



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Πολυμορφισμοί των γονιδίων *MBL2*, *CD40* & *CTLA4* σε ασθενείς με  
Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια**

**Περιστέρη Αθανασία – Μαρίνα**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας
- Γιαννακούλας Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας

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

Λάρισα, Οκτώβριος 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**

**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**

**Polymorphisms of MBL2, CD40 & CTLA4 in Common Variable  
Immunodeficiency**

**By  
Athanasia – Marina Peristeri**

Examining Committee:

- Matthaïos Speletas, Professor of Medical Immunology (Supervisor)
- Efthimia Peteinaki, Professor of Biopathology and Clinical Microbiology
- Giannakoulas Nikolaos, Assistant Professor of Hematology & Internal Medicine

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

Larissa, October 2021

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΗΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν Έλληνες ασθενείς με Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια, οι οποίοι παρακολουθούνται συστηματικά στο Ιατρείο Ανοσοανεπαρκειών του Π.Γ.Ν.Λάρισας και σε άλλα συνεργαζόμενα ιατρεία της χώρας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. Ματθαίο Σπελέτα, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας για την εμπιστοσύνη του και την καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου, ήδη από τα φοιτητικά μου χρόνια. Επιπλέον, θα επιθυμούσα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαρηστίες στην κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας καθώς και στον κ. Νικόλαο Γιαννακούλα, Επίκουρο Καθηγητή Παθολογία – Αιματολογίας, που συμμετείχαν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου και αξιολόγησαν την εν λόγω εργασία. Τέλος, αισθάνομαι την υποχρέωση και τη χαρά να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας, χωρίς τη βοήθεια των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, καθώς και την οικογένεια μου που είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b> .....	<b>6</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ</b> .....	<b>10</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ</b> .....	<b>12</b>
<b>1. ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ</b> .....	<b>14</b>
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	14
1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	14
1.3 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ .....	15
1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ CVID .....	17
1.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	18
1.5.1 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ .....	18
1.5.2 ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ .....	19
1.5.3 ΛΕΜΦΟΥΠΕΡΙΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ .....	20
1.5.4 ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΕΙΑ.....	20
1.5.5 ΑΣΘΜΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΡΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	21
1.5.6 ΑΛΛΕΣ ΣΠΑΝΙΟΤΕΡΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ .....	21
1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	22
<b>2. Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL</b> .....	<b>23</b>
2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL.....	23
2.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL .....	24
2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>MBL2</i> .....	27
<b>3. ΤΟ ΜΟΡΙΟ CD40 &amp; ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CD40-CD40ligand (CD154)</b> .....	<b>30</b>
3.1 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ CD40 & CD40 ligand (CD154).....	30
3.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CD40-CD40L (CD154).....	31
3.3 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ CD40-CD40L ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ.....	33
3.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>CD40</i> ( <i>TNFRSF5</i> ) ΚΑΙ Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs1883832 .....	24
<b>4. ΤΟ ΜΟΡΙΟ CTLA4 &amp; ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CTLA4/B7</b> .....	<b>35</b>
4.1 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ CTLA4 .....	35



4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ CTLA4 ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CTLA4/B7 .....	37
4.3 ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ CTLA4 .....	39
4.4 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. +49A/G (rs231775).....	41
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	<b>43</b>
<b>2. ΥΛΙΚΟ</b> .....	<b>44</b>
2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ .....	44
2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	46
<b>3. ΜΕΘΟΔΟΣ</b> .....	<b>47</b>
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ .....	47
3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	48
3.2.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	48
3.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	49
3.2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ.....	50
3.2.4 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ.....	51
3.2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ (SEQUENCING).....	53
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	53
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>54</b>
4.1 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>MBL2</i> . .....	54
4.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ CD40 -1C>T (rs1883832).....	57
4.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs231775 (c. +49 A/G, p.T17A) .....	58
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>60</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>62</b>

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>AHA (Autoimmune Hemolytic Anemia)</b>	<b>Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναμία</b>
<b>APCs (Antigen-presenting cells)</b>	<b>Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο</b>
<b>BAFFR (B-cell activating factor receptor)</b>	<b>Υποδοχέας του BAFF</b>
<b>Bregs (Regulatory B cells)</b>	<b>Ρυθμιστικά Β-λεμφοκύτταρα</b>
<b>Btk (Bruton's tyrosine kinase)</b>	<b>Τυροσινική κινάση του Bruton</b>
<b>CD (Clusters of Differentiation)</b>	<b>Αντιγόνα Διαφοροποίησης</b>
<b>CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4)</b>	<b>Πρωτεΐνη 4 σχετιζόμενη με τα Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα</b>
<b>CVID (Common variable immunodeficiency)</b>	<b>Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια</b>
<b>ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)</b>	<b>Ανοσοενζυμική μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνου ή/και αντισώματος.</b>
<b>ESID (European Society for Immunodeficiencies)</b>	<b>Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανοσοανεπαρκειών</b>
<b>HIGM (Hyper-IgM)</b>	<b>Σύνδρομο Υπερπαραγωγής IgM</b>
<b>HLA (Human Leukocyte Antigen)</b>	<b>Ανθρώπινο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο</b>
<b>ICOS (Inducible T-cell co-stimulator)</b>	<b>Επαγόμενος συνδιεγέρτης των Τ-κυττάρων</b>
<b>IL (Interleukin)</b>	<b>Ιντερλευκίνη</b>
<b>ITP (Immune thrombocytopenic purpura)</b>	<b>Αυτοάνοση Θρομβοπενική Πορφύρα</b>
<b>JAK (Janus kinase)</b>	<b>Κινάσες της οικογένειας Janus</b>
<b>MBL (Mannose - binding lectin)</b>	<b>Λεκτίνη η συνδέουσα μαννόζη</b>
<b>MBL2 (Mannose - binding lectin2)</b>	<b>Γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνδέουσα με μαννόζη λεκτίνη</b>
<b>NF-κB (Nuclear factor-kappa B)</b>	<b>Πυρηνικός παράγοντας-κΒ</b>
<b>NRH (Nodular Regenerative Hyperplasia)</b>	<b>Οζώδης αναγεννητική υπερπλασία</b>
<b>PADs (Primary Antibody Deficiencies)</b>	<b>Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες</b>
<b>PCR (Polymerase Chain Reaction)</b>	<b>Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης</b>
<b>PD1 (Programmed cell death protein 1)</b>	<b>Πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1</b>
<b>PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)</b>	<b>Κινάση 3 της Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης</b>
<b>RFLP (Restriction fragment length polymorphism)</b>	<b>Πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους</b>
<b>SHP (Src homology region 2 domain-containing phosphatase</b>	<b>Φωσφατάση που περιέχει την περιοχή ομόλογη της Src</b>
<b>sIgAD (selective IgA Deficiency)</b>	<b>Εκλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης Α</b>
<b>STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription)</b>	<b>Μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής</b>
<b>TAC1 (transmembrane activator &amp; CAML interactor)</b>	<b>Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το CAML</b>
<b>TCR (T-cell Receptor)</b>	<b>Αντιγονικός υποδοχέας Τ-λεμφοκυττάρου</b>

<b>TGF-β (Transforming growth factor beta)</b>	<b>Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β</b>
<b>TH (T helper cells)</b>	<b>Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα</b>
<b>TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig)</b>	<b>Υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων σχετιζόμενος με ανοσοσφαιρίνες</b>
<b>TLR (Toll-like receptor)</b>	<b>Ανάλογοι των Toll υποδοχείς</b>
<b>TNF (Tumor Necrosis Factor)</b>	<b>Παράγοντας νέκρωσης των όγκων</b>
<b>TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)</b>	<b>Υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων</b>
<b>TRAFs (Tumor necrosis factor receptor-associated factors)</b>	<b>Παράγοντες σχετιζόμενοι με υποδοχείς των TNF</b>
<b>Treg (T-regulatory cell)</b>	<b>Ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο</b>
<b>Tregs (Regulatory T cells)</b>	<b>Ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα</b>
<b>XLA (X-linked agammaglobulinemia)</b>	<b>X-φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία</b>
<b>ΣΕΛ</b>	<b>Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος</b>
<b>ΧΑΠ</b>	<b>Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η CVID είναι η πιο συχνή κλινικά σημαντική πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια των ενηλίκων. Πρόκειται για μία ετερογενή ομάδα διαταραχών, καθώς πέραν της αυξημένης ευπάθειας σε λοιμώξεις χαρακτηρίζεται επιπλέον από αυτοανοσία, κοκκιωμάτωση, λεμφοϋπερπλασία καθώς και από αυξημένη επίπτωση κακοηθειών. Παρά τη διαρκή έρευνα, οι μοριακοί μηχανισμοί και το γενετικό υπόβαθρο της νόσου παραμένουν αδιευκρίνιστα. Η κλινική ετερογένεια της νόσου πιθανά σχετίζεται με ποικίλες γενετικές διαταραχές, το τελικό αποτέλεσμα των οποίων είναι η υπογαμμασφαιριναιμία, η οποία αποτελεί και το βασικό εργαστηριακό εύρημα στο οποίο βασίζεται η διάγνωση αυτής. Σχετικά με τη γενετική βάση της CVID, αυτή δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως για το σύνολο των πασχόντων. Από τα έως τώρα δεδομένα παθογόνες μεταλλάξεις σε μια ομάδα γονιδίων ορισμένα από τα οποία σχετίζονται με την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων, έχουν ανευρεθεί περίπου στο 20% των ασθενών.

Η μεγάλη κλινική ετερογένεια της νόσου εγείρει ωστόσο ερωτήματα, σχετικά με το ρόλο λειτουργικών πολυμορφισμών στον φαινότυπο αυτής. Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση πολυμορφισμών σε μόρια τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας με τον κλινικό φαινότυπο της νόσου. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν πολυμορφισμοί στο εξόνιο 1 και στον υποκινητή του γονιδίου *MBL2*, (rs7096206, rs1800450, rs1800451, rs5030737) καθώς και πολυμορφισμοί των γονιδίων *TNFRSF5* (rs1883832) και *CTLA4* (rs231775), γνωστοί από τη διεθνή βιβλιογραφία σε 82 Έλληνες ασθενείς με CVID (άνδρες/γυναίκες: 37/45, μέση ηλικία:33,2 έτη, ηλικιακό εύρος: 4 έως 70 ετών).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις μοριακές τεχνικές PCR-RFLP για τους πολυμορφισμούς rs7096206, rs1800450, rs1800451, rs5030737 και rs1883832, ενώ η ανάλυση του πολυμορφισμού rs231775 πραγματοποιήθηκε με την τεχνική αλληλούχισης κατά Sanger. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε συσχέτιση των πολυμορφισμών rs1800450, rs1800451 με την εκδήλωση αυτοανοσίας, καθώς και του πολυμορφισμού rs1883832 με την εκδήλωση ψωρίασης και ατοπίας. Ο πολυμορφισμός rs231775 συσχετίσθηκε με ηπατοσπληνομεγαλία, λεμφοϋπερπλασία, υπερσπληνισμό και ηπατική νόσο, ενώ οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση αναδείχθηκε μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της εκδήλωσης χρόνιας διάμεσης πνευμονικής νόσου. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, αναδεικνύεται πως λειτουργικοί πολυμορφισμοί μορίων του ανοσιακού συστήματος, τροποποιούν τον κλινικό φαινότυπο της νόσου.

## Abstract

CVID is the most common clinically important antibody deficiency in adults. It represents a heterogeneous group of disorders characterized by recurrent infections as well as autoimmunity, systematic granulomas formation, benign lymphoproliferation, and an increased tendency to malignancies. Despite ongoing research in this field, the molecular and genetic background of CVID remains unclear. The clinical heterogeneity of the disease is probably related to a multitude of disorders both in immune system molecules and at the genetic level, the result of which is hypogammaglobulinemia. The genetic basis of CVID has not been fully elucidated, however, from the data available so far mutations in a group of genes, some of which are related to the maturation and differentiation of B lymphocytes, have been associated with the onset of the disease.

The great clinical heterogeneity of the disease raises questions about the role of functional polymorphisms in its phenotype. Thus, the aim of the present study was to correlate polymorphisms in molecules of both innate and adaptive immunity with the clinical phenotype of the disease. Polymorphisms in exon 1 and in promoter of the *MBL2* gene (rs7096206, rs1800450, rs1800451, rs5030737) as well as polymorphisms of the *TNFRSF5* (rs1883832) and *CTLA4* gene were studied in a group of 82 Greek CVID patients (men/ women: 37/45, median age: 33.2 years, range: 4-70 years).

Molecular analysis performed by PCR-RFLP (rs7096206, rs1800450, rs1800451, rs5030737, rs1883832) and Sanger sequencing (rs231775). According to the statistical analysis rs1800450 and rs1800451 are correlated with the presence of autoimmunity, while rs1883832 is correlated with psoriasis and atopy. In addition, rs231775 was associated with hepatosplenomegaly, lymphoid hyperplasia, hypersplenism and liver disease, while a marginal statistical correlation emerged between this polymorphism and chronic interstitial lung disease. According to the results, functional polymorphisms of molecules of the immune system, modify the clinical phenotype of CVID.

## ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι PADs καθιστούν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών και πάρα την υπάρχουσα αντίληψη περί σπανιότητας, αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα της καθημερινής κλινικής πράξης τόσο σε παιδιατρικούς όσο και σε ενήλικες ασθενείς. Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά των διαταραχών αυτών έλαβε χώρα πριν από περίπου μισό αιώνα, με την περιγραφή της XLA. Από την εποχή αυτή μέχρι και σήμερα οι εξελίξεις τόσο στην κλινική ανοσολογία γενικότερα όσο και στο πεδίο των ανοσοανεπαρκειών ήταν ραγδαίες, γεγονός που αποδεικνύεται από την διαρκή ανάδειξη νέων νοσολογικών οντοτήτων. (1)

Η πιο γνωστή PAD που οφείλεται σε μονογονιδιακή βλάβη είναι η XLA, η περιγραφή της οποίας άνοιξε το δρόμο για ένα νέο πεδίο τόσο κλινικής όσο και βασικής έρευνας. Η νόσος αυτή είναι το αποτέλεσμα μιας βλάβης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των Β – λεμφοκυττάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ελλειμματική παραγωγή ανοσοσφαιρινών.(2) Από την ανάδειξη της το 1952 μέχρι και σήμερα η αντιμετώπιση της βασίζεται στην θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση γ-σφαιρίνης. Με την πάροδο του χρόνου η ενδομυϊκή χορήγηση αντικαταστάθηκε από την ενδοφλέβια, ενώ το 1960 άνοιξε ο δρόμος και για την χορήγηση γ-σφαιρίνης υποδόρια γεγονός που αποτέλεσε επανάσταση στην θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες καθώς επέτρεψε την εφαρμογή της θεραπείας εκτός νοσοκομειακού περιβάλλοντος. (3)

Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών έδωσε τη δυνατότητα ανάδειξης ολοένα και περισσότερων γενετικών βλαβών, οι οποίες αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες για την ανάπτυξη πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, γεγονός που άνοιξε το δρόμο τόσο για την καλύτερη κατανόηση των νοσολογικών αυτών οντοτήτων όσο και για την σε βάθος κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια τους. Πιο συγκεκριμένα, το 1970 σε μια επιτροπή υπό την επίβλεψη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ανατέθηκε η ταξινόμηση των έως τότε γνωστών πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Από την εποχή εκείνη έως σήμερα έχουν αναδειχθεί περισσότερες από 240 νοσολογικές οντότητες με γνωστό γενετικό υπόστρωμα. Επιπλέον, αναδείχθηκε ο ρόλος πολλών διαφορετικών μορίων και κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, γεγονός που οδήγησε σε νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις. (4)



---

*ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*

---

## ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Οι PADs αποτελούν τις πιο συχνές πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες των ενηλίκων. Αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών και χαρακτηρίζονται από διαταραγμένες ανοσολογικές απαντήσεις λόγω των μειωμένων επιπέδων ανοσοσφαιρινών. Στο παρελθόν, οι PADs θεωρούνταν αποτέλεσμα αποκλειστικά και μόνο διαταραχών που αφορούσαν τα Β – λεμφοκύτταρα, ωστόσο σήμερα είναι γνωστό πως οι διαταραχές αυτές σχετίζονται με πληθώρα βλαβών σε ποικίλες κυτταρικές ομάδες του ανοσιακού συστήματος. (5)

Η ηλικία εμφάνισης των νοσημάτων αυτών ποικίλλει, με τους μισούς ασθενείς να διαγιγνώσκονται κατά την ενήλικη ζωή και με μια μέση καθυστέρηση στη διάγνωση περί τα πέντε έτη, γεγονός που τα καθιστά ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται διαφορές στην επίπτωση των νοσημάτων αυτών μεταξύ των δύο φύλων. (6) Οι βλάβες ποικίλουν από παντελή έλλειψη Β-λεμφοκυττάρων και ανοσοσφαιρινών έως και εκλεκτικές βλάβες με φυσιολογικά ολικά επίπεδα ανοσοσφαιρινών. Ωστόσο, παρά το διαφορετικό υπόβαθρο οι ασθενείς κατά κανόνα μοιράζονται τον ίδιο κλινικό φαινότυπο, ακρογωνιαίο λίθο του οποίου αποτελεί η αυξημένη ευπάθεια σε λοιμώξεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών παρουσιάζει υποτροπιάζουσες λοιμώξεις αναπνευστικού, ενώ μεγάλη μερίδα αυτών παρουσιάζει μη αναστρέψιμες βλάβες κατά τη στιγμή της διάγνωσης με συχνότερες τις βρογχεκτασίες. Για το λόγο αυτό, εξέχουσα σημασία έχει η έγκαιρη διάγνωση των ασθενών αυτών, η οποία σε συνδυασμό με την κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση μπορεί να μειώσει τη νοσηρότητα αυξάνοντας ταυτόχρονα το προσδόκιμο επιβίωσης. (7)

Η παθογένεια των διαταραχών αυτών μπορεί να είναι το αποτέλεσμα είτε απλών γονιδιακών μεταλλάξεων οι οποίες σχετίζονται με πρωτεΐνες υπεύθυνες για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, είτε να σχετίζεται με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε άτομα με συγκεκριμένο γονιδιακό υπόστρωμα. Πιο αναλυτικά οι διαταραχές σε επίπεδο Β-λεμφοκυττάρου μπορεί να αφορούν είτε τα αρχικά είτε τα τελικά στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης αυτού. Συγκεκριμένα διαταραχές στην μΗ αλυσίδα, στην L αλυσίδα, στο κλάσμα διαφοροποίησης (CD)79a8 και στον Β – cell linker (BLNK) οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης των Β-λεμφοκυττάρων και σοβαρή αγαμμασφαιριναιμία. Παρόμοια, ανωμαλίες στην Btk πρωτεΐνη έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένα ή και απόντα Β – λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια και αναλόγως απουσία ανοσοσφαιρινών στον ορό, καθώς η Btk πρωτεΐνη κατέχει κεντρικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων σε στάδιο προ-Β κυττάρου. Επιπλέον, τα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα προκειμένου να επιτύχουν διαφοροποίηση σε Β-λεμφοκύτταρα μνήμης και πλασματοκύτταρα υφίστανται ισχυρή μεταστροφή και σωματική υπερμετάλλαξη, με το αποτέλεσμα των ανωμαλιών σε αυτά τα

μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης των Β-λεμφοκυττάρων να οδηγεί σε νοσολογικές οντότητες όπως η sIgAD και η CVID, το γενετικό υπόστρωμα τον οποίον δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Πέραν της αυξημένης ευπάθειας σε λοιμώξεις οι PADs και ιδίως η CVID χαρακτηρίζονται επιπλέον από δυσλειτουργία του ανοσιακού συστήματος, η οποία εκδηλώνεται κυρίως υπό τη μορφή αυτοανοσίας. Οι πλέον χαρακτηριστικές είναι οι αυτοάνοσες αιματολογικές εκδηλώσεις, ενώ αντίθετα τα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα σπανίζουν. Το γεγονός αυτό φαντάζει παράδοξο καθώς ανοσοανεπάρκεια και αυτοανοσία φαίνεται να αποτελούν τις δύο διαφορετικές όψεις του ίδιου νομίσματος. Η βάση της αυτοανοσίας θεωρείται η αδυναμία του ξενιστή να εξαλείψει πλήρως τους διάφορους μικροοργανισμούς και τα αντιγόνα αυτών, γεγονός που οδηγεί σε μια εξεσημασμένη και χρόνια ανοσολογική αντίδραση η οποία συχνά προκαλεί αλλοιώσεις στους διάφορους ιστούς. Για το λόγο αυτό, η αυτοανοσία θεωρείται πως δεν οφείλεται στην διαταραχή της ανοχής έναντι των διαφόρων αυτοαντιγόνων, αλλά μάλλον στην χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση και στην συνοδό βλάβη των ιστών. Επιπλέον, μια υποομάδα ασθενών με CVID παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα κοκκιωμάτωσης, κακοηθειών και λεμφοϋπερπλασίας γεγονός που καθιστά τη συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα ένα σημαντικό διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα της καθημερινής κλινικής πρακτικής.

