτομα (ασθενείς και φυσιολογικοί) Ευρωπαϊκής καταγωγής. Βρέθηκαν 60 φυσιολογικοί (0.32%) από τα Βρετανικά δείγματα να είναι ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη M89V. Παρόμοιες συχνότητες ομοζυγωτών για την μετάλλαξη M89V, που ήταν φυσιολογικοί βρέθηκαν και στις άλλες ομάδες φυσιολογικών δειγμάτων (π.χ. Γερμανικών) [174]. Σε αντίθεση, οι Surolia *et al.* αναφέρουν ότι η μετάλλαξη M89V συσχετίζεται με αυτοάνοσα νοσήματα (ο φαινότυπος στη μετάλλαξη αυτή κληρονομείται με υπολειπόμενο χαρακτήρα πίνακας 2). Στην ίδια μελέτη, οι Surolia *et al.* δημοσίευσαν ότι στους ομοζυγώτες για την μετάλλαξη M89V η SIAE ήταν καταλυτικά ενεργή, αλλά δεν εκκρίνονταν (πίνακας 2). Οι συγγραφείς της μελέτης υποστήριξαν ότι η μετάλλαξη M89V έχει ως αποτέλεσμα την μη έκκριση της SIAE [173].

Στην μελέτη των Hunt *et al.* μελετήθηκε επίσης η συσχέτιση άλλων 8 μεταλλάξεων του γονιδίου της SIAE (που είχαν μελετήσει οι Surolia *et al.*) σε σχέση με 10 σχετικά συχνές αυτοάνοσες ασθένειες (συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις W48X, C196F, G212R, Q390P, R314H, Y349C, F404S, R479C). Έλαβαν μέρος 43378 άτομα και ασθενείς. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των Surolia *et al.* Δηλαδή, δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων, με τις αυτοάνοσες ασθένειες που μελετήθηκαν [174].

Οι Szymanski *et al.* (2011) που μελέτησαν δείγματα αποκλειστικά στο Πολωνικό πληθυσμό, επίσης δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ 2 αυτοάνοσων ασθενειών και της μετάλλαξης M89V. Συγκεκριμένα μελέτησαν τη μετάλλαξη M89V σε σχέση με τον ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη τύπου I, και τη νόσο του Grave [175].

Το 2013 οι Chellara *et al.* επιβεβαίωσαν πειραματικά ότι η πρωτεΐνη SIAE που φέρει τη μετάλλαξη M89V είναι καταλυτικά φυσιολογική. Επίσης, έθεσαν το ερώτημα εάν όντως η έκκριση της SIAE με τη μετάλλαξη M89V είναι ελαττωματική κάτι που δημοσιεύθηκε το 2011 (Surolia *et al.*) παρόλο που η SIAE με την συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι καταλυτικά φυσιολογική. Σε αυτό το πλαίσιο σκέψης οι Chellara *et al.* προχώρησαν σε κυτταρομετρικές μελέτες σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος που έδειξαν ότι η SIAE εκφράζεται ενδοκυτταρικά αλλά όχι στην επιφάνεια των ανθρώπινων λευκών αιμοσφαιρίων. Επίσης, ανάτρεξαν στη βιβλιογραφία και βρήκαν ότι σύμφωνα με λεπτομερείς αναλυτικές μελέτες δεν υπάρχουν καν ίχνη SIAE στο ανθρώπινο πλάσμα. Για τους δύο αυτούς λόγους συμπέραναν ότι το ένζυμο αυτό δρα σε ενδοκυτταρική τοποθεσία. Έτσι, οι Chellara *et al.* κατηγορηματικά αναφέρουν ότι SIAE που φέρει τη μετάλλαξη M89V πρέπει να αποκλειστεί από το ενδεχόμενο συσχέτισης με ασθένεια [176].

Όμως, υπάρχουν μελέτες όπου έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων της SIAE και αυτοάνοσων νοσημάτων. Συγκεκριμένα, οι Hirschfield *et al.* (2012) υποστηρίζουν ότι οι μεταλλάξεις της SIAE, M89V, F404S και T312M (που είχαν πρωτοαναφερθεί από τους Surolia *et al.*), όπως επίσης οι μεταλλάξεις F119C, P356L και Q382R (που αναφέρονται για πρώτη φορά) στατιστικά συσχετίζονται με την εμφάνιση πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης [177]. Επίσης, οι Yamamoto *et al.* (2014) εντόπισαν τη μετάλλαξη A476V του γονιδίου της SIAE, σε ετερόζυγη μορφή και στους τρεις ασθενείς της μελέτης που έπασχαν από anti-PIT-1 antibody syndrome (αυτοάνοσο ενδοκρινολογικό νόσημα) έναντι μόλις 6% από τους 200 φυσιολογικούς που πήραν μέρος στη μελέτη. Έτσι βρέθηκε να υπάρχει μία στατιστική συσχέτιση της τάξεως $p = <0.0005$ της μετάλλαξης A476V με το anti-PIT-1 antibody syndrome [178].

Τέλος, σε ένα άρθρο ανασκόπησης ο Pillai (2013), αναφέρει ότι θα ήταν πολύτιμο να ερευνηθεί σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, αν επιγενετικοί μηχανισμοί παίζουν ρόλο ρυθμιστή στο μονοπάτι της SIAE και επηρεάζουν στην εκδήλωση αυτοάνοσου φαινότυπου εφόσον ή όχι υπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της SIAE (170).

Από τα παραπάνω μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι η ακριβής βιολογική σημασία τόσο του SIAE όσο και των μεταλλάξεων του δεν είναι μέχρι σήμερα απόλυτα διευκρινισμένη. Από την άλλη, η συμμετοχή του SIAE τόσο στην παθογένεση, όσο στο φαινότυπο της COVID και της sIgAD (π.χ. στην εκδήλωση αυτοανοσίας) είναι τελείως άγνωστα.

2

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω βιογραφικά δεδομένα ότι οι ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) και εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA (sIgAD) και οι συγγενείς τους, εμφανίζουν μία προδιάθεση για αυτοανοσία, ο σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη και διερεύνηση των μεταλλάξεων της SIAE και η πιθανή συμβολή τους στη προδιάθεση αυτοάνοσων ασθενειών σε οικογένειες και άτομα με CVID και sIgAD.

2.0 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Συνολικά μελετήθηκαν 40 ασθενείς ελληνικής καταγωγής, 14 ήταν άνδρες (35%) και 26 ήταν γυναίκες (65%). Η ηλικία τους είχε φάσμα 2-85 έτη, και μέσο όρο τα 29.20 έτη.

Αναλυτικά, 26 από τους συνολικά 40 ασθενείς είχαν εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (65%). Δέκα ήταν άνδρες (38.5%), και 16 ήταν γυναίκες (61.5%).

Τρεις από τους 26 ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια είχαν και εκλεκτική αντισωματική ανοσοανεπάρκεια IgG₄.

Δώδεκα (12) από τους 26 ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (46.15%) εμφάνιζαν αυτοάνοσες παθήσεις (συστημικό ερυθηματώδη λύκο, σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, κοιλιοκάκη, ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα, νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα, αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα).

Δύο από τους 26 ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια έπασχαν από Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό.

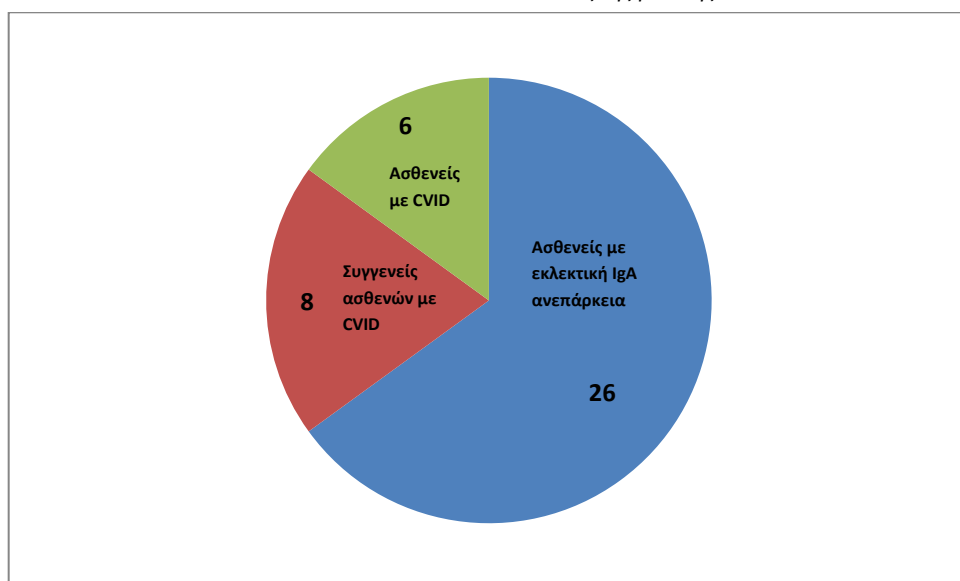
Επίσης μελετήθηκαν 5 οικογένειες, [6 ασθενείς με CVID (5 γυναίκες και ένας άνδρας) και 8 συγγενείς τους]. Κάποιοι εκ των οποίων με ιστορικό αυτοάνοσων νοσημάτων όπως συστημικό ερυθηματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, υποτροπιάζουσα ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα, αυτοάνοση θυρεοειδική νόσο.

Περισσότερα δεδομένα σχετικά με τη διάγνωση των ασθενών της μελέτης υπάρχουν στο επόμενο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

Από όλους τους ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη έγινε λήψη περιφερικού αίματος. Η συλλογή των δειγμάτων των ασθενών έγινε κατά το χρονικό διάστημα: Ιανουάριος 2008 – Φεβρουάριο 2013.

Τα δείγματα αίματος όλων των ασθενών με CVID, των 8 συγγενών τους και 7 ασθενών με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια, προήλθαν από το Ανοσολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ τα δείγματα αίματος των υπόλοιπων 19 ασθενών με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια προήλθαν από το Παιδιατρικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Εικόνα 2-1: Οι ασθενείς της μελέτης



3.0 Υλικά

3.1 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA Blood mini kit της Qiagen (Cat No. 51104), που περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια/υλικά:

Πίνακας 2-1: Αντιδραστήρια και υλικά που περιέχει το DNA Blood mini kit της Qiagen

Αντιδραστήρια/Υλικά	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
Πρωτεΐναση	Qiagen Protease	Qiagen, Germany
Διάλυμα λύσης	Lysis Buffer AL	Qiagen, Germany
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1	Wash Buffer 1	Qiagen, Germany
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2	Wash Buffer 2	Qiagen, Germany
Διάλυμα εκχύλισης	Elution Buffer AE	Qiagen, Germany
Στήλες QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns	Qiagen, Germany

Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε επίσης, απόλυτη αιθανόλη της εταιρείας Scharlau Chemie, Spain (Cat No. ET00162500).

3.2 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) των εξονίων του γονιδίου SIAE.

Πίνακας 2-2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Αντιδραστήρια/Υλικά	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
10 X Ρυθμιστικό διάλυμα (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)	10 X PCR Buffer (Part of Taq DFS Polymerase Kit) Cat No. 101005	BIORON, Germany
Αποστειρωμένο νερό	Water for Injection	DEMO, Greece
Διμεθυλοσουλφοξείδιο	Dimethyl sulfoxide (DMSO), HPLC grade Cat No. SU01551000	Scharlau, Spain
Εκκινητές (Πίνακας 2-3)	Primers	Invitrogen, U.K.
Ολιγονουκλεοτίδια	Oligonucleotides dNTP set (100 mM) Cat No. 10297-018	Invitrogen, U.K.
Πολυμεράση TAK	DFS Taq DNA polymerase (Part of Taq DFS Polymerase Kit) Cat No. 101005 5u/μl	BIORON, Germany

3.3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) των εξονίων του γονιδίου SIAE

Πίνακας 2-3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR

Εξόνιο SIAE	Εκκινιτής	Αλληλουχία εκκινιτή (5'-3')	Μέγεθος αμπλικονίου
Εξόνιο-1	Πρόσθιος	GTACAGCCCAGTCCTGAGGTCG	339 bp
	Οπίσθιος	GACGCGAGCCCCTAGCCTAGCTAG	
Εξόνιο-2	Πρόσθιος	GACTGTATGTTCTTTGCTGTTTCAC	344 bp
	Οπίσθιος	TGGATAATGTGAGCTACAGCATTAG	
Εξόνιο-3	Πρόσθιος	CAGAGGCTGGGAATAGCCACAAATG	366 bp
	Οπίσθιος	AGAAACAGCCCTGCTTCTCCTTGTT	
Εξόνιο-4	Πρόσθιος	GTGGATCAAGGTGATTCAGTGCAGC	457 bp
	Οπίσθιος	CCTGAAATAGTCACCATCAGGAAGG	
Εξόνιο-5	Πρόσθιος	GACCTCTGCCACCCCTTCTCACCTC	380 bp
	Οπίσθιος	TGGGACATTCACCATATACTTAACT	
Εξόνιο-6	Πρόσθιος	ACAAGTGAAAGTGGATAGATGACCA	288 bp
	Οπίσθιος	TGTTGCTTTAAGCCACTACGTTCTA	
Εξόνιο-7	Πρόσθιος	AAGACCACTACCTCAGGGCATGGAT	342 bp
	Οπίσθιος	CAGGAAAGAGATCCAAATAGCACAT	
Εξόνιο-8	Πρόσθιος	GCAATGAGAGAAGCAGAAGCAGAGT	359 bp
	Οπίσθιος	GACTCTTAAGTGCCAATCCTCAGTC	
Εξόνιο-9	Πρόσθιος	CTGATCACAGAGTTCAGTCAACTTT	432 bp
	Οπίσθιος	CAACCAAGACCCGCCACATCGTAAT	
Εξόνιο-10	Πρόσθιος	CAGGTTTGTCTGCTTACTGTAGGA	544 bp
	Οπίσθιος	ATATAGAAACAGCCATGTGCTAGCT	

