

# ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μεταλλάξεις του γονιδίου TNFRSF13B/TAC1 σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα**

**Ιωάννης Κουλάς**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- ΣΠΕΛΕΤΑΣ ΜΑΤΘΑΙΟΣ, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- ΚΑΤΣΙΑΡΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας
- ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας -Αιματολογίας

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

Λάρισα, Οκτώβριος 2020



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



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**  
**Mutations of TNFRSF13B/TACI in patients with autoimmune disorders**

**By**  
**Ioannis Koulas**

Examining Committee:

- SPELETAS MATTHAIOS, Professor of Medical Immunology, Supervisor
- KATSIARI CHRISTINA, Associate Professor of Internal Medicine-Rheumatology
- GIANNAKOULAS NIKOLAOS, Assistant Professor of Internal Medicine - Hematology

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

Larissa, October 2020

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τον κύριο Σπελέτα ότι και να πω θα είναι λίγο. Τον ευχαριστώ μέσα από τη καρδιά μου για την μοναδική ευκαιρία που μου παραχώρησε όταν με δέχτηκε στο εργαστήριό του, καθώς και για όλες εκείνες τις συμβουλές που μου έδωσε κατά τη διάρκεια της χρονιάς όταν συζητούσαμε για θέματα που με απασχολούσαν. Νιώθω πως έχω αποκτήσει ένα πρότυπο ανθρώπου από όλες τις απόψεις για να ακολουθώ στα επόμενα βήματα της ζωής μου, είτε στην κλινική πράξη και έρευνα είτε, ίσως ακόμα πιο πολύ, σε όλους τους υπόλοιπους τομείς της ζωής μου. Ανεξάρτητα από το πού θα συνεχίσω την πορεία μου θα προσπαθήσω να κρατήσω ζωντανή τη σύνδεση αυτή και να προσφέρω όσα περισσότερα μπορώ στον ίδιο και την ομάδα του.

Ανάμεσα σε αυτά που θα θυμάμαι πιο πολύ θα είναι το πόσο όμορφα ένιωθα κάθε μέρα που πήγαινα στο εργαστήριο. Από την πρώτη μέρα οι διδακτορικές φοιτήτριες Γερασιμίνα Τσιντή και Σοφία Ραφτοπούλου ήταν στο πλευρό μου δείχνοντας μου τεχνικές και λύσεις στις δυσκολίες μου, συχνά αφήνοντας στην άκρη τις δικές τους εργασίες. Τις δυσκολίες που έφερε η πανδημία του Covid 19 στη διεκπεραίωση των πειραμάτων είχα την τύχη να τις αντιμετωπίσω με τους υπόλοιπους φοιτητές που έκαναν πειράματα στο εργαστήριο, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Αθανασία Φουσίκα και Χρήστο Παπαδόπουλο και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Εύα Βακαλούλη και Αργυρώ Συρακούλη. Συχνά βοηθούσαμε ο ένας τον άλλο όπου χρειαζόμασταν βοήθεια και δεν ήταν λίγες οι φορές που μέναμε στο εργαστήριο μέχρι αργά το βράδυ για να τελειώσουμε τα πειράματα. Για όλους τους παραπάνω λόγους νιώθω πως δεν θα μπορούσα να είμαι σε καλύτερη ομάδα από αυτήν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ και τον διευθυντή της ρευματολογικής κλινικής και κ. Δημήτρη Μπόγδανο καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της κλινικής για την έμπρακτη υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, η εργασία δεν θα μπορούσε να είχε γίνει χωρίς την ανεκτίμητη βοήθεια της κα. Χριστίνας Κατσιάρη η οποία, παρά το μεγάλο φόρτο των κλινικών της καθηκόντων, είχε την υπομονή να καθίσει μαζί μου για να μελετήσουμε φακέλους ασθενών και να συλλέξουμε τα δείγματά τους. Επίσης, θα θυμάμαι και τις συζητήσεις μας για θέματα που εκτείνονταν από τη διαφορική διάγνωση μεταξύ συνδρόμου Sjogren και Συστηματικού Ερυθρηματώδη Λύκου μέχρι θεωρία αρμονίας μοντέρνας μουσικής (θέματα τα οποία προσωπικά με ενδιαφέρουν πολύ αλλά και στα οποία η ίδια έχει πολλές γνώσεις).

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Πλαγέρα ο οποίος μου παραχώρησε το υλικό των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση το οποίο ο ίδιος σε παλιότερες μελέτες είχε απομονώσει και τον κ. Χρήστο Λιάσκο για τη συγκέντρωση των κλινικών πληροφοριών αυτών των ασθενών. Ευχαριστώ, επίσης, και τον κύριο Νικόλαο Γιαννακούλα για τον πολύτιμο του χρόνο τον οποίο διέθεσε ως μέλος της τριμελούς επιτροπής μου.

Η ανοσολογία είναι ένα μικρόβιο από το οποίο ορισμένοι από εμάς δεν θα αποκτήσουν ποτέ ανοσία. Αυτό το μικρόβιο το απέκτησα στα φοιτητικά μου χρόνια από τα μαθήματα ανοσολογίας της Ομότιμης καθηγήτριας κλινικής ανοσολογίας κα Παναγιώτας Μπούρας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, η οποία με έχει στηρίξει σε όλα μου τα βήματα από τότε μέχρι και σήμερα και την ευχαριστώ βαθύτατα για αυτό.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	

### *1.1.1.1. Σύνδρομο Sjogren*

- 1.1.1.1.1. Εισαγωγή-Επιδημιολογία 9*
- 1.1.1.1.2. Παθογένεση 10*
- 1.1.1.1.3. Κλινικές Εκδηλώσεις-Διαφορική Διάγνωση 11*
- 1.1.1.1.4. Απεικονιστικές Εξετάσεις 13*
- 1.1.1.1.5. Εξωαδενικές Εκδηλώσεις 14*
- 1.1.1.1.6. Λεμφώματα 16*
- 1.1.1.1.7. Αντιμετώπιση 18*

### *1.1.1.2. Συστηματική Σκλήρυνση (Σκληρόδερμα)*

- 1.1.1.2.1. Επιδημιολογία-Παθογένεση 19*
- 1.1.1.2.2. Φάσμα διαταραχών συστηματικής σκλήρυνσης 20*
- 1.1.1.2.3. Διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της συστηματικής σκλήρυνσης 21*
  - 1.1.1.2.3.1. Δέρμα, Φαινόμενο Raynaud 22*
  - 1.1.1.2.3.2. Καρδιαγγειακά και αναπνευστικά*
  - 1.1.1.2.3.3. Γαστρεντερικό 23*
  - 1.1.1.2.3.4. Νεφρικό 23*
  - 1.1.1.2.3.5. Μυοσκελετικό 23*
  - 1.1.1.2.3.6. Εξετάσεις 24*
  - 1.1.1.2.3.7. Θεραπευτική αντιμετώπιση 25*

### *1.1.1.3. Το γονίδιο TACI*

- 1.1.1.3.1. Πρωτεΐνες APRIL, BAFF και οι υποδοχείς τους 27*
- 1.1.1.3.2. TACI 28*
- 1.1.1.3.3. TACI και CVID 31*
- 1.1.1.3.4. TACI και Αυτοανοσία 31*

1.1.1.3.5. *Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TACI στο σύνδρομο Sjogren και τη Συστηματική Σκλήρυνση 32*

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

33

- 1.1.1.1.1. *Σκοπός της Μελέτης 33*
- 1.1.1.1.2. *Ασθενείς 33*
- 1.1.1.1.3. *Απομόνωση DNA 34*
- 1.1.1.1.4. *PCR για το γονίδιο TNFRSF13B/TACI 34*
- 1.1.1.1.5. *Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αραρόζης 36*
- 1.1.1.1.6. *Καθαρισμός των Προϊόντων της PCR 37*
- 1.1.1.1.7. *Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων 37*
- 1.1.1.1.8. *Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων 38*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

38

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

42

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

47

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ABBREVIATIONS

BAFF	B-cell activating factor	DLBCL	Diffuse Large B cell Lymphomas
CVID	Common Variable Immunodeficiency	MRI	Magnetic Resonance Imaging
EULAR	European League Against Rheumatism	IFN	Interferon
IL	Interleukin	BALT	Bronchus Associated Lymphoid Tissue
NF-κB	Nuclear Factor-κB		
NKs	Natural Killer cells	MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
PCR	Polymerase Chain Reaction	anti-CCPs	anti-Citrulinated Proteins antibodies
RF	Rheumatoid Factor	CREST	Calcinosis, Raynaud, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia
SOX	Sialadenitis, Osteoarthritis, and Xerostomia	HLA	Human Leukocyte Antigen
TGF-β	Transforming Growth Factor-β	APRIL	a proliferation-inducing ligand
TLR	Toll-like Receptors	BCMA	B cell maturation antigen
TNF	Tumor Necrosis Factor	CRDs	cysteine-rich domains
TNFRSF13B/TACI	(Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor)	ESSDAI	EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index
TRAF	TNF Receptor Associated Factor	CAML	calcium modulating cyclophilin ligand

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **Εισαγωγή:**

Μεταλλάξεις του γονιδίου TNFRSF13B/TACI (Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor) έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση Κοινής Ποικίλης Ανοσοανεπάρκειας (CVID), όπου ένας σημαντικός αριθμός ασθενών αναπτύσσει αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε γονιδιακός έλεγχος για τυχόν μεταλλάξεις του γονιδίου σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren και Συστηματική Σκλήρυνση, δύο αυτοάνοσα νοσήματα όπου ο ρόλος του υποδοχέα TACI δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

### **Υλικά και Μέθοδοι:**

Έγινε συλλογή περιφερικού αίματος από 30 ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren και 46 ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση και ακολούθησε απομόνωση DNA από τα δείγματα. Έπειτα έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) των 5 εξονίων του γονιδίου και αλληλούχιση κατά Sanger. Στη συνέχεια τα χρωματογραφήματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν με ένα σύγχρονο πρόγραμμα βιοπληροφορικής.

### **Αποτελέσματα:**

Από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων βρέθηκαν πολλοί κοινοί πολυμορφισμοί και στις δύο ομάδες των ασθενών αλλά και γνωστές παθογόνες μεταλλάξεις σε τέσσερις ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (4/46, 8.7%). Στην ομάδα των ασθενών με σύνδρομο Sjogren δεν βρέθηκε καμία παθογόνος μετάλλαξη. Η συχνότητα των μεταλλάξεων ήταν αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ύστερα από σύγκριση με δεδομένα που αφορούν τον πληθυσμό νότιων Ευρωπαϊκών χωρών ( $\chi^2$   $p < 0.01$ , διαφορά συχνοτήτων 8,3%, 95% CI: 3% - 20%).

### **Συμπέρασμα:**

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη καταγεγραμμένη ανίχνευση παθογόνων μεταλλάξεων του γονιδίου TACI σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση. Περαιτέρω μελέτες χρειάζεται να γίνουν για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του TACI σε αυτή την ομάδα ασθενών.

Λέξεις-Κλειδιά: TNFRSF13B/TACI, Σύνδρομο Sjogren, Συστηματική Σκλήρυνση

## ABSTRACT

### **Background**

TNFRSF13B/TACI (Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor) mutations have been associated with Common Variable Immunodeficiency cases (CVID), where a significant number of patients develops autoimmune disorders. In this study we performed genetic testing for TACI mutations in 30 patients with Sjogren syndrome and 46 patients with Systemic Sclerosis, two autoimmune disorders where TACI involvement is not adequately studied.

