



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ



Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

**Ανίχνευση μεταλλάξεων της ακετυλεστεράσης του σιαλικού
οξέος στη Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα και σε Πρωτοπαθείς
Αντισωματικές Ανεπάρκειες**

Σεβδαλή Ειρήνη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Λάρισα 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

(επιβλέπων)

Ματθαίος Σπελέτας

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Ευθυμία Πετεινάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

*Στους γονείς μου,
για όλα όσα μου έχουν προσφέρει*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. Η 9-O-AΚΕΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΙΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	12
1.1. Δομή γονιδίου	13
1.1.1. Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου <i>SIAE</i>	13
1.2. Η λυσοσωμική ισομορφή της <i>SIAE</i>	13
1.3. Η κυτταροπλασματική ισομορφή της <i>SIAE</i>	14
1.4. Η διαμεσολάβηση της περιφερικής ανοχής των Β-κυττάρων από την καταστολή της BCR σηματοδότησης από το <i>SIAE-Siglec-Lyn-SHP-1</i> μονοπάτι	15
1.5. Γενετικές βλάβες του γονιδίου <i>SIAE</i> και αυτοανοσία	19
2. Η ΝΕΑΝΙΚΗ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	23
2.1. Ολιγοαρθρίτιδα	24
2.2. Πολυαρθρίτιδα με θετικούς ρευματοειδείς παράγοντες	25
2.3. Πολυαρθρίτιδα με αρνητικούς ρευματοειδείς παράγοντες	25
2.4. Η παθογένεια της Ολιγο/Πολυαρθρικής Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας	26
2.4.1. Γενετική συσχέτιση	26
2.4.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες	26
2.4.3. Ο ρόλος των προερχόμενων από τον χόνδρο αυτοαντιγόνων	27
2.4.4. Ανισορροπία μεταξύ ανοχής και φλεγμονής	28
2.4.4.1. Ο ρόλος των Th1/Th17 και Treg κυττάρων	28
2.4.4.2. Ο ρόλος των HSPs	30
2.4.4.3. Ανισορροπία μεταξύ των φλεγμονωδών Th1/Th17 και αντιφλεγμονωδών Treg κυττάρων	30
2.5. Συστηματική αρθρίτιδα	31
2.6. Η παθογένεια της Συστηματικής Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας	32
2.6.1. Γενετικό υπόβαθρο	33
2.6.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και εμβολιασμός	33
2.6.3. Ο ρόλος των κυτταροκινών που προωθούν τη φλεγμονή	33
2.6.4. Οι ειδικές των φαγοκυττάρων S100 πρωτεΐνες στη ΣΝΙΑ	34
2.6.5. Απώλεια ελέγχου του εναλλακτικού εκκριτικού μονοπατιού των φαγοκυττάρων	35

3. ΟΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	36
3.1 Η IgA ανοσοανεπάρκεια	37
3.1.1 Κλινικές εκδηλώσεις	37
3.1.2. Η παθογένεια της αυτοανοσίας στην IgAD	38
3.1.2.1 Η γενετική επιδεκτικότητα για αυτοανοσία στην IgAD	38
3.1.2.2 Η ανοσοπαθολογία της αυτοανοσίας στην IgAD	39
3.2 Η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια	40
3.2.1 Κλινική εικόνα	40
3.2.2 Η παθογένεια της αυτοανοσίας στη CVID	41
3.2.2.1 Η γενετική προδιάθεση για αυτοανοσία στη CVID	41
3.2.2.2 Οι μοριακοί μηχανισμοί στην πρόκληση αυτοανοσίας στη CVID	42
4. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ	43
5. ΣΚΟΠΟΣ	44
<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	45
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	46
1.1. Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα	46
1.2. Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες	47
1.3. Υγιείς μάρτυρες	48
2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ	49
3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	50
3.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα	50
3.2 Μοριακή μελέτη	51
3.2.1 PCR για το γονίδιο της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος	51
3.2.2. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αгарόζης	53
3.2.3. Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων	54
3.2.4. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	55
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
4.1. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος	56
4.2. Γενετικές βλάβες του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος	57
4.2.1. Οικογενειακή μελέτη των δύο νέων μεταλλάξεων	58
4.2.2 Επίπτωση των νεοπροσδιορισθέντων μεταλλάξεων στο γενικό πληθυσμό	59
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

BCR (B cell receptor) υποδοχέας του Β-κυττάρου

Cse (cytoplasmic sialic acid acetyltransferase) κυτταροπλασματική ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος

CVID (Common Variable Immunodeficiency) Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια

HLA (Human Leukocyte Antigen) Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο

HSP (Heat shock protein) Πρωτεΐνη θερμικού πλήγματος

Η αλυσίδα (heavy chain) βαριά αλυσίδα (ενν. ανοσοσφαιρίνης)

Ig (immunoglobulin) ανοσοσφαιρίνη

ITIM (immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif) ανασταλτικό μοτίβο ανοσοϋποδοχέα βασισμένο σε τυροσίνη

(s)IgAD [(selective) IgA Deficiency] (επιλεκτική) IgA ανοσοανεπάρκεια

ILAR (International League of Associations for Rheumatology) Διεθνής Σύνδεσμος Συλλόγων Ρευματολογίας

Λ αλυσίδα (light chain) ελαφρά αλυσίδα (ενν. ανοσοσφαιρίνης)

Lse (lysosomal sialic acid acetyltransferase) λυσοσωμική ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος

MHC (Major Histocompatibility Complex) Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

MIF (Macrophage migration inhibitory factor) Ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης των μακροφάγων

MPP3 (Matrix-metalloproteinase 3) μεταλλοπρωτεΐνωση 3 της θεμέλιας ουσίας

PADs (Primary Antibody Deficiencies) Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες

PBC (Primary Biliary Cirrhosis) Πρωτοπαθής χολική κίρρωση

PCR (Polymerase Chain Reaction) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RF (Rheumatoid factor) Ρευματοειδής παράγοντας

Sia (Sialic acid) σιαλικό οξύ

SIAE (sialate O-acetyltransferase) σιαλική Ο-ακετυλεστεράση

SIAT (sialate O-acetyltransferase) σιαλική Ο-ακετυλομεταφοράση

Siglec (sialic acid binding Ig superfamily lectin) λεκτίνη της Ig υπεροικογένειας που δεσμεύει σιαλικό οξύ

SNPs (Single nucleotide polymorphisms) Απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί

Th (T helper cell) βοηθητικό Τ-κύτταρο

Treg (T regulatory cell) ρυθμιστικό Τ-κύτταρο

ANA Αντικυρηνικά Αντισώματα

NIA Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα

Ο/ΠΝΙΑ Ολιγο/Πολυαρθρική Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα

PA Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

ΣΕΛ Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος

ΣΝΙΑ Συστηματική Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για την απομάκρυνση των ακετυλομάδων από την 9-OH θέση των α2,6 συνδεδεμένων σιαλικών οξέων,¹ που εμφανίζει ανοδική ρύθμιση κατά την ωρίμανση των Β-κυττάρων.² Οι Cariappa et al έδειξαν ότι η SIAE ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση από το Β-κυτταρικό υποδοχέα, συμμετέχοντας στη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής στο ποντίκι.³ Πρόσφατα, διάφορες μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν την παρουσία σπάνιων γενετικών ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας του SIAE με την ανάπτυξη ορισμένων αυτοάνοσων νοσημάτων, αλλά τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι αντιφατικά.^{4,5} Στα νοσήματα αυτά που μελετήθηκαν συγκαταλεγόταν η Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα, το πιο κοινό χρόνια ρευματικό νόσημα της παιδικής ηλικίας· ωστόσο καμία μελέτη δεν παρείχε στοιχεία σχετικά με τις μορφές της νόσου που συμπεριλήφθησαν σε αυτή. Από την άλλη πλευρά, νεότερα δεδομένα που έχουν ανακλύψει τα τελευταία χρόνια υποδεικνύουν ότι διακριτοί μηχανισμοί ενέχονται στην παθογένεση των 2 κύριων μορφών της NIA, της συστηματικής και ολιγο/πολυαρθρικής· η συστηματική NIA είναι μία αυτοφλεγμονώδης κατάσταση, οι αιτιοπαθογενετικές βλάβες της οποίας φαίνεται ότι εντοπίζονται στο επίπεδο της φυσικής ανοσίας, ενώ η ολιγο/πολυαρθρική NIA είναι ένα μεσολαβούμενο από λεμφοκύτταρα αυτοάνοσο νόσημα, που πυροδοτείται από αντιγόνα, γεγονός που υποδηλώνει βλάβη στο επίπεδο της ειδικής ανοσίας.^{6,7} Στο πλαίσιο αυτό δεν έχουν γίνει μελέτες συσχέτισης της πιθανής συμβολής ή μη των σπάνιων ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας του SIAE στην παθογένεση αυτών των νοσημάτων.

Η παρουσία αυτοανοσίας σε διάφορα σύνδρομα αντισωματικής ανεπάρκειας, συμπεριλαμβανομένων των IgAD και CVID, εγείρει σημαντικά ερωτήματα σχετικά με την παθογένεσή τους. Η πλειονότητα αυτών των νοσημάτων οφείλεται σε μία αδυναμία του ανοσιακού συστήματος των ασθενών να εξαλείψει αποτελεσματικά τα διάφορα αντιγόνα που προκαλούν εκτεταμένες ανοσιακές απαντήσεις.^{8,9} Νέα στοιχεία δείχνουν επίσης μία σαφή επικράτηση συχνών αυτοάνοσων νοσημάτων στις οικογένειες ασθενών με IgAD και CVID, γεγονός που υποδηλώνει κάποιο πιθανό κοινό γενετικό υπόβαθρο.¹⁰ Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την παθογένεση αυτών των νοσημάτων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και η συσχέτιση των λειτουργικώς ελαττωματικών ποικιλομόρφων του SIAE με αυτοάνοσες καταστάσεις υποδηλώνει ίσως και κάποιο πιθανό ρόλο αυτών στην πρόκληση αυτοανοσίας στους ασθενείς με IgAD και CVID, και στις οικογένειές τους.

Με το σκεπτικό αυτό, στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε η σχέση ποικιλομόρφων του SIAE με τον κίνδυνο εμφάνισης αυτοανοσίας στη NIA και στις PADs. Η εργασία που περιγράφεται εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2011 με Ιούλιο 2013, στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο πρόγραμμα «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς με PADs από το ίδιο και συνεργαζόμενα εργαστήρια και ασθενείς με NIA από την Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «η Αγία Σοφία».

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής. Ιδιαίτερα, οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αναστάσιο Γερμενή, που με δέχθηκε στο Εργαστήριο και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, καθώς επίσης για την

υλικοτεχνική εργαστηριακή υποδομή και τη γενική στήριξη που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ματθαίο Σπελέτα θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου για την αδιάλειπτη καθοδήγηση και συμβολή καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Ακόμη περισσότερο, τους ευχαριστώ και τους δύο για τα μαθήματα ζωής. Ευχαριστώ θερμά και την Παιδορευματολόγο Δρ. Έλενα Τσιτσάμη για την άψογη συνεργασία στη συλλογή του υλικού και των κλινικών δεδομένων των ασθενών με Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα.

Ευχαριστώ την Ευαγγελία Καραμούτη για την αμέριστη στήριξη, βοήθεια, ενθάρρυνση και υπομονή της, καθώς επίσης τους Ευαγγελία Γραμμουστιάνου, Μαρία Ζαμανάκου, Νικολέτα Αργέντου, Αντιγόνη Μαμάρα, Ζωή Φλώρου, Ευαγγελία Κουβάτα, Κατερίνα Καμηνιώτη, Αντιγόνη Αβραμούλη, Φανή Τσαντούλα και την υπόλοιπη ομάδα του Εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία όλο αυτό το διάστημα. Αν έμαθα κάτι καθόλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο είναι ότι η συνεργασία και η ομαδικότητα, είναι πολύ πιο σπουδαίες από την ίδια την εργασία. Ευχαριστώ επίσης τους Γεδεών Λουλέ και Λουκία Ποταμιάνου για τη βοήθειά τους στην ανάλυση κατά Sanger. Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένειά μου για την αδιάλειπτη υποστήριξη και συμπαράσταση που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μία από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες του ανοσιακού συστήματος των σπονδυλωτών είναι η ικανότητά του να αποκρίνεται σε έναν τεράστιο αριθμό αντιγόνων, παράγοντας έναν αντίστοιχα μεγάλο αριθμό ανοσοσφαιρινικών μορίων μοναδικής αντιγονοειδικότητας. Η ετερογένεια αυτή των αντισωμάτων οφείλεται, αφενός στον πολύπλοκο μηχανισμό της V/(D)/J αναδιάταξης των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, καθώς επίσης και σε άλλες διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων των σωματικών υπερμεταλλάξεων, της γονιδιακής μετατροπής και της μεταστροφής τάξης. Η ωρίμανση των ανθρώπινων προδρόμων του Β-κυττάρου σε λειτουργικά Β-κύτταρα αντιπροσωπεύει μία αναπτυξιακά προγραμματισμένη πολυσταδιακή διαδικασία που επηρεάζεται από το μικροχημικό περιβάλλον και έναν αριθμό διαλυτών παραγόντων, και βασίζεται σ' έναν καταρράκτη σωματικών αναδιατάξεων των γονιδίων των Η και L αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (που ξεκινά από τα πολύ αρχικά στάδια ωρίμανσης του Β-κυττάρου) και στην έκφραση χαρακτηριστικών κυτταροεπιφανειακών αντιγόνων.

Στο μυελό των οστών, το πρωιμότερο γεγονός που λαμβάνει χώρα κατά την οντογένεση του Β-κυττάρου είναι η σύνδεση των D- και J- γονιδιακών τμημάτων των Η αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης που μπορεί να ξεκινήσει από τον κοινό λεμφοκυτταρικό πρόγονο, ένα διαφοροποιημένο αιμοποιητικό στελεχειαίο κύτταρο, αλλά συμβαίνει κυρίως στα πρώιμα προ-προ-Β-κύτταρα, οδηγώντας στην παραγωγή όψιμων προ-προ-Β-κυττάρων που προχωρούν σε V_H-DJ_H αναδιατάξεις του γονιδίου της Η αλυσίδας. Η επιτυχής αναδιάταξη οδηγεί στην παραγωγή κυτταροπλασματικών κυρίως μ Η αλυσίδων, οι οποίες δύνανται να ζευγαρώσουν με δύο σταθερές «προσωρινές» L αλυσίδες (ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο διακριτές πρωτεΐνες, τις λ5 και VπροB), που παράγονται απουσία αναδιάταξης των γονιδίων της L αλυσίδας, καθώς επίσης και με τις σταθερές πρωτεΐνες Igα και Igβ (που είναι υπεύθυνες για την μεταγωγή του σήματος με αλληλεπίδρασή τους με ενδοκυτταρικές κινάσες της τυροσίνης μέσω των κυτταροπλασματικών τους ουρών) σχηματίζοντας τελικά τον προ-Β-κυτταρικό υποδοχέα (προ-BCR). Η λήξη αυτών των VDJ αναδιατάξεων και η συναρμολόγηση του προ-BCR σηματοδοτεί την μετάβαση από το προ-προ- στο μεγάλο προ-Β-κύτταρο, και φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του αντιγόνου ή άλλου εξωγενούς συνδέτη. Το κύτταρο αυτό πολλαπλασιάζεται ταχέως, ωστόσο σε κάποια φάση σταματά να διαιρείται και μετατρέπεται σε ένα μικρό προ-Β-κύτταρο που βρίσκεται σε ηρεμία. Τα μικρά προ-Β-κύτταρα προχωρούν σε V/J αναδιάταξη των γονιδίων της L αλυσίδας και εφόσον αυτή ολοκληρωθεί με επιτυχία, το κύτταρο μετατρέπεται σε άωρο Β κύτταρο που συνθέτει κ και λ ελαφρές αλυσίδες, που θα ζευγαρώσουν με μία μ Η αλυσίδα, σχηματίζοντας πλήρη IgM μόρια στην κυτταρική επιφάνεια και τα οποία συνδέονται με τις πρωτεΐνες Igα και Igβ για να σχηματίσουν το λειτουργικό σύμπλοκο του BCR. Τα άωρα Β-κύτταρα αποκρίνονται σε T-κυτταροανεξάρτητα τύπου 1 αντιγόνα (π.χ. λιποπολυσακχαρίτες) και εφόσον δεν εμφανίσουν καμία ισχυρή αυτοδραστικότητα μπορούν να μεταναστεύσουν από το μυελό των οστών στο σπλήνα όπου αρχίζουν πλέον να εκφράζουν κυτταροεπιφανειακή IgD και μία σειρά άλλων δεικτών (όπως τους CD21 και CD22), οπότε και συμπεριφέρονται ως ώριμα πλέον Β-κύτταρα. Όταν τα ώριμα Β-κύτταρα συναντήσουν T-κυτταροεξαρτώμενα ξένα αντιγόνα στα λεμφικά θυλάκια του σπλήνα και των λεμφαδένων, θα διαφοροποιηθούν σε λεμφοβλάστες που θα δώσουν πλασματοκύτταρα υπεύθυνα για την παραγωγή των κυκλοφορούντων αντισώματων, ίδιας αντιγονικότητας με τα μητρικά μόρια. Είναι

δυνατόν όμως τα Β-κύτταρα να εισέλθουν σε λεμφοζίδια και είτε να δώσουν γένεση σε βραχύβια πλασματοκύτταρα είτε να σχηματίσουν βλαστικά κέντρα με στόχο την παραγωγή πλασματοκυττάρων και μνημονικών Β-κυττάρων με υψηλότερη συγγένεια για το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους.^{11,12,13,14}

Η ενεργοποίηση του Β-κυττάρου ξεκινά από το σύμπλοκο του ΒCR. Η σύνδεση του υποδοχέα με ένα αντιγόνο ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη που οδηγεί στην έκφραση κάποιων πρώιμων γονιδίων που επάγουν άλλα γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό, την ενεργοποίηση και την επιβίωση του Β-κυττάρου. Η ΒCR σηματοδότηση μπορεί ωστόσο να είναι ανεξάρτητη του αντιγόνου, όπου στην περίπτωση αυτή τα σήματα από τον υποδοχέα, απουσία ενός συνδέτη, αναφέρονται συχνά ως τονικά σήματα, αλλά μπορεί επίσης να ξεκινήσει από ένα «ίδιο» αντιγόνο, σχετικά υψηλής συγγένειας, συμβάλλοντας έτσι στην επαγωγή των μηχανισμών αυτοανοχής σε άωρα Β-κύτταρα. Καθώς όμως τα κύτταρα ωριμάζουν, αυτοί οι μηχανισμοί κεντρικής ανοχής προφανώς παύουν να λειτουργούν, οπότε και ξεκινά η δράση των μηχανισμών περιφερικής ανοχής. Η διέγερση των πιο ώριμων Β-κυττάρων από «ίδια» αντιγόνα διαφορετικής συγγένειας, μπορεί να συμβάλει σε φαινόμενα δέσμευσης στη σειρά, όπως στην απόφαση για τη παραγωγή των λεμφοζιδιακών ή των Β-κυττάρων της οριακής ζώνης.¹⁵ Η συνεχής ισχύς του ΒCR σήματος συμβάλλει τόσο σε γεγονότα θετικής όσο και αρνητικής επιλογής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του Β-κυττάρου.

Οι πιο καλά μελετημένοι μηχανισμοί ανοχής των Β-κυττάρων είναι η αναδιαμόρφωση του υποδοχέα, η εξάλειψη και η ανεργία των κλώνων, οι οποίοι εξαρτώνται από την επαγωγή της σηματοδότησης καθοδικά του υποδοχέα του Β-κυττάρου από «ίδια» αντιγόνα. Ωστόσο ένας διακριτός αλλά εξίσου σημαντικός μηχανισμός ανοχής του Β-κυττάρου περιλαμβάνει την καταστολή και όχι την επαγωγή, της ΒCR σηματοδότησης. Η καταστολή αυτή εξαρτάται από τη δραστηριότητα της SIAE, ενός ενζύμου που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του Β-κυττάρου, συμμετέχοντας σε ένα μονοπάτι που απαιτεί τη συνεργική δράση της Lyn κινάσης της Src οικογένειας, της SHP-1 φωσφατάσης της τυροσίνης και ανασταλτικών μελών της οικογένειας των Siglecs. Σε αντίθεση με όλους τους «συμβατικούς» μηχανισμούς της ανοχής, η συνδεδεμένη με τη SIAE διαδικασία δεν εξαρτάται από την ίδια τη ΒCR σηματοδότηση, αλλά από ανασταλτικούς υποδοχείς που την εξασθενούν.

1. Η 9-Ο-ΑΚΕΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΙΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η SIAE είναι ένα ένζυμο που υδρολύει τον εστερικό δεσμό μεταξύ των ακετυλ- και υδροξυλομάδων του σιαλικού οξέος, συμβάλλοντας στην απομάκρυνση των Ο-ακετυλομάδων από την 9-OH θέση των α2,6 συνδεδεμένων σιαλικών οξέων και κατεπέκταση στον καταβολισμό αυτών των μονοσακχαριτών.¹⁶ Τα σημερινά δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο 9-Ο-ακετυλεστεράσες στα συστήματα των θηλαστικών. Η μία φαίνεται να είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο με εξειδίκευση για τα ελεύθερα 9-Ο-ακετυλοσιαλικά οξέα,¹⁷ ενώ η άλλη είναι μία υδατοδιαλυτή γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται σε όψιμα ενδοκυτταρικά μεμβρανοσυνδεδεμένα διαμερίσματα (κυρίως λυσοσώματα) και εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση για τη διάσπαση των 9-Ο-ακετυλομάδων από σιαλικά οξέα των γλυκοσυζευγμάτων. Αξιοπρόσεκτα, τα ένζυμα αυτά είναι ειδικά για τους εστέρες

μόνο στην 9-θέση, αλλά μπορούν να δράσουν σε Ο-ακετυλεστερές στην 7- ή 8-θέση μετά από μετανάστευση αυτών στην 9-θέση.¹⁶

1.1. Δομή γονιδίου

Η ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος κωδικοποιείται από ένα γονίδιο (*SIAE* ή *YSG2* ή *H-Lse*) μεγέθους περίπου 47 kbp, που αποτελείται από 10 εξόνια τα οποία διαχωρίζονται από 9 ιντρόνια, κι έχει χαρτογραφηθεί στη χρωμοσωμική θέση 11q24.¹⁸ Το γονίδιο αυτό έχει πέντε μετάγραφα εκ των οποίων τα δύο κωδικοποιούν για τη λυσοσωμική και κυτταροπλασματική ισομορφή της πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Το ποικιλόμορφο 1 αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μετάγραφο (5583 bp) από αυτά τα δύο και κωδικοποιεί τη μεγαλύτερη πρωτεΐνη (ισομορφή 1), που αναφέρεται ως η λυσοσωμική πρωτεΐνη. Το ποικιλόμορφο 2 διαφέρει, ως προς το μεταγραφικό ποικιλόμορφο 1, στην 5'-UTR και στην κωδικοποιούσα περιοχή. Η τελική πρωτεΐνη που προκύπτει (ισομορφή 2) έχει ένα διακριτό N-τελικό άκρο και αναφέρεται ως η κυτταροπλασματική διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης. Τα υπόλοιπα τρία μετάγραφα δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνη, καθώς το ένα από αυτά δεν φέρει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και τα άλλα δύο περιέχουν ιντρονική αλληλουχία.

1.1.1. Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *SIAE*

Η ρύθμιση της λυσοσωμικής και κυτταροπλασματικής *SIAE* σε μοριακό επίπεδο αποτελεί ωστόσο ένα ανοιχτό προς συζήτηση θέμα. Τα ευρήματα των Takematsu et al προτείνουν ότι, τουλάχιστον στο ποντίκι, ένα μόνο γονίδιο 9-Ο-ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος κωδικοποιεί δύο διαφορετικά εντοπισμένες πρωτεΐνες με διαφορεική χρήση ενός εξονίου που κωδικοποιεί για ένα πεπτίδιο σήματος που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο.¹⁹ Πράγματι, επειδή μεταξύ του εξονίου 1 του *Lse* και του εξονίου 2 και των δύο ισομορφών δεν έχει ανιχνευθεί κάποιο επιπλέον εξόνιο με υβριδισμό κατά Southern για το *Cse*, υποτέθηκε ότι ο υποκινητής του *Cse* και η θέση έναρξης της μεταγραφής είναι πιθανόν να εντοπίζονται στη 5' περιοχή του γονιδίου της εστεράσης, ανοδικά του πρώτου εξονίου του *Lse* που κωδικοποιεί το πεπτίδιο σήματος. Οι διαφορές στο 5' άκρο των *Lse* και *Cse* και η τελείως διαφορετική έκφραση αυτών των 2 ισομορφών, με τη λυσοσωμική να εμφανίζει ευρεία κατανομή και την κυτταροπλασματική να εμφανίζει ιστοειδική έκφραση (κυρίως για τον εγκέφαλο), υποδεικνύουν τη χρήση διαφορετικών υποκινητών για την έκφρασή τους.

1.2. Η λυσοσωμική ισομορφή της *SIAE*

Η *Lse* είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 523 αμινοξέων και μοριακού βάρους 58 kDa, η οποία εμφανίζει υψηλή ομολογία για την αντίστοιχη πρωτεΐνη *Lse* του ποντικού. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά σταθερό ένζυμο,²⁰ με εξελικτική κατανομή παράλληλη αυτής των σιαλικών οξέων στη φύση, που είναι παρόντα στα ανώτερα ασπόνδυλα και στα χορδωτά.²¹ Η *Lse* είναι μία υδατοδιαλυτή γλυκοπρωτεΐνη με πολύπλοκες, τύπου μαννόζης, N-συνδεδεμένες αλυσίδες, η οποία διασχίζει το μονοπάτι ενδοπλασματικού δικτύου-σωματίου Golgi κατά τη βιοσύνθεσή της, αλλά απομονώνεται σε ενδοκυτταρικά μεμβρανοσυνδεδεμένα διαμερίσματα.²⁰ Αν και η δραστηριότητα της μορφής αυτής ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στο σωματίο Golgi, φαίνεται πλέον ότι η πλειονότητα του ενζύμου

απαντάται σε όψιμα διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων των λυσοσωμάτων, παρά το γεγονός ότι έχει ουδέτερο βέλτιστο pH, χάρη στην παρουσία ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου, που αντιστοιχεί στα πρώτα 23 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Ως λυσοσωμικό κατά κύριο λόγο ένζυμο, η Lse μπορεί να εμπλέκεται μόνο στην τελική αποικοδόμηση των Ο-ακετυλιωμένων σιαλικών οξέων, εμφανίζοντας υψηλή εξειδίκευση για τη διάσπαση των 9-Ο-ακετυλομάδων από σιαλικά οξέα (υψηλή Km για το υπόστρωμα). Είναι σαφές ότι η πρωτεΐνη αυτή πρέπει να δρα σε ένα post-Golgi διαμέρισμα καθώς τα α2,6 συνδεδεμένα σιαλικά οξέα προστίθενται και ακετυλιώνονται στην 9-OH θέση στο trans-Golgi. Μελέτες υπερέκφρασης της SIAE ωστόσο αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να εκκριθεί και να «καλύψει» την επιφάνεια διαμολυσμένων μη λεμφοειδών κυττάρων που την υπερεκφράζουν, προφανώς με σύνδεση σε κάποιο εξωκυττάριο συστατικό, αλλά η φυσιολογική σημασία της έκκρισης και της κυτταροεπιφανειακής έκφρασης της πρωτεΐνης δεν είχε αξιολογηθεί *in vivo*. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ωστόσο ότι η πρωτεΐνη όχι μόνο δεν εκκρίνεται *in vivo*, αλλά η έκφρασή της περιορίζεται, τουλάχιστον στα λεμφοκύτταρα, ενδοκυτταρικά, όπου και μεσολαβεί των δράσεων της με έναν ενδογενή τρόπο, όπως παρατηρήθηκε σε Β κύτταρα ποντικού.³

Η διαφορική έκφραση του mRNA του Lse τόσο στην *in vivo* όσο και στην *in vitro* ανάπτυξη υποδηλώνει κάποιο πιθανό ρόλο της απο-Ο-ακετυλίωσης των σιαλικών οξέων σε αναπτυξιακές διεργασίες, όπως η οργανογένεση και η κυτταρική διαφοροποίηση, αφού τροποποίηση αυτών μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης, όπως η εμβρυογένεση.^{22,23} Μια ενδιαφέρουσα πτυχή που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι η Lse μπορεί να εκφράζεται διαφορικά σε διαδοχικά βήματα της οντογένεσης των διαφορετικών τύπων κυττάρων του αίματος,² όπως επίσης και κυττάρων του ανοσιακού συστήματος. Πάντως, το μοτίβο της έκφρασης της Lse φαίνεται να περιλαμβάνει απουσία ή χαμηλή έκφραση σε πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης, αλλά υψηλή σε μεταγενέστερα στάδια.