3.4 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

Πίνακας 2-4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Αντιδραστήρια/Υλικά	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
Αγαρόζη	peqGOLD Universal Agarose Cat No. 35-1010/20/30	Peqlab, Germany
Αποστειρωμένο νερό	Water for Injection	DEMO, Greece
Βρωμιούχο αιθίδιο	1% Ethidium Bromide (10 mg/mL) Cat No. UN 2810	AppliChem, Germany
Διάλυμα TBE	10 X TBE Buffer Cat No. A0972,1000	Applichem, Germany
Μάρτυρας DNA	100bp ladder Cat No. N3231S	New England Biolabs, USA
Χρωστική	10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer Cat No. 10816-015	Invitrogen, UK

3.5 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR με τη μέθοδο καθαρισμού QIAquick PCR purification kit

Για το καθαρισμό των προϊόντων της PCR (εξόνια SIAE), που **δεν** είχαν παραπροϊόντα, χρησιμοποιήθηκε το QIAquick PCR Purification kit της Qiagen (Cat No. 28106) , που περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια/υλικά:

Πίνακας 2-5: Αντιδραστήρια και υλικά που περιέχει το QIAquick PCR Purification kit της Qiagen

Αντιδραστήρια/Υλικά	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
Ρυθμιστικό διάλυμα PB	Buffer PB	Qiagen, Germany
Ρυθμιστικό διάλυμα PE	Buffer PE	Qiagen, Germany
Διάλυμα εκχύλισης	Elution Buffer EB	Qiagen, Germany
Στήλες QIAquick Spin	QIAquick Spin Columns	Qiagen, Germany

Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε επίσης, απόλυτη αιθανόλη της εταιρείας Scharlau Chemie, Spain (Cat No. ET00162500).

3.6 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR με τη μέθοδο εξαγωγής QIAquick gel extraction

Για το καθαρισμό των προϊόντων της PCR (εξόνια SIAE), που είχαν παραπροϊόντα, χρησιμοποιήθηκε το QIAquick® Gel Extraction Kit kit της Qiagen (Cat No. 28704) , που περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια/υλικά:

Πίνακας 2-6: Αντιδραστήρια και υλικά που περιέχει το QIAquick Gel Extraction kit της Qiagen

Αντιδραστήρια/Υλικά	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
Ρυθμιστικό διάλυμα QG	Buffer QG	Qiagen, Germany
Ρυθμιστικό διάλυμα PE	Buffer PE	Qiagen, Germany
Διάλυμα εκχύλισης	Buffer EB	Qiagen, Germany
Στήλες QIAquick Spin	QIAquick Spin Columns	Qiagen, Germany

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν:

- ♦ Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης : (πίνακας 2-4), χωρίς 1 X TBE.
- ♦ Ρυθμιστικό διάλυμα TAE, UltraPure™ (10 x TAE buffer), Gibco, U.K. (Cat No. 15558-042)
- ♦ 1 αποστειρωμένο μικρό χειρουργικό νυστέρι μίας χρήσεως, Sterile Disposable Scalpel, Huan Tianda Medical Instruments, China
- ♦ Ισοπροπανόλη, 2-Propanol, Analytical grade Chemie, Spain (Cat No. AL 0323)
- ♦ Απόλυτη αιθανόλη (Absolute Ethanol) Scharlau Chemie, Spain (Cat No. ET00162500).

3.7 Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός

Πίνακας 2-7: Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη

Περιγραφή	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
Μικροφυγόκεντρος	Centrifuge: Minispin	Eppendorf, Germany
Συσκευή Ανάδευσης	Vortex Press to mix (34524)	Snijders Scientific, Holland
Θερμικός κυκλοποιητής	DNA Engine® Peltier Thermal Cycler (PTC-0200)	Bio-Rad, USA
Συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης	Wide mini subcell GT system electrophoresis tanks	Bio-Rad, USA Cat No 63S33160 Cat No 63S35755
Συσκευή υπεριώδης φωτός	UV Transilluminator Mini Bis Pro	DNr Bio-Imaging Systems, USA
Βαθμολογημένες πιπέτες 0,2-2μL, 2-20μL, 2-100μL, 50-200 μL, 200-1000 μL	Gilson Pipetman Classic™ Adjustable volume pipettes	Gilson, France

3.8 Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη

Πίνακας 2-8: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

Περιγραφή	Όνομα Προϊόντος	Προμηθευτής
Σωληνάκια γενικής αίματος	Vacurette® EDTA tubes Cat No. 454087	Vacurette, USA
Φιαλίδια PCR	0,2 ml, Thin Wall PCR Tubes Cat No. 683201	Greiner Bio-one, Germany
Φιαλίδια Φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase-Dnase free, 1,5mL microfuge tubes Cat No. AM 12400	Ambion, USA
Ρύγχη πιπέτας 10μL με φίλτρο	10μL sterilized filter tips Cat No. DF10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100μL με φίλτρο	100μL sterilized filter tips Cat No. DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200μL	200μL sterilized tips Cat No. D200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200μL με φίλτρο	200μL sterilized filter tips Cat No. DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000μL	1000μL sterilized tips Cat No. D1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000μL με φίλτρο	1000μL sterilized filter tips Cat No. DF1000ST	Gilson Inc, USA

4.0 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

4.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από περιφερικό αίμα, που είχε ληφθεί άμεσα, σε σωληνάρια γενικής αίματος που περιείχαν K₃EDTA ως αντιπηκτικό, με τη χρήση του QIAamp DNA mini kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Αναλυτικά, 20μL πρωτεΐνασης K τοποθετήθηκαν σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5ml. Ο σκοπός του ενζύμου αυτού είναι η πέψη πεπτιδικών δεσμών που βρίσκονται είτε στην κυτταρική μεμβράνη είτε προσδεμένα στο DNA. Με τη χρήση του ενζύμου αυτού επιτυγχάνεται λύση της κυτταρικής μεμβράνης και "καθαρισμός" του DNA.

Στη συνέχεια, στο ίδιο σωληνάριο, προστέθηκαν 200μL του δείγματος (περιφερικό αίμα), και 200 μL διαλύματος λύσης (AL buffer), το οποίο παρέχεται έτοιμο από το κατασκευαστή (Qiagen).

Μετά από ανάδευση (pulse-vortexing) για περίπου 15 δευτερόλεπτα του παρασκευάσματος, ακολούθησε επώαση στους 56°C για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 200μL απόλυτης αιθανόλης. (Η αιθανόλη τερματίζει τη δράση της πρωτεΐνασης).

Ύστερα από ταχεία ανάδευση, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές στήλες (Qiagen spin columns), και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8000 rpm (κατακράτηση του DNA στον ηθμό της στήλης).

Ακολούθησε προθήκη 500 μL διαλύματος έκπλυσης AW1 και νέα φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό, και στο επόμενο βήμα έγινε προσθήκη 500μL διαλύματος έκπλυσης AW2 και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3 λεπτά. Τα

διαλύματα AW1 και AW2 απομακρύνουν πρωτεΐνες και άλατα από το DNA κάνοντας έτσι τη καθαρότητα του DNA βέλτιστη.

Έπειτα, αφού προστέθηκαν σε κάθε στήλη 200 μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$) για ένα λεπτό και ακολούθησε τελική φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για ένα λεπτό. Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν στη βαθιά κατάψυξη (-80°C).

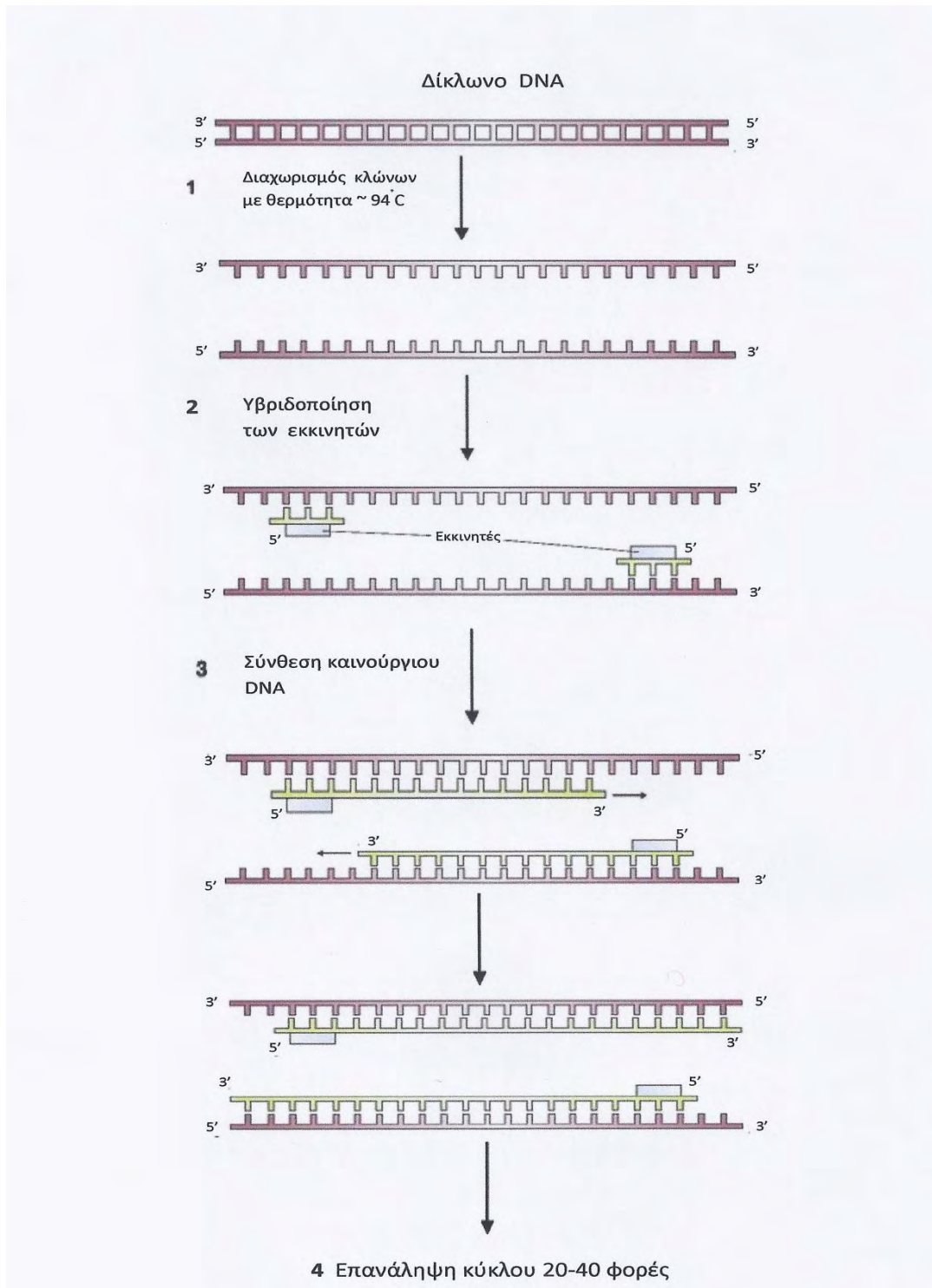
4.2 PCR ΤΩΝ 10 ΕΞΟΝΙΩΝ ΤΟΥ SIAE

Προκειμένου να αναλυθεί η ακολουθία ενός τμήματος DNA, είναι απαραίτητο να παραχθεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός αντιγράφων του συγκεκριμένου τμήματος αυτού. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής *in vitro* τεραστίου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η μέθοδος της PCR εφευρέθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, που πήρε για την ανακάλυψη του αυτή το Νόμπελ χημείας το 1994 [179, 180]

Ένας πλήρης κύκλος μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια (και τα 3 στάδια γίνονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες) [181] :

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation step). Γίνεται θέρμανση του DNA για την αποδιάταξη του στους $93-95^{\circ}\text{C}$.
- Αναδιάταξη του DNA (annealing step). Γίνεται ελάττωση θερμοκρασίας για να επιτευχθεί η θερμοκρασία υβριδισμού ή αναδιάταξης, όπου κάθε ένας από τους εκκινητές προσδένεται στο συμπληρωματικό του κομμάτι με το στόχο (template) DNA.
- Επιμήκυνση του DNA (elongation step). Η Πολυμεράση συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα του στόχου DNA και χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) συνθέτει μία νέα αλυσίδα DNA με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$.