# 1. ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

## 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ & ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο όρος Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (Common Variable Immunodeficiency) εισήχθη στη διεθνή βιβλιογραφία το 1971 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας προκειμένου να περιγράψει τα σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια αντισωμάτων αλλά τα οποία δεν μπορούν να ενταχθούν σε κάποια από τις ήδη υπάρχουσες κατηγορίες.(8) Με τον τρόπο αυτό η νόσος αποτελούσε διάγνωση εξ αποκλεισμού. Μετά από πρόταση της ESID, η νόσος ορίστηκε ως εξής:

Η διάγνωση της CVID είναι πιθανή σε άνδρες ή γυναίκες ασθενείς με μειωμένα επίπεδα IgG ανοσοσφαιρινών στον ορό (τουλάχιστον κάτω από 2 σταθερές αποκλείσεις από τις μέσες τιμές για την ηλικία και το φύλο) και μειωμένα επίπεδα τουλάχιστον της IgM ή της IgA και που επιπλέον ικανοποιεί τα παρακάτω κριτήρια:

- Έναρξη της ανοσοανεπάρκειας σε ηλικία μεγαλύτερη των 4 ετών.
- Πλήρης απουσία ανταπόκρισης ή πτωχή ανταπόκριση σε εμβολιασμό.
- Αποκλεισμός άλλων αιτιών υπογαμμασφαιριναιμίας.(9)

## 1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι αντισωματικές ανεπάρκειες είναι οι πιο συχνές διαταραχές της ευρύτερης ομάδας των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Από τις διαταραχές αυτές η πλέον συχνή και κλινικά σημαντική είναι η CVID. (10) Η επίπτωση της νόσου διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών, όπως αποδεικνύεται από μια πρόσφατη αναφορά του Jeffrey Modell Centers Network.(11) Με βάση τη μελέτη αυτή ο υψηλότερος επιπολασμός της νόσου παρατηρείται στις ΗΠΑ (40,2% μεταξύ όλων των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών) και ο χαμηλότερος στην Μέση Ανατολή και την Αφρική γεγονός που συνάδει με τις διαγνωστικές δυνατότητες και το επίπεδο ευαισθητοποίησης των κλινικών ιατρών σε σχέση με τη νόσο. (11),(12)

Η επίπτωση της νόσου δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των 2 φύλων σε αντίθεση με την ηλικία διάγνωσης η οποία παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις.(13)(14) Πιο συγκεκριμένα, μια αρχική μελέτη από τις ΗΠΑ έδειξε μια διακριτή διπλή κατανομή των ηλικιών διάγνωσης. Έτσι, ένα ποσοστό των ασθενών διαγιγνώσκονται στην παιδική ηλικία και ένα άλλο περί την τρίτη δεκαετία της ζωής.(15) Ωστόσο, μια Ευρωπαϊκή μελέτη έρχεται να ανατρέψει την υπάρχουσα αυτή εικόνα καθώς αναδεικνύει το γεγονός πως η νόσος μπορεί να διαγνωστεί σε

οποιαδήποτε ηλικία.(14) Επιπλέον, αξιολογείται ότι είναι και η καθυστέρηση στη διάγνωση της νόσου η οποία ποικίλει από 4 έως 9 έτη από την έναρξη των συμπτωμάτων.(16)(17) Η καθυστέρηση αυτή αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας για τους ασθενείς καθώς τη στιγμή της διάγνωσης μια ομάδα αυτών παρουσιάζει ήδη μη αναστρέψιμες βλάβες σε όργανα στόχους (π.χ. βρογχεκτασίες), γεγονός που επηρεάζει αρνητικά την πρόγνωση αυτών συγκριτικά με ασθενείς που διαγνώστηκαν στα αρχικά στάδια της νόσου και έλαβαν άμεσα θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη.(14)

### 1.3 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ & ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Με εξαίρεση ορισμένες περιπτώσεις που οφείλονται σε συγκεκριμένες γενετικές βλάβες, η παθογένεια της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστη. Με την υπογαμμασφαιριναιμία να αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για τη διάγνωση αυτής, είναι φανερό πως η κοινή ανοσολογική διαταραχή σε όλους τους ασθενείς είναι η απώλεια της λειτουργικότητας των Β λεμφοκυττάρων. Αναλυτικότερα, τόσο ο απόλυτος αριθμός όσο και το ποσοστό των ενεργοποιημένων Β κυττάρων είναι μειωμένος σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών(18) ενώ επιπλέον παρατηρείται και απώλεια των πλασματοκυττάρων.(19)(20)

Οι διαταραχές σε επίπεδο Β και Τ λεμφοκυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως η βάση για την κατηγοριοποίηση ασθενών με CVID. Σχετικά με τα Β λεμφοκύτταρα, στους περισσότερους ασθενείς αυτά τείνουν να βρίσκονται στα κατώτερα φυσιολογικά επίπεδα. (18) Σε ορισμένους όμως ασθενείς τα επίπεδα των Β λεμφοκυττάρων είναι αυξημένα γεγονός που συνδέεται με τις λεμφοϋπερπλαστικές εκδηλώσεις και την αυτοανοσία που συχνά συμπληρώνει την κλινική εικόνα αυτών.(14) Από την άλλη σε ένα μικρό ποσοστό τα Β λεμφοκύτταρα είναι μειωμένα, κατάσταση που σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση.(15) Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των Β λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος ανέδειξε μειωμένα επίπεδα ενεργοποιημένων CD27<sup>+</sup> Β λεμφοκυττάρων μνήμης στην πλειοψηφία των ασθενών.(21)(22) Τα ευρήματα αυτά αποτελούν τη βάση για τις ταξινομήσεις του “Freiburg” και του “Παρισιού”, ο στόχος των οποίων είναι η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες με παρόμοιο κλινικό φαινότυπο με στόχο την καλύτερη εν τέλει διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση αυτών.(23)(24)

Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη, ανέδειξε πως τα Β λεμφοκύτταρα ορισμένων ασθενών με CVID διαφοροποιούνται μέχρι το επίπεδο κεντροβλάστης/κεντροκυττάρου αλλά η περαιτέρω διαφοροποίηση αυτών σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες δεν

είναι δυνατή.(24) Τέλος, αναμένεται πως στο μέλλον ένας συνδυασμός των επιφανειακών δεικτών των B λεμφοκυττάρων και των διαδικασιών φωσφορυλίωσης, θα αποτελέσουν χρήσιμους δείκτες για την περαιτέρω διερεύνηση και καλύτερη κατανόηση των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου.(25)

Σε επίπεδο T λεμφοκυττάρων οι διαταραχές ποικίλουν ευρέως και αφορούν το συνολικό αριθμό των κυττάρων και τα ποσοστά αυτών αλλά και τους επιφανειακούς δείκτες καθώς και τους διάφορους υποπληθυσμούς.(26) Αναλυτικότερα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει μείωση στα επίπεδα των παρθένων και των μνημονικών CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων και αύξηση στα επίπεδα των ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων.(27) Η μείωση αυτή είναι ενδεχομένως το αποτέλεσμα της ελαττωμένης απελευθέρωσης των κυττάρων αυτών από το θύμο αδένα καθώς και της αυτόματης απόπτωσης. Αντίθετα, τα αυξημένα επίπεδα των ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων αποτελούν το αποτέλεσμα των μειωμένων Tregs και της διαταραγμένης λειτουργικότητας αυτών.(27)(28)

Ο ρόλος των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της COVID παραμένει θέμα υπό συζήτηση. Έχει αναφερθεί πως τα επίπεδα των κυτταροκινών που απελευθερώνονται από τα Th2 λεμφοκύτταρα, όπως η IL-4 και η IL-10 παρουσιάζονται αυξημένα σε ασθενείς με COVID, ενώ δεν παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στα επίπεδα των Th1 κυτταροκινών.(29) Επιπλέον, μια μελέτη ανέδειξε μειωμένη συχνότητα Th17 κυκλοφορούντων κυττάρων.(30) Όσον αφορά τα Tregs, αν και αρχικά είχε φανεί πως δεν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα αυτών σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, νέες μελέτες υποστηρίζουν πως τα επίπεδα των Tregs μπορούν να σχετιστούν με την εκδήλωση αυτοάνοσων εκδηλώσεων, κοκκιωμάτωσης και σπληνομεγαλίας.(31)(32)

Παρόμοια με τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, τα παρθένα και τα δραστικά μνημονικά CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα παρουσιάζονται μειωμένα σε αντίθεση με τα ενεργοποιημένα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα τα οποία παρουσιάζουν αύξηση. Επιπρόσθετες μελέτες έδειξαν πως τα CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα είναι αυξημένα σε ασθενείς με COVID και πως η αύξηση αυτή σχετίζεται με κλινικές επιπλοκές που περιλαμβάνουν την κοκκιωμάτωση, την αυτοανοσία, τη σπληνομεγαλία και τη λεμφοϋπερπλασία.(33)(34)



#### 1.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ CVID

Αν και κατά κανόνα τα κρούσματα της CVID εμφανίζονται σποραδικά, εντούτοις σε ένα ποσοστό της τάξης 10-20% υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό.(15)(35) Οι περισσότερες οικογενείς περιπτώσεις ακολουθούν αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας και οι περισσότερες από αυτές επιπλέκουν περιπτώσεις sIgAD, CVID καθώς και άλλους τύπους ανοσοανεπαρκειών.(35)

Διάφορα μέλη της υπεροικογένειας των TNF υποδοχέων φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Αναλυτικότερα, μονογονιδιακές βλάβες έχουν εντοπιστεί στα γονίδια *TACI (TNFRSF13B)*, *TNFRSF12*, *BAFFR (TNFRSF13C)* και *CD27*.(36)(37)(38)(39)(40) Αν και οι βλάβες του TACI απαντώνται στο 10% περίπου των ασθενών, η ανεύρεση αυτών και στο γενικό πληθυσμό χωρίς συνοδά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα εγείρει ερωτήματα για την επίπτωση αυτών στην εκδήλωση του φαινοτύπου της νόσου.(41)

Πέραν της υπεροικογένειας των TNF υποδοχέων, βλάβες στα μόρια του συμπλέγματος CD19 (CD19, CD21 και CD81) καθώς και σε συνδιεγερτικά μόρια όπως το CD20 και ο υποδοχέας της IL-21 έχουν επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με CVID. Ο ρόλος των μορίων αυτών έγκειται στην ορθή ρύθμιση της ανάπτυξης, ωρίμανσης και επιβίωσης των B λεμφοκυττάρων γεγονός που αναδεικνύει το ρόλο τους στην παθογένεια της CVID.(26) Επιπλέον, βλάβες ανευρέθηκαν σε συνδιεγερτικά μόρια και ανασταλτικούς υποδοχείς (ICOS και CTLA-4) των T – λεμφοκυττάρων σε ομάδα ασθενών με διαταραχές στα κύτταρα αυτά. (26) Τέλος, τα τελευταία έτη έχουν αναδειχθεί βλάβες σε ποικίλα μόρια διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία εντοπίζονται τόσο στην επιφάνεια των κυττάρων όσο και σε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό επίπεδο και τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

## 1.5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η νόσος αποτελεί μια ετερογενή ομάδα διαταραχών καθώς πέραν της αυξημένης ευπάθειας σε λοιμώξεις, η κλινική εικόνα των ασθενών είναι δυνατόν να περιλαμβάνει επιπλέον αυτοάνοσες εκδηλώσεις, κακοήθειες, κοκκιωμάτωση και λεμφοϋπερπλασία. Η ετερογένεια αυτή που παρουσιάζεται μεταξύ των ασθενών καθιστά την διάγνωση αυτής μια πρόκληση για τον κλινικό ιατρό.(42)

### 1.5.1. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Οι λοιμώξεις αποτελούν το πιο τυπικό κλινικό εύρημα σε ασθενείς με COVID. Οι βαριές, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις οι οποίες απαιτούν παρατεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών και σχετίζονται με χρόνιες βλάβες οργάνων-στόχων, θέτουν την υπόνοια πρωτοπαθούς αντισωματικής ανεπάρκειας. Οι πλέον συχνές λοιμώξεις αφορούν το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Αξιοσημείωτο, είναι το γεγονός ότι οι λοιμώξεις από το ανώτερο και κατώτερο αναπνευστικό σύστημα αποτελούν σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας.(43) Κατά κανόνα οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται σε πυογόνα βακτήρια όπως: *Streptococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Moraxella catharralis*, *Neisseria meningitides* και *Staphylococcus spp*. Σχετικά με τις ιογενείς λοιμώξεις, αυτές δεν αποτελούν τυπικό εύρημα της νόσου αν και είναι δυνατόν να παρουσιάζονται με πιο βαριά κλινική εικόνα σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό.(44)

Οι βρογχεκτασίες και η διάμεση πνευμονική νόσος, αποτελούν τις πιο συχνές επιπλοκές των χρόνιων λοιμώξεων του αναπνευστικού και επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής αλλά και την πρόγνωση των ασθενών.(44) Η θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη επηρεάζει τη φυσική πορεία της νόσου και συνεπάγεται μείωση των διεισδυτικών λοιμώξεων, ενώ η επίπτωση των λοιμώξεων του αναπνευστικού φαίνεται να επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες και δεν μειώνεται σημαντικά.(45)

Επιπλέον, εξέχουσα θέση στην κλινική εικόνα των ασθενών καταλαμβάνουν και οι λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος υπό τη μορφή κυρίως χρόνιου διαρροϊκού συνδρόμου.(46) Κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες αυτού είναι το παράσιτο *Giardia lamblia* ακολουθούμενο σε συχνότητα από τους μικροβιακούς παράγοντες *Campylobacter jejuni* και *Salmonella spp*.(47) Πιο αναλυτικά, οι παρασιτικές λοιμώξεις μπορούν να διαγνωστούν είτε με μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων κοπράνων (PCR, ELISA, κλασική μικροσκόπηση) είτε με ιστολογική εξέταση βιοψιών του λεπτού εντέρου.(47) Αξιοσημείωτο είναι επιπλέον το

γεγονός ότι οι ασθενείς με CVID δεν παρουσιάζουν συχνά λοιμώξεις από *Helicobacter pylori* πιθανότατα λόγω της συχνής χρήσης αντιβιοτικών. Ανεξάρτητα όμως αυτού, είναι σημαντική η εφαρμογή προσυμπτωματικού ελέγχου για λοίμωξη από *H. Pylori* εξαιτίας του ρόλου του μικροβίου αυτού στην ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος στομάχου.(48)

### 1.5.2. ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ

Οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις κατέχουν εξέχουσα θέση στην κλινική εικόνα των ασθενών με CVID, καθώς παρατηρούνται σε ποσοστό 21% έως 42% αυτών.(14) Οι πλέον συχνές και δυνητικά επικίνδυνες, είναι οι αυτοάνοσες αιματολογικές εκδηλώσεις (αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα και αυτοάνοση ουδετεροπενία).(49) Πέρα από αυτές μια ποικιλία τόσο οργανοειδικών όσο και συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων έχουν επιπλέον περιγραφεί.(50)

Η συνύπαρξη ανοσοανεπάρκειας και αυτοανοσίας φαντάζει παράδοξη. Ωστόσο, μια πληθώρα δυνητικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών έχουν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία.(51) Αναλυτικότερα, παράγοντες που επηρεάζουν την ανοχή έναντι των T λεμφοκυττάρων, όπως τα χαμηλότερα επίπεδα Tregs και οι διαταραχές της έκκρισης κυτταροκινών, έχουν σχετιστεί με την εκδήλωση αυτοανοσίας σε ασθενείς με CVID.(52) Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν αυξημένα επίπεδα του BAFF, διαταραχές στη διαδικασία πρόκλησης σωματικών υπερμεταλλάξεων καθώς και διαταραχές των TLRs.(53)(54)

Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι σε μια μεγάλη μερίδα ασθενών οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις αποτελούν το πρώτο εύρημα της νόσου και για το λόγο αυτό απαιτείται αυξημένος δείκτης κλινικής υποψίας προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν καθυστερήσεις στη διάγνωση αυτής. Έτσι, σε κάθε ασθενή με αυτοάνοσο νόσημα και συμβατό ατομικό ή/και κληρονομικό αναμνηστικό ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών πριν από την έναρξη θεραπείας θα μπορούσε να αποτελέσει πολύτιμο διαφοροδιαγνωστικό εργαλείο για τον κλινικό ιατρό.  
(54)

### 1.5.3. ΛΕΜΦΟΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ

Οι ασθενείς με CVID παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα κακοηθειών, με τον ακριβή ωστόσο παθοφυσιολογικό μηχανισμό της κατάστασης αυτής να παραμένει ασαφής.(54) Αναλυτικότερα, οι ασθενείς που παρουσιάζουν λεμφαδενοπάθεια βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης αιματολογικών κακοηθειών με συχνότερη το non – Hodgkin λέμφωμα. (55)(56) Επιπλέον, αυξημένη είναι και η επίπτωση γαστρικού αδενοκαρκινώματος, η οποία πιθανόν να οφείλεται σε διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης έναντι παραγόντων όπως ο ιός Epstein – Barr και το βακτήριο *H. pylori*.(57) Εντυπωσιακά, είναι τα αποτελέσματα μιας Ιταλικής μελέτης η οποία κατατάσσει το γαστρικό καρκίνο ως την κύρια αιτία θανάτου των ασθενών με CVID.(58)

Στην κατεύθυνση αυτή μία επιπλέον πρόσφατη μελέτη από την Τσεχία κατέδειξε πως ο κίνδυνος ανάπτυξης νεοπλασματικής νόσου είναι 6 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης αποτελεί επιπλέον το γεγονός ότι οι ασθενείς με ιστορικό ITP παρουσίαζαν τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν κάποια κακοήθεια και για το λόγο αυτό η εκδήλωση ITP μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ένας πιθανός παράγοντας κινδύνου για τους ασθενείς αυτούς.(59) Στο μέλλον αναμένεται η μελέτη μεγαλύτερων ομάδων ασθενών και η καλύτερη κατανόηση του ρόλου των σχετιζόμενων με CVID γονιδίων στην ογκογένεση.

### 1.5.4. ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΕΙΑ

Μια διακριτή ομάδα ασθενών με CVID χαρακτηρίζεται από διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος. Αναλυτικότερα, η παθοφυσιολογία της εντεροπάθειας που σχετίζεται με την CVID δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί με αποτέλεσμα να αποτελεί αντικείμενο διαρκούς έρευνας. Χαρακτηριστικό των καταστάσεων αυτών είναι η αντίσταση στις συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που συχνά οδηγεί σε απώλεια βάρους και ανεπαρκή πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, ενώ έχουν περιγραφεί ακόμη και περιπτώσεις που έχρηζαν μακροχρόνιας παρεντερικής σίτισης. (60)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πιο συχνή επιπλοκή που αφορά το γαστρεντερικό σύστημα είναι το χρόνια διαρροϊκό σύνδρομο, το οποίο κατά κανόνα είναι λοιμώδους αιτιολογίας. Πέραν αυτού, ένα ποσοστό ασθενών της τάξης 10-12% παρουσιάζουν μη λοιμώδη εντεροπάθεια η οποία είναι δυνατόν να μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με νοσήματα όπως η νόσος Crohn, η ελκώδης κολίτιδα και η κοιλιοκάκη.(61) Σε μια μεγάλη σειρά ασθενών, η

οποία περιλάμβανε 50 ασθενείς με CVID το 40% αυτών παρουσίαζε χρόνια συμπτώματα από το γαστρεντερικό. Τα συχνότερα ευρήματα αποτελούσαν οι διάρροιες και το κοιλιακό άλγος. (62) Ιστολογικές βλάβες αναδείχθηκαν σε 34 από τις 41 βιοψίες δωδεκαδακτύλου και σε 28 από τις 35 βιοψίες παχέος εντέρου.(60) Χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα αποτελούν η οζώδης λεμφική υπερπλασία, με αυξημένα Β λεμφοκύτταρα και μειωμένα πλασματοκύτταρα και η διήθηση του χορίου με CD8+T λεμφοκύτταρα.(63)(64)

### **1.5.5 ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΡΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ**

Οι ασθενείς με CVID παρουσιάζουν αυξημένη προδιάθεση ανάπτυξης ατοπικών εκδηλώσεων, κατάσταση που πιθανόν οφείλεται σε ανοσολογικές διαταραχές των βλεννογόνων καθώς και σε εκτροπή των ανοσολογικών απαντήσεων προς την κατεύθυνση του Th2 φαινοτύπου.(64) Από τις έως τώρα μελέτες οι ασθενείς συχνότερα παρουσιάζουν βρογχικό άσθμα, ατοπική δερματίτιδα, αλλεργική ρινίτιδα και έκζεμα, ενώ η επίπτωση των διαταραχών αυτών ποικίλει μεταξύ των διαφόρων μελετών από 12-42%.(65)(66) Οι διαφοροποιήσεις αυτές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων μελετών θα μπορούσαν να ερμηνευθούν στα πλαίσια των υποκείμενων μοριακών διαταραχών οι οποίες ποικίλουν μεταξύ των ασθενών. Πράγματι φαίνεται πως στη βάση των συχνών λοιμώξεων και της ατελούς πολλές φορές κάθαρσης των μικροβιακών αντιγόνων σε συνδυασμό με τη μη αποτελεσματική δράση της IgA στους βλεννογόνους, οι διαταραχές από το φάσμα της ατοπίας με κύριο εκπρόσωπο το βρογχικό άσθμα αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας μεταξύ των ασθενών με CVID. Πράγματι, όπως και με τις υπόλοιπες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου αποφασιστικής σημασίας κρίνεται ο υψηλός δείκτης κλινικής υποψίας, προκειμένου να επιτευχθεί η άμεση θεραπευτική παρέμβαση με γνώμονα την καλύτερη δυνατή κλινική διαχείριση των ασθενών.

### **1.5.6. ΑΛΛΕΣ ΣΠΑΝΙΟΤΕΡΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ**

Πέραν των όσων έχουν ήδη αναφερθεί οι ασθενείς με CVID συχνά παρουσιάζουν και εκδηλώσεις από άλλα συστήματα. Για παράδειγμα, έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ασθενών με CVID των οποίων οι πρώτες κλινικές εκδηλώσεις ήταν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ΚΝΣ.(67) Παράλληλα, έχουν γίνει και αναφορές επεισοδίων μυελίτιδας, με τους ασθενείς κατόπιν να παρουσιάζουν πλήρη κλινική ανταπόκριση σε θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη.(68) Τέλος, συσχετίσεις έχουν γίνει και με περιπτώσεις έλλειψης βιταμίνης E και B<sub>12</sub>.

Περίπου, ένας στους 10 ασθενείς με CVID παρουσιάζει εκδηλώσεις από το ήπαρ, κύριος εκπρόσωπος των οποίων είναι η NRH.(69) Άλλες διαταραχές που έχουν καταγραφεί είναι η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα και η κοκκιωματώδης νόσος του ήπατος. (70)

## 1.6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο ακρογωνιαίος λίθος της νόσου είναι η υπογαμμασφαιριναιμία και κατά συνέπεια, η θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη αποτελεί την πλέον αξιόπιστη θεραπευτική προσέγγιση αυτής. Πράγματι, η θεραπεία υποκατάστασης έχει σχετισθεί με μειωμένη συχνότητα λοιμώξεων και κατά συνέπεια ελαχιστοποίηση των ημερών νοσηλείας.(71) Να σημειωθεί πως η δοσολογία χρήζει τροποποίησης σε ασθενείς με συνοδά νοσήματα ή κατά την περίοδο της κύησης.(72) Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη χορήγηση χημειοπροφύλαξης καθώς και τον εμβολιασμό με ζώντες εξασθενημένους μικροοργανισμούς.

Επιπλέον, ιδιαίτερος σημαντική κρίνεται η τακτική παρακολούθηση των ασθενών από εξειδικευμένους και έμπειρους ιατρούς, καθώς πέραν της αυξημένης ευπάθειας σε λοιμώξεις οι ασθενείς με CVID παρουσιάζουν κατά την πορεία της νόσου πληθώρα κλινικών εκδηλώσεων(73). Για παράδειγμα, σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα έχει χρησιμοποιηθεί πληθώρα ανοσοτροποποιητικών και ανοσοκατασταλτικών παραγόντων(74). Εξέχουσα θέση στις ανωτέρω θεραπευτικές επιλογές κατέχει και το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών. Μια επιπρόσθετη θεραπευτική επιλογή αποτελεί και η ετερόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών, η οποία έχει εφαρμοστεί σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών, με μεικτά ωστόσο αποτελέσματα. Πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν την εφαρμογή αυτής σε εξαιρετικά βαριές περιπτώσεις ασθενών με CVID και κατά κανόνα σε ασθενείς με διαταραχές στο επίπεδο της κυτταρικής ανοσίας(75). Τέλος, στο μέλλον αναμένεται η εφαρμογή της ετερόλογης μεταμόσχευσης σε ασθενείς με συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο.

