



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

---

*Διδακτορική Διατριβή*

**"Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΑCΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ  
ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ"**

**ΦΩΤΕΙΝΗ Δ. ΜΠΑΡΔΑΚΑ**

Ειδικευόμενη Ιατρός Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Φωτεινή Μπαρδάκα

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

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (6<sup>η</sup>/20-01-2016 ΓΣΕΣ):**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπουσα)** Δρ. Ζωή **Δανιήλ**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Ι. **Γουργουλιάνης**  
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ματθαίος **Σπελέτας**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Αναστάσιος **Γερμενής**  
Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Επαμεινώνδας **Ζακυνθινός**  
Καθηγητής Εντατικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Σωτήριος **Ζαρογιάννης**  
Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Δημοσθένης **Μακρής**  
Επίκουρος Καθηγητής Εντατικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς οι οποίοι παρακολουθούνταν στα Εξωτερικά Ιατρεία Διαμέσων Πνευμονοπαθειών της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Πανεπιστημίου Κρήτης, καθώς και υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Η εργασία τιμήθηκε με το βραβείο ερευνητικής υποτροφίας της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας το έτος 2009.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: τον Καθηγητή Πνευμονολογίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για την ευκαιρία που μου έδωσε και για τη στήριξη του, τον Αναπλ. Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα για την άψογη συνεργασία, και ιδιαίτερα, την επιβλέπουσα Αναπλ. Καθηγήτρια Πνευμονολογίας κ. Ζωή Δανιήλ για την υποστήριξη και την προσωπική συμβολή της σε όλα τα στάδια της διδακτορικής μου διατριβής. Ακόμη, ευχαριστώ την Επίκ. Καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Κατερίνα Αντωνίου για την άριστη συνεργασία, καθώς και την ιατρό κ. Εύη Βασσάλου για τη συμβολή της στη συλλογή του δείγματος.

Η έρευνα αυτή, εξαιτίας της πολλαπλότητας και πολυπλοκότητας των πειραμάτων, δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη σημαντική υποστήριξη πολλών ανθρώπων.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Αντιγόνη Μαμάρα και την Κυριακή Λιαδάκη για τις ατελείωτες ώρες συνεργασίας μας, τη βοήθεια και την υποστήριξη σε όλα τα επίπεδα, χωρίς τα οποία δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Αναστάσιο Γερμενή για την αμέριστη συμπαράστασή του. Ευχαριστώ θερμά τη Φανή Καλαλά που μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις της στην κυτταρομετρία ροής, τη Λίτσα Καραμούτη, τη Φαίη Σούκου, τη Νικολέτα Αργέντου, τον Κωνσταντίνο Μπούκα, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου. Επίσης, ευχαριστώ τη Φωτεινή Μάλλη για τη βοήθειά της, αλλά και τις ώρες που περάσαμε μαζί, ώστε να συλλεχθεί το δείγμα των ασθενών.

*Φωτεινή Μπαρδάκα*

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Φωτεινή Δ. Μπαρδάκα

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 24 Ιουνίου 1982

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Τρίκαλα

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ            E-mail: bardakafotini@yahoo.gr

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:                    Αγγλικά (άριστα , Cambridge Proficiency)

### ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

2000    Απολυτήριο Λυκείου με γενικό βαθμό 19<sup>5/10</sup>, 1<sup>ο</sup> Λύκειο Τρικάλων

2008    Πτυχίο Ιατρικής με βαθμό «Λίαν Καλώς», Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

2009    Βραβείο ερευνητικής υποτροφίας Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας για την  
εργασία με τίτλο : The role of *TNFRSF13B/TAC1* gene expression and mutational  
status in sarcoidosis.

2010    Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση στη θεματική ενότητα Χρόνια Αποφρακτική  
Πνευμονοπάθεια με τίτλο: Η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFFR σε ασθενείς

με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ρόδος.

2010 Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση στη θεματική ενότητα Διάχυτες Πνευμονοπάθειες με τίτλο: Η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR σε ασθενείς με Σαρκοείδωση. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ρόδος.

2011 Βραβείο Παναγιώτη Χόρτη για την προφορική ανακοίνωση με τίτλο: Συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο *MycD88* με την ανάπτυξη φυματίωσης. 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα.

2012 Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση με τίτλο: Μελέτη της συσχέτισης του πολυμορφισμού *ANXA11-R230C* με τη σαρκοείδωση και την κοκκιωματώδη νόσο της Κοινής Ποικίλης Ανοσοανεπάρκειας. 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.

2014 Έπαινος για την εργασία με τίτλο: Μιτοχονδριακές tRNA μεταλλάξεις σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ) και Σαρκοείδωση. 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. SPELETAS M, MAMARA A, PAPADOPOULOU-ALATAKI E, IORDANAKIS G, LIADAKI K, **BARDAKA F**, KANARIOU M, GERMENIS AE. *TNFRSF13B/TACI* Alterations in Greek Patients with Antibody Deficiencies. *J Clin Immunol* 2011 Aug;31(4):550-9.
2. MALLI F, BARGIOTA A, THEODORIDOU K, FLOROU Z, **BARDAKA F**, KOUKOUKIS GN, GOURGOULIANIS KI, DANIIL Z. Increased primary autoimmune thyroid diseases and thyroid antibodies in

sarcoidosis: evidence for an under-recognised extrathoracic involvement in sarcoidosis? *Hormones (Athens)*. 2012 Oct-Dec;11(4):436-43.

3. MALLI F, **BARDAKA F**, TSILIONI I, KARETSI E, GOURGOULIANIS KI, DANIIL Z. 8-isoprostane levels in serum and bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:160-3.
4. SPELETAS M, SALZER U, FLOROU Z, PETINAKI E, DANIIL Z, **BARDAKA F**, GOURGOULIANIS KI, SKOULAKIS C, GERMENIS AE. Heterozygous alterations of *TNFRSF13B/TACI* in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:532437.
5. MALLI F, GEORGOULIAS P, VALOTASSIOY V, **BARDAKA F**, TSILIONI I, GOURGOULIANIS KI, DANIIL Z. Leptin and Adiponectin Levels in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Association with Hypoxia. *J Obes Weight Loss Ther* 5: 284.

## **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ**

### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. MALLI F, VAVOUGIOS G, **BARDAKA F**, GOURGOULIANIS KI, DANIIL Z. Validation of a prognostic score for pulmonary embolism short-term mortality. 25<sup>th</sup> Annual Congress of European Respiratory Society, 26-30 September, Amsterdam, Netherlands 2015.
2. VAVOUGIOS G, PANAGIS P, KARETSI E, PAPANIKOLAOU I, **BARDAKA F**, MARAGOZIDIS P, STAUROUS V, GOURGOULIANIS KI, DANIIL Z. The effect of exercise on serum amyloid a levels in patients with sarcoidosis: A preliminary report. 25<sup>th</sup> Annual Congress of European Respiratory Society, 26-30 September, Amsterdam, Netherlands 2015.



3. MAMARA A, KALALA F, FLOROU Z, MANDALA E, PALASOPOULOU M, **MPARDAKA F**, GIANNAKOULAS N, MPANTI A, GERMENIS AE, SPELETAS M. *TNFRSF13B/TACI* and *TNFRSF13C/BAFFR* in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). 3<sup>rd</sup> European Congress of Immunology, 5-8 September 2012, Glasgow, *Immunology*, 137 (Suppl.1):162.
4. **BARDAKA F**, DANIIL Z, ANTONIOU K, MAMARA A, MALLI F, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE, SPELETAS M. Association study of *ANXA11-R230C* with sarcoidosis. 22<sup>nd</sup> Annual Congress of European Respiratory Society, 1-5 September, Vienna, Austria 2012, *Book of Abstracts*, p.:3.
5. SPELETAS M, MAMARA A, **BARDAKA F**, LIADAKI K, ARGENTOU N, TSITSAMI E, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. BAFFR deficiency due to *TNFRSF13C-P21R* homozygosity resulting in mild immunodeficiency phenotype. XIV Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 6-9 Oct 2010, Istanbul, Turkey, *Abstract book*, p86.
6. **BARDAKA F**, DANIIL Z, MAMARA A, LIADAKI K, MALLI F, GOURGOULIANIS KI, SPELETAS M. TACI and BAFFR expression in sarcoidosis. European Respiratory Society Conference, 18-22 September, Barcelona, Spain 2010, *Book of Abstracts*, p.:196.

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. ΠΕΛΕΤΙΔΟΥ Σ, ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΓΚΙΚΑ Ε, ΜΑΛΛΗ Φ, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΙ, ΜΑΜΟΥΡΗΣ Ζ, ΖΙΦΑ Α, ΔΑΝΙΗΛ Ζ. Μιτοχονδριακές tRNA μεταλλάξεις σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ) και Σαρκοείδωση. 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 5-8 Νοεμβρίου 2014, *ΠΝΕΥΜΩΝ*, 2014.

2. **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΔΑΝΙΗΛ Ζ, ΑΝΤΩΝΙΟΥ Κ, ΜΑΜΑΡΑ Α, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΙ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Μελέτη συσχέτισης του πολυμορφισμού *ANXA11-R230C* με τη σαρκοείδωση και την κοκκιωματώδη νόσο της κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας. 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 18-21 Οκτωβρίου 2012, *ΠΝΕΥΜΩΝ*, 2012.
3. **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΔΑΝΙΗΛ Ζ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΙ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Μελέτη συσχέτισης του πολυμορφισμού *ANXA11-R230C* με τη σαρκοείδωση. 4<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος. Λάρισα 29-31 Μαρτίου 2012, *Βιβλίο Περιλήψεων*, σελ.:59.
4. ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ, ΜΑΜΑΡΑ Α, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΛΙΑΔΑΚΗ Κ, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΝΙΚΟΥΛΗΣ Δ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ. Επίπτωση ασυμπτωματικών εκλεκτικών ανεπαρειών των ανοσοσφαιρινών στους υπερήλικες. 4<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος. Λάρισα 29-31 Μαρτίου 2012, *Βιβλίο Περιλήψεων*, σελ.:95.
5. ΜΑΜΑΡΑ Α, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΜΑΝΔΑΛΑ Ε, ΠΑΛΑΣΟΠΟΥΛΟΥ Μ, ΚΑΡΤΣΙΟΣ Χ, ΛΙΑΔΑΚΗ Κ, ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑΣ Ν, ΤΣΙΟΝΗ Κ, ΕΦΡΑΙΜΙΔΟΥ Σ, ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ Ν, ΚΑΡΤΑΣΗΣ Ζ, ΜΑΤΣΟΥΚΑ Π, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Μελέτη της έκφρασης των *TNFRSF13B/TAC1* και *TNFRSF13C/BAFFR* σε ασθενείς με χρόνια Β λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα. 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-26 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, *Haema* 2011, 2 (Suppl.4):143.
6. ΜΑΛΛΗ Φ, ΓΕΡΟΓΙΑΝΝΗ Ε, ΑΓΓΕΛΟΥ Κ, ΜΑΛΛΑΚΗ Β, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΙ, ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ Γ, ΔΑΝΙΗΛ Ζ. Συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο *MyD88* με την ανάπτυξη φυματίωσης. 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα 24-27 Νοεμβρίου 2011, *ΠΝΕΥΜΩΝ* 2011, 24(1):16.

7. ΛΙΑΔΑΚΗ Κ, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΜΑΜΑΡΑ Α, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΙ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Η έκφραση των πρωτεϊνών TAC1 και BAFFR σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ρόδος 21-24 Οκτωβρίου 2010, *ΠΝΕΥΜΩΝ 2010*, 23(1):9.
8. **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΔΑΝΙΗΛ Ζ, ΑΝΤΩΝΙΟΥ Κ, ΜΑΜΑΡΑ Α, ΛΙΑΔΑΚΗ Κ, ΜΑΛΛΗ Φ, ΒΑΣΣΑΛΟΥ Ε, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΙ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Η έκφραση των πρωτεϊνών TAC1 και BAFFR σε ασθενείς με σαρκοείδωση. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ρόδος 21-24 Οκτωβρίου 2010, *ΠΝΕΥΜΩΝ 2010*, 23(1):13.
9. ΜΑΜΑΡΑ Α, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΚΑΡΤΣΙΟΣ Χ, ΛΙΑΔΑΚΗ Κ, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΕΦΡΑΙΜΙΔΟΥ Σ, ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ Ν, ΜΑΤΣΟΥΚΑ Π, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Ταυτόχρονη έκφραση κ και λ ελαφρών αλύσων σε Β-λεμφοπαραγωγά σύνδρομα. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 29/04-2/05 2010, Αργοστόλι Κεφαλλονιάς, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, *Βιβλίο περιλήψεων*, σελ.:176.
10. ΜΑΜΑΡΑ Α, **ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ**, ΛΙΑΔΑΚΗ Κ, ΜΠΟΥΚΑΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Χαμηλή έκφραση BAFFR ως αίτιο κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 29/04-2/05 2010, Αργοστόλι Κεφαλλονιάς, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, *Βιβλίο περιλήψεων*, σελ.:180.

**" Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΑΣΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ**

**ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ "**

**ΦΩΤΕΙΝΗ ΜΠΑΡΔΑΚΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Ζωή Δ. Δανιήλ**, *Αν.Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπουσα)*
2. **Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης**, *Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
3. **Δρ. Ματθαίος Σπελέτας**, *Αν.Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>14</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....	<b>15</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>17</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>18</b>
1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ .....	20
1.2 ΕΞΩΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ .....	22
1.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ.....	24
1.4 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ .....	26
1.5 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ .....	29
1.5.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....	31
1.5.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....	32
<b>2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ – TAC1 ΚΑΙ BAFFR</b> .....	<b>36</b>
2.1 TAC1 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ .....	36
2.1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ .....	36
2.1.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ .....	40
2.1.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TAC1 ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....	43
2.2 BAFFR ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ .....	48
2.2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ .....	48
2.2.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ .....	49
2.2.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ BAFFR ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....	52
<b>3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	<b>56</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>57</b>
<b>1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ</b> .....	<b>58</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ</b> .....	<b>61</b>
2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ .....	61
<b>3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ</b> .....	<b>66</b>
3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ .....	66
3.1.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ TAC1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ .....	66
3.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ BAFF ΥΠΟΔΟΧΕΑ (BAFFR) .....	67
3.1.3 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ .....	68
3.1.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	68
3.2 ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ .....	69
3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	71
3.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA .....	71
3.3.2 PCR ΓΙΑ ΤΙΣ V220A, P251L ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ <i>TNFRSF13B/TAC1</i> .....	72
3.3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ V220A ΚΑΙ P251L ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ .....	73
3.3.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>TNFRSF13B/TAC1</i> .....	76
3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	80
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>81</b>

4.1	ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TAC1 ΚΑΙ BAFFR .....	82
4.2	ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ .....	84
4.3	ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ- ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ .....	87
4.4	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ .....	88
4.5	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ .....	89
4.5.1	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TNFRSF13B/TAC1 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ .....	89
<b>5.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>93</b>
	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>101</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>105</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική φλεγμονώδης νόσος, χαρακτηριστικό ιστολογικό γνώρισμα της οποίας αποτελεί το μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα. Συχνότερα προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα, αλλά μπορεί να εντοπιστεί και σε οποιοδήποτε άλλο όργανο. Παρόλη την πρόοδο στην κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια, η αιτιολογία της παραμένει άγνωστη. Γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Πρόκειται για μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από Th1/Th17 ανοσιακή απάντηση έναντι αγνώστου αντιγόνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος. Επομένως, κρίνεται απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω το ανοσιακό σύστημα των ασθενών, ιδιαίτερα στο πλαίσιο των Β-κυττάρων, ο ρόλος των οποίων δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Με την παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η έκφραση των υποδοχέων της ειδικής ανοσίας TACI και BAFFR στην επιφάνεια των Β-κυττάρων, στο περιφερικό αίμα ασθενών με σαρκοείδωση και αντιστοίχων υγιών εθελοντών. Παράλληλα, σε όλα τα άτομα της μελέτης έγινε ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος και προσδιορισμός της συγκέντρωσης ανοσοσφαιρινών. Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκε η παρουσία γενετικών βλαβών-παραλλαγών στο γονίδιο της ειδικής ανοσίας *TNFRSF13B/TACI* που δεν είχε προηγουμένως μελετηθεί σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>APC</b> (antigen presenting cell)	Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
<b>APRIL</b> (A proliferation inducing ligand)	Συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό
<b>ATS</b> (American Thoracic Society)	Αμερικανική Εταιρία Θώρακος
<b>ANA</b> (Antinuclear antibodies)	Αντιπυρηνικά αντισώματα
<b>BAFF</b> (B-cell activating factor)	Παράγοντας ενεργοποίησης των Β-κυττάρων
<b>BAFFR</b> (B-cell activating factor Receptor)	Υποδοχέας του BAFF
<b>BAL</b> (bronchoalveolar lavage)	Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
<b>CAML</b> (Calcium modulating ligand)	Συνδέτης που συμμετέχει στην ρύθμιση του ασβεστίου
<b>CTL</b> (Cytolytic T Lymphocyte)	CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος
<b>CVID</b> (Common variable immunodeficiency)	Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
<b>DNA</b> (Deoxyribonucleic acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>ERS</b> (European Respiratory Society)	Ευρωπαϊκή Εταιρία Θώρακος
<b>FA-PBS</b> (Formaldehyde-PBS)	Διάλυμα φορμαλδεΰδης-PBS
<b>FDG-PET</b> (fluorodeoxyglucose positron emission tomography)	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων με τη χρήση φθοριωμένης γλυκόζης
<b>GM-CSF</b> (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)	Παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων
<b>HLA</b> (human leukocyte antigen)	Αντιγόνο ανθρώπινων λευκοκυττάρων
<b>MCP-1</b> (monocyte chemotactic protein 1)	Χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων
<b>MHC</b> (major histocompatibility complex)	Μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
<b>MIP-1</b> (macrophage inflammatory protein 1)	Φλεγμονώδης πρωτεΐνη 1 των μακροφάγων
<b>NK cells</b> (natural killer cells)	Κύτταρα φυσικοί φονείς
<b>NF-κB</b> (Nuclear factor-kappa B)	Πυρηνικός παράγοντας-κΒ



<b>PCR</b> (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>RFLP</b> (Restriction fragment length polymorphism)	Πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους
<b>RT</b> (Room Temperature)	Θερμοκρασία δωματίου
<b>TAC1</b> (transmembrane activator & CAML interactor)	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το CAML
<b>TBS</b> (TRAF binding site)	Σημείο πρόσδεσης των TRAF πρωτεϊνών
<b>Th1</b> (T helper 1)	Τύπου 1 βοηθητικά κύτταρα
<b>Th17</b> (T helper 17)	Τύπου 17 βοηθητικά κύτταρα
<b>THC</b> (TAC1 highly conserved)	Υψηλά διατηρημένο πεδίο του TAC1 υποδοχέα
<b>TLRs</b> (Toll-like receptors)	Ανάλογοι των Toll υποδοχέων
<b>TNF</b> (Tumor Necrosis Factor)	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (Tumor Necrosis Factor - $\alpha$ )	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων- $\alpha$
<b>WASOG</b> (World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders)	Παγκόσμια Οργάνωση για τη Σαρκοείδωση και άλλα Κοκκιωματώδη Νοσήματα

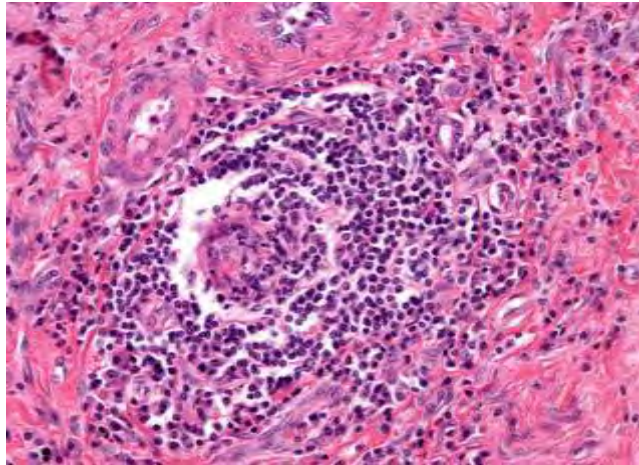
# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

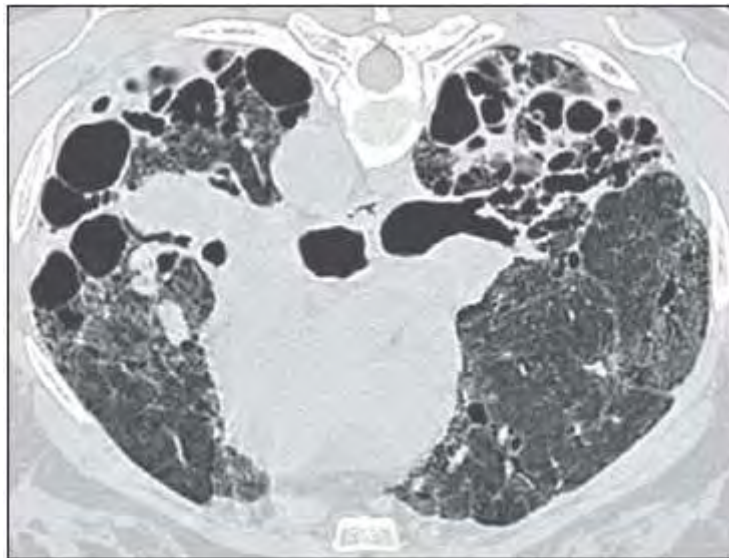
---

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σαρκοείδωση είναι μια χρόνια, πολυσυστηματική, κοκκιωματώδης νόσος αγνώστου αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα στους ιστούς που προσβάλλουν (**Εικόνα 1**). Οι πνεύμονες, οι οφθαλμοί και το δέρμα είναι τα όργανα τα οποία προσβάλλονται συχνότερα, ωστόσο όλα τα υπόλοιπα όργανα του ανθρώπινου σώματος είναι δυνατό να προσβληθούν από τη νόσο σε χαμηλότερη συχνότητα [1], (**Πίνακας 1**). Η νόσος εκδηλώνεται όταν άτομα με γενετική προδιάθεση εκτίθενται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες με αντιγονικές ιδιότητες. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να είναι είτε εξωγενείς (λοιμώξεις, αντιγονικές δομές) ή ενδογενείς, οι οποίοι παράγονται από κατεστραμένα κύτταρα του οργανισμού. Ίνωση και μη αναστρέψιμη βλάβη των οργάνων παρατηρείται όταν το ανοσιακό σύστημα δεν καταφέρνει να εξαλείψει τα κοκκιώματα [2], (**Εικόνα 2**).



**Εικόνα 1:** Μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, x20 μεγέθυνση). Το μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα είναι χαρακτηριστικό ιστολογικό γνώρισμα στη σαρκοείδωση. Σχηματίζεται για να εσωκλείσει το παθογόνο και κατ' αυτό τον τρόπο να περιορίσει τη φλεγμονή και να προστατέψει τον περιβάλλοντα ιστό. Αποτελείται από μακροφάγα και επιθηλιοειδή κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από λεμφοκύτταρα (από *Human Pathology Digital Image Gallery*).



**Εικόνα 2:** Αξονική τομογραφία θώρακος υψηλής ενκρίνειας ασθενούς με σαρκοείδωση. Ο ασθενής δεν είχε λάβει θεραπεία για τη νόσο. Παρατηρούνται εκτεταμένες κυστικές αλλοιώσεις των πνευμόνων αμφοτερόπλευρα, καθώς και πάχυνση του διάμεσου δικτύου και εικόνα ίνωσης, τα οποία αντιστοιχούν σε ακτινολογικό στάδιο IV της νόσου (προσαρμοσμένο από *Ianuzzi MC και συν [2]*)

## 1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ

Η σαρκοείδωση είναι μια νόσος με παγκόσμια γεωγραφική κατανομή και ο επιπολασμός της κυμαίνεται από 4,7-64 ανά 100,000, ενώ η επίπτωσή της είναι 1,0-35,5 ανά 100,000 ανά έτος. Η νόσος προσβάλλει άτομα και των δύο φύλων και περίπου 70% των ασθενών είναι ηλικίας 25-45 ετών. Στην Ευρώπη και την Ιαπωνία έχει παρατηρηθεί εμφάνιση της νόσου σε γυναίκες >50 ετών [3,4]. Η εμφάνιση της σαρκοείδωσης είναι σποραδική, ωστόσο οικογενής σαρκοείδωση εμφανίζεται στο 3,6 έως 9,6 των περιπτώσεων. Τα αδέρφια ασθενούς με σαρκοείδωση έχουν υψηλότερο κίνδυνο να νοσήσουν συγκριτικά με τους γονείς, ενώ στα μονοζυγωτικά δίδυμα ο κίνδυνος αυξάνεται 80 φορές, υποδηλώνοντας ότι γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου [5,6].