Τα τρία παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται 20-40 φορές, που έχει ως αποτέλεσμα η DNA αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Να σημειωθεί, ότι η αύξηση δεν είναι εκθετική μετά από αρκετούς κύκλους, καθώς τα αντιδραστήρια του μείγματος ελαττώνονται.



Εικόνα 2-2: Τα βασικά βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (από Brown TA, με τροποποιήσεις [182])

Στο πειραματικό κομμάτι της διατριβή αυτής, έγινε βελτιστοποίηση τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και για τα δέκα εξόνια του SIAE. Η ενίσχυση -πολλαπλασιασμός όλων των εξονίων (10 συνολικά) του SIAE, συμπεριλαμβανομένων και των ορίων μεταξύ εξονίων και εσονίων, επιτεύχθηκε με την εφαρμογή/ χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Οι πίνακες 2-8 μέχρι 2-18 παρουσιάζουν τις συνθήκες και ποσοτικές λεπτομέρειες σχετικά με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη PCR του κάθε εξονίου

ΕΞΟΝΙΟ 1

Πίνακας 2-9: PCR Μείγμα για εξόνιο 1

PCR MIX SIAE ΕΞΟΝΙΟ 1	
dH ₂ O	185 μL
10 x Buffer (χωρίς Mg-incomplete)	50 μL
5' primer (50 pmol/ μL)	10 μL
3' primer (50 pmol/ μL)	10 μL
dNTPs (2,5 mM)	40 μL
MgCl ₂ (100mM)	15 μL
DMSO	50 μL

Το Taq Mix ήταν ίδιο για τις PCR και των δέκα εξονίων

Πίνακας 2-10: Μείγμα Taq (ίδιο για τις PCR και των 10 εξονίων)

TAQ MIX	
Taq DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (DFS Taq polymerase Bioron) 5u/μl	4.4 μL
d H ₂ O	100 μL

Για όλες τις αντιδράσεις PCR, για όλα τα εξόνια, ό όγκος του μείγματος ήταν 30 μL : (24μL PCR mix + 4μL Taq Mix + 2μL DNA).

Πίνακας 2-11: Συνθήκες PCR για εξόνιο 1

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 1	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	63 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	34

ΕΞΟΝΙΟ 2

Για τις PCR των εξονίων 2-10, ο τρόπος που έγιναν οι PCR ήταν ακριβώς ίδιος, αλλά διέφεραν οι συνθήκες της αντίδρασης.

Πίνακας 2-12: Μείγμα PCR, (εξόνια 2-10)

PCR MIX SIAE ΕΞΟΝΙΟ 2	
dH ₂ O	235 µL
10 x Buffer (χωρίς Mg-incomplete)	50 µL
5' primer (50 pmol/ µL)	10 µL
3' primer (50 pmol/ µL)	10 µL
dNTPs (2,5 mM)	40 µL
MgCl ₂ (100mM)	15 µL

Πίνακας 2-13: Συνθήκες PCR για εξόνιο 2

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 2	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	53 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	32

ΕΞΟΝΙΟ 3

Πίνακας 2-14: Συνθήκες PCR για εξόνιο 3

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 3	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	60 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	32

ΕΞΟΝΙΟ 4

Πίνακας 2-15: Συνθήκες PCR για εξόνιο 4

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 4	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	60 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	33

ΕΞΟΝΙΟ 5

Πίνακας 2-16: Συνθήκες PCR για εξόνιο 5

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 5	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	56 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	31

ΕΞΟΝΙΟ 6

Πίνακας 2-17: Συνθήκες PCR για εξόνιο 6

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 6	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	56 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	32

ΕΞΟΝΙΟ 7

Πίνακας 2-18: Συνθήκες PCR για εξόνιο 7

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 7	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	56 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	30

ΕΞΟΝΙΟ 8

Πίνακας 2-19: Συνθήκες PCR για εξόνιο 8

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 8	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	55 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	32

ΕΞΟΝΙΟ 9

Πίνακας 2-20: Συνθήκες PCR για εξόνιο 9

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 9	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	55 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	31

ΕΞΟΝΙΟ 10

Πίνακας 2-21: Συνθήκες PCR για εξόνιο 10

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΕΞΟΝΙΟ 10	
Αρχική αποδιάταξη	94 για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94 για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	55 για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 για 5 λεπτά
Συνολικός αριθμός κύκλων	30

4.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να διαπιστωθεί η επιτυχία των PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μία απλή και αποτελεσματική μέθοδος για την ανίχνευση και διαχωρισμό μορίων DNA που κυμαίνονται από 100 μέχρι 25000 bp [183].

Οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA έχουν αρνητικό φορτίο, έτσι όταν ηλεκτρικό φορτίο εφαρμόζεται στα άκρα του πηκτώματος, το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται στην θετικά φορτισμένη άνοδο. Για το λόγο ότι το DNA έχει ομοιόμορφη αναλογία φορτίου προς μάζα, τα μόρια του DNA κινούνται σε πήκτωμα αγαρόζης με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο του λογάριθμου του μοριακού του βάρους [183,184].

Εκτός από το μέγεθος του μορίου του DNA, άλλοι παράγοντες που καθορίζουν το διαχωρισμό για την ανίχνευση του DNA στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι: η συγκέντρωση της αγαρόζης, η σχηματική δομή του DNA, το μέγεθος της τάσης που εφαρμόζεται, ο τύπος της αγαρόζης και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται [183,184].

Η ανίχνευση των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA, και έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση του κάτω από υπεριώδης φως. Σημαντικό μειονεκτήματα της χρήσης βρωμιούχου αιθιδίου ως μέθοδος ανίχνευσης των προϊόντων PCR είναι ότι η συγκεκριμένη χρωστική ανιχνεύει μπάντες που περιέχουν πάνω από 5 ng ή περισσότερο DNA και επίσης η τοξικότητα του [185].

Αναλυτικά:

1. Σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE (Tris borate EDTA) διαλύθηκαν 2 gr. αγαρόζης σε κωνική φιάλη. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με βρασμό για 2 min σε φούρνο μικροκυμάτων.
2. Η κωνική φιάλη με την διαλυμένη αγαρόζη αφήνεται να κρυώσει λιγάκι (περίπου στους 50°C) και στη συνέχεια προστέθηκαν 5μL χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου.
3. Το διάλυμα έπειτα μεταφέρθηκε στο «πιάτο» ηλεκτροφόρησης, όπου προγενέστερα είχαν τοποθετηθεί τα ειδικά κτενάκια.
4. Το πήκτωμα αφέθηκε προκειμένου να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά και έπειτα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 1 X TBE.
5. Σε 2μL προϊόντων PCR και σε 2μL control προστέθηκαν 0.5μL χρωστικής (10X Blue Juice™ Gel loading buffer).
6. Τα παραπάνω δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος και επίσης ένα δείγμα DNA μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους.
7. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε με εφαρμογή ρεύματος 400mA και 120V για 40 λεπτά
8. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε κάτω από υπεριώδη φώς και φωτογραφήθηκε με τη χρήση της συσκευής UV transilluminator Mini Bis Pro (DNr Bio-Imaging Systems, USA).

4.4 Καθαρισμός DNA έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας το QIAquick PCR Purification kit της Qiagen.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να καθαριστούν τα προϊόντα PCR, που δεν είχαν παραπροϊόντα.

1. Αναλυτικά, πέντε όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος PB (140 μ L) προσθέτονταν σε ένα όγκο αντίδρασης PCR (28 μ L).
2. Ύστερα από ελαφρά ανάμιξη, τα μείγματα μεταφέρονταν σε στήλη QIAquick spin όπου γίνονταν φυγοκέντρηση για 1 min στις 13 000 rpm.
3. Το έκλουσμα αποχύνονταν και στη στήλη προσθέτονταν 750 μ L ρυθμιστικού διαλύματος PE^{*}. Ακολούθησε, φυγοκέντρηση για 1 min στις 13 000 rpm.
4. Το έκλουσμα ξανά αποχύνονταν και ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση για 1 min στις 13 000 rpm.
5. Προκειμένου να εξατμιστεί όλη η παραμένουσα αιθανόλη, το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε για ακόμα μια φορά, και η στήλη αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου (~20°C) για πέντε λεπτά.
6. Στο τελικό βήμα της διαδικασίας, το DNA εκλούονταν με την προσθήκη 30 μ L ρυθμιστικού διαλύματος EB και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13 000 rpm και τα καθαρισμένα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στη βαθιά κατάψυξη (-80°C).

(Να σημειωθεί ότι πριν την έναρξη της διαδικασίας 55 μ L PE είχαν αραιωθεί με 220 μ L καθαρής αιθανόλης για να γίνει ένας τελικός όγκος 275 μ L, δηλαδή αραιώση 1:5).

4.5 Καθαρισμός DNA έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας το QIAquick Gel Extraction kit της Qiagen.

Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται παραπάνω (3.2.2), με μερικές τροποποιήσεις.

1. Συγκεκριμένα, σε βαθύτερα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκαν 24μL προϊόντος PCR με 4μL χρωστικής. Αντί για ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, χρησιμοποιήθηκε 1 X TAE. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε με εφαρμογή ρεύματος 400mA και 120V για 55 λεπτά.
2. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το κομμάτι της πηκτής με τις επιθυμητή ζώνη DNA διαχωρίζονταν από την υπόλοιπη πηκτή χρησιμοποιώντας μία αποστειρωμένη λεπίδα χειρουργικού νυστεριού.
3. Το κομμάτι της πηκτής (με την επιθυμητή ζώνη DNA), ζυγίζονταν σε ένα αποστειρωμένο Eppendorf. Τρεις όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG προσθέτονταν σε ένα όγκο πηκτής (θεωρώντας ότι 100mg πηκτής ~ 100μL).
4. Το μείγμα επωάζονταν στους 50°C για 10 λεπτά, και στο χρονικό αυτό διάστημα γίνονταν ελαφρά ανάδευση κάθε τρία λεπτά περίπου, προκειμένου η πηκτή να διαλυθεί τελείως. (Το χρώμα που προέκυπτε έπειτα από την διάλυση της πηκτής ήταν πάντα κίτρινο, ενδεικτικό $pH \leq 7$, οπότε δε χρειάστηκε η προσθήκη διαλύματος 3M CH_3COONa).
5. Ακολούθησε προσθήκη όγκου ισοπροπανόλης ίσου με το αρχικό βάρος του κομματιού πηκτής του δείγματος, ανάμειξη και μεταφορά του διαλύματος στην ειδική στήλη QIAquick και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13000rpm. Στη φάση αυτή το DNA προσδένεται στη στήλη. Το διάλυμα που διαπέρναγε τη στήλη πετάγονταν.

6. Στη συνέχεια προσθέτονταν 500 μL QG. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης στις 13000 rpm για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη πετάγονταν.
7. Μετά προστέθηκαν 750 μL PE. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη πετάγονταν. Η στήλη αφέθηκε για 5 min, προκειμένου η αιθανόλη που βρίσκεται στο διάλυμα PE να εξατμιστεί.
8. Ακολούθησε άλλη μία φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min και το ελάχιστο διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη ξανά πετάγονταν.
9. Στο τελικό βήμα της διαδικασίας, το DNA εκλούονταν με την προσθήκη 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος EB και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13 000 rpm, και τα καθαρισμένα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στη βαθιά κατάψυξη (-80°C).

4.6 Αυτόματος προσδιορισμός ακολουθίας DNA (Sequencing)

Ο αυτόματος προσδιορισμός ακολουθίας DNA πραγματοποιήθηκε με τον αναλυτή ABI Prism 310 Genetic Analyzer της Applied Biosystems, χρησιμοποιώντας το kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing της ίδιας εταιρείας.

Ο συγκεκριμένος αναλυτής έχει ως βάση λειτουργίας μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου των Sanger *et al.* (1997) [186]. Ο διαχωρισμός των προϊόντων PCR επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση, με τη χρήση τριχοειδή (capillary electrophoresis). Η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται μέσω μέτρησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού από τα επισημασμένα τμήματα DNA, έπειτα από διέγερση με laser ιόντων αργού [187]. Τα χρώματα που αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια έχουν ως εξής : A – πράσινο, C-μπλε, G- μαύρο, T- κόκκινο.