1.3. Η κυτταροπλασματική ισομορφή της SIAE

Η Cse αναφέρθηκε προηγουμένως ότι είναι η ισομορφή εκείνη της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος που προκύπτει από το μεταγραφικό ποικιλόμορφο 2, έχει μοριακή μάζα 54 kDa, και διαφέρει από το ποικιλόμορφο 1 στην 5'-UTR και στην κωδικοποιούσα περιοχή.¹ Πράγματι, η ώριμη Cse στον άνθρωπο στερείται των πρώτων 35 αμινοξέων και συνεπώς του σηματοδοτικού πεπτιδίου (1-23 αμινοξέα) με αποτέλεσμα τη στόχευση του πρωτεϊνικού προϊόντος στο κυτταρόπλασμα, ενώ παράλληλα διατηρείται η δραστηριότητα εστεράσης.¹⁹ Η απουσία ωστόσο ενός μοναδικού καταλοίπου κυστεΐνης από την πρωτοταγή αμινοξική της αλληλουχίας, την καθιστά λιγότερο σταθερό ένζυμο σε σύγκριση με την Lse. Η Cse φαίνεται να παρουσιάζει μάλλον ιστοειδική έκφραση, με το ισχυρότερο σήμα να εντοπίζεται στον εγκέφαλο και στην ωθήκη και να ανιχνεύεται μερικώς στο ήπαρ και στο θύμο αδένιο στο ποντίκι.¹⁹ Σε αντίθεση με την Lse, η Cse έχει προταθεί ως ένα ένζυμο «ανακύκλωσης» που δρα στην ελεύθερη κυτταροπλασματική δεξαμενή των 9-Ο-ακετυλιωμένων Sias, ρυθμίζοντας τα επίπεδά τους και εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανακύκλωσή τους, καθώς οι Ο-ακετυλιωμένες μορφές του Sia είναι φτωχά υποστρώματα για διάφορα ένζυμα του μεταβολικού τους μονοπατιού.²⁴ Έτσι, η Cse πιθανώς «διασώζει» οποιοδήποτε 9-Ο-ακετυλιωμένο σιαλικό οξύ έχει διαφύγει της δράσης της λυσοσωμικής εστεράσης, ώστε να μπορέσει να εισέλθει ξανά στο μεταβολικό

του μονοπάτι. Ωστόσο, νεότερες μελέτες υποδηλώνουν ότι είναι πιθανόν να υπάρχουν ένα ή περισσότερα άλλα γονίδια που μπορούν να δημιουργήσουν δραστικότητα Cse σε άλλους ιστούς, που συνεπάγεται μία ακόμη μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στις μορφές του μηνύματος και στο πολυπεπτίδιο το οποίο μπορεί να προέρχεται από το γονίδιο *Lse*. Συνεπώς, προκύπτει ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί η ρύθμιση της SIAE σε μοριακό επίπεδο, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης του υποκινητή, προκειμένου να αποδειχθεί η πιθανολογούμενη διαφορική χρήση του.¹⁹

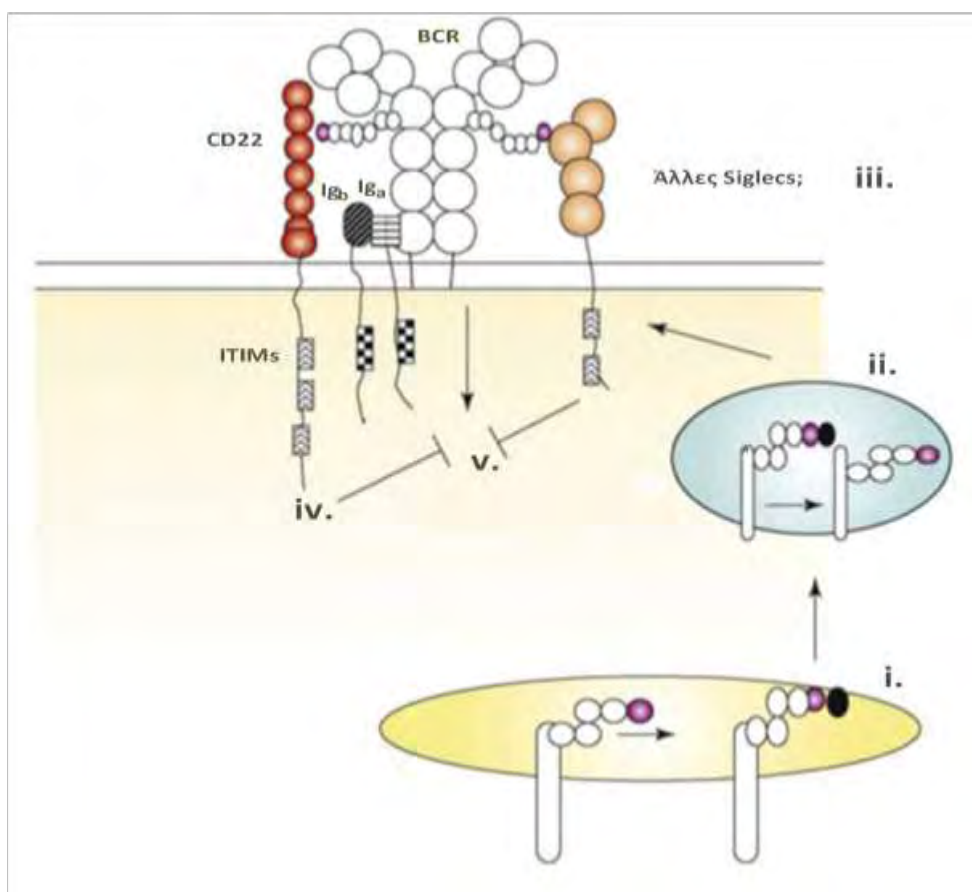
1.4. Η διαμεσολάβηση της περιφερικής ανοχής των B-κυττάρων από την καταστολή της BCR σηματοδότησης από το SIAE-Siglec-Lyn-SHP-1 μονοπάτι

Η SIAE αναφέρθηκε προηγουμένως ότι είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό των σιαλικών οξέων, με απομάκρυνση των 9-O-ακετυλομάδων από αυτά. Η ταυτοποίησή της ως ένα γονίδιο που ρυθμίζεται ανοδικά κατά την ωρίμανση των B-κυττάρων υπέδειξε κάποιο δραστικό ρόλο γι' αυτήν στην βιολογία των B-κυττάρων.² Πράγματι, πειράματα έδειξαν ότι το ένζυμο αυτό μπορεί να λειτουργεί με έναν B-κυτταρικό εγγενή τρόπο *in vivo*, συμμετέχοντας σε ένα μονοπάτι που μεσολαβείται από ανασταλτικά μέλη της οικογένειας των Siglecs και κυριότερα του CD22, με στόχο την παρεμπόδιση της BCR σηματοδότησης.³ Ο CD22 εκφράζεται ιδιосуστατικά σε ώριμα B-κύτταρα και είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση του σήματος του αντιγονικού υποδοχέα ως απόκριση σε μηνύματα του μικροπεριβάλλοντος,²⁵ προκειμένου να διασφαλιστεί ότι μια κατάλληλη χυμική απάντηση έναντι των παθογόνων θα λάβει χώρα, αλλά παράλληλα αποφεύγονται η αντιδραστικότητα προς τα αυτοαντιγόνα και η αυτοανοσία.²⁶ Το μόριο αυτό έχει τη δυνατότητα να συνδέεται σε N-γλυκάνες που φέρουν α2,6 συνδεδεμένα σιαλικά οξέα, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών IgM και IgG.²⁷ Ωστόσο, *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι ο CD22 μπορεί να προσδέσει μόνο συνδέτες που περιέχουν α2,6 συνδεδεμένο σιαλικό οξύ, το οποίο δεν είναι ακετυλιωμένο στην 9-OH θέση και είναι πιθανόν, η λειτουργία αυτής της Siglec να ρυθμίζεται *in vivo* με ενζυμική αποακετυλίωση των σιαλικών οξέων από την SIAE.

Η έναρξη της ανασταλτικής σηματοδότησης από τον CD22 δεν είναι πλήρως κατανοητή και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει αντιφατικός. Το απλούστερο μοντέλο που μπορεί έμμεσα να εξαχθεί από το φαινότυπο knock-out ποντικών,²⁸ προτείνει ότι η διασταυρούμενη σύνδεση του BCR από το αντιγόνο συμβάλλει σε μία εξαρτώμενη από το σιαλικό οξύ στρατολόγηση του CD22 στον BCR και στην επακόλουθη φωσφορυλίωση των CD22 ITIM τυροσινών.²⁹ Το γεγονός αυτό απαιτεί τη δραστικότητα της Lyn,³⁰ μιας πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης της Src οικογένειας, που συγκεντρώνεται σε λιπιδιακές σχεδίες, και πιστεύεται ότι είναι επίσης υπεύθυνη εν μέρει για την φωσφορυλίωση των Igα (CD79a) και Igβ (CD79b) αλυσίδων του BCR συμπλόκου.³¹ Με την φωσφορυλίωση των τυροσινών του CD22, σχηματίζονται θέσεις προσάραξης για έναν αριθμό πρωτεϊνών που φέρουν SH2-επικράτεια, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης SHP-1,³² που δρα για την αποφωσφορυλίωση συστατικών του BCR σηματοδοτικού καταρράκτη προκειμένου να πραγματοποιήσει μια απόσβεση του BCR σήματος. Στόχοι της SHP-1 φαίνεται να αποτελούν οι Van-1, CD19 και SLP65/BLNK,³²⁻³⁴ όλοι εκ των οποίων εμπλέκονται θετικά στην Ca²⁺ σηματοδότηση. Ένας

άλλος πιθανός στόχος της SHP-1 είναι η ATPάση-ασβεστίου της πλασματικής μεμβράνης (PMCA4), που προάγει τη Ca^{2+} απελευθέρωση και την εξασθένηση του BCR σήματος.³³

Ποντικοί με μετάλλαγμα στο *SIAE* αναπτύσσουν υψηλά επίπεδα ορισμένων μεταστροφής τάξης ανοσοσφαιρινών, συμπεριλαμβανομένων των IgE και IgG_{2b}, υψηλούς τίτλους αντιπυρηνικών αντισωμάτων και κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων σε νεαρή ηλικία και εμφανή- εξαρτώμενη από ενεργοποίηση -μείωση των λεμφοζιδιακών B-κυττάρων, επιδεικνύοντας έναν πιο σοβαρό φαινότυπο σε σχέση με αυτό των ποντικών που στερούνται του CD22. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν έμμεσα ότι η SIAE όχι μόνο εξασθενεί τη CD22 λειτουργία, αλλά μπορεί επίσης να ρυθμίσει, ενδεχομένως, μία πρόσθετη Siglec ή Siglecs σε B-κύτταρα (π.χ. Siglec 10).³⁴ Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι το Lyn-CD22-SHP-1 μονοπάτι αναστολής μεσολαβεί στη B-κυτταρική ανοχή μόνο σε ώριμα B-κύτταρα,³⁵ επομένως το SIAE σημείο ελέγχου πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην περιφερική ανοχή των B-κυττάρων. Η συγκεκριμένη οδός, η οποία ανταγωνίζεται βιοχημικά αυτής των σιαλομεταφορασών, αποσβένει την BCR σηματοδότηση και μεταλλάξεις σε αυτή πιθανώς συμβάλλουν στην αυτοανοσία προκαλώντας αυξημένη ισχύ του BCR σήματος (Εικόνα 1).

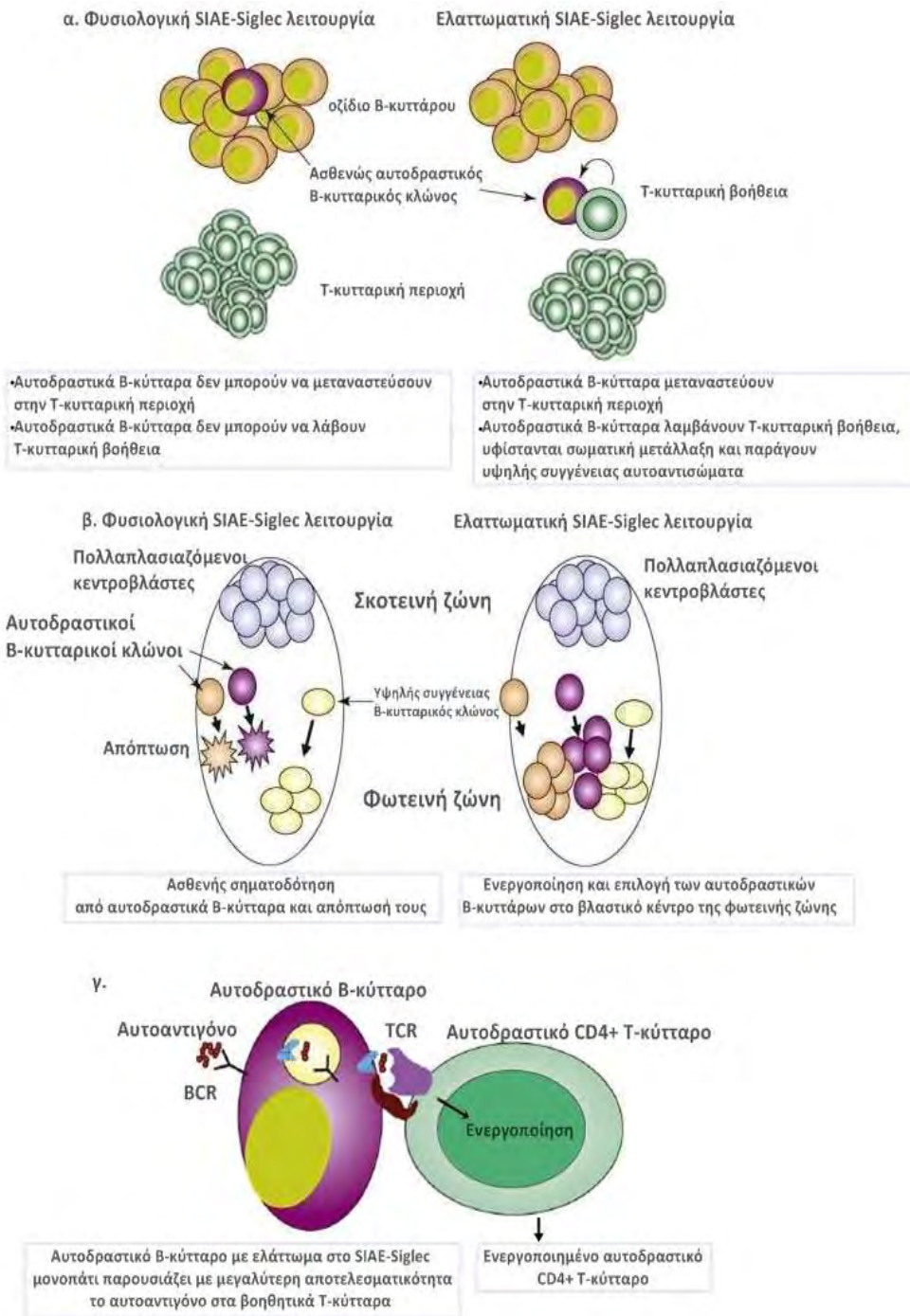


Εικόνα 1: Το SIAE-Siglec μονοπάτι για την αναστατική σηματοδότηση. i. Ο BCR και άλλες μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες φέρουν N-γλυκάνες με τελικά $\alpha 2,6$ συνδεδεμένα σιαλικά οξέα ακετυλιωμένα στην 9-OH θέση από μία SIAE, ii. Τα ακετυλιωμένα τμήματα μπορούν να αφαιρεθούν με αποακετυλίωση, από τη SIAE, είτε σε κυστίδια είτε στην κυτταρική επιφάνεια, iii. Η αποακετυλίωση των σιαλικών οξέων της N-γλυκάνης επιτρέπει την αλληλεπίδραση με Siglecs όπως ο CD22, μεταξύ άλλων. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση φωσφατασών, όπως η SHP-1, στις ITIMs των Siglecs iv., και κατά συνέπεια την αναστολή της BCR σηματοδότησης v.³⁶

Παρόλο που οι CD22, SHP-1 και Lyn έχουν προταθεί ότι μεσολαβούν της ανοχής με λεπτό συντονισμό της BCR σηματοδότησης,³⁷ και θέτοντας έναν ουδό για την ενεργοποίηση του Β-κυττάρου,³⁸ δεν έχει τεκμηριωθεί ο ακριβής μηχανισμός επαγωγής της ανοχής μέσω αυτής της οδού. Έχουν υποτεθεί τρία πιθανά σενάρια για την κρισιμότητα αυτού του βιοχημικού μονοπατιού στην περιφερική Β-κυτταρική ανοχή (Εικόνα 2). Ασθενώς αυτοδραστικά Β-κύτταρα μπορεί να διατηρούνται σε μία ανενεργή κατάσταση από τη SIAE-Siglec-Lyn-SHP-1 σηματοδότηση, με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση να εσωτερικεύσουν αποτελεσματικά συγγενή αυτοαντιγόνα. Μπορούν επίσης να είναι ανάκανα να επάγουν τον υποδοχέα χημειοκίνης CCR7, ως επακόλουθο της συνάντησης με αυτοαντιγόνα, με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση, στο άγριου τύπου πλαίσιο, να κινηθούν προς τη ζώνη των Τ-κυττάρων για να εξασφαλίσουν Τ-κυτταρική βοήθεια. Αν ένα συστατικό του SIAE-Siglec-Lyn-SHP-1 μονοπατιού είναι λειτουργικά ελαττωματικό, η BCR σηματοδότηση μπορεί να είναι αρκετά ισχυρή ώστε να διευκολυνθεί η επαγωγή του CCR7, η βέλτιστη εσωτερίκευση των συμπλόκων που περιέχουν αυτοαντιγόνο, και η επακόλουθη μετανάστευση του αυτοδραστικού Β-κυττάρου προς την Τ-κυτταρική ζώνη. Ταυτόχρονη διακοπή στην Τ-κυτταρική ανοχή ή σχηματισμός ενός παροδικού συμπλόκου μεταξύ αυτοαντιγόνου και μίας μη «ίδιας» πρωτεΐνης, κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης (π.χ. ιογενούς), ενδέχεται να επιτρέψει την παροχή βοήθειας από τα Τ-κύτταρα σε ένα ασθενώς αυτοδραστικό Β-κύτταρο με ελάττωμα στην ανασταλτική σηματοδότηση. Ένα τέτοιο Β-κύτταρο θα μπορούσε συνεπώς να είναι σε κίνδυνο για σωματική μετάλλαξη και επακόλουθη παραγωγή υψηλής συγγένειας αυτοαντισωμάτων (Εικόνα 2α).³⁶

Μια άλλη πιθανή ανατομική θέση για τη διατήρηση της ανοχής από το SIAE-Siglec-Lyn-SHP-1 μονοπάτι είναι το ίδιο το βλαστικό κέντρο. Έχει προταθεί ότι η ενισχυμένη BCR σηματοδότηση είναι ίσως μία απαραίτητη προϋπόθεση για το σωστό σχηματισμό του βλαστικού κέντρου, αλλά δεν είναι σαφές κατά πόσο τα κεντροκύτταρα της φωτεινής ζώνης εκφράζουν λειτουργικούς CD22 συνδέτες. Από την άλλη πλευρά, η ανασταλτική σηματοδότηση σε κεντροκύτταρα αποτρέπει την επιλογή των αυτοδραστικών μεταλλαγμένων Β-κυτταρικών κλώνων κι ένα ελάττωμα στην ανασταλτική σηματοδότηση αυτών μπορεί να επιτρέψει την επέκταση των αυτοδραστικών Β-κυττάρων, που διαφορετικά δεν θα είχαν επιτύχει το σηματοδοτικό ουδό για την επιλογή τους από τα αντιγόνα που παρουσιάζονται σε λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 2β).

Η εμπλοκή των Β-κυττάρων στην αυτοανοσία, δεν περιορίζεται μόνο στο σχηματισμό αυτοαντισωμάτων. Είναι πιθανόν ότι σε ορισμένες αυτοάνοσες διαταραχές η αποτελεσματική παρουσίαση των αυτοαντιγόνων σε αυτοδραστικά Τ-κύτταρα απαιτεί αυτοδραστικά Β-κύτταρα στη διαδικασία της παθογένεσης. Ένα ελάττωμα στο SIAE-Siglec-Lyn-SHP-1 μονοπάτι μπορεί να διευκολύνει την ικανότητα των ασθενώς αυτοδραστικών Β-κυττάρων να εσωτερικεύουν αυτοαντιγόνα και να τα παρουσιάζουν με έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο σε βοηθητικά Τ-κύτταρα, των Th17 ή Th1 υποσυνόλων, μεταξύ άλλων (Εικόνα 2γ). Ένα τέτοιο σενάριο θα μπορούσε να ισχύει σε περιπτώσεις νοσημάτων όπως η πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας.



Εικόνα 2: Πιθανοί μηχανισμοί μεσολάβησης της SIAE-Siglec οδού στην Β-κυτταρική ανοχή. α. Εντός των οξιδίων Β-κυττάρου των λεμφαδένων, ανασταλτικά σήματα εμποδίζουν ασθενώς αυτοδραστικά Β-κύτταρα από το να μεταναστεύσουν στην Τ-κυτταρική ζώνη και να λάβουν Τ-κυτταρική βοήθεια με τη μορφή των ενεργοποιημένων σημάτων. Σε αντίθεση, η ελαττωματική ανασταλτική σηματοδότηση μέσω του SIAE-Siglec μονοπατιού επιτρέπει σε αυτοδραστικά Β-κύτταρα να μεταναστεύσουν στην Τ-κυτταρική ζώνη όπου λαμβάνουν Τ-κυτταρική βοήθεια, υφίστανται σωματική μετάλλαξη και εκκρίνουν αυτοαντισώματα υψηλής συγγένειας. β. Εντός του βλαστικού κέντρου, η ανασταλτική σηματοδότηση αποτρέπει τα αυτοδραστικά Β-κύτταρα από το να επιλεγούν θετικά στη φωτεινή ζώνη. Εξασθένηση της SIAE-Siglec αναστολής αυξάνει την πιθανότητα επιλογής των χαμηλής συγγένειας αυτοδραστικών Β-κυτταρικών κλώνων. γ. Ανασταλτικά σήματα που προκαλούνται από το SIAE-Siglec μονοπάτι εμποδίζουν φυσιολογικά τα Β-κύτταρα από το να υπηρετούν ως αποτελεσματικά αυτοαντιγονοπαραρσιαστικά κύτταρα· ωστόσο διακοπή αυτής της οδού επιτρέπει την Β-κυτταρική παρουσίαση σε αυτοδραστικά Τ-κύτταρα.³⁶

Ανωμαλίες στη SIAE θα μπορούσαν να συσχετιστούν επίσης με την παρουσία διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων, και συνεπώς, η κατανόηση των πιθανών μηχανισμών με τους οποίους αυτή η εστεράση και τα βιοχημικά της ανάλογα συμβάλλουν στην ανοχή και την αυτοανοσία θα μπορούσε τελικά να αποδειχθεί θεραπευτικής σημασίας.

1.5. Γενετικές βλάβες του γονιδίου SIAE και αυτοανοσία

Η ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων σε ποντίκια με μετάλλαξη στο SIAE οδήγησε τους ερευνητές στο να διερευνήσουν αν το ένζυμο αυτό θα μπορούσε να συσχετιστεί με την παρουσία αυτοανοσίας στον άνθρωπο. Αν και η πανγενωμική μελέτη σύνδεσης δεν αποκάλυψε κάποια τροποποιημένη συχνότητα των κοινών ποικιλομόρφων του SIAE σε ασθενείς με αυτοανοσία, η πιθανότητα για σπάνια ποικιλόμορφα απώλειας λειτουργίας αυτού του γονιδίου σε αυτοάνοσες διαταραχές διερευνήθηκε με εκ νέου αλληλούχιση όλων των εξονίων του SIAE σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με αυτοανοσία (NIA, σκλήρυνση κατά πλάκας, PA, σύνδρομο Sjogren, ΣΕΛ, διαβήτη τύπου 1, ελκώδης κολίτιδα) και υγιών ατόμων Ευρωπαϊκής προέλευσης, από τους Surolija et al. Η αλληλούχιση αυτή υπέδειξε μια ισχυρή σύνδεση σπάνιων ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας με τα αυτοάνοσα νοσήματα που ελέγχθηκαν, προτείνοντας ότι η ρυθμιστική λειτουργία του ενζύμου αυτού δεν περιορίζεται στα τρωκτικά. Ο λόγος των πιθανοτήτων για την κληρονόμηση των ελαττωματικών αλληλομόρφων του SIAE ήταν 8.6 σε όλους τους ασθενείς με αυτοανοσία, 8.3 στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, και 7.9 στους ασθενείς με διαβήτη τύπου I.

Ένας αριθμός ετερόζυγων σπάνιων ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας της βλαστικής σειράς, που ενέπλεκαν κατά κύριο λόγο κατάλοιπα συντηρημένα κατά τη διαδικασία της εξέλιξης, ταυτοποιήθηκε σε 19 από τους 923 ασθενείς με αυτοανοσία που εξετάστηκαν. Τα ποικιλόμορφα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως «λειτουργικώς ελαττωματικά», είτε λόγω ενός ελαττώματος στη καταλυτική δραστηριότητα κάτω από το 50% ή εξαιτίας ενός ελαττώματος στην έκκριση (απουσία καταλυτικού ελαττώματος). Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε μια ομάδα παρερμηνεύσιμων ποικιλομόρφων με σοβαρό καταλυτικό ελάττωμα, η οποία περιλάμβανε τα c.935C>T, c.587G>T, c.926A>C, c.634G>A, c.1435C>T, c.1178G>A, και c.688C>T που κωδικοποιούν τα SIAE(T312M), SIAE(C196F), SIAE(Q309P), SIAE(G212R), SIAE(R479C), SIAE(R393H) και SIAE(R230W), αντίστοιχα. Τα ποικιλόμορφα αυτά βρέθηκε ότι εκκρίνονται ελάχιστα, πιθανώς επειδή πρόκειται για μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες που αποτυγχάνουν να διαφύγουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Λιγότερο σοβαρά ως προς την λειτουργικότητά τους ήταν τα c.796T>G [SIAE(C266G)], c.1046A>G [SIAE(Y349C)] και c.1211T>C [SIAE(F404S)] ποικιλόμορφα, ενώ προσδιορίστηκε και μία ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη (c.143G>A, W48X) σε έναν ασθενή με διαβήτη τύπου I, η οποία όμως δεν ελέγχθηκε λειτουργικά. Η SIAE(F404S) βρέθηκε σε 4 ασθενείς με αυτοανοσία συμπεριλαμβανομένων δύο συγγενών εξ αίματος, έναν με ΣΕΛ και έναν εκ των 33 ασθενών με NIA που μελετήθηκαν, χωρίς όμως να αναφέρονται στοιχεία για την μορφή της NIA από την οποία έπασχαν οι ασθενείς αυτοί. Παράλληλα, ένας αριθμός σπάνιων ποικιλομόρφων του SIAE (N33S, A3G, K400N) με φυσιολογική δραστηριότητα ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς, τα οποία προφανώς δεν εμπλέκονται στη γενετική προδιάθεση αυτών των ατόμων στην αυτοανοσία. Όλες οι ετερόζυγες μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του SIAE που ταυτοποιήθηκαν ήταν

σε θέση να λειτουργούν με έναν επικρατούντα αρνητικό τρόπο. Ωστόσο, η ίδια ομάδα ερευνητών πρότεινε ότι η απλοανεπάρκεια δύναται να είναι ένας άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης κάποιων από τα ελαττωματικά ποικιλόμορφα, που θα μπορούσε να οδηγήσει στη μείωση των επιπέδων του καταλυτικά ενεργού ενζύμου σε Β-κύτταρα, κάτω από ένα όριο. Αυτό θα συνεπαγόταν ότι η W48X μετάλλαξη θα μπορούσε να έχει κάποια κλινική σημαντικότητα.

Όσον αφορά την παρουσία λειτουργικώς ελαττωματικών ποικιλομόρφων στους φυσιολογικούς μάρτυρες, μόνο 2 έφεραν τις R314H και T312M βλάβες, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των ποικιλομόρφων που προσδιορίστηκαν σε αυτούς εμφάνισαν φυσιολογική δραστικότητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση ενός πολυμορφικού ποικιλομόρφου, του c.265A>G [SIAE(M89V)], το οποίο ταυτοποιήθηκε σε ομοζυγωτία μόνο στους ασθενείς με αυτοανοσία (ΡΑ, ΣΕΛ, πολλαπλή σκλήρυνση, διαβήτη τύπου Ι). Μάλιστα, ο 89V πολυμορφισμός σε ετερόζυγη κατάσταση ήταν αρκετά κοινός στους υγιείς μάρτυρες (σε ποσοστό 9,7%). *In vitro* πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων φανέρωσαν ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το 89V πολυμορφικό αλληλίο του SIAE είναι καταλυτικά δραστική, αλλά δεν εκκρίνεται. Ωστόσο, επειδή το συγκεκριμένο ποικιλόμορφο δεν μπορεί να δράσει με έναν επικρατούντα αρνητικό τρόπο, όπως τα υπόλοιπα, υποτέθηκε ότι μόνο σε ομοζυγωτία θα μπορούσε να προδιαθέσει σε αυτοανοσία. Δεδομένου του ελαττώματος στην έκκριση αυτού του ποικιλομόρφου, θεωρήθηκε πιθανό ότι σε άτομα με ομόζυγο 89V/89V SIAE αυτή η εστεράση δεν είναι σε θέση να έχει αποτελεσματική πρόσβαση σε ένα post-Golgi σωμάτιο, όπου φυσιολογικά θα απο-9-ακετυλίωνε Ο-ακετυλιωμένες σιαλογλυκοπρωτεΐνες που χρησιμεύουν ως συνδέτες του CD22.

Διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία σπάνιων γενετικών ποικιλομόρφων με την επιδεκτικότητα στην ανάπτυξη λιγότερο συχνών νοσημάτων.^{39,40} Τα αποτελέσματα της ομάδας αυτής ωστόσο παρείχαν μία σημαντική ένδειξη για ένα ρόλο των σπάνιων γονοτύπων του SIAE στην προδιάθεση για σχετικά συχνά αυτοάνοσα νοσήματα, υποδηλώνοντας παράλληλα τη σημασία των λειτουργικών δοκιμών των εκάστοτε ποικιλομόρφων που μελετούνται. Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν μάλιστα ότι η SIAE μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλα νοσήματα, στα οποία τα Β-κύτταρα δεν είναι απαραίτητα αιτιοπαθογενούς σημασίας, όπως της πολλαπλής σκλήρυνσης, της νόσου του Crohn, της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, λόγω της ικανότητας αυτοαντιγονοειδικών Β-κυττάρων να δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία μέσω των κυτταροκινών που εκκρίνουν, οδηγούν την πόλωση βοηθητικών Τ-κυτταρικών πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων των Th1 και Th17 υποσυνόλων, που εμπλέκονται στην παθογένεια διαφόρων νοσημάτων. Η πιθανότητα η SIAE να είναι λειτουργικής σημασίας και για τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και ως εκ τούτου να επηρεάζει τη παθογένεση ασθενειών, αξίζει επίσης να διερευνηθεί.⁴

Ωστόσο, η μελέτη των Szymanski et al σχετικά με το M89V γονότυπο του SIAE σε ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι, νόσο του Grave και σε φυσιολογικούς μάρτυρες σε έναν Πολωνικό πληθυσμό, έδειξε ότι η επικράτηση του ομόζυγου M89V ποικιλομόρφου ήταν παρόμοια μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Το SIAE είναι ένας ιδιαίτερα ελκυστικός υποψήφιος γενετικός τόπος ευπάθειας για νοσήματα όπως η νόσος του Grave, που χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία της Β-κυτταρικής ανοχής και από υπεραυξημένους τίτλους θυρεοειδών αυτοαντισωμάτων.⁴¹ Η ασυμφωνία μεταξύ αυτής της μελέτης και των Surolija et al⁴ θεωρήθηκε ότι μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στην παθογένεση των νοσημάτων

που εξετάστηκαν μεταξύ του Πολωνικού πληθυσμού και των πληθυσμών της Δυτικής Ευρώπης, πιθανώς λόγω ποικίλων εθνικών ή και περιβαλλοντικών παραγόντων. Υπάρχει ωστόσο και η πιθανότητα η ομάδα των *Suroliá et al* να υπερεκτίμησε το μέγεθος της επίδρασης των ποικιλομόρφων του *SIAE*. Η ομάδα αυτή πρότεινε ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες προκειμένου η ισχυρή επίδραση αυτών των ποικιλομόρφων στην επιδεκτικότητα για ανάπτυξη κάποιας αυτοάνοσης διαταραχής να γίνει καθολικά αποδεκτή.

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της μελέτης των *Hunt et al* που προσπάθησαν να επεκτείνουν τα ευρήματα των *Suroliá et al* σε μια πολύ μεγαλύτερη ανεξάρτητη μελέτη 66.924 ατόμων με αυτοάνοσα και χρόνια ανοσολογικά νοσήματα (ατοπικό έκζεμα, κοιλιοκάκη, νόσος του Crohn, νόσος Grave, νόσος Hashimoto, NIA, πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σαρκοείδωση, ΣΕΛ, διαβήτης τύπου I και ελκώδης κολίτιδα) και φυσιολογικών μαρτύρων, από πέντε γεωγραφικές περιοχές Ευρωπαϊκής προέλευσης. Οι ερευνητές αυτοί εστίαστηκαν στη μελέτη του M89V και 8 εκ των 11 σπάνιων λειτουργικώς ελαττωματικών ποικιλομόρφων του *SIAE* και διαπίστωσαν παρόμοια επικράτηση του ομόζυγου M89V γονιότυπου και των υπόλοιπων ποικιλομόρφων του *SIAE* μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.⁵ Τα ευρήματά τους ισχυροποίησαν την άποψη ότι η παρουσία μη συνώνυμων ποικιλομόρφων λειτουργικής σημασίας σε ένα γονίδιο, μπορεί να μη σχετίζεται με την επιδεκτικότητα για την ανάπτυξη κάποιου νοσήματος, δεδομένου ότι υπάρχουν πολλές χιλιάδες λειτουργικά ποικιλόμορφα τα οποία δεν επηρεάζουν τον φαινότυπο, τονίζοντας έτσι τη σημασία της ανάλυσης οικογενειών σε τέτοιες μελέτες. Στο ίδιο μοτίβο κινήθηκαν και τα ευρήματα των *Gan et al*, που μελέτησαν το ρόλο 9 λειτουργικώς ελαττωματικών σπάνιων ποικιλομόρφων βλαστικής σειράς (C196F, T312M, C226F, F404S, R230W, R479C, W48X, Y349C and M89V) του *SIAE* σε 378 ασθενείς με νόσο Addison και σε 387 υγιείς μάρτυρες, με βάση την υπόθεση ότι σπάνια γενετικά ποικιλόμορφα κατέχουν σημαντικότερο ρόλο στην επιδεκτικότητα σε λιγότερο διαδεδομένα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η νόσος του Addison. Αυτοί ταυτοποίησαν 4 ασθενείς που έφεραν σε ομοζυγωτία τη M89V και σε ετεροζυγωτία τις T312M και C196F, με τη τελευταία να έχει βρεθεί και σε ένα φυσιολογικό μάρτυρα. Όλοι αυτοί οι ασθενείς έπασχαν παράλληλα κι από άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, στο φάσμα του τύπου 2 αυτοάνοσου συνδρόμου πολυενδοκρινολοπίας. Αν και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ήταν αρνητικά, οι ερευνητές πρότειναν ότι μία μελλοντική μελέτη ενός μεγαλύτερου πληθυσμού ατόμων με νόσο Addison ή μία οικογενειακή μελέτη γενετικής συσχέτισης θα μπορούσε να συνδράμει στη διαλεύκανση της συμβολής σπάνιων ποικιλομόρφων του *SIAE* στη παθογένεια του νοσήματος αυτού.⁴²

Η εκ νέου αλληλούχιση των 10 εξονίων του γονιδίου *SIAE* και οι λειτουργικές δοκιμές, από τους *Hirschfield et al*, σε 381 ασθενείς με PBC αποκάλυψε έξι ασθενείς με λειτουργικές μη συνώνυμες μεταλλάξεις στο *SIAE*, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν και προδιαθεσικούς παράγοντες για την νόσο αυτή. Τα αποτελέσματα έδειξαν συνολικά 12 σημειακές αντικαταστάσεις μεταξύ των ασθενών, 6 από τις οποίες ήταν μη συνώνυμες αλλαγές που βρέθηκαν σε 10 από τους 381 ασθενείς, αλλά παρατηρήθηκαν μόνο σε έναν από τους 648 φυσιολογικούς μάρτυρες. Μεταξύ των μη συνώνυμων πολυμορφισμών, δύο κωδικοποιούν διαφορετικές *SIAE* πρωτεΐνες (τις F404S και T312M, που είναι καταλυτικά ελαττωματικές) και η άλλη τη M89V, που είναι καταλυτικά δραστική αλλά δεν εκκρίνεται. Ακόμη, τρεις νέοι πολυμορφισμοί ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με PBC, οι F199C, P356L και Q382R, εκ

των οποίων το F199C ποικιλόμορφο φάνηκε να παρουσιάζει σοβαρά μειωμένη καταλυτική δραστικότητα και χαμηλή έκκριση σε υπερκείμενα καλλιέργειας, ενώ τα P356L και Q382R ποικιλόμορφα εμφανίζουν φυσιολογική έκκριση.