Οι κλινικές εκδηλώσεις της σαρκοείδωσης ποικίλλουν και τα συμπτώματα συχνά είναι μη ειδικά. Συστηματικά συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν όπως εύκολη κόπωση, αρθραλγίες, απώλεια βάρους, πυρετός, περιφερική νευροπάθεια, κατάθλιψη [7,8]. Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σημαντικό ποσοστό των ασθενών με σαρκοείδωση είναι ασυμπτωματικοί και η νόσος ανακαλύπτεται σε τυχαίο διαγνωστικό έλεγχο. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τα όργανα που προσβάλλει η νόσος (**Πίνακας 1**). Ασθενείς με πνευμονική συμμετοχή αναφέρουν συχνά ξηρό βήχα, δύσπνοια και θωρακαλγία (περίπου 50% των ασθενών). Η παρουσία πυλαίας λεμφαδενοπάθειας ή/και λεμφαδενοπάθειας μεσοθωρακίου δε συνδυάζεται συχνά με την εμφάνιση συμπτωμάτων, αλλά περιστασιακά οι ασθενείς αναφέρουν οπισθοστερνικό άλγος, αίσθημα βάρους ή δυσφαγία. Η προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος απαντάται συχνότερα. Σπανιότερα, όμως, μπορεί να προσβληθούν ο λάρυγγας, η τραχεία και οι αεραγωγοί με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποφρακτικού συνδρόμου ή/και βρογχεκτασιών. Περίπου 20% των ασθενών εμφανίζουν βρογχική

υπεραντιδραστικότητα, η οποία αποδίδεται σε εκτεταμένη βλάβη του βρογχικού επιθηλίου που πιθανά οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητά του και έκθεση των επιφανειακών νευρικών απολήξεων [1]. Η συμμετοχή του υπεζωκότα είναι εξαιρετικά σπάνια και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη υπεζωκοτικών παχύνσεων λόγω κοκκιωματώδους φλεγμονής, αποτιτανωμένων πλακών, υπεζωκοτική συλλογή και χυλοθώρακα. Σε 10-20% των ασθενών με πνευμονική σαρκοείδωση, η κοκκιωματώδης φλεγμονή χρονίζει με αποτέλεσμα την εμφάνιση ίνωσης με συνήθη εντόπιση τους άνω λοβούς των πνευμόνων (**Εικόνα 2**).

**Πίνακας 1-** Προσβολή των οργάνων στη σαρκοείδωση

<b>Όργανο</b>	<b>% των ασθενών</b>
Λεμφαδένες μεσοθωρακίου	95-98%
Πνεύμονες	>90%
Σπλήνας	50-80%
Οφθαλμοί	40-80%
Περιφερικοί λεμφαδένες	20-50%
Δέρμα	30%
Νευρικό Σύστημα	25%
Καρδιά (υποκλινικά)	10%
Καρδιά (κλινικά)	5%

## 1.2 ΕΞΩΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Η σαρκοείδωση μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε όργανο του σώματος, ωστόσο η προσβολή της καρδιάς και του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) είναι οι πιο σοβαρές εκδηλώσεις που δυνητικά μπορεί να απειλήσουν τη ζωή των ασθενών. Η προσβολή του ΚΝΣ αφορά το 25% των ασθενών σε νεκροτομικές μελέτες. Η πιο συχνή εκδήλωση από το ΚΝΣ είναι η πάρεση του προσωπικού νεύρου, ενώ άλλες εγκεφαλικές συζυγίες που προσβάλλονται συχνά είναι το οπτικό, το γλωσσοφαρυγγικό, το πνευμονογαστρικό, το οφθαλμοκινητικό και το ακουστικό νεύρο. Άλλες κλινικές εκδηλώσεις αποτελούν η μηνιγγική διήθηση (που εκδηλώνεται με κεφαλαλγία, αυχενική δυσκαμψία ή υδροκέφαλο) και η εμφάνιση σπασμών (δευτεροπαθώς σε λεπτομηνιγγική συμμετοχή, παρεγχυματικές μάζες, υποθαλαμική δυσλειτουργία, κ.α.) [9,10].

Η προσβολή της καρδιάς είναι σπάνια, αλλά δυνητικά θανατηφόρα. Περίπου 5% των ασθενών έχουν κλινικά εμφανή προσβολή της καρδιάς, αλλά σε νεκροτομικές μελέτες η παρουσία κοκκιωμάτων στο μυοκάρδιο είναι συχνότερη, υποδεικνύοντας την παρουσία υποκλινικής προσβολής [11]. Η πιο συχνή εντόπιση των κοκκιωμάτων είναι το τοίχωμα της αριστερής κοιλίας και ακολουθεί σε συχνότητα το μεσοκοιλιακό διάφραγμα. Στις κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται διαταραχές αγωγιμότητας, συγκοπτικά επεισόδια, περικαρδιακή νόσος και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [9]. Επειδή η καρδιακή προσβολή συνδέεται με αυξημένη θνητότητα, συστήνεται σε κάθε ασθενή με διάγνωση σαρκοείδωσης η λήψη προσεκτικού ιστορικού με έμφαση σε καρδιολογικά συμπτώματα και η πραγματοποίηση ηλεκτροκαρδιογραφήματος. Αν υπάρχει ισχυρή υποψία για καρδιακή συμμετοχή, η διερεύνηση συνεχίζεται με την πραγματοποίηση 24ωρης καταγραφής καρδιακού ρυθμού (Holter ρυθμού 24ώρου), μαγνητική τομογραφία με γαδολίνιο ή FDG-PET.

Η προσβολή των οφθαλμών κυμαίνεται από 20-30% και είναι σοβαρή λόγω της απειλής της τύφλωσης. Η ραγοειδίτιδα είναι η πιο συχνή οφθαλμική εκδήλωση και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε πρόσθια, οπίσθια, μέση και πανραγοειδίτιδα. Η ραγοειδίτιδα έχει τυπικά υποξεία εμφάνιση και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά την πορεία της νόσου. Η προσβολή του επιπεφυκότα και των βλεφάρων είναι η αμέσως επόμενη σε συχνότητα εκδήλωση οφθαλμικής συμμετοχής. Μπορεί να παρατηρηθεί δακρυοκυστίτιδα και κερατοεπιπεφυκίτιδα [12].

Η συμμετοχή του δέρματος έχει μεγάλο εύρος εκδηλώσεων. Οι πιο συχνές εκδηλώσεις είναι το οζώδες ερύθημα, ο χειμετλώδης λύκος και η παρουσία κηλίδων, βλατίδων ή πλακών [13,14].

Η προσβολή του ήπατος είναι συνήθως υποκλινική. Τα κλινικά συμπτώματα είναι συχνά μη ειδικά και περιλαμβάνουν αδυναμία, κνησμό και άλγος στο δεξιό υποχόνδριο, ενώ στην κλινική εξέταση διαπιστώνεται ηπατομεγαλία σε περίπου 20% των ασθενών. Ο εργαστηριακός έλεγχος της ηπατικής βιοχημείας αποκαλύπτει διαταραχές σε 4-24% των ασθενών [1].

Οι ασθενείς με σαρκοείδωση μπορεί να εμφανίσουν αυξημένα επίπεδα ασβεστίου αίματος ή/και ούρων, γι' αυτό πρέπει να αναζητείται η ύπαρξη νεφρολιθίασης στο ιστορικό του ασθενούς. Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης στον ορό (serum angiotensin converting enzyme, SACE) είναι αυξημένο περίπου στο 57-66% των ασθενών, ενώ η ειδικότητα είναι περίπου 84-90% [15]. Ο διαλυτός υποδοχέας της ιντερλευκίνης 2 (sIL-2R), ένας δείκτης ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, είναι αυξημένος στο 47-70% των ασθενών, ωστόσο εμφανίζει πολύ χαμηλή ειδικότητα [16]. Φυσιολογικές τιμές των παραπάνω δεν αποκλείουν τη διάγνωση, ενώ αυξημένες τιμές τους δεν είναι παθογνωμονικές.



### 1.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ

Παρά το γεγονός ότι τα μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα είναι χαρακτηριστικό ιστολογικό γνώρισμα στη σαρκοείδωση, ωστόσο δεν είναι ειδικό εύρημα. Η διάγνωση παραμένει εξ' αποκλεισμού, αφού δεν κατέστη δυνατή μέχρι σήμερα η θέσπιση παθογνωμονικού διαγνωστικού κριτηρίου. Η διάγνωση της σαρκοείδωσης, λοιπόν, βασίζεται στη συμβατή κλινική και ακτινολογική εικόνα, την παρουσία μη τυροειδοποιημένων κοκκιωμάτων και τον αποκλεισμό άλλων νόσων με παρόμοια ιστολογική ή κλινική εικόνα [1].

Την τελευταία δεκαετία η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων με τη χρήση φθοριωμένης γλυκόζης (FDG-PET) και η διαβρογχική αναρρόφηση με λεπτή βελόνη υπό καθοδήγηση με ενδοβρογχικό υπέρηχο (EBUS-TBNA), παρέχουν τη δυνατότητα χρήσης λιγότερο επεμβατικών και υψηλότερης ευαισθησίας τεχνικών για τη διάγνωση της νόσου. Η FDG-PET, ανιχνεύοντας τη φλεγμονή, μπορεί να αποκαλύψει ιστούς ή όργανα τα οποία έχουν προσβληθεί από τη νόσο και τα οποία είναι προσβάσιμα για διενέργεια βιοψίας με λιγότερο επεμβατικές μεθόδους. Ακόμη, η χρησιμότητά της έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να αξιολογήσει την ανταπόκριση στη θεραπεία, καθώς και να διαγνώσει την προσβολή της καρδιάς [17,18,19]. Η EBUS-TBNA βελτιώνει το διαγνωστικό πεδίο της βρογχοσκόπησης και η ειδικότητά της για την ανεύρεση κοκκιωμάτων σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου ανέρχεται στο 75% συγκριτικά με τη συμβατική TBNA της οποίας η ειδικότητα κυμαίνεται στο 48% [20].

Η ακτινογραφία θώρακα σε ασθενείς με σαρκοείδωση αναδεικνύει τα ακόλουθα ακτινολογικά πρότυπα: σαρκοείδωση σταδίου I με εικόνα αμφοτερόπλευρης πυλαίας λεμφαδενοπάθειας, σαρκοείδωση σταδίου II με παρουσία αμφοτερόπλευρης πυλαίας

λεμφαδενοπάθειας και παρεγχυματικής νόσου, σαρκοείδωση σταδίου III με παρεγχυματική συμμετοχή χωρίς την ανάδειξη λεμφαδενοπάθειας, σαρκοείδωση σταδίου IV με προχωρημένη ίνωση και εικόνα μελικηρύθρας, βρογχεκτασίες εξ'έλιξης, έλξη πυλών ή/και εμφυσηματικές κύστεις (**Εικόνα 2**). Η υπολογιστική τομογραφία θώρακα υψηλής ευκρίνειας έχει μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια από την απλή ακτινογραφία θώρακα στην ανάδειξη παρεγχυματικής νόσου [1].

Η παρουσία διογκωμένων λεμφαδένων παρατηρείται στην πλειοψηφία των ασθενών (περίπου 85% των ασθενών) και συνήθως αφορά τους πυλαίους και τους δεξιούς παρατραχειακούς λεμφαδένες [21]. Η διόγκωση μεσοθωρακικών λεμφαδένων χωρίς την παρουσία διογκωμένων πυλαίων λεμφαδένων αποτελεί σπάνια εκδήλωση που παρατηρείται κυρίως σε ηλικιωμένους ασθενείς. Περιστασιακά μπορεί να παρατηρηθεί αποτιτάνωση σε λεμφαδένες και είναι ενδεικτική μακροχρόνιας νόσου.

Η παρεγχυματική προσβολή αφορά συχνότερα τους άνω λοβούς σε σύγκριση με τους κάτω λοβούς των πνευμόνων. Στις τυπικές μορφές, οι βλάβες έχουν λεμφαγγειακή κατανομή με την παρουσία οζιδίων στο διάμεσο χώρο, ανώμαλη πάχυνση των περιβρογχικών δεματίων (bronchovascular bundles) και των μεσολοβιδίων διαφραγματίων. Λιγότερο τυπικές εικόνες αποτελούν τα παρακάτω: πολλαπλά κεγχροειδή οζίδια, πάχυνση του τοιχώματος των βρόγχων, εικόνα δίκην θολής υάλου, εικόνα μάζας (ή μαζών) και κυψελιδικού τύπου σκίαση (ή σκιάσεις). Σε ασθενείς με ακτινολογικό στάδιο IV της νόσου παρατηρούνται τυπικά ινώδεις βλάβες με μετατόπιση των πυλών προς τα άνω, εικόνα μελικηρύθρας και βρογχεκτασίες εξ'έλιξης με κατανομή κυρίως στους άνω λοβούς [1], (**Εικόνα 2**).

Η ανάλυση του κυτταρικού προφίλ του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (bronchoalveolar lavage, BAL) μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στη διάγνωση της

σαρκοείδωσης. Η τυπική ανάλυση του BAL περιλαμβάνει τον αυξημένο αριθμό κυττάρων, επικράτηση των λεμφοκυττάρων και (σχεδόν) φυσιολογικά επίπεδα ουδετεροφίλων και ηωσινοφίλων. Τα λεμφοκύτταρα του BAL ασθενών με σαρκοείδωση είναι κυρίως T λεμφοκύτταρα με αυξημένο λόγο  $CD4^+/CD8^+$  κυττάρων. Ο λόγος  $CD4^+/CD8^+ > 3.5$  είναι διαγνωστικός της σαρκοείδωσης, όταν η κλινική και η απεικονιστική εικόνα είναι συμβατή [22].

Ο λειτουργικός έλεγχος του αναπνευστικού μπορεί να είναι φυσιολογικός σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Ωστόσο, μπορεί να εμφανίσουν αποφρακτικού ή περιοριστικού τύπου διαταραχή αερισμού, μειωμένη διαχυτική ικανότητα ή συνδυασμό των παραπάνω διαταραχών.

#### **1.4 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ**

Στην αρχική εκτίμηση του ασθενούς με σαρκοείδωση καθορίζεται η αναγκαιότητα χορήγησης θεραπείας. Οι μισοί περίπου ασθενείς θα χρειαστούν θεραπεία κατά τη διάγνωση, ενώ οι ασθενείς που δε θα χρειαστούν θεραπεία τους πρώτους έξι μήνες μετά τη διάγνωση, έχουν μόνο 10% πιθανότητες να χρειαστούν θεραπεία κατά την πορεία της νόσου [23,24]. Τα συνήθη συμπτώματα της πνευμονικής νόσου τα οποία υποδηλώνουν ανάγκη χορήγησης θεραπείας είναι ο βήχας, η δύσπνοια και η θωρακαλγία, ενώ για την εξωπνευμονική νόσο ενδείξεις χορήγησης θεραπείας είναι η υπερασβεστιαμία, η οφθαλμική, νευρολογική και καρδιακή προσβολή, καθώς και η ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια [25].

Τα κορτικοστεροειδή, όπως η πρεδνιζόνη ή η πρεδνιζολόνη, είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για τη σαρκοείδωση [25]. Αυτή η θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται σε αποτελέσματα κλινικών μελετών, οι οποίες έδειξαν ότι η θεραπεία με κορτικοστεροειδή υπερτερούσε του εικονικού φαρμάκου στη θεραπεία της πνευμονικής νόσου [26,27]. Ωστόσο,

η εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών ή η πρόοδος της νόσου, παρά τη θεραπεία με κορτικοστεροειδή, είναι ενδείξεις χορήγησης δεύτερης γραμμής θεραπείας, όπως οι αντιμεταβολίτες, στους οποίους περιλαμβάνονται η μεθοτρεξάτη, η αζαθειοπρίνη, η λεφλουνομίδη και η μυκοφαινολάτη μοφετίλ. Παράγοντες κινδύνου για χρόνια νόσο η οποία απαιτεί θεραπεία, με πρώτης ή δεύτερης γραμμής φάρμακα, για περισσότερο από 2 χρόνια είναι οι ηλικιωμένοι ασθενείς, οι Αφρικανο-Αμερικάνοι [24,28], η ανάγκη χορήγησης θεραπείας κατά τη διάγνωση, η μέτρια ή σοβαρή δύσπνοια ή η επηρεασμένη λειτουργική ικανότητα των πνευμόνων κατά τη διάγνωση, η νευροσαρκοείδωση, η καρδιακή προσβολή και ο χειμετλώδης λύκος [23,29]. Η μεθοτρεξάτη είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο δεύτερης γραμμής για τη θεραπεία της πνευμονικής νόσου [30]. Η αζαθειοπρίνη είναι εξίσου αποτελεσματική για τη θεραπεία της σαρκοείδωσης, εμφανίζει, όμως συχνότερα ανεπιθύμητες ενέργειες [31]. Η λεφλουνομίδη έχει χρησιμοποιηθεί, σε συνδυασμό με τη μεθοτρεξάτη, με επιτυχία σε ασθενείς με σαρκοείδωση [32] και η μυκοφαινολάτη μοφετίλ έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της πνευμονικής και της οφθαλμικής προσβολής, καθώς και για τη νευροσαρκοείδωση, σε συνδυασμό με την ινφλιξιμάμπη [33,34,35]. Το επόμενο βήμα στη θεραπεία της σοβαρής σαρκοείδωσης, όταν δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή ή αντιμεταβολίτες, είναι οι αντι-TNF παράγοντες, ειδικότερα όταν η νόσος απειλεί τη λειτουργία ενός οργάνου ή τη ζωή του ασθενούς. Η ινφλιξιμάμπη και η αδαλιμουμάμπη έχουν χρησιμοποιηθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [36,37], ωστόσο οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χορήγησή τους αποτελούν αιτίες διακοπής της θεραπείας [38]. Η συγχορήγηση λεβοφλοξασίνης, εθαμβουτόλης, αζιθρομυκίνης και ριφαμπικίνης (concomitant levofloxacin, ethambutol, azythromycin, and rifampin, CLEAR) έχει χρησιμοποιηθεί στη δερματική και πνευμονική σαρκοείδωση [39,40] και η ριτουξιμάμπη έχει

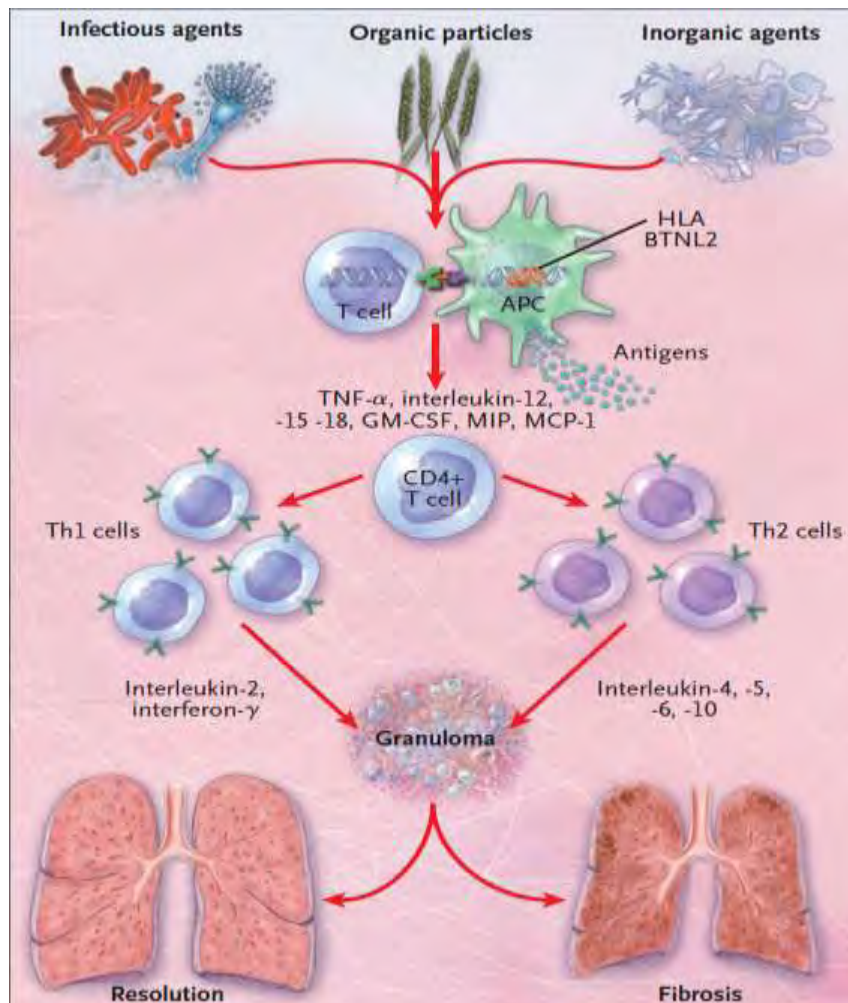
χρησιμοποιηθεί στην πνευμονική και οφθαλμική νόσο [41,42] σε μικρές, ωστόσο, ομάδες ασθενών, στους οποίους οι πρώτης και δεύτερης γραμμής θεραπείες ήταν αναποτελεσματικές.

Η κλινική πορεία της σαρκοείδωσης ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Στις μισές περιπτώσεις η νόσος υφίεται αυτόματα εντός 2 ετών και σε αρκετές ακόμα εντός 5 ετών. Μετά τα 5 έτη, οι πιθανότητες αυτόματης ύφεσης μειώνονται σημαντικά [1,43], ενώ υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του ακτινολογικού σταδίου κατά τη διάγνωση και της αυτόματης ύφεσης. Ο όρος ανθεκτική σαρκοείδωση αναφέρεται στους ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν πρόοδο της νόσου παρά τη χορήγηση θεραπείας [44]. Οι κυριότερες επιπτώσεις κατά την πορεία της χρόνιας ενεργού νόσου είναι η ίνωση (πνευμονική και εξωπνευμονική), η πνευμονική υπέρταση και τα διάφορα, μη υφιόμενα συμπτώματα, τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς.

Περίπου 20% των ασθενών εμφανίζουν χρόνια συμπτώματα τα οποία οφείλονται σε ίνωση, κυρίως πνευμονική ίνωση και σπανιότερα ίνωση άλλων οργάνων [1]. Οξυγονοθεραπεία κατ'οίκον χρειάζεται περίπου 12% των ασθενών με σαρκοείδωση ακτινολογικού σταδίου IV, ενώ αρκετοί αναπτύσσουν επιπλοκές όπως πνευμονική υπέρταση και ασπεργίλλωμα. Οι ασθενείς με σαρκοείδωση έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, ενώ η θνητότητα ανέρχεται στο 7,6% [45,46]. Στις δυτικές χώρες, η θνητότητα οφείλεται κυρίως σε αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω πνευμονικής ίνωσης και λιγότερο συχνά σε προσβολή της καρδιάς, του ΚΝΣ και του ήπατος [1].

## 1.5 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ

Παρά τη σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της νόσου, η αιτιολογία της παραμένει άγνωστη. Η σύγχρονη βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η σαρκοείδωση αναπτύσσεται όταν γενετικά προδιατεθειμένα άτομα εκτίθενται σε κάποιο άγνωστο αντιγόνο, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ανοσολογικών μηχανισμών με τελική κατάληξη τον σχηματισμό κοκκιωμάτων σε διάφορους ιστούς [1], (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Υποθετικό μοντέλο για την αιτιοπαθογένεια της σαρκοείδωσης (προσαρμοσμένο από *Ianuzzi MC και συν [47]*).

Λοιμώδεις, οργανικοί και ανόργανοι παράγοντες αποτελούν πιθανά αντιγόνα στη σαρκοείδωση. Οποιοδήποτε μικρόβιο δρα σαν αιτιολογικός παράγοντας, συνήθως όμως εξουδετερώνεται, αφήνοντας πίσω ένα μη διασπασμένο προϊόν ή πυροδοτώντας μια διασταυρούμενη ανοσολογική απάντηση ενάντια σε αυτοαντιγόνο. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APCs), εκτός του ότι παράγουν TNF- $\alpha$ , εκκρίνουν ιντερλευκίνη-12, -15, -18, φλεγμονώδη πρωτεΐνη 1 των μακροφάγων (macrophage inflammatory protein 1, MIP-1), χημιοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) και παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) [48]. Ένα βασικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της σαρκοείδωσης είναι η παρουσία CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα APCs, ξεκινώντας τη δημιουργία και διατήρηση των κοκκιομάτων. Τα CD4<sup>+</sup> T-κυττάρια απελευθερώνουν ιντερλευκίνη-2 και ιντερφερόνη- $\gamma$ . Τα ενεργηποιημένα CD4<sup>+</sup> T-κυττάρια διαφοροποιούνται σε τύπου 1 βοηθητικά κύτταρα (T helper 1, Th1) και εκκρίνουν κυρίως ιντερλευκίνη-2 και ιντερφερόνη- $\gamma$ . Η ικανότητα της επεξεργασίας του αντιγόνου, της αντιγονοπαρουσίασης και της απελευθέρωσης κυτταροκινών ελέγχεται γενετικά. Ευρήματα υποστηρίζουν ισχυρά το ρόλο των αλληλίων HLA και BTNL2 στην προδιάθεση για εμφάνιση σαρκοείδωσης, καθώς και στο φαινότυπο της νόσου [49,50]. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί γονίδια των T-κυττάρων που μπορεί να ευθύνονται για προδιάθεση στη νόσο ή να επηρεάζουν το φαινότυπό της. Τα σαρκοειδικά κοκκιώματα αποτελούνται από μακροφάγα και τα παράγωγά τους, επιθηλιοειδή κύτταρα, γιγαντοκύτταρα και T-κύτταρα. Τα σαρκοειδικά κοκκιώματα είναι δυνατόν να διατηρούνται, να λύνονται ή να οδηγούν σε ίνωση. Τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα οποία ενεργοποιούνται στα πλαίσια Th2 ανοσιακής απάντησης, φαίνεται ότι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή κολλαγόνου που οδηγεί σε προοδευτική ίνωση.