### **Materials and Methods**

Peripheral blood samples were collected from 30 patients with primary Sjogren syndrome and 46 patients with Systemic Sclerosis and DNA was isolated from the samples. All 5 exons of the TACI gene were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and sent for Sanger sequencing. The resulting chromatographs were analyzed with the help of a modern bioinformatics tool.

### **Results**

Several common normal variants were found among both patient groups as well as known disease-causing mutations in four patients with Systemic Sclerosis (4/46, 8.7%). No pathogenic mutations were found in the Sjogren syndrome patient group. The presence of mutations in the Systemic Sclerosis group was significantly more frequent compared to the healthy southern European population ( $\chi^2$   $p < 0.01$ , difference in frequency 8.3%, 95% CI: 3% - 20%).

### **Conclusions**

The current study is, to the best of our knowledge, the first study that associates pathogenic TACI mutations with Systemic Sclerosis cases. Further studies are needed to clarify the role of TACI in this patient group.

**Keywords:** TNFRSF13B/TACI, Sjogren syndrome, Systemic Sclerosis



## **Σύνδρομο Sjogren:**

### *Εισαγωγή-Επιδημιολογία:*

Το σύνδρομο Sjogren είναι μια χρόνια αυτοάνοση ρευματική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση κυρίως εξωκρινών αδένων αλλά και άλλων οργάνων σε συνδυασμό με την παραγωγή διαφόρων αυτοαντισωμάτων στο αίμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτή η διαταραχή αναπτύσσεται υποκλινικά σε μια περίοδο μηνών έως ετών. Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ξηροφθαλμία, ξηροστομία, κόπωση, μυοσκελετικό πόνο και οίδημα των σιελογόνων αδένων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η σταδιακή και προοδευτική δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων έχει ως αποτέλεσμα την ξηρότητα διάφορων σημείων του σώματος, όπως είναι το σύνδρομο sicca (από τη λατινική λέξη siccus που σημαίνει ξηρό ή διψασμένο). Η συμμετοχή εσωτερικών οργάνων εμφανίζεται σε περίπου 25% των ασθενών, με την ανάπτυξη μη-Hodgkin's λεμφώματος από B-λεμφοκύτταρα να αντιπροσωπεύει τη σημαντικότερη επιπλοκή της νόσου.

Το σύνδρομο Sjogren είχε παλαιότερα θεωρηθεί ως «καλοήθης μορφή» του Συστηματικού Ερυθρηματώδη Λύκου, αλλά νεότερες οδηγίες το ταξινομούν ως ξεχωριστή νόσο. Το 2008, ύστερα από μία επιδημιολογική μελέτη για τον επιπολασμό της αρθρίτιδας στις ΗΠΑ, το σύνδρομο Sjogren κατατάχθηκε ως η 2η πιο συχνή αυτοάνοση ρευματική νόσος μετά τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, με εκτιμώμενο επιπολασμό που κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 3,1 εκατομμύρια ασθενείς. Όπως συχνά συμβαίνει στις αυτοάνοσες ασθένειες, το σύνδρομο Sjogren εμφανίζει υψηλή αναλογία γυναικών προς άντρες (9: 1), παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο. Η μέγιστη επίπτωση είναι στην ηλικιακή ομάδα των 40-55 ετών, με χαρακτηριστικό πρότυπο ασθενή την περιεμμηνοπαυσιακή καυκάσια γυναίκα. Πλέον, τα δημογραφικά στοιχεία έχουν επεκταθεί και περιλαμβάνουν γυναίκες όλων των φυλών, συμπεριλαμβανομένων Αφροαμερικανών, γυναικών οποιασδήποτε ηλικίας και όλο και περισσότερων αντρών. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές καλά τεκμηριωμένες περιπτώσεις του συνδρόμου σε παιδική ηλικία.

### *Παθογένεση*

Η παθογένεση του συνδρόμου Sjogren βασίζεται σε μια σειρά από πολλές μικρές δυσλειτουργίες στα διάφορα στάδια της δημιουργίας ανοσιακής απάντησης κατά των οργάνων στόχων με ταυτόχρονη μείωση της ανοσιακής ανοχής. Στο επίπεδο των σιελογόνων αδένων, για παράδειγμα, τα επιθηλιακά κύτταρα γίνονται στόχοι μίας υπέρμετρης ανοσιακής απάντησης με αποτέλεσμα την καταστροφή τους και την απελευθέρωση των χαρακτηριστικών μορίων Ro και La (SS-A, SS-B

αντίστοιχα) στον ορό. (1) Ταυτόχρονα, η προφλεγμονώδης κατάσταση του ανοσιακού συστήματος μέσω αυξημένων προφλεγμονοδών μορίων όπως IL-1, IL-6 και TNF $\alpha$ , αλλά και άλλες ιντερλευκίνες όπως IL-7, IL-18 και IL-22. (2) (3) (4) (5)

Τα μόρια αυτά οδηγούν σε μια έντονη κατάσταση φλεγμονής η οποία πολύ συχνά δεν είναι περιορισμένη σε ένα όργανο αλλά οδηγεί στις συστηματικές εκδηλώσεις της νόσου. Στην καταστροφή των κυττάρων συμμετέχουν, επίσης, και μηχανισμοί απόπτωσης-προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος- η οποία διαμεσολαβείται κυρίως από το μονοπάτι Fas-Fas Ligand της σηματοδοτικής οδού του μορίου NF $\kappa$ B, μεταβολές του οποίου συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της νόσου. (6) (7) Επιβεβαιωμένος είναι και ο ρόλος της ιντερφερόνης στο σιελογόνο αδένια καθώς και στο περιφερικό αίμα ασθενών με SS, παρόμοια με όσα ότι ισχύει στον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο.

Σε ασθενείς με Sjogren η IFN $\alpha$  παράγεται από τα ενεργοποιημένα πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (activated plasmacytoid dendritic cells, pDCs) ως απόκριση σε αυξημένα επίπεδα TLR7, TLR9 και IL-12. Η INF $\gamma$  παράγεται από κύτταρα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells, DCs), κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer cells, NKs) και Th1 κύτταρα. Η IFN ενεργεί ως ο σύνδεσμος μεταξύ φυσικής και ειδικής ανοσίας στο Sjogren. Οι IFN $\alpha$  και INF $\gamma$  μεσολαβούν στη λεμφοκυτταρική διήθηση των σιελογόνων αδένων με κύτταρα T και B, στην ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων, στην επαγωγή έκφρασης MHC και συνδιεγερτικών μορίων στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων, διεγείρει την παραγωγή του μορίου BAFF (B-cell activating factor, BAFF) και αυτοαντισωμάτων, καθώς επίσης προάγει την απόπτωση. (8)

Όσον αφορά την συμμετοχή των κυττάρων, κυρίως T και B κύτταρα δημιουργούν τα χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα στο σύνδρομο. Τα T και τα δενδριτικά κύτταρα βρίσκονται σε ήπιες αλλοιώσεις, ενώ τα B κύτταρα και τα μακροφάγα ανιχνεύθηκαν σε σοβαρότερες βλάβες οι οποίες συσχετίζονταν έντονα με υψηλότερο σκορ κατά Tarpley. (9)

Τα χαρακτηριστικά ανοσολογικά ευρήματα υπερδραστηριότητας των B κυττάρων στη νόσο είναι η υπεργαμμασφαιριναιμία (αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών), η κρυσφαιριναιμία (αυξημένα επίπεδα IgG ή κυρίως IgM που κάνουν ανοσοσυμπλέγματα σε ψυχρές θερμοκρασίες), οι θετικοί τίτλοι των ειδικών αντισωμάτων στον ορό, ο σχηματισμός βλαστικών κέντρων (Germinal Centers, GCs) στα όργανα-στόχους και η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης λεμφώματος. Ειδικά για τα λεμφώματα, το Sjogren έχει τον υψηλότερο επιπολασμό λεμφώματος μεταξύ όλων των αυτοάνοσων ασθενειών με μέσο όρο εμφάνισης 7,5 έτη μετά τη διάγνωση. (10) (11)

### *Κλινικές Εκδηλώσεις:*

Περίπου, το 80% των ασθενών παρουσιάζει κάποια μορφή του συνδρόμου sicca. Το πιο συνηθισμένο σενάριο είναι η ξηροφθαλμία ακολουθούμενη από ξηροστομία. Λιγότερο συχνά, η ξηροστομία είναι η κυρίαρχη παρουσίαση ή τα συμπτώματα μπορεί να αναπτυχθούν ταυτόχρονα. Το υπόλοιπο 20% των ασθενών παρουσιάζουν μη τυπικά συμπτώματα, καθώς τη στιγμή που τα άτομα αναζητούν ιατρική περίθαλψη τα συμπτώματά τους μπορεί να είναι ελάχιστα ή ακόμα και να είναι τελείως ασυμπτωματικοί.

Μάλιστα, η συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της ξηροφθαλμίας και της ξηροστομίας με τα αποτελέσματα από τις αντικειμενικές εξετάσεις για ξηροφθαλμία και ξηροστομία αντίστοιχα δεν είναι απόλυτη. (12) Άλλες κοινές εκδηλώσεις του Sjogren's περιλαμβάνουν μυοσκελετικά άλγη, χρόνια κόπωση, οίδημα και φλεγμονή σιελογόνων αδένων, απομυελινωτική νόσος και νευροπάθειες (13).

### *Διαφορική Διάγνωση:*

Η διαφορική διάγνωση του συνδρόμου Sjogren είναι εκτεταμένη και περιλαμβάνει ιογενείς λοιμώξεις, άλλες συστηματικές ασθένειες και διάφορες καταστάσεις που επηρεάζουν κυρίως τους εξωκρινείς αδένες.

### Διαφορική Διάγνωση Συνδρόμου Sjogren

---

Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος	Ηπατίτιδα C
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	Αμυλοείδωση
Σαρκοείδωση	HIV
Ινομυαλγία	Σιελαδενίτιδα
Πολλαπλή Σκλήρυνση	Ανεπάρκεια Βιταμίνης A

---

Πίνακας: Διαφορική Διάγνωση Συνδρόμου Sjogren [Ανατύπωση από Sjogren's syndrome: Clinical aspects , Frederick B.Vivino, Clinical Immunology, 2017 (14)]

Η πιο κοινή αιτία των συμπτωμάτων τύπου sicca στις ΗΠΑ παραμένει να είναι η ανεπιθύμητη ενέργεια από φαρμακευτική αγωγή, μιας και πολλά συνταγογραφούμενα φάρμακα μπορεί να προκαλέσουν ξηροφθαλμία και ξηροστομία, ιδίως όσα έχουν αντιχολινεργικές ιδιότητες.(15)

Τέτοια συμπτώματα, επίσης, παρατηρούνται σε άτομα που χρησιμοποιούν αντιυπερτασικά (π.χ. διουρητικά), αντικαταθλιπτικά (π.χ. τρικυκλικά), μυοχαλαρωτικά, υπνωτικά, οπιοειδή, βενζοδιαζεπίνες, αντισταμινικά και αποσυμφορητικά, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό.

