



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ
ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ, ΕΘΝΙΚΟ
ΚΕΝΤΡΟ ΕΜΠΕΙΡΟΓΝΩΜΟΣΥΝΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ
ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ
Διευθυντής : Καθηγητής ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ν. ΝΤΑΛΕΚΟΣ**

Διδακτορική διατριβή

**«Η μεθυλίωση του DNA σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος
(PBMCs) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και πρωτοπαθή
χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ).»**

ΑΡΒΑΝΙΤΗ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

Ιατρός, Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική κι Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο,
Εθνικό Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης για τα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος,
ΠΓΝΛάρισας.

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

Η παρούσα έρευνα πριμοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παθολογίας (European Federation of Internal Medicine) και την FDIME (Federation for the Development of Internal Medicine in Europe) με το Βραβείο για Έρευνα Σπανίων Νοσημάτων (Research Grant for Rare Diseases) το έτος 2018.

Επιπλέον, το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο χρηματοδοτήθηκε από την υποτροφία της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος με σκοπό την έρευνα στην Ηπατολογία για το έτος 2019-2020.

Μέρος του παρόντος ερευνητικού πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Πανεπιστημίου της Μπρεστ, Γαλλία υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Yves Renaudineau.

© 2020 Αρβανίτη Πηνελόπη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή: 13^η/22.07.2020 (Γ.)Σ.(Ε.Σ.)

1^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Καλλιόπη Ζάχου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, **(Επιβλέπουσα)**

Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Γεώργιος Ν. Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας,

Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Νικόλαος Γατσέλης

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας,

Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Ειρήνη Ρηγοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας,

Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Ματθαίος Σπελέτας

Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας,

Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Μαρία Ιωάννου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής,

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής ΠΓΝΛάρισας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής Ονοματεπώνυμο: Γεώργιος Κουκούλης

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής,

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής ΠΓΝΛάρισας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Πανεπιστημίου της Μπρέστ, Γαλλία και έχει χρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παθολογίας: Research Grant for Rare Diseases, 2018 και την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος: Χρηματοδότηση Ερευνητικών Πρωτοκόλλων 2019-2020.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γ.Ν Νταλέκο, που αποτελούσε πάντα πηγή έμπνευσης για εμένα και με εμπιστεύτηκε ώστε να εργαστώ σκληρά και να εκπαιδευτώ στον τομέα της ηπατολογίας. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διατριβής μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Καλλιόπη Ζάχου για την επιμονή, την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξή της.

Τις θερμές μου ευχαριστίες στην Αγγελική Λυμπεροπούλου που χωρίς τη βοήθειά της δε θα είχε επιτευχθεί ο σχεδιασμός αλλά και η ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής, καθώς και στην κ. Ελένη Εξάρχου για την τεχνική και όχι μόνο υποστήριξη. Ευχαριστώ επίσης την κ. Ειρήνη Σεβδαλή και το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Π.Θ (υπεύθυνος Καθηγητής κ. Σπελέτας) για την πολύτιμη βοήθεια στο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Καθηγητή Υ. Renaudineau, ο οποίος με τις γνώσεις του στον τομέα της Επιγενετικής, αποτέλεσε πολύτιμο συνεργάτη για το σχεδιασμό και την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Χρήστο Τζερεφό για την υπομονή του και την ενθάρρυνσή του καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής και τον πατέρα μου, Αρβανίτη Δημήτρη που κατορθώνει πάντα να δώσει τη σωστή συμβουλή τη δυσκολότερη στιγμή.

Αρβανίτη Πηνελόπη

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Αρβανίτη Πηνελόπη

Ημερομηνία γέννησης: 10/07/1990

Τόπος γέννησης: Πτολεμαΐδα

Διεύθυνση κατοικίας: Δούκα 35, Λάρισα

Τηλ. Επικοινωνίας: 6974244909

Διεύθυνση εργασίας: ΠΓΝ Λάρισας, Μεζούρλο 41110, Λάρισα

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: peni.arvaniti@gmail.com

Ξένες γλώσσες: Αγγλική, Γαλλική, Ισπανική

ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ

- Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Σοφάδων του ΓΝ Καρδίτσας με μετακίνηση στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του ΠΓΝΛάρισας.
- Ερευνήτρια ιατρός στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας, Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης για τα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. (Δ/ντής: Καθηγητής Γ.Ν. Νταλέκος).

ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ

- **10/2014-11/2014:** Έναρξη κι ολοκλήρωση του μήνα προεκπαίδευσης για την εκπλήρωση της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Γενικό Νοσοκομείο Καρδίτσας.
- **11/2014-02/2015:** Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Παλαμά του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.
- **24/03/2015-23/02/2020:** Ειδικευόμενη Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κι Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου, Κέντρο

Εμπειρογνομosύνης για τα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος (Δ/ντής: Καθηγητής Γ.Ν. Νταλέκος).

• **11/2018-5/2019:** Ολοκλήρωση 6 μηνών ειδίκευσης στην Παθολογική και Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Μπρεστ, Γαλλία (Διευθυντής Καθηγητής Christophe Leroyer) και παράλληλα ερευνήτρια ιατρός στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Μπρεστ, Γαλλία (επιβλέπων Prof. Yves Renaudineau)

• **24/02/2020-σήμερα:** Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Σοφάδων του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας με μετακίνηση στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του ΠΓΝΛάρισας.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Αποφοίτησα από το 3^ο ενιαίο Λύκειο Πτολεμαΐδας το **2008** και το Σεπτέμβριο του ίδιου έτους πέτυχα την εισαγωγή μου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τον **Ιούλιο του 2014** πήρατο πτυχίο της ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με βαθμό «Λίαν Καλώς»(8,37).

Από τον **Αύγουστο του 2014** μέχρι και σήμερα εργάστηκα, αρχικά ως ερευνήτρια ιατρός και στη συνέχεια ως ειδικευόμενη της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Δ/ντής: Καθηγητής Γ.Ν. Νταλέκος), όπου εκπαιδεύτηκα στην εκμάθηση ανοσολογικών τεχνικών (έμμεσος ανοσοφθορισμός, ELISA, Western Blot) και τεχνικών Μοριακής Βιολογίας (PCR, υβριδισμό). Παράλληλα συμμετείχα ενεργά στα πειράματα ρουτίνας του εργαστηρίου καθώς και στα ερευνητικά πρωτόκολλα.

Από τον **Οκτώβριο του 2014** έως και τον **Νοέμβριο του 2014**, εκπλήρωσα το μήνα προεκπαίδευσης, της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Γενικό Νοσοκομείο Καρδίτσας με ισόχρονη τοποθέτησή μου στην Β' Παθολογική Κλινική και Χειρουργική κλινική του Νοσοκομείου.

Από τον **Νοέμβριο του 2014** έως και τον **Φεβρουάριο του 2015** εκπλήρωσα τέσσερεις μήνες υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Παλαμά του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας με εφημερίες στο κέντρο αυτό (4-7 ανά μήνα).

Από τον **Μάρτιο του 2015** έως και τον **Φεβρουάριο του 2020** υπηρέτησα στην Πανεπιστημιακή Παθολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (Κέντρο εμπειρογνομosύνης για τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος) (Δ/ντής:

Καθηγητής Γ.Ν. Νταλέκος) ως ασκούμενη ιατρός, όπου εκπαιδεύτηκα στην διαγνωστική προσπέλαση και θεραπευτική αντιμετώπιση των εσωτερικών (νοσηλεύομενων) και εξωτερικών ασθενών, Ιατρείο της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και σε πληθώρα διαγνωστικών επεμβατικών μεθόδων (βιοψία ήπατος, παρακεντήσεις θώρακος- κοιλιάς, στερνικές παρακεντήσεις, οστεομυελικές βιοψίες, βιοψίες δέρματος, χείλους, τοποθέτηση σφαγιτιδικών καθετήρων κ.λ.π.), ενώ συμμετείχα στο πρόγραμμα εφημεριών της κλινικής τόσο ως εσωτερική ιατρός όσο και στο τμήμα επειγόντων περιστατικών (8-9 εφημερίες το μήνα).

Από τον **Νοέμβριο του 2017 έως και τον Ιούνιο του 2018** παρακολούθησα τον κύκλο μαθημάτων του 11^{ου} Σχολείου Κλινικής Ηπατολογίας που διοργανώνεται από την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος και συμμετείχα με επιτυχία στις τελικές εξετάσεις (2^η επιτυχούσα).

Κατά το διάστημα των 6 μηνών, από το **Νοέμβριο του 2018** έως και τον **Μάιο του 2019** εξέτισα τμήμα της ειδίκευσής μου στην Παθολογική και Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Μπρεστ στη Γαλλία, ενώ παράλληλα παρακολούθησα το ερευνητικό πρόγραμμα του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Yves Renaudineau συμμετέχοντας σε ερευνητικά πρωτόκολλα στο πεδίο των αυτοανόσων νοσημάτων και πιο συγκεκριμένα του συνδρόμου Sjögren.

Από τον **Φεβρουάριο του 2020** έως και **σήμερα** υπηρετώ ως ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Σοφάδων με μετακίνηση στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Διπλώματα

- Απολυτήριο Λυκείου (3^ο Ενιαίο Λύκειο Πτολεμαΐδας) **2008**
- Certificate of Proficiency in English (University of Michigan) **2004**
- Delf 2 (UNITES A5-A6) **2005**
- Diploma superior de Espanol (DELE C2) Instituto Cervantes **2011**
- Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας **2014**

- Βεβαίωση παρακολούθησης των μαθημάτων του 11^{ου} Σχολείου Κλινικής Ηπατολογίας **2017-2018**

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΩΣ ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ ΣΕ ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ, ΟΜΙΛΙΕΣ, ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ

1. 23^η Διημερίδα Ιογενών Ηπατιτίδων Β και C ‘Χατζηγιάννης’ Αθήνα **30-31/01/2016**. Ερευνητικό Βήμα, ομιλία με θέμα: **«Χρόνια ηπατίτιδα C και αιμοσφαιρινοπάθειες στην Κεντρική Ελλάδα: Προκαταρκτικά αποτελέσματα»**
2. 8th International Congress of Internal Medicine of Central Greece, Larissa 17-19 March 2016, Greece. Ελεύθερες Ανακοινώσεις, **“Prompt initiation of intravenous corticosteroids prevents deterioration of acute-severe autoimmune hepatitis (AS-AIH) and the need for liver transplantation”**.
3. 9th International Congress of Internal Medicine March 9-11 2017 Athens Greece. Ελεύθερες Ανακοινώσεις, **“Patients with haemoglobinopathies and chronic hepatitis C: A really difficult to treat population in 2016?”**.
4. 9th International Congress of Internal Medicine March 9-11 2017 Athens Greece Ελεύθερες Ανακοινώσεις, **“Post-infantile Giant Cell hepatitis (PIGGH): a rare histological presentation of autoimmune hepatitis (AIH) leading to fulminant liver failure”**.
5. 16^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο Αθήνα 4-6 Μαΐου 2018. Στρογγυλή τράπεζα με θέμα «Η συμβολή τη βιοψίας ήπατος στη διάγνωση», **«Παρουσίαση Κλινικού Περιστατικού»**.
6. 18th Congress of Internal Medicine Lisbon 29-31 August 2019, Portugal. Award Ceremony, **”Epigenetics in Autoimmune Liver Diseases”**

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΩΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ (ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ)

- Sub-investigator στο Ερευνητικό Πρωτόκολλο «Η μεθυλίωση του DNA σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ)» χρηματοδοτούμενο από την Ελληνική

Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος. Επιστημονικός Υπεύθυνος Καθηγητής Γ.Ν Νταλέκος.
(06/2019 έως και σήμερα)

ΠΛΗΡΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. K. Zachou, N. Gatselis, **P. Arvaniti**, S. Gabeta, E.I. Rigopoulou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos. *A real-world study focused on the long-term efficacy of mycophenolate mofetil as first-line treatment of autoimmune hepatitis*. Aliment Pharmacol Ther 2016, 43:1035-47.
2. K. Zachou, **P. Arvaniti**, N.K. Gatselis, K. Azariadis, G. Papadamou, E.I. Rigopoulou and G.N. Dalekos. *Patients with Haemoglobinopathies and Chronic Hepatitis C: A Real Difficult to Treat Population in 2016?* Mediterr J Hematol Infect Dis 2017, 9: e2017003.
3. E. Sinakos, D.A. Kountouras, J. Koskinas, K. Zachou, S. Karatapanis, C.Triantos, T.Vasileiadis, J. Goulis, A. Koyrakli, E. Vlachaki, B. Toli, M. Tampaki, **P. Arvaniti**, G. Tsiaoussis, A. Bellou, A. Kattamis, K. Maragkos, F. Petropoulou, G.N. Dalekos, E. Akriviadis, G.V. Papatheodoridis. *Treatment of Chronic Hepatitis C with Direct-Acting Antivirals in Patients with β -Thalassaemia Major and Advanced Liver Disease*. Br J Haematol. 2017;178:130-136.
4. N.K. Gatselis, K. Zachou, V. Lygoura, K. Azariadis, **P. Arvaniti**, E. Spyrou, G. Papadamou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos, E.I. Rigopoulou. *Geoepidemiology, clinical manifestations and outcome of primary biliary cholangitis in Greece*. Eur J Intern Med. 2017;42:81-88.
5. **P. Arvaniti**, K. Zachou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos. *Post infantile giant cell hepatitis with features of acute/severe autoimmune hepatitis probably triggered by diclofenac in a patient with myelofibrosis*. Case Reports Hepatol. 2018 Mar 11;2018:9793868.
6. K. Zachou, **P. Arvaniti**, K. Azariadi, V. Lygoura, N.K. Gatselis, A. Lyberopoulou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos. *Prompt initiation of high-dose i.v. corticosteroids seems to prevent progression to liver failure in patients with original acute severe autoimmune hepatitis*. Hepatol Res. 2019;49:96-104.
7. E.I. Rigopoulou, S. Gyftaki, **P. Arvaniti**, V. Tsimourtou, G.K. Koukoulis, G. Hadjigeorgiou, G.N. Dalekos. *Autoimmune hepatitis in patients with multiple sclerosis: The role of immunomodulatory treatment*. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2019;43:e25-e32

8. A. Charras, **P. Arvaniti**, C. Le Dantec, M.I. Arleevskaya, K. Zachou, G.N. Dalekos, A. Bordron, Y. Renaudineau. *JAK Inhibitors Suppress Innate Epigenetic Reprogramming: a Promise for Patients with Sjögren's Syndrome*. Clin Rev Allergy Immunol. 2020;58:182-193.
9. **P. Arvaniti**, K. Zachou, A. Lyberopoulou, N. K.Gatselis, W.H. Brooks, G.N. Dalekos and Y. Renaudineau. *Epigenetic modifications in Generalized Autoimmune Epithelitis: Sjögren's syndrome and Primary Biliary Cholangitis*. Epigenomes 2019;3:15
10. A. Charras, **P. Arvaniti**, C. Le Dantec, G.N. Dalekos, K. Zachou, A. Bordron, Y. Renaudineau. *Jak inhibitors and oxidative stress control*. Front Immunol. 2019;10:2814.
11. **P. Arvaniti**, C. Le Dantec, A. Charras, M.A. Arleevskaya, C.M. Hedrich, K. Zachou, G.N. Dalekos and Y. Renaudineau. *Linking genetic variation with epigenetic profiles in Sjögren's syndrome*. Clin Immunol. 2019 Nov 22:108314
12. **P. Arvaniti**, G. Giannoulis, S. Gabeta, K. Zachou, G. Koukoulis, G.N. Dalekos. *Belimumab: A promising third line treatment option for refractory autoimmune hepatitis*. JHEP Rep. 2020;2:100123.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ (ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ Ή ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ)

2009

1-1. 15^ο Επιστημονικό συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 3^ο Διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Θεσσαλονίκη 8-10 Μαΐου 2009

1. Ε. Γεωργάκης, Π. Μητροπούλου, **Π. Αρβανίτη**, Ι. Λεμπέσης, Γ. Αντωνακόπουλος. Αμεση Μικροσκοπική Καταγραφή και Παρατήρηση Καλυπτικού Επιθηλιακού Ιστού στο Εργαστήριο. (**e-poster**)

2015

2-1. 14^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό συνέδριο Κως, 7-10 Μαΐου 2015

2. Κ. Ζάχου, Ν. Γατσέλης, Σ. Γκαμπέτα, Α. Σαΐτης, **Π. Αρβανίτη**, Ε. Ρηγοπούλου, Γ. Κουκούλης, Γ.Ν. Νταλέκος. Mycophenolate Mofetil (MMF) ως θεραπεία πρώτης γραμμής στην αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ): αποτελέσματα μακροχρόνιας

παρακολούθησης. (Aliment Pharmacol Ther 2016, 43:1035-47). **(προφορική ανακοίνωση)**

2016

3-1.23η Δημερίδα Ιογενών Ηπατιτίδων Β και C ‘Χατζηγιάννης’ Αθήνα 2016

3. **Π. Αρβανίτη**, Κ. Αζαριάδη, Ν. Γατσέλης, Γ. Παπαδάμου, Ε. Ρηγοπούλου, Γ.Ν. Νταλέκος, Κ. Ζάχου. Χρόνια Ηπατίτιδα C κι αιμοσφαιρινοπάθειες στην Κεντρική Ελλάδα: Προκαταρκτικά Αποτελέσματα. **(προφορική ανακοίνωση)**

3-2. 8th International Congress of Internal Medicine of Central Greece Λάρισα 17-19 Μαρτίου 2016

4. **P. Arvaniti**, Κ. Azariadi, Ν. Gatselis, G.N. Dalekos, Κ. Zachou. Prompt initiation of intravenous corticosteroids prevents deterioration of acute-severe autoimmune hepatitis (AS-AIH) and the need for liver transplantation. (Hepatol Res. 2019;49:96-104). **(προφορική ανακοίνωση)**

5. Κ. Azariadis, **P. Arvaniti**, Κ. Zachou, G.N. Dalekos, Ν.Κ. Gatselis. Autoimmune Hepatitis: impact of age at disease onset, on disease severity, outcome and response to treatment. **(προφορική ανακοίνωση)**

6. V. Ligoura, Ν.Κ. Gatselis, Κ. Zachou, Κ. Azariadi, **P. Arvaniti**, Ε.Ι. Rigopoulou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos. Hepatic steatosis and/or steatohepatitis in primary biliary cholangitis (PBC): An innocent bystander or a guilty player? **(προφορική ανακοίνωση)**

3-3. 15th European Congress of Internal Medicine Amsterdam 2-3 September 2016

7. V. Ligoura, Ν.Κ. Gatselis, Κ. Zachou, Κ. Azariadi, **P. Arvaniti**, Ε.Ι. Rigopoulou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos Hepatic steatosis and/or steatohepatitis in primary biliary cholangitis (PBC): An innocent bystander or a guilty player? **(e-poster)**

8. Κ. Zachou, Ν. Gatselis, **P. Arvaniti**, Κ. Azariadi, V. Lygoura, Ε.Ι. Rigopoulou, G.N. Dalekos. Patients with hemoglobinopathies and chronic hepatitis C: Is it a difficult to treat population? Preliminary results. **(e-poster)**

9. **P.Arvaniti**, K. Azariadi, N. Gatselis, G. N. Dalekos, K. Zachou Prompt initiation of intravenous corticosteroids prevents deterioration of acute/severe autoimmune hepatitis (AS-AIH) and the need of liver transplantation (LT). (**e-poster**)

2017

4-1. 9th International Congress of Internal Medicine, March 9-11 Athens Greece.

10. K. Azariadi, V. Lygoura, K. Zachou, **P. Arvaniti**, A. Saitis, N.K. Gatselis, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos Characteristics of Greek male patients with Primary Biliary Cholangitis (PBC). (**προφορική ανακοίνωση**)

11. K.Azariadi, **P.Arvaniti**, N.K. Gatselis, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos, K. Zachou. Severe acute non-A, non-B, non-C hepatitis with autoimmune features: consider acute hepatitis E virus (HEV) infection not just autoimmune hepatitis (AIH). (**προφορική ανακοίνωση**)

12. K. Zachou, **P. Arvaniti**, N.K. Gatselis, K. Azariadi, G. Papadamou, E.Rigopoulou, G.N. Dalekos. Patients with haemoglobinopathies and chronic hepatitis C: A real difficult to treat population in 2016? (Mediterr J Hematol Infect Dis 2017; 9; e2017003). (**προφορική ανακοίνωση**)

13. **P. Arvaniti** K. Azariadi, V. Lygoura, N.K. Gatselis, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos, K.Zachou. Postinfantile Giant Cell hepatitis (PIGGH): a rare histological presentation of autoimmune hepatitis (AIH) leading to fulminant liver failure. (Case Reports Hepatol. 2018 Mar 11;2018:9793868). (**προφορική ανακοίνωση**)

14. E. Polychronopoulou, **P. Arvaniti**, A. Samakidou, L. Mavroidis, K.P. Makaritsis, G.N. Dalekos, K. Zachou. Prolonged febrile illness (PFI) revisited: a retrospective analysis of a single tertiary referral center experience in central Greece. (**προφορική ανακοίνωση**)

15. E. Polychronopoulou, **P. Arvaniti**, D. Sagris, A. Loukopoulos, G. Papadamou, N.K. Gatselis, K.P. Makaritsis, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos. A patient with an unusual presentation of visceral leishmaniasis: thinking outside the box. (**e-poster**)

16. K. Azariadi, **P. Arvaniti**, M.Tsitsia, K. Zachou, G. Papadamou, A. Loukopoulos, N.K. Gatselis, K.P. Makaritsis, George K. Koukoulis, George N. Dalekos. Glycogenic hepatopathy: an unusual hepatic complication of diabetes mellitus. (**e-poster**)

4-2. The International Liver Congress 2017, 19-23 April Amsterdam, the Netherlands

17. K. Zachou, **P. Arvaniti**, N.K. Gatselis, K. Azariadi, G. K. Koukoulis, G.N. Dalekos. Prompt initiation of intravenous corticosteroids prevents deterioration of acute/severe autoimmune hepatitis (AS-AIH) and the need for liver transplantation (LT). **(e-poster)**

4-3. 15^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Λάρισα 25-27 Μαΐου 2017

18. N.K. Γατσέλης, Κ. Ζάχου, **Π. Αρβανίτη**, Α. Μπέλλου, Γ. Διαμαντοπούλου, Ε. Χολόγκιτας, Ν. Παπαδόπουλος, Ε. Σινάκος, Α. Χουντά, Α. Πρωτοπαπιάς, Θ. Βασιλειάδης, Χ. Τριάντος, Γ. Ν. Νταλέκος. Η Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ) στην Ελλάδα: Προκαταρκτικά αποτελέσματα από τη βάση δεδομένων της Ελληνικής Εταιρίας Μελέτης Ήπατος. **(προφορική ανακοίνωση)**

19. Β. Λυγούρα, **Π. Αρβανίτη**, Κ. Αζαριάδη, Ν. Γατσέλης, Γ. Κ. Κουκούλης, Γ. Ν. Νταλέκος, Κ. Ζάχου. Προκαταρκτικά αποτελέσματα της εκτίμησης της ηπατικής ίνωσης με ελαστογραφία στην Αυτοάνοση Ηπατίτιδα. **(προφορική ανακοίνωση)**

20. Β. Λυγούρα, **Π. Αρβανίτη**, Κ. Αζαριάδη, Ν. Γατσέλης, Γ. Κ. Κουκούλης, Γ. Ν. Νταλέκος, Κ. Ζάχου. Μακροχρόνια παρατεταμένη ανταπόκριση μετά την πλήρη διακοπή της αγωγής σε πρωτοθεραπευόμενους με mycophenolate mofetil ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. **(προφορική ανακοίνωση)**

21. Ε. Ι. Ρηγοπούλου, Σ. Γυφτάκη, **Π. Αρβανίτη**, Β. Τσιμούρτου, Γ. Χατζηγεωργίου, Γ. Ν. Νταλέκος. Ανοσοτροποποιητικές θεραπείες: Αίτια για την εμφάνιση οξείας αυτοάνοσης ηπατίτιδας σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. **(προφορική ανακοίνωση)**

22. Κ. Αζαριάδη, Β. Λυγούρα, Κ. Ζάχου, **Π. Αρβανίτη**, Α. Σαίτης, Γ. Κ. Κουκούλης, Γ. Ν. Νταλέκος, Ν. Κ. Γατσέλης. Χαρακτηριστικά Ελλήνων ανδρών ασθενών με Πρωτοπαθή Χολική Χολαγγειίτιδα. **(προφορική ανακοίνωση)**

2018

5-1. 16ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο Αθήνα, 4-6 Μαΐου 2018

23. **Π. Αρβανίτη**, Γ. Κ. Κουκούλης, Γ. Ν. Νταλέκος. Η συμβολή της βιοψίας ήπατος στη διάγνωση. **(προφορική ανακοίνωση)**

2019

6-1. 17^o Πανελλήνιο Ηπατολογικό συνέδριο Καλαμάτα, 9-11 Μαΐου 2019

24. Κ. Αζαριάδη, Ν. Κ. Γατσέλης, **Π. Αρβανίτη**, Β. Λυγούρα, Σ. Γκαμπέτα, Κ. Ζάχου, Γ. Ν. Νταλέκος. Η αυτοάνοση ηπατίτιδα στους ηλικιωμένους ασθενείς. **(προφορική ανακοίνωση)**

6-2. 18th Congress of Internal Medicine Lisbon 29-31 August 2019, Portugal.

25. **P. Arvaniti**, K. Zachou, G.N Dalekos, Y.Renaudineau. Epigenetics in Autoimmune Liver Diseases. **(προφορική ανακοίνωση)**

26. Κ. Azariadis, N.K Gatselis, **P. Arvaniti**, V. Lygoura, S. Gabeta, K. Zachou, G.N Dalekos. Autoimmune Hepatitis: the impact of ageing on severity, treatment response and outcome of autoimmune hepatitis. **(e-poster)**

27. **P. Arvaniti**, K. Zachou, A. Lyberopoulou, E. Sevdali, M. Speletas, Y. Renaudineau, G.N Dalekos. Altered expression of DNA methylation/hydroxymethylation enzymes in patients with autoimmune hepatitis (AIH). **(e-poster)**

ΒΡΑΒΕΙΑ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ – ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Πριμοδότηση με την “**Υποτροφία για Σπάνια Νοσήματα**” (**Research Grant for Rare Diseases 2018**) της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Παθολογίας [European Federation of Internal Medicine (EFIM) και Federation for the Development of Internal Medicine in Europe (FDIME)] για το έτος 2018 στα πλαίσια μετεκπαίδευσης σε ερευνητικές μεθόδους σχετικές με τη μελέτη επιγενετικών μηχανισμών στα αυτοάνοσα νοσήματα.
- Πριμοδότηση με την υποτροφία της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος για μετεκπαίδευση σε Ηπατολογικό κέντρο του Εξωτερικού διάρκειας 12 μηνών για το έτος 2020-2021.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- Internal Medicine Society of Greece
- Hellenic Association for the Study of the Liver
- Hellenic Society of Internal Medicine

«Η μεθυλίωση του DNA σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ).»

Αρβανίτη Πηνελόπη

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Καλλιόπη Ζάχου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**επιβλέπουσα**)
2. **Γεώργιος Ν. Νταλέκος**, Καθηγητής Παθολογίας, Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Νικόλαος Κ. Γατσέλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΛάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	16
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	21
1. Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ)	21
1.1. Εισαγωγή-Επιδημιολογικά δεδομένα	21
1.2. Αιτιοπαθογένεια.....	22
1.2.1. Γενετικοί παράγοντες	22
1.2.2. Μοριακή Μίμηση	23
1.2.3. Ανοσιακή απάντηση έναντι αυτοαντιγόνων και διαταραχή της λειτουργίας των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στην ΑΗ.....	23
1.3. Κλινική εικόνα και διάκριση φαινοτύπων της ΑΗ	25
1.3.1. Κλινική εικόνα	25
1.3.2. Εμφάνιση σε ειδικές καταστάσεις.....	26
1.3.3. Επιπλοκές	27
1.3.4. Εργαστηριακά Ευρήματα	27
1.3.5. Υπότυποι κι ανίχνευση αντισωμάτων	27
1.3.6. Προβλήματα σχετικά με τον έλεγχο των αντισωμάτων	30
1.3.7. Άλλα αυτοαντισώματα στην ΑΗ.....	30
1.3.8. Ιστολογικά ευρήματα	31
1.3.9. Εναλλακτικές μορφές ΑΗ	33
1.4. Διαγνωστικά κριτήρια.....	33
1.5. Θεραπεία και έκβαση.....	36
1.5.1. Κλασική θεραπεία	36
1.5.2. Θεραπεία «δύσκολων ασθενών» και εναλλακτικών μορφών ΑΗ	38
1.5.3. Μελλοντικές θεραπείες	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	40
2. Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ)	40
2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	40
2.2. Αιτιοπαθογένεια.....	40
2.3. Παθοφυσιολογία	41
2.4. Κλινική εικόνα	43
2.5. Εργαστηριακά ευρήματα	43
2.6. Ειδικά αυτοαντισώματα	44
2.7. Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων	45
2.8. Ιστολογικά ευρήματα.....	45
2.9. Διαγνωστικά κριτήρια.....	47
2.10. Πρόγνωση	47
2.10.1. Δημογραφικά στοιχεία	47
2.10.2. Συμπτώματα	48
2.10.3. Βιοχημικοί και ορολογικοί δείκτες	48
2.10.4. Προσδιορισμός του βαθμού ηπατικής ίνωσης	49
2.10.5. Ιστολογικά ευρήματα	49
2.10.6. Ανταπόκριση στη θεραπεία.....	49
2.11. Θεραπεία.....	51
2.11.1. Εγκεκριμένη θεραπεία.....	51
2.11.2. Μη εγκεκριμένες θεραπείες	51
2.12. Αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και των εξωηπατικών εκδηλώσεων.....	52
2.13. Μεταμόσχευση Ήπατος	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	54
3. Επιγενετική και Αυτοανοσία	54
3.1. Επιγενετικοί μηχανισμοί.....	54
3.1.1. Μεθυλίωση του DNA.....	56
3.1.2. Τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών	59

3.1.3. miRNAs.....	59
3.2. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στα αυτοάνοσα νοσήματα.....	60
3.2.1. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο ΣΕΛ.....	60
3.2.2. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο σύνδρομο Sjögren	62
3.3. Επιγενετική στα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος.....	63
3.3.1. Επιγενετικές μελέτες στην ΠΧΧ.....	63
3.3.2. Επιγενετικές μελέτες στην ΠΣΧ.....	65
3.3.3. Επιγενετικές μελέτες στην ΑΗ	66
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	68
Εισαγωγή.....	69
1. Ασθενείς και Μέθοδοι	72
1.1. Ασθενείς.....	72
1.2. Ανοσολογικός έλεγχος.....	73
1.3. Ιστολογικά ευρήματα.....	73
2. Ερευνητικό Πρωτόκολλο.....	75
2.1. Απομόνωση μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)	75
2.2. Απομόνωση Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων.....	75
2.3. Απομόνωση ολικού DNA και RNA από τα Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκύτταρα	79
2.4. Προσδιορισμός του επιπέδου της ολικής μεθυλίωσης (5 ^m C)/υδροξυμεθυλίωσης (5 ^{hm} C) του DNA των Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων.	80
2.5. Αντίστροφη μεταγραφή του RNA και διενέργεια ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	82
2.6. Προσδιορισμός του επιπέδου της 5 ^m C των επιμέρους CpG αλληλουχιών του ολικού DNA των Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων- μελέτη EWAS.	83
3. Στατιστική ανάλυση.....	86

4.	Αποτελέσματα	89
4.1.	Προσδιορισμός του επιπέδου ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/ υδροξυμεθυλίωσης ($5^{hm}C$) του DNA σε B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα	89
4.2.	Συσχέτιση του ποσοστού 5^mC και $5^{hm}C$ με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων.....	91
4.3.	Προσδιορισμός της έκφρασης των DNMTs και TETs στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα.	91
4.4.	Συσχέτιση της έκφρασης των DNMTs και TETs με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων.....	96
4.5.	Συσχέτιση της έκφρασης των DNMTs και TETs με τα επίπεδα της 5^mC και $5^{hm}C$ στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών και μαρτύρων.	97
4.6.	Epigenome wide association study (EWAS) σε T CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με AH, ΠΧΧ και υγιών μαρτύρων.....	98
4.6.1.	AH tp1 vs YM.....	99
4.6.2.	ΠΧΧ vs YM.....	105
4.6.3.	AH tp1 vs ΠΧΧ.....	116
4.6.4.	AH tp2 vs AH tp1.....	124
5.	Συζήτηση	130
6.	Συμπεράσματα	146
	Βιβλιογραφικές αναφορές	148
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	189
	ABSTRACT	191

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ)

1.1. Εισαγωγή-Επιδημιολογικά δεδομένα

Η ΑΗ είναι χρόνια φλεγμονώδης νόσος του ήπατος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες και χαρακτηρίζεται από σημαντικό βαθμό πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία, κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα, περιτυλαία ηπατίτιδα στη βιοψία ήπατος και ευνοϊκή ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή (1–3). Μέχρι σήμερα η αιτιοπαθογένεια της νόσου παραμένει εν πολλοίς άγνωστη με αποτέλεσμα ο αποκλεισμός οποιασδήποτε άλλης ηπατικής νόσου να κρίνεται απαραίτητος προκειμένου να τεθεί η διάγνωση. Επιπλέον η απουσία ειδικού ορολογικού τεστ καθώς και η μεγάλη ετερογένεια της κλινικής της εικόνας, υποδηλώνουν ότι η νόσος θα πρέπει να υπεισέρχεται στη διαφορική διάγνωση σε κάθε περίπτωση οξείας ή χρόνιας ηπατίτιδας, ειδικά εφόσον συνυπάρχει υπερσφαιριναιμία ή οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος του ήπατος.

Η ΑΗ θεωρείται σχετικά σπάνια νόσος με επιπολασμό 11-17 περιπτώσεις ανά 100000 κατοίκους, επιπολασμός που προσομοιάζει τον αντίστοιχο της ΠΧΧ (4–7). Ωστόσο, υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου έχει αναφερθεί σε περιοχές με κλειστούς πληθυσμούς. Στην πιο πρόσφατη μελέτη από τη Ν. Ζηλανδία ο επιπολασμός ανέρχεται σε 24.5/100000 κατοίκους (8), γεγονός που υποδηλώνει ότι το νόσημα πιθανώς να υποδιαγιγνώσκεται σε άλλες περιοχές.

Η νόσος έχει παγκόσμια κατανομή και προσβάλλει ασθενείς οποιασδήποτε ηλικίας και φύλου ανεξαρτήτως εθνικότητας. Αν και μέχρι πρόσφατα η νόσος θεωρείτο συχνότερη στις γυναίκες (γυναίκες/άνδρες= 3.6/1), πλέον είναι σαφές ότι εμφανίζεται σε παιδιά και ενήλικες και των δύο φύλων (4), και προσβάλλει ενήλικες όλων των ηλικιών συμπεριλαμβανομένων και των ατόμων άνω των 60 ετών (9). Μάλιστα οι ηλικιωμένοι ασθενείς συχνότερα παρουσιάζουν προχωρημένη ηπατική νόσο κατά τη διάγνωση, ενώ η πρόωμη έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής στην ομάδα αυτή των ασθενών είναι το ίδιο αποτελεσματική και ασφαλής όπως και σε νεότερους ασθενείς (10,11).

Η εθνικότητα, πιθανώς επηρεάζει εκτός από τον επιπολασμό και τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Πιο συγκεκριμένα στους καυκάσιους έχει παρατηρηθεί υψηλότερα συχνότητα εμφάνισης της ΑΗ με τη μορφή οξείας ικτερικής ηπατίτιδας, σε αντίθεση με αφρικανικούς πληθυσμούς οι οποίοι εμφανίζουν μία πιο προοδευτική μορφή εμφάνισης της νόσου, ενώ σε ασιατικούς πληθυσμούς χειρότερη πρόγνωση της νόσου (12–14). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι υποκείμενοι ανοσογενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση κι εξέλιξη της νόσου καθώς και την ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή.

1.2. Αιτιοπαθογένεια

Παρά το γεγονός ότι σημαντική πρόοδος έχει γίνει τα τελευταία χρόνια όσο αφορά στην κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου, τα αίτια που οδηγούν στην ανάπτυξη της ΑΗ παραμένουν σε ένα μεγάλο μέρος άγνωστα. Η κυρίαρχη θεωρία υποστηρίζει την ανάπτυξη του νοσήματος σε ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο μετά την επίδραση ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων. Στη συνέχεια οι μηχανισμοί της αυτοανοσίας διαιωνίζονται, πιθανότατα μέσω μηχανισμών μοριακής μίμησης, γεγονός που ευνοείται από τη διαταραγμένη λειτουργία των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων.

1.2.1. Γενετικοί παράγοντες

Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη της ΑΗ αποδίδεται κυρίως σε πολυμορφισμούς των αλληλίων του MHC τάξης II που παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD4(+) λεμφοκύτταρα. Ο κυρίαρχος ρόλος των γονιδίων που κωδικοποιούνται από τα HLA τάξης II επιβεβαιώνεται στη μεγαλύτερη γενετική μελέτη που έχει διενεργηθεί στην ΑΗ (15). Τα γονίδια του HLA διαφέρουν ανάλογα με την εθνικότητα και τη γεωγραφική κατανομή. Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική τα αλληλία HLA-DR3 (HLADRB1*0301) και HLA-DR4 (HLADRB1*0401) φαίνεται να προδιαθέτουν για την ανάπτυξη ΑΗ τύπου 1 (16,17). Στην Ιαπωνία, το Μεξικό και την Αργεντινή η προδιάθεση σχετίζεται με την ύπαρξη των HLADRB1*0405 και HLADRB1*0404 (18), ενώ στη Βόρεια Ευρώπη το HLADRB1*03 προδιαθέτει στην ανάπτυξη ΑΗ σε αντίθεση με το HLADRB1*04 που θεωρείται προστατευτικό αλληλίο (19,20). Αντίστοιχα το HLA-DR13 σχετίζεται με την ανάπτυξη ΑΗ στη Νότια Αμερική (21). Τέλος, τα HLA-DR7 και HLA-DR3 προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΑΗ τύπου 2 (22).

1.2.2. Μοριακή Μίμηση

Σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη της ΑΗ, η ανοσιακή απάντηση έναντι των αυτοαντιγόνων του ήπατος φαίνεται να πυροδοτείται μέσω μηχανισμών μοριακής μίμησης μέσω των οποίων η ανοσολογική απάντηση έναντι ξένων παραγόντων στρέφεται έναντι δομικά όμοιων αυτοαντιγόνων. Στη συνέχεια Τ λεμφοκύτταρα που κατευθύνονται έναντι αυτόλογων επιτόπων πολλαπλασιάζονται, διαιωνίζοντας την ανοσολογική απάντηση που οδηγεί στην πρόκληση ηπατικής βλάβης. Η μοριακή μίμηση έχει περιγραφεί στην ΑΗ-2 στην οποία το αυτοαντιγόνο στόχος των anti-LKM (liver kidney microsomes) αποτελεί το ένζυμο του κυττοχρώματος P450, CYP2D6. Μία αλληλουχία αμινοξέων του CYP2D6 παρουσιάζει κοινή ομολογία με πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται τόσο από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), όσο και από μέλη της οικογένειας των ερπητοϊών όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός Epstein Barr (EBV) και ο ιός του απλού έρπητα (HSV) (1,3,23). Η υπόθεση ότι η έκθεση σε εξωγενείς παράγοντες που μιμούνται αυτοαντιγόνα μπορεί να ενεργοποιήσει την ανάπτυξη της ΑΗ υποστηρίζεται από μία σειρά μελετών όπως αυτές του Kerkar και συνεργατών που ανέδειξαν την διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ του 193-212 CYP2D6 και της ομολογίας 2977-2996 του HCV και 121-140 του CMV αντίστοιχα, και του Bogdanos και συνεργατών που ανέδειξαν ότι οι ομοιότητες σε μοριακό επίπεδο μεταξύ του CYP2D6 και του HCV και HSV μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη των LKM-1 σε γενετικά προδιαθετιμένα άτομα (24,25).

Η συμμετοχή της μοριακής μίμησης στην αιτιοπαθογένεια της ΑΗ, υποστηρίζεται επιπλέον από μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ζωικά μοντέλα. Πιο συγκεκριμένα, ποντίκια τα οποία είχαν εκτεθεί στο CYP2D6 ανέπτυξαν anti-LKM αντισώματα. Η αυτοανοσία έναντι ενός αυτοαντιγόνου όπως το CYP2D6 διασπείρεται στη συνέχεια έναντι επιτόπων με λιγότερο ομολογες αλληλουχίες (26,27).

1.2.3. Ανοσιακή απάντηση έναντι αυτοαντιγόνων και διαταραχή της λειτουργίας των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στην ΑΗ

Η ανοσιακή απάντηση στην ΑΗ πιθανότατα ενεργοποιείται από την παρουσίαση αντιγόνων σε άωρα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα (TH0). Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα Β λεμφοκύτταρα

συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή παρουσιάζοντας αντιγόνα στους υποδοχείς των Τ κυττάρων (TCR). Το ήπαρ περιλαμβάνει διάφορους τύπους αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων όπως τα κύτταρα Kupffer και τα δενδριτικά κύττατα, με αποτέλεσμα η αντιγονοπαρουσίαση στα CD4(+) και CD8(+) Τ λεμφοκύτταρα να γίνεται τοπικά χωρίς τη μεσολάβηση των επιχώριων λεμφαδένων (1,28).

Τα άωρα CD4(+) Τ κύτταρα ενεργοποιούνται κατά την αντιγονοπαρουσίαση και ωριμάζουν σε Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Η διαφοροποίησή τους σε TH1 λεμφοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή IL-2 και ιντερφερόνης γ (IFNγ) που με τη σειρά τους οδηγούν στην ενεργοποίηση των CD8(+) κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων που παράγουν IFNγ και TNF. Η έκθεση των ηπατοκυττάρων στην IFNγ και τον TNF οδηγεί σε ενεργοποίηση των HLA τάξης I και αύξηση της έκφρασης των HLA τάξης II που οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των Τ κυττάρων και διαιώνιση της ηπατικής καταστροφής. Η διαφοροποίησή τους σε TH2 λεμφοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή IL-4, IL-10 και IL-13 οι οποίες οδηγούν στην ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη κυτταροτοξικότητας μέσω αντισωμάτων. Αντίστοιχα, η διαφοροποίησή τους σε TH17 λεμφοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή προφλεγμονδών κυτταροκινών IL-17, IL-22 και TNF και τη συνοδό παραγωγή IL-6 από τα ηπατοκύτταρα. Παρ' ότι αυξημένος αριθμός TH17 περιγράφεται στην ΑΗ, ο ρόλος τους στην παθογένεια της νόσου δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί. Τέλος, σημαντικό ρόλο φαίνεται να κατέχουν τα Τ βοηθητικά κύτταρα των δευτερογενών λεμφικών ιστών, τα οποία μέσω του CD40L οδηγούν στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων από τα Β κύτταρα, ενώ παράγουν υψηλά ποσά IL-21 τα επίπεδα της οποίας σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου (3,23,29–32).

Η ανάπτυξη ωστόσο της αυτοανοσίας φαίνεται να ευνοείται από μηχανισμούς απώλειας της λειτουργίας των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Τον κύριο πληθυσμό των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων αποτελούν τα CD4(+)/CD25(+)/FOXP3(+) Τ κύτταρα, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 5-10% του συνόλου των κυκλοφορούντων CD4(+) λεμφοκυττάρων στα υγιή άτομα και ρυθμίζουν την ανοσιακή απάντηση περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη δράση των αυτοαντιδρώντων Τ κυττάρων. Τα CD4(+)/CD25(+) καταστέλλουν αυτοαντιδρώντες κλώνους με την απελευθέρωση κυτταροκινών όπως η IL-10 και ο αυξητικός παράγοντας TGF-β.

Στην ΑΗ τα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα είναι ποσοτικά και ποιοτικά διαταραγμένα κυρίως κατά τη διάγνωση της νόσου ενώ κατά την ανταπόκριση στη θεραπεία παρατηρείται μερική αποκατάσταση του πληθυσμού τους (33,34). Το εύρημα αυτό

υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα που απομονώνονται από τους ασθενείς κατά τη διάγνωση της νόσου έχουν μικρότερη ικανότητα να ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των CD4(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων απ' ό,τι τα αντίστοιχα των ασθενών που βρίσκονται σε ύφεση. Επιπλέον, ο αριθμός τους σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον τίτλο των αυτοαντισωμάτων όπως τα anti-SLA (soluble liver antigen) και anti-LKM υποδηλώνοντας ότι η μείωση του αριθμού τους ευνοεί τις εκδηλώσεις της ΑΗ (35).

Εφόσον η απώλεια της ανοσορύθμισης κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΑΗ, πιθανοί θεραπευτικοί χειρισμοί θα μπορούσαν να στραφούν στην αποκατάσταση του αριθμού και της λειτουργίας των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Ωστόσο περισσότερη έρευνα στον τομέα αυτό κρίνεται απαραίτητη προκειμένου οι στρατηγικές που θα αναπτυχθούν να μην οδηγήσουν στη μετατροπή των T ρυθμιστικών κυττάρων σε μεσολαβητή της ιστικής καταστροφής.

1.3. Κλινική εικόνα και διάκριση φαινοτύπων της ΑΗ

1.3.1. Κλινική εικόνα

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΑΗ κυμαίνονται από την πλήρη απουσία συμπτωμάτων μέχρι ανάπτυξη οξείας σοβαρής ηπτίτιδας ή ακόμη και οξείας κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας (1,3,23). Η οξεία εμφάνιση παρατηρείται στο 25-40% των ασθενών και δε διαφέρει σε τίποτα από την οξεία ηπατίτιδα οποιασδήποτε άλλης αιτιολογίας. Δύο διακριτά σύνδρομα περιγράφονται στην περίπτωση της οξείας ΑΗ. Το πρώτο αφορά σε επιδείνωση προϋπαρχουσας, αδιάγνωστης χρόνιας ΑΗ και το δεύτερο αφορά στην πραγματική οξεία ΑΗ, στην οποία δεν ανευρίσκονται χρόνιες βλάβες στη βιοψία ήπατος (36–40).

Ωστόσο, τα 2/3 των ασθενών εμφανίζονται είτε χωρίς να αναφέρουν οποιοδήποτε σύμπτωμα είτε με ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω μη ειδικά συμπτώματα: κόπωση, ήπιο άλγος στην περιοχή του δεξιού υποχονδρίου, λήθαργος, ανορεξία, απώλεια βάρους, κνησμό, ίκτερο και αρθραλγίες των μικρών αρθρώσεων. Διαταραχές εμμήνου ρύσης μπορεί επίσης να παρατηρηθούν ενώ η ύπαρξη πυρετού και κηλιδοβλατιδώδους εξανθήματος είναι σχετικά σπάνιο εύρημα (41–44).

Η αντικειμενική εξέταση μπορεί να είναι απόλυτα φυσιολογική, μπορεί όμως να αναδείξει σημεία χρόνιας ηπατικής νόσου, ενώ η εικόνα της πυλαίας υπέρτασης προεξάρχει σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Το 12-35% των ασθενών είναι

εντελώς ασυμπτωματικοί και η διάγνωση τίθεται κατά τη διερεύνηση τρανσαμινασαιμίας η οποία ανευρέθη σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών είναι ήδη κίρρωτικοί κατά τη διάγνωση, γεγονός που σχετίζεται με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης (1,23,42,43,45)

Σε ορισμένες περιπτώσεις με εμφάνιση οξείας ΑΗ, τα επίπεδα της IgG ανοσοσφαιρίνης μπορεί να ανευρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων ενώ αρνητικά μπορεί να αναδειχθούν τα αντιπυρηνικά (ANA) αντισώματα. Ως εκ τούτου ο κλινικός ιατρός ίσως να μην υποπτευθεί τη νόσο η οποία μπορεί ωστόσο να εξελιχθεί σε οξεία κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ'όψιν καθώς η πρόωμη αναγνώρισή της και η έγκαιρη έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής μειώνει τον κίνδυνο προόδου σε ηπατική ανεπάρκεια και την ανάγκη για μεταμόσχευση ήπατος (1,3,23,41,44).

1.3.2. Εμφάνιση σε ειδικές καταστάσεις

Η ΑΗ μπορεί να εμφανιστεί μετά τη χορήγηση ορισμένων φαρμάκων όπως η νιτροφουραντοΐνη και η μινουκυκλίνη που ενοχοποιούνται για πάνω από 90% των περιπτώσεων. Στις περιπτώσεις αυτές δραστηριοί μεταβολίτες, προϊόντα ηπατικού μεταβολισμού συνδέονται με πρωτεΐνες προκαλώντας την αναγνώρισή τους ως επί νεοαντιγόνων από το ανοσοποιητικό σύστημα. Άλλα ενοχοποιούμενα φάρμακα είναι η δικλοφενάκη, η μεθυλ-ντόπα, η ατορβαστατίνη καθώς και μονοκλωνικά αντισώματα όπως τα adalimumab και natalizumab. Οι ασθενείς με φαρμακευτικά επαγόμενη ΑΗ φαίνεται να έχουν όμοια κλινική πορεία και ιστολογικά ευρήματα ωστόσο δείχνουν να χρειάζονται μικρότερο διάστημα χορήγησης ανοσοκαταστολής (1,46–48).

Όσο αφορά στην κύηση, η νόσος μπορεί να διαγνωστεί κατά τη διάρκεια της κύησης ενώ συχνές είναι οι υποτροπές κατά την περίοδο της λοχείας σε ασθενείς που κατά τη διάρκεια της κύησης παρατηρήθηκε ύφεση λόγω της επικράτησης μίας TH2 μεσολαβούμενης αντίδρασης (49,50). Επιπλέον έναρξη της νόσου έχει παρατηρηθεί μετά από ιογενείς λοιμώξεις όπως λοίμωξη από τους ιούς EBV και τον ιό της ηπατίτιδας Α καθώς και μετά από μεταμόσχευση ήπατος για άλλα ηπατικά νοσήματα. (51,52). Τελος ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ΑΗ είναι η εμφάνισή της παράλληλα με μία πληθώρα άλλων αυτοανόσων νοσημάτων με κυρίαρχα εξ'αυτών την υποξεία θυρεοειδίτιδα, τη λεύκη, την ελκώδη κολιτιδα, την κοιλιοκάκη και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (53,54).

1.3.3. Επιπλοκές

Οι επιπλοκές της ΑΗ είναι όμοιες με αυτές όλων των χρόνιων ηπατοπαθειών. Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω το ένα τρίτο των ασθενών είναι ήδη κίρρωτικοί κατά τη διάγνωση και αυτό καθιστά απαραίτητη την έγκαιρη διάγνωση ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μη αντιρροπούμενης κίρρωσης και κατά συνέπεια ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ). Επομένως με δεδομένο τον κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ όλοι οι ασθενείς με ΑΗ και κίρρωση ήπατος χρήζουν στενής παρακολούθησης (55,56).

1.3.4. Εργαστηριακά Ευρήματα

Τα επίπεδα των τρανσαμινασών μπορεί να κυμαίνονται από ήπια αύξηση πάνω από τις φυσιολογικές τιμές έως και 50 φορές πάνω από αυτές, με φυσιολογικές ή οριακά αυξημένες τιμές των χολοστατικών ενζύμων. Τα επίπεδά τους ωστόσο δεν αντικατοπτρίζουν αξιόπιστα την ιστολογική ενεργότητα της νόσου, ενώ μπορεί να υπάρξει αυτόματη υποχώρηση των τιμών τους παρά την ύπαρξη ιστολογικής δραστηριότητας, γεγονός που οδηγεί συχνά σε υποδιάγνωση της νόσου για μήνες ή χρόνια (1,3).

Πλέον χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη πολυκλωνικής υπεργαμμασφαιριναιμίας στην πλειονότητα (85%) των ασθενών με εκλεκτική αύξηση της IgG ανοσοσφαιρίνης που συχνά είναι σημαντική. Ωστόσο ένα ποσοτό 15-25% των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα κυρίως παιδιά και ασθενείς προχωρημένης ηλικίας, μπορεί να έχουν φυσιολογικές τιμές IgG κατά την έναρξη της νόσου γεγονός που δεν θα πρέπει να αποκλείει τη διάγνωση. Επιπλέον ένας ακόμη δείκτης που συνεισφέρει στη διάγνωση είναι η επίμονα χαμηλή τιμή του κλάσματος C4 του συμπληρώματος (1,3,4,57,58).

1.3.5. Υπότυποι κι ανίχνευση αντισωμάτων

Η ανίχνευση αντισωμάτων αν και μη παθογνωμονική παραμένει θεμελιώδης για τη διάγνωση της ΑΗ μετά τον αποκλεισμό ιογενών, μεταβολικών, γενετικών ή τοξικών αιτιών οξείας ή χρόνιας ηπατίτιδας (3,59). Σύμφωνα με το πρότυπο των ανιχνευόμενων αντισωμάτων η ΑΗ χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες την ΑΗ τύπου 1 και την ΑΗ τύπου 2. Η κλινική εικόνα και οι ανοσολογικοί φαινότυποι απεικονίζονται στον **Πίνακα 1**. Ο διαχωρισμός αυτός αρχικά βασίστηκε μόνο στα κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα ωστόσο στη συνέχεια κι άλλες διαφορές αναγνωρίστηκαν.

Πίνακας 1: Κλινικοί κι ορολογικοί υπότυποι ΑΗ

Υπότυπος	ΑΗ-1	ΑΗ-2
Αντισώματα	ANA, SMA, anti-F-actin, anti alpha-actinin, anti-SLA/LP	anti-LKM1, anti-LC1, anti-LKM3
Ηλικία εμφάνισης	Οποιαδήποτε	Συχνή σε παιδιά και νέους ενήλικες
Γενετική προδιάθεση	HLA DR3, DR4 και DR13	HLA DR3 και DR7
Κλινική εικόνα	Μεταβλητή	Συνήθως οξεία σοβαρή
Ιστοπαθολογικά ευρήματα στη διάγνωση	Ήπια νόσος έως και κίρρωση	Συνήθως προχωρημένη ηπατική ίνωση
Αποτυχία θεραπείας	Σπάνια	Συνήθης
Υποτροπή μετά τη διακοπή της θεραπείας	Πιθανή	Συνήθης
Ανάγκη μακράς διάρκειας αγωγής	Πιθανή	Πολύ συχνή

ΑΗ-1: αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, ΑΗ-2: αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 2, ANA: αντιπυρηνικά αντισώματα, SMA: αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών, anti-SLA/LP: αντισώματα έναντι διαλυτού αντιγόνου ήπατος/ήπατος-παγκρέατος, anti-LKM1: αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος/νεφρών τύπου 1, anti-LKM3: αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος/νεφρών τύπου 3, anti-LC1: αντισώματα έναντι κυτοσολίων ήπατος τύπου 1, HLA: ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο.

Η ΑΗ-1 αντιπροσωπεύει το 75-80% όλων των περιπτώσεων και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ANA (anti-nuclear antibodies) σε ποσοστό 43% και SMA (smooth muscle autoantibodies) σε ποσοστό 41% (1-4,60,61). Στις περισσότερες περιπτώσεις το πρότυπο των ANA με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IIF) έχει ομοιογενές πρότυπο αλλά και το στικτό πρότυπο δεν είναι σπάνιο. Τα SMA ανιχνεύονται στον IIF σε φρέσκες κατεψυγμένες τομές ήπατος, στομάχου και νεφρού αρουραίου, λόγω του φθορισμού των λειων μυϊκών ινών και στοιχείων του κυτταροσκελετού όπως τα νημάτια της F-ακτίνης, της τροπονίνης και της βιμεντίνης (3,23,61,62). Τίτλοι πάνω από 1/40 για τους ενήλικες και πάνω από 1/20 για τα παιδιά, σε φρέσκες κατεψυγμένες τομές ήπατος, νεφρού, στομάχου αρουραίου θεωρούνται θετικοί. Κατά τη διάκριση της

ανοσοκαταστολής παρατηρείται απώλεια των ANA και SMA ωστόσο οι τίτλοι των αντισωμάτων κατά τη διάγνωση ή κατά την πορεία της νόσου δεν αποτελούν προγνωστικό δείκτη (3,58).

Τα SLA/LP (soluble liver antigen/liver pancreas) ανιχνεύονται στο 15-30% των ασθενών και αντιπροσωπεύουν το πιο ειδικό αντίσωμα για την ΑΗ (3,23,63). Στο 98% των ασθενών με θετικά SLA/LP ανιχνεύονται επίσης αντισώματα anti-Ro52. Η ανεύρεση anti-Ro52 σε συνδυασμό ή όχι με την ύπαρξη anti-SLA/LP έχει συσχετισθεί με χειρότερη έκβαση των ασθενών όπως φαίνεται από τα υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης κηρώσεως, θανάτου σχετιζόμενο με ηπατική νόσο ή ανάγκης για μεταμόσχευση ήπατος (64,65). Ωστόσο, σε μία πρόσφατη μελέτη από τους Zachou και συνεργάτες φάνηκε ότι η ύπαρξη anti-SLA/LP δεν χαρακτηρίζει μία ομάδα ασθενών με σοβαρότερη μορφή της νόσου ή χειρότερη επιβίωση, όμως οι εν λόγω ασθενείς έχουν ανάγκη για μακροχρόνια ανοσοκατασταλτική αγωγή και παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά υποτροπής της νόσου κατά τη διακοπή των κορτικοστεροειδών (66).

Τα p-ANCA (perinuclear neutrophil cytoplasmic antibodies) ανιχνεύονται συχνά στους ασθενείς με ΑΗ-1, παρ'οτι αρχικά είχαν θεωρηθεί ειδικά για την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) και τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Το αυτοαντιγόνο στόχος των ANCA στην ΑΗ εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη και γι' αυτό το λόγο τα αντισώματα αυτά περιγράφονται ως περιπυρηνικά ANCA (p-ANNA) (1,3,23).

Η ΑΗ-2 χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση των anti-LKM1 ή σπανιότερα των anti-LKM3 ή/και των anti-LC1 (2,59,67) και αντιπροσωπεύει το 10–15% του συνόλου των περιπτώσεων στην Ευρώπη και Νότιο Αμερική. Με τη χρήση του έμμεσου ανοσοφθορισμού το πρότυπο των anti-LKM1 χαρακτηρίζεται από διάχυτο φθορισμό του κυτταπολάσματος των ηπατοκυττάρων σε όλο το λόβιο και έντονο φθορισμό του Ρ3 τμήματος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων. Τα anti-LKM1 μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) τα οποία προκαλούν φθορισμό τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω τμήματα των νεφρικών σωληναρίων (4,68). Το αντιγόνο στόχος των anti-LKM1 θεωρείται ότι είναι το CYP2D6 (3,69).

Τα anti-LKM3 μόνα τους ή σε συνδυασμό με τα anti-LKM1, ανιχνεύονται σε ποσοστό 5–10% των ασθενών με ΑΗ-2. Τα ένζυμα της UDP-γλυκουρονικής μεταφοράς 1 είναι ο κύριος στόχος των anti-LKM3 είτε στην ΑΗ είτε στην περίπτωση της χρόνιας ηπατίτιδας D στην οποία επίσης ανιχνεύονται (1,3). Τα anti-LC1 ανιχνεύονται σε ποσοστό 30% (3,59) και χαρακτηρίζονται από κυτταροπλασματικό φθορισμό των

περιπυλαίων ηπατοκυττάρων και χαρακτηριστική ελάττωση του σήματος φθορισμού γύρω από την κεντρική φλέβα του λοβίου. Η ανίχνευσή τους όμως με IF παρεμποδίζεται συνήθως από την ύπαρξη anti-LKM αντισωμάτων οπότε συμπληρωματικές τεχνικές όπως η ELISA και η ανοσοαποτύπωση (Western blot) χρειάζονται για την ανίχνευσή τους (70,71). Τόσο για τα anti-LKM όσο και για τα anti-LC1 τίτλοι πάνω από 1/40 για τους ενήλικες και πάνω από 1/10 για τα παιδιά θεωρούνται θετικοί (3,68).

1.3.6. Προβλήματα σχετικά με τον έλεγχο των αντισωμάτων

Η διεθνής ομάδα για τη μελέτη της ΑΗ έχει εκδώσει λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με τον έλεγχο αντισωμάτων σχετιζόμενων με την ΑΗ, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας των τομών, τη βέλτιστη διάλυση, τον τύπο του φθοριοχρώματος και την επιλογή των φρέσκων κατεψυγμένων τομών οι οποίες θα πρέπει να φυλάσσονται για διάστημα 4-8 εβδομάδων, ενώ οι τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου αρουραίου θεωρούνται ως οι καταλληλότερες για τον έλεγχο των ANA, SMA, anti-LKM1, anti-LKM3, anti-LC-1 και AMA. Η χρήση των κυττάρων Hep2 δε συστήνεται καθώς οδηγεί σε υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (2-4,67). Οι τίτλοι των αντισωμάτων μπορεί να ποικίλουν κατά τη διάρκεια της νόσου, ωστόσο οι χαμηλοί τίτλοι των αντισωμάτων δεν αποκλείουν τη διάγνωση (2,67,72).