4.7 Επεξεργασία δεδομένων με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων

Τα αποτελέσματα του αυτόματου προσδιορισμού ακολουθίας DNA, αναλύθηκαν από το λογισμικό Chromas LITE έκδοση 2.01. και το διαδικτυακό πρόγραμμα ensembl <http://www.ensembl.org/index.html>

Οι στοιχίσεις μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκαν με το διαδικτυακό πρόγραμμα Multalin <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

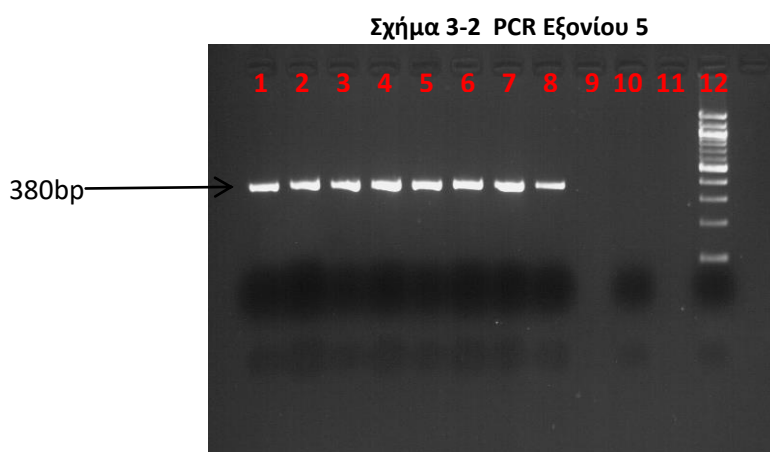
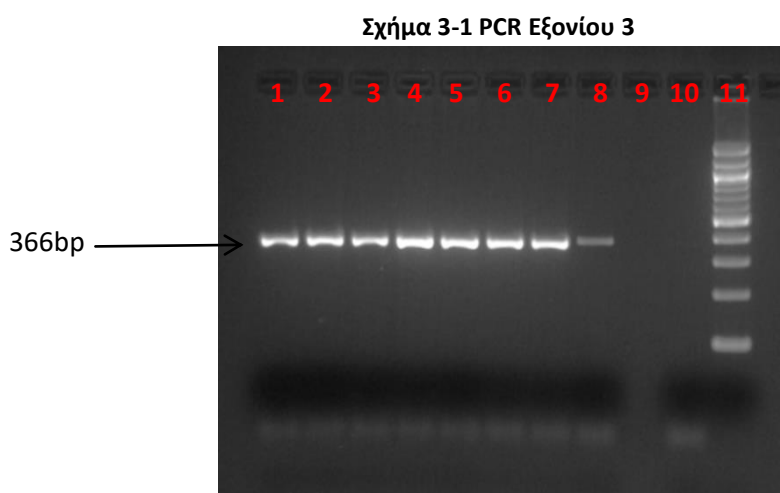
3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.0 PCR των υπό μελέτη τμημάτων του γονιδίου της SIAE

Τα αναμενόμενα τμήματα γονιδιακού DNA που αφορούν στις υπό μελέτη περιοχές μεταλλάξεων του γονιδίου πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς. Συγκεκριμένα: πολλαπλασιάστηκαν για τα εξόνια 1-10, τμήματα περιοχών DNA με μήκος 339bp, 344bp, 366bp, 457bp, 380bp, 288bp, 342bp, 259bp, 432bp, 544bp, αντίστοιχα.

Ενδεικτικά στις εικόνες 3-1 και 3-2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ηλεκτροφορητικού ελέγχου σε πήκτωμα αγαρόζης των PCR που αφορούν τις υπό μελέτη περιοχές του εξωνίου 3 και 5, αντίστοιχα.



Κατόπιν του ηλεκτροφορητικού ελέγχου της PCR ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων αυτών από τυχών προσμίξεις (παραπροϊόντα) και εν συνεχεία η αλληλούχιση (sequencing) των υπό μελέτη περιοχών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

2.0 Αποτελέσματα αλληλούχισης (sequencing)

2.1. Οικογένειες που μελετήθηκαν με CVID (5 οικογένειες)

Ο πίνακας 3-1 παρακάτω παρουσιάζει τυχών κλινικές εκδηλώσεις και τη κλινική διάγνωση μελών της οικογένειας 1 και ο πίνακας 3-2 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE.

Πίνακας 3-1. Ασθενείς, διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της οικογένειας Νο 1

Ασθενής/Υγιής No.	Φύλο	Ηλικία	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
1 (Γιαγιά)	Θ	85			Υγιής
2 (Υιός)	A	54	Βρογχεκτασία, Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) Παθολογικές εκδηλώσεις άνω και κάτω αναπνευστικού		CVID
3 (Υιός)	A	53		Ρευματοειδή αρθρίτιδα	RA
4 (Κόρη)	Θ	51			Υγιής
5 (Κόρη)	Θ	47		Ατοπία	Υγιής
6 (Εγγονή)	Θ	34	Κοκκιωματώδη νόσο, Παθολογικά συμπτώματα άνω αναπνευστικού		CVID
7 (Εγγονός)	A	22			sigG4
8 (Εγγονή)	Θ	17			sigG4

Πίνακας 3-2. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE για την οικογένεια Νο 1.

Ηλικία	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
1	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
2	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
3	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
4	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
5	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
6	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
7	wt	g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
8		g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225						g.41675A>G ετερόζυγος (εσόνιο 8) rs620499		

Ο πίνακας 3-3 παρακάτω παρουσιάζει τυχών κλινικές εκδηλώσεις και τη κλινική διάγνωση μελών της οικογένειας 2 και ο πίνακας 3-4 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE.

Πίνακας 3-3. Ασθενείς, διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της οικογένειας No 2

Ασθενής No.	Φύλο	Ηλικία	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
9 (Κόρη)	Θ	30		Υποτροπιάζουσα ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα, Ατροφική γαστρίτιδα	CVID
10 (Μητέρα)	Θ	63		Λύκος	SLE (Συστημικός ερυθματώδης λύκος)

Πίνακας 3-4. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE για την οικογένεια No 2.

Ασθενής No.	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
9 (Κόρη)	wt	g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
10 (Μητέρα)	wt	g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	g.20536A>G M89V/wt rs78778622	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

Ο πίνακας 3-5 παρακάτω παρουσιάζει τυχών κλινικές εκδηλώσεις και τη κλινική διάγνωση μελών της οικογένειας 3 και ο πίνακας 3-6 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE.

Πίνακας 3-5. Ασθενείς, διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της οικογένειας No 3

Ασθενής No.	Φύλο	Ηλικία	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
11 (ανιψιά)	Θ	29	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικού	αρθρίτιδα	CVID
12 (αδελφός μητέρας)	A	61		Δερματικός λύκος	

Πίνακας 3-6. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE για την οικογένεια No 3.

Ασθενής No.	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
11 (ανιψιά)	wt	g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	g.41675A>G ετερόζυγος (εσόνιο 8) rs620499	wt	wt
12 (αδελφός μητέρας)	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

Ο πίνακας 3-7 παρουσιάζει τυχών κλινικές εκδηλώσεις και τη κλινική διάγνωση μελών της οικογένειας 4 και ο πίνακας 3-8 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE.

Πίνακας 3-7. Ασθενείς, διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της οικογένειας No 4

Ασθενής No.	Φύλο	Ηλικία	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
13	Θ	38		Ορογονίτις	CVID

Πίνακας 3-8. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE για την οικογένεια No 4.

Ασθενής No.	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
13	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

Ο πίνακας 3-9 παρουσιάζει τυχών κλινικές εκδηλώσεις και τη κλινική διάγνωση μελών της οικογένειας 5 και ο πίνακας 3-10 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE

Πίνακας 3-9. Ασθενείς, διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της οικογένειας Νο 5

Ασθενής No.	Φύλο	Ηλικία	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
14	Θ	30	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικού		CVID

Πίνακας 3-10. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE για την οικογένεια Νο 5.

Ασθενής No.	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
14	wt	g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

2.2 Οικογένεια που μελετήθηκε με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (οικογένεια Νο 6)

Ο πίνακας 3-11 παρουσιάζει τυχών κλινικές εκδηλώσεις και τη κλινική διάγνωση μελών της οικογένειας 6 και ο πίνακας 3-12 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE

Πίνακας 3-11. Ασθενείς, διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της οικογένειας Νο 6

Ασθενής No.	Φύλο	Ηλικία	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
15 Γιος	A	32	Υπερτρανσαμινασαιμία, Λιπώδες ήπαρ	Πιθανή πρωτοπαθής χολική κίρρωση	slgAD
16 Μητέρα	Θ	64			slgAD

Πίνακας 3-12. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE για την οικογένεια Νο 6.

Ασθενής No.	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
15 Γιος	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
16 Μητέρα	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

2.3 Ασθενείς με IgA ανεπάρκεια που όλοι ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες

Στον πίνακα **3-13** που ακολουθεί παρουσιάζονται η διάγνωση και τυχών κλινικές εκδηλώσεις ασθενών με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια σε ασθενείς που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες τόσο από τις ήδη που μελετήθηκαν όσο και μεταξύ τους. (ασθενείς 17-40)

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	Οικογένεια	Κλινικές εκδηλώσεις	Αυτοανοσία	Διάγνωση
17	Θ	33	7	Ουρολοιμώξεις και λοιμώξεις άνω αναπνευστικού	Σύνδρομο Raynaud	slgAD +IgG4D
18	Θ	6	8		Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι	slgAD +IgG4D
19	Θ	37	9		Αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός	slgAD
20	Θ	11	10	Παθολογικές εκδηλώσεις από το ανώτερο αναπνευστικό	Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι, Κολιοκάκη	slgAD
21	A	6	11	Οικογενής μεσογειακός πυρετός (FMF)		slgAD
22	A	14	12		Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι	slgAD
23	A	15	13		Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι, νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα (αυτοάνοση)	slgAD
24	Θ	13	14		Υποτροπιάζουσα ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα	slgAD
25	Θ	13	15	Παθολογικές εκδηλώσεις από το ανώτερο αναπνευστικό	Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι, Αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός	slgAD
26	Θ	53	16		Συστημικός ερυθματώδης λύκος, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	slgAD + SLE
27	A	11	17	Τυχαίο εύρημα		slgAD
28	A	64	18	Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD)		slgAD
29	Θ	11	19		Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι	slgAD
30	Θ	11	20	Λοιμώξεις του αναπνευστικού		slgAD
31	Θ	9	21		Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης τύπου Ι	slgAD
32	Θ	13,5	22	Τυχαία εύρημα		slgAD
33	Θ	79	23	Τυχαίο εύρημα		IgAD +IgG4D
34	A	7	24	Πνευμονία		slgAD
35	Θ	16	25	Παθολογικές εκδηλώσεις αναπνευστικού, γαστρεντερικού και ουροποιητικού		slgAD
36	A	6	26	Οικογενής μεσογειακός πυρετός (FMF)		slgAD
37	Θ	5	27	Τυχαίο εύρημα		slgAD
38	A	2	28	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικού		slgAD
39	Θ	18	29	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικού		slgAD
40	A	5	30	Λοιμώξεις αναπνευστικού		slgAD

Στον πίνακα 3-14 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου της SIAE σε ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια, οι οποίοι ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες τόσο από τις ήδη που μελετήθηκαν όσο και μεταξύ τους.

Ασθενής	Εξόνιο 1	Εξόνιο 2	Εξόνιο 3	Εξόνιο 4	Εξόνιο 5	Εξόνιο 6	Εξόνιο 7	Εξόνιο 8	Εξόνιο 9	Εξόνιο 10
17	wt	g.11964G>A ετερόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
18	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
19	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
20	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
21	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
22	wt	wt	wt	g.26573>C rs1942663 S156S/wt	g.31722C>T ετερόζυγος (εσόνιο 5) rs79300393	wt	wt	wt	wt	g.44233G>A rs7941327 T484T/wt
23	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
24	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	Wt
25	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
26	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
27	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
28	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
29	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
30	wt	wt	g.20536A>G M89V/wt rs78778622	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
31	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
32	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
33	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	g.41675A>G ετερόζυγος (εσόνιο 8) rs620499	wt	wt
34	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	ετερόζυγος g.26532T>C, c.427T>C, L143L	wt	wt	wt	wt	wt	wt
35	wt	g.11964G>A ομόζυγος (εσόνιο 2) rs512225	wt	wt	wt	wt	wt	g.41675A>G ετερόζυγος (εσόνιο 8) rs620499	wt	wt
36	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
37	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
38	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
39	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	g.42499C>T ετερόζυγος (εσόνιο 8) rs77343428	wt	wt
40	wt	Wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

3.0 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

1. Κανείς ασθενής με CVID (με αυτοανοσία ή όχι), δε βρέθηκε να φέρει κάποια SIAE μετάλλαξη εξωνίων.

2. Μία ασθενής 11 ετών που διαγνώσθηκε με sIgAD κατά τη διάρκεια μίας λοίμωξης του αναπνευστικού (ασθενής 30), αλλά επίσης η μητέρα μίας ασθενούς με CVID (οικογένεια 2, ασθενής 10), που έπασχε από Συστημικό ερυθματώδη λύκο βρέθηκαν να είναι ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη **M89V** (g.20536A >G, rs **78778622**), στο Εξόνιο 3, (βλεπ. σχήμα 3-3). Όπως είχε αναφερθεί στο γενικό μέρος η SIAE που φέρει τη μετάλλαξη M89V είναι καταλυτικά φυσιολογική και πιθανότατα δρα σε ενδοκυτταρική τοποθεσία.

3. Σε ένα ασθενή με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (ασθενής 34) βρέθηκε μία novel, σιωπηλή μετάλλαξη, συγκεκριμένα η **L143L** (g.26532T>C, c.427T>C) στο Εξόνιο 4. (βλεπ. σχήμα 3-4). Οι σιωπηλές μεταλλάξεις είναι μεταλλάξεις που οδηγούν σε συνώνυμο κωδικόνιο, οπότε δεν αλλάζει η αλληλουχία της παραγόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, σε αυτή την περίπτωση η αλληλουχία της SIAE. Novel μετάλλαξη ονομάζεται η μετάλλαξη που ανακαλύπτεται για πρώτη φορά.