Μια πιθανή ανεπάρκεια βιταμίνης Α πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε οποιονδήποτε ασθενή με ανεξήγητη έντονη ξηροφθαλμία που ενδέχεται να έχει παράγοντες κινδύνου για διατροφική ανεπάρκεια. Ασθενείς με σοβαρά συμπτώματα sicca και οστεοαρθρίτιδα που αποτυγχάνουν να ικανοποιήσουν διαγνωστικά κριτήρια για το Sjogren μπορεί να έχουν χρόνια σιαλαδενίτιδα και σύνδρομο SOX (Sialadenitis, Osteoarthritis, and Xerostomia-σιαλαδενίτιδα, οστεοαρθρίτιδα, ξηροστομία) (16). Επιπρόσθετα, Σε άτομα που παρουσιάζουν επίμονα διογκωμένους σιελογόνους ή δακρυϊκούς αδένες και που έχουν βιοψία που καταδεικνύει λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση, συστήνεται πάντα να εκτελείται ειδική χρώση για IgG4 στα πλασματοκύτταρα για να αποκλειστεί τυχόν IgG4 σύνδρομο. (17)

Τα κριτήρια ταξινόμησης ACR – EULAR 2016 για πρωτογενές SS μπορούν να εφαρμοστούν σε οποιοδήποτε άτομο με τουλάχιστον ένα οφθαλμικό σύμπτωμα ή με στοματική ξηρότητα, όπως ορίζεται από τις ακόλουθες ερωτήσεις που αναπτύχθηκαν αρχικά σε προηγούμενα κριτήρια: 1) *Είχατε καθημερινή, επίμονη, ενοχλητική ξηροφθαλμία για >3 μήνες;* 2) *Έχετε μια*

Κριτήρια EULAR 2016	Βαθμοί (>=4 χρειάζεται για διάγνωση)
Θετική βιοψία	3
Θετικοί τίτλοι anti-SSA (anti-Ro)	3
Βαθμός χρώσης οφθαλμικής επιφάνειας >=5	1 (για κάθε μάτι)
Δοκιμασία ερεθισμού οφθαλμών Schirmer χωρίς αναισθησία <=5mm/5 λεπτά	1 (για κάθε μάτι)
Ρυθμός έκκρισης σιέλων χωρίς διέγερση <=0,1 ml/λεπτό	1

Πίνακας: Ταξινόμηση Συνδρόμου Sjogren κατά EULAR [Ανατύπωση από Sjogren's syndrome: Clinical aspects, Frederick B. Vivino, Clinical Immunology, 2017]

*επαναλαμβανόμενη αίσθηση άμμου ή χαλικιού στα μάτια;* 3) *Χρησιμοποιείτε υποκατάστατα δακρύων >3 φορές την ημέρα;* 4) *Έχετε καθημερινή αίσθηση ξηροστομίας για >3 μήνες;* 5) *Πίνετε συχνά υγρά για να βοηθήσετε την κατάποση ξηρών τροφών;* (18) Επιπλέον, αυτά τα κριτήρια μπορούν επίσης να εφαρμοστούν σε κάθε ασθενή που εμφανίζει τουλάχιστον 1 εξτραδενική εκδήλωση του Sjogren

όπως ορίζεται από το EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI). (19) Απαιτείται σωστή αξιολόγηση για σημάδια στοματικής και οφθαλμικής ξηρότητας η οποία γίνεται μόνο μετά τη διακοπή όλων των αντιχολινεργικών φαρμάκων (20) Ο έλεγχος για ξηροστομία πραγματοποιείται με μέτρηση του ρυθμού ροής σάλιου σε ολόκληρο το στόμα μετά από τουλάχιστον μία ώρα. Ένα τεστ Schirmer-χωρίς αναισθησία- μπορεί να πραγματοποιηθεί και στα δύο μάτια για μια περίοδο πέντε λεπτών για την αξιολόγηση της παραγωγής δακρύων. Εναλλακτικά, ο έλεγχος για ξηροφθαλμία μπορεί να πραγματοποιηθεί με βαφή της οφθαλμικής επιφάνειας. Ο βαθμός οφθαλμικής επιφανειακής βλάβης ποσοτικοποιείται ανάλογα με τη βαφή ή τις βαφές που χρησιμοποιούνται.

Συχνά σημαντικό ρόλο στη διάγνωση έχει η ιστοπαθολογική αξιολόγηση της βιοψίας των σιελογόνων αδένων του κάτω χείλους, με εκτομή τουλάχιστον 5 λεπτών σιελογόνων αδένων για επαρκή δειγματοληψία. Τα χαρακτηριστικά ευρήματα περιλαμβάνουν εστιακή λεμφοκυτταρική σιελαδενίτιδα με βαθμολογία εστίασης  $\geq 1/4\text{mm}^2$  επιφάνειας ιστού. (21) Τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων παρέχουν ένα χρήσιμο μέσο τεκμηρίωσης αυτοανοσίας ειδικά όταν παρατηρούνται τα ακόλουθα μοτίβα: Θετικοί τίτλοι αντισωμάτων Anti-SSA (γνωστή ως anti-Ro), θετικοί τίτλοι αντισωμάτων anti-SSA / SSB (γνωστή ως anti-La) ή θετικός ρευματοειδής παράγοντας συν θετικά αντιπυρηνικά αντισώματα  $\geq 1: 320$  (οποιοδήποτε μοτίβο). Ασθενείς που είναι οροαρνητικοί ή αυτοί που παρουσιάζουν μεμονωμένη αντι-SSB θετικότητα πάντοτε χρειάζονται βιοψία σιελογόνων αδένων για διάγνωση. Μεμονωμένα θετικοί τίτλοι αντι-SSB είναι σπάνια περίπτωση και το πιθανότερο είναι ότι αυτά τα άτομα δεν εμφανίζουν τον τυπικό φαινότυπο του Sjogren. (22)

#### *Απεικονιστικές εξετάσεις:*

Αν και δεν περιλαμβάνονται στα τρέχοντα κριτήρια ταξινόμησης για SS, η διαγνωστική απεικόνιση παρέχει συχνά πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη συμμετοχή των κύριων σιελογόνων αδένων. Το σπινθηρογράφημα σιελογόνων αδένων με Technetium 99 m (99m Tc-PT) είναι μια μελέτη διαδοχικής απεικόνισης που μπορεί να αξιολογήσει σε πραγματικό χρόνο τη λειτουργία των σιελογόνων αδένων μετρώντας τον σχηματισμό σάλιου στους κύριους σιελογόνους αδένες. (23) Μπορεί μάλιστα να δείχνει διαφορετική εμπλοκή των σιελογόνων αδένων, με τους υπογνάθιους να επηρεάζονται τυπικά πρώτοι. Δεδομένου ότι τα πρωτόκολλα για σπινθηρογράφημα σιελογόνων αδένων δεν είναι προς το παρόν τυποποιημένα, η χρησιμότητα αυτής της μελέτης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ενδιαφέρον ή / και την εμπειρία του κέντρου απεικόνισης που το εκτελεί.

Η συμβατική σιαλογραφία ακτίνων X, αν και περισσότερο επεμβατική και τεχνικά δύσκολη από τη σπινθηρογραφία, χρησιμοποιείται περιστασιακά για την τεκμηρίωση αλλαγών στην αρχιτεκτονική των παρωτίδων ή για την αξιολόγηση περιπτώσεων υποψίας απόφραξης των πόρων. Η MRI

(Magnetic Resonance Imaging), συμπεριλαμβανομένης της μαγνητικής σιαλογραφίας, μπορεί να είναι χρήσιμη στην αξιολόγηση των ασθενών με οίδημα των παρωτιδικών αδένων και όγκους, συμπεριλαμβανομένων των λεμφωμάτων. Από την άλλη, η αξονική τομογραφία (CT, Computed Tomography) των μαλακών ιστών του τραχήλου παρέχει ένα βολικό, μη επεμβατικό, τρόπο ανίχνευσης για σιαλολιθίαση ή φλεγμονή των σιελογόνων αδένων.

Οι βελτιώσεις των τελευταίων ετών στις τεχνικές απεικόνισης και η ευκολία στην προσβασιμότητα, έχει ενισχύσει τη χρήση της υπερηχογραφίας σιελογόνων αδένων ως διαγνωστική μέθοδο για το σύνδρομο Sjogren. Τα ευρήματα μπορεί να περιλαμβάνουν αυξημένη παρεγχυματική ηχογένεια ή/και ανομοιογένεια ή αλλαγές στο μέγεθος των αδένων. Τα αποτελέσματα από τους υπερήχους συσχετίζονται με τους ρυθμούς ροής των σιελογόνων ολόκληρου του στόματος, αλλά και τη βαθμολογία των βιοψιών σιελογόνων αδένων μικρού χείλους (24).

Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο υπέρηχος μπορεί να αποτελέσει έναν αξιόπιστο τρόπο διάκρισης μεταξύ SS και χρόνιας σιαλαδενίτιδας, με ~ 66% ευαισθησία και 95-97% ειδικότητα σε ασθενείς με έναρξη συμπτωμάτων <5 ετών (25). Επιπρόσθετα, μπορεί να γίνει χρήση βελόνας με καθοδήγηση από υπερήχους, αντί για ανοιχτή χειρουργική επέμβαση, για τη διενέργεια βιοψίας με υψηλό βαθμό ακρίβειας για παρωτιδικές μάζες. (26)

#### *Εξωαδενικές εκδηλώσεις:*

Σε ποσοστό μέχρι και 25% μπορεί να προκύψει σημαντική συμμετοχή εξωαδενικών οργάνων στην πορεία της νόσου. (27)

Πίνακας: Συχνές εξωαδενικές εκδηλώσεις στο σύνδρομο Sjogren ανά σύστημα
Γενικά: Καταβολή, πυρετός, Γαστρεντερικό: οισοφαγική δυσκινησία, ατροφική γαστρίτιδα, γαστροπάρεση, αυτοάνοση παγκρεατίτιδα, ηπατική νόσος Ουρογεννητικό: Ξηρασία κόλπου, διάμεση κυστίτιδα Αιμοποιητικό: Αναιμία, λευκοπενία, λεμφοπενία, κρυσφαιριναιμία, λέμφωμα Αναπνευστικό: Βρογχίτιδες/πνευμονίες, διάμεση πνευμονία, πνευμονική ίνωση, βρογχεκτασίες, πνευμονική υπέρταση, αποφρακτική βρογχολίτιδα Νευρικό: περιφερική/ αυτόνομη νευροπάθεια, προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος Νεφροί: Διάμεση νεφρίτιδα, νεφροσωληναριακή οξέωση (τύπου I και II), νεφρολιθίαση

Μυοσκελετικό: Μυοσίτιδα, αρθραλγία, πολυαρθρίτιδα, φαινόμενο Raynaud

Δέρμα: Ξηροδερμία, πορφύρα, αγγειίτιδα

[Ανατύπωση από Sjogren's syndrome: Clinical aspects, Frederick B.Vivino, Clinical Immunology, 2017]

Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτά τα χαρακτηριστικά της ασθένειας κυριαρχούν κατά την έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων και γίνονται το κυρίαρχο σύμπτωμα. Σχεδόν οποιοδήποτε όργανο μπορεί να επηρεαστεί, ιδιαίτερα όμως το μυοσκελετικό σύστημα, το γαστρεντερικό, οι πνεύμονες και το αιμοποιητικό. Η πλειονότητα των ασθενών με SS πάσχουν από φλεγμονές στις αρθρώσεις και μυϊκό πόνο, με τις αρθραλγίες να παρατηρούνται πιο συχνά από ότι η αρθρίτιδα. Συνήθως επηρεάζονται πολλές αρθρώσεις αλλά μπορεί να υπάρχουν και oligoarθρικά και monoarθρικά συμπτώματα με/χωρίς οίδημα στις αρθρώσεις. Οι μικρές αρθρώσεις των χεριών, οι καρποί και τα γόνατα επηρεάζονται συχνότερα. Η αρθρίτιδα είναι συνήθως μη διαβρωτική και χωρίς παραμόρφωση. Οι ασθενείς που είναι θετικοί στα anti-CCPs αντισώματα (anti-Citrullinated Proteins) είναι πιο επιρρεπείς στο να αναπτύξουν πολυαρθρίτιδα και μερικές φορές αναπτύσσονται αλληλεπικαλυπτόμενα χαρακτηριστικά με ρευματοειδή αρθρίτιδα. (28) (29) Η συνύπαρξη ινομυαλγίας ή συμπτωματικής οστεοαρθρίτιδας σχετιζόμενη με την ηλικία, συχνά περιπλέκει την αξιολόγηση του μυοσκελετικού πόνου σε αυτούς τους ασθενείς.