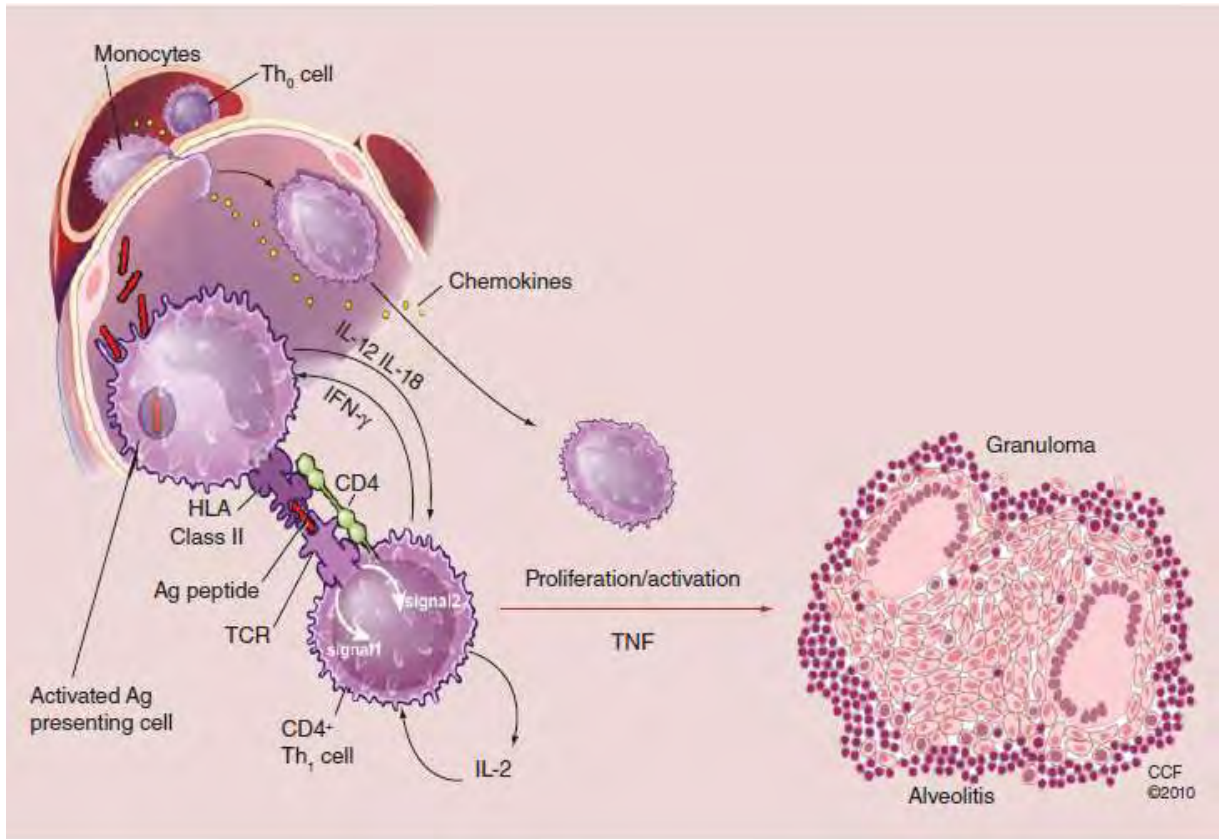
### 1.5.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η παρουσία γενετικής προδιάθεσης αναφέρεται για πρώτη στη βιβλιογραφία το 1923, όπου παρατηρήθηκε ότι δύο αδερφές έπασχαν από σαρκοείδωση [51]. Στη μελέτη ACCESS (A Case Control Etiologic Sarcoidosis Study) παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με σαρκοείδωση ανέφεραν πέντε φορές συχνότερα ότι κάποιος πρώτου βαθμού συγγενής τους (γονείς, αδερφός/ή) έπασχε από σαρκοείδωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [5]. Αν και οι συγγενείς ασθενών με σαρκοείδωση έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, φαίνεται ότι η νόσος δεν παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά σε άτομα της ίδιας οικογένειας. Εξαίρεση σε αυτό τον κανόνα αποτελεί η προσβολή των οφθαλμών και του ήπατος, καθώς έχει αποδειχθεί ότι ασθενείς με συμμετοχή των παραπάνω οργάνων είναι πιο πιθανό να έχουν συγγενείς με παρόμοιες εκδηλώσεις [52]. Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει συσχέτιση της πορείας της νόσου με αλληλία MHC II και μάλιστα έχει βρεθεί ότι ασθενείς με *HLA-DRB1\*03* έχουν καλύτερη πρόγνωση και μεγαλύτερη συχνότητα αυτόματης ύφεσης της νόσου (συμπεριλαμβανομένου και του σ.Löfgren), ενώ ασθενείς με *HLA-DRB1\*14* και *HLA-DRB1\*15* έχουν προδιάθεση για χρόνια, ενεργό νόσο [53,54]. Επιπλέον, διάφοροι γενετικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες έχουν συνδεθεί με τη νόσο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί σε μεγάλους πληθυσμούς [55].



### 1.5.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ένα προτεινόμενο μοντέλο για το σχηματισμό των κοκκιωμάτων, στο οποίο μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, με τη βοήθεια κυτταροκινών και χημειοκινών, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Προτάθηκε ότι η διαδικασία πυροδοτείται από ένα άγνωστο αντιγόνο το οποίο συνδέεται σε ένα ανάλογο του Toll υποδοχέα (Toll like receptor, TLR) και στη συνέχεια μεταφέρεται από τα δενδριτικά κύτταρα του διάμεσου ιστού στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες, δίνοντας το έναυσμα για τη διαφοροποίηση και την κλωνική έκπτυξη των Th1 και Th17 κυττάρων. Τα κυψελιδικά μακροφάγα παράγουν TNF- $\alpha$  με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και ενεργοποίησης, όπως HLA-DR, CD80/86, ICAM-1. Ο TNF- $\alpha$  σε συνδυασμό με την ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) που παράγεται από τα NK κύτταρα, διεγείρει τα μακροφάγα για να παράγουν συνδέτες-χημειοκίνες, οι οποίες ελκύουν Th17, ρυθμιστικά T (Tregs) και B-κύτταρα καθώς και μονοκύτταρα. Η διαρκής διέγερση από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στους πνεύμονες, σε συνδυασμό με την παρουσία Th1/17 κυτταροκινών, έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή στρατολόγηση κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής, οδηγώντας στο σχηματισμό κοκκιωμάτων [56], **(Εικόνα 4)**.



**Εικόνα 4:** *Ανοσολογική απάντηση στη σαρκοείδωση με αποτέλεσμα το σχηματισμό κοκκιώματος και επακόλουθη λύση ή ίνωση (προσαρμοσμένο από Baughman RP και συν. [44]).*

Παρά το γεγονός ότι η σαρκοείδωση θεωρείται μια οδηγούμενη κυρίως από τα T-κύτταρα διαταραχή, διάφορες μελέτες καταδεικνύουν την εμπλοκή μηχανισμών της χυμικής ανοσίας, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία ανοσοσφαιρινών, κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων και συμπληρώματος [57,58,59,60]. Πρόσφατες ιστολογικές μελέτες έχουν εντοπίσει B-κύτταρα στην περιφέρεια διαφόρων ιστών σε ασθενείς με σαρκοείδωση [59,61,62]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αυξημένος αριθμός ωρίμων και μεταβατικών συστηματικών B-κυττάρων σε ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση σε σχέση με τους ασθενείς με σαρκοείδωση σε ύφεση και με την ομάδα ελέγχου. Ακόμη, οι ασθενείς με ενεργό νόσο είχαν μειωμένο αριθμό συστηματικών B-κυττάρων μνήμης σε σύγκριση με τις ομάδες

ελέγχου. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ίδιοι ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα Β-κυττάρων που παράγουν ιντερλευκίνη 10 (IL-10), καθώς και «ρυθμιστικών» Β-κυττάρων που σχετίζονται με την καταστολή της φλεγμονής. Επιπροσθέτως, στον ορό ασθενών με χρόνια, ενεργό σαρκοείδωση παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά BAFF, ενός φαινοτύπου που τυπικά σχετίζεται με αυτοανοσίες [59,62,63]. Ο BAFF εκτός από το ότι παρέχει σηματοδότηση απαραίτητη για την επιβίωση και την ωρίμανση των Β-κυττάρων, βρέθηκε πρόσφατα να συμμετέχει και στη συνενεργοποίηση των Τ-κυττάρων [64].

Παρόλο που υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις για την παρουσία Β-κυττάρων σε σαρκοειδικούς ιστούς, υπάρχουν και ενδείξεις για μειωμένη λειτουργική ικανότητα αυτών. Απομόνωση CD19<sup>+</sup> κυττάρων από ασθενείς με σαρκοείδωση, ακολούθως αποδιέγερσή τους για 24 ώρες και ανάλυση της ικανότητάς τους να εκφράζουν ειδικούς δείκτες ενεργοποίησης, έδειξε διαταραγμένη ικανότητα αντίδρασης στο σήμα ενεργοποίησης. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση CD25, CD69 και CD86 σε σχέση με τα Β-κύτταρα φυσιολογικών ατόμων ελέγχου. Επίσης, παρατηρήθηκε μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, έπειτα από διέγερση με CD40L, CpG-ODN, IL-2, IL-10 και IL-15 με επίπεδα 69,3% ±11,8% για το φυσιολογικό δείγμα ελέγχου και 47,9% ± 16,3% για τα Β-κύτταρα ασθενών με σαρκοείδωση. Οι Lee και συν. παρατήρησαν, επίσης, μειωμένη έκφραση των υποδοχέων συνενεργοποίησης CD19, CD20, CD21 και CD24 με παράλληλη μειωμένη έκφραση των ανασταλτικών υποδοχέων CD22, CD32, CD35, CD85J και CD152 σε Β-κύτταρα ασθενών με σαρκοείδωση, σε σύγκριση με κύτταρα φυσιολογικών ατόμων ελέγχου. Τέλος, οι ασθενείς με σαρκοείδωση παρουσίαζαν μια μείωση της τάξης του 65% στα επίπεδα του NF-κΒ των Β-κυττάρων του περιφερικού αίματος [63]. Το CD20 είναι ένα κανάλι ιόντων ασβεστίου που εκφράζεται στην επιφάνεια των Β-κυττάρων με την εξαίρεση των

πλασματοκυττάρων [63,65]. Η θεραπεία εξάλειψης των Β-κυττάρων με αντι-CD20 μετέρχεται διαφορετικούς τρόπους δράσης που περιλαμβάνουν κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα, λύση κυττάρων εξαρτώμενη από αντισώματα, καθώς και επαγωγή απόπτωσης των Β-κυττάρων [66]. Η θεραπεία με αντι-CD20 έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη θεραπεία αυτοάνοσων και φλεγμονοδών νόσων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η σκλήρυνση κατά πλάκας, με περιορισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες [67,68]. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ασθενών με σαρκοείδωση, οι οποίοι εμφανίζουν βελτίωση έπειτα από θεραπεία με αντι-CD20 και οι οποίοι δεν είχαν ωφεληθεί από άλλες θεραπείες όπως η αγωγή με κορτικοστεροειδή [68,69,70,71]. Οι Mathas και συν. αναφέρουν ότι έπειτα από 24 ώρες επώασης της ανθρώπινης σειράς BL60-2 (από λέμφωμα Burkitt) με αντι-CD20 αντίσωμα και χρώση με acridineorange, 70% των κυττάρων είχαν κατατετημημένο πυρήνα, χαρακτηριστικό ενός κυττάρου που υφίσταται κυτταρικό θάνατο. Η ένδειξη αυτή συνοδευόταν από 80% μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Επίσης, έπειτα από 2 ώρες διέγερσης, τα κύτταρα επέδειξαν αύξηση της σχετιζόμενης με το Bcl-2-πρωτεΐνης X (BAX). Το BAX συνδέεται με την πρωτεΐνη Β λεμφώματος 2 και με αυτόν τον τρόπο αναστέλει την αντι-αποπτωτική της δράση. Παρουσία του αντισώματος αντι-CD20, ανιχνεύθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και τα προϊόντα κοπής της, SP1 και PARP [72]. Παρότι η επιτυχία της θεραπείας είναι καλά τεκμηριωμένη και δεν υπάρχει σοβαρή τοξικότητα, κάποιοι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία εξάλειψης Β-κυττάρων [73].

## 2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ – TACI ΚΑΙ BAFFR

Οι υποδοχείς TACI (Transmembrane Activator και CAML Interactor, *TNFRSF13B*, CD267) και BAFFR (BAFF receptor, *TNFRSF13C*, CD268) ανήκουν στην υπεροικογένεια των TNF. Οι TNF είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση των λεμφικών οργάνων και στην ομοιόσταση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος [74]. Τα μέλη της μπορεί να είναι είτε μόρια-συνδέτες (ligands) που συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη (membrane-bound) ή μόρια-συνδέτες που εκκρίνονται (secreted) από τα κύτταρα και συνδέονται με ένα ή περισσότερα μέλη της αντίστοιχης οικογένειας TNFR στην επιφάνεια των κυττάρων.

### 2.1 TACI ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

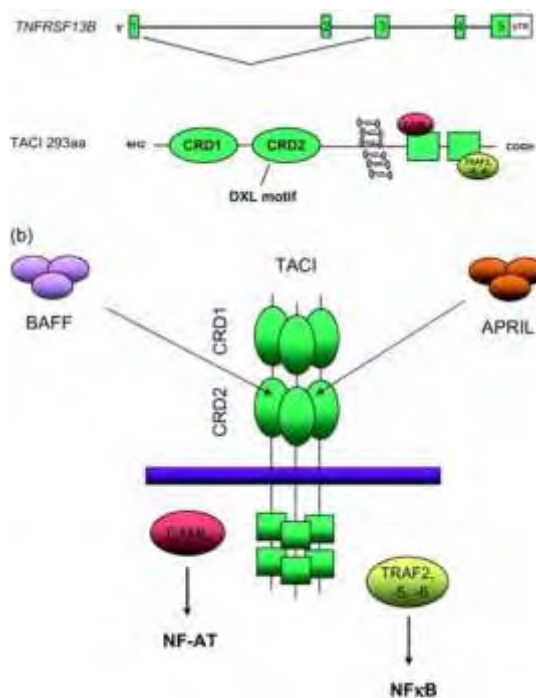
#### 2.1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ

Ο υποδοχέας TACI προστέθηκε στην υπεροικογένεια-TNF, όταν διαπιστώθηκε ότι συνδέεται με την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη CAML [75]. Το γονίδιο *TNFRSF13B*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI (293 αμινοξέων), βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p11.2), περιοχή που αποτελεί συχνό στόχο για μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς [76].

Ο υποδοχέας TACI είναι μια τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη, στην οποία το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα είναι εξωκυττάριο και δεν υπάρχει αμινοτελική αλληλουχία σηματοδότησης. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο τμημάτων πλούσιων σε κυστεΐνες (CRDs), χαρακτηριστικές της TNF-υπεροικογένειας υποδοχέων, οι οποίες είναι μεταξύ τους

κατά 50% όμοιες [77]. Ειδικότερα, ο υποδοχέας αποτελείται από εξωκυττάριο τμήμα συνολικού μεγέθους 166 αμινοξέων (αα), διαμεμβρανικό μεγέθους 20 αα (166-186 αα) και ενδοκυττάριο τμήμα μεγέθους 107 αα (187-293 αα). Το πρώτο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-1) εκτείνεται από το 32 αα έως το 67 αα, που λείπει από μια ισομορφή του TACI και είναι αυτό το οποίο συμμετέχει στον τριμερισμό του υποδοχέα. Το δεύτερο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-2), εκτείνεται από το 68 αα έως το 106 αα και είναι αυτό στο οποίο προσδένονται οι συνδέτες του υποδοχέα με υψηλή συγγένεια [77]. Όλες οι επαναλήψεις κυστεΐνης του TACI υποδοχέα και των συνδετών του, περιέχουν το λεγόμενο DxL μοτίβο: (F/Y/W)-D-x-L-(V/T)-(R/G), μια διατηρημένη αλληλουχία που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των συνδετών στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, όπως έχουν δείξει μελέτες κρυσταλλογραφίας του τμήματος αυτού [78,79], **(Εικόνα 5)**.

Με εναλλακτικό μάτισμα προκύπτει μια μικρότερου μεγέθους TACI πρωτεΐνη (short TACI), η οποία περιέχει μόνο μια επανάληψη κυστεΐνης (CRD-2), αλλά οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κΒ. Το χαρακτηριστικό αυτό, κάνει τον TACI υποδοχέα να διαφέρει από τα άλλα μέλη των TNFR, στην περίπτωση των οποίων απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις κυστεΐνης για την πρόσδεση με τους συνδέτες τους [80]. Εντούτοις, μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο η δεύτερη επανάληψη CRD-2 του υποδοχέα TACI απαιτείται για την υψηλής συγγένειας σύνδεση με τους συνδέτες του.



**Εικόνα 5:** Η γονιδιακή οργάνωση και η δομή της πρωτεΐνης TACI. Το γονίδιο TNFRSF13B που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, αποτελείται από πέντε εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 293 αμινοξέων. Ο υποδοχέας TACI περιέχει τις πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές 1 και 2 (CRD-1 και CRD-2) στο εξωκυττάριο τμήμα του. Στο ενδοκυττάριο τμήμα του περιέχει θέσεις δέσμησης για τις πρωτεΐνες TRAF (TRAF -2, -5 και -6) και την πρωτεΐνη CAML. Ένα εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να συμβεί, δίνοντας αφορμή για μια σύντομη πρωτεΐνη TACI, από την οποία λείπει το CRD1. (b) ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί την δημιουργία τριμερών. Τα BAFF και APRIL είναι οι συνδέτες του TACI (προσαρμοσμένο από Bacchelli και συν. [81])

Τα μόρια BAFF και APRIL είναι οι κύριοι συνδέτες του υποδοχέα TACI, όπου μάλιστα προσδέονται σε αυτόν με μεγάλη συγγένεια και ειδικότητα [82]. Ο BAFF (γνωστός και ως BLyS, THANK, TALL-1 και zTNF4) ενισχύει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Β-κυττάρων, ενώ αυξημένες συγκεντρώσεις του έχουν βρεθεί σε διάφορα νοσήματα, τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε πειραματόζωα [83,84]. Ο APRIL (γνωστός ως *TNSF13A*, Tall-2, και TRDL-1), επάγει την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών [85]. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγγένεια σύνδεσης των BAFF και APRIL στον υποδοχέα TACI είναι παρόμοιες [86], ενώ επιπρόσθετα, ετεροτριμερή των BAFF και APRIL μπορούν να ενεργοποιήσουν το σηματοδοτικό καταρράκτη του υποδοχέα [87]. Τα BAFF/APRIL ετεροτριμερή μπορούν να προσδέονται στον TACI, αλλά όχι στους άλλους δύο TNF υποδοχείς BCMA (B Cell Maturation Antigen) ή BAFFR, στους οποίους οι συνδέτες APRIL και BAFF μπορούν να συνδεθούν αντίστοιχα [88].

Η πρωτεογλυκάνη syndecan-2 μπορεί, επίσης, να δρα ως συνδέτης του TACI, βασιζόμενη αποκλειστικά στις πλευρικές αλυσίδες της. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο TACI υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιείται και από άλλες HSPGs (heparan sulphate proteoglycans, HSPGs) *in vivo* (π.χ. syndecan-4) [89]. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδέτης APRIL μπορεί να συνδέεται ανεξάρτητα σε πρωτεογλυκάνες, όπως η syndecan-1 (CD138), δημιουργώντας ένα βιολογικά ενεργό σύμπλοκο στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων [90,91]. Αν και δεν είναι πλήρως γνωστή η χρησιμότητα της σύνδεσης αυτής, πιστεύεται όμως ότι είναι πολύ σημαντική για τον πολυμερισμό του APRIL κατά την σύνδεσή του στον TACI υποδοχέα και ίσως εξηγεί τα εναλλακτικά αποτελέσματα κατά τη σηματοδότησή του στα Β-κύτταρα.



### 2.1.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

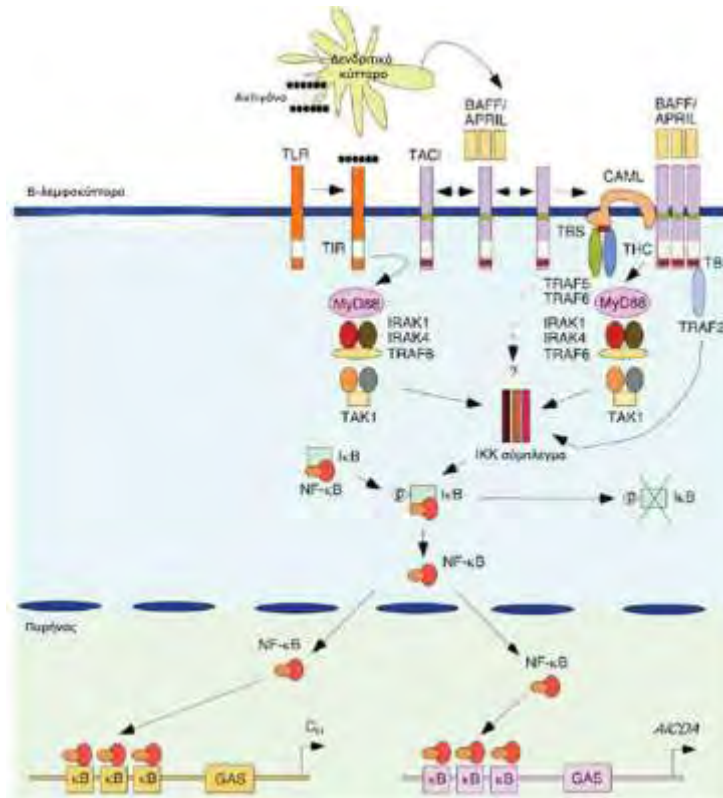
Ο TAC1 υποδοχέας εκφράζεται κυρίως στα ώριμα B-κύτταρα. Αρχικά, είναι ανιχνεύσιμος στα μεταβατικά T1 σταδίου (transitional) B-κύτταρα, αυξάνεται δεκαπλάσια στα B-κύτταρα στη ζώνη του μανδύα (marginal zone) [92], ενώ καταστέλλεται στο στάδιο των πλασματοκυττάρων [93]. Φαίνεται ότι η επαγωγή του TAC1 σε σπληνικά B-κύτταρα επιμύων, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA, είναι άμεση έπειτα από διέγερση με LPS μέσω του υποδοχέα TLR4 [94], αλλά και μετά από διέγερση με CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια μέσω του υποδοχέα TLR9 [95]. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του BcR υποδοχέα παρουσία των κυτταροκινών IL-2 και IL-10 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα TAC1 στην επιφάνεια των κυττάρων [96]. Εντούτοις, υπάρχουν αναφορές για χαμηλή έκφραση του υποδοχέα και σε άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει ανιχνευθεί χαμηλή έκφραση TAC1 σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα επιμύων [97] ή σε κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με τον συνδέτη BAFF [98]. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι ο TAC1 υποδοχέας μπορεί να ανιχνευθεί και σε μονοκύτταρα, στα οποία ο BAFF προάγει σήματα επιβίωσης και ενεργοποίησης, προκαλώντας τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα [99].

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι ο TAC1 υποδοχέας προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του NF-κB, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα άλλα μέλη της TNFR-υπεροικογένειας. Μάλιστα, διαμόλυνση με το *TNFRSF13B* γονίδιο σε κύτταρα Jurkat (T-οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας), τα οποία φυσιολογικά δεν εκφράζουν τον υποδοχέα, αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας TAC1 μπορεί να ενεργοποιήσει επίσης τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-AT, καθώς και να επάγει σηματοδότηση μέσω της κινάσης JNK. Τα ευρήματα αυτά προσδίδουν έναν κομβικό ρόλο στον TAC1 υποδοχέα, για ποικίλες ανοσιακές απαντήσεις.

Συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση του συνδέτη (BAFF ή APRIL), επάγεται τριμερισμός του TACI υποδοχέα, με τον οποίο ακολούθως προσδένονται TRAF μόρια στο ενδοκυττάριο τμήμα του. Ειδικότερα, προσδένονται τα TRAF-2, -5 και -6 σε ένα διαφορετικό σημείο πρόσδεσης από αυτό της CAML πρωτεΐνης [97,100]. Η τελευταία, εμπλέκεται τόσο στην εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  [101], όσο και στη διαδικασία διακίνησης υποδοχέων (receptor trafficking) [102], δηλαδή τη μετακίνηση του υποδοχέα στο κύτταρο, με στόχο την ενεργοποίηση, ή την απενεργοποίησή του, ή ακόμα και την αποικοδόμησή του. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της CAML πρωτεΐνης στη σηματοδότηση του TACI δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.

Σε μια πρόσφατη μελέτη από τους Bossen και συν., διαπιστώθηκε ότι ο BAFF μπορεί να υιοθετήσει δύο σταθερές και υψηλής οργάνωσης δομές, με τις οποίες προσδένεται στον υποδοχέα TACI, μια τριμερή και μία 60-μερή, οργανωμένη σε ένα σύμπλεγμα τύπου ιού [103]. Αν και οι δύο δομές μπορούν να συνδεθούν στον TACI υποδοχέα, ωστόσο μόνο η 60-μερής ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι του, χωρίς να μπορεί να εξηγηθεί ταυτόχρονα ποια γεγονότα καθορίζουν την σχετική αναλογία 3-μερούς/60-μερούς. Ωστόσο, το γεγονός ότι και οι δύο μορφές του BAFF έχουν βρεθεί στον ορό επίμυων και ανθρώπων, καταδεικνύει ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης στη σηματοδότηση του TACI υποδοχέα, εκείνο της πολυμερικής αλλαγής της δομής του συνδέτη του. Τέλος, ενδιαφέρουσα είναι η ανακάλυψη ότι στο κυτταροπλασματικό τμήμα του TACI υποδοχέα, πλην των TRAF και CAML πρωτεϊνών, υπάρχει και ένα διατηρημένο μοτίβο πρόσδεσης της MyD88 πρωτεΐνης. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη προσαρμογής, η οποία μπορεί και ενεργοποιεί τον NF-κB μέσω ενός TIR πεδίου. Ο TACI υποδοχέας δεν έχει TIR πεδίο, αλλά παρόλα αυτά μπορεί να ενεργοποιήσει την ισοτυπική μεταστροφή και να ελέγξει ένα εσωτερικό, TIR-ανεξάρτητο και

TACI-εξαρτώμενο μονοπάτι, για την διαφοροποίηση των ανοσοσφαιρινών [104]. Η σηματοδότηση του TACI υποδοχέα, απεικονίζεται στην **Εικόνα 6**.