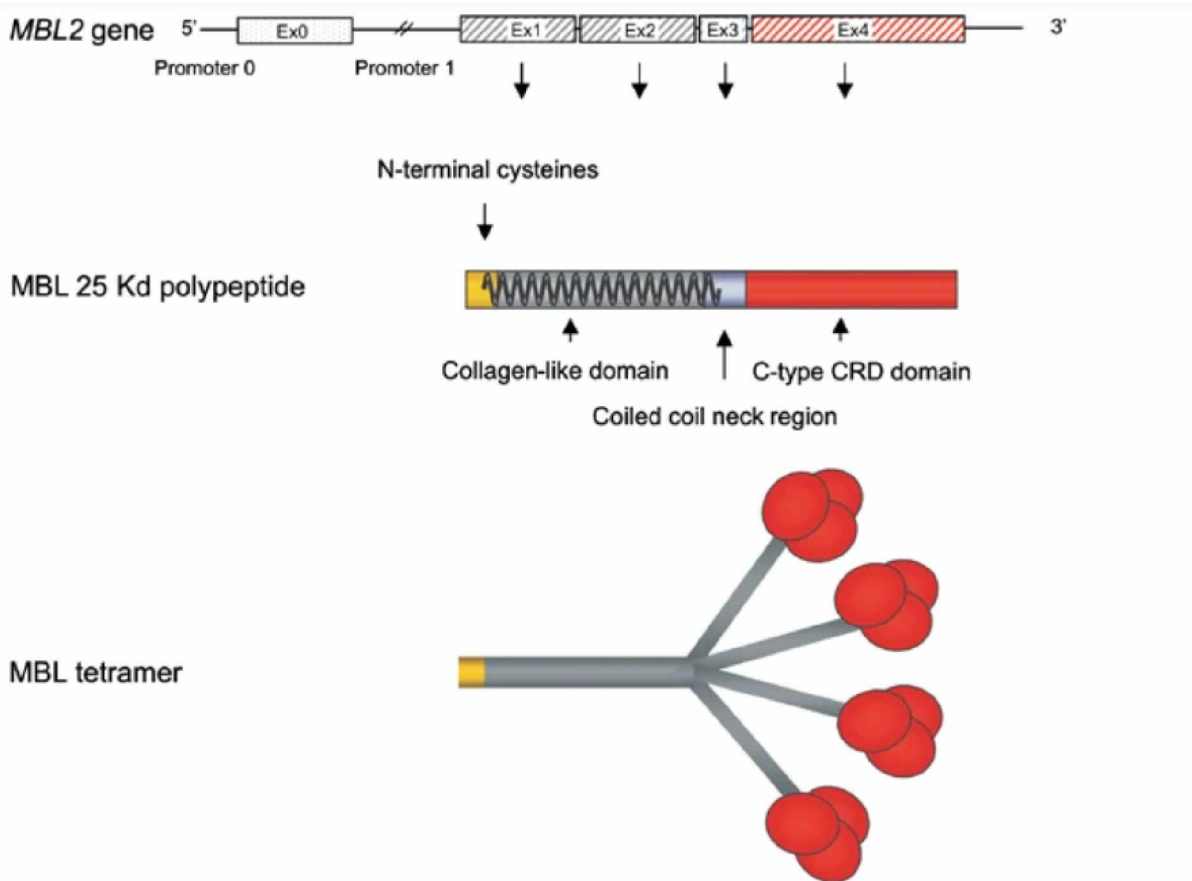


## 2. Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL.

### 2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL.

Η πρωτεΐνη MBL εντάσσεται στις κολλεκτίνες και συχνά απεικονίζεται όπως φαίνεται στη Εικόνα 1. Πρόκειται για ένα ολιγομερές το οποίο αποτελείται από τρεις ή και περισσότερες δομικές υπομονάδες κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από τρεις πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες δομικά περιστρέφονται η μία γύρω από την άλλη δημιουργώντας μία δομή η οποία θα μπορούσε να παρομοιαστεί με μία αλυσίδα. Στο N-αμινοτελικό άκρο της πλούσιας σε κολλαγόνο περιοχής, βρίσκονται 21 αμινοξέα, τρία εκ των οποίων είναι κυστεΐνες και ο ρόλος των οποίων έγκειται στην παροχή σταθερότητας σε κάθε μία από τις υπομονάδες. Ακολουθεί μία περιοχή που δομικά ομοιάζει με κολλαγόνο και η οποία αποτελείται από επαναλήψεις της τριπλέτας Gly – X – Y (όπου X και Y οποιοδήποτε αμινοξύ). Αρχικά, 7 επαναλήψεις οι οποίες διακόπτονται από GlyGIn και στη συνέχεια, άλλες 12 επαναλήψεις. Στη συνέχεια, ανευρίσκεται μία μικρή περιοχή με δομή έλικας (coiled – coil region) ο ρόλος της οποίας είναι κομβικός για την έναρξη του πολυμερισμού και τέλος ακολουθεί το καρβοξυτελικό άκρο.(76)

Η εν λόγω πρωτεΐνη, προκειμένου να καταστεί βιολογικά ενεργή υπόκειται σε ολιγομερισμό, διαμορφώνοντας ολιγομερή 2-6 υπομονάδων. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι η υπομονάδα δεν δύναται να προσδεθεί με μαννόζη στερεής φάσης και κατ' επέκταση να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα. Αντιθέτως, στην ολιγομερική της μορφή και με το σχηματισμό τετραμερούς, οι υπομονάδες της πρωτεΐνης είναι σε θέση να συνδεθούν με μαννόζη και άλλα σάκχαρα της επιφάνειας των μικροοργανισμών, χωρίς ωστόσο να είναι δυνατή η σύνδεση με τις περισσότερες γλυκοπρωτεΐνες των θηλαστικών, γεγονός που ερμηνεύεται με βάση τη στερεοχημική δομή του καρβοξυτελικού άκρου του πολυπεπτιδίου της MBL και το οποίο επιτρέπει τη σύνδεση με τις επαναλήψεις σακχάρων οι οποίες χαρακτηρίζουν δομικά μικροβιακές δομές, χωρίς ωστόσο να συνδέονται με δομές μαννόζης σε πιο εξελιγμένα ήδη όπως τα θηλαστικά.(77)



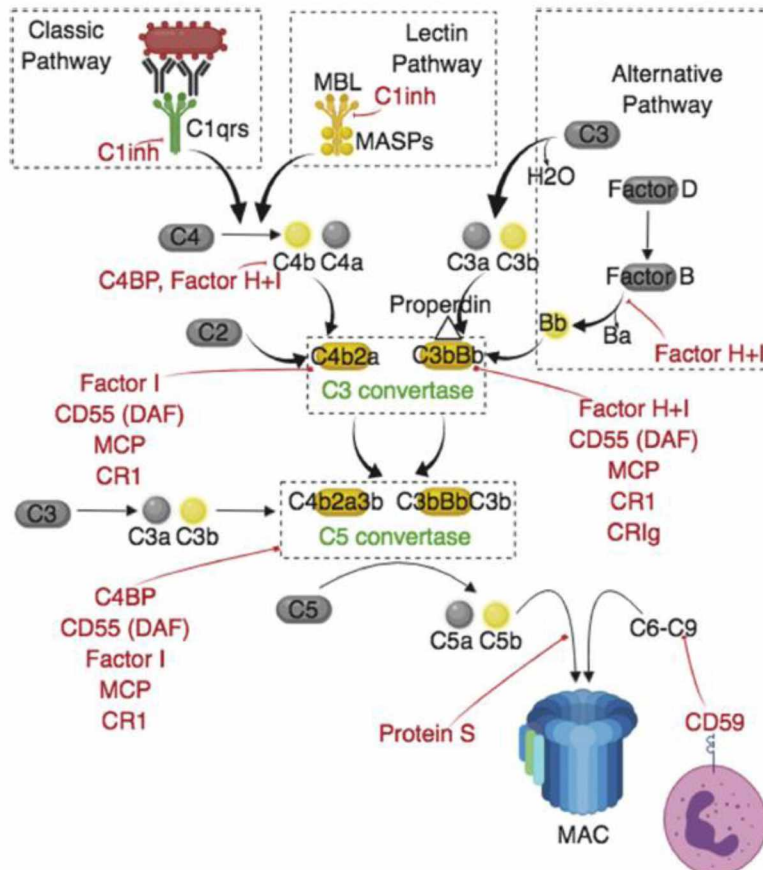
**Εικόνα 1:** Η δομή του γονιδίου *MBL2*, το πολυπεπίδιο MBL και η ολιγομερική δομή της πρωτεΐνης MBL. (Garred και συνεργάτες, με τροποποιήσεις [77]).

## 2.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MBL.

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί τμήμα του συστήματος της φυσικής ανοσίας, το οποίο ωστόσο παίζει ρόλο και στην ειδική ανοσιακή απάντηση. Αποτελεί ένα σύνολο πρωτεϊνών οι οποίες εντοπίζονται τόσο στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, όσο και στο πλάσμα. Οι εν λόγω πρωτεΐνες συντίθενται κυρίως στο ήπαρ αρχικά ως ανενεργά ένζυμα, τα οποία στη συνέχεια μέσω πρωτεόλυσης καθίστανται ενεργά μέσα από έναν καταρράκτη ενζυμικών αντιδράσεων σε καθεμία από τις οποίες το ενεργό ένζυμο αποτελεί ουσιαστικά τον καταλύτη για την ενεργοποίηση του επόμενου ενζύμου. Ο ρόλος του συστήματος του συμπληρώματος έγκειται στην οψωνινοποίηση μικροοργανισμών και τμημάτων αυτών, στην κυτταρόλυση τους, στην απομάκρυνση ανοσοσυμπλεγμάτων από την κυκλοφορία, ενώ οι πρωτεΐνες του συστήματος του

συμπληρώματος, δρουν και ως συμπαράγοντες για την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων και την περαιτέρω διαφοροποίησή τους.(78)

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να γίνει μέσω τριών οδών (Εικόνα 2):



**Εικόνα 2:** Το σύστημα του συμπληρώματος. Σχηματική απεικόνιση της κλασσικής και εναλλακτικής οδού, καθώς και της οδού της λεκτίνης. (από Ling et al με τροποποιήσεις [79]).

1. **Κλασσική οδός:** η κλασσική οδός του συμπληρώματος άρχεται μέσω του συμπλέγματος αντιγόνου – αντισώματος το οποίο αναγνωρίζεται από το C1q, επιτρέποντας σε αυτό να αλληλεπιδράσει με το C1r και το C1s σχηματίζοντας το ενεργοποιημένο C1r2s2 το οποίο στη συνέχεια διασπά το C4 κλάσμα σε C4a και C4b και το C2 επίσης σε C2a και C2b. Ακολούθως, το σύμπλεγμα C4bC2a το οποίο είναι μία κονβερτάση, διασπά το C3 σε C3a και C3b. Τέλος, το σύμπλεγμα C4bC2aC3b είναι η κονβερτάση C5, ο σχηματισμός της οποίας αποτελεί το πέρας της κλασσικής οδού. (79)

2. **Εναλλακτική οδός:** η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος δεν εξαρτάται από την παρουσία αντισώματος, προϋποθέτει όμως την παρουσία ενός ενεργοποιημένου παράγοντα, του C3b, με την ενεργοποίηση αυτού να λαμβάνει χώρα είτε μέσω υδρόλυσης, είτε μέσω της κλασσικής οδού. Με τον τρόπο αυτό, ο ενεργοποιημένος παράγοντας C3b δύναται πλέον να συνδεθεί με έναν παράγοντα του ορού που ονομάζεται παράγοντας B (factor B). Συγκεκριμένα, η σύζευξη αυτή επιτρέπει στον παράγοντα D να διασπάσει τον παράγοντα B σε Ba και Bb. Έτσι, με τη σύνδεση C3b και Bb δομείται η κονβερτάση της εναλλακτικής οδού C3bBb, η οποία σταθεροποιείται μέσω της προπερδίνης, μιας πρωτεΐνης η οποία εντοπίζεται σε ενεργοποιημένες κυτταρικές επιφάνειες με μειωμένη ποσότητα σιαλικών οξέων (π.χ. κυτταρικές μεμβράνες μικροοργανισμών), αλλά όχι στις πλούσιες σε σιαλικά οξέα κυτταρικές μεμβράνες του ανθρώπινου οργανισμού.
3. **Οδός της λεκτίνης:** η οδός της λεκτίνης, μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω των pattern recognition receptors (PRRs) οι οποίοι αναγνωρίζουν συγκεκριμένους υδατάνθρακες των μικροβιακών τοιχωμάτων όπως η μαννόζη και η N – ακετυλογλυκοζαμίνες. Στους PRRs περιλαμβάνονται: α) η MBL και β) οι φικολίνες. Οι φικολίνες είναι PRRs οι οποίες διαθέτουν ένα κύριο τμήμα το οποίο ομοιάζει με ινωδογόνο και συντίθενται είτε στο ήπαρ (L- ficolin & H- ficolin), είτε εκκρίνονται από τους πνεύμονες ή από κύτταρα του αίματος (M – ficolin). Η MBL πρωτεΐνη δημιουργεί σύμπλοκο με τις MBL – associated serine proteases (MASP-1 & MASP-2), οι οποίες σχετίζονται εξελικτικά με τα C1r και C1s κλάσματα και με τον τρόπο αυτό διασπά τα κλάσματα C4 και C2, σχηματίζοντας της κονβερτάση C4b2a, η οποία αποτελεί το τελικό προϊόν της οδού της λεκτίνης, πριν από τον τελικό κοινό μονοπάτι, όπως αυτό φαίνεται στην εικόνα 2 και του οποίου το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός του συμπλόκου MAC (membrane attack complex) που εισέρχεται στη μεμβράνη και προκαλεί λύση του κυττάρου. (80)

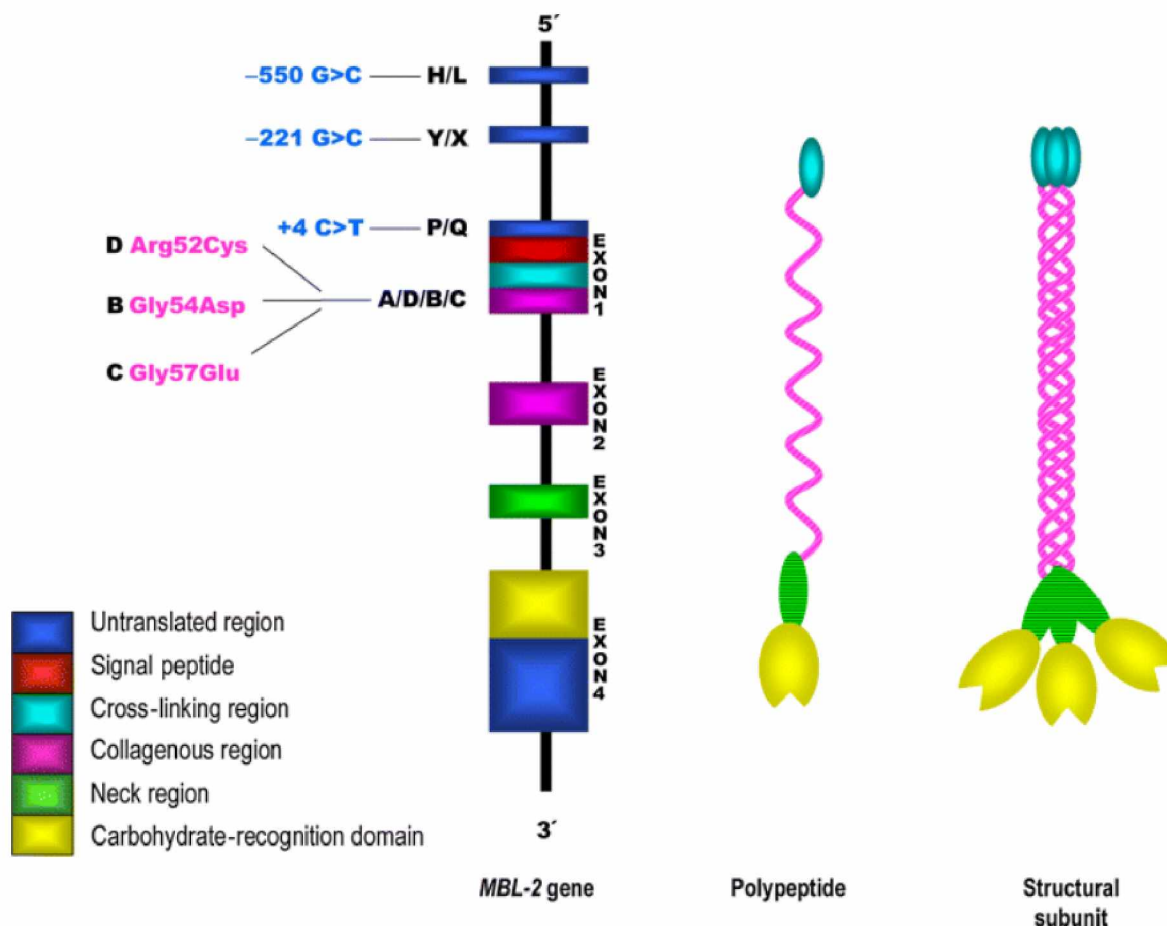
Πέραν του ρόλου της στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος η πρωτεΐνη MBL κατέχει και άλλους ρόλους στο ανοσιακό σύστημα, καθώς δύναται να επάγει οψωνινοποίηση ανεξάρτητα από το συμπλήρωμα, ενώ φαίνεται επιπλέον να εμπλέκεται στη φλεγμονή και στη διαδικασία της απόπτωσης. Αναλυτικότερα, έχουν αναφερθεί διάφοροι υποδοχείς στους οποίους προσδένεται η MBL, όπως η cC1qR/καρλετικουλίνη, η C1qRp και η CR1. Ωστόσο, δεν είναι πλήρως κατανοητό εάν η MBL δρα άμεσα ως οψωνίνη ή αν ασκεί τη δράση της μέσω

άλλων οδών του συμπληρώματος ή/και μέσω φαγοκυττάρωσης εξαρτώμενης από αντισώματα.  
(81)

Σχετικά με το ρόλο της MBL στη φλεγμονή, αυτός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί καθώς φαίνεται να ασκεί έναν τροποποιητικό χαρακτήρα επάγοντας την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα. Ρόλος της MBL στην κάθαρση αποπτωτικών κυττάρων είχε προταθεί από τους Ogden και συνεργάτες το 2001, καθώς φαίνεται να συνδέεται άμεσα σε αυτά μέσω των εκτεθειμένων σακχάρων των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, προάγοντας τη φαγοκυττάρωση αυτών από τα μακροφάγα.(81)(82) Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει ο ρόλος της MBL στην ανοσοογκολογία, καθώς οι αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα των καρκινικών κυττάρων επάγουν τη σύνδεση της MBL στα κύτταρα αυτά προάγοντας την MBL διαμεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα, γεγονός που συνεπάγεται την ανάγκη περαιτέρω έρευνας προς την κατεύθυνση αυτή προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της εν λόγω πρωτεΐνης στην ανοσολογία του καρκίνου.(83)

### **2.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MBL2*.**

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν δύο γονίδια *MBL* εκ των οποίων το γονίδιο *MBL1* αποτελεί ψευδογονίδιο και δεν εκφράζεται, ενώ το γονίδιο *MBL2* εκφράζεται και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *MBL*. Το λειτουργικό γονίδιο *MBL2* εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 και αποτελείται από τέσσερα εξόνια. Το πρώτο εξόνιο κωδικοποιεί την αμινοτελική περιοχή που είναι πλούσια σε κυστεΐνες (N-terminal cysteines) και ένα τμήμα της περιοχής με δομή κολλαγόνου που είναι πλούσιο σε γλυκίνη, με το υπόλοιπο της περιοχής αυτής να κωδικοποιείται από το δεύτερο εξόνιο. Το εξόνιο τρία κωδικοποιεί τη λεγόμενη περιοχή του «λαιμού» (coiled-coil-neck region), ενώ τέλος το εξόνιο 4 δίνει τη γενετική πληροφορία για τη λεγόμενη CRD περιοχή η οποία αποτελεί την περιοχή δέσμευσης των υδατανθράκων.



**Εικόνα 3:** Δομή του γονιδίου *MBL2* και της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό. Στην περιοχή του υποκινητή και στην περιοχή του εξονίου 1 φαίνονται οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2* οι οποίοι είναι γνωστοί από την διεθνή βιβλιογραφία (από Dommert et al με τροποποιήσεις [80]).