Ολόκληρη η γαστρεντερική οδός μπορεί να προσβληθεί, με συχνά συμπτώματα τη ξηροστομία, τη γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, τη δυσφαγία, τη δυσπεψία και τη χρόνια δυσκοιλιότητα. Ο μηχανισμός πίσω από αυτά τα συμπτώματα πιθανόν να σχετίζεται με προβλήματα κινητικότητας στον οισοφάγο, το στομάχι ή το παχύ έντερο ή με μειωμένη ροή σιελογόνων αδένων και, επομένως, λιγότερα υγρά στον γαστρεντερικό αυλό .

Μαζί με το Sjogren μπορεί να παρουσιαστεί, επίσης, αυτοάνοση παγκρεατίτιδα ή/και ηπατική νόσος. Ασθενείς οι οποίοι παραπονιούνται για διάρροια θα πρέπει να αξιολογούνται και για κοιλιοκάκη, σύνδρομο υπερανάπτυξης βακτηρίων λεπτού εντέρου ή μικροσκοπική κολίτιδα.

Οι πνευμονικές επιπλοκές είναι συχνές στο Sjogren. Χρόνιος βήχας εμφανίζεται συχνά λόγω της αποξήρανσης των ανώτερων αεραγωγών, παλινδρόμησης ή διάμεσης πνευμονοπάθειας. (30) Διάμεση πνευμονοπάθεια μπορεί επίσης να εμφανιστεί με δύσπνοια κατά την άσκηση ή λιγότερο συχνά ως οξεία πνευμονίτιδα. Η πιο συχνή παρουσίαση είναι η μη ειδική διάμεση πνευμονίτιδα (Non-specific Interstitial Pneumonitis, NSIP). Ωστόσο, μπορεί να εμφανιστεί και ως συνήθης διάμεση πνευμονίτιδα (Usual Interstitial Pneumonitis, UIP), λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονίτιδα (Lymphocytic Interstitial Pneumonitis, LIP) ή κρυπτογενής οργανωτική πνευμονία (Cryptogenic Organising Pneumonitis, COP). Η λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονίτιδα μπορεί περιστασιακά να εξελιχθεί σε λέμφωμα BALT (Bronchus Associated Lymphoid Tissue, BALT). Η ξηρότητα στους

αεραγωγούς μπορεί επίσης να οδηγήσει σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις αναπνευστικού λόγω μειωμένου καθαρισμού των βλεννογόνων, ιδίως των μικρών αεραγωγών. (31)

Η αναιμία χρόνιας νόσου, η λευκοπενία και η λεμφοπενία είναι οι πιο συχνές αιματολογικές εκδηλώσεις του Sjogren. Ενίοτε, μπορεί να προκληθεί αυτοάνοση ουδετεροπενία, αιμολυτική αναιμία, θρομβοπενία ή ακοκκιοκυτταραιμία. Κρυσφαιριναιμία μπορεί να προκύψει με ή χωρίς αγγειίτιδα. Μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS) έχει παρατηρηθεί σχεδόν στο 20% ασθενών με Sjogren όταν πραγματοποιείται ανοσοηλεκτροφόρηση ορού. (32) (33). Περίπου το 5% των ασθενών με μονοκλωνική γαμμαπάθεια μπορεί να προχωρήσει σε λέμφωμα ή άλλη αιματολογική κακοήθεια.

#### *Λεμφώματα:*

Η ανάπτυξη non-Hodgkin λεμφωμάτων Β-κυττάρων αποτελεί τη μεγαλύτερη επιπλοκή της νόσου και μπορεί να εμφανιστεί στο 5-7% των ασθενών, συνήθως εντός 10 ετών από τη διάγνωση. (11) (34) Ενίοτε, το λέμφωμα μπορεί να διαγνωστεί κατά την αρχική διάγνωση του Sjogren αλλά μπορεί να συμβεί έως και 36 χρόνια μετά την έναρξη της νόσου. Τα λεμφώματα στο Sjogren συνήθως παρουσιάζονται ως επίμονα διογκωμένοι σιελογόνοι αδένες (ειδικά στην παρωτίδα) αλλά μπορεί επίσης να εμφανιστούν σε λεμφαδένες ή εξωλεμφαδενικά σημεία του σώματος (π.χ. στόμαχος, πνεύμονες, ήπαρ, σπλήνας, οφθαλμικός κόγχος). Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε αύξηση σχεδόν 7 φορές στον κίνδυνο ανάπτυξης λεμφωμάτων σε ασθενείς με Sjogren σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. (35)

Τα λεμφώματα οριακής ζώνης (Marginal Zone Lymphomas), τα οποία μπορεί να είναι είτε λεμφαδενικά είτε εξωαδενικά (πχ. MALT λέμφωμα), είναι τα πιο συνηθισμένα, ακολουθούμενα από διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β κυττάρων (Diffuse Large B cell Lymphomas, DLBCL) (36) (37) Παράγοντες κινδύνου για λεμφογένεση αποτελούν η επίμονη διόγκωση των παρωτίδων, η σπληνομεγαλία, η λεμφαδενοπάθεια, η δερματική αγγειίτιδα, η νευροπάθεια, η μικτή μονοκλωνική κρυσφαιριναιμία, η CD4 T-λεμφοπενία και τα χαμηλά επίπεδα C4 στο συμπλήρωμα. (38) Τα βλαστικά κέντρα είναι θέσεις αυξημένης αποπτωτικής δραστηριότητας καθώς και παραγωγής αντισωμάτων. Η παρουσία βλαστικών κέντρων είναι επίσης ένας παράγοντας προδιάθεσης για λέμφωμα, ενώ βλαστικά κέντρα παρατηρούνται συχνά στις βιοψίες σιελογόνων αδένων.

Τα έκτοπα βλαστικά κέντρα είναι πιθανώς το σημείο εκκίνησης της λεμφογένεσης στο Sjogren, αντιπροσωπεύοντας την εκτεταμένη ανοσολογική εκτροπή κατευθυνόμενη από χημειοκίνες, κυτταροκίνες και γενετική προδιάθεση. Όταν τα βλαστικά κέντρα έχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τότε μπορεί να γίνει κατάργηση της ανοσιακής ανοχής με αποτέλεσμα την



παραγωγή αυτοδραστικών Β κυττάρων. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι για παράδειγμα ο φαινότυπος όμοιος με λεμφαδένα περιθωριακής ζώνης και η απουσία κάψας γύρω από το κέντρο, με αποτέλεσμα συνεχή έκθεση σε αντιγόνα, κυτταροκίνες και διεγερμένα κύτταρα.

Με τη βοήθεια των Τ κυττάρων, αυτά τα αυτοδραστικά Β κύτταρα πολλαπλασιάζονται ώστε να γίνουν ολιγοκλωνικά, με αποτέλεσμα την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι νεοπλαστικοί κλώνοι Β κυττάρων από λέμφωμα που σχετίζεται με Sjogren παράγουν συνήθως ρευματοειδή παράγοντα (RF, Rheumatoid Factor). Παραλλαγές σε διάφορα γονίδια έχουν περιγραφεί σε λέμφωμα που σχετίζεται με Sjogren. Αυτά περιλαμβάνουν το BAFF, το FMS-like tyrosine kinase 3 ligand και το TNFAIP3. (39) (40) (41)

Ο πιο συνηθισμένος τύπος λεμφώματος είναι το λέμφωμα από Β κύτταρα οριακής/περιθωριακής ζώνης (marginal zone B cell lymphoma) του λεμφικού ιστού σχετιζόμενου με βλεννογόνο που ακολουθείται από το διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β κυττάρων. Η μετατόπιση t(11, 18) έχει περιγραφεί σε ένα μικρό υποσύνολο των σχετιζόμενων με Sjogren MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue, MALT) λεμφωμάτων που δεν εκφράζουν RF. Τα λεμφώματα MALT αποκτούν περαιτέρω γενετικές παρεκκλίσεις, για παράδειγμα, απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53, p15 και p16 και στη συνέχεια μετατροπή σε λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (grade). (42)

Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, τον τύπο των κυττάρων του λεμφώματος, το στάδιο και τις σχετιζόμενες εξω-αδενικές εκδηλώσεις του Sjogren. Οι συχνότεροι κλινικοί και εργαστηριακοί παράγοντες κινδύνου για τη δημιουργία λεμφώματος είναι: α) επίμονο οίδημα παρωτίδας ή / και σκλήρυνση, β) ψηλαφητή πορφύρα, γ) χαμηλό συμπλήρωμα C3, C4 και δ) μικτή μονοκλωνική κρυσφαιριναιμία. Τα αναφερόμενα ποσοστά θνησιμότητας από λεμφώματα ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών ομάδων ασθενών, αλλά φτάνουν έως και 23-33%, αποτελώντας σημαντική αιτία θνησιμότητας. (38) (43)

#### *Αντιμετώπιση:*

Προς το παρόν δεν υπάρχει κάποια πλήρως αποτελεσματική θεραπεία για το Sjogren. Οι κύριοι στόχοι της αντιμετώπισης περιλαμβάνουν ανακούφιση των συμπτωμάτων, πρόληψη επιπλοκών, ύφεση των εξωαδενικών εκδηλώσεων και επιλογή ασθενών για ανοσοκατασταλτική θεραπεία με βάση την ενεργότητα, την έκταση και τη σοβαρότητα της ασθένειας.

Η εφαρμογή φθορίου τοπικά στη στοματική κοιλότητα, σε οποιαδήποτε μορφή, συνιστάται σε όλους τους ασθενείς με ξηροστομία για την πρόληψη των οδοντικών διαβρώσεων. Βοηθητική στις προχωρημένες περιπτώσεις είναι και η προσθήκη χλωρεξιδίνης σε αντιμικροβιακά στοματικά

διαλύματα ή / και διέγερση της ροής του σάλιου με παστίλιες χωρίς ζάχαρη ή με από του στόματος ουσίες με χολινεργικές ικανότητες που αυξάνουν την έκκριση σάλιου (π.χ. πιλοκαρπίνη, σιβιλίνη).

Όσον αφορά την ξηροφθαλμία, σε ήπιες έως μέτριας βαρύτητας περιπτώσεις, οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν τη χρήση τοπικών υποκατάστατων δακρύων, τοπικών τζελ για τον ύπνο και αλοιφές, σταγόνες με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της τοπικής κυκλοσπορίνης ή/και οφθαλμικές σταγόνες με κορτικοειδή) και/ή από του στόματος συμπληρώματα διατροφής με ωμέγα-3 λιπαρά οξέα.