Μια σύνδεση των *SIAE* ποικιλομόρφων με τη PBC, όπως προέκυψε από τα δεδομένα αυτά, είναι σύμφωνη με τη μη σπάνια εμφάνιση στους ασθενείς με PBC και στις οικογένειες αυτών, άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (PA και ΣΕΛ) που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με *SIAE* παραλλαγές (σε 8 από τις 10 PBC περιπτώσεις με μια λειτουργική *SIAE* βλάβη, ένα μέλος της οικογένειας έπασχε από ένα ή περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα). Η αντιστοιχία μεταξύ της PBC και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων υπονοεί ότι οι παρατηρούμενες συσχετίσεις PBC - *SIAE* μπορεί να αντανακλούν και την παρουσία των άλλων αυτών νοσημάτων. Μελέτες αλληλούχισης ενός πολύ μεγαλύτερου αριθμού ασθενών/φυσιολογικών ατόμων απαιτούνται για να διασαφηνιστεί αυτή η πιθανότητα και να οριοθετηθεί καλύτερα η συχνότητα και οι κυτταρικές συνέπειες των σπάνιων *SIAE* ποικιλομόρφων στη PBC, καθώς και αν οι αλληλεπιδράσεις αυτών με πιο κοινά ποικιλόμορφα προδιαθέτουν για την ανάπτυξη της PBC έναντι άλλου αυτοάνοσου νοσήματος.⁴³

Η ομάδα που πρωτοπεριέγραψε μία σύνδεση των σπάνιων γονοτύπων του *SIAE* με την αυτοανοσία, προχώρησε σε μετανάλυση των αρχικών της δεδομένων αλλά και αυτών από τις μελέτες που ακολούθησαν, σε μία προσπάθεια αποσαφήνισης της πιθανής συμβολής αυτού του γενετικού τόπου στην αυτοανοσία. Εξάιρεση από την ανάλυση αποτέλεσαν γνωστά συχνά μη συνώνυμα ποικιλόμορφα με φυσιολογική καταλυτική δραστικότητα καθώς και το M89V ποικιλόμορφο, το οποίο αν και είχε χαρακτηριστεί από τους ίδιους ως «λειτουργικώς ελαττωματικό», λόγω μηδαμινής έκκρισης, διαπιστώθηκε ότι είναι φυσιολογικό, καθώς η *SIAE* δεν εκφράζεται στην επιφάνεια των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, όπως προέκυψε και από την ανάλυση ανθρώπινου πλάσματος, και αυτή η ελάχιστη έκκριση που παρατηρήθηκε αρχικά ήταν ένα *in vitro* φαινόμενο, χωρίς κάποια αποδεδειγμένη φυσιολογική σημασία. Πρότειναν λοιπόν, ότι η έκκριση της *SIAE per se* δεν θα πρέπει να αποτελεί κριτήριο για τη λειτουργικότητα του ενζύμου. Η μετανάλυση των υπόλοιπων γονοτύπων αποκάλυψε ότι τα ελαττωματικά ποικιλόμορφα του *SIAE* παραμένουν συνδεδεμένα με την αυτοανοσία. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη την πολύ μικρή συχνότητα των καταλυτικά ελαττωματικών σπάνιων βλαβών, η ένταξη ακόμη και ενός μόνο καταλυτικά φυσιολογικού συχνού ποικιλομόρφου υψηλότερης συχνότητας, μπορεί να παρεμποδίσει την ανίχνευση συσχετίσεων που συνδέονται με αυτές τις βλάβες. Επίσης, επειδή η πλειοψηφία όλων αυτών των παραλλαγών που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα (67 σε αριθμό), ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά, είναι πιθανόν ο συνολικός αριθμός των σπάνιων ποικιλομόρφων του *SIAE* να είναι αρκετά μεγάλος. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη μικρή συχνότητά τους που αναφέρθηκε προηγουμένως, υποδηλώνει ότι πλήρης αλληλούχιση του γενετικού τόπου του *SIAE* σε μεγάλα πληθυσμιακά μεγέθη, ακολουθούμενη από λειτουργικές δοκιμές, κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να προσδιορισθεί ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των ελαττωματικών σπάνιων γενετικών ποικιλομόρφων του *SIAE*, ενώ μελέτες γονοτύπησης, ίσως και μεγαλύτερες από αυτή των Hunt et al, μπορεί να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη σύνδεση των ποικιλομόρφων αυτών με την επιδεκτικότητα σε διάφορα νοσήματα.⁴⁴

2. Η ΝΕΑΝΙΚΗ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα είναι μία ετερογενής ομάδα πολυπαραγοντικών νοσημάτων, που χαρακτηρίζονται από αρθρίτιδα άγνωστης προέλευσης, με ηλικία έναρξης κάτω των 16 ετών και διάρκειας άνω των 6 εβδομάδων. Πρόκειται για το πιο κοινό χρόνιο ρευματικό νόσημα της παιδικής ηλικίας, που λόγω της χρόνιας φλεγμονής των αρθρώσεων, οδηγεί συχνά σε βραχύβια και μακρόβια αναπηρία. Η επίπτωση της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 0.07 έως 4.01 ανά 1000 παιδιά ανά έτος, ενώ ο επιπολασμός της από 0.008 έως 0.226 περιπτώσεις ανά 1000 παιδιά, και φαίνεται να διαφέρουν κατά εθνικότητα και γεωγραφική περιοχή.⁴⁵ Στην Ελλάδα, αναμένεται ότι κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 1000 νέες περιπτώσεις ΝΙΑ. Στα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνονται γενικότερα ο πόνος, το οίδημα, η ευαισθησία, η θερμότητα και η δυσκαμψία των αρθρώσεων, με διάρκεια περισσότερο από 6 συνεχόμενες εβδομάδες. Με βάση τον αριθμό των αρθρώσεων που προσβάλλονται κατά τους πρώτους 6 μήνες του νοσήματος, καθώς και την εξωαρθρική εμπλοκή, διακρίνονται 7 διαφορετικές μορφές αυτής (ταξινόμηση ILAR): επιμένουσα ή επεκταθείσα ολιγοαρθρίτιδα, πολυαρθρίτιδα με θετικούς ή αρνητικούς ρευματοειδείς παράγοντες, συστηματική, ψωριασική, αρθρίτιδα σχετιζόμενη με ενθεσίτιδα και άλλες αδιαφοροποίητες αρθρίτιδες.⁴⁶

Κάθε μορφή χαρακτηρίζεται από διακριτές κλινικές και εργαστηριακές εκδηλώσεις, πρόγνωση και, κατά πάσα πιθανότητα, αιτιοπαθογένεση. Η ολιγοαρθρική ΝΙΑ, για την οποία δεν συναντάται ισοδύναμη μορφή στους ενήλικες, προσβάλλει μέχρι και 4 αρθρώσεις κατά την εμφάνισή της (συνήθως μεγάλες, και ιδιαίτερα τα κάτω άκρα, με το γόνατο να είναι η πιο συχνά προσβαλλόμενη άρθρωση, ακολουθούμενη από τον αστράγαλο), ενώ συμμετρική αρθρική προσβολή παρατηρείται σε λιγότερο από το ένα τρίτο των περιπτώσεων.^{47,48} Η πολυαρθρική ΝΙΑ προσβάλλει 5 ή περισσότερες μεγάλες ή μικρές αρθρώσεις κατά την έναρξη, συνηθέστερα τις μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις και τους καρπούς,⁴⁹ όπου η συμμετρική συμμετοχή των μεγάλων και μικρών αρθρώσεων των χεριών και των ποδιών είναι τυπική της θετικής για τον RF πολυαρθρικής ΝΙΑ, το παιδιατρικό ισοδύναμο της ρευματοειδούς αρθρίτιδας των ενηλίκων. Η συστηματική ΝΙΑ χαρακτηρίζεται από εξάρσεις πυρετού, ένα τυπικό παροδικό εξάνθημα, ορογονίτιδα, λεμφαδενοπάθεια και ηπατοσπληνομεγαλία. Ομοιάζει κλινικά με τη νόσο Still των ενηλίκων, με τα περισσότερα από αυτά τα παιδιά να αναπτύσσουν μετέπειτα μια πολυαρθρική νόσο με συμμετοχή τόσο των μεγάλων όσο και των μικρών αρθρώσεων (συχνότερα των καρπών και των αστραγάλων).⁷ Άλλες μορφές της ΝΙΑ, αν και ιδιοπαθείς στην αιτιολογία τους, συνοδεύουν άλλα νοσήματα. Ένα παράδειγμα είναι η ψωριασική αρθρίτιδα, η οποία, συχνά, μοιάζει με την ολιγοαρθρίτιδα ή την RF⁻ πολυαρθρίτιδα, παρά το γεγονός ότι προσβάλλει συνήθως τις μικρές αρθρώσεις.⁵⁰ Ομοίως, η αρθρίτιδα σχετιζόμενη με ενθεσίτιδα ομοιάζει αρχικά με την ολιγοαρθρίτιδα, στο ότι προσβάλλει τις αρθρώσεις των κάτω άκρων, αν και δεν επηρεάζει την ιερολαγόνια άρθρωση συνήθως για χρόνια. Τέλος, η αδιαφοροποίητη αρθρίτιδα περιλαμβάνει όλα εκείνα τα νοσήματα που δεν πληρούν τα κριτήρια για να καταταγούν σε κάποια από τις παραπάνω 6 μορφές, ή αυτά τα νοσήματα που πληρούν περισσότερα από ένα κριτήρια, με βάση τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε περισσότερες της μίας αυτών των υποκατηγοριών.⁵¹

Αν και η ακριβής αιτιολογία της ΝΙΑ παραμένει άγνωστη, παρόλα αυτά θεωρείται αυτοάνοσο νόσημα, ως αποτέλεσμα της ανοσιακής απάντησης που προκαλείται ή ενεργοποιείται μέσω

περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. μολυσματικών), σε ένα γενετικά ευαίσθητο ξενιστή. Η συστηματική μορφή είναι αυτή που φέρει κλινικές εκδηλώσεις καθώς και άλλες ομοιότητες με μολυσματικές ασθένειες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι πολυάριθμοι παράγοντες (ψυχολογικοί, το στρες, ο καιρός, το μητρικό κάπνισμα) είναι συντελεστές της πολυπαραγοντικής παθογένεσης της ΝΙΑ και πιθανώς υπεύθυνοι για την έναρξη της νόσου σε ευπαθείς ξενιστές, διαμορφώνοντας δυνητικά και την κλινική της πορεία. Η ερμηνεία των μελετών σχετικά με το ρόλο του περιβάλλοντος στη ΝΙΑ αποτελεί πρόκληση κυρίως λόγω της ετερογένειας των μορφών της.⁴⁶

2.1. Ολιγοαρθρίτιδα

Αν και η μορφή της ολιγοαρθρίτιδας, ως σύνολο, είναι πιθανώς ετερογενής, οι περισσότεροι ασθενείς -τουλάχιστον στις ανεπτυγμένες χώρες- έχουν μία σαφώς ορισμένη νόσο που παρατηρείται μόνο σε παιδιά.^{52,53,54} Η ολιγοαρθρίτιδα, που εμφανίζεται συχνότερα στα κορίτσια απ' ό,τι στα αγόρια, έχει πρώιμη έναρξη (πριν από την ηλικία των 6 ετών), σταθερές συσχετίσεις με το HLA, και χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη αρθρίτιδα που προσβάλλει κυρίως μεγάλες αρθρώσεις (στο 30-50% των περιπτώσεων προσβάλλει μία άρθρωση κατά την έναρξη). Η συμμετοχή των αρθρώσεων των άνω άκρων και η υψηλή ταχύτητα καθίζησης των ερυθροκυττάρων κατά την έναρξη έχουν ταυτοποιηθεί ως προγνωστικοί παράγοντες για την εξέλιξη στον επεκταθέντα φαινότυπο, ο οποίος απαντάται στο 50% περίπου των ασθενών.^{48,47,55} Μολονότι, σύμφωνα με την ILAR ταξινόμηση, η παρουσία οικογενειακού ιστορικού ψωρίασης αποτελούσε ένα κριτήριο εξαίρεσης στη διάγνωση της ολιγοαρθρίτιδας, οι Tsitsami et al⁵⁶ δεν εντόπισαν διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ή χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό ψωρίασης.

Οι πρωτεΐνες οξείας φάσεως είναι συχνά φυσιολογικές ή μετρίως αυξημένες, αν και η ταχύτητα καθίζησης των ερυθροκυττάρων μπορεί να είναι αρκετά υψηλή. Οι ασθενείς εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις ANA (περίπου στο 70-80% των περιπτώσεων), που αντιπροσωπεύουν έναν παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση ιριδοκυκλίτιδας, μιας χρόνιας, μη κοκκιωματώδους, πρόσθιας ραγοειδίτιδας που επηρεάζει την ίριδα και τον άνω και κάτω ταρσό του βλεφάρου και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές διαταραχές της όρασης (Εικόνα 3α). Η ομοιογένεια αυτής της υποομάδας ασθενών αποδεικνύεται από μια ισχυρή συσχέτιση με ορισμένα HLA αλληλόμορφα. Τα κριτήρια ταξινόμησης της ΝΙΑ⁴⁶ διακρίνουν δύο κατηγορίες ολιγοαρθρίτιδας: επιμένουσα ολιγοαρθρίτιδα, στην οποία καθόλη τη διάρκεια της νόσου δεν πάσχουν περισσότερες από 4 αρθρώσεις, και επεκταθείσα ολιγοαρθρίτιδα, όπου μετά τους πρώτους 6 μήνες του νοσήματος, προσβάλλονται περισσότερες από 4 αρθρώσεις. Ωστόσο, οι ασθενείς με επιμένουσα ή επεκταθείσα ολιγοαρθρίτιδα, που είναι θετικοί για ANA έχουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά (π.χ. ηλικία έναρξης, αναλογία φύλου, ασυμμετρία της αρθρικής προσβολής και συχνότητα της ιριδοκυκλίτιδας), η οποία υποδεικνύει έντονα ότι αυτές οι δύο κατηγορίες της ολιγοαρθρίτιδας είναι το ίδιο νόσημα, που διαφέρει μόνο στη δριμύτητα.^{57,58}

2.2. Πολυαρθρίτιδα με θετικούς ρευματοειδείς παράγοντες

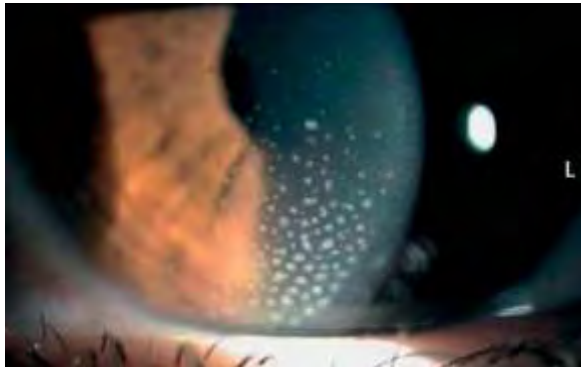
Η θετική για τον ρευματοειδή παράγοντα πολυαρθρίτιδα αποτελεί μία μικρή υποκατηγορία της ΝΙΑ (αφορά το 5% των ασθενών), η οποία προσβάλλει 5 ή περισσότερες αρθρώσεις κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 μηνών της νόσου, ενώ τουλάχιστον δύο εξετάσεις για την παρουσία IgM RF, σε απόσταση 3 μηνών μεταξύ τους, είναι θετικές. Πρόκειται για το ανάλογο της θετικής για τον RF ρευματοειδούς αρθρίτιδας της ενήλικης ζωής.^{59,60} Οι κύριες διαφορές με την ενήλικη μορφή της νόσου σχετίζονται με την επίδρασή της σε άτομα των οποίων ο σκελετός εξακολουθεί να αυξάνεται (στα παιδιά οδηγεί είτε σε γενική καθυστέρηση της ανάπτυξης ή στην επιτάχυνση της ανάπτυξης της προσβληθείσας άρθρωσης). Πρόκειται για τη μόνη μορφή νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας με θετικά αντισώματα για τα κυκλικά κιτρολινωμένα πεπτιδία.⁶¹ Η τυπική παρουσίαση περιλαμβάνει μία συμμετρική πολυαρθρίτιδα που επηρεάζει τις μικρές αρθρώσεις των χεριών και των ποδιών (Εικόνα 3β). Δύναται ωστόσο να προσβληθούν και μεγάλες αρθρώσεις (συνήθως τα γόνατα και οι αστράγαλοι), κυρίως κατά την έναρξη και συνήθως σε συνδυασμό με μικρές αρθρώσεις. Τα ρευματοειδή οζίδια, τα οποία είναι σπάνια σε άλλα υποσύνολα της ΝΙΑ, εντοπίζονται σε θέσεις που ασκείται πίεση (κυρίως πήχης και αγκώνας), περίπου στο ένα τρίτο των ασθενών, κατά τον πρώτο χρόνο της νόσου. Οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις αν και πολύ σπάνιες, μπορεί να περιλαμβάνουν σοβαρή αναστροφή αίματος της αορτικής βαλβίδας, που απαιτεί και αντικατάσταση αυτής.⁶² Κατά καιρούς, έχει αναφερθεί ασύμμετρη ΝΙΑ με ολιγοαρθρική εμφάνιση, που συνδέεται με αυξημένους και επίμονους τίτλους του RF,⁶³ και συνοδεύεται από πρόωρη διαβρωτική νόσο, χωρίς ωστόσο να έχει καταστεί ακόμη σαφές το αν ανήκει στην πολυαρθρική RF⁺ ΝΙΑ, ή αν αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή οντότητα.

2.3. Πολυαρθρίτιδα με αρνητικούς ρευματοειδείς παράγοντες

Η RF⁻ πολυαρθρίτιδα ορίζεται ως μια αρθρίτιδα που προσβάλλει 5 ή περισσότερες αρθρώσεις κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 μηνών της νόσου, απουσία IgM RF. Πρόκειται ίσως για την πιο ετερογενή κατηγορία της ΝΙΑ,^{53,54} όπου τουλάχιστον 3 διακριτά υποσύνολα αυτής μπορούν να ταυτοποιηθούν. Το πρώτο υποσύνολο μοιάζει με την ολιγοαρθρική ΝΙΑ πρώιμης έναρξης, εκτός από τον αριθμό των αρθρώσεων που προσβάλλονται στους πρώτους 6 μήνες της νόσου. Ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη αρθρίτιδα, νεαρή ηλικία έναρξης, αυξημένη συχνότητα στα θηλυκά άτομα, συχνά θετικότητα για ANA, αυξημένο κίνδυνο ιριδοκυκλίτιδας και σύνδεση με το HLA-DRB1*0801. Οι ομοιότητες αυτές έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι πιθανόν να πρόκειται και για το ίδιο νόσημα, με μία ταχεία εξάπλωση της αρθρίτιδας στο υποσύνολο αυτό απ' ότι στην πρώιμη αρθρίτιδα αργότερα.⁵² Έτσι, η ANA⁺ ολιγοαρθρίτιδα μοιράζεται τα ίδια χαρακτηριστικά με την ANA⁺ RF⁻ πολυαρθρίτιδα, αλλά όχι με την ANA⁻ RF⁻ πολυαρθρίτιδα ή με την ANA⁻ ολιγοαρθρίτιδα.⁵⁷ Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται επίσης, από το ότι σε χώρες που η ANA⁺ ολιγοαρθρίτιδα είναι σπάνια, το ίδιο συμβαίνει και με την ANA⁺ RF⁻ πολυαρθρίτιδα.⁵² Το δεύτερο υποσύνολο μοιάζει με την RF⁻ ρευματοειδή αρθρίτιδα των ενηλίκων, και χαρακτηρίζεται από μία συμμετρική υμενίτιδα των μεγάλων και των μικρών αρθρώσεων, έναρξη στη σχολική ηλικία, αυξημένο λόγο καθίζησης ερυθροκυττάρων, απουσία της έκφρασης ANA και μεταβλητή έκβαση. Το τρίτο υποσύνολο είναι μια μορφή γνωστή ως «ξηρή» υμενίτιδα, η οποία προκαλεί αμελητέο πρήξιμο στη άρθρωση, αλλά ακαμψία και φυσιολογικό ή ελαφρώς αυξημένο λόγο

καθίζησης ερυθροκυττάρων.^{64,65} Αυτό το υποσύνολο εμφανίζει ανεπαρκή ανταπόκριση στη θεραπεία, και θα μπορούσε να έχει μια δυσμενή έκβαση.

α.



β.



Εικόνα 3: Κλινικά χαρακτηριστικά της ΝΙΑ: α. ιριδοκυκλίτιδα στην ολιγοαρθρίτιδα, β. συμμετρική πολυαρθρίτιδα που επηρεάζει τις μετακαρποφαλαγγικές, εγγύς και διαφαλαγγικές, και κερκιδοκαρπικές αρθρώσεις στην RF⁺ πολυαρθρίτιδα.⁴⁵

2.4. Η παθογένεια της Ολιγο/Πολυαρθρικής Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας

Ένας αριθμός γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων έχουν ενοχοποιηθεί ότι συμβάλλουν στην αιτιοπαθογένεια της ΝΙΑ, η οποία ωστόσο δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή.

2.4.1. Γενετική συσχέτιση

Παρά την ετερογένεια της ΝΙΑ, μια σαφής γενετική επικάλυψη φαίνεται να υφίσταται μεταξύ των μορφών της, δεδομένου ότι όλοι τους εμφανίζουν ως κύριο χαρακτηριστικό την αρθρική φλεγμονή.⁶⁶ Τα αποτελέσματα από την πρώτη πανγενωμική σάρωση σε παιδιά με ΝΙΑ υπέδειξαν ότι αρκετά γονίδια, συμπεριλαμβανομένου τουλάχιστον ενός στην HLA περιοχή, επηρεάζουν την επιδεκτικότητα στη νόσο.⁶⁷ Πράγματι, η ολιγοαρθρική ΝΙΑ εμφανίζει θετικές συσχετίσεις με τα HLA-A2, HLA-DRB1*11 και HLA-DRB1*08 αλληλόμορφα, ενώ τα HLA-DRB1*04 και HLA-DRB1*07 εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα. Αυτή η γενετική συσχέτιση της ολιγοαρθρικής νόσου με τα HLA-DR αλληλόμορφα θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη μοριακή μίμηση πεπτιδίων που προέρχονται από ιικά αντιγόνα, όπως αυτά από τον ιό Epstein-Barr.⁶⁸ Όσον αφορά την πολυαρθρική μορφή, αυτός φαίνεται να συνδέεται με το HLA-DR4 αλληλόμορφο. Αυτή η γενετική συσχέτιση της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ με τα HLA αλληλόμορφα υποδηλώνει ότι πρόκειται για ένα νόσημα της επίκτητης ανοσίας.^{69,70,71}

2.4.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, η αιτιοπαθογένεση της ΝΙΑ φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Ένα γενετικά ευαίσθητο άτομο μπορεί να αναπτύξει μία επιβλαβή και ανεξέλεγκτη απάντηση έναντι ενός αυτοαντιγόνου, μετά από έκθεση σε άγνωστο περιβαλλοντικό ερεθίσμα. Αυτή η απάντηση οδηγεί σε έναν αυτοδιδιωριζόμενο βρόγχο ενεργοποίησης τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας με αποτέλεσμα την ιστική βλάβη. Έχει προταθεί ότι στη ΝΙΑ, οι λοιμώξεις και οι εμβολιασμοί αποτελούν δύο υποψήφια ερεθίσματα, χωρίς όμως κάποιο από αυτά να έχει επιβεβαιωθεί ως έναυσμα για την έναρξη της νόσου. Ένας μολυσματικός παράγοντας μπορεί να

επάγει μία διασταυρούμενη ανοσιακή απάντηση, γνωστή ως μοριακή μίμηση. Η φλεγμονή που πυροδοτείται από τη λοίμωξη ενεργοποιεί τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, οδηγώντας σε αυξημένη ανοσογονικότητα των αυτοαντιγόνων, κινητοποίηση των T-κυττάρων με ευρείες ειδικότητες, πολυκλωνική ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και επακόλουθη αυτοανοσία. Ποικίλοι μολυσματικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί ότι πυροδοτούν την ανάπτυξη της ΝΙΑ σε αρκετές μελέτες. Η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης Α, της ερυθράς και τον παρβοϊό Β19 έχουν προταθεί ότι συνδέονται με την έναρξη της ΝΙΑ, αλλά η παθογονικότητά τους δεν έχει αποδειχθεί. Πιο συγκεκριμένα, ο ιός της γρίπης Α έχει συσχετιστεί με την έναρξη της πολυαρθρικής ΝΙΑ, ενώ τόσο ο παρβοϊός Β19, όσο και η βακτηριακή λοίμωξη από το *Mycoplasma pneumoniae* και την ομάδα Α του *Streptococcus*, με την έναρξη και έξαρση της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ. Όσον αφορά τα εμβόλια, τα οποία δρουν με παρόμοιο τρόπο με τους μολυσματικούς παράγοντες στην πρόκληση αυτοανοσίας,^{72,73} οι μέχρι τώρα μελέτες δεν έχουν κατορθώσει να τα συσχετίσουν με την έναρξη ή την έξαρση της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ, με εξαίρεση μία έρευνα σε ασθενείς με την πολυαρθρική μορφή, οι οποίοι εμφάνισαν αυξημένη φλεγμονώδη ανοσιακή απάντηση μετά από εμβολιασμό για τον *Meningococcus C*, προτείνοντάς τον ως έναν πιθανό παράγοντα κινδύνου για την επιδείνωση της φλεγμονής.⁷⁴

Από την άλλη πλευρά, το στρες και οι ψυχολογικοί παράγοντες, το μητρικό κάπνισμα και οι περιγεννητικές συνθήκες, καθώς και οι αλλαγές του καιρού έχουν διερευνηθεί ως παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την έναρξη ή την έξαρση της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ. Το στρες, ως διεγέρτης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, φαίνεται ότι αυξάνει την παραγωγή της IL-6 από τα λευκοκύτταρα, μίας από τις πιο σημαντικές φλεγμονώδεις κυτταροκίνες της νόσου. Η έκθεση σε προϊόντα καπνού κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής επηρεάζει την ανάπτυξη του ανοσιακού συστήματος του εμβρύου, οδηγώντας σε αυξημένη επιδεκτικότητα σε μολυσματικούς παράγοντες που μπορεί να πυροδοτήσουν αρθρίτιδα και συμβάλλοντας παράλληλα στην ανάπτυξη επακόλουθων νοσημάτων σε ένα γενετικά ευαίσθητο παιδί. Μία μελέτη έδειξε ότι το κάπνισμα της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη σχετίζεται με υψηλότερο ρυθμό πολυαρθρικής ΝΙΑ κατά τη διάρκεια των 7 πρώτων χρόνων της ζωής του παιδιού. Τέλος, οι θερμοκρασιακές αλλαγές δύνανται να πυροδοτήσουν την έξαρση της αρθραλγίας σε ασθενείς με ολιγο/πολυαρθρική ΝΙΑ.

2.4.3. Ο ρόλος των προερχόμενων από τον χόνδρο αυτοαντιγόνων

Η φλεγμονή της άρθρωσης στη ΝΙΑ χαρακτηρίζεται από μία επιλεκτική συσσώρευση ενεργοποιημένων CD4⁺ T-κυττάρων στον αρθρικό υμένα, τα οποία συγκεντρώνονται γύρω από αντιγονοπαρουσιαστικά (δενδριτικά κυρίως) κύτταρα.^{75,76} Η ολιγοκλωνική επέκταση των T-κυττάρων λαμβάνει χώρα στο αρθρικό υγρό, με τα κύτταρα αυτά να δείχνουν έναν ενεργοποιημένο, υψηλά διαφοροποιημένο μνημονικό φαινότυπο που υποδηλώνει επιλεκτική στρατολόγηση αυτών από το αίμα.^{77,78} Λόγω της ισχυρής συσχέτισης της ολιγο/πολυαρθρίτιδας με τα γονίδια των HLA τάξης II μορίων^{79,80,81,82,71} είναι προφανές ότι μια συνεχής ανοσιακή απάντηση λαμβάνει χώρα, οδηγούμενη από αντιγόνο, με έναν κεντρικό ρόλο για τα αυτοδραστικά T-κύτταρα που αναγνωρίζουν αντιγόνα τα οποία παρουσιάζονται στην άρθρωση από τα HLA μόρια. Τα αυτοαντιγόνα που προέρχονται από τον χόνδρο και τους γύρω ιστούς παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή αυτών των T-κυτταρικών ανοσιακών απαντήσεων. Συγκεκριμένα, εαυτά πεπτίδια που προέρχονται από την αγκρεκάνη, τη

φιμπριλλίνη και την μεταλλοπρωτεΐνάση 3 της θεμέλιας ουσίας έχουν αναφερθεί ότι εμπλέκονται στη παθογένεια της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ.⁸³ Η αγγρεκάνη είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τα προϊόντα αποδόμησης αυτής μπορεί να ανιχνευθούν στα υγρά του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού υγρού, όπου και αντανακλούν την ανακύκλωσή της.⁸⁴ Έχει δειχθεί ότι στην ΝΙΑ, η αγγρεκάνη ενεργοποιεί αυτοδραστικά Τ-κύτταρα, με το πολλαπλασιασμό αυτών να είναι ανεξάρτητος από την μορφή της ΝΙΑ και να διαφέρει σημαντικά από τους υγιείς μάρτυρες. Η φιμπριλλίνη, επίσης μέρος της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, πιστεύεται ότι καθοδηγεί την ελαστογένεση, εμπλέκεται στην ομοιοστάση και μορφογένεση του ιστού, αλλά μπορεί να ανιχνευθεί στον αρθρικό υμένα τόσο υγιών όσο και πασχόντων αρθρώσεων.⁸⁵ Τ-κυτταρικές βλαστικές απαντήσεις απαντώνται αρχικά στην πολυαρθρική ΝΙΑ, ανεξάρτητα από τη διάρκεια της νόσου, πιθανώς λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητας των επίτοπων φιμπριλλίνης που είναι παρόντες στην ολιγοαρθρική ΝΙΑ και στους υγιείς μάρτυρες, όπου η αρθρική καταστροφή είναι ελάχιστη ή και μηδαμινή. Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες της θεμέλιας ουσίας αποτελούν βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Επιπλέον, νέα δεδομένα δείχνουν ότι αυτή η οικογένεια των ενζύμων μπορεί να ρυθμίζει διάφορες διαδικασίες φλεγμονής και επιδιόρθωσης.⁸⁶ Η MMP3 εκφράζεται τόσο στον φυσιολογικό αρθρικό ιστό όσο και σε αυτόν της ΝΙΑ, επάγει τον Τ-κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η έκφρασή της σχετίζεται με το βαθμό της φλεγμονής.⁸⁷ Η καταστροφή της άρθρωσης μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νέων αυτοαντιγόνων που είναι οι στόχοι των νέων αυτοδραστικών Τ-κυττάρων. Στην ολιγο/πολυαρθρική ΝΙΑ, αυτά τα αυτοαντιγόνα μπορούν να ενεργοποιήσουν αυτοδραστικά CD4⁺ Τ-κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των Th1 και Th17 υποσυνόλων, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό αυτών, παραγωγή των κυτταροκινών που ευνοούν την φλεγμονή, όπως INF-γ και IL-17 και σε αναστολή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10.⁸³