**Εικόνα 6:** Ο TACI υποδοχέας, εκτός από τις πρωτεΐνες TRAF και CAML, χαρακτηρίζεται από ένα τύπου TLR, TIR-ανεξάρτητο μονοπάτι, στο οποίο εμπλέκεται η MyD88 πρωτεΐνη. Η σύνδεση του BAFF ή του APRIL, που παράγονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (π.χ. δενδρικό κύτταρο), στον TACI, ενεργοποιεί τον ολιγομερισμό του υποδοχέα και την στρατολόγηση της MyD88 πρωτεΐνης στο THC πεδίο. Ακόλουθη στρατολόγηση των IRAK-1, IRAK-4 και TAK-1 προκαλεί ενεργοποίηση του IKK συμπλέγματος. Αυτή η διαδικασία ενισχύεται περαιτέρω με την πρόσδεση του TRAF2 στο TBS του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την τελική ενεργοποίηση του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα και εν τέλει την ισotuπική μεταστροφή, παρουσία και άλλων σημάτων που παράγονται από κυτταροκίνες και συνδέτες των TLR (αντιγόνα). Οι TLRs, χρησιμοποιούν ένα κανονικό TIR-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι, ενώ συνεργάζονται με τους αντίστοιχους συνδέτες του TACI για την επαγωγή της παραγωγής ανοσοσφαιρινών (προσαρμοσμένο από He και συν. [104]).

Μια πρόσφατη μελέτη περιέγραψε έναν απροσδόκητο ρόλο για τον υποδοχέα TACI, όσον αφορά τη διέγερση των CTLs. Συγκεκριμένα, μετά από ανοσοποίηση επίμυων χωρίς B-κύτταρα, με πολλαπλά διαφορετικά πεπτίδια ή πρωτεΐνες (π.χ. OVA), αυτά δεν μπορούσαν να παράγουν CTLs. Ακόλουθη ανασύσταση των επίμυων αυτών, με φυσιολογικά B-κύτταρα ή B-κύτταρα από διαγονιδιακά ζώα με απουσία έκφρασης ποικίλων μορίων (π.χ. b2m, CD40, IL-2 ή IL-4) κατέστησε εφικτή την παραγωγή φυσιολογικών CTLs. Αντίθετα, όταν εγχύθηκαν B-κύτταρα από TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα, η ανασύσταση αυτή δεν ήταν εφικτή, προτείνοντας έτσι έναν σημαντικό ρόλο του TACI στην *in vivo* διέγερση των CTLs. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον, ότι η χορήγηση μικρών ποσοτήτων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (εξωκυττάριο τμήμα του TACI συγχωνευμένο με ένα Fc πολυπεπίδιο), δεν στόχευε τα CTLs, όπως θα περίμενε κανείς, αλλά τα δενδριτικά κύτταρα [105]. Ως αποτέλεσμα έχει προταθεί, ότι η παρουσία του TACI είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (που φυσιολογικά εκφράζουν μεγάλες ποσότητες BAFF και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα *in vitro* παρουσία των B-κυττάρων), επάγοντας την έκπτυξη μεγάλου αριθμού ενεργοποιημένων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων κατά την CTL διέγερση. Συμπερασματικά, αν και ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης δεν είναι ακόμη γνωστός, προκύπτει ξεκάθαρα ότι ο TACI υποδοχέας μπορεί να δρα και ως συνδέτης, διευκολύνοντας την T-κυτταροτοξικότητα. Επομένως, μπορεί να συμπεριληφθεί στα μέλη της TNFR-υπεροικογένειας που μπορούν να δρουν και προς τις δύο κατευθύνσεις [106].

### **2.1.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TACI ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο του BAFF στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων, θα περίμενε κανείς σε διαγονιδιακούς επίμυες που δεν εκφράζουν TACI (TACI<sup>-/-</sup>)

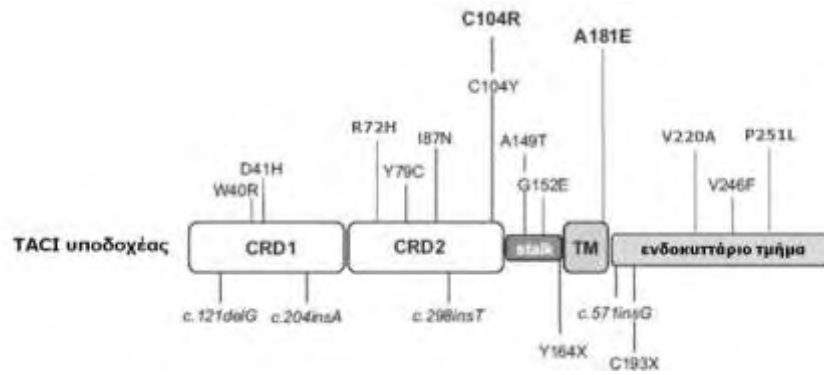
ένα φαινότυπο που θα επηρέαζε αρνητικά τα Β-κύτταρα. Αντίθετα όμως, TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα παρουσίασαν υπερπλασία των Β-κυττάρων με διπλάσιο αριθμό τους στο περιφερικό αίμα και το σπλήνα, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και ανάπτυξη λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου [107]. Παράλληλα, η απουσία έκφρασης του TACI υποδοχέα οδήγησε σε διαταραχή της θυμο-ανεξάρτητης παραγωγής ανοσοσφαιρινών (σε απόκριση στην NP-φικόλη ή σε αντιγόνα της κάψας του πνευμονιοκόκκου), την στιγμή που οι T-εξαρτώμενες αποκρίσεις ήταν φυσιολογικές. Επίσης, το γεγονός ότι ο υποδοχέας υπερεκφράζεται, έπειτα από διέγερση των Β-κυττάρων, οδήγησε τους Castigli και συν., στην διαπίστωση ότι η σηματοδότηση μέσω του TACI είναι κομβικής σημασίας για την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών [108]. Η επιβεβαίωση ήρθε αργότερα, όταν αποδείχθηκε ότι η διέγερση του TACI με τον συνδέτη APRIL, παρουσία πρωτεογλυκανών, προκαλούσε παραγωγή IgA ανοσοσφαιρίνης [109]. Τα παραπάνω ευρήματα, συσχετίστηκαν με την ανίχνευση μεταλλάξεων του TACI γονιδίου σε ασθενείς με COVID, που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν διαταραχή της ισοτυπικής μεταστροφής [110,111]. Ωστόσο, είναι γεγονός ότι υπάρχουν ασάφειες όσον αφορά τον ακριβή βιολογικό ρόλο του TACI, δεδομένου ότι έχει αναφερθεί τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση της διέγερσης του υποδοχέα [112]. Η σύνοψη των λειτουργιών του TACI υποδοχέα σε επίμυες και στον άνθρωπο παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 2**.

**Πίνακας 2:** Σύνοψη των λειτουργιών του υποδοχέα TAC1 στον άνθρωπο και σε επίμυες, *in vivo*

<b>Δράση ενεργοποίησης του υποδοχέα TAC1</b>	
<b><i>In vitro</i></b>	
Ανθρώπινα PBMC	Τα δενδριτικά κύτταρα προάγουν, μέσω των BAFF και APRIL, την CD40-ανεξάρτητη ισοτυπική μεταστροφή [96]
Παρθένα Β-κύτταρα επιμύων	T-ανεξάρτητη ισοτυπική μεταστροφή. Έκκριση IgG1 και IgA, έπειτα από διέγερση με BAFF και APRIL [113]
<b><i>In vivo</i></b>	
APRIL <sup>-/-</sup> επίμυες	Διαταραχή της IgA ισοτυπικής μεταστροφής [108]
TAC1 <sup>-/-</sup> επίμυες	Διαταραχή της TI τύπου II απόκρισης έναντι πολυσακχαριδικών αντιγόνων βακτηρίων με κάψα (π.χ. <i>Streptococcus pneumoniae</i> ) [107]
CVID ασθενείς	Μεταλλάξεις στο γονίδιο TAC1 συσχετίστηκαν με CVID [110, 111] και IgA ανεπάρκεια [110]. Επιπρόσθετα, η παραγωγή αντισωμάτων, έπειτα από εμβολιασμό με πνευμονιόκοκκο, ήταν επιλεκτικά μειωμένη [110]
<b>Ανασταλτική δράση του υποδοχέα TAC1</b>	
<b><i>In vitro</i></b>	
B-κύτταρα ανθρώπου	Αντι-TAC1 αντισώματα παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό B-κυττάρων, προάγουν την απόπτωση [114] και εμποδίζουν την παραγωγή αντισωμάτων [109]
B-κύτταρα επιμύων	Αντι-TAC1 αντισώματα παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό B-κυττάρων και προάγουν την απόπτωση [114]
<b><i>In vivo</i></b>	
TAC1 <sup>-/-</sup> επίμυες	Υπερπλασία B-κυττάρων [107], αυτοανοσία, λεμφοϋπερπλασία και υπεργαμμασφαιριναιμία, αύξηση βλαστικών κέντρων στο σπλήνα και αυξημένη κυτταροβρίθεια λεμφοζιδίων [115]. Αυτοάνοση σπειραματονεφρίτιδα, λέμφωμα [114].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω και παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2**, μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* διαπιστώθηκαν σε ασθενείς με COVID και συσχετίστηκαν, ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή, με την ανάπτυξη της νόσου [110,111]. Η COVID αποτελεί, μετά την εκλεκτική IgA ανοσοανεπάρκεια, τη συχνότερη ανοσοανεπάρκεια στον άνθρωπο. Οι πάσχοντες εμφανίζουν υπογαμμασφαιριναιμία, αδυναμία παραγωγής αντισωμάτων, έπειτα από εμβολιασμό ή έκθεση σε παθογόνα και, ως αποτέλεσμα, συχνές λοιμώξεις [116]. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον ότι αρχικά περιγράφηκαν αρκετές μεταλλάξεις του *TNFRSF13B* που συσχετίστηκαν με τη νόσο [110,111]. Ωστόσο, τα ίδια κέντρα που πρωτοπεριέγραψαν το 2005 μεταλλάξεις του γονιδίου ως παθογενετικές του νοσήματος [110], δύο χρόνια αργότερα αναθεώρησαν τη θέση αυτή, δεδομένου ότι όλες οι μεταλλάξεις έχουν βρεθεί και σε φυσιολογικά άτομα [117,110]. Μερικές από τις πιο συχνές μεταλλάξεις του *TNFRSF13B* παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7**.

Ωστόσο, δύο από τις μεταλλάξεις του *TNFRSF13B*, οι A181E και C104R, φαίνεται να συνδέονται ισχυρά με την ανάπτυξη της COVID [118]. Αν και είναι πολύ πιθανόν οι μεταλλάξεις αυτές να μην είναι παθογενετικές, μπορούν ωστόσο να επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται σε πρόσφατη ανασκόπηση των Salzer και συν., η παρουσία μετάλλαξης στο ένα ή και στα δύο αλληλία του *TNFRSF13B* σχετίζεται ισχυρά με υπογαμμασφαιριναιμία (RR: 4,3, 95% CI:2,4-7,6), ενώ όσον αφορά τις κύριες μεταλλάξεις C104R και A181E, η συσχέτιση με την ετερόζυγη μετάλλαξη C104R είναι ισχυρή για την ανάπτυξη COVID, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο και για την A181E [118]. Επίσης, η παρουσία των μεταλλάξεων σχετίζεται με την αυξημένη συχνότητα σπληνομεγαλίας και αυτοανοσίας [119,118].



**Εικόνα 7:** Η κατανομή των πιο συχνών μεταλλάξεων του *TNFRSF13B* (προσαρμοσμένο από Salzer και συν.[118]).

Στον Ελληνικό πληθυσμό, φαίνεται να επικρατούν κυρίως οι παραλλαγές P251L και V220A, τόσο σε ασθενείς με CVID, όσο και σε υγιείς μάρτυρες [120], η βιολογική σημασία των οποίων δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Μάλιστα, η θέση τους, βάσει της βιβλιογραφίας, βρίσκεται στο σημείο πρόσδεσης των πρωτεϊνών TRAF [97,100,121]. Σύμφωνα με την μελέτη των Salzer και συν., η V220A θεωρείται «καλοήθης» εξαλλαγή, αν και μπορεί να επηρεάσει το κέντρο σταθεροποίησης της πρωτεΐνης (stabilization center, SC), δηλαδή συσσωρευμένα κατάλοιπα, τα οποία επηρεάζουν την τρισδιάστατη δομή της. [118]. Αντίθετα, η παρουσία της P251L, θεωρείται επιβλαβής [118], ενώ είναι ενδιαφέρουσα η άποψη, ότι αποτελεί μια από τις αρχαιότερες παραλλαγές του *TNFRSF13B* γονιδίου [122]. Ο ρόλος του TACI στην παθογένεια ή και το φαινότυπο της σαρκοείδωσης είναι τελείως άγνωστος.



## 2.2 BAFFR ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

### 2.2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ

Ο υποδοχέας BAFFR (επίσημα: BR3, TNFRSF13C, CD268), ανήκει στην TNF υπεροικογένεια, έπειτα από την ανακάλυψη πως, παρόμοια με τους TACI και BCMA υποδοχείς, προσδένεται στον BAFF [123]. Το γονίδιο *TNFRSF13C/BAFFR* βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 22 (22q13.2) και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο 184 αμινοξέων. Ο BAFFR υποδοχέας, παρόμοια με τους TACI [97] και BCMA [124] υποδοχείς, είναι μια τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που περιέχει ένα πεδίο CRD, στο οποίο περιέχονται μόνο τέσσερις επαναλήψεις κυστεΐνης, αντίθετα με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας που χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον έξι [125]. Η δομή του υποδοχέα περιλαμβάνει εξωκυττάριο (1-101 αα), διαμεμβρανικό (102-122 αα) και ενδοκυττάριο τμήμα (123-184 αα) [123].

Ο μοναδικός συνδέτης του BAFFR υποδοχέα είναι ο BAFF, με τον οποίο ο υποδοχέας συνδέεται με υψηλή συγγένεια [123]. Όπως προαναφέρθηκε, ο BAFF είναι μέλος της TNF υπεροικογένειας, που εκφράζεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα με σημαντικό ρόλο για την διατήρηση της ομοιόστασης και της διαφοροποίησης των Β-κυττάρων [126,127]. Ο συνδέτης αυτός χαρακτηρίζεται από ένα καρβοξυτελικό πεδίο που ονομάζεται THD, το οποίο μοιράζεται 20-30% ομολογία με άλλα 16 μέλη της TNF υπεροικογένειας (π.χ. TNF, CD40L, FasL κτλ) [128]. Ο BAFF, όπως και ο APRIL, χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία-μοτίβο, που αναγνωρίζεται από το πρωτεολυτικό ένζυμο φουρίνη (furin). Αποτέλεσμα της αναγνώρισης αυτής είναι η δημιουργία μιας διαλυτής μορφής του BAFF, υποδηλώνοντας ότι ο συνδέτης υπάρχει και συνδεδεμένος με την κυτταρική μεμβράνη [129]. Η διαλυτή μορφή του BAFF είναι συνήθως τριμερής, αλλά μπορεί,

επίσης, να οργανωθεί σε ανώτερη δομή 20 τριμερών (60-μερή), όπως αναφέρθηκε παραπάνω [103].

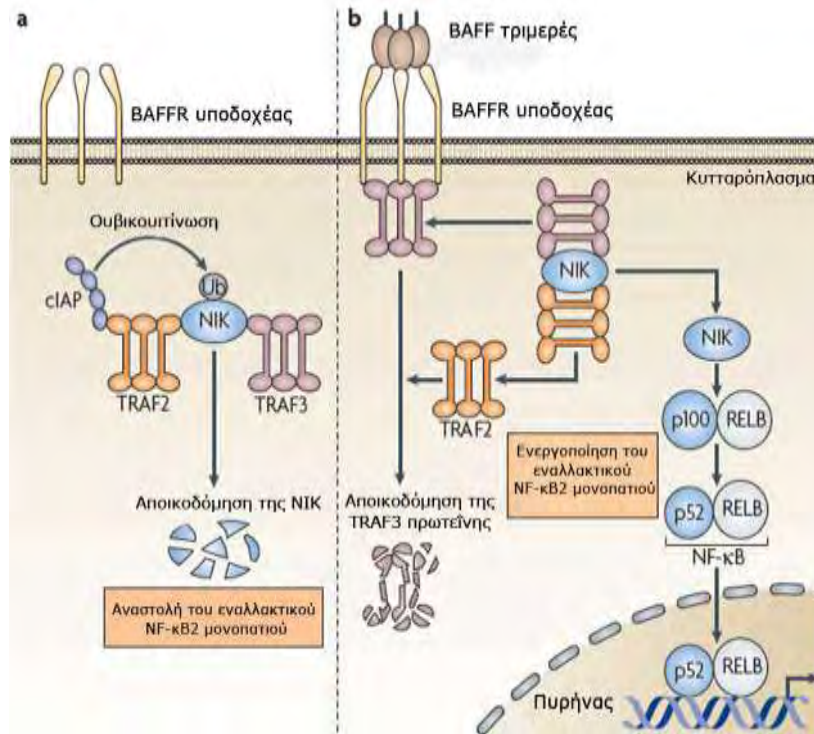
### **2.2.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ**

Τα Β-κύτταρα, καθώς και μικρός αριθμός μη ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων στην περιφέρεια, εκφράζουν τον BAFFR υποδοχέα [123,130]. Επίσης, ανιχνεύθηκε υψηλή έκφραση του υποδοχέα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, στον σπλήνα και τους λεμφαδένες, ενώ ανιχνεύθηκε χαμηλή έκφραση του στο μυελό των οστών [123,131] και το εμβρυϊκό ήπαρ [123].

Μετά την έναρξη της σηματοδότησης, στο ενδοκυττάριο τμήμα του BAFFR υποδοχέα, συνδέονται οι πρωτεΐνες TRAFs. Πρόκειται για τριμερείς πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να συνδέονται και στους τρεις υποδοχείς TACI, BAFF-R και BCMA [121,132,133]. Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ η συγγένεια της πρωτεΐνης TRAF για ένα μονομερές BAFFR υποδοχέα είναι χαμηλή, η σύνδεση TRAF-υποδοχέα σταθεροποιείται όταν υπάρχει σύνδεση τριμερούς TRAF-τριμερούς BAFFR υποδοχέα [134]. Ο BAFFR υποδοχέας, συνδέεται και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TRAF3, η οποία επακόλουθα φωσφορυλιώνει την NIK κινάση. Η NIK κινάση συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κΒ2 εναλλακτικού μονοπατιού [135].

Ωστόσο, αν και δεν υπάρχει άμεση σύνδεση του BAFFR υποδοχέα με την TRAF2, έχει διαπιστωθεί ότι η απαλοιφή της τελευταίας, προκαλεί συσσώρευση της πρωτεΐνης TRAF3. Οι παρατηρήσεις αυτές θέτουν τη βάση για ένα μοντέλο που εξηγεί τα αρχικά βήματα της σηματοδότησης του υποδοχέα. Ειδικότερα, απουσία του BAFF, η TRAF3 συνδέεται με την

NIK κινάση και στην συνέχεια αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα, με την βοήθεια της TRAF2. Επομένως, με αυτόν τον τρόπο, η TRAF3 δεν συμμετέχει στην ενεργοποίηση του εναλλακτικού NF-κΒ μονοπατιού. Αντίθετα, παρουσία του BAFF, η TRAF3 συνδέεται στον BAFFR, η NIK κινάση σταθεροποιείται με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ2, που με την σειρά της θα οδηγήσει στην επιβίωση των Β-κυττάρων [136]. Τα αρχικά στάδια σηματοδότησης του BAFFR υποδοχέα δεν είναι πλήρως κατανοητά, δεδομένου ότι μπορεί να ενεργοποιήσει το κλασσικό (classical) ή το εναλλακτικό (non-canonical) NF-κΒ μονοπάτι [137,138] ή άλλους αντι-αποπτωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. Bcl-2) [139]. Ο ρόλος των πρωτεϊνών TRAF στην σηματοδότηση του BAFFR παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8**.



**Εικόνα 8: Ο ρόλος των πρωτεϊνών TRAF στην σηματοδότηση του BAFFR.** A) Απουσία της BAFF/BAFFR πρόσδεσης η NIK κινάση συνδέεται με τις TRAF2 και TRAF3 πρωτεΐνες. Η TRAF2 «στρατολογεί» τον cIAP, ο οποίος έχει ως στόχο την NIK κινάση, την οποία αποικοδομεί μέσω της ουβικουιτίνωσης, αναστέλλοντας έτσι τον NF-κB2. B) Έπειτα από την BAFF/BAFFR σύνδεση, η TRAF3 πρωτεΐνη συνδέεται με τον BAFFR, ενώ με την σειρά της, η TRAF2 προάγει την αποικοδόμηση της TRAF3. Η NIK κινάση είναι πλέον ελεύθερη να συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB2 εναλλακτικού μονοπατιού, το οποίο προάγει την επιβίωση των κυττάρων (από Mackay F & Schneider P, με τροποποιήσεις [136]).

### 2.2.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ BAFFR ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Σημαντικός παράγοντας για την κατανόηση του ρόλου του υποδοχέα BAFFR, όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων, είναι ο συνδέτης BAFF. Ο BAFFR κατέχει το προνόμιο της αποκλειστικής σύνδεσης με τον συγκεκριμένο συνδέτη [123], ο οποίος ρυθμίζει θετικά την ομοιόσταση των Β-κυττάρων, μεταβιβάζοντας σήματα επιβίωσης [140]. Ωστόσο, η διαπίστωση ότι επίμυες με βλάβες στο γονίδιο *BAFFR*, είχαν τις ίδιες διαταραχές στα Β-κύτταρα με *BAFF*<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα, κατέδειξε τον BAFFR πολύ σημαντικό υποδοχέα για την διαφοροποίηση και την επιβίωση των Β-κυττάρων [123].

Επιπρόσθετα, ο BAFFR εκτός από το σημαντικό του ρόλο στην ομοιόσταση των Β-κυττάρων, συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή, στην διατήρηση των βλαστικών κέντρων των λεμφοζιδίων και την επαγωγή της έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών στα Β-κύτταρα [141]. Οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί και συνοψίζουν τον ρόλο του συστήματος BAFF/BAFFR συνοψίζονται στον **Πίνακα 3**.

**Πίνακας 3:** Μελέτες που καταδεικνύουν τον ρόλο του συστήματος BAFF/BAFFR.

---

<b>BAFF συνδέτης</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>In vitro</i> διέγερση του πολλαπλασιασμού ανθρώπινων B-κυττάρων και της παραγωγής ανοσοσφαιρινών [129].</li><li>• Παράταση της επιβίωσης ανθρώπινων CD27<sup>+</sup> μνημονικών και CD38<sup>+</sup> B-κυττάρων [142].</li><li>• Αυξημένος αριθμός ώριμων B-κυττάρων και δραστικών T-κυττάρων, αυτοάνοσες εκδηλώσεις και εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στους νεφρούς σε <i>Baff</i><sup>+/+</sup> διαγονιδιακά ζώα [143]</li><li>• Υποπλασία B-κυττάρων, μείωση των ανοσοσφαιρινών στην κυκλοφορία και μείωση της χυμικής ανοσιακής απόκρισης σε <i>BAFF</i><sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα [144]</li></ul>
<b>BAFFR υποδοχέας</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Εκδήλωση τύπου-ΣΕΛ συνδρόμου, παρουσία αντι-dsDNA αντισωμάτων, υπεργαμμασφαιριναιμία, ελαττωματική διαφοροποίηση B-κυττάρων και σπειραματονεφρίτιδα σε επίμυες με μετάλλαξη στο <i>Baffr</i> γονίδιο [145,146,147]</li><li>• Απώλεια περιφερικών B-κυττάρων και μείωση ανοσοσφαιρινών στην κυκλοφορία σε <i>Baffr</i><sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα [141]</li><li>• Μείωση των B-κυττάρων στην περιφέρεια, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα, έπειτα από χορήγηση BAFFR αναστολέων [148]</li><li>• Μείωση των B-κυττάρων στην περιφέρεια, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα, έπειτα από χορήγηση αντι-BAFFR αντισώματος, σε πρωτεύοντα (<i>Macaca fascicularis</i>) [149].</li></ul>

---

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο BAFF συνδέτης εμπλέκεται στην εκδήλωση αυτοανοσίας και ΣΕΛ, οι Ju και συν., θέλησαν να διερευνήσουν περαιτέρω τον ρόλο του BAFFR υποδοχέα στα παραπάνω φαινόμενα. Για το λόγο αυτό, διασταύρωσαν πειραματόζωα με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, ώστε να προκύψει ένα *Baffr* μεταλλαγμένο διαγονιδιακό ζώο (A/WySnJ/MRL-*lpr* έπιμυς). Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν επίμυες με μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης των Β-κυττάρων *in vitro* (ανώριμων, ώριμων και ζώνης μανδύα) στον σπλήνα, αλλά με μεγαλύτερο αριθμό και Β-κυττάρων και πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών [147].