Η χρήση φυσικών τεχνητών δακρύων συνιστάται για όλες τις περιπτώσεις. Σε ασθενείς με βλεφαρίτιδα μπορεί να προτιμώνται δάκρυα που περιέχουν λιπίδια. Η διαχείριση της βλεφαρίτιδας απαιτεί επίσης προσοχή στην υγιεινή των βλεφάρων, όπως η τακτική χρήση θερμών κομπρεσών και η εφαρμογή τοπικών αντιβιοτικών σταγόνων και/ή αλοιφών σε περιπτώσεις βλεφαρικών λοιμώξεων. (44)

Για περιπτώσεις μυοσκελετικών συμπτωμάτων, θεραπεία πρώτης εκλογής είναι η υδροξυχλωροκίνη, ακολουθούμενη από τη μεθοτρεξάτη ή, σε ανθεκτικές περιπτώσεις, συνδυασμό τους. Για τη θεραπεία ανθεκτικών περιπτώσεων, μπορεί να γίνει χρήση χαμηλής δόσης κορτικοστεροειδών (πρεδνιζόνη  $\leq 15$  mg / ημέρα). Η λεφλουνομίδη, η σουλφασαλαζίνη και η αζαθειοπρίνη θεωρούνται ότι έχουν ισοδύναμη αποτελεσματικότητα με τα στεροειδή, εκτός από περιπτώσεις σοβαρής εμπλοκής εσωτερικών οργάνων (π.χ. διάμεση πνευμονική νόσος, Interstitial Lung Disease) για την οποία προτιμάται η αζαθειοπρίνη. (45) Για την αντιμετώπιση της χρόνιας κόπωσης, ένα πολύ κοινό σύμπτωμα, έχει προταθεί και η συστηματική αερόβια άσκηση, η οποία έχει επιβεβαιωμένα οφέλη και σε άλλα ρευματολογικά νοσήματα.

Η θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες (μονοκλωνικά αντισώματα) θα πρέπει να εξετάζεται μόνο σε ασθενείς με σοβαρές εκδηλώσεις εσωτερικών οργάνων όταν τα πιθανά οφέλη ξεπερνούν τους πιθανούς κινδύνους και, όταν οι λιγότερο τοξικές και δαπανηρές ανοσοκατασταλτικές θεραπείες με προαναφερθέντες παράγοντες έχουν προηγουμένως δοκιμαστεί και αποτύχει. Υπάρχει μία σύσταση για θεραπεία με rituximab (αντι-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα) για τις ακόλουθες ενδείξεις: α) αγγειίτιδα με ή χωρίς κρυσφαιριναιμία, β) σοβαρό οίδημα της παρωτίδας, γ) φλεγμονώδης αρθρίτιδα, δ) πνευμονική νόσος και ε) επιλεγμένες περιπτώσεις περιφερικής νευροπάθειας. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι υπάρχει σύσταση κατά της χρήσης αναστολέων TNF- $\alpha$  στο Sjogren, εκτός από καταστάσεις όπου υπάρχουν αλληλεπικαλυπτόμενα χαρακτηριστικά με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

## *Συστηματική Σκλήρυνση (Σκληρόδερμα)*

### *Επιδημιολογία*

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μια σχετικά σπάνια ρευματολογική κατάσταση (σε σύγκριση με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα που προσβάλλει περίπου 1 στους 100 ανθρώπους). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, ο επιπολασμός της συστηματικής σκλήρυνσης έχει αναφερθεί σε 8,2 ανά 100.000. (46) Όπως πολλές άλλες ρευματολογικές καταστάσεις, οι γυναίκες επηρεάζονται συχνότερα από τους άνδρες, με αναφερόμενη αναλογία μεταξύ 3:1 έως 8:1 (47), ενώ μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, συμπεριλαμβανομένης της παιδικής ηλικίας, με μέγιστη ηλικία εμφάνισης μεταξύ 55 και 69 ετών (48). Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση νόσου σε προχωρημένη ηλικία, το ανδρικό φύλο και η Αφρικανική καταγωγή έχουν συσχετιστεί με μια πιο σοβαρή πορεία νόσου.

### *Παθογένεση*

Η αγγειακή νόσος πιστεύεται ότι παίζει κεντρικό ρόλο (και ενδεχομένως ακόμη και την έναρξη) στην παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης. Η συστηματική αγγειοπάθεια στη συστηματική σκλήρυνση χαρακτηρίζεται από προοδευτική αγγειοπάθεια με αναδιαμόρφωση των αγγείων, ειδικά των δακτυλικών και πνευμονικών αρτηριών και των τριχοειδών αγγείων. Πιθανότατα κάποιος προηγούμενος αγγειακός τραυματισμός (άγνωστης αιτίας) και μία παράλληλη τοπική δυσλειτουργία προκαλεί ισχαιμία του τοπικού ιστού που προάγει την ίνωση των ιστών. Η μετάβαση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες είναι ένα βασικό συμβάν στην παθογένεση και καθοδηγείται από έναν αριθμό παραγόντων που ευνοούν την ίνωση, ιδιαίτερα από τον TGF-β (Transforming Growth Factor-β) (49). Η έντονη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος αποδεικνύεται από την ανίχνευση ειδικών αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με τη συστηματική σκλήρυνση και την διήθηση Β και Τ λεμφοκυττάρων σε βιοψίες δέρματος ασθενών με διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση. Εκτός από τη συμμετοχή HLA γονιδίων στην παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης τα περισσότερα Non-HLA γονίδια που έχουν ενοχοποιηθεί συσχετίζονται κυρίως είτε με φλεγμονώδεις καταστάσεις (IFN, TNF) είτε με την αναδιαμόρφωση των ιστών μετά τη φλεγμονή με έναν μη ελεγχόμενο τρόπο (γονίδια του κολλαγόνου, TGF) (50)(51).

### *Φάσμα διαταραχών συστηματικής σκλήρυνσης*

Ο όρος «σκληρόδερμα» αναφέρεται σε πάχυνση του δέρματος. Αυτό μπορεί να είναι εντοπισμένο (π.χ. μορφέας ή γραμμικό σκληρόδερμα) ή μπορεί να συμβεί σε συνδυασμό με συμμετοχή των εσωτερικών οργάνων (συστηματική σκλήρυνση). Η συστηματική σκλήρυνση μπορεί να συμβεί σε αλληλοεπικάλυψη με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις του συνδετικού ιστού όπως το Sjögren η

μυοσίτιδα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ενώ ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων μπορεί να μιμηθεί τη συστηματική σκλήρυνση.

Πίνακας: Παθήσεις που μπορεί να μιμηθούν τη συστηματική σκλήρυνση	
Αυτοφλεγμονώδη/Αυτοάνοσα	Νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή, Νεφρογενής συστηματική ίνωση, Θυροειδοπάθεια, αμυλοείδωση, πορφύρα
Φαρμακευτικής/Χημικής αιτιολογίας	Χρήση L-τροπτοφάνης (σύνδρομο ηωσινοφιλίας-μυαλγίας), μπλεομυκίνη, καρβεντόπα, πενταζοσίνη
Έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες	Ίνωση από έκθεση σε ραδιενέργεια
Άλλα	Παρανεοπλασματικά σύνδρομα, σύνδρομα πρόωρης γήρανσης

[Ανατύπωση από Hughes et. al. British Journal of Hospital Medicine, September 2019, Vol 80, No 9 (52)]

Σε γενικές γραμμές, η διάγνωση της συστηματικής σκλήρυνσης είναι απίθανη απουσία του φαινομένου του Raynaud ή εάν η πάχυνση του δέρματος δεν επηρεάζει τα άκρα. Ωστόσο, το φαινόμενο του Raynaud μπορεί να συμβεί μετά την έναρξη του σκληρόδερματος σε ασθενείς με διάχυτη δερματική νόσο. Σπάνια, η συστηματική σκλήρυνση μπορεί να εμφανιστεί απουσία πάχυνσης του δέρματος αλλά με εμπλοκή των εσωτερικών οργάνων. Ασθενείς με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού μπορεί να εμφανίσουν χαρακτηριστικά φαινοτύπου συστηματικής σκλήρυνσης μαζί με χαρακτηριστικά συστηματικού ερυθματώδους λύκου, μυοσίτιδας και ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

#### *Διάγνωση και κλινικές εκδηλώσεις της συστηματικής σκλήρυνσης*

Δεν υπάρχει συγκεκριμένη διαγνωστική εξέταση για τη συστηματική σκλήρυνση. Η διάγνωση βασίζεται συνήθως σε κλινικά χαρακτηριστικά αλλά υποστηρίζεται έντονα από ευρήματα από εστιασμένες εξετάσεις, όπως είναι τα αντισώματα που σχετίζονται με τη συστηματική σκλήρυνση και η τριχοειδοσκόπηση νυχιών. Τα κριτήρια ταξινόμησης από τους οργανισμούς American College of Rheumatology και EULAR για τη συστηματική σκλήρυνση αποτελούν μία χρήσιμη μέθοδο για τη διάγνωση της συστηματικής σκλήρυνσης (53), ωστόσο, θεωρείται ότι δεν αποτελούν απόλυτα διαγνωστικά κριτήρια αλλά χρησιμοποιούνται κυρίως για να διευκολύνουν την κλινική έρευνα.

Πίνακας: Κριτήρια διάγνωσης της Συστηματικής Σκλήρυνσης	
Κριτήρια	Βαθμοί (>=9 για διάγνωση)
Πάχυνση του δέρματος στα δάκτυλα και των δύο χεριών, με επέκταση εγγύτερα από τις μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις	9
Πάχυνση του δέρματος στα δάκτυλα	2-4
Δακτυλικά έλκη	2-3
Τηλαγγειεκτασίες	2
Μη φυσιολογικά τριχοειδή ονύχων	2
Πνευμονική υπέρταση/Διάμεση πνευμονοπάθεια	2
Φαινόμενο Raynaud	2
Θετικοί τίτλοι αυτοαντισωμάτων Αντι-κεντρομεριδίου/Αντι-τοποισομεράσης I/Αντι-RNA πολυμεράσης III	3 (για οποιοδήποτε από τα τρία)

[Ανατύπωση από Hughes et. al. British Journal of Hospital Medicine, September 2019, Vol 80, No 9]

Η συστηματική σκλήρυνση χωρίζεται σε υποσύνολα: περιορισμένη και διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση, με βάση την κατανομή της πάχυνσης του δέρματος (54). Ο όρος «CREST» (επασβεστώσεις, φαινόμενο Raynaud, οισοφαγική δυσκινησία, σκληροδακτυλία και τελαγγειεκτασίες) χρησιμοποιείται γενικά για τους ασθενείς με περιορισμένη νόσο, αλλά ο όρος δεν είναι αποκλειστικός για αυτούς καθώς ασθενείς με διάχυτη νόσο μπορούν επίσης να αναπτύξουν αυτές τις εκδηλώσεις.

### *Δέρμα*

Η εμπλοκή του δέρματος μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της νόσου. Αρχικά τα δάκτυλα μπορεί να έχουν οίδημα και η πρώιμη διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση μερικές φορές λανθασμένα θεωρείται (και αντιμετωπίζεται ως) φλεγμονώδης αρθρίτιδα. Στη συνέχεια, το δέρμα υφίσταται προοδευτική ίνωση. Αργότερα στην ασθένεια, το δέρμα μπορεί να ατροφεί και να φαίνεται σχετικά φυσιολογικό εάν η διάγνωση καθυστερήσει.

Άλλες συχνές δερματικές εκδηλώσεις είναι οι τηλαγγειεκτασίες (διασταλμένα αιμοφόρα αγγεία του δέρματος και οι επασβεστώσεις (calcinosis), οι υποδόριες και/ή ενδοδερμικές εναποθέσεις ασβεστίου. Οι επασβεστώσεις είναι εύκολα εμφανείς σε απλή ακτινογραφία, αλλά μπορεί επίσης

να αξιολογηθούν χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές απεικόνισης (π.χ. αξονική τομογραφία). (55) Σημαντικός κνησμός, επίσης, παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με πρόωμη διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση, ενώ ο υπο- και ο υπερ-χρωματισμός του δέρματος μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στην εξωτερική εμφάνιση των ασθενών.