4. Σε ένα ασθενή με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (ασθενής 22) βρέθηκαν δύο σιωπηλές μεταλλάξεις συγκεκριμένα η μετάλλαξη **S156S** (g.26573T>C, rs**1942663**) στο Εξόνιο 4 και η μετάλλαξη **T484T** (g. 44233G>A, rs**7941327**) στο Εξόνιο 10. (βλεπ σχήμα 3-5 και 3-6 αντίστοιχα). Ο ασθενής έπασχε από Ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη τύπου I.

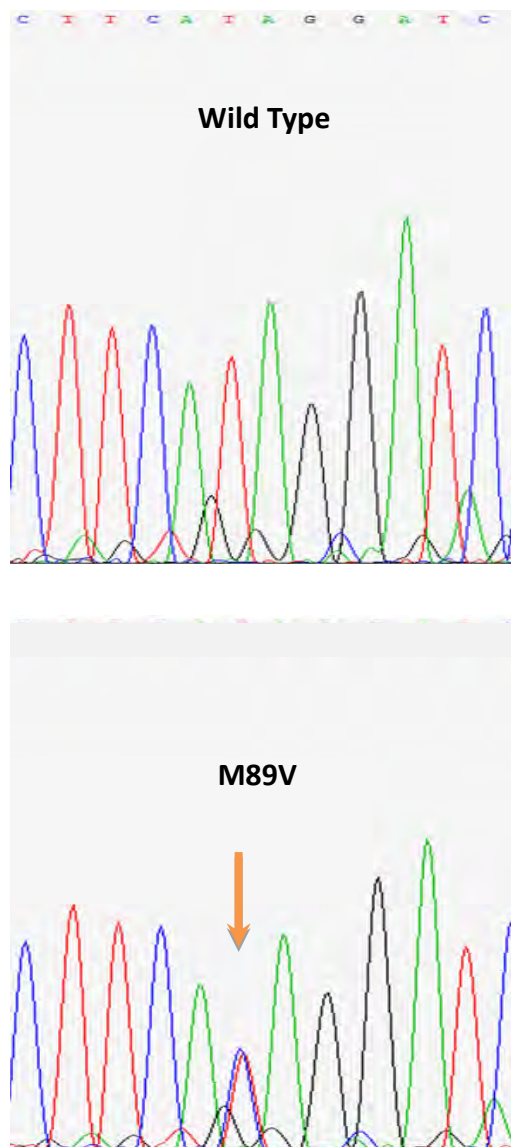
5. Εσόνια είναι οι ενδιάμεσες αλληλουχίες DNA των γονιδίων, άρα και του πρόδρομου RNA, που δε μεταφράζονται σε αμινοξέα. Όπως ήταν αναμενόμενο, αρκετές γνωστές μεταλλάξεις εσονίων βρέθηκαν στα δείγματα. Αυτές είναι οι g.11964G>A (rs512225, εσόνιο 2), g.31722C>T (rs79300393, εσόνιο 5), g.42499C>T (rs 77343428, εσόνιο 8) και g.41675A>G (rs620499, εσόνιο 8).

6. Άλλες παρατηρήσεις:

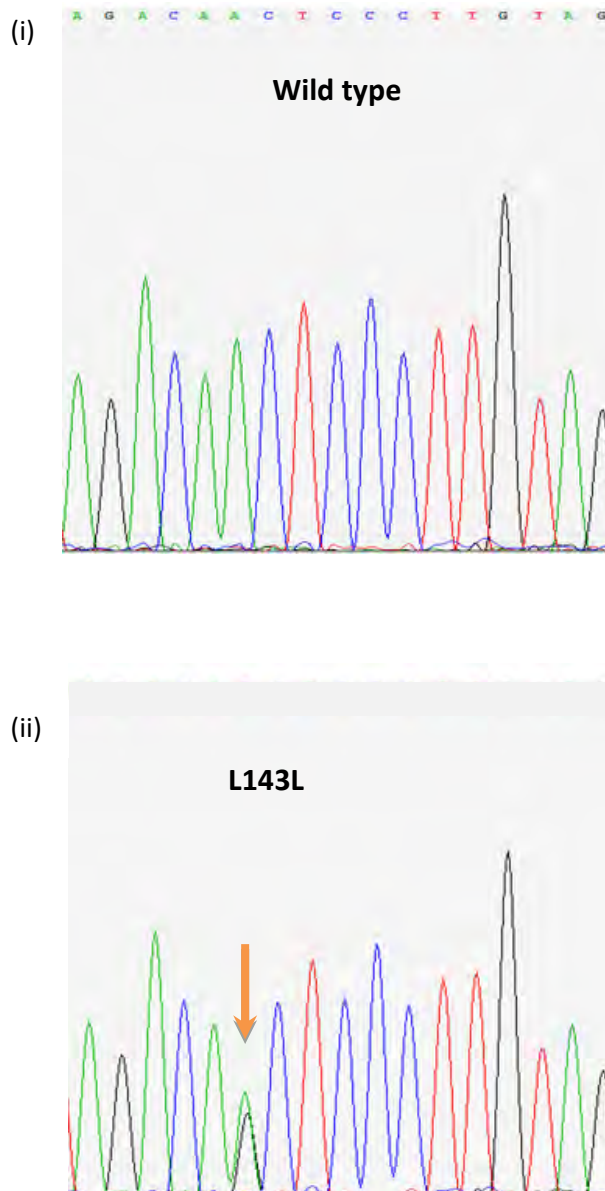
i. Τρεις από τους έξι ασθενείς με CVID (50%) εμφάνιζαν αυτοάνοσες παθήσεις, και δώδεκα από τους 26 ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (46.15%) εμφάνιζαν αυτοάνοσες παθήσεις.

ii. Δύο από τους 26 ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια έπασχαν από Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό (**FMF**).

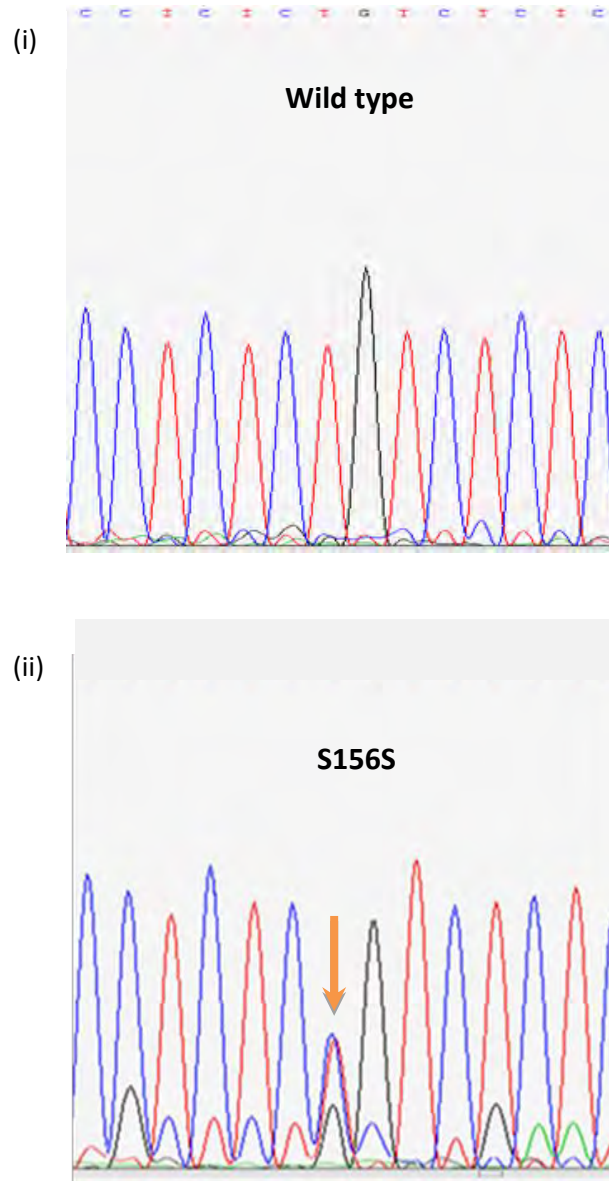
Σχήμα 3-3 :Απεικόνιση της μετάλλαξης **M89V** : Στο κωδικόνιο **ATG (Μεθειονίνη)**, η βάση αδενίνη αντικαταστάθηκε με γουανίνη και πλέον κωδικοποιεί για το αμινοξύ **Βαλίνη (GTG)**. (Υ.Γ. :Οι βάσεις διαβάζονται συμπληρωματικά και αντίστροφα, χρησιμοποιήθηκε οπίσθιος εκκινητής.)



Σχήμα 3-4 :Απεικόνιση της μετάλλαξης L143L : Στο κωδικόνιο **TTG (Λευκίνη)**, η βάση θειαμίνη αντικαταστάθηκε με τη βάση κυτοσίνη αλλά εξακολουθεί να κωδικοποιεί για το αμινοξύ **Λευκίνη (CTG)**. (Υ.Γ. :Οι βάσεις διαβάζονται συμπληρωματικά και αντίστροφα, χρησιμοποιήθηκε οπίσθιος εκκινητής.)

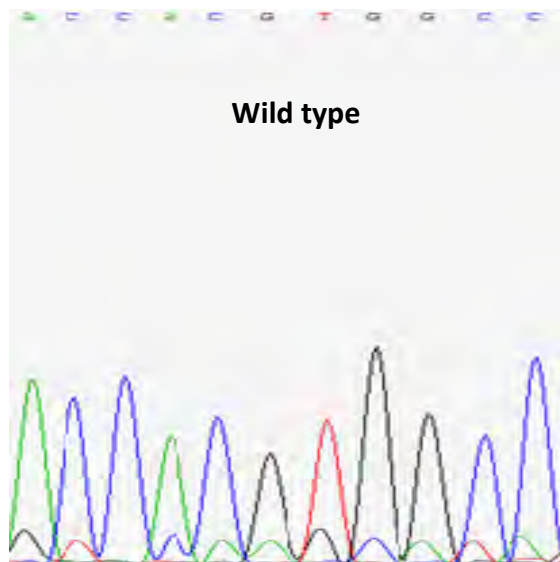


Σχήμα 3-5 :Απεικόνιση της μετάλλαξης S156S : Στο κωδικόνιο TCT (Σερίνη), η βάση θειαμίνη αντικαταστάθηκε με τη βάση κυτοσίνη αλλά εξακολουθεί να κωδικοποιεί για το αμινοξύ Σερίνη (TCC). (Χρησιμοποιήθηκε πρόσθιος εκκινητής.)

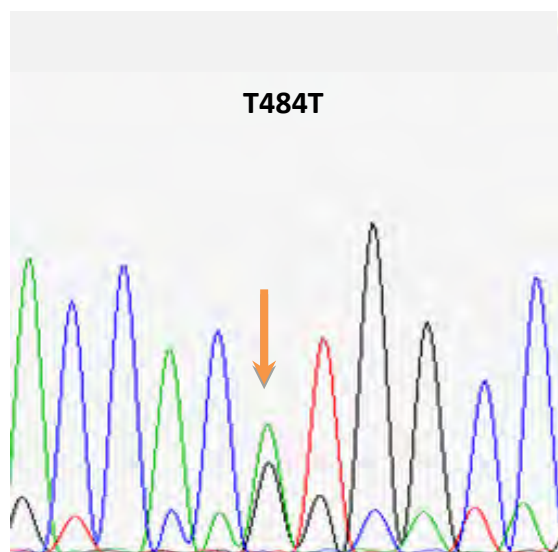


Σχήμα 3-6 :Απεικόνιση της μετάλλαξης T484T : Στο κωδικόνιο **ACG (Θρεονίνη)**, η βάση γουανίνη αντικαταστάθηκε με τη βάση αδενίνη αλλά εξακολουθεί να κωδικοποιεί για το αμινοξύ **Θρεονίνη (ACA)**. (Υ.Γ. :Οι βάσεις διαβάζονται συμπληρωματικά και αντίστροφα, χρησιμοποιήθηκε οπίσθιος εκκινητής.)

(i)



(ii)



4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.0 Μεταλλάξεις του γονιδίου SIAE που εντοπίστηκαν στη μελέτη

Η παρούσα μελέτη έχει την καινοτομία ότι είναι η πρώτη φορά όπου οι μεταλλάξεις του γονιδίου της SIAE μελετούνται προκειμένου να διευκρινιστεί η πιθανή συμμετοχή τους στην παθογένεση και το φαινότυπο δύο πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών και συγκεκριμένα της CVID και της sIgAD.

Το γεγονός ότι κανείς ασθενής με CVID (με αυτοανοσία ή όχι) δε βρέθηκε να φέρει κάποια μετάλλαξη εξονίων στο γονίδιο της SIAE είναι ένδειξη, ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της SIAE δεν εμπλέκονται στην παθογένεση και στο φαινότυπο της CVID. Ιδανικά, αν είχαν μελετηθεί περισσότερα από 6 δείγματα πιο ασφαλή συμπεράσματα θα μπορούσαν να βγουν.

Ο ασθενής 11 ετών που διαγνώσθηκε με sIgAD κατά τη διάρκεια μίας λοίμωξης του αναπνευστικού που ήταν ετερόζυγος για τη μετάλλαξη **M89V** δεν έπασχε από αυτοανοσία (ασθενής 30).