Από τις παραπάνω αναφορές προκύπτει πως μεταλλάξεις στο *BAFFR* γονίδιο συνδέονται με ένα τροποποιημένο φαινότυπο όσον αφορά τον αριθμό των Β-κυττάρων, προτείνοντας ότι η παρουσία τους συμβάλλει στην έλλειψη της χυμικής ανοσίας. Οι Losi και συν., έπειτα από την ανάλυση αλληλουχίας σε όλο το γονίδιο *TNFRSF13C/BAFFR* σε ασθενείς με CVID και υγιή άτομα, περιέγραψαν τις μεταλλάξεις, που συνοψίζονται στον **Πίνακα 4**. Παρά το γεγονός ότι στο σύνολο των ασθενών οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν ήταν σε ετερόζυγη κατάσταση, η παρουσία τους ωστόσο δεν προκάλεσε κάποια διαταραχή στην έκφραση του BAFFR υποδοχέα [150].

Οι Warnatz και συν., περιέγραψαν πρόσφατα για πρώτη φορά CVID που προκαλείται από BAFFR ανεπάρκεια. Η ανεπάρκεια αυτή οφείλεται σε ομόζυγη έλλειψη 8 αμινοξέων στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης και οδηγεί σε CVID, που χαρακτηρίζεται από χαμηλό αριθμό των Β-κυττάρων στην περιφέρεια και μείωση στον ορό των IgG και IgM ανοσοσφαιρινών, χωρίς όμως αντίστοιχη μείωση της IgA [151]. Παράλληλα, πρόσφατα ανακοινώθηκε από τους Σπελέτα και συν., πως η παρουσία της P21R σε ομόζυγη κατάσταση επηρεάζει την σύνθεση του υποδοχέα με το συνδέτη και πως η συχνότητα του

P21R αλληλίου είναι υψηλότερη σε άτομα με ανεπάρκεια παραγωγής αντισωμάτων συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες [152].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σύμφωνα με τη μελέτη των Polverino και συν, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του BAFFR στον πνεύμονα ασθενών με ΧΑΠ και ιδιαίτερα στα λεμφοζίδια [153]. Ωστόσο, ο ρόλος των μεταλλάξεων-παραλλαγών του *TNFRSF13C* και της σηματοδότησης του BAFFR σε ασθενείς με σαρκοείδωση δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα.

**Πίνακας 4:** Οι μεταλλάξεις του BAFFR γονιδίου.

Θέση	Νουκλεοτίδιο	Πρωτεΐνη	Τμήμα υποδοχέα	Ασθενείς (%)	Υγιείς (%)
Εξώνιο 1	62C>G	Pro21Arg (P21R)	Εξωκυττάριο	10.4	3.5
Ιντρόνιο 2	IVS2-33T>C	-	-	10.4	5.2
Εξώνιο 2	191G>T	Gly64Val (G64V)	Εξωκυττάριο	0	3.5
Εξώνιο 2	192C>T	Gly64Val (G64V)	Εξωκυττάριο	0	3.5
Εξώνιο 3	475C>T	His159Tyr(H159Y)	Ενδοκυττάριο	2.08	1.75



### **3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Ο ρόλος των Β-κυττάρων στην αιτιοπαθογένεια της σαρκοείδωσης αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων της ειδικής ανοσίας TACI και BAFFR στην επιφάνεια των Β-κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών με σαρκοείδωση και αντιστοίχων υγιών μαρτύρων. Επίσης, μελετήθηκαν οι υποπληθυσμοί των Β-κυττάρων και οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων, καθώς και η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών για την περαιτέρω διερεύνηση διαταραχών της χυμικής ανοσίας. Τέλος, εξετάστηκε η παρουσία γενετικών βλαβών-παραλλαγών στο γονίδιο της ειδικής ανοσίας *TNFRSF13B/TACI*, που δεν είχε προηγουμένως μελετηθεί σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

---

## 1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 71 ασθενείς με σαρκοείδωση, οι οποίοι επισκέφθηκαν το Εξωτερικό Ιατρείο Διαμέσων Πνευμονοπαθειών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, καθώς και του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Το σύνολο των ασθενών συμμετείχε στη μοριακή μελέτη, ενώ για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη και την ανοσονεφελομετρία επιλέχθηκαν τυχαία 55 ασθενείς με σαρκοείδωση, οι οποίοι και συμπεριλήφθησαν. Η διάγνωση της σαρκοείδωσης βασίστηκε σε κλινικά, ακτινολογικά και ιστολογικά κριτήρια (μη τυροειδοποιημένα, επιθηλιοειδή κοκκιώματα) και αφού αποκλείστηκαν άλλα κοκκιωματώδη νοσήματα, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των ATS/ERS/WASOG [1]. Κατά την ένταξη στη μελέτη, πραγματοποιήθηκε λεπτομερής καταγραφή του ιστορικού των ασθενών, πλήρης κλινική εξέταση και λειτουργικός έλεγχος της αναπνοής.

Για την ομάδα ελέγχου, συγκεντρώθηκαν περίπου 200 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών, μη-συγγενικών ατόμων του ευρύτερου πληθυσμού της Θεσσαλίας, κάποια από τα οποία προέρχονταν από Κέντρα Ανοικτής Προστασίας Ηλικιωμένων (Κ.Α.Π.Η) Αργυροπουλίου και Δαμασίου, του Νομού Λάρισας και από τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία 55 δείγματα αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (age- και sex-matched) με τους ασθενείς που συμμετείχαν στην ανοσοφαινοτυπική μελέτη και την ανοσονεφελομετρία. Κριτήρια ένταξης υγιών ατόμων στη μελέτη, ήταν η απουσία συμπτωμάτων ή γνωστού ιστορικού αναπνευστικής νόσου, λοίμωξης, νεοπλασίας, ατοπίας ή αυτοάνοσης εκδήλωσης.

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2009 – Μάιος 2011 Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ενημερώθηκαν και έδωσαν ενυπόγραφη

συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Συνθήκη του Ελσίνκι. Από τους ασθενείς με σαρκοείδωση και τους υγιείς μάρτυρες συλλέχθηκε περιφερικό αίμα κατά την ένταξή τους στην μελέτη.

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των υγιών μαρτύρων συνοψίζονται στους

### Πίνακες 5 και 6.

**Πίνακας 5:** *Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων που συμμετείχαν στην ανοσοφαινοτυπική μελέτη και την ανοσονεφελομετρία.*

Μεταβλητή	Ασθενείς	Μάρτυρες
No.	55	55
Ηλικία	53,3±13,1(20-75)	54,9±14,9(20-76)
Φύλο		
Άρρεν (n <sup>a</sup> , %)	21 (38,2)	21(38,2)
Θήλυ (n, %)	34 (61,8)	34(61,8)
Ακτινολογικό στάδιο νόσου		
0, n (%)	2 (3,60)	-
1, n (%)	9 (16,4)	-
2, n (%)	42 (76,4)	-
3, n (%)	2 (3,60)	-
4, n (%)	0 (0,00)	-
Αγωγή με κορτικοστεροειδή per os		
Ναι, n (%)	22(40)	0 (0)
Όχι, n (%)	33(60)	55 (100,0)
Αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή		
Ναι, n (%)	13(23,6)	0 (0)
Όχι, n (%)	42(76,4)	55 (100,0)

<sup>a</sup> n (number), αριθμός ατόμων

**Πίνακας 6:** Δημογραφικά στοιχεία ασθενών που συμμετείχαν στη μοριακή μελέτη.

<b>Μεταβλητή</b>	<b>Ασθενείς</b>
No.	71
Ηλικία	49,9(20-75)
Φύλο	
Άρρεν (n <sup>a</sup> , %)	24 (33,8)
Θήλυ (n, %)	47 (66,2)
Ακτινολογικό στάδιο νόσου	
0, n (%)	2 (2,80)
1, n (%)	13(18,4)
2, n (%)	54 (76,1)
3, n (%)	2 (2,8)
4, n (%)	0 (0,00)
Αγωγή με κορτικοστεροειδή per os ή εισπνεόμενα	
Ναι, n (%)	45(63,4)
Όχι, n (%)	26(36,6)

<sup>a</sup> n (number), αριθμός ατόμων

## 2. ΥΛΙΚΑ

### 2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

#### α) Μονοκλωνικά αντισώματα

Για την κυτταρομετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους **Πίνακες 7 και 8**.

#### β) Λοιπά αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά

Για τις λοιπές διεργασίες της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους **Πίνακες 9 και 10**, αντίστοιχα.

**Πίνακας 7:** Τα ισοτυπικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό ασθενών και μαρτύρων.

mab	Φθορ <sup>a</sup>	Προέλευση	Αριθμός καταλόγου	Ισοτυπικό αντίσωμα για την ανίχνευση:
IgG <sub>2a</sub> -K	PE	eBioscience, USA	12-4321-42	του TACI υποδοχέα
Fab-τμήματα ανοσοσφαιρινών	FITC	Dako, Denmark	X092901	του μορίου IgD
IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter, USA	A07796	του BAFFR υποδοχέα
IgG <sub>1</sub>	PC5	Beckman Coulter, USA	A07798	του μορίου CD27
IgG <sub>1</sub> /IgG <sub>1</sub>	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07794	αντιγόνων σημασμένων με διπλά FITC/PE αντισώματα

<sup>a</sup>Φθοριόχρωμα

**Πίνακας 8:** Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη των επιφανειακών αντιγόνων.

<b>Αντιγόνο</b>	<b>Κλώνος</b>	<b>Φθορ<sup>α</sup></b>	<b>Προέλευση</b>	<b>Αριθμός καταλόγου</b>
<b>CD45</b>	J33	PC5	Beckman Coulter, USA	A07785
<b>CD3</b>	UCHT1	PC5	Beckman Coulter, USA	A07749
<b>CD19</b>	J3-119	FITC PE	Beckman Coulter, USA	A07768 A07769
<b>CD5</b>	BL1a	FITC	Beckman Coulter, USA	A08932
<b>CD27</b>	1A4CD27	PC5	Beckman Coulter, USA	6607107
<b>IgD</b>	<b>ΜΔ<sup>β</sup></b>	FITC	Dako, Denmark	F0059
<b>BAFFR</b>	11C1	PE	BioLegend, USA	316906
<b>TACI</b>	1A1	PE	Abcam, USA	ab5994
<b>CD3/CD4</b>	UCHT1/ 13B8.2	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07733
<b>CD3/CD8</b>	UCHT1/ B9.11	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07734
<b>CD45/CD14</b>	Immu19.2/ RMO52	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07738
<b>CD3/CD19</b>	UCHT1/ J3-119	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07736
<b>CD3/CD16.56</b>	UCHT1/ 3G8, N901 (NKH1)	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07735

Φθοριόχρωμα, <sup>β</sup> ΜΔ, μη διαθέσιμο.

**Πίνακας 9:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους.

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όνομα προϊόντος</b>	<b>Αρ.Καταλόγου</b>	<b>Προέλευση</b>
Αλβουμίνη βοδινού ορού	10x BSA	B9001S	New England Biolabs, USA
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex CardioPhase hsCRP Reagent	OQIY21	Siemens, Germany
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A, Greece
Αραιωτικό διάλυμα	N Diluent D	OUMT65	Siemens, Germany
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, UK
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα PBS	PBS	508002	INOVA Diagnostics, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer,	15581-028	Invitrogen,UK
Διάλυμα πλύσης	Buffer AW1	19081	Qiagen, Germany
Διάλυμα πλύσης	Buffer AW2	19072	Qiagen, Germany
Διάλυμα εκχύλισης	<b>Elution Buffer AE</b>	19077	Qiagen, Germany
Διάλυμα λύσης	Lysis Buffer AL	19075	Qiagen, Germany
Διάλυμα ελέγχου	N/T Protein Control SL/M	OQIO135	Siemens, Germany
Διάλυμα Novex TBE	<b>Novex® TBE Running Buffer (5X)</b>	LC6675	Invitrogen, UK
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, USA
Διάλυμα λύσης	<b>VersaLyse™ Lysing Solution</b>	A09777	Beckman Coulter, USA
Διάλυμα Supplementary	N Supplementary Reagent/Precipitation	OUMU15	Siemens, Germany
Διάλυμα Diluent	N Diluent	OUMT 65	Siemens, Germany
Διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης	<b>N Protein Standard SL</b>	OQIM13	Siemens, Germany
Διάλυμα Tango	<b>10x Buffer Tango</b>	BY5	Fermentas, Germany
Διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης	Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction	X0903	Dako, Denmark
Διάλυμα NEB 2	10xNEBuffer 2 Restriction Endonuclease Buffer	B7002S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα NEB 3	10x NEB Buffer 3 Restriction Endonuclease Buffer	B7003S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα NEB 4	10x NEB Buffer 4 Restriction Endonuclease Buffer	B7004S	New England BioLabs, USA
Διάλυμα REACT 2	RE <sub>ACT</sub> <sup>®</sup> 2	16302-010	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	10bp DNA Ladder	10821-015	Invitrogen, UK



---

**Πίνακας 9: (συνέχεια)**

Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder	12373-031	Invitrogen, UK
Νερό ελεύθερο Ρησών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex IgG4	OPAU003	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex IgG3	OPAV03	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	N AS IgG2	OQXK09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	N AS IgG1	OQXI09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgM	OSAR09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgG	OSAS09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgA	OSAT09	Siemens, Germany
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, UK
Περιοστική ενδονουκλεάση Bve I	Bve I (BspMI) Restriction Enzyme	ER1741	Fermentas, Germany
Περιοστική ενδονουκλεάση Mnl I	Mnl I Restriction Enzyme	R0163L	New England Biolabs, USA
Πολυακρυμίδη	20% TBE Gels 1.0 mm, 15 well	EC63155BOX	Invitrogen, UK
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, UK
Πρωτεϊνάση	Qiagen Protease	19131	Qiagen, Germany
Φορμαλδεΰδη	Formaldehyde, solution 37%	FO0011	Scharlau, Spain
Φυσιολογικός ορός αρουραίου	Normal Rat Serum	24-5555	eBioscience, USA
Χρωστική	<b>10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer</b>	10816-015	Invitrogen, UK
DNA kit	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
PCR kit	Taq PCR Master Mix Kit	201445	Qiagen, Germany

---

**Πίνακας 10:** Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους

<b>Αναλώσιμα</b>	<b>Όνομα προϊόντος</b>	<b>Αρ.Καταλόγου</b>	<b>Προέλευση</b>
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510	Bioline, Israel
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, UK
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125	Nalgene, Denmark
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, 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 πολυστυρενίου 5 mL	FACS tube, EasySep	3520105	Stem Cell Techn, Canada
Σωληνάρια γενικής αίματος	VACUETTE® EDTA tubes	454087	Vacurette, USA
Σωληνάριο ορού	Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST)	367954	BD Vacutainer, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA

## **3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ**

### **3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ**

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση του πρόσθιου (Forward scatter, FS) και του πλάγιου σκεδασμού (Side scatter, SS) των κυττάρων, ώστε να χαρακτηριστεί το μέγεθος και η κοκκίωσή τους, αντίστοιχα. Επίσης, η χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία είναι σημασμένα με φθοριοχρώματα και προσδένονται σε συγκεκριμένους αντιγονικούς καθοριστές στην επιφάνεια των κυττάρων, κατέστησε δυνατό το χαρακτηρισμό συγκεκριμένων πληθυσμών. Στη διαδικασία αυτή, ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων με λύση τους, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός των λευκοκυττάρων.

#### **3.1.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ TAC1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ**

Ο κυτταρομετρικός προσδιορισμός του TAC1 υποδοχέα έγινε με την χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων, μετά από προεργασία κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα, σε ειδικά σωληνάρια πολυστυρενίου τοποθετήθηκαν έως  $10^6$  κύτταρα περιφερικού αίματος και 1mL διαλύματος λύσης VersaLyse. Με την χρήση του VersaLyse εφαρμόστηκε μια γρήγορη και ήπια λύση των ερυθρών, που δεν επηρεάζει την λειτουργία των λεμφοκυττάρων και διατηρεί την ακεραιότητα της κυτταρικής επιφάνειας (απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη των κυττάρων σε κυτταρομετρητή ροής). Ο λόγος που η λύση των ερυθρών καθίσταται απαραίτητη σε όλες τις διαδικασίες της κυτταρομετρίας είναι διότι ο σίδηρος (Fe) της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών φθορίζει δίνοντας μη ειδικό σήμα. Μετά από ανάδευση (vortex) του παρασκευάσματος, ακολούθησε επώαση σε RT για τουλάχιστον 10min, μετά το πέρας

των οποίων το άνω μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1600rpm για 5min με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύματος λύσης. Ακολούθησε μια πλύση με διάλυμα 1xPBS στις 1600rpm για 5min και στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο ορός αρουραίου 3%, στους 4-6°C για 15min, ώστε να παρεμποδιστούν μη ειδικές συνδέσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Έπειτα, προστέθηκαν τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (eBioscience, abcam, Beckman Coulter). Συγκεκριμένα, στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκε το ισοτυπικό αντίσωμα Rat IgG<sub>2a</sub>-PE, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας το αντίσωμα Rat anti-human TACI/CD267-PE. Και στα δύο σωληνάκια χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD19-FITC και CD45-PC5. Ακολούθησε επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι και μια τελευταία έκπλυση με 1xPBS στις 1600rpm για 5min, όπως παραπάνω. Μετά την τελική φυγοκέντρηση, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL 1%FA-PBS, ώστε να γίνει μονιμοποίηση της σύνδεσης των αντισωμάτων. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) με το πρόγραμμα CXP software version 2.0.

### **3.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ BAFFR ΥΠΟΔΟΧΕΑ (BAFFR)**

Για την ανίχνευση του BAFFR υποδοχέα, χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάριο ελέγχου και ένα σωληνάριο δοκιμασίας και τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα. Συγκεκριμένα, στο σωληνάριο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το ισοτυπικό αντίσωμα Rat IgG1-PE, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Rat BAFFR-PE/CD268. Και στα δύο σωληνάκια προστέθηκε το αντίσωμα CD19-FITC και το CD3-PC5. Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν έως 10<sup>6</sup> κύτταρα περιφερικού αίματος, ακολούθησε ανάδευση και επώασή τους για 15min σε RT στο σκοτάδι. Τέλος, έγινε λύση των ερυθροκυττάρων στο

COULTER® TQ-Prep™ Workstation (Beckman Coulter) και ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο.

### **3.1.3 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν σε συνδυασμό με πλήρη ανοσοφαινοτυπική μελέτη των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Αρχικά, προσδιορίστηκε ο αριθμός τους, με αδρή διάκριση των υποπληθυσμών τους στον αιματολογικό αναλυτή MD-II Hematology Analyzer (Beckman/Coulter) και στη συνέχεια, προστέθηκαν τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα στα αντίστοιχα σωληνάρια. Συγκεκριμένα, για τον χαρακτηρισμό των βοηθητικών ( $CD4^+$ ) και των κυτταροτοξικών ( $CD8^+$ ) T-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα, τα αντισώματα CD3-FITC/CD4-PE και CD3-FITC/CD8-PE. Για τον χαρακτηρισμό των μονοκυττάρων και των B-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα, τα αντισώματα CD45-FITC/CD14-PE και CD3-FITC/CD19-PE. Τέλος, με την χρήση των CD3-FITC/CD16.56-PE αντισωμάτων έγινε χαρακτηρισμός των NK-κυττάρων. Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάριο, προστέθηκαν έως  $10^6$  κύτταρα περιφερικού αίματος, ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι και λύση των ερυθροκυττάρων και τέλος τα δείγματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο.

### **3.1.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΠΑΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Για την ανίχνευση παρθένων (naïve), μη μετεστραμμένων (non-switched) και B-κυττάρων μνήμης (memory), χρησιμοποιήθηκαν τα IgD και CD27 μονοκλωνικά αντισώματα. Τους  $IgD^+CD27^-$  πληθυσμούς χαρακτηρίζουν τα παρθένα B-κύτταρα, τους  $IgD^+CD27^+$  χαρακτηρίζουν τα μη μετεστραμμένα (memory-non-switched) B-κύτταρα μνήμης, ενώ τους  $IgD^-CD27^+$  χαρακτηρίζουν τα B-κύτταρα μνήμης, που έχουν υποστεί ισοτυπική μεταστροφή [154]. Αρχικά, σε 2 σωληνάρια RIA τοποθετήθηκαν έως  $10^6$  κύτταρα περιφερικού αίματος, τα οποία εναιωρήθηκαν σε 1mL διαλύματος λύσης VersaLyse για 10min σε RT. Ακολούθησε

φυγοκέντρηση στις 1600rpm για 5min, ενώ μετά το πέρας αυτής τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε 4mL 1xPBS. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1600rpm για 5min και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Negative control Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal) για 20min στους 37°C, ώστε να αποφευχθούν μη ειδικές συνδέσεις. Έπειτα, αφού προστέθηκε και στα δύο σωληνάρια το CD19-PE, στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκαν τα αντισώματα Fab-FITC και το ισοτυπικό IgG1-PC5, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας, τα αντισώματα Rabbit anti-Human IgD-FITC και CD27-PC5. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min στους 4°C και μια τελευταία έκπλυση με 1xPBS στις 1600rpm για 5min, όπως παραπάνω. Μετά την τελική έκπλυση, το ίζημα επαναιώρηθηκε σε 1mL διαλύματος 1%FA-PBS.

Παράλληλα, για την ανίχνευση του CD5<sup>+</sup> υποπληθυσμού των Β-κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν 2 δοκιμαστικά σωληνάρια, όπου στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκε το αντίσωμα IgG1-FITC/IgG1-PE, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας τα αντισώματα CD5-FITC και CD19-PE. Παρόμοια με τις παραπάνω εξωκυττάρειες χρώσεις, ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min σε RT και λύση των ερυθροκυττάρων με 1mL VersaLyse.

### **3.2 ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ**

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM και υποτάξεων της IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), καθώς και προσδιορισμός της CRP. Η νεφελομετρία, είναι μια εξαιρετικά ακριβής μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραπάνω και πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων αντιορών, αφού πρώτα στα δείγματα έγινε αυτόματα αρχική αραιώση με ειδικό διάλυμα (N Diluent D).

Ο νεφελομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα διάφορα βιολογικά υγρά, στηρίζεται στη σχέση της τελευταίας με την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός από τα συμπλέγματα που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης (αντιγόνου) και του προστιθέμενου αντίστοιχου αντισώματος. Συγκεκριμένα, τα συμπλέγματα αυτά, «διασκορπίζουν» μια δέσμη φωτός που διαπερνά το δείγμα προς ανάλυση, όπου η ένταση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αξιολογείται έπειτα από σύγκριση με μια γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνη [155].

Η διαδικασία απομόνωσης ορού, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα τεχνική, περιλάμβανε λήψη περιφερικού αίματος σε ειδικά σωληνάρια και φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 5min, ενώ τα δείγματα ορού που ελήφθησαν, αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Τα δείγματα ορού, έπειτα από την απόψυξή τους και πριν την χρήση τους, παρέμειναν στους 4°C για 2-4h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ειδικά διάφανα σωληνάρια RIA.

Η καμπύλη αναφοράς (reference curve), βάσει της οποίας γίνεται ο νεφελομετρικός προσδιορισμός, σχηματίζεται ως συνάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός ( $I_s$ ) και της γνωστής συγκέντρωσης της υπό εξέταση πρωτεΐνης ( $c$ ) στα πρότυπα διαλύματα (standards). Συγκεκριμένα, η καμπύλη αναφοράς προκύπτει με βαθμονόμηση πολλαπλού-σημείου, έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις μιας πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης (N Protein Standard SL). Μετά τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, γίνεται εσωτερικός έλεγχος ποιότητας με την χρήση των N/T Protein Controls SL/M, τα οποία αναλύονται και εκτιμώνται όπως αναλύονται και τα δείγματα των ασθενών.

### 3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

#### 3.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από άμεσα ληφθέν περιφερικό αίμα, σε σωληνάρια γενικής αίματος με αντιπηκτικό  $K_3EDTA$ , με την χρήση του QiAamp DNA Blood Mini Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Αρχικά, σε ειδικό σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1,5mL, εναποτέθηκαν 20μL Qiagen πρωτεάσης. Σκοπός του ενζύμου αυτού, είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Στο ίδιο σωληνάριο, προστέθηκαν 200μL δείγματος (περιφερικό αίμα) και 200μL διαλύματος λύσης (Buffer AL), το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Qiagen). Μετά από ανάδευση (vortex) του παρασκευάσματος, ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20min και στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL απόλυτης αιθανόλης 96-100%. Το άνω μίγμα, εναποτέθηκε σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column) και φυγοκεντρήθηκε στις 8000rpm για 1min. Ακολούθησαν 2 πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 8000rpm για 1min και 14000rpm για 3min, αντίστοιχα. Τα διαλύματα αυτά μέσω των αλάτων τους, προκαλούν αλλαγή του pH, ώστε να διασφαλίσουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υλικών που πιθανόν να παρεμποδίσουν την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η βελτίωση της ποιότητας του DNA. Έπειτα, αφού προστέθηκαν σε κάθε στήλη 100μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), ακολούθησε επώαση 1min και τελική φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1min. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 50-200ng/μL. Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν μέχρι την χρήση τους σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).