Από τη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί στο εξόνιο 1, αρχικά σε δύο παιδιά από τη Βρετανία, με ιστορικό λοιμώξεων. Αναλυτικότερα, μία σημειακή μετάλλαξη στο κωδικό 54 παρατηρήθηκε και στους δύο αυτούς ασθενείς. Η μετάλλαξη αυτή, είχε ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της αλληλουχίας από GGC σε GAC και κατά συνέπεια την αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος από γλυκίνη σε επίπεδο πρωτεΐνης. (82) Μετέπειτα, περιγράφηκαν άλλες δύο μεταλλάξεις στο εξόνιο ένα, με τη μία να αφορά το κωδικό 57 (Gly→Glu) και την άλλη το κωδικό 52 (Arg→Cys). Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις έγιναν γνωστές ως αλληλίο B, C και D αντίστοιχα, με το αλληλίο A να καθιστά την αγρίου τύπου αλληλουχία (wild type). Η σημασία των διαφόρων αυτών αλληλίων παραμένει αντικείμενο μελέτης, ενώ από τα έως τώρα δεδομένα προκύπτει πως τα αλληλίο B και C έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση μιας γλυκίνης από δικαρβοξυλικά οξέα, γεγονός που



συνεπάγεται την δομική παραμόρφωση ενός κομβικού τμήματος της πρωτεΐνης MBL και κατά συνέπεια τη λειτουργική ανεπάρκεια αυτής. Αντίθετα, στην περίπτωση του αλληλίου D η αντικατάσταση μίας αργινίνης από μία κυστεΐνη, έχει ως αποτέλεσμα την διευκόλυνση σύναψης δισουλφιδικών δεσμών και ως επακόλουθο τη δυσχέρεια του ολιγομερισμού. (84),(85)

Πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί επίσης και στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *MBL2*. Αναλυτικότερα, μελέτες από τους Madsen και συνεργάτες ανέδειξαν διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της MBL πρωτεΐνης στον ορό καθώς και την ύπαρξη πολυμορφισμών στον υποκινητή του γονιδίου, οι οποίοι πιθανά σχετίζονται με τις διαφοροποιήσεις αυτές. Οι εν λόγω πολυμορφισμοί ανευρίσκονται στις περιοχές -550 (H/L), -221 (X/Y) και +4 (P/Q). Στα πλαίσια αυτά και βάσει των πολυμορφισμών αυτών ταυτοποιήθηκαν οι τέσσερις παρακάτω απλότυποι: LXP, LYP, LYQ και HYP. Από τους απλοτύπους αυτούς, ο HYP έχει συσχετισθεί με μετρίως αυξημένα επίπεδα MBL στον ορό, ενώ ο LXP με μειωμένα, γεγονός που τους καθιστά τους πλέον κλινικά σημαντικούς. (86)(87)

Οι εν λόγω πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2*, έχουν συσχετισθεί με πληθώρα νοσημάτων. Αναλυτικότερα, έχουν συσχετισθεί με αυξημένη επίπτωση τόσο βακτηριακών όσο και ιογενών και μυκητιασικών λοιμώξεων, καθώς και με αυξημένη επίπτωση αυτοάνοσων – ρευματολογικών νοσημάτων, όπως ο Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος, η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα και η νόσος Behcet's. (87) Παράλληλα, νεότερες μελέτες συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς αυτούς με Ισχαιμική Καρδιακή Νόσο και με Κυστική Ίνωση. (88)(89) Σχετικά με τις λοιμώξεις από ενδοκυττάρια παθογόνα, μελέτες έδειξαν πως αυξημένα επίπεδα MBL στον ορό, προδιαθέτουν σε λοιμώξεις από *Mycobacterium leprae* και *Leishmania donovani*, γεγονός που αποτελεί παράδοξο σε σχέση με τα προηγούμενα δεδομένα που συσχέτιζαν τα μειωμένα επίπεδα MBL με την αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων. Το παράδοξο αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι τα ενδοκυττάρια παθογόνα εξαρτώνται από τη φαγοκυττάρωση προκειμένου να κατορθώσουν να εισέλθουν στα κύτταρα του ξενιστή και χρησιμοποιούν την οψωνινοποίηση προκειμένου να εισέλθουν στα φαγοκύτταρα μέσω των υποδοχέων του συμπληρώματος. Έτσι, τα χαμηλά επίπεδα MBL στον ορό σχετίζονται με μειωμένη πιθανότητα εκδήλωσης λοιμώξεων από ενδοκυττάρια παθογόνα λόγω ελαττωμένης δυνατότητας φαγοκυττάρωσης μέσω του συμπληρώματος. Στα πλαίσια αυτά, τα διάφορα αλληλία και η επίδραση αυτών στα επίπεδα και τη λειτουργικότητα της MBL πιθανά να προσφέρουν εξελικτικό πλεονέκτημα σε άτομα που κατοικούν σε ενδημικές για τα ανωτέρω νοσήματα περιοχές. (90)(91) Όπως έχει ήδη αναφερθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο

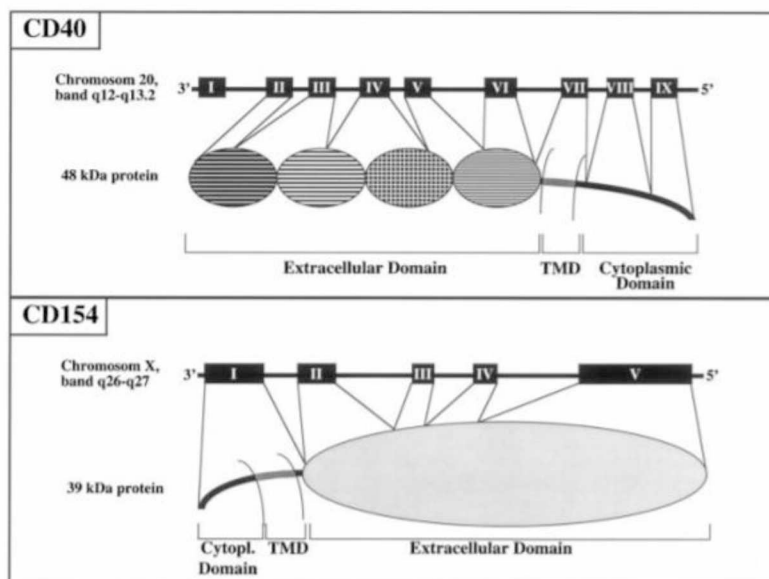
ρόλος της φυσικής ανοσίας στην εκδήλωση της CVID τόσο σε επίπεδο παθοφυσιολογίας, όσο και σε κλινικό επίπεδο. Έτσι, η μελέτη των εν λόγω πολυμορφισμών σε Έλληνες ασθενείς με CVID και η συσχέτιση αυτών με τον κλινικό φαινότυπο της νόσου, κρίνεται ιδιαίτερης σημασίας καθώς πιθανά να δώσει φως στο ρόλο ενός τμήματος της φυσικής ανοσίας στην εκδήλωση της νόσου.

### **3. ΤΟ ΜΟΡΙΟ CD40 & ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CD40 – CD40ligand (CD154).**

#### **3.1. ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ CD40 & CD40 ligand (CD154).**

Η πρωτεΐνη CD40 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας της υπεροικογένειας των TNF και εκφράζεται σε μία πληθώρα κυττάρων, όπως τα μονοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Αναλυτικότερα, πρόκειται για μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I μοριακού βάρους 47-48 kDa, η οποία αποτελείται από 277 αμινοξέα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ανήκει στην υπεροικογένεια των TNF και όπως συμβαίνει σε πολλά μέλη της οικογένειας αυτής, το εξωκυττάριο τμήμα αυτής χαρακτηρίζεται από επαναλήψεις κυστεΐνης και αποτελείται από ένα N αμινοτελικό άκρο το οποίο περιλαμβάνει τέσσερις υπομονάδες καθεμία από τις οποίες σταθεροποιείται με έναν ή δυο δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο προσδέτης του CD40 (CD40 ligand ή CD154) προσδένεται στη δεύτερη και τρίτη υπομονάδα του εξωκυττάριου τμήματος του CD40. (92)

Το μόριο CD40 εντοπίζεται στην επιφάνεια των κυττάρων ως μονομερές, ως διμερές ή ως τριμερές. Από τις έως τώρα μελέτες έχει φανεί πως η διμερής μορφή είναι αυτή η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταβίβαση του σήματος, με την τριμερή μορφή να δρα επικουρικά ενισχύοντας τη σηματοδότηση. Ο προσδέτης του CD40 δηλαδή ο CD40 ligand είναι μία τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη και αποτελείται από 261 αμινοξέα εκ των οποίων τα 215 αποτελούν το εξωκυττάριο τμήμα αυτού, ενώ ανευρίσκεται σε δύο μορφές: την διαμεμβρανική μορφή και τη διαλυτή μορφή με μοριακό βάρος 39kDa και 18kDa αντίστοιχα.(92)(93)



**Εικόνα 4:** Δομή των πρωτεϊνών CD40 και CD40 ligand (CD154) καθώς και των αντίστοιχων γονιδίων. [από Schönbeck και συνεργάτες με τροποποιήσεις (94)]

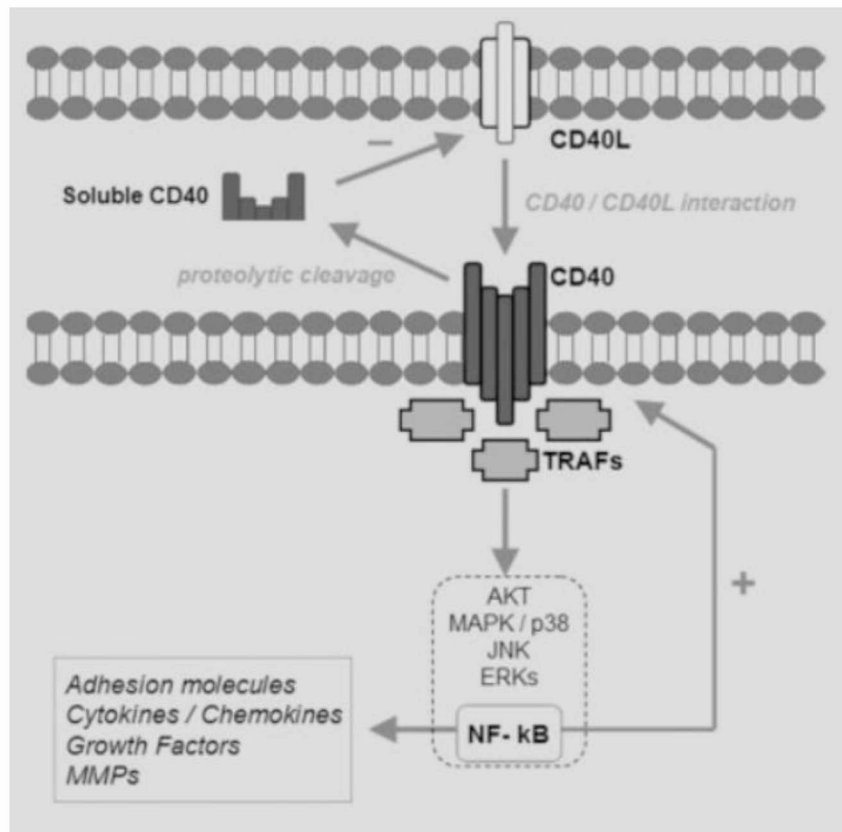
### 3.2. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CD40-CD40ligand (CD154)

Η πρόσδεση του CD40ligand (είτε στη διαμεμβρανική είτε στη διαλυτή μορφή, sCD40ligand) στο CD40 όπως είναι ήδη γνωστό κατέχει κομβικό ρόλο στην εξαρτώμενη από T λεμφοκύτταρα ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων, καθώς και στη διαφοροποίηση αυτών και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Ωστόσο, πέραν αυτού η πρόσδεση CD40 – CD40ligand φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και σε μια σειρά άλλων διεργασιών, όπως η ενεργοποίηση κινασών, η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το κυτταρικό στρες, η επαγωγή της απόπτωσης καθώς και η ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την απόρριψη μοσχεύματος ή σε περιπτώσεις αυτοανοσίας.(95)

Αναλυτικότερα, η σηματοδότηση μέσω του CD40 φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγονοπαρουσίασης και της παραγωγής κυτταροκινών και χημειοκινών από τα καρκινικά κύτταρα, καθιστώντας τα πιο ευάλωτα στα T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, πέραν αυτού μέσω του μορίου CD40 φαίνεται να προάγεται η φλεγμονή και η κυτταρική επιβίωση γεγονός που υπογραμμίζει το ρόλο αυτού στην ανάπτυξη αυτοανοσίας και κακοηθειών.(96)

Εντός του κυττάρου, το αποτέλεσμα της πρόσδεσης του CD40ligand στον υποδοχέα, συνεπάγεται την προσέλκυση πρωτεϊνών που δρουν ως προσαρμογείς και οι οποίες είναι γνωστές ως TRAFs.(97) Οι πρωτεΐνες αυτές μέσω δευτερογενών σηματοδοτικών μορίων ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια όπως το κανονικό και μη κανονικό σηματοδοτικό

μονοπάτι του NF-κB και των MAPKs (mitogen-activated protein kinases), μονοπάτια τα οποία είναι απαραίτητα για την αποφυγή της απόπτωσης και την προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης. Ωστόσο, εκτός από το μονοπάτι που ενεργοποιούνται μέσω των TRAF πρωτεϊνών, το ενδοκυττάριο τμήμα του CD40 αλληλεπιδρά και με την τυροσινική κινάση JAK3 η οποία επάγει τη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων και μορίων που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος (π.χ. STAT-3, STAT-5a, STAT-6).(92)



**Εικόνα 5:** Σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω της αλληλεπίδρασης CD40 – CD40ligand εξαρτώμενο από τις TRAF πρωτεΐνες. (από Chatzigeorgiou και συνεργάτες με τροποποιήσεις [96])

### 3.3. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ CD40-CD40L ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι εμπλέκεται τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρική ανοσία, ενώ φαίνεται να κατέχει κομβικό ρόλο σε ποικίλα χρόνια φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα. Αναλυτικότερα, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν το CD40 ή το CD40ligand είναι υπεύθυνες για το υπερ-IgM σύνδρομο (HIgM) το οποίο χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα IgG και IgA και από αυξημένα επίπεδα IgM.(98) Πέραν του συνδρόμου αυτού σημαντικός είναι ο ρόλος του συστήματος αυτού στις ιογενείς λοιμώξεις, καθώς και στις λοιμώξεις από ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια παθογόνα γεγονός που ερμηνεύεται από τη θέση που κατέχει στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μόριο CD40 στα CD8 T-λεμφοκύτταρα σχετίζεται με την επίκτητη ανοσιακή απάντηση έναντι λοιμώξεων, ενώ στα CD4 T-λεμφοκύτταρα κατέχει κομβικό ρόλο στην εκδήλωση αυτοανοσίας.(98) Πρόσφατα στοιχεία οι Wagner και συνεργάτες υπέδειξαν τον κομβικό ρόλο του CD40 στην εκδήλωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου I, μέσω της ανάδειξης ενός αυτοδραστικού πληθυσμού CD4/CD40+ T λεμφοκυττάρων σε μοντέλα ποντικών, ενώ μελέτες σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I έδειξαν σταθερά αυξημένα επίπεδα διαλυτού CD40ligand, τα οποία συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας.(99)(100)

Παράλληλα, μελέτες έχουν αναδείξει αυξημένα επίπεδα διαμεμβρανικού CD40 σε ασθενείς με νόσο Alzheimer, πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδή αρθρίτιδα και αθηροσκλήρυνση.(101)(102)(103) Στα πλαίσια αυτά, ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού CD40-CD40ligand αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων με απώτερο σκοπό την ανάδειξη νέων θεραπευτικών επιλογών σε ασθενείς με φλεγμονώδη ή αυτοάνοσα νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CD40 έχουν μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα και με στόχο τη χρήση αυτών θεραπευτικά στην πολλαπλή σκλήρυνση, στην αθηροσκλήρυνση, στη νόσο Graves, σε αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους καθώς και στη χρόνια νεφρική νόσο.(104)(105)(106). Παράλληλα, έχουν μελετηθεί και μονοκλωνικά αντισώματα με δράση αγωνιστών του CD40 ως αντικαρκινικά θεραπευτικά μέσα, καθώς ενισχύουν τη δράση των T λεμφοκυττάρων έναντι των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση παραγόντων που μπλοκάρουν ή ενισχύουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του CD40 σε πειραματικά μοντέλα που αφορούν μεταμόσχευση ιστών καθώς και για την κατασκευή εμβολίων όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του Gram θετικού μικροβίου *Listeria monocytogenes*. (107),(108).

### 3.4. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ CD40 (TNFRSF5) ΚΑΙ Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs1883832

Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο CD40 χαρτογραφήθηκε το 1994 και εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 20 (q11.2 – q13.2), ενώ αποτελείται από συνολικά 9 εξόνια όπως φαίνεται στην εικόνα 4.(109) Όπως έχει ήδη αναφερθεί μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση του Υπερ-IgM συνδρόμου τύπου 3 (HIGM3).(110) Η αλληλούχηση του γονιδίου αυτού ανέδειξε την παρουσίας ενός λειτουργικού πολυμορφισμού στην αλληλουχία Kozak στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Η ακολουθία Kozak είναι μία αρκετά συντηρημένη αλληλουχία η οποία αποτελεί τη θέση έναρξης της μετάφρασης στα περισσότερα ευκαρυωτικά mRNA. Περιλαμβάνει τα τελευταία 6 νουκλεοτίδια της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA, το κωδικόνιο έναρξης καθώς και ένα ακόμα νουκλεοτίδιο. Η ακολουθία αυτή εγγυάται τη σωστή μετάφραση και τη σύνθεση της πρωτεΐνης, ενώ σχετίζεται και με την ποσότητα της πρωτεΐνης που συντίθεται. (109)(110)

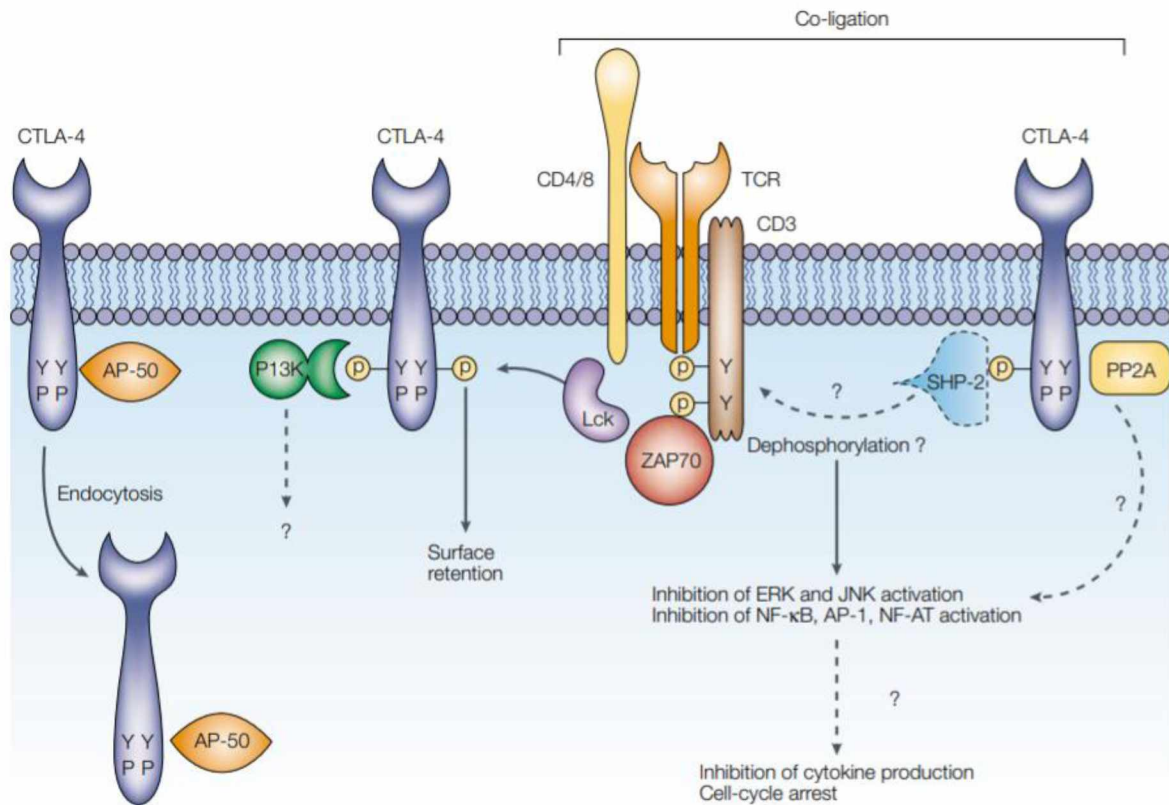
Ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs1883832 του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CD40, εντοπίζεται στη θέση -1 (c. -1 T/C) και χαρακτηρίζεται από την αντικατάσταση μιας θυμίνης από μία κυτοσίνη. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία το αλληλίο C σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα μετάφρασης του mRNA που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του CD40, γεγονός το οποίο συνεπάγεται αυξημένη έκφραση αυτού στις διάφορες κυτταρικές ομάδες. Κατά συνέπεια παρατηρείται αύξηση στην ένταση όλων όσων προκύπτουν μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού CD40-CD40ligand, κατ' επέκταση και των αυτοάνοσων εκδηλώσεων.(109)(111)

Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετισθεί με πληθώρα νοσημάτων όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I (112), η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (113), το Βρογχικό Άσθμα (114), η Κροταφική Αρτηρίτιδα (115), η Οστεοπόρωση (116), η Πολλαπλή Σκλήρυνση (117)(118), η Αυτοάνοση Θυρεοειδίτιδα(119), τα καρδιαγγειακά νοσήματα (120)(121)(122) ο ΣΕΛ (123) (124) καθώς επίσης και με αιματολογικές κακοήθειες.(125)(126) Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία αναδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης ITP, όπως προκύπτει από μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον Αιγυπτιακό πληθυσμό.(126) Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης μελέτη που συσχετίζει το γονότυπο TT με αυξημένη επίπτωση HCV λοίμωξης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα μίας μεταανάλυσης σχετικά με τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1883832 με αυτοάνοσα νοσήματα ανέδειξε συσχέτιση αυτού με αυξημένη επίπτωση Πολλαπλή Σκλήρυνσης, ενώ δεν ανέδειξε συσχέτιση με την εκδήλωση Αυτοάνοσης Θυρεοειδίτιδας, Συστηματικής Σκλήρυνσης ή Βρογχικού άσθματος. Για τα υπόλοιπα νοσήματα τα δεδομένα δεν επαρκούν προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.(126)

## 4. ΤΟ ΜΟΡΙΟ CTLA4 & ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CTLA4/B7

### 4.1 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ CTLA4 .

Το μόριο CTLA4 (ή CD152) ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 34kDa. Η πρώτη αναφορά σε αυτή έγινε το 1987 από τους Brunet και συνεργάτες μέσω ανάλυσης cDNA βιβλιοθηκών από κυτταροτοξικά T- λεμφοκύτταρα, οι οποίοι την περιέγραψαν ως μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 233 αμινοξέα.(127) Δομικά αποτελείται από μία εξωκυττάρια περιοχή (V-like domain), μία διαμεμβρανική περιοχή και τέλος μία κυτταροπλασματική ουρά. Η ισομορφή του μορίου η οποία εδράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου υπόκειται σε διμερισμό, με τα δύο επιμέρους τμήματα του διμερούς να συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Αντίθετα, η διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης λειτουργεί ως μονομερές. Το ενδοκυττάριο τμήμα του CTLA4 ομοιάζει με αυτό του CD28 και κατά συνέπεια, δεν έχει ενδογενή καταλυτική δράση, ενώ διαθέτει ένα μοτίβο YxxM το οποίο κατόπιν φωσφορυλίωσης δύναται να προσδένει πρωτεΐνες που διαθέτουν SH2 (Src – homology 2) τμήμα, όπως για παράδειγμα η PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase).(128) Αναλυτικότερα, σε αντίθεση με το CD28 επί απουσίας φωσφορυλίωσης αλληλεπιδρά με την  $\mu 2$  υπομονάδα της κλαθρίνης AP2 η οποία καθιστά μία πρωτεΐνη – προσαρμογέα και ακολούθως αποθηκεύεται σε κυστίδια. Με την ενεργοποίηση του TCR το μόριο CTLA4 μεταφέρεται από τα ενδοκυττάρια αυτά κυστίδια στην κυτταρική επιφάνεια.(129) Αξίζει όμως να σημειωθεί πως ακόμη και στην περίπτωση αυτή ένα μικρό ποσοστό του μορίου εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Η διαρκής αυτή μετακίνηση του μορίου CTLA4 προς την κυτταρική επιφάνεια μέσω των κυστιδίων που είναι επικαλυμμένα με κλαθρίνη. Η επικρατέστερη θεωρία υποστηρίζει πως το κύτταρο δύναται να τροποποιεί την έκφραση του CTLA4 ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του TCR, γεγονός που καθιστά ένα άρτια ρυθμισμένο ανασταλτικό σήμα. Επιπλέον, πιθανά από μόνη της η έκφραση του CTLA4 να λειτουργεί ως ανασταλτικό σήμα, ανεξαρτήτως σύνδεσης αυτού με το συνδέτη.(130)



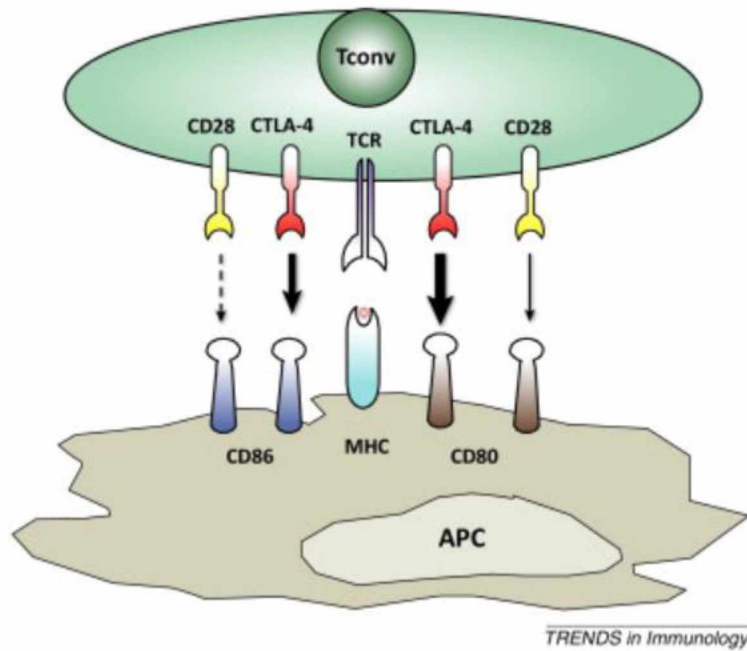
**Εικόνα 6:** Σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του CTLA4. Απεικονίζεται η κυτταροπλασματική ουρά του CTLA4 η οποία διαθέτει δύο υπολείμματα τυροσίνης (Y) στις θέσεις 201 και 208 καθώς και μία περιοχή πλούσια σε προλίνη (P). Η τυροσίνη στη θέση 201 (Y201) εμπεριέχεται στο μοτίβο YxxM, το οποίο μοτίβο στην μη φωσφορυλιωμένη μορφή του επιτρέπει τη σύνδεση του CTLA4 με την  $\mu 2$  υπομονάδα της κλαθρίνης AP2 και κατ' επέκταση την εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση του CTLA4, περιορίζοντας έτσι την έκφραση αυτού στην κυτταροπλασματική επιφάνεια. (από Alegre και συνεργάτες με τροποποιήσεις [133])



## 4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ CTLA4 ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CTLA4/B7.