2.4.4. Ανισορροπία μεταξύ ανοχής και φλεγμονής

2.4.4.1. Ο ρόλος των Th1/Th17 και Treg κυττάρων

Ο κυρίαρχος πληθυσμός εντός της άρθρωσης των ασθενών με Ο/Π ΝΙΑ είναι τα Th1 κύτταρα που εκκρίνουν INF-γ,^{88,89} κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αυξημένα επίπεδα χημειοκινών που προσελκύουν τα κύτταρα αυτά, όπως οι CCL2, και CXCL8, CXCL10. Τα Th17 κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα RORc και έχουν μία αμοιβαία συσχέτιση με τα Foxp3⁺ Tregs,⁹⁰ θα μπορούσαν να αποδειχθούν κρίσιμα για τη ρύθμιση της αρθρικής φλεγμονής. Μετά από ενεργοποίηση, τα κύτταρα αυτά μπορούν να παράγουν τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-17 και IL-22, διαδραματίζοντας κρίσιμο ρόλο στην έναρξη και διατήρηση της αυτοάνοσης αρθρίτιδας, συμπεριλαμβανομένης της Ο/Π ΝΙΑ. Τα Th17 κύτταρα αποτελούν <1% των CD4⁺ Τ-κυττάρων του ανθρώπινου περιφερικού αίματος, με υψηλούς αριθμούς αυτών καθώς και των IL-17 και IL-22, να απαντώνται στην άρθρωση ασθενών με Ο/Π ΝΙΑ, και ιδιαίτερα στην επεκταθείσα μορφή αυτής. Η IL-17 έχει ένα ευρύ φάσμα δράσεων στην αυτοάνοση αρθρίτιδα. Οι υποδοχείς της εκφράζονται ευρέως σε επιθηλιακά κύτταρα, Β- και Τ-κύτταρα, μυελομονοκύτταρα, στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών, και εντός της άρθρωσης σε αρθρικούς ινοβλάστες,⁹¹ αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και χονδροκύτταρα.⁹² Η δράση της σε ανοσοδραστικά κύτταρα της έμφυτης

ανοσίας συνεισφέρει στην βλάβη του χόνδρου και του οστού που παρατηρείται στην αυτοάνοση αρθρίτιδα,⁹³ ενώ διεγείρει την απελευθέρωση των MMPs από τους αρθρικούς ινοβλάστες, με αποτέλεσμα την άμεση θραύση του χόνδρου.⁹⁴ Η IL-17 δρα συνεργικά με την IL-1 επάγοντας τον RANKL και τον υποδοχέα του, RANK, αυξάνοντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών οδηγώντας έτσι σε οστεώδεις διαβρώσεις,⁹⁵ ενώ δρα σε συνδυασμό με την IL-1 και τον TNF-α για να επάγει φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες από μονοκύτταρα και ινοβλάστες του αρθρικού υμένα (π.χ. IL-8 και G-CSF) σε καλλιέργεια,⁹⁶ τα οποία διεγείρουν την στρατολόγηση ουδετεροφίλων στην άρθρωση και την κοκκιοποίηση. Μάλιστα η IL-17 είναι σε θέση να διατηρήσει τη νόσο ανεξάρτητα από τον TNF-α.⁹⁷ Επιπλέον, η IL-22, μια άλλη φλεγμονώδης κυτταροκίνη που παράγεται από τα Th17 κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί τους αρθρικούς ινοβλάστες *in vitro*.⁹⁸

Τα ρυθμιστικά T-κύτταρα αποτελούν το 5-10% των ανθρώπινων CD4⁺ T-κυττάρων του περιφερικού αίματος. Εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 και είναι κρίσιμα για τη φλεγμονή, την καταστολή της λειτουργίας των ανοσοδραστικών T-κυττάρων και τη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής έναντι των αυτοαντιγόνων.⁹⁹ Ανεπάρκεια στον αριθμό ή τη λειτουργία των Treg κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων.^{100,101,102,103} Η ανοσοκατασταλτική λειτουργία των Treg κυττάρων μεσολαβείται από την διακυτταρική επαφή και την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10.^{104,105} Με βάση το μηχανισμό ανοσοκαταστολής και τον φαινότυπο, διακρίνονται 2 τύποι Treg κυττάρων: φυσικώς απαντώμενα Treg κύτταρα και τα επαγόμενα από ενεργοποίηση Treg κύτταρα. Τα φυσικώς απαντώμενα Treg κύτταρα είναι παρόντα από τη γέννηση και εκφράζουν τον Foxp3, που προγραμματίζει την ανοσοκατασταλτική τους λειτουργία.¹⁰⁶ Τα επαγόμενα από ενεργοποίηση Treg κύτταρα, ωστόσο ενεργοποιούνται στους περιφερικούς ιστούς και χαρακτηρίζονται από την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, αποτελώντας ίσως τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές των ανοσοαπαντήσεων.^{107,108} Στην Ο/Π ΝΙΑ, η ήπια κλινική πορεία και η ευνοϊκότερη πρόγνωση συσχετίζονται με την παρουσία και την λειτουργική ικανότητα δύο τύπων Treg κυττάρων στο αρθρικό υγρό, των φυσικώς απαντώμενων Foxp3⁺ Treg και των επαγόμενων από εαυτές πρωτεΐνες του θερμικού σοκ Treg κυττάρων.^{109,110} Αυτό ενέχει ένα σημαντικό ρόλο των Treg κυττάρων στον έλεγχο της αρθρικής φλεγμονής στην αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ. Ασθενείς με ήπια και αυτοδιαλείπουσα (self-remitting) ολιγοαρθρική ΝΙΑ εμφάνισαν υψηλότερο αριθμό CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg κυττάρων στο αρθρικό υγρό, από ότι οι ασθενείς με προοδευτική και επεκταθείσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ.¹¹⁰ Διαπιστώθηκε επίσης ότι τα CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg κύτταρα από τις αρθρώσεις των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την έκκριση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IFN-γ και IL-17 από ανοσοδραστικά Th1 και Th17 κύτταρα.¹¹¹ Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι τα CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg κύτταρα μπορεί να διαδραματίσουν ενεργό ρόλο στον περιορισμό και ακόμα και στην αναστροφή της εγκαθιδρυμένης αυτοάνοσης παθολογίας σε ασθενείς με ήπια και αυτοδιαλείπουσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ. Η εξέλιξη στην επεκταθείσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ δεν φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα ενός εγγενούς ελαττώματος των CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg κυττάρων, αλλά μάλλον μία αποτυχία να επεκταθούν στο σημείο της φλεγμονής.

2.4.4.2. Ο ρόλος των HSPs

Οι HSPs είναι ενδογενείς πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά το κυτταρικό στρες, όπως στη χρόνια φλεγμονή, και είναι σε θέση να ρυθμίζουν ανοσοαπαντήσεις.¹¹² Στην φλεγμονώδη άρθρωση των ασθενών με Ο/Π ΝΙΑ, οι HSPs απελευθερώνονται από τα τραυματισμένα κύτταρα στους αρθρικούς ιστούς και επάγουν μια ανεκτικόγόνο (αντιφλεγμονώδη) ανοσοαπάντηση.^{113,114} Αυτο-HSPs και πεπτίδια που προέρχονται από αυτές μπορούν να ενεργοποιήσουν T-κύτταρα έναντι των HSPs, τα οποία διακρίνονται για την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, επάγουν μία αύξηση στον αριθμό και τη λειτουργία των Treg κυττάρων και έτσι οδηγούν σε ανοσιακή ανοχή.^{115,116} Ανάμεσα στους διάφορες μορφές της ΝΙΑ, μόνο οι ασθενείς με ήπια και αυτοδιαλείπουσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ είχαν T-κυτταρικές απαντήσεις σε αυτο-HSP60 πεπτίδια, που ενδεχομένως έχουν κάποιο ρόλο στην καταστολή της αυτοάνοσης αρθρικής φλεγμονής και στην πρόβλεψη μιας ύφεσης της νόσου.¹¹⁷ Επιπλέον, φάνηκε ότι οι ασθενείς με ήπια και αυτοδιαλείπουσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ είχαν υψηλότερα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 στο αρθρικό υγρό, από τους ασθενείς με επιμένουσα και επεκταθείσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ.¹¹⁵

2.4.4.3. Ανισορροπία μεταξύ των φλεγμονωδών Th1/Th17 και αντιφλεγμονωδών Treg κυττάρων

Στην αυτοάνοση αρθρίτιδα, συμπεριλαμβανομένης της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ, αυτοδραστικά Th1 και Th17 κύτταρα παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως τις INF-γ και IL-17, μετά την ενεργοποίηση από αυτοαντιγόνο, ενισχύοντας την αρθρική φλεγμονή. Αντιθέτως, τα Treg κύτταρα παράγουν την αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-10 μετά την ενεργοποίηση από αυτο-HSP, η οποία μπορεί να αναστείλει την αρθρική φλεγμονή. Όταν η φλεγμονώδης δράση των Th1 και Th17 κυττάρων είναι εντονότερη της αντιφλεγμονώδους δράσης των Treg κυττάρων, η ανισορροπία αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη της ολιγο/πολυαρθρικής ΝΙΑ. Έχει προταθεί ότι το χρόνια φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον στο εσωτερικό των αρθρώσεων των ασθενών με Ο/Π ΝΙΑ μπορεί να επιδράσει στην τοπική δυσλειτουργία των Treg κυττάρων ή καθιστά τα ενεργοποιημένα ανοσοδραστικά T-κύτταρα ανθεκτικά στη Treg-μεσολαβούμενη καταστολή.¹¹⁸ Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ Th17 και Treg κυττάρων όσον αφορά την ανάπτυξη και τη μετανάστευση.¹¹⁹ Τα στοιχεία δείχνουν ότι η κατανομή των Th17 κυττάρων στην αυτοάνοση νόσο αντανακλά μία διαφοροποίηση στο σημείο της φλεγμονής.¹²⁰ Οι συνθήκες που συνήθως ευνοούν την ανάπτυξη των Treg κυττάρων και προωθούν την ανοχή μπορεί να ανατραπούν από τοπικά φλεγμονώδη σήματα με στόχο την γένεση των Th17 κυττάρων. Σε ανθρώπους και ποντίκια, ο TGF-β από μόνος του επάγει τυπικά την διαφοροποίηση των πρόδρομων T-κυττάρων προς Treg κύτταρα, ενώ παρουσία των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, IL-1β, IL-21 ή IL-23 οδηγεί στην παραγωγή Th17 κυττάρων.^{121,122} Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-6 και IL-1β, στο μικροπεριβάλλον του εσωτερικού των αρθρώσεων των ασθενών με Ο/Π ΝΙΑ ευνοούν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων T-κυττάρων προς Th17 κύτταρα αντί των Treg κυττάρων, πυροδοτώντας έτσι την αυτοανοσία.

Η ανισορροπία λοιπόν μεταξύ αυτοδραστικών Th1/Th17 και Treg κυττάρων οδηγεί στην αποτυχία της T-κυτταρικής ανοχής για τα αυτοαντιγόνα. Η T-κυτταρική ενεργοποίηση του επίκτητου ανοσιακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής των φλεγμονωδών κυτταροκινών INF-γ και IL-17,

οδηγεί επίσης την ενεργοποίηση του έμφυτου ανοσιακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των ουδετεροφύλων, των μακροφάγων και των συνοβιοκυττάρων και επάγει την παραγωγή πολλών άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και μεσολαβητών όπως οι IL-1, IL-6 και TNF-α.¹²³ Η παρακολούθηση των αλλαγών στο επίπεδο αυτών των φλεγμονωδών κυτταροκινών και μεσολαβητών στο αρθρικό υγρό μπορούν να λειτουργήσουν ως θεραπευτικοί και ενδεχομένως ακόμη και ως προγνωστικοί βιοδείκτες για την Ο/Π ΝΙΑ. Η ενεργοποίηση τόσο της επίκτητης όσο και της έμφυτης ανοσίας αναπτύσσεται σε ένα αυτοδιδαιωνιζόμενο βρόγχο φλεγμονωδών απαντήσεων, που συμβάλλει στην αρθρική φλεγμονή της Ο/Π ΝΙΑ.⁶⁸

2.5. Συστηματική αρθρίτιδα

Το 1987, ο George Frederic Still ήταν ο πρώτος που έδωσε μία συστηματική περιγραφή αυτής της τυπικής φλεγμονώδους νόσου της παιδικής ηλικίας, η οποία παρουσίαζε τα κλινικά χαρακτηριστικά της ΣΝΙΑ.¹²⁴ Πρόκειται για έναν τύπο χρόνιας αρθρίτιδας της παιδικής ηλικίας με σημαντική νοσηρότητα και σοβαρές επιπλοκές, και αντιπροσωπεύει το 6-20% των περιπτώσεων της ΝΙΑ στην Ευρώπη.^{125,126} Παρά την προσπάθεια που έγινε για ένταξη αυτής στην ομάδα των αυτοάνοσων νοσημάτων, η απουσία αυτοαντιγόνων/αυτοαντισωμάτων και η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας υποδεικνύουν ότι η συστηματική ΝΙΑ είναι πρωτίστως ένα αυτοφλεγμονώδες νόσημα. Σε αντίθεση με τις άλλες μορφές της ΝΙΑ, δεν διαφέρει ως προς το φύλο ή το χρόνο έναρξης της νόσου στη πρώτη δεκαετία της ζωής. Η έναρξή της κατά την εφηβεία είναι σπάνια, ενώ έχει αναφερθεί μόνο σε λίγες περιπτώσεις κατά την ενήλικη ζωή (γνωστή ως νόσος Still).

Η συστηματική μορφή της ΝΙΑ ορίζεται ως η αρθρίτιδα εκείνη της παιδικής ηλικίας, με έναρξη πριν από την ηλικία των 16 ετών, που συνοδεύεται ή της οποίας προηγείται περιοδικός πυρετός, διάρκειας τουλάχιστον 2 εβδομάδων. Παράλληλα, παρατηρείται και μία από τις ακόλουθες κλινικές εκδηλώσεις συστηματικής φλεγμονώδους προέλευσης: ένα χαρακτηριστικό παροδικό ερυθματώδες εξάνθημα (Εικόνα 4α), γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, ορογονίτιδα (π.χ. πλευρίτιδα ή περικαρδίτιδα), μυαλγίες και κοιλιακό άλγος (όταν ο πυρετός είναι έντονος).^{127,46} Όσον αφορά την αρθρίτιδα, αρχικά παρουσιάζεται με ολιγοαρθρικό και ασύμμετρο μοτίβο. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις με διαλείπουσα ή συνεχόμενη δραστηριότητα της νόσου, η αρθρίτιδα εξελίσσεται σε πολυαρθρική συμμετρική νόσο. Μία άλλη σοβαρή και δυνητικά απειλητική για τη ζωή δευτερογενής επιπλοκή της ΣΝΙΑ είναι το σύνδρομο ενεργοποίησης των μακροφάγων, που εμφανίζεται περίπου στο 5-8% των ασθενών με ΣΝΙΑ. Πρόκειται για μια δραστική μορφή αιμοφαγοκυτταρικής λεμφοϊστικοκυττάρωσης που χαρακτηρίζεται από αιφνίδια εμφάνιση επίμονου πυρετού, σοβαρή πανκυτταροπενία, ηπατοσπληνομεγαλία, ηπατική ανεπάρκεια, διαταραχή της πήξης με αιμορραγικές εκδηλώσεις, και νευρολογικά συμπτώματα (Εικόνα 4β). Τα εργαστηριακά ευρήματα της ΣΝΙΑ δείχνουν μια σημαντική φλεγμονώδη απάντηση που χαρακτηρίζεται από λευκοκυττάρωση (με ουδετεροφιλία), υψηλή ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων και συγκέντρωση C-αντιδρώσας πρωτεΐνης καθώς και θρομβοκυττάρωση, υποδηλώνοντας μία υπέρμετρη ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας. Η παρουσία μικροκυτταρικής αναιμίας είναι κοινή στα παιδιά με συστηματική αρθρίτιδα και διαφέρει σημαντικά, και ως προς την σοβαρότητα, από την αναιμία της χρόνιας νόσου που παρατηρείται στα ενήλικα άτομα

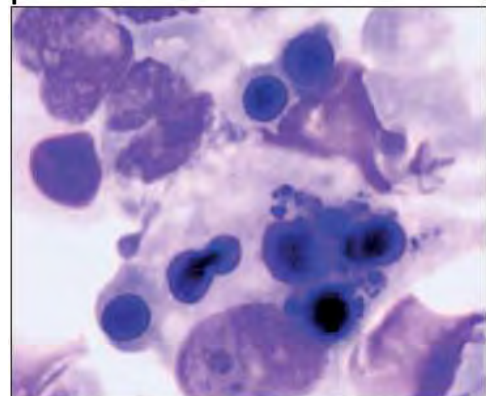
με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Φαίνεται επίσης ότι, ως επί το πλείστον, σχετίζεται με επαγόμενη από την IL-6-δέσμευση του σιδήρου στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα.^{128,129}

Η κλινική πορεία της ΣΝΙΑ είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Στο 40% περίπου των ασθενών, η νόσος είναι μονοκυκλική ή χαρακτηρίζεται από υποτροπές που ακολουθούν διαστήματα ύφεσης, με την αρθρίτιδα να υποχωρεί συνήθως, όταν ελέγχονται συστηματικά χαρακτηριστικά. Η μακροπρόθεσμη πρόγνωση αυτών των ασθενών είναι συνήθως καλή. Σ' ένα 10% περίπου των ασθενών, η νόσος είναι πολυκυκλική και σε >50% των ασθενών, επιμένουσα. Σε πολλούς ασθενείς με πολυκυκλική ή επιμένουσα ΣΝΙΑ, τα συστηματικά χαρακτηριστικά υποχωρούν κατά τους πρώτους μήνες ή χρόνια της νόσου, ενώ η αρθρίτιδα είναι προοδευτική. Με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία για την αναστολή της IL-1, έχουν διακριθεί 2 υποπληθυσμοί της ΣΝΙΑ: ένας με έντονη, πλήρη απάντηση στον αποκλεισμό της δράσης της IL-1, και ένας άλλος ανθεκτικός ή με ενδιάμεση απόκριση στη θεραπεία. Αυτοί οι δύο υποπληθυσμοί δεν διαφέρουν στην παραγωγή της IL-1 *in vitro*, αλλά στον αριθμό των προσβεβλημένων αρθρώσεων και των ουδετεροφίλων, όπου ασθενείς με υψηλές συγκεντρώσεις ουδετερόφιλων και μικρότερο αριθμό προσβεβλημένων αρθρώσεων, έχουν αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία.^{130,131} Τα ευρήματα από 2 κλινικές μελέτες με στόχο τις IL-1 και IL-6 πιθανόν να συμβάλλουν στην κατανόηση της ετερογένειας και της παθογένειας των δύο υποομάδων. Οι διαφορές στις κλινικές εκδηλώσεις, στην έκβαση και την ανταπόκριση στη θεραπεία δείχνουν ότι η ΣΝΙΑ μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σύνδρομο και όχι απλά ένα νόσημα.¹³²

α.



β.



Εικόνα 4: Κλινικά χαρακτηριστικά συστηματικής ΝΙΑ: **α.** τυπικό εξάνθημα 8-χρονου παιδιού, **β.** δείγμα μυελού των οστών που δείχνει αιμοφαγοκυττάρωση από μακροφάγα σε έναν ασθενή με ΣΝΙΑ και σύνδρομο ενεργοποίησης των μακροφάγων

2.6. Η παθογένεια της Συστηματικής Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας

Τα εμφανή συστηματικά κλινικά χαρακτηριστικά, η απουσία αυτοαντισωμάτων, και η μη συσχέτιση της ΣΝΙΑ με τα HLA αλληλόμορφα έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι είναι μια νοσολογική οντότητα με περισσότερες ομοιότητες με τα αυτοφλεγμονώδη απ' ό,τι με τα κλασικά αυτοάνοσα νοσήματα.^{133,134,135} Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι ασθενείς με τη συστηματική μορφή της ΝΙΑ έχουν πολύ λιγότερο ευνοϊκή απάντηση στην αντι-TNF θεραπεία, απ' ό,τι

οι ασθενείς με άλλες μορφές της νόσου, παρά τις αυξημένες συγκεντρώσεις του TNFα στο αρθρικό υγρό.

2.6.1 Γενετικό υπόβαθρο

Όπως και σε αρκετές αυτοφλεγμονώδεις καταστάσεις, και σε αντίθεση με τις άλλες μορφές της ΝΙΑ, δεν έχει βρεθεί καμία ισχυρή συσχέτιση της ΣΝΙΑ με τα αλληλόμορφα των MHC τάξης II μορίων, με εξαίρεση το HLA-DR4 το οποίο φαίνεται να συνδέεται με τη διαβρωτική αρθρίτιδα που εμφανίζουν ορισμένοι ασθενείς.¹³⁶ Οι κληρονομικοί παράγοντες κινδύνου για τη ΣΝΙΑ περιορίζονται σε απλούς πολυμορφισμούς σε στοιχεία του υποκινητή και στα γονίδια που κωδικοποιούν τους TNF,¹³⁷ IL-6,¹³⁸ IL-10,¹³⁹ τον MIF,¹⁴⁰ και την οικογένεια της IL-1 (IL1-α, IL1RN, IL1R2 και ενδεχομένως IL1F10).¹⁴¹ Πιο συγκεκριμένα, ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (-174) στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της IL-6 και ένας πολυμορφισμός στην 5' πλευρική περιοχή (-173) του γονιδίου MIF έχουν συσχετιστεί με υπερπαραγωγή της IL-6^{142, 138} και με υψηλά επίπεδα του MIF στον ορό και το αρθρικό υγρό,^{140,143} αντίστοιχα, σε παιδιά με συστηματική αρθρίτιδα. Επιπλέον, έχει αναφερθεί μία συσχέτιση μεταξύ της ευαισθησίας στη ΣΝΙΑ με SNPs εντός του γονιδίου *SLC26A2*, οι μεταλλάξεις στο οποίο προκαλούν διαστροφική δυσπλασία.¹⁴⁴ Η παρουσία ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο *P2X7*, το οποίο κωδικοποιεί έναν ATP υποδοχέα που ρυθμίζει την επεξεργασία και έκκριση της IL-1, έχει συνδεθεί μερικώς με την ΣΝΙΑ.¹³¹ Δεν έχουν βρεθεί σημαντικές συσχετίσεις της συστηματικής αρθρίτιδας με τα γονίδια *NLRP3*, *NOD2*, *MEFV* ή *PSTPIP1*, μεταλλάξεις σε καθένα από τα οποία προκαλούν μονογονιδιακές αυτοφλεγμονώδεις ασθένειες.¹⁴⁵ Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι η ΣΝΙΑ είναι ένα πολυγενετικό νόσημα, με το κάθε αλληλόμορφο που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα, να έχει μια μικρή συμβολή στην κληρονομική προδιάθεση.

2.6.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και εμβολιασμός

Η συστηματική μορφή φέρει κλινικές εκδηλώσεις καθώς και άλλες ομοιότητες με μολυσματικά νοσήματα, κυρίως ιογενή. Αυτό φαίνεται και από την εποχιακή διακύμανση της έναρξης της ΣΝΙΑ, η οποία μπορεί να συνεπάγεται ιογενή αιτιολογία.¹⁴⁶ Η λοίμωξη από τον παρβοϊό Β19 έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με την έναρξη και την έξαρση της ΣΝΙΑ¹⁴⁷ (αυξημένα επίπεδα IgG αντισωμάτων έναντι του ιού σε παιδιά με αυτήν τη μορφή).¹⁴⁸ Όσον αφορά τον εμβολιασμό, μόνο μία περίπτωση έξαρσης της νόσου έχει αναφερθεί μετά τη χρήση ζωντανών εξασθενημένων μικροοργανισμών ερυθράς.¹⁴⁹

2.6.3 Ο ρόλος των κυτταροκινών που προωθούν την φλεγμονή

Τόσο κατά την έναρξη, όσο και κατά την έξαρση της ΣΝΙΑ λαμβάνει χώρα μια πρώιμη ενεργοποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου με την έκφραση μορίων προσκόλλησης των λευκοκυττάρων, όπως η E-σελεκτίνη, ο VCAM-1 και ο ICAM-1 και μία μεταγενέστερη περιαγγειακή διείσδυση των ουδετεροφίλων και των ενεργοποιημένων φλεγμονωδών μονοκυττάρων.¹⁵⁰ Σημαντικές φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που εκκρίνονται από αυτά τα φαγοκύτταρα είναι οι TNF-α, IL-1 και IL-6. Ο TNF παίζει κεντρικό ρόλο σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα αρθρίτιδας¹⁵¹ και η αναστολή του, φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματική σε διάφορες μορφές ρευματοειδούς αρθρίτιδας.¹⁵² Ωστόσο, σε σύγκριση με άλλες μορφές της ΝΙΑ, οι ασθενείς με ΣΝΙΑ εμφανίζουν μια περιορισμένη απάντηση στην αντι-TNF θεραπεία.¹⁵³ Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν έναν σημαντικό ρόλο της IL-1 στη ΣΝΙΑ, η οποία εκκρίνεται

σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα των ασθενών. Φυσιολογικά, η IL-1 δρα στο μυελό των οστών και διεγείρει την κοκκιοποίηση, οδηγώντας σε ουδετεροπενία του περιφερικού αίματος. Οι υποδοχείς της IL-1 στον εγκέφαλο ενεργοποιούν τη θερμορύθμιση του υποθαλάμου οδηγώντας σε πυρετό. Επιπλέον, η IL-1β ενεργοποιεί τους υποδοχείς της IL-1 επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, προκαλώντας δερματικό εξάνθημα στη ΣΝΙΑ και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή IL-6.¹⁵⁴ Μάλιστα, ο ορός των ασθενών με ΣΝΙΑ φαίνεται να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας (συμπεριλαμβανομένης και της IL-1) στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος.¹³⁰ Επιπλέον, μία άλλη κυτταροκίνη της οικογένειας της IL-1, η IL-18, απαντάται, επίσης, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στον ορό ατόμων με ΣΝΙΑ, σε σύγκριση με άλλες μορφές της νόσου.^{155,156} Η IL-18 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των κυττάρων φυσικών φονιάδων, που όμως είναι σε κίνδυνο στους ασθενείς με ΣΝΙΑ, λόγω ενός ελαττώματος στη σηματοδότηση από τον υποδοχέα της IL-18.¹⁵⁷ Η IL-6, από την άλλη πλευρά, διεγείρει τα ηπατοκύτταρα και επάγει την παραγωγή πολλών πρωτεϊνών οξείας φάσεως, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και το Α αμυλοειδές στον ορό. Τα επίπεδα της IL-6 στον ορό και στο αρθρικό υγρό¹⁵⁸ είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ΣΝΙΑ και συσχετίζονται με τη κλινική δραστηριότητα και τα συστηματικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως τις περιόδους του πυρετού, τη θρομβοκυττάρωση, την μικροκυτταρική αναιμία.¹⁵⁹ Χρόνια υπερέκφραση της IL-6 σε διαγονιδιακά για την IL-6 ποντίκια, δύναται να οδηγήσει σε διαταραχή της ανάπτυξης, αύξηση της οστεοκλαστογένεσης και μειωμένη δραστηριότητα των οστεοβλαστών.¹⁶⁰ Στον επίμονο τύπο της ΣΝΙΑ, οι συγκεντρώσεις της IL-6 στον ορό συσχετίζονται αρνητικά με τον IGF-1 και την πρωτεΐνη δέσμευσης 3 του IGF, ενώ η παραγωγή της αυξητικής ορμόνης παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα.¹⁶¹ Εν ολίγοις, η πλειονότητα των συστηματικών και τοπικών χαρακτηριστικών της ΣΝΙΑ καθώς και οι δευτερογενείς επιπλοκές της επίμονης φλεγμονώδους δραστηριότητας της νόσου μπορεί να αποδοθούν στην ενεργοποίηση ενός δικτύου κυτταροκινών, που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα.

2.6.4. Οι ειδικές των φαγοκυττάρων S100 πρωτεΐνες στη ΣΝΙΑ

Ο κυρίαρχος ρόλος της έμφυτης ανοσίας στη ΣΝΙΑ υπογραμμίζεται περαιτέρω από την υψηλή έκφραση και τις συγκεντρώσεις στον ορό των φλεγμονωδών S100 πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα των S100A8, S100A9 και S100A12, οι οποίες εκκρίνονται ειδικά από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα. Πρόκειται για πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο, και τα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα αυτών των ειδικών για τα φαγοκύτταρα S100 πρωτεϊνών στην ΣΝΙΑ είναι στενά συνδεδεμένα με τη δραστηριότητα της νόσου και δεν απαντώνται σε άλλες μορφές φλεγμονώδους αρθρίτιδας, ούτε σε άλλα αυτοάνοσα ή μολυσματικά νοσήματα,¹⁶² αποτελώντας έτσι σημαντικούς βιοδείκτες για τη συστηματική ΝΙΑ. Επιπλέον, η έκφραση των S100A8 και S100A9 δείχνει μία σημαντική ενεργοποίηση του επιθηλιακού στρώματος του δέρματος, κατά την αρχική φάση της ΣΝΙΑ, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό φλεγμονώδη ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στη ΣΝΙΑ.¹⁶³ Οι S100A8, S100A9 και S100A12 έχουν φλεγμονώδη δράση στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και έτσι είναι πιθανό να εμπλέκονται άμεσα στη φλεγμονώδη διαδικασία της ΣΝΙΑ.^{164,165,166} Η S100A12 επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης, καθώς και φλεγμονωδών κυτταροκινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με έναν εξαρτώμενο από τον NF-κΒ τρόπο.¹⁶⁷ Φαίνεται μάλιστα ότι συμμετέχει σε ένα

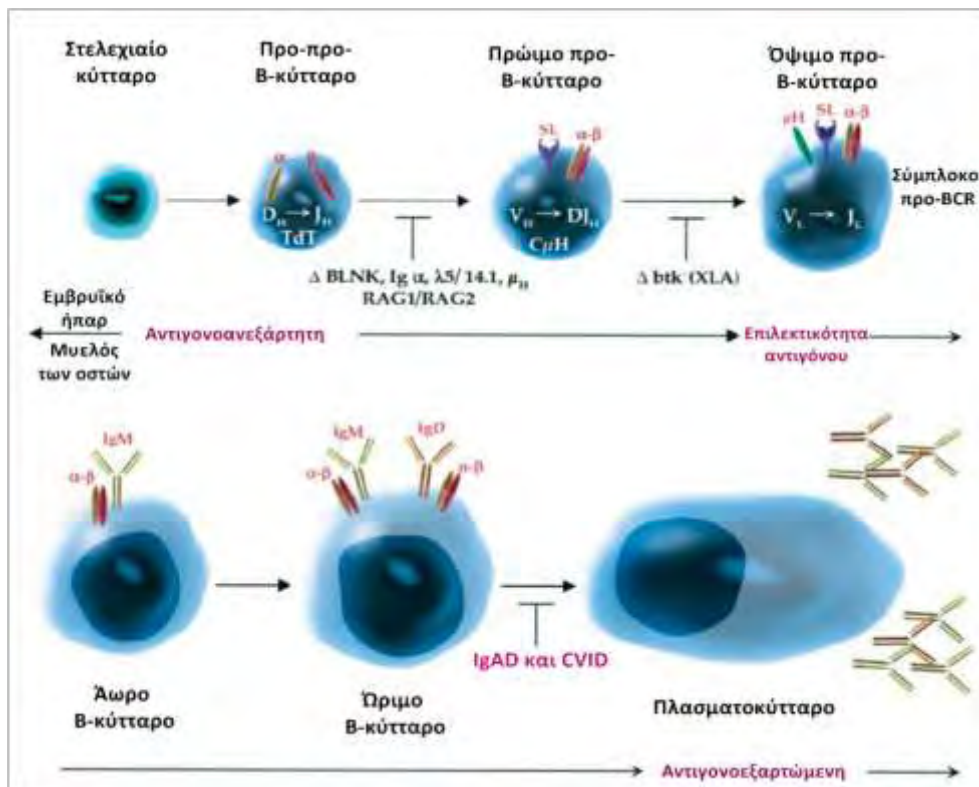
σηματοδοτικό μονοπάτι της φλεγμονής που εμπλέκει το RAGE (έναν υποδοχέα για τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης), ως υποδοχέα μεταγωγής φλεγμονωδών σημάτων σε ενδοθηλιακά κύτταρα και φαγοκύτταρα.^{168,167} Ωστόσο, οι άμεσες επιπτώσεις της S100A12 στην έκφραση των IL-1 και IL-6 δεν έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα. Σε αντίθεση με την S100A12, οι S100A8 και S100A9 δεν φαίνονται να συνδέονται με το RAGE. Η S100A8 ενεργοποιεί φαγοκύτταρα με έναν εξαρτώμενο από τον TLR4 τρόπο και επάγει την έκφραση των TNFα, IL-1β και IL-12.¹⁶⁹ Έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την S100A9, τα οποία προσδένονται ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων, αυξάνοντας την ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα της ιντεγκρίνης CD11b-CD18 των λευκοκυττάρων, στο ICAM-1 μόριο στο ενδοθήλιο.¹⁷⁰ Επιπλέον, τα S100A8/S100A9 σύμπλοκα επάγουν μία θρομβογενή, φλεγμονώδη και αποπτωτική απάντηση σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα.^{165,166} Ως εκ τούτου, αυτές οι φλεγμονώδεις S100-πρωτεΐνες είναι πιθανοί στόχοι για μελλοντική ανοσοθεραπεία στη ΣΝΙΑ.