### 3.3.2 PCR ΓΙΑ ΤΙΣ V220A, P251L ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ *TNFRSF13B/TACI*

Η ανίχνευση των P251L και V220A παραλλαγών, οι οποίες είναι και οι συχνότερες γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *TACI* στον Ελληνικό χώρο, έγινε με AS-PCR ακολουθούμενη από RFLP. Με τη συγκεκριμένη τεχνική έγινε αρχικά ενίσχυση τμήματος DNA του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*, στο οποίο εμπεριέχονται οι παραπάνω γενετικές παραλλαγές. Ωστόσο, η αλληλουχία του DNA στη θέση όπου ανιχνεύεται η V220A παραλλαγή, δεν περιελάμβανε θέσεις πέψης για κανένα ένζυμο περιορισμού. Κατά συνέπεια, χρειάστηκε ειδικός σχεδιασμός με στόχο τη δημιουργία αλληλουχίας πέψης από κατάλληλο ένζυμο περιορισμού παρουσία της παραλλαγής. Η συγκεκριμένη τροποποίηση δεν εμπόδιζε τη σύνδεση του εκκινήτη στην αλληλουχία του DNA, δεδομένου ότι δεν αφορά την τελευταία βάση του. Στον Πίνακα 11, παρουσιάζονται οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών του *TACI*.

**Πίνακας 11:** *Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών του TACI. Υπογραμμισμένες φαίνονται οι βάσεις που αντικαταστάθηκαν, ενώ σε παρένθεση οι βάσεις που τοποθετήθηκαν στη θέση τους, ώστε να δημιουργηθεί η αλληλουχία πέψης παρουσία της παραλλαγής.*

Γενετική παραλλαγή	Εκκινήτης	Αλληλουχία εκκινήτη (5'-3')	Μήκος (bp)
V220A & P251L	Πρόσθιος	TACI-33544	ACgCgATggAAgCCggCAgC(A)CCTg
	Οπίσθιος	TACI-33772	CATTTATgCACCTgggCCCCCCTC

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μL και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5mM

MgCl<sub>2</sub>, 62.5μM από κάθε dNTP, 20 pmoles από κάθε εκκινητή (Thermo Fisher Scientific), 0,8u Taq-πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O. Οι συνθήκες των αντιδράσεων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φαίνονται στον **Πίνακα 12**.

**Πίνακας12:** Οι συνθήκες της PCR για την ανίχνευση των V220A και P251L.

Στάδιο	V220A & P251L	
	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30sec
Υβριδισμός (Annealing)	68°C	30sec
Επέκταση (Extension)	72°C	5min
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min
Κύκλοι	30	

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων.

### 3.3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ V220A ΚΑΙ P251L ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA

Για την ανίχνευση της V220A παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Bve* I (BspMI), το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E.coli* που φέρει το *bveIR* γονίδιο, που προέρχεται από το πρωτεοβακτήριο *Brevundimonas vesicularis*. Για την πέψη 6μL του

προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου *Bve* I παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 10xBuffer Tango, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Fermentas).

Αντίστοιχα, για την ανίχνευση της P251L παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Mnl* I, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *MnlI* γονίδιο που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Moraxella nonliquefaciens*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου *Mnl* I παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 2 και 10xBSA. Η χρησιμότητα της BSA πρωτεΐνης έγκειται αφενός στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ενζύμου στα σωληνάρια ή άλλες επιφάνειες (π.χ ρύγχη πιπετών), αφετέρου στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών της αντίδρασης.

Τα παραπάνω ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, οι οποίες φαίνονται στον **Πίνακα 13**.

**Πίνακας 13:** Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των V220A, P251L παραλλαγών και η αλληλουχία που αυτά αναγνωρίζουν. Όπου R: A ή G, Y: C ή T, N: A, G, C ή T.

Γενετική παραλλαγή	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης
V220A	BveI (BspMI)	5'... ACCTGC(N) <sub>4</sub> ... 3' 3'... TGGACG(N) <sub>8</sub> ... 5'
P251L	MnlI	5'... CCTC (N) <sub>7</sub> ... 3' 3'... GGAG (N) <sub>6</sub> ... 5'

Συγκεκριμένα, σε ένα φυσιολογικό δείγμα, ως προς την V220A παραλλαγή, το ένζυμο *Bve* I αναγνώρισε μια φορά την αλληλουχία, η οποία υπήρχε φυσιολογικά στο τμήμα που ενισχύεται, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα προϊόντα πέψης μήκους 192bp και 60bp. Σε ένα

ετερόζυγο δείγμα, το ένζυμο εκτός από την καθορισμένη αλληλουχία αναγνώρισε και αυτή που δημιουργήθηκε στην θέση του πρόσθιου εκκινήτη παρουσία του V220A, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα προϊόντα πέψης μήκους 192bp, 60bp, 31bp και 29bp. Τέλος, σε ένα ομόζυγο δείγμα προέκυψαν τα προϊόντα πέψης 192bp, 31bp και 29bp. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 12-24h σε υδατόλουτρο. Τα αποτελέσματα έγιναν ορατά έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε προπαρασκευασμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης 20% TBE χρησιμοποιώντας κάθετη συσκευή XCell SureLock Mini-Cell. Οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι ηλεκτροφορήσεις των δειγμάτων ήταν 200V και 10-18mA για 2h. Τέλος, η σήμανση των δεσμών στην πηκτή έγινε έπειτα από ανάδευση της για 30min σε διάλυμα Novex TBE που περιείχε βρωμιούχο αιθύδιο σε συγκέντρωση 0,5μg/mL. Η φωτογράφιση της πηκτής έγινε υπό υπεριώδες φως, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μοριακών βαρών τον 10bp DNA Ladder.

Αναφορικά με την P251L, σε ένα φυσιολογικό άτομο, δεν υπήρχε η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο *Mnl* I, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα μοναδικό προϊόν μήκους 252bp. Σε ένα ετερόζυγο, προκύπτει το προϊόν μήκους 252bp και δύο επιπρόσθετων τμημάτων 134bp και 118bp. Τέλος, σε ένα ομόζυγο, προκύπτουν τα προϊόντα πέψης 134bp και 118bp. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε στους 37°C για περίπου 2h, ενώ τα αποτελέσματα έγιναν ορατά σε πηκτή αγαρόζης 2% TBE. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση ήταν 120V και 400mA, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μοριακών βαρών τον E-Gel Low Range Ladder (100-2000bp).

### 3.3.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TAC1*

Πραγματοποιήθηκε αρχικά ενίσχυση των 5 εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing). Οι εκκινητές των αντιδράσεων σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Oligo-6 software (NBI, Plymouth, MN, USA) και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14**, ενώ οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 15**. Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μl και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 62.5μM από κάθε dNTP, 20pmoles από κάθε εκκινητή (Thermo Fisher Scientific), 0.8u Taq-πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

**Πίνακας 14:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR.

<b>Εξώνια</b>	<b>Εκκινητές</b>	<b>Αλληλουχία</b>
1	Πρόσθιος	5' TGCCCTTCATATAGCCATTG 3'
	Οπίσθιος	5' AGTCATTTTGCCTTTCATCTTT 3'
2	Πρόσθιος	5' GCAACAGAGATGACTTTATGCATTGA 3'
	Οπίσθιος	5' CTGCATCTAAGTGAACCTCCAA 3'
3	Πρόσθιος	5' AAGCCCTTCTATAAAACCACATT 3'
	Οπίσθιος	5' TGTCTCCCTGTTGGTCAA 3'
4	Πρόσθιος	5' TGGGGGATATTCCTTTTGGTC 3'
	Οπίσθιος	5' TCTAGAATTAGGCCTTGGAGATGTT 3'
5	Πρόσθιος	5' GTGTATGAAAGGCAATGGAGAGG 3'
	Οπίσθιος	5' AGAATGCTGGCCCATTAAGATGAT 3'

Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονταν ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν από διάφορες προσμίξεις με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (QIAGEN, QIAquick gel purification kit). Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Αναλυτικότερα, σε πρώτη φάση προστέθηκε σε κάθε προϊόν PCR που προοριζόταν για καθαρισμό, διάλυμα (PBI buffer) σε ποσότητα τρεις φορές μεγαλύτερη από τον αρχικό όγκο του προϊόντος PCR. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIAquick column) η οποία περιέχει μεμβράνη, έτσι ώστε να γίνει προσρόφηση του DNA μέσω του διαλύματος PBI το οποίο εξασφαλίζει την απαιτούμενη συγκέντρωση αλάτων και pH. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 10000 rcf για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, ακολούθησε πλύση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αιθανόλη (PE buffer) και φυγοκέντρηση στις 10000 rcf για 1 min. Ακολούθησε τρίτη φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν αιθανόλης στα τοιχώματα της στήλης. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο φυγοκέντρησης 1,5ml, προστέθηκαν 35μl διαλύματος εκχύλισης (EB buffer), παρέμεινε για 1 min σε RT και πραγματοποιήθηκε τελική φυγοκέντρηση στις 10.000 rcf για 1 λεπτό.

Η αλληλούχισή τους που ακολούθησε, απαιτούσε τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator DNA sequencing kit) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**Πίνακας 15:** Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR.

<b>Εξώνια</b>	<b>Συνθήκες</b>
1	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 62°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (31 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
2	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 64°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (30 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
3	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 62°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (31 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
4	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 60°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (35 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
5	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 55°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (30 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min



### 3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Προκειμένου να συγκριθούν οι συχνότητες των αλληλίων μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων, χρησιμοποιήθηκε η  $\chi^2$  (*chi-square*) ανάλυση. Όπου χρειάστηκε, χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος Fisher. Η αναζήτηση συσχέτισης ανάμεσα στη σαρκοείδωση και την παρουσία των παραλλαγών που εξετάστηκαν, έγινε με τη χρήση της μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης (*univariate logistic regression*). Κατά τον ίδιο τρόπο διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων της παρουσίας των παραλλαγών και με άλλες μεταβλητές. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (*odds ratio, OR*) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (*confidence interval, CI*). Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε μια απόκλιση όταν  $p < 0,05$ . Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία *U* των Mann–Whitney, προκειμένου να συγκριθούν οι συνεχείς μεταβλητές. Τέλος, αναζητήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης (*correlation coefficient r*) κατά Spearman. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της 13<sup>ης</sup> έκδοσης του Στατιστικού Πακέτου για τις Κοινωνικές Επιστήμες (*Statistical Package for the Social Sciences 10, SPSS 10, Chicago, IL, USA*).

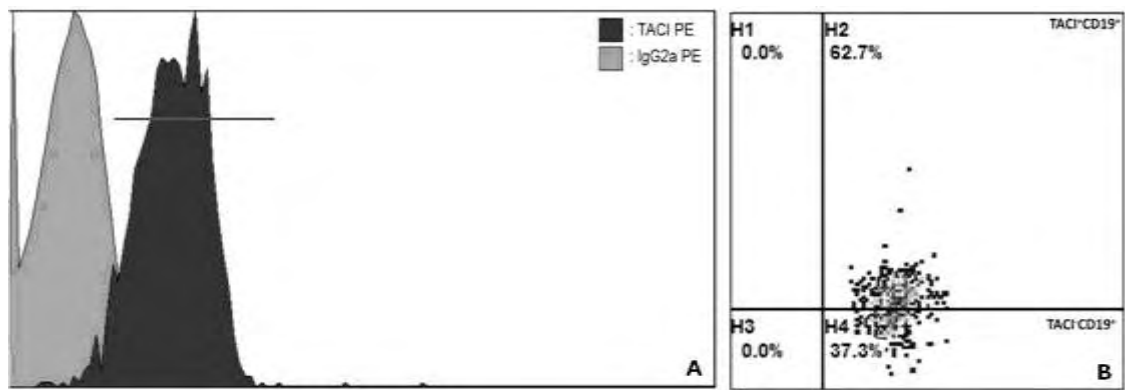
## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

---

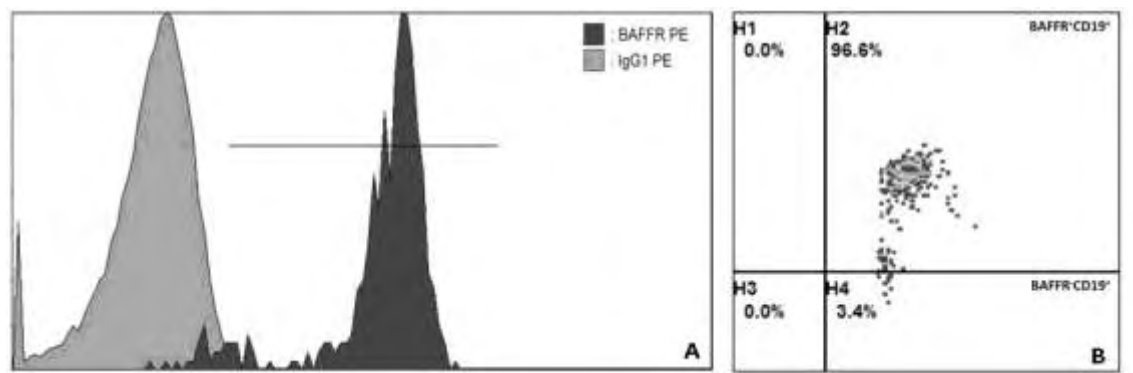
---

#### 4.1 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TACI ΚΑΙ BAFFR

Ένα από τα ερωτήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR σε ασθενείς με σαρκοείδωση και υγιείς εθελοντές. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα πειραμάτων κατά την κυτταρομετρική ανάλυση των υποδοχέων TACI και BAFFR (Εικόνες 9 και 10).



**Εικόνα 9:** Α. Ιστόγραμμα του TACI υποδοχέα (TACI-PE) συγκριτικά με το ισotypικό αντίσωμα (IgG2a-PE). Β. στικτόγραμμα του TACI υποδοχέα στα B-κύτταρα (CD19<sup>+</sup>).



**Εικόνα 10:** Α. Ιστόγραμμα του του BAFF-R (BAFFR-PE) συγκριτικά με το ισotypικό αντίσωμα (IgG1-PE). Β. Στικτόγραμμα του BAFFR υποδοχέα στα B-κύτταρα (CD19<sup>+</sup>).

Η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με σαρκοείδωση και των υγιών εθελοντών (**Πίνακας 16**). Επιπρόσθετα, η έκφραση των υποδοχέων δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των ασθενών με αυξημένες τιμές ρευματοειδούς παράγοντα και των ασθενών με φυσιολογικές τιμές ρευματοειδούς παράγοντα ( $26,6 \pm 13,1$  vs  $25,9 \pm 19,1$ ,  $p=0,519$  και  $99,4 \pm 1,2$  vs  $99,8 \pm 0,5$ ,  $p=0,076$ , αντίστοιχα), ούτε μεταξύ των ασθενών με αυξημένες τιμές ANA και χαμηλές τιμές ANA ( $25,9 \pm 17,8$  vs  $26 \pm 19,2$ ,  $p=0,919$  και  $99,8 \pm 0,6$  vs  $99,7 \pm 0,7$ ,  $p=0,326$ , αντίστοιχα)

**Πίνακας 16:** Η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR, στους ασθενείς με σαρκοείδωση και τους υγιείς εθελοντές.

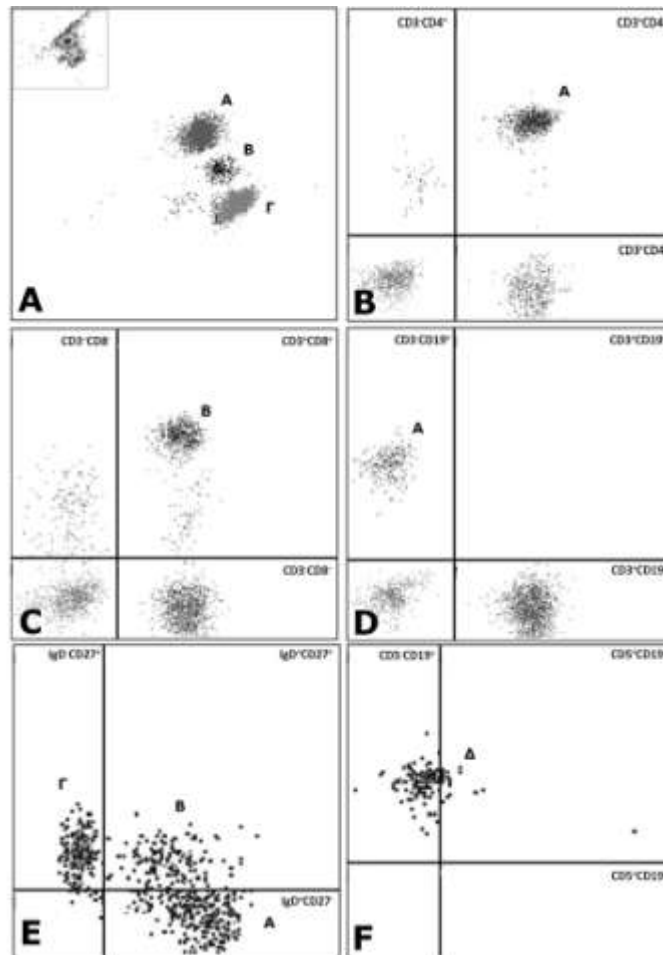
	<b>Ασθενείς με σαρκοείδωση (n=55)</b>	<b>Μάρτυρες (n=55)</b>	<b>P</b>
<b>TACI (%)</b>	25,98±18,27	25,92±12,74	0,433
<b>TACI (MFI)</b>	1,18±0,96	1,16±0,68	0,907
<b>BAFFR (%)</b>	99,78±0,67	99,76±0,41	0,231
<b>BAFFR (MFI)</b>	11,3±6,26	12,1±4,31	0,228

## 4.2 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα πειραμάτων κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών και υγείων εθελοντών (**Εικόνα 11**).

Οι ασθενείς με σαρκοείδωση εμφάνιζαν χαμηλότερες τιμές T- και B-κυττάρων συγκριτικά με τους υγείς εθελοντές (**Πίνακας 14**). Πιο συγκεκριμένα, ο απόλυτος αριθμός των B-κυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένος στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγείς εθελοντές.

Προκειμένου να εκτιμήσουμε τους υποπληθυσμούς των B-κυττάρων, συγκρίναμε τους απόλυτους αριθμούς, καθώς και τα ποσοστά των παρθένων και των μνημονικών B-κυττάρων. Οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά των μνημονικών B-κυττάρων που έχουν ( $CD19^+CD27^+IgD^-$ ) ή δεν έχουν μετέλθει ιστοτυπική μεταστροφή ( $CD19^+CD27^+IgD^+$ ) βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα, ενώ η συχνότητα των παρθένων B-κυττάρων ( $CD19^+CD27^-IgD^+$ ) βρέθηκε σημαντικά αυξημένη (**Πίνακας 17**). Κατατάσσοντας τους ασθενείς σε δύο ομάδες, ανάλογα με το αν λάμβαναν θεραπεία με κορτικοειδή ή όχι, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους υποπληθυσμούς των B-κυττάρων.



**Εικόνα 11:** (A). Στικτόγραμμα στο οποίο διακρίνονται οι τρεις πληθυσμοί των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, A. πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, B. μονοκύτταρα και Γ. λεμφοκύτταρα. (B, C). Στικτογράμματα στα οποία διακρίνονται υποπληθυσμοί των T-κυττάρων A. βοηθητικά, B. κυτταροτοξικά T-κύτταρα. (D). Στικτογράμμα στο οποίο διακρίνονται τα A. B-κύτταρα ( $CD19^+$ ). (E, F). Στικτογράμματα στα οποία απεικονίζονται υποπληθυσμοί των B-κυττάρων. A. Παρθένα B-κύτταρα ( $IgD^+CD27^-$ ), B. Μη μετεστραμμένα B-κύτταρα μνήμης ( $IgD^+CD27^+$ ), Γ. B-κύτταρα μνήμης ( $IgD^-CD27^+$ ), Δ. B-1 κύτταρα ( $CD5^+CD19^+$ ).

**Πίνακας 17:** Τα αποτελέσματα του ανοσοφαινοτυπικού χαρακτηρισμού κυττάρων του περιφερικού αίματος και υποπληθυσμών των Β-κυττάρων στους ασθενείς με σαρκοείδωση και τους υγιείς εθελοντές.

	Ασθενείς (n=55)	Μάρτυρες (n=55)	P
Λευκοκύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	7,82 $\pm$ 3,23	6,98 $\pm$ 1,90	0,404
Λεμφοκύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>1,79<math>\pm</math>0,98</b>	<b>2,36<math>\pm</math>0,65</b>	<b>&lt;0,001</b>
Μονοκύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,50<math>\pm</math>0,22</b>	<b>0,38<math>\pm</math>0,14</b>	<b>&lt;0,001</b>
Ουδετερόφιλα ( $\times 10^9/L$ )	5,07 $\pm$ 3,14	3,95 $\pm$ 1,63	0,148
T-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>1,16<math>\pm</math>0,77</b>	<b>1,69<math>\pm</math>0,53</b>	<b>&lt;0,001</b>
Βοηθητικά T-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,69<math>\pm</math>0,57</b>	<b>1,09<math>\pm</math>0,39</b>	<b>&lt;0,001</b>
Κυτταροτοξικά T-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,41<math>\pm</math>0,27</b>	<b>0,54<math>\pm</math>0,19</b>	<b>0,002</b>
Λόγος CD4/CD8	2,29 $\pm$ 2,98	2,10 $\pm$ 0,75	0,050
B-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,21<math>\pm</math>0,14</b>	<b>0,28<math>\pm</math>0,14</b>	<b>0,006</b>
Υποπληθυσμοί των Β-κυττάρων			
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> (%)	<b>73,6<math>\pm</math>14,9</b>	<b>62,66<math>\pm</math>14,8</b>	<b>&lt;0,001</b>
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> ( $\times 10^9/L$ )	0,16 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,11	0,243
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (%)	<b>7,6<math>\pm</math>9,9</b>	<b>13,3<math>\pm</math>10,5</b>	<b>&lt;0,001</b>
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,13<math>\pm</math>0,10</b>	<b>0,37<math>\pm</math>0,32</b>	<b>&lt;0,001</b>
IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> (%)	<b>15,7<math>\pm</math>12,3</b>	<b>19,6<math>\pm</math>9,3</b>	<b>0,005</b>
IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,33<math>\pm</math>0,42</b>	<b>0,54<math>\pm</math>0,37</b>	<b>&lt;0,001</b>
NK-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,26<math>\pm</math>0,18</b>	<b>0,38<math>\pm</math>0,23</b>	<b>0,003</b>

### 4.3 ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ- ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Οι συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών του ορού μεταξύ των ασθενών και των υγιών εθελοντών αναγράφονται στον **Πίνακα 18**. Τα επίπεδα της IgM στον ορό των ασθενών με σαρκοείδωση ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Οι συγκεντρώσεις των IgA, IgG και των υποτάξεων IgG στον ορό δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων. Η μελέτη των ανοσοσφαιρινών του ορού ανέδειξε μια ασθενή 71 ετών η οποία εμφάνιζε μη μετρήσιμες τιμές IgG4, ωστόσο η μοριακή μελέτη του *TNFRSF13B/TACI* δεν ανέδειξε μεταλλάξεις του γονιδίου, όπως έχει περιγραφεί [156]. Η ασθενής, λόγω πνευμονικής και οφθαλμολογικής προσβολής κατά τη διάγνωση (πριν από 5 έτη), έλαβε κορτικοστεροειδή με αποτέλεσμα την ύφεση της νόσου.

**Πίνακας 18:** Η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών σε ασθενείς με σαρκοείδωση και σε υγιείς εθελοντές.

<b>Ανοσοσφαιρίνη</b> (mg/dL)	<b>Ασθενείς</b>	<b>Μάρτυρες</b>	<b>P</b>
IgG	1095±254,6	1149±218,3	0,216
IgM	127,5±71,1	100,3±50,6	0,031
IgA	236±96,6	222±91,3	0,626
IgG1	719,9±159,9	696,3±165,8	0,417
IgG2	350±122	377±123	0,331
IgG3	43,87±22,1	47,85±25,5	0,468
IgG4	76±81,8	77,4±75,6	0,925



#### 4.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του TACI και του BAFFR και της παρουσίας σ.Löfgren, του ακτινολογικού σταδίου της νόσου κατά τη διάγνωση, του λειτουργικού ελέγχου της αναπνοής, της παρουσίας αυτοανοσίας, των υποτροπών ( $p>0.05$  σε όλες τις περιπτώσεις). Περαιτέρω ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του TACI και του BAFFR και του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων, των T-κυττάρων (και των υποπληθυσμών αυτών), των B-κυττάρων (και των υποπληθυσμών αυτών), των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στο περιφερικό αίμα.

Οι ασθενείς με σαρκοείδωση, οι οποίοι είχαν δερματική προσβολή από τη νόσο, εμφάνιζαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα IgG1 ορού συγκριτικά με τους ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν δερματική προσβολή (μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση:  $636 \pm 130$  mg/dL έναντι  $754 \pm 160$  mg/dL,  $p=0,048$ ), ανεξάρτητα από το αν λάμβαναν αγωγή με κορτικοειδή (στους ασθενείς οι οποίοι δεν λάμβαναν κορτικοειδή:  $586 \pm 166$  mg/dL έναντι  $880 \pm 125$  mg/dL,  $p=0,025$ ).

Οκτώ ασθενείς (15%), συμπεριλαμβανομένου και ενός ασθενούς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, εμφάνιζαν αυξημένες τιμές ρευματοειδούς παράγοντα ενώ 5 ασθενείς εμφάνιζαν θετικά ANA (τίτλος  $>1:320$ ). Όλοι οι ασθενείς με θετικά ANA και 7 από τους 8 ασθενείς (87,5%) με αυξημένες τιμές ρευματοειδούς παράγοντα ήταν γυναίκες, ενώ κανείς δεν είχε σ.Löfgren ούτε οφθαλμική προσβολή.