Τα μόρια CD28 και CTLA4 ανήκουν στην οικογένεια των σχετιζόμενων με ανοσοσφαιρίνες κυτταρικών υποδοχέων, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για διάφορα τμήματα της διαμεσολαβούμενης από T λεμφοκύτταρα ανοσιακής απάντησης. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τα μόρια CD28, CTLA-4 και ICOS καθώς και άλλες πρωτεΐνες όπως οι PD-1, CD272 και TIGIT. Οι υποδοχείς αυτοί μπορεί να έχουν επαγωγικό (CD28, ICOS) ή ανασταλτικό ρόλο (CTLA4, PD-1, CD272 και TIGIT) στην λειτουργία του T λεμφοκυττάρου. (131)

Οι πρωτεΐνες CD28 και CTLA4, αποτελούν ομόλογους υποδοχείς που εκφράζονται από αμφότερα τα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, ενώ διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Οι δύο αυτοί υποδοχείς μοιράζονται κοινούς προσδέτες οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Το CD28 προσδέεται στο διμερές CD80 με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ό τι στο μονομερές CD86, συμβάλλοντας μαζί με σήματα από τον TCR στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, οι αλληλεπιδράσεις των συνδετών CD28 και CD86 με τον υποδοχέα CTLA4 συνεπάγεται την αναστολή της διαμεσολαβούμενης από T λεμφοκύτταρα ανοσιακής απάντησης. (132) Αναλυτικότερα, ο υποδοχέας CTLA4 αλληλεπιδρά με τους συνδέτες αυτούς με μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με το CD28, με τη σύνδεση CTLA4 – CD80 να καθιστά την πλέον ισχυρή και τη σύνδεση CD28 – CD86 αυτή με τη μικρότερη ισχύ. Βάσει των ανωτέρω εγείρεται η υποψία ανταγωνισμού μεταξύ CTLA4 και CD28, για τη σύνδεση με τους συνδέτες CD80 και CD86. (132) Οι αλληλεπιδράσεις αυτές θεωρείται ότι λαμβάνουν χώρα στη σύναψη μεταξύ των T λεμφοκυττάρων και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων όπου λόγω αυξημένη συγγένειας το CTLA4 «στρατολογεί» διαρκώς το CD80, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την αλληλεπίδραση του με το CD28 ασκώντας ουσιαστικά ανταγωνιστική δράση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.



**Εικόνα 7:** Απεικονίζονται οι υποδοχείς CTLA4 και CD28 στην επιφάνεια του T λεμφοκυττάρου οι οποίοι μοιράζονται κοινούς συνδέτες (CD80 και CD86) των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Το πάχος κάθε βέλους απεικονίζει την ένταση της σύνδεσης μεταξύ υποδοχέα και συνδέτη. [από Walker και Sansom με τροποποιήσεις (133)].

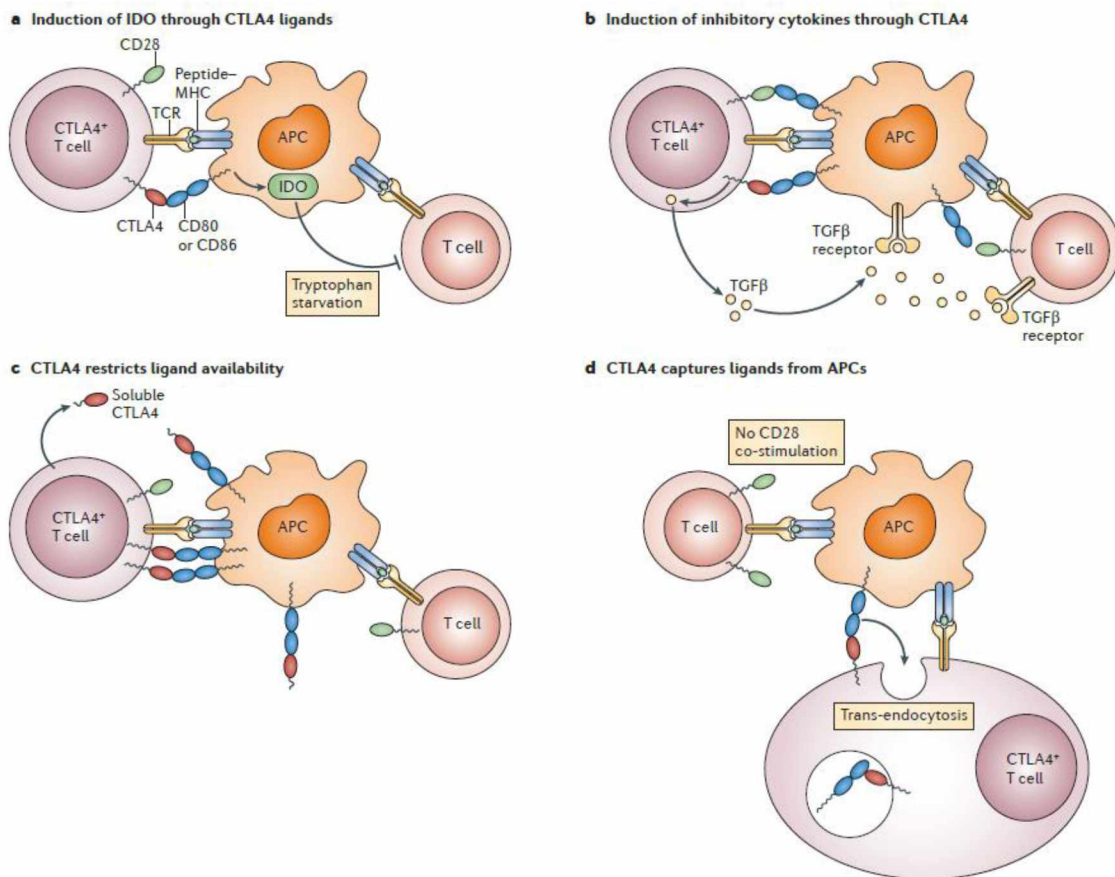
Τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των CD80 και CD86 είναι ευρέως γνωστά με βάση δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Ωστόσο, οι λειτουργικές διαφορές μεταξύ αυτών δεν είναι πλήρως κατανοητές, ενώ συχνά αναφέρονται μαζί ως B7 ή CD80/CD86. Αμφότεροι οι δύο αυτοί υποδοχείς εντοπίζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αν και παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης. Για παράδειγμα, το μόριο CD86 εκφράζεται κατά κανόνα στα Δενδριτικά κύτταρα, ενώ η έκφραση αυτού επάγεται στα πλαίσια φλεγμονής. Αντίθετα, η έκφραση του CD80 στα Δενδριτικά κύτταρα επάγεται σε δεύτερο χρόνο. Επιπλέον, τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, εκφράζουν CD86 και όχι CD80, ενώ κάποιες ομάδες T λεμφοκυττάρων μπορούν να εκφράζουν αμφότερα τα δύο μόρια υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Στα πλαίσια αυτά, καθίσταται σαφές πως οι διαφορές σε επίπεδο λειτουργικότητας αποτελούν αντικείμενο που χρήζει περαιτέρω έρευνας καθώς ο ρόλος αυτών στην ανοσιακή απάντηση είναι κομβικός. (132)(134)

#### 4.4 ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ CTLA4.

Όπως ήδη αναφέρθηκε σε αντίθεση με το CD28 που είναι ένας επιφανειακός υποδοχέας, το CTLA4 καθιστά κυρίως ένα ενδοκυττάριο μόριο καθώς το 90% αυτού ανευρίσκεται κυρίως σε ενδοκυττάρια κυστίδια. Πολυάριθμοι μοριακοί μηχανισμοί έχουν προταθεί σχετικά με την ανασταλτική δράση αυτού στα T λεμφοκύτταρα, ενώ οι μηχανισμοί αυτοί παραμένουν πεδίο διαρκούς έρευνας. Αναλυτικότερα, έχουν αναπτυχθεί υποθέσεις οι οποίες υποστηρίζουν την ανασταλτική δράση αυτού έναντι του CD28, το οποίο αποτελεί το κύριο μόριο που ασκεί επαγωγική δράση για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων.

Παρόμοια, μελέτες υποστηρίζουν πως το μόριο CTLA4 ασκεί ανασταλτική δράση στο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται μέσω του TCR. Παράδειγμα, αποτελεί η φωσφορυλίωση του YxxM μοτίβου που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική ουρά του CTLA4, γεγονός που συνεπάγεται τη σύνδεση της SH2-containing phosphatase (SHP2) με παρόμοιο τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η φωσφορυλίωση των τυροσινών στο σηματοδοτικό μονοπάτι του CD28.(134) Έτσι, η «στρατολόγηση» της SHP2 συνεπάγεται μείωση του επιπέδου της φωσφορυλίωσης τυροσινών σε διάφορα μόρια του συμπλέγματος του TCR και κατά συνέπεια επιβράδυνση της σηματοδότησης μέσω του TCR. Ωστόσο, στοιχεία που προέκυψαν μετέπειτα ανέδειξαν πως τόσο τα αρχικά αυτά ευρήματα, όσο και η υπόθεση περί διαταραχής της φωσφορυλίωσης του CD3z δεν κατόρθωσαν να γίνουν αποδεκτά μέσα από τις διάφορες ερευνητικές εργασίες που προέκυψαν.(134) Παρομοίως, κομβικός φαίνεται να είναι ο ρόλος του PI3K/akt μονοπατιού αν και τα έως τώρα στοιχεία παραμένουν αντικρουόμενα.(135)

Έτσι, παρά τη διαρκή έρευνα που διεξάγεται στο πεδίο αυτό, μόνο η αρχική υπόθεση περί ανταγωνισμού μεταξύ CTLA4 και CD28 ως προς την πρόσδεση αυτών στους συνδέτες CD80 και CD86 κατέχει αληθή υπόσταση με βάση τα επιστημονικά δεδομένα. Με τον τρόπο αυτό, οι μηχανισμοί με τους οποίους το μόριο CTLA4 εξασκεί τη δράση του, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, αυτοί που επηρεάζουν τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν το μόριο αυτό και αυτοί που επηρεάζουν άλλους κυτταρικούς τύπους.(136) Αν και ορισμένα στοιχεία εξακολουθούν να υποστηρίζουν την ενδογενή δράση αυτού μέσω ενός μονοπατιού το οποίο συνεπάγεται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, οι πλέον σημαντικοί μηχανισμοί θεωρούνται οι εξωγενείς μηχανισμοί και συνοψίζονται στην Εικόνα 8.



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση των εξωγενών μηχανισμών δράσης του CTLA4: a) Μέσω των CD80 και CD86 επάγει σήματα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της IDO (tryptophan-degrading enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase) και κατ' επέκταση την αναστολή των T λεμφοκυττάρων είτε στα πλαίσια της αποικοδόμησης της τρυπτοφάνης είτε λόγω συσσώρευσης μεταβολιτών, b) Επαγωγή ρυθμιστικών κυτταροκινών (όπως ο TGFβ), οι οποίες αναστέλλουν τα αντιγονοπαρουσιαστικά ή/και τα T λεμφοκύτταρα, c) Περιορισμός των διαθέσιμων συνδετών, γεγονός που προλαμβάνει την πρόσληψη επαγωγικού σήματος μέσω του CD28 από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, d) Η έκφραση του CTLA4 προκαλεί trans-ενδοκύττωση των συνδετών στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα γεγονός που μειώνει την ικανότητα διέγερσης αυτών και οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. [από Walker και Sansom με τροποποιήσεις (134)]

#### 4.5 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c.+49A/G (rs231775)

Το γονίδιο *CTLA4* το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα CTLA4 εντοπίζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (θέση 2q33.2) και αποτελείται από συνολικά 4 εξόνια. Πολυμορφισμοί του γονιδίου αυτού έχουν σχετισθεί με πληθώρα νοσημάτων και κατά κύριο λόγο με αυτοάνοσα νοσήματα και κακοήθειες.(137) Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός rs231775 ο οποίος εντοπίζεται στο εξόνιο 1 στη θέση +49 και συνεπάγεται αντικατάσταση μίας θρεονίνης από μία αλανίνη (p.T17A) σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή σχετίζεται με διαταραχή της γλυκοζυλίωσης, γεγονός που επηρεάζει τη μεταφορά της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και τα επίπεδα αυτής στην κυτταροπλασματική επιφάνεια. (138)

Δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία αναδεικνύουν πως ο γονότυπος GG σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων καθώς και αυξημένη παραγωγή του mRNA που κωδικοποιεί το CTLA4. Παράλληλα, πέραν των αυξημένων επιπέδων mRNA, ο γονότυπος GG έχει σχετισθεί και με αύξηση των επιπέδων της IL-2. Κλινικά το αλληλίο G σχετίζεται με την εκδήλωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου I (137)(139)(140) καθώς και με άλλα νοσήματα όπως ο ΣΕΛ(141) , η θυρεοειδίτιδα Hashimoto και η νόσος Addison(142), καθώς και η κοιλιοκάκη.(143)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο γονότυπος AA παρουσιάζει συσχέτιση με την εκδήλωση κοιλιοκάκης, σε αντίθεση με τα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα στα οποία το αλληλίο G είναι αυτό που σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου. Η διαπίστωση αυτή γεννά ερωτήματα σε σχέση με την κλινική σημασία των αλληλίων αυτών, καθώς πιθανά η επίδραση αυτών στον φαινότυπο της νόσου να επηρεάζεται και από άλλους γειτονικούς και μη πολυμορφισμούς. (144), (144).

---

*ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*

---

## 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η CVID αποτελεί ένα ετερογενές νόσημα, καθώς πέραν της αυξημένης ευπάθειας σε λοιμώξεις δύναται να χαρακτηρίζεται επιπλέον από αυτοάνοσες εκδηλώσεις, νεοπλάσματα, κοκκιωμάτωση και λεμφοϋπερπλασία. Σχετικά με την αιτιοπαθογένεια της νόσου, αυτή δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και παραμένει ένα διαρκές πεδίο έρευνας. Έως τώρα έχει φανεί πως μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μόρια που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων καθώς και στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Β και Τ λεμφοκυττάρων πιθανά να αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως κατανοητή η μεγάλη κλινική ετερογένεια αυτής, γεγονός που γεννά ερωτήματα σε σχέση με το ρόλο λειτουργικών πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια που εμπλέκονται στο σύστημα τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας. Βάσει των ανωτέρω, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση λειτουργικών πολυμορφισμών στα γονίδια *MBL2*, *TNFRSF5* (CD40) και *CTLA4* με τον κλινικό φαινότυπο της νόσου.

## **2. ΥΛΙΚΟ**

### **2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ**

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 82 ασθενείς με CVID (άνδρες/γυναίκες: 37/45, μέση ηλικία:33,2 έτη, ηλικιακό εύρος: 4 έως 70 ετών). Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με την πλειοψηφία των ασθενών να παρακολουθούνται στο Ειδικό Ιατρείο Ανοσοανεπαρκειών του Π.Γ.Ν. Λάρισας. Μικρή μερίδα ασθενών παρακολουθείται σε συνεργαζόμενα ιατρεία άλλων νοσοκομείων της χώρας. Τέλος, η διάγνωση της CVID τέθηκε βάσει των κριτηρίων της ESID (European Society of Immunodeficiencies) όπως έχει ήδη αναφερθεί στο γενικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



**Πίνακας 1:** Δημογραφικά στοιχεία και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

	<b>CVID</b>
<b>Αριθμός ασθενών</b>	82
<b>Φύλο (άνδρες/γυναίκες)</b>	37/45
<b>Ηλικία (μέση τιμή, εύρος )</b>	33,2 έτη, 4-70 έτη
<b>Σπληνομεγαλία (αρ. , %)</b>	43 (52,4)
<b>Ηπατομεγαλία (αρ. , %)</b>	21 (26,3)
<b>Λεμφοϋπερπλασία (αρ. , %)</b>	49 (59,7)
<b>Λεμφαδενοπάθεια (αρ. , %)</b>	36 (43,9)
<b>Λοιμώξεις ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος (αρ. , %)</b>	68 (82,9%)
<b>Λοιμώξεις κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος (αρ. , %)</b>	55 (67%)
<b>Λοιμώξεις γαστρεντερικού συστήματος (αρ. , %)</b>	26 (31,7%)
<b>Λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος (αρ. , %)</b>	23 (28%)
<b>Λοιμώξεις κεντρικού νευρικού συστήματος (αρ. , %)</b>	3 (3,7%)
<b>Λοιμώξεις δέρματος (αρ. , %)</b>	23 (28%)
<b>Αυτοανοσία (αρ. , %)</b>	47 (57,3%)
<b>Θυρεοειδική νόσος (αρ. , %)</b>	22 (26,8%)
<b>ΑΝΑ ή/και ΙΤΡ ή/και Σύνδρομο Evans (αρ. , %)</b>	17 (20,7%)
<b>Ψωρίαση (αρ. , %)</b>	3 (3,7%)
<b>Κοκκιομάτωση (αρ. , %)</b>	10 (12,2%)
<b>Αλλεργικές αντιδράσεις (αρ. , %)</b>	23 (28%)
<b>Νεοπλάσματα (αρ. , %)</b>	23 (28%)
<b>Υπερσπληνισμός (αρ. , %)</b>	15 (18,3%)
<b>Χρόνιες επιπλοκές λόγω λοιμώξεων (αρ. , %)</b>	48 (58,5%)
<b>Βρογχεκτασίες (αρ. , %)</b>	24 (29,3%)
<b>ΧΑΠ (αρ. , %)</b>	14 (17,1%)
<b>Χρόνια παραρρινοκολπίτιδα με ή χωρίς ρινικούς πολύποδες (αρ. , %)</b>	15 (18,3%)
<b>Ηπατικά νοσήματα* (αρ. , %)</b>	10 (12,2%)
<b>Φλεγμονώδης νόσος εντέρου (αρ. , %)</b>	22 (26%)

\*Περιλαμβάνονται τα εξής: οζώδης αναγεννητική υπερπλασία (nodular regenerative hyperplasia, NRH), πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα, πύλαια υπέρταση και κίρρωση.

## 2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την μοριακή ανάλυση των κλινικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια, τα χαρακτηριστικά των οποίων καταγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 2:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A.
Αγαρόζη	Ultra pure™ Agarose	16500-500	Invitrogen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10mg/dl	15585 - 011	BioRad
Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl <sub>2</sub>	100Mm MgCl <sub>2</sub>	P041311-M	BIORON
Διάλυμα TBE	UltraPure™ 10X TBE Buffer	15581-044	Gibco
Μάρτυρας DNA	100 bp plus DNA Ladder	304-105	GeneON
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dATP 100mM dCTP 100mM dGTP 100mM dTTP	P/N 55082 P/N 55083 P/N 55084 P/N 55084	Invitrogen
Περιοριστική ενδονουκλεάση NcoI	NcoI Restriction Enzyme	R0193	New England BioLabs
Πολυμεράση Taq	DFS-Taq DNA polymerase	101005	BIORON
Χρωστική	Formaldehyde Load Dye	8550G	Ambion
Kit εκχύλισης DNA	PureLink® Genomic DNA Kit	K1820-01	Invitrogen
Kit καθαρισμού PCR προϊόντος	PureLink® PCR Purification Kit	K3100-01	Invitrogen

### 3. ΜΕΘΟΔΟΣ

#### 3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Η απομόνωση του DNA από δείγματα περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των στηλών απομόνωσης της Invitrogen (PureLink® Genomic DNA Kit). Η βασική αρχή του ανωτέρω πρωτοκόλλου στηρίζεται στην εκλεκτική δέσμευση του DNA σε ειδική μεμβράνη που φέρει διοξείδιο του πυριτίου και σε ελεγχόμενες συνθήκες όσον αφορά το pH και την παρουσία αλάτων. Με την ανωτέρω τεχνική απομακρύνονται άλλου είδους μόρια όπως πρωτεΐνες, RNA και ένζυμα. Το kit απομόνωσης αποτελείται συνολικά από τέσσερα είδη διαλυμάτων, με τη σύσταση αυτών να μην γνωστοποιείται στο φύλλο οδηγιών. Ακολουθώντας αναφέρεται η διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA όπως αυτή αναγράφεται στο φύλλο οδηγιών του κατασκευαστή. Σε σωληνάρια τύπου Eppendorf τελικού όγκου 1,5 ml προστίθενται 200μl ολικού αίματος από ειδικό φιαλίδιο το οποίο περιέχει αντιπηκτικό K<sub>3</sub>EDTA. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μL πρωτεΐνάσης K, ο ρόλος της οποίας έγκειται στη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων, καθώς και 20 μL RNAασης η προσθήκη της οποίας συνεπάγεται την απομάκρυνση του υπάρχοντος RNA. Κατόπιν, το δείγμα αναδύεται και επωάζεται για συνολικά 2 λεπτά, ενώ ακολουθεί η προσθήκη 200μL διαλύματος PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer, το οποίο ενισχύει τη δράση της πρωτεΐνάσης K και συνεπάγεται τη λύση των κυττάρων. Με την προσθήκη του διαλύματος αυτού και αφού προηγηθεί ανάδευση, το δείγμα στη συνέχεια επωάζεται για συνολικά 25 λεπτά σε θερμοκρασία 55 °C με τη χρήση υδατόλουτρου. Με το πέρας της διαδικασίας αυτής, στο διάλυμα προστίθενται 200μL αιθανόλης 96-100% και κατόπιν ανάδευσης το τελικό διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλη στήλη (PureLink® Spin Column). Ο συνδυασμός αιθανόλης και διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer) συνεπάγεται καλύτερη πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη του διοξειδίου του πυριτίου (silica gel). Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 10.000 g για 1 λεπτό, απομάκρυνση του υπερκειμένου και ακολούθως πλύσεις με τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 ως εξής: αρχικά προσθήκη 500μL Wash Buffer 1 και φυγοκέντρηση σε 10.000 g για 1 λεπτό με απομάκρυνση του υποκειμένου και ακολούθως προσθήκη 500μL Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα της φυγοκέντρου για συνολικά 3 λεπτά, με στόχο την τελική απομάκρυνση παραπροϊόντων. Τέλος, η στήλη τοποθετείται σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf με τελικό όγκο 1,5 ml με προσθήκη επιπλέον 100μL διαλύματος PureLink Genomic Elution Buffer. Αφού προηγηθεί επώαση ενός λεπτού ακολουθεί φυγοκέντρηση για συνολικά 1 λεπτό στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα. Η στήλη απομακρύνεται και το τελικό διάλυμα DNA με βάση τις πληροφορίες που δίνονται από τον κατασκευαστή, έχει συγκέντρωση περίπου 50-200ng/μl.