2.6.5 Απώλεια ελέγχου του εναλλακτικού εκκριτικού μονοπατιού των φαγοκυττάρων

Οι αυξημένοι αριθμοί των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων που σχετίζονται με την περιφερική επέκταση των άωρων CD34⁺ CD33⁺ μυελομονοκυτταροειδών (myelomonocytoid) προδρόμων είναι αρκετά συχνοί στη ΣΝΙΑ. Η ειδική υπερέκφραση των εκκρινόμενων από τα φαγοκύτταρα φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, IL-6, IL-18 και πρωτεϊνών S100A8, S100A9 και S100A12 υποδεικνύει μία νέα άποψη σχετικά με την παθογένεια της ΣΝΙΑ. Όλα αυτά τα μόρια εκκρίνονται από το λεγόμενο εναλλακτικό εκκριτικό μονοπάτι, το οποίο διαφέρει από τον κλασικό ενδοκυτταρικό μηχανισμό μεταφοράς μέσω ενδοπλασματικού δικτύου-συσσκευής Golgi που χρησιμοποιείται από άλλες κυτταροκίνες.¹⁷¹ Αυτή η οδός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του νουκλεοτιδικού υποδοχέα P2X7, μια εκροή καλίου από το κύτταρο που έχει ως αποτέλεσμα την εισροή ιόντων ασβεστίου, καθώς και την ενεργοποίηση των φωσφολιπασών και της λυσοσωμικής εξωκυττάρωσης. Η αρχική ενεργοποίηση των IL-1 και IL-18 περιλαμβάνει την πρωτεολυτική διάσπαση των ανενεργών προ-κυτταροκινών από ένα σύμπλοκο που ονομάζεται πολυπρωτεϊνικό φλεγμονόσωμα. Η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και η διάσπαση της προ-IL-1 από την κασπάση-1 έχουν δειχθεί ότι αποτελούν σημαντικούς μοριακούς μηχανισμούς σε διάφορα κληρονομήσιμα αυτοφλεγμονώδη σύνδρομα που προκύπτουν σε αιφνίδιες εξάρσεις πυρετού.^{172,173} Σε αντίθεση με τις IL-1 και IL-18, οι S100 πρωτεΐνες δεν επεξεργάζονται από την κασπάση 1, πριν από την απελευθέρωση.¹⁴⁵ Έτσι, η αδυναμία ελέγχου του εναλλακτικού εκκριτικού μονοπατιού καθοδικά της κασπάσης 1, που οδηγεί σε ανώμαλη ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, φαίνεται να εμπλέκεται στην απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και πρωτεϊνών, που συμβάλλουν στην πολυσυστηματική φλεγμονή της ΣΝΙΑ.⁶

3. ΟΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Οι πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες αντιπροσωπεύουν τον πιο κοινό τύπο πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στον άνθρωπο. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα διαταραχών, οι οποίες διακρίνονται για την αδυναμία παραγωγής μιας αποτελεσματικής αντισωματικής απάντησης έναντι ενός παθογόνου. Οι περισσότερες PADs έχουν συσχετιστεί με απλές μεταλλάξεις γονιδίων που προκαλούν ανωμαλίες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των B-κυττάρων (Εικόνα 5). Ωστόσο, ορισμένες μπορεί να οφείλονται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε γενετικά ευπαθή άτομα, ενώ άλλες αποδίδονται στη καθυστερημένη ανοσιακή ωρίμανση.¹⁷⁴ Παρόλο που η ανοσοανεπάρκεια και η αυτοανοσία αποτελούν δύο αντίθετες πλευρές στο φάσμα της κλινικής ανοσιακής απάντησης, στην πραγματικότητα, αυτές οι δύο συνθήκες συνδέονται συχνά και μάλιστα η πρώτη περίπτωση ασθενούς με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια που περιγράφηκε από τον Bruton, συνδέθηκε με αυτοάνοση αρθρίτιδα.¹⁷⁵ Κατά τη διάρκεια των επόμενων ετών, πολλά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, μεταξύ των οποίων η IgAD και η CVID, βρέθηκαν να συνδέονται με διάφορες αυτοάνοσες εκδηλώσεις.¹⁷⁶



Εικόνα 5: B-κυτταρική ανάπτυξη και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντισωματικές ανεπάρκειες. Εξάλειψη ή μετάλλαξη στη μ H αλυσίδα, στη προσωρινή L αλυσίδα, ή στο σύμπλοκο Ig α /Ig β οδηγούν σε αναστολή της B-κυτταρικής ανάπτυξης και σοβαρή αγαμμασφαιριναιμία. Όμοια, ανωμαλίες στα μονοπάτια της B-κυτταρικής σηματοδότησης που μεσολαβούνται από την Btk και την πρωτεΐνη προσαρμογέα BLNK οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης στο προ-προ-B-κυτταρικό στάδιο, προτείνοντας ότι η συναρμολόγηση ενός λειτουργικού προ-B-κυτταρικού υποδοχέα είναι κρίσιμη για τη μετάβαση από το προ-B-κύτταρο στο άωρο B-κύτταρο. Ώριμα B-κύτταρα υφίστανται μεταστροφή τάξης και σωματική υπερμετάλλαξη των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών τους προκειμένου να αυξήσουν τη συγγένεια του υποδοχέα και τη διαφοροποίηση σε μνημονικά B-κύτταρα ή πλασματοκύτταρα. Ανωμαλίες σε αυτές τις όψιμες διαδικασίες της B-κυτταρικής διαφοροποίησης οδηγούν στις IgAD και CVID, αν και δεν γνωστή η ακριβής μοριακή βάση αυτών των αντισωματικών ανεπαρκειών.¹⁷⁷

3.1. Η IgA ανοσοανεπάρκεια

Η IgA ανοσοανεπάρκεια είναι η πιο συχνή αντισωματική ανεπάρκεια, με επικράτηση η οποία ποικίλει ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα. Ως IgAD ορίζεται η ελάττωση της συγκέντρωσης ή η απουσία της IgA στον ορό, παρουσία φυσιολογικών επιπέδων IgG και IgM ανοσοσφαιρινών στον ορό ασθενούς με ηλικία μεγαλύτερη των 4 ετών, όπου έχουν αποκλειστεί άλλες αιτίες υπογαμμασφαιριναιμίας. Όταν τα επίπεδα της IgA στον ορό βρίσκονται κάτω από τα 7 mg/dL, χαρακτηρίζεται ως επιλεκτική IgA ανοσοανεπάρκεια, καθώς η συγκέντρωση αυτή αντιπροσωπεύει το κατώτερο ανιχνεύσιμο επίπεδο που έχει καθιερωθεί από τα περισσότερα εργαστήρια. Όταν τα επίπεδα της IgA στον ορό είναι υψηλότερα των 7 mg/dL, αλλά κάτω των δύο σταθερών αποκλίσεων από τα μέσα για την ηλικία του ασθενούς επίπεδα ανοσοσφαιρίνης, η κατάσταση αναφέρεται ως μερική IgA ανοσοανεπάρκεια, η οποία είναι αρκετά κοινή ενώ τα επίπεδα της IgA μπορεί να επανέλθουν στο φυσιολογικό με το χρόνο.¹⁷⁸

3.1.1. Κλινικές εκδηλώσεις

Ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων συναντάται στην IgAD. Το 85-90% των ασθενών αυτών είναι ασυμπτωματικοί και η ταυτοποίησή τους θεωρείται τυχαίο εύρημα. Η IgAD είναι συχνότερα συμπτωματική όταν συνυπάρχει με ανεπάρκεια των IgG υποτάξεων ή με ελαττώματα σε ειδικές χυμικές απαντήσεις σε πολυσακχαριτικά αντιγόνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τελευταίες αυτές ανωμαλίες μπορεί να είναι πιο σημαντικοί αιτιώδεις παράγοντες σε οποιοδήποτε συνδυασμένη ανεπάρκεια. Στις κλινικές εκδηλώσεις της IgAD περιλαμβάνονται υποτροπιάζουσες πνευμονολογικές λοιμώξεις, γαστρεντερικές λοιμώξεις και διαταραχές, αλλεργίες, αυτοάνοσα νοσήματα, και κακοήθειες.

Οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του αναπνευστικού αποτελούν τη πιο συχνή διάγνωση σε άτομα με IgA ανεπάρκεια, και η πλειονότητα αυτών οφείλεται σε βακτήρια όπως τα *Haemophilus influenzae* και *Streptococcus pneumoniae*. Ορισμένοι ασθενείς αναπτύσσουν βλάβες τελικών οργάνων, όπως βρογχιεκτασίες ή χρονίζουσες λοιμώξεις,¹⁷⁹ και μάλιστα τα άτομα με IgA-IgG2 ανοσοανεπάρκεια έχουν υψηλότερη πιθανότητα να εμφανίσουν πιο σοβαρές λοιμώξεις και επιπλοκές.¹⁸⁰ Όσον αφορά τις γαστρεντερικές λοιμώξεις, η λαμβλίαση, η δυσσαπορρόφηση, η δυσανεξία στη λακτόζη, η κοιλιοκάκη, η ελκώδης κολίτιδα και η οξώδης λεμφοειδής υπερπλασία είναι ανάμεσα στα νοσήματα που έχουν συσχετιστεί με την IgAD. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να οφείλονται, μεταξύ άλλων, σε βλάβη του γαστρεντερικού συστήματος (που λόγω της IgA ανεπάρκειας, επιτρέπει σε πρωτόζωα όπως η *Giardia lamblia* να προσκολληθούν στο επιθήλιο και να πολλαπλασιαστούν),¹⁸¹ σε δομικές βλάβες των εντερικών λαχνών και στην αδυναμία του βλεννογόνου να απομακρύνει μακρομόρια και πρωτεΐνες που διαπερνούν υποεπιδερμικούς και υποβλεννογόνιους ιστούς, διευκολύνοντας έτσι την παραγωγή αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων και τη δυσανεξία σε ορισμένες τροφές.¹⁸² Οι αλλεργικές διαταραχές που έχουν επίσης συνδεθεί με την IgAD περιλαμβάνουν αλλεργική επιπεφυκίτιδα, ρινίτιδα, κνίδωση, ατοπικό έκζεμα, τροφική αλλεργία, και το βρογχικό άσθμα,^{183,184} και φαίνεται να είναι πιο συχνές στα νεαρά άτομα. Μάλιστα ένα ποσοστό της τάξης του 25% των ασθενών με IgAD ταυτοποιείται κατά την αξιολόγηση για αλλεργικές διαταραχές.¹⁸³ Επίσης, μια συσχέτιση μεταξύ IgAD και κακοηθειών έχει αναφερθεί σε σποραδικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα σε μεγαλύτερες ηλικίες και είναι συνήθως

λεμφοειδούς και γαστρεντερικής προέλευσης (π.χ. αδενοκαρκίνωμα του στομάχου και οζώδης λεμφοειδής υπερπλασία).¹⁸⁵

Στις πιο σημαντικές κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών με IgAD ανήκουν τα αυτοάνοσα νοσήματα, με μία επικράτηση που κυμαίνεται από 7 μέχρι 36%,¹⁸⁶ κι η οποία φαίνεται να εξαρτάται από τα κριτήρια της IgAD. Αυτοαντισώματα έναντι, μεταξύ άλλων, του σουλφατιδίου, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης, του κολλαγόνου, των πυρηνικών πρωτεϊνών, των ερυθροκυττάρων και της θυρεοσφαιρίνης έχουν ανιχνευθεί σε αρκετούς ασθενείς με IgAD, ακόμη και απουσία εμφανών κλινικών εκδηλώσεων αυτοανοσίας.^{187,188} Τόσο συστηματικά όσο και οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με IgAD: αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός, νόσος Grave, κοιλιοκάκη, Henoch-Schoenlein πορφύρα, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, χρόνια ενεργή ηπατίτιδα, αιμολυτική αναιμία και θρομβοκυτταροπενία, μεταξύ άλλων. Από τις αιματολογικές αυτοάνοσες διαταραχές, οι πιο κοινές είναι η ιδιοπαθής θρομβοκυτταρική πορφύρα και η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία.¹⁸⁷ Η ανοσιακή ανεπάρκεια για την IgA φαίνεται να προδιαθέτει επίσης στην ανάπτυξη ρευματικών νοσημάτων, συνηθέστερα ΣΕΛ και ρευματοειδούς αρθρίτιδας (νεανικής και ενήλικης), μέσω βλάβης της άμυνας του ξενιστή έναντι μολυσματικών παραγόντων.^{189,190}

3.1.2. Η παθογένεια της αυτοανοσίας στην IgAD

3.1.2.1. Η γενετική επιδεκτικότητα για αυτονοσία στην IgAD

Αν και υπάρχει πληθώρα δημοσιεύσεων για την IgAD, φαίνεται ότι είναι μια πολύπλοκη ασθένεια, η γενετική επιδεκτικότητα στην οποία δεν έχει οριστεί επαρκώς. Η πλειοψηφία των ατόμων με IgAD εμφανίζει μία οικογενή προδιάθεση χωρίς κάποιο διακριτό πρότυπο Μεντελικής κληρονομικότητας, καθώς έχουν παρατηρηθεί σωματικά υπολειπόμενα, σωματικά επικρατή και σποραδικά πρότυπα μεταβίβασης.¹⁹¹ Λόγω της διακύμανσης στα πρότυπα κληρονομικότητας και της έλλειψης ενός καθορισμένου πρωτογενούς γενετικού ελαττώματος, είναι πιθανόν η IgAD να αποτελεί μια ετερογενή ομάδα γενετικών ανωμαλιών, όπως συμβαίνει και με τη CVID. Ωστόσο, συγκεκριμένοι απλότυποι για τα MHC τάξης I, II και III μόρια,^{183,192} καθώς και γονίδια που δεν σχετίζονται με το MHC έχουν αναφερθεί ότι συνδέονται με την ανάπτυξη της διαταραχής. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι η IgAD δεν συνδέεται με έναν συγκεκριμένο απλότυπο, αλλά ο σχετικός κίνδυνος για ανάπτυξη αυτής αποδίδεται στον κοινό εκτεταμένο MHC απλότυπο HLA-A1, B8, DR3, DQ2 (8.1 απλότυπος),¹⁹³ ο οποίος έχει συσχετιστεί με μία ποικιλία αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η νόσος Grave, ο ΣΕΛ, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, η κοιλιοκάκη και πιθανόν η μυασθένεια Gravis και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Το 45% των ασθενών με IgAD φέρουν τουλάχιστον ένα αντίγραφο του 8.1 απλότυπου, σε σύγκριση με το 16% του γενικού πληθυσμού, και η ομοζυγωτία ως προς αυτόν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την IgAD. Από την άλλη πλευρά, ο DR15, DQ6 απλότυπος φαίνεται να προσδίδει σχεδόν πλήρη προστασία έναντι της IgAD. Στην περιοχή του MHC τάξης III, ποικιλόμορφα του γονιδίου *MSH5* έχουν συσχετιστεί με την IgAD και την CVID, χωρίς ωστόσο να σημαίνει ότι το γονίδιο αυτό αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την IgAD.¹⁹⁴ Ωστόσο, ο HLA γονότυπος από μόνος του δεν καθορίζει την ανάπτυξη της αυτοανοσίας, καθώς τα μονοζυγωτικά δίδυμα είναι πολύ πιο πιθανό να αναπτύξουν την ίδια αυτοάνοση ασθένεια από τα MHC-πανομοιότυπα μη δίδυμα αδέλφια, γεγονός που υποδηλώνει ότι

γενετικοί παράγοντες, άλλοι από το MHC επηρεάζουν επίσης την ευαισθησία στη νόσο.¹⁹⁵ Άλλα γονίδια, όπως τα *IFIH1* και *CLEC16A*, έχουν πρόσφατα συνδεθεί με την IgAD.¹⁹⁶ Ποικιλόμορφα των γονιδίων αυτών έχουν συσχετιστεί επίσης με διάφορες αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 και ο ΣΕΛ. Πρόσφατες μεταanalύσεις έχουν εντάξει επιπλέον γενετικούς τόπους στη παθογένεια της IgAD, τους *TNFAIP3*, *PVT1*, *FAS*, *CDH23* και *TM7SF3*,¹⁹⁷ και ενός ακόμη μορίου που μεσολαβεί της ισοτυπικής μεταστροφής στα Β-κύτταρα, του TACI.¹⁹⁸

3.1.2.2. Η ανοσοπαθολογία της αυτοανοσίας στην IgAD

Διάφορες υποθέσεις έχουν προσπαθήσει να εξηγήσουν τη σύνδεση μεταξύ IgAD και αυτοάνοσων φαινομένων. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί είναι αρκετά πολύπλοκοι, αλλά τόσο οι πιθανοί μικροβιακοί ανοσιακοί παράγοντες όσο και άλλα εξωγενή μη μικροβιακά αντιγόνα θα μπορούσαν να λειτουργήσουν με παρόμοιο τρόπο. Η απουσία της IgA από τις επιφάνειες του βλεννογόνου φαίνεται ότι διευκολύνει την απορρόφηση πολλών αντιγόνων που ενδεχομένως θα μπορούσαν να αντιδράσουν διασταυρωτά με αυτοαντιγόνα. Μια άλλη εξήγηση για την εμφάνιση αυτοανοσίας στα άτομα αυτά είναι η αδυναμία απομάκρυνσης του αντιγόνου, με αποτέλεσμα την απόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων σε πολλά όργανα με τελικό αποτέλεσμα τη φλεγμονή. Μια άλλη θεωρία σχετίζει την IgAD με ανωμαλίες στην T-κυτταρική ρύθμιση, που θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη τόσο για αυτή όσο και για την αυτοανοσία. Η ανοσοανεπάρκεια των T-κυττάρων και η IgAD μπορεί να οδηγήσουν σε ελαττωματική άμυνα του ξενιστή κατά των ιογενών λοιμώξεων και ανώμαλη παρουσίαση των ιικών αντιγόνων που αντιδρούν διασταυρωτά με φυσιολογικούς ιστούς.¹⁹⁹

Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ένα νέο μηχανισμό που πιθανόν ευθύνεται για την εμφάνιση αυτοανοσίας στους ασθενείς με IgAD, ο οποίος βασίζεται σε έναν εκ των 5 υποδοχέων της IgA ανοσοσφαιρίνης, του FcαRI, που εκφράζεται σε όλους τους τύπους μυελοειδών κυττάρων, αλλά όχι σε κύτταρα του βλεννογόνου (συμπεριλαμβανομένων των εντερικών μακροφάγων). Σε φυσιολογικά άτομα, η IgA του ορού εμφανίζει μία σχετικά ισχυρή συγγένεια για τον FcαRI, σε σχέση με τον FcγR.²⁰⁰ Αυτή η μονοσθενής αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα τη μερική φωσφορυλίωση του FcγR-συνδεδεμένου FcαRI, ιδίως στο ITAM μοτίβο που αυτός φέρει, επάγοντας τη στρατολόγηση της SHP-1 φωσφατάσης της τυροσίνης. Αυτό οδηγεί σε καταστολή πολλών οδών ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοϋποδοχέων που φέρουν ITAM μοτίβο και των ITAM-ανεξάρτητων υποδοχέων, αποτρέποντας έτσι τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και την ανάπτυξη αυτοανοσίας. Ωστόσο, η ιδιοσυστατική έκφραση του FcαRI και η έλλειψη της IgA του ορού σε ασθενείς με επιλεκτική IgAD, καταστέλλει τον FcαRI-ανασταλτικό μηχανισμό εκθέτοντας τους ασθενείς αυτούς σε αυτοάνοσες καταστάσεις.²⁰¹

3.2. Η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια

Η CVID είναι το συχνότερο συμπτωματικό σύνδρομο πρωτοπαθούς αντισωματικής ανεπάρκειας,¹⁷⁷ που χαρακτηρίζεται από υπογαμμασφαιριναιμία²⁰² και υποτροπιάζουσες πνευμονολογικές βακτηριακές λοιμώξεις.²⁰³ Στην πραγματικότητα, ο όρος CVID αντιπροσωπεύει μία ιδιοπαθή ομάδα διαταραχών, όπως αντανακλάται από τον εξαιρετικά μεταβλητό, κλινικά και ανοσολογικά, φαινότυπο που απαντάται με την ίδια συχνότητα στα δύο φύλα, με επιπολασμό που κυμαίνεται από 1:10.000 έως 1:200.000. Η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων εντοπίζεται κατά κύριο λόγο κατά τη διάρκεια της 2ης και 3ης δεκαετίας της ζωής των ασθενών, με τους ασθενείς να εμφανίζουν σημαντική μείωση των επιπέδων κυρίως της IgG ανοσοσφαιρίνης, καθώς επίσης και των IgA, ή/και IgM ανοσοσφαιρινών.²⁰⁴ Η διάγνωση της CVID βασίζεται στον αποκλεισμό άλλων ασθενειών που σχετίζονται με υπογαμμασφαιριναιμία. Ένα σημαντικό ποσοστό ωστόσο των ασθενών δε διαγιγνώσκεται και υπάρχει μία έλλειψη αντιστοιχίας μεταξύ των κλινικών συμπτωμάτων και των συνολικών επιπέδων ανοσοσφαιρίνης.²⁰⁵

3.2.1 Κλινική εικόνα

Οι ασθενείς με CVID εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία σε βακτηριακές, κυρίως, λοιμώξεις (συνηθέστερα από τους *Streptococcus pneumoniae* και *Hemophilus influenzae*) του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, όπως μέση ωτίτιδα, χρόνια ιγμορίτιδα, βρογχίτιδα που συχνά οδηγούν σε βρογχιεκτασίες, αποτελώντας τη συχνότερη αιτία θανάτου και χρόνιων προβλημάτων υγείας σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες.²⁰² Οι λοιμώξεις μπορούν να αφορούν επίσης τη γαστρεντερική οδό, το δέρμα, τα μάτια, το σκελετό και το κεντρικό νευρικό σύστημα.¹⁷⁷ Οι ευκαιριακές λοιμώξεις από ιούς, πρωτόζωα και μύκητες είναι σπάνιες, με εξαίρεση τις μυκοπλασματικές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και των αρθρώσεων, που συχνά ενέχουν σημαντική καταστροφή των ιστών, και τα εντερογενή νοσήματα (όπως η λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος από εντεροϊό²⁰⁶). Μέχρι στιγμής, δεν έχει καταστεί σαφές αν οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται σε ανεπάρκεια της T-κυτταρικής σειράς.²⁰⁵ Τέλος ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών πάσχει από χρόνια διάρροια που μπορεί να προκληθεί από διάφορους μολυσματικούς οργανισμούς, όπως οι *Giardia lamblia* ή *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*. Αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν επίσης φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και δυσσαπορρόφηση,²⁰⁷ με χαρακτηριστική οζώδη λεμφοειδή υπερπλασία, διάχυτη λεμφοειδή διείδυση και απώλεια των εντερικών λαχνών.²⁰⁸

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ασθενείς με CVID που είναι επιρρεπείς σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις λόγω αδυναμίας παραγωγής αντισωμάτων, εμφανίζουν και μία επιδεκτικότητα σε αυτοάνοσες διαταραχές. Πολλαπλά αυτοαντισώματα έναντι αυτοαντιγόνων έχουν αναφερθεί στη CVID, αλλά σε σύγκριση με άλλες ανοσοανεπάρκειες (π.χ. sIgAD), ο επιπολασμός τους είναι χαμηλός.²⁰⁹ Η αυτοάνοση συναντάται σε ένα ποσοστό περίπου 22% των ασθενών με CVID (με μία ελαφριά επικράτηση στις γυναίκες), αποτελώντας, σε ορισμένες περιπτώσεις, το αρχικό σύμπτωμα κατά την παρουσίαση της νόσου.²⁰⁵ Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες, κυρίως η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα και η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, αποτελούν τις πιο κοινές μορφές αυτοάνοσας στη CVID,¹⁸⁷ με εξαίρεση τα παιδιά πάσχοντες.²¹⁰ Στις αιματολογικές αυτοάνοσες διαταραχές ανήκουν επίσης η αυτοάνοση ουδετεροπενία, η λεμφοπενία και η κακοήθης αναιμία.^{187,211} Αρκετά άλλα

αυτοάνοσα νοσήματα έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία σε ασθενείς με CVID. Σε αυτά συγκαταλέγονται διάφορες μορφές αρθρίτιδας (νεανικής και ενήλικης έναρξης), ο ΣΕΛ, η αγγειίτιδα,²⁰² αυτοάνοσες νευρολογικές διαταραχές (σύνδρομο Guillain-Barré),²¹⁰ χρόνια ενεργή ηπατίτιδα (που συχνά σχετίζεται με τον ιό της ηπατίτιδας C) και αυτοάνοσες ενδοκρινοπάθειες (π.χ. του θυρεοειδούς).²¹² Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης τόσο των μεσολαβούμενων από κύτταρα, όσο και από αυτοαντισώματα αυτοάνοσων διαταραχών στη CVID υποδηλώνει ότι πιο πολύπλοκες ανωμαλίες, πέραν της ποσοτικά και ποιοτικά ανώμαλης παραγωγής αντισωμάτων,²¹³ πιθανόν διέπουν τη μεγάλη ποικιλομορφία των κλινικών εκδηλώσεων της ανοσοανεπάρκειας, προτείνοντας ένα σημαντικό ρόλο της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης στην παθογένεση της αυτοανοσίας σε ασθενείς με CVID.

Οι ασθενείς με CVID έχουν υψηλή σχετικά συχνότητα εμφάνισης λεμφοϋπερπλαστικών, κυρίως καλοηθών, συνδρόμων (11-13%), η οποία αυξάνεται κατά την πέμπτη και έκτη δεκαετία της ζωής αυτών.²¹⁴ Τα περισσότερα λεμφώματα αφορούν σε εξωλεμφαδενικές θέσεις και είναι Β-κυτταρικού τύπου. Τέλος, ένα άλλο ενδιαφέρον κλινικό χαρακτηριστικό των ασθενών με CVID είναι διάφορες νεκρωτικές κοκκιωματώδεις βλάβες που διεισδύουν όργανα όπως το ήπαρ, οι λεμφαδένες, οι πνεύμονες, ο μυελός των οστών και το δέρμα κι έχουν συσχετιστεί στενά με την παρουσία σπληνομεγαλίας και με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων.²¹⁵

3.2.2. Η παθογένεια της αυτοανοσίας στη CVID

3.2.2.1. Η γενετική προδιάθεση για αυτοανοσία στη CVID

Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την εκδήλωση της CVID δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Αν και η CVID είναι συνήθως σποραδική, μία οικογενειακή συρροή με σωματικό επικρατές πρότυπο μεταβίβασης εμφανίζεται σε ένα 20% των ασθενών αυτών.²¹⁶ Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της sIgAD σε συγγενείς ασθενών με CVID, υποδηλώνει μια γενετική σύνδεση μεταξύ των δύο ασθενειών,²⁰⁵ ενώ έχουν αναφερθεί και κάποιες περιπτώσεις εξέλιξης της sIgAD σε CVID.²¹⁷ Υπάρχουν ακόμη στοιχεία ότι μέλη των οικογενειών ατόμων με CVID έχουν αυξημένη επίπτωση εμφάνισης αυτοανοσίας.²¹⁸ Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, αρκετές γενετικές βλάβες έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με CVID. Μελέτες γενετικής συσχέτισης και ανάλυση απλοτύπων έχουν δείξει σύνδεση της CVID με ορισμένα HLA αλληλόμορφα (π.χ. HLA-A1-B8-DR3 απλότυπος), μερικά από τα οποία μάλιστα έχουν συσχετιστεί και με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Πιο πρόσφατα, η CVID έχει συνδεθεί με γενετικές βλάβες σε γονίδια που εμπλέκονται στην τελική Β-κυτταρική διαφοροποίηση (συμπεριλαμβανομένων αυτών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταστροφής τάξης και της γένεσης μνημονικών Β-κυττάρων) όπως τα *ICOS*,²¹⁹ *CD19*,²²⁰ *TACI*,^{198,221} *BAFFR*,²²² και *MSH5*.¹⁹⁴ Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι η πρόωμη έναρξη κλινικών συμπτωμάτων και αυτοανοσίας στη CVID σχετίζεται με κάποια αλληλόμορφα του γονιδίου της συνδεόμενης με τη μαννόζη λεκτίνης, υποδηλώνοντας κάποιο πιθανό ρόλο της έμφυτης ανοσίας στη παθογένεση της νόσου.²²³

3.2.2.2. Οι μοριακοί μηχανισμοί στην πρόκληση αυτοανοσίας στη COVID

Η αδυναμία του ανοσιακού συστήματος των ασθενών με COVID να εξαλείψει αποτελεσματικά εξωγενή αντιγόνα και υπεραντιγόνα έχει ως αποτέλεσμα μία χρόνια φλεγμονώδη απάντηση, που μπορεί να οδηγήσει σε ιστική βλάβη, λόγω απόθεσης ανοσοσυμπλεγμάτων, σχηματισμό αντισωμάτων έναντι ιστών και διασταυρωτή αντίδραση μεταξύ υγιών ιστών και ξένων αντιγόνων. Ένας αριθμός ανοσιακών βλαβών έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στον φαινότυπο της COVID η κύρια φαινοτυπική βλάβη αντανακλάται σε μια αποτυχία διαφοροποίησης των πρώιμων και όψιμων Β-κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκκριση ανοσοσφαιρινών οποιουδήποτε ιστύπου (εξού και ο όρος δυσγαμμασφαιριναιμία). Τα Β-κύτταρα των ασθενών με COVID χαρακτηρίζονται από ελαττωματική ανοδική ρύθμιση δεικτών ενεργοποίησης και βλάβες στις σωματικές υπερμεταλλάξεις, οδηγώντας κατεπέκταση στη παραγωγή αντισωμάτων με μειωμένη ή μηδαμινή συγγένεια για το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους.²²⁴ Το ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό άωρων Β-κυττάρων στους ασθενείς αυτούς έχει προταθεί ως μια πιθανή αιτιολογία για την αυτοανοσία, ενισχύοντας την άποψη ότι τα άωρα Β-κύτταρα μπορούν να παράγουν αυτοαντισώματα, ενώ βρίσκονται στο μυελό των οστών.²²⁵ Όσον αφορά τον αριθμό των κυκλοφορούντων Β-κυττάρων, αυτός είναι συνήθως φυσιολογικός στη COVID, σε αντίθεση με τους πληθυσμούς των $IgM^+ CD27^+$ μνημονικών κυττάρων, των μεταστροφής τάξης $IgD^- IgM^- CD27^+$ μνημονικών Β-κυττάρων και των πλασματοκυττάρων που είναι σημαντικά μειωμένοι,²²⁶ ενώ αυξημένα είναι τα ποσοστά των αδιαφοροποιητών Β-κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών, υποδηλώνοντας σοβαρά ελαττώματα στην ωρίμανση των Β-κυττάρων.²²⁷

Η Τ-κυτταρική λειτουργία φαίνεται να είναι αρκετά μεταβλητή στη COVID. Μείωση του απόλυτου αριθμού των Τ-κυττάρων έχει παρατηρηθεί στο 1/3 των ασθενών αυτών, με μία ανεστραμμένη αναλογία $CD4^+/CD8^+$ κυττάρων,²²⁸ είτε λόγω μείωσης των $CD4^+ CD45RA^+$ παρθένων λεμφοκυττάρων ή λόγω αύξησης των $CD8^+$ Τ-κυττάρων που εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης όπως τον HLA-DR. Η αύξηση των $CD8^+$ κυττάρων συνοδεύεται από αύξηση των $CD8^+ CD28^-$ κυττάρων, που σχετίζονται με μία ταχεία μείωση των αναδιατάξεων του TCR, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του ρεπερτορίου του, υποδηλώνοντας μία ανωμαλία στο διαμέρισμα των παρθένων Τ-κυττάρων.²²⁹ Η Τ-λεμφοπενία αποδίδεται σε βλάβες στη θυμοποίηση, στη παραγωγή της IL-2, στη μεσολαβούμενη από την IL-7 ομοιόσταση και σε αυξημένη απόπτωση, όπως υποδηλώνεται και από τα επίπεδα των FAS και FASL.²³⁰ Μία μείωση επίσης των $CD4^+ CD25^{high}$ Treg, ενός κύριου ανοσορυθμιστικού πληθυσμού έχει συσχετιστεί επίσης με την εμφάνιση αυτοανοσίας σε ασθενείς με COVID.²³¹

Τέλος, ανωμαλίες στη φυσική ανοσία φαίνεται να περιπλέκουν ακόμη περισσότερο το φαινότυπο της COVID, καθώς μειώνουν την ικανότητα του οργανισμού να εξαλείψει εξωγενή αντιγόνα. Η αδυναμία των δενδριτικών κυττάρων να διαφοροποιηθούν, να ωριμάσουν και να εκφράσουν συνδεδεγμένα μόρια (όπως τα CD80, CD86, HLA-DR), οι μειωμένοι αριθμοί NK κυττάρων καθώς και βλάβες στη μεσολαβούμενη από NK κύτταρα κυτταροτοξικότητα έχουν επίσης αναφερθεί στη COVID.²³⁰

4. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Πρόσφατα, διάφορες μελέτες έχουν προσπαθήσει να διερευνήσουν τη πιθανή συμβολή σπάνιων ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας του *SIAE* σε αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι αντιφατικά.^{4,5} Από την άλλη πλευρά αρκετά ερωτήματα υπάρχουν όσον αφορά την εμφάνιση αυτοανοσίας στη Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα και στις Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες. Όσον αφορά τη ΝΙΑ, νέα δεδομένα έχουν ανακύψει τα τελευταία χρόνια σχετικά με τη διακριτή παθογένεση των δύο κύριων μορφών της, της συστηματικής και ολιγο/πολυαρθρικής. Η ΣΝΙΑ είναι ένα αυτοφλεγμονώδες νόσημα που χαρακτηρίζεται από μία ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση δικτύων κυτταροκινών που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η Ο/Π ΝΙΑ είναι μία μεσολαβούμενη από λεμφοκύτταρα αυτοάνοση κατάσταση που πυροδοτείται από αντιγόνα και οφείλεται σε μία ανισορροπία μεταξύ των αυτοδραστικών Th1/Th17 και των Treg κυττάρων που οδηγεί σε αποτυχία της T-κυτταρικής ανοχής.^{6,7} Αν και ορισμένες μελέτες για τη σύνδεση του *SIAE* με την αυτοανοσία, είχαν συμπεριλάβει στα νοσήματα που μελέτησαν τη ΝΙΑ, ωστόσο δεν είχε γίνει καμία σαφής διάκριση όσον αφορά τις μορφές της ΝΙΑ που συμπεριλήφθησαν σε αυτές. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, υποθέτουμε ότι τα λειτουργικώς ελαττωματικά ποικιλόμορφα του *SIAE* θα εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με την αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ σε σχέση με αυτούς με την αυτοφλεγμονώδη νόσο, υποστηρίζοντας ακόμη περισσότερο τους διαφορετικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τη παθογένεση αυτών των μορφών της ΝΙΑ.