1.3.7. Άλλα αυτοαντισώματα στην ΑΗ

Μία μεγάλη ποικιλία αυτοαντισωμάτων με περιορισμένη κλινική σημασία μπορεί να ανευρεθεί σε ασθενής με ΑΗ. Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται αντισώματα έναντι της διπλής έλικας του DNA, αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης, έναντι ιστονών καθώς και έναντι του υποδοχέα των ασιαλογλυκοπρωτεϊνών (anti-ASGPR), έναντι της alpha actinin (anti-α actinin) αλλά και AMA (3,73-81).

Αυτά που αξίζει να σχολιασθούν περαιτέρω είναι τα AMA, τα anti-α actinin και anti-ASPGPR. Παρ'όλο που τα AMA παραμένουν ο κύριος ορολογικός δείκτης για τη διάγνωση της ΠΧΧ μπορούν να ανιχνευθούν και στην ΑΗ. Οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ανίχνευση των AMA δεν υποδηλώνει ένα διαφορετικό υπότυπο ΑΗ που χρήζει διαφορετικής αντιμετώπισης ή εξελίσσεται σε χολοστατικό σύνδρομο (82).

Η α-actinin είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που ανήκει στην οικογένεια της F-ακτίνης κι έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη σπειραματονεφρίτιδας σε ασθενείς με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) (83). Τα αντισώματα έναντι α-actinin ανιχνεύονται σε ποσοστό άνω των 40% των ασθενών με ΑΗ τύπου I, χαρακτηρίζοντας σε συνδυασμό με την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της F-actin μία ομάδα ασθενών με κλινικά και ιστολογικά σοβαρή μορφή της νόσου (84).

Τα anti-ASGPR ανιχνεύονται συχνά σε ασθενείς με ΑΗ και μπορούν να θέσουν τη διάγνωση όταν τα υπόλοιπα αντισώματα είναι αρνητικά. Ωστόσο χαρακτηρίζονται από χαμηλή ειδικότητα καθώς ανιχνεύονται και σε άλλα ηπατικά νοσήματα όπως η ΠΧΧ, η αλκοολική κίρρωση και οι ηπατίτιδες Β, C. Η ανίχνευσή τους επίσης σχετίζεται με την ιστολογική δραστηριότητα της νόσου, ωστόσο μία αξιόπιστη και ευρεία μέθοδος προσδιορισμού τους δεν έχει ακόμη εδραιωθεί (85).

1.3.8. Ιστολογικά ευρήματα

Διαγνωστική βιοψία ήπατος θα πρέπει να πραγματοποιείται σε όλους τους ασθενείς που υπάρχει υποψία ΑΗ συμπεριλαμβανομένων των ασθενών που εμφανίζονται με οξεία ηπατική ανεπάρκεια. (1,3,44,59,60,86). Η ιστολογική επιβεβαίωση καθίσταται απαραίτητη για τη διάγνωση της ΑΗ καθώς περιλαμβάνεται τόσο στα αναθεωρημένα όσο και στα απλοποιημένα κριτήρια τα οποία απεικονίζονται στον **Πίνακα 2** (87). Ένα χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα αποτελεί η παρουσία πυλαίας και περιπυλαίας ηπατίτιδας με διήθηση από πλασματοκύτταρα και λεμφοκύτταρα όπως δείχνει η **Εικόνα 1** (3,44,88). Ο σχηματισμός ηπατοκυτταρικών ροζεττών καθώς κι η ύπαρξη εμπεριπόλισης θεωρούνται επίσης τυπικά χαρακτηριστικά της ΑΗ (87) όπως απεικονίζεται στις **Εικόνες 1 και 2**. Η φλεγμονή φείδεται των χοληφόρων πόρων ενώ μπορεί να επεκτείνεται στα λόβια. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί προσβολή των μικρών πόρων ωστόσο ελλείπει λοιπών κλινικών και ορολογικών ευρημάτων συμβατών με ΠΧΧ και δεδομένης της καλής ανταπόκρισης αυτών των ασθενών στα κορτικοστεροειδή η περίπτωση αυτή θεωρείται μία κλασσική μορφή ΑΗ (89).

Τα ιστολογικά ευρήματα της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας δεν βαίνουν παράλληλα με τη βιοχημική δραστηριότητα κι αυτός είναι ο λόγος που η βιοψία ήπατος παρέχει πληροφορίες όσο αφορά στην πρόγνωση καθώς το ένα τρίτο των ασθενών παρουσιάζει ήδη κίρρωση ή γεφυροποιό νέκρωση κατά τη διάγνωση. Τα

ιστολογικά ευρήματα ωστόσο μπορεί να διαφέρουν στην περίπτωση της οξείας και οξείας κεραυνοβόλου ΑΗ. Στις περιπτώσεις αυτές αναγνωρίζονται δύο διαφορετικά πρότυπα μαζικής ηπατικής νέκρωσης που υποδεικνύουν αυτοάνοση αιτιολογία. Το πρώτο αντιπροσωπεύει τη σοβαρότερη μορφή του προτύπου που περιγράφεται ως κεντρολοβιακή ηπατίτιδα και χαρακτηρίζεται από πανλοβιακή νέκρωση, ενώ το δεύτερο αναδεικνύει την κλασική μορφή ΑΗ, με μαζική νέκρωση και ενίοτε κεντρολοβιακή συμμετοχή (1–3,43,59,60,87,90).

Πίνακας 2: Απλοποιημένα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ

Συνθήκη	Όρια	Βαθμοί
ANA ή SMA	≥1/40	+1
ANA ή SMA	≥1/80	+2*
ή LKM	≥1/40	
ή SLA/LP	θετικά	
Βιοψία Ήπατος	Συμβατή	+1
	Τυπική †	+2
IgG	>2 x ULN	+2
	>1.1 x ULN	+1
Ιολογικοί δείκτες	αρνητικοί	+2
Σύνολο		≥6 πιθανή ΑΗ ≥7 βέβαιη ΑΗ

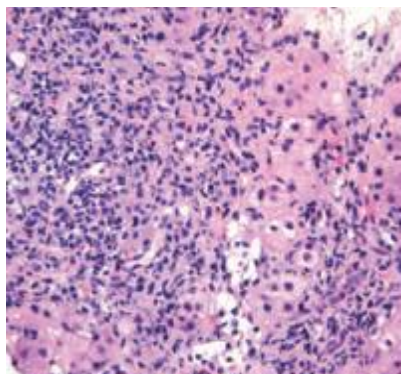
* Προσθήκη πόντων για όλα τα αντισώματα (maximum 2 βαθμοί)

† Για να θεωρηθεί τυπική αυτοάνοση ηπατίτιδα θα πρέπει να ανευρίσκονται και τα τρία ιστολογικά χαρακτηριστικά της ΑΗ (περιτυλαία ηπατίτιδα, εμπεριπόλιση, ηπατικές ροζέττες).

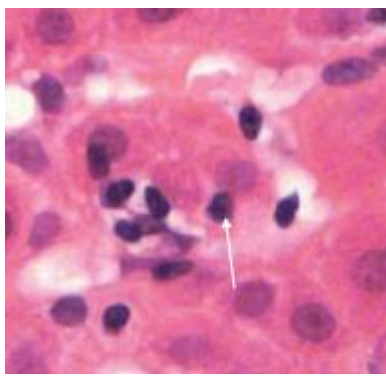
Συμβατή θεωρείται η εικόνα της χρόνιας ηπατίτιδας με διήθηση από λεμφοκύτταρα.

ULN: ανώτερη φυσιολογική τιμή (upper limit of normal)

Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 1: Πυλαία-περιπυλαία ηπατίτιδα με διήθηση από λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και ηωσινόφιλα, σχηματισμός ροζετών.

Εικόνα 2: Εμπεριόλιση μετά από συνήθη χρώση και μετά από ανοσοχρώση των CD8(+) λεμφοκυττάρων (λευκό βέλος).

Zachou et al, Aliment Pharmacol Ther 2013(3)

1.3.9. Εναλλακτικές μορφές ΑΗ

Ορισμένοι ασθενείς με ΑΗ μπορεί να εμφανίζουν ταυτόχρονα χαρακτηριστικά της ΠΧΧ ή της ΠΣΧ (91,92). Ο όρος «αλληλοεπικάλυψη» που χρησιμοποιείται τα προηγούμενα χρόνια για την οντότητα αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών νοσημάτων που συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή και για το λόγο αυτό ο όρος «εναλλακτικές μορφές» έχει επικρατήσει. Η επίπτωση της ΑΗ-ΠΧΧ ανέρχεται στο 10% ενώ αυτή της ΑΗ-ΠΣΧ στο 7-14% αντίστοιχα (41,44). Επιπλέον μία ειδική εναλλακτική μορφή έχει περιγραφεί σε πάνω από 50% των παιδιών με ΑΗ που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τόσο ΑΗ όσο και ΠΣΧ οπότε ο όρος αυτοάνοση «σκληρυντική χολαγγειίτιδα» προτείνεται γι' αυτούς τους ασθενείς (92).

1.4. Διαγνωστικά κριτήρια

Η ετερογένεια της νόσου και η απουσία μίας μεμονωμένης διαγνωστικής εξέτασης καθιστούν πιθανή την ΑΗ σε κάθε ασθενή με οξεία ή χρόνια ηπατική νόσο ή πρωτοδιαγνωσθείσα, αγνώστου αιτιολογίας κίρρωση όταν αποκλειστούν άλλα αίτια (1,3,4,86,87,93). Για το λόγο αυτό η ύπαρξη διαγνωστικών κριτηρίων κρίνεται

απαραίτητη στην προσπάθεια διάγνωσης της ΑΗ στην καθ' ημέρα κλινική πράξη (86,94).

Τα πρώτα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ δημοσιεύθηκαν το 1993 (95) ενώ το 1999 δημοσιεύθηκαν τα αναθεωρημένα κριτήρια για τη διάγνωση τα οποία χρησιμοποιούνται για μελέτες πληθυσμού και κλινικές μελέτες (88) (**Πίνακας 3**). Τα αναθεωρημένα κριτήρια περιλαμβάνουν την ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή ή την υποτροπή μετά τη διακοπή της, επιτρέποντας έτσι τη διαφοροποίηση των προ- και μετά- θεραπείας σκορ. Ένα σκορ > 15 προ θεραπείας είναι ενδεικτικό «βέβαιης» ΑΗ με ευαισθησία και ειδικότητα 95% και 97% αντίστοιχα και διαγνωστική ακρίβεια που ανέρχεται στο 94%. Ένα σκορ > 10 προ θεραπείας ή >12 μετά θεραπείας είναι ενδεικτικό «πιθανής» ΑΗ. Ωστόσο ο υπολογισμός του σκορ αυτού αποδείχθηκε περίπλοκος στην καθ' ημέρα πράξη οπότε το 2008, η ίδια ομάδα δημοσίευσε, τα σήμερα ευρέως χρησιμοποιούμενα, απλοποιημένα κριτήρια (**Πίνακας 2**), τα οποία βασίζονται στις εξείς τέσσερεις παραμέτρους: την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, τα επίπεδα της IgG, την απουσία ιογενούς ηπατίτιδας και την ιστολογία ήπατος (87).

Ωστόσο, καθώς δεν υπάρχει «ο χρυσός κανόνας» για τη διάγνωση της ΑΗ, τα διαγνωστικά σκορ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βοηθητικά. Σε ασθενείς με μη διαγνωστικά απλοποιημένα κριτήρια, η εφαρμογή των αναθεωρημένων κριτηρίων μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή λάθους κατά τη διάγνωση (96).

Πίνακας 3: Αναθεωρημένα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ

Φύλο	θήλυ	+2	HLA	DR3 ή DR4	+1	
AP:AST ή ALT	>3	-2	Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα	Θυρεοειδίτιδα	+2	
	<1.5	+2		Κολίτιδα κ.α		
IgG > xULN	>2	+3		Άλλοι δείκτες anti-SLA, anti-actin, anti-LC1, pANCA	+2	
	1.5-2	+2				
	1-1.5	+1				
ANA, SMA, ή anti-LKM1	>1/80	+3	Ιστολογικά χαρακτηριστικά			
	1/80	+2	Περιτυλαία ηπατίτιδα		+3	
	1/40	+1	Πλασματοκύτταρα		+1	
	<1/40	0	Ροζέττες		+1	
				Τίποτα από τα ανωτέρω		-5
				Αλλοιώσεις των χοληφόρων		-3
AMA	θετικά	-4				
Ιολογικοί δείκτες	θετικοί	-3	Συνολικό σκορ προ θεραπείας:			
	αρνητικοί	+3	Βέβαιη διάγνωση >15			
Λήψη φαρμάκων	ναι	-4	Πιθανή διάγνωση 10-15			
	όχι	+1	Συνολικό σκορ μετά τη θεραπεία:			
Αλκοόλ	<25γρ/ημέρα	+2	Βέβαιη διάγνωση >17			
	>60γρ ημέρα	-2	Πιθανή διάγνωση 12-17			

AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση

ULN: ανώτερη φυσιολογική τιμή (upper limit of normal)

1.5. Θεραπεία και έκβαση

1.5.1. Κλασική θεραπεία

Ήδη από τη δεκαετία του '70 έχει αποδειχθεί η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης μετά τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής σε ασθενείς με ΑΗ (97,98). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει όχι μόνο το θεραπευτικό αποτέλεσμα των κορτικοστεροειδών αλλά και την κακή έκβαση των ασθενών που θα αφεθούν χωρίς θεραπεία (99). Η θεραπεία είναι απαραίτητη και συνήθως αποτελεσματική στους ασθενείς που παρουσιάζουν κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά ενεργού φλεγμονής (100–102). Η χορήγηση θεραπείας σε ασθενείς με ήπια νόσο παραμένει ακόμη υπό αμφισβήτηση, αν και όλες οι κατευθυντήριες γραμμές τείνουν να υποστηρίζουν τη χορήγηση θεραπείας σε όλους τους ασθενείς, αλλιώς χρειάζεται πολύ στενή παρακολούθηση. Οι ασθενείς με ανενεργό νόσο ή με ήδη εγκατεστημένη μη αντιρροπούμενη κίρρωση σπάνια οφελούνται από τη θεραπεία ενώ βρίσκονται σε κίνδυνο σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών (41,44).

Η θεραπεία της ΑΗ μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις: 1) επαγωγή της ύφεσης και 2) διατήρηση της ύφεσης (100–103). Η θεραπεία για την επίτευξη της ύφεσης περιλαμβάνει τη χορήγηση πρεδνιζολόνης σε δόση 0,5-1mg/kg την ημέρα, σε συνδυασμό με αζαθειοπρίνη σε δόση 50mg την ημέρα η οποία ξεκινάει μετά από 2 εβδομάδες και εφόσον η τιμή της χολερυθρίνης είναι <6mg/dl. Στη συνέχεια η δόση της αζαθειοπρίνης αυξάνεται σταδιακά και ανάλογα με την ανταπόκριση του ασθενούς σε 1-2mg/kg την ημέρα σύμφωνα με τις οδηγίες του AASLD (American association for the study of the liver) και του EASL (European association for the study of the liver) αλλά και τις ελληνικές οδηγίες (41,44,103). Ο στόχος της θεραπείας είναι η επίτευξη πλήρους κλινικής και βιοχημικής ανταπόκρισης με τη χαμηλότερη δυνατή δόση των κορτικοστεροειδών ή ακόμη και με πλήρη διακοπή τους, προκειμένου να αποφευχθούν οι μακροχρόνιες επιπλοκές από τη χρήση τους. Για το λόγω αυτό η δόση της πρεδνιζολόνης μειώνεται σταδιακά έως τα 20mg ή σε δόση που επαρκεί για τη διατήρηση της ύφεσης και στη συνέχεια με ρυθμό 2,5mg/15 ημέρες με στενή παρακολούθηση των εργαστηριακών τιμών έως την πλήρη διακοπή της (103). Στη συνέχεια ο ασθενής παραμένει σε μονοθεραπεία με αζαθειοπρίνη που αποτελεί και τη θεραπεία διατήρησης της ύφεσης (44,103,104).

Ωστόσο, ένα ποσοστό τουλάχιστον 10% των ασθενών δεν ανέχονται την αζαθειοπρίνη και παρουσιάζουν συμπτώματα όπως ναυτία, εμέτους, αρθραλγίες, εξάνθημα ή ακόμη και σοβαρότερες επιπλοκές όπως χολοστατική ηπατίτιδα, παγκρεατίτιδα ή καταστολή μυελού των οστών. Η αζαθειοπρίνη εξάλλου, μπορεί να προκαλέσει ηπατοτοξικότητα σε βαρέως πάσχοντες ή ικτερικούς ασθενείς και για το λόγο αυτό η έναρξή της συστήνεται σε δεύτερο χρόνο σε αυτές τις περιπτώσεις (44,102,105,106). Επιπλέον σε μία μετανάλυση από τους Lamers και συνεργάτες φάνηκε ότι η ύφεση της νόσου με την κλασική θεραπεία προσεγγίζει μόλις το 43%, καθιστώντας το θεραπευτικό αυτό σχήμα κάθε άλλο παρά ιδανικό (107). Ως εκ τούτου διάφορες στρατηγικές έχουν προταθεί τα τελευταία χρόνια για τους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην κλασική θεραπεία (62,108–110).

Η μυκοφαινολάτη (MMF) αποτελεί εναλλακτική θεραπεία πρώτης γραμμής σε με ή χωρίς το συνδυασμό με πρεδνιζολόνη. Η μυκοφαινολάτη αποτελεί προφάρμακο του μυκοφαινολικού οξέος που μπλοκάρει τη σύνθεση του DNA και διαθέτει εκλεκτική ανασταλτική δράση όσο αφορά στον πολλαπλασιασμό των Β και Τ λεμφοκυττάρων (111) με αποτέλεσμα να καθίσταται πιο δραστικό και καλύτερα ανεκτό φάρμακο, δρώντας εκλεκτικά με ελάχιστες παρενέργειες, χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για τη θεραπεία των αυτοανόσων νοσημάτων (112). Η μυκοφαινολάτη έχει αποδειχθεί ασφαλής κι αποτελεσματική θεραπεία πρώτης γραμμής, επιτυγχάνοντας επαγωγή και διατήρηση της ύφεσης σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς σε ποσοστό 88% και 75% αντίστοιχα, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται γρήγορη μείωση κι απόσυρση των κορτικοστεροειδών με συνοδό βελτίωση της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας στη βιοψία ήπατος (103,112–114). Πράγματι σε μία από τις μεγαλύτερες μελέτες πρωτοθεραπευόμενων ασθενών με ΑΗ (n=109), το ποσοστό επίτευξης μακροχρόνιας ύφεσης μετά τη διακοπή της θεραπείας έφτανε στο 75% (115), ενώ σε μία πρόσφατη μετανάλυση φάνηκε ότι ο συνδυασμός MMF με πρεδνιζολόνη υπερέχει έναντι του συνδυασμού αζαθειοπρίνης με πρεδνιζολόνη ως προς την ομαλοποίηση των ηπατικών ενζύμων και το ποσοστό μη ανταπόκρισης στη θεραπεία (116).

Η βουδεσονίδη είναι ένα συνθετικό κορτικοστεροειδές που υφίσταται μεταβολισμό πρώτης διόδου στο ήπαρ κι έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στους ασθενείς με ΑΗ. Ο συνδυασμός βουδεσονίδης (9mg/kg/ημέρα) με αζαθειοπρίνη (1-2mg/kg/ημέρα), φαίνεται αποτελεσματικός σε μη κίρρωτικούς ασθενείς με ΑΗ ενώ παράλληλα έχει μικρότερο ποσοστό συστηματικών παρενεργειών (117,118). Ωστόσο, μέχρι τώρα, η μακροχρόνια έκβαση των ασθενών που θεραπεύονται με βουδεσονίδη όσο αφορά στη

βελτίωση της ιστολογικής δραστηριότητας και τη διατήρηση της ύφεσης δεν είναι γνωστή (119).

1.5.2. Θεραπεία «δύσκολων ασθενών» και εναλλακτικών μορφών ΑΗ

Τα κορτικοστεροειδή θεωρούνται ασφαλή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και παρόλο που η αζαθειοπρίνη ανήκει στην κατηγορία D των φαρμάκων στην κύηση η χρήση της δεν έχει συσχετιστεί με επιπλοκές για τη μητέρα και το παιδί. Εξάλλου έχει φανεί ότι η ΑΗ εισέρχεται σε ύφεση κατά τη διάρκεια της κύησης οπότε μπορεί να γίνει μείωση ακόμη και διακοπή της ανοσοκαταστολής, ωστόσο υποτροπές μετά τον τοκετό παρατηρούνται συχνά οπότε η ανοσοκαταστολή θα πρέπει να ξεκινήσει άμεσα ή να αυξηθεί πριν τον τοκετό (44,120,121).

Όσο αφορά στους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην αγωγή, πρωτίστως οφείλει να εξεταστεί το ενδεχόμενο αμφισβήτησης της διάγνωσης και στη συνέχεια το ενδεχόμενο μη συμμόρφωσης με τη θεραπεία. Η μη ανταπόκριση στη θεραπεία ορίζεται ως η επιδείνωση της κλινικής, εργαστηριακής ή ιστολογικής εικόνας σε οποιοδήποτε συνδυασμό εφόσον έχει τεκμηριωθεί η συμμόρφωση με τη θεραπεία. Πολλά νοσήματα του ήπατος μπορούν να μιμηθούν την ΑΗ, όπως η νόσος Wilson, η ΠΧΧ και η ΠΣΧ οπότε η αναθεώρηση της διάγνωσης κρίνεται πάντα απαραίτητη (3,4).

Η έννοια των εναλλακτικών μορφών ΑΗ παραμένει αμφιλεγόμενη όπως και τα διαγνωστικά τους κριτήρια (91,122). Επιπλέον λόγω του χαμηλού επιπολασμού τους δεν μπορούν να διεξαχθούν με ευκολία προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες για αξιολόγηση της χορηγούμενης θεραπείας. Οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να θεραπεύονται με γνώμονα την κυρίαρχη νόσο (ΑΗ, ΠΧΧ ή ΠΣΧ) ενώ η θεραπεία θα πρέπει να εξατομικεύεται με δεδομένη πάντα και την ανταπόκριση σε αυτή (3,123).

1.5.3. Μελλοντικές θεραπείες

Από τα παραπάνω καταδεικνύεται ότι δεν υπάρχει έως σήμερα μία απόλυτα ασφαλής και αποτελεσματική θεραπεία της ΑΗ. Ως εκ τούτου, η ανάγκη ανεύρεσης νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την αντιμετώπισή της θεωρείται απαραίτητη. Η αναζήτηση νέων θεραπευτικών επιλογών μπορεί να γίνει μόνο με την καλύτερη κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου ενώ, στην εποχή της επιγενετικής η

αναζήτηση επιγενετικών τροποποιήσεων που εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια μπορεί να ανοίξει το δρόμο για την εφαρμογή νέων, αποτελεσματικότερων θεραπειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ)

2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Η ΠΧΧ (προηγούμενως γνωστή ως πρωτοπαθής χολική κίρρωση) είναι ένα χρόνια, αυτοάνοσο χολοστατικό νόσημα του ήπατος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη χολόστασης, αντιμιτοχονδριακών (AMA) ή/και ειδικών αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) και ιστολογικά, από την ανεύρεση χρόνιας, «μη πυώδους», κοκκιωματώδους λεμφοκυτταρικής χολαγγειίτιδας των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων (124–127).

Η νόσος προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας με αναλογία ανδρών/γυναικών 1/10 ωστόσο τόσο η αναλογία του φύλου όσο και η ηλικία διάγνωσης βαίνουν αυξανόμενα. Σύμφωνα με τις νεότερες επιδημιολογικές μελέτες, η επίπτωση της ΠΧΧ στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό κυμαίνεται μεταξύ 1-2/100000 ενώ ο επιπολασμός αντίστοιχα μεταξύ 1.9-40.2/100000 (128–131).

2.2. Αιτιοπαθογένεια

Η αιτιοπαθογένεια της ΠΧΧ παραμένει μέχρι και σήμερα εν πολλοίς άγνωστη ωστόσο, φαίνεται σαφώς ο κεντρικός ρόλος που κατέχουν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που οδηγούν σε απώλεια της ανοσοανοχής για την 2-OADC των μιτοχονδρίων και την ανάπτυξη των AMA.

Μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους, υποστηρίζουν ότι κατά ένα μέρος η ΠΧΧ είναι κληρονομική καθώς το ποσοστό ύπαρξης σε μονοζυγωτικούς διδύμους αγγίζει το 63%. Επιπλέον, γενετικές μελέτες (genome-wide association studies), έχουν αναδείξει ισχυρή συσχέτιση με συγκεκριμένα αλληλία HLA όπως το HLADRB1*0801 που προδιαθέτει στην ανάπτυξη της νόσου σε αντίθεση με τα HLADRB1*11 και HLADRB1*13 που φαίνεται να δρουν προστατευτικά (132–134). Πέραν όμως των HLA, πάνω από 40 μη-HLA γενετικοί πολυμορφισμοί φαίνεται να προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της ΠΧΧ. Ανάμεσα στα εμπλεκόμενα γονίδια, ανευρίσκονται γονίδια που συμμετέχουν σε μονοπάτια διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων (IL7R, CD80, IL12, IL12R, TYK2, STAT4, SOCS1) καθώς και γονίδια που συμμετέχουν στη

λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων (SPIB, IRF8, PLC-L2, SPIB, PLC-L2, IKZF3, CXCR5) (134,135). Ανάμεσα στο γονίδια αυτά την ισχυρότερη συσχέτιση κατέχουν οι γονιδιακοί επίτοποι της IL-12 (136).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, χημικές ουσίες και μικρόβια θεωρείται ότι συμβάλλουν στη ρήξη της ανοσολογικής ανοχής μέσω μηχανισμών μοριακής μίμησης. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ένας επίτοπος που φέρει ένας μικροοργανισμός ή ένα νεο-αντιγόνο που δημιουργείται από τη δράση ενός ξενοβιοτικού, μιμείται τη δομή μίας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης πυροδοτώντας μία ανοσολογική απάντηση η οποία στη συνέχεια διαιωνίζεται μέσω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με μη τοποποιημένα αντιγόνα της επιφάνειας των χολαγγειοκυττάρων. Για παράδειγμα ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) των Gram(-) μικροοργανισμών προκαλεί στο ήπαρ ποντικών βλάβες παρόμοιες με αυτές της ΠΧΧ. Αντίστοιχα, ο ρόλος των ξενοβιοτικών υποστηρίζεται από την ανεύρεση αντιδραστικότητας των ορών των ασθενών με ΠΧΧ εναντίον οργανικών ουσιών που η δομή τους παρουσιάζει ομοιότητες με το λιποϊκό οξύ της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (135).

Η σύνδεση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια της ΠΧΧ πιθανότατα εντοπίζεται στην ύπαρξη υποκείμενων επιγενετικών μηχανισμών. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΠΧΧ, μελετώνται εκτενέστερα τα τελευταία χρόνια αν και η μέχρι τώρα έρευνα περιορίζεται σε μικρό αριθμό ασθενών και σε γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμα X.

2.3. Παθοφυσιολογία

Η παθοφυσιολογία της ΠΧΧ έγκειται στην απώλεια της ανοσοανοχής για την 2-OADC των μιτοχονδρίων που οδηγεί στην ανοσολογική επίθεση εναντίον των χολαγγειοκυττάρων και την καταστροφή των μικρών χοληφόρων. Πιο αναλυτικά, η E2 υποομάδα καθενός από τα τρία σύμπλοκα της 2-OADC (πυρουβική δεϋδρογενάση, PDC, 2-οξο γλουταρική δεϋδρογενάση, OGDC, και διακλαδιζόμενης αλύσου 2-οξοοξική δεϋδρογενάση, BCOADC) και ο E3-προσδετικός τομέας της E2 (E3-BP) αποτελούν τα αυτοαντιγόνα στόχους των AMA, με κυριότερα την PDC-E2 και το E3-BP (137). Ο μηχανισμός με τον οποίο η PDC-E2 μετατρέπεται σε αυτοαντιγόνο στόχο έχει εκτενώς ερευνηθεί και έχουν διατυπωθεί θεωρίες όπως αυτή της μοριακής μίμησης μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης με βακτηριακά αντιγόνα ή αλλαγής των ίδιων αντιγόνων από ξενοβιοτικά (137,138).

Ακόμη πιο πρόσφατα ευρήματα παραπέμπουν στο ότι η ανοσολογική επίθεση έναντι των χολαγγειοκυττάρων στην ΠΧΧ, προκαλείται από την παρουσία ανέπαφης ανοσοαντιδραστικής PDC-E2 μέσα στις αποπτωτικές κύστες των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων (139). Σίγουρο πάντως είναι ότι οι αυτοαντιδραστικοί επίτοποι τόσο των CD4(+) όσο και των CD8(+) λεμφοκυττάρων, που ανιχνεύονται στο αίμα και τα διηθήματα του ήπατος των ασθενών με ΠΧΧ, αλληλοεπικαλύπτονται με τους αντίστοιχους επίτοπους των Β λεμφοκυττάρων και μάλιστα ανιχνεύονται ανεξάρτητα από την ανίχνευση AMA στον ορό (139,140). Η αναπαραγωγή των μηχανισμών της ανοσολογικής βλάβης στην ΠΧΧ σε ζωικά μοντέλα, αναδεικνύει τον κεντρικό ρόλο της IFN γ στην ανοσολογική απόκριση των Τ κυττάρων, καθώς και την ύπαρξη άλλων ανοσολογικών μονοπατιών όπως της IL-12 (136,141). Επιπλέον, η φυσική ανοσία μέσω των κυττάρων φυσικών φονέων (NK-TH17 cells) φαίνεται να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της ιστολογικής βλάβης ενώ τα ίδια τα χολαγγειοκύτταρα πιθανώς δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζοντας μόρια προσκόλλησης και κυτταροκίνες (142).

Η ανοσολογική βλάβη φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη χολόσταση όπως υποδεικνύει η λειτουργία της αντλίας των διαττανθρακικών, Cl/HCO₃ (AE2, anion exchanger 2) στους ασθενείς με ΠΧΧ. Η λειτουργία της αντλίας AE2 καθώς και η ύπαρξη άθικτου γλυκοκάλυκα στο επιθήλιο των χοληφόρων είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της προστατευτικής «ομπρέλας HCO₃⁻» ώστε να αποφεύγεται η είσοδος υδρόφοβων μονομερών των χολικών οξέων. Στους ασθενείς με ΠΧΧ παρατηρείται καταστολή της αντλίας AE2 στα χολαγγειοκύτταρα ευαισθητοποιώντας τα σε αποπτωτικά ερεθίσματα και προκαλώντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου που οδηγούν στη φλεγμονή των χοληφόρων. Συνοπτικά λοιπόν, η χολόσταση στην ΠΧΧ σχετίζεται με: 1) τη μειωμένη λειτουργία της αντλίας AE2, 2) την ελάττωση της περιεκτικότητας της χολής σε διττανθρακικά και 3) την ελάττωση της ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (143,144).

Τέλος, περαιτέρω πρόοδος στην κατανόηση της ηπατικής βλάβης στην ΠΧΧ προκύπτει από την καλύτερη κατανόηση του εντερου-ηπατικού άξονα και κυρίως της σηματοδοτικής οδού του υποδοχέα FXR (farnesoid X receptor). Ο FXR κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των χολικών οξέων και φαίνεται ότι η διαταραχή της λειτουργίας του στην ΠΧΧ οδηγεί σε ελάττωση της παραγωγής των χολικών οξέων(135,141).

2.4. Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα της ΠΧΧ ποικίλει, από την πλήρη απουσία συμπτωμάτων και την τυχαία ανεύρεση διαταραχής της ηπατικής βιοχημείας έως την ύπαρξη σχετιζόμενων με την κίρρωση επιπλοκών όπως ο ίκτερος, η κίρρωση, η κίρρωση, η κίρρωση και η ηπατική εγκεφαλοπάθεια (145,146). Τα συμπτώματα που παρατηρούνται συχνότερα στους ασθενείς περιλαμβάνουν την ύπαρξη κνησμού, ξηροστομίας και ξηροφθαλμίας, έντονης κόπωσης, κατάθλιψης και διαταραχών ύπνου (147,148). Ο κνησμός στην ΠΧΧ συμβαδίζει με τον κερκάρδιο ρυθμό εμφανίζοντας τη μεγαλύτερη έντασή του τη νύχτα και παρ'ότι δε σχετίζεται άμεσα με την πρόγνωση της νόσου μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη ζωή του ασθενούς και να αποτελέσει ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος παρά την απουσία ηπατικής ανεπάρκειας (149–151). Όσο αφορά στην αιτιολογία του κνησμού, η συσσώρευση των χολικών αλάτων στα πλαίσια της χολόστασης έχει ενοχοποιηθεί, ενώ μελέτες υποστηρίζουν ότι η αύξηση των ενδογενών οπιοειδών ή των σεροτονινεργικών υποδοχέων επίσης ενοχοποιείται (152,153). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της λυσοφωσφολιπάσης autotoxin του ορού πιθανώς εμπλέκονται στην ανάπτυξη κνησμού στα χολοστατικά νοσήματα (149,154). Η κόπωση αφορά το 40-80% των ασθενών και παρ'ότι ο μηχανισμός της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως θεωρείται ότι σχετίζεται με διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (153). Άλλες κλινικές εκδηλώσεις που έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΠΧΧ περιλαμβάνουν την εμφάνιση οζώδους ευθήματος και την ανάπτυξη αλλεργικής πορφύρας (Henoch Schönlein) η οποία μάλιστα σχετίζεται με την ύπαρξη IgA αντισωμάτων (155,156). Σημαντική επίσης είναι η συνύπαρξη της ΠΧΧ με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα με συχνότερη τη συνύπαρξη με τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto (45%), ενώ και το σύνδρομο Sjögren έχει αυξημένη επίπτωση στους ασθενείς με ΠΧΧ που προσεγγίζει το 40% (157,158)

2.5. Εργαστηριακά ευρήματα

Η ΠΧΧ θα πρέπει να τίθεται στη διαφορική διάγνωση σε κάθε ασθενή που εμφανίζει αύξηση των χολοστατικών ενζύμων, συμπτώματα επίμονου κνησμού ή/ και κόπωσης. Χαρακτηριστικά αυξημένη ανευρίσκεται επίσης η τιμή της IgM ανοσοσφαιρίνης (159). Οι ασθενείς μπορεί επιπλέον να παρουσιάζουν αύξηση των τρανσαμινασών, που αντικατοπτρίζει τον βαθμό φλεγμονής και νέκρωσης του ηπατικού παρεγχύματος. Ο

λόγος αλανινικής/ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST/ALT) >1 μπορεί να είναι δείκτης προόδου της ηπατικής ίνωσης. Υπερχολερυθριναιμία παρατηρείται χαρακτηριστικά σε προχωρημένα στάδια της νόσου, ενώ η ανεύρεση θρομβοπενίας, υπολευκωματιναιμίας και πρήτασης του INR (international normalized ratio) υποδηλώνουν την ανάπτυξη κίρρωσης (135,141). Η χολόσταση επηρεάζει επίσης το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών με αποτέλεσμα οι ασθενείς να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, ξανθώματα και ξανθελάσματα. Παρ'όλα αυτά δεν παρατηρείται αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου καθώς η αύξηση της ολικής χοληστερόλης οφείλεται κυρίως στην αύξηση της Lp(X) (lipoprotein X) (160).

2.6. Ειδικά αυτοαντισώματα

Η ανίχνευση των AMA αποτελεί το ορόσημο για τη διάγνωση της ΠΧΧ. Η ύπαρξη των AMA περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1958 ενώ το 1967 ανακαλύφθηκε ότι το αυτοαντιγόνο στόχος τους εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (161,162). Τα AMA ανιχνεύονται σε πάνω από 90% των ασθενών και αντιδρούν έναντι της E2 υποομάδας καθενός από τα τρία σύμπλοκα της 2-OADC (PDC, OGDC, και BCOADC) και E3-BP. Συνεθέστερα ανιχνεύονται AMA τα οποία αντιδρούν έναντι της PDC-E2 και της BCOADC-E2 (163). Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι σε <10% των ασθενών ανιχνεύονται αντισώματα μόνο έναντι της BCOADC-E2 ή/και της OGDC-E2, υποδεικνύοντας έτσι πως η χρήση μόνο της PDC-E2 ως το κύριο υπόστρωμα για την ανίχνευση των AMA οδηγεί σε χαμηλότερη ευαισθησία της μεθόδου. Τα AMA έναντι των άλλων συμπλόκων της 2-OADC είναι ήσσονος σημασίας καθώς αυτοαντιδραστικότητα έναντι των τελευταίων ανευρίσκεται σπάνια σε ασθενείς που δεν εμφανίζουν αυτοαντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2 (81,163–166).

Παρ'ότι τα AMA αποτελούν το σημαντικότερο δείκτη για τη διάγνωση της ΠΧΧ, σε πάνω από 50% των ασθενών ανιχνεύονται ειδικά για την ΠΧΧ ANA. Τα ειδικά για την ΠΧΧ ANA παρουσιάζουν δύο χαρακτηριστικούς τύπους φθορισμού με IF σε κύτταρα Hep2, τον περιπυρηνικό-RLM (rim like membrane) και τον φθορισμό με πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες-MND (multiple nuclear dots) (81,141,167–169). Το πρότυπο RLM χαρακτηρίζεται από φθορισμό της περιπυρηνικής μεμβράνης και είναι αποτέλεσμα της αυτοαντιδραστικότητας με τα πυρηνικά αντιγόνα της γλυκοπρωτεΐνης gp210, της νουκλεοπορίνης NUP62 και του υποδοχέα lamin B receptor (LBR). Το πρότυπο των MND χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλαπλών κηλίδων εντός του πυρήνα χωρίς

ωστόσο φθορισμό του πυρηνίσκου και είναι αποτέλεσμα αντιδραστικότητας με στοιχεία του πυρηνικού περιβλήματος και συγκεκριμένα των sp100 (nuclear body speckled 100) και των PML (promyelocytic leukemia proteins) (81,166,170,171).

2.7. Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων

Ο ΠΦ σε φρέσκες κατεψυγμένες τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου θεωρείται η βασική μέθοδος ρουτίνας για την ανίχνευση των AMA (3,141,166). Τα AMA φθορίζουν τόσο τα εγγύς όσο και τα άπω νεφρικά σωληνάκια σε αντίθεση με τα anti-LKM1 τα οποία χαρακτηρίζονται από φθορισμό μόνο των εγγύς σωληναρίων, ενώ φθορίζουν και τα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου σε αντίθεση και πάλι με τα anti-LKM1. Στο υπόστρωμα των Hep2 τα AMA χαρακτηρίζονται από κοκκιώδη κυτταροπλασματικό φθορισμό (79,166,172). Επιπλέον, καθώς τα AMA στον ορό περιλαμβάνουν και τους τρεις μείζονες υπότυπους των ανοσοσφαιρινών (IgG, IgA, IgM) συστήνεται να χρησιμοποιείται πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη για τον προσδιορισμό τους (173).

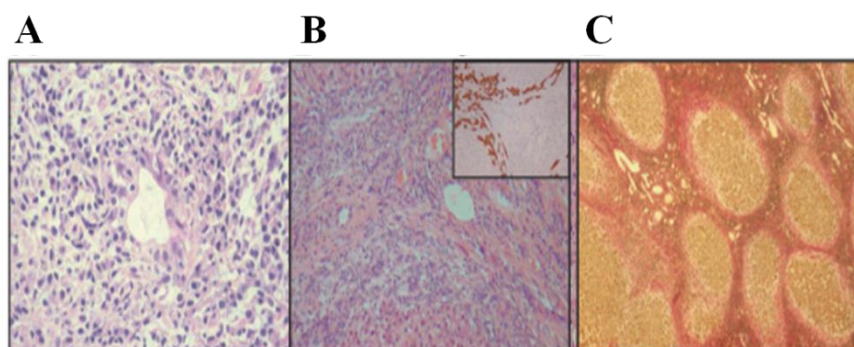
Η πρώτη γεννιάς ELISA που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των AMA, χρησιμοποιούσαν μόνο την PDC-E2 ως υπόστρωμα, ωστόσο ένα 10% των ασθενών είναι θετικοί μόνο για την anti-BCOADC-E2 and/or anti-OGDC-E2 [139]. Μέθοδοι ELISA που χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και για τα τρία αυτοαντιγόνα στόχους χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως με μεγαλύτερα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας (174,175).

Η ανοσοαποτύπωση θεωρείται μία ευαίσθητη κι ειδική μέθοδος για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των AMA επιτρέποντας την ανίχνευση των αυτοαντιγόνων στόχος με βάση το μοριακό τους βάρος και συγκεκριμένα στα 74 kDa για την (PDH-E2, στα 52 kDa για την BCKD-E2 και στα 48 kDa για την OGD-E2. Ανθρώπινο μιτοχονδριακό κλάσμα ή και κλάσμα ήπατος αρουραίου χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την ανοσοαποτύπωση (79,166).

2.8. Ιστολογικά ευρήματα

Η ΠΧΧ ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη «μη πυώδους» φλεγμονής η οποία περιβάλλει και καταστρέφει τους μεσολόβιους χοληφόρους πόρους, εύρημα το οποίο στα αρχικά στάδια αναφέρεται ως λεμφοκυτταρική χολαγγειίτιδα ή “florid duct lesions”. Τα φλεγμονώδη διηθήματα αποτελούνται κυρίως από T λεμφοκύτταρα και

λιγότερα Β λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και ηωσινόφιλα ενώ παρατηρούνται και κοκκιώματα. Η προοδευτική καταστροφή των χοληφόρων πόρων οδηγεί σε ποροπενία και εναπόθεση συνδετικού ιστού η οποία χρησιμοποιείται και ως δείκτης για τη σταδιοποίηση της ΠΧΧ σύμφωνα με τα κριτήρια του Ludwig όπως απεικονίζονται στην **Εικόνα 3**. Το στάδιο 4 αντιστοιχεί στην ύπαρξη κίρρωσης (176) **Πίνακας 4**.



Εικόνα 3. Ιστολογικά χαρακτηριστικά της ΠΧΧ: Α) λεμφοκυτταρική χολαγγειίτιδα, “florid duct lesions”, Β) απώλεια χοληφόρων πόρων και χολαγγειολική αντίδραση, C) εγκατεστημένη κίρρωση με εκτεταμένα ινωτικά διαφράγματα και αναγεννητικά οζίδια.

EASL, J Hep 2017 (141)

Πίνακας 4: Ιστολογική κατάταξη της ΠΧΧ κατά Ludwig

Ιστολογική κατάταξη της ΠΧΧ κατά Ludwig

- I.** Φλεγμονώδης διήθηση των πυλαίων διαστημάτων, λεμφοκυτταρική χολαγγειίτιδα (florid duct lesions) και ανάπτυξη επιθηλιοειδών κοκκιωμάτων
- II.** Χολαγγειολική αντίδραση, ποροπενία, διάσπαση του αφοριστικού πετάλου και επέκταση της φλεγμονής στο ηπατικό παρέγχυμα
- III.** Γεφυροποιός ίνωση
- IV.** Κίρρωση κι αναγεννητικά οζίδια

2.9. Διαγνωστικά κριτήρια

Τα διαγνωστικά κριτήρια της ΠΧΧ περιλαμβάνουν 1) την ανίχνευση AMA ή ειδικών για την ΠΧΧ ANA, 2) την ύπαρξη αυξημένων χολοστατικών ενζύμων και 3) την ύπαρξη χαρακτηριστικών ιστολογικών ευρημάτων με ανάδειξη λεμφοκυτταρικής χολαγγειίτιδας. Η διάγνωση τίθεται όταν ο ασθενής πληροί τουλάχιστον δύο από τα τρία διαγνωστικά κριτήρια της νόσου. Τα AMA ανιχνεύονται σε πάνω από 90% των ασθενών ενώ τα ANA σε ένα ποσοστό που ανέρχεται στο 30%. Δεδομένης της υψηλής ειδικότητας των αντισωμάτων η ανάγκη διενέργειας βιοψίας ήπατος αμφισβητείται, ωστόσο θεωρείται απαραίτητη στις περιπτώσεις που ο έλεγχος των AMA και ANA αποβαίνει αρνητικός ενώ η υποψία για τη διάγνωση της νόσου παραμένει ισχυρή αλλά και όταν η πιθανότητα συνύπαρξης με ΑΗ ή ΜΑΣΗ καθίσταται υψηλή. Η μη ανταπόκριση στη θεραπεία αποτελεί επίσης μία από τις περιπτώσεις στην οποία η βιοψία ήπατος μπορεί να κριθεί βοηθητική ωστόσο δεν αποτελεί απόλυτη ένδειξη (141,177).

2.10. Πρόγνωση

Η ΠΧΧ είναι μία προοδευτικά εξελισσόμενη ηπατική νόσος που ακόμη και μετά την έναρξη της ενδεδειγμένης θεραπείας μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική νόσο τελικού σταδίου και θάνατο. Για το λόγο αυτό όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να σταδιοποιούνται για τον κίνδυνο εξέλιξης σε τελικού σταδίου ηπατική νόσο. Οι δείκτες καθορισμού του κινδύνου περιλαμβάνουν δυναμικές και στατικές παραμέτρους ανάλογα με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Οι στατικές παράμετροι μπορούν να προσδιοριστούν τόσο κατά τη διάγνωση όσο και σε οποιαδήποτε στιγμή κατά την κλινική πορεία της νόσου και στηρίζονται σε δημογραφικά στοιχεία, στα συμπτώματα του ασθενούς, σε ορολογικούς και βιοχημικούς δείκτες, στον προσδιορισμό του βαθμού ηπατικής ίνωσης και σε ιστολογικά χαρακτηριστικά (141,178).

2.10.1. Δημογραφικά στοιχεία

Η ηλικία και το φύλο έχει φανεί ότι επηρεάζουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη μακροχρόνια έκβαση των ασθενών με ΠΧΧ. Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε νεαρότερη ηλικία <45 ετών είναι συνήθως συμπτωματικοί και έχουν μικρότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία γεγονός που μεταφράζεται ως δυσμενέστερη

πρόγνωση και μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου σχετιζόμενο με ηπατική νόσο (179,180). Το άρρεν φύλο σχετίζεται με καθυστέρηση στη διάγνωση, προχωρημένη ηπατική νόσο κατά την εμφάνιση του ασθενούς, μικρότερη ανταπόκριση στη θεραπεία και μεγαλύτερο κίνδυνο για την ανάπτυξη ΗΚΚ (181,182).

2.10.2. Συμπτώματα

Η παρουσία συμπτωμάτων μπορεί να προδικάζει χειρότερη ανταπόκριση στη θεραπεία και δυσμενέστερη πρόγνωση. Η παρουσία σοβαρού κνησμού έχει συσχετισθεί ιστολογικά με την ύπαρξη σοβαρής ποροπενίας παρά την απουσία κίρρωσης και με κακή πρόγνωση αυτής της υποομάδας ασθενών οι οποίοι συχνά καταλήγουν στην ανάγκη για μεταμόσχευση ήπατος (183). Η σοβαρότητα του αισθήματος κόπωσης από την άλλη, δε σχετίζεται απαραίτητα με τη σοβαρότητα της νόσου ή το θάνατο σχετιζόμενο με ηπατική νόσο (141).

2.10.3. Βιοχημικοί και ορολογικοί δείκτες

Η χολερυθρίνη αποτελεί προγνωστικό δείκτη της νόσου και μαζί με την αλβουμίνη κατά τη διάγνωση, μπορούν να διακρίνουν ασθενείς, που λαμβάνουν UDCA, σε ομάδα χαμηλού (φυσιολογικές και οι δύο), μέτριου (μία από τις δύο παθολογική) και υψηλού (και οι δύο παθολογικές) κινδύνου. Όμως, τόσο η χολερυθρίνη όσο και η αλβουμίνη επηρεάζονται σε προχωρημένα στάδια της νόσου, οπότε δεν αποτελούν προγνωστικούς δείκτες σε πρώιμο στάδιο. Επιπλέον, υψηλότερες τιμές ALP σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση ανεξαρτήτως της χρονικής στιγμής προσδιορισμού της (135,141,184).

Η συσχέτιση των AMA με την πρόγνωση της νόσου παραμένει ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα. Οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των AMA και της σοβαρότητας της νόσου ή της ανταπόκρισης στη θεραπεία (185) ωστόσο σύμφωνα με άλλες μελέτες υψηλοί τίτλοι AMA σχετίζονται με εξελισσόμενη νόσο ενώ τα επίπεδα των AMA στον ορό αντανακλούν το βαθμό ηπατικής ανεπάρκειας (186). Τα AMA μπορεί να αφορούν και τους τρεις κύριους ισότυπους των ανοσοσφαιρινών (IgA, IgG, IgG). Η ανεύρεση AMA του ισοτύπου IgG3 πιθανώς σχετίζεται με σοβαρότερη νόσο πιθανότατα λόγω της ιδιότητας του ισοτύπου αυτού να ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και να ενεργοποιεί μηχανισμούς ιστικής καταστροφής (173).

Επιπλέον, η ανεύρεση θετικών ANA αντισωμάτων ειδικών για τη νόσο φαίνεται να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, ειδικά στις περιπτώσεις που τα ANA εκφράζουν

τον IgG3 ισότυπο της IgG ανοσοσφαιρίνης (186,187). Η ανίχνευση των anti-gp210 έχει συσχετισθεί με χειρότερη ανταπόκριση στη θεραπεία ενώ η στενή παρακολούθηση των τίτλων των anti-sp100 μπορεί να βοηθήσει στην κατηγοριοποίηση των ασθενών όσο αφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία καθώς τα εμμένοντα υψηλά επίπεδά τους υποδηλώνουν χειρότερη θεραπευτική ανταπόκριση (186,188).

2.10.4. Προσδιορισμός του βαθμού ηπατικής ίνωσης

Όσο αφορά στο βαθμό ηπατικής ίνωσης, έχει φανεί ότι τιμές ελαστογραφίας ήπατος μεγαλύτερες από 9,6 kPa σχετίζονται με 5 πλάσιο κίνδυνο ρήξης της αντιρρόπησης, μεταμόσχευσης ήπατος ή θανάτου. Επιπλέον, η προοδευτική αύξηση των τιμών του ελαστογραφήματος σχετίζεται ισχυρότερα με την ανίχνευση των ασθενών που θα έχουν χειρότερη έκβαση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης της προόδου της νόσου (189).

2.10.5. Ιστολογικά ευρήματα

Όσο αφορά στα ιστολογικά ευρήματα, η ανεύρεση προχωρημένου ιστολογικού σταδίου της νόσου έχει συσχετισθεί με χειρότερη πρόγνωση. Ο βαθμός περιπυλαιάς ηπατίτιδας θεωρείται ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ανάπτυξη κίρρωσης ενώ η παρουσία ποροπενίας σχετίζεται με την πρόοδο του ιστολογικού σταδίου. Ωστόσο μετά την ανάπτυξη των μη επεμβατικών μεθόδων προσδιορισμού του βαθμού ηπατικής ίνωσης η συνεισφορά της βιοψίας ήπατος στην εκτίμηση της πρόγνωσης θεωρείται περιορισμένη (190,191).

2.10.6. Ανταπόκριση στη θεραπεία

Η ανταπόκριση στη θεραπεία μπορεί να αξιολογηθεί είτε χρησιμοποιώντας απλές βιοχημικές παραμέτρους είτε χρησιμοποιώντας συστήματα βαθμονόμησης “scoring systems”. Οι δύο πιο σημαντικές βιοχημικές παράμετροι είναι η ALP και η ολική χολερυθρίνη. Αυτός είναι και ο λόγος που τα κριτήρια του Παρισιού-1, **Πίνακας 5**, έχουν την καλύτερη απόδοση στο διαχωρισμό των ασθενών χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι παρ’ότι οι τιμές της ALP έχουν προγνωστικό χαρακτήρα, η διαγνωστική ακρίβεια στον καθορισμό ασθενών υψηλού κινδύνου δε φάνηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ 1,5 , 1,67 και 3 x το ανώτερο φυσιολογικό όριο (178). Με δεδομένο ότι το ιστολογικό στάδιο της νόσου επηρεάζει

την ανταπόκριση στη θεραπεία, τα κριτήρια του Παρισιού-II, **Πίνακας 5**, σχεδιάστηκαν για τους ασθενείς που εμφανίζονται σε πρώιμο στάδιο της νόσου κι αντιπροσωπεύουν τα 2/3 του συνόλου των ασθενών (192).

Τα νεώτερα συστήματα βαθμονόμησης εμπεριέχουν τόσο μετρήσεις σχετικές με την ανταπόκριση στη θεραπεία όσο και στατικές παραμέτρους καθορισμού της σοβαρότητας της νόσου. Το Globe score και το UK-PBC score, **Πίνακας 5**, έχουν την καλύτερη απόδοση στην πρόβλεψη του θανάτου ή της ανάγκης για μεταμόσχευση ήπατος ενώ το Mayo risk score προβλέπει την επιβίωση των ασθενών με ΠΧΧ χωρίς μεταμόσχευση. Σύμφωνα μάλιστα με το Globe score το 40% των ασθενών που βρίσκεται υπό θεραπεία με UDCA (ursodeoxycholic acid) αναμένεται να έχουν μικρότερη επιβίωση χωρίς μεταμόσχευση συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (193–196).

Πίνακας 5: Βιοχημικές παράμετροι και συστήματα βαθμονόμησης για τον καθορισμό ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς με ΠΧΧ

Βιοχημικές παράμετροι	Χρόνος σε μήνες	Μη ανταπόκριση στη θεραπεία
Barcelona (197)	12	Μείωση ALP $\leq 40\%$ και ALP $\geq 1 \times \text{ULN}$
Rochester (198)	6	ALP $\geq 2 \times \text{ULN}$ or Mayo score ≥ 4.5
Ehime (199)	6	Μείωση $\gamma\text{GT} \leq 70\%$ και $\gamma\text{GT} \geq 1 \times \text{ULN}$
Rotterdam (200)	12	Χολερυθρίνη $\geq 1 \times \text{ULN}$ και/ή αλβουμίνη $< 1 \times \text{ULN}$
Toronto (191)	24	ALP $> 1,67 \times \text{ULN}$
Paris-I (178)	12	ALP $\geq 3 \times \text{ULN}$, ή AST $\geq 1 \times \text{ULN}$
Paris-II (192)	12	ALP $\geq 1,5 \times \text{ULN}$, ή AST $\geq 1,5 \times \text{ULN}$, ή χολερυθρίνη $> 1\text{mg/dl}$
Συτήματα βαθμονόμησης	Χρόνος σε μήνες	
Globe score (195)	12	Χολερυθρίνη, ALP, αλβουμίνη και τιμή αιμοπεταλίων στους 12 μήνες θεραπείας, ηλικία κατά τη διάγνωση
UK-PBC score (193)	12	Χολερυθρίνη, ALP και AST ή ALT στους 12 μήνες θεραπείας, αλβουμίνη και τιμή αιμοπεταλίων κατά τη διάγνωση.

ALP: αλκαλική φωσφατάση, AST: ασπαρτική αμινοτρασφεράση, ALT: αλανινική αμινοτρασφεράση, ULN: ανώτερη φυσιολογική τιμή

2.11. Θεραπεία

2.11.1. Εγκεκριμένη θεραπεία

Η θεραπεία πρώτης γραμμής για την ΠΧΧ είναι το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA). Το UDCA αποτελεί φυσιολογικά το 1-3% του συνόλου των χολικών οξέων της χολής ενώ με τη θεραπεία γίνεται το κύριο χολικό οξύ. Το UDCA δρα μετα-μεταγραφικά ευοδώνοντας τη μεταφορά των πρωτεϊνών-μεταφορέων προς τη μεμβράνη των χολαγγειοκυττάρων, ευοδώνοντας την έκκριση HCO_3^- , χολικών οξέων οργανικών ανιόντων, σταθεροποιώντας την «ομπρέλα των HCO_3^- » ενώ παράλληλα έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο στα χολαγγειοκύτταρα και τα ηπατοκύτταρα (141,201). Το UDCA χορηγείται σε δόση 13-15mg/kg σε μία ή σε δύο δόσεις ημερησίως ενώ η χρήση του θεωρείται ασφαλής με τις μελέτες να αναφέρουν ελάχιστες παρενέργειες και λιγότερο από 20% απόσυρση του φαρμάκου λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών (141,201–203). Παράλληλα φάνηκε έως και 5 πλάσια μείωση της ετήσιας εξέλιξης της νόσου από το πρώιμο στάδιο σε νόσο τελικού σταδίου ενώ η πιθανότητα παραμονής της νόσου σε πρώιμο στάδιο για τα επόμενα 4 χρόνια ανέρχεται στο 76% (204). Επιπλέον η χρήση του UDCA, βελτιώνει την ελεύθερη επιβίωση των ασθενών, ανεξαρτήτως σταδίου της νόσου και της βιοχημικής ανταπόκρισης (205)

Παρ' όλα αυτά έως και 40% των ασθενών μπορεί να μην ανταποκριθεί στη θεραπεία με UDCA γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο προόδου της νόσου. Η εγκεκριμένη θεραπεία δεύτερης γραμμής είναι ομπεταχολικό οξύ (OCA) (206). Το OCA δρα στον πυρηνικό υποδοχέα FXR και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή, έκκριση και μεταφορά των χολικών οξέων. Η θεραπεία με OCA έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη βελτίωση των βιοχημικών δεικτών σε ασθενείς με $\text{ALP} > 1,67 \times \text{ULN}$ ή/και με χολερυθρίνη $< 2 \times \text{ULN}$ και έχει εγκριθεί ως θεραπευτική προσθήκη σε ασθενείς που παρουσιάζουν μερική ανταπόκριση στη θεραπεία με UDCA, σε δόση 5 έως 10 mg/dl ημερησίως. Η κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η εμφάνιση ή η επιδείνωση προϋπάρχοντος κνησμού γεγονός που αντιμετωπίζεται με τιτλοποίηση της δόσης ή προσθήκη ριφαμπικίνης (141,206–208).

2.11.2. Μη εγκεκριμένες θεραπείες

Η βουδεσονίδη είναι ένα συνθετικό κορτικοστεροειδές με υψηλό μεταβολισμό πρώτης δόδου από το ήπαρ με αποτέλεσμα να μην εμφανίζει τις συστηματικές παρενέργειες

των κορτικοειδών. Ωστόσο αυτό δεν ισχύει σε κίρρωτικούς ασθενείς, οι οποίοι εμφανίζουν παρενέργειες και για το λόγο αυτό το φάρμακο αντενδείκνυται στους ασθενείς αυτούς. Η βουδεσονίδα χορηγείται μαζί με UDCA σε δόση από 3 έως 9 mg την ημέρα και φαίνεται να είναι αποτελεσματική στη βελτίωση των ιστολογικών ευρημάτων και της ηπατικής βιοχημείας (209).

Οι φιμπράτες έχουν αντι-χολοστατική δράση, μέσω ενεργοποίησης του PPAR υποδοχέα (peroxisome proliferator-activated receptor), αλλά και της απενεργοποίησης οδών σύνθεσης των χολικών οξέων. Η bezafibrate συνδέεται και με τους PPAR υποδοχείς, οδηγώντας σε μειωμένη σύνθεση χολικών οξέων, ενώ παράλληλα έχει αντι-ινωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Η προσθήκη φιμπράτης (bezafibrate 400 mg/ημέρα ή fenofibrate 10-200 mg/ημέρα) στο UDCA σε ασθενείς μη ανταποκρινόμενους φαίνεται ότι οδηγεί σε βιοχημική ύφεση >50% των ασθενών, και πιθανά βελτιώνει την επιβίωση. Κύριες παρενέργειες των φιμπρατών είναι η πρόκληση μυαλγιών (5-10% των ασθενών), τρανσαμινασαιμίας και αύξησης της κρεατινίνης ορού. Η χρήση τους ωστόσο δεν έχει μελετηθεί σε ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση οπότε και θα πρέπει να αποφεύγεται σε αυτούς τους ασθενείς (203,210).

2.12. Αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και των εξωηπατικών εκδηλώσεων

Η αντιμετώπιση των εξωηπατικών εκδηλώσεων της ΠΧΧ καθίσταται εξαιρετικής σημασίας λόγω της επίπτωσής τους στην καθημερινότητα του ασθενούς. Ο κνησμός είναι το κυριότερο από τα συμπτώματα της νόσου, μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και σε πρώιμα στάδια ενώ μπορεί να επιδεινώνεται με την εξέλιξη της νόσου. Η αντιμετώπιση του κνησμού στηρίζεται στη δέσμευση των χολικών οξέων και φάρμακο πρώτης γραμμής που χορηγείται σε συνδυασμό με τη θεραπεία με UDCA είναι η χολεστυραμίνη η οποία χορηγείται 2-4 ώρες πριν από τα γεύματα και μειώνει την εντερική απορρόφηση των χολικών αλάτων (211). Η ριφαμπικίνη χορηγείται ως φάρμακο δεύτερης γραμμής για την αντιμετώπιση του επίμονου κνησμού λόγω της δράσης στον υποδοχέα pregnane X των χολικών αλάτων και της χολαιρετικής της δράσης (212). Η ναλτρεξόνη αποτελεί το φάρμακο τρίτης γραμμής και χρησιμοποιείται με σκοπό τη μείωση του αισθήματος κνησμού με τη δράση της στο κεντρικό νευρικό σύστημα (213) ενώ η χρήση ανταγωνιστών των σεροτονινεργικών υποδοχέων καθώς και της autotaxin του ορού έχει επίσης περιγραφεί (149,154,213). Σε περίπτωση μη

ανταπόκρισης σε καμία από τις ανωτέρω θεραπείες ενδείκνυται η μεταμόσχευση ήπατος.