#### *Φαινόμενο Raynaud*

Πάνω από το 95% των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση αναφέρει προσβολή από το φαινόμενο Raynaud, το οποίο μπορεί να εμφανιστεί πολλά χρόνια (ακόμη και δεκαετίες) πριν ή με την έναρξη της πάχυνσης του δέρματος. Το φαινόμενο παρουσιάζεται ως επεισόδια αλλαγής χρώματος ή/και αισθητηριακών συμπτωμάτων που προκαλούνται από έκθεση σε ψύχος ή/και συναισθηματικό στρες. Συνήθως επηρεάζονται τα δάχτυλα, αλλά μπορεί να εμπλέκονται και άλλες περιοχές, όπως τα χείλη και τα αυτιά. Το χρώμα του δέρματος μετατρέπεται από λευκό (ισχαιμία) σε μπλε (αποοξυγόνωση) και έπειτα σε κόκκινο (υπεραιμία) σε επαναλαμβανόμενους κύκλους. Δακτυλικά έλκη εμφανίζονται συχνά στη συστηματική σκλήρυνση, με τους μισούς ασθενείς να αναφέρουν έστω και ένα συμβάν (50).

#### *Καρδιαγγειακά και αναπνευστικά*

Η καρδιαγγειακή εμπλοκή είναι συχνή στη συστηματική σκλήρυνση και μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή. Η πρωτογενής καρδιακή εμπλοκή (ανωμαλίες του συστήματος αγωγής) είναι συχνά υποκλινική (56) ενώ έχει αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος αθηροσκληρωτικής νόσου (57). Η καρδιακή νόσος μπορεί να εμφανιστεί δευτερογενώς από άλλες επιπλοκές που σχετίζονται με τη συστηματική σκλήρυνση (π.χ. πνευμονική αρτηριακή υπέρταση). Επιπλοκές από το αναπνευστικό (πνευμονική ίνωση και πνευμονική υπέρταση) είναι σήμερα η κύρια αιτία θανάτου. Στοιχεία διάμεσης πνευμονικής νόσου μπορούν να βρεθούν σε περίπου 80% των ασθενών, αλλά είναι μόνο κλινικά σημαντικά στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών. (58)

#### *Γαστρεντερικό*

Η πλειονότητα (περίπου 90%) των ασθενών έχει γαστρεντερική εμπλοκή και αυτό μπορεί να επηρεάσει το σύνολο της οδού από το στόμα έως τον πρωκτό. Οι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με μειωμένη οισοφαγική κινητικότητα ή γαστροπάρεση. Επιπρόσθετα, συμπτώματα δυσφαγίας και γαστρεντερικής παλινδρόμησης είναι κοινά σε πολλούς ασθενείς. Αιμορραγία μπορεί, επίσης, να συμβεί από αγγειεκτασίες του στομάχου. Ο υποσιτισμός είναι συχνός και συχνά πολυπαραγοντικός, συμπεριλαμβανομένου του μειωμένου στοματικού ανοίγματος και της μειωμένης λειτουργίας του άνω άκρου ή της κινητικής επιδεξιότητας των ασθενών. Οι ασθενείς μπορούν να αναπτύξουν δυσαπορρόφηση, συμπεριλαμβανομένης της

δευτερογενούς λόγω βακτηριακής υπερανάπτυξης του λεπτού εντέρου. Η ακράτεια κοπράνων είναι επίσης συχνή.

### *Νεφρικό*

Οι σοβαρές επιπλοκές από νεφρική επιπλοκή ήταν παλαιότερα η κύρια αιτία θανάτου σε άτομα με συστηματική σκλήρυνση. Η νεφρική κρίση του σκληροδέρματος εμφανίζεται συνήθως ως υπέρταση (π.χ. οξύ πνευμονικό οίδημα και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία) με νεφρική ανεπάρκεια, επηρεάζοντας το 5-10% των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. (59)

### *Μυοσκελετικό*

Το μυοσκελετικό σύστημα επηρεάζεται πολλές φορές σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, με τις εκδηλώσεις να κυμαίνονται από μη ειδική αρθραλγία και μυαλγία έως αρθρίτιδα και μυοσίτιδα αντίστοιχα. Το σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με πρόιμη (διάχυτη) νόσο και μερικές φορές είναι η πρώτη εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης, ακόμα και χωρίς Raynaud.

### *Εξετάσεις*

Οι ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση θα πρέπει να υποβάλλονται σε τακτική (συνήθως ετήσια) καρδιοαναπνευστική εξέταση (διαθωρακικός υπέρηχος καρδιάς και λειτουργικές εξετάσεις πνευμονικής λειτουργίας) για να διευκολύνουν την έγκαιρη διάγνωση της διάμεσης πνευμονικής νόσου ή/και της πνευμονικής υπέρτασης.

Ανάμεσα στις βασικές εξετάσεις για τη διάγνωση της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με τη συστηματική σκλήρυνση και η τριχοειδική εξέταση των νυχιών. Η συντριπτική πλειονότητα (> 95%) των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση είναι θετική ως προς τα αντιπυρηνικά αντισώματα. (60) Ειδικά αυτοαντισώματα που σχετίζονται με συστηματική σκλήρυνση παρατηρούνται σε τουλάχιστον τους μισούς ασθενείς και έχουν προγνωστικούς συσχετισμούς.

<b>Αντίσωμα</b>	<b>Κλινικός Συσχετισμός</b>
Αντικεντρομερές αντίσωμα	Συνδέεται με περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση και πνευμονική υπέρταση. Προστατευτικό έναντι της πνευμονικής ίνωσης

Αντίσωμα κατά της τοποϊσομεράσης (αντι-Scl-70)	Συνδέεται με διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση, πνευμονική ίνωση
Αντίσωμα αντι-RNA πολυμεράσης III	Συνδέεται με διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση και νεφρική κρίση σκληροδέρματος

Πίνακας: Αντισώματα που σχετίζονται με τη Συστηματική Σκλήρυνση και κλινικές συσχετίσεις [Ανατύπωση από Hughes et. al. British Journal of Hospital Medicine, September 2019, Vol 80, No 9]

Μπορούν επίσης να παρατηρηθούν αντισώματα μη ειδικών εκχυλίσμων πυρηνικών αντιγόνων (Extractable Nuclear Antigen Antibodies, ENA) που παρατηρούνται και σε άλλες νόσους του συνδετικού ιστού ή σε ρευματολογικές καταστάσεις. Η τριχοειδοσκόπηση των νυχιών είναι μια μη επεμβατική τεχνική απεικόνισης της μικροκυκλοφορίας. Στο νύχι, τα τριχοειδή βρίσκονται παράλληλα με την επιφάνεια του δέρματος και όχι κάθετα όπως σε άλλα σημεία, επιτρέποντας την εξέταση των τριχοειδών στο σύνολό τους. Σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, οι μικροαγγειακές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν διευρυμένα («γιγαντιαία») τριχοειδή αγγεία, μικροαιμορραγίες, μείωση αριθμού τριχοειδών και νεοαγγειογένεση.

#### Θεραπευτική αντιμετώπιση

Υπάρχει πλέον ένα ευρύ φάσμα αποτελεσματικών θεραπειών για πολλές επιπλοκές της συστηματικής σκλήρυνσης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δρουν στο αγγειακό σύστημα (π.χ. αγγειοδιασταλτικά φάρμακα για αγγειακή νόσο) και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη ρευματολογία για ορισμένες επιπλοκές, όπως σε περίπτωση διάμεσης πνευμονοπάθειας και μυοσίτιδας. Η πρόιμη διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση αποτελεί προτεραιότητα που συνήθως αντιμετωπίζεται με ανοσοκαταστολή. (61) (62)

Η αυτόλογη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων είναι μια πολλά υποσχόμενη πιθανή θεραπεία για συστηματική σκλήρυνση (63), με σταθεροποίηση ή ακόμα και βελτίωση των συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των δερματικών και πνευμονικών παθήσεων. Ωστόσο, λόγω της πιθανότητας θνησιμότητας που σχετίζεται με τη θεραπεία (περίπου 5%), οι ασθενείς πρέπει να υποβληθούν σε εκτεταμένες εξετάσεις πριν από τη μεταμόσχευση, κυρίως για να αποκλειστεί οποιαδήποτε ένδειξη πιθανής καρδιακής επιπλοκής.

Σύστημα οργάνων	Κλινική εκδήλωση	Παραδείγματα
-----------------	------------------	--------------



		θεραπειών
Δέρμα	Σκληρόδερμα	Ανοσοκατασταλτική θεραπεία (π.χ. μεθοτρεξάτη και μυκοφαινολάτη μοφετύλη)
Μυοσκελετικό	Φλεγμονώδης αρθρίτιδα	Ανοσοκατασταλτική θεραπεία (π.χ. μεθοτρεξάτη)
Καρδιαγγειακό	Καρδιαγγειακή ανεπάρκεια	Αναστολείς ενζύμων μετατροπής αγγειοτενσίνης και διουρητικά
	Φλεγμονώδης καρδιακή νόσος	Ανοσοκατασταλτική θεραπεία (π.χ. κορτικοστεροειδή ή/και κυκλοφωσφαμίδη)
Αναπνευστικό	Πνευμονική Υπέρταση	Ανταγωνιστές υποδοχέα ενδοθηλίνης, αναστολείς φωσφοδιεστεράσης τύπου 5, ανάλογα προστακυκλίνης
	Διάμεση πνευμονοπάθεια	Διαλυτοί αγωνιστές της γουανυλικής κυκλάσης, ανσοκατασταλτική θεραπεία (π.χ. κυκλοφωσφαμίδη και μυκοφαινολάτη μοφετύλ)
Γαστρεντερική νόσος	Γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση	Συμβουλές αλλαγής τρόπου ζωής, αναστολείς αντλίας πρωτονίων
Περιφερική κυκλοφορία	Φαινόμενο Raynaud	Αναστολείς διαύλων ασβεστίου, αναστολείς

			φωσφοδιεστεράσης τύπου 5, αποκλειστές υποδοχέα αγγειοτενσίνης II Ανταγωνιστές υποδοχέα ενδοθηλίνης, ανάλογα προστακυκλίνης (π.χ. ενδοφλέβια iloprost), φροντίδα τραυμάτων για δακτυλικά έλκη, αντιβιοτική θεραπεία για μολυσμένα έλκη, χειρουργικός καθαρισμός ή ακρωτηριασμός
Νεφρικό	Δακτυλικά έλκη και Ισχαιμία	Νεφρική κρίση σκληροδέρματος	Αναστολείς ενζύμου μετατροπής αγγειοτενσίνης