Η αυτοανοσία μπορεί να υφίσταται ταυτόχρονα στο ίδιο άτομο με την ανοσοανεπάρκεια. Πολλά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, συμπεριλαμβανομένων των IgAD και CVID, έχουν συνδεθεί με αυτοάνοσες διαταραχές. Η πλειονότητα αυτών οφείλεται σε μία αδυναμία του ανοσιακού συστήματος των ασθενών να εξαλείψει αποτελεσματικά τα διάφορα αντιγόνα που προκαλούν εκτεταμένες ανοσιακές απαντήσεις.^{8,9} Στην περίπτωση της CVID, μία ομάδα ασθενών μπορεί να εμφανίσει αυτοανοσία ή/και κοκκιωματώδη φλεγμονή, γεγονός που περιπλέκει ακόμη περισσότερο τους μηχανισμούς οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση αυτών των διακριτών φαινοτύπων. Νέα δεδομένα δείχνουν επίσης μία σαφή επικράτηση διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων στις οικογένειες ασθενών με IgAD και CVID, που υποδηλώνει κάποια πιθανή κοινή γενετική συνιστώσα.¹⁰ Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν αυτά τα φαινόμενα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και η συσχέτιση των λειτουργικώς ελαττωματικών ποικιλομόρφων του *SIAE* με αυτοάνοσες καταστάσεις ίσως να υποδηλώνει και κάποιο πιθανό ρόλο αυτών στην πρόκληση αυτοανοσίας στους ασθενείς με IgAD και CVID, και στις οικογένειές τους.

5. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση μίας πιθανής σύνδεσης των σπάνιων ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας του *SIAE* με την αυτοάνοση, αλλά όχι με την αυτοφλεγμονώδη, μορφή της ΝΙΑ και της πιθανής συμβολής των ποικιλομόρφων αυτών στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυτοανοσίας σε ασθενείς με Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες, και στις οικογένειές τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

1.1. Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος 67 ασθενών με Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα (άνδρες/γυναίκες: 20/47, μέση ηλικία: 9.8 έτη, ηλικιακό εύρος: 2.5 έως 18.3 ετών). Τα δείγματα προήλθαν από την Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «η Αγία Σοφία». Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος του 2011 με Ιούλιο του 2013. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες -επιμένουσα ή επεκταθείσα ολιγοαρθρική ΝΙΑ, RF⁻ πολυαρθρική ΝΙΑ και συστηματική ΝΙΑ- σύμφωνα με τα ILAR κριτήρια. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τους ασθενείς εκείνους που διαγιγνώσκονται με αρθρίτιδα η οποία προσβάλλει 1 έως 4 αρθρώσεις κατά τους πρώτους 6 μήνες· η επιμένουσα αρθρίτιδα προσβάλλει μέχρι 4 αρθρώσεις σε όλη την πορεία της νόσου και η επεκταθείσα ολιγοαρθρίτιδα προσβάλλει περισσότερες από 4 αρθρώσεις μετά τους πρώτους 6 μήνες της νόσου. Όσον αφορά την ομάδα των ασθενών με RF⁻ πολυαρθρίτιδα, αυτή χαρακτηρίζεται από αρθρίτιδα που προσβάλλει 5 ή περισσότερες αρθρώσεις κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 μηνών της νόσου, απουσία IgM RF. Τέλος, η ομάδα των ασθενών με συστηματική ΝΙΑ χαρακτηρίζεται από την παρουσία αρθρίτιδας σε 1 ή περισσότερες αρθρώσεις που συνοδεύεται, ή της οποίας προηγείται, πυρετός διάρκειας τουλάχιστον 2 εβδομάδων· ο πυρετός είναι διαπιστωμένα περιοδικός, με εξάρσεις το λιγότερο κάθε 3 ημέρες και συνοδεύεται από ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω συμπτώματα: παροδικό εξάνθημα, γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια, ηπατο/σπληνομεγαλία, ορογονίτιδα.^{46,232} Επιπλέον, η πλειοψηφία των ασθενών εξετάστηκε για την παρουσία ή μη αντιπυρηνικών αντισωμάτων. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και με βάση τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε ανάλυση των οικογενειών 3 ασθενών με ολιγοαρθρίτιδα, πολυαρθρίτιδα και συστηματική αρθρίτιδα, αντίστοιχα. Οι συγγενείς των ασθενών με πολυαρθρίτιδα και συστηματική ΝΙΑ (τρεις σε αριθμό για την κάθε οικογένεια) είχαν ελεύθερο ιστορικό, ενώ στην οικογένεια του παιδιού με ολιγοαρθρίτιδα (τέσσερις σε αριθμό), η μητέρα έπασχε από αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Hashimoto και ο πατέρας από άσθμα. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών όπως και ο διαχωρισμός τους με βάση την κλινική εκδήλωση της νόσου συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών με ΝΙΑ

	Ολιγοαρθρίτιδα	Πολυαρθρίτιδα	Συστηματική αρθρίτιδα
Αριθμός (οικογενειών, ασθενών)	1, 47	1, 11	1, 9
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	11/36	4/7	5/4
Ηλικία ανάλυσης (μέση τιμή, εύρος)	9.6, 2.5-15.2	10.7, 2.9-18.3	10.1, 6-15.4

1.2. Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 40 ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες (άνδρες/γυναίκες: 15/25, μέση ηλικία: 31.7 έτη, ηλικιακό εύρος: 3 έως 85 ετών) (Πίνακας 2). Τα δείγματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και πρόκειται για ασθενείς που είτε παρακολουθούνται από το ίδιο εργαστήριο είτε στάλθηκαν για ανάλυση από άλλα τμήματα, συμπεριλαμβανομένων των *Ιπποκράτειο* και *Παπαγεωργίου* Γενικών Νοσοκομείων Θεσσαλονίκης. Ειδικότερα, αξιολογήθηκαν 26 ασθενείς με IgAD (22 με sIgAD, 4 με IgAD και sIgG4D: άνδρες/γυναίκες 11/15, μέση ηλικία: 24.6 έτη, ηλικιακό εύρος: 3 έως 79 ετών), 6 οικογένειες με CVID και αυτοανοσία, συμπεριλαμβανομένων 6 ασθενών (άνδρες/γυναίκες: 1/5, μέση ηλικία: 38.3 έτη, ηλικιακό εύρος: 29 έως 54 ετών) και 8 συγγενών (2 με IgG4D: άνδρες/γυναίκες: 3/5, μέση ηλικία: 49.9, ηλικιακό εύρος: 17 έως 85 ετών). Η πλειονότητα των περιπτώσεων ήταν σποραδικές, με την εξαίρεση τριών ασθενών που εμφάνισαν οικογενειακό ιστορικό ανοσοανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, στην πρώτη οικογένεια, δύο ασθενείς έπασχαν από CVID (ο προς εξέταση ασθενής και η ανιψιά του) και άλλα 3 άτομα από sIgG4D (μία κόρη και δύο ανίψια του προς εξέταση ασθενή-μόνο 2 αναλύθηκαν)· στη δεύτερη οικογένεια, δύο ασθενείς έπασχαν από sIgAD (ο προς εξέταση ασθενής και η μητέρα του)· και στην τρίτη, δύο δίδυμα αδέρφια είχαν sIgAD. Από τις οικογένειες των ασθενών αυτών αναλύσαμε για μεταλλάξεις του *SIAE* κυρίως τα άτομα με αυτοανοσία. Η διάγνωση της CVID έγινε βάση των τυπικών κριτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των χαμηλών επιπέδων της IgG του ορού, και/ή μίας IgM τιμής άνω των 2 τυπικών αποκλίσεων από την μέση τιμή, μίας απουσίας ή ανώμαλης απάντησης σε εμβόλια, και του αποκλεισμού άλλων αιτιών υπογαμμασφαιριναιμίας.²³³ Στα κλινικά χαρακτηριστικά αυτών, 5 ασθενείς με CVID παρουσίασαν λοιμώξεις του κατώτερου και ανώτερου αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος· όσον αφορά την παρουσία αυτοανοσίας, 2 ασθενείς με CVID έπασχαν από υποτροπιάζουσα ιδιοπαθή θρομβοκυτταροπενική πορφύρα, κακοήγη αναιμία και PA, ενώ 3 από τους συγγενείς τους από ΣΕΛ και PA. Για τους ασθενείς με IgAD, ισχύει ότι η διάγνωση αυτών έγινε κατά τη διάρκεια αξιολόγησης υποτροπιάζουσων λοιμώξεων και/ή αυτοανοσίας ή τυχαία. Δώδεκα ασθενείς είχαν παρουσιάσει υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, της γαστρεντερικής και ουροποιητικής οδού μεταξύ άλλων, και 10 ασθενείς έπασχαν από αυτοανοσία (σύνδρομο Raynaud, λύκο, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, κοιλιοκάκη, NIA, νόσο του θυρεοειδούς, υποτροπιάζουσα ιδιοπαθή θρομβοκυτταροπενική πορφύρα, καταστροφικό αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο).

Πίνακας 2: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες

	IgAD		Οικογένειες με CVID (n=6)	
	sIgAD	sIgAD+sIgG4D	CVID	Συγγενείς
Αριθμός ατόμων	22	4	6	8
Φύλο (άνδρες/ γυναίκες)	11/11	0/4	1/5	3/5
Ηλικία ανάλυσης (μέση τιμή, εύρος)	22.4, 3-64	36.5, 6-79	38.3, 29-54	49.9, 17-85
Αυτοανοσία	8	2	2	3
Λοιμώξεις	12	1	5	-

1.3. Υγιείς μάρτυρες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω, μία ομάδα 83 υγιών δοτών περιφερικού αίματος (άνδρες/γυναίκες: 24/59, μέση ηλικία: 9.6 έτη, ηλικιακό εύρος: 1.9 έως 18 ετών) αναλύθηκαν για τη διερεύνηση στο γενικό πληθυσμό του επιπολασμού δύο νέων μεταλλάξεων στα εξόνια 8 και 10 (με PCR-RFLP και ανάλυση αλληλουχίας βάσεων, αντίστοιχα), που δεν έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Η κατανομή των δύο φύλων και της ηλικίας έγινε με βάση αυτή των ασθενών με Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα. Τα δείγματα προήλθαν από τη βάση DNA του Εργαστηρίου Υγιεινής Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, που συντάχθηκε από την Παγκόσμια Ιατρική Ένωση (WMA) και εγκρίθηκε από τα Επιστημονικά Συμβούλια των συμμετεχόντων νοσοκομείων. Γραπτή συγκατάθεση δόθηκε από το συνοδεύοντα συγγενή, εφόσον η συναίνεση από τα παιδιά δεν ισχύει νομικά.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε μία σειρά αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους Πίνακες 3 και 4, αντίστοιχα.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια και χαρακτηριστικά αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau, Spain
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A, Greece
Αγαρόζη	peqGOLD Universal- Agarose	35-1020	Peqlab, Deutschland
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl ₂	PCR Run Buffer 10x (-MgCl ₂)	-	BIORON, Germany
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂	100Mm MgCl ₂	P041311-M	BIORON, Germany
Διάλυμα TBE	TBE buffer (10X)	A0972, 1000	Applichem, USA
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	25-2010	PEQLAB, Deutschland
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dATP	P/N 55082	Invitrogen, UK
	100mM dCTP	P/N 55083	
	100mM dGTP	P/N 55084	
	100mM dTTP	P/N 55084	
Περιοστική ενδονουκλεάση BtsCI	BtsCI Restriction Enzyme	R0647S	New England Biolabs, USA
Πολυμεράση Taq	DFS-Taq DNA polymerase	101005	BIORON, Germany
Χρωστική	Formaldehyde Load Dye	8550G	Ambion, UK
Kit εκχύλισης DNA	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
	PureLink® Genomic DNA Kit	K1820-01	Invitrogen, UK
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	QiAquick PCR Purification Kit	28106	Qiagen, Germany
	PureLink® PCR Purification Kit	K3100-01	Invitrogen, UK
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QiAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Germany
	PureLink Quick® Gel Extraction Kit	K2100-12	Invitrogen, UK

Πίνακας 4: Αναλώσιμα και χαρακτηριστικά αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 0,2-2 μL	0,2-2 μL pipette, sterile	F144801	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 1-10 μL	1-10 μL pipette, sterile	F144802	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20 μL	2-20 μL pipette, sterile	F123600	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 20-100 μL	20-100 μL pipette, sterile	F123615	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 50-200 μL	50-200 μL pipette, sterile	F123601	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 200-1000 μL	200-1000 μL pipette, sterile	F123602	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 10 μL	10 μL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 μL, με φίλτρο	100 μL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 μL	1000 μL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL	200 μL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL, με φίλτρο	200 μL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 μL, με φίλτρο	30 μL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σωληνάρια γενικής αίματος	S-Monovette® Haematology EDTA K ₃ tubes	04.1917	SARSTEDT, GERMANY
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	683201	GREINER BIO-ONE, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1.5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes- sterile,	430791	Corning, USA
Sterile Disposable Scalpel	Shangai Medex International	GRF-2980	MedExSupply, USA

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

3.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν ειδικά συστήματα των QiAamp DNA Blood Mini Kit και PureLink® Genomic DNA Kit (Qiagen & Invitrogen) για την επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαστροπικών αλάτων. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του παρασκευάσματος, για την απομόνωση γενετικού υλικού από εμπύρηννα λευκοκύτταρα και τον καθαρισμό του από προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικούς αναστολείς. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε με βάση το PureLink® Genomic DNA Kit. Το σύστημα απομόνωσης περιλάμβανε 4 τύπους διαλυμάτων, η σύσταση των οποίων δεν αναφέρεται από την εταιρία. Σε σωληνάρια φυγοκέντρησης των 1.5 mL μεταφέρθηκαν 200 μL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό K₃EDTA. Μετά από προσθήκη

20 μ L πρωτεΐνάσης K, για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις καρβοξυτελικές θέσεις αλειφατικών, αρωματικών και υδρόφοβων αμινοξέων, και 20 μ L RNAάσης για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 2 min. Κατόπιν, προστέθηκαν 200 μ L διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer) που ενισχύει τη δραστικότητα της πρωτεΐνάσης K, στοχεύοντας έτσι, στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατεπέκταση την αποτελεσματική λύση των κυττάρων, και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 55 °C για 10 min. Έπειτα προστέθηκαν 200 μ L αιθανόλης 96-100% που σε συνδυασμό με το διάλυμα λύσης επιτρέπει υψηλό βαθμό πρόσδεσης του DNA στη στήλη, και ακολούθησε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μ L από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και στις 14.000 στροφές για 3 min, αντίστοιχα, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικοί αναστολείς. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1,5 mL όπου και προστέθηκαν 100 μ L διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) σε αυτή, και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 1 min. Η τελική συγκέντρωση του DNA ανερχόταν περίπου στα 50-200 ng/ μ L. Τα δείγματα DNA διατηρούνται στους 2-8°C για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως στην δική μας περίπτωση.

3.2. Μοριακή μελέτη

3.2.1. PCR για το γονίδιο της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με εκκινητές προερχόμενους από τη διεθνή βιβλιογραφία,²³⁴ με σκοπό την ενίσχυση και των 10 εξονίων του γονιδίου *SIAE*. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται αναλυτικά η νουκλεοτιδική σύσταση και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύεται.

Πίνακας 5: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 10 εξονίων του *SIAE*

	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος (bp)	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
Εξόνιο 1	5'-GTACAGCCCAGTCCTGAGGTCG-3'	22	339 bp
	5'-GACGCGAGCCCCTAGCCTAGCTAG-3'	24	
Εξόνιο 2	5'-GACTGTATGTTCTTTGCTGTTTCAC-3'	25	344 bp
	5'-TGGATAATGTGAGCTACAGCATTAG-3'	25	
Εξόνιο 3	5'-CAGAGGCTGGGAATAGCCACAAATG-3'	25	366 bp
	5'-AGAAACAGCCCTGCTTCTCCTTGT-3'	25	
Εξόνιο 4	5'-GTGGATCAAGGTGATTCAGTGCAGC-3'	25	457 bp
	5'-CCTGAAATAGTCACCATCAGGAAGG-3'	25	
Εξόνιο 5	5'-GACCTCTGCCACCCCTTCTCACCTC-3'	25	380 bp
	5'-TGGGACATTCACCATATACTTAACT-3'	25	
Εξόνιο 6	5'-ACAAGTAAAAGTGGATAGATGACCA-3'	25	288 bp
	5'-TGTTGCTTTAAGCCACTACGTTCTA-3'	25	
Εξόνιο 7	5'-AAGACCACTACCTCAGGGCATGGAT-3	25	342 bp
	5'-CAGGAAAGAGATCCAAATAGCACAT-3'	25	
Εξόνιο 8	5'-GCAATGAGAGAAGCAGAAGCAGAGT-3'	25	360 bp
	5'-GACTCTTAAGTGCCAATCCTCAGTC-3'	25	
Εξόνιο 9	5'-CTGATCACAGAGTTCAGTCAACTTT-3'	25	432 bp
	5'-CAACCAAGACCCGCCACATCGTAAT-3'	25	
Εξόνιο 10	5'-CAGGTTTGTCTGCTTACTGTAGGA-3'	25	544 bp
	5'-ATATAGAAACAGCCATGTGCTAGCT-3'	25	

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικού DNA, 210 μmol/L από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl₂ and 0.04 U/μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μL. Στον Πίνακα 6 παρατίθενται οι θερμοκρασίες, η διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και οι κύκλοι στους οποίους διεξήχθησαν οι συνθήκες της αντίδρασης. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Robocycler Gradient 96 Stratagene (California, USA), και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας με dH₂O, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 6: Οι συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 10 εξονίων του *SIAE*

ΣΤΑΔΙΟ		ΕΞΟΝΙΟ									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	Θερμοκρασία	94°C									
	Διάρκεια	2 min									
Αποδιάταξη (Denaturation)	Θερμοκρασία	94°C									
	Διάρκεια	30 sec									
Υβριδισμός (Annealing)	Θερμοκρασία	63°C	53°C	60°C	60°C	56°C	56°C	56°C	55°C	55°C	55°C
	Διάρκεια	30 sec									
Επέκταση (Extension)	Θερμοκρασία	72°C									
	Διάρκεια	30 sec									
Τελική επέκταση (Final Extension)	Θερμοκρασία	72°C									
	Διάρκεια	5 min									
Κύκλοι		33	32	32	33	30	32	32	32	32	32

3.2.2. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αγαρόζης

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς και των καθαρισμένων προϊόντων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης [2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE]. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για 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 ηλεκτροφορείται (5 μL δείγματος, 1 μL χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις 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 bitmap.

3.2.3. Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων

Η παρουσία γενετικών ποικιλομόρφων στο γονίδιο *SIAE* ελέγχθηκε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) των δειγμάτων, μετά από καθαρισμό των προϊόντων PCR. Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχιση με τη χρήση του BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση των Purelink PCR Purification Kit/QiAquick PCR Purification Kit και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/Invitrogen). Το σύστημα απομόνωσης αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων και βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Ακολουθεί περιγραφή του πρωτοκόλλου των kit της Invitrogen. Η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR, σε όγκο τετραπλάσιο από τον αρχικό, και κατόπιν μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit) για την προσρόφηση του DNA στη στήλη. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης, ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 650 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer). Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και έπειτα ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (14.000 στροφές για 3 min), χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (10 Mm Tris-HCL, pH 8.5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 2 min.

Για την απομάκρυνση τυχόν παραπροϊόντων, αντί της παραπάνω μεθόδου, ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση του PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Αρχικά, το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται για 50 min και κατόπιν τοποθετείται σε μηχανήμα που εκπέμπει υπεριώδες φως (UV transilluminator, UVITEC, Cat.No. M031308), προκειμένου να απομονωθεί με νυστέρι η επιθυμητή δέσμη. Ακολουθεί μεταφορά της σε φιαλίδιο στο οποίο προστίθεται το διάλυμα L3 (Gel Solubilization Buffer) σε όγκο τριπλάσιο από αυτόν της γέλης που απομονώθηκε και έπειτα επώαση σε υδατόλουτρο, στους 50°C για 20 min [κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιούμε ανάδευση (vortex) ανά 3 min, προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η γέλη]. Στη συνέχεια προσθέτουμε στο φιαλίδιο έναν όγκο ισοπροπανόλης, αναδεύουμε και μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε ειδική στήλη (Quick Gel Extraction Column, Invitrogen) που περιέχει μεμβράνη, ειδική για τη δέσμευση του DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min, απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης και προσθήκη 500 μ L διαλύματος πλύσης (Wash Buffer, W1) που περιέχει αιθανόλη. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min και ακολουθεί ακόμη μία, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, στις 14.000 στροφές για 3 min, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύματος πλύσης και της αιθανόλης. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, E5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min. Και στις δύο μεθόδους τα

καθαρισμένα προϊόντα ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 μL και κατόπιν ηλεκτροφορούνται, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητάς τους. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR αποθηκεύονται στους -20°C , μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

3.2.4. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Για την μελέτη της νεοπροσδιορισθείσας μετάλλαξης p.Gln343Pro στην ομάδα των υγιών μαρτύρων, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων PCR του 8ου εξονίου με το ένζυμο περιορισμού BtsCI. Για την πέψη 6 μL προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 0.32 U/ μL του ενζύμου, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 10X NEBUFFER 4, που παρέχεται από τον κατασκευαστή (New England Biolabs). Ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 50°C για τουλάχιστον 16 ώρες. Στην Εικόνα 6 απεικονίζεται η αλληλουχία του δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το BtsCI.



Εικόνα 6: Η αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το ένζυμο *BtsCI*

Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Καθώς το ένζυμο αναγνωρίζει μόνο το μεταλλαγμένο αλληλίο, απουσία μετάλλαξης, διακρίνεται μόνο μία δέσμη προϊόντος PCR στις 360 bp (προϊόν όγδοου εξονίου). Σε περίπτωση ομοζυγωτίας, δημιουργείται μία νέα θέση κατάτμησης, οπότε ανιχνεύονται δύο δέσμες, στις 150 και 210 bp, έπειτα από ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος. Για τους ετεροζυγώτες φορείς της μετάλλαξης, ανιχνεύονται μετά την ηλεκτροφόρηση τρεις δέσμες στις 150, 210 και 360 bp. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα στο οποίο είχε επιβεβαιωθεί η παρουσία της μετάλλαξης (σε ετεροζυγωτία) με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος

Ένας αριθμός ετερόζυγων σημειακών αντικαταστάσεων χωρίς λειτουργική σημασία προσδιορίστηκαν σε όλες τις ομάδες ασθενών που μελετήθηκαν καθώς επίσης και στους υγιείς μάρτυρες. Μία σύνοψη αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7. Σε αυτές περιλαμβάνονται τόσο συνώνυμα όσο και μη- ποικιλόμορφα. Όσον αφορά τις μη συνώνυμες αλλαγές, μία μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση αδενίνης από γουανίνη στον νουκλεοτίδιο 20536 (g.20536A>G, c.160A>G ή c.265A>G) του εξονίου 3, όπου μία μεθειονίνη αντικαθίσταται από βαλίνη (και τα δύο είναι μη πολικά αμινοξέα) στη θέση 89 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (**p.Met89Val**) ταυτοποιήθηκε σε 3 ασθενείς με ολιγοαρθρίτιδα, σε μία ασθενή με sIgAD και διαλείπουσες αναπνευστικές λοιμώξεις καθώς και στη μητέρα μίας ασθενούς με CVID, η οποία έπασχε από ΣΕΛ. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, ο οποίος είχε αρχικά αποδειχθεί από πειράματα υπερέκφρασης ότι επηρεάζει την έκκριση της πρωτεΐνης, αλλά όχι τη δραστικότητα της, προτάθηκε από τους Surolija et al ότι σε ομοζυγωτία μπορεί να προδιαθέσει σε αυτοανοσία, γεγονός που ενισχύθηκε από την απουσία ομόζυγων φυσιολογικών μαρτύρων από τη συγκεκριμένη μελέτη.⁴ Ωστόσο, μετέπειτα έρευνες έδειξαν μία παρόμοια επικράτηση του ομόζυγου γονοτύπου μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών ατόμων,⁵ και μάλιστα η ίδια ερευνητική ομάδα που το χαρακτήρισε ως «λειτουργικά ελαττωματικό ποικιλόμορφο» έδειξε πρόσφατα ότι η συγκεκριμένη αλλαγή δεν έχει κάποια επίδραση στην έκκριση της πρωτεΐνης, καθώς η δράση της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος είναι ενδοκυτταρική στα λεμφοκύτταρα και η έκκρισή της αποτελεί ένα ψευδές αποτέλεσμα της *in vitro* υπερέκφρασης.⁴⁴ Επομένως, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν έχει κάποια λειτουργική σημασία και άρα δεν σχετίζεται με την προδιάθεση σε αυτοανοσία.

Δύο ακόμη μη συνώνυμα ποικιλόμορφα των εξονίων 2 και 10, τα g.11927A>G (c.107A>G ή c.212A>G) και g.44181C>T (c.1295C>T ή c.1400C>T) που οδηγούν σε αντικατάσταση μίας λυσίνης (μικρό υδρόφοβο αμινοξύ) από αργινίνη (μεσαίου μεγέθους υδρόφοβο αμινοξύ) στη θέση 71 (**p.Lys71Arg**) και σε αντικατάσταση αλανίνης από βαλίνη (μη πολικά αμινοξέα) στη θέση 467 (**p.Ala467Val**) της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκαν από κοινού σε έναν ασθενή με συστηματική αρθρίτιδα. Το p.Ala467Val ανιχνεύθηκε επίσης σε έναν από τους φυσιολογικούς μάρτυρες που εξετάστηκαν. Ωστόσο, τα συχνά αυτά ποικιλόμορφα βρέθηκε ότι επιδεικνύουν επίσης φυσιολογική καταλυτική δραστικότητα και έκκριση και εμφανίζονται εξίσου συχνά και στον υγιή πληθυσμό. Αν και οι συχνότητες αυτών των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στους ασθενείς με ΣΝΙΑ αποκλίνουν από αυτές που έχουν παρατηρηθεί στο γενικό πληθυσμό, δε μπορούμε να βγάλουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα, λόγω του πολύ μικρού αριθμού των ασθενών με ΣΝΙΑ που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Βέβαια, η διαφορά στη συχνότητα του p.Ala467Val μεταξύ του γενικού πληθυσμού και των υγιών μαρτύρων που αναλύσαμε, ίσως να αξίζει περαιτέρω διερεύνηση.

Επιπλέον, μία σειρά 4 ετερόζυγων σημειακών αντικαταστάσεων, που οδηγούν σε συνώνυμες αλλαγές, προσδιορίστηκαν στις ομάδες των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Ένας ασθενής με sIgAD έφερε την g.26532T>C (c.322T>C ή c.427T>C) μετάλλαξη στο εξόνιο 4 (**p.Leu143=**). Η g.26573T>C (c.363T>C ή c.468T>C) στο κωδικόνιο 156 (**p.Ser156=**) ταυτοποιήθηκε σε 3 ασθενείς με την

ολιγοαρθρική, πολυαρθρική και συστηματική μορφή της ΝΙΑ αντίστοιχα, καθώς επίσης και σε έναν ασθενή με sIgAD. Ένας ασθενής με συστηματική αρθρίτιδα έφερε την g.41490T>C (c.915T>C ή c.1020T>C) αλλαγή στο κωδικόνιο 340 (**p.Arg340=**), ενώ η g.44233G>A (c.1347G>A ή c.1452G>A) στο κωδικόνιο 484 (**p.Thr484=**) ταυτοποιήθηκε σε δύο ασθενείς με ολιγοαρθρική και συστηματική ΝΙΑ, αντίστοιχα, σε έναν ασθενή με sIgAD και σε 2 φυσιολογικούς μάρτυρες. Να σημειωθεί ότι τρεις από τους ασθενείς που αναφέρθηκαν προηγουμένως, με ολιγοαρθρίτιδα, συστηματική ΝΙΑ και sIgAD (ο ασθενής αυτός έπασχε και από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1) έφεραν παράλληλα τις p.Ser156= και p.Thr484= σιωπηλές αντικαταστάσεις. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση ενός αγοριού με συστηματική αρθρίτιδα ο οποίος βρέθηκε να φέρει τα Lys71Arg - Ser156= - Ala467Val - Thr484= SIAE ποικιλόμορφα. Προκειμένου να διερευνήσουμε τη πιθανή σημασία των μη συνώνυμων ποικιλομόρφων, προχωρήσαμε σε ανάλυση της οικογένειας του παιδιού, η οποία είχε ελεύθερο ιστορικό. Διαπιστώσαμε ότι τόσο ο πατέρας, όσο και η αδερφή του παιδιού αυτού έφεραν τις Lys71Arg- Ala467Val αλλαγές (και την Thr484=), υποδεικνύοντας ότι τα αλληλόμορφα αυτά βρίσκονται στο ίδιο κλώνο του DNA. Το γεγονός αυτό ίσως προτείνει ότι αν μόνο το ένα αντίγραφο του SIAE είναι παθολογικό, μπορεί να είναι ανίκανο να συμβάλλει στην πρόκληση αυτοανοσίας από μόνο του, εξηγώντας ίσως και τη λειτουργική ουδετερότητα των συγκεκριμένων ποικιλομόρφων. Πάντως μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την παρουσία ή μη αυτών των ποικιλομόρφων στον ίδιο κλώνο. Τέλος ένας αριθμός ιντρονικών βλαβών, γνωστών αλλά και νέων, προσδιορίστηκαν σε όλες τις ομάδες ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων που μελετήθηκαν, οι οποίες και συνοψίζονται στον Πίνακα 8.