## 4.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

### 4.5.1 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TAC1* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Από την ενίσχυση του γονιδίου *TNFRSF13B/TAC1* και την αλληλούχιση των 5 εξωνίων καθώς και των προσκείμενων σε αυτά ιντρονικών αλληλουχιών (εσώνια), ανιχνεύθηκαν αρκετές κοινές πολυμορφικές παραλλαγές που αφορούν συνώνυμους, μη συνώνυμους και ιντρονικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), καθώς και 2 μεταλλάξεις. Η συχνότητα των πολυμορφικών αλληλίων που παρατηρήθηκε στους ασθενείς της μελέτης, περιγράφεται στον **Πίνακα 19**. Οι συχνότητες που παρατηρήθηκαν είναι σε συμφωνία με τις συχνότητες που παρατηρήθηκαν σε προηγούμενη μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό με ανεπάρκεια αντισωμάτων [156].

**Πίνακας 19.** Συχνότητα αλληλίων (%) του γονιδίου *TNFRSF13B/TAC1* σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

Μη συνώνυμοι SNPs		Συνώνυμοι SNPs			Ιντρονικοί SNPs		
V220A	P251L	27T	97P	277S	g24625A >C	g.33402T >G	g.33482T >C
rs56063729	rs34562254	rs8072293	rs35062843	rs11078355	rs2274892	rs11652843	rs11652811
3,52	16,9	71,83	3,52	43,66	48,49	29,58	29,58

Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι συχνότητες των πολυμορφισμών P251L (rs34562254) και V220A (rs56063729), των σιωπηλών μεταλλάξεων 27T (rs8072293), 97P (rs35062843) και 277S (rs11078355). Για τον πολυμορφισμό P251L, από τους 71 ασθενείς με σαρκοείδωση, οι

22 ήταν ετερόζυγοι και ένας ήταν ομόζυγος με συχνότητα αλληλίου 16,91%. Για τον πολυμορφισμό V220A, 5 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι με συχνότητα αλληλίου 3,52%, ενώ 2 ασθενείς ήταν διπλά ετερόζυγοι και για τους 2 πολυμορφισμούς.

Επίσης, ανιχνεύθηκαν 2 μεταλλάξεις σε 2 ασθενείς με σαρκοείδωση. Η πρώτη μετάλλαξη παρατηρήθηκε σε άνδρα ασθενή 42 ετών, ο οποίος ήταν ετερόζυγος για τη μετάλλαξη E36K (g.24550G>A). Στην περίπτωση αυτή, το κωδικόνιο GAA μετατρέπεται σε AAA λόγω σημειακής παρερμηνεύσιμης (missense) μετάλλαξης G>A με αποτέλεσμα το 36<sup>ο</sup> αμινοξύ της πρωτεΐνης TAC1 μετατρέπεται από γλουταμινικό οξύ (E) σε λυσίνη (K). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει περιγραφεί και είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων SNPs (rs143099385) με εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό (<0,0001)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Έχοντας υπόψιν ότι δεν έχουν περιγραφεί λειτουργικές μελέτες για αυτή την αλλαγή, έγιναν αναλύσεις βιοπληροφορικής [162] χρησιμοποιώντας δύο προγράμματα, το PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) και το SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), ώστε να γίνει πρόβλεψη της επίδρασης της μετάλλαξης στη δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης. Και τα δύο υπολογιστικά μοντέλα υπέδειξαν ότι η μετάλλαξη E36K είναι επιβλαβής ή και καταστροφική για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.(PolyPhen2 ανάλυση με score 0,995, ευαισθησία: 0,68, ειδικότητα: 0,97 και η SIFT ανάλυση με score <0,01 αντίστοιχα).

Από το ιστορικό του ασθενούς δεν προέκυπταν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, αυτοάνοσα νοσήματα, ούτε οικογενειακό ιστορικό ανοσοανεπάρκειας. Ο ασθενής εμφάνιζε φυσιολογικά επίπεδα ανοσοσφαιρινών στον ορό, συμπεριλαμβανομένου και των υποτάξεων, και φυσιολογικά επίπεδα αντι-PCP (έναντι του πολυσακχαριδικού καψιδίου του πνευμονιοκόκκου) αντισωμάτων. Η διάγνωση της σαρκοείδωσης πραγματοποιήθηκε 2 χρόνια

πριν την ένταξη στη μελέτη, σε ηλικία 40 ετών και η νόσος κατά τη διάγνωση ήταν ακτινολογικού σταδίου II, ενώ εμφάνιζε προσβολή και του δέρματος. Ο ασθενής έλαβε από του στόματος κορτικοστεροειδή με αποτέλεσμα την ύφεση της νόσου, ενώ κατά την ένταξη στη μελέτη δεν λάμβανε κάποια θεραπεία.

Η δεύτερη μετάλλαξη παρατηρήθηκε σε γυναίκα ασθενή 60 ετών και ήταν η μετάλλαξη R202H (g.36737G>A). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το κωδικόνιο CGT μετατρέπεται σε CAT λόγω σημειακής παρερμηνεύσιμης (missense) μετάλλαξης G>A με αποτέλεσμα το 202<sup>ο</sup> αμινοξύ της πρωτεΐνης TACI μετατρέπεται από αργινίνη(R) σε ιστιδίνη (H). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει περιγραφεί, είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων SNPs (rs104894649) και παρατηρείται σε συχνότητα 0,001-0,003 στο γενικό πληθυσμό (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Όσον αφορά την επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, δεν φαίνεται να σχετίζεται με απώλεια λειτουργίας και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη TACI συμπεριφέρεται σαν τη φυσιολογική όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης του συνδέτη, αλλά και της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB [157].

Η ασθενής εμφάνιζε από το ιστορικό της υπερπρολακτιναιμία και υποθυροειδισμό. Η διάγνωση της σαρκοειδωσης πραγματοποιήθηκε 8 έτη πριν από την ένταξη στη μελέτη και το ακτινολογικό στάδιο της νόσου ήταν III, ενώ έλαβε από του στόματος κορτικοστεροειδή με αποτέλεσμα την ύφεση της νόσου. Επιπλέον, η ασθενής ανέφερε ιστορικό υποτροπιάζουσων λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού (υποτροπιάζουσες ιγμορίτιδες) για 10 έτη πριν από τη διάγνωση της σαρκοειδωσης και οι οποίες αντιμετωπιζόταν με αντιβιοτική αγωγή. Ενδιαφέρον παρουσίαζε το γεγονός ότι κατά την ένταξη στη μελέτη, η ασθενής εμφάνιζε επιλεκτική IgG4 ανεπάρκεια (sIgG4D) με σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IgG4 στον ορό. Η

μοριακή ανάλυση του γονιδίου *TACI* σε μέλη της οικογένειας ανέδειξε ότι ο υιός της, ηλικίας 34 ετών, έφερε επίσης τη μετάλλαξη R202H, ωστόσο εμφάνιζε υψηλά επίπεδα IgG4 στον ορό (354mg/dL, Φ.Τ=8-140) ενώ ο εγγονός της, ο οποίος ήταν 6 ετών, ήταν επίσης ετερόζυγος για τη μετάλλαξη και εμφάνιζε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IgG4 στον ορό, ενώ η μητέρα του έπασχε από CVID. Κανένας από τους συγγενείς που είχαν την R202H μετάλλαξη (υιός και εγγονός) δεν έχει παρουσιάσει υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, ούτε αυτοανοσία, μέχρι τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη.

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

---

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων και οι συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών στους ασθενείς με σαρκοείδωση και στους υγιείς εθελοντές. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR στα B-κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με σαρκοείδωση και υγιείς εθελοντές. Από όσο γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία μελετά την έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι οι ασθενείς με σαρκοείδωση εμφανίζουν διαταραχή στην ομοίωση των B-κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με τη νόσο παρουσιάζουν σημαντική μείωση των B-κυττάρων στο περιφερικό αίμα και αυτό αφορά κυρίως τα B-κύτταρα μνήμης. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των παρθένων B-κυττάρων στο περιφερικό αίμα, καθώς και αύξηση των επιπέδων των IgM ανοσοσφαιρινών. Τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής της χυμικής ανοσίας στην παθογένεια της νόσου.

Ο ρόλος της χυμικής ανοσίας στην παθογένεια της σαρκοείδωσης έχει απασχολήσει τη βιβλιογραφία στο παρελθόν. Οι Fasel και συν. έδειξαν ότι οι ασθενείς με σαρκοείδωση παρουσιάζουν πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία, όμως το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από άλλους ερευνητές [58,158,159]. Έχει, επίσης, διαπιστωθεί από προηγούμενες μελέτες ότι η σαρκοείδωση συνδυάζεται με αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων, καθώς και με την παρουσία κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων [57]. Τέλος, δημοσιευμένες μελέτες αναφέρονται σε διαταραχές στη διαφοροποίηση των B-κυττάρων σε ασθενείς με τη νόσο [58]. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών σε Έλληνες ασθενείς με σαρκοείδωση και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της IgM ανοσοσφαιρίνης, εύρημα το οποίο διαφοροποιούσε τους

ασθενείς από την ομάδα των υγιών εθελοντών. Πρέπει να τονίσουμε εδώ ότι η ομάδα των ασθενών δεν παρουσίαζε διαφορά στα επίπεδα των IgG ανοσοσφαιρινών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα της μελέτης μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες [58].

Γνωρίζουμε ότι τα T-κύτταρα και τα μακροφάγα παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην παθογένεια της σαρκοείδωσης. Η διαδικασία σχηματισμού των κοκκιωμάτων, το βασικό ιστολογικό γνώρισμα της σαρκοείδωσης, χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων, τα οποία μαζί με τα επιθηλιοειδή κύτταρα σχηματίζουν το κέντρο των κοκκιωμάτων και περιβάλλονται από ινοβλάστες, B-κύτταρα και CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα [2].

Παρόλο που η συμμετοχή της κυτταρικής ανοσίας είναι αποδεδειγμένη, πολλές παρατηρήσεις υποδηλώνουν διαταραγμένες απαντήσεις των B-κυττάρων στη σαρκοείδωση. Αυτές αφορούν κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα, υπεργαμμασφαιριναιμία, παραγωγή αυτοαντισωμάτων, κυτταρική ανέργεια και μειωμένες συχνότητες κυκλοφορούντων CD27<sup>+</sup> μνημονικών B-κυττάρων [63,57,159,58]. Επιπλέον, θεραπείες εξάλειψης των B-κυττάρων με το χειμερινό αντι-CD20 αντίσωμα ριτουξιμάμπη επιφέρει κλινική βελτίωση σε ασθενείς με σαρκοείδωση [68,69,70,71]. Η συμμετοχή των B-κυττάρων έχει αναφερθεί και σε άλλες κοκκιωματώδεις νόσους. Στην κοκκιωματώδη αγγειίτιδα, τα B-κύτταρα ανευρίσκονται σε βλάβες και η θεραπεία εξάλειψης των B-κυττάρων είναι πολύ αποτελεσματική [160].

Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν το εύρημα της μελέτης σχετικά με την παρουσία μειωμένου αριθμού B-κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με σαρκοείδωση [57]. Μελετώντας τους υποπληθυσμούς των B-κυττάρων, οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά των μνημονικών B-κυττάρων που έχουν (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) ή δεν έχουν μετέλθει ιστοτυπική μεταστροφή (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα, ενώ η συχνότητα των



παρθένων Β-κυττάρων (CD19<sup>+</sup>CD27IgD<sup>+</sup>) βρέθηκε σημαντικά αυξημένη, υποδηλώνοντας διαταραχή του Β-κυτταρικού πληθυσμού στη σαρκοείδωση. Τα ευρήματά μας, σε συνδυασμό με παρόμοια ευρήματα άλλων μελετών [62,63], ενισχύουν την άποψη ότι διαταραγμένη ομοιόσταση των Β-κυττάρων συμμετέχει στην παθογένεια της σαρκοείδωσης. Πρέπει, ωστόσο, να τονιστεί ότι στη μελέτη των Saussine και συν. οι ασθενείς με σαρκοείδωση χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση την ενεργότητα της νόσου. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς με ενεργό νόσο λάμβαναν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Στην παρούσα μελέτη έγινε διαχωρισμός των ασθενών με κριτήριο τη λήψη ή όχι κορτικοστεροειδών. Ελεύθεροι κορτικοστεροειδών θεωρήθηκαν οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει κορτικοστεροειδή τους τελευταίους 6 μήνες πριν από την ένταξη στη μελέτη. Κανείς από τους ασθενείς της μελέτης δεν λάμβανε άλλη ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Σκοπός του παραπάνω διαχωρισμού ήταν να αποκλειστεί η επίδραση των κορτικοστεροειδών στο φαινότυπο των Β-κυττάρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι και στις δύο ομάδες ο αριθμός των μνημονικών Β-κυττάρων ήταν μειωμένος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαταραχή στην ομοιόσταση των Β-κυττάρων συνδυάζεται πιθανόν με την παθογένεια της νόσου και δεν είναι αποτέλεσμα της δράσης των κορτικοστεροειδών.

Η ωρίμανση και η επιβίωση των Β-κυττάρων επηρεάζεται από τα επίπεδα των πρωτεϊνικών μορίων BAFF και APRIL. Τα Β-κύτταρα εκφράζουν 3 υποδοχείς για τον BAFF: τον BAFFR, τον TACI και τον BCMA. Από αυτούς τους 3 υποδοχείς, ο TACI και ο BCMA συνδέονται επίσης και με τον APRIL. Ο BAFFR είναι ο υποδοχέας που σηματοδοτεί την ωρίμανση και την επιβίωση των παρθένων Β-κυττάρων. Η υπέρμετρη παραγωγή του BAFF σε BAFF διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρών αυτοάνοσων νοσημάτων, που προσομοιάζουν με τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο και το σ.Sjögren. Επίσης, η

αύξηση των επιπέδων του BAFF στον ορό ασθενών συσχετίζεται με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων σαν αποτέλεσμα της μειωμένης επιβίωσης των αυτο-αντιδραστικών Β-κυττάρων.

Οι Saussine και συν. έδειξαν ότι τα επίπεδα του BAFF ανευρίσκονται αυξημένα στον ορό ασθενών με ενεργό σαρκοείδωση και συσχετίζονται με υπεργαμμασφαιριναιμία [62]. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η έκφραση των δύο υποδοχέων του BAFF, συγκεκριμένα των υποδοχέων BAFFR και TACI, στα περιφερικά Β-κύτταρα. Καμία διαφορά στην έκφραση των δύο αυτών υποδοχέων δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ των ασθενών με σαρκοείδωση και της ομάδας ελέγχου. Παρομοίως, οι Lavie και συν. δεν ανέδειξαν αυξημένη έκφραση του BAFF στους χειλικούς σιελογόνους αδένες δύο ασθενών με σαρκοείδωση [161].

Ο TACI εκφράζεται κυρίως στα Β-κύτταρα και ειδικά στα ενεργοποιημένα Β-κύτταρα. Όμως, είναι δυνατόν να εκφράζεται και από έναν μικρό αριθμό μιας υποομάδας Τ-κυττάρων μετά από ενεργοποίηση. Επίσης, φαίνεται ότι ο TACI εκφράζεται και από τα ανθρώπινα μακροφάγα και επηρεάζει την επιβίωσή τους. Ο ρόλος του TACI είναι διπλός: ένας θετικός, που οδηγεί σε ανοσολογική απάντηση ανεξάρτητη από τα Τ-κύτταρα και ένας αρνητικός, που μειώνει την ενεργοποίηση και την επέκταση των Β-κυττάρων. Η έκφραση του TACI συνδέεται στενά με την ενεργοποίηση των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας στα Β-κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* συνδέονται αιτιολογικά με την CVID [110,111]. Αργότερα όμως, το εύρημα αυτό αναθεωρήθηκε, καθώς φάνηκε ότι αυτές οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TACI*, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως πολυμορφισμοί, ανευρίσκονται και σε υγιή άτομα [117]. Είναι πιθανόν ότι οι παραπάνω μεταλλάξεις τροποποιούν τον φαινότυπο της CVID. Όμως, σε πειραματόζωα που δεν εκφράζουν TACI, παρατηρείται υπεργαμμασφαιριναιμία, ανάπτυξη

αυτοαντισωμάτων και πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων που μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη λεμφώματος. Με βάση τα προηγούμενα μελετήσαμε την έκφραση του μορίου TACI στα περιφερικά B-κύτταρα, που όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, δε βρέθηκε να διαφέρει από αυτή που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου.

Εξ όσων γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που αναλύεται ο επιπολασμός παραλλαγών του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με σαρκοείδωση [162]. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι Saussine και οι συν. έχουν αναφέρει ότι η σηματοδότηση μέσω BAFF σχετίζεται με το φαινότυπο της νόσου και συγκεκριμένα ότι ασθενείς με ενεργή νόσο παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα BAFF που συνοδεύονταν από υπεργαμμασφαιριναιμία και από υψηλά επίπεδα μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, συγκρινόμενοι με υγιείς εθελοντές και ασθενείς σε ύφεση [62]. Ο αριθμός των ασθενών με σαρκοείδωση που είχαν ελλατωματική πρωτεΐνη TACI ήταν πολύ μικρός, ώστε να μπορούσαμε να διευκρινίσουμε τη συμμετοχή του TACI στην ενεργότητα της νόσου και είναι κάτι που απομένει να διερευνηθεί.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια ετερόζυγη παραλλαγή του *TNFRSF13B/TACI* σε μια ασθενή με σαρκοείδωση, αλλά και στον υγιή εγγονό της (R202H), ενώ γνωρίζουμε ότι *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η μετάλλαξη R202H δεν προκαλεί απώλεια λειτουργικότητας. Ο συσχετισμός, λοιπόν, της μετάλλαξης και των κλινικών και φαινοτυπικών συνεπειών της χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις που αναγνωρίσαμε αφορούσαν ετερόζυγη κατάσταση, κάτι που εγείρει την ερώτηση εάν αυτές οι παραλλαγές είναι παθογόνες. Προηγούμενες μελέτες, *in vitro* αλλά και σε ζωικά μοντέλα, έχουν δείξει ότι ετερόζυγες μεταλλάξεις του *TNFRSF13B/TACI* είναι από μόνες τους επαρκείς να διαταράξουν τη λειτουργία των B-κυττάρων και να οδηγήσουν σε διαταραχές της ομοιόστασης και της παραγωγής αντισωμάτων [157]. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι

υπάρχουν και μελέτες, που σε συμφωνία και με τα δικά μας αποτελέσματα (εγγονός), έχουν ταυτοποιήσει ετερόζυγες παραλλαγές του *TNFRSF13B/TACI* σε υγιή άτομα, υποδεικνύοντας ότι οι παραλλαγές αυτές μάλλον είναι τροποποιητικές στο φαινότυπο της νόσου ή/και αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες. Περαιτέρω μεγαλύτερες μελέτες σε ασθενείς με σαρκοείδωση, οι οποίες θα περιλαμβάνουν και τους συγγενείς τους, μπορούν να αποσαφηνίσουν τον ακριβή ρόλο αυτών των παραλλαγών στην παθογένεση της νόσου, αλλά και άλλων ανοσομεσολαβούμενων διαταραχών.

Η σηματοδότηση μέσω BAFF/APRIL παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογία, όχι μόνο στην αυτοανοσία αλλά και στον καρκίνο, στις λοιμώξεις, στη μεταμόσχευση, στην αλλεργία αλλά και στις ανοσοανεπάρκειες. Η χρήση της μελιμουμάμπης, ενός μονοκλωνικού αντισώματος το οποίο αναστέλλει τον BAFF, στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο είναι ένα σημαντικό πρώτο βήμα στην ανάπτυξη περισσότερο στοχευμένων θεραπειών. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την καλύτερη κατανόηση του συστήματος σηματοδότησης μέσω BAFF/APRIL [163].

Παρόλη την πρόοδο των τελευταίων ετών στην κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της σαρκοείδωσης, η αιτιολογία της παραμένει άγνωστη. Η μελέτη μας δεν κατέδειξε διαφορά στην έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR ανάμεσα στους ασθενείς με σαρκοείδωση και τους υγιείς εθελοντές, ωστόσο η συμμετοχή των μορίων TACI και BAFFR στην παθογένεια της σαρκοείδωσης δεν μπορεί να αποκλειστεί. Αναγκαίες κρίνονται περαιτέρω λειτουργικές μελέτες πάνω στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TACI και BAFFR, έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην παθογένεια της σαρκοείδωσης.

Δεδομένου των καινούριων τεχνολογιών στον τομέα της μοριακής βιολογίας, η έρευνα τα επόμενα χρόνια μπορεί να βελτιώσει την κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της

σαρκοείδωσης και να οδηγήσει στην εφαρμογή αποτελεσματικότερων και καλύτερα ανεκτών θεραπειών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΑCΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

*Φωτεινή Μπαρδάκα*

Πνευμονολογική Κλινική

Τμήμα Ιατρικής – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(Διευθυντής: Καθ. Κ.Ι.Γουργουλιάνης)

*ΣΚΟΠΟΣ* Η παθογένεια της σαρκοείδωσης θεωρείται ότι καθορίζεται από την απορρύθμιση της T κυτταρικής ανοσίας. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με σαρκοείδωση παρουσιάζουν αυξημένη χυμική ανοσιακή απάντηση η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών και αυτόαντισωμάτων. Ωστόσο, η συμμετοχή των B-κυττάρων στην παθογένεια της σαρκοείδωσης δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς. Η ομοίωση των B-κυττάρων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τον παράγοντα ενεργοποίησης των B-κυττάρων (BAFF) ο οποίος δρά μέσω του υποδοχέα BAFF (BAFFR) και του διαμεμβρανικού ενεργοποιητή και ρυθμιστή ασβεστίου και του αλληλεπιδρών με τον συνδέτη κυκλοφιλίνης (TACI). Σκοπός της μελέτης ήταν ο καθορισμός της κατανομής των υποπληθυσμών των περιφερικών B-κυττάρων στο αίμα, ο καθορισμός της έκφρασης των TACI και BAFFR στα B-κύτταρα, καθώς και των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

*ΥΛΙΚΟ* Εβδομήντα ένας ασθενείς με σαρκοείδωση και αντίστοιχος αριθμός υγιών εθελοντών συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα κατά την ένταξή τους στη μελέτη. Από όλα τα άτομα της μελέτης απομονώθηκε γενετικό υλικό καθώς και ορός.

*ΜΕΘΟΔΟΙ* Η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR, μέσω των μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-CD267 (Abcam, κλώνος:1α1) και αντι-CD268 (Clone:11C1, BioLegend), καθώς και ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Η ανίχνευση των παραλλαγών V220A, P251L του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* έγινε με πρωτόκολλο PCR-RFLP. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών έγινε με ανοσονεφελομετρία. Η αναζήτηση συσχετίσεων έγινε με τη χρήση μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Η σύγκριση των συνεχών μεταβλητών έγινε με μη παραμετρική δοκιμασία U των Mann-Whitney και τον συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος SPSS (v10.0).

*ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ* Οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά των μνημονικών B-κυττάρων που έχουν (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) ή δεν έχουν μετέλθει ιστοτυπική μεταστροφή (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) βρέθηκαν να είναι σημαντικά μειωμένοι, ενώ η συχνότητα των παρθένων (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>) B-κυττάρων βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένη. Η έκφραση του TACI και του BAFFR δεν παρουσίασε διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς και στους υγιείς εθελοντές ενώ παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στον απόλυτο αριθμό των T και B-κυττάρων η οποία δεν σχετιζόταν με την θεραπευτική αγωγή.

*ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ* Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν διαταραγμένη ομοιόσταση των περιφερικών B-κυττάρων σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Αναγκαίες κρίνονται περαιτέρω λειτουργικές μελέτες πάνω στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TACI και BAFFR, έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην παθογένεια της σαρκοείδωσης.

# ABSTRACT

## Expression and mutational status of *TACI* in sarcoidosis

*Fotini Bardaka*

Respiratory Medicine Department

School of Medicine – University of Thessaly

(Director: Prof. K.I.Gourgoulianis)

**OBJECTIVE** The pathogenesis of sarcoidosis is presumed to be dictated by enhanced T cell immunity deregulation, however studies have suggested that patients with sarcoidosis exhibit an augmented humoral immune response manifested by increased amount of circulating immunoglobulins and the presence of autoantibodies. However the pathogenetic involvement of B cells in the development of sarcoidosis is poorly investigated. B cell homeostasis is largely influenced by B cell Activating Factor (BAFF) that acts through BAFF receptor (BAFFR) and Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI). The goal of this study was to determine the subpopulation distribution of peripheral blood B cells, the levels of TACI and BAFFR expression in B cells and immunoglobulins levels in patients with sarcoidosis.

**SAMPLES** Seventy one sarcoidosis patients and an equivalent number of control subjects were enrolled in the study.

**METHODS** The expression levels of the TACI and BAFFR receptors, through monoclonal antibodies anti-CD267 (clone: 1a1, BioLegend) and anti-CD268 (clone: 11C1, BioLegend) respectively, and the immunophenotyping of peripheral blood cells were estimated by flow cytometry. The detection of V220A, P251L variants of *TNFRSF13B/TACI*, was performed by



PCR-RFLP protocol. The concentration of immunoglobins was determined by immunonephelometry. Statistical analyses were performed by the non-parametric Mann-Whitney and the Spearman correlation tests, using the SPSS (v10.0) software.

*RESULTS* Absolute numbers and percentages of class-switched ( $CD19^+CD27^+IgD^-$ ) and unswitched ( $CD19^+CD27^+IgD^+$ ) memory B cells were significantly decreased while frequency of naive ( $CD19^+CD27^-IgD^+$ ) B cells was significantly increased. TACI and BAFFR expression did not differ between patients and controls, while a significant reduction of T and B lymphocyte count was found and was not related to medical treatment.