Επιπροσθέτως η μητέρα μίας ασθενούς με CVID (οικογένεια 2), που έπασχε από συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ασθενής 10), που βρέθηκε να είναι ετερόζυγη για την μετάλλαξη **M89V** αυτό που μπορεί να επισημανθεί είναι ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν ευθύνεται για το αυτοάνοσο φαινότυπο της συγκεκριμένης ασθενούς. Αυτό διότι, ξέρουμε από τη βιβλιογραφία ότι η **M89V** SIAE είναι καταλυτικά φυσιολογική και ότι εκκρίνεται φυσιολογικά και ενδοκυτταρικά (Chellara και συν) [176].

Για τον ασθενή 14 ετών που έπασχε από εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (ασθενής 22) και έπασχε από ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη τύπου I, και βρέθηκε να είναι ετερόζυγος για τη σιωπηλές μεταλλάξεις **S156S** και **T484T** μπορεί να επισημανθεί με μία σχετική βεβαιότητα ότι οι δύο αυτές συνώνυμες μεταλλάξεις δεν ευθύνονται για το αυτοάνοσο φαινότυπο του ασθενή. Όπως είχε προαναφερθεί, οι σιωπηλές μεταλλάξεις οδηγούν σε συνώνυμο κωδικόνιο, οπότε δεν γίνεται αλλαγή στην αλληλουχία της παραγόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, σε αυτή την περίπτωση η αλληλουχία της SIAE.

Παρόλα αυτά, θα πρέπει να αφεθεί μία πάρα πολύ μικρή πιθανότητα αμφιβολίας, ότι όντως η μετάλλαξη **S156S** ή η μετάλλαξη **T484T** της SIAE μπορεί να ευθύνεται ή να συμβάλει στο αυτοάνοσο φαινότυπο της εκλεκτικής IgA ανεπάρκειας. Το σκεπτικό έχει ως εξής: Την τελευταία δεκαετία ένας αριθμός μελετών έχουν δείξει ότι οι συνώνυμες μεταλλάξεις μπορούν να εμπλέκονται στην αιτιολογία ασθενειών. Αρκετοί από τους μηχανισμούς όπου οι συνώνυμες μεταλλάξεις μεταβάλλουν τη δομή, λειτουργία και έκφραση των πρωτεϊνών έχουν αποσαφηνιστεί. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι συνώνυμες μεταλλάξεις επιφέρουν αλλαγές στο φαινότυπο επηρεάζοντας το μάτισμα (splicing)

του mRNA, τη μεταφραστική πιστότητα, τη δομή του mRNA και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών [188,189]. Επιπροσθέτως, μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει καμία μελέτη προκειμένου να διαπιστωθεί αν η **S156S** SIAE ή η **T484T** SIAE είναι λιγότερο καταλυτικά φυσιολογική από τη SIAE που δε φέρει την **S156S** μετάλλαξη ή την **T484T** μετάλλαξη.

Για τη novel σιωπηλή μετάλλαξη **L143L** που βρέθηκε στο επτάχρονο αγόρι με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια ισχύει ότι και για τις συνώνυμες μεταλλάξεις **S156S** και **T484T**.

Επιγραμματικά, το συμπέρασμα της μελέτης φαίνεται να είναι ότι οι μεταλλάξεις της SIAE δεν ευθύνονται για ρίσκο αυτοάνοσων ασθενειών σε ασθενείς με CVID ή εκλεκτικής IgA ανεπάρκειας.

Σε τελική ανάλυση, η γνώμη μου είναι πως πραγματικά θα άξιζε η μελέτη να επαναληφθεί με ένα αρκετά μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (CVID και sIgAD) και ιδανικά να έχουν προέλευση από όλους της ηπείρου της γης.

2.0 Άλλες παρατηρήσεις και γενικότερα σχόλια

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (FMF), χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια πυρετού και τοπική φλεγμονώδη προσβολή των ορογόνων υμένων, των αρθρώσεων και του δέρματος [190]. Ο FMF προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο MEFV, το οποίο κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη pyrin [191]. Ο FMF είναι η πιο συχνή κληρονομική αυτοφλεγμονώδη ασθένεια [191]. Εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα μεσογειακής και μεσανατολικής καταγωγής και κυρίως Εβραίους, Τούρκους, Αρμένιους. Στους πληθυσμούς με αυξημένη συχνότητα ο αριθμός των ασθενών κυμαίνεται 1-3 στους 1000 ανθρώπους [192]. Στους ασθενείς της μελέτης με sIgAD 2/26 (7.7%) είχαν FMF, ποσοστό πολύ υψηλότερο από το γενικό πληθυσμό. Από τα παραπάνω, μπορώ να συμπεράνω ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που συσχετίζονται με την sIgAD, πιθανότατα επίσης συσχετίζονται και με την FMF.

Το αν κάποιος ασθενής με CVID ή sIgAD εμφανίσει κάποια αυτοάνοση νόσο ή όχι, πιθανότατα εξαρτάται από άλλους γενετικούς παράγοντες και όχι τις μεταλλάξεις του SIAE, όπως επίσης και περιβαλλοντικούς και επιγενετικούς παράγοντες.

Π.χ. ασθενείς με CVID που φέρουν κάποια μετάλλαξη στο μόριο TAC1 έχουν αυξημένη πιθανότητα να παρουσιάσουν αυτοάνοση κυτταροπενία και σπληνομεγαλία [193].

Υπάρχει πλέον κοινή παραδοχή ότι ανοσοανεπάρκειες και αυτοάνοσες ασθένειες μοιράζονται κοινά γονίδια [194].

Όσο αφορά τους περιβαλλοντικούς λόγους σε αυτή τη κατηγορία μπορούμε να συμπεριλάβουμε λοιμώξεις από ιούς και βακτήρια. Π.χ. πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει την εμπλοκή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) μόλυνσης στη παθογένεση της χρόνιας φλεγμονής σε ασθενείς με COVID [193].

Μιλώντας σε γενικότερη βάση, έχει ευρέως παρατηρηθεί ότι ορισμένες λοιμώξεις μπορούν να γίνουν η αιτία να προκληθεί κάποια αυτοάνοση ασθένεια. Παραδόξως, κάποιες λοιμώξεις μπορούν να έχουν προστατευτική επίδραση έναντι αυτοάνοσων νόσων [195].

Θεραπεία ανοσοανεπαρκειών με γονιδιακή θεραπεία είναι κάτι που πιθανόν θα γίνεται στο μέλλον (έπεται) [194].

Περίληψη

Εισαγωγή: Η ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος (SIAE) εμπλέκεται στη ρύθμιση της BCR σηματοδότησης, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της SIAE προδιαθέτουν για μια σειρά από σχετικά κοινά ανθρώπινα αυτοάνοσα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, του συστηματικού ερυθματώδη λύκου και της πολλαπλής σκλήρυνσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) και εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA (sIgAD) και/ή οι συγγενείς τους, εμφανίζουν μία προδιάθεση για αυτοανοσία, ο σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη και διερεύνηση των μεταλλάξεων της SIAE και η πιθανή συμβολή τους στη προδιάθεση αυτοάνοσων ασθενειών σε οικογένειες και άτομα με CVID και sIgAD.

Υλικά και Μέθοδοι: Σαράντα (40) ασθενείς (άνδρες/γυναίκες: 14/26, μέση ηλικία 29,2 χρόνια, με εύρος: 2-85 έτη) συμμετείχαν στη μελέτη. Μεταξύ αυτών, 26 ασθενείς έπασχαν από εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA. Δώδεκα (12) από τους 26 ασθενείς εμφάνιζαν αυτοάνοσες εκδηλώσεις όπως (συστημικό ερυθματώδη λύκο, σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, κοιλιοκάκη, νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα, αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα). Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν 5 οικογένειες [6 ασθενείς με CVID και 8 συγγενείς τους] κάποιιοι εκ των οποίων είχαν ιστορικό αυτοάνοσων ασθενειών όπως (συστηματικού ερυθματώδη λύκου, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, υποτροπιάζουσας ιδιοπαθούς θρομβοπενικής πορφύρας και νεανικής ρευματοειδούς αρθρίτιδας). Γενομικό DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα με τη χρήση του QIAamp DNA mini kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Για όλα τα δείγματα και τα δέκα εξόνια του γονιδίου SIAE ενισχύθηκαν συμπεριλαμβανομένων των ορίων εξονίων-ιντρονίων κάνοντας χρήση συμβατικών PCR. Το επόμενο βήμα ήταν να γίνει καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση συστήματος Qiagen PCR. Αυτόματος προσδιορισμός ακολουθίας DNA πραγματοποιήθηκε με τον αναλυτή ABI PRISM 310 Genetic Analyzer της Applied Biosystems, χρησιμοποιώντας το kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing της ίδιας εταιρείας.

Αποτελέσματα: Κανείς ασθενής με CVID (με εμφάνιση αυτοάνοσων συμπτωμάτων ή όχι) βρέθηκε να έχει κάποια μετάλλαξη σε εξόνιο της SIAE. Ωστόσο, μία ασθενής 11 χρόνων που διαγνώστηκε με sIgAD κατά τη διάρκεια μίας λοίμωξης του αναπνευστικού όπως επίσης και η μητέρα μίας ασθενούς με CVID βρέθηκαν να είναι ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη M89V (g.20536A>G, rs78778622, εξόνιο 3). Επιπροσθέτως, μία novel σιωπηλή μετάλλαξη βρέθηκε σε ένα ασθενή με sIgAD στο

εξόνιο 4 (g.26532T>C, c.427T>C, L143L). Επίσης, σε ένα ασθενή με sIgAD, 2 σιωπηλές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν, συγκεκριμένα η σιωπηλή μετάλλαξη S156S (g.26573T>C, rs1942663, εξόνιο 4) και η T484T (g.44233G>A, rs7941327, εξόνιο 10). Όπως ήταν αναμενόμενο, αρκετές γνωστές μεταλλάξεις εσονίων βρέθηκαν στα δείγματα. Αυτές είναι οι g.11964G>A (rs512225, εσόνιο 2), g.31722C>T (rs79300393, εσόνιο 5), g.42499C>T (rs 77343428, εσόνιο 8) και g.41675A>G (rs620499, εσόνιο 8).

Συμπεράσματα: Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι μεταλλάξεις της SIAE δεν σχετίζονται με κίνδυνο αυτοάνοσων ασθενειών, σε ασθενείς με CVID ή sIgAD. Ωστόσο, ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων CVID και sIgAD απαιτείται για ανάλυση, προκειμένου να έχουμε πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Abstract

Introduction: Sialic acid acetyltransferase (SIAE) is involved in the regulation of BCR signaling, contributing to the maintenance of immunological tolerance. Recently, it has been reported that mutations in the SIAE gene predispose to a number of relative common human autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, diabetes mellitus type I, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. Considering that patients with common variable immunodeficiency (CVID) and selective IgA deficiency (sIgAD) and/or their relatives display a predisposition to autoimmunity, the aim of this study was to investigate the mutational status of SIAE and its possible contribution in the autoimmune disease risk in families and individuals with CVID and sIgAD.

Materials and methods: Forty (40) patients (male/female: 14/26, mean age 29.2 years, and range: 2-85 years) were enrolled. Among them, 26 patients suffered from IgA deficiency. Twelve (12) of those 26 patients displayed autoimmune manifestations (lupus, diabetes mellitus I, celiac disease, juvenile rheumatoid arthritis, autoimmune thyroiditis, Raynaud's syndrome, idiopathic thrombocytopenic purpura). In addition, 5 families were studied, [6 patients with CVID and 8 relatives], some of which had a medical history of autoimmune diseases (lupus, rheumatoid arthritis, recurrent ITP, juvenile rheumatoid arthritis). Genomic DNA was extracted from whole blood using QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen,UK) according to the instructions of the manufacturer. For all samples, all 10 exons of the SIAE gene were amplified including the exon-intron boundaries using conventional PCR. The next step was to purify the PCR products by the use of the Qiagen PCR purification system (Qiagen). Direct sequencing of the purified PCR products then took place, using an ABI prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) and a BigDye Terminator DNA sequencing kit of the same company.

Results: No patient with CVID (displaying autoimmunity or not) was found to have a SIAE exon mutation. However, an 11 year old patient with sIgAD diagnosed during a respiratory infection and the mother of a CVID patient who suffered from lupus were heterozygous for the M89V mutation (g.20536A>G, rs78778622, exon 3 mutation.) In addition, a novel silent mutation was found in an IgAD patient in exon 4 (g.26532T>C, c.427T>C, L143L). Also, in a patient with sIgA deficiency 2 silent mutations were found, specifically the silent mutation S156S (g.26573T>C, rs1942663, exon 4) and T484T (g.44233G>A, rs7941327, exon 10.) Furthermore, as expected, a number of intronic SNPs were identified. These were the intronic alterations g.11964G>A (rs512225, intron 2), g.31722C>T (rs790300393, intron5), g.41675A>G (rs620499, intron 8) and g.42499C>T (rs77343428, intron 8).