Η κόπωση εμφανίζεται σε περίπου 50% των ασθενών, δε σχετίζεται με το στάδιο της νόσου και συνήθως δεν ανταποκρίνεται στη συνήθη θεραπεία. Δυστυχώς ειδική θεραπεία δεν υπάρχει ενώ έχει δοκιμαστεί η χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων σεροτονίνης (203).

2.13. Μεταμόσχευση Ήπατος

Οι ενδείξεις για μεταμόσχευση ήπατος στην ΠΧΧ είναι οι ίδιες με αυτές των άλλων νοσημάτων του ήπατος. Οι ασθενείς θα πρέπει να θεωρούνται υποψήφιοι για μεταμόσχευση ήπατος όταν έχουν εμφανιστεί ήδη οι επιπλοκές της κίρρωσης ή όταν το MELD score (model for end stage liver disease) είναι ≥ 15 , η τιμή της χολερυθρίνης > 6 mg/dl ή ο ασθενής εμφανίζει βασανιστικό κνησμό. Η χρόνια κόπωση δεν αποτελεί ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος καθώς συνήθως δεν υποχωρεί μετά από αυτή. Η επανεμφάνιση της ΠΧΧ μετά τη μεταμόσχευση ανέρχεται στο 20% ωστόσο σπάνια επηρεάζει την ελεύθερη επιβίωση του ασθενούς ή του μοσχεύματος (184,203,214).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Επιγενετική και Αυτοανοσία

3.1. Επιγενετικοί μηχανισμοί

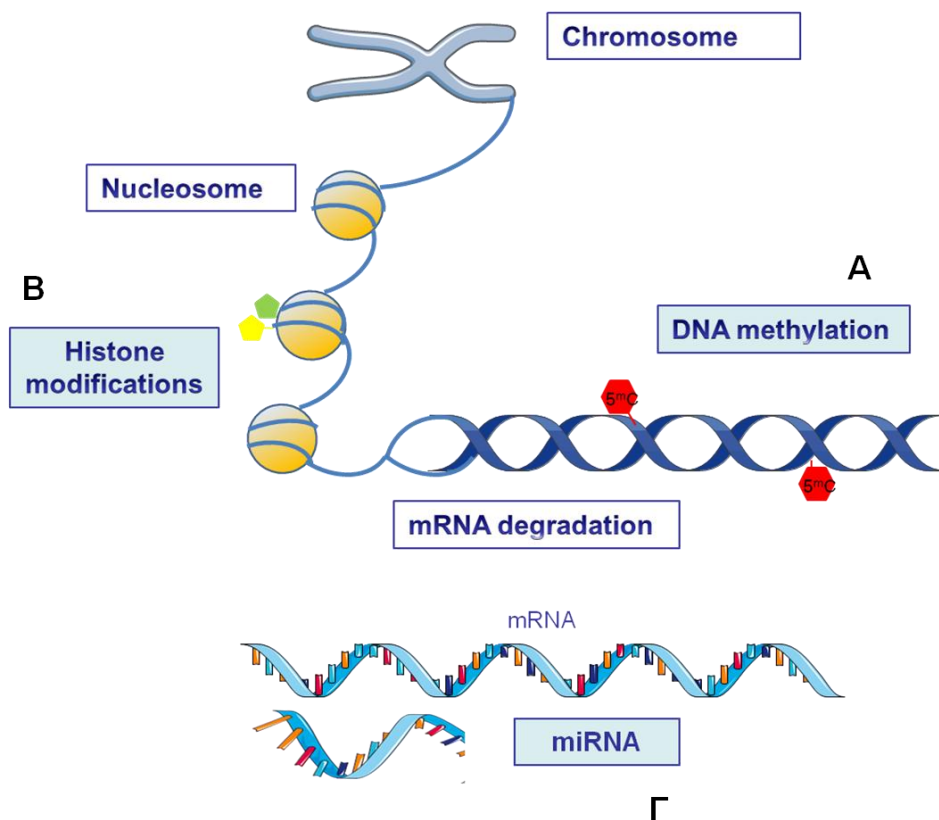
Τα αυτοάνοσα νοσήματα θεωρούνται πολυπαραγοντικές νόσοι στις οποίες το γενετικό υπόβαθρο συμμετέχει στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου, αποδεικνύεται όμως ανεπαρκές στο να εξηγήσει πλήρως την αιτιολογία και την παθογένειά τους. Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί στην ανάπτυξη αυτοανοσίας παραμένει κατά ένα μεγάλο μέρος ανεξήγητη παρ' ότι αλλαγές στην αλληλουχία και έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη αυτοανόσων μηχανισμών.

Ο όρος «επιγενετική» αναφέρεται σε σταθερές και μεταβιβαζόμενες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση, οι οποίες ωστόσο είναι αναστρέψιμες, αφορούν συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και δεν προκαλούν αλλαγές στον γενετικό κώδικα. Ως εκ τούτου η επιγενετική, κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική ανάπτυξη, υπό την επίδραση βιολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Βιολογικοί παράγοντες όπως η ηλικία και το φύλο, αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως φάρμακα, ξενοβιοτικά και χημικές ουσίες, επηρεάζουν το επιγενετικό πρότυπο των κυττάρων υποστηρίζοντας με τον τρόπο αυτό τη συσχέτιση που έχει παρατηρηθεί μεταξύ περιβαλλοντικών παραγόντων και ηλικίας και της ανάπτυξης αυτοανόσων νοσημάτων. Επιπρόσθετα, η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των αυτοανόσων νοσημάτων στο γυναικείο φύλο, θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί σε επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες εμπλέκονται στην απενεργοποίηση των γονιδίων του ενός εκ των δύο X χρωμοσωμάτων (215–217).

Εφόσον οι γενετικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα, δεν έχουν κατορθώσει να διαλευκάνουν πλήρως τους παθογενετικούς μηχανισμούς των αυτοανόσων νοσημάτων θεωρείται, ότι η μελέτη των επιγενετικών μονοπατιών είναι αυτή που θα οδηγήσει στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν και προκαλούν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και διαταραχή στην ανοσολογική ομοιόσταση. Επιπλέον, η αντιστρεπτή φύση των επιγενετικών αλλαγών δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων θεραπειών. Για το λόγο αυτό, οι μελέτες που αφορούν στη διερεύνηση των επιγενετικών μηχανισμών των νοσημάτων έχουν αυξηθεί

δραματικά τα τελευταία χρόνια, αποδεικνύοντας τη σημασία της διερεύνησής τους για την επίτευξη του τελικού σκοπού που είναι η στοχευμένη και αποτελεσματικότερη θεραπεία (218–220).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στα ευκαρυωτικά κύτταρα περιλαμβάνουν τρεις κύριους μηχανισμούς, τη μεθυλίωση του DNA, τις τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών με αντιδράσεις ακετυλίωσης, μεθυλίωσης, φωσφορυλίωσης και συμπικτινιποίησης και τα μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα, miRNAs, όπως αυτοί περιγράφονται στην **Εικόνα 4** (158,215).



Arvaniti et al, *Epigenomes* 2019 (158)

Εικόνα 4: Οι επιγενετικοί μηχανισμοί στα ευκαρυωτικά κύτταρα περιλαμβάνουν: Α) τη μεθυλίωση του DNA, Β) τις τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών και Γ) τα μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα-miRNAs. Α) Η μεθυλίωση του DNA είναι το αποτέλεσμα μεταξύ της 5^mC και $5^{hm}C$ στα CpG νησίδια, μία διαδικασία που καταλύεται από τις DNMTs και TETs αντίστοιχα. Η μεθυλίωση οδηγεί σε δομικές αλλαγές της χρωματίνης που με τη σειρά της οδηγεί σε αλλαγή, συνήθως αναστολή, της έκφρασης του γονιδίου. Β) Η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, ένα σύμπλεγμα νουκλεοπρωτεϊνών το οποίο αποτελείται από το DNA που τυλίγεται γύρω από το οκταμερές των ιστονών. Τα Ν-τελικά άκρα των

ιστονών υφίστανται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, κυρίως με αντιδράσεις μεθυλίωσης, φωσφορυλίωσης, ακετυλίωσης και ουμπικιτινοποίησης. Οι τροποποιήσεις των ιστονών τείνουν να αυξάνουν την μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων. Γ) Τα miRNAs προσδένονται στο mRNA το οποίο κι οδηγούν σε επικείμενη καταστροφή από το πρωτεάσωμα μειώνοντας έτσι την μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων.

DNMTs: DNA methyl-transferases, TETs: Ten eleven translocation deoxygenase, mRNA: messenger RNA, miRNA: micro-RNA

3.1.1. Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ο κύριος παράγοντας επιγενετικής τροποποίησης των ευκαρυωτικών κυττάρων και περιλαμβάνει την προσθήκη μίας μεθυλομάδας στη θέση 5' του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης που οδηγεί στη δημιουργία της 5' μεθυλκυτοσίνης (5^mC). Η διαδικασία αυτή συμβαίνει σε δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης- γουανίνης (CpG) σε περιοχές που ονομάζονται CpG-νησίδια κι αποτελούν το 76% των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων. Το επίπεδο μεθυλίωσης των CpG νησιδίων, οδηγεί σε δομικές αλλαγές της χρωματίνης που μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του εκκινήτη ενός γονιδίου οδηγεί στην πρόσδεση των μεθυλ-CpG-δεσμευτικών πρωτεϊνών, όπως η MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) και MBD2 (methyl-CpG-binding domain protein 2) οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στην πρόσδεση συμπλόκων απενεργοποίησης της χρωματίνης τα οποία περιλαμβάνουν αποακετυλάσες (HDACs-histone deacetylases) και μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs-histone methyl-transferases) των ιστονών. Η διαδικασία της μεθυλίωσης καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται μεθυλ-τρανσφεράσες (DNMTs: DNA methyl-transferases) και περιλαμβάνουν τη DNMT1, DNMT3A και DNMT3B ενώ ως δότης μεθυλομάδων χρησιμοποιείται η S-adenosylmethionine (SAM). Οι DNMT3A και DNMT3B σχετίζονται με την “de novo” μεθυλίωση ενώ η DNMT1 σχετίζεται με τη διατήρηση της μεθυλίωσης κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA (158,215,218–220).

Πρόσφατα περιγράφηκε μία ενεργός διαδικασία απομεθυλίωσης που περιλαμβάνει τη δράση των δεοξυγενασών, Ten-Eleven Translocation (TET) deoxygenases (TET1, TET2, TET3). Οι TETs οξειδώνουν την 5^mC σε 5'υδροξυμεθυλ-κυτοσίνη (5^{hm}C) και κατ' επέκταση σε 5-formylcytosine (5-fCyt) και 5-carboxylcytosine (5-CaCyt) με τη χρήση του α-ketoglutarate (α-KG) με οξυγόνο και σίδηρο ως συμπαραγόντες. Η διαδικασία αυτή αντιπροσωπεύει ένα νέο μηχανισμό μέσω του οποίου το DNA μπορεί

να απομεθυλιωθεί μέσω των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, thymine DNA glycosylase (TDG)/base excision repair (BER) (158,221–223) **Εικόνα 5.**

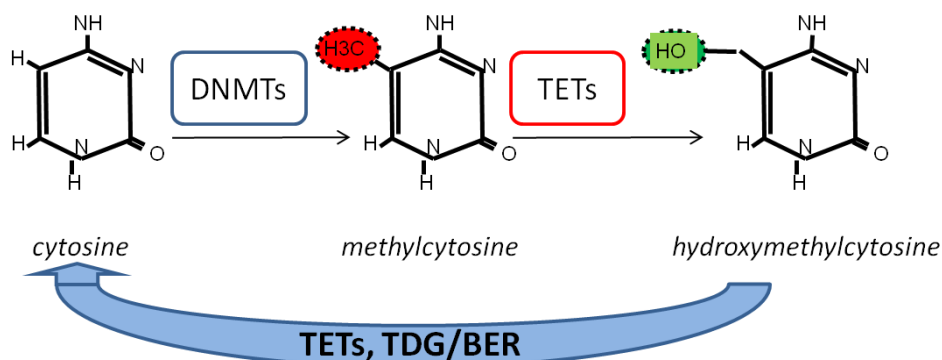
Οι αλλαγές στο επίπεδο της μεθυλίωσης τόσο σε περιφερικά λεμφοκύτταρα όσο και κύτταρα των ιστών στόχος, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη των αυτοανόσων νοσημάτων. Στο ΣΕΛ έχει παρατηρηθεί μείωση της ολικής μεθυλίωσης στα λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ η οποία μάλιστα φαίνεται να σχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου (224,225). Επιπλέον, πρόσφατα περιγράφηκε η αύξηση της ολικής υδροξυμεθυλίωσης του DNA σε συνδυασμό με την αύξηση των TETs στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ (226). Αντίστοιχα στο σύνδρομο Sjögren έχει παρατηρηθεί μείωση του επιπέδου μεθυλίωσης στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων σε αντίθεση με τα διηθούντα τον αδένα B λεμφοκύτταρα (227).

Εκτός από γονιδιακές περιοχές πλούσιες σε CpG αλληλουχίες, CpG υπάρχουν και σε περιοχές του DNA που δεν μεταγράφονται καθώς δεν αποτελούν γονίδια και χαρακτηρίζονται ως “junk DNA”. Εκεί, οι CpG αλληλουχίες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με περιοχές με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, όπως τα transposons, αλλά και με καλά συντηρημένες κατά τη διάρκεια της εξέλιξης περιοχές όπως τα ρετροστοιχεία (retroelements), που αποτελούν συνολικά το 2.8% και το 41.5% του ανθρώπινου γονιδιώματος, αντίστοιχα. Τα ρετροστοιχεία υποδιαιρούνται σε τρεις κατηγορίες: τα LINEs (long interspersed nuclear elements), που αποτελούν το 20.1% του ανθρώπινου γονιδιώματος, τα ALU (short interspersed nuclear elements), που αποτελούν το 10.6% (όπως π.χ. τα MIR) και τις αλληλουχίες των ενδογενών ρετροϊών (HERVs-human endogenous retroviruses), που αποτελούν το 8.3% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το μεγαλύτερο μέρος των retroelements είναι μεθυλιωμένο στα σωματικά κύτταρα με αποτέλεσμα να μην εκφράζεται. Η υπομεθυλίωση κι η ενεργοποίηση των αλληλουχιών αυτών φαίνεται να επηρεάζει αρκετές λειτουργίες, όπως τον έλεγχο της έκφρασης διαφόρων γονιδίων ρυθμίζοντας τους ενεργοποιητές ή τους καταστολείς τους (215,228,229).

Η υπομεθυλίωση κι η ενεργοποίηση των retroelements έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ), η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (ΡΑ) και η ψωρίαση. Στον ΣΕΛ, έχει δειχθεί ότι το LINE-1 είναι σημαντικά υπομεθυλιωμένο στα CD4+ T λεμφοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα ασθενών που είναι σε έξαρση της νόσου. Τα ίδια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στους ασθενείς με ψωρίαση. Στη ΡΑ έχουν ανιχνευθεί άφθονα μετάγραφα του LINE-1 στο

αρθρικό υγρό των ασθενών, καθώς και υπομεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του LINE-1 στους αρθρικούς ινοβλάστες. Αντίστοιχα στο σύνδρομο Sjögren τα μετάγραφα του LINE-1 υπερεκφράζονται στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων και η υπερέκφραση αυτή σχετίζεται με την παραγωγή IFNα (220,228,230–232).

Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη επιγενετικών αλλαγών σχετιζόμενες με την ανίχνευση των HERVs στα αυτοάνοσα νοσήματα. Οι πρωτεΐνες των HERVs δεν εκφράζονται, αν δεν παραβλάπτεται η λειτουργία των επιγενετικών μηχανισμών. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι ιοί, η υπεριώδης ακτινοβολία και διάφορα φάρμακα είναι γνωστό ότι απορυθμίζουν την έκφραση των HERVs σε ορισμένα κύτταρα, υποστηρίζοντας ότι τα στοιχεία των HERVs παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη ή/και στην εξέλιξη των αυτοανόσων νοσημάτων. Εκτός από την υπομεθυλίωση και την ενεργοποίηση των retroelements, στο ΣΕΛ, που αποτελεί μοντέλο στη μελέτη της παθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων, επιγενετικές αλλαγές έχουν αναφερθεί σε διάφορους κυτταρικούς υποτύπους, όπως τα CD4+ T κύτταρα, τα B κύτταρα και τα μονοκύτταρα μεταξύ των ασθενών με ΣΕΛ και υγιών μαρτύρων, υποδεικνύοντας πως η υπομεθυλίωση αποτελεί κυρίαρχο χαρακτηριστικό της νόσου (220,225,226,233–235).



Charras et al, Clin Rev Immunol 2019 (236)

Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA.

DNMTs: DNA methyl-transferases, TETs: Ten eleven translocation deoxygenases. TDG/BER: thymine DNA glycosylase/base excision repair

3.1.2. Τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών

Το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική μονάδα χρωματίνης που αποτελείται από 146 ζεύγη βάσεων DNA τυλιγμένα γύρω από το οκταμερές δύο αντιγράφων κάθε μίας από τις H2A, H2B, H3 και H4 τάξεις των ιστονών. Οι ιστόνες είναι μικρού μεγέθους πρωτεΐνες που φέρουν ένα ευέλικτο N-τελικό άκρο που προεξέχει του νουκλεοσώματος. Οι θέσεις επιγενετικής τροποποίησης της χρωματίνης αποτελούνται κυρίως από κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης και σερίνης. Τα κατάλοιπα αυτά τροποποιούνται μετα-μεταγραφικά κυρίως μέσω αντιδράσεων ακετυλίωσης, μεθυλίωσης, φωσφορυλίωσης και ουμπικιτινοποίησης (237). Οι τροποποιήσεις των ιστονών έχουν ένα λιγότερο προβλέψιμο αποτέλεσμα στη γονιδιακή έκφραση συγκριτικά με τη μεθυλίωση του DNA, το οποίο εξαρτάται από τη φύση και την εντόπισή τους. Κατά κανόνα ωστόσο, οι επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών τείνουν να αποσταθεροποιούν το DNA και έχουν συσχετιστεί με την απώλεια της ανοσοανοχής και την ανάπτυξη αυτοανοσίας (223,237–239).

Στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ έχει παρατηρηθεί αποακετυλίωση των H3 και H4 και υπερμεθυλίωση (H3k9me2/3 and H3K4me) σε συνδυασμό με μειωμένη έκφραση των HDACs. Αντίθετα στους ασθενείς με ΡΑ, παρατηρείται υπερέκφραση των HDACs στα κύτταρα του αρθρικού θυλάκου και η χρήση ειδικών siRNAs (silencer RNAs) ανέδειξε τον κεντρικό ρόλο που κατέχουν οι HDACs στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων του αρθρικού υμένα (239,240).

3.1.3. miRNAs

Τα miRNAs αποτελούν μονόκλιωνα μόρια, μήκους 19 έως 22 νουκλεοτιδίων τα οποία ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα mi-RNAs δημιουργούνται στον πυρήνα σαν πρωτογενή mRNA από την RNA πολυμεράση II και στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου ωριμάζουν σε mi-RNAs. Τα περισσότερα από αυτά προσδένονται στο 3'-μη μεταφραζόμενο άκρο του RNA στόχος γεγονός που οδηγεί είτε σε αποδόμηση του RNA, είτε σε καταστολή του. Η σύνδεση του miRNA στο mRNA αναστέλει το σχηματισμό της πρωτεΐνης, ενώ κάποια από αυτά αλληλεπιδρούν με γονίδια που ρυθμίζουν τη μεθυλίωση του DNA και των ιστονών. Τα miRNAs παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς το όργανο στόχο και ρυθμίζουν μία πληθώρα ανοσιακών αποκρίσεων όπως τα μονοπάτια παραγωγής κυτταροκινών τα

οποία κατ'επέκταση ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Η διαταραχή στην έκφραση των mi-RNAs σχετίζεται με την έναρξη και εξέλιξη των αυτονόσων νοσημάτων όπως το σύνδρομο Sjögren και η ΠΧΧ (241–243). Για παράδειγμα στο σύνδρομο Sjögren παρατηρείται καταστολή του miRNAlet-7b, γεγονός που σχετίζεται με απώλεια της ρύθμισης σε μεταγραφικό επίπεδο των δ'το κύριων αυτοαντιγόνων, του SSA/Ro και SSB/La αντίστοιχα (244). Αντίστοιχα στην ΠΧΧ, η αύξηση του miR-506 οδηγεί σε διαταραχή της λειτουργίας της ομπρέλας των διαττανθρακικών, γεγονός που πιθανότατα εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου (245).

3.2. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στα αυτοάνοσα νοσήματα

3.2.1. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο ΣΕΛ

Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στην εμφάνιση και την εξέλιξη του ΣΕΛ έχει μελετηθεί ιδιαίτερα, τα τελευταία χρόνια με τη μεθυλίωση του DNA να είναι ο κυριότερος επιγενετικός μηχανισμός (224,246). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μείωση της ολικής μεθυλίωσης στα λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ η οποία μάλιστα φαίνεται να σχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου (224,225). Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων παραγωγής κυτταροκινών είναι υπομεθυλιωμένος στα CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των γονιδίων αυτών και των αντίστοιχων κυτταροκινών που συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου (224). Για παράδειγμα, η υπερπαραγωγή της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) φαίνεται να συμμετέχει στη διαφοροποίηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων και στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών (247). Επιπλέον, πιο πρόσφατα βρέθηκε ότι η υπομεθυλίωση αφορά γονίδια των CD4(+) λεμφοκυττάρων που ρυθμίζονται από τις IFNs όπως για παράδειγμα τα γονίδια του i) ρυθμιστικός παράγοντας της IFN (interferon regulatory factor 7): *IRF7* ii) διαμεμβρανική πρωτεΐνη επαγόμενη από την IFN 1 (interferon-induced transmembrane protein 1): *IFITM1* και iii) γονίδιο ενεργοποιούμενο από την IFN 15 (interferon-stimulated gene 15): *ISG15*. Μάλιστα η IFN τύπου I (IFN α) φαίνεται να παίζει προεξάρχοντα ρόλο στη παθοφυσιολογία του ΣΕΛ γεγονός που περιγράφεται ως το λεγόμενο «αποτύπωμα της IFN» (IFN signature) (248,249).

Ένα ακόμη εύρημα που υποστηρίζει τη συμμετοχή της μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων στη παθοφυσιολογία του ΣΕΛ είναι η πλημμελής μεθυλίωση των

αλληλουχιών των HERVs. Συγκεκριμένα μελέτες που αφορούν τα CD5(+) B λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ, κατέδειξαν την υπομεθυλίωση του εκκινήτη του CD5E-1B, ενός γονιδίου που αποτελεί προϊόν σύντηξης μεταξύ του CDE-1A και της 5'-long terminal repeat (LTR) αλληλουχίας του HERV. Η υπομεθυλίωση αυτή οδηγεί σε υπερέκφραση του CD5E-1B εις βάρος της μεμβρανικής ισομορφής CD5E-1A, γεγονός που οδηγεί σε διαταραχή της λειτουργίας των υποδοχέων των B λεμφοκυττάρων (BCR) και την πυροδότηση μονοπατιών αυτοανοσίας (247). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το HRES-1, η πρότυπη αλληλουχία του HERV, υπερεκφράζεται στα B λεμφοκύτταρα των ασθενών, γεγονός που οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα του Erk/DNMT1 μονοπατιού να μεθυλιώσει τον εκκινήτη του. Η διαδικασία αυτή σχετίζεται με την υπεραπαγωγή IL-6 από τα B λεμφοκύτταρα των ασθενών καθώς η αναστολή της δράσης της IL-6 αντιστρέφει το αποτέλεσμα αυτό (250).

Εκτός όμως από τη μεθυλίωση, η υδροξυμεθυλίωση του DNA φαίνεται να παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του ΣΕΛ. Πρόσφατα περιγράφηκε η αύξηση της ολικής υδροξυμεθυλίωσης του DNA σε συνδυασμό με αυξημένη έκφραση των TETs στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα των ασθενών, ενώ προηγούμενες μελέτες έδειξαν μείωση της έκφρασης των DNMT1 και DNMT3A στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό (226,251).

Πέρα όμως από τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ένας μεγάλος αριθμός ενδο- και εξωκυττάρων σηματοδοτικών μορίων ρυθμίζεται από τη μεθυλίωση του DNA και παρουσιάζει διαφοροποιήσεις στα B και T λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ συγκριτικά με αυτά των υγιών μαρτύρων. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί υπομεθυλίωση των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων του TNF ligand superfamily member 7: *TNFSF7* (CD70/CD62L) (233) και του TNF ligand superfamily member 5: *TNFSF5* (CD40L/CD154) στα T λεμφοκύτταρα (252) και του cluster of differentiation 5: *CD5* στα B λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ (247). Τέλος, η υπομεθυλίωση ρυθμιστικών περιοχών πιθανώς σχετίζεται με τη λειτουργία των miRNAs, καθώς το miR126 έχει συσχετισθεί με μειωμένη έκφραση της DNMT1 στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα των ασθενών οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των CD11A and CD70 συνδιεγερτικών μορίων, που οδηγεί με τη σειρά της σε αυξημένη δραστηριότητα των B και T λεμφοκυττάρων (253).

3.2.2. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο σύνδρομο Sjögren

Το σύνδρομο Sjögren αποτελεί χρόνια αυτοάνοσο νόσημα που προσβάλλει κυρίως γυναίκες και χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση των εξωκρινών αδένων, κυρίως των σιελογόνων και δακρυϊκών αδένων, οδηγώντας προοδευτικά στην καταστροφή τους και την ανάπτυξη ξηροστομίας και ξηροφθαλμίας. Η αιτιοπαθογένεια του συνδρόμου παραμένει έως και σήμερα κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστη, ωστόσο η συμμετοχή των επιγενετικών μηχανισμών στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου έχει μελετηθεί ιδιαίτερα, τα τελευταία χρόνια (236,254–256).

Επιγενετικές μελέτες σε κύτταρα των σιελογόνων αδένων έχουν δείξει μείωση της ολικής μεθυλίωσης του DNA η οποία σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της DNMT1 και αφορά κυρίως σε γονίδια η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από την IFN (227,257,258). Σε αντίθεση με τα κύτταρα των σιελογόνων αδένων, υψηλότερα επίπεδα 5^{mC} και DNMTs παρατηρήθηκαν στα Β και Τ λεμφοκύτταρα που διηθούν τους αδένες μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων (227). Μελέτες που αφορούν ωστόσο, στον προσδιορισμό της μεθυλίωσης μεμονωμένων CpG περιοχών κατά μήκος του γονιδιώματος (Epigenome Wide Association Studies) ανέδειξαν σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των διαφορετικά μεθυλιωμένων CpG επιτόπων ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και τα Β και Τ λεμφοκύτταρα των ίδιων ασθενών (227,258–260). Επιπλέον, οι συγκεκριμένες CpG αλληλουχίες αφορούν γονίδια των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από την IFN ενώ το ποσοστό μεθυλίωσης των περιοχών αυτών σχετίζεται με το επίπεδο των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών (260). Η ολική μεθυλίωση στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων σχετίζεται επιπλέον, αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων που διηθούν τον αδένα και αποκαθίσταται μετά τη χορήγηση θεραπείας με anti-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα (261).

Εκτός όμως από τη μείωση της DNMT1 παρατηρήθηκε επιπλέον αύξηση της έκφρασης της TET2 σε συνδυασμό με την αύξηση των επιπέδων της ολικής 5^{hmC} που αφορά στα επιθηλιακά κύτταρα χωρίς τα ίδια ευρήματα να παρατηρούνται στα Β και Τ λεμφοκύτταρα των ίδιων ασθενών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης χαρακτηρίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τα περιφερικά Β και Τ λεμφοκύτταρα των ασθενών με σύνδρομο Sjögren (262).

Πέραν όμως των γονιδίων που ρυθμίζονται από την IFN, υπομεθυλίωση παρατηρείται σε γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων, όπως τα

γονίδα LTA (lymphotoxin A) και FOXP3 (forkhead box protein P3) καθώς και γονιδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη λεμφώματος όπως το RUNX1 (runt-related transcription factor 1) (259,260). Επιπλέον υπομεθυλιωμένος ανεδείχθη κι ο εκκινητής του SSB/LA (anti-sicca syndrome type B) γεγονός που οδηγεί στην υπερέκφρασή του και στην παραγωγή των χαρακτηριστικών αυτοαντισωμάτων (234,263).

Τέλος, μελέτες που αφορούν την έκφραση των miRNAs έδειξαν ότι τόσο το miRNA146a όσο και το miRNA155 υπερεκφράζονται στους ασθενείς με σύνδρομο Sjögren. Πιο συγκεκριμένα η υπερέκφραση του miRNA146a στα περιφερικά μονοκύτταρα των ασθενών που αναπτύσσουν το σύνδρομο προηγείται της έναρξης της νόσου, ενώ το ίδιο εύρημα χαρακτηρίζει τα κύτταρα των σιελογόνων αδένων των ίδιων ασθενών κατά την πλήρη έκφραση της νόσου (264,265).

3.3. Επιγενετική στα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος

3.3.1. Επιγενετικές μελέτες στην ΠΧΧ

Παρ'ότι η ακριβής αιτιοπαθογένεια της ΠΧΧ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, μελέτες GWAS ταυτοποίησαν διάφορους γονιδιακούς επιτόπους πέραν των HLA περιοχών οι οποίοι φαίνεται να συμμετέχουν στην προδιάθεση για εμφάνιση της νόσου. Ωστόσο τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αδυνατούν να εξηγήσουν πλήρως την επίπτωση και αιτιοπαθογένεια της νόσου (133,134). Ως εκ τούτου, οι επιγενετικές μελέτες αν και περιορισμένες, ανοίγουν το δρόμο για την αποσαφήνιση της συμμετοχής των επιγενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια της ΠΧΧ. Πιο συγκεκριμένα, Α) η μεθυλίωση των γονιδίων του χρωμοσώματος X, Β) οι τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών και Γ) η έκφραση των miRNAs έχουν διερευνηθεί για τη συμμετοχή τους στην επίθεση έναντι των χολαγγειοκυττάρων και την ανάπτυξη της ΠΧΧ.

Α) Μεθυλίωση των γονιδίων του χρωμοσώματος X

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της ΠΧΧ είναι η προσβολή γυναικών μέσης ηλικίας. Συγκεκριμένα η αναλογία ανδρών/γυναικών που πάσχουν από τη νόσο ανέρχεται στο 1/9. Βασιζόμενοι σε αυτή την παρατήρηση οι Selmi και συνεργάτες ανέλυσαν τη μεθυλίωση του γονιδιώματος των PBMCs μεταξύ 3 ζευγών μονοζυγωτικών διδύμων και 8 ζευγών αδερφών γυναικείου φύλου εκ των οποίων ο ένας εκ των δύο έπασχε από ΠΧΧ και ταυτοποίησαν 60 διαφορετικά μεθυλιωμένα

γονίδια εκ των οποίων τα 51 εδράζοντο στο χρωμόσωμα X. Παράλληλα ανέδειξαν ότι οι αλλαγές αυτές συνεπαγόταν αλλαγές στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων καθώς 5 γονίδια βρέθηκαν κατεσταλμένα (CXCR5, HLA-B, IF44L, IFITI και SMARCA1) ενώ η έκφραση του γονιδίου της IL-6 βρέθηκε αυξημένη (266).

Παράλληλα τα αποτελέσματα δύο ακόμη μελετών ανέδειξαν την υπομεθυλίωση των εκκινητών του CXCR3 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 3) και CD40L (CD40 ligand) αντίστοιχα, στα CD4(+) T κύτταρα ασθενών με ΠΧΧ (267,268). Ο CXCR3 υποδοχέας εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T και NK κύτταρα και σχετίζεται με τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Η υπομεθυλίωση του εκκινητή του CXCR3 σχετίζεται με αύξηση της διαφοροποίησης των T κυττάρων σε TH1 λεμφοκύτταρα και με τον τρόπο αυτό πιθανώς συμμετέχει στην εξέλιξη της νόσου. Αντίστοιχα, ο CD40L εκφράζεται στα ώριμα CD4(+) T λεμφοκύτταρα και η διασύνδεσή του με το CD40 των B λεμφοκυττάρων είναι απαραίτητη για τη μεταστροφή της τάξης της Ig ανοσοσφαιρίνης. Μεταλλαγές του CD40L οδηγούν σε αναστολή της μεταστροφής της IgM ανοσοσφαιρίνης και αύξηση των επιπέδων της στον ορό. Η υπομεθυλίωση του εκκινητή του CD40L σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων της IgM ανοσοσφαιρίνης που χαρακτηρίζει τους ασθενείς με ΠΧΧ (269–271).

B) Επιγενετικές τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών στην ΠΧΧ

Πέραν της υπομεθυλίωσης του εκκινητή του CD40L έχει φανεί ότι η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από αύξηση της ακετυλίωσης της ιστόνης H4, γεγονός που επίσης οδηγεί στην αυξημένη έκφρασή του CD40L (269,270). Επιγενετικές τροποποιήσεις ωστόσο αφορούν τους εκκινητές και άλλων γονιδίων καθώς αύξηση της ακετυλίωσης της ιστόνης H4 παρατηρήθηκε επίσης στους εκκινητές του LIGHT (TNF Superfamily Member 14), της IL-17 (interleukin-17) και της IFN γ (interferon γ) στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΧ (270). Το γονίδιο LIGHT παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αυτοανοσίας καθώς αποτελεί συνδιεγερτικό μόριο που συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, αποακετυλίωση της H4 ιστόνης παρατηρήθηκε στους εκκινητές των γονιδίων TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), Apo2 (apolipoprotein 2) και HDAC7A (histone deacetylase 7A). Το γονίδιο TRAIL ρυθμίζει την επαγωγή απόπτωσης και θεωρείται ότι εμποδίζει την ανάπτυξη αυτοανοσίας μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο (271).

Γ) miRNAs στην ΠΧΧ

Μέχρι σήμερα πάνω από 200 miRNAs παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στα PBMCs ασθενών με ΠΧΧ. Η πρώτη μελέτη που αφορούσε την έκφραση των miRNAs ανέδειξε ότι 35 miRNAs παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στην ΠΧΧ: τα miR-122a και miR-26a παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση ενώ τα miR-328 και miR-299-5b που είναι αυξημένα (272). Αρκετές μελέτες ακολούθησαν (273–275) στη συνέχεια με αυτή των Tan και συνεργατών (276), να προτείνει την χρήση των hsa-miR-122-5p, (homo sapiens-miR-122-5p), hsa-miR-141-3p και hsa-miR-26b-5p για τη διάγνωση της νόσου.

Ωστόσο, μία μόνο μελέτη συσχέτισε τα miRNAs στην αιτιοπαθογένεια της νόσου (245). Όπως είναι γνωστό τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων προστατεύονται από την τοξική δράση των χολικών αλάτων από την ομπρέλα διττανθρακικών η οποία δημιουργείται από το CL^-/HCO_3^- AE2. Οι Banales και συνεργάτες ανέδειξαν ότι η άύξηση του miR-506, η οποία χαρακτηρίζει την ΠΧΧ, εμποδίζει τη μεταφορά του mRNA του AE2 καθώς και την πρόσδεσή του στην 3'UTR περιοχή. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη λειτουργικότητα του AE2 στην ΠΧΧ. Το εύρημα αυτό αποδεικνύει ότι τα mi-RNAs παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία της προστατευτικής ομπρέλας των διττανθρακικών ευοδώνοντας έτσι την καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων και παίζοντας με τον τρόπο αυτό κεντρικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου (245).

3.3.2. Επιγενετικές μελέτες στην ΠΣΧ

Η ΠΣΧ αποτελεί ένα χρόνια αυτοάνοσο χολοστατικό νόσημα του ήπατος που προσβάλλει κυρίως άντρες και χαρακτηρίζεται από πολλαπλές στενώσεις και διατάσεις των ενδο- και εξωηπατικών χοληφόρων οδηγώντας τελικά σε κίρρωση του ήπατος. Οι ασθενείς παρουσιάζουν ίκτερο, κνησμό και υποτροπιάζοντα επεισόδια οξείας χολαγγειίτιδας ενώ από τον εργαστηριακό έλεγχο αναδεικνύεται αύξηση των χολοστατικών ενζύμων και άμεση υπερχολερυθριναιμία. Το 60 έως 80% των ασθενών πάσχει παράλληλα από κάποια ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο (ΙΦΕΝ) συνηθέστερα ελκώδη κολίτιδα, ενώ το 10,9% των ασθενών αναπτύσσει χολαγγειοκαρκίνωμα στην πορεία της νόσου. Δεδομένης της απουσίας

αποτελεσματικής θεραπείας πλην του UDCA ο μέσος χρόνος ανάγκης για μεταμόσχευση ήπατος ανέρχεται στα 12 με 18 χρόνια (277,278).

Επιγενετικές μελέτες έδειξαν ότι 21 miRNAs παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση σε ασθενείς με ΠΣΧ ενώ 33 miRNAs διαφοροποιούν τους ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα με ή χωρίς υποκείμενη ΠΣΧ από τους υγιείς μάρτυρες. Τον κύριο ορολογικό δείκτη σε ασθενείς με ΠΣΧ αποτελεί το miR-200c ενώ οι κύριοι δείκτες στους ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα είναι το miR-222 και miR-483-5p. Το miR-200c υποεκφράζεται στους ασθενείς με ΠΣΧ συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ενώ αντίθετα υπερκφράζεται στους ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα συγκριτικά με τους πάσχοντες από ΠΣΧ. Επιπλέον τα miR-222 και miR-483-5p υπερκφράζονται στους ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα συγκριτικά με ΠΣΧ (279,280).

Με βάση τα ανωτέρω δεδομένα τα miRNAs φαίνεται να αντικατοπτρίζουν την απορύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ασθενείς με ΠΣΧ και τη συμμετοχή των επιγενετικών παραγόντων σε αυτή ωστόσο ο ακριβής παθογενετικός τους ρόλος δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.

3.3.3. Επιγενετικές μελέτες στην ΑΗ

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις, πιθανώς επηρεάζουν την εμφάνιση και εξέλιξη της ΑΗ και η διερεύνησή τους κρίνεται αναγκαία προκειμένου να διευκρινιστεί η φύση τους, οι επιπτώσεις τους αλλά και η πιθανή αξιοποίησή τους ως μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επιγενετικές μελέτες που να αφορούν σε ασθενείς με ΑΗ.

Οι μέχρι τώρα μελέτες περιορίζονται στην ανάλυση της έκφρασης των miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του miR21 βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με ΑΗ ενώ τα επίπεδα τόσο του miR-21 όσο και του miR-122 σχετίζονται με τα επίπεδα της ALT στον ορό (281). Το miR-21 εκφράζεται στα Τ λεμφοκύτταρα και στοχεύει ένα πλήθος γονιδίων συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου PDCD4 (Programmed cell death 4), το οποίο επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση. Η ανασταλτική δράση του miR-21 στο γονίδιο PDCD4 προκαλεί μείωση της απόπτωσης των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων και προάγει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (282). Αντίθετα το miR-122 αυξάνει την παραγωγή της IFNα μπλοκάροντας τους αναστολείς των σηματοδοτικών μορίων των κυτταροκινών

(283,284). Τα επίπεδα του miR-21 παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα ενώ σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με το στάδιο της ίνωσης. Η μείωση των επιπέδων του στους ασθενείς με ΑΗ και υποκείμενη κίρρωση υποδηλώνει ότι τα επίπεδά του αποτελούν δείκτη της φλεγμονώδους δραστηριότητας (281).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που προάγουν την υπερέκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών και την καταστολή ανοσορυθμιστικών γονιδίων αποτελούν μελλοντικούς στόχους θεραπευτικών στρατηγικών στα αυτοάνοσα νοσήματα και η μελέτη τους στην αυτοάνοση ηπατίτιδα κρίνεται αναγκαία. Η μέχρι τώρα έρευνα στα αυτοάνοσα νοσήματα έχει αναδείξει αλλαγές στη μεθυλίωση των γονιδίων και συνοδό ακετυλίωση των μορίων των ιστονών, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της μεταγραφικής τους δραστηριότητας σε συνδυασμό με αλλαγές στο επίπεδο των κυκλοφορούντων miRNAs. Συνεπώς, οι επιγενετικά στοχευμένες θεραπείες θα πρέπει να επιδρούν στη μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων στόχος, με ακρίβεια και ειδικότητα. Οι DNMTs και TETs, οι αποακετυλάσες των ιστονών καθώς και τα miRNAs αρχίζουν να εξελίσσονται ως θεραπευτικοί στόχοι σε νεοπλασματικά νοσήματα, ωστόσο στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα τυχαιοποιημένες μελέτες που να αφορούν σε ανάλογους θεραπευτικούς μηχανισμούς (285).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Τα αυτοάνοσα νοσήματα θεωρούνται πολυπαραγοντικές νόσοι στις οποίες το γενετικό υπόβαθρο, παρ'ότι συμμετέχει στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου όπως αποδεικνύεται από την διεξαγωγή γενετικών μελετών, δεν κατορθώνει να εξηγήσει πλήρως την αιτιολογία και την παθογένειά τους. Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί στην ανάπτυξη αυτοανοσίας παραμένει εν πολλοίς άγνωστη, παρ'ότι αλλαγές στην αλληλουχία και έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη αυτοανόσων μηχανισμών. Οι επιγενετικοί παράγοντες καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με γενετικές μεταλλαγές φαίνεται να επηρεάζουν και να συμμετέχουν τόσο στην αιτιοπαθογένεια, όσο και στην εξέλιξη των αυτοανόσων νοσημάτων. Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται να έχουν οι επιγενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και τον αναδιπλασιασμό του DNA, καθώς με τον τρόπο αυτό συμβάλλουν στην πυροδότηση αυτοανόσων αντιδράσεων (218–220).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι επιγενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τρεις κύριους μηχανισμούς, τη μεθυλίωση του DNA, τις τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών και τα micro RNAs (miRNAs) (158,215). Επιγενετικές τροποποιήσεις που αφορούν στο επίπεδο της ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/υδροξυμεθυλίωσης ($5^{hm}C$) τόσο σε κύτταρα των προσβεβλημένων ιστών όσο και σε περιφερικά Β και Τ λεμφοκύτταρα, έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην αιτιοπαθογένεια αυτοανόσων νοσημάτων όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ) και το σύνδρομο Sjögren (222–225). Παράλληλα αλλαγές στην έκφραση, σε μεταγραφικό επίπεδο, των ενζύμων μεθυλίωσης [DNA methyl-transferases (DNMTs)]/υδροξυμεθυλίωσης [Ten eleven translocation deoxygenases-(TETs)], τόσο σε επίπεδο ιστού όσο και σε περιφερικά λεμφοκύτταρα, επηρεάζουν τη μεθυλίωση των εκκινητών συγκεκριμένων γονιδίων οδηγώντας με τη σειρά τους σε ενεργοποίηση ή αναστολή της μεταγραφικής τους δραστηριότητας (222,223,236,262,286,287). Επιπλέον, μελέτες ευρείας συσχέτισης των επιγενετικών τροποποιήσεων [epigenome wide association studies (EWAS)] στα αυτοάνοσα νοσήματα απέδειξαν ότι οι επιγενετικές αλλαγές μπορεί να εντοπίζονται σε συγκεκριμένες δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης-γουανίνης (CpG), τόσο σε ρυθμιστικές όσο και σε αμετάφραστες περιοχές [untranslated region (UTR)] των γονιδίων επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό τόσο την έκφραση του ίδιου του γονιδίου όσο και μεμονωμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών [single nucleotide polymorphisms (SNPs)], ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την άποψη της στενής

συνύπαρξης γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων στα αυτοάνοσα νοσήματα (227,256,258–261).

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ) αποτελούν τα δύο μείζονα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Η ΑΗ είναι χρόνια φλεγμονώδης ηπατοπάθεια που χαρακτηρίζεται από σημαντικό βαθμού πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία, κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα, περιτυλαία ηπατίτιδα στη βιοψία ήπατος και ευνοϊκή ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή (1–3). Με δεδομένη την απουσία ενός ειδικού ορολογικού δείκτη, η διάγνωση της ΑΗ βασίζεται στα αναθεωρημένα και απλοποιημένα κριτήρια τα οποία θεσπίστηκαν από τη διεθνή ομάδα μελέτης της ΑΗ (87,88). Η ΠΧΧ είναι χρόνια χολοστατικό νόσημα του ήπατος που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη λεμφοκυτταρικής, κοκκιωματώδους χολαγγειίτιδας των μικρών χοληφόρων. Η παρουσία χολόστασης, κυκλοφορούντων αντιμιτοχονδριακών [antimitochondrial antibodies (AMA)] ή ειδικών αντιπυρηνικών [antinuclear antibodies (ANA)] αντισωμάτων και καταστροφής των ενδοηπατικών χολαγγείων αποτελούν τα τρία χαρακτηριστικά της νόσου, ενώ η ύπαρξη δύο εξ' αυτών θέτει τη διάγνωση (124,127,141).

Η αιτιοπαθογένεια τόσο της ΑΗ όσο και της ΠΧΧ αποδίδεται στην αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ωστόσο, παρ' ότι γενετικοί πολυμορφισμοί μεμονωμένων γονιδίων εντός και εκτός του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας [major histocompatibility complex (MHC)] έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια των δύο αυτών νοσημάτων, αδυνατούν να την εξηγήσουν πλήρως, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή επιγενετικών τροποποιήσεων στην εμφάνιση και εξέλιξή τους (15,134,136).

Μέχρι σήμερα ο αριθμός των επιγενετικών μελετών που αφορούν στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος είναι περιορισμένος. Η πλειοψηφία τους αφορά σε πληθυσμούς περιφερικών μονοκυττάρων [peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)] και λεμφοκυττάρων ασθενών με ΠΧΧ και κατέδειξε αλλαγές της μεθυλίωσης των εκκινητών συγκεκριμένων γονιδίων που εδράζονται στο χρωμόσωμα X (266–269). Παράλληλα τροποποιήσεις των μορίων των ιστονών και αλλαγές στην έκφραση συγκεκριμένων miRNAs έχουν συσχετισθεί με την αιτιοπαθογένεια της νόσου (245). Ωστόσο, δύο από τους σημαντικότερους περιορισμούς των μελετών αυτών είναι ο μικρός αριθμός ασθενών που έχει συμπεριληφθεί και η ετερογένεια του υπό μελέτη κυτταρικού πληθυσμού, εφόσον η πλειοψηφία τους έχει διεξαχθεί σε περιφερικά μονοκύτταρα και όχι σε πληθυσμούς Β ή Τ λεμφοκυττάρων, ενώ μέχρι σήμερα δεν

υπάρχουν επιγενετικές μελέτες που να αφορούν σε ηπατικό ιστό. Όσο αφορά στην ΑΗ, η μοναδική έως τώρα επιγενετική μελέτη που έχει διεξαχθεί αφορά στην έκφραση των miRNAs (281) ενώ, μελέτες που να αφορούν στον προσδιορισμό της ολικής 5^mC/5^{hm}C ή της έκφρασης των DNMTs και TETs στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος δεν έχουν διενεργηθεί.

Η σημασία της μελέτης των παθογενετικών μηχανισμών στα αυτοάνοσα νοσήματα έγκειται στην πιθανότητα να αποτελέσουν θεραπευτικό στόχο. Στα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren, οι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι μπορούν να αποτελέσουν δυνητικά θεραπευτικό στόχο, ωστόσο τυχαίοι μελέτες για τη χρήση τους δεν έχουν μέχρι σήμερα διεξαχθεί, αν και οι αναστολείς των DNMTs και των miRNAs άρχισαν να μελετώνται στη θεραπεία νεοπλασματικών νοσημάτων. Ως εκ τούτου, η ανάδειξη νέων παθογενετικών μηχανισμών που βασίζονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, ανοίγει νέους δρόμους για την κατανόηση της αιτιοπαθογένειάς τους με σκοπό την ανεύρεση νέων στοχευμένων θεραπειών.

Με βάση τα ανωτέρω, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

- Ο προσδιορισμός του επιπέδου της ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/υδροξυμεθυλίωσης (5^{hm}C) του DNA περιφερικών Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων ασθενών με ΑΗ (κατά τη διάγνωση της νόσου και κατά την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική αγωγή) και ΠΧΧ, συγκριτικά με ομάδα των υγιών μαρτύρων.
- Ο προσδιορισμός της έκφρασης, σε μεταγραφικό επίπεδο, των ενζύμων μεθυλίωσης (DNMTs)/υδροξυμεθυλίωσης (TETs) Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων ασθενών με ΑΗ (κατά τη διάγνωση της νόσου και κατά την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική αγωγή) και ΠΧΧ, συγκριτικά με ομάδα των υγιών μαρτύρων.
- Η ανάλυση της μεθυλίωσης συγκεκριμένων CpG αλληλουχιών κατά μήκος του συνόλου του γονιδιώματος των Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με ΑΗ και ΠΧΧ με τη διενέργεια μελέτης EWAS.

1. Ασθενείς και Μέθοδοι

1.1. Ασθενείς

Ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος που παρακολουθούνται στην Παθολογική Κλινική και το Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ), εθνικού κέντρου εμπειρογνομosύνης για τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν 10 ασθενείς με καλά τεκμηριωμένη ΑΗ-1, 9 ασθενείς με ΠΧΧ και 10 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ) παρόμοιας ηλικίας και φύλου, προερχόμενοι από το προσωπικό της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του ΠΓΝΛ.

Η αξιολόγηση των ασθενών με ΑΗ έγινε σε δύο χρονικές στιγμές. Η πρώτη χρονική στιγμή [time point 1 (**tp1**)] αφορούσε τη στιγμή της διάγνωσης πριν την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Όλοι οι ασθενείς με ΑΗ μετά τη διάγνωση της νόσου έλαβαν θεραπεία με πρεδνιζολόνη σε δόση 0.5-1mg/kg/ημέρα σε συνδυασμό με μυκοφαινολάτη μοφετίλ (MMF) σε δόση 2g/ημέρα σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα της ομάδας μας που συνάδουν με τις ελληνικές και διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές (38,41,44,103,113,115). Η δεύτερη χρονική στιγμή [time point 2 (**tp2**)] αξιολογήθηκε στους 8 από τους 10 ασθενείς κι αφορούσε τη φάση πλήρους ανταπόκρισης (βιοχημικής και ιστολογικής) στην ανοσοκατασταλτική αγωγή με MMF, με ή χωρίς μικρή δόση κορτικοστεροειδών (6 ασθενείς ελάμβαναν μικρή δόση πρεδνιζολόνης <10mg). Αντίστοιχα οι ασθενείς με ΠΧΧ αξιολογήθηκαν κατά τη στιγμή διάγνωσης της νόσου και παρουσίαζαν αύξηση των χολοστατικών ενζύμων, θετικούς τίτλους AMA ή ειδικών ANA αντισωμάτων και ιστολογικά επιβεβαιωμένη νόσο. Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει τα δημογραφικά, εργαστηριακά, ανοσολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και υγιών μαρτύρων που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

1.2. Ανοσολογικός έλεγχος

Ο ανοσολογικός έλεγχος για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας (Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης για τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος) του ΠΓΝΑ. Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε αρχικά με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IIF) σε φρέσκες κατεψυγμένες τομές ήπατος/νεφρού/στομάχου αρουραίου σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα που συνάδουν με τις διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές του International Autoimmune Hepatitis study group (IAIHG) (3,23,38,67,113). Εμπορικά διαθέσιμες ELISA που χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένη αλληλουχία SLA/LP/tRNP(Ser)Sec (INOVA, Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) και formininotransferase cyclodeaminase (Euroimmune, Medizinische Labor Diagnostika AG, D23560 Lubeck, Deutschland) χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των anti-SLA/LP and anti-LC1 αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπλέον, εκτός του ανοσοφθορισμού, ανίχνευση των anti-LKM-1 έγινε με εμπορικά διαθέσιμη LKM-1 ELISA (LKM-1 QUANTA Lite (R), INOVA Diagnostics) ενώ η ανίχνευση των AMA με τη χρήση της M2 ELISA (MIT3 ELISA, QUANTA Lite (R), INOVA Diagnostics) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος η παρουσία των AMA/anti-LKM/anti-LC1/anti-SLA/LP εκτιμήθηκε επιπλέον με ανοσοαποτύπωση [western blot (WB)] σε μιτοχονδριακό, μικροσωματικό και κυτοσολικό εκχύλισμα ήπατος αρουραίου (3,23).

1.3. Ιστολογικά ευρήματα

Οι βιοψίες των ασθενών με AH εκτιμήθηκαν με βάση το Knodell score, όπως έχει προηγουμένως δημοσιευτεί από την ομάδα μας (38,113,115,288). Σύμφωνα με το βαθμό νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο υποομάδες i) ελάχιστη-ήπια δραστηριότητα (score:0-8) και ii) μέτρια-σοβαρή δραστηριότητα (score:9-18) ενώ σύμφωνα με το βαθμό ίνωσης σε i) ήπια-μέτρια ίνωση (score:0-2) και ii) σοβαρή ίνωση-κίρρωση (score:3-4). Λεπτομερής περιγραφή των βιοψιών (πυλαία/περιπυλαία ηπατίτιδα, ροζέττες, εμπεριπόληση) συμπεριελήφθη στην ανάλυση. Οι βιοψίες των ασθενών με ΠΧΧ, ταξινομήθηκαν κατά Ludwig σε 4 στάδια i) λεμφοκυττατική χολαγγειίτιδα, ii) χολαγγειολική αντίδραση-ποροπενία, iii) γεφυροποιός ίνωση iv) κίρρωση. Λεπτομερής περιγραφή των βιοψιών (χολόσταση, περιπυλαία ηπατίτιδα, κοκκιώματα) συμπεριελήφθη στην ανάλυση (176,289,290).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων

Χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων (n=37)	AH tp1 (n=10)	AH tp2 (n=8)	ΠΧΧ (n=9)	ΥΜ (n=10)
Ηλικία (έτη)	54 (33-77)	54 (33-78)	58 (37-76)	48 (29-78)
Φύλο (Α/Θ)	2/8	2/6	0/9	3/7
Διάρκεια νόσου (μήνες)	29±42	42±44	53±57	-
Κίρρωση (ναι/όχι)	0/10	0/10	0/9	0/10
Θεραπεία (ναι/όχι)	0/10	8/0	0/9	0/10
Πρεδνιζολόνη (<10mg) (ναι/όχι)	0/10	6/2	0/9	0/10
MMF (2g) (ναι/όχι)	0/10	8/0	0/9	0/10
Διάρκεια θεραπείας (μήνες)	-	6 (2-13)	-	-
AST (<40 U/L)	184±166	24,5±6	38±16	20±3,4
ALT (<40 U/L)	250±191	18±6	52±40	20±7,6
Χολερυθρίνη (0,1-1 mg/dl)	3,3±3,7	0,8±0,6	0,8±0,6	0,6±0,32
γGT (<45 U/L)	111±92	23,7±25	131±116	20±11
ALP (<120 U/L) x ULN*	0,8±0,2*	0,5±0,13*	2,2±3,1*	0,6±0,1*
IgG (<1650 mg/dl)	2244±449	1054±325	1333±191	866±135
IgM (64-249 mg/dl)	181±109	74,6±28,6	324±228	115±38
ANA (θετικά/αρνητικά)	3/7	1/7	1/8	0/10
SMA (θετικά/αρνητικά)	10/0	7/1	0/9	0/10
AMA (θετικά/αρνητικά)	0/10	0/8	9/0	0/10
SLA/LP (θετικά/αρνητικά)	1/9	0/8	0/9	0/10
LKM-1 (θετικά/αρνητικά)	0/10	0/8	0/9	0/10
Ιστολογικά ευρήματα	n=9	n=3	n=9	-
Δραστηριότητα (ήπια-μέτρια/σοβαρή)	2/7	3/0	-	-
Ίνωση (ήπια-μέτρια/σοβαρή-κίρρωση)	8/1	3/0	-	-
Ludwig (stage I/II/III/IV)	-	-	3/4/2/0	-
Αναθεωρημένα κριτήρια	15,6±2,9	-	-	-
>15 βέβαιη AH προ-θεραπείας	-	-	-	-
>17 βέβαιη AH μετά-θεραπεία	-	18±3,4	-	-
Απλοποιημένα κριτήρια	7±1	-	-	-
>6 βέβαιη AH	-	-	-	-

AH: αυτοάνοση ηπατίτιδα, ΠΧΧ: πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα, ΥΜ: υγιείς μάρτυρες, MMF: μυκοφαινόλη μοφετίλ, ANA: αντιπυρηνικά αντισώματα, AMA: αντιμιτοχονδριακά αντισώματα, SMA: αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών, SLA/LP: αντισώματα έναντι διαλυτών αντιγόνων ήπατος/ήπατος παγκρέατος

* Οι τιμές εκφράζονται ως λόγος μεταξύ της τιμής και του ανώτερου φυσιολογικού ορίου [upper limit of normal (ULN)].

2. Ερευνητικό Πρωτόκολλο

2.1. Απομόνωση μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

Ολικό αίμα ελήφθη από όλους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες (για τους ασθενείς με ΑΗ η πρώτη αιμοληψία πραγματοποιήθηκε πριν από την έναρξη ανοσοκαταστολής-tr1 ενώ η δεύτερη πραγματοποιήθηκε μετά την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης στη θεραπεία-tr2) και στη συνέχεια έγινε απομόνωση PBMCs με φυγοκέντρηση με τη χρήση Ficoll-Hyraque ως μέσο διαβάθμισης πυκνότητας. Συγκεκριμένα 20 ml ολικού αίματος διαλυμένα σε 5 ml phosphate buffered saline (PBS) τοποθετήθηκαν σε 20 ml διαλύματος Ficoll και φυγοκεντρήθηκαν σε συσκευή φυγοκέντρησης στα 600g για 12 λεπτά στους 25°C με φρένο. Μετά τη φυγοκέντρηση αναγνωρίστηκαν διαφορετικές στιβάδες οι οποίες περιλαμβάνουν κατά σειρά τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα κοκκιοκύτταρα, τη Ficoll, τα PBMCs και το πλάσμα που αποτελεί την ανώτερη στιβάδα. Στη συνέχεια, τα PBMCs απομονώθηκαν με αναρρόφηση ανάμεσα στη στιβάδα του πλάσματος και της Ficoll. Μετά την απομόνωση τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 50ml διαλύματος PBS και φυγοκεντρήθηκαν στα 800g για 20 λεπτά χωρίς φρένο. Μετά τη φυγοκέντρηση η στιβάδα των PBMCs αναγνωρίστηκε ως ίζημα ενώ το υπερκείμενο διάλυμα PBS απορρίφθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε για δεύτερη φορά. Στη συνέχεια τα PBMCs διαλύθηκαν σε 3 ml διαλύματος freezing medium [10-20% DMSO and 40% fetal bovine serum (FBS)] και 5μl διαλύθηκαν σε 45μl Trypan blue, προκειμένου να γίνει καταμέτρησή τους με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου. Τέλος, τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια περιεκτικότητας 5×10^6 έως 10^7 κύτταρα/ml σε υγρό άζωτο.