*CONCLUSION* Our findings suggest disturbed homeostasis in peripheral B cells in patients with sarcoidosis. Further functional studies addressing TACI and BAFFR signalling pathway are needed in order to elucidate their role in the pathogenesis of sarcoidosis.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- [1] "Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999". *Am J Respir Crit Care Med* 1999 Aug;160(2):736-55.
- [2] **Iannuzzi MC, Fontana JR.** "Sarcoidosis: clinical presentation, immunopathogenesis, and therapeutics". *JAMA* 2011 Jan 26;305(4):391-9.
- [3] **Hillerdal G, Nöu E, Osterman K, et al.** "Sarcoidosis: epidemiology and prognosis. A 15-year European study". *Am Rev Respir Dis* 1984 Jul;130(1):29-32.
- [4] **Morimoto T, Azuma A, Abe S, et al.** "Epidemiology of sarcoidosis in Japan". *Eur Respir J* 2008 Feb;31(2):372-9.
- [5] **Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, et al.** "Familial aggregation of sarcoidosis: A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS)". *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2085-91.
- [6] **Sverrild A, Backer V, Kyvik KO, et al.** "Heredity in sarcoidosis: a registry-based twin study". *Thorax* 2008 Oct;63(10):894-6.
- [7] **Drent M, Loxer EE, De Vries J.** "Sarcoidosis-associated fatigue". *Eur Respir J* 2012;40:255-263.

- 
- [8] **Tavee J, Culver D.** "Sarcoidosis and small-fiber neuropathy". *Curr Pain Headache Rep* 2011;15:201-206.
- [9] **Sharma OP.** "Cardiac and neurologic dysfunction in sarcoidosis". *Clin Chest Med* 1997;18:813–825.
- [10] **Oksanen V.** "Neurosarcoidosis". *Sarcoidosis* 1994 Mar;11(1):76-9.
- [11] **Iwai K, Sekigutti M, Hosoda Y, et al.** "Racial difference in cardiac sarcoidosis incidence observed at autopsy". *Sarcoidosis* 1994;11:26–31.
- [12] **James DG.** "Ocular sarcoidosis". *Ann N Y Acad Sci* 1986;465:551-63.
- [13] **James D.** "Sarcoidosis of the skin". *Semin. Respir. Med* 1992 13:422–441.
- [14] **Olive KE, Kataria YP.** "Cutaneous manifestations of sarcoidosis". *Arch Int Med* 1985;145:1811–1814.
- [15] **Ainslie GM, Benatar SR.** "Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis: sensitivity and specificity in diagnosis: correlations with disease activity, duration, extra-thoracic involvement, radiographic type and therapy". *Quarterly J Med* 1985;55:253-270.
- [16] **Keijsers RG, Verzijlbergen FJ, Oyen WJ, et al.** "18F-FDG PET, genotype-corrected ACE and sIL-2R in newly diagnosed sarcoidosis". *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36:1131-1137.
- [17] **Cremers JP, Van Kroonenburgh MJ, Mostard RL, et al.** "Extend of disease activity assessed by 18F-FDG-PET/CT in a Dutch sarcoidosis population". *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2014;31:37-45.

- 
- [18] **Sobic-Saranovic DP, Grozdic IT, Videnovic-Ivanof J, et al.** "Responsiveness of FDG-PET/CT to treatment of patients with active chronic sarcoidosis". *Clin Nucl Med* 2013;38:516-521.
- [19] **Blankstein R, Osborne M, Naya M, et al.** "Cardiac positron emission tomography enhances prognostic assessments of patients with suspected cardiac sarcoidosis". *J Am Coll Cardiol* 2014;63:329-336.
- [20] **Gupta D, Dadhwal DS, Agarwal R, et al.** "Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration vs conventional transbronchial needle aspiration in the diagnosis of sarcoidosis". *Chest* 2014;146:547-556.
- [21] **Koyama T et al,** "Radiologic manifestations of sarcoidosis in various organs". *Radiographics* 2004 Jan-Feb;24(1):87-104.
- [22] **Costabel U, Bonella F, Ohshimo S, et al.** "Diagnostic modalities in sarcoidosis: BAL, EBUS, and PET". *Semin Respir Crit Care Med* 2010 Aug;31(4):404-8.
- [23] **Baughman RP, Judson MA, Teirstein A, et al.** "Presenting characteristics as predictors of duration of treatment in sarcoidosis". *QJM* 2006 May;99(5):307-15.
- [24] **Baughman RP, Nagai S, Balter M, et al.** "Defining the clinical outcome status (COS) in sarcoidosis: results of WASOG Task Force. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2011 Jul;28(1):56-64.
- [25] **Valeyre D, Prasse A, Nunes H, et al.** "Sarcoidosis". *Lancet* 2014 Mar 29;383(9923):1155-67.

- 
- [26] **Gibson GJ, Prescott RJ, Muers MF, et al.** "British Thoracic Society Sarcoidosis study: effects of long term corticosteroid treatment". *Thorax* 1996 Mar;51(3):238-47.
- [27] **Baughman RP, Nunes H, Sweiss NJ, et al.** "Established and experimental medical therapy of pulmonary sarcoidosis". *Eur Respir J* 2013 Jun;41(6):1424-38.
- [28] **Gottlieb JE, Israel HL, Steiner RM, et al.** "Outcome in sarcoidosis. The relationship of relapse to corticosteroid therapy". *Chest* 1997 Mar;111(3):623-31.
- [29] **Baughman RP, Lower EE.** "Features of sarcoidosis associated with chronic disease". *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2015 Jan 5;31(4):275-81.
- [30]. **Schutt AC, Bullington WM, Judson MA.** "Pharmacotherapy for pulmonary sarcoidosis: a Delphi consensus study". *Respir Med* 2010 May;104(5):717-23.
- [31] **Vorselaars AD, Wuyts WA, Vorselaars VM, et al.** "Methotrexate vs azathioprine in second-line therapy of sarcoidosis". *Chest* 2013 Sep;144(3):805-12.
- [32] **Baughman RP, Lower EE.** "Leflunomide for chronic sarcoidosis". *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004 Mar;21(1):43-8.
- [33] **Hamzeh N, Voelker A, Forssén A, et al.** "Efficacy of mycophenolate mofetil in sarcoidosis". *Respir Med* 2014 Nov;108(11):1663-9.
- [34] **Galor A, Jabs DA, Leder HA, et al.** "Comparison of antimetabolite drugs as corticosteroid-sparing therapy for noninfectious ocular inflammation". *Ophthalmology* 2008 Oct;115(10):1826-32.

- 
- [35] **Moravan M, Segal BM.** "Treatment of CNS sarcoidosis with infliximab and mycophenolate mofetil". *Neurology* 2009 Jan 27;72(4):337-40.
- [36] **Baughman RP, Drent M, Kavuru M, et al.** "Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement". *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Oct 1;174(7):795-802.
- [37] **Sweiss NJ, Noth I, Mirsaeidi M, et al.** "Efficacy Results of a 52-week Trial of Adalimumab in the Treatment of Refractory Sarcoidosis". *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2014 Apr 18;31(1):46-54.
- [38] **Drent M, Cremers JP, Jansen TL, et al.** "Practical eminence and experience-based recommendations for use of TNF- $\alpha$  inhibitors in sarcoidosis". *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2014 Jul 8;31(2):91-107.
- [39] **Drake WP, Oswald-Richter K, Richmond BW, et al.** "Oral antimycobacterial therapy in chronic cutaneous sarcoidosis: a randomized, single-masked, placebo-controlled study". *JAMA Dermatol* 2013 Sep;149(9):1040-9.
- [40] **Drake WP, Richmond BW, Oswald-Richter K, et al.** "Effects of broad-spectrum antimycobacterial therapy on chronic pulmonary sarcoidosis". *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2013 Nov 25;30(3):201-11.
- [41] **Lower EE, Baughman RP, Kaufman AH.** "Rituximab for refractory granulomatous eye disease". *Clin Ophthalmol* 2012;6:1613-8.

- 
- [42] **Sweiss NJ, Lower EE, Mirsaeidi M, et al.** "Rituximab in the treatment of refractory pulmonary sarcoidosis". *Eur Respir J* 2014 May;43(5):1525-8.
- [43] **Neville E, Walker AN, James DG.** "Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis: an analysis of 818 patients". *Q J Med* 1983 Autumn;52(208):525-33.
- [44] **Baughman RP, Culver DA, Judson MA.** "A concise review of pulmonary sarcoidosis". *Am J Respir Crit Care Med* 2011 Mar 1;183(5):573-81.
- [45] **Nardi A, Brillet PY, Letoumelin P, et al.** "Stage IV sarcoidosis: comparison of survival with the general population and causes of death". *Eur Respir J* 2011 Dec;38(6):1368-73.
- [46] **Swigris JJ, Olson AL, Huie TJ, et al.** "Sarcoidosis-related mortality in the United States from 1988 to 2007". *Am J Respir Crit Care Med* 2011 Jun 1;183(11):1524-30.
- [47] **Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS.** "Sarcoidosis". *N Engl J Med* 2007 Nov 22;357(21):2153-65.
- [48] **Agostini C, Adami F, Semenzato G.** "New pathogenetic insights into the sarcoid granuloma". *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:71-6.
- [49] **Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al.** "Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2". *Nat Genet* 2005;37:357-64.
- [50] **Rybicki BA, Walewski JL, Maliariak MJ, et al.** "The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and whites". *Am J Hum Genet* 2005;77:491-9.
- [51] **Martenstein H.** "Knochveranderunge bei lupus pernio". *Z Haut Geschlechtskr* 1923;7:308.

- 
- [52] **Judson MA, Hirst K, Iyengar SK, et al.** "Comparison of sarcoidosis phenotypes among affected African-American siblings". *Chest* 2006;130:855-62.
- [53] **Berlin M, Fogdell-Hahn A, Olerup O, et al.** "HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis". *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Nov;156(5):1601-5.
- [54] **Costabel U.** "Sarcoidosis: clinical update". *Eur Respir J* 2001 Sep;32:56s-68s.
- [55] **Somoskövi A, Zhissel G, Seitzer U, et al.** "Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the *TNF-alpha* and in the first intron on the *TNF-beta* genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis". *Cytokine* 1999 Nov;11(11):882-7.
- [56] **Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, et al.** "Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis". *Front Immunol* 2013 Dec;10;4:437.
- [57] **Daniele RP, McMillan LJ, Dauber JH, et al.** "Immune complexes in sarcoidosis: a correlation with activity and duration of disease". *Chest* 1978;74(3), 261–264.
- [58] **Fazel SB, Howie SE, Krajewski AS, et al.** "B lymphocyte accumulations in human pulmonary sarcoidosis". *Thorax* 1992;47(11), 964–967.
- [59] **Kamphuis LS, van Zelm MC, Lam KH, et al.** "Perigranuloma localization and abnormal maturation of B cells: emerging key players in sarcoidosis?". *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(4), 406–416.



- 
- [60] **Schoenfeld N, Schmolke B, Schmitt M, et al.** “Specification and quantitation of circulating immune complexes in the serum of patients with active pulmonary sarcoidosis”. *Thorax* 1994;49(7), 688–691.
- [61] **Quismorio FP Jr, Sharma OP, Chandor S.** “Immunopathological studies on the cutaneous lesions in sarcoidosis”. *Br. J. Dermatol* 1997;97(6), 635–642.
- [62] **Saussine A, Tazi A, Feuillet S, et al.** “Active chronic sarcoidosis is characterized by increased transitional blood B cells, increased IL-10-producing regulatory B cells and high BAFF levels”. *PLoS One* 2012;7(8), e43588.
- [63] **Lee NS, Barber L, Akula SM, et al.** “Disturbed homeostasis and multiple signaling defects in the peripheral blood B-cell compartment of patients with severe chronic sarcoidosis”. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18(8), 1306–1316.
- [64] **Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al.** “B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells”. *J Immunol* 2004;173(2), 807–817.
- [65] **McLaughlin P.** “Rituximab: perspective on single agent experience, and future directions in combination trials”. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;40(1), 3–16.
- [66] **Shaw T, Quan J, Totoritis MC.** “B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience”. *Ann Rheum Dis* 2003;62(Suppl. 2), ii55–ii59.
- [67] **Barun B, Bar-Or A.** “Treatment of multiple sclerosis with anti-CD20 antibodies”. *Clin Immunol* 2012;142(1), 31–37.

- 
- [68] **Gottenberg JE, Guillevin L, Lambotte O, et al.** "Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases". *Ann Rheum Dis* 2005;64(6), 913–920.
- [69] **Belkhou A, Younsi R, El B, et al.** "Rituximab as a treatment alternative in sarcoidosis". *Joint Bone Spine* 2008;75(4), 511–512.
- [70] **Bomprezzi R, Pati S, Chansakul C, et al.** "A case of neurosarcoidosis successfully treated with rituximab". *Neurology* 2010;75(6), 568–570.
- [71] **Dasilva V, Breuil V, Chevallier P, et al.** "Relapse of severe sarcoidosis with an uncommon peritoneal location after TNF-alpha blockade. Efficacy of rituximab, report of a single case". *Joint Bone Spine* 2010;77(1), 82–83.
- [72] **Mathas S, Rickers A, Bommert K, et al.** "Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways". *Cancer Res* 2000;60(24), 7170–7176.
- [73] **Van MT, Hagenbeek A.** "CD20-targeted therapy: a breakthrough in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma". *Neth J Med* 2009;67(7), 251–259.
- [74] **Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell* 2001;104:487-501.
- [75] **Bram RJ, Crabtree GR.** "Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein". *Nature* 1994;371:355-358.

- 
- [76] **Shaw CJ, Lupski JR.** “Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms”. *Hum Genet* 2005;116:1-7.
- [77] **Hymowitz S, Patel D, Wallweber H, et al.** “Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding”. *J Biol Chem* 2005;280:7218–7227.
- [78] **Gordon NC, Pan B, Hymowitz SG, et al.** “BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site”. *Biochemistry* 2003;42:5977-5983.
- [79] **Patel DR, Wallweber HJ, Yin J, et al.** “Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen”. *J Biol Chem* 2004;279:16727-16735.
- [80] **Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J.** “The molecular architecture of the TNF superfamily”. *Trends Biochem Sci* 2002;27:19-26.
- [81] **Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, et al.** “Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency”. *Clin Exp Immunol* 2007;149:401-409.
- [82] **Wu Y, Bressette D, Carrell JA, et al.** “Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS”. *J Biol Chem* 2000;275:35478-35485.
- [83] **Gross JA, Johnston J, Mudri S, et al.** “TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease”. *Nature* 2000;404:995-999.

- 
- [84] **Vugmeyster Y, Seshasayee D, Chang W, et al.** "A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys". *Am J Pathol* 2006;168:476-489.
- [85] **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al.** "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL". *Nat Immunol* 2002;3:822-829.
- [86] **Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, et al.** "An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets". *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:235-246.
- [87] **Dillon SR, Harder B, Lewis KB, et al.** "B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin". *Arthritis Res Ther* 2010;12:R48.
- [88] **Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al.** "BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF". *Science* 2001;293:2108-2111.
- [89] **Bischof D, Elswa SF, Mantchev G, et al.** "Selective activation of TACI by syndecan-2". *Blood* 2006;107:3235-3242.
- [90] **Kimberley FC, Van Bostelen L, Cameron K, et al.** "The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking". *FASEB J* 2009;23:1584-1595.

- 
- [91] **Moreaux J, Sprynski AC, Dillon SR, et al.** "APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop". *Eur J Haematol* 2009;83:119-129.
- [92] **Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, et al.** "Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators". *J Immunol* 2002;168:5993-5996.
- [93] **O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al.** "BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells". *J Exp Med* 2004;199:91-98.
- [94] **Ozcan E, Garibyan L, Lee J, et al.** "Transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor drives plasma cell differentiation in LPS-activated B cells". *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1277-1286.
- [95] **Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, et al.** "Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion". *Eur J Immunol* 2007;37:1785-1795.
- [96] **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al.** "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL". *Nat Immunol* 2002;3:822-829.
- [97] **Von Bülow GU, Bram RJ.** "NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily". *Science* 1997;278:138-141.
- [98] **Huard B, Schneider P, Mauri D, et al.** "T cell costimulation by the TNF ligand BAFF". *J Immunol* 2001;167:6225-6231.
- [99] **Chang SK, Arendt BK, Darce JR, et al.** "A role for BlyS in the activation of innate immune cells". *Blood* 2006;108:2687-2694.

- 
- [100] **Von Bülow GU, Russell H, Copeland NG, et al.** “Molecular cloning and functional characterization of murine transmembrane activator and CAML interactor (TACI) with chromosomal localization in human and mouse”. *Mamm Genome* 2000;11:628-632.
- [101] **Bram RJ, Crabtree GR.** “Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein”. *Nature* 1994;371:355-358.
- [102] **Tran DD, Russell HR, Sutor SL, et al.** “CAML is required for efficient EGF receptor recycling”. *Dev Cell* 2003;5:245-256.
- [103] **Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, et al.** “TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts”. *Blood* 2008;111:1004-1012.
- [104] **He B, Santamaria R, Xu W, et al.** “The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88”. *Nat Immunol* 2010;11:836-845.
- [105] **Diaz-de-Durana Y, Mantchev GT, Bram RJ, et al.** “TACI-BLyS signaling via B-cell-dendritic cell cooperation is required for naive CD8+ T-cell priming in vivo”. *Blood* 2006;107:594-601.
- [106] **Sun M, Fink PJ.** “A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family”. *J Immunol* 2007;179:4307-4312.
- [107] **Von Bülow GU, van Deursen JM, Bram RJ.** “Regulation of the T-independent humoral response by TACI”. *Immunity* 2001;14:573-582.

- 
- [108] **Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, et al.** "Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice". *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3903-3908.
- [109] **Sakurai D, Hase H, Kanno Y, et al.** "TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG". *Blood* 2007;109:2961-2967.
- [110] **Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, et al.** "TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency". *Nat Genet* 2005;37:829-834.
- [111] **Salzer U, Chapel HM, Webster AD, et al.** "Mutations in *TNFRSF13B* encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans". *Nat Genet* 2005;37:820-828.
- [112] **Salzer U, Jennings S, Grimbacher B.** "To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation". *Eur J Immunol* 2007;37:17-20.
- [113] **Castigli E, Wilson SA, Scott S, et al.** "TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells". *J Exp Med* 2005;201:35-39.
- [114] **Seshasayee D, Valdez P, Yan M, et al.** "Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor". *Immunity* 2003;18:279-288.
- [115] **Yan M, Wang H, Chan B, et al.** "Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice". *Nat Immunol* 2001;2:638-643.
- [116] **Cunningham-Rundles C, Bodian C.** "Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients". *Clin Immunol* 1999;92:34-48.

- 
- [117] **Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, et al.** “Reexamining the role of *TACI* coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency”. *Nat Genet* 2007;39:429-430.
- [118] **Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, et al.** “Relevance of biallelic versus monoallelic *TNFRSF13B* mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing *TNFRSF13B* variants in antibody deficiency syndromes”. *Blood* 2009;113:1967-1976.
- [119] **Zhang L, Radigan L, Salzer U, et al.** “Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes”. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1178-1185.
- [120] **Speletas M, Mamara A, Iordanakis G, et al.** “TACI expression and mutational status in Greek patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency”. 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009, *Eur J Immun* 2009;39:S457.
- [121] **Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, et al.** “TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation”. *J Exp Med* 2000;192:137-143.
- [122] **Sazzini M, Zuntini R, Farjadian S, et al.** “An evolutionary approach to the medical implications of the tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B (*TNFRSF13B*) gene”. *Genes Immun* 2009;10:566-578.
- [123] **Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al.** “BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF”. *Science* 2001;293:2108-2111.



- 
- [124] **Madry C, Laabi Y, Callebaut I, et al.** “The characterization of murine *BCMA* gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily” *Int Immunol* 1998;10:1693-1702.
- [125] **Smith CA, Farrah T, Goodwin RG.** “The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death”. *Cell* 1994;76:959-962.
- [126] **Moreaux J, Cremer FW, Reme T, et al.** “The level of *TACI* gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature”. *Blood* 2005;106:1021–1030.
- [127] **Rowland S, Leahy K, Halverson R, et al.** “BAFF Receptor Signaling Aids the Differentiation of Immature B Cells into Transitional B Cells following Tonic BCR Signaling”. *J Immunol* 2010;185:4570-4581.
- [128] **Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J.** “The molecular architecture of the TNF superfamily”. *Trends Biochem Sci* 2002;27:19-26.
- [129] **Schneider P, MacKay F, Steiner V, et al.** “BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth”. *J Exp Med* 1999;189:1747-1756.
- [130] **Ng LG Sutherland AP, Newton R, et al.** “B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells”. *J Immunol* 2004;173:807-817.
- [131] **Gorelik L, Cutler AH, Thill G, et al.** “Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function”. *J Immunol* 2004;172:762-766.

---

[132] **Morrison MD, Reiley W, Zhang M, et al.** “An atypical tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-binding motif of B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) receptor mediates induction of the noncanonical NF-kappaB signaling pathway”. *J Biol Chem* 2005;280:10018-10024.

[133] **Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, et al.** “TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase”. *J Immunol* 2000;165:1322-1330.

[134] **Ye H, Wu H.** “Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8961-8966.

[135] **Claudio E, Brown K, Park S, et al.** “BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells”. *Nat Immunol* 2002;3:958-965.

[136] **Mackay F, Schneider P.** “Cracking the BAFF code”. *Nat Rev Immunol* 2009;9:491-502.

[137] **Mayne CG, Amanna IJ, Nashold FE, et al.** “Systemic autoimmunity in BAFF-R-mutant A/WySnJ strain mice”. *Eur J Immunol* 2008;38:587-598.

[138] **Enzler T, Bonizzi G, Silverman GJ, et al.** “Alternative and classical NF-kappa B signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease”. *Immunity* 2006;25:403-415.

- 
- [139] **Do RK, Hatada E, Lee H, et al.** "Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response". *J Exp Med* 2000;192:953-964.
- [140] **Zhang X, Park CS, Yoon SO, et al.** "BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors". *Int Immunol* 2005;17:779-788.
- [141] **Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, et al.** "B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation". *J Immunol* 2004;173:2331-2341.
- [142] **Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, et al.** "BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells". *J Clin Invest* 2003;112:286-297.
- [143] **Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al.** "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations". *J Exp Med* 1999;190:1697-1710.
- [144] **Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al.** "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway". *Science* 2001;293:2111-2114.
- [145] **Mayne CG, Amanna IJ, Nashold FE, et al.** "Systemic autoimmunity in BAFF-R-mutant A/WySnJ strain mice". *Eur J Immunol* 2008;38:587-598.
- [146] **Mayne CG, Nashold FE, Sasaki Y, et al.** "Altered BAFF-receptor signaling and additional modifier loci contribute to systemic autoimmunity in A/WySnJ mice". *Eur J Immunol* 2009;39:589-599.

- 
- [147] **Ju ZL, Shi GY, Zuo JX, et al.** “Unexpected development of autoimmunity in BAFF-R-mutant MRL-lpr mice”. *Immunology* 2007;120:281-289.
- [148] **Pelletier M, Thompson JS, Qian F, et al.** “Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF”. *J Biol Chem* 2003;278:33127-33133.
- [149] **Vugmeyster Y, Seshasayee D, Chang W, et al.** “A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys”. *Am J Pathol* 2006;168:476-489.
- [150] **Losi CG, Silini A, Fiorini C, et al.** “Mutational analysis of human BAFF receptor *TNFRSF13C* (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency”. *J Clin Immunol* 2005;25:496-502.
- [151] **Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, et al.** “B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:13945-13950.
- [152] **Speletas M, Mamara A, Bardaka F, et al.** “BAFF-R deficiency due to *TNFRSF13C*-P21R homozygosity resulting in mild immunodeficiency phenotype”. *XIV Meeting of the European Society for Immunodeficiencies*, 6-9 Oct 2010, Istanbul, Turkey, Abstract book, p86.
- [153] **Polverino F, Baraldo S, Bazzan E et al.** “A novel insight into adaptive immunity in chronic obstructive pulmonary disease: B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family”. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1011-1019.

- 
- [154] **Klein U, Rajewsky K, Küppers R.** “Human immunoglobulin (Ig)M<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells”. *J Exp Med* 1998;188:1679-1689.
- [155] **Γερμενής ΑΕ.** “Διαγνωστική Ανοσολογία”. *Εκδόσεις Παπαζήση* 2000, σελ 16-18.
- [156] **Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, et al.** “*TNFRSF13B/TACI* alterations in Greek patients with antibody deficiencies”. *J Clin Immunol* 2011 Aug;31(4):550-9.
- [157] **Bacchelli C, Buckland KF, Buckridge S, et al.** “The C76R transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor mutation disrupts antibody production and B-cell homeostasis in heterozygous and homozygous mice”. *J Allergy Clin Immunol* 2011 May;127(5):1253-9.e13.
- [158] **Barth J, Falsafi-Amin R, Petermann W, et al.** “B-lymphocyte response in peripheral blood of patients with pulmonary sarcoidosis”. *Sarcoidosis* 1992 Mar;9(1):49-53.
- [159] **Hunninghake GW, Crystal RG.** “Mechanisms of hypergammaglobulinemia in pulmonary sarcoidosis. Site of increased antibody production and role of T lymphocytes”. *J Clin Invest* 1981 Jan;67(1):86-92.
- [160] **Hinze CH, Colbert RA.** “B-cell depletion in Wegener's granulomatosis”. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008 Jun;34(3):372-9.

---

[161] **Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, et al.** "Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome". *J Pathol* 2004 Apr;202(4):496-502.

[162] **Speletas M, Salzer U, Florou Z, et al.** "Heterozygous alterations of *TNFRSF13B/TACI* in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis". *Clin Dev Immunol* 2013;2013:532437.

[163] **Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, et al.** "The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity". *Cytokine Growth Factor Rev* 2013 Jun;24(3):203-15.