Conclusion: The results of this study indicate that SIAE mutations are not associated with autoimmune risk in patients with CVID and IgAD deficiency. However, a larger number of CVID samples and IgAD samples are required to be analyzed in order to draw a conclusion of more certainty.

5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007, 120:776-94.
2. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol*. 2010, 71:317-28.
3. Chinen J, Anmuth D, Franklin AR, Shearer WT. Long-term follow-up of patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2007, 120:795-97.
4. Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in primary immune deficiency: taking lessons from our patients. *Clin Exp Immunol*. 2011, 164 Suppl 2:6-11.
5. Rezaei N, Hedayat M, Aghamohammadi A, Nichols KE. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011, 127:1329-41.
6. Bussone G, Mouthon L. Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmun Rev*. 2009, 8:332-6.
7. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010, 125 Suppl 2:S182-94.
8. Gambinieri E. New frontiers in primary immunodeficiency disorders: immunology and beyond...*Cell Mol Life Sci*. 2012, 69:1-5.
9. Kumar A, Teuber SS, Gershwin ME. Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clin Dev Immunol*. 2006, 13:223-59.
10. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*. 2009, 124:1161-78.
11. Chapel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clin Exp Immunol*. 2012, 168:58-9.
12. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco JL, Geha RS, Hammarström L, Nonoyama S, Notarangelo LD, Ochs HD, Puck JM, Roifman CM, Seger R, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2011, 2:1-16.
13. Wang N, Hammarström L. IgA deficiency: what is new? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012, 12:602-608.
14. Jorgensen GH, Gardulf A, Sigurdsson MI, Sigurdardottir ST, Thorsteinsdottir I, Gudmundsson S, Hammarström L, Ludviksson BR. Clinical symptoms in adults with selective IgA deficiency: A case-control study. *J Clin Immunol* 2013, 33:742-747.

15. Latiff AH, Kerr MA. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Ann Clin Biochem.* 2007, 44:131-139.
16. Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000, 120:225-231
17. Srinivasa BT, Alizadehfar R, Desrosiers M, Shuster J, Pai NP, Tsoukas CM. Adult primary immune deficiency: What are we missing? *Am J Med.* 2012, 125:779-786.
18. Γερμενής ΑΕ. Ιατρική ανοσολογία , Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα 2000, σελ 350-352.
19. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol.* 2007, 27:497-502.
20. de Vries E, Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge. *Eur J Pediatr.* 2011, 170:169-177.
21. Modell V, Gee B, Lewis DB, Orange JS, Roifman CM, Routes JM, Sorensen RU, Notarangelo LD, Modell F. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI)-diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol Res.* 2011, 51:61-70.
22. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Benhsaien I, Mahlaoui N, Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol.* 2013, 33:1-7.
23. Cunningham-Rundles C, Maglione PJ. Common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012, 129:1425-1426.e3.
24. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, Claudio P, Franco D, Maria Pesce A, Borghese F, Guerra A, Rondelli R, Plebani A; Italian Primary Immunodeficiency Network. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2007, 27:308-16.
25. Goldman L, Ausiello D. Cecil Textbook of Medicine, 22nd edition, Saunders, Philadelphia, 2004. p. 1598-1599.
26. Ameratunga R, Brewerton M, Slade C, Jordan A, Gillis D, Steele R, Koopmans W, Woon ST. *Front Immunol.* 2014,5:1-9.
27. Janeway CA, Apt L, Gitlin D. Aggammaglobulinemia. *Trans Assoc Am Physicians.* 1953, 66:200-2.
28. Salzer U, Warnatz K, Peter HH, Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Res Ther.* 2012, 14:223.
29. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet.* 2008, 372:489-502.
30. Deane S, Selmi C, Naguwa SM, Teuber SS, Gershwin ME. Common variable immunodeficiency: etiological and treatment issues. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009, 150:311-324.

31. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 patients. *J Clin Immunol*, 1999, 92: 34-38.
32. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Br J Haematol*. 2008, 112: 277-286.
33. Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2002, 109: 1001-1004.
34. Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med* 2004, 3:211-217.
35. Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2001,1:421-429.
36. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Théodorou I, Rabian C, Debré P; DEFI Study Group. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*, 2008, 46:1547-1554.
37. Urschel S, Kaykci L, Wintergerst U, Notheis G, Jansson A, Belohradsky BH. Common variable immunodeficiency disorders in children: delayed diagnosis despite typical clinical presentation. *J Pediatr*. 2009, 154: 888-94.
38. Kainulainen L, Nikoskelainen J, Ruuskanen O. Diagnostic findings in 95 Finnish patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2001, 21: 145-149.
39. Lopes-da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2008, 28 (Suppl 1): S46-S55.
40. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009, 9:347-52.
41. Yong PF, Thaventhiran JE, Grimbacher B. "A rose is a rose is a rose," but CVID is Not CVID common variable immune deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Adv Immunol*. 2011, 111:47-107.
42. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012, 119(7):1650-1657.
43. Boileau J, Mouillot G, Gérard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E, Pasquali JL, Korganow AS; DEFI Study Group. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *J Autoimmun*. 2011, 36: 25-32.
44. Kalha I, Sellin JH. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004, 6(5):377-383.

45. Agarwal S, Smereka P, Harpaz N, Cunningham-Rundles C, Mayer L. Characterization of immunologic defects in patients with common variable immunodeficiency (CVID) with intestinal disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011,17:251-259.
46. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009, 124:658-664.
47. Agarwal S, Mayer L. Gastrointestinal manifestations in primary immune disorders. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, 16:703-711.
48. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012, 2012:301-304.
49. Ardeni O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2009, 133:98-207.
50. Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005, 5:370-375.
51. Abolhassani H, Aghamohammadi A, Imanzadeh A, Mohammadinejad P, Sadeghi B, Rezaei N. Malignancy Phenotype in Common Variable Immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012, 22:133-134.
52. Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990, 56:239-48.
53. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med*. 2005, 11:370-376.
54. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003, 23:385-400.
55. Bright P, Grigoriadou S, Kamperidis P, Buckland M, Hickey A, Longhurst HJ. Changes in B cell immunophenotype in common variable immunodeficiency: cause or effect - is bronchiectasis indicative of undiagnosed immunodeficiency? *Clin Exp Immunol*. 2013, 171:195-200.
56. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. *J Clin Immunol*. 2003, 5:385-400
57. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, De Felice M, Mora B, Esposito A, Carello R, Pizzuti A, Paggi MG, Paganelli R, Malorni W, Aiuti F. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 2007, 15:3932-3943.

58. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, Packwood K, Burden J, Harrison D, Kaenzig N, Lee M, Chapel HM, Ferry BL. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol.* 2012, 170:202-211.
59. Horn J, Manguiat A, Berglund LJ, Knerr V, Tahami F, Grimbacher B, Fulcher DA. Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2009,156:446-454.
60. Yu GP, Chiang D, Song SJ, Hoyte EG, Huang J, Vanishsam C, Nadeau KC. Regulatory T cell dysfunction, in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. *Clin Immunol.* 2009, 131:240-253
61. Isgro A, Marziali M, Mezzaroma I, Luzi G, Mazzone AM, Guazzi V, Andolfi G, Cassani B, Aiuti A, Aiuti F. Bone marrow clonogenic capability, cytokine production, and thymic output in patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol.* 2005,174:5074-5081.
62. Eisenstein EM, Jaffe JS, Strober W. Reduced interleukin-2 (IL-2) production in common variable immunodeficiency is due to a primary abnormality of CD4+ T cell differentiation. *J Clin Immunol.* 1993, 13:247-258.
63. Cunningham-Rundles C, Bodian C, Ochs HD, Martin S, Reiter-Wong M, Zhuo Z. Long-term low-dose IL-2 enhances immune function in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2001,100:181-190.
64. Del Vecchio GC, Martire B, Lassandro G, Cecinati V, De Mattia D, Ciccarelli M, Piacente L, Giordano P. Reduced interleukin-5 production by peripheral CD4+ T cells in common variable immunodeficiency patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008,30:679-686.
65. Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998, 86:298-304.
66. Di Renzo M, Serrano D, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol.* 2001,125:117-122.
67. Kondratenko I, Amlot PL, Webster AD, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. *Clin Exp Immunol.* 1997, 108:9-13.
68. Cunningham-Rundles C, Radigan L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. *Clin Immunol.* 2005, May;115:147-153.
69. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patiño PJ, Montoya CJ. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011, 21:207-215.

70. Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramón S, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2009, 124:349-56
71. 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, 31:550-559.
72. Aghamohammadi A, Mohamadi J, Parvaneh N, Rezaei N, Moin M, Espanol T, Hammarstrom L. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008, 147:87-92.
73. Español T, Catala M, Hernandez M, Caragol I, Bertran JM. Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996, 80:333-335.
74. Carvalho Neves Forte W, Ferreira De Carvalho Júnior F, Damaceno N, Vidal Perez F, Gonzales Lopes C, Mastroti RA. Evolution of IgA deficiency to IgG subclass deficiency and common variable immunodeficiency. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2000, 28:18-20.
75. Olerup O, Smith CI, Björkander J, Hammarström L. Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89:10653-10657.
76. 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*. 1998, 4:72-86.
77. Kralovicova J, Hammarström L, Plebani A, Webster AD, Vorechovsky I. Fine-scale mapping at IGAD1 and genome-wide genetic linkage analysis implicate HLA-DQ/DR as a major susceptibility locus in selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 2003, 170:2765-75.
78. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, Eibel H, Fischer B, Schäffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003, 4:261-8.
79. Salzer U, Unger S, Warnatz K. Common variable immunodeficiency (CVID): exploring the multiple dimensions of a heterogeneous disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012, 1250:41-9
80. Bonilla FA, Geha RS. Common Variable Immunodeficiency. *Pediatr Res*. 2009, 65:13R-19R.
81. Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, Holm A, Franco JL, Plebani A, Hammarstrom L, Skrabl A, Schwinger W, Grimbacher B. *Clin Immunol*. 2004, 113:234-40.81.
82. Yong PF, Salzer U, Grimbacher B. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev*. 2009, 229:101-113.

83. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, Liu YJ. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008, 28:870-880.
84. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJ, van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patiño PJ, van Dongen JJ, Franco JL. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med.* 2006, 354:1901-12.
85. Carter RH, Fearon DT. CD19: Lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science.* 1992, 256:105-107.
86. Schäffer AA, Salzer U, Hammarström L, Grimbacher B. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis. *Curr Opin Genet Dev.* 2007, 17:201-12.
87. Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2007,149:401-9.
88. Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, Martínez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* 2013, 131:468-76.
89. Poodt AE, Driessen GJ, de Klein A, van Dongen JJ, van der Burg M, de Vries E. TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2009, 156:35-39
90. Lougaris V, Gallizzi R, Vitali M, Baronio M, Salpietro A, Bergbreiter A, Salzer U, Badolato R, Plebani A. A novel compound heterozygous TACI mutation in an autosomal recessive common variable immunodeficiency (CVID) family. *Hum Immunol.* 2012, 73:836-839.
91. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schäffer AA, Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet.* 2005, 37:820-828.
92. Romberg N, Chamberlain N, Saadoun D, Gentile M, Kinnunen T, Ng YS, Virdee M, Menard L, Cantaert T, Morbach H, Rachid R, Martinez-Pomar N, Matamoros N, Geha R, Grimbacher B, Cerutti A, Cunningham-Rundles C, Meffre E. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *J Clin Invest.* 2013, 123:4283-4293.
93. Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, Theill LE, Colombero A, Solovyev I, Lee F, McCabe S, Elliott R, Miner K, Hawkins N, Guo J, Stolina M, Yu G, Wang J, Delaney J, Meng SY, Boyle WJ, Hsu H. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med.* 2000, 192:137-143.
94. Lobito AA, Gabriel TL, Medema JP, Kimberley FC. Disease causing mutations in the TNF and TNFR superfamilies: Focus on molecular mechanisms driving disease. *Trends Mol Med.* 2011, 17:494-505.

95. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarström Q, Jennings S, Lougaris V, Bergbreiter A, Hagen T, Birmelin J, Plebani A, Webster AD, Peter HH, Suez D, Chapel H, McLean-Tooke A, Spickett GP, Anover-Sombke S, Ochs HD, Urschel S, Belohradsky BH, Ugrinovic S, Kumararatne DS, Lawrence TC, Holm AM, Franco JL, Schulze I, Schneider P, Gertz EM, Schäffer AA, Hammarström L, Thrasher AJ, Gaspar HB, Grimbacher B. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood*. 2009, 113: 1967-1976.
96. Park JH, Resnick SE, Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency. *Ann N Y Acad Sci*. 2011, 1246:41-49.
97. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity*. 2003, 18:279-88.
98. Speletas M, Salzer U, Florou Z, Petinaki E, Daniil Z, Bardaka F, Gourgoulisanis KI, Skoulakis C, Germeis AE. Heterozygous alterations of TNFRSF13B/TACI in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis. *Clin Dev Immunol*. 2013, 2013:532437
99. La Cava A. Common variable immunodeficiency: two mutations are better than one. *J Clin Invest*. 2013,123:4142-3.
100. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008, 19:263-276.
101. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Böhm J, Kienzler AK, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Rakhmanov M, Schlesier M, Grimbacher B, Peter HH, Eibel H. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106:13945-13950.
102. Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Ziemba B, de Vries SS, Liu J, Hippen K, Koeuth T, Ortmann W, Iwahori A, Elliott MK, Offer S, Skon C, Du L, Novitzke J, Lee AT, Zhao N, Tompkins JD, Altshuler D, Gregersen PK, Cunningham-Rundles C, Harris RS, Her C, Nelson DL, Hammarström L, Gilkeson GS, Behrens TW. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104:7193-7198.
103. Schroeder HW Jr. Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2000, 19:127-40.
104. Yel L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2010, 30:10-16.
105. Σπελέτας ΜΓ, Γερμενής ΑΕ. Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες στους ενήλικες. Σύγχρονη κλινική προσέγγιση. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*. 2013, 30:420-435.
106. Pan-Hammarström Q, Hammarström L. Antibody deficiency diseases. *Eur J Immunol*. 2008,38:327-33

107. Aghamohammadi A, Cheraghi T, Gharagozlou M, Movahedi M, Rezaei N, Yeganeh M, Parvaneh N, Abolhassani H, Pourpak Z, Moin M. IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. *J Clin Immunol.* 2009, 29:130-6.
108. Edwards E, Razvi S, Cunningham-Rundles C. IgA deficiency: clinical correlates and responses to pneumococcal vaccine. *Clin Immunol.* 2004, 111:93-97.
109. Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G, Rantapää-Dahlqvist S, Elvin K, Truedsson L, Andersson BA, Dahle C, Ortvist E, Gregersen PK, Behrens TW, Hammarström L. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med.* 2011, 17:1383-1396.
110. Singh K, Chang C, Gershwin ME. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2014, 13:163-77.
111. Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2001, 21:303- 309
112. Ferreira RC1, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Gateva V, Fontán G, Lee AT, Ortmann W, Urcelay E, Fernández-Arquero M, Núñez C, Jorgensen G, Ludviksson BR, Koskinen S, Haimila K, Clark HF, Klareskog L, Gregersen PK, Behrens TW, Hammarström L. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2010, 42:777-780.
113. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet.* 2005, 37:829-34. 113.
114. López-Mejías R, del Pozo N, Fernández-Arquero M, Ferreira A, García-Rodríguez MC, de la Concha EG, Fontán G, Urcelay E, Martínez A, Núñez C. Role of polymorphisms in the TNFRSF13B (TACI) gene in Spanish patients with immunoglobulin A deficiency. *Tissue Antigens.* 2009, 74:42-45.
115. Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, Bacchelli C, Gaspar HB, Offer S, Behrens TW, Grimbacher B, Hammarström L. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA. *Nat Genet.* 2007, 39:429-430.
116. Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Morra M, Curran J, Geha R. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007, 39:430-1.
117. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood.* 2010, 116:7-15.
118. Lucas M, Lee M, Lortan J, Lopez-Granados E, Misbah S, Chapel H. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125:1354-1360.

119. Berger M, Pinciario PJ, Althaus A, Ballow M, Chouksey A, Moy J, Ochs H, Stein M. Efficacy, pharmacokinetics, safety, and tolerability of Flebogamma 10% DIF, a high-purity human intravenous. *J Clin Immunol.* 2010, 30:321-329.
120. Li Y, Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012, 94:887-905
121. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 2009, 19:507-514.
122. Traving C, Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci.* 1998, 54:1330-1349.
123. Schauer R, Srinivasan GV, Wipfler D, Kniep B, Schwartz-Albiez R. O-Acetylated sialic acids and their role in immune defense. *Adv Exp Med Biol.* 2011, 705:525-548.
124. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008, 14:351-360
125. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.* 2002, 102:439-469.
126. Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur J Clin Nutr.* 2003, 57(11):1351-1369.
127. Cariappa A, Takematsu H, Liu H, Diaz S, Haider K, Boboila C, Kalloo G, Connole M, Shi HN, Varki N, Varki A, Pillai S. B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med.* 2009, 206:125-138.
128. Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks. *TIBS.* 1985, 10:357-360.
129. Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci.* 2006, 1331-1354.
130. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012, 1253:16-36.
131. Crocker PR, Redelinghuys P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem Soc Trans.* 2008, 36:1467-1471.
132. Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunol Rev.* 2009, 230:128-143.
133. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7:255-266.
134. Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and Immune Regulation. *Annu Rev Immunol.* 2012, 30:357-392.
135. Paulson JC, Macauley MS, Kawasaki N. Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2012, 1253:37-48.

136. Münster-Kühnel AK, Tiralongo J, Krapp S, Weinhold B, Ritz-Sedlacek V, Jacob U, Gerardy-Schahn R. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*. 2004, 14:43R-51R.
137. Schauer R, Schmid H, Pommerencke J, Iwersen M, Kohla G. Metabolism and role of O-acetylated sialic acids. *Adv Exp Med Biol*. 2001, 491:325-342.
138. Stoddart A, Zhang Y, Paige CJ. Molecular cloning of the cDNA encoding a murine sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase and RNA expression in cells of hematopoietic and non-hematopoietic origin. *Nucleic Acids Res*. 1996, 24:4003-4008.
139. Schauer R, Reuter G, Stoll S. Sialate O-acetyltransferases: key enzymes in sialic acid catabolism. *Biochimie*. 1988, 70:1511-1519.
140. Varki A, Schauer R. Sialic Acids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Chapter 14.
141. Takematsu H, Diaz S, Stoddart A, Zhang Y, Varki A. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetyltransferase activities can be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J Biol Chem*. 1999, 274:25623-25631.
142. Γερμενής ΑΕ. Ιατρική ανοσολογία , Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα 2000, σελ 208.
143. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Immunology*, 6th edition, Freeman and Company, New York, 2007, pg G-11.
144. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's Immunobiology*, 8th edition, Garland Science, 2012, pg 285-290.
145. Pillai S, Cariappa A, Pirnie SP. Esterases and autoimmunity: the sialic acid acetyltransferase pathway and the regulation of peripheral B cell tolerance. *Trends Immunol*. 2009, 30:488-493.
146. Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2011, 23:721-731.
147. Ding C, Yan J. Regulation of autoreactive B cells: checkpoints and activation. *Arch Immunol Ther Exp*. 2007, 55:83-89.
148. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2011, 1217:96-121
149. Jankovic M, Casellas R, Yannoutsos N, Wardemann H, Nussenzweig MC. RAGs and regulation of autoantibodies. *Annu Rev Immunol*. 2004, 22:485-501.
150. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol*. 2007, 7:633-643.

151. Basten A, Silveira PA. B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr Opin Immunol.* 2010, 22:566-74
152. Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K. Identification of the gene variations in human CD22. *Immunogenetics.* 1999, 49:280-286.
153. Erickson LD, Tygrett LT, Bhatia SK, Grabstein KH, Waldschmidt TJ. Differential expression of CD22 (Lyb8) on murine B cells. *Int Immunol.* 1996, 8:1121-1129.
154. Ghosh S, Bandulet C, Nitschke L. Regulation of B cell development and B cell signalling by CD22 and its ligands alpha2,6-linked sialic acids. *Int Immunol.* 2006, 18:603-611.
155. Walker JA, Smith KG. CD22: an inhibitory enigma. *Immunology.* 2008, 123:314-25.
156. Nitschke L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2005, 17:290-297.
157. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science.* 2000, 290:84-89.
158. Daëron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman WH. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity.* 1995, 3:635-646.
159. Dörner T, Shock A, Smith KG. CD22 and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 2012, 31:363-378.
160. Daridon C, Blassfeld D, Reiter K, Mei HE, Giesecke C, Goldenberg DM, Hansen A, Hostmann A, Frölich D, Dörner T. Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010,12:R204.
161. Sjöberg ER, Powell LD, Klein A, Varki A. Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol.* 1994, 126:549-562.
162. Nishizumi H, Horikawa K, Mlinaric-Rascan I, Yamamoto T. A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. *J Exp Med.* 1998,187:1343-1348.
163. Gross AJ, Lyandres JR, Panigrahi AK, Prak ET, DeFranco AL. Developmental acquisition of the Lyn-CD22-SHP-1 inhibitory pathway promotes B cell tolerance. *J Immunol.* 2009, 182:5382-5392.
164. Zhang J, Somani AK, Siminovitch KA. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol.* 2000, 12:361-78.
165. Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity.* 1997, 7:69-81.
166. Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, Grail D, Hodgson G, Maglitta R, Stacker SA, Dunn AR. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell.* 1995, 83:301-311.

167. Chan VW, Lowell CA, DeFranco AL. Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn-deficient B lymphocytes. *Curr Biol*. 1998, 8:545-553.
168. Pao LI, Lam KP, Henderson JM, Kutok JL, Alimzhanov M, Nitschke L, Thomas ML, Neel BG, Rajewsky K. B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity*. 2007, 27:35-48.
169. Srinivasan GV, Schauer R. Assays of sialate-O-acetyltransferases and sialate-O-acetyl esterases. *Glycoconj J*. 2009, 26:935-944.
170. Pillai S. Rethinking mechanisms of autoimmune pathogenesis. *J Autoimmun*. 2013, 45:97-103.
171. Ensembl genome browser. Homo sapiens-Exons-Transcript: SIAE-001. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000110013;r=11:124633113-124695707;t=ENST00000263593, accessed July 22, 2014.
172. Zhu H, Chan HC, Zhou Z, Li J, Zhu H, Yin L, Xu M, Cheng L, Sha J. A Gene Encoding Sialic Acid-Specific 9-O-Acetyltransferase Found in Human Adult Testis. *J Biomed Biotechnol*. 2004, (2004):130-136.
173. Suroliya I, Pirnie SP, Chellappa V, Taylor KN, Cariappa A, Moya J, Liu H, Bell DW, Driscoll DR, Diederichs S, et al. Functionally defective germline variants of sialic acid acetyltransferase in autoimmunity. *Nature*. 2010, 466: 243-247.
174. Hunt KA, Smyth DJ, Balschun T, Ban M, Mistry V, Ahmad T, Anand V, Barrett JC, Bhaw-Rosun L, Bockett NA, et al. Rare and functional SIAE variants are not associated with autoimmune disease risk in up to 66,924 individuals of European ancestry. *Nat Genet*. 2011, 44:3-5.
175. Szymański K, Skórka A, Szypowska A, Bednarczyk T, Płoski R. Functionally defective germline variant of sialic acid acetyltransferase (Met89Val) is not associated with type 1 diabetes mellitus and Graves' disease in a Polish population. *Tissue Antigens*. 2011, 78:214-216.
176. Chellappa V, Taylor KN, Pedrick K, Donado C, Netravali IA, Haider K, Cariappa A, Dalomba NF, Pillai S. M89V Sialic acid Acetyl Esterase (SIAE) and all other non-synonymous common variants of this gene are catalytically normal. *PLoS One*. 2013, 8:e53453.
177. Hirschfield GM, Xie G, Lu E, Sun Y, Juran BD, Chellappa V, Coltescu C, Mason AL, Milkiewicz P, Myers RP, et al. Association of primary biliary cirrhosis with variants in the CLEC16A, SOCS1, SPIB and SIAE immunomodulatory genes. *Genes Immun*. 2012, 13:328-335.
178. Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyltransferase (SIAE) gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. *Endocr J*. 2014, 61:641-644.
179. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987, 155:335-50.
180. A short History of PCR. http://www.scienceisart.com/A_PCR/PCRhistory_2.html, accessed February 22, 2013.

181. Erlich HA. Polymerase Chain Reaction. *J Clin Immunol*. 1989, 9:437-47.
182. Brown TA. Gene cloning and DNA Analysis. An Introduction, Sixth edition, Blackwell publishing Ltd, 2010, pg 6.
183. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012, 62: e3923.
184. Agarose gel electrophoresis of DNA. Preparing and running standard agarose DNA gels. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>, accessed January 13, 2013.
185. Jenkins FJ. Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods Appl*. 1994, 3:S77-82.
186. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977, 74:5463-5467.
187. ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's manual. What the 310 Genetic Analyzer does. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041812.pdf, accessed March 2, 2013.
188. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*. 2009, 578:23-39.
189. Sauna ZE, Kimchi-SarfatyC. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011,12:683-691
190. Ευαγγελάτος ΝΓ, Κωσταντοπούλου Π, Πανταζή Λ, Καραγιάννης Α, Βαϊόπουλος Γ. Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα. *Ελληνική Ρευματολογ*. 2007, 18:130-137.
191. Speletas M, Kalala F, Mitroulis I, Papadopoulos V, Merentiti V, Germenis AE, Ritis K. TLR2 and TLR4 polymorphisms in familial Mediterranean fever. *Hum Immunol*. 2009, 70:750-753.
192. ΕυσταθίουΕ. Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός. <http://www.paidiatros.com/asthenies/spanies-arrosties/oikogenis-mesogiakos-pyretos-fmf>, accessed Sept 6, 2015.
193. Baldovino S, Montin D, Martino S, Sciascia S, Menegatti E, Roccatello D. Common variable immunodeficiency: crossroads between infections, inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013,12:796-801.
194. Mackay IR, Leskovsek NV, Rose NR. The odd couple: a fresh look at autoimmunity and immunodeficiency. *J Autoimmun*. 2010, 35:199-205.
195. Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends Immunol*. 2009, 30:409-414.