2.2. Απομόνωση B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκυττάρων

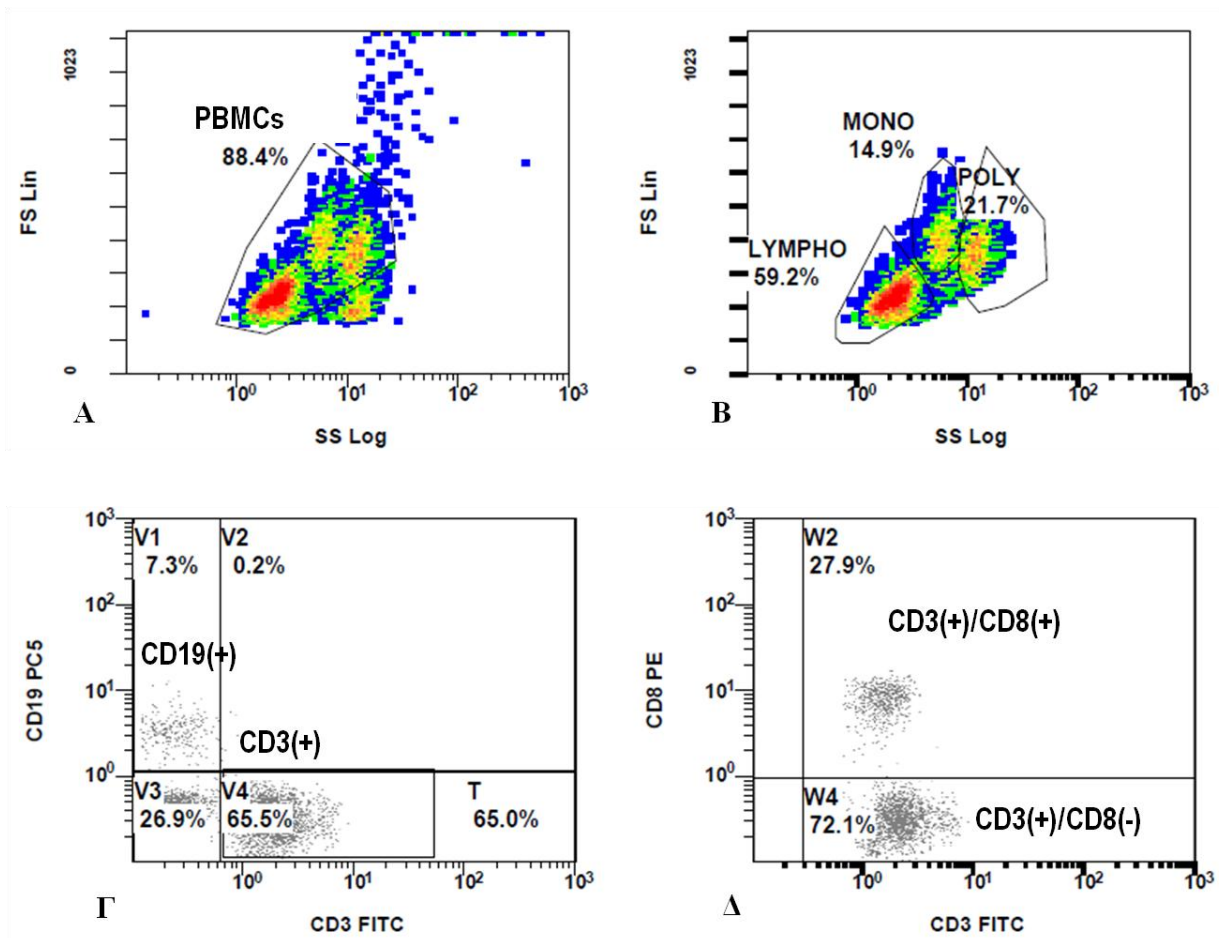
Τα PBMCs περιλαμβάνουν τόσο τα λεμφοκύτταρα όσο και τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Εφόσον οι αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA διαφέρουν ως προς τον υπό μελέτη κυτταρικό πληθυσμό έγινε απομόνωση B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκυττάρων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με διαδικασία θετικής επιλογής για τα B CD19(+) λεμφοκύτταρα και αρνητικής επιλογής για T CD4(+) λεμφοκύτταρα. Αναλυτικά, τα PBMCs διαλύθηκαν σε διάλυμα Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) (cat # 12440053 Gibco™, Thermo Fischer Scientific) εμπλουτισμένο με 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine. Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε μία αρχική φυγοκέντρωση στα 1200rpm, για 7' σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε καταμέτρηση των κυττάρων για έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητάς τους ενώ στη συνέχεια περίπου 1×10^6 κύτταρα επώαστηκαν με CD3 FITC /CD8 PE (cat # A07734, Beckman Coulter, Leriva) και CD19 Pe-Cy5 (cat # A07771, Beckman Coulter, Leriva) για 20' ώστε να καθοριστεί το ποσοστό και ο ακριβής αριθμός των B και T κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Ο αριθμός των CD4(+) T κυττάρων προσδιορίστηκε ως CD3(+)/CD8(-) κύτταρα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**.

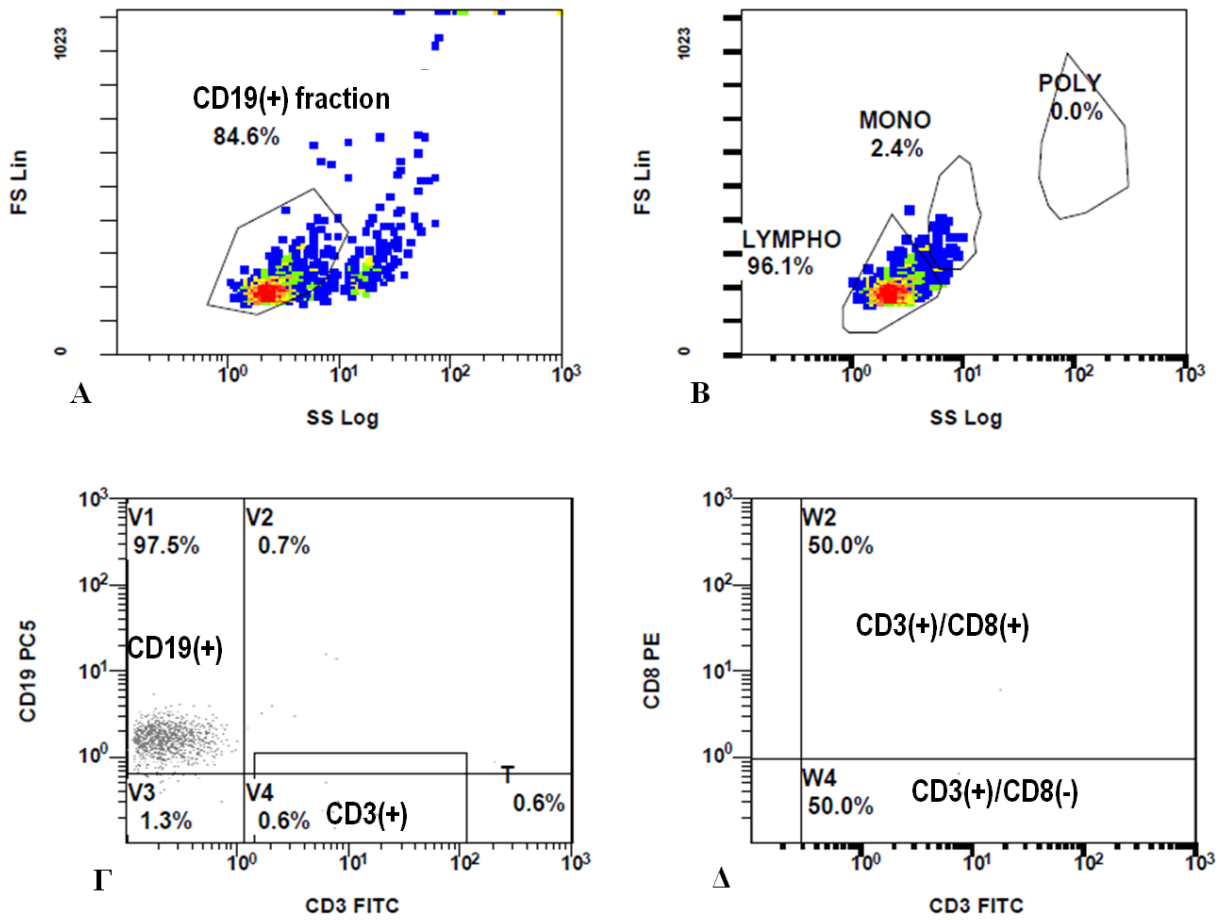
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε 2^η φυγοκέντρωση με τις ίδιες συνθήκες και ακολούθησε διάλυση των κυττάρων σε διάλυμα Robosep. Το σύνολο των κυττάρων μεταφέρθηκε σε φιαλίδια polystyrene των 5ml και τοποθετήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις της πλατφόρμας ROBOSEP™ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του πρωτοκόλλου απομόνωσης, [(EasySep Human CD19 Positive Selection Kit II, cat # 17854RF Stem Cell Technologies, ANTISEL)]. Παράλληλα στην πλατφόρμα του Robosep τοποθετήθηκαν 2 ακόμη φιαλίδια στα οποία έγινε συλλογή των CD19(+) και των CD19(-) κυττάρων στα οποία εμπεριέχονταν τα CD4(+) κύτταρα. Η διάρκεια της διαδικασίας ανήλθε στα 45'. Αρχικά τα κύτταρα επώαστηκαν με το cocktail των αντισωμάτων και στη συνέχεια με μαγνητικά μικρομόρια, ενώ στο τέλος τοποθετήθηκαν στο μαγνητικό πεδίο όπου και πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός. Μετά το διαχωρισμό τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 1% FBS-PBS κι ένας μικρός αριθμός της τάξης των 10^6 κυττάρων σημάνθηκε με CD3 FITC – CD8 PE - CD19 Pe-Cy5 για 20' ώστε να προσδιοριστεί με κυτταρομετρία ροής ο αριθμός κι η καθαρότητα των CD19(+) κυττάρων, η οποία και προσέγγιζε το 97,5% όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2**. Στη συνέχεια τα CD19(+) κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 3000rpm για 7' και αποθηκεύτηκαν στους -80°C σε μορφή ιζήματος.

Το αρνητικό κλάσμα, που περιείχε τα CD4(+) κύτταρα, φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 1200rpm για 7' και επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα Robosep. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν με τον ίδιο τρόπο στην πλατφόρμα ROBOSEP™ σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου (EasySep Human CD4 Positive Selection Kit, cat # 18052RF, Stem Cell Technologies, ANTISEL). Μετά το διαχωρισμό τα T CD4(+) [CD3(+)/CD8(-)] επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 1% FBS-PBS κι ένας μικρός αριθμός της τάξης των 10^6 κυττάρων σημάνθηκε με CD3 FITC – CD8 PE - CD19 Pe-Cy5 για 20' ώστε να προσδιοριστεί με κυτταρομετρία ροής ο αριθμός κι η καθαρότητα των κυττάρων, η οποία και προσέγγιζε το 97,8% όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3**. Τέλος τα CD4(+)

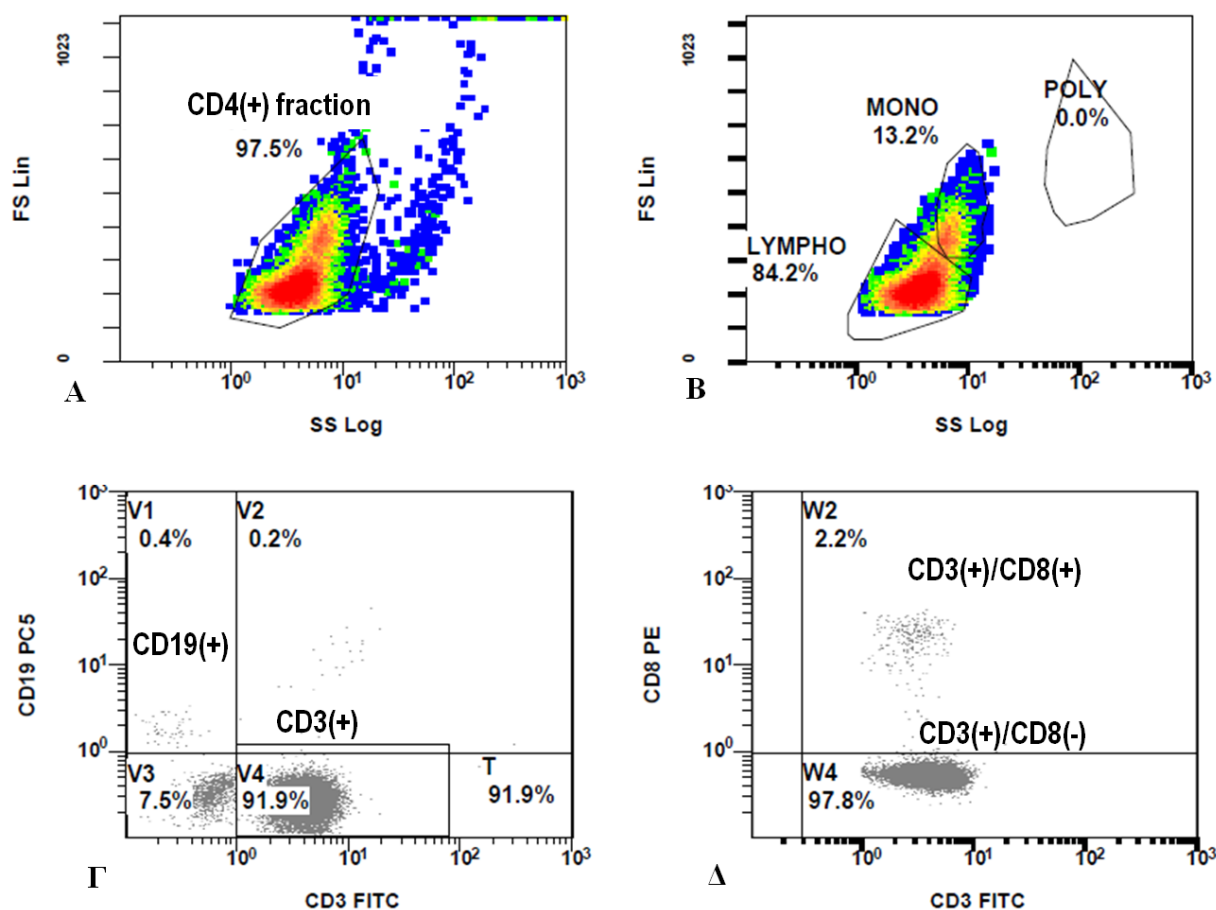
κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 3000rpm για 7' και αποθηκεύτηκαν ως ίζημα στους -80°C.



Εικόνα 1: Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα και το ποσοστό των προς απομόνωση B και T λεμφοκυττάρων. Α) Ολικό κλάσμα PBMCs. Β) Ποσοστό του συνόλου των λεμφοκυττάρων επί του συνολικού αριθμού των PBMCs. Γ) Σήμανση λεμφοκυττάρων με CD19 Pe-Cy5 και CD3 FITC που αναδεικνύει το ποσοστό των B CD19(+) και T CD3(+) λεμφοκυττάρων αντίστοιχα. Δ) Σήμανση λεμφοκυττάρων με CD8 PE και CD3 FITC που αναδεικνύει τον πληθυσμό των CD3(+)/CD8(+) και CD3(+)/CD8(-) [CD4(+)] T κυττάρων αντίστοιχα.



Εικόνα 2: Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν τον προσδιορισμό του αριθμού και της καθρότητας των CD19(+) κυττάρων. Α) Ολικό κλάσμα απομονωθέντων Β CD19(+) λεμφοκυττάρων Β) Τελικό κλάσμα Β CD19(+) λεμφοκυττάρων μετά την απομάκρυνση των πολυμορφοπυρήνων και μονοκυττάρων Γ) Σήμανση των λεμφοκυττάρων με CD19 Pe-Cy5 και CD3 FITC που αναδεικνύει τον πληθυσμό των CD19(+) χωρίς πρόσμιξη CD3(+) κυττάρων Δ) Σήμανση των λεμφοκυττάρων με CD8 PE και CD3 FITC που δεν αναδεικνύει κυτταρικό πληθυσμό CD8(+) ή CD4(+) [CD8(-)] Τ κυττάρων.



Εικόνα 3: Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν τον προσδιορισμό του αριθμού και της καθαρότητας των CD4(+) κυττάρων. Α) Ολικό κλάσμα απομονωθέντων T CD4(+) λεμφοκυττάρων Β) Τελικό κλάσμα T CD4(+) λεμφοκυττάρων μετά την απομάκρυνση των πολυμορφοπυρήνων και μονοκυττάρων Γ) Σήμανση λεμφοκυττάρων με CD19 Pe-Cy5 και CD3 FITC που αναδεικνύει τον πληθυσμό των CD4(+) χωρίς πρόσμιξη CD19(+) κυττάρων Δ) Σήμανση λεμφοκυττάρων με CD8 PE και CD3 FITC που αναδεικνύει πολύ μικρό κυτταρικό πληθυσμό στην περιοχή των CD8(+) κυττάρων.

2.3. Απομόνωση ολικού DNA και RNA από τα Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκύτταρα

Μετά την απομόνωση CD19(+) και CD4(+) λεμφοκυττάρων έγινε απομόνωση του ολικού DNA και RNA και των δύο κυτταρικών πληθυσμών. Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση silica-membrane (cat #51304, DNA blood mini kit, Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά το ίζημα των κυττάρων διαλύθηκε σε 200μl PBS στο οποίο προσετέθησαν 20μl proteinase K και 200μl

αλατούχου διαλύματος. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναδεύτηκαν, επώαστηκαν στους 56°C για 10' και φυγοκεντρήθηκαν στα 8000g για 1 sec. Στο διάλυμα προσετέθησαν 200μl αιθανόλης και πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρωση με τις ίδιες συνθήκες. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στη συνέχεια στις στήλες του kit και φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 1'. Το υποκείμενο απορρίφθηκε, ακολούθησαν δύο πλύσεις και διενεργήθηκε φυγοκέντρωση στα 20000g μετά την οποία το υποκείμενο απορρίφθηκε. Η έκλουση του DNA έγινε σε 30μl elution buffer ενώ η συγκέντρωση προσδιορίστηκε με τη χρήση nanodrop (Nano Drop® 1000 latech) με μέτρηση της απορρόφησης στα 260:280 nm. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο kit (cat #74104 RNeasy mini kit, Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά τα κύτταρα διαλύθηκαν σε 350μl διαλύματος άλατος γουανιδίνης στο οποίο προσετέθησαν 350μl αιθανόλης 70%. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στις στήλες του kit και φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 15 sec. Το υποκείμενο απορρίφθηκε και ακολούθησαν τρεις πλύσεις και τελική φυγοκέντρωση στα 20000g για 1' μετά την οποία το υποκείμενο απορρίφθηκε. Η έκλουση έγινε σε 30μl RNeasy free water και η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε και πάλι με τη χρήση nanodrop με μέτρηση της απορρόφησης στα 260:280 nm. Το απομονωθέν DNA και RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C.

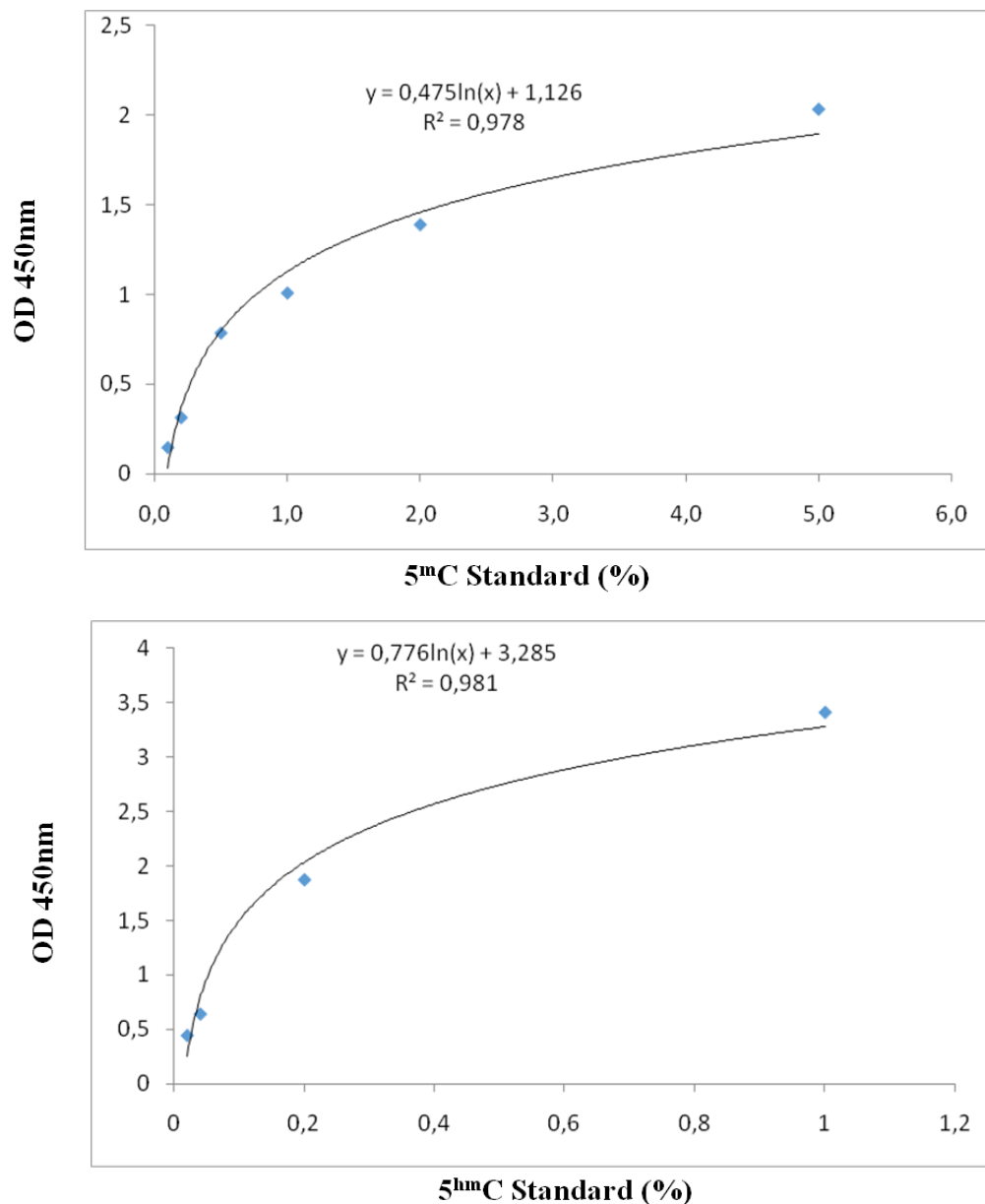
2.4. Προσδιορισμός του επιπέδου της ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/υδροξυμεθυλίωσης (5^{hm}C) του DNA των B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκυττάρων.

Ο προσδιορισμός της ολικής 5^mC/5^{hm}C πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA [MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) cat # P1030 και MethylFlash™ Global DNA Hydroxymethylation (5-hmC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) cat # P1032, EPIGENTEK] σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σύμφωνα με αυτές, 100ng ολικού DNA του κάθε δείγματος επώαστηκαν εις διπλούν στα πηγαδάκια πιάτων τα οποία παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα μόρια του DNA. Το επίπεδο της 5^mC και 5^{hm}C ανιχνεύθηκε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων (5-^mC mAb, 5-^{hm}C mAb) και ποσοτικοποιήθηκε φασματοσκοπικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 450nm με τη χρήση ELISA reader (Opsys MR Microplate Reader, Dynex Technologies, USA). Ο υπολογισμός της οπτικής πυκνότητας (OD) για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με τη χρήση

θετικών και αρνητικών μαρτύρων η OD των οποίων υπολογίστηκε εις διπλούν. Το ποσοστό της 5^mC και $5^{hm}C$ επί του συνόλου των βάσεων κυτοσίνης για κάθε δείγμα, προσδιορίστηκε με την εφαρμογή λογαριθμικής καμπύλης σύμφωνα με τον τύπο:

$$5^mC\% \text{ ή } 5^{hm}C\% = e^{[(Y-b)/a]}/S \times 100\%$$

Οι πρότυπες καμπύλες για την 5^mC και $5^{hm}C$ απεικονίζονται στην **Εικόνα 4**.



Εικόνα 4: Πρότυπες καμπύλες οπτικής πυκνότητας της 5^mC και $5^{hm}C$ αντίστοιχα. Ο άξονας των X παριστά το ποσοστό 5^mC και $5^{hm}C$ του κάθε μάρτυρα ενώ ο άξονας των Y την OD.

2.5. Αντίστροφη μεταγραφή του RNA και διενέργεια ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Το απομονωθέν από τα κύτταρα RNA μετατράπηκε σε cDNA με εμπορικά διαθέσιμο kit (cat #4896866001 Transcriptor First Stand cDNA synthesis kit Roche) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά το master mix της PCR αποτελούνταν από 1μg ολικού RNA, 1μl (2,5μM) oligo(dT) και αντίστοιχη ποσότητα νερού ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να ανέρχεται στα 13μl. Στη συνέχεια προσετέθησαν 4μl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5μl Protector RNase Inhibitor (40 U/μl), 2μl Deoxynucleotide Mix (10 mM) και 0,5μl Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μl) και το διάλυμα επώαστηκε στους 55°C για 30'. Έπειτα το διάλυμα θερμάνθηκε στους 85°C για 5' και η αντίδραση διακόπηκε με τοποθέτηση του δείγματος σε πάγο. Η έκλουση έγινε σε όγκο 20μl και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε RT-qPCR με σκοπό τον προσδιορισμό της έκφρασης των DNMTs και TETs σε μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό των DNMT3A, DNMT3B, TET1 και TET2 χρησιμοποιήθηκε ως φθοριόχρωμα SYBR Green I (Lot # 1706553, Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific). Το master mix αποτελούνταν από 1μl RNase free water, 0,5μl από κάθε αλληλουχία του αντίστοιχου primer (Sigma Alrich), 5μl SYBR Green I και 3μl από το κάθε δείγμα σε αραιώση 1/10. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) απεικονίζονται στον **Πίνακα 2**. Ο πολλαπλασιασμός και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκαν με το Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System.

Για τον προσδιορισμό των DNMT1 και TET3 χρησιμοποιήθηκε ως φθοριόχρωμα Taqman (Lot # 00707126, Applied Biosystems, Thermo F.S) και οι αντίστοιχοι primers (DNMT1:Hs00945875_m1, TET3:Hs00896441_m1) και (GAPDH:Hs02758991_g1) (Thermo F.S). Το master mix της PCR αποτελούνταν από 1,5μl RNase free water, 0,5μl από κάθε primer, 5μl Taqman και 3μl δείγματος σε αραιώση 1/10. Ο πολλαπλασιασμός και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκαν με το Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System.

Ως ενδογενής μάρτυρας και για τις δύο αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν, ενώ η έκφραση των γονιδίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΔCT στην οποία η ποσότητα του γονιδίου στόχου δίδεται από τον τύπο $2^{-(\Delta\text{CT}_{\text{target}} - \Delta\text{CT}_{\text{calibrator}})}$ ή $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Πίνακας 2: Αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-qPCR με τη χρήση SYBR Green.

Γονίδιο	Αλυσίδα	Συμπληρωματική αλυσίδα
DNMT3A	CTCCTGTGGGAGCCTCAATGTT ACC	CAGTTCTTGCAGTTTTGGCACAT TCC
DNMT3B	ACCACCTGCTGAATTACTCACG C	GATGGCATCAATCATCACTGGA TT
TET1	AATGGAAGCACTGTGGTTTG	ACATGGAGCTGCTCATCTTG
TET2	AATGGCAGCACATTGGTATG	AGCTTCCACACTCCCAAACCT
GAPDH	TGCCCTCAACGACCACTTT	GGTCCAGGGGTCTTACTCCTT

2.6. Προσδιορισμός του επιπέδου της 5^mC των επιμέρους CpG αλληλουχιών του ολικού DNA των T CD4(+) λεμφοκυττάρων- μελέτη EWAS.

Οι μελέτες EWAS (epigenome wide association studies) επιτρέπουν τον προσδιορισμό της μεθυλίωσης συγκεκριμένων CpG περιοχών κατά μήκος του γονιδιώματος. Για τη μελέτη της μεθυλίωσης των επιμέρους CpG περιοχών επιλέχθηκε ο πληθυσμός των T CD4(+) λεμφοκυττάρων. Η επιλογή αυτή έγινε διότι ο πληθυσμός των T CD4(+) κυττάρων υπερτερεί του πληθυσμού των B CD19(+) λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, με αποτέλεσμα η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε από τον παραπάνω κυτταρικό πληθυσμό να επαρκεί για τη διενέργεια μελέτης EWAS χωρίς την ανάγκη δημιουργίας κυτταροκαλλιέργειών. Επιπλέον, η τρέχουσα βιβλιογραφία έχει αναδείξει αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA των περιφερικών T λεμφοκυττάρων τόσο σε ασθενείς με ΣΕΛ όσο και σε ασθενείς με ΠΧΧ, με αποτέλεσμα η μελέτη του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού να επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η Illumina Infinium Methylation EPIC array BeadChip (850K) της εταιρείας Diagenode (Belgium). Η Infinium HumanMethylation 850K array της Illumina στηρίζεται σε τεχνολογία σφαιριδίων (probes) κι επιτρέπει τον προσδιορισμό της μεθυλίωσης σε πάνω από 850000 CpG περιοχές κατά μήκος του γονιδιώματος. Η συστοιχία (array) στηρίζεται στην επώαση του DNA με bisufite κατά την οποία οι μη μεθυλιωμένες βάσεις κυτοσίνης (C) μετατρέπονται σε βάσεις ουρακίλης (U), δημιουργώντας στις εν λόγω CpG αλληλουχίες έναν C/T

πολυμορφισμό. Οι probes (ιχνηθέτες) της συστοιχίας ενσωματώνουν στις εν λόγω θέσεις νουκλεοτίδια σημασμένα με φθοριόχρωμα. Στη συνέχεια η Infinium HD array ανιχνεύει τις παραπάνω C/T αντιστοιχίες μετρώντας την ένταση φθορισμού. Το ποσοστό μεθυλίωσης του DNA σε κάθε CpG περιοχή μετράται ως β -value σύμφωνα με τον τύπο:

$$Beta_i = \frac{\max(y_{i,methy}, 0)}{\max(y_{i,unmethy}, 0) + \max(y_{i,methy}, 0) + \alpha}$$

i = κάθε CpG νησίδιο

y_i methy= ένταση μεθυλιωμένου σήματος

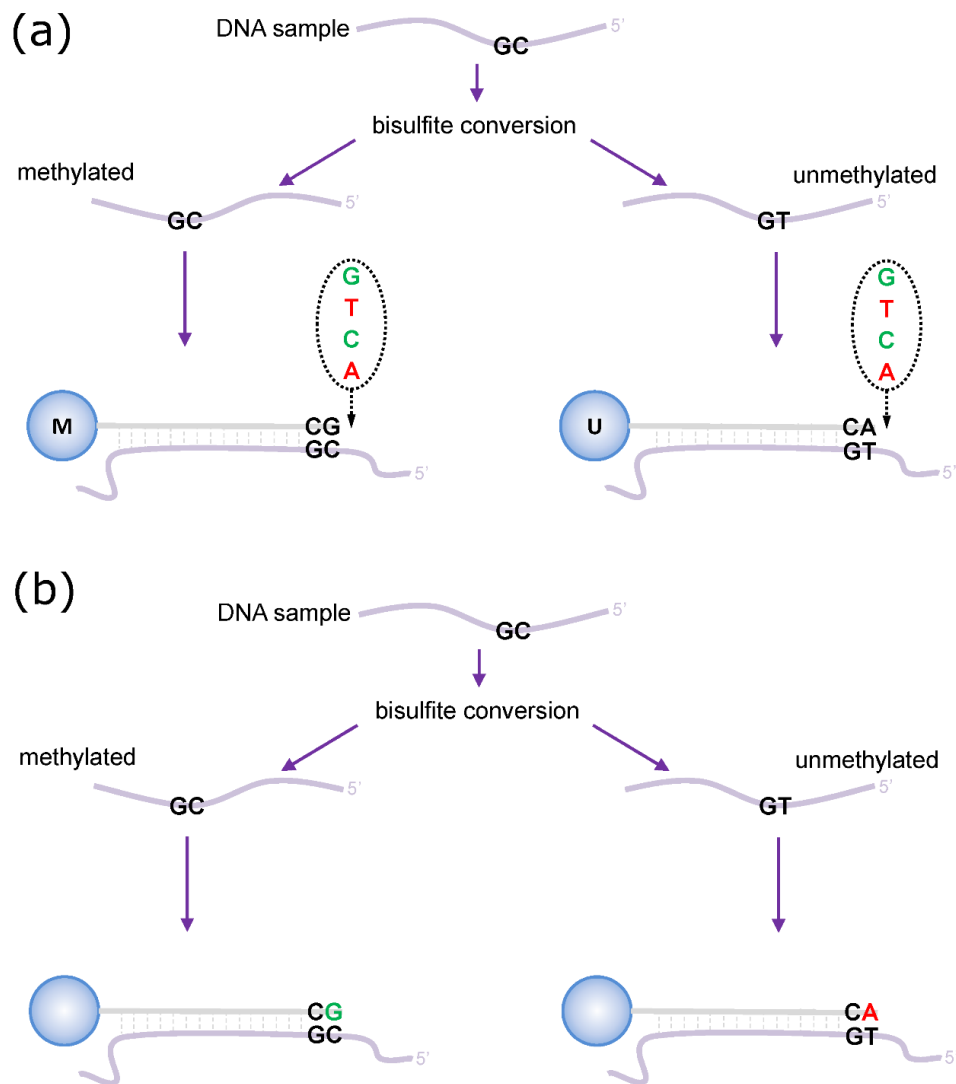
y_i unmethy= ένταση του μη μεθυλιωμένου σήματος

α = 100

Μία τιμή της β -value ίση με το 0 αντιπροσωπεύει μία μη μεθυλιωμένη CpG περιοχή ενώ μία τιμή β -value που προσεγγίζει την τιμή 1 αντιπροσωπεύει μία πλήρως μεθυλιωμένη περιοχή. Η συστοιχία χρησιμοποιεί δύο ειδών probes, τύπου I και τύπου II. Οι probes τύπου I έχουν δύο διαφορετικές αλληλουχίες για κάθε CpG περιοχή (μία για τις μεθυλιωμένες και μία για τις μη μεθυλιωμένες CpGs αντίστοιχα) ενώ οι τύπου II probes έχουν μόνο μία αλληλουχία για κάθε CpG περιοχή όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 5**.

Συνοπτικά η διαδικασία περιέλαβε τα εξής βήματα:

1. Μέτρηση της ποσότητας του DNA του κάθε δείγματος με τη χρήση PicoGreen.
2. Τοποθέτηση 500ng DNA από T CD4(+) λεμφοκύτταρα στη συστοιχία. Συγκεκριμένα αναλύθηκε DNA από 10 ασθενείς με AH κατά τη διάγνωση της νόσου (AH tp1), 5 ασθενείς με AH κατά την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης (AH tp2), 8 ασθενείς με ΠΧΧ και 9 YM.
3. Επώαση του DNA με bisulfite.
4. Ποσοτική μέτρηση του DNA με τη χρήση Methylation Specific PCR.
5. Πολλαπλασιασμός του συνολικού DNA.
6. Υβριδισμός του DNA και ενσωμάτωση σημασμένων με φθοριόχρωμα νουκλεοτιδίων, με τη χρήση τύπου I και τύπου II ιχνηθετών (probes).
7. Ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Maksimovic et al, F1000Res. 2016 (291)

Εικόνα 5: (a) Τύπου I probes: κάθε CpG περιοχή επισημαίνεται με δύο ειδών σφαιρίδια, μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα αντίστοιχα, τα οποία ενσωματώνουν τα ίδια νουκλεοτίδια σημασμένα με το ίδιο φθοριόχρωμα. Το είδος του νουκλεοτιδίου που προστίθεται καθορίζεται από τη βάση που βρίσκεται περιφερικότερα της βάσης C στη CpG περιοχή. Το ποσοστό μεθυλίωσης μετράται ως ένταση φθορισμού από τους δύο διαφορετικούς probes. (b) Τύπου II probes: κάθε CpG περιοχή επισημαίνεται με ένα είδος σφαιριδίων. Το ποσοστό μεθυλίωσης ανιχνεύεται με την προσθήκη σημασμένων συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων “G” ή “A” αντίστοιχα, στις μεθυλιωμένες “C” ή μη μεθυλιωμένες “T” CpG περιοχές. Ο κάθε επίτοπος ανιχνεύεται με διαφορετικό χρώμα και το ποσοστό μεθυλίωσης υπολογίζεται ως αναλογία των δύο χρωμάτων για την κάθε θέση.

3. Στατιστική ανάλυση

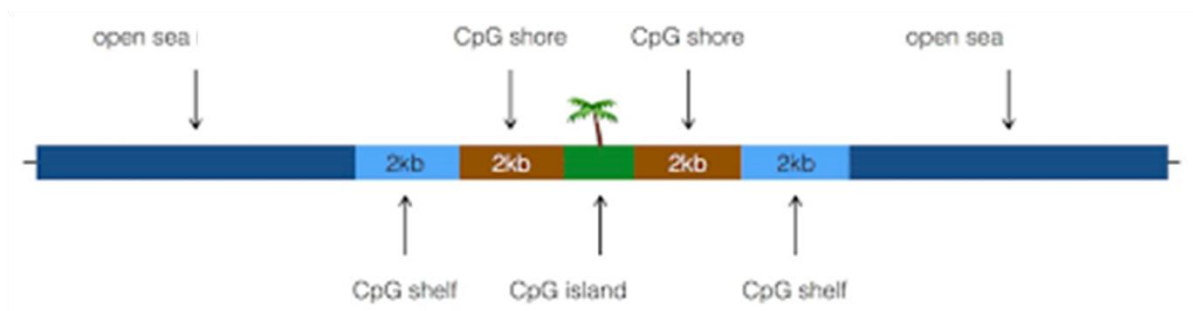
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη χρήση της μέσης τιμής (mean)±τυπική απόκλιση (SD). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 20 και του Graph Pad Prism 8.0. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού Mann Whitney test για ανεξάρτητα δείγματα, του μη παραμετρικού Wilcoxon test για ζευγαρωτά δείγματα, του μη παραμετρικού αναλόγου της ανάλυσης διακύμανσης για ένα παράγοντα Kruskal Wallis test για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ των ομάδων ενώ το χ^2 test χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση κατηγορικών μεταβλητών. Η ανάλυση συσχέτισης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των συντελεστών Pearson και Spearman για την ανάλυση δεδομένων με κανονική και μη κανονική κατανομή αντίστοιχα καθώς και την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression analysis). Ο έλεγχος στατιστικής σημαντικότητας έγινε σε 95% διάστημα εμπιστοσύνης ενώ ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν τιμές του $p < 0.05$.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης EWAS χρησιμοποιήθηκε το Bioconductor R package Chip Analysis Methylation Pipeline [ChAMP] (292). Αρχικά έγινε έλεγχος της ύπαρξης δειγμάτων με υψηλό ποσοστό αποτυχημένων μαρτύρων (>0.1) και ομαλοποίηση των δειγμάτων για απομάκρυνση τυχόν ενδογενών σφαλμάτων (293,294). Στη συνέχεια έγινε ανίχνευση των διαφορετικά μεθυλιωμένων θέσεων (differentially methylates probes-DMPs) με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας Benjamini-Hochberg σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, για την αποφυγή στατιστικού σφάλματος τύπου I (ψευδώς θετικά αποτελέσματα). Η ανίχνευση των διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών (differentially methylated regions-DMRs) έγινε με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας BumpHunter σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ (295).

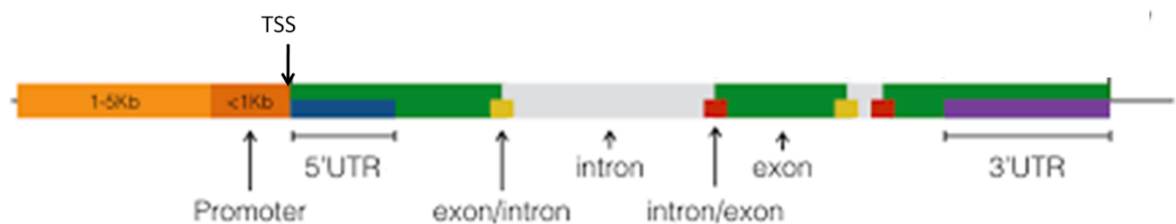
Οι DMRs αποτελούν εκτεταμένα τμήματα γονομικού DNA που μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές του επιπέδου μεθυλίωσης μεταξύ δύο ομάδων. Κάθε DMR περιλαμβάνει ορισμένο αριθμό CpGs οι οποίες εδράζονται κατά μήκος του CpG νησιδίου. Κάθε CpG νησίδιο αποτελείται από τις περιοχές shores που εκτείνονται 2kb μπροστά και πίσω από την κεντρική περιοχή του νησιδίου, τις περιοχές shelves που εκτείνονται 2kb μπροστά και πίσω των shores και τις πιο απομακρυσμένες CpGs, open sea regions, όπως δείχνει η **Εικόνα 6Α**. Οι DMRs μπορεί να εκτείνονται σε οποιαδήποτε περιοχή του γονιδίου, ήτοι σε περιοχές εκκινήτων/σημείων έναρξης της

μεταγραφής (promoters/transcription start sites), εξονίων (exons), εσονίων (introns) ή αμετάφραστων περιοχών (untranslated regions) όπως αυτές καταναίμονται κατά μήκος του γονιδιώματος όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 6B**.

Οι ομάδες που συγκρίθηκαν ανά δύο ήταν οι εξής: AH tp1 versus (vs) YM, ΠXX vs YM, AH vs ΠXX, AH tp1 vs AH tp2. Για κάθε σύγκριση ανιχνεύθηκαν οι DMPs και DMRs καθώς και τα γονίδια στα οποία αντιστοιχούν. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των γονιδίων με το μεγαλύτερο αριθμό DMPs. Η γονιδιακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο “gometh” (296,297). Η συγκεκριμένη μέθοδος λαμβάνει υπόψιν τον αριθμό των CpG περιοχών που σχετίζονται με το κάθε γονίδιο στη συστοιχία της Illumina, καθώς τα γονίδια με το μεγαλύτερο αριθμό CpGs έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να χαρακτηρίζονται από διαφορετικό ποσοστό μεθυλίωσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα.



A



B

www.bioconductor.org

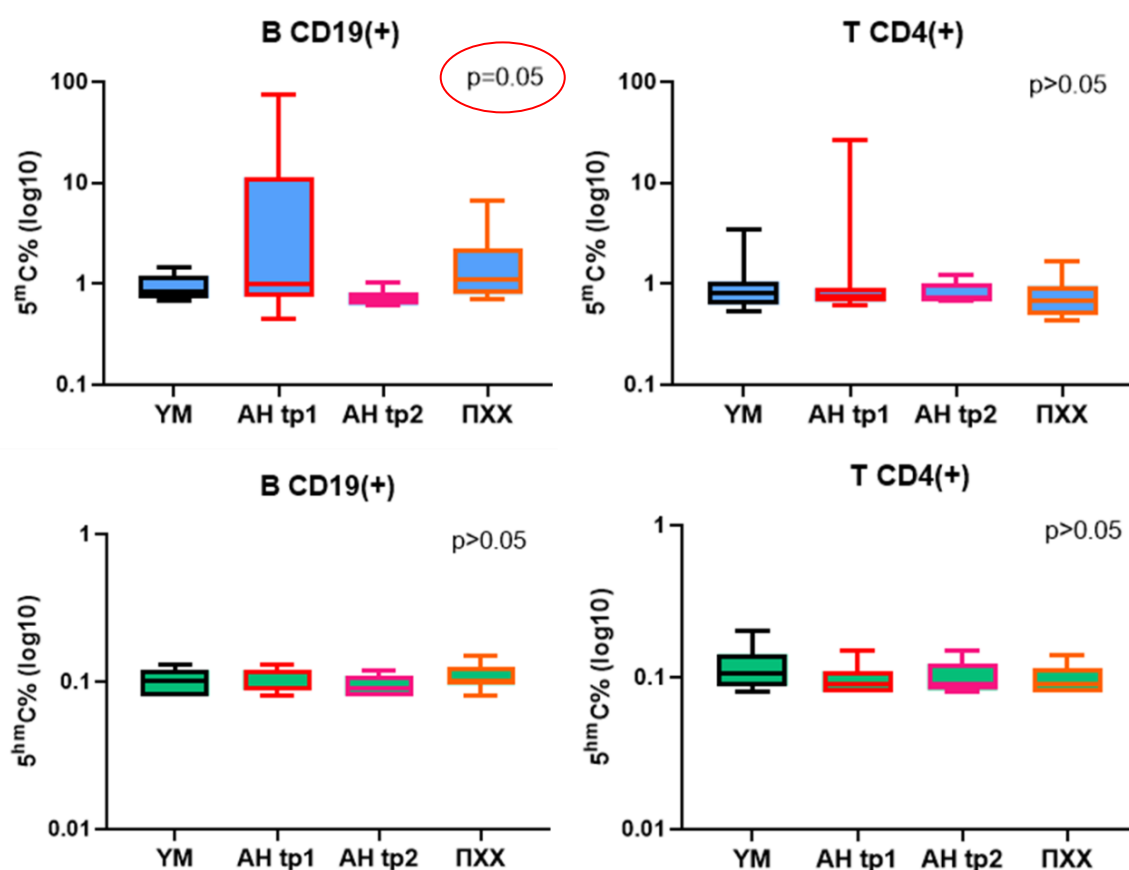
Εικόνα 6: **A)** Δομή του CpG νησιδίου. Κάθε CpG νησίδιο αποτελείται από την κεντρική περιοχή του νησιδίου που είναι και η πιο πλούσια σε CpGs. Σε μήκος 2kb μπροστά και πίσω από την κεντρική περιοχή εκτείνονται οι περιοχές shores ενώ αντίστοιχα, σε έκταση 2kb από τα shores εκτείνονται οι περιοχές shelves. Έξω από τις περιοχές shelves εκτείνονται τα open

sea regions που περιλαμβάνουν και το μικρότερο αριθμό CpGs. **B)** Δομή του γονιδίου. Ανάλογα με τη δομή του CpG νησιδίου ορίζεται και η δομή του γονιδίου η οποία περιλαμβάνει το σημείο έναρξης της μεταγραφής (transcription start site-TSS), την περιοχή του εκκινητή (promoter) που εκτείνεται 1kb πριν το TSS, την 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) που εκτείνεται αμέσως μετά το TSS, τις περιοχές των εσωνίων (introns) και εξονίων (exons) που αντιστοιχούν στο «σώμα» του γονιδίου (gene body) καθώς και τα όρια μεταξύ τους και τέλος την 3'UTR.

4. Αποτελέσματα

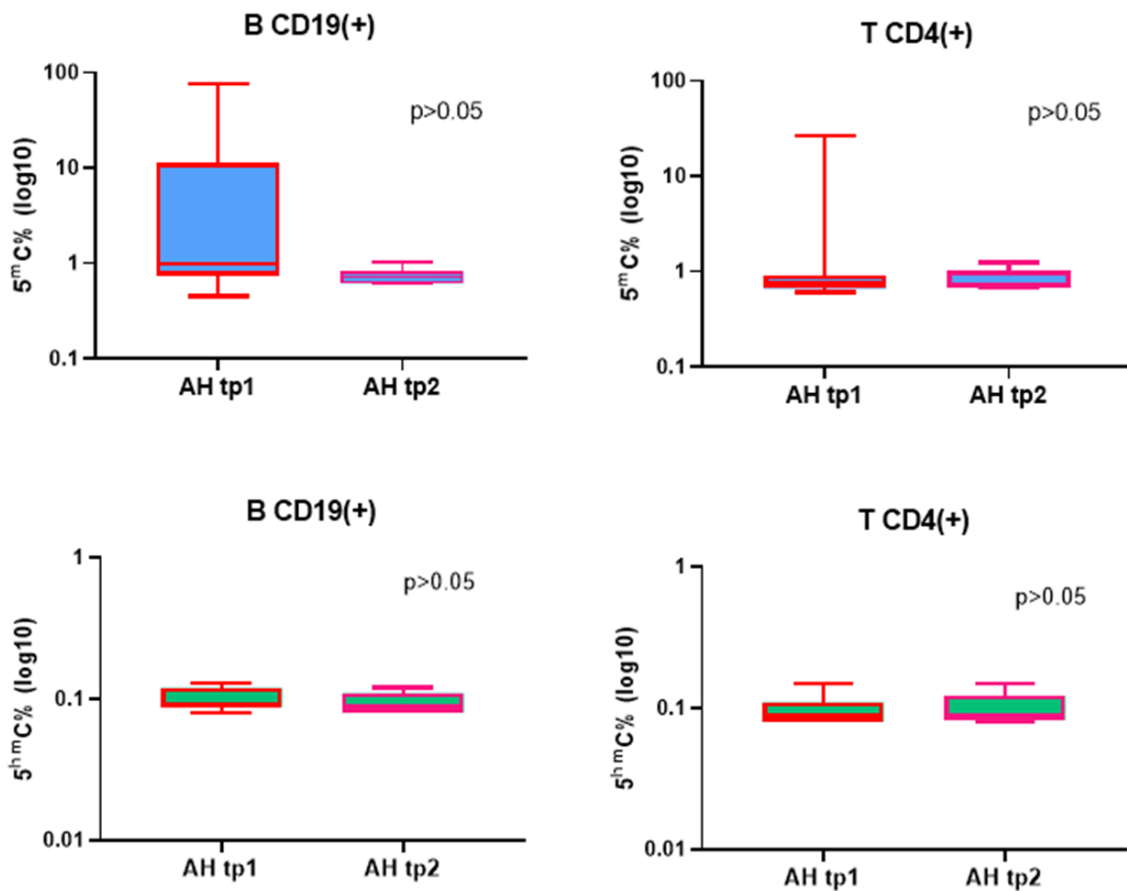
4.1. Προσδιορισμός του επιπέδου ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/ υδροξυμεθυλίωσης ($5^{hm}C$) του DNA σε B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα

Μετά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό 5^mC και $5^{hm}C$ μεταξύ των ομάδων που να αφορούν είτε στα B CD19(+) είτε στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα ($p>0.05$) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7**. Ωστόσο, στον πληθυσμό των B CD19(+) παρατηρήθηκε τάση αύξησης της 5^mC στους ασθενείς με ΠΧΧ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΑΗ και τους ΥΜ ($p=0.05$).



Εικόνα 7: Το ποσοστό ολικής 5^mC στα B CD19(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΧ ($n=9$) παρουσιάζει οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά (αυξημένο) σε σχέση με των ασθενών με ΑΗ tp1 ($n=10$), ΑΗ tp2 ($n=8$) και των ΥΜ ($n=10$). (Kruskal Wallis, $p=0.05$).

Όσο αφορά στην ανάλυση των ασθενών με ΑΗ πριν και μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής, ΑΗ tp1 vs ΑΗ tp2, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο επίπεδο 5^mC και $5^{hm}C$ στον πληθυσμό των Β CD19(+) ή των Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8**.



Εικόνα 8: Ποσοστό ολικής 5^mC και $5^{hm}C$ μεταξύ ασθενών με ΑΗ tp1 και tp2 στα Β CD19(+) και Τ CD4(+) λεμφοκυττάρων (Wilcoxon test). Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο ποσοστό της 5^mC και $5^{hm}C$ μεταξύ των ασθενών με ΑΗ πριν και μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής ($p > 0.05$), στον πληθυσμό των Β ή των Τ λεμφοκυττάρων.

4.2. Συσχέτιση του ποσοστού 5^mC και $5^{hm}C$ με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση του ποσοστού της 5^mC και $5^{hm}C$ των B CD19(+) και των T CD4(+) λεμφοκυττάρων με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των YM. Όσο αφορά στην ομάδα ασθενών με AH tp1 δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση του ποσοστού 5^mC και $5^{hm}C$ με την ηλικία, τα επίπεδα των τρανσαμινασών, την τιμή της IgG ανοσοσφαιρίνης ή τον τίτλο των αντισωμάτων (ANA, SMA). Ωστόσο διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού της 5^mC στον πληθυσμό των T CD4(+) λεμφοκυττάρων και της διάρκειας της νόσου ($n=10$, $p=0.01$, $r=-0.76$ Spearman) ενώ αρνητική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ του ποσοστού της $5^{hm}C$ στα B CD19(+) λεμφοκύτταρα και των αναθεωρημένων κριτηρίων για τη διάγνωση της νόσου (88) ($n=10$, $p=0.02$, $r=-0.72$ Spearman).

Σε αντίθεση με τους ασθενείς με AH tp1, στην ομάδα ασθενών με ΠΧΧ διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση του ποσοστού της 5^mC στον πληθυσμό των B CD19(+) λεμφοκυττάρων με τα επίπεδα της ALP ($n=9$, $p=0.03$, $r=0.72$ Spearman), ενώ επιπλέον τάση θετικής συσχέτισης βρέθηκε μεταξύ της γ GT και της 5^mC στον πληθυσμό των B CD19(+) λεμφοκυττάρων ($n=9$, $p=0.07$, $r=0.62$ Spearman) και της IgM ανοσοσφαιρίνης και του ποσοστού της 5^mC στον πληθυσμό των T CD4(+) λεμφοκυττάρων ($n=9$, $p=0.09$, $r=0.58$ Spearman). Καμία συσχέτιση δεν διαπιστώθηκε μεταξύ του ποσοστού 5^mC και $5^{hm}C$ και της ηλικίας, της διάρκειας της νόσου ή του τίτλου των AMA.

Στην ομάδα των YM και των ασθενών με AH tp2, δεν διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού της 5^mC και $5^{hm}C$ με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά.

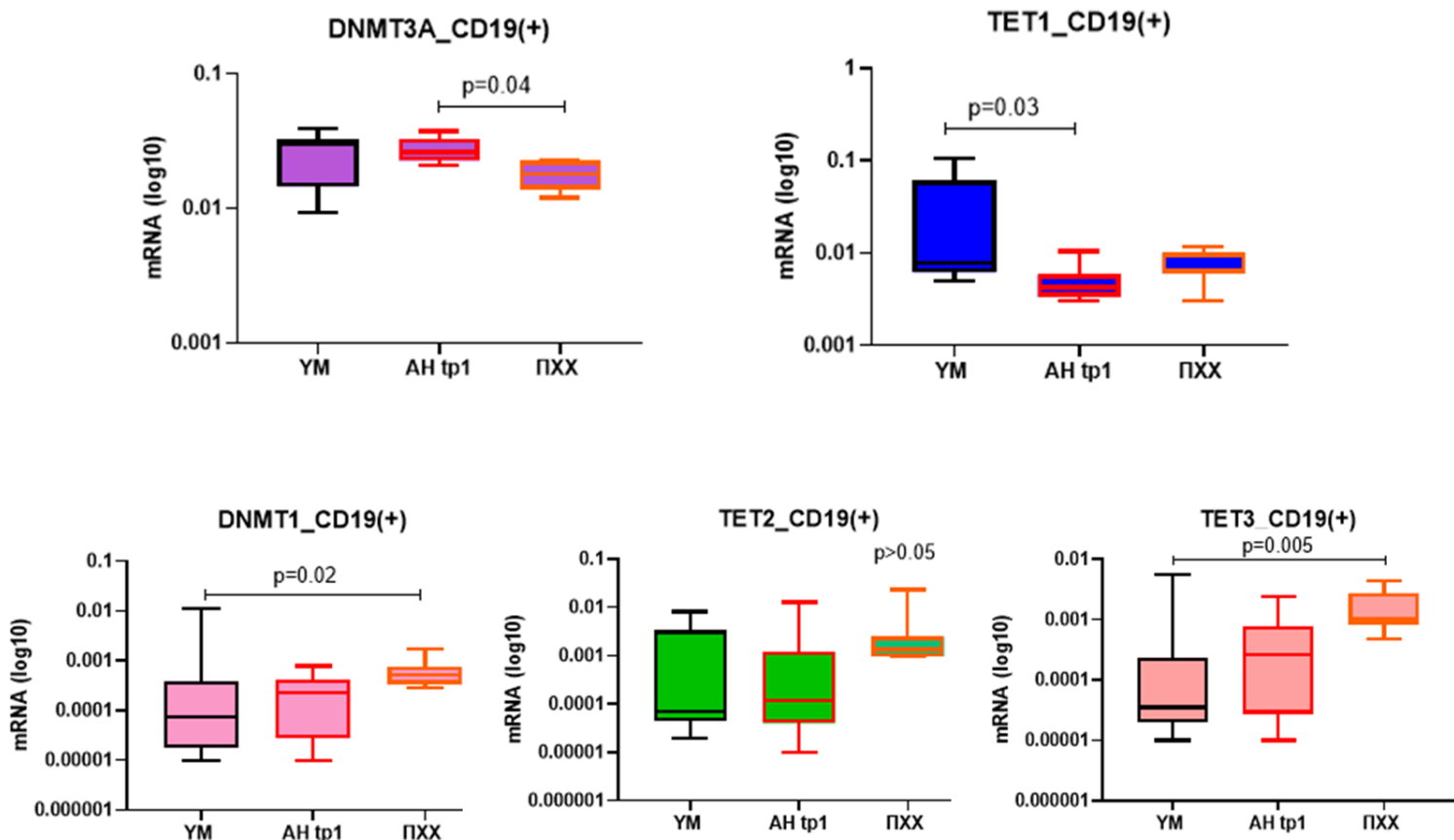
4.3. Προσδιορισμός της έκφρασης των DNMTs και TETs στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα.

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των ενζύμων μεθυλίωσης (DNMTs) και υδροξυμεθυλίωσης (TETs) σε μεταγραφικό επίπεδο στα B CD19(+) όσο και T CD4(+) λεμφοκύτταρα, μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων.

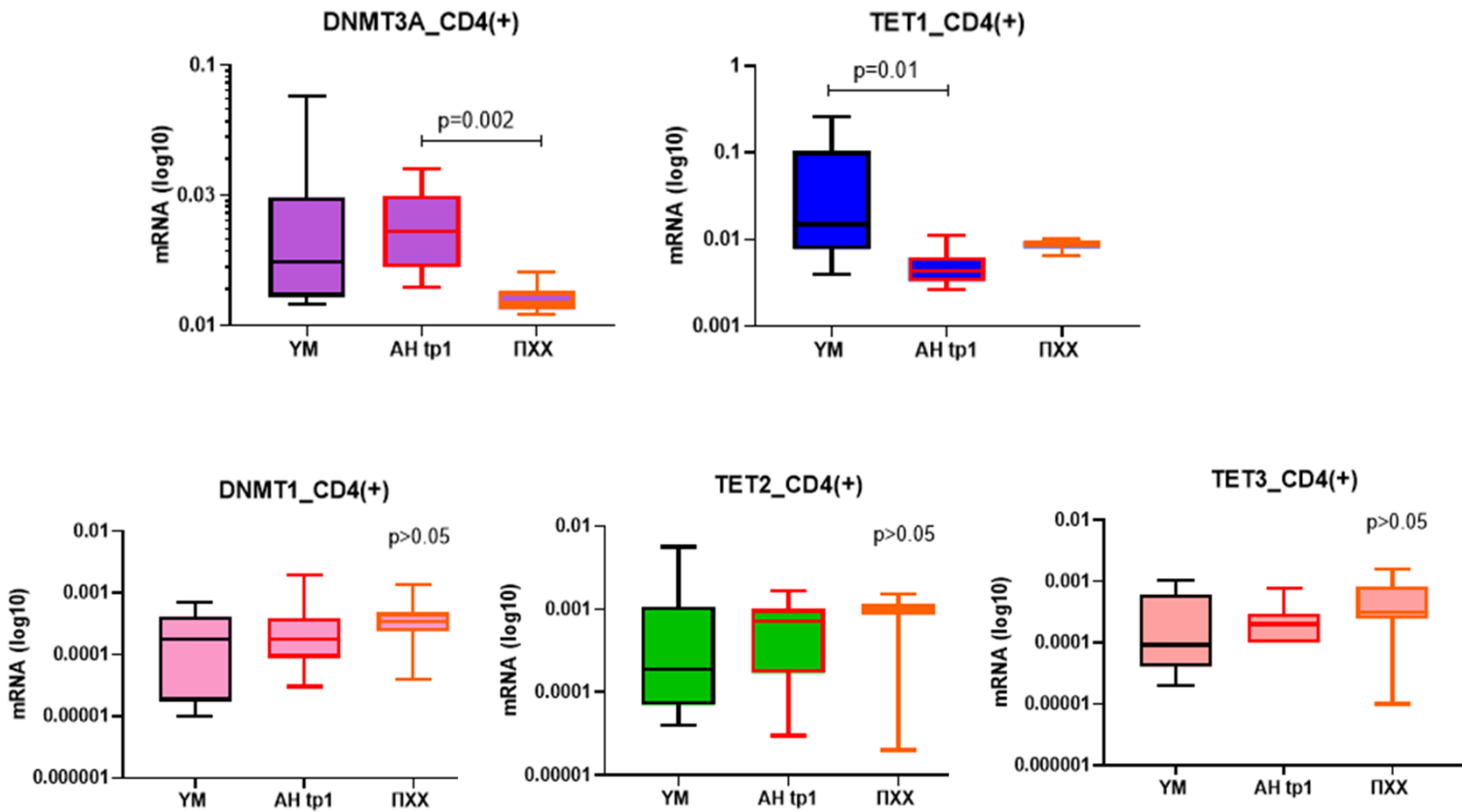
Αναφορικά με τον πληθυσμό των B CD19(+) λεμφοκυττάρων και την ομάδα των ασθενών με AH διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με AH tp1 παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα της DNMT3A συγκριτικά με την ομάδα των ασθενών με ΠΧΧ ($p=0.004$), και χαμηλά επίπεδα της TET1 συγκριτικά με την ομάδα των YM ($p=0.03$). Αντίθετα, οι ασθενείς με ΠΧΧ παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα της DNMT1 και της TET3 συγκριτικά με την ομάδα των YM ($p=0.02$ και $p=0.05$ αντίστοιχα). Τα ευρήματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 9**.

Όσο αφορά στον πληθυσμό των T CD4(+) λεμφοκυττάρων, τα ευρήματα ήταν όμοια για την ομάδα των ασθενών με AH tp1, ήτοι αυξημένη DNMT3A συγκριτικά με την ομάδα των ασθενών με ΠΧΧ ($p=0.002$) και χαμηλή TET1 συγκριτικά με την ομάδα των YM ($p=0.01$). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ευρήματα στον πληθυσμό των B CD19(+) λεμφοκυττάρων, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην DNMT1 και TET3 στα T CD4(+) κύτταρα. Τα ευρήματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 10**.

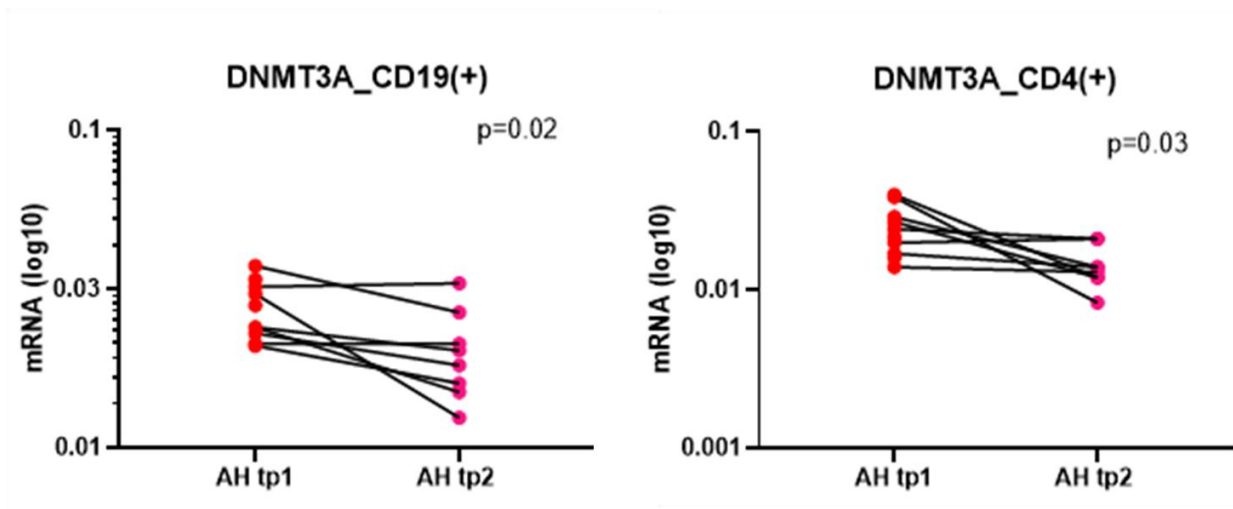
Τέλος, όσο αφορά στα επίπεδα των DNMTs και TETs μεταξύ των ασθενών με AH πριν και μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής (AH tp1 vs AH tp2), διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της DNMT3A παρουσιάζουν μείωση τόσο στα B CD19(+) όσο και στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με AH στη φάση ύφεσης της νόσου (AH tp2) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11**. Αντίθετα, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων της TET1 στους ασθενείς με AH πριν και μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της DNMT3A στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με AH tp2, δε διαφέρουν από αυτά των ασθενών με ΠΧΧ και των YM όπως φαίνεται στην **Εικόνα 12**.



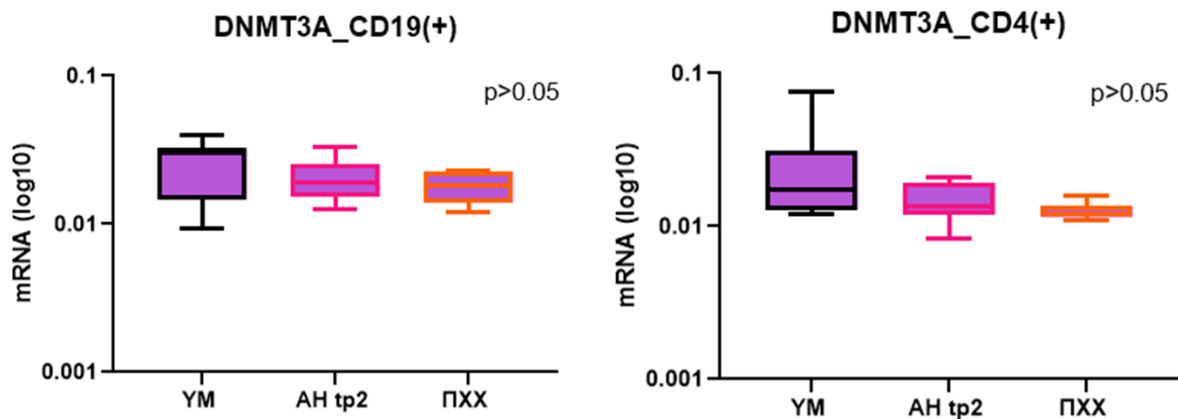
Εικόνα 9: Επίπεδα των DNMTs και TETs στα B CD19(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με AH tp1, ΠXX και YM. Οι ασθενείς με AH tp1 (n=10) παρουσιάζουν αυξημένη DNMT3A συγκριτικά με τους ασθενείς με ΠXX (=9) ($p=0.04$) και χαμηλή TET1 συγκριτικά με τους YM (n=10) ($p=0.03$) (Kruskal Wallis). Οι ασθενείς με ΠXX (n=9) παρουσιάζουν αυξημένη DNMT1 ($p=0.02$) και TET3 ($p=0.005$) συγκριτικά με τους YM (n=10) ενώ δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην TET2 (Kruskal Wallis).



Εικόνα 10: Επίπεδα των DNMTs και TETs στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με AH tp1, ΠXX και YM. Οι ασθενείς με AH tp1 (n=10) παρουσιάζουν αυξημένη DNMT3A συγκριτικά με τους ασθενείς με ΠXX (=9) ($p=0.002$) και χαμηλή TET1 συγκριτικά με τους YM (n=10) ($p=0.01$) (Kruskal Wallis). Οι ασθενείς με ΠXX (n=9) δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην DNMT1, TET2 και TET3 στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα (Kruskal Wallis).



Εικόνα 11: Επίπεδα της DNMT3A στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών κατά τη διάγνωση (AH tp1) vs κατά την ύφεση της νόσου (AH tp2) (n=8) (Wilcoxon). Παρατηρείται μείωση των επιπέδων της DNMT3A και στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς [(p=0.02 CD19(+)) και p=0.03 CD4(+)] μετά τη χορήγηση θεραπείας και την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης.



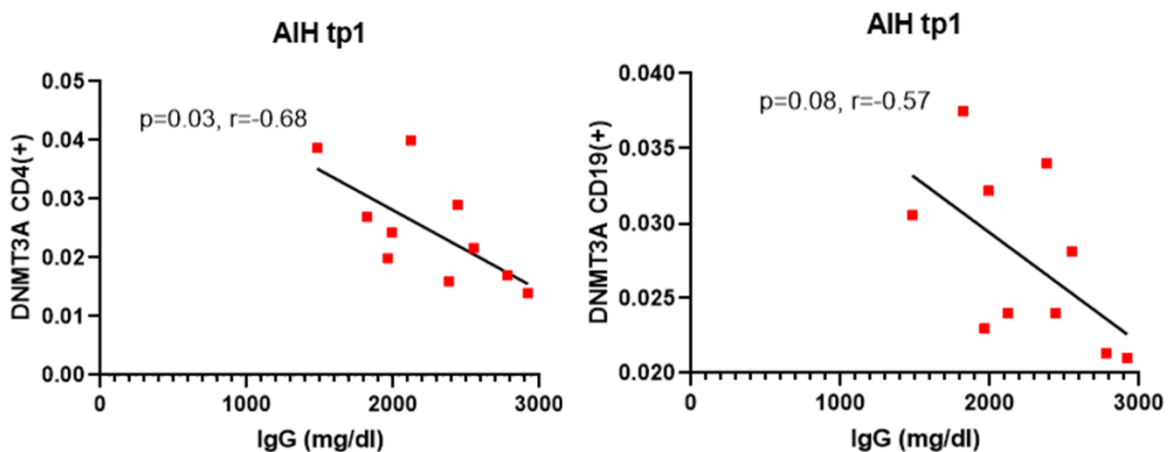
Εικόνα 12: Τα επίπεδα της DNMT3A στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών AH tp2 (n=8) δε διαφέρουν από αυτά των ασθενών με ΠXX (n=9) και των YM (n=10) (p>0.05) (Kruskal Wallis).

4.4. Συσχέτιση της έκφρασης των DNMTs και TETs με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων των DNMTs και TETs με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά ανά ομάδα ασθενών (AH tp1, AH tp2, ΠΧΧ) και υγιών μαρτύρων.

Όσο αφορά στην ομάδα ασθενών με AH κατά τη διάγνωση (AH tp1) παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της τιμής της IgG ανοσοσφαιρίνης και της DNMT3A στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα ($p=0.03$) ενώ η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στα B CD19(+) λεμφοκύτταρα ($p=0.08$) (Εικόνα 13). Παράλληλα θετική συσχέτιση ανεδείχθη μεταξύ της TET1 και της διάρκειας της νόσου στα B CD19(+) λεμφοκύτταρα ($n=10$, $p=0.002$, $r=0.85$ Spearman). Αντίθετα, στους ασθενείς με AH κατά την ύφεση της νόσου (AH tp2) παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της IgG ανοσοσφαιρίνης με τα επίπεδα της DNMT3A στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα ($n=8$, $p=0.02$, $r=0.8$ Spearman).

Όσο αφορά στην ομάδα των ασθενών με ΠΧΧ καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των DNMTs και TETs με κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Τέλος, στους YM, παρατηρήθηκε η ίδια θετική συσχέτιση της IgG ανοσοσφαιρίνης με τα επίπεδα της DNMT3A στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα ($n=10$, $p=0.02$, $r=0.7$ Spearman) όπως στους ασθενείς με AH tp2.



Εικόνα 13: Αρνητική συσχέτιση της DNMT3A με την τιμή της IgG στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με AH tp1 ($n=10$, $p=0.03$, $r=-0.68$) (Pearson) και όμοια τάση για τον πληθυσμό των B CD19(+) λεμφοκυττάρων ($n=10$, $p=0.08$ $r=-0.57$) (Pearson).

4.5. Συσχέτιση της έκφρασης των DNMTs και TETs με τα επίπεδα της 5^mC και 5^{hm}C στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών και ΥΜ.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των DNMTs και TETs με το ποσοστό της 5^mC και 5^{hm}C στα B CD19(+) και T CD4(+) λεμφοκύτταρα. Στους ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση (ΑΗ tp1) ουδεμία συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των DNMTs και TETs και του συνολικού ποσοστού 5^mC/5^{hm}C του DNA των δύο κυτταρικών πληθυσμών, υποδηλώνοντας ότι η διαφορετική έκφραση της DNMT3A και TET1 που χαρακτηρίζει τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ tp1 πιθανότατα σχετίζεται με τη μεθυλίωση μεμονωμένων γονιδίων και όχι με τη συνολική μεθυλίωση του γονιδιώματος.

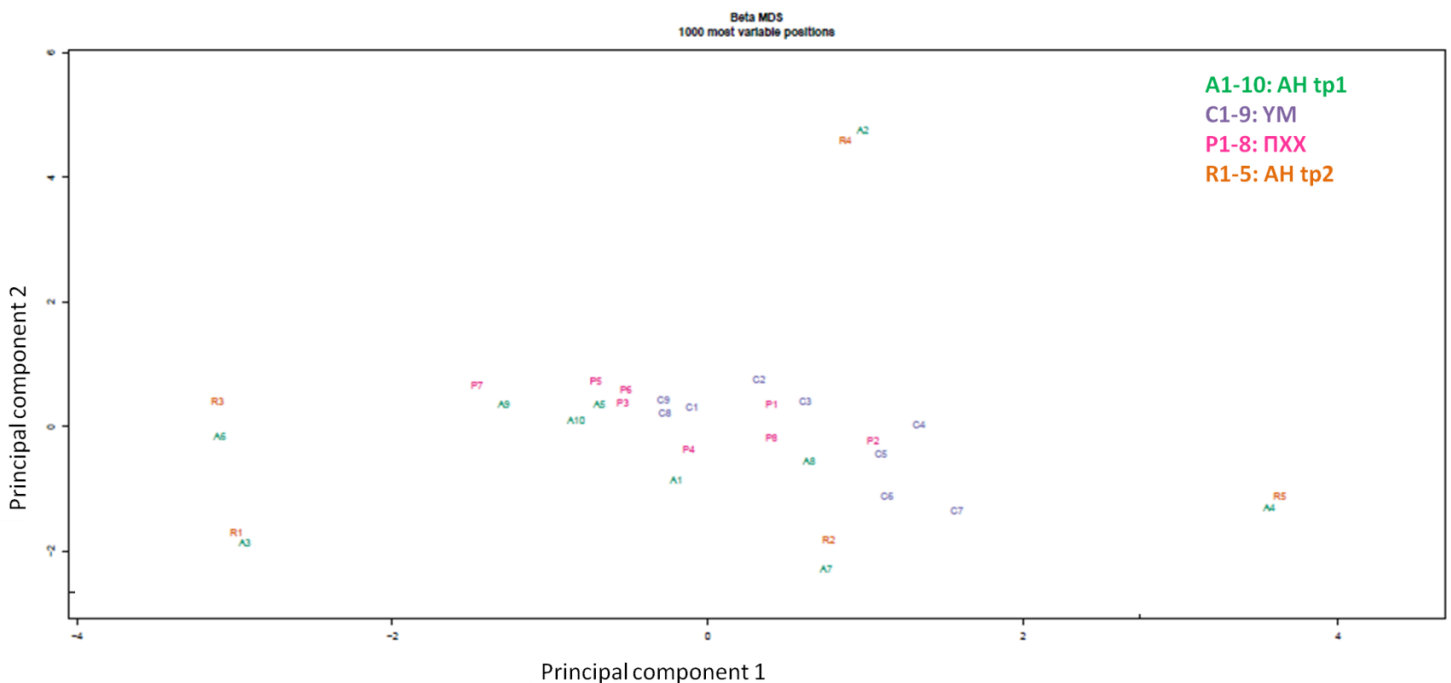
Ομοίως στην ομάδα ασθενών με ΠΧΧ, η αυξημένη DNMT1 και TET3 στα B CD19(+) λεμφοκύτταρα δεν παρουσίαζε συσχέτιση με το ολικό ποσοστό της 5^mC και 5^{hm}C των κυττάρων αυτών.

Ωστόσο, στους ασθενείς με ΑΗ κατά την ύφεση της νόσου (ΑΗ tp2) παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της TET1 και της ολικής 5^{hm}C των T CD4(+) λεμφοκυττάρων (n=8, p=0.02, r=-0.79 Spearman).

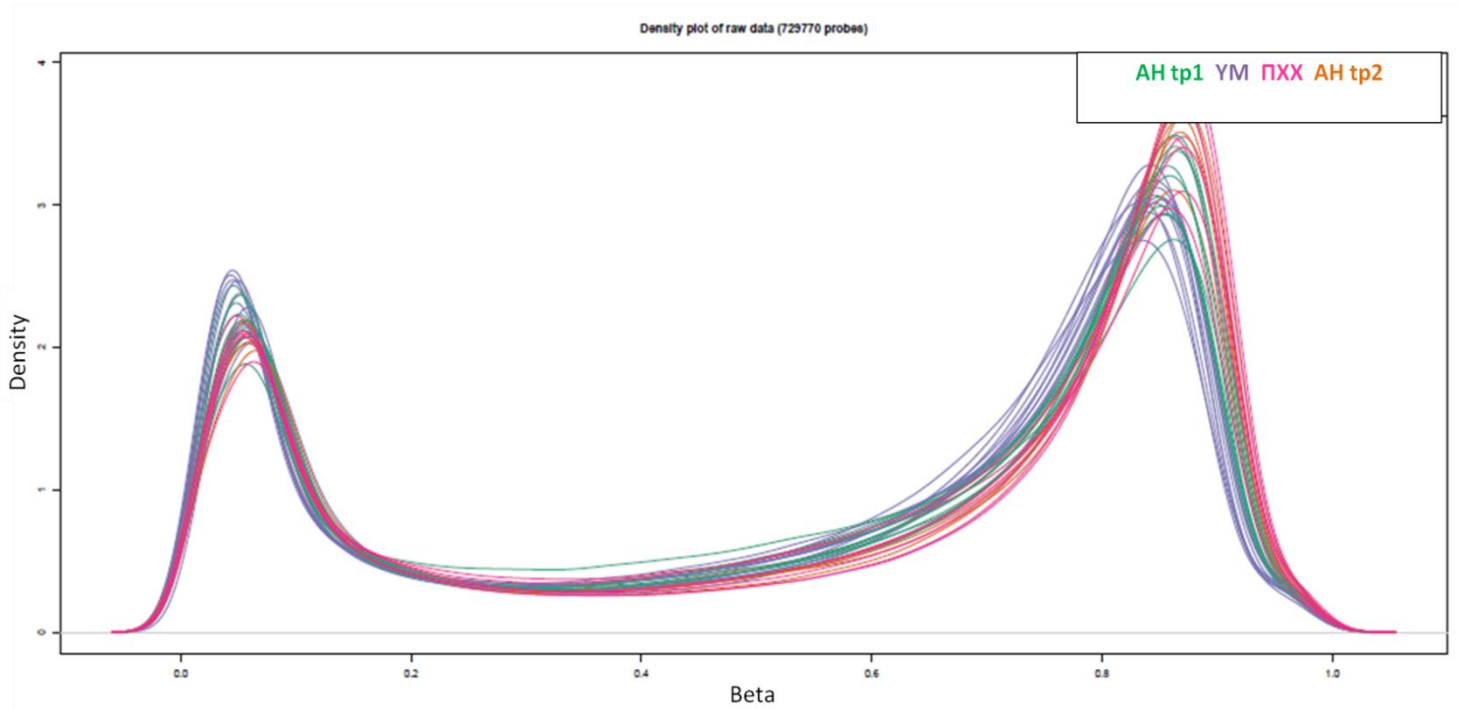
Τέλος στην ομάδα των υγιών μαρτύρων, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της DNMT1 και της 5^mC των T CD4(+) λεμφοκυττάρων (n=10, p=0.02, r=0.72 Spearman). Το εύρημα αυτό συνάδει με το γεγονός ότι η DNMT1 αποτελεί το κυρίαρχο ένζυμο μεθυλίωσης που διατηρεί τη μεθυλίωση του DNA ανά κυτταρικό κύκλο.

4.6. Epigenome wide association study (EWAS) σε T CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΑΗ, ΠΧΧ και ΥΜ.

Η αρχική αδρή ανάλυση των δεδομένων έγινε με multidimensional plots (MDS), όπως δείχνει η **Εικόνα 14Α**, που εξετάζουν τις ομοιότητες και τις διαφορές της μεθυλίωσης στις 1000 πιο μεθυλιωμένες θέσεις (DMPs) που εντοπίστηκαν σε συνάρτηση με τις δύο μεγαλύτερες πηγές διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων (principal components 1 και 2). Με τον τρόπο αυτό έγινε μία πρώτη εκτίμηση των σχέσεων μεταξύ των ομάδων η οποία δεν ανέδειξε έκδηλες διαφορές μεταξύ τους, ωστόσο επιβεβαιώθηκε η ομοιότητα μεταξύ των ασθενών με ΑΗ tp1 συγκριτικά με τους ασθενείς με ΑΗ tp2, καθώς επρόκειτο για τους ίδιους ασθενείς πριν και μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Η **Εικόνα 14Β** παρουσιάζει το διάγραμμα κατανομής της μεθυλίωσης των δειγμάτων, που απεικονίζει τη δικόρυφη καμπύλη της μεθυλίωσης με δύο αιχμές, οι τιμές των οποίων εκφράζονται ως β -value και κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1. Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό δεν ανιχνεύθηκαν δείγματα με ατελή μετατροπή μετά την επώαση με bisulfite.



A



B

Εικόνα 14: **A)** Το MDS plot των 1000 DMPs απεικονίζει την ομοιότητα μεταξύ των 32 δειγμάτων σε σχέση με τους δύο άξονες που απεικονίζουν τις δύο μεγαλύτερες πηγές διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων (principal component 1 και 2). **B)** Το διάγραμμα κατανομής της μεθυλίωσης παρουσιάζει τη δικόρυφη καμπύλη της μεθυλίωσης μεταξύ $0 < \beta < 1$.

4.6.1. AH tp1 vs YM

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της ομάδας των ασθενών με AH κατά τη διάγνωση (AH tp1) (n=10) και των YM (n=9) όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 15**. Το MDS plot ανέδειξε αδρές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, ωστόσο μετά την ομαλοποίηση των δειγμάτων δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών DMPs ($p > 0.05$). Αντίθετα, η ανάλυση εκτεταμένων περιοχών του γονιδιώματος ανέδειξε την ύπαρξη 29 DMRs οι οποίες αντιστοιχούν σε 29 γονίδια, 3 εκ των οποίων βρίσκονται σε φυλετικά χρωμοσώματα. Το διάγραμμα Heatmap των 287 CpGs που αντιστοιχούν στις 29 DMRs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ ασθενών με AH tp1 και YM απεικονίζεται στην **Εικόνα 16A**.

Όσο αφορά στην εντόπιση των ανωτέρω DMRs κατά μήκος του γονιδιώματος, το μεγαλύτερο ποσοστό 48,3% (14/29) αφορούσε τους εκκινήτες (promoters) και τα

σημεία έναρξης της μεταγραφής [transcription start sites (TSS)] των γονιδίων. Το 20,7% (6/29) εντοπιζόταν σε περιοχές εσονίων (introns), το 17,8% στις διαγονιδιακές περιοχές [intergenic regions (IGR)], το 3,4% (1/29) στην 5' αμετάφραστη περιοχή [untranslated region (UTR)] ενώ 6,9% αντιστοιχούσε σε περιοχές του triplex-target DNA site (TTS) (ολιγονουκλεοτιδικές περιοχές τριπλής έλικας που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση) και των εξονίων (exons), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16B**.

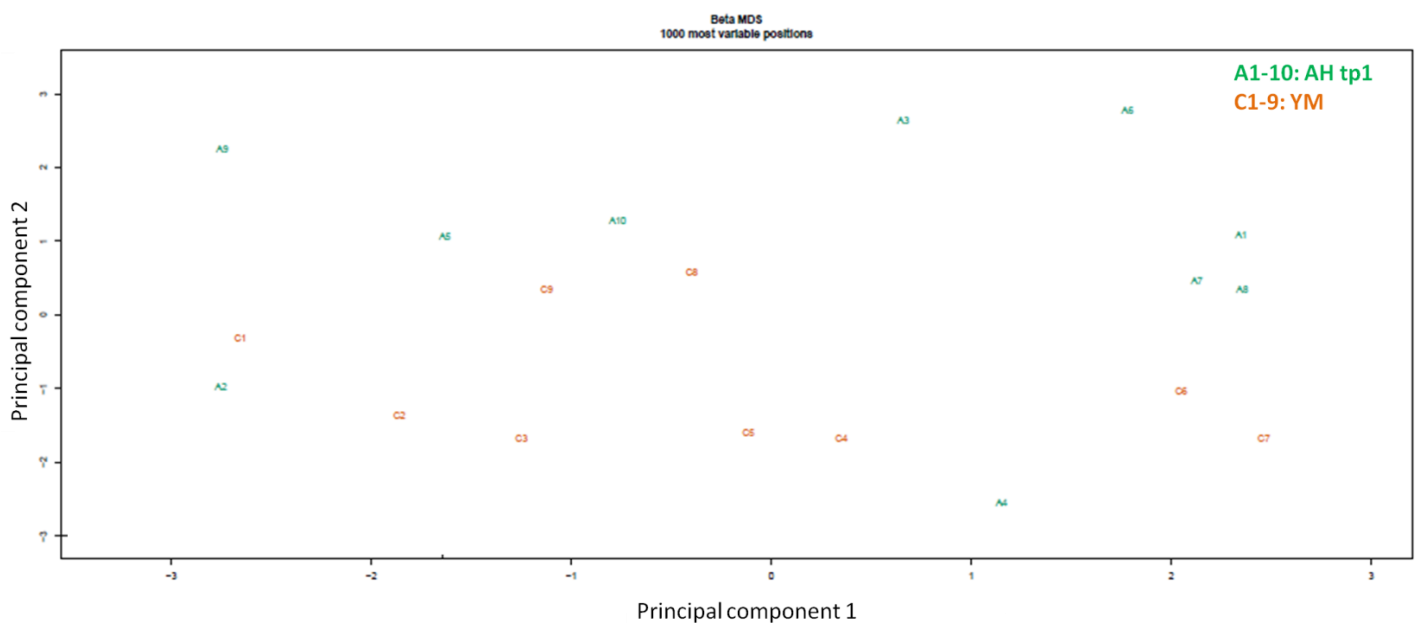
Ο **Πίνακας 3** παρουσιάζει τα γονίδια που σχετίζονται με τις 29 DMRs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών με AH κατά τη διάγνωση (AH tp1) και των YM, το χρωμόσωμα στο οποίο εδράζονται, το βαθμό μεθυλίωσης, τη θέση τους σε αυτό καθώς και τη λειτουργία τους. Το 58,6% (17/29) των DMRs παρουσίαζε υπομεθυλίωση στους ασθενείς με AH tp1 σε σχέση με τους YM ενώ 41,4% (12/29) ανευρέθησαν υπερμεθυλιωμένες. Οκτώ από τα 29 διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια που ανιχνεύθηκαν εδράζονται στο χρωμόσωμα 6. Το χρωμόσωμα 6 αποτελεί το 5,5-6% του συνολικού DNA των κυττάρων και περιέχει τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) που κωδικογραφούν τα HLA μόρια τάξης I και II τα οποία είναι ουσιώδη για την ανοσολογική απόκριση έναντι ξένων αντιγόνων και για μηχανισμούς αυτοανοσίας (298). Δύο εκ των οκτώ γονιδίων αφορούσαν σε γονίδια HLA τάξης II και πιο συγκεκριμένα στα HLA-DPA1 (υπερμεθυλίωση) και HLA-DPB2 (υπομεθυλίωση). Το HLA-DPA1 κατέχει κεντρικό ρόλο στην παρουσίαση ξένων αντιγόνων στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και συμμετέχει σε αντιδράσεις μοσχεύματος κατά ξενιστή (299). Το HLA-DPB2 αποτελεί ψευδογονίδιο (300). Επιπλέον υπομεθυλίωση παρατηρήθηκε και στον εκκινητή του γονιδίου του TNF στο χρωμόσωμα 6, ο οποίος αποτελεί προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που συμμετέχει σε πληθώρα φλεγμονωδών μονοπατιών καθώς και μονοπατιών αυτοανοσίας.

Τρεις DMRs ανιχνεύθηκαν σε φυλετικά χρωμοσώματα: μία αφορούσε το X και δύο το Y χρωμόσωμα. Από τα γονίδια που σχετίζονται με τις παραπάνω DMRs, το γονίδιο CDK16 (Cyclin Dependent Kinase 16) εδράζεται στο X χρωμόσωμα και συμμετέχει σε μονοπάτια καταστροφής του DNA, το γονίδιο EIF1AY (Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A Y-Linked) του Y χρωμοσώματος σχετίζεται με μονοπάτια απόπτωσης των ινοβλαστών ενώ το γονίδιο TXLNGY (Taxilin Gamma Pseudogene, Y-Linked) αποτελεί ψευδογονίδιο του οποίου ο ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί.

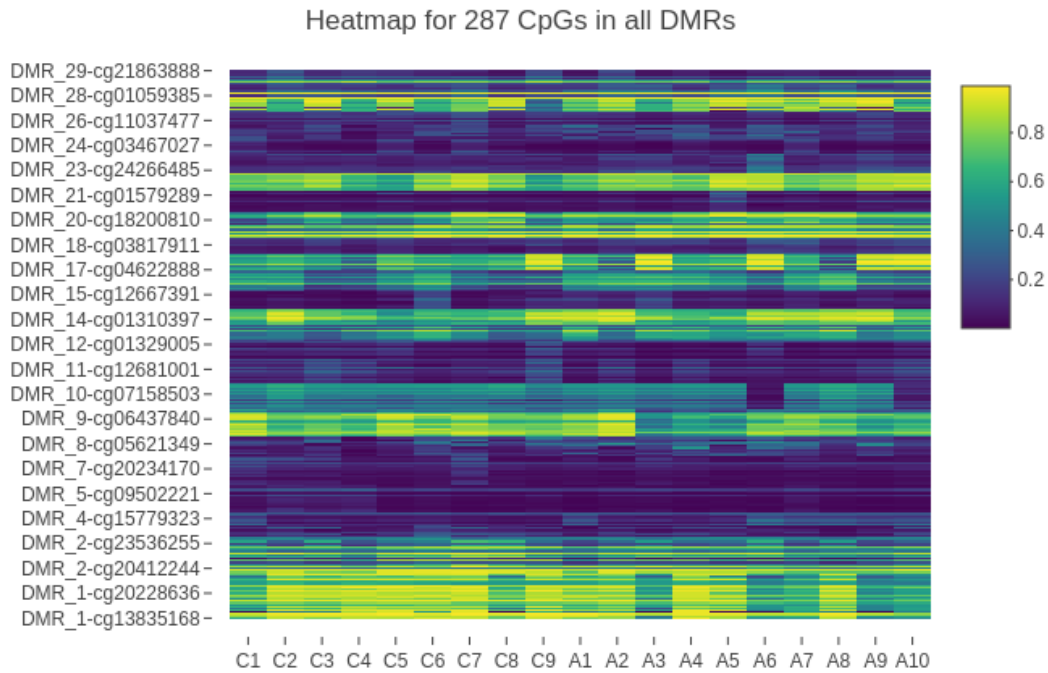
Στη DMR_3 ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεθυλίωσης μεταξύ AH tp1 και YM. Το γονίδιο ADAM21P (ADAM metallopeptidase domain 21

pseudogene 1), που αντιστοιχεί στη DMR_3, αποτελεί ψευδοοικογονίδιο του οποίου ο ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί ενώ η 2^η σε σειρά στατιστικά σημαντική DMR αφορούσε στη DMR_4 και τον εκκινητή του γονιδίου PDGFRL (platelet derived growth factor receptor like). Το γονίδιο PDGFRL κωδικογραφεί μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων οι οποίες ενεργοποιώντας ένα καταρράκτη σηματοδοτικών αντιδράσεων επηρεάζουν πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις κι έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη αλλά και την πρόγνωση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (301).

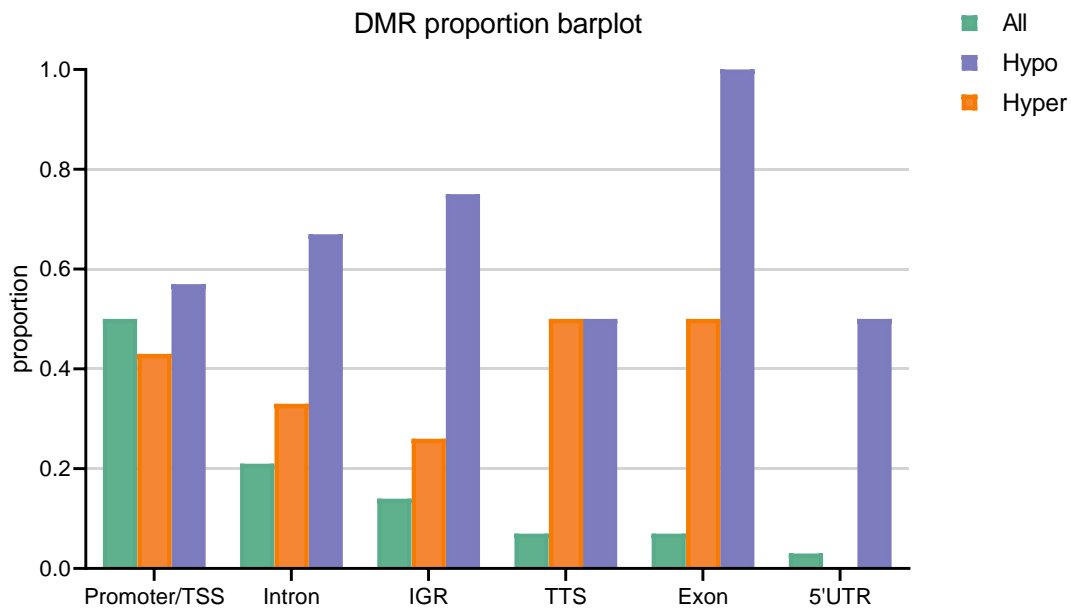
Τέλος, προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο τα πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια να συμμετέχουν σε κοινά λειτουργικά μονοπάτια πραγματοποιήθηκε έλεγχος των γονιδίων με το μεγαλύτερο αριθμό CpGs. Ωστόσο, η ανωτέρω ανάλυση δεν ανέδειξε την ύπαρξη συγκεκριμένων λειτουργικών μονοπατιών.



Εικόνα 15: Το MDS plot των 1000 DMPs απεικονίζει τη θέση των ασθενών με AH tp1 και των YM σε σχέση με τους δύο άξονες που απεικονίζουν τις δύο μεγαλύτερες πηγές διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων (principal component 1 και 2). Παρατηρείται τάση συρροής των YM στο κέντρο του διαγράμματος ενώ οι ασθενείς με AH tp1 εντοπίζονται κυρίως περιφερικά.



A



B

Εικόνα 16: **A)** Heatmap των 287 CpGs για τις 29 DMRs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών με AH tp1 και των YM (A1-A10 ασθενείς με AH tp1 και C1-C9 υγιείς μάρτυρες) **B)** Διάγραμμα που απεικονίζει την εντόπιση των 29 DMRs (άξονας X) κατά μήκος του γοιδιώματος, σε σχέση με το ποσοστό μεθυλίωσης (άξονας Y). Το μεγαλύτερο ποσοστό των DMRs αντιστοιχεί σε περιοχές εκκινητών και σημείων έναρξης της μεταγραφής ενώ το μικρότερο ποσοστό αντιστοιχεί στις 5' UTR.

DMRs: differentially methylated regions, Promoter/TSS: εκκινητές/transcription start site, Intron: εσόνιο, IGR: intergenic regions, Exon: εξώνιο, TTS: triplex-target DNA sites, 5'UTR: 5' untranslated regions

Πίνακας 3: Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα γονίδια που σχετίζονται με τις 29 DMRs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών με AH tp1 και των YM.

Στήλη 1^η: συντομογραφία γονιδίου, στήλη 2^η: χρωμόσωμα στο οποίο εδράζονται τα γονίδια, στήλη 3^η: περιγραφή του γονιδίου, στήλη 4^η: ο βαθμός μεθυλίωσης του γονιδίου, στήλη 5^η: εντόπιση της DMR στο γονίδιο, στήλη 6^η: λειτουργική σημασία του γονιδίου.

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Περιγραφή	Μεθυλίωση	Εντόπιση	Λειτουργία
ADAM21P	14	ADA metallopeptidase domain 21 pseudogene 1	υπέρ	intron (NR_135825)	pseudogene
BISPR	19	BST2 interferon stimulated positive regulator	υπέρ	promoter-TSS (NM_004335)	ncRNA
CAT	11	catalase	υπέρ	promoter-TSS (NM_001752)	protein-coding
CDK16	X	cyclin dependent kinase 16	υπό	promoter-TSS (NM_033018)	protein-coding
DDX43	6	DEAD-box helicase 43	υπέρ	exon (NM_018665)	protein-coding
EID3	12	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3	υπό	promoter-TSS (NM_001008394)	protein-coding
EIF1AY	Y	eukaryotic translation initiation factor 1A	υπό	promoter-TSS (NM_004681)	pseudogene
EIF4E	4	eukaryotic translation initiation factor 4E	υπό	promoter-TSS (NM_001130678)	protein-coding

GOLGA3	12	golgin A3	υπό	intron (NM_001161347)	protein-coding
HCG4B	6	HLA complex group 4B	υπέρ	promoter-TSS (NR_001317)	ncRNA
HTR2A	13	5-hydroxytryptamine receptor 2A	υπό	Intergenic	protein-coding
HLA-DPA1	6	major histocompatibility complex	υπέρ	intron (NM_002121)	protein-coding
HLA-DPB2	6	major histocompatibility complex	υπό	intron (NR_001435)	pseudogene
LHX6.1	9	LIM Homeobox 6	υπό	intron (NM_001242333)	protein-coding
LINC02571	6	long intergenic non- protein coding RNA 2571	υπέρ	Intergenic	ncRNA
MUC-20	3	Mucin 20, Cell Surface Associated	υπό	intron (NM_138297)	protein-coding
TCF19	6	transcription factor 19	υπό	exon (NM_007109)	protein-coding
RHOJ	14	ras homolog family member J	υπό	5' UTR (NM_020663)	protein-coding
PAIP2B	2	poly(A) binding protein interacting protein 2B	υπό	Intergenic	protein-coding
PDGFRL	8	platelet derived growth factor receptor like	υπό	promoter-TSS (NM_006207)	protein-coding
PM20D1	2	peptidase M20 domain containing 1	υπό	promoter-TSS (NR_135186)	protein-coding
RHOH	4	ras homolog family member H	υπέρ	promoter-TSS (NM_001278369)	protein-coding
STPG2	4	sperm tail PG-rich repeat containing 2	υπέρ	promoter-TSS (NM_174952)	protein-coding
TNF	6	tumor necrosis factor	υπό	promoter-TSS	protein-coding

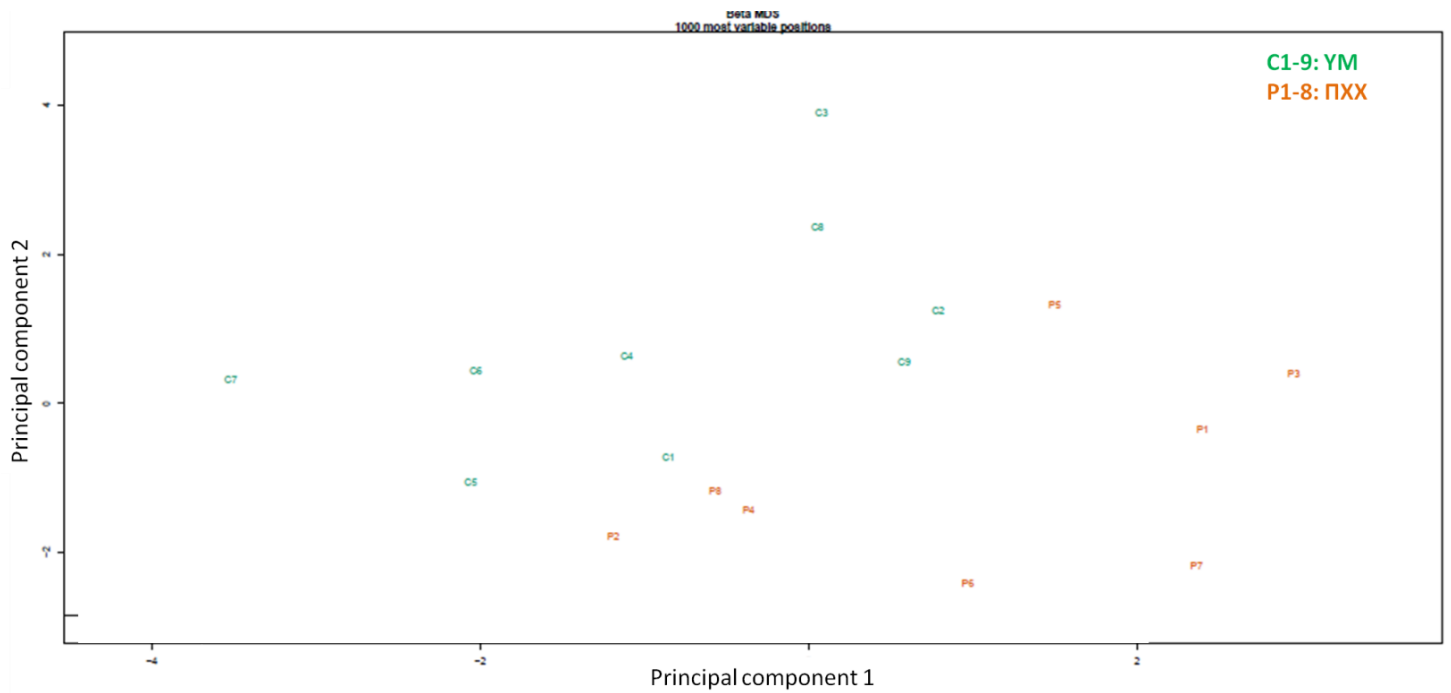
				(NM_000594)	
TXLNGY	Y	taxilin gamma pseudogene	υπό	promoter-TSS (NR_045129)	pseudogene
TYW3	1	tRNA-yW synthesizing protein 3 homolog	υπέρ	promoter-TSS (NR_027962)	protein-coding
VTRNA2-1	5	vault RNA 2-1	υπέρ	TTS (NR_030583)	ncRNA
WBP2NL	22	WBP2 N-terminal like	υπό	TTS (NM_019106)	protein-coding
ZFP57	6	ZFP57 zinc finger protein	υπέρ	Intergenic	protein-coding

Protein coding: γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, ncRNA: non coding RNA, pseudogene: ψευδογονίδιο

4.6.2. ΠΧΧ vs ΥΜ

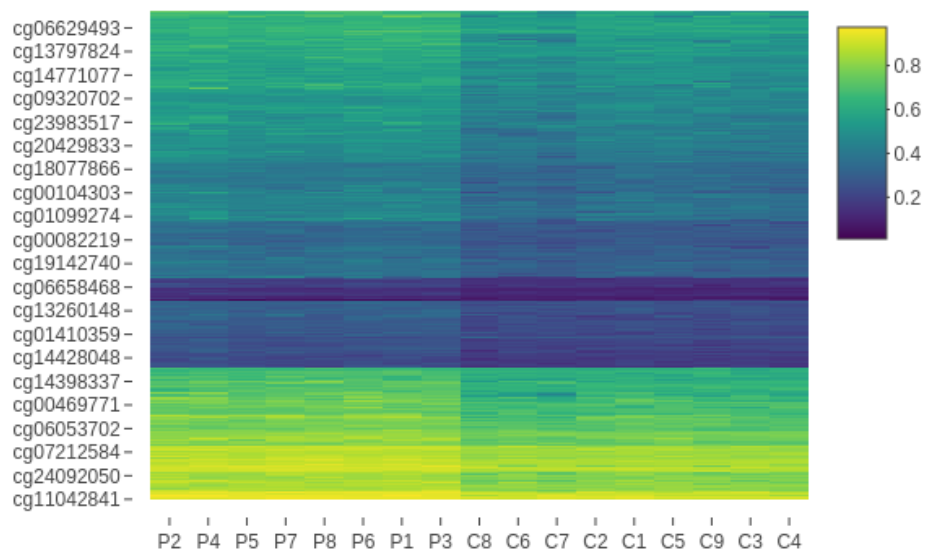
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της ομάδας των ασθενών με ΠΧΧ (n=8) και των ΥΜ (n=9). Το MDS plot (**Εικόνα 17**) ανέδειξε αδρές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων καθώς παρατηρείται συρροή των ΥΜ στην αριστερή πλευρά του διαγράμματος σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ. Μετά από ομαλοποίηση των δειγμάτων και απομάκρυνση τυχόν ενδογενών σφαλμάτων, ανιχνεύθηκαν 1016 DMPs (99,8% υπερμεθυλιωμένες και 0,2% υπομεθυλιωμένες) στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα των ασθενών με ΠΧΧ σε σχέση με τους ΥΜ, οι οποίες αντιστοιχούν σε 695 γονίδια. Το Heatmap για τις DMPs μεταξύ ασθενών με ΠΧΧ και ΥΜ απεικονίζεται στην **Εικόνα 18**.

Όσο αφορά στην εντόπιση των DMPs στο CpG νησίδιο, η πλειοψηφία εντοπίστηκε στις open sea regions και τα shores ενώ περιορισμένος αριθμός CpGs βρέθηκε στις κεντρικές περιοχές των CpG νησιδίων και των shelves όπως φαίνεται στην **Εικόνα 19Α**. Περαιτέρω ανάλυση της κατανομής για τις υπέρ και υπομεθυλιωμένες DMPs, ανέδειξε ότι η πλειοψηφία των υπερμεθυλιωμένων DMPs εντοπιζόταν στο gene body και τις IGR ενώ οι υπομεθυλιωμένες DMPs εντοπιζόταν κυρίως στο gene body και την 5' UTR όπως δείχνει η **Εικόνα 19Β**.

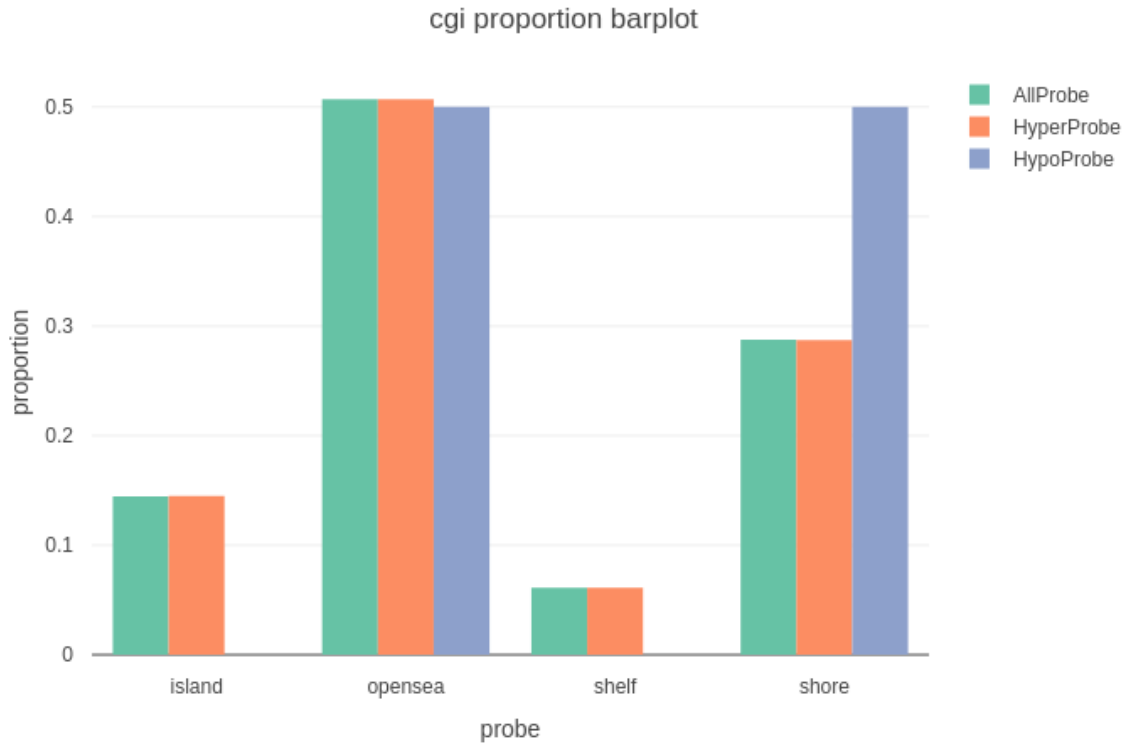


Εικόνα 17: Το MDS plot των 1000 DMPs απεικονίζει την ομοιότητα μεταξύ των ασθενών με ΠΧΧ και των YM σε σχέση με τους δύο άξονες που απεικονίζουν τις δύο μεγαλύτερες πηγές διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων (principal component 1 και 2). Παρατηρείται τάση συρροής των YM στην αριστερά πλευρά του διαγράμματος σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ που εντοπίζονται κυρίως δεξιά.

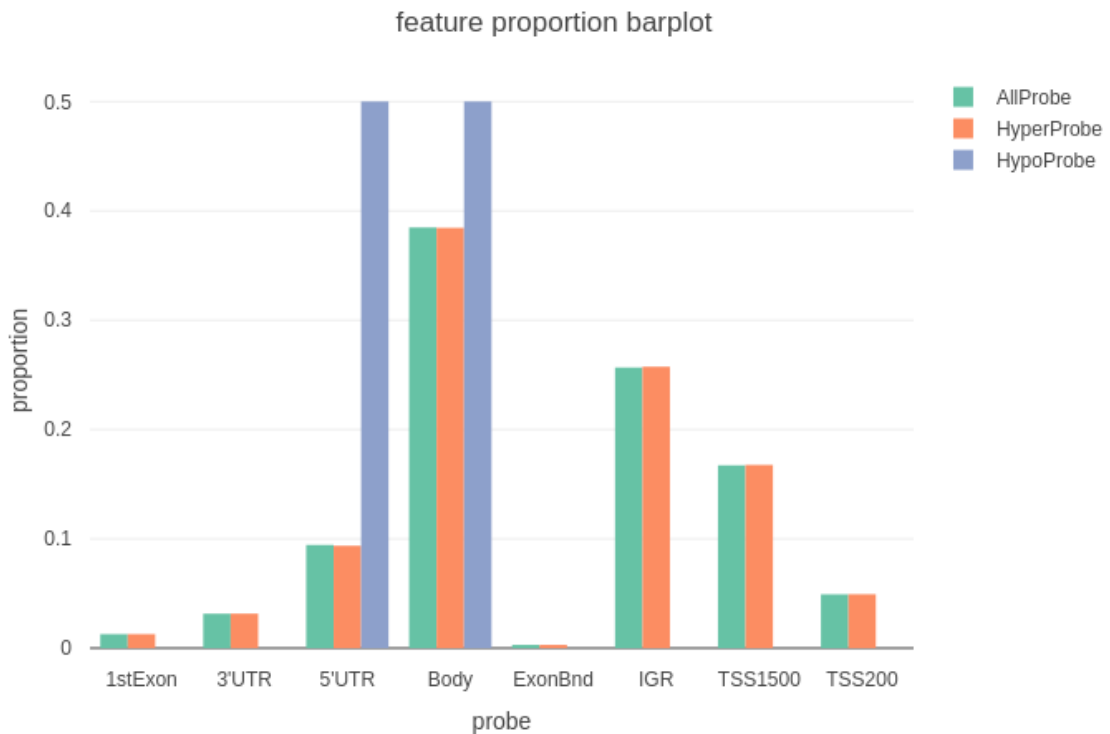
Heatmap for 1016 0.05 significant CpGs



Εικόνα 18: Heatmap των CpGs για τις 1016 DMPs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών με ΠΧΧ και των YM (P1-P8 ασθενείς με ΠΧΧ και C1-C9 υγιείς μάρτυρες).



A



B

Εικόνα 19: **A)** Εντόπιση των DMPs κατά μήκος του CpG νησιδίου στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Η πλειοψηφία των DMPs εντοπίζεται στις περιοχές open sea και στα shores. **B)** Εντόπιση των υπερ και υπομεθυλιωμένων DMPs κατα μήκος του γονιδίου. Η πλειοψηφία των

υπερμεθυλιωμένων DMPs ανιχνεύθηκε σε περιοχές των gene bodies και των IGR ενώ οι υπομεθυλιωμένες DMPs εντοπίστηκαν στις 5' UTR και το gene body.

DMPs: differentially methylated probes, IGR: intergenic region, 5' UTR: 5' untranslated region, TSS: transcription start site, Exon: εξόνιο, 3' UTR: 3' untranslated region, 5' UTR: 5' untranslated region.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των 50 γονιδίων που παρουσίαζαν το μεγαλύτερο αριθμό DMPs (≥ 2) (**Εικόνα 20A**). Η μεγαλύτερη διαφορά στη μεθυλίωση παρατηρήθηκε στο γονίδιο SGCE και αφορούσε σε 7 υπερμεθυλιωμένες CpGs που εδράζονται στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής, TSS1500. Το SGCE (sarcoglycan epsilon) γονίδιο κωδικογραφεί μία πρωτεΐνη της οικογένειας των σαρκογλυκανών. Οι σαρκογλυκάνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούν στοιχεία του συμπλέγματος δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης οι οποίες συνδέουν την ακτίνη του κυτταροσκελετού με την εξωκυττάρια ουσία. Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας που εκφράζονται κυρίως στους γραμμωτούς μύες, η έψιλον σαρκογλυκάνη εκφράζεται ευρέως και σε άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του ήπατος (302). Στην **Εικόνα 20B** παρουσιάζεται η μέση μεθυλίωση του γονιδίου SGCE για τους ασθενείς με ΠΧΧ και τους ΥΜ καθώς και η θέση των CpGs οι οποίες εδράζονται εντός της κεντρικής περιοχής του CpG νησιδίου στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής, TSS1500.

Μεταξύ των πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων ανιχνεύθηκαν γονίδια που εμπλέκονται σε μονοπάτια σχετιζόμενα με τη φυσική και επίκτητη ανοσία και πιο συγκεκριμένα υπερμεθυλιωμένα βρέθηκαν τα γονίδια: TLR9 (Toll like receptor, CD289) που σχετίζεται με την αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών και την ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας, SQSTM1 (ubiquitin-binding protein p62) που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των TLR και την αυτοφαγία, RHOD (Ras Homolog Family Member D) που σχετίζεται με τη χημειοταξία των μακροφάγων, GSTP1 (Glutathione S-Transferase Pi 1) που προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, DUSP3 (Dual Specificity Phosphatase 3) το οποίο ελέγχει μονοπάτια διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων, CD19 (CD19 molecule) που αποτελεί συνδιεγερτικό μόριο των Β λεμφοκυττάρων, ALOX12 (Arachidonate 12-Lipoxygenase, 12S Type) που σχετίζεται με τη σύνθεση και απελευθέρωση των εικοσανοειδών, CAMTA1 (Calmodulin Binding Transcription Activator 1) που

αποτελεί ματαγραφικό παράγοντα σχετιζόμενο με τη διαφοροποίηση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων, C1QTNF3 (C1q And TNF Related 3) που παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τον TNF και το C1q του συμπληρώματος και συμμετέχει στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από μονοκύτταρα και ινοβλάστες, RPTOR (Regulatory Associated Protein of mTOR Complex 1) που εμπλέκεται στον έλεγχο του στόχου της ραπαμυκίνης που ελέγχει την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, PRKAR1B (Protein Kinase cAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Beta) που κωδικογραφεί μία πρωτεϊνική κινάση με πρωταρχικό ρόλο στη μεταγωγή των Τ κυττάρων και LOC100996291(LINC01993 -Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1993) που αποτελεί γονίδιο το οποίο δεν κωδικογραφεί πρωτεΐνη ωστόσο αλλαγές της μεθυλίωσής του σχετίζονται ισχυρά με τη νόσο του Crohn (303).

Περαιτέρω ανάλυση της μεθυλίωσης των CpGs διενεργήθηκε για το χρωμοσώματα X. Μετά από την απομάκρυνση ενδογενών σφαλμάτων ανιχνεύθηκαν 1203 DMPs που αντιστοιχούσαν σε 322 γονίδια εκ των οποίων 5 (1,5%) παρουσίαζαν υπομεθυλίωση. Η ανάλυση των γονιδίων με το μεγαλύτερο αριθμό DMPs (≥ 5) ανέδειξε υπερμεθυλίωση σε γονίδια όπως το NDUFB11 (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B11), GK (Glycerol Kinase) και το SLC25A14 (Solute Carrier Family 25 Member 14) που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια των μιτοχονδρίων, το γονίδιο HTR2C (5-Hydroxytryptamine Receptor 2C) το οποίο κωδικογραφεί έναν ενδογενή νευροδιαβιβαστή της σεροτονίνης και σχετίζεται με την ανάπτυξη καταθλιπτικής διαταραχής, το γονίδιο TSC22D3 (TSC22 Domain Family Member 3) του οποίου η έκφραση επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή και σχετίζεται με την ανάπτυξη οστεοπόρωσης αλλά και το γονίδιο OGT (O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase) το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών διεργασιών μέσω αντιδράσεων γλυκοσυλίωσης και φωσφορυλίωσης. Στον **Πίνακα 4** περιλαμβάνονται τα γονίδια με το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs του X χρωμοσώματος μεταξύ ασθενών με ΠΧΧ έναντι ΥΜ.

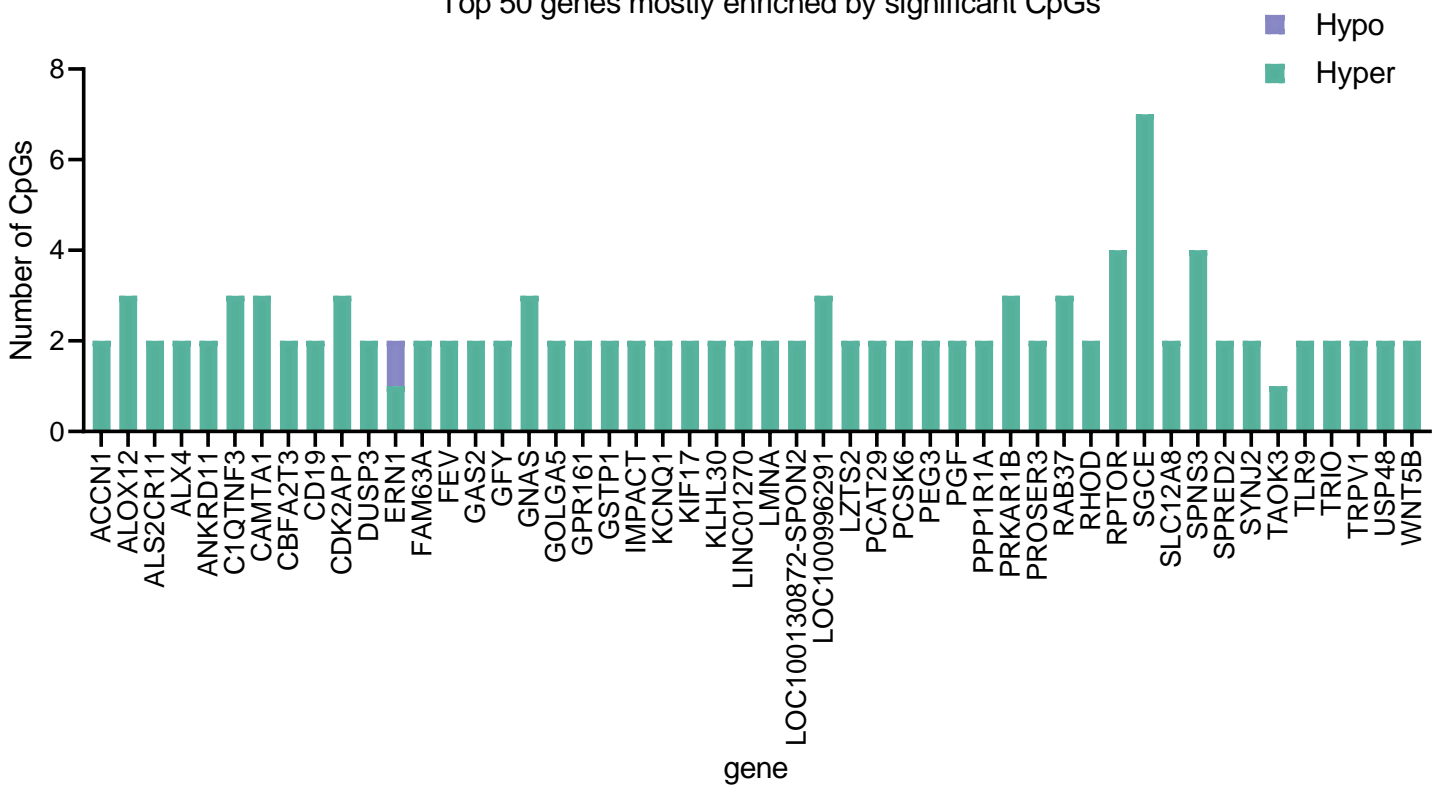
Καθώς δύο ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει διαφορές στη μεθυλίωση του DNA του χρωμοσώματος X μεταξύ ασθενών με ΠΧΧ και ΥΜ (266,267), πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η σύγκριση ανέδειξε σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των γονιδίων που παρουσιάζουν διαφορές στη μεθυλίωση μεταξύ ασθενών με ΠΧΧ και ΥΜ καθώς και στο πρότυπο μεθυλίωσής τους (26/30 γονίδια υπερμεθυλιωμένα σε όλες τις μελέτες, 4/30 υπομεθυλιωμένα σε μία από τις προηγούμενες μελέτες και υπερμεθυλιωμένα στην

παρούσα μελέτη), στον πληθυσμό των CD4(+) T λεμφοκυττάρων και των PBMCs όπως φαίνεται στην **Εικόνα 21**. Το γονίδιο IDH3G (Isocitrate Dehydrogenase (NAD(+))), το οποίο καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του κιτρικού σε 2-οξογλουταρικό, παρουσίαζε αλληλοεπικάλυψη στις τρεις μελέτες ωστόσο ανεδείχθη υπομεθυλιωμένο σε μία εκ των δύο μελετών σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα. Στον **Πίνακα 5** απεικονίζονται τα γονίδια για τα οποία ανευρέθη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της τρέχουσας και των προηγούμενων μελετών.

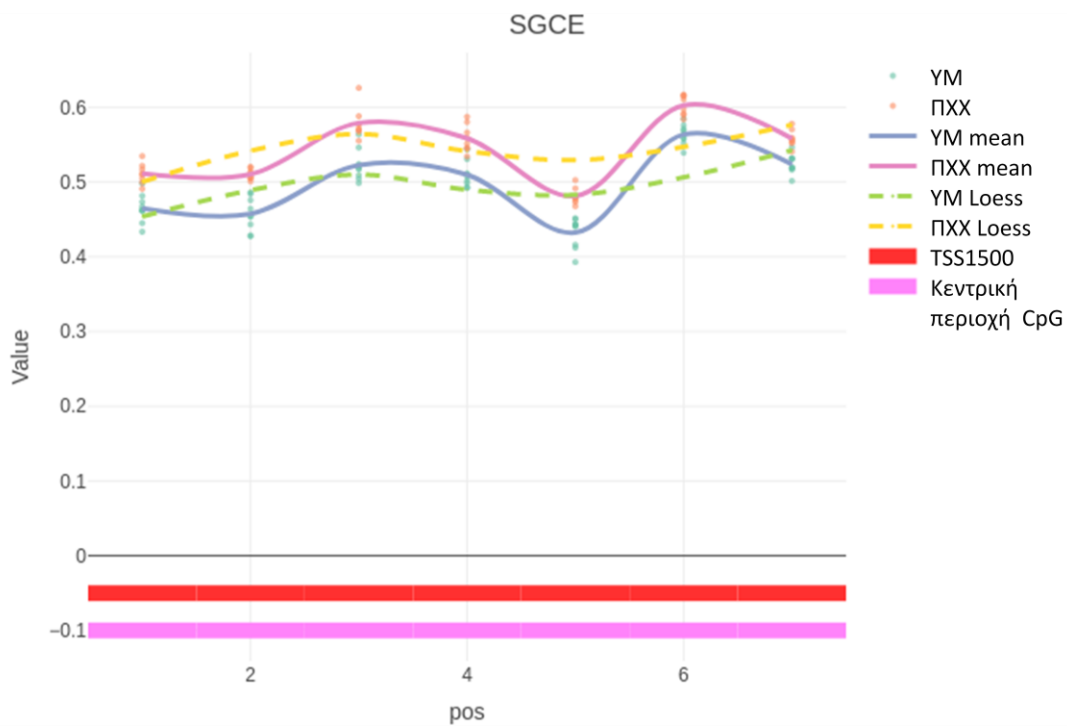
Κατά την ανάλυση εκτεταμένων περιοχών του γονιδιώματος ανιχνεύθηκαν 331 DMRs οι οποίες αντιστοιχούν σε 331 γονίδια. Η πλειοψηφία (76%, 253/331) εντοπιζόταν σε περιοχές εκκινητών και σημείων έναρξης της μεταγραφής ενώ ακολουθούσε η 5' UTR με ποσοστό 7% (23/331). Ανάμεσα στα γονίδια αυτά ανιχνεύθηκαν γονίδια που σχετίζονται με μονοπάτια φυσικής ανοσίας. Πιο συγκεκριμένα υπομεθυλίωση παρατηρήθηκε στον εκκινητή του CD24 (CD24 molecule) το οποίο εμπλέκεται σε μονοπάτια διαφοροποίησης των B κυττάρων, ενώ υπερμεθυλίωση παρατηρήθηκε στον εκκινητή του CD96 (CD96 molecule) και το εσώνιο CD247 (CD247 molecule) που εμπλέκονται στην αντιγονοπαρουσίαση μέσω μορίων HLA I και στην ανοσολογική απόκριση των NK κυττάρων. Υπερμεθυλίωση ανιχνεύθηκε επιπλέον στους εκκινητές των IFNGR2 (interferon gamma receptor 2), υποδοχέα της ιντερφερόνης γ και TICAM2 (toll like receptor adaptor molecule 2), προσαρμογέα σε μονοπατια επαγόμενα μέσω της ιντερφερόνης α, ενώ υπομεθυλιωμένος βρέθηκε ο εκκινητής του CCRL2 (C-C motif chemokine receptor like 2) που ρυθμίζει τη χημειοταξία των μακροφάγων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των γονιδίων με το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs προκειμένου να εξεταστεί η συμμετοχή τους σε κοινά λειτουργικά μονοπάτια. Ωστόσο, η ανωτέρω ανάλυση δεν ανέδειξε την ύπαρξη κοινών λειτουργικών μονοπατιών.

Top 50 genes mostly enriched by significant CpGs



A



B

Εικόνα 20: **A)** Διάγραμμα που απεικονίζει τα 50 πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια μεταξύ των ασθενών με ΠΧΧ και των ΥΜ παράλληλα με τον αριθμό των υπέρ και υπομεθυλιωμένων CpGs. **B)** Απεικόνιση της μεθυλίωσης του SGCE γονιδίου για τους ασθενείς με ΠΧΧ και τους υγιείς μάρτυρες. Ο άξονας Y παριστά το ποσοστό της μεθυλίωσης ως β -value. Η συνεχής γραμμή παριστά τη μέση τιμή μεθυλίωσης για τους ασθενείς με ΠΧΧ και τους ΥΜ αντίστοιχα. Στον άξονα X ορίζεται η θέση των ανωτέρω CpGs σε σχέση με το CpG νησίδιο και το γονίδιο αντίστοιχα. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το γονίδιο SGCE παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης για τους ασθενείς με ΠΧΧ συγκριτικά με τους ΥΜ. Οι CpGs που περιλαμβάνονται βρίσκονται στο σημείο έναρξης της μεταγραφής TSS1500 και εκτείνονται κατά μήκος της κεντρικής περιοχής του CpG νησιδίου.

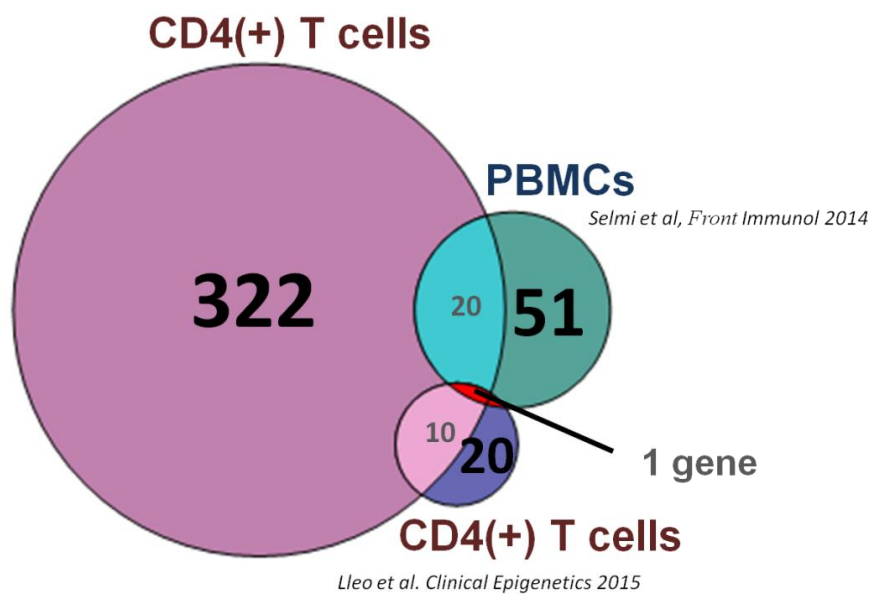
Πίνακας 4: Στον πίνακα 4 απεικονίζονται τα γονίδια με το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση του X χρωμοσώματος μεταξύ των ασθενών με ΠΧΧ και των ΥΜ.

Στήλη 1^η: συντομογραφία γονιδίου, στήλη 2^η: αριθμός DMPs, στήλη 3^η: εντόπιση του γονιδίου στο χρωμόσωμα, στήλη 4^η: περιγραφή του γονιδίου.

Γονίδιο	DMPs	Εντόπιση	Περιγραφή
APLN	5	chrX:128788003-128789195	Apelin Rac/Cdc42 Guanine
ARHGEF6	5	chrX:135849030-135850178	Nucleotide Exchange Factor 6
ARX	8	chrX:25025211-25025715	Aristaless Related Homeobox B Cell Receptor Associated
BCAP31	6	chrX:152988874-152991719	Protein 31 Dyskerin Pseudouridine
DKC1	6	chrX:153990840-153991831	Synthase 1 Discs Large MAGUK Scaffold
DLG3	7	chrX:69674799-69675305	Protein 3
DUSP9	6	chrX:152909502-152910069	Dual Specificity Phosphatase 9 E74 Like ETS Transcription
ELF4	5	chrX:129243674-129245575	Factor 4
ESX1	5	chrX:103498706-103499843	ESX Homeobox 1
FLNA	5	chrX:153598874-153600604	Filamin A
FGF13	11	chrX:138285888-138287622	Fibroblast Growth Factor 13

GK	5	chrX:30670739-30671869	Glycerol Kinase
GPR50	5	chrX:150343147-150344269	G Protein-Coupled Receptor 50 5-Hydroxytryptamine Receptor 2C
HTR2C	5	chrX:113818519-113819453	Interleukin 1 Receptor Accessory Protein Like 2
IL1RAPL1	5	chrX:103809794-103810167	Insulin Receptor Substrate 4
IRS4	6	chrX:107978210-107980145	MAGE Family Member H1 Muscleblind Like Splicing Regulator 3
MAGEH1	5		Mortality Factor 4 Like 2 Motile Sperm Domain Containing 1
MBNL3	5	chrX:131623144-131624115	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B11 NHS Actin Remodeling Regulator
MORF4L2	5	chrX:102942107-102942486	Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1 O-Linked N- Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
MOSPD1	5	chrX:134048706-134049272	P21 (RAC1) Activated Kinase 3
NDUFB11	5	chrX:47003750-47004987	Proteolipid Protein 2 RP2 Activator Of ARL3 GTPase
NHS	5	chrX:17393159-17395817	Ribosomal Protein L36a SAM And SH3 Domain Containing 3 Solute Carrier Family 25 Member 14
NR0B1	7	chrX:30326439-30327668	Solute Carrier Family 25 Member 43 Solute Carrier Family 9 Member A6
OGT	6	chrX:70752638-70752965	
PAK3	5	chrX:110339364-110339679	
PLP2	5	chrX:49028091-49029111	
RP2	8	chrX:46696141-46697075	
RPL36A	5	chrX:100645780-100646107	
SASH3	5		
SLC25A14	6	chrX:129473463-129473945	
SLC25A43	5	chrX:118533163-118533787	
SLC9A6	5	chrX:135067507-135068309	

SLITRK2	6	chrX:144899363-144900266	SLIT And NTRK Like Family Member 2
SOX3	5	chrX:139585867-139588578	SRY-Box Transcription Factor 3
STARD8	6	chrX:67913299-67914134	StAR Related Lipid Transfer Domain Containing 8
TMEM185A	5	chrX:148712839-148713679	Transmembrane Protein 185A
TSC22D3	7	chrX:107018606-107019611	TSC22 Domain Family Member 3
TSPYL2	5	chrX:53111281-53112016	TSPY Like 2
ZBTB33	5	chrX:119384369-119385058	Zinc Finger And BTB Domain Containing 33
ZNF75D	5	chrX:134477583-134477999	Zinc Finger Protein 75D



Εικόνα 21: Αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων που ανιχνεύθηκαν στο χρωμόσωμα X των CD4(+) T λεμφοκυττάρων συγκριτικά με τα γονίδια που έχουν ανευρεθεί με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε PBMCs και CD4(+) T λεμφοκύτταρα.

Πίνακας 5: Στον πίνακα 5 απεικονίζονται αναλυτικά τα γονίδια για τα οποία ανευρέθη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της παρούσας και δύο προηγούμενων μελετών (266,267)

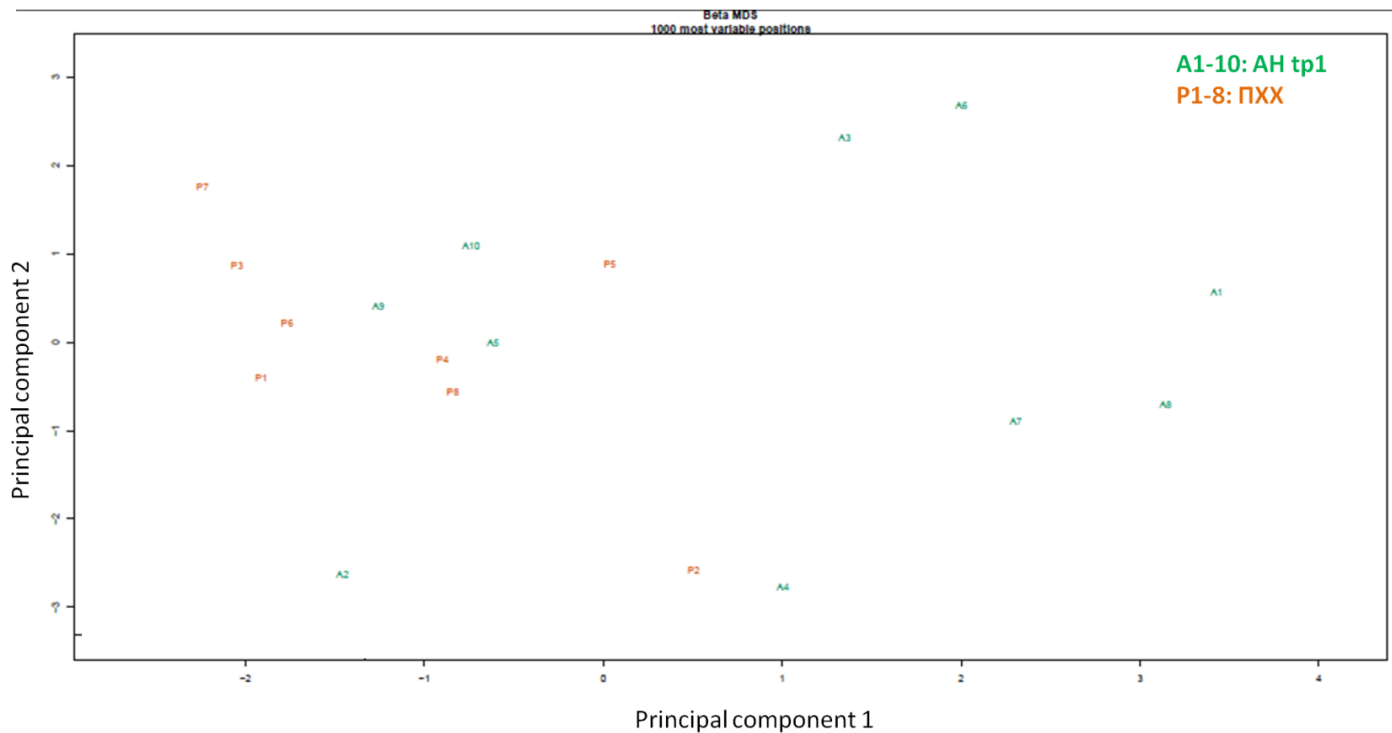
Γονίδιο (που ανιχνεύθηκε στην παρούσα μελέτη)	Περιγραφή	Selmi et al (PBMCs)	Lleo et al [CD4(+) T cells]
ATP6AP2	ATPase H ⁺ Transporting Accessory Protein 2		√
BCAP31	B Cell Receptor Associated Protein 31	√	
BRCC3	BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3	√	
CDK16	Cyclin Dependent Kinase 16)	√	
CFP	Complement Factor Properdin	√	
CHST7	Carbohydrate Sulfotransferase 7	√	
CUL4B	Cullin 4B		√
EBP	(EBP Cholesterol Delta-Isomerase		√
FAM50A	Family With Sequence Similarity 50 Member A		√
FGD1	FYVE, RhoGEF And PH Domain Containing 1	√	
FUNDC2	FUN14 Domain Containing 2	√	
GPC4	Glypican 4		√
HCCS	Holocytochrome C Synthase	√	
HTATSF1	HIV-1 Tat Specific Factor 1		√
IDH3G	Isocitrate Dehydrogenase (NAD(+)	√	√
IDS	Iduronate 2-Sulfatase	√	
IRAK1	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1	√	
KBTBD6	Kelch Repeat And BTB Domain Containing 6	√	
PQBP1	(Polyglutamine Binding Protein 1		√
RAP2C	RAP2C, Member of RAS Oncogene Family		√
SCLY	Selenocysteine Lyase	√	
SH3KBP1	SH3 Domain Containing Kinase Binding Protein 1		√
SHROOM4	Shroom Family Member 4	√	

SLC9A6	Solute Carrier Family 9 Member A6	√
SLITRK2	SLIT And NTRK Like Family Member 2	√
SLITRK4	SLIT And NTRK Like Family Member 4	√
SMARCA1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 1	√
TCEAL6	Transcription Elongation Factor A Like 6	√
UBE2A	(Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 A	√
UBL4A	Ubiquitin Like 4A	√

4.6.3. AH tp1 vs ΠXX

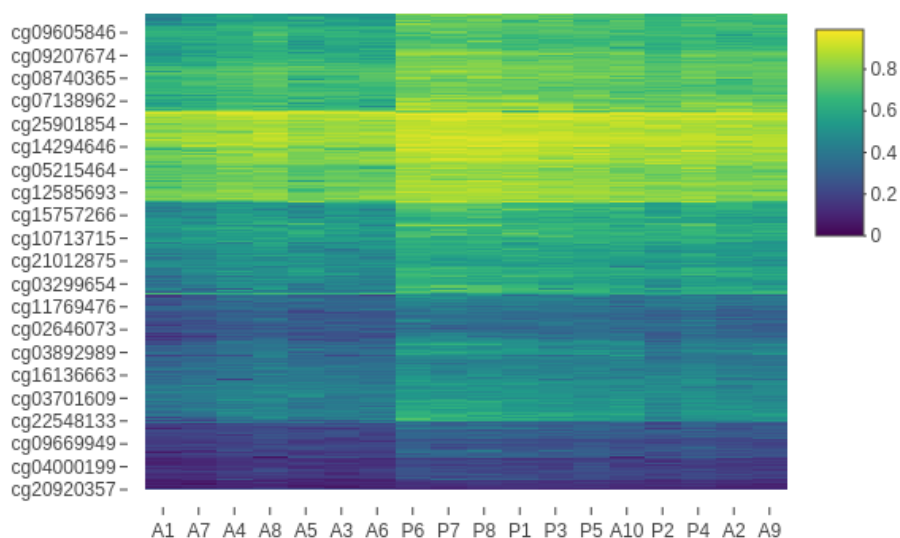
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της ομάδας των ασθενών με AH tp1 (n=10) έναντι της ομάδας ασθενών με ΠXX (n=8). Το MDS plot (**Εικόνα 22**) ανέδειξε αδρές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων καθώς παρατηρείται συρροή των ασθενών με AH tp1 στη δεξιά πλευρά του διαγράμματος σε σχέση με τους ασθενείς με ΠXX. Μετά από ομαλοποίηση των δειγμάτων και απομάκρυνση τυχόν ενδογενών σφαλμάτων, ανιχνεύθηκαν 5766 DMPs εκ των οποίων το 98% παρουσίαζε υπομεθυλίωση στους ασθενείς με AH tp1 έναντι των ασθενών με ΠXX, ενώ 2% ανευρέθηκαν υπερμεθυλιωμένες. Το σύνολό τους αντιστοιχεί σε 4018 γονίδια. Οι 73 DMPs (1,3%) αφορούσαν το χρωμόσωμα X κι αντιστοιχούσαν σε 51 γονίδια. Το Heatmap για τις DMPs μεταξύ ασθενών με AH tp1 και ΠXX απεικονίζεται στην **Εικόνα 23**.

Όσο αφορά στην εντόπιση των DMPs αναφορικά με τις περιοχές του CpG νησιδίου, η πλειοψηφία εντοπίστηκε στις open sea regions και τα shores ενώ μικρότερος αριθμός αντιστοιχούσε στις κεντρικές περιοχές των CpG νησιδίων και των shelves όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24A**. Περαιτέρω ανάλυση της κατανομής για τις υπέρ και υπομεθυλιωμένες DMPs, ανέδειξε ότι η πλειοψηφία τους εντοπιζόταν στο gene body και τις IGR ενώ μικρότερος αριθμός αφορούσε στο TSS και στην 3', 5' UTR όπως δείχνει η **Εικόνα 24B**.

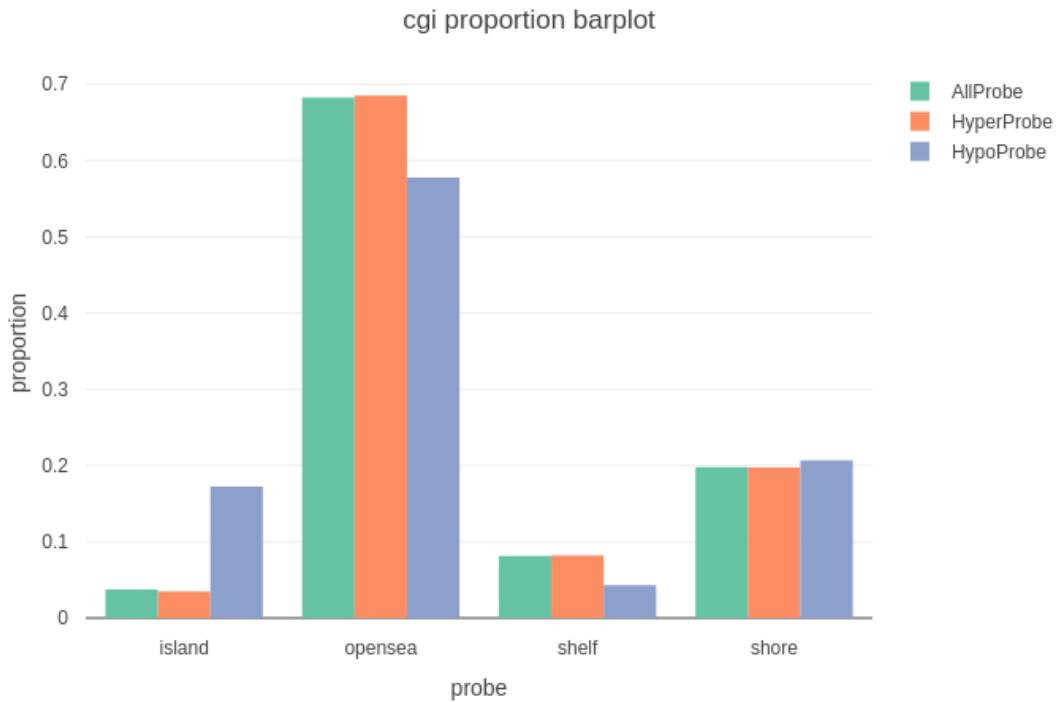


Εικόνα 22: Το MDS plot των 1000 DMPs απεικονίζει την ομοιότητα μεταξύ των ασθενών με AH tp1 και ΠΧΧ σε σχέση με τους δύο άξονες που απεικονίζουν τις δύο μεγαλύτερες πηγές διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων (principal component 1 και 2). Παρατηρείται τάση συρροής των ασθενών με AH tp1 στη δεξιά πλευρά του διαγράμματος σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ.

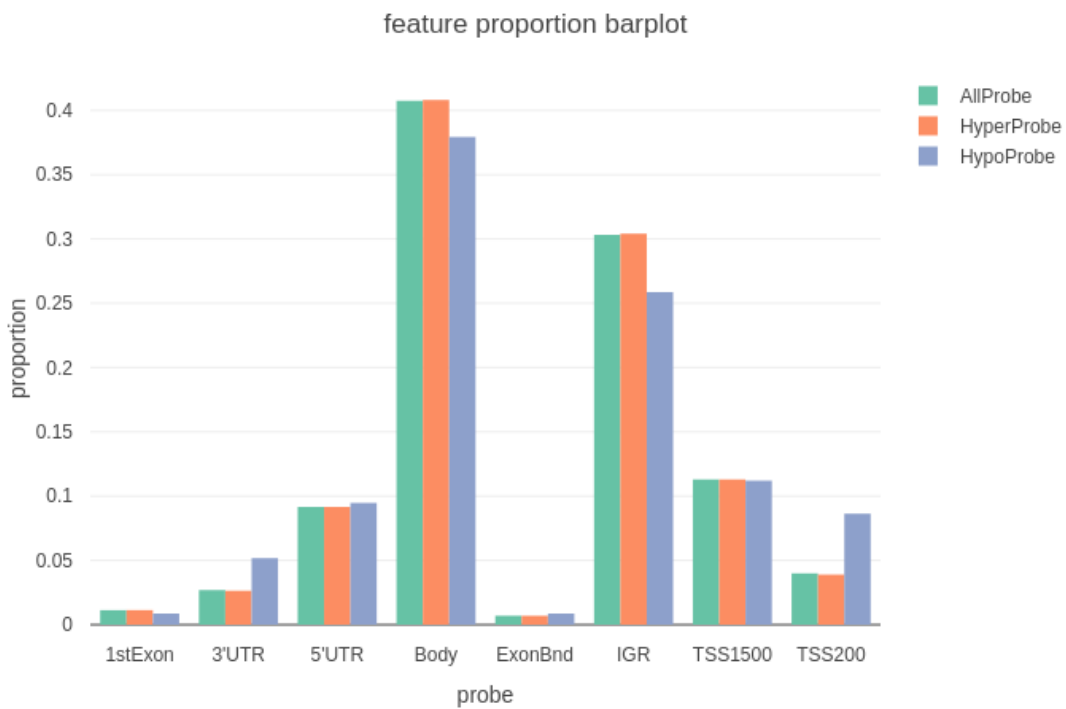
Heatmap for 5000 0.05 significant CpGs



Εικόνα 23: Heatmap των CpGs για τις 5000 DMPs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών με AH tp1 και των ασθενών με ΠΧΧ (A1-A10 ασθενείς με AH tp1 και P1-P8 ασθενείς με ΠΧΧ).



A



B

Εικόνα 24: **A)** Εντόπιση των DMPs στις περιοχές του CpG νησιδίου. Η πλειοψηφία των DMPs εντοπίζεται στις open sea regions και τα shores. **B)** Εντόπιση των υπέρ και υπομεθυλωμένων DMPs κατά μήκος του γονιδίου. Η πλειοψηφία των DMPs ανιχνεύθηκε σε περιοχές των gene bodies και των IGR ενώ μικρότερος αριθμός αφορούσε στο TSS και στην 3', 5' UTR.

DMPs: differentially methylated probes, IGR: intergenic region, Exon: εξώνιο, TSS: transcription start site, 3' UTR: 3' untranslated region, 5' UTR: 5' untranslated region.

Η ανάλυση των 70 γονιδίων που παρουσίαζαν το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs μεταξύ των δύο ομάδων, ανέδειξε ότι τη μεγαλύτερη διαφορά στη μεθυλίωσή τους είχαν τα γονίδια ANKRD11 και PTPRN2 (**Εικόνα 25A**) τα οποία βρέθηκαν υπομεθυλιωμένα στους ασθενείς με AH tp1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ. Το γονίδιο ANKRD11 (Ankyrin Repeat Domain 11) έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει την ακετυλίωση των ιστονών και κατά συνέπεια τη γονιδιακή έκφραση ενώ έχει βρεθεί ότι αποτελεί συνδιεγερτικό παράγοντα του p53 που συμμετέχει στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων (304). Το γονίδιο PTPRN2 (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type N2) είναι γνωστό ότι συμμετέχει στη γλυκοζοεξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος κι έχει χαρακτηριστεί ως αυτοαντιγόνο στόχος στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (305). Στην **Εικόνα 25B** παρουσιάζεται η μέση μεθυλίωση του γονιδίου PTPRN2 για τους ασθενείς με AH tp1 και τους ασθενείς με ΠΧΧ αντίστοιχα, καθώς και η θέση των 9 CpGs οι οποίες εδράζονται εντός του shore, shelf και open sea region όσο αφορά στο CpG νησίδιο, και στην περιοχή του gene body όσο αφορά την εντόπισή τους σε σχέση με το γονίδιο.

Υπομεθυλιωμένα στους ασθενείς με AH tp1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ βρέθηκαν τα γονίδια ACOX2, ATP11A, ARID5B, CHD9 και ACTN4. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο ACOX2 (Acyl-CoA Oxidase 2) εμπλέκεται σε μηχανισμούς σύνθεσης των χολικών οξέων, ενώ το γονίδιο ATP11A (ATPase Phospholipid Transporting 11A) κωδικογραφεί τον αντίστοιχο ηπατοχολικό μεταφορέα και εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της καλοήθους υποτροπιάζουσας ενδοηπατικής χολόστασης τύπου 1 (BRIC 1) (306). Επιπλέον το γονίδιο ARID5B (AT-Rich Interaction Domain 5B) ρυθμίζει τη σύνθεση του λιπώδους ιστού και την ανάπτυξη του ήπατος, ενώ το CHD9 (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 9) λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποίησης των υποδοχέων PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (126,307). Το γονίδιο ACTN4 (Actinin Alpha 4) κωδικογραφεί ένα από τα 4 ισομερή της α -actinin που αποτελούν πρωτείνες του κυτταροσκελετού, εκφράζονται στα ηπατοκύτταρα και έχει δειχθεί από την ομάδα μας ότι αποτελούν αυτοαντιγόνο στόχο στην AH-1, ενώ τα αντισώματα έναντι α -actinin χρησιμοποιούνται ως δείκτης διάγνωσης και σοβαρότητας της νόσου (77).

Επιπλέον, μεταξύ των υπομεθυλιωμένων γονιδίων που ανευρέθησαν στους ασθενείς με AH tr1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ, ανεδείχθησαν γονίδια που σχετίζονται με μηχανισμούς φυσικής ανοσίας και συγκεκριμένα τα SMAD3, SH3BP5, και TRIM26. Το γονίδιο SMAD3 (SMAD Family Member 3) ρυθμίζει την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα TGF-β και τη διαφοροποίηση των TH17 λεμφοκυττάρων, ενώ οι μεταλλάξεις του SH3BP5 σχετίζονται με τη φυλοσύνδετη αγγαμμασφαιριναιμία Bruton. Το γονίδιο TRIM26 (Tripartite Motif Containing 26) μειώνει την παραγωγή IFN-β ως απάντηση της ενεργοποίησης των TLR3/4 (308–310).

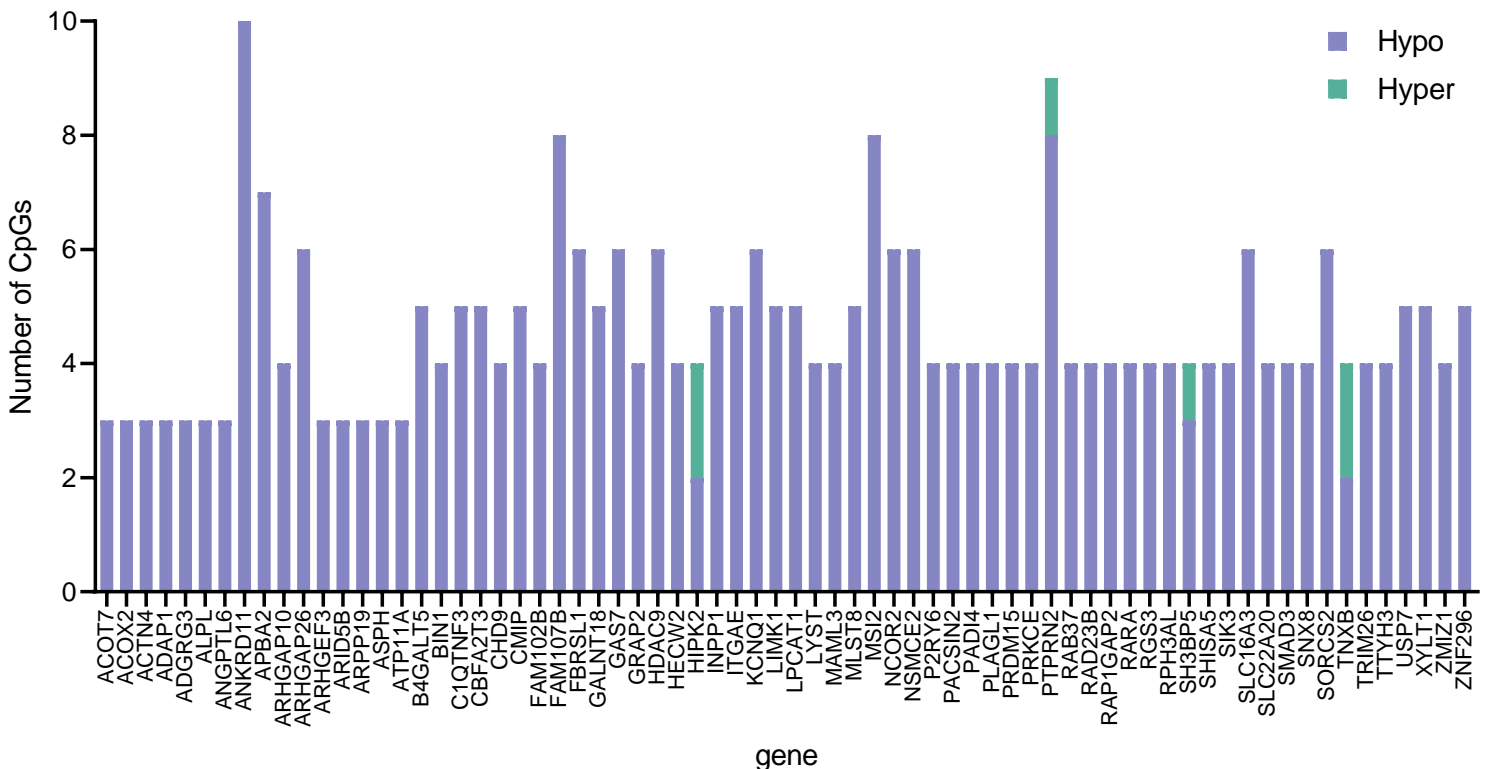
Ξεχωριστή ανάλυση έγινε για τα γονίδια του Χ χρωμοσώματος. Η ανωτέρω ανάλυση ανέδειξε υπομεθυλίωση σε γονίδια που εμπλέκονται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς σχετιζόμενους με τη δράση των Β και Τ λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με AH tr1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ. Πιο συγκεκριμένα υπομεθυλίωση παρατηρήθηκε στα γονίδια ASB9, BCAP31, BTK, CFP και IRAK1, ARHGAP10 και ARHGAP26, C1QTNF3 και MSI2. Πιο αναλυτικά, το γονίδιο ASB9 (Ankyrin Repeat And SOCS Box Containing 9) συμμετέχει σε μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας μέσω αντιγονοπαρουσίασης μεσολαβούμενης από μόρια MHC τάξης I, το γονίδιο BCAP31 (B Cell Receptor Associated Protein 31) εμπλέκεται σε μηχανισμούς απόπτωσης των Β λεμφοκυττάρων, το γονίδιο BTK (Bruton Tyrosine Kinase), σχετίζεται με τη φυλοσύνδετη αγγαμμασφαιριναιμία ενώ το γονίδιο CFP (Complement Factor Properdin), κωδικογράφοντας το σύμπλεγμα της προπερδίνης, ενεργοποιεί την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος. Το γονίδιο IRAK1 (Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1) εμπλέκεται στην ανοσολογική απάντηση έναντι ξένων αντιγόνων μέσω ενεργοποίησης των TLRs και του υποδοχέα της IL-1 (311–314), τα γονίδια ARHGAP10 και ARHGAP26 (Rho GTPase Activating Protein 10 και 26) ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες δέσμησης της γουανίνης (GTPases) οι οποίες λειτουργούν ως μεσολαβητές του σήματος των TCR υποδοχέων των Τ λεμφοκυττάρων (315), το γονίδιο C1QTNF3 (C1q And TNF Related 3) παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τον TNF και το C1q του συμπληρώματος και συμμετέχει στη φυσική ανοσία και το γονίδιο MSI2 (Musashi RNA Binding Protein 2) κωδικογραφεί μία δεσμευτική πρωτεΐνη του RNA που συμμετέχει στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση ενεργοποίησης της ανοσολογικής απάντησης (316).

Περαιτέρω ανάλυση εκτεταμένων περιοχών του γονιδιώματος, ανέδειξε 68 DMRs (52 υπομεθυλιωμένες έναντι 16 υπερμεθυλιωμένων) μεταξύ των ασθενών με AH tr1 έναντι των ασθενών με ΠΧΧ. Το 72% (49/68) αυτών εντοπίστηκε σε περιοχές

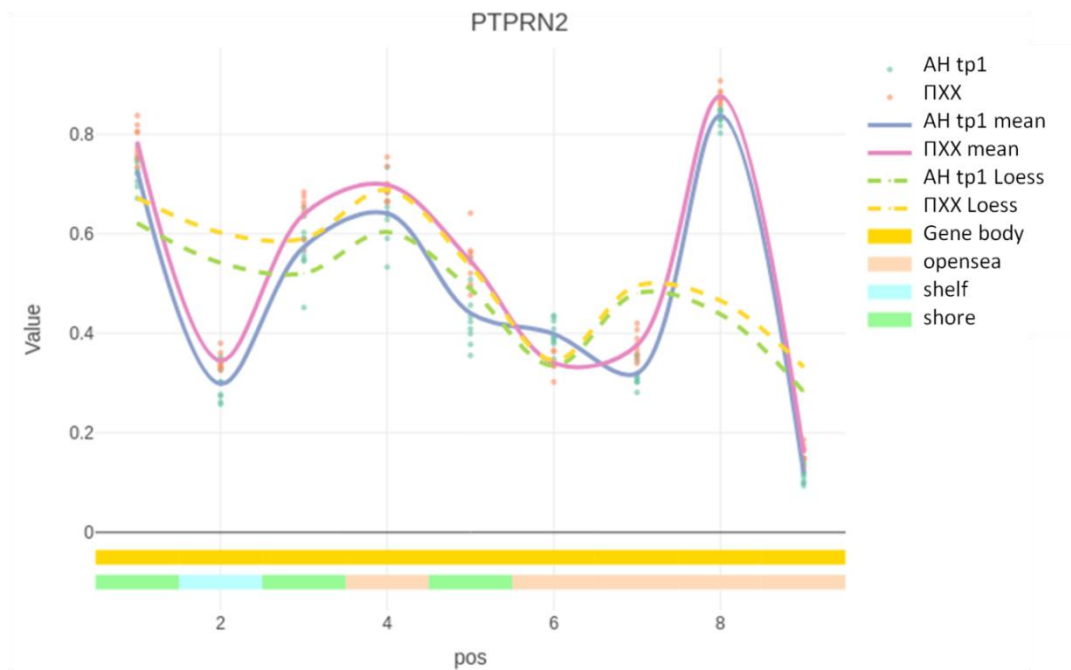
εκκινητών και σημείων έναρξης της μεταγραφής (Promoter/TSS) ενώ το 8% (6/68) αντιστοιχούσε σε περιοχές εσονίων. Ανάμεσα στα γονίδια που αντιστοιχούν σε αυτές, ανιχνεύθηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη φυσική ανοσία (AZU1, IRF6, S100P και ZAP70) καθώς και γονίδια HLA τάξης II (HLA-DMB και HLA-DPA1) που σχετίζονται με αυτοανόσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ) (317,318) (Πίνακα 6).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των γονιδίων με το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλωμένων CpGs προκειμένου να εξεταστεί τυχόν ενίσχυση κοινών λειτουργικών μονοπατιών. Ωστόσο, η ανωτέρω ανάλυση δεν ανέδειξε την ύπαρξη κοινών λειτουργικών μονοπατιών.

Top 70 genes mostly enriched by significant CpGs



A



B

Εικόνα 25: Α) Διάγραμμα που απεικονίζει τα 70 πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια μεταξύ των ασθενών με AH tp1 και των ασθενών με ΠXX παράλληλα με τον αριθμό των υπέρ και υπομεθυλιωμένων CpGs. **Β)** Απεικόνιση της μεθυλίωσης του PTPRN2 γονιδίου για τους ασθενείς με ΠXX και τους ασθενείς με AH tp1. Ο άξονας των Y παριστά το ποσοστό της μεθυλίωσης ως β -value. Η συνεχής γραμμή παριστά τη μέση τιμή μεθυλίωσης για τους ασθενείς με AH tp1 και τους ασθενείς με ΠXX αντίστοιχα. Στον άξονα X ορίζεται η θέση των 9 CpGs σε σχέση με το CpG νησίδιο και το γονίδιο αντίστοιχα. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το γονίδιο PTPRN2 παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης για τους ασθενείς με ΠXX συγκριτικά με τους ασθενείς με AH tp1. Οι 9 CpGs που περιλαμβάνονται βρίσκονται στο gene body και εκτείνονται κατά μήκος του shore, shelf και open sea region του CpG νησιδίου.

Πίνακας 6: Στον πίνακα 6 απεικονίζονται τα διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια που συμμετέχουν σε μονοπάτια φυσικής ανοσίας και αντιστοιχούσαν στις DMRs μεταξύ ασθενών με AH tp1 και ΠΧΧ.

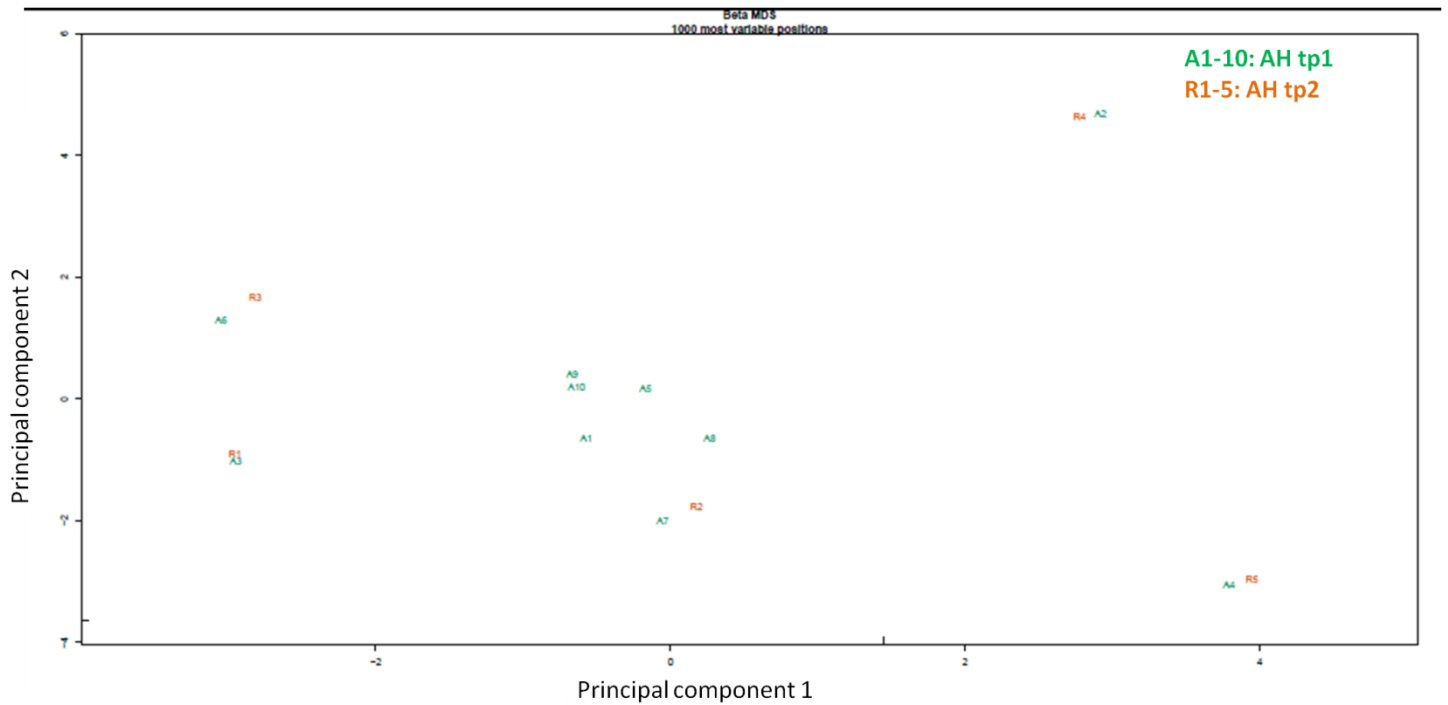
Στήλη 1^η: συντομογραφία του γονιδίου, στήλη 2^η:χρωμόσωμα στο οποίο εντοπίζεται το γονίδιο, στήλη 3^η:περιγραφή του γονιδίου, στήλη 4^η:μεθυλίωση του γονιδίου, στήλη 5^η: εντόπιση του γονιδίου, στήλη 6^η:λειτουργία του γονιδίου.

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Περιγραφή	Μεθυλίωση	Εντόπιση	Λειτουργία
ALOX12	17	arachidonate 12-lipoxygenase	υπό	promoter-TSS (NM_000697)	protein-coding
AZU1	19	azurocidin 1	υπό	promoter-TSS (NM_001700)	protein-coding
CLEC2D	12	C-type lectin domain family 2 member D	υπέρ	promoter-TSS (NM_013269)	protein-coding
IRF6	1	interferon regulatory factor 6	υπό	promoter-TSS (NM_001206696)	protein-coding
LTA	6	lymphotoxin alpha	υπέρ	promoter-TSS (NM_000595)	protein-coding
HLA-DMB	6	Major Histocompatibility Complex, Class II, DM Beta	υπό	intron 3 of 5	protein-coding
HLA-DPA1	6	Major Histocompatibility Complex, Class II, DP Alpha 1	υπό	intron 1 of 5	protein-coding
S100P	4	S100 calcium binding protein P	υπό	promoter-TSS (NM_005980)	protein-coding
ZAP70	2	zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70	υπέρ	promoter-TSS (NM_001079)	protein-coding

4.6.4. AH tp2 vs AH tp1

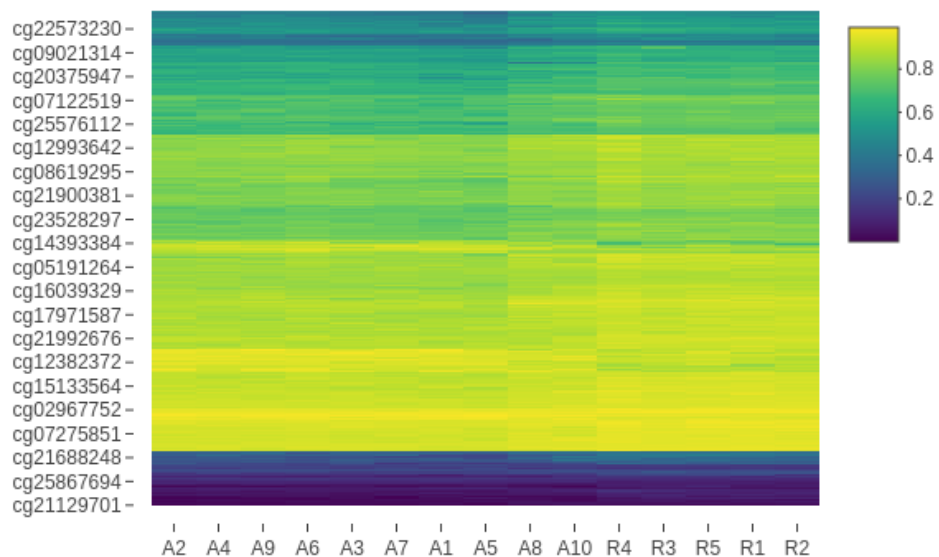
Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της ομάδας των ασθενών με AH που βρισκόταν σε πλήρη ύφεση υπό ανοσοκατασταλτική αγωγή (AH tp2, n=5) έναντι των ασθενών με AH κατά τη διάγνωση (AH tp1 n=10). Το MDS plot (**Εικόνα 26**) δεν ανέδειξε αδρές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Ωστόσο, μετά την ομαλοποίηση των δειγμάτων διαπιστώθηκε η ύπαρξη 831 DMPs (11,2% υπομεθυλωμένων και 88,2% υπερμεθυλωμένων) μεταξύ της ομάδας AH tp2 σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με AH tp1 που αντιστοιχούν σε 576 γονίδια. Επτά DMPs εδράζονταν στο χρωμόσωμα X και αντιστοιχούσαν σε 6 γονίδια. Το Heatmap για τις DMPs μεταξύ ασθενών με AH tp2 έναντι AH tp1 απεικονίζεται στην **Εικόνα 27**.

Όσο αφορά στην εντόπιση των DMPs στις περιοχές του CpG νησιδίου, η πλειοψηφία εντοπίστηκε στις open sea regions και τα shores ενώ μικρός αριθμός CpGs αντιστοιχούσε στις κεντρικές περιοχές των CpG νησιδίων και των shelves όπως φαίνεται στην **Εικόνα 28A**. Περαιτέρω ανάλυση της κατανομής για τις υπερ και υπομεθυλωμένες DMPs, ανέδειξε ότι η πλειοψηφία τους εντοπιζόταν στο gene body και τις IGR ενώ μικρότερος αριθμός αφορούσε στο TSS1500, TSS200, 1stExon και στην 3', 5' UTR όπως δείχνει η **Εικόνα 28B**.

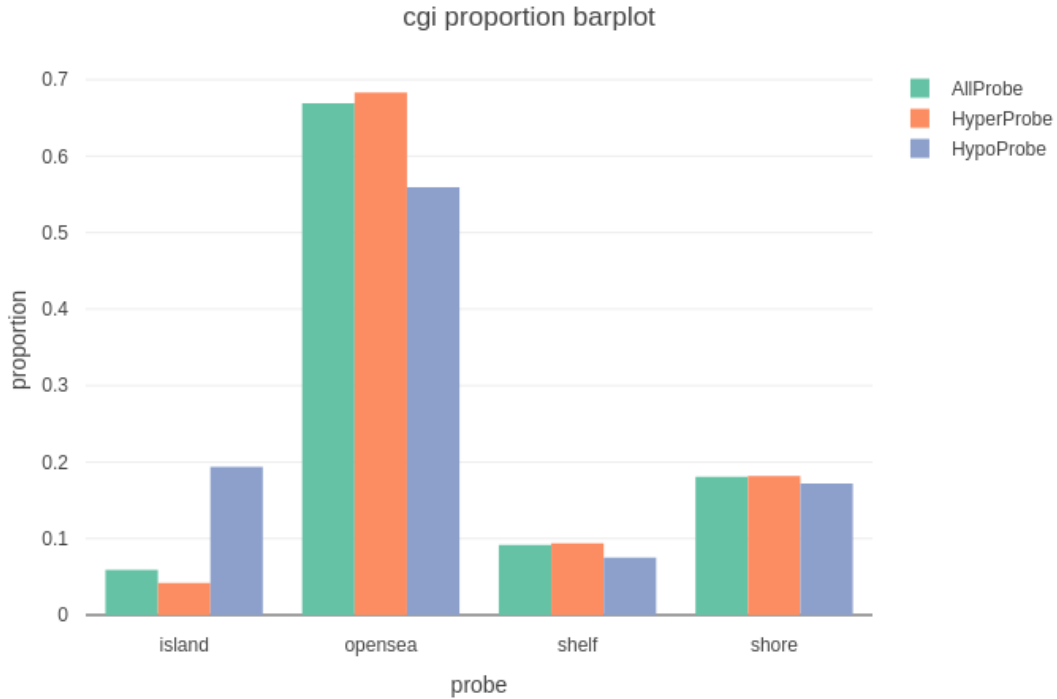


Εικόνα 26: Το MDS plot των 1000 DMPs απεικονίζει την ομοιότητα μεταξύ των ασθενών με AH tp2 και AH tp1 σε σχέση με τους δύο άξονες που απεικονίζουν τις δύο μεγαλύτερες πηγές διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων (principal component 1 και 2).

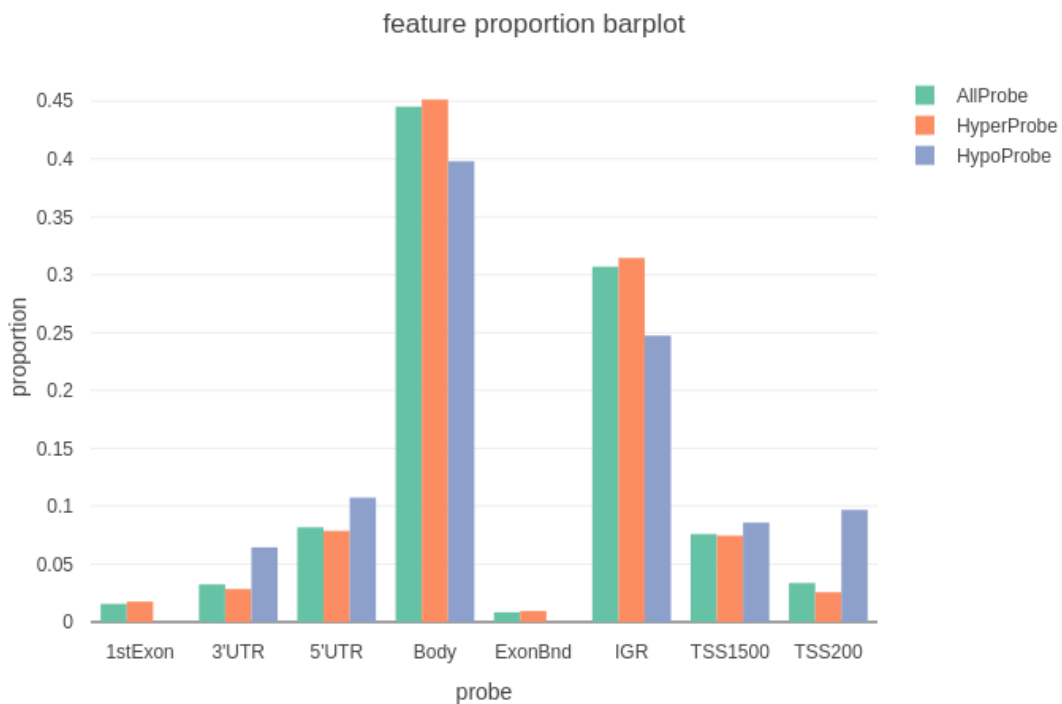
Heatmap for 831 0.05 significant CpGs



Εικόνα 27: Heatmap των CpGs για τις 831 DMPs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών με AH tp2 και των ασθενών με AH tp1 (A1-A10 ασθενείς με AH tp1, R1-R5 ασθενείς με AH tp2).



A



B

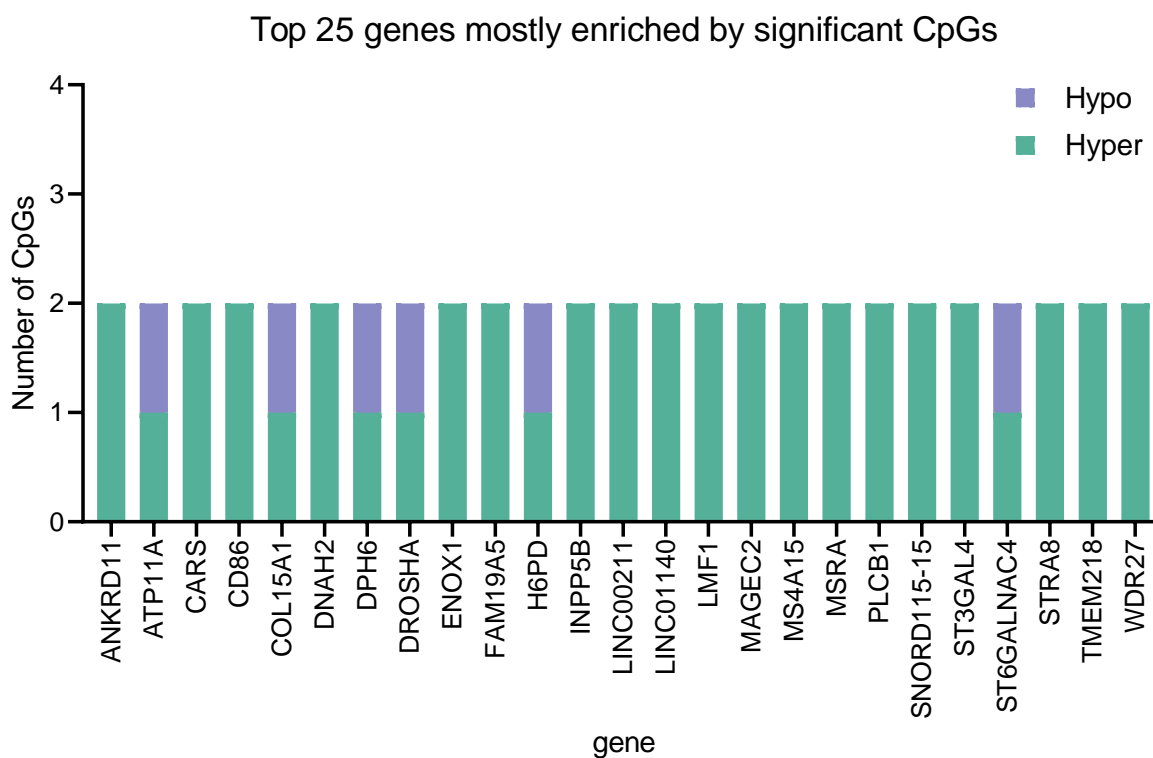
Εικόνα 28: **A)** Εντόπιση των DMPs αναφορικά με τις περιοχές του CpG νησιδίου. Η πλειοψηφία των DMPs εντοπίζεται στις περιοχές open sea και shores. **B)** Εντόπιση των υπέρ και υπομεθυλιωμένων CpGs κατα μήκος του γονιδίου. Η πλειοψηφία των DMPs ανιχνεύθηκε σε περιοχές των gene bodies και των IGR ενώ μικρότερος αριθμός αφορούσε στο TSS1500, TSS200, 1stExon και στην 3', 5' UTR.

DMPs: differentially methylated probes, IGR: intergenic regions, TSS: transcription start site, Exon: εξόνιο, 3' UTR: 3' untranslated region, 5' UTR: 5' untranslated region

Η ανάλυση των 25 γονιδίων που παρουσίαζαν το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs (≥ 2) μεταξύ των δύο ομάδων φαίνεται στην **Εικόνα 29**. Ο **Πίνακας 7** απεικονίζει τα 25 γονίδια με το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs, την εντόπισή τους, το βαθμό μεθυλίωσης και τη λειτουργία τους. Ανάμεσα στα γονίδια αυτά ανιχνεύθηκε το γονίδιο ANKRD11 (Ankyrin Repeat Domain 11) το οποίο ανευρέθηκε υπερμεθυλιωμένο στους ασθενείς με AH tp2 συγκριτικά με τους ασθενείς με AH tp1. Ανάλογα ευρήματα παρατηρήθηκαν για το γονίδιο ATP11A (ATPase Phospholipid Transporting 11A). Η cg14354398 του γονιδίου ATP11A ανευρέθη υπερμεθυλιωμένη στους ασθενείς με AH tp2 συγκριτικά με τους ασθενείς με AH tp1. Επιπλέον, ανάμεσα στα πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια ανεδείχθη ο υποδοχέας CD86 των T λεμφοκυττάρων, ο οποίος λειτουργεί ως συνδιεγερτικό μόριο απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή IL-2 και ανευρέθη υπερμεθυλιωμένος στους ασθενείς με AH tp2 σε σχέση με τους ασθενείς με AH tp1.

Κατά την ανάλυση των γονιδίων του X χρωμοσώματος, διαφορετικό ποσοστό μεθυλίωσης μεταξύ ασθενών με AH tp2 και AH tp1 ανευρέθη για το γονίδιο MAGEC2 (MAGE Family Member C2) το οποίο εκφράζεται σε νεοπλασματικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (319,320). Συγκεκριμένα οι ασθενείς με AH tp2 παρουσίαζαν υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης για το MAGEC2 γονίδιο συγκριτικά με τους ασθενείς με AH tp1.

Περαιτέρω ανάλυση εκτεταμένων περιοχών του γονιδιώματος ανέδειξε την ύπαρξη 14 DMRs οι 9 εκ των οποίων ανευρέθησαν σε περιοχές εκκινητών. Ανάμεσα στα σχετιζόμενα γονίδια υπερμεθυλίωση ανιχνεύθηκε για τον εκκινητή του HLA-DMA (major histocompatibility complex class II DM alpha) το οποίο κατέχει κεντρικό ρόλο στην απελευθέρωση του σημείου πρόσδεσης των αντιγονικών πεπτιδίων στα HLA-II.



Εικόνα 29: Διάγραμμα που απεικονίζει τα 25 πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια μεταξύ των ασθενών με AH tr2 και των ασθενών με AH tr1 παράλληλα με τον αριθμό των υπέρ και υπομεθυλιωμένων CpGs.

Πίνακας 7: Στον πίνακα 7 απεικονίζονται τα 25 γονίδια με το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικά μεθυλιωμένων CpGs μεταξύ ασθενών AH tp2 και AH tp1.

Στήλη 1^η: συντομογραφία του γονιδίου, στήλη 2^η: αριθμός DMPs, στήλη 3^η: χρωμόσωμα στο οποίο εντοπίζεται το γονίδιο, στήλη 4^η: μεθυλίωση του γονιδίου, στήλη 5^η: περιγραφή του γονιδίου.