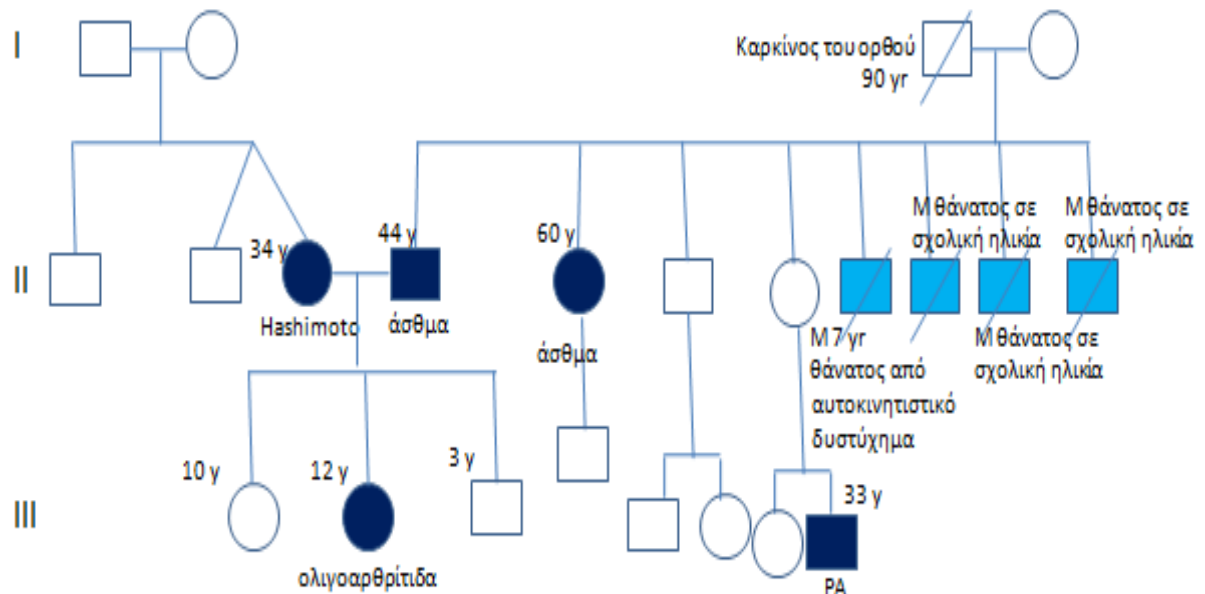
4.2. Γενετικές βλάβες του γονιδίου της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος

Από το σύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, με Ο/Π, συστηματική ΝΙΑ και αντισωματικές ανεπάρκειες, 2 ασθενείς με την αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ έφεραν σε ετεροζυγωτία δύο νέες μεταλλάξεις που δεν έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Πίνακας 7). Πιο συγκεκριμένα, ένα κορίτσι με επιμένουσα ANA⁺ ολιγοαρθρίτιδα έφερε μία μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση στο εξόνιο 8, την **g.41498A>C** (c.1201A>C ή c.1028A>C) που οδηγεί σε παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 343, όπου μία γλουταμίνη αντικαθίσταται από προλίνη (**p.Gln343Pro**) (Εικόνα 8α). Η βιοπληροφορική ανάλυση της μεταστροφής αυτής της πουρίνης (A) σε πυριμιδίνη (C) με τα προγράμματα **SIFT** (**Shorting Intolerant From Tolerant**- <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) και **PolyPhen-2** (**Polymorphism Phenotyping v2**- <http://genetics.bwh.harvard.edu/rph2/>), τα οποία προβλέπουν αν μια αμινοξική αντικατάσταση επηρεάζει την λειτουργία μίας πρωτεΐνης με βάση την ομολογία της αλληλουχίας της με άλλες και τις φυσικές ιδιότητες των αμινοξέων, έδειξε ότι η αλλαγή αυτή πιθανότατα έχει κάποια λειτουργική σημασία για την πρωτεΐνη, καθώς επιφέρει την αντικατάσταση ενός ουδέτερου πολικού αμινοξέος από ένα μη πολικό αμινοξύ, σε μία επικράτεια η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των μελών της υπεροικογένειας των υδρολασών σερίνης, στην οποία ανήκει η SIAE. Η δεύτερη μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε σε ένα κορίτσι με RF⁻ ANA⁺ πολυαρθρίτιδα (η μορφή αυτή της αρθρίτιδας ομοιάζει αρκετά με την ANA⁺ ολιγοαρθρίτιδα που έπασχε η ασθενής με την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη), το οποίο έφερε μία σημειακή αντικατάσταση στο εξόνιο 10, την **g.44266C>A** (c.1658C>A ή c.1485C>A),

που οδηγεί σε μία ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη, όπου μία τυροσίνη αντικαθίσταται από ένα κωδικόνιο λήξης (**p.Tyr495Ter**) (Εικόνα 8β). Λόγω του πρόωρου σήματος λήξης, μια πρωτεΐνη μόνο 495 αμινοξέων θα μπορούσε δυνητικά να παραχθεί. Ωστόσο, επειδή η συγκεκριμένη αλλαγή εντοπίζεται κοντά στο 3' άκρο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, είναι πιθανόν να οδηγεί σε ένα μερικώς λειτουργικό κατατετηγμένο πολυπεπίδιο, αντί μίας πλήρως αδρανούς πρωτεΐνης. Να σημειώσουμε ότι λόγω της πολύ μικρής συχνότητας των ποικιλομόρφων αυτών στο δείγμα των ασθενών που εξετάστηκε, είναι σαφές ότι δεν μπορεί να γίνει καμία συσχέτιση με τις υποκατηγορίες της ολιγοαρθρίτιδας και πολυαρθρίτιδας, ούτε με την παρουσία ή μη αντιτυρηνικών αντισωμάτων. Αν και η λειτουργική ανάλυση των 2 αυτών ποικιλομόρφων κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να αποσαφηνιστεί το κατά πόσο θα μπορούσαν αυτοί οι δύο γονότυποι να τροποποιούν την επιδεκτικότητα των ατόμων σε αυτοανοσία, υπάρχει πιθανότητα η παρουσία και η λειτουργική σχετικότητα αυτών των ποικιλομόρφων να μην επηρεάζει την ευαισθησία αυτή, καθώς το γονιδίωμα του ανθρώπου περιέχει χιλιάδες σπάνια λειτουργικώς ελαττωματικά ποικιλόμορφα που δεν επηρεάζουν τον φαινότυπο.

4.2.1. Οικογενειακή μελέτη των δύο νέων μεταλλάξεων

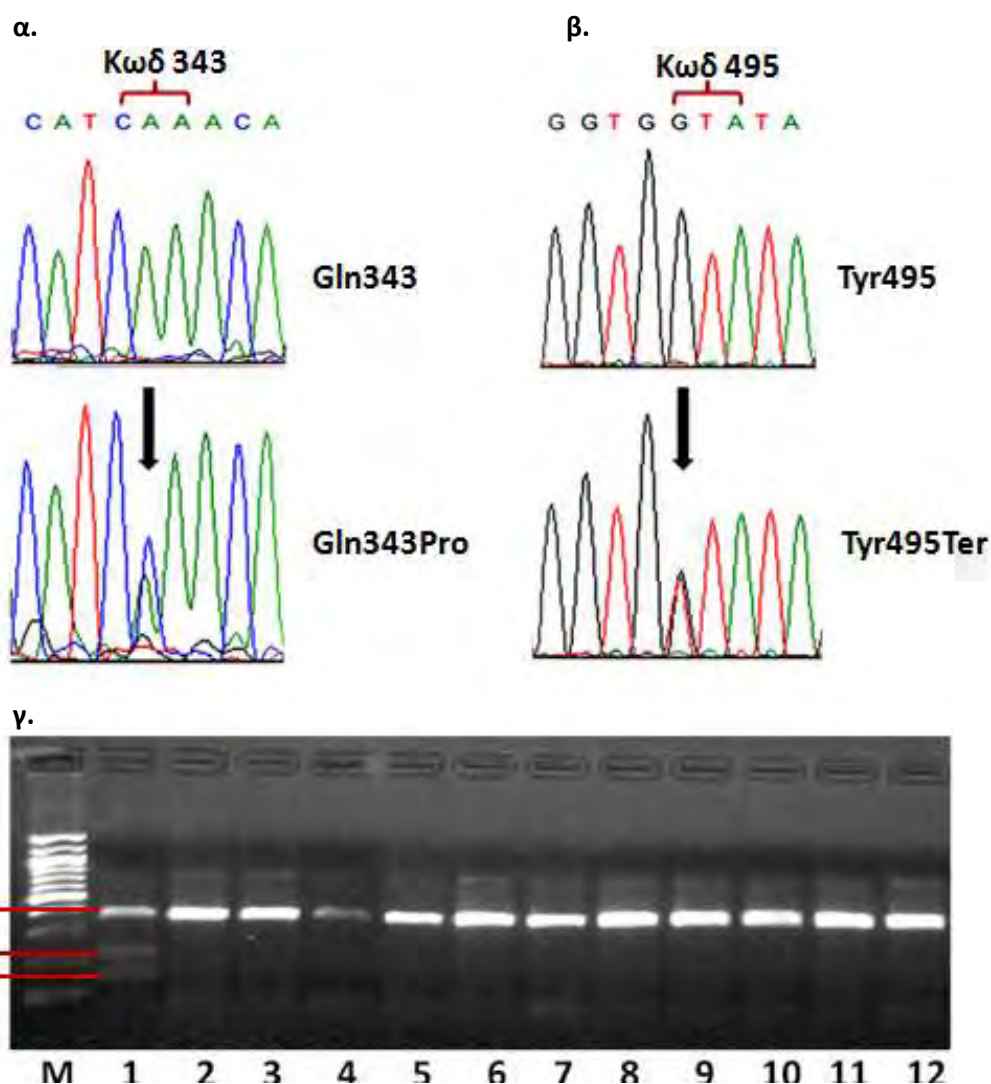
Λαμβάνοντας υπόψη τη μη σπάνια εμφάνιση στις οικογένειες των ασθενών με ΝΙΑ, άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (ΡΑ και ΣΕΛ, μεταξύ άλλων),²³⁵ που έχουν συσχετιστεί με το *SIAE*, θελήσαμε να ενισχύσουμε την υπόθεσή μας ότι αυτά τα δύο νέα, πιθανώς ελαττωματικά, ποικιλόμορφα του γονιδίου, που ταυτοποιήθηκαν στις 2 ασθενείς με την αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ, έχουν όντως κάποια σημασία για την ανάπτυξη αυτοανοσίας, πραγματοποιώντας ανάλυση των οικογενειών των 2 παιδιών για τις νεοπροσδιορισθείσες μεταλλάξεις. Η μελέτη της οικογένειας της ασθενούς με την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη (Εικόνα 7) έδειξε ότι μόνο ο πατέρας, που έφερε στο περιβάλλον του ένα συγγενή με ρευματοειδή αρθρίτιδα, αν και ο ίδιος έπασχε μόνο από άσθμα, ήταν ετερόζυγος για την ίδια μετάλλαξη. Ωστόσο, η μητέρα, που έπασχε από αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Hashimoto αλλά και τα δύο αδέρφια του κοριτσιού ήταν φυσιολογικά ως προς τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Να σημειωθεί ότι ο πατέρας και τα δύο αδέρφια του παιδιού έφεραν σε ετεροζυγωτία τη συνώνυμη αλλαγή **p.Arg340=**. Όσον αφορά την οικογένεια της ασθενούς με την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη, με ελεύθερο ιστορικό, η ανάλυση έδειξε ότι ο πατέρας ήταν ετερόζυγος για την ίδια βλάβη, ενώ η μητέρα και ο αδερφός της ασθενούς έφεραν μία ιντρονική αντικατάσταση (g.44078C>T, c.1320+15T>C ή c.1493+15T>C). Τα δεδομένα αυτά φαίνεται να ενισχύουν την άποψη ότι οι μεταλλάξεις του *SIAE* δεν αποτελούν από μόνες τους αιτιολογικό παράγοντα για την εκδήλωση αυτοανοσίας, αλλά σε συνδυασμό με άλλες γενετικές βλάβες μπορούν να συνεισφέρουν σε έναν βαθμό σε αυτήν. Η συμβολή των οικογενειακών μελετών είναι σαφής στη διαλεύκανση της σημαντικότητας της *SIAE* για διάφορες αυτοάνοσες καταστάσεις.



Εικόνα 7: Οικογενειακό ιστορικό της ασθενούς με την παρερμηνεύσιμη p.Gln343Pro μετάλλαξη.

4.2.2. Επίπτωση των νεοπροσδιορισθέντων μεταλλάξεων στο γενικό πληθυσμό

Προκειμένου να διερευνήσουμε τον επιπολασμό των p.Gln343Pro και p.Tyr495Ter μεταλλάξεων στο γενικό πληθυσμό, εξετάσαμε μία ομάδα 83 φυσιολογικών μαρτύρων με PCR-RFLP και ανάλυση αλληλουχίας βάσεων για τις 2 μεταλλάξεις, αντίστοιχα (Εικόνα 8). Διαπιστώσαμε ότι κανένας εξ αυτών δεν έφερε κάποιο από τα δύο ποικιλόμορφα, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για πολυμορφικές βλάβες αλλά για σπάνιους γονοτύπους, που μπορεί να έχουν λειτουργική σημασία και να συμβάλλουν στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αυτοανοσίας στα άτομα αυτά.



Εικόνα 8: Απεικόνιση των p.Gln343Pro (α) και p.Tyr495Ter (β) *SIAE* μεταλλάξεων (σε ετεροζυγωτία). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP για την p.Gln343Pro βλάβη· M: μάρτυρας, δείγμα 1: ετερόζυγο για τη βλάβη, δείγματα 2-12: με γονότυπο p.Gln343. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε γέλη αгарόζης 2% (γ).

Πέραν της παρουσίας των δύο νέων, πιθανά ελαττωματικών ποικιλομόρφων του *SIAE* σε 2 ασθενείς με την αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ, κανένας από τους ασθενείς με την αυτοφλεγμονώδη μορφή της νόσου δεν έφερε κάποιο γνωστό λειτουργικά ελαττωματικό ποικιλόμορφο. Η ύπαρξη λειτουργικής σημαντικότητας αυτών των 2 νεοπροσδιορισθέντων γονοτύπων πιθανών να μπορέσει να συμβάλει στην κατανόηση των διακριτών μηχανισμών που εμπλέκονται στη παθογένεια των δύο αυτών μορφών της ΝΙΑ που αναλύθηκαν, και που προδιαθέτουν στην εκδήλωση της αυτοάνοσης (Ο/Π ΝΙΑ) έναντι της αυτοφλεγμονώδους (συστηματική ΝΙΑ) κατάστασης. Λαμβάνοντας υπόψη τη σπανιότητα αυτών των δύο γονοτύπων καθώς και το πολύ μικρό μέγεθος του δείγματος των ασθενών με συστηματική αρθρίτιδα που αναλύθηκαν, είναι κατανοητό ότι δεν τίθεται θέμα στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων, κάτι το οποίο όμως συμπίπτει με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία για τη σύνδεση των σπάνιων ποικιλομόρφων απώλειας λειτουργίας του *SIAE* με την αυτοανοσία. Οπότε, δε μπορούμε να αποκλείσουμε μία πιθανή συμβολή των δύο νέων ποικιλομόρφων του *SIAE* στην ανάπτυξη της αυτοάνοσης μορφής της ΝΙΑ. Μελέτες αλληλούχισης μεγαλύτερων ομάδων ασθενών/μαρτύρων σε συνδυασμό με λειτουργικές δοκιμές, απαιτούνται για τον πληρέστερο

προσδιορισμό της συχνότητας, του ρεπερτορίου και των κυτταρικών συνεπειών αυτών των σπάνιων ποικιλομόρφων στην αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ καθώς επίσης και για την αλληλεπίδραση τους με πιο κοινά ποικιλόμορφα στη προδιάθεση για ΝΙΑ, αντί κάποιου άλλου αυτοάνοσου νοσήματος.

Ο γενετικός τόπος του *SIAE* δεν έχει εμπλακεί ειδικά στην παθογένεση της ΝΙΑ από προηγούμενες μελέτες. Η μόνη αναφορά για τη πιθανή συμβολή του γονιδίου *SIAE* στη ΝΙΑ, έγινε από τους Surolija et al,⁴ οι οποίοι συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους 33 ασθενείς, χωρίς ωστόσο να γίνει λόγος για τις μορφές της αρθρίτιδας που αναλύθηκαν, και διαπίστωσαν την παρουσία του p.Phe404Ser (g.42653T>C, c.1106T>C ή c.1211T>C) λειτουργικά ελαττωματικού ποικιλομόρφου σε έναν εξ αυτών. Για το λόγο αυτό, αλλά και επειδή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία σχετικά με τη συμβολή των σπάνιων γονοτύπων στον κίνδυνο ανάπτυξης αυτοανοσίας, πιστεύουμε ότι η παρούσα συσχέτιση της ΝΙΑ με ποικιλόμορφα του *SIAE* προσθέτει μια σημαντική νέα διάσταση στη γενετική κατανόηση των εν λόγω όρων.

Όσον αφορά τους ασθενείς με IgA ανοσοανεπάρκεια και CVID, καθώς και τους συγγενείς αυτών με αυτοανοσία, πέρα από κάποια λειτουργικώς φυσιολογικά ποικιλόμορφα, δεν ταυτοποιήθηκε κάποιος επιπλέον γονότυπος που να δύναται να επηρεάσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης και να έχει συσχετιστεί με την αυτοανοσία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ακετυλεστεράση του σιαλικού οξέος ενδέχεται να μην αποτελεί έναν από τους παράγοντες που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσων καταστάσεων στα άτομα με αντισωματικές ανεπάρκειες και στις οικογένειές τους. Παρόλα αυτά, μεγαλύτερος αριθμός ατόμων απαιτείται προκειμένου να ισχυροποιηθεί το συμπέρασμα αυτό.

Πίνακας 7: Συνώνυμα και μη- ποικιλόμορφα του *SIAE* που ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των ασθενών (Ο/Π ΝΙΑ, ΣΝΙΑ, ΡΑDs) και των φυσιολογικών μαρτύρων που εξετάστηκαν. Όλες οι βλάβες ταυτοποιήθηκαν σε ετερόζυγη μορφή.

Εξόνιο	c.DNA	g. DNA	πρωτεΐνη	rs	Συχνότητα *							
					Γενικός πληθυσμός	Ο/Π ΝΙΑ (n=58)		ΣΝΙΑ (n=9)		ΡΑDs (n=40)		Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=83)
						%	n, %	Υποκατηγορία	n, %	Υποκατηγορία	n, %	
2	c.107A>G ή c.212A>G	g.11927A>G	p.Lys71Arg	rs12282107	9.8				1, 5.6	ANA ⁻		
3	c.160A>G ή c.265A>G	g.20536A>G	p.Met89Val	rs78778622	3.7	3, 2.6	Επιμένουσα ANA ⁺ ONIA (2) Επιμένουσα ANA ⁻ ONIA (1)			2, 2.5	slgAD, ΣΕΛ	
4	c.363T>C ή c.468T>C	g.26573T>C	p.Ser156=	rs1942663	22.7	2, 1.7	Επιμένουσα ANA ⁺ ONIA, RF ⁻ ANA ⁻ ΠΝΙΑ	1, 5.6	ANA ⁻	1, 1.3	slgAD	
	c.322T>C ή c.427T>C	g.26532T>C	p.Leu143=	rs201552273	0.1					1, 1.3	slgAD	
8	c.915T>C ή c.1020T>C	g.41490T>C	p.Arg340=	rs35451312	0.2			1, 5.6	ANA ⁻			
	c.1201A>C ή c.1028A>C	g.41498A>C	p.Gln343Pro	νέα	-	1, 0.9	Επιμένουσα ANA ⁺ ONIA					
10	c.1295C>T ή c.1400C>T	g.44181C>T	p.Ala467Val	rs7941523	3.4			1, 5.6	ANA ⁻			1, 0.6
	c.1347G>A ή c.1452G>A	g.44233G>A	p.Thr484=	rs7941327	16.8	1, 0.9	Επιμένουσα ANA ⁺ ONIA	1, 5.6	ANA ⁻	1, 1.3	slgAD	2, 1.2
	c.1658C>A ή c.1485C>A	g.44266C>A	p.Tyr495Ter	νέα	-	1, 0.9	RF ⁻ ANA ⁺ ΠΝΙΑ					

* Τα % αναφέρονται στη συχνότητα αλληλίου

Πίνακας 8: Ιντρονικές βλάβες του *SIAE* που ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των ασθενών (Ο/ΠΝΙΑ, ΣΝΙΑ, PADs) και των φυσιολογικών μαρτύρων που εξετάστηκαν. Όλες οι βλάβες ταυτοποιήθηκαν σε ετερόζυγη μορφή, με εξαίρεση την g.11964G>A που ανιχνεύθηκε και σε ομοζυγωτία.

Περιοχή	c.DNA	g. DNA	rs	Γενικός Πληθυσμός	Συχνότητα *			
					Ο/Π ΝΙΑ (n=58) n, %	ΣΝΙΑ (n=9) n, %	PADs (n=40) n, %	Φυσιολογικοί Μάρτυρες (n=83)* n, %
5'UTR	c.-36T>G ή c.121T>G	g.7560T>G	νέα	-	1, 0.9			
	-39+1539T>A ή c.-11T>A	g.7585T>A	rs202021641	0.2		1, 5.6		
2	c.124+20G>A ή c.229+20G>A	g.11964G>A	rs512225	25.1	Ετερο/Ομοζυγώτες: 21/3, 23.8	Ετεροζυγώτες: 4, 22.2	Ετερο/Ομοζυγώτες : 12/2, 20	
5	c.617+37C>T ή c.722+37C>T	g.31722C>T	rs79300393	2.3	1, 0.9		1, 1.3	
	c.617+65C>T ή c.722+65C>T	g.31750C>T	rs149793694	Δεν υπάρχουν στοιχεία	1, 0.9			
6	c.1005+59G>C ή c.832+59G>C	g.33297G>C	νέα	-		1, 5.6		
7	c.861+39C>T ή c.966+39C>T	g.33978C>T	rs142737112	0.5	1, 0.9		1, 1.3	
8	c.1019+81A>G ή c.1124+81A>G	g.41675A>G	rs620499	5	8, 6.9		4, 5	
	c.1020-68C>T ή c.1125-68C>T	g.42499C>T	rs77343428	1.7	2, 1.7	1, 5.6	1, 1.3	
9	c.1020-66T>C ή c.1125-66T>C	g.42501T>C	rs140288211	Δεν υπάρχουν στοιχεία	1, 0.9			
	c.1320+15T>C ή c.1493+15T>C	g.42795T>C	νέα	-	1, 0.9			
	c.1216-24C>T ή c.1321-24C>T	g.44078C>T	rs138194723	2.9	9, 7.8	1, 5.6		6, 3.6

* Τα % αναφέρονται στη συχνότητα αλληλίου.

Ο συνολικός αριθμός των σπάνιων ποικιλομόρφων του *SIAE*, όπως προκύπτει από διάφορες πρόσφατες μελέτες, φαίνεται να είναι πολύ μεγάλος. Επί του παρόντος υπάρχουν 67 τεκμηριωμένα σπάνια ποικιλόμορφα του *SIAE*,⁴⁴ και ο αριθμός αυτός φαίνεται να αυξάνεται ραγδαία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μία ανάγκη για μεγάλης κλίμακας αναλύσεις της αλληλουχίας του γονιδίου *SIAE*, ακολουθούμενες από λειτουργικές δοκιμές των νέων ποικιλομόρφων προκειμένου να ταυτοποιηθούν εκείνα που μπορεί να συσχετίζονται με αυτοάνοσες καταστάσεις. Μελέτες γονοτύπησης των επιμέρους ποικιλομόρφων θα συμβάλλουν στον προσδιορισμό στατιστικώς σημαντικών αποτελεσμάτων για οποιοδήποτε δεδομένο σπάνιο αλληλόμορφο και της συμβολής αυτών στην επιδεκτικότητα για αυτοανοσία.

Είδαμε προηγουμένως ότι τα αποτελέσματα των μελετών σχετικά με τη πιθανή συσχέτιση σπάνιων γενετικών ποικιλομόρφων του *SIAE* με την ευπάθεια σε συχνά ή μη αυτοάνοσα νοσήματα, ήταν αντικρουόμενα μεταξύ των διάφορων ερευνητικών ομάδων. Παρόλα αυτά, σπάνια ποικιλόμορφα απώλειας λειτουργίας στα γονίδια *TREX1* και *CYP27B1* έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη ΣΕΛ και πολλαπλής σκλήρυνσης αντίστοιχα, προτείνοντας ότι είναι πιθανόν σπάνια γενετικά ποικιλόμορφα να παίζουν κάποιο ρόλο στον αυξημένο κίνδυνο για κάποιες λιγότερο διαδεδομένες αυτοάνοσες καταστάσεις. Αποδείξαμε την παρουσία 2 ετεροζυγωτών για τα δύο νέα p.Gln343Pro και p.Tyr495Ter ποικιλόμορφα του *SIAE* μεταξύ των ασθενών με την αυτοάνοση μορφή της ΝΙΑ, τα οποία απουσίαζαν από όλες τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών, όπως επίσης και από τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, έχουμε σκοπό να περάσουμε σε ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού ασθενών με ΝΙΑ και PADs, σε συνδυασμό με οικογενειακές μελέτες γενετικής συσχέτισης, προκειμένου να ισχυροποιήσουμε τη σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας. Επίσης, θα προχωρήσουμε σε λειτουργική ανάλυση των δύο νέων ποικιλομόρφων, προκειμένου να αποσαφηνίσουμε το κατά πόσο αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία του ενζύμου και δύνανται κατεπέκταση να συμβάλλουν στην εκδήλωση αυτοανοσίας. Τέλος, λόγω των αποκλίσεων που παρατηρήσαμε στις συχνότητες ορισμένων κοινών μη συνώνυμων ποικιλομόρφων μεταξύ του γενικού πληθυσμού και των ατόμων που αναλύθηκαν από την παρούσα μελέτη, είναι πιθανόν να πραγματοποιήσουμε πληθυσμιακή ανάλυση για αυτές, σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε αν οι διαφορές που εντοπίστηκαν έχουν κάποια πρακτική σημασία. Λαμβάνοντας υπόψη όμως ότι όλα τα καταλυτικά ελαττωματικά σπάνια ποικιλόμορφα που έχουν ανιχνευθεί μέχρι τώρα βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συχνότητα, η ένταξη ακόμη και ενός μόνο καταλυτικού φυσιολογικού συχνού ποικιλομόρφου υψηλής συχνότητας θα μπορούσε να παραποιήσει την συνολική ανάλυση και να εμποδίσει οποιαδήποτε πιθανή συσχέτιση που συνδέεται με τα ελαττωματικά σπάνια ποικιλόμορφα.

Συνεπώς, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι ο γενετικός τόπος του *SIAE* είναι πιθανόν να συμβάλλει στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της αυτοάνοσης, έναντι της αυτοφλεγμονώδους, μορφής της Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας, ενισχύοντας τη διακριτή παθογένεση αυτών των νοσημάτων, αλλά δε φαίνεται να σχετίζεται με την προδιάθεση για εμφάνιση διάφορων αυτοάνοσων καταστάσεων στους ασθενείς με IgA ανοσοανεπάρκεια και COVID, και στις οικογένειές τους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Guimarães MJ, Bazan JF, Castagnola J, Diaz S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Varki A, Zlotnik A. Molecular cloning and characterization of lysosomal sialic acid O-acetyltransferase. *J Biol Chem* 1996;271:13697–13705.
- ² Stoddart A, Zhang Y, Paige CJ. Molecular cloning of the cDNA encoding a murine sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase and RNA expression in cells of hematopoietic and non-hematopoietic origin. *Nucleic Acids Res* 1996;24:4003–4008.
- ³ Cariappa A, Takematsu H, Liu H, Diaz S, Haider K, Boboila C, Kalloo G, Connole M, Shi HN, Varki N, Varki A, Pillai S. B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med* 2009;206:125-38.
- ⁴ Suroli I, Pirnie SP, Chellappa V, Taylor KN, Cariappa A, Moya J, Liu H, Bell DW, Driscoll DR, Diederichs S, Haider K, Netravali I, Le S, Elia R, Dow E, Lee A, Freudenberg J, De Jager PL, Chretien Y, Varki A, MacDonald ME, Gillis T, Behrens TW, Bloch D, Collier D, Korzenik J, Podolsky DK, Hafler D, Murali M, Sands B, Stone JH, Gregersen PK, Pillai S. Functionally defective germline variants of sialic acid acetyltransferase in autoimmunity. *Nature* 2010;466:243-247
- ⁵ Hunt KA, Smyth DJ, Balschun T, Ban M, Mistry V, Ahmad T, Anand V, Barrett JC, Bhaw-Rosun L, Bockett NA, Brand OJ, Brouwer E, Concannon P, Cooper JD, Dias KR, van Diemen CC, Dubois PC, Edkins S, Fölster-Holst R, Fransen K, Glass DN, Heap GA, Hofmann S, Huizinga TW, Hunt S, Langford C, Lee J, Mansfield J, Marrosu MG, Mathew CG, Mein CA, Müller-Quernheim J, Nutland S, Onengut-Gumuscu S, Ouwehand W, Pearce K, Prescott NJ, Posthumus MD, Potter S, Rosati G, Sambrook J, Satsangi J, Schreiber S, Shtir C, Simmonds MJ, Sudman M, Thompson SD, Toes R, Trynka G, Vyse TJ, Walker NM, Weidinger S, Zhernakova A, Zoledziwska M; Type 1 Diabetes Genetics Consortium; UK Inflammatory Bowel Disease (IBD) Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Weersma RK, Gough SC, Sawcer S, Wijmenga C, Parkes M, Cucca F, Franke A, Deloukas P, Rich SS, Todd JA, van Heel DA. Rare and functional SIAE variants are not associated with autoimmune disease risk in up to 66,924 individuals of European ancestry. *Nat Genet* 2011;44:3-5.
- ⁶ Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev* 2011;10:482-489
- ⁷ Mellins ED, Macaubas C, Grom AA. Pathogenesis of systemic juvenile idiopathic arthritis: some answers, more questions. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:416-426
- ⁸ Jacob CM, Pastorino AC, Fahl K, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC. Autoimmunity in IgA Deficiency: Revisiting the Role of IgA as a Silent Housekeeper. *J Clin Immunol.* 2008;28 Suppl 1:S56-61.
- ⁹ Lopes-da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2008;28 Suppl 1:S46-55.
- ¹⁰ Jorgensen GH, Thorsteinsdottir I, Gudmundsson S, Hammarstrom L, Ludviksson BR. Familial aggregation of IgAD and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2009;131:233-9.
- ¹¹ Ollila J, Vihinen M. B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:518-23.
- ¹² LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570-80.
- ¹³ Murphy K. *Janeway's Immunobiology*, 8th edition. New York: Garland Publishing 2011.
- ¹⁴ Γαϊτανάκη Α, Μπαξεβάνης Κ. Ανοσολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007: σελ 318-320
- ¹⁵ Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, Goodnow CC. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 1993;72:325–335

-
- ¹⁶ Higa HH, Manzi A, Varki A. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. Purification, characterization, and properties of a glycosylated rat liver esterase specific for 9-O-acetylated sialic acids. *J Biol Chem*. 1989;264:19435-42.
- ¹⁷ Schauer R, Reuter G, Stoll S. Sialate O-acetylsterases: key enzymes in sialic acid catabolism. *Biochimie* 1988;70:1511-9.
- ¹⁸ Zhu H, Chan HC, Zhou Z, Li J, Zhu H, Yin L, Xu M, Cheng L, Sha J. A Gene Encoding Sialic-Acid-Specific 9-O-Acetylsterase Found in Human Adult Testis. *J Biomed Biotechnol* 2004;2004:130-136.
- ¹⁹ Takematsu H, Diaz S, Stoddart A, Zhang Y., Varki A. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetylsterase activities can be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J. Biol. Chem* 1999;274:25623–25631.
- ²⁰ Butor C, Higa HH, Varki A. Structural, immunological, and biosynthetic studies of a sialic acid-specific O-acetylsterase from rat liver. *J Biol Chem* 1993;268:10207-13.
- ²¹ Hayes BK, Varki A. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. Sialic acid esterases of diverse evolutionary origins have serine active sites and essential arginine residues. *J Biol Chem* 1989;264:19443-8.
- ²² Varki A, Hooshmand F, Diaz S, Varki NM, Hedrick SM. Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetylsterase. *Cell* 1991;65:65-74.
- ²³ Guimarães MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T. Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1832-3.
- ²⁴ Higa HH, Paulson JC. Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids. *J Biol Chem* 1985;260:8838-49.
- ²⁵ Cyster JG, Goodnow CC. Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment. *Immunity* 1997;6:509–17.
- ²⁶ Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 2005;174:1775–81.
- ²⁷ Peaker CJ and Neuberger MS. Association of CD22 with the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol* 1993;23:1358–1363
- ²⁸ Hippen KL, Schram BR, Tze LE, Pape KA, Jenkins MK, Behrens TW. In vivo assessment of the relative contributions of deletion, anergy, and editing to B cell self-tolerance. *J Immunol* 2005;175:909–916
- ²⁹ LePrince C, Draves KE, Geahlen RL, Ledbetter JA, Clark EA. CD22 associates with the human surface IgM–B-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3236–40.
- ³⁰ Cornall RJ, Cyster JG, Hibbs ML, Dunn AR, Otipoby KL, Clark EA, Goodnow CC. Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity* 1998;8:497–508.
- ³¹ Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005;22:9–18.
- ³² Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, Matthews RJ, Lin J, Thomas ML, Fearon DT. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 1995;269:242–4.
- ³³ Chen J, McLean PA, Neel BG, Okunade G, Shull GE, Wortis HH. CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nat Immunol* 2004;5:651–7.