### 3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

#### 3.2.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Για την ενίσχυση των προς μελέτη τμημάτων DNA εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Αναλυτικότερα, ενισχύθηκαν τμήματα των εξής γονιδίων: *MBL2*, *TNFRSF5* (CD40), *CTLA4*.

**Πίνακας 3:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή μελέτη των τμημάτων των γονιδίων *MBL2*, *TNFRSF5* και *CTLA4*.

ΠΕΡΙΟΧΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ
ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ <i>MBL2</i>	Πρόσθιος 5' GAAAATGCTTACCCAGACAAGCCTGT 3' Οπίσθιος 5' TCATCTGTGCCTAGACACCTGGC 3'
ΕΞΟΝΙΟ 1 <i>MBL2</i>	Πρόσθιος 5' CATCAACGGCTTCCCAGGGCAAGATGGG3' Οπίσθιος 5' GTCTCCTCATATCCCCAGGC 3'
ΕΞΟΝΙΟ 1 <i>TNFRSF5</i>	Πρόσθιος 5' ATAGGTGGACCGCGATTGGT 3' Οπίσθιος 5' -TCCCAACTCCCGTCTGGT- 3'
ΕΞΟΝΙΟ 1 <i>CTLA4</i>	Πρόσθιος 5' TTCAAGTGCCTTCTGTGTGTG 3' Οπίσθιος 5' AATCACTGCCTTTGACTGCT 3'

Σε καθεμιά από τις PCR χρησιμοποιήθηκαν 100-200 ng γενωμικού DNA, 210 μmol/L κάθε τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου, 1,02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1,52 mmol/L MgCl<sub>2</sub> και 0,04 U/μL πολυμεράση Taq. Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR για κάθε ένα από τα παραπάνω τμήματα των γονιδίων. Αναλυτικότερα, αναγράφονται οι θερμοκρασίες, η διάρκεια των σταδίων της αντίδρασης καθώς και ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν.

**Πίνακας 4:** Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του υποκινητή και του εξονίου 1 του γονιδίου *MBL2*.

ΠΕΡΙΟΧΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
<i>MBL2</i> ΕΞΟΝΙΟ 1 & ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ	Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 2 min, αποδιάταξη: 94 °C για 30 sec, υβριδισμός: 64 °C για 20 sec, επέκταση: 72 °C για 30 sec (35 κύκλοι), τελική επέκταση: 72 °C για 10 min

**Πίνακας 5:** Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του εξονίου 1 του γονιδίου *TNFRSF5* (*CD40*).

ΕΞΟΝΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
<i>TNFRSF5</i> 1	Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 10 min, αποδιάταξη: 94 °C για 30 sec, υβριδισμός: 58 °C για 30 sec, επέκταση: 72 °C για 30 sec (32 κύκλοι), τελική επέκταση: 72 °C για 10 min

**Πίνακας 6:** Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του εξονίου 1 του γονιδίου *CTLA4*.

ΕΞΟΝΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
<i>CTLA4</i> 1	Αρχική αποδιάταξη: 94 °C για 2 min, αποδιάταξη: 94 °C για 30 sec, υβριδισμός: 59 °C για 30 sec, επέκταση: 72 °C για 1 min (32 κύκλοι), τελική επέκταση: 72 °C για 5 min

Για τις ανωτέρω αντιδράσεις έγινε χρήση του αυτόματου κυκλικού μετατροπέα θερμοκρασίας Applied Biosystems Veriti 96 well thermal cycler (California, USA). Ο μετατροπέας αυτός παρέχει τη δυνατότητα υποδοχής σωληναρίων PCR και δύναται να εναλλάσσει θερμοκρασίες μεταξύ +4 °C έως και +99 °C, με τη χρήση βασικού ενισχυτή ηλεκτρικού ρεύματος. Βασικό πλεονέκτημα της εν λόγω μονάδας, αποτελεί το θερμαινόμενο κάλυμμα αυτού, το οποίο συγχρονίζεται με τη βάση γεγονός που συνεπάγεται αποφυγή τυχόν εξάτμισης των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες.

Με σκοπό τον έλεγχο της καθαρότητας των δειγμάτων και την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας στο οποίο δεν τέθηκε γενετικό υλικό αλλά dH<sub>2</sub>O. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% και η απεικόνιση αυτών πραγματοποιήθηκε μέσω έκθεσης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

### 3.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Με σκοπό τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X. Προκειμένου να εντοπιστούν οι ζώνες DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορεύεται (5  $\mu$ L δείγματος, 1  $\mu$ L χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Στη συνέχεια, κάθε μείγμα μεταφέρεται σε μία από τις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού «Gel Capture» (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή αρχείου bitmap.

### **3.2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ**

Για τη μελέτη του πρώτου εξονίου του γονιδίου *CTLA4* πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) κάθε δείγματος, κατόπιν καθαρισμού των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των στηλών καθαρισμού της Invitrogen (PureLink PCR Purification Kit). Βάση της μεθόδου αποτελεί η δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), γεγονός που συνεπάγεται την απομάκρυνση των διαφόρων προσμίξεων, όπως για παράδειγμα εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων. Το kit χρησιμοποιεί τρεις τύπους διαλυμάτων. Στη συνέχεια περιγράφεται το πρωτόκολλο του συστήματος της Invitrogen όπως αυτό αναλύεται στο φύλλο οδηγιών που προορίζεται για το χρήστη. Αρχικά, γίνεται προσθήκη 4  $\mu$ L διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε έναν όγκο προϊόντος PCR και ο τελικός όγκος μεταφέρεται σε ειδικές στήλες (Spin columns/Purelink PCR Purification Kit) με στόχο τη δέσμευση του DNA στην ειδική μεμβράνη που περιέχεται σε αυτές. Αναλυτικότερα, σε 25  $\mu$ L προϊόντος PCR προστίθενται 100  $\mu$ L Binding Buffer B2 και το τελικό διάλυμα φυγοκεντρείται στα 10.000 g για 1 λεπτό. Ακολούθως, απομακρύνεται το υποκείμενο και γίνεται πλύση της στήλης με προσθήκη 650  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer) και φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 1 λεπτό. Εφόσον απομακρυνθεί το διάλυμα φυγοκέντρωσης, πραγματοποιείται μία επιπλέον φυγοκέντρωση στη μέγιστη δυνατή ταχύτητας (17.000 g) για τρία λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα αιθανόλης και με σκοπό την αποφυγή αναστολής της πολυμεράσης από αυτή κατά τη διαδικασία της αλληλούχισης. Στο τελικό στάδιο η στήλη μεταφέρεται σε ειδικό

σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml και ακολούθως προστίθενται 30  $\mu$ L διαλύματος έκλουσης. Ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 10.000 g για ένα λεπτό. Τα καθαρισμένα προϊόντα ηλεκτροφορούνται με σκοπό τον ποσοτικό και ποιοτικό τους έλεγχο. Τέλος, αποθηκεύονται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

### 3.2.4 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA

Η μελέτη των SNPs Arg52Cys, Gly54Arg και Gly57Glu στο γονίδιο *MBL2* πραγματοποιήθηκε κατόπιν πέψης των PCR προϊόντων του εξωνίου 1 με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Για την πέψη 6  $\mu$ L PCR προϊόντος, χρησιμοποιήθηκαν 0,32 U/ $\mu$ L καθενός από τα παρακάτω περιοριστικά ένζυμα: Mwo I, Ban I και Mbo II, παρουσία των ρυθμιστικών διαλυμάτων NEbuffer 3 και NEbuffer αντίστοιχα. Τα παραπάνω ένζυμα και ρυθμιστικά διαλύματα παρέχονται από τον κατασκευαστή New England Biolabs, ενώ το τελικό διάλυμα που προκύπτει έχει όγκο 15  $\mu$ L. Ακολούθως, το τελικό διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για συνολικά 8 ώρες. Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται τα εν λόγω ένζυμα καθώς και οι αλληλουχίες δίκλωνου DNA που κατατέμουν.

**Πίνακας 7:** Ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πολυμορφισμών Arg52Cys (rs5030737), Gly54Arg (rs1800450) και Gly57Glu (rs1800451) στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου *MBL2* και η αλληλουχία που αναγνωρίζουν. Όπου R: A ή G, Y: C ή T, N: A, G, C ή T.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ	ENZYMO	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
Arg52Cys (rs5030737)	Mwo I	5'... GCNNNNN $\nabla$ NNGC... 3' 3'... CGNN $\blacktriangle$ NNNNNCG... 5'
Gly54Arg (rs1800450)	Ban I	5'... G $\nabla$ GYRCC... 3' 3'... CCRYG $\blacktriangle$ G... 5'
Gly57Glu (rs1800451)	Mbo II	5'... GAAGA (N) $\nabla$ <sub>8</sub> ... 3' 3'... CTTCT (N) $\blacktriangle$ <sub>7</sub> ... 5'

Τα προϊόντα της πέψης και στις τρεις παραπάνω περιπτώσεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 3%. Πιο αναλυτικά επί απουσίας του SNP Arg52Cys (wild type), ανιχνεύονται δύο δέσμες 109 και 25bp μετά από την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης.

Αντίθετα, επί παρουσίας της μεταλλαγής σε ομοζυγωτία προκύπτει μία δέσμη 134bp, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρεις δέσμες 134bp, 109bp και 25bp.

Σχετικά με την παραλλαγή στο κωδικίο 54 (Gly54Arg) κατόπιν ηλεκτροφόρησης και απουσία της εν λόγω παραλλαγής προκύπτουν δύο δέσμες μήκους 99 και 35 bp, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας δεν γίνεται κατάτμηση του αρχικού προϊόντος PCR και κατά συνέπεια ανιχνεύεται μία μόνο δέσμη 134 bp. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανιχνεύονται τρεις δέσμες 134, 99 και 35 bp. Τέλος, σχετικά με την παραλλαγή Gly57Glu, επί απουσίας αυτής δεν γίνεται κατάτμηση του αρχικού προϊόντος PCR και κατά συνέπεια προκύπτει μία μόνο δέσμη 134 bp. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας για την παραλλαγή Gly57Glu δημιουργείται θέση κατάτμησης και προκύπτουν δύο δέσμες 78 και 56 bp, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρεις θέσεις 134, 78 και 56 bp. Να σημειωθεί πως για κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες η επιβεβαίωση των οποίων έγινε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

Για τον πολυμορφισμό στη θέση -221 του υποκινητή χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Btg I. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει και τέμνει φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Για την πέψη 6 μL PCR προϊόντος χρησιμοποιήθηκαν 0,32 U/ μL ενζύμου παρουσία NEBuffer και 10XB SA (New England Biolabs). Η χρήση της πρωτεΐνης BSA συμβάλει στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ενζύμου στις διάφορες επιφάνειες (π.χ. ρύγχη πιπετών) καθώς και στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών της αντίδρασης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση για συνολικά 8 ώρες σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Σε περίπτωση απουσίας της εν λόγω παραλλαγής δεν προκύπτει θέση κατάτμησης και κατά συνέπεια παρατηρείται μία μόνο δέσμη 410 bp, ενώ με περίπτωση ομοζυγωτίας για την εν λόγω παραλλαγή προκύπτει μια θέση κατάτμησης και κατόπιν ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της πέψης δύο δέσμες 352 και 58 bp. Τέλος, σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν συνολικά τρεις δέσμες 410, 352 και 58 bp.

**Πίνακας 8:** Ένζυμο BtgI που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs7096206.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ	ENZYMΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
-221 G>C (rs7096206)	BtgI	5'... C <sup>▼</sup> CRYGG...3' 3'... GGYR <sup>▲</sup> C...5'

Για τη μοριακή μελέτη του πολυμορφισμού rs1883832 στο γονίδιο *TNFRSF5* πραγματοποιήθηκε πέψη των PCR προϊόντων με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου NcoI. Για την πέψη 6 μL PCR προϊόντος, χρησιμοποιήθηκαν 0,32 U/μL περιοριστικού ενζύμου παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer3 του κατασκευαστή New England



Biolabs. Στη συνέχεια το δείγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C για συνολικά 8 ώρες. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η αλληλουχία του δίκλωνου DNA που κατατέμνει το περιοριστικό ένζυμο NcoI.

**Πίνακας 9:** Ένζυμο NcoI που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1883832.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ	ENZYMΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
CD40 -1C>T (rs1883832)	NcoI	5'...C <sup>+</sup> C A T G G...3' 3'...G G T A C <sup>+</sup> C...5'

Ακολούθως, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 3%. Παρουσία του πολυμορφισμού σε ομοζυγωτία (γονότυπος TT) δεν υπάρχει θέση κατάτμησης και κατά συνέπεια κατόπιν ηλεκτροφόρησης προκύπτει μία μόνο μια δέσμη 217 bp η οποία πρακτικά αντιστοιχεί στο αρχικό προϊόν της PCR. Απουσία του πολυμορφισμού, δηλαδή σε γονότυπο CC (wild type) και καθώς δημιουργείται θέση κατάτμησης για το περιοριστικό ένζυμο NcoI, προκύπτουν δύο δέσμες 127 και 90 bp από την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης. Κατά συνέπεια, σε περίπτωση ετεροζυγωτίας (γονότυπος CT) ανιχνεύονται τρεις δέσμες 217, 127 και 90 bp. Τέλος, να σημειωθεί πως όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση θετικού μάρτυρα ο οποίος φέρει την παραλλαγή σε ετεροζυγωτία. Η επιβεβαίωση του εν λόγω γονοτύπου έγινε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

### 3.2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ (SEQUENCING)

Για τη μοριακή μελέτη του πρώτου εξονίου του γονιδίου του *CTLA4* και την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs231775 (c. +49 A/G, p.T17A) πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων, με τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit) στο γενετικό αναλυτή ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη συσχέτιση των μεταβλητών, δηλαδή για τη συσχέτιση των γενετικών παραλλαγών με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία  $\chi^2$  για ποιοτικές μεταβλητές. Σημαντική θεωρήθηκε η απόκλιση  $p < 0,05$ . Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics 28.0.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

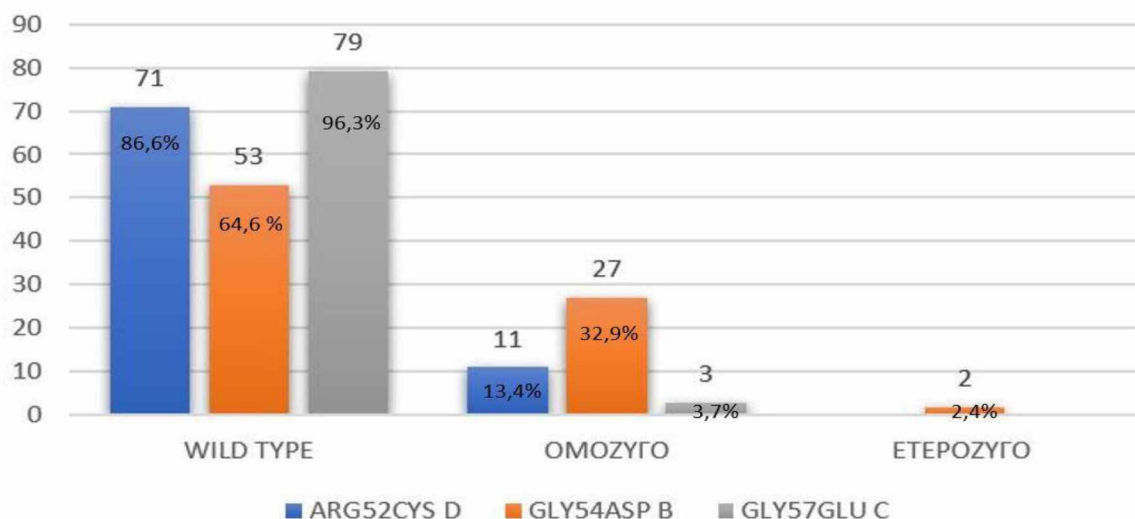
##### 4.1 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MBL2*.

Ακολούθως του καθορισμού των αλληλίων D, B και C για πρώτη φορά σε Έλληνες ασθενείς με CVID, διερευνήθηκε η συχνότητα αυτών και η συσχέτιση με τον κλινικό φαινότυπο των ασθενών. Η συχνότητα των αλληλίων D, B και C στο σύνολο των 82 ασθενών με CVID ήταν 13,4 , 29 και 3% αντίστοιχα.

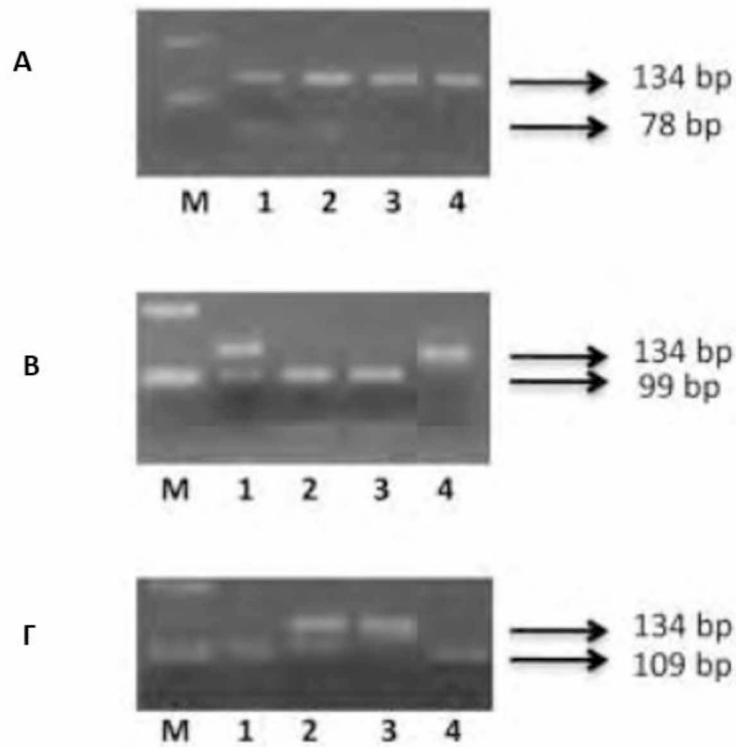
**Πίνακας 10:** Συχνότητα εμφάνισης αλληλίων σε ασθενείς με CVID.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ CVID	
<b><i>MBL2</i> ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΙΩΝ</b>	
<b>ARG52CYS D ΑΛΛΗΛΙΟ (ΑΡ. , %)</b>	11 (13,4%)
<b>GLY54ASP B ΑΛΛΗΛΙΟ (ΑΡ. , %)</b>	29 (35,4%)
<b>GLY57GLU C ΑΛΛΗΛΙΟ (ΑΡ. , %)</b>	3 (3,7%)

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας  $\chi^2$  αναδείχθηκε πως η παρουσία του B ( $p=0,029$ ) και C ( $p=0,022$ ) αλληλίου σχετίζεται με την εκδήλωση αυτοανοσίας.



**Γράφημα 1:** Απεικονίζεται η συχνότητα των αλληλίων B (Gly54Asp), C (Gly57Glu), D (Arg52Cys).

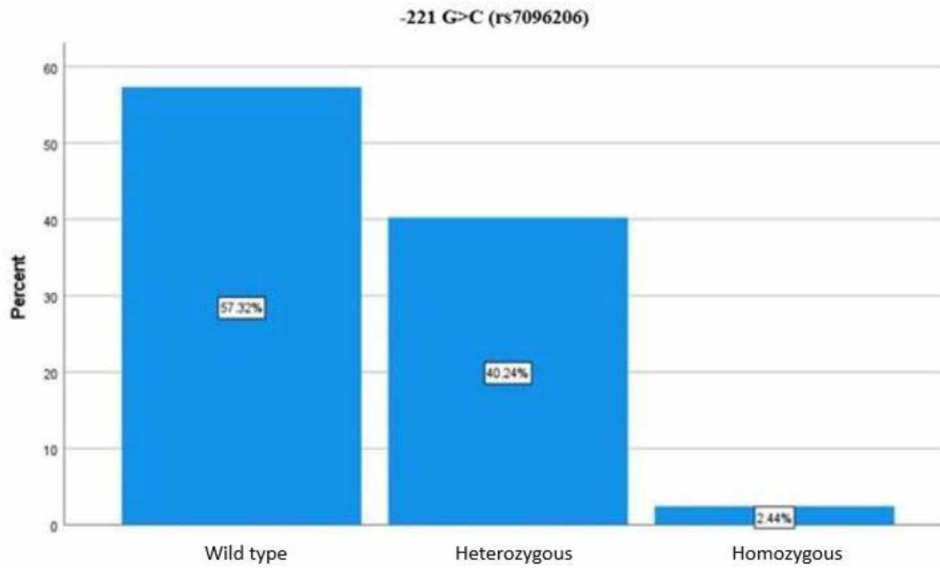


**Εικόνα 9:** **A)** PCR-RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικό 57 (Gly57Glu), απεικονίζονται κατά σειρά ο μάρτυρας, 1 και 2: ετερόζυγα δείγματα, 3 και 4: δείγματα χωρίς την παρουσία της μετάλλαξης (wild type), **B)** PCR-RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικό 54 (Gly54Asp), απεικονίζονται κατά σειρά ο μάρτυρας, 1: ετερόζυγο δείγμα, 2 και 3: χωρίς την παρουσία της μετάλλαξης (wild type), 4: ομόζυγο δείγμα για τη μετάλλαξη Gly54Asp, **Γ)** PCR-RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικό 52 (Arg52Cys), απεικονίζονται κατά σειρά ο μάρτυρας, 1 και 4: απουσία μετάλλαξης (wild type), δείγμα 2: ετερόζυγο δείγμα, 3: ομόζυγο δείγμα για τη μετάλλαξη Arg52Cys.