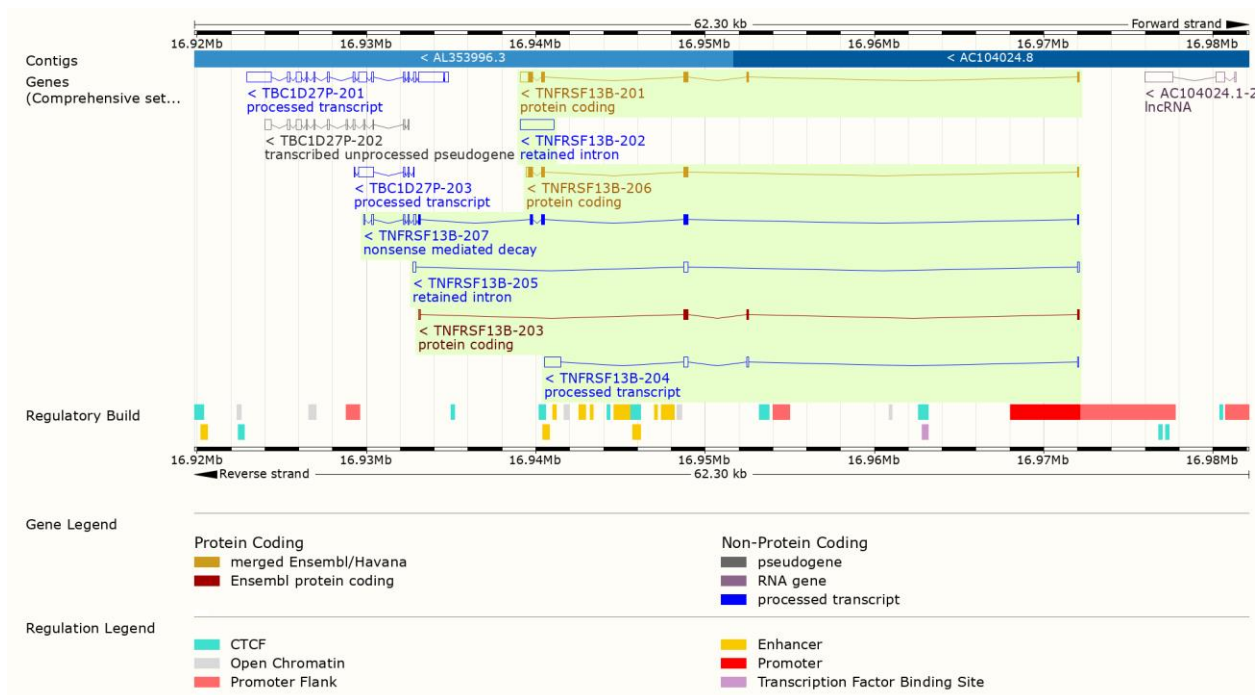
Πίνακας: Θεραπευτικές επιλογές στο Σκληρόδερμα στοχευμένες ανά σύστημα [Ανατύπωση από Hughes et. al. British Journal of Hospital Medicine, September 2019, Vol 80, No 9]

## Το γονίδιο TACI

### A. Πρωτεΐνες APRIL, BAFF και οι υποδοχείς τους

Τα μέλη της οικογένειας TNF APRIL (a proliferation-inducing ligand) και BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) συνδέονται με δύο υποδοχείς, το BCMA (B cell maturation antigen) και το TACI (Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor), τα οποία είναι μέλη της οικογένειας TNF-R. Το BCMA εκφράζεται αποκλειστικά σε B κύτταρα, ενώ το TACI εκφράζεται τόσο σε B κύτταρα και πλασματοκύτταρα, όσο και σε ενεργοποιημένα T κύτταρα, ενώ η έκφρασή του έχει βρεθεί και σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα. (64)

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα ο γενετικός τόπος του TACI βρίσκεται στον βραχίονα του χρωμοσώματος 17, αποτελείται από 5 εξόνια και εκφράζεται με 7 διαφορετικά πιθανά μετάγραφα. Το εξωκυτταρικό N-τελικό κομμάτι της πρωτεΐνης TACI χαρακτηρίζεται από δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (cysteine-rich domains, CRDs) που είναι χαρακτηριστικό για την υπεροικογένεια TNFR. Το πρώτο TACI CRD εκτείνεται από το αμινοξύ 32 έως το 67 και το δεύτερο εκτείνεται από το 68 έως το 106 και δεσμεύει τις πρωτεΐνες APRIL και BAFF με υψηλή συγγένεια.



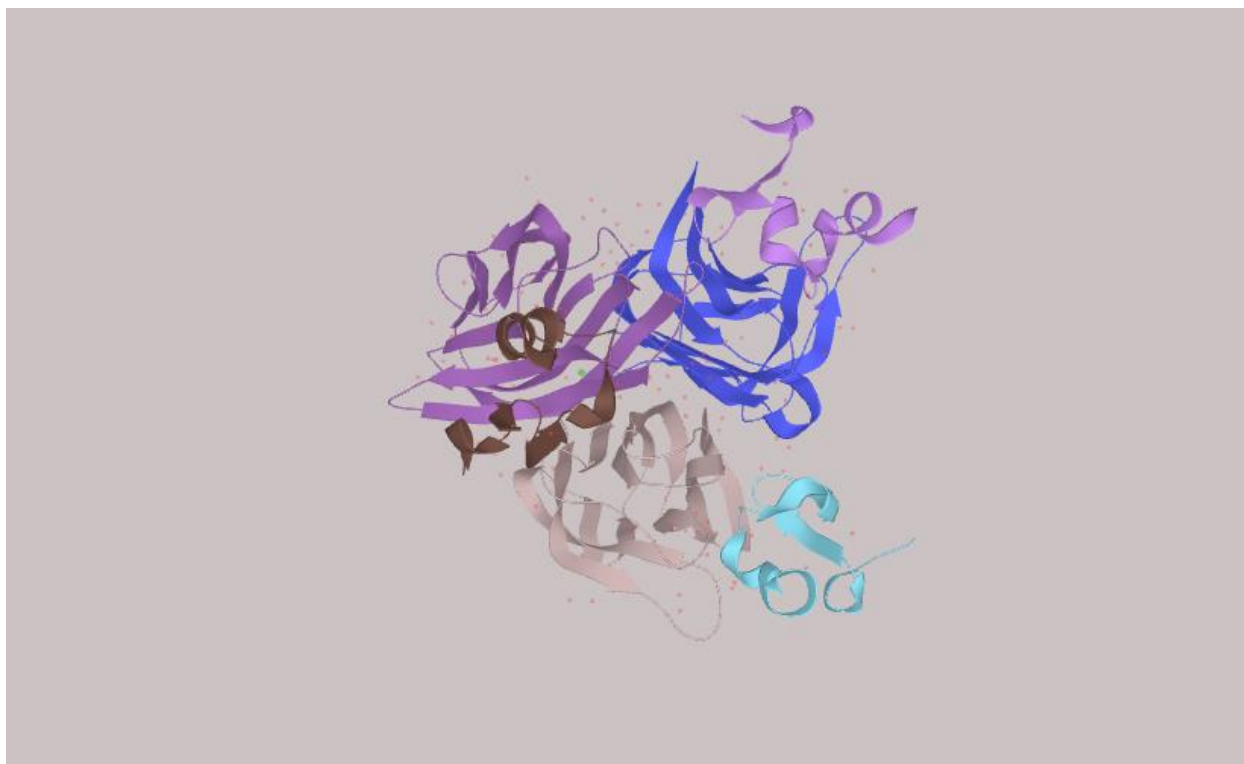
Εικόνα: Μετάγραφα του γονιδίου TACI [Πηγή: Ensemble.org, “Gene: TNFRSF13B“]

Ο υποδοχέας BAFF-R, ο οποίος είναι μοναδικός για το BAFF, εκφράζεται κυρίως σε Β κύτταρα, αλλά και σε μη ενεργοποιημένα Τ κύτταρα. Επιπλέον, τα TACI και APRIL αλλά όχι ο BAFF, δεσμεύονται με πρωτεογλυκάνες στην κυτταρική επιφάνεια, συμπεριλαμβανομένου του syndecan-1 (CD138), το οποίο εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε πλασματοκύτταρα. Αυτή η δέσμευση θεωρείται σημαντική για τον πολυμερισμό του APRIL. (65)

Το BAFF ενισχύει την επιβίωση των Β κυττάρων. Τα ποντίκια με ανεπάρκεια BAFF έχουν σοβαρή ανεπάρκεια στην ανάπτυξη των Β κυττάρων τους (66), πολύ χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών στον ορό και εξασθενημένη ειδική απόκριση σε θυμοεξαρτώμενα (εξαρτώμενα από Τ κύτταρα) και θυμοανεξάρτητα (ανεξάρτητα από Τ κύτταρα) αντιγόνα, ενώ το APRIL δεν έχει ανιχνεύσιμη επίδραση στην επιβίωση των Β κυττάρων.

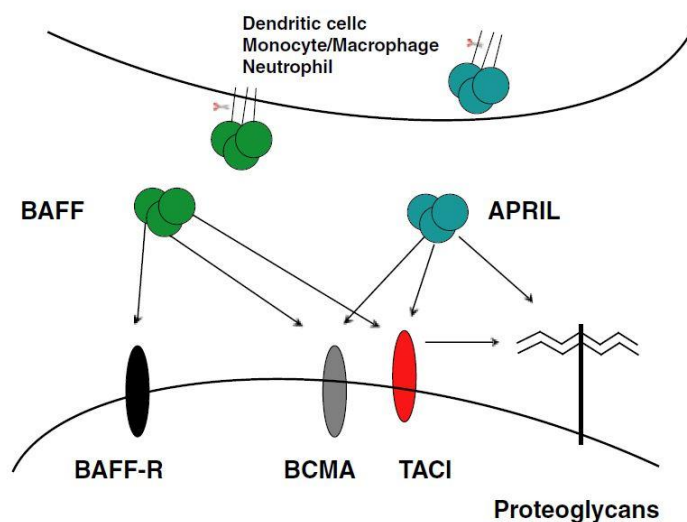
### TACI

Ο υποδοχέας TACI δεσμεύει τόσο το APRIL όσο και το BAFF και εκφράζεται κυρίως σε ώριμα Β κύτταρα και πλασματοκύτταρα (67). Τα BAFF και APRIL δεσμεύουν το TACI μόνο όταν παρουσιάζονται ως ολιγομερές ή βρίσκονται συνδεδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη. (68)



Εικόνα: Η πρωτεΐνη TACI σε τρισδιάστατη δομή [Πηγή: Uniprot.org (69)]

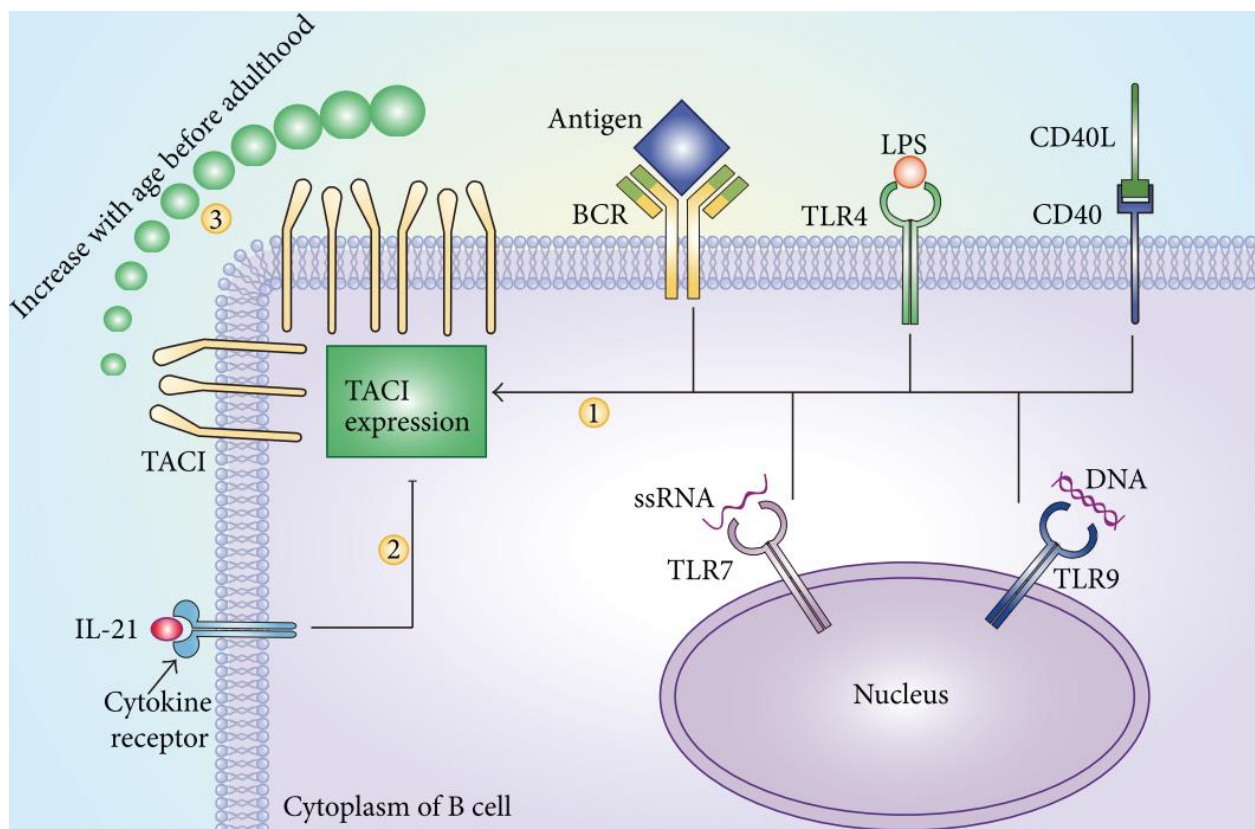
Το πολυμερές BAFF αλληλοεπιδρά τόσο με το TACI όσο και με το BAFF-R σε μη ενεργοποιημένα B κύτταρα, B κύτταρα οριακής ζώνης και B κύτταρα σε βλαστικά κέντρα, ενώ το πολυμερές APRIL μπορεί να δεσμεύσει τόσο το BCMA όσο και το TACI σε πλασματοκύτταρα. Η έκφραση του TACI αυξάνεται με την ηλικία μέχρι την εφηβεία, κάτι που ίσως να υποδηλώνει την εδραίωση των B κυττάρων οριακής ζώνης στους λεμφαδένες. (70) Η έκφραση του TACI αυξάνεται σε ενεργοποιημένα B κύτταρα, ιδιαίτερα ως απόκριση σε συνδέτες των υποδοχέων TLR (Toll-like Receptors). (71)