Γονίδιο	DMPs	Χρωμόσωμα	Μεθυλίωση	Περιγραφή
ANKRD11	2	16	υπέρ	Ankyrin Repeat Domain 11
ATP11A	2	13	*υπέρ/υπό	ATPase Phospholipid Transporting 11A
CARS	2	11	υπέρ	Cysteinyl-TRNA Synthetase 1
CD86	2	3	υπέρ	CD86 Molecule
COL15A1	2	9	υπέρ/υπό	Collagen Type XV Alpha 1 Chain
DNAH2	2	17	υπέρ	Dynein Axonemal Heavy Chain 2
DPH6	2	15	υπέρ/υπό	Diphthamine Biosynthesis 6
DROSHA	2	5	υπέρ/υπό	Drosha Ribonuclease III
ENOX1	2	13	υπέρ	Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 1
FAM19A5	2	22	υπέρ	FAM Chemokine Like Family Member 5
H6PD	2	1	υπέρ/υπό	Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase/Glucose 1-Dehydrogenase
INPP5B	2	1	υπέρ	Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase B
LINC00211	2	2	υπέρ	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 211
LINC01140	2	1	υπέρ	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1140
LMF1	2	16	υπέρ	Lipase Maturation Factor 1
MAGE2	2	X	υπέρ	MAGE Family Member E2
MS4A15	2	11	υπέρ	Membrane Spanning 4-Domains A15
MSRA	2	8	υπέρ	Methionine Sulfoxide Reductase A
PLCB1	2	20	υπέρ	Phospholipase C Beta 1
SNORD115-15	2	15	υπέρ	Small Nucleolar RNA, C/D Box 115-15
ST3GAL4	2	11	υπέρ	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 4
ST6GALNAC4	2	9	υπέρ/υπό	ST6 N-Acetylgalactosaminide Alpha-2,6-Sialyltransferase 4
STRA8	2	7	υπέρ	Stimulated By Retinoic Acid 8
TMEM218	2	11	υπέρ	Transmembrane Protein 218
WDR27	2	6	υπέρ	WD Repeat Domain 27

* υπέρ/υπό: υποδηλώνει ότι η μία εκ των δύο CpGs παρουσίαζε υπέρμεθυλίωση ενώ η δεύτερη υπομεθυλίωση

5. Συζήτηση

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά, όσο είναι γνωστό από τη διεθνή βιβλιογραφία, η συμμετοχή των επιγενετικών τροποποιήσεων στην παθογένεια της ΑΗ, με στόχο την ανάδειξη νέων παθοφυσιολογικών μηχανισμών, που θα συμβάλλουν μελλοντικά στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών. Για το σκοπό αυτό έγινε προσδιορισμός του επιπέδου ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/υδροξυμεθυλίωσης ($5^{hm}C$), καθώς και των ενζύμων μεθυλίωσης (DNMTs)/υδροξυμεθυλίωσης (TETs) σε μεταγραφικό επίπεδο, σε CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση και σε ύφεση της νόσου μετά από χορήγηση ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα YM και ασθενών με ΠΧΧ, που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Τέλος, διενεργήθηκε μελέτη EWAS σε CD4(+) T λεμφοκύτταρα ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση και κατά την ύφεση της νόσου, YM και ασθενών με ΠΧΧ, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή ύπαρξη μεμονωμένων, διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στις τρεις ομάδες (ΑΗ, ΠΧΧ, YM), που μελετήθηκαν.

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη είναι:

1. Τα CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα mRNA του ενζύμου TET1, που αποτελεί ένα από τα βασικά ένζυμα απομεθυλίωσης της κυτοσίνης, σε σχέση με τους YM και αυξημένα επίπεδα mRNA του ενζύμου DNMT3A, που είναι μία από τις βασικές μεθυλ-τρανσφεράσες σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ.
2. Τα επίπεδα της DNMT3A σε μεταγραφικό επίπεδο παρουσίαζαν αρνητική συσχέτιση με την IgG, ενώ η ανοσοκατοστολή φαίνεται ότι μειώνει τα επίπεδα της DNMT3A.
3. Οι αλλαγές στα επίπεδα mRNA των DNMT3A και TET1 δε συμβαδίζουν με σημαντικές διαφορές στο επίπεδο ολικής $5^mC/5^{hm}C$ τόσο των CD19(+) όσο και των CD4(+) λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΑΗ, παραπέμποντας στην πιθανή παρουσία εντοπισμένων επιγενετικών αλλαγών, οι οποίες επιδρούν στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων.
4. Για τη διερεύνηση της τελευταίας υπόθεσης, έγινε EWAS στα CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ (κατά τη διάγνωση και κατά την ύφεση) και των ομάδων ελέγχου, που επιβεβαίωσε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών

στη μεθυλίωση μεμονωμένων γονιδίων μεταξύ των ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση σε σύγκριση με τους ΥΜ αλλά και τους ασθενείς με ΠΧΧ. Ιδιαίτερης σημασίας ήταν το γεγονός ότι η πλειοψηφία (60%) των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων των ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση σε σχέση με τους ΥΜ παρουσίαζαν υπομεθυλίωση, σε αντίθεση με τους ασθενείς με ΠΧΧ που σε ποσοστό 98% ήταν υπερμεθυλιωμένα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επιπλέον το εύρημα ότι, μεταξύ των πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων, εντοπίστηκαν γονίδια που εμπλέκονται σε μονοπάτια φυσικής και επίκτητης ανοσίας καθώς και γονίδια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς χολόστασης και ηπατοκαρκινογένεσης.

5. Τέλος, επιβεβαιώθηκε η γνωστή από τη βιβλιογραφία σημασία των επιγενετικών τροποποιήσεων πολλαπλών γονιδίων που εδράζονται στο χρωμόσωμα Χ στην ΠΧΧ. Σε αντίθεση με την ΠΧΧ, στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το πλείστο των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στα CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ, εντοπίζονταν σε μη φυλετικά χρωμοσώματα.

Αναλυτικότερα, στην παρούσα μελέτη, αρχικά έγινε προσδιορισμός με ELISA του επιπέδου της ολικής $5^mC/5^{hm}C$ του DNA CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση και μετά από θεραπεία, ΥΜ και ασθενών με ΠΧΧ. Από την ανάλυση αυτή δεν προέκυψαν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και ΥΜ, ωστόσο στα CD19(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΧ παρατηρήθηκε τάση υψηλότερου ποσοστού 5^mC σε σχέση με τους ασθενείς με ΑΗ και τους ΥΜ. Το εύρημα αυτό συνάδει με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, που ανέδειξαν την υπερμεθυλίωση διαφόρων γονιδίων τόσο σε PBMCs όσο και σε CD4(+) T λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΧΧ (266,267), προσδιορισμός όμως, της ολικής $5^mC/5^{hm}C$ του DNA CD19(+) και CD4(+) λεμφοκυττάρων στην ΠΧΧ έγινε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, στο σύνδρομο Sjögren (νόσημα που όπως και η ΠΧΧ χαρακτηρίζεται ως αυτοάνοση επιθηλίτιδα), έχει δείχθει η ύπαρξη αυξημένων ποσοστών 5^mC στα Β και Τ λεμφοκύτταρα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων (262).

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το mRNA των DNMTs και TETs στα περιφερικά CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών και ΥΜ που ανέδειξε αυξημένη μεταγραφική έκφραση της DNMT3A στους ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση σε

σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ και χαμηλή της TET1 στους ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση συγκριτικά με τους ΥΜ. Η μεταγραφική έκφραση των DNMTs και TETs σε περιφερικά λεμφοκύτταρα έχει μελετηθεί σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren. Στο ΣΕΛ, αν και οι μελέτες συμφωνούν όσον αφορά στην ολική υπομεθυλίωση των PBMCs ή/και των CD4(+) λεμφοκυττάρων, τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν σε ένζυμα μεθυλίωσης/απομεθυλίωσης είναι αντικρουόμενα (219). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τις μελέτες των Balada (286) και συνεργάτες και των Wang και συνεργάτες (321) που έδειξαν αυξημένη μεταγραφική έκφραση των DNMTs και συγκεκριμένα των DNMT1 και DNMT3A, σε ασθενείς με κλινικά ή/και ορολογικά ενεργό ΣΕΛ. Στο σύνδρομο Sjögren έχει δειχθεί αυξημένη μεταγραφική έκφραση των DNMTs στα Β και Τ λεμφοκύτταρα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες (262). Όσον αφορά στο νοσήματα του ήπατος, πρόσφατες μελέτες (322) βρήκαν αυξημένα επίπεδα mRNA των DNMTs και μειωμένα επίπεδα των TETs σε ζωικό μοντέλο ηπατικής ίνωσης όσο και στον ηπατικό ιστό ασθενών με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (ΜΑΣΗ). Η μειωμένη μεταγραφική έκφραση των TETs συσχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα $5^{hm}C$, ενώ αντίθετα η αύξηση των DNMTs δεν οδηγούσε σε αύξηση της ολικής 5^mC παραπέμποντας σε πιθανές επιγενετικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος. Επιπλέον στη μη αλκοολική λιπώδη νόσου του ήπατος (ΜΑΛΝΗ), παρατηρήθηκε αύξηση της DNMT1 (323), ενώ συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί της TET1 φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων, υποδηλώνοντας το ρόλο των επιγενετικών τροποποιήσεων στον προγραμματισμένο ηπατοκυτταρικό θάνατο (324).

Στην ΠΧΧ τα CD19(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών παρουσίαζαν υψηλότερη μεταγραφική έκφραση της DNMT1, που σχετίζεται με τη διατήρηση της μεθυλίωσης κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA και της TET3 συγκριτικά με αυτά των ΥΜ. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης (325), που έδειξε ότι οι διαφορετικά μεθυλιωμένες CpGs στους ασθενείς με ΠΧΧ εντοπίζονται κυρίως σε ενισχυτές κι εκκινητές γονιδίων που εδράζονται στα Β λεμφοκύτταρα. Παρόμοια ευρήματα έχουν δείξει μελέτες σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren, το οποίο φαίνεται να παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες στην παθογένειά του με την ΠΧΧ (157). Συγκεκριμένα, όπως έχει αναφερθεί, στο σύνδρομο Sjögren βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA των DNMTs στα λεμφοκύτταρα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες (262), ενώ επιπλέον έχει δειχθεί αυξημένη μεταγραφική έκφραση της TET3 σε

κυτταρικές σειρές σιελογόνων αδένων μετά από κατάλληλη επώαση σε φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον (236).

Όσον αφορά στη συσχέτιση της έκφρασης των DNMTs και TETs με κλινικά, βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση (ΑΗ tp1), τα επίπεδα mRNA της DNMT3A στα CD4(+) λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν αρνητική συσχέτιση με την τιμή της IgG ανοσοσφαιρίνης στον ορό (η οποία είναι δείκτης ενεργότητας της νόσου), και το ίδιο ίσχυε (τάση αρνητικής συσχέτισης) για τα CD19(+) λεμφοκύτταρα. Η DNMT3A σχετίζεται με “de novo” μεθυλίωση του DNA σε εκκινητές συγκεκριμένων γονιδίων στα CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με γενετική διαγραφή του γονιδίου της DNMT3A και DNMT3B (326) έδειξαν ότι, όσον αφορά στα Β λεμφοκύτταρα, η DNMT3 και κατ’ επέκταση η “de novo” μεθυλίωση του DNA παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίησή τους και τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, καταστέλλοντάς τα και μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή αυταντισωμάτων από αυτοαντιδραστικά Β κύτταρα. Η αρνητική συσχέτιση των επιπέδων mRNA της DNMT3A με την IgG συμβαδίζει με το γεγονός ότι η αύξηση της “de novo” μεθυλίωσης οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών.

Επιπλέον, στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναδεικνύεται για πρώτη φορά η επίπτωση της ανοσοκατασταλτικής αγωγής στο επιγενετικό προφίλ της ΑΗ. Ειδικότερα, τα μεταγραφικά επίπεδα της DNMT3A προ θεραπείας μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής με κορτικοστεροειδή και MMF τόσο στα CD19(+) όσο και στα CD4(+) λεμφοκύτταρα, ενώ παραδόξως, τα επίπεδα mRNA της DNMT3A στα CD4(+) λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της IgG ανοσοσφαιρίνης του ορού, σε αντίθεση με ό,τι παρατηρήθηκε στους ίδιους ασθενείς πριν την έναρξη αγωγής. Η επίδραση των κορτικοστεροειδών στην έκφραση των DNMTs έχει ήδη αναφερθεί στο ΣΕΛ, όπου η αγωγή με μεθυλπρεδνιζολόνη οδηγούσε σε αύξηση των επιπέδων της DNMT1 στα PBMCs των ασθενών (327). Όσον αφορά στο MMF, έχει δειχθεί ότι επάγει επιγενετικές τροποποιήσεις σε PBMCs ασθενών με ΣΕΛ, καθώς μεταβολιζόμενο στον ενεργό μεταβολίτη του mycophenolic acid (MPA), αναστρέφει την υποακετυλίωση των ιστονών στα CD4(+) λεμφοκύτταρα και επιπρόσθετα καταστέλλει την έκφραση του συνδιεγερτικού μορίου CD40L μέσω μείωσης της κατάστασης ακετυλίωσης των ιστονών του εκκινητή του γονιδίου (328). Το CD40L παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων και τη

σύνθεση IgG, οπότε η θεραπεία με MMF οδηγεί με τον τρόπο αυτό στη μείωση της παραγωγής αυτοαντισωμάτων από τα αυτοαντιδραστικά B κύτταρα (328,329). Επιπλέον οι Peters και συνεργάτες (330), έδειξαν ότι σε T λεμφοκύτταρα υγιών, το MMF (αλλά όχι το tacrolimus) αναστρέφει το επίπεδο υπομεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου της IFN γ (προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και έχει δειχθεί ότι συμμετέχει σε πολλαπλούς μηχανισμούς σε ποικίλα νοσήματα) (331), η οποία (υπομεθυλίωση) προκαλείται κατά την ξωγενή ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων.

Μελέτες EWAS

Οι διαφορές στην έκφραση των DNMTs και TETs μεταξύ των ασθενών με AH έναντι των ασθενών με ΠΧΧ και των ΥΜ, παρά την απουσία σημαντικών διαφορών στο επίπεδο ολικής $5^mC/5^{hm}C$, μας οδήγησαν στην υπόθεση της πιθανής ύπαρξης μεμονωμένων, διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων οπότε έγινε περαιτέρω διερεύνηση με EWAS στα CD4(+) T κύτταρα ασθενών με AH κατά τη διάγνωση, ΥΜ και ασθενών με ΠΧΧ. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση μεμονωμένων CpGs αξιολογήθηκαν μεταξύ των τριών ομάδων σύμφωνα με την ανεύρεση διαφορετικά μεθυλιωμένων θέσεων (DMPs) ή/και διαφορετικά μεθυλιωμένων εκτεταμένων περιοχών του γονιδιώματος (DMRs).

Όσον αφορά στην AH κατά τη διάγνωση δε βρέθηκαν DMPs σε σχέση με τους ΥΜ αλλά ανιχνεύθηκαν DMPs σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ και σε σχέση με τη χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση ανοσοκαταστολής (AH tp2). Αντίθετα, στους ασθενείς με ΠΧΧ ανιχνεύθηκαν DMPs σε σχέση με τους ΥΜ. Συνολικά, η πλειοψηφία των DMPs σε όλες τις περιπτώσεις αφορούσε τις open sea regions και τα shores (περιοχές που είναι μακριά από την κεντρική περιοχή των CpG islands), ενώ ως προς την εντόπισή τους κατά μήκος του γονιδιώματος, η πλειοψηφία εντοπιζόταν στα gene bodies και τις IGR (intergenic regions). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με EWAS στο σύνδρομο Sjögren (227,258) στο οποίο το πλείστο των DMPs στα PBMCs και στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων ανιχνεύτηκε στις open sea regions. Ωστόσο, η ανάλυση των DMRs έδειξε ότι η πλειοψηφία τους, εντοπιζόταν στις περιοχές των εκκινητών και των σημείων έναρξης της μεταγραφής (promoter/TSS), γεγονός που καθιστά πολύ πιθανή την επίπτωσή τους στη μεταγραφή και έκφραση των εμπλεκόμενων γονιδίων.

EWAS σε ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση σε σχέση με τους YM

Κατά τη σύγκριση των ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση με τους YM, 8 από τα 29 (28%) διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια εδράζονταν στο χρωμόσωμα 6. Το χρωμόσωμα 6 περιέχει τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) που κωδικογραφούν τα HLA μόρια τάξης I και II. Είναι γνωστή από παλιότερες μικρές μελέτες και από μελέτες GWAS (genome wide association studies), η συσχέτιση της ΑΗ με τα HLA και κυρίως με τους γονότυπους HLA-DRB1*0301 και HLA-DRB1*0401 (HLA τάξης II) (15). Στην παρούσα μελέτη ανεδείχθη υπερμεθυλίωση του HLA-DPA1 το οποίο συμμετέχει σε αντιδράσεις μοσχεύματος κατά ξενιστή (299) και υπομεθυλίωση του HLA-DPB2 που είναι ψευδοοικογονίδιο (300). Τα HLA-DP αντιγόνα είναι, μαζί με τα HLA-DR και HLA-DQ, τάξης II αντιγόνα που παίζουν κεντρικό ρόλο στη σύνδεση μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας, ενώ DP αντιγόνα που προκύπτουν από πολυμορφισμούς των HLA-DP γονιδίων έχει δείχθει ότι μπορούν να παρουσιάσουν στα CD4(+) λεμφοκύτταρα όχι μόνο εξωγενή (όπως κλασικά πιστευόταν) αλλά και ενδογενή αντιγόνα (αυτοαντιγόνα) (332). Πολυμορφισμοί στη DPB αλυσίδα έχουν συσχετισθεί με τη συχνότητα εμφάνισης ή την έκφραση της νόσου σε νοσήματα όπως η ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η ηπατίτιδα Β (333–335).

Επιπλέον, υπομεθυλιωμένη ανεδείχθη η περιοχή του εκκινητή του TNF ο οποίος αποτελεί προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που συμμετέχει σε πληθώρα φλεγμονωδών αντιδράσεων και αντιδράσεων αυτοανοσίας. Το εύρημα αυτό συνάδει με το γεγονός ότι αυξημένη παραγωγή του TNF έχει καταγραφεί τόσο στα περιφερικά T CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ όσο και στα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον ηπατικό ιστό (336). Από παθοφυσιολογική άποψη, η υπομεθυλίωση εκκινητών γονιδίων που συμμετέχουν σε μονοπάτια έμφυτης ανοσίας είναι πιθανό να ευθύνεται για την έναρξη και διαίωνιση της φλεγμονώδους αντίδρασης στην ΑΗ.

Στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ παρατηρήθηκε επίσης υπομεθυλίωση στους εκκινητές των γονιδίων PDGFRL, CDK16 και EIF4E σε σχέση πάντα με τους YM. Οι PDGFR αποτελούν υποδοχείς τυροσινικών κινασών που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ίνωσης, κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HKK) (301,337). Η αυξημένη έκφραση του PDGFRα σε καρκινικά ηπατοκύτταρα έχει συσχετισθεί με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών και μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία ενώ έχει προταθεί ως προγνωστικός δείκτης και μελλοντικός θεραπευτικός στόχος (301). Το γονίδιο CDK16 (cyclin dependent kinase

16) κωδικογραφεί μία τυροσινική κινάση η οποία εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και συμμετέχει στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Υπερέκφραση της CDK16 έχει παρατηρηθεί στο HKK, έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση επιθετικότερου ιστοπαθολογικού φαινότυπου, ενώ η καταστολή του γονιδίου οδηγεί σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (338). Ανάλογα είναι τα ευρήματα για το γονίδιο EIF4E (eukaryotic Translation Initiation Factor 4E), το οποίο σχετίζεται με τη μετάφραση και το μεταβολισμό του mRNA και αύξηση της έκφρασής του έχει παρατηρηθεί στο HKK και έχει συσχετισθεί με υψηλότερο δείκτη υποτροπής (339).

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα ανωτέρω ευρήματα αφορούν σε ηπατικό ιστό κι όχι σε περιφερικά λεμφοκύτταρα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Σύμφωνα όμως, με τη μελέτη που διενεργήθηκε από τους Charras και συνεργάτες (258) στο σύνδρομο Sjögren, υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων που ανευρίσκονται σε περιφερικά B και T λεμφοκύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα των σιελογόνων αδένων. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι κοινοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί ανευρίσκονται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές και υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση γονιδίων που ανευρέθηκαν σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με AH πιθανώς να αφορούν και στα ηπατοκύτταρα των ασθενών. Για το λόγο αυτό καθίσταται απαραίτητη η διεξαγωγή επιγενετικών μελετών σε ηπατικό ιστό που θα οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση της σημασίας των παραπάνω ευρημάτων.

EWAS σε ασθενείς με AH κατά τη διάγνωση σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ

Προχωρώντας στη σύγκριση των ασθενών με AH tp1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ, παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση στην πλειοψηφία των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στους ασθενείς με AH tp1, ενώ υπερμεθυλιωμένα ανεδείχθησαν τα αντίστοιχα γονίδια στους ασθενείς με ΠΧΧ. Το δεύτερο κατά σειρά γονίδιο με το μεγαλύτερη διαφορά στη μεθυλίωση μεταξύ των δύο ομάδων, ήταν το γονίδιο PTPRN2. Το γονίδιο PTPRN2 (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type N2) κωδικογραφεί μία πρωτεΐνη τυροσινικής φωσφατάσης με διαμεμβρανικό υποδοχέα η οποία παρουσιάζει ειδικότητα για τα κατάλοιπα φωσφο-τυροσίνης. Οι τυροσινικές φωσφατάσες (PTPs) ελέγχουν τα ενδοκυττάρια δίκτυα φωσφορυλίωσης ρυθμίζοντας μία πληθώρα κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων καθώς στις περισσότερες των περιπτώσεων καταστέλλουν τη μετάδοση του σήματός τους (340). Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η

εξάλειψη του γονιδίου PTPRN2 οδηγεί στην έναρξη της φλεγμονής μέσω κατάργησης της ανοσοανοχής από τα T λεμφοκύτταρα. Οι μεταλλάξεις του PTPRN2 έχουν συχετισθεί με την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου I μέσω αυξημένης απόπτωσης των β-κυττάρων του παγκρέατος, ενώ προδιαθέτουν στην εμφάνιση της νόσου Crohn μέσω διαταραγμένης ανοσολογικής απάντησης από τα T κύτταρα και αυξημένης απόπτωσης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (305). Το γονίδιο PTPRN2 έχει βρεθεί υπομεθυλιωμένο στα T CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ (341), εύρημα που υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του γονιδίου, πιθανώς επηρεάζουν την ενεργοποίηση και την κυτταρική απόκριση των CD4(+) λεμφοκυττάρων οδηγώντας στην ανάπτυξη αυτοανοσίας.

Διαφορές στη μεθυλίωση μεταξύ των ασθενών με ΑΗ tp1 και ΠΧΧ παρατηρήθηκαν επιπλέον σε γονίδια που εμπλέκονται σε μηχανισμούς παραγωγής και διακίνησης των χολικών οξέων. Συγκεκριμένα στους ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση της νόσου (ΑΗ tp1), παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση των γονιδίων ACOX2 και ATP11A, που συμμετέχουν στη σύνθεση και έκκριση των χολικών οξέων. Η έλλειψη του γονιδίου ACOX2 (Acyl-CoA Oxidase 2) προκαλεί διαταραχή στη σύνθεση των χολικών οξέων, ανάπτυξη τρανσαμινασαιμίας και ηπατικής ίνωσης (342,343), ενώ το γονίδιο ATP11A (ATPase Phospholipid Transporting 11A) κωδικογραφεί τον αντίστοιχο ηπατοχολικό μεταφορέα, οι μεταλλάξεις του οποίου σχετίζονται με την ανάπτυξη της καλοήθους υποτροπιάζουσας ενδοηπατικής χολόστασης (BRIC) (306,344).

Σε σύγκριση με την ΠΧΧ, στην ΑΗ βρέθηκε, επιπλέον, υπομεθυλίωση στο γονίδιο CHD9. Το γονίδιο CHD9 (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 9) λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποίησης των υποδοχέων PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor). Οι PPAR είναι πυρηνικοί υποδοχείς που παίζουν κεντρικό ρόλο (κυρίως οι PPAR που εκφράζονται στο ήπαρ) στη διατήρηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση και μεταφορά της χολής (345). Οι φιμπράτες (αγωνιστές PPARα) χρησιμοποιούνται ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής στην ΠΧΧ και δρουν ενεργοποιώντας τους υποδοχείς PPAR, μεταβάλλοντας την έκκριση της χολής και ασκώντας αντιφλεγμονώδη και ανοσοτροποιοτική δράση (126,141,307). Η ανεύρεση διαφορετικού προτύπου μεθυλίωσης των γονιδίων αυτών στα περιφερικά λεμφοκύτταρα υποδεικνύει ότι οι διαφορετικές επιγενετικές τροποποιήσεις επιδρούν διαφορετικά στο φαινότυπο των νοσημάτων του ήπατος, αν και η ακριβής σημασία των ευρημάτων αυτών στον πληθυσμό των CD4(+) λεμφοκυττάρων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Ανάλογα ευρήματα, παρατηρήθηκαν για το γονίδιο ACTN4 (actinin alpha 4) το οποίο ανευρέθη υπομεθυλιωμένο στους ασθενείς με AH tp1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ. Το γονίδιο ACTN4 κωδικοποιεί μία από τις πρωτείνες του συμπλέγματος της α -actinin. Τα ισομερή της α -actinin αντιπροσωπεύουν ένα δομικό συστατικό της F-actin που αποτελεί πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Η α -actinin 4 εκφράζεται στη μεμβράνη και το κυτοσόλιο των ηπατοκυττάρων και των χολαγγειοκυττάρων. Όπως έχει δείξει η ομάδα μας, τα αντισώματα έναντι της α -actinin αποτελούν διαγνωστικό δείκτη για την AH-1 καθώς ανιχνεύονται σε πάνω από το 40% των ασθενών και αποτελούν δείκτη ενεργότητας της νόσου και ανταπόκρισης στην ανοσκατασταλτική αγωγή (77,84,346). Η ανεύρεση υπομεθυλίωσης στο γονίδιο της α -actinin 4 υποδηλώνει ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις των γονιδίων εμπλέκονται σε μηχανισμούς παραγωγής αυτοαντισωμάτων στην AH και θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο εφαρμογής επιγενετικά προσανατολισμένων θεραπειών.

Ανάμεσα στα γονίδια με τις μεγαλύτερες διαφορές της μεθυλίωσης μεταξύ ασθενών με AH tp1 και ΠΧΧ, ανευρέθη ένα σημαντικό ποσοστό γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια φυσικής ανοσίας όπως τα SMAD3, IRAK1 και C1QTNF3. Η πρωτεΐνη SMAD3 (SMAD Family Member 3) λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που επάγει τη διαφοροποίηση των T CD4(+) λεμφοκυττάρων σε TH17 και FOXP3⁺ κύτταρα, διατηρώντας μία ισορροπία μεταξύ προφλεγμονωδών και ανοσορρυθμιστών μηχανισμών. Ο TGF- β (transforming growth factor- β), αποτελεί το κύριο σηματοδοτικό μόριο που ρυθμίζει την έκφραση του SMAD3 (347). Στα αστεροειδή κύτταρα (πρώην Ito), ο TGF- β επάγει την έκφραση του SMAD3 και οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου προάγοντας την ίνωση (348). Η υπομεθυλίωση του SMAD3 που χαρακτηρίζει τα CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με AH πιθανώς να επηρεάζει την έκφρασή του και κατά συνέπεια την πρόοδο της ηπατικής ίνωσης. Η κινάση IRAK1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1) λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο μεταξύ των TLRs και του υποδοχέα της IL-1. Στα CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του IRAK1 που σχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου αλλά και με τα επίπεδα της IL-17, ενώ αντίθετα μειωμένη έκφραση του IRAK1 χαρακτηρίζει τα περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με σύνδρομο Sjögren (349,350). Η υπομεθυλίωση του IRAK1 που χαρακτηρίζει τα CD4(+) κύτταρα των ασθενών με AH και η αντίστοιχη υπερμεθυλίωση στην ΠΧΧ, συνάδουν με τα ανωτέρω ευρήματα και υποδεικνύουν ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμμετέχουν στη διαφορετική έκφραση του IRAK1 στα

αυτοάνοσα νοσήματα. Επιπλέον, η καταστολή του IRAK1 έχει δειχθεί ότι μειώνει τη διαφοροποίηση των TH17 κυττάρων και έχει προταθεί ως θεραπευτικός στόχος στο ΣΕΛ, μηχανισμός ο οποίος θα μπορούσε να μελετηθεί και στην ΑΗ. Ωστόσο, προκειμένου να σχεδιαστούν ανάλογες θεραπευτικές στρατηγικές στην ΑΗ κρίνεται απαραίτητη η συσχέτιση του διαφορετικού προτύπου μεθυλίωσης με την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο.

Το γονίδιο C1QTNF3 κωδικογραφεί την πρωτεΐνη CRTP3 η οποία αποτελεί αυξητικό παράγοντα και εμποδίζει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα λιποκύτταρα, μονοκύτταρα και τις ινοβλάστες υπό την επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη των Gram(-) μικροοργανισμών. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα στη ρευματοειδή αρθρίτιδα έδειξαν ότι η εξάλειψη του γονιδίου σχετίζεται με την επίπτωση και τη σοβαρότητα της νόσου, καθώς και με τα επίπεδα των παραγόμενων φλεγμονωδών κυτταροκινών, προτείνοντας τη χρήση του ως μελλοντική θεραπεία (351).

Επιπρόσθετα, υπομεθυλίωση στους ασθενείς με ΑΗ tp1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ, παρατηρήθηκε στο γονίδιο MSI2 (Musashi RNA Binding Protein 2), το οποίο συμμετέχει στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση ενεργοποίησης της ανοσολογικής απάντησης. Το γονίδιο MSI2 κωδικογραφεί μία δεσμευτική πρωτεΐνη του RNA. Η οικογένεια των RNA δεσμευτικών πρωτεϊνών (RNA binding proteins-RBPs) αποτελεί κυρίαρχο μετα-μεταγραφικό ρυθμιστή της ανοσολογικής απάντησης καθώς οι αλλαγές που επάγει στο mRNA επηρεάζουν την τελική έκφραση της πρωτεΐνης. Στα T λεμφοκύτταρα οι RBPs αλλάζοντας την έκφραση του mRNA επηρεάζουν την ενεργοποίηση των CD8(+) T κυττάρων, ενώ η ενεργοποίηση των T κυττάρων οδηγεί σε συσσώρευση των RBPs στο κυτταρόπλασμα η οποία επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών. Ανάλογα, στα B λεμφοκύτταρα οι RBPs εμπλέκονται στην παραγωγή IgD και IgM και ελέγχουν την παραγωγή αντισωμάτων τόσο για θυμοεξαρτώμενα όσο και για θυμοανεξάρτητα αντιγόνα (316).

Κατά την ανάλυση εκτεταμένων περιοχών του γονιδιώματος (DMRs) μεταξύ των ασθενών με ΑΗ tp1 και ΠΧΧ, βρέθηκε σημαντικός αριθμός διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη φυσική ανοσία. Από αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γονίδια AZU1, IRF6, S100P και ZAP70. Οι εκκινητές των εν λόγω γονιδίων ανευρέθησαν υπομεθυλιωμένοι στους ασθενείς με ΑΗ tp1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΧ. Η γλυκοπρωτεΐνη AZU1 (Azurocidin 1) συμμετέχει στη μετάδοση του σήματος των μονοκυττάρων κατά τη φλεγμονώδη απάντηση κι ο

εκκινητής του γονιδίου της έχει βρεθεί υπομεθυλιωμένος σε περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ (352). Αντίστοιχα, ο IRF6 (Interferon regulatory factor 6) ανήκει σε μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν μία πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών της φυσικής κι επίκτητης ανοσίας επάγοντας την παραγωγή IFNα και έχει προταθεί ως θεραπευτικός στόχος για αυτοάνοσα νοσήματα (353). Οι πρωτείνες S100P (S100 Calcium Binding Protein P) αποτελούν ρυθμιστές της φλεγμονώδους απάντησης και η έκφρασή τους επηρεάζεται ισχυρά από αλλαγές στη μεθυλίωση του γονιδίου τους και της ακετυλίωσης του εκκινητή του. Η πρωτεΐνη ZAP70 (Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70) είναι απαραίτητη για τα σηματοδοτικά μονοπάτια των T κυττάρων και η έλλειψη της οδηγεί σε πλημμελή λειτουργία των CD4(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων, ενώ η έκφρασή της σε CD4(+) λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ έχει συσχετισθεί με τη δραστηριότητα της νόσου (251,354,355) .

Το διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης που χαρακτηρίζει ένα σημαντικό αριθμό γονιδίων της φυσικής ανοσίας μεταξύ ασθενών με ΑΗ και ΠΧΧ, υποδηλώνει ότι διαφορετικές επιγενετικές τροποποιήσεις επιδρούν στην αιτιοπαθογένεια και επηρεάζουν το φαινότυπο των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση των εν λόγω γονιδίων φαίνεται να επηρεάζουν την έκφρασή τους σε μεταγραφικό επίπεδο όπως έχει ήδη αποδειχθεί σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren. Ωστόσο, για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων στον τομέα αυτό κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια επιγενετικών μελετών που θα συσχετίσουν τις επιγενετικές αλλαγές με την επίδραση τους στην έκφραση των εμπλεκόμενων γονιδίων έτσι ώστε να συμβάλλουν στο σχεδιασμό επιγενετικά προσανατολισμένων θεραπευτικών στρατηγικών.

EWAS σε ασθενείς με ΑΗ με πλήρη ανταπόκριση στην ανοσοκαταστολή σε σχέση με τους ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση

Όσο αφορά στην ανάλυση των ασθενών με ΑΗ μετά την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική αγωγή (ΑΗ tp2), παρατηρήθηκε αλλαγή στο πρότυπο μεθυλίωσης σε σχέση με τους ασθενείς πριν την έναρξη θεραπείας (ΑΗ tp1). Συγκεκριμένες CpGs που ανευρέθησαν υπομεθυλιωμένες στους ασθενείς πριν την έναρξη αγωγής, όπως για τα γονίδια ANKRD11 (cg00169122 και cg08423714) και ATP11A (cg14354398), ανεδείχθησαν υπερμεθυλιωμένες μετά την επίτευξη πλήρους ύφεσης. Το εύρημα αυτό ενισχύει το συμπέρασμα ότι η ανοσοκατασταλτική αγωγή με

MMF επάγει επιγενετικές αλλαγές που επηρεάζουν την έκφραση μεμονωμένων γονιδίων (328,330) και συνάδει με τα ευρήματά μας που αποδεικνύουν την επίδραση της ανοσοκατασταλτικής αγωγής στην έκφραση των DNMTs. Προς αυτή την κατεύθυνση συνηγορεί το εύρημα της υπερμεθυλίωσης του εκκινητή του CD86 μορίου που χαρακτήριζε τους ασθενείς με AH tp2. Η έκφραση του CD86 στα ηπατοκύτταρα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C έχει συσχετισθεί με αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών από τα CD4(+) T λεμφοκύτταρα που συμμετέχει στην ηπατοκυτταρική βλάβη (356). Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου στους ασθενείς με AH μετά την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής πιθανώς να σχετίζεται με επαγόμενες επιγενετικές αλλαγές που αναστέλουν την εξέλιξη της ηπατοκυτταρικής βλάβης.

Ανάμεσα στα διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια ανεδείχθη επιπλέον, το γονίδιο MAGEC2. Το γονίδιο MAGEC2 εδράζεται στο χρωμόσωμα X και εκφράζεται σε νεοπλασματικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου του ΗΚΚ. Η έκφρασή του στα ηπατοκύτταρα ασθενών με ΗΚΚ έχει συσχετισθεί με χειρότερη πρόγνωση της νόσου, ενώ έχει προταθεί η χρήση του ως στόχος αντινεοπλασματικής ανοσοθεραπείας (319,320). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΗΚΚ. Τα ευρήματα αυτά ωστόσο, αφορούν σε CD4(+) λεμφοκύτταρα και όχι σε ηπατικό ιστό με αποτέλεσμα η σημασία τους να μην καθίσταται πλήρως κατανοητή και η ανάγκη διενέργειας επιγενετικών μελετών σε ηπατικό ιστό να κρίνεται αναγκαία.

EWAS σε ασθενείς με ΠΧΧ σε σχέση με τους YM

Η ανάλυση των ασθενών με ΠΧΧ συγκριτικά με τους YM ανέδειξε υπερμεθυλίωση σε μια σειρά γονιδίων των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς φυσικής κι επίκτητης ανοσίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπερμεθυλίωση των γονιδίων TLR9, SQSTM1, GSTP1, ALOX12, CAMTA1 και PRKAR1B. Οι TLR9 (Toll like receptor 9) αντιπροσωπεύουν υποδοχείς της φυσικής ανοσίας που συμμετέχουν στην άμυνα έναντι ξένων μικροοργανισμών. Οι TLR εκφράζονται στα αστεροειδή κύτταρα και η ενεργοποίησή τους σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου (357). Στην ΠΧΧ η παραγωγή των AMA καθώς και η αυξημένη παραγωγή IgM ανοσοσφαιρίνης από τα B κύτταρα έχει συσχετισθεί με αυξημένη ενεργοποίηση των TLR9 ενώ η έκφραση των τελευταίων στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη χολαγγειοκαρκινώματος (358,359).

Το γονίδιο SQTM1 (Sequestosome 1), εμπλέκεται σε μηχανισμούς αυτοφαγίας των κυττάρων και αυξημένη έκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε φλεγμαινόντα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων στην ΠΧΧ, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή του στην καταστροφή των χοληφόρων πόρων (360). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του γονιδίου ρυθμίζεται από τον πυρηνικό υποδοχέα FXR των ηπατοκυττάρων ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την πιθανή συμμετοχή του στην ανάπτυξη χολόστασης (361). Αναφορικά με το γονίδιο GSTP1 (Glutathione S-Transferase Pi 1), το οποίο κατέχει κεντρικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων έναντι των ελεύθερων ριζών, μία πρόσφατη μετανάλυση έδειξε ότι η υπερμεθυλίωση του γονιδίου οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησής του, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ (362–364). Όσο αφορά στο γονίδιο ALOX12 (Arachidonate 12-Lipoxygenase), το οποίο ρυθμίζει την απελευθέρωση των εικοσανοειδών, μελέτες σε ζωικά μοντέλα ανέδειξαν τη συμμετοχή του σε μηχανισμούς ανάπτυξης στεατοηπατίτιδας ενώ η αναστολή του, οδηγούσε σε βελτίωση των ευρημάτων στη NAFLD (365,366).

Υπερμεθυλιωμένα στην ΠΧΧ βρέθηκαν και τα γονίδια CAMTA1 (Calmodulin Binding Transcription Activator 1) και PRKAR1B (Protein Kinase cAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Beta) που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια των Τ λεμφοκυττάρων συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους (367,368). Σε μία πρόσφατη μελέτη σε CD4(+) λεμφοκύτταρα από υγιείς δότες, εκτιμήθηκε το επίπεδο μεθυλίωσης μεμονωμένων CpGs κατά μήκος του γονιδίου CAMTA1 και βρέθηκε ότι η υπομεθυλίωση συγκεκριμένων CpGs του γονιδίου μπορούσε να χαρακτηρίσει τους διαφορετικούς υπότυπους των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs) συγκριτικά με τα υπόλοιπα Τ λεμφοκύτταρα (367). Το γονίδιο PRKAR1B κωδικογράφει τη ρυθμιστική υπομονάδα RI-b της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA) που εξαρτάται από το cAMP και αποτελεί κεντρικό ένζυμο στο σηματοδοτικό μονοπάτι του 2^{ου} αγγελιοφόρου cAMP ελέγχοντας (μέσω φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών στόχων) πολλές κυτταρικές λειτουργίες (μεταβολικές, μεταφοράς ιόντων και μεταγραφής γονιδίων). Η PKA παίζει πρωταρχικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα Τ λεμφοκύτταρα, ενώ τα επίπεδά της έχουν βρεθεί μειωμένα σε κυτταρικές σειρές Τ λεμφοκυττάρων ασθενών με ΣΕΛ γεγονός που πιθανά να σχετίζεται με τη δυσλειτουργία τους όσον αφορά στη σηματοδότηση (368).

Στους ασθενείς με ΠΧΧ (σε σχέση με τους ΥΜ), υπερμεθυλιωμένο βρέθηκε και το γονίδιο RPTOR (Regulatory Associated Protein of mTOR Complex 1) που εμπλέκεται στον έλεγχο του στόχου της ραπαμυκίνης, η οποία ρυθμίζει την αύξηση και τον

πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το σύμπλεγμα mTORC1 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων, ευοδώνει την ανάπτυξη των T βοηθητικών και TH17 λεμφοκυττάρων και αναστέλλει την ανάπτυξη των T ρυθμιστικών κυττάρων, ενώ εκτός του ανοσιακού συστήματος προάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών (369). Στο ΣΕΛ η θεραπευτική δράση της ραπαμυκίνης, αναστολέα του mTOR έγκειται στην αναστολή της ενεργοποίησης των T κυττάρων. Στην ΑΗ η ραπαμυκίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε μικρές σειρές ασθενών με θετικά αποτελέσματα (370).

Η υπερμεθυλίωση των ανωτέρω γονιδίων που παρατηρήθηκε σε περιφερικά CD4(+) λεμφοκύτταρα υποδηλώνει ότι οι τροποποιήσεις της μεθυλίωσης του DNA πιθανώς οδηγούν στην ανάπτυξη παθοφυσιολογικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΠΧΧ. Ωστόσο, η διεξαγωγή περαιτέρω επιγενετικών μελετών, τόσο σε περιφερικά λεμφοκύτταρα όσο και σε ηπατοκύτταρα ασθενών, κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των αλλαγών της μεθυλίωσης στην έκφραση των ανωτέρω γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο και να αποσαφηνιστεί η ακριβής σημασία των ανωτέρω ευρημάτων.

Κατά την ανάλυση των ασθενών με ΠΧΧ σημαντικά ήταν τα ευρήματα που ανέκυψαν από την ανάλυση των γονιδίων του χρωμοσώματος X. Πιο συγκεκριμένα η ανάλυση του χρωμοσώματος X ανέδειξε υπερμεθυλίωση του γονιδίου HTR2C 5-(Hydroxytryptamine Receptor 2C) που αποτελεί έναν ενδογενή νευροδιαβιβαστή της σεροτονίνης (371) και του γονιδίου TSC22D3 (TSC22 Domain Family Member 3) που σχετίζεται με την ανάπτυξη οστεοπόρωσης (372). Οι ενδογενείς νευροδιαβιβαστές σεροτονίνης έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση κνησμού στην ΠΧΧ και έχουν προταθεί ως θεραπευτικός στόχος (153,154,373), ενώ η οστεοπόρωση αφορά πάνω από 30% των ασθενών (374). Ωστόσο, η αιτιοπαθογένειά και η θεραπευτική αντιμετώπιση τόσο του κνησμού όσο και της οστεοπόρωσης στους ασθενείς με ΠΧΧ παραμένουν αμφιλεγόμενες. Η ανεύρεση υπερμεθυλίωσης στα δύο αυτά γονίδια υποδεικνύει την ύπαρξη επιγενετικών αλλαγών που ενδεχομένως επηρεάζουν την έκφρασή τους και με τον τρόπο αυτό οδηγούν σε λειτουργικά μονοπάτια που ευθύνονται για την εμφάνιση κνησμού και μειωμένης οστικής δόμησης στην ΠΧΧ. Ως εκ τούτου η αναστολή της μεθυλίωσης των γονιδίων αυτών θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικό θεραπευτικό στόχο για συμπτωματικούς ασθενείς που δεν οφελούνται από τις τρέχουσες θεραπείες.

Υπερμεθυλίωση παρατηρήθηκε επίσης για το γονίδιο OGT (O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase του χρωμοσώματος X. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες το γονίδιο OGT σχετίζεται με μηχανισμούς απόπτωσης των

ηπατοκυττάρων, ενώ μείωση των επιπέδων του έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση του ήπατος. Επιπλέον μελέτες σε ζωικά μοντέλα ανέδειξαν εκσεσημασμένη απόπτωση ηπατοκυττάρων που είχαν υποστεί καταστολή της έκφρασης του γονιδίου (375). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το γονίδιο OGT λειτουργεί ως ρυθμιστής της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων και η υπερμεθυλίωση που παρατηρήθηκε στα CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΧ πιθανώς να σχετίζεται εξίσου με μειωμένη έκφραση του γονιδίου και κατά συνέπεια αυξημένη ηπατοκυτταρική νέκρωση.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του χρωμοσώματος X με τα ευρήματα της τρέχουσας βιβλιογραφίας. Σύμφωνα με την τελευταία, οι Selmi και συνεργάτες (266), μελέτησαν διαφορές στη μεθυλίωση του DNA με τη μέθοδο της ανοσοκαθίζησης, χρησιμοποιώντας PBMCs από 3 ζεύγη μονοζυγωτικών διδύμων και 8 ζεύγη αδερφών εκ των οποίων η μία εκ των δύο εμφάνιζε ΠΧΧ, ενώ οι Leo και συνεργάτες (267) προχώρησαν σε μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων του X χρωμοσώματος με τη χρήση bisulfite σε 10 ασθενείς με ΠΧΧ έναντι 10 υγιών μαρτύρων σε CD4(+), CD8(+) και CD14(+) T λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης (266) ανέδειξαν 51 υπερμεθυλιωμένα γονίδια στο χρωμόσωμα X, ενώ η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης ανέδειξε καταστολή της έκφρασης γονιδίων: IFIT1 (IFN induced protein with tetratricopeptide repeats) και IFI44L (IFN induced protein 44 like), που επάγονται από την IFN, SMARCA1 (μεταγραφικός ρυθμιστής που τροποποιεί τη δομή της χρωματίνης και σχετίζεται με την απόπτωση και τη διαφοροποίηση του κυττάρου), CXCR5 (υποδοχέας της αντίστοιχης χυμοκίνης που εκφράζεται στα B και T λεμφοκύτταρα και ελέγχει την μετακίνησή τους στους λεμφαδένες), HLA-B και διέγερση (upregulation) της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου της IL-6. Η δεύτερη μελέτη (267) ανέδειξε την υπομεθυλίωση του εκκινητή του CXCR3 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 3), υποδοχέα κυτταροκινών που κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, τα επίπεδα μεθυλίωσης του οποίου ήταν αντιστρόφως ανάλογα των επιπέδων της μεταγραφικής έκφρασης του CXCR3 στα CD(4+) T λεμφοκύτταρα. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας και των δύο προηγούμενων μελετών (266,267), ανέδειξε σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση που παρατηρήθηκε στη συντριπτική πλειοψηφία των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στην παρούσα μελέτη,

επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των Selmi και συνεργατών οι οποίοι ανέδειξαν υπερμεθυλίωση σε 51 γονίδια του χρωμοσώματος X, 20 εκ των οποίων παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη με την παρούσα μελέτη. Επιπλέον, παρ'οτι στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μεθυλίωση των IFIT1 και IFI44L (όπως βρήκαν οι Selmi και συνεργάτες), επιβεβαιώθηκε ο ρόλος της IFN στην παθογένεια της ΠΧΧ καθώς ανιχνεύθηκε υπερμεθυλίωση στα γονίδια IFNGR2 (Interferon gamma receptor 2), υποδοχέα της IFN γ και TICAM2 (Toll Like Receptor Adaptor Molecule 2), προσαρμογέα σε μονοπατία επαγόμενα από την IFN α . Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση διαφορετικών γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι ρύθμισης της IFN στις δύο μελέτες, θα μπορούσε να αποδοθεί πρωτίστως, στη μελέτη διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών (PBMCs έναντι CD4(+) T λεμφοκυττάρων) και επιπλέον στη διαφορετική μέθοδο προσδιορισμού της μεθυλίωσης που χρησιμοποιήθηκε στις δύο μελέτες (ανοσοκαθίζηση έναντι 850K Methylation array Illumina).

Συγκριτικά με τη μελέτη των Lleo και συνεργατών, αλληλοεπικάλυψη παρατηρήθηκε σε 10 γονίδια, ωστόσο σε 4 από αυτά και συγκεκριμένα στα ATP6AP2 (ATPase H+ Transporting Accessory Protein 2), RAP2C (RAP2C, Member of RAS Oncogene Family), HTATSF1 (HIV-1 Tat Specific Factor 1) και IDH3G (Isocitrate Dehydrogenase (NAD(+))) παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης καθώς τα γονίδια αυτά ανεδείχθησαν υπομεθυλιωμένα στην προηγούμενη και υπερμεθυλιωμένα στην παρούσα μελέτη. Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι στη μελέτη των Lleo και συνεργατών οι ασθενείς με ΠΧΧ βρισκόταν υπό αγωγή με ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA), ενώ στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν ασθενείς κατά τη διάγνωση της νόσου και πριν την έναρξη θεραπευτικής αγωγής.

Τα αποτελέσματα της EWAS στους ασθενείς με ΠΧΧ συγκριτικά με τους YM αντικατοπτρίζουν τη σημασία του χρωμοσώματος X στην παθογένεια της νόσου και επιβεβαιώνουν την επικράτηση της υπερμεθυλίωσης στο πλείστο των γονιδίων που εδράζονται στο χρωμόσωμα X. Η σημασία του χρωμοσώματος X στην ΠΧΧ υποδηλώνεται έμμεσα από το γεγονός ότι η συχνότητά της είναι ως γνωστό σαφώς μεγαλύτερη στις γυναίκες (αναλογία γυναικών/ανδρών=9/1), αλλά και πιο άμεσα από μελέτες που δείχνουν ότι η συχνότητα μονοσωμίας X (που περιλαμβάνει γονίδια σχετιζόμενα με την πρόκληση ανοσολογικής ανοχής) είναι σημαντικά αυξημένη σε γυναίκες με ΠΧΧ (376,377).

6. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά η συμμετοχή των επιγενετικών τροποποιήσεων των CD19(+) και CD4(+) T λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της ΑΗ. Τα ευρήματά μας, ανέδειξαν τη διαφορετική έκφραση των DNMTs και TETs σε μεταγραφικό επίπεδο στους ασθενείς με ΑΗ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, αλλά και το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των DNMTs και TETs μεταξύ ΑΗ και ΠΧΧ, οι οποίες αποτελούν τα δύο κύρια αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Ωστόσο, η διαφορετική έκφραση των DNMTs και TETs δεν επάγει αλλαγές στο επίπεδο ολικής μεθυλίωσης/υδροξυμεθυλίωσης του DNA των CD19(+) και CD4(+) T λεμφοκυττάρων, παραπέμποντας στην ύπαρξη εντοπισμένων επιγενετικών αλλαγών κατά μήκος του γονιδιώματος, που επηρεάζουν την έκφραση μεμονωμένων γονιδίων.

Η μελέτη της μεθυλίωσης μεμονωμένων γονιδίων κατά μήκος του συνόλου του γονιδιώματος με τη διενέργεια EWAS ανέδειξε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, την ύπαρξη υπομεθυλίωσης στο πλείστο των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στους ασθενείς με ΑΗ σε σχέση τόσο με τους ΥΜ όσο και με τους ασθενείς με ΠΧΧ. Σε αντίθεση, και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, στους ασθενείς με ΠΧΧ, ο μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων βρέθηκε υπερμεθυλιωμένος.

Ανάμεσα στα διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια ανιχνεύθηκαν γονίδια που εμπλέκονται σε μηχανισμούς φυσικής κι επίκτητης ανοσίας παραπέμποντας στο γεγονός ότι οι επιγενετικές αλλαγές στα CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα επιδρούν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς πυροδότησης και διαίωξης της ανοσιακής απάντησης. Η υπομεθυλίωση στην ΑΗ και η υπερμεθυλίωση στην ΠΧΧ, αφορούσαν επιπλέον, γονίδια που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανάπτυξης χολόστασης και ηπατοκαρκινογένεσης. Τα ευρήματα αυτά ωστόσο, αφορούν σε περιφερικά Β και Τ λεμφοκύτταρα και όχι σε κύτταρα από ηπατικό ιστό με αποτέλεσμα η σημασία τους να είναι αβέβαιη. Ωστόσο, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι επιγενετικές αλλαγές που συμβαίνουν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως το σύνδρομο Sjögren, παρουσιάζουν σημαντική αλληλοεπικάλυψη, υποδηλώνοντας ότι οι επιγενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στα περιφερικά Β και Τ λεμφοκύτταρα πιθανώς να αντανακλούν αλλαγές που επισυμβαίνουν και στον ηπατικό ιστό στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Η

υπόθεση αυτή βέβαια μένει να αποδειχθεί με τη διενέργεια επιγενετικών μελετών σε ηπατικό ιστό.

Επιπρόσθετα, η μελέτη μας επιβεβαίωσε τη σημασία των επιγενετικών τροποποιήσεων πολλαπλών γονιδίων που εδράζονται στο χρωμόσωμα X στην ΠΧΧ. Σε αντίθεση με την ΠΧΧ, στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το πλείστο των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στα CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ, εντοπίζονταν σε μη φυλετικά χρωμοσώματα, τονίζοντας το διαφορετικό επιγενετικό προφίλ μεταξύ των δύο κύριων αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος.

Τέλος, ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα ευρήματά μας ήταν η μείωση των επίπεδων της DNMT3A, δηλαδή του ενζύμου που σχετίζεται με τη “de novo” μεθυλίωση, τόσο στα CD19(+) όσο και στα CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ που βρίσκονται σε πλήρη ύφεση της νόσου σε σχέση με τα επίπεδά της κατά τη διάγνωση. Παρόμοιο φαινόμενο αντιστροφής της μεθυλίωσης, παρατηρήθηκε σε ορισμένα γονίδια στους ασθενείς με ΑΗ μετά τη χορήγηση ανοσοκαταστολής στην EWAS (από υπομεθυλιωμένα προ θεραπείας βρέθηκαν υπερμεθυλιωμένα μετά θεραπεία).

Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει σαφώς, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, ότι τόσο στην ΑΗ όσο και στην ΠΧΧ οι επιγενετικές τροποποιήσεις παίζουν δυνητικά σημαντικό παθογενετικό ρόλο, ο οποίος μένει να διευκρινιστεί με περαιτέρω έρευνα πάνω στο πεδίο αυτό. Ωστόσο, ένας από τους περιορισμούς της παρούσας μελέτης είναι ότι μελετήθηκε η έκφραση των ενζύμων που συμμετέχουν στη μεθυλίωση/υδροξυμεθυλίωση σε μεταγραφικό μόνο επίπεδο. Δεδομένου ότι τα επίπεδα του mRNA δε συμβαδίζουν πάντα με την τελική έκφραση της πρωτεΐνης, θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες προσδιορισμού της έκφρασης των DNMTs και TETs σε επίπεδο πρωτεΐνης. Επιπλέον, δεδομένου ότι η υπερμεθυλίωση ή υπομεθυλίωση δε σχετίζεται πάντα με αναστολή ή ενεργοποίηση, αντίστοιχα, της έκφρασης ενός γονιδίου, καθώς η τελική έκφρασή του επηρεάζεται και από άλλες επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση των ιστονών, είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων, που στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν διαφορετικά μεθυλιωμένα. Παρ' όλα αυτά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ανοίγουν νέους δρόμους για την κατανόηση της αιτιοπαθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος και την εύρεση νέων, στοχευμένων θεραπειών.

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, Manns MP, Krawitt EL, Vierling JM, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primer*. 2018;4(1):18017.
2. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med*. 2002;13(5):293–303.
3. Zachou K, Muratori P, Koukoulis GK, Granito A, Gatselis N, Fabbri A, et al. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(8):887–913.
4. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2010;51(6):2193–213.
5. Boberg KM. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis*. 2002;6(3):635–47.
6. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol*. 1998 Jan;33(1):99–103.
7. Francque S, Vonghia L, Ramon A, Michielsen P. Epidemiology and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatic Med Evid Res*. 2012;4:1–10.
8. Ngu JH, Bechly K, Chapman BA, Burt MJ, Barclay ML, Geary RB, et al. Population-based epidemiology study of autoimmune hepatitis: a disease of older women? *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(10):1681–6.
9. Al-Chalabi T, Boccato S, Portmann BC, McFarlane IG, Heneghan MA. Autoimmune hepatitis (AIH) in the elderly: a systematic retrospective analysis of a large group of consecutive patients with definite AIH followed at a tertiary referral centre. *J Hepatol*. 2006;45(4):575–83.

10. Verslype C, George C, Buchel E, Nevens F, van Steenberg W, Fevery J. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis at age 65 and older. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21(6):695–9.
11. Azariadi K, Gatselis N.K, Arvaniti P, Lygoura V, Gabeta S, Zachou K, Dalekos G.N. Autoimmune hepatitis: the impact of ageing on severity, treatment response and outcome of autoimmune hepatitis. 18th International Congress of Internal Medicine; 2019:Lisbon.(e poster presentation)
12. Hurlburt KJ, McMahon BJ, Deubner H, Hsu-Trawinski B, Williams JL, Kowdley KV. Prevalence of autoimmune liver disease in Alaska Natives. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(9):2402–7.
13. Lim KN, Casanova RL, Boyer TD, Bruno CJ. Autoimmune hepatitis in African Americans: presenting features and response to therapy. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(12):3390–4.
14. Wong RJ, Gish R, Frederick T, Bzowej N, Frenette C. The impact of race/ethnicity on the clinical epidemiology of autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46(2):155–61.
15. Boer YS de, Gerven NMF van, Zwiers A, Verwer BJ, Hoek B van, Erpecum KJ van, et al. Genome-Wide Association Study Identifies Variants Associated With Autoimmune Hepatitis Type 1. *Gastroenterology.* 2014;147(2):443-452.e5.
16. Czaja AJ, Doherty DG, Donaldson PT. REVIEW: Genetic Bases of Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2002;47(10):2139–50.
17. Muratori P, Czaja AJ, Muratori L, Pappas G, Maccariello S, Cassani F, et al. Genetic distinctions between autoimmune hepatitis in Italy and North America. *World J Gastroenterol WJG.* 2005;11(12):1862–6.
18. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev.* 2000;174:250–9.
19. Donaldson PT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2002;22(4):353–64.

20. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* Baltimore Md. 1997;25(3):541–7.
21. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, et al. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* Baltimore Md. 1999;30(6):1374–80.
22. Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology*. 2006;130(3):868–82.
23. Gatselis NK, Zachou K, Koukoulis GK, Dalekos GN. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World J Gastroenterol*. 2015;21(1):60–83.
24. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* Baltimore Md 1950. 2003;170(3):1481–9.
25. Bogdanos D-P, Lenzi M, Okamoto M, Rigopoulou EI, Muratori P, Ma Y, et al. Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004;17(1):83–92.
26. Holdener M, Hintermann E, Bayer M, Rhode A, Rodrigo E, Hintereder G, et al. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med*. 2008;205(6):1409–22.
27. Hintermann E, Holdener M, Bayer M, Loges S, Pfeilschifter JM, Granier C, et al. Epitope spreading of the anti-CYP2D6 antibody response in patients with autoimmune hepatitis and in the CYP2D6 mouse model. *J Autoimmun*. 2011;37(3):242–53.
28. Crispe IN. Liver Antigen-Presenting Cells. *J Hepatol*. 2011;54(2):357–65.

29. Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PloS One*. 2011;6(4):e18909.
30. Thomas-Dupont P, Remes-Troche JM, Izaguirre-Hernández IY, Sánchez-Vargas LA, Maldonado-Rentería M de J, Hernández-Flores KG, et al. Elevated circulating levels of IL-21 and IL-22 define a cytokine signature profile in type 2 autoimmune hepatitis patients. *Ann Hepatol*. 2016;15(4):550–8.
31. Kimura N, Yamagiwa S, Sugano T, Setsu T, Tominaga K, Kamimura H, et al. Possible involvement of chemokine C-C receptor 7- programmed cell death-1+ follicular helper T-cell subset in the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(1):298–306.
32. Floreani A, Restrepo-Jiménez P, Secchi MF, De Martin S, Leung PSC, Krawitt E, et al. Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun*. 2018;95:133–43.
33. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2011;10(12):744–55.
34. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006;176(7):4484–91.
35. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, et al. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol*. 2012;57(1):125–32.
36. Takahashi H, Zeniya M. Acute presentation of autoimmune hepatitis: Does it exist? A published work review. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 2011;41(6):498–504.
37. Yeoman AD, Westbrook RH, Zen Y, Bernal W, Al-Chalabi T, Wendon JA, et al. Prognosis of acute severe autoimmune hepatitis (AS-AIH): the role of corticosteroids in modifying outcome. *J Hepatol*. 2014;61(4):876–82.

38. Zachou K, Arvaniti P, Azariadis K, Lygoura V, Gatselis NK, Lyberopoulou A, et al. Prompt initiation of high-dose i.v. corticosteroids seems to prevent progression to liver failure in patients with original acute severe autoimmune hepatitis. *Hepatology Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2019;49(1):96–104.
39. Abe M, Mashiba T, Zeniya M, Yamamoto K, Onji M, Tsubouchi H, et al. Present status of autoimmune hepatitis in Japan: a nationwide survey. *J Gastroenterol.* 2011;46(9):1136–41.
40. Stravitz RT, Lefkowitz JH, Fontana RJ, Gershwin ME, Leung PSC, Sterling RK, et al. Autoimmune acute liver failure: proposed clinical and histological criteria. *Hepatology Baltim Md.* 2011;53(2):517–26.
41. Dalekos G. Hellenic Association for the Study of the Liver Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *Ann Gastroenterol.* 2019;32(1):1–23
42. Werner M, Prytz H, Ohlsson B, Almer S, Björnsson E, Bergquist A, et al. Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(10):1232–40.
43. Muratori P, Granito A, Quarneti C, Ferri S, Menichella R, Cassani F, et al. Autoimmune hepatitis in Italy: the Bologna experience. *J Hepatol.* 2009;50(6):1210–8.
44. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2015;63(4):971–1004.
45. Feld JJ, Dinh H, Arenovich T, Marcus VA, Wanless IR, Heathcote EJ. Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology Baltim Md.* 2005;42(1):53–62.
46. Czaja AJ. Drug-induced autoimmune-like hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2011;56(4):958–76.
47. Björnsson E, Talwalkar J, Treeprasertsuk S, Kamath PS, Takahashi N, Sanderson S, et al. Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. *Hepatology Baltim Md.* 2010;51(6):2040–8.

48. Suzuki A, Brunt EM, Kleiner DE, Miquel R, Smyrk TC, Andrade RJ, et al. The use of liver biopsy evaluation in discrimination of idiopathic autoimmune hepatitis versus drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2011;54(3):931–9.
49. Westbrook RH, Yeoman AD, Kriese S, Heneghan MA. Outcomes of pregnancy in women with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun*. 2012;38(2–3):J239-244.
50. Muratori P, Loffreda S, Muratori L, Ferrari R, Afandi K, Cassani F, et al. Spontaneous remission of autoimmune hepatitis during pregnancy. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2002;34(8):608–9.
51. Vento S, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmun Rev*. 2004;3(1):61–9.
52. Cabibi D. Autoimmune hepatitis following Epstein-Barr virus infection. *BMJ Case Rep*. 2008;2008:bcr0620080071.
53. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kayser A, Barut A, Loges S, et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology*. 2001;121(3):668–77.
54. Gatselis NK, Zachou K, Norman GL, Tzellas G, Speletas M, Gabeta S, et al. IgA antibodies against deamidated gliadin peptides in patients with chronic liver diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2012;413(19–20):1683–8.
55. Ngu JH, Gearry RB, Frampton CM, Stedman CAM. Mortality and the risk of malignancy in autoimmune liver diseases: a population-based study in Canterbury, New Zealand. *Hepatology*. 2012;55(2):522–9.
56. Valean S, Acalovschi M, Dumitrascu DL, Ciobanu L, Nagy G, Chira R. Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis – a systematic review of the literature published between 1989–2016. *Med Pharm Rep*. 2019;92(2):99–105.
57. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang M-H, Fujisawa T, et al. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;49(2):158–64.

58. Manns MP, Lohse AW, Vergani D. Autoimmune hepatitis--Update 2015. *J Hepatol.* 2015;62:S100-111.
59. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis.* 2004;1:2.
60. Gleeson D, Heneghan MA, British Society of Gastroenterology. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut.* 2011;60(12):1611–29.
61. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, Descovich C, Cassani F, Ballardini G, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology Baltim Md.* 1997 May;25(5):1105–7.
62. Muratori P, Muratori L, Agostinelli D, Pappas G, Veronesi L, Granito A, et al. Smooth muscle antibodies and type 1 autoimmune hepatitis. *Autoimmunity.* 2002;35(8):497–500.
63. Zachou K, Gampeta S, Gatselis NK, Oikonomou K, Goulis J, Manoussakis MN, et al. Anti-SLA/LP alone or in combination with anti-Ro52 and fine specificity of anti-Ro52 antibodies in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2015;35(2):660–72.
64. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2012;32(1):85–92.
65. Ma Y, Okamoto M, Thomas MG, Bogdanos DP, Lopes AR, Portmann B, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology Baltim Md.* 2002;35(3):658–64.
66. Zachou K, Weiler-Normann C, Muratori L, Muratori P, Lohse AW, Dalekos GN. Permanent immunosuppression in SLA/LP-positive autoimmune hepatitis is required although overall response and survival are similar. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2020;40(2):368–76.

67. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cançado ELR, Mackay IR, Manns MP, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol.* 2004;41(4):677–83.
68. Bogdanos DP, Dalekos GN. Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. *Curr Med Chem.* 2008;15(22):2285–92.
69. Fabien N, Desbos A, Bienvenu J, Magdalou J. Autoantibodies directed against the UDP-glucuronosyltransferases in human autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev.* 2004;3(1):1–9.
70. Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Martini E, Soulier E, Laperche S, et al. Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatol Baltim Md.* 1992;16(4):892–8.
71. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, Cataleta M, Ballardini G, Cassani F, et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut.* 1995;36(5):749–54.
72. Makaritsis KP, Gatselis NK, Ioannou M, Petinaki E, Dalekos GN. Polyclonal hypergammaglobulinemia and high smooth-muscle autoantibody titers with specificity against filamentous actin: consider visceral leishmaniasis, not just autoimmune hepatitis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2009;13(4):e157-160.
73. Renaudineau Y, Dalekos GN, Guéguen P, Zachou K, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies cross-react with anti-ssDNA antibodies in active autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;34(3):321–5.
74. Liaskos C, Rigopoulou E, Zachou K, Georgiadou S, Gatselis N, Papamihali R, et al. Prevalence and clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2005;24(3):251–60.

75. Chen M, Shirai M, Czaja AJ, Kurokohchi K, Arichi T, Arima K, et al. Characterization of anti-histone antibodies in patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13(5):483–9.
76. Hausdorf G, Roggenbuck D, Feist E, Büttner T, Jungblut PR, Conrad K, et al. Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) measured by a novel ELISA--revival of a disease-activity marker in autoimmune hepatitis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2009;408(1–2):19–24.
77. Oikonomou KG, Zachou K, Dalekos GN. Alpha-actinin: a multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2011;10(7):389–96.
78. Zachou K, Oikonomou K, Renaudineau Y, Chauveau A, Gatselis N, Youinou P, et al. Anti- α actinin antibodies as new predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type 1: Alpha-actinin and autoimmune hepatitis type 1 treatment response. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(1):116–25.
79. Rigopoulou EI, Dalekos GN. Molecular diagnostics of primary biliary cirrhosis. *Expert Opin Med Diagn*. 2008;2(6):621–34.
80. Nezu S, Tanaka A, Yasui H, Imamura M, Nakajima H, Ishida H, et al. Presence of antimitochondrial autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Sep;21(9):1448–54.
81. Liaskos C, Bogdanos D-P, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Development of antimitochondrial antibodies in patients with autoimmune hepatitis: art of facts or an artifact? *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(3):454–5.
82. Montano-Loza AJ, Carpenter HA, Czaja AJ. Frequency, behavior, and prognostic implications of antimitochondrial antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(9):1047–53.
83. Renaudineau Y, Deocharan B, Jousse S, Renaudineau E, Putterman C, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies: a new marker of lupus nephritis. *Autoimmun Rev*. 2007;6(7):464–8.

84. Guéguen P, Dalekos G, Nousbaum J-B, Zachou K, Putterman C, Youinou P, et al. Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. *J Clin Immunol*. 2006;26(6):495–505.
85. Yoshioka M, Mizuno M, Morisue Y, Shimada M, Hirai M, Nasu J, et al. Anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies, detected by a capture-immunoassay, are associated with autoimmune liver diseases. *Acta Med Okayama*. 2002;56(2):99–105.
86. Vierling JM. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14(1):25–36.
87. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48(1):169–76.
88. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999;31(5):929–38.
89. Czaja AJ, Muratori P, Muratori L, Carpenter HA, Bianchi FB. Diagnostic and therapeutic implications of bile duct injury in autoimmune hepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2004;24(4):322–9.
90. Te HS, Koukoulis G, Ganger DR. Autoimmune hepatitis: a histological variant associated with prominent centrilobular necrosis. *Gut*. 1997;41(2):269–71.
91. Rust C, Beuers U. Overlap syndromes among autoimmune liver diseases. *World J Gastroenterol WJG*. 2008;14(21):3368–73.
92. Gregorio G. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: A 16-year prospective study. *Hepatology*. 2001;33(3):544–53.
93. Czaja AJ, Manns MP. Advances in the diagnosis, pathogenesis, and management of autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 2010;139(1):58-72.e4.
94. Lohse AW, Wiegand C. Diagnostic criteria for autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(6):665–71.

95. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology*. 1993;18(4):998–1005.
96. Lohse AW. Recognizing autoimmune hepatitis: Scores help, but no more. *J Hepatol*. 2011;54(2):193–4.
97. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR, et al. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology*. 1972;63(5):820–33.
98. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet Lond Engl*. 1973;1(7806):735–7.
99. Kirk AP, Jain S, Pocock S, Thomas HC, Sherlock S. Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis. *Gut*. 1980;21(1):78–83.
100. Lohse AW, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2011;55(1):171–82.
101. Medina J, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(1):1–16.
102. Wang Q, Qiu D, Ma X. Early normalisation of aminotransferase predicts complete biochemical remission in autoimmune hepatitis patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(1):107–9.
103. Mack CL, Adams D, Assis DN, Kerkar N, Manns MP, Mayo MJ, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis in adults and children: 2019 practice guidance and guidelines from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2019; 31065
104. Lowe D, John S. Autoimmune hepatitis: Appraisal of current treatment guidelines. *World J Hepatol*. 2018;10(12):911–23.

105. Yeoman AD, Longhi MS, Heneghan MA. Review article: the modern management of autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31(8):771–87.
106. Czaja AJ. Safety issues in the management of autoimmune hepatitis. *Expert Opin Drug Saf.* 2008;7(3):319–33.
107. Lamers MMH, van Oijen MGH, Pronk M, Drenth JPH. Treatment options for autoimmune hepatitis: a systematic review of randomized controlled trials. *J Hepatol.* 2010;53(1):191–8.
108. Papamichalis PA, Zachou K, Koukoulis GK, Velsoni A, Karacosta EG, Kypri L, et al. The revised international autoimmune hepatitis score in chronic liver diseases including autoimmune hepatitis/overlap syndromes and autoimmune hepatitis with concurrent other liver disorders. *J Autoimmune Dis.* 2007;4:3.
109. Muratori L, Muratori P, Granito A, Pappas G, Cassani F, Lenzi M. Current topics in autoimmune hepatitis. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2010;42(11):757–64.
110. Czaja AJ. Emerging opportunities for site-specific molecular and cellular interventions in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2010;55(10):2712–26.
111. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus.* 2005;14:s2–8.
112. Iaccarino L, Rampudda M, Canova M, Della Libera S, Sarzi-Puttinic P, Doria A. Mycophenolate mofetil: what is its place in the treatment of autoimmune rheumatic diseases? *Autoimmun Rev.* 2007;6(3):190–5.
113. Zachou K, Gatselis N, Papadamou G, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Mycophenolate for the treatment of autoimmune hepatitis: prospective assessment of its efficacy and safety for induction and maintenance of remission in a large cohort of treatment-naïve patients. *J Hepatol.* 2011;55(3):636–46.
114. Hlivko JT, Shiffman ML, Stravitz RT, Luketic VA, Sanyal AJ, Fuchs M, et al. A single center review of the use of mycophenolate mofetil in the treatment of

- autoimmune hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2008;6(9):1036–40.
- 115.Zachou K, Gatselis NK, Arvaniti P, Gabeta S, Rigopoulou EI, Koukoulis GK, et al. A real-world study focused on the long-term efficacy of mycophenolate mofetil as first-line treatment of autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(10):1035–47.
- 116.Yu Z-J, Zhang L-L, Huang T-T, Zhu J-S, He Z-B. Comparison of mycophenolate mofetil with standard treatment for autoimmune hepatitis: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2019;31(7):873–7.
- 117.Zandieh I, Krygier D, Wong V, Howard J, Worobetz L, Minuk G, et al. The use of budesonide in the treatment of autoimmune hepatitis in Canada. *Can J Gastroenterol.* 2008;22(4):388–92.
- 118.Manns MP, Woynarowski M, Kreisel W, Lurie Y, Rust C, Zuckerman E, et al. Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 2010;139(4):1198–206.
- 119.Lohse AW, Gil H. Reactivation of autoimmune hepatitis during budesonide monotherapy, and response to standard treatment. *J Hepatol.* 2011;54(4):837–9.
- 120.Aggarwal N, Chopra S, Suri V, Sikka P, Dhiman RK, Chawla Y. Pregnancy outcome in women with autoimmune hepatitis. *Arch Gynecol Obstet.* 2011 Jul;284(1):19–23.
- 121.Terrabuio DRB, Abrantes-Lemos CP, Carrilho FJ, Cançado ELR. Follow-up of pregnant women with autoimmune hepatitis: the disease behavior along with maternal and fetal outcomes. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(4):350–6.
- 122.Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, Lohse AW, Manns MP, Schrupf E, et al. Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol.* 2011;54(2):374–85.

123. Al-Chalabi T, Portmann BC, Bernal W, McFarlane IG, Heneghan MA. Autoimmune hepatitis overlap syndromes: an evaluation of treatment response, long-term outcome and survival. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28(2):209–20.
124. Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet Lond Engl.* 2011;377(9777):1600–9.
125. Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol.* 2013;8:303–30.
126. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol.* 2015;62:S25-37.
127. Webb GJ, Hirschfield GM. Primary biliary cholangitis in 2016: High-definition PBC: biology, models and therapeutic advances. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(2):76–8.
128. Boonstra K, Kunst AE, Stadhouders PH, Tuynman HA, Poen AC, van Nieuwkerk KMJ, et al. Rising incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis: a large population-based study. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2014;34(6):e31-38.
129. Griffiths L, Dyson JK, Jones DEJ. The new epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2014;34(3):318–28.
130. Lleo A, Jepsen P, Morenghi E, Carbone M, Moroni L, Battezzati PM, et al. Evolving Trends in Female to Male Incidence and Male Mortality of Primary Biliary Cholangitis. *Sci Rep.* 2016;6.
131. Gatselis NK, Zachou K, Lygoura V, Azariadis K, Arvaniti P, Spyrou E, et al. Geoepidemiology, clinical manifestations and outcome of primary biliary cholangitis in Greece. *Eur J Intern Med.* 2017;42:81–8.
132. Tanaka A, Leung PSC, Gershwin ME. Evolution of our understanding of PBC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2018;34–35:3–9.

133. Invernizzi P. HLA IN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS: AN OLD STORY NOW REVIVING. *Hepatology* Baltim Md. 2011;54(2):714–23.
134. Gulamhusein AF, Juran BD, Lazaridis KN. GWAS in Primary Biliary Cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2015;35(4):392.
135. Zachou K and Lygoura V. Primary biliary cholangitis. *Clinical Hepatology* (pp247-257). University Studio Press (Eds).
136. Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Lu Y, et al. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2544–55.
137. Selmi C, Mackay IR, Gershwin ME. The autoimmunity of primary biliary cirrhosis and the clonal selection theory. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(1):70–80.
138. Nguyen DL, Juran BD, Lazaridis KN. Primary Biliary Cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24(5):647–54.
139. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Mackay IR, et al. Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* Baltim Md. 2009;49(3):871–9.
140. Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2008;31(2):110–5.
141. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol.* 2017;67(1):145–72.
142. Hydes TJ, Blunt MD, Naftel J, Vallejo AF, Seumois G, Wang A, et al. Constitutive Activation of Natural Killer Cells in Primary Biliary Cholangitis. *Front Immunol.* 2019;10.
143. Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJM, Kremer AE, Jansen PLM, Elferink RPJO. The biliary HCO₃⁻ umbrella: a unifying hypothesis on

- pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):1489–96.
144. Hisamoto S, Shimoda S, Harada K, Iwasaka S, Onohara S, Chong Y, et al. Hydrophobic bile acids suppress expression of AE2 in biliary epithelial cells and induce bile duct inflammation in primary biliary cholangitis. *J Autoimmun.* 2016;75:150–60.
145. Ali AH, Sinakos E, Silveira MG, Jorgensen RA, Angulo P, Lindor KD. Varices in early histological stage primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(7):e66-71.
146. Parés A, Rodés J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003;7(4):779–94.
147. Mells GF, Pells G, Newton JL, Bathgate AJ, Burroughs AK, Heneghan MA, et al. Impact of primary biliary cirrhosis on perceived quality of life: the UK-PBC national study. *Hepatology*. 2013;58(1):273–83.
148. Dyson JK, Wilkinson N, Jopson L, Mells G, Bathgate A, Heneghan MA, et al. The inter-relationship of symptom severity and quality of life in 2055 patients with primary biliary cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;44(10):1039–50.
149. Kremer AE, Beuers U, Oude-Elferink RPJ, Pusch T. Pathogenesis and treatment of pruritus in cholestasis. *Drugs.* 2008;68(15):2163–82.
150. Jin XY, Khan TM. Quality of life among patients suffering from cholestatic liver disease-induced pruritus: A systematic review. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* 2016;115(9):689–702.
151. EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *J Hepatology.* 2016;64(2):433–85.
152. Tajiri K, Shimizu Y. Recent advances in the management of pruritus in chronic liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2017;23(19):3418–26.

153. Khanna A, Leighton J, Lee Wong L, Jones DE. Symptoms of PBC - Pathophysiology and management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2018;34-35:41-7.
154. Kremer AE, Namer B, Bolier R, Fischer MJ, Oude Elferink RP, Beuers U. Pathogenesis and Management of Pruritus in PBC and PSC. *Dig Dis Basel Switz*. 2015;33:164-75.
155. Gatselis NK, Zachou K, Dalekos GN. Early primary biliary cirrhosis: a new association with erythema nodosum of unknown origin. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010.
156. Gatselis NK, Stefos A, Gioti C, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Primary biliary cirrhosis and Henoch-Schonlein purpura: report of two cases and review of the literature. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2007;27(2):280-3.
157. Selmi C, Gershwin ME. Chronic Autoimmune Epithelitis in Sjögren's Syndrome and Primary Biliary Cholangitis: A Comprehensive Review. *Rheumatol Ther*. 2017;4(2):263-79.
158. Arvaniti P, Zachou K, Lyberopoulou A, Gatselis NK, Brooks WH, Dalekos GN, et al. Epigenetic Modifications in Generalized Autoimmune Epithelitis: Sjögren's Syndrome and Primary Biliary Cholangitis. *Epigenomes*. 2019;3(3):15.
159. Taal BG, Schalm SW, de Bruyn AM, de Rooy FW, Klein F. Serum IgM in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1980;108(3):457-63.
160. Longo M, Crosignani A, Battezzati PM, Squarcia Giussani C, Invernizzi P, Zuin M, et al. Hyperlipidaemic state and cardiovascular risk in primary biliary cirrhosis. *Gut*. 2002;51(2):265-9.
161. Mackay IR. Primary biliary cirrhosis showing a high titer of autoantibody; report of a case. *N Engl J Med*. 1958;258(4):185-8.
162. Berg PA, Doniach D, Roitt IM. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes. *J Exp Med*. 1967;126(2):277-90.

163. Ishibashi H, Shimoda S, Gershwin ME. The immune response to mitochondrial autoantigens. *Semin Liver Dis.* 2005;25(3):337–46.
164. Bogdanos D-P, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies. *Clin Liver Dis.* 2003;7(4):759–77.
165. Invernizzi P, Lleo A, Podda M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis.* 2007;27(2):161–72.
166. Gatselis NK, Dalekos GN. Molecular diagnostic testing for primary biliary cholangitis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(9):1001–10.
167. Zografos TA, Gatselis N, Zachou K, Liaskos C, Gabeta S, Koukoulis GK, et al. Primary biliary cirrhosis-specific autoantibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients. *World J Gastroenterol.* 2012;18(34):4721–8.
168. Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesierska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2005;25(3):298–310.
169. de Liso F, Matinato C, Ronchi M, Maiavacca R. The diagnostic accuracy of biomarkers for diagnosis of primary biliary cholangitis (PBC) in anti-mitochondrial antibody (AMA)-negative PBC patients: a review of literature. *Clin Chem Lab Med.* 2017;56(1):25–31.
170. Wesierska-Gadek J, Klima A, Komina O, Ranftler C, Invernizzi P, Penner E. Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1109:519–30.
171. Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T, et al. Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study. *J Autoimmun.* 2003;20(3):247–54.
172. Granito A, Muratori P, Muratori L, Pappas G, Cassani F, Worthington J, et al. Antibodies to SS-A/Ro-52kD and centromere in autoimmune liver disease: a clue

- to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(6):831–8.
173. Rigopoulou EI, Davies ET, Bogdanos D-P, Liaskos C, Mytilinaiou M, Koukoulis GK, et al. Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2007;27(9):1226–31.
174. Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, Papamichalis PA, Zografos T, Garagounis A, et al. Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol.* 2007;27(4):378–87.
175. Liu H, Norman GL, Shums Z, Worman HJ, Krawitt EL, Bizzaro N, et al. PBC screen: an IgG/IgA dual isotype ELISA detecting multiple mitochondrial and nuclear autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2010;35(4):436–42.
176. Scheuer PJ. Ludwig Symposium on biliary disorders--part II. Pathologic features and evolution of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc.* 1998 Feb;73(2):179–83.
177. Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ, et al. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology Baltim Md.* 2009;50(1):291–308.
178. Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, Chrétien Y, Andréani T, Johanet C, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology Baltim Md.* 2008;48(3):871–7.
179. Carbone M, Mells GF, Pells G, Dawwas MF, Newton JL, Heneghan MA, et al. Sex and age are determinants of the clinical phenotype of primary biliary cirrhosis and response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology.* 2013;144(3):560-569.
180. Murillo Perez CF, Goet JC, Lammers WJ, Gulamhusein A, van Buuren HR, Ponsioen CY, et al. Milder disease stage in patients with primary biliary

- cholangitis over a 44-year period: A changing natural history. *Hepatology* Baltim Md. 2018;67(5):1920–30.
181. Kubota J, Ikeda F, Terada R, Kobashi H, Fujioka S, Okamoto R, et al. Mortality rate of patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis diagnosed at age 55 years or older is similar to that of the general population. *J Gastroenterol.* 2009;44(9):1000–6.
182. Cheung AC, Lammers WJ, Murillo Perez CF, van Buuren HR, Gulamhusein A, Trivedi PJ, et al. Effects of Age and Sex of Response to Ursodeoxycholic Acid and Transplant-free Survival in Patients With Primary Biliary Cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2019;17(10):2076-2084.e2.
183. Vleggaar FP, van Buuren HR, Zondervan PE, ten Kate FJ, Hop WC, Dutch Multicentre PBC study group. Jaundice in non-cirrhotic primary biliary cirrhosis: the premature ductopenic variant. *Gut.* 2001;49(2):276–81.
184. Shapiro JM, Smith H, Schaffner F. Serum bilirubin: a prognostic factor in primary biliary cirrhosis. *Gut.* 1979;20(2):137–40.
185. Invernizzi P, Crosignani A, Battezzati PM, Covini G, De Valle G, Larghi A, et al. Comparison of the clinical features and clinical course of antimitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* Baltim Md. 1997;25(5):1090–5.
186. Gatselis NK, Zachou K, Norman GL, Gabeta S, Papamichalis P, Koukoulis GK, Dalekos GN. Clinical significance of the fluctuation of primary biliary cirrhosis-related autoantibodies during the course of the disease. *Autoimmunity.* 2013;46(7):471-9.
187. Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev.* 2003;2(4):211–7.
188. Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, et al. Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to

- treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 2015;45(8):846–55.
189. Corpechot C, Carrat F, Poujol-Robert A, Gaouar F, Wendum D, Chazouillères O, et al. Noninvasive elastography-based assessment of liver fibrosis progression and prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Baltim Md*. 2012;56(1):198–208.
190. Corpechot C, Carrat F, Poupon R, Poupon R-E. Primary biliary cirrhosis: incidence and predictive factors of cirrhosis development in ursodiol-treated patients. *Gastroenterology*. 2002;122(3):652–8.
191. Kumagi T, Guindi M, Fischer SE, Arenovich T, Abdalian R, Coltescu C, et al. Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(10):2186–94.
192. Corpechot C, Chazouillères O, Poupon R. Early primary biliary cirrhosis: biochemical response to treatment and prediction of long-term outcome. *J Hepatol*. 2011;55(6):1361–7.
193. Carbone M, Sharp SJ, Flack S, Paximadas D, Spiess K, Adgey C, et al. The UK-PBC risk scores: Derivation and validation of a scoring system for long-term prediction of end-stage liver disease in primary biliary cholangitis. *Hepatol Baltim Md*. 2016;63(3):930–50.
194. Efe C, Taşçılar K, Henriksson I, Lytvyak E, Alalkim F, Trivedi H, et al. Validation of Risk Scoring Systems in Ursodeoxycholic Acid-Treated Patients With Primary Biliary Cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(7):1101–8.
195. Lammers WJ, Hirschfield GM, Corpechot C, Nevens F, Lindor KD, Janssen HLA, et al. Development and Validation of a Scoring System to Predict Outcomes of Patients With Primary Biliary Cirrhosis Receiving Ursodeoxycholic Acid Therapy. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1804-1812.e4.

196. Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology* Baltim Md. 1989;10(1):1–7.
197. Parés A, Caballería L, Rodés J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology*. 2006;130(3):715–20.
198. Angulo P, Lindor KD, Therneau TM, Jorgensen RA, Malinchoc M, Kamath PS, et al. Utilization of the Mayo risk score in patients with primary biliary cirrhosis receiving ursodeoxycholic acid. *Liver*. 1999;19(2):115–21.
199. Azemoto N, Abe M, Murata Y, Hiasa Y, Hamada M, Matsuura B, et al. Early biochemical response to ursodeoxycholic acid predicts symptom development in patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol*. 2009;44(6):630–4.
200. Kuiper EMM, Hansen BE, de Vries RA, den Ouden-Muller JW, van Ditzhuijsen TJM, Haagsma EB, et al. Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2009;136(4):1281–7.
201. Dilger K, Hohenester S, Winkler-Budenhofer U, Bastiaansen BAJ, Schaap FG, Rust C, et al. Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid profiles and intestinal detoxification machinery in primary biliary cirrhosis and health. *J Hepatol*. 2012;57(1):133–40.
202. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997;113(3):884–90.
203. Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, Levy C, Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;hep.30145.

204. Corpechot C, Carrat F, Bonnard AM, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2000;32(6):1196–9.
205. Harms MH, van Buuren HR, Corpechot C, Thorburn D, Janssen HLA, Lindor KD, et al. Ursodeoxycholic acid therapy and liver transplant-free survival in patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol*. 2019;71(2):357–65.
206. Nevens F, Andreone P, Mazzella G, Strasser SI, Bowlus C, Invernizzi P, et al. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *N Engl J Med*. 2016;375(7):631–43.
207. Schaap FG, Trauner M, Jansen PLM. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(1):55–67.
208. Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, et al. Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2015;148(4):751-761.e8.
209. Hempfling W, Grunhage F, Dilger K, Reichel C, Beuers U, Sauerbruch T. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in early- and late-stage primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2003;38(1):196–202.
210. Corpechot C, Chazouillères O, Rousseau A, Le Gruyer A, Habersetzer F, Mathurin P, et al. A Placebo-Controlled Trial of Bezafibrate in Primary Biliary Cholangitis. *N Engl J Med*. 2018;378(23):2171–81.
211. Rust C, Sauter GH, Oswald M, Büttner J, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, et al. Effect of cholestyramine on bile acid pattern and synthesis during administration of ursodeoxycholic acid in man. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(2):135–9.
212. Ghent CN, Carruthers SG. Treatment of pruritus in primary biliary cirrhosis with rifampin. Results of a double-blind, crossover, randomized trial. *Gastroenterology*. 1988;94(2):488–93.

213. Terg R, Coronel E, Sordá J, Muñoz AE, Findor J. Efficacy and safety of oral naltrexone treatment for pruritus of cholestasis, a crossover, double blind, placebo-controlled study. *J Hepatol.* 2002;37(6):717–22.
214. Silveira MG, Talwalkar JA, Lindor KD, Wiesner RH. Recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010;10(4):720–6.
215. Brooks WH, Le Dantec C, Pers J-O, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2010;34(3):J207-219.
216. Grolleau-Julius A, Ray D, Yung RL. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;39(1):42–50.
217. Brooks WH. X chromosome inactivation and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;39(1):20–9.
218. Lu Q, Renaudineau Y, Cha S, Ilei G, Brooks WH, Selmi C, et al. Epigenetics in autoimmune disorders: highlights of the 10th Sjögren's syndrome symposium. *Autoimmun Rev.* 2010;9(9):627–30.
219. Renaudineau Y, Youinou P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med.* 2011;60(1):10–6.
220. Le Dantec C, Vallet S, Brooks WH, Renaudineau Y. Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases. *Viruses.* 2015;7(3):1238–57.
221. Rasmussen KD and Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 2016; 30(7): 733–750.
222. Konsta OD, Thabet Y, Le Dantec C, Brooks WH, Tzioufas AG, Pers J-O, et al. The contribution of epigenetics in Sjögren's Syndrome. *Front Genet.* 2014;5.
223. Bordron A, Charras A, Le Dantec C, Renaudineau Y. Épigenome et syndrome de Gougerot-Sjögren. *Rev Médecine Interne.* 2018;39(5):346–51.

- 224.Hedrich CM, Crispin JC, Tsokos GC. Epigenetic regulation of cytokine expression in systemic lupus erythematosus with special focus on T cells. *Autoimmunity*. 2014;47(4):234–41.
- 225.Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med*. 2011;17(12):714–24.
- 226.Zhao M, Wang J, Liao W, Li D, Li M, Wu H, et al. Increased 5-hydroxymethylcytosine in CD4(+) T cells in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2016;69:64–73.
- 227.Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlöf JC, Nordlund J, Signér L, Norheim KB, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjögren’s syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(11):2029–36.
- 228.Pačes J, Pavlíček A, Pačes V. HERVd: database of human endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):205–6.
- 229.Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14572–9.
- 230.Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2009;60(12):3613–22.
- 231.Brooks W. A commentary on types of DNA methylation status of the interspersed repetitive sequences for LINE-1, Alu, HERV-E and HERV-K in the neutrophils from systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. *J Hum Genet*. 2014;59(4):174–5.
- 232.Mavragani PC, Sagalovskiy I, Nezos A, Kapsogeorgou KE, Lu P, et al. Long interspersed nuclear element-1 retroelements are expressed in patients with systemic autoimmune disease and induce type I interferon. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(11): 2686–2696.

- 233.Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005;174(10):6212–9.
- 234.Yin H, Zhao M, Wu X, Gao F, Luo Y, Ma L, et al. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjögren’s syndrome. *J Dermatol Sci*. 2010;59(3):198–203.
- 235.Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(1):259–73.
- 236.Charras A, Arvaniti P, Le Dantec C, Arleevskaya MI, Zachou K, Dalekos GN, et al. JAK Inhibitors Suppress Innate Epigenetic Reprogramming: a Promise for Patients with Sjögren’s Syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(2):182-193
- 237.Dieker J, Muller S. Epigenetic histone code and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010;39(1):78–84.
- 238.Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
- 239.Hu N, Qiu X, Luo Y, Yuan J, Li Y, Lei W, et al. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. *J Rheumatol*. 2008;35(5):804–10.
- 240.Horiuchi M, Morinobu A, Chin T, Sakai Y, Kurosaka M, Kumagai S. Expression and function of histone deacetylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol*. 2009;36(8):1580–9.
- 241.Hoefig KP, Heissmeyer V. MicroRNAs grow up in the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):281–7.
- 242.Bi Y, Liu G, Yang R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol*. 2009;218(3):467–72.
- 243.Yang X, Wu Y, Zhang B, Ni B. Noncoding RNAs in multiple sclerosis. *Clin Epigenetics*. 2018;10.

- 244.Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's syndrome: candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression. *J Autoimmun.* 2011;37(2):129–35.
- 245.Banales JM, Sáez E, Uriz M, Sarvide S, Urribarri AD, Splinter P, et al. Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Baltim Md.* 2012;56(2):687–97.
- 246.Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2110–21.
- 247.Garaud S, Le Dantec C, Jousse-Joulin S, Hanrotel-Saliou C, Saraux A, Mageed RA, et al. IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2009;182(9):5623–32.
- 248.Bengtsson AA, Rönnblom L. Role of interferons in SLE. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017;31(3):415–28.
- 249.Absher DM, Li X, Waite LL, Gibson A, Roberts K, Edberg J, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4⁺ T-cell populations. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003678.
- 250.Fali T, Le Dantec C, Thabet Y, Jousse S, Hanrotel C, Youinou P, et al. DNA methylation modulates HRES1/p28 expression in B cells from patients with Lupus. *Autoimmunity.* 2014;47(4):265–71.
- 251.Januchowski R, Wudarski M, Chwalińska-Sadowska H, Jagodzinski PP. Prevalence of ZAP-70, LAT, SLP-76, and DNA methyltransferase 1 expression in CD4⁺ T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008;27(1):21–7.
- 252.Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;179(9):6352–8.

253. Zhao S, Wang Y, Liang Y, Zhao M, Long H, Ding S, et al. MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4⁺ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1376–86.
254. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:273–85.
255. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Sisó-Almirall A, Bosch X. Primary Sjögren syndrome. *BMJ.* 2012;344:e3821.
256. Arvaniti P, Le Dantec C, Charras A, Arleevskaya MA, Hedrich CM, Zachou K, et al. Linking genetic variation with epigenetic profiles in Sjögren's syndrome. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2019;210:108314.
257. Cole MB, Quach H, Quach D, Baker A, Taylor KE, Barcellos LF, et al. Epigenetic Signatures of Salivary Gland Inflammation in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2016;68(12):2936–44.
258. Charras A, Konsta OD, Le Dantec C, Bagacean C, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(3):625–8.
259. Altorok N, Coit P, Hughes T, Koelsch KA, Stone DU, Rasmussen A, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4⁺ T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2014;66(3):731–9.
260. Miceli-Richard C, Wang-Renault S-F, Boudaoud S, Busato F, Lallemand C, Bethune K, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(5):933–40.
261. Thabet Y, Le Dantec C, Ghedira I, Devauchelle V, Cornec D, Pers J-O, et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun.* 2013;41:175–81.

262. Lagos C, Carvajal P, Castro I, Jara D, González S, Aguilera S, et al. Association of high 5-hydroxymethylcytosine levels with Ten Eleven Translocation 2 overexpression and inflammation in Sjögren's syndrome patients. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2018;196:85–96.
263. Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, Cornec D, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun.* 2016;68:30–8.
264. Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;32(3–4):189–94.
265. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS One.* 2012;7(3):e30679.
266. Selmi C, Cavaciocchi F, Lleo A, Cheroni C, De Francesco R, Lombardi SA, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation, copy number variation, and gene expression in monozygotic twins discordant for primary biliary cirrhosis. *Front Immunol.* 2014;5:128.
267. Lleo A, Zhang W, Zhao M, Tan Y, Bernuzzi F, Zhu B, et al. DNA methylation profiling of the X chromosome reveals an aberrant demethylation on CXCR3 promoter in primary biliary cirrhosis. *Clin Epigenetics.* 2015;7(1):61.
268. Chuang Y-H, Lian Z-X, Cheng C-M, Lan RY, Yang G-X, Moritoki Y, et al. Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and MIG in patients with primary biliary cirrhosis and their first degree relatives. *J Autoimmun.* 2005;25(2):126–32.
269. Lleo A, Liao J, Invernizzi P, Zhao M, Bernuzzi F, Ma L, et al. Immunoglobulin M levels inversely correlate with CD40 ligand promoter methylation in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology Baltim Md.* 2012;55(1):153–60.
270. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229(1):152–72.

271. Hu Z, Huang Y, Liu Y, Sun Y, Zhou Y, Gu M, et al. β -Arrestin 1 modulates functions of autoimmune T cells from primary biliary cirrhosis patients. *J Clin Immunol*. 2011;31(3):346–55.
272. Padgett KA, Lan RY, Leung PC, Lleo A, Dawson K, Pfeiff J, et al. Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression. *J Autoimmun*. 2009;32(3–4):246–53.
273. Qin B, Huang F, Liang Y, Yang Z, Zhong R. Analysis of altered microRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with primary biliary cirrhosis: microRNAs in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(3):543–50.
274. Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, et al. Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers. *PloS One*. 2013;8(6):e66086.
275. Sakamoto T, Morishita A, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, et al. Identification of microRNA profiles associated with refractory primary biliary cirrhosis. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):3350–6.
276. Tan Y, Pan T, Ye Y, Ge G, Chen L, Wen D, et al. Serum microRNAs as potential biomarkers of primary biliary cirrhosis. *PloS One*. 2014;9(10):e111424.
277. Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol*. 2017;67(6):1298–323.
278. Ponsioen CY, Vrouenraets SME, Prawirodirdjo W, Rajaram R, Rauws E a. J, Mulder CJJ, et al. Natural history of primary sclerosing cholangitis and prognostic value of cholangiography in a Dutch population. *Gut*. 2002;51(4):562–6.
279. Bernuzzi F, Marabita F, Lleo A, Carbone M, Mirolo M, Marzioni M, et al. Serum microRNAs as novel biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol*. 2016;185(1):61–71.

280. Cheung AC, LaRusso NF, Gores GJ, Lazaridis KN. Epigenetics in the Primary Biliary Cholangitis and Primary Sclerosing Cholangitis. *Semin Liver Dis.* 2017;37(2):159–74.
281. Migita K, Komori A, Kozuru H, Jiuchi Y, Nakamura M, Yasunami M, et al. Circulating microRNA Profiles in Patients with Type-1 Autoimmune Hepatitis. *PloS One.* 2015;10(11):e0136908.
282. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(2):1026–33.
283. Ando Y, Yang G-X, Kenny TP, Kawata K, Zhang W, Huang W, et al. Overexpression of microRNA-21 is associated with elevated pro-inflammatory cytokines in dominant-negative TGF- β receptor type II mouse. *J Autoimmun.* 2013;41:111–9.
284. Haider BA, Baras AS, McCall MN, Hertel JA, Cornish TC, Halushka MK. A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PloS One.* 2014;9(2):e89565.
285. Czaja AJ. Epigenetic changes and their implications in autoimmune hepatitis. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(4).
286. Balada E, Ordi-Ros J, Serrano-Acedo S, Martinez-Lostao L, Rosa-Leyva M, Vilardell-Tarrés M. Transcript levels of DNA methyltransferases DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology.* 2008;124(3):339–47.
287. Nawrocki MJ, Majewski D, Puszczewicz M, Jagodziński PP. Decreased mRNA expression levels of DNA methyltransferases type 1 and 3A in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2017;37(5):775–83.
288. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology Baltim Md.* 1981;1(5):431–5.

289. Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos D-P, et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut*. 2005;54(4):528–32.
290. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1978;379(2):103–12.
291. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Research*. 2016;5:1281.
292. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014;30(3):428–30.
293. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(6):882–3.
294. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostat Oxf Engl*. 2007;8(1):118–27.
295. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, et al. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):200–9.
296. Geleher P, Hartnett L, Egan LJ, Golden A, Raja Ali RA, Seoighe C. Gene-set analysis is severely biased when applied to genome-wide methylation data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013;29(15):1851–7.
297. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol*. 2010;11(2):R14.
298. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature [Internet]*. 2003;425(6960):805–11.

- 299.Haddad J, Shammaa D, Abbas F, Mahfouz RAR. First report on HLA-DPA1 gene allelic distribution in the general Lebanese population. *Meta Gene*. 2016;8:11–3.
- 300.HLA-DPB2 major histocompatibility complex, class II, DP beta 2 (pseudogene). Available from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-DPB2>
- 301.Wei T, Zhang L-N, Lv Y, Ma X-Y, Zhi L, Liu C, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(21):10307–17.
- 302.SGCE gene.Available from <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SGCE>
- 303.Somineni HK, Venkateswaran S, Kilaru V, Chopra P, Okou DT, Hyams JS, et al. Epigenome-wide association study identified shared methylomic contributions to susceptibility and progression in paediatric Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 2018;154(1):S101.
- 304.Neilsen PM, Cheney KM, Li C-W, Chen JD, Cawrse JE, Schulz RB, et al. Identification of ANKRD11 as a p53 coactivator. *J Cell Sci*. 2008;121(21):3541–52.
- 305.Hale AJ, Ter Steege E, den Hertog J. Recent advances in understanding the role of protein-tyrosine phosphatases in development and disease. *Dev Biol*. 2017 15;428(2):283–92.
- 306.Sun K, Tian W, Liu W, Yang Y, Zhu X. Disease mutation study identifies essential residues for phosphatidylserine flippase ATP11A. *bioRxiv*. 2020;2020.01.13.904045.
- 307.Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, et al. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res*. 2010;2010.
- 308.SMAD3 Gene - GeneCards | SMAD3 Protein | SMAD3 Antibody. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SMAD3>

- 309.SH3BP5 Gene - GeneCards | 3BP5 Protein | 3BP5 Antibody. Available from:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SH3BP5>
- 310.TRIM26 Gene - GeneCards | TRI26 Protein | TRI26 Antibody. Available from:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRIM26>
- 311.ASB9 Gene - GeneCards | ASB9 Protein | ASB9 Antibody. Available from:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ASB9>
- 312.BCAP31 Gene - GeneCards | BAP31 Protein | BAP31 Antibody. Available from:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCAP31>
- 313.BTK Gene - GeneCards | BTK Protein | BTK Antibody. Available from:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BTK>
- 314.IRAK1 Gene - GeneCards | IRAK1 Protein | IRAK1 Antibody. Available from:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRAK1>
- 315.Cantrell DA. GTPases and T cell activation. *Immunol Rev.* 2003 Apr;192:122–30.
- 316.Díaz-Muñoz M.D and Martin Turner M. Uncovering the Role of RNA-Binding Proteins in Gene Expression in the Immune System *Front Immunol.* 2018; 9: 1094.
- 317.Busch R. Low HLA-DM expression in RA. *Arthritis Res Ther.* 2001;3(1):66885.
- 318.Zhang J, Zhan W, Yang B, Tian A, Chen L, Liao Y, et al. Genetic Polymorphisms of rs3077 and rs9277535 in HLA-DP associated with Systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Sci Rep.* 2017;7.
- 319.Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1999;85(6):1234–40.
- 320.Riener M-O, Wild PJ, Soll C, Knuth A, Jin B, Jungbluth A, et al. Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2009;124(2):352–7.

321. Wang GS, Zhang M, Li XP, Zhang H, Chen W, Kan M, et al. Ultraviolet B exposure of peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus inhibits DNA methylation. *Lupus*. 2009;18(12):1037–44.
322. Page A, Paoli P, Moran Salvador E, White S, French J, Mann J. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape. *J Hepatol*. 2016;64(3):661–73.
323. Pirola CJ, Gianotti TF, Burgueño AL, Rey-Funes M, Loidl CF, Mallardi P, et al. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2013;62(9):1356–63.
324. Pirola CJ, Scian R, Gianotti TF, Dopazo H, Rohr C, Martino JS, et al. Epigenetic Modifications in the Biology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role of DNA Hydroxymethylation and TET Proteins. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(36):e1480.
325. Farh KK-H, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*. 2015;518(7539):337–43.
326. Barwick BG, Scharer CD, Martinez RJ, Price MJ, Wein AN, Haines RR, et al. B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA methylation. *Nat Commun*. 2018;9(1):1900.
327. Ogasawara H, Okada M, Kaneko H, Hishikawa T, Sekigawa I, Hashimoto H. Possible role of DNA hypomethylation in the induction of SLE: relationship to the transcription of human endogenous retroviruses. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21(6):733–8.
328. Yang Y, Tang Q, Zhao M, Liang G, Wu H, Li D, et al. The effect of mycophenolic acid on epigenetic modifications in lupus CD4+T cells. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2015;158(1):67–76.

- 329.Slight-Webb S, Guthridge JM, Chakravarty EF, Chen H, Lu R, Macwana S, et al. Mycophenolate mofetil reduces STAT3 phosphorylation in systemic lupus erythematosus patients. *JCI Insight*. 2019;4(2).
- 330.Peters FS, Peeters AMA, Hofland LJ, Betjes MGH, Boer K, Baan CC. Interferon-Gamma DNA Methylation Is Affected by Mycophenolic Acid but Not by Tacrolimus after T-Cell Activation. *Front Immunol*. 2017;8.
- 331.Lees JR. Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage. *Cytokine*. 2015;74(1):18–26.
- 332.Anczurowski M, Hirano N. Mechanisms of HLA-DP Antigen Processing and Presentation Revisited. *Trends Immunol*. 2018;39(12):960–4.
- 333.Merkel PA, Xie G, Monach PA, Ji X, Ciavatta DJ, Byun J, et al. Identification of Functional and Expression Polymorphisms Associated With Risk for Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2017;69(5):1054–66.
- 334.Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Kochi Y, Ohmura K, et al. Contribution of a Non-classical HLA Gene, HLA-DOA, to the Risk of Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet*. 2016 Aug 4;99(2):366–74.
- 335.Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):591–5.
- 336.Bovensiepen S.C, Schakat M, Sebode M, Zenouzi R, Hartl J, Peiseler M et al. TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients With Autoimmune Hepatitis *J Immunol*. 2019;203(12):3148-3156. .
- 337.Kikuchi A, Monga SP. PDGFR α in Liver Pathophysiology: Emerging Roles in Development, Regeneration, Fibrosis, and Cancer. *Gene Expr*. 2015;16(3):109–27.

338. Wang Y, Qin X, Guo T, Liu P, Wu P, Liu Z. Up-regulation of CDK16 by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res CR* . 2017;36:97.
339. Wang X-L, Cai H-P, Ge J-H, Su X-F. Detection of eukaryotic translation initiation factor 4E and its clinical significance in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol WJG*. 2012;18(20):2540–4.
340. Castro-Sánchez P, Aguilar-Sopeña O, Alegre-Gómez S, Ramirez-Munoz R, Roda-Navarro P. Regulation of CD4+ T Cell Signaling and Immunological Synapse by Protein Tyrosine Phosphatases: Molecular Mechanisms in Autoimmunity. *Front Immunol*. 2019;10:1447.
341. Coit P, Ognenovski M, Gensterblum E, Maksimowicz-McKinnon K, Wren JD, Sawalha AH. Ethnicity-specific epigenetic variation in naïve CD4+ T cells and the susceptibility to autoimmunity. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8.
342. Ferdinandusse S, Denis S, van Roermund CWT, Preece MA, Koster J, Ebberink MS, et al. A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2018;1864(3):952–8.
343. Monte MJ, Alonso-Peña M, Briz O, Herraez E, Berasain C, Argemi J, et al. ACOX2 deficiency: An inborn error of bile acid synthesis identified in an adolescent with persistent hypertransaminasemia. *J Hepatol*. 2017;66(3):581–8.
344. Klomp LW1, Vargas JC, van Mil SW, Pawlikowska L, Strautnieks SS, van Eijk MJ, et al. Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology*. 2004;40(1):27-38.
345. Ghonem N.S, Assis D.N and Boyer J.L. Fibrates and Cholestasis. *Hepatology*. 2015;62(2):635-43.
346. Zachou K, Oikonomou K, Renaudineau Y, Chauveau A, Gatselis N, Youinou P, et al. Anti- α actinin antibodies as new predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type 1. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(1):116–25.

347. Malhotra N, Kang J. SMAD regulatory networks construct a balanced immune system. *Immunology*. 2013;139(1):1–10.
348. Uemura M, Swenson E, Gaça D.A. M, Giordano J.F, Reiss M and Wells G.R. Smad2 and Smad3 Play Different Roles in Rat Hepatic Stellate Cell Function and α -Smooth Muscle Actin Organization *Mol Biol Cell*. 2005;16(9): 4214–4224.
349. Zhou Z, Tian Z, Zhang M, Zhang Y, Ni B, Hao F. Upregulated IL-1 Receptor-associated Kinase 1 (IRAK1) in Systemic Lupus Erythematosus: IRAK1 Inhibition Represses Th17 Differentiation with Therapeutic Potential. *Immunol Invest*. 2018;47(5):468–83.
350. Su L-C, Xu W-D, Huang A-F. IRAK family in inflammatory autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2020;19(3):102461.
351. Masanori A, Murayama M.A, Kakuta S, Maruhashi T, Shimizu K, Seno A, Kubo S, Sato N et al. CTRP3 plays an important role in the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(1):42-8.
352. Wang X, Lei D, Ding J, Liu S, Tao L, Zhang F, et al. A DNA-Methylated Sight on Autoimmune Inflammation Network across RA, pSS, and SLE. *J Immunol Res*. 2018;2018.
353. Thompson CD, Matta B, Barnes BJ. Therapeutic Targeting of IRFs: Pathway-Dependence or Structure-Based? *Front Immunol* 2018;9:2622.
354. Chan AY, Punwani D, Kadlec TA, Cowan MJ, Olson JL, Mathes EF, et al. A novel human autoimmune syndrome caused by combined hypomorphic and activating mutations in ZAP-70. *J Exp Med*. 2016;213(2):155–65.
355. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol*. 2018;8:1908.
356. Sun J, Tumurbaatar B, Jia J, Diao H, Bodola F, Lemon SM, et al. Parenchymal Expression of CD86/B7.2 Contributes to Hepatitis C Virus-Related Liver Injury. *J Virol*. 2005;79(16):10730–9.

357. Yang L, Seki E. Toll-Like Receptors in Liver Fibrosis: Cellular Crosstalk and Mechanisms. *Front Physiol.* 2012;3:138
358. Moritoki Y, Lian Z-X, Wulff H, Yang G-X, Chuang Y-H, Lan RY, et al. AMA production in primary biliary cirrhosis is promoted by the TLR9 ligand CpG and suppressed by potassium channel blockers. *Hepatology.* 2007;45(2):314–22.
359. Matsushita H, Miyake Y, Takaki A, Yasunaka T, Koike K, Ikeda F, et al. TLR4, TLR9, and NLRP3 in biliary epithelial cells of primary sclerosing cholangitis: relationship with clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(3):600–8.
360. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2012;32(3):487–99.
361. Manley S, Williams JA, Ding W-X. The Role of p62/SQSTM1 in Liver Physiology and Pathogenesis. *Exp Biol Med Maywood NJ.* 2013;238(5):525–38.
362. Wang J, Qin Y, Li B, Sun Z, Yang B. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1 in the tumor and serum of Chinese human primary hepatocellular carcinoma patients. *Clin Biochem.* 2006;39(4):344–8.
363. Jain S, Chen S, Chang K-C, Lin Y-J, Hu C-T, Boldbaatar B, et al. Impact of the location of CpG methylation within the GSTP1 gene on its specificity as a DNA marker for hepatocellular carcinoma. *PloS One.* 2012;7(4):e35789.
364. Li Y, Cai Y, Chen H, Mao L. Clinical significance and association of GSTP1 hypermethylation with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2018;14:S486-S489.
365. Han Y-H, Shin K-O, Kim J-Y, Khadka DB, Kim H-J, Lee Y-M, et al. A maresin 1/ROR α /12-lipoxygenase autoregulatory circuit prevents inflammation and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1684–98.

366. Martínez-Clemente M, Ferré N, Titos E, Horrillo R, González-Pérez A, Morán-Salvador E, et al. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene (Alox15) protects hyperlipidemic mice from nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2010 ;52(6):1980–91.
367. Minskaia E, Saraiva B.C, Soares M.M.V, Azevedo R.I, Ribeiro R.M, Kumar S.D, Ana I. S. Vieira A.I.S and Lacerda J.F. Molecular Markers Distinguishing T Cell Subtypes With TSDR Strand-Bias Methylation. *Front Immunol.* 2018; 9: 2540.
368. Laxminarayana D, Khan U.I, Mishra N, Olorenshaw I, Taskén K, Kammer G.M. Diminished Levels of Protein Kinase A RI Alpha and RI Beta Transcripts and Proteins in Systemic Lupus Erythematosus T Lymphocytes. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5639-48.
369. Perl A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(3):169–82.
370. Chatrath H, Allen L, Boyer TD. Use of sirolimus in the treatment of refractory autoimmune hepatitis. *Am J Med.* 2014 Nov;127(11):1128–31.
371. HTR2C - 5-hydroxytryptamine receptor 2C precursor - Homo sapiens (Human) - HTR2C gene & protein. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P28335>
372. TSC22D3 Gene - GeneCards | T22D3 Protein | T22D3 Antibody. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSC22D3>
373. Mayo MJ, Handem I, Saldana S, Jacobe H, Getachew Y, Rush AJ. Sertraline as a first-line treatment for cholestatic pruritus. *Hepatology.* 2007;45(3):666–74.
374. Danford CJ, Trivedi HD, Papamichael K, Tapper EB, Bonder A. Osteoporosis in primary biliary cholangitis. *World J Gastroenterol.* 2018;24(31):3513–20.
375. Zhang B, Li M-D, Yin R, Liu Y, Yang Y, Mitchell-Richards KA, et al. O-GlcNAc transferase suppresses necroptosis and liver fibrosis. *JCI Insight.* 2019;4(21).

376. Invernizzi P, Pasini S, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;33(1):12–6.
377. Invernizzi P, Miozzo M, Battezzati PM, Bianchi I, Grati FR, Simoni G, et al. Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis. *Lancet Lond Engl.* 2004;363(9408):533–5.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεθυλίωση του DNA σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ)

Αρβανίτη Πηνελόπη

Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική κι Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο, Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης για τα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος, ΠΓΝ Λάρισας

(Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Ν. Νταλέκος)

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ) αποτελούν τα δύο κύρια αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος τα οποία χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή, η οποία οδηγεί προοδευτικά σε κίρρωση αν αφηθεί χωρίς θεραπεία. Καθώς οι γενετικοί παράγοντες, μόνιμοι τους, αδυνατούν να εξηγήσουν την αιτιοπαθογένειά των αυτοανόσων νόσων του ήπατος, η μελέτη της επίδρασης επιγενετικών παραγόντων θα μπορούσε δια φωτίσει μέρος των μηχανισμών που σχετίζονται τόσο με την παθογένεση όσο και με την εξέλιξή τους.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της συμμετοχής των επιγενετικών μηχανισμών στην αιτιοπαθογένεια της ΑΗ και της ΠΧΧ με στόχο την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Για το σκοπό αυτό περιφερικά μονοκύτταρα (PBMCs) 10 ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση (σε 8 από αυτούς έγινε μελέτη και κατά την επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης μετά από χορήγηση ανοσοκαταστολής), 9 ασθενών με ΠΧΧ και 10 υγιών μαρτύρων (ΥΜ) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση CD19(+) Β και CD4(+) Τ λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της ολικής μεθυλίωσης (5^mC)/υδροξυμεθυλίωσης ($5^{hm}C$) του DNA με τη χρήση ELISA, ενώ η έκφραση των ενζύμων μεθυλίωσης (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B)/υδροξυμεθυλίωσης (TET1, TET2, TET3) σε μεταγραφικό επίπεδο, έγινε με τη χρήση ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR). Περαιτέρω ανάλυση της μεθυλίωσης των επιμέρους CpG αλληλουχιών κατά μήκος του γονιδιώματος έγινε με την αλληλουχία 850k της Illumina.

Αυξημένη DNMT3A και χαμηλή TET1 χαρακτηρίζει τα CD19(+) και CD4(+) λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΑΗ κατά τη διάγνωση της νόσου συγκριτικά με τους ασθενείς με ΠΧΧ και τους ΥΜ αντίστοιχα. Τα επίπεδα mRNA της DNMT3A

σχετιζόταν αρνητικά με την IgG ανοσοσφαιρίνη κατά τη διάγνωση της ΑΗ υποδηλώνοντας τη συσχέτισή της DNMT3A με τη δραστηριότητα της νόσου. Η χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής βρέθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα της DNMT3A στους ασθενείς με ΑΗ κατά την ύφεση της νόσου τόσο στα CD19(+) όσο και στα CD4(+) Τ λεμφοκύτταρα. Οι αλλαγές στα επίπεδα των DNMT3A και TET1 δε συμβάδιζαν με σημαντικές διαφορές στο επίπεδο ολικής $5^mC/5^{hm}C$, παραπέμποντας στην παρουσία εντοπισμένων επιγενετικών αλλαγών που επιδρούν στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Υπέρ του ευρήματος αυτού, συνηγορούν τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μεθυλίωσης του συνόλου του γονιδιώματος των CD4(+) Τ λεμφοκυττάρων, που ανέδειξαν σημαντικές διαφορές στη μεθυλίωση μεμονωμένων γονιδίων μεταξύ ασθενών με ΑΗ έναντι των ΥΜ και των ασθενών με ΠΧΧ. Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων στους ασθενείς με ΑΗ κατά τη διάγνωση βρέθηκαν υπομεθυλιωμένα, ενώ αντίθετα στους ασθενείς με ΠΧΧ παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση του πλείστου των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων. Επιπλέον, η υπομεθυλίωση των γονιδίων στην ΑΗ βρέθηκε ότι επηρεάζονταν από την ανοσοκατασταλτική αγωγή. Μεταξύ των πλέον διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων αναδειχθηκαν γονίδια, που εμπλέκονται σε μονοπάτια φυσικής ανοσίας καθώς και γονίδια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς ανάπτυξης χολόστασης και ηπατοκαρκινογένεσης. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η σημασία του χρωμοσώματος X στην παθογένεια της ΠΧΧ καθώς τα περισσότερα διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια εδράζονταν στο χρωμόσωμα X, ενώ στην ΑΗ δεν υπήρχε αντίστοιχο εύρημα (τα περισσότερα διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια εδράζονταν σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα).

Συμπερασματικά, η μελέτη μας δείχνει για πρώτη φορά, ότι η ΑΗ χαρακτηρίζεται από αλλαγές στην έκφραση των ενζύμων μεθυλίωσης/υδροξυμεθυλίωσης, που σχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου, αλλά και από αλλαγές στη μεθυλίωση μεμονωμένων γονιδίων, που επηρεάζονται από τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Αντίθετα, η ΠΧΧ χαρακτηρίζεται από υπερμεθυλίωση των περισσότερων διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων. Τα ευρήματα αυτά ανοίγουν νέους δρόμους για την κατανόηση της αιτιοπαθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος και την εύρεση νέων, στοχευμένων θεραπειών.

ABSTRACT

DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with autoimmune hepatitis (AH) and primary biliary cholangitis (PBC)

Arvaniti Pinelopi

Department of Medicine and Research Laboratory of Internal Medicine, National Expertise Center in Autoimmune Liver Diseases, University Hospital of Larissa, Greece.

(Director: Prof George. N Dalekos)

Autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cholangitis (PBC) are the two major autoimmune liver diseases, characterized by chronic inflammation of liver parenchyma that leads to end stage liver disease, if untreated. Their aetiopathogenesis has not yet been completely elucidated. Since genetic factors are insufficient to explain the observed risk, the role of potential epigenetic modifications in diseases' pathogenesis has to be clarified.

The aim of the present study was to assess the contribution of epigenetic modifications in AIH and PBC pathogenesis. For this purpose, PBMCs from 10 AIH patients at diagnosis, 8 AIH patients at disease remission, 9 PBC patients and 10 healthy controls (HC) were used for further isolation of CD19(+) B and CD4(+) T lymphocytes with flow cytometry. Global DNA methylation (5^mC)/hydroxymethylation (5^{hmC}) was determined by ELISA, while the transcriptional levels of DNA methylation (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B)/hydroxymethylation (TET1, TET2, TET3) enzymes were determined by quantitative PCR. Further analysis of the methylation level of specific CpG sites across the whole genome was performed by 850k array of Illumina.

According to our findings, CD19(+) and CD4(+) lymphocytes from AIH patients at diagnosis are characterized by increased DNMT3A and reduced TET1 mRNA levels compared to PBC patients and HC respectively. DNMT3A mRNA levels are negatively associated with IgG serum levels, indicating a correlation between DNMT3A and

disease activity. Immunosuppression reduces DNMT3A levels in both CD19(+) and CD4(+) lymphocytes from AIH patients at disease remission. Interestingly, changes in DNMT3A and TET1 expression have no effect on global $5^mC/5^{hm}C$ levels in CD19(+) and CD4(+) cells from AIH patients, supporting the probable presence of differential methylation of isolated genes. This fact is further supported by the methylation analysis across the whole genome, which revealed hypomethylation of several genes in AIH, in contrast to the hypermethylation of the majority of the differentially methylated genes in PBC. In addition, the hypomethylation of certain genes in AIH patients at diagnosis is reversed after treatment administration. Some of the most differentially methylated genes were involved in pathways of innate immunity, development of cholestasis and of hepatocellular carcinoma. Last but not least, our study highlights the role of the X chromosome in PBC pathogenesis, a finding that is not verified in AIH.

In conclusion, our study supports that AIH is characterized by altered expression of DNA methylation/hydroxymethylation enzymes, which is associated with disease activity, but also by hypomethylation of specific genes involved in immune pathways, which is reversed by immunosuppressive treatment. These findings open new insights in understanding disease's pathogenesis and establishing novel, targeted therapeutic interventions.