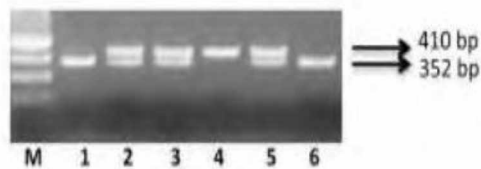
Όσον αφορά τον πολυμορφισμό -221 G>C (rs7096206) από τους 82 ασθενείς που αναλύθηκαν γενετικά, βρέθηκαν 47 ομόζυγοι για το γονότυπο GG (wild type), 2 ομόζυγοι για γονότυπο CC και 33 ετερόζυγοι, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 11:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων σε ασθενείς με CVID.

<b>-221 G&gt;C (RS7096206)</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CVID</b>
<b>G/G WILD TYPE</b>	47 (57,3%)
<b>G/C</b>	33 (40,2%)
<b>C/C</b>	2 (2,4%)



**Γράφημα 2:** Απεικόνιση συχνότητας γονοτύπων για τον πολυμορφισμό -221 G>C (rs7096206).



**Εικόνα 10:** Μελέτη του πολυμορφισμού -221 G>C (rs7096206). Απεικονίζονται κατά σειρά: M, μάρτυρας. Δείγματα 1 και 6: ομόζυγα για τον πολυμορφισμό (γονότυπος CC). Δείγματα 2, 3 και 5: ετερόζυγα (γονότυπος GC). Δείγμα 4: απουσία του πολυμορφισμού (γονότυπος GG, wild type).

Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων με τη δοκιμασία  $\chi^2$  δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p > 0,05$ ), που να συσχετίζουν τον πολυμορφισμό -221 G>C (rs7096206) με τον κλινικό φαινότυπο της νόσου.

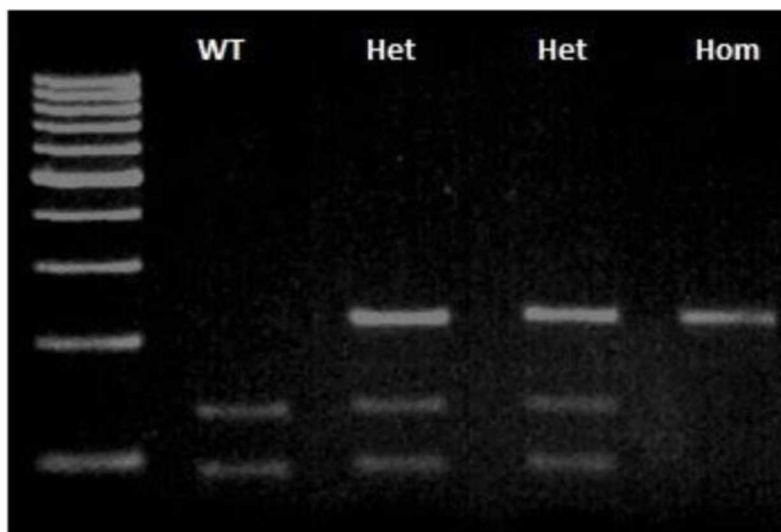
#### 4.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ CD40 -1C>T (rs1883832)

Από τους συνολικά 82 ασθενείς με CVID βρέθηκαν 8 ομοζυγώτες με γονότυπο TT, 37 ετεροζυγώτες με γονότυπο CT και 37 ομόζυγοι με γονότυπο CC (wild type), όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

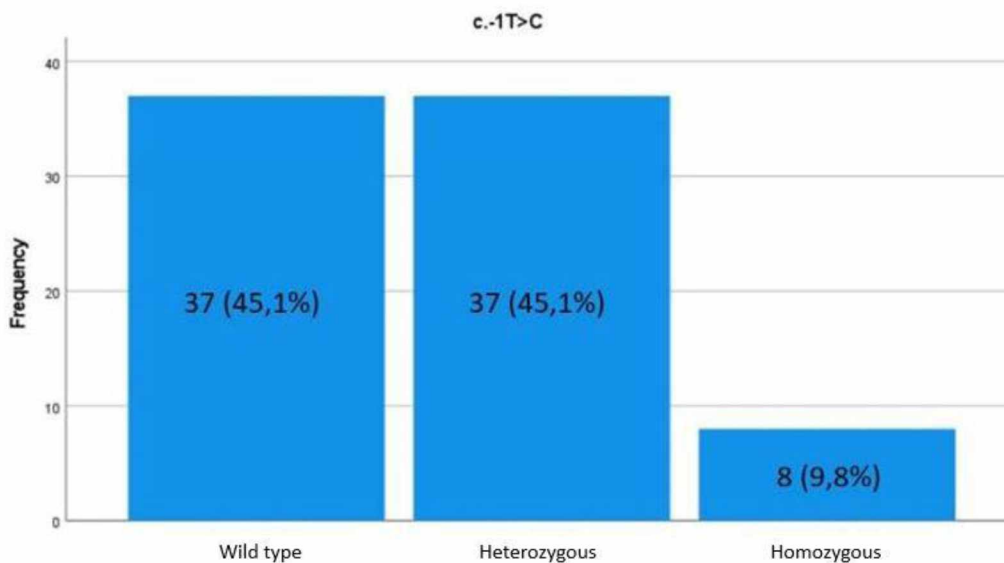
**Πίνακας 12:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων σε ασθενείς με CVID.

CD40 -1C>T (RS1883832)	ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CVID
C/C WILD TYPE	37 (45,1%)
C/T	37 (45,1%)
T/T	8 (9,8%)

Κατόπιν ανάλυσης με τη χρήση της δοκιμασίας  $\chi^2$  αναδείχθηκε πως η παρουσία του πολυμορφισμού CD40 -1C>T (rs1883832) σε ασθενείς με CVID σχετίζεται με την εκδήλωση ψωρίασης ( $p=0,028$ ) και ατοπίας – αλλεργικών αντιδράσεων ( $p=0,008$ ).



**Εικόνα 11:** Μελέτη του πολυμορφισμού CD40 -1C>T (rs1883832). Απεικονίζονται κατά σειρά: ο μάρτυρας, και οι γονότυποι C/C (wild type), C/T (ετερόζυγο δείγμα), TT (ομόζυγο δείγμα).



**Γράφημα 3:** Απεικόνιση συχνότητας γονοτύπων για τον πολυμορφισμό CD40 -1C>T (rs1883832).

#### 4.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs231775 (c. +49 A/G, p.T17A)

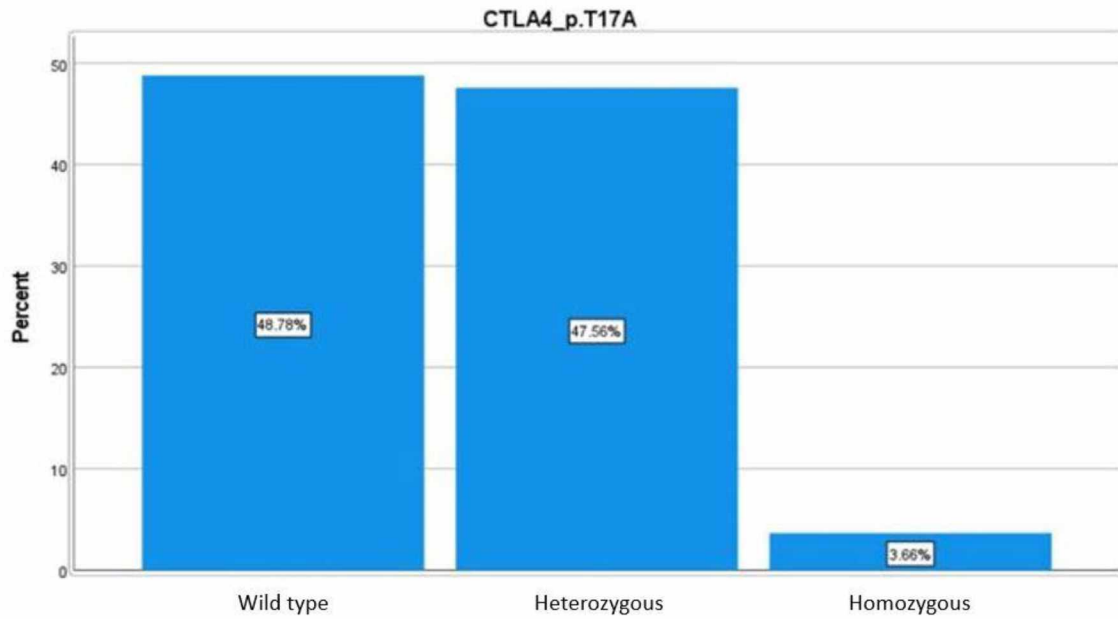
Από το σύνολο των 82 ασθενών που μελετήθηκαν 40 ήταν ομοζυγώτες για τον γονότυπο AA (wild type), 39 ετεροζυγώτες AG και 3 ομοζυγώτες για το γονότυπο GG, όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 13:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων σε ασθενείς με CVID.

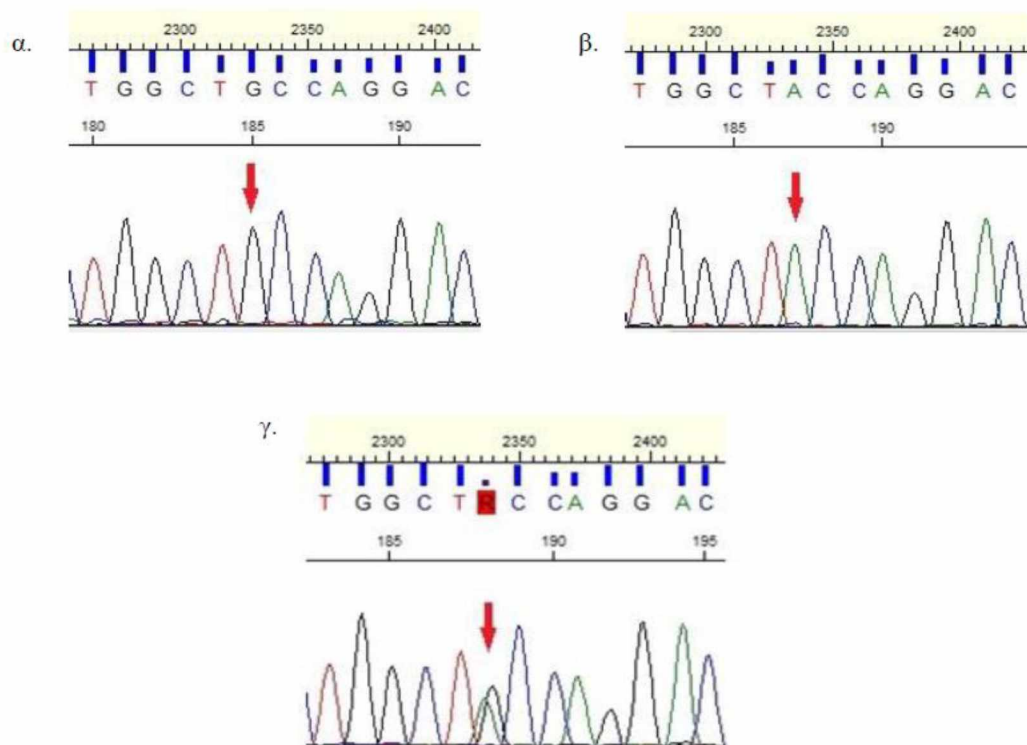
RS231775 (C. +49 A/G, P.T17A)	ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CVID
A/A WILD TYPE	40 (48,8%)
A/G	39 (3,8%)
G/G	3 (3,8%)

Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης με τη χρήση της δοκιμασίας  $\chi^2$  αναδείχθηκε πως η παρουσία του πολυμορφισμού αυτού σχετίζεται με την εκδήλωση λεμφοϋπερπλασίας (p.0,034) του τύπου ηπατομεγαλίας (p.0,014) και σπληνομεγαλίας (p.0,09), καθώς και με την εκδήλωση ηπατικής νόσου (πλην της NRH, p.0,039) και υπερσπληνισμού (p.0,034).





**Γράφημα 4:** Απεικόνιση συχνότητας γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs231775 (c. +49 A/G, p.T17A).



**Εικόνα 12:** Αποτέλεσμα αλληλούχησης κατά Sanger για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs231775 (c. +49 A/G, p.T17A). α) Δείγμα ομόζυγο (G/G), β) Δείγμα wild type (A/A), γ) Δείγμα ετερόζυγο (G/A).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναλύθηκαν για πρώτη φορά σε Έλληνες ασθενείς με COVID πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2*. Αναλυτικότερα, αναλύθηκε ένας πολυμορφισμός στον υποκινητή του γονιδίου (-221) και τρεις πολυμορφισμοί στην περιοχή του πρώτου εξονίου ένα (κωδικία 52, 54 και 56). Από την εν λόγω ανάλυση αναδείχθηκε πως η παρουσία του αλληλίου B και C σχετίζεται με την εκδήλωση αυτοανοσίας χωρίς ωστόσο να αναδειχθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Από τη διεθνή βιβλιογραφία και με βάση τα αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής μελέτης, η μελέτη των εν λόγω πολυμορφισμών σε μία ομάδα 94 ασθενών με COVID από διαφορετικά κέντρα ανέδειξε πως η παρουσία γονοτύπων που σχετίζονται με μειωμένα επίπεδα MBL φαίνεται να παρουσιάζει συσχέτιση με την ανάπτυξη βρογχεκτασιών, ενώ οι γονότυποι σχετιζόμενοι με απουσία MBL σχετίζονται με την παρουσία πνευμονικής ίνωσης. (145)

Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων της ομάδας που μελετήσαμε σε σχέση με τα ήδη γνωστά δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία εγείρει ερωτήματα σε σχέση με το ρόλο των λειτουργικών αυτών πολυμορφισμών σε διαφορετικές εθνικές ομάδες. Στα πλαίσια αυτά και λαμβάνοντας υπόψιν το μικρό αριθμό ασθενών τόσο της δικής μας μελέτης όσο και της πολυκεντρικής μελέτης που συσχετίζει τους πολυμορφισμούς αυτούς με την εκδήλωση βρογχεκτασιών και πνευμονικής ίνωσης, είναι σαφές πως για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων είναι ανάγκη να μελετηθεί μεγαλύτερη ομάδα ασθενών από διάφορες εθνικές ομάδες.

Επιπλέον, στην ίδια ομάδα ασθενών μελετήθηκε ο πολυμορφισμός c. -1C>T του γονιδίου *TNFRSF5 I* που κωδικοποιεί το μόριο CD40. Όπως έχει ήδη αναφερθεί από τη διεθνή βιβλιογραφία είναι γνωστή η συσχέτιση του C αλληλίου με αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης CD40 τόσο στην επιφάνεια των B κυττάρων όσο και στα άλλα κύτταρα τα οποία εκφράζεται η πρωτεΐνη αυτή. Στα πλαίσια αυτά, η παρουσία του εν λόγω αλληλίου σχετίζεται με την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η νόσος Grave's και η Πολλαπλή Σκλήρυνση. Στην ομάδα των ασθενών που μελετήθηκε, η παρουσία του πολυμορφισμού σχετίζεται με την εκδήλωση ατοπίας και ψωρίασης, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω ελέγχου σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών καθώς και την ανάγκη μελέτης πιθανά και του πολυμορφισμού rs4810485 ο οποίος εντοπίζεται στο εξόνιο δύο του εν λόγω γονιδίου και ο οποίος φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα mRNA, το οποίο κωδικοποιεί το μόριο CD40 και πιθανά σε



συνδυασμό με τον πολυμορφισμό rs1883832 να επηρεάζουν τόσο τα επίπεδα όσο και τη λειτουργικότητα της CD40 πρωτεΐνης.

Τέλος, μελετήθηκε η παρουσία του πολυμορφισμού rs231775 (c. +49 A/G, p.T17A) του γονιδίου *CTLA4*. Ο εν λόγω πολυμορφισμός με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία έχει σχετισθεί με την εκδήλωση αυτοανοσίας σε αρκετές μελέτες, καθώς επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης CTLA4. Αναλυτικότερα, η παρουσία του αλληλίου G φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη σύνθεση της εν λόγω πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, γεγονός που συνεπάγεται ελαττωμένη ανασταλτική δράση του CTLA4 μέσω του T λεμφοκυττάρου. Ιδιαίτερο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο γονότυπος AA φαίνεται να σχετίζεται με την εκδήλωση κοιλιοκάκης, γεγονός που γεννά ερωτήματα σε σχέση με την ανάγκη μελέτης και άλλων πολυμορφισμών οι οποίοι συνδυαστικά πιθανά να ασκούν τροποποιητικό χαρακτήρα στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης CTLA. Από την εν λόγω μελέτη αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εκδήλωση λεμφοϋπερπλασίας του τύπου της ηπατοσπληνομεγαλίας, υπερσπληνισμού και ηπατικής νόσου στην ομάδα ασθενών με CVID που μελετήθηκε. Μελέτη μεγαλύτερης ομάδας ασθενών και έλεγχος των επιπέδων του CTLA4 πιθανά να δώσει περισσότερο φως στο ρόλο του πολυμορφισμού αυτού στον κλινικό φαινότυπο ασθενών με CVID.

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναδεικνύεται η σημασία λειτουργικών πολυμορφισμών στον κλινικό φαινότυπο της CVID. Επιπλέον, καθώς πρόκειται για ένα νόσημα με μεγάλη κλινική ετερογένεια, πέραν της μελέτης γονιδίων τα οποία θεωρούνται αιτιολογικά για τη νόσο σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος γονιδίων τα οποία θα μπορούσαν να ασκούν τροποποιητικό ρόλο στον κλινικό φαινότυπο αυτής. Τέλος, σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος μορίων της φυσικής ανοσίας, γεγονός που επιβεβαιώνεται με τη συσχέτιση πολυμορφισμών στο γονίδιο της MBL2 με την εκδήλωση αυτοανοσίας στην ομάδα των ασθενών που αναλύθηκε γενετικά, καθώς μέσω των αποτελεσμάτων αυτών υποστηρίζεται περαιτέρω η παραπάνω υπόθεση περί του ρόλου των «τροποποιητικών» γονιδίων τα οποία πιθανά να αποτελέσουν κομβικό σημείο για την περαιτέρω κατανόηση και ερμηνεία της κλινικής ετερογένειας της CVID.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. HD O, WH H. History of primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2021 Aug 24];12(6):577–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23095909/>
2. Camcioğlu Y. Bruton’s Disease. *Immunopathol Immunomodulation* [Internet]. 2015 Nov 18 [cited 2021 Aug 24]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/48875>
3. P S, M B. Immunoglobulin Replacement Therapy for Primary Immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Aug 24];35(4):713–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26454315/>
4. Sriaroon P, Ballow M. Immunoglobulin Replacement Therapy for Primary Immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin NA* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 24]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.006>
5. A D, S K, A F. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Aug 25];13(7):519–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23765059/>
6. Abolhassani H, Azizi G, Sharifi L, Yazdani R, Mohsenzadegan M, Delavari S, et al. Global systematic review of primary immunodeficiency registries. <https://doi.org/10.1080/1744666X20201801422> [Internet]. 2020 Jul 2 [cited 2021 Aug 25];16(7):717–32. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1744666X.2020.1801422>
7. Seymour B, Miles J, Haeney M. Primary antibody deficiency and diagnostic delay. *J Clin Pathol* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2021 Aug 25];58(5):546–7. Available from: <https://jcp.bmj.com/content/58/5/546>
8. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2018 Jan 1;38(1):96–128.
9. Edgar D, Ehl S. ESID Registry - Working definitions for clinical diagnosis of PID. ESID

- Regist – Work Defin Clin Diagnosis PID. 2016;(Cid):1–33.
10. Cunningham-Rundles C, Maglione PJ. Common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2012 May [cited 2019 Aug 19];129(5):1425-1426.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674912005301>
  11. Modell V, Orange JS, Quinn J, Modell F. Global report on primary immunodeficiencies: 2018 update from the Jeffrey Modell Centers Network on disease classification, regional trends, treatment modalities, and physician reported outcomes. *Immunol Res* [Internet]. 2018 [cited 2019 Aug 19];66(3):367–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29744770>
  12. Shillitoe B, Bangs C, Guzman D, Gennery AR, Longhurst HJ, Slatter M, et al. The United Kingdom Primary Immune Deficiency (UKPID) registry 2012 to 2017. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Aug 19];192(3):284–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29878323>
  13. Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2001 Sep [cited 2019 Aug 19];1(5):421–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11882-001-0027-1>
  14. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2019 Aug 19];112(2):277–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319398>
  15. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* [Internet]. 1999 Jul [cited 2019 Aug 19];92(1):34–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413651>
  16. Wood PM. Primary antibody deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(4):356–61.
  17. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* [Internet]. 2007 May [cited 2019 Aug

- 19];27(3):308–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510807>
18. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):77–85.
  19. Gomes Ochtrop ML, Goldacker S, May AM, Rizzi M, Draeger R, Hauschke D, et al. T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood*. 2011 Jul 14;118(2):309–18.
  20. Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter H-H, et al. Defined Blocks in Terminal Plasma Cell Differentiation of Common Variable Immunodeficiency Patients. *J Immunol [Internet]*. 2005 Oct 15 [cited 2019 Aug 19];175(8):5498–503. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.175.8.5498>
  21. Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, et al. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol [Internet]*. 2002 Apr [cited 2019 Aug 19];103(1):34–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11987983>
  22. Brouet JC, Chedeville A, Fermanand JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol [Internet]*. 2000 Sep [cited 2019 Aug 19];30(9):2516–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009084>
  23. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood [Internet]*. 2002 Mar 1 [cited 2019 Aug 20];99(5):1544–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861266>
  24. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol [Internet]*. 2003 Sep [cited 2019 Aug 20];23(5):385–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601647>

25. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Abolhassani H, Olbrich P, et al. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical manifestations, Diagnosis, Classification and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2019;30(1):1–45.
26. Azizi G, Rezaei N, Kiaee F, Tavakolinia N, Yazdani R, Mirshafiey A, et al. T-cell abnormalities in common variable immunodeficiency. Vol. 26, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. ESMON Publicidad S.A.; 2016. p. 233–43.
27. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the Complexity of T Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. *J Immunol*. 2007 Mar 15;178(6):3932–43.
28. Vlckova M, Ticha O, Nechvatalova J, Kalina T, Litzman J, Mauri C, et al. Regulatory B cells in CVID patients fail to suppress multifunctional IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ + CD4+ T cells differentiation. *Clin Immunol [Internet]*. 2015 Oct [cited 2019 Aug 20];160(2):292–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232673>
29. Rezaei N, Haji-Molla-Hoseini M, Aghamohammadi A, Pourfathollah AA, Moghtadaie M, Pourpak Z. Increased serum levels of soluble CD30 in patients with common variable immunodeficiency and its clinical implications. *J Clin Immunol [Internet]*. 2008 Jan [cited 2019 Aug 20];28(1):78–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912490>
30. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4 T-cell homeostasis and B-cell differentiation. *PLoS One [Internet]*. 2011 [cited 2019 Aug 20];6(8):e22848. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21826211>
31. Kutukculer N, Azarsiz E, Aksu G, Karaca NE. CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells, Th1 (CCR5, IL-2, IFN- $\gamma$ ) and Th2 (CCR4, IL-4, IL-13) type chemokine receptors and intracellular cytokines in children with common variable immunodeficiency. *Int J Immunopathol Pharmacol [Internet]*. 2016 Jun [cited 2019 Aug 20];29(2):241–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26684629>
32. Arandi N, Mirshafiey A, Abolhassani H, Jeddi-Tehrani M, Edalat R, Sadeghi B, et al. Frequency and expression of inhibitory markers of CD4(+) CD25(+) FOXP3(+)

- regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* [Internet]. 2013 May [cited 2019 Aug 20];77(5):405–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432692>
33. Carbone J, Sarmiento E, Micheloud D, Rodríguez-Molina J, Fernández-Cruz E. Elevated levels of activated CD4 T cells in common variable immunodeficiency: Association with clinical findings. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2006;34(4):131–5.
  34. Viallard J-F, Ruiz C, Guillet M, Pellegrin J-L, Moreau J-F. Perturbations of the CD8(+) T-cell repertoire in CVID patients with complications. *Results Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2019 Aug 20];3:122–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600567>
  35. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2019 Aug 24];46(10):1547–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419489>
  36. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Mar [cited 2019 Aug 24];4(3):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12577056>
  37. Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* [Internet]. 2005 Aug [cited 2019 Aug 24];37(8):820–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007087>
  38. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJM, van Tol MJD, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 May 4 [cited 2019 Aug 24];354(18):1901–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672701>
  39. Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Ziemba B, De Vries SS, et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 24;104(17):7193–8.

40. Cunningham-Rundles C. Human B cell defects in perspective. Vol. 54, Immunologic Research. 2012. p. 227–32.
41. 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 [Internet]. 2013 Feb [cited 2019 Sep 2];131(2):468–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237420>
42. Gathmann B, Mahlaoui N, Ceredih for, erard LG, Oksenhendler E, Warnatz K, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2013; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1077>
43. Patuzzo G, Barbieri A, Tinazzi E, Veneri D, Argentino G, Moretta F, et al. Autoimmunity and infection in common variable immunodeficiency (CVID). Autoimmun Rev [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 Sep 7];15(9):877–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27392505>
44. Hampson FA, Chandra A, Screatton NJ, Condliffe A, Kumararatne DS, Exley AR, et al. Respiratory disease in common variable immunodeficiency and other primary immunodeficiency disorders. Clin Radiol [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Sep 7];67(6):587–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226567>
45. Yazdani R, Abolhassani H, Asgardoon M, Shaghghi M, Modaresi M, Azizi G, et al. Infectious and Noninfectious Pulmonary Complications in Patients With Primary Immunodeficiency Disorders. J Investig Allergol Clin Immunol [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 7];27(4):213–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28731410>
46. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. Clin Infect Dis [Internet]. 2008 May 15 [cited 2019 Sep 10];46(10):1547–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419489>
47. Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study

- and review. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2019 Sep 11];31(12):1800–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043034>
48. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, Tralka TS, McQuillan G. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J Infect Dis* [Internet]. 2000 Apr [cited 2019 Sep 13];181(4):1359–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762567>
49. Wang J, Cunningham-Rundles C. Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *J Autoimmun* [Internet]. 2005 Aug [cited 2019 Sep 13];25(1):57–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994061>
50. Azizi G, Abolhassani H, Asgardoost MH, Alinia T, Yazdani R, Mohammadi J, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: epidemiology, pathophysiology and management. Vol. 13, *Expert Review of Clinical Immunology*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 101–15.
51. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Sep 13];3:210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826712>
52. Kofod-Olsen E, Jørgensen SE, Nissen SK, Westh L, Møller BK, Østergaard L, et al. Altered fraction of regulatory B and T cells is correlated with autoimmune phenomena and splenomegaly in patients with CVID. *Clin Immunol* [Internet]. 2016 Jan [cited 2019 Sep 13];162:49–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586095>
53. Salek Farrokhi A, Aghamohammadi A, Pourhamdi S, Mohammadinejad P, Abolhassani H, Moazzeni SM. Evaluation of class switch recombination in B lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol Methods* [Internet]. 2013 Aug 30 [cited 2019 Sep 24];394(1–2):94–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23714403>
54. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Sep 24];3:210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826712>



55. Gathmann B, Mahlaoui N, CEREDIH, Gérard L, Oksenhendler E, Warnatz K, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2019 Sep 24];134(1):116–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582312>
56. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* [Internet]. 2012 Feb 16 [cited 2019 Sep 24];119(7):1650–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180439>
57. Mellekjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2002 Dec [cited 2019 Sep 24];130(3):495–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452841>
58. Pulvirenti F, Pecoraro A, Cinetto F, Milito C, Valente M, Santangeli E, et al. Gastric cancer is the leading cause of death in Italian adult patients with common variable immunodeficiency. *Front Immunol*. 2018 Nov 5;9(NOV).
59. Kralickova P, Milota T, Litzman J, Malkusova I, Jilek D, Petanova J, et al. CVID-associated tumors: Czech nationwide study focused on epidemiology, immunology, and genetic background in a cohort of patients with CVID. *Front Immunol*. 2019;10(JAN).
60. Uzzan M, Ko HM, Mehandru S, Cunningham-Rundles C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). *Curr Gastroenterol Rep* [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 Oct 13];18(4):17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951230>
61. Uzzan M, Ko HM, Mehandru S, Cunningham-Rundles C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). Vol. 18, *Current Gastroenterology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2016.
62. Malamut G, Verkarre V, Suarez F, Viillard J-F, Lascaux A-S, Cosnes J, et al. The

- enteropathy associated with common variable immunodeficiency: the delineated frontiers with celiac disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2019 Oct 13];105(10):2262–75. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551941>
63. Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2019 Oct 14];31(12):1800–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043034>
64. 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 Jan;17(1):251–9.
65. Yazdani R, Heydari A, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Asthma and allergic diseases in a selected group of patients with common variable immunodeficiency. Vol. 26, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. ESMON Publicidad S.A.; 2016. p. 209–11.
66. Agondi RC, Barros MT, Kokron CM, Cohon A, Oliveira AKB, Kalil J, et al. Can patients with common variable immunodeficiency have allergic rhinitis? *Am J Rhinol Allergy*. 2013 Mar;27(2):79–83.
67. Abati E, Faravelli I, Magri F, Govoni A, Velardo D, Gagliardi D, et al. Central nervous system involvement in common variable immunodeficiency: A case of acute unilateral optic neuritis in a 26 -year-old Italian Patient. *Front Neurol* [Internet]. 2018 Nov 30 [cited 2020 Aug 27];9(NOV):1031. Available from:  
</pmc/articles/PMC6284006/?report=abstract>
68. Zerbe CS, Marciano BE, Katial RK, Santos CB, Adamo N, Hsu AP, et al. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Primary Immune Deficiencies: Stat1 Gain of Function and Review of the Literature. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016 Apr 15 [cited 2020 Aug 27];62(8):986–94. Available from:  
</pmc/articles/PMC4803104/?report=abstract>
69. Malamut G, Zioli M, Suarez F, Beaugrand M, Viillard JF, Lascaux AS, et al. Nodular regenerative hyperplasia: The main liver disease in patients with primary

- hypogammaglobulinemia and hepatic abnormalities. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2020 Sep 17];48(1):74–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17998147/>
70. Ward C, Lucas M, Piris J, Collier J, Chapel H. Abnormal liver function in common variable immunodeficiency disorders due to nodular regenerative hyperplasia. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2020 Sep 17];153(3):331–7. Available from: </pmc/articles/PMC2527366/?report=abstract>
  71. Salehzadeh M, Aghamohammadi A, Rezaei N. Evaluation of Immunoglobulin Levels and Infection Rate in Patients with Common Variable Immunodeficiency After Immunoglobulin Replacement Therapy. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Feb;43(1):11–7.
  72. Egawa M, Kanegane H, Imai K, Morio T, Miyasaka N. Intravenous immunoglobulin (IVIg) efficiency in women with common variable immunodeficiency (CVID) decreases significantly during pregnancy [Internet]. Vol. 32, *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. Taylor and Francis Ltd; 2019 [cited 2020 Sep 17]. p. 3092–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29614902/>
  73. Abolhassani H, Sagvand BT, Shokuhfar T, Mirminachi B, Rezaei N, Aghamohammadi A. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency [Internet]. Vol. 9, *Expert Review of Clinical Immunology*. Expert Rev Clin Immunol; 2013 [cited 2020 Sep 17]. p. 561–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23730886/>
  74. Azizi G, Ziaee V, Tavakol M, Alinia T, Yazdai R, Mohammadi H, et al. Approach to the Management of Autoimmunity in Primary Immunodeficiency [Internet]. Vol. 85, *Scandinavian Journal of Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017 [cited 2020 Sep 17]. p. 13–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27862144/>
  75. Froehlich M, Schwaneck EC, Gernert M, Gadeholt O, Strunz P-P, Morbach H, et al. Autologous Stem Cell Transplantation in Common Variable Immunodeficiency: A Case of Successful Treatment of Severe Refractory Autoimmune Encephalitis. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jun 25 [cited 2020 Sep 17];11:1317. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01317/full>

76. Jensenius H, Klein DCG, Van Hecke M, Oosterkamp TH, Schmidt T, Jensenius JC. Mannan-Binding Lectin: Structure, Oligomerization, and Flexibility Studied by Atomic Force Microscopy. *J Mol Biol* [Internet]. 2009 [cited 2021 Aug 25];391:246–59. Available from: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
77. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006 72 [Internet]. 2006 Jan 5 [cited 2021 Aug 25];7(2):85–94. Available from: <https://www.nature.com/articles/6364283>
78. Vignesh P, Rawat A, Sharma M, Singh S. Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 30];465:123–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.017>
79. Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clin Lab Med* [Internet]. 2019;39(4):579–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.07.006>
80. P C, P T, E B, C P, R P, MS C. Complement, infection, and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Sep 3];31(5):532–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31192812/>
81. Dommett RM, Klein N, Turner MW, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.
82. CA O, A deCathelineau, PR H, D B, B G, VA F, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Sep 17 [cited 2021 Sep 6];194(6):781–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11560994/>
83. S H. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2001 [cited 2021 Sep 6];491:369–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14533809/>
84. RJ L, M S, AV H, YL L, RJ L, JA S, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1992 Dec [cited 2021 Sep 6];1(9):709–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1304173/>

85. HO M, P G, JA K, LU L, LP R, S T, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. Immunogenetics [Internet]. 1994 Jan [cited 2021 Sep 6];40(1):37–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8206524/>
86. Garred P, Madsen HO, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Thiel S, Hey AS, et al. DIALLELIC POLYMORPHISM MAY EXPLAIN VARIATIONS OF THE BLOOD CONCENTRATION OF MANNAN-BINDING PROTEIN IN ESKIMOS, BUT NOT IN BLACK AFRICANS. Int J Immunogenet. 1992;19(6):403–12.
87. Garred Hans Madsen PO, Leonardo Satz M, Hogh B. America Populations from Southeast Africa and South Protein Levels of Mannan-Binding Lectin in Different Molecular Events Result in Low. 2021 [cited 2021 Sep 6]; Available from: <http://www.jimmunol.org/content/161/6/3169>
88. TA N, W T, E N, T S, JA R, KR W. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Cardiovascular Disease: Do Similar Risk Genes Suggest Similar Drug Targets? Chest [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Sep 6];155(6):1260–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30660782/>
89. HO M, V V, A S, JL S, P G. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. Lancet (London, England) [Internet]. 1998 Sep 19 [cited 2021 Sep 6];352(9132):959–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9752823/>
90. P G, M H, T O, C K, A S. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? Eur J Immunogenet [Internet]. 1994 [cited 2021 Sep 6];21(2):125–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9098426/>
91. IK S, CH C, H K, MF F, D Z, B F, et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. Infect Immun [Internet]. 2001 [cited 2021 Sep 6];69(8):5212–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11447210/>
92. U S, P L. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2001 [cited 2021 Sep 7];58(1):4–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11229815/>

93. Kooten C van, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2021 Sep 7];67(1):2–17. Available from: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jlb.67.1.2>
94. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(1):4–43.
95. Siepmann K, Skok J, Essen D van, Harnett M, Gray D. Rewiring of CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology* [Internet]. 2001 [cited 2021 Sep 8];102(3):263. Available from: </pmc/articles/PMC1783186/>
96. Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors*. 2009 Nov;35(6):474–83.
97. Ji I, T I, N T, N K, A N, S A, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* [Internet]. 2000 Jan 10 [cited 2021 Sep 8];254(1):14–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10623461/>
98. S F, S G, A I, A A-G, AR S, M L, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Oct 23 [cited 2021 Sep 9];98(22):12614–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11675497/>
99. Wagner DH, Vaitaitis G, Sanderson R, Poulin M, Dobbs C, Haskins K. Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Mar 19 [cited 2021 Sep 9];99(6):3782–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/99/6/3782>
100. F C, C G, A V, A M, A M. Increased concentrations of soluble CD40 ligand may help to identify type 1 diabetic adolescents and young adults at risk for developing persistent microalbuminuria. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2008 [cited 2021 Sep 9];24(7):570–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18756582/>
101. JD L, M DB, BA H. CD40 in clinical inflammation: from multiple sclerosis to

- atherosclerosis. *Dev Immunol* [Internet]. 1998 [cited 2021 Sep 9];6(3–4):215–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9814595/>
102. E T, Y S. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* [Internet]. 2004 Sep [cited 2021 Sep 9];37(6–7):457–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15621572/>
103. BD H, JL M, NW P, M D, K T, C W, et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer* [Internet]. 2006 May 15 [cited 2021 Sep 9];106(10):2148–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16598754/>
104. RP P, L K, E L, SY R, T B, J K. The CD40-CD40 ligand system: a potential therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2021 Sep 9];2(6):773–7. Available from: <https://europepmc.org/article/med/11572655>
105. Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2021 Sep 9];19(5):1035. Available from: </pmc/articles/PMC3590838/>
106. Kahaly GJ, Stan MN, Frommer L, Gergely P, Colin L, Amer A, et al. A Novel Anti-CD40 Monoclonal Antibody, Iscalimab, for Control of Graves Hyperthyroidism—A Proof-of-Concept Trial. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Sep 9];105(3):696–704. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/105/3/696/5568230>
107. MS R, SH K. CD40 signaling converts a minimally immunogenic antigen into a potent vaccine against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* [Internet]. 2001 Apr 15 [cited 2021 Sep 9];166(8):5115–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11290793/>
108. Larsen, C. P., Alexander, D. Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E. T., Ritchie, S. C., Aruffo, A., Hendrix, R., and Pearson, T. C. (1996) CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* - Αναζήτηση Google [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://www.google.com/search?q=Larsen%2C+C.+P.%2C+Alexander%2C+D.+Z.%2C+>

- Hollenbaugh%2C+D.%2C+Elwood%2C+E.+T.%2C+Ritchie%2C+S.+C.%2C+Aruffo%2C+A  
 .%2C+Hendrix%2C+R.%2C+and+Pearson%2C+T.+C.+(1996)+CD40-  
 gp39+interactions+play+a+critical+role+during+allograft+rejection.+Suppression+of+  
 allograft+rejection+by+blockade+of+the+CD40-gp39+pathway.+Trans-  
 +plantation%23&oq=Larsen%2C+C.+P.%2C+Alexander%2C+D.+Z.%2C+Hollenbaugh%  
 2C+D.%2C+Elwood%2C+E.+T.%2C+Ritchie%2C+S.+C.%2C+Aruffo%2C+A.%2C+Hendrix  
 %2C+R.%2C+and+Pearson%2C+T.+C.+(1996)+CD40-  
 gp39+interactions+play+a+critical+role+during+allograft+rejection.+Suppression+of+  
 allograft+rejection+by+blockade+of+the+CD40-gp39+pathway.+Trans-  
 +plantation%23&aqs=chrome..69i57.652j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8
109. JD L, E C, RJ N. Functions of CD40 and Its Ligand, gp39 (CD40L). *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 10];37(2–6):371–420. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29773027/>
  110. S F, S G, A I, A A-G, AR S, M L, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2021 Sep 10];98(22):12614–9. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC60102>
  111. AL P, RM P, RR G, DM A, KL M, PM G, et al. A novel polymorphism of the human CD40 receptor with enhanced function. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2021 Sep 12];112(5):1863–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18591382/>
  112. Cooper JD, Smyth DJ, Bailey R, Payne F, Downes K, Godfrey LM, et al. The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet* 2007 81 [Internet]. 2007 Nov 28 [cited 2021 Sep 12];8(1):1–14. Available from: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-8-71>
  113. S R, EF R, AT L, R H, C G, NP B, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Oct [cited 2021 Sep 12];40(10):1216–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18794853/>
  114. YY H, L W, CCC, CH T, FJ T. STAT2\**C* related genotypes and allele but not TLR4 and CD40 gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma. *Int J*



- Biol Sci [Internet]. 2009 Jan 9 [cited 2021 Sep 12];5(1):74–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19159017/>
115. L R-R, S C, TR V-R, IC M, B M-A, C G-V, et al. Influence of CD40 rs1883832 polymorphism in susceptibility to and clinical manifestations of biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2021 Sep 12];37(10):2076–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682661/>
  116. B P, P L, C H, A C, MA G-P. A C > T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* [Internet]. 2008 Aug [cited 2021 Sep 12];19(8):1147–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18097708/>
  117. Buck D, Kroner A, Rieckmann P, Mäurer M, Wiendl H. Analysis of the C/T-1 single nucleotide polymorphism in the CD40 gene in multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2006 Oct;68(4):335–8.
  118. M W, A W, M B, A P-D, M C, P K, et al. Investigation of gene-gene interactions between CD40 and CD40L in Polish multiple sclerosis patients. *Hum Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 12];75(8):796–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912008/>
  119. Y B. Genetic factors of autoimmune thyroid diseases in Japanese. *Autoimmune Dis* [Internet]. 2012 [cited 2021 Sep 12];2012(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22242199/>
  120. CS S, M W, M T, T K, M B, CA G, et al. Functional association of a CD40 gene single-nucleotide polymorphism with the pathogenesis of coronary heart disease. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 12];116(6):1214–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31373353/>
  121. E L. rs1883832: a CD40 single-nucleotide polymorphism for predicting coronary heart disease in humans. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 12];116(6):1095–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31722420/>
  122. DE M-F, JR P-G, F C-M, E V-A, B P-R, M A-R, et al. Analysis of Genetic Variation in CD40 and CD40L: Relationship with mRNA Relative Expression and Soluble Proteins in Acute

- Coronary Syndrome. *J Immunol Res* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 12];2019. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31183392/>
123. JM C, J G, CD W, CF W, HCL, YS W, et al. The association of CD40 polymorphisms with CD40 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus. *BMC Genet* [Internet]. 2015 Oct 16 [cited 2021 Sep 12];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26474561/>
  124. R T-L, JF M-V, IV R-F, M M-R, DC S-C, A C, et al. Association of soluble CD40 levels with -1 C > T CD40 polymorphism and chronic kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Mol Genet genomic Med* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Sep 12];7(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31642196/>
  125. CF S, A N, PM B, JD C, L A, DR S, et al. A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma. *Blood* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2021 Sep 12];111(8):4348–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18287517/>
  126. A N, PM B, S de S, N B, M M, Y B, et al. A functional TNFRSF5 polymorphism and risk of non-Hodgkin lymphoma, a pooled analysis. *Int J cancer* [Internet]. 2011 Mar 15 [cited 2021 Sep 12];128(6):1481–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20473910/>
  127. Brunet J-F, Denizot F, Luciani M-F, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei M-G, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nat* 1987 3286127 [Internet]. 1987 [cited 2021 Sep 14];328(6127):267–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/328267a0>
  128. JC S, X Z, AA F, SG N, SC A. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* [Internet]. 2001 Mar 29 [cited 2021 Sep 14];410(6828):604–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11279501/>
  129. TI, H O, C N, M S, M T-E, H A, et al. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2021 Sep 14];165(9):5062–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11046036/>
  130. ML A, KA F, CB T. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* [Internet].

- 2001 [cited 2021 Sep 13];1(3):220–8. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11905831/>
131. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018 Jan 4;131(1):58–67.
  132. T P-H, JG E, K W, JP A. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* [Internet]. 2004 Sep [cited 2021 Sep 14];21(3):401–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15357951/>
  133. Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol*. 2015 Feb 1;36(2):63–70.
  134. LS W, DM S. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Sep 14];11(12):852–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22116087/>
  135. Alissafi T, Banos A, Boon L, Sparwasser T, Ghigo A, Wing K, et al. Tregs restrain dendritic cell autophagy to ameliorate autoimmunity. *J Clin Invest* [Internet]. 2017 Jun 30 [cited 2021 Sep 15];127(7):2789–804. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI92079>.
  136. Coillie S Van, Wiernicki B, Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 15];1248:7–32. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-3266-5\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-3266-5_2)
  137. PA Z, A A, H S, TG Z, H T, G H, et al. Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Hum Immunol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2021 Sep 16];65(7):719–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15301861/>
  138. Stojanova J, Pouché L, Picard N. Genetic polymorphisms in the immune response: A focus on kidney transplantation. *Clin Biochem*. 2016 Mar 1;49(4–5):363–76.
  139. L N, R B, LE P, B V der A, C G, E B, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1996 Jul [cited 2021 Sep 16];5(7):1075–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8817351/>

140. MP M, LJ R, HJ G, CO J, M S-R, MT ML, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1997 Aug [cited 2021 Sep 16];6(8):1275–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9259273/>
141. YH L, JB H, SK N. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet* [Internet]. 2005 Apr [cited 2021 Sep 16];116(5):361–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15688186/>
142. H D, J B, C S, H R, R F, M V, et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto’s thyroiditis and Addison’s disease. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1997 Dec 1 [cited 2021 Sep 16];82(12):4130–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9398726/>
143. I D-S, J S, E H-H, JF M, JF B, S C-Z. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut* [Internet]. 1998 [cited 2021 Sep 16];43(2):187–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10189842/>
144. GG S, JH K, YH K, YH L. Association between CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to Celiac disease: a meta-analysis. *Hum Immunol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2021 Sep 17];74(9):1214–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770251/>
145. Litzman J, Freiberger § T, Grimbacher § B, Gathmann B, Salzer U, Pavlík T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency. 2008;