Εικόνα: Σύνδεση του TACI με τους συνδέτες BAFF, APRIL [Ανατύπωση από Castigli E. et al TACI, isotype switching, CVID and IgAD, Immunologic Research 2007 (72)]

Η πρωτεΐνη TACI έχει επίσης την ικανότητα να δεσμεύει τα μόρια TRAF2, TRAF5 και TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor, TRAF) στο εσωτερικό του κυττάρου, αλλά και να ενεργοποιήσει το μόριο NF-κB (Nuclear Factor-κB), ένα πολύ σημαντικό σηματοδοτικό μόριο για την έναρξη της φλεγμονής, με τρόπο που εξαρτάται από το μονοπάτι MyD88 / IRAK4. (73) Το MyD88 και το TRAF2 συνδέονται στην ίδια περιοχή του TACI και ενεργούν συνεργατικά για την ενεργοποίηση του NF-κB, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μίας φλεγμονώδους κατάστασης.

Ο TRAF6 είναι σημαντικός στη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων, μία ακόμα ένδειξη για το ρόλο του TACI στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Η έκφραση του TACI, επίσης βοηθάει στην θυμοανεξάρτητη μεταστροφή υποτύπου αντισωμάτων (Class Switch Recombination), μία λειτουργία η οποία όταν υπολείπεται λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου οδηγεί σε ανοσοανεπάρκειες, όπως περιγράφεται παρακάτω. (74) Η πρωτεΐνη TACI αλληλεπιδρά, επίσης, με μοναδικό τρόπο με τον παράγοντα CAML (calcium modulating cyclophilin ligand), ο οποίος ρυθμίζει θετικά την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης, μιας φωσφατάσης εξαρτώμενης από ασβέστιο, η οποία αποφωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον NF-AT (nuclear factor of activated T cells) (75).



Εικόνα: Παράγοντες ρύθμισης έκφρασης του TACI [Ανατύπωση από Zhang Y et al, Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases, Journal of Immunology Research. Hindawi Limited 2015 (76)]

### TACI και COVID

Το CVID (Common Variable Immune Deficiency, Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια) είναι ένα από τα πιο κοινά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας και χαρακτηρίζεται από μείωση της παραγωγής αντισωμάτων και συγκεκριμένα IgG, IgA και IgM, με αποτέλεσμα την ελλιπή ανοσιακή απόκριση στον εμβολιασμό ή σε έκθεση σε παθογόνα.

Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς με CVID είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε λοιμώξεις, ιδίως εκείνες της αναπνευστικής οδού. Άλλες ανοσολογικές διαταραχές, όπως η εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων επηρεάζουν περίπου το 20% των ασθενών με CVID. Η αιτιολογία του CVID φαίνεται να συνδέεται με διάφορα γενετικά ελαττώματα που επηρεάζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος όπως μεταλλάξεις ή διαγραφή ενός αριθμού γονιδίων που είναι σημαντικά για τη λειτουργία των Β κυττάρων, με παραδείγματα τους παράγοντες ICOS (Inducible Costimulator), CD19, CD81 και CD20.

Πολλές πρόσφατες μελέτες, μερικές από τις οποίες προέρχονται από το εργαστήριο ανοσολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, έχουν εντοπίσει μια σειρά από μεταλλάξεις στο γονίδιο TACI που βρέθηκαν περίπου στο 8-10% ασθενών με CVID αλλά και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα όπως Σαρκοείδωση (77) (78) (79) (80).

Ομοζυγωτία για τις μεταλλάξεις C104R, A181E και S144X του γονιδίου TACI έχει επιβεβαιωθεί σε έναν αριθμό ασθενών με CVID, όπως επίσης και ετεροζυγωτία για τις μεταλλάξεις C104R, A181E, S194X και R202H. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις είναι η C104R που επηρεάζει το εξωκυτταρικό μέρος του TACI και η A181E, η οποία βρίσκεται στο διαμεμβρανικό τμήμα, με την ετεροζυγωτία να είναι πιο συχνή από την ομοζυγωτία. Τα ποντίκια που δεν έχουν έκφραση του TACI εμφανίζουν διαταραχές που μοιάζουν με τις διαταραχές σε ασθενείς με CVID, όπως μειωμένα επίπεδα IgA και μειωμένη απόκριση σε T-ανεξάρτητα αντιγόνα (81). Πιστεύεται ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TACI δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που συμβάλλει στην εμφάνιση του CVID αλλά μπορεί να τη διευκολύνει σε συνδυασμό με άλλους συντελεστές.

#### *TACI και Αυτοανοσία*

Οι μεταλλάξεις του TACI σε ασθενείς με CVID συσχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία σε αυτοάνοσες διαταραχές. Το TACI ρυθμίζει τη λειτουργία των μορίων BCR, TLR7 και TLR9, τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στην αναγνώριση των αυτο-αντιγόνων και στην κεντρική ανοσιακή ανοχή των Β κυττάρων. Επομένως, οι μεταλλάξεις στο TACI εξασθενούν την κεντρική ανοχή των Β κυττάρων, με αποτέλεσμα την αδυναμία αφαίρεσης αυτοαντιδραστικών κλώνων οι οποίοι στη συνέχεια μπορεί να ξεκινήσουν έντονες φλεγμονώδεις απαντήσεις ενάντια σε ιστούς-στόχους. (82) Σε υγιή άτομα που φέρουν μεταλλάξεις του TACI, η φυσιολογική περιφερική ανοχή μπορεί να αντισταθμίσει ελαττώματα στην κεντρική ανοχή. Επομένως, αυτά τα άτομα φαίνεται να μην είναι

περισσότερο επιρρεπείς σε αυτοάνοσες ασθένειες. Ασθενείς με CVID, ωστόσο, εμφανίζουν διαταραχές στους μηχανισμούς περιφερικής ανοχής. Τα επίπεδα του BAFF είναι αυξημένα σε ασθενείς με CVID, ενώ τα επίπεδα των ρυθμιστικών T κυττάρων είναι μειωμένα. (83) (84) Σε ασθενείς με CVID που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο TACI, η περιφερειακή ανοχή δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσει τα ελαττώματα της κεντρικής ανοχής με αποτέλεσμα αυξημένη επιρρέπεια σε αυτοάνοσες ασθένειες.

Επιπλέον, επειδή το TACI προωθεί τη διαφοροποίηση και επιβίωση των πλασματοκυττάρων, ομόζυγες μεταλλάξεις στο TACI έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της λειτουργίας του, άρα και την αδυναμία διατήρησης συνεχούς παραγωγής αυτοαντιδραστικών αντισωμάτων. (85) Αντιθέτως, στις ετερόζυγες μεταλλάξεις παρόλο που υποβαθμίζεται η λειτουργία του TACI, αυτή δεν χάνεται εντελώς και επαρκεί για να διατηρηθεί η έκφραση στα B κύτταρα και η διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Για το λόγο αυτό συμβαίνει το παράδοξο ότι οι ασθενείς με CVID με ετερόζυγες μεταλλάξεις στο TACI είναι επιρρεπείς σε αυτοάνοσες ασθένειες, ενώ οι ασθενείς με ομόζυγες μεταλλάξεις φαίνεται να εμφανίζουν μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης των νόσων. (86)

#### *Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TACI στο σύνδρομο Sjogren και τη Συστηματική Σκλήρυνση*

Η συγκεκριμένη μελέτη εστιάζει στο ρόλο των B κυττάρων στην παθογένεση των υπό διερεύνηση νοσημάτων, και ειδικότερα στη σημασία του γονιδίου TACI και του σηματοδοτικού μονοπατιού του. Μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι του BAFF εμπλέκονται στην υπερδραστηριότητα των B κυττάρων στο Sjogren. Ύστερα από διέγερση από ιντερφερόνες, το BAFF παίζει ρόλο στην ωρίμανση των B κυττάρων, την αλλαγή τάξης, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Αυτές οι επιδράσεις είναι πιο έντονες στα αυτοαντιδραστικά B κύτταρα.

Αυξημένη έκφραση του BAFF παρατηρείται σε αρκετές αυτοάνοσες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης του Sjogren, με τα επίπεδά της να συσχετίζονται με τους τίτλους των σχετικών αυτοαντισωμάτων. (87) Αν και η βιβλιογραφία είναι αρκετά πιο περιορισμένη όσον αφορά την παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης, υπάρχουν ορισμένες μελέτες που υποστηρίζουν την συμμετοχή του BAFF ως παράγοντα που ευνοεί τόσο τη φλεγμονή όσο και την ίνωση, ενώ έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό ασθενών τα οποία, σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, μειώνονται ύστερα από φαρμακευτική θεραπεία. (88)(89)(90)

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Σκοπός της Μελέτης

Ο ρόλος του γονιδίου TAC1 σε αυτοάνοσες παθήσεις όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος έχει εκτενώς μελετηθεί στη βιβλιογραφία, κάτι που φαίνεται από το γεγονός ότι πολλές αναδυόμενες θεραπείες στοχευμένες στο σηματοδοτικό μονοπάτι του βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια κλινικών ερευνών. Παρόλο που το Sjogren και ο Ερυθηματώδης Λύκος μοιράζονται αρκετά στοιχεία ως προς την παθογένεση και τις κλινικές εκδηλώσεις, δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος του TAC1 στο Sjogren. Τα τελευταία χρόνια φαίνεται σταδιακά να αυξάνεται το ερευνητικό ενδιαφέρον για αυτή την σύνδεση, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την έναρξη κλινικής μελέτης στην Κίνα το 2019 για τη χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TAC1 σε ασθενείς με Sjogren. (91) Αντίθετα, δεν υπάρχει καμία μελέτη μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία που να συνδέει το γονίδιο TAC1 και την πρωτεΐνη που εκφράζει με τη συστηματική σκλήρυνση.

Σύμφωνα με την εδραιωμένη εμπειρία του εργαστηρίου Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη διερεύνηση μεταλλάξεων του γονιδίου