-
- ³⁴ Hoffmann A, Kerr S, Jellusova J, Zhang J, Weisel F, Wellmann U, Winkler TH, Kneitz B, Crocker PR, Nitschke L. Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol* 2007;8:695–704
- ³⁵ Gross AJ, Lyandres JR, Panigrahi AK, Prak ET, DeFranco AL. Developmental acquisition of the Lyn-CD22- SHP-1inhibitory pathway promotes B cell tolerance. *J Immunol* 2009;182:5382–5392
- ³⁶ Pillai S, Cariappa A, Pirnie SP. Esterases and autoimmunity:the sialic acid acetylerase pathway and the regulation of peripheral B cell tolerance. *Trends Immunol* 2009;30:488-93.
- ³⁷ Cornall RJ, Cyster JG, Hibbs ML, Dunn AR, Otipoby KL, Clark EA, Goodnow CC. Polygenic autoimmune traits:Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity* 1998;8:497–508.
- ³⁸ Lanoue A, Batista FD, Stewart M, Neuberger MS. Interaction of CD22 with α 2,6-linked sialoglycoconjugates:innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *Eur J Immunol* 2002;32:348-355.
- ³⁹ Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008;322:881–888.
- ⁴⁰ Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases—disorders of immune homeostasis. *Nature Rev. Genet.* 2006;7:917–928.
- ⁴¹ Szymański K, Skórka A, Szybowska A, Bednarczuk T, Płoski R. Functionally defective germline variant of sialic acid acetylerase (Met89Val) is not associated with type 1 diabetes mellitus and Graves' disease in a Polish population. *Tissue Antigens* 2011;78:214-6.
- ⁴² Gan EH, MacArthur K, Mitchell AL, Pearce SH. The role of functionally defective rare germline variants of sialic acid acetylerase in autoimmune Addison's disease. *Eur J Endocrinol.* 2012;167:825-8.
- ⁴³ Hirschfield GM, Xie G, Lu E, Sun Y, Juran BD, Chellappa V, Coltescu C, Mason AL, Milkiewicz P, Myers RP, Odin JA, Luketic VA, Bacon B, Bodenheimer H, Liakina V, Vincent C, Levy C, Pillai S, Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA. Association of primary biliary cirrhosis with variants in the CLEC16A, SOCS1, SPIB and SIAE immunomodulatory genes. *Genes Immun* 2012;13:328-35.
- ⁴⁴ Chellappa V, Taylor KN, Pedrick K, Donado C, Netravali IA, Haider K, Cariappa A, Dalomba NF, Pillai S. M89V Sialic acid Acetyl Esterase (SIAE) and all other non-synonymous common variants of this gene are catalytically normal. *PLoS One* 2013;8:e53453.
- ⁴⁵ Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2007;369:767-78
- ⁴⁶ Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, He X, Maldonado-Cocco J, Orozco-Alcala J, Prieur AM, Suarez-Almazor ME, Woo P. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis:second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004;31:390–2.
- ⁴⁷ Al-Matar MJ, Petty RE, Tucker LB, Malleson PN, Schroeder DA, Cabral DA. The early pattern of joint involvement predicts disease progression in children with oligoarticular (pauciarticular) juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2708– 15.
- ⁴⁸ Guillaume S, Prieur AM, Coste J, Job-Deslandre C. Long-term outcome and prognosis in oligoarticular-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1858– 65.
- ⁴⁹ Minden K, Kiessling U, Listing J, Niewerth M, Döring E, Meincke J, Schöntube M, Zink A. Prognosis of patients with juvenile chronic arthritis and juvenile spondyloarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:2256– 63.

-
- ⁵⁰ Huemer C, Malleson PN, Cabral DA, Huemer M, Falger J, Zidek T, Petty RE. Patterns of joint involvement at onset differentiate oligoarticular juvenile psoriatic arthritis from pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:1531–5.
- ⁵¹ Verpoort KN, van Dongen H, Allaart CF, Toes RE, Breedveld FC, Huizinga TW. Undifferentiated arthritis--disease course assessed in several inception cohorts. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S12-7.
- ⁵² Martini A. Are the number of joints involved or the presence of psoriasis still useful tools to identify homogeneous disease entities in juvenile idiopathic arthritis? *J Rheumatol* 2003;30:1900–03.
- ⁵³ Cassidy JT, Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB (eds). *Textbook of pediatric rheumatology*. 5th edn. Philadelphia:Elsevier, 2005.
- ⁵⁴ Szer IS, Kimura Y, Malleson PN, Southwood T. *Arthritis in children and adolescents*. New York:Oxford University Press 2006.
- ⁵⁵ Felici E, Novarini C, Magni-Manzoni S, Pistorio A, Magnani A, Bozzola E, Buoncompagni A, Martini A, Ravelli A. Course of joint disease in patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:1805–10.
- ⁵⁶ Tsitsami E, Bozzola E, Magni-Manzoni S, Viola S, Pistorio A, Ruperto N, Martini A, Ravelli A. Positive family history of psoriasis does not affect the clinical expression and course of juvenile idiopathic arthritis patients with oligoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;49:488–93.
- ⁵⁷ Ravelli A, Felici E, Magni-Manzoni S, Pistorio A, Novarini C, Bozzola E, Viola S, Martini A. Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis Rheum* 2005;52:826–32.
- ⁵⁸ Ravelli A, Varnier GC, Oliveira S, Castell E, Arguedas O, Magnani A, Pistorio A, Ruperto N, Magni-Manzoni S, Galasso R, Lattanzi B, Dalprà S, Battagliese A, Verazza S, Allegra M, Martini A. Antinuclear antibody positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:267-75
- ⁵⁹ Prakken BJ, Albani S. Using biology of disease to understand and guide therapy of JIA. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23:599–608.
- ⁶⁰ Nistala K, Wedderburn LR. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:602–06.
- ⁶¹ van Rossum M, van Soesbergen R, de Kort S, ten Cate R, Zwinderman AH, de Jong B, Dijkmans B, van Venrooij WJ. Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:825–28.
- ⁶² Southwood TR, Petty RE, Malleson PN, Delgado EA, Hunt DW, Wood B, Schroeder ML. Psoriatic arthritis in children. *Arthritis Rheum* 1989;32:1007–13.
- ⁶³ Stoll ML, Lio P, Sundel RP, Nigrovic PA. Comparison of Vancouver and International League of Associations for rheumatology classification criteria for juvenile psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;59:51–58.
- ⁶⁴ Ansell BM. Juvenile chronic arthritis. *Scand J Rheumatol* 1987;66 (suppl):47–50.
- ⁶⁵ Ostrov BE. What is the significance of dry synovitis? *Pediatr Rheumatol Online J* 2004;2:114–18.
- ⁶⁶ Woo P, Colbert RA. An overview of genetics of paediatric rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23:589–97.
- ⁶⁷ Thompson SD, Moroldo MB, Guyer L, Ryan M, Tombragel EM, Shear ES, Prahalad S, Sudman M, Keddache MA, Brown WM, Giannini EH, Langefeld CD, Rich SS, Nichols WC, Glass DN. A genome-wide scan for juvenile

-
- rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis Rheum* 2004;50:2920–30.
- ⁶⁸ Massa M, Mazzoli F, Pignatti P, De Benedetti F, Passalia M, Viola S, Samodal R, La Cava A, Giannoni F, Ollier W, Martini A, Albani S. Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2721–29.
- ⁶⁹ Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum* 1999;42:2261–8.
- ⁷⁰ Prahalad S. Genetics of juvenile idiopathic arthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:588–94.
- ⁷¹ Thomson W, Donn R. Juvenile idiopathic arthritis genetics — what's new? What's next? *Arthritis Res* 2002;4:302–6.
- ⁷² Shoenfeld Y, Aharon-Maor A, Sherer Y. Vaccination as an additional player in the mosaic of autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:181–4.
- ⁷³ Aharon-Maor A, Shoenfeld Y. The good, the bad and the ugly of vaccination. *Isr Med Assoc J* 2000;2:225–7
- ⁷⁴ Ronaghy A, de Jager W, Zonneveld-Huijssoon E, Klein MR, van Wijk F, Rijkers GT, Kuis W, Wulffraat NM, Prakken BJ. Vaccination leads to an aberrant FOXP3 T cell response in non-remitting Juvenile Idiopathic Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:2037-43.
- ⁷⁵ Bywaters EG. Pathologic aspects of juvenile chronic polyarthritis. *Arthritis Rheum* 1977;20:271–6.
- ⁷⁶ Wynne-Roberts CR, Anderson CH, Turano AM, Baron M. Light- and electronmicroscopic findings of juvenile rheumatoid arthritis synovium: comparison with normal juvenile synovium. *Semin Arthritis Rheum* 1978;7:287–302.
- ⁷⁷ Silvermann ED, Isacovics B, Petsche D, Laxer RM. Synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective T cell migration to inflamed tissue. *Clin Exp Immunol* 1993;91:90-95.
- ⁷⁸ Black AP, Bhayani H, Ryder CA, Gardner-Medwin JM, Southwood TR. T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res* 2002;4:177-183.
- ⁷⁹ Murray K, Thompson SD, Glass DN. Pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors. *Arch Dis Child* 1997;77:530-534.
- ⁸⁰ Moroldo MB, Donnelly P, Saunders J, Glass DN, Giannini EH. Transmission disequilibrium as a test of linkage and association between HLA alleles and pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1620-1624.
- ⁸¹ Wedderburn LR, Patel A, Varsani H, Woo P. Divergence in the degree of clonal expansions in inflammatory T cell subpopulations mirrors HLA-associated risk alleles in genetically and clinically distinct subtypes of childhood arthritis. *Int Immunol* 2001;13:1541-1550.
- ⁸² Prahalad S, Ryan MH, Shear ES, Thompson SD, Giannini EH, Glass DN. Juvenile rheumatoid arthritis: linkage to HLA demonstrated by allele sharing in affected sibpairs. *Arthritis Rheum* 2000;43:2335-2338.
- ⁸³ Kamphuis S, Hrafnkelsdóttir K, Klein MR, de Jager W, Haverkamp MH, van Bilsen JH, Albani S, Kuis W, Wauben MH, Prakken BJ. Novel self-epitopes derived from aggrecan, fibrillin, and matrix metalloproteinase-3 drive distinct autoreactive T-cell responses in juvenile idiopathic arthritis and in health. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R178.
- ⁸⁴ Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest* 1994;94:25–33.

-
- ⁸⁵ Waggett AD, Kielty CM, Shuttleworth CA. Microfibrillar elements in the synovial joint: presence of type VI collagen and fibrillin-containing microfibrils. *Ann Rheum Dis* 1993;52:449–53.
- ⁸⁶ Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:617–29.
- ⁸⁷ Gattorno M, Gerloni V, Morando A, Comanducci F, Buoncompagni A, Picco P, Fantini F, Pistoia V, Gambini C. Synovial membrane expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor 1 in juvenile idiopathic arthritides. *J Rheumatol* 2002;29:1774–9.
- ⁸⁸ Miossec P, van den Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:2105–15.
- ⁸⁹ Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:765–74.
- ⁹⁰ Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, Amox D, Roord S, de Kleer I, Bonnin D, Lanza P, Berry C, Massa M, Billetta R, Albani S. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4228–33.
- ⁹¹ Zrioual S, Toh ML, Tournadre A, Zhou Y, Cazalis MA, Pachot A, Miossec V, Miossec P. IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood. *J Immunol* 2008;180:655–63.
- ⁹² Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, Cane S, Frizziero L, Facchini A. High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:522–7.
- ⁹³ Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van Den Berg W, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001;3:168–77.
- ⁹⁴ Koshy PJ, Henderson N, Logan C, Life PF, Cawston TE, Rowan AD. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 2002;61:704–13.
- ⁹⁵ Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003;170:2655–62.
- ⁹⁶ Katz Y, Nativ O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. *Arthritis Rheum* 2001;44:2176–84.
- ⁹⁷ Koenders MI, Lubberts E, van de Loo FA, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Kolls JK, Di Padova FE, Joosten LA, van den Berg WB. Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions. *J Immunol* 2006;176:6262–9.
- ⁹⁸ Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005;52:1037–46.
- ⁹⁹ Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev* 2010;10:112–5.
- ¹⁰⁰ Antiga E, Kretz CC, Klempt R, Massi D, Ruland V, Stumpf C, Baroni G, Hartmann M, Hartschuh W, Volpi W, Del Bianco E, Enk A, Fabbri P, Krammer PH, Caproni M, Kuhn A. Characterization of regulatory T cells in patients with dermatomyositis. *J Autoimmun* 2010;35:342–50.

-
- ¹⁰¹ Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.
- ¹⁰² Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277–85.
- ¹⁰³ Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005;174:164–73.
- ¹⁰⁴ Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775–87.
- ¹⁰⁵ Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523–32.
- ¹⁰⁶ Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
- ¹⁰⁷ Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:2423–33.
- ¹⁰⁸ Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)/CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008;29:429–35.
- ¹⁰⁹ de Graeff-Meeder ER, van Eden W, Rijkers GT, Prakken BJ, Kuis W, Voorhorst-Ogink MM, van der Zee R, Schuurman HJ, Helders PJ, Zegers BJ. Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *J Clin Invest* 1995;95:934–40.
- ¹¹⁰ de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+ CD25 bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004;172:6435–43.
- ¹¹¹ Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25 bright CD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R335–46.
- ¹¹² Rajaiah R, Moudgil KD. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009;8:388–93.
- ¹¹³ Boog CJ, de Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, van der Zee R, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJ, Geuze HJ, van Eden W. Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J Exp Med* 1992;175:1805–10.
- ¹¹⁴ Durai M, Huang MN, Moudgil KD. Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis. *J Autoimmun* 2009;33:208–13.
- ¹¹⁵ de Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers GT, Scholtens L, Gordon G, De Jager W, Häfner R, van de Zee R, van Eden W, Kuis W, Prakken BJ. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. *Arthritis Rheum* 2003;48:2001–10.
- ¹¹⁶ Prakken BJ, Roord S, van Kooten PJ, Wagenaar JP, van Eden W, Albani S, Wauben MH. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. *Arthritis Rheum* 2002;46:1937–46.

-
- ¹¹⁷ Prakken AB, van Eden W, Rijkers GT, Kuis W, Toebes EA, de Graeff-Meeder ER, van der Zee R, Zegers BJ. Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1826–32.
- ¹¹⁸ Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299:1033–6.
- ¹¹⁹ Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, Varsani H, Hunter P, Wedderburn LR. Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* 2008;58:875–87.
- ¹²⁰ Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007;8:1086–94.
- ¹²¹ Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179–89.
- ¹²² Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 2008;9:641–9.
- ¹²³ Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 2010;9:531–5.
- ¹²⁴ Still GF. On a form of chronic joint disease in children. *Am J Dis Child* 1978;132:195–200, reprinted from *Medico-Chirurgical Transactions*, vol 80, 1897.
- ¹²⁵ Woo P, Wedderburn LR. Juvenile chronic arthritis. *Lancet* 1998;351:969–73.
- ¹²⁶ Woo P. Systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, management, and outcome. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:28–33.
- ¹²⁷ Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, Maldonado-Cocco J, Suarez-Almazor M, Orozco-Alcala J, Prieur AM. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998;25:1991–4.
- ¹²⁸ Martini A, Ravelli A, Di Fuccia G, Rosti V, Cazzola M, Barosi G. Intravenous iron therapy for severe anaemia in systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Lancet* 1994;344:1052–54.
- ¹²⁹ Cazzola M, Ponchio L, de Benedetti F, Ravelli A, Rosti V, Beguin Y, Invernizzi R, Barosi G, Martini A. Defective iron supply to erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Blood* 1996;87:4824–30.
- ¹³⁰ Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2005;201:1479–86.
- ¹³¹ Gattorno M, Piccini A, Lasigliè D, Tassi S, Brisca G, Carta S, Delfino L, Ferlito F, Pelagatti MA, Caroli F, Buoncompagni A, Viola S, Loy A, Sironi M, Vecchi A, Ravelli A, Martini A, Rubartelli A. The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1505–15.
- ¹³² Martini A. It is time to rethink juvenile idiopathic arthritis classification and nomenclature. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1437–9.
- ¹³³ Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. *Horror autoinflammaticus*: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:621–68.
- ¹³⁴ Vastert SJ, van Wijk R, D'Urbano LE, de Vooght KM, de Jager W, Ravelli A, Magni-Manzoni S, Insalaco A, Cortis E, van Solinge WW, Prakken BJ, Wulffraat NM, de Benedetti F, Kuis W. Mutations in the perforin gene can be

-
- linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:441–49.
- ¹³⁵ Vastert SJ, Kuis W, Grom AA. Systemic NIA: new developments in the understanding of the pathophysiology and therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23:655–64.
- ¹³⁶ Nepom BS, Glass DN. Juvenile rheumatoid arthritis and HLA: report of the Park City III workshop. *J Rheumatol* 1992;Suppl 33:70–74.
- ¹³⁷ Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, Ohkuni M, Tatsuzawa O, Yokota S, Joo K, Ueda K, Sasazuki T, Kimura A, Itoh K, Kato H. Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNF α gene and HLA genes. *Arthritis Rheum.* 42, 2577–2582 (1999).
- ¹³⁸ Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, Fisher SA, Lewis CM, Prieur AM, Glass DN, Woo P. The –174 G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* 2003;48:3202–6.
- ¹³⁹ Möller JC, Paul D, Ganser G, Range U, Gahr M, Kelsch R, Rösen-Wolff A, Hedrich CM. IL10 promoter polymorphisms are associated with systemic onset juvenile idiopathic arthritis (SoNIA). *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:912–918.
- ¹⁴⁰ De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, Lunt M, Thomson W, Ravelli A, Donn R, Martini A; British Paediatric Rheumatology Study Group. Functional and prognostic relevance of the –173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1398–1407.
- ¹⁴¹ Stock CJ, Ogilvie EM, Samuel JM, Fife M, Lewis CM, Woo P. Comprehensive association study of genetic variants in the IL-1 gene family in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun* 2008;9:349–357.
- ¹⁴² Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369–76.
- ¹⁴³ Donn R, Alourfi Z, Zeggini E, Lamb R, Jury F, Lunt M, Meazza C, De Benedetti F, Thomson W, Ray D; British Paediatric Rheumatology Study Group. A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1604–10.
- ¹⁴⁴ Lamb R, Thomson W, Ogilvie E, Donn R. Positive association of SLC26A2 gene polymorphisms with susceptibility to systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1286–1291.
- ¹⁴⁵ Day TG, Ramanan AV, Hinks A, Lamb R, Packham J, Wise C, Punaro M, Donn RP. Autoinflammatory genes and susceptibility to psoriatic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2142–2146.
- ¹⁴⁶ Lindsley CB. Seasonal variation in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:838–9.
- ¹⁴⁷ Gonzalez B, Larrañaga C, León O, Díaz P, Miranda M, Barría M, Gaggero A. Parvovirus B19 may have a role in the pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2007;34:1336–40.
- ¹⁴⁸ Angelini F, Cancrini C, Colavita M, Panei P, Concato C, Romiti ML, Chini L. Role of parvovirus B19 infection in juvenile chronic arthritis. Is more investigation needed? *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:684.
- ¹⁴⁹ Korematsu S, Miyahara H, Kawano T, Yamada H, Akiyoshi K, Sato K, Maeda T, Suenobu S, Izumi T. A relapse of systemic type juvenile idiopathic arthritis after a rubella vaccination in a patient during a long-term remission period. *Vaccine* 2009;27:5041–2.

-
- ¹⁵⁰ Frosch M, Metze D, Foell D, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp Dermatol* 2005;14:259–65.
- ¹⁵¹ van den Berg WB, Joosten LA, van de Loo FA. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:S105–14.
- ¹⁵² Graninger W, Smolen J. Treatment of rheumatoid arthritis by TNF-blocking agents. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:10–4.
- ¹⁵³ Quartier P, Taupin P, Bourdeaut F, Lemelle I, Pillet P, Bost M, Sibilia J, Koné-Paut I, Gandon-Laloum S, LeBideau M, Bader-Meunier B, Mouy R, Debré M, Landais P, Prieur AM. Efficacy of etanercept for the treatment of juvenile idiopathic arthritis according to the onset type. *Arthritis Rheum* 2003;48:1093–101.
- ¹⁵⁴ Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005;201:1355–9.
- ¹⁵⁵ de Jager W, Hoppenreijns EP, Wulffraat NM, Wedderburn LR, Kuis W, Prakken BJ. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis; a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 2007;66:589–98.
- ¹⁵⁶ Kawashima M, Yamamura M, Tani ai M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M, Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, Makino H. Levels of interleukin-18 and its binding inhibitors in the blood circulation of patients with adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:550–60.
- ¹⁵⁷ de Jager W, Vastert SJ, Beekman JM, Wulffraat NM, Kuis W, Coffey PJ, Prakken BJ. Defective phosphorylation of interleukin-18 receptor beta causes impaired natural killer cell function in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2782–93.
- ¹⁵⁸ De Benedetti F, Pignatti P, Gerloni V, Massa M, Sartirana P, Caporali R, Montecucco CM, Corti A, Fantini F, Martini A. Differences in synovial fluid cytokine levels between juvenile and adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997;24:1403–9.
- ¹⁵⁹ Fonseca JE, Santos MJ, Canhao H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 2009;8:538–42.
- ¹⁶⁰ De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarelli M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, Ferrari S, Teti A. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice. A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 2006;54:3551–63.
- ¹⁶¹ De Benedetti F, Alonzi T, Moretta A, Lazzaro D, Costa P, Poli V, Martini A, Ciliberto G, Fattori E. Interleukin-6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-1. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest* 1997;99:643–50.
- ¹⁶² Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2004;50:3762–71.
- ¹⁶³ Frosch M, Vogl T, Seeliger S, Wulffraat N, Kuis W, Viemann D, Foell D, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2622–6.
- ¹⁶⁴ Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C. Phagocyte specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* 2003;24:155–8.
- ¹⁶⁵ Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, Hirono K, Ichida F, Foell D, Kehrel B, Gerke V, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood* 2005;105:2955–62

-
- ¹⁶⁶ Viemann D, Barczyk K, Vogl T, Fischer U, Sunderkötter C, Schulze-Osthoff K, Roth J. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood* 2007;109:2453–60.
- ¹⁶⁷ Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007;81:28–37.
- ¹⁶⁸ Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889–901.
- ¹⁶⁹ Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 are novel endogenous activators of toll-like receptor 4 promoting lethal endotoxin-induced shock. *Nature Med* 2007;13:1042–9
- ¹⁷⁰ Newton RA, Hogg N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta(2) integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* 1998;160:1427–35.
- ¹⁷¹ Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* 1997;272:9496–502.
- ¹⁷² Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:95–104.
- ¹⁷³ Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29:301–5.
- ¹⁷⁴ Wood P, Stanworth S, Burton J, Jones A, Peckham DG, Green T, Hyde C, Chapel H; UK Primary Immunodeficiency Network. Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin Exp Immunol* 2007;149:410–423.
- ¹⁷⁵ Bruton OC. A-gammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952;9:722 –8.
- ¹⁷⁶ Ammann AJ, Wara DW, Risetty RJ, Talal N. The prevalence of autoantibodies in T-cell, B-cell and phagocytic immunodeficiency disorders. *Clin Immunol Immunopathol* 1979;14:456 –66.
- ¹⁷⁷ Ballow M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:581–91.
- ¹⁷⁸ Yel L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2010, 30:10–16
- ¹⁷⁹ Chipps BE, Talamo RC, Winkelstein JA. IgA deficiency, recurrent pneumonias, and bronchiectasis. *Chest*. 1978;73:519–26.
- ¹⁸⁰ Oxelius VA, Laurell AB, Linquist B, Golebiowska H, Axelsson U, Björkander J, Hanson LÅ. IgG subclasses in selective IgA deficiency. *N Engl J Med* 304:1476–1477, 1981
- ¹⁸¹ Zinneman HH, Kaplan AP. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Am J Dig Dis*. 1972;17:793–7.
- ¹⁸² Cunningham-Rundles C, Brandeis WE, Pudifin DJ, Day NK, Good RA. Autoimmunity in selective IgA deficiency: relationship to anti-bovine protein antibodies, circulating immune complexes and clinical disease. *Clin Exp Immunol*. 1981;45:299–304.
- ¹⁸³ Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2001;21:303–9.

-
- ¹⁸⁴ Janzi M, Kull I, Sjöberg R, Wan J, Melén E, Bayat N, Ostblom E, Pan-Hammarström Q, Nilsson P, Hammarström L. Selective IgA deficiency in early life: association to infections and allergic diseases during childhood. *Clin Immunol.* 2009;133:78–85.
- ¹⁸⁵ Kersey JH, Shapiro RS, Filipovich AH. Relationship of immunodeficiency to lymphoid malignancy. *Pediatr Infect Dis J.* 1988;7:S10–2.
- ¹⁸⁶ Etzioni A. Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2003;2:364–9.
- ¹⁸⁷ Cunningham-Rundles C. Hematologic complications of primary immune deficiencies. *Blood Rev.* 2002;16:61–4.
- ¹⁸⁸ Carneiro-Sampaio MMS, Coutinho A. Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies. *Adv Immunol.* 2007;95:51–82.
- ¹⁸⁹ Badcock LJ, Clarke S, Jones PW, Dawes PT, Matthey DL. Abnormal IgA levels in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:83–4.
- ¹⁹⁰ Cassidy JT, Kitson RK, Seiby CL. Selective IgA deficiency in children and adults with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16:647–50.
- ¹⁹¹ Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000;120:225–31.
- ¹⁹² De la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Gual L, Vigil P, Martinez A, Urcelay E, Ferreira A, Garcia-Rodriguez MC, Fontan G. MHC susceptibility genes to IgA deficiency are located in different regions on different HLA haplotypes. *J Immunol.* 2002;169:4637–43.
- ¹⁹³ Mohammadi J, Ramanujam R, Jarefors S, Rezaei N, Aghamohammadi A, Gregersen PK, Hammarström L. IgA deficiency and the MHC: assessment of relative risk and microheterogeneity within the HLA A1 B8, DR3 (8.1) haplotype. *J Clin Immunol.* 2009;in press PMID:19834793.
- ¹⁹⁴ Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Ziemba B, de Vries SS, Liu J, Hippen K, Koeuth T, Ortmann W, Iwahori A, Elliott MK, Offer S, Skon C, Du L, Novitzke J, Lee AT, Zhao N, Tompkins JD, Altshuler D, Gregersen PK, Cunningham-Rundles C, Harris RS, Her C, Nelson DL, Hammarström L, Gilkeson GS, Behrens TW. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7193–7198.
- ¹⁹⁵ A. Wandstrat, E. Wakeland. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001;2:802–809.
- ¹⁹⁶ Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, Gunnarsson I, Svenungsson E, Padyukov L, Sturfelt G, Jönsen A, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Baechler EC, Brown EE, Alarcón GS, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, McGwin G Jr, Reveille JD, Vilá LM, Kimberly RP, Manzi S, Petri MA, Lee A, Gregersen PK, Seldin MF, Rönnblom L, Criswell LA, Syvänen AC, Behrens TW, Graham RR. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2009;41:1228–1233.
- ¹⁹⁷ Bronson PG, Manoharan AP, Bhangale TR, Ortmann W, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Graham RR, Behrens TW. Selective immunoglobulin A deficiency is associated with IFIH1, TNFAIP3, PVT1, FAS, CDH23 and TM7SF3 in a genomewide association study and meta-analysis, 2012:manuscript
- ¹⁹⁸ Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet.* 2005;37:829–34.
- ¹⁹⁹ Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. *Blood* 2002;99:2694–702.
- ²⁰⁰ Monteiro RC, Van De Winkel JG. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:177–204.

-
- ²⁰¹ Chevailler A, Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Immunofluorescence analysis of IgA binding by human mononuclear cells in blood and lymphoid tissue. *J Immunol*. 1989;142:2244–9.
- ²⁰² Spickett GP. Current perspectives on common variable immunodeficiency. *Clin Exp Allergy* 2001;31:536–542
- ²⁰³ Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:412–429
- ²⁰⁴ Plebani A, Ugazio AG, Meini A, Ruggeri L, Negrini A, Albertini A, Leibovitz M, Duse M, Bottaro A, Brusco R, Cariota U, Boccazzi C, Carbonara A.O. Extensive deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in the absence of recurrent infections: when is IgG subclass deficiency clinically relevant? *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:46–50
- ²⁰⁵ Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34–48
- ²⁰⁶ Halliday E, Winkelstein J, Webster ADB. Enteroviral infections in primary immunodeficiency (PID): a survey of morbidity and mortality. *J Infect* 2003;46:1–8
- ²⁰⁷ Lai Ping So A, Mayer L. Gastrointestinal manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Semin Gastrointest Dis* 1997;8:22–32
- ²⁰⁸ Hermans P, Huizenga K, Hoffman H, Brown A. Dysgammaglobulinemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine. *Am J Med* 1966;40:78-89.
- ²⁰⁹ Gershwin ME, Blaese RM, Steinberg AD, Wistar Jr R, Strober W. Antibodies to nucleic acids in congenital immune deficiency states. *J Pediatr* 1976;89:377–81.
- ²¹⁰ Conley ME, Park CL, Douglas SD. Childhood common variable immunodeficiency with autoimmune disease. *J Pediatr* 1986;108:915–22.
- ²¹¹ Michel M, Chanet V, Galicier L, Ruivard M, Levy Y, Hermine O, Oksenhendler E, Schaeffer A, Bierling P, Godeau B. Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:254–63.
- ²¹² Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med* 1997;127:613-7.
- ²¹³ Bloch-Michel C, Viallard JF, Blanco P, Bloch Liferman F, Neau D, Moreau JF, Baillet L, Etienne G, Longy-Boursier M, Pellegrin JL. Common variable immunodeficiency: 17 observations in the adult. *Rev Med Interne* 2003;24:640–50.
- ²¹⁴ Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1989;9:22-33.
- ²¹⁵ Laszewski MJ, Kemp JD, Goeken JA, Mitros FA, Platz CE, Dick FR. Clonal immunoglobulin gene rearrangement in nodular lymphoid hyperplasia of the gastrointestinal tract associated with common variable immunodeficiency. *Am J Clin Pathol* 1990;94:338–343
- ²¹⁶ Nijenhuis T, Klasen I, Weemaes CM, Preijers F, Vries E de, Meer JW van der. Common variable immunodeficiency (CVID) in a family: an autosomal dominant mode of inheritance. *Neth J Med* 2001;59:134–139
- ²¹⁷ Slyper AH, Pietryga D. Conversion of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency in an adolescent female with 18q deletion syndrome. *Eur J Pediatr* 1997;156:155–156
- ²¹⁸ Hermans PE, Diaz-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patients. *Am J Med* 1976;61:221–37.

-
- ²¹⁹ Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, Eibel H, Fischer B, Schäffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003;4:261-268.
- ²²⁰ van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJ, van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patiño PJ, van Dongen JJ, Franco JL. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006;354:1901-1912.
- ²²¹ Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, Kanariou M, Germeis A. TNFRSF13B/TACI Alterations in Greek Patients with Antibody Deficiencies. *J Clin Immunol* 2011;31:550-559
- ²²² Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: Molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2007;149:401-409.
- ²²³ Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early stage of onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 2000;51:111-122
- ²²⁴ Goldacker S, Warnatz K. Tackling the heterogeneity of CVID. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:504-9.
- ²²⁵ Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2005;116:37-41.
- ²²⁶ Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter HH, Eibel H. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol* 2005;175:5498-503.
- ²²⁷ Brouet JC, Chedeville A, Fermanand JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 2000;30:2516-20.
- ²²⁸ Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, De Felice M, Mora B, Esposito A, Carello R, Pizzuti A, Paggi MG, Paganelli R, Malorni W, Aiuti F. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2007;178:3932-43.
- ²²⁹ Serrano D, Becker K, Cunningham-Rundles C, Mayer L. Characterization of the T cell receptor repertoire in patients with common variable immunodeficiency: oligoclonal expansion of CD8+ T cells. *Clin Immunol* 2000;97:248-258
- ²³⁰ Bayry J, Hermine O, Webster DA, Levy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med* 2005;11:370-6.
- ²³¹ Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, Müller F, Aukrust P, Frøland SS. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol* 2007;147:521-5.
- ²³² Τσιτσάμη Ε. Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα: όσα πρέπει να ξέρουν οι γονείς. Εκδόσεις Τεχνόγραμμα, 2010:σελ 10-12
- ²³³ WHO Scientific Group. Primary immunodeficiency diseases. *Clin Exp Immunol*. 1999;118:1-28.
- ²³⁴ Suroliia I, Pirnie SP, Chellappa V, Taylor KN, Cariappa A, Moya J, Liu H, Bell DW, Driscoll DR, Diederichs S, Haider K, Netravali I, Le S, Elia R, Dow E, Lee A, Freudenberg J, De Jager PL, Chretien Y, Varki A, MacDonald ME, Gillis T, Behrens TW, Bloch D, Collier D, Korzenik J, Podolsky DK, Hafler D, Murali M, Sands B, Stone JH, Gregersen PK, Pillai S. Functionally defective germline variants of sialic acid acetyltransferase in autoimmunity. *Nature* 2010;466:243-247 (supplementary information)
- ²³⁵ Prahallad S, Shear S, Thompson S, Giannini E, Glass D. Increased Prevalence of Familial Autoimmunity in Simplex and Multiplex Families With Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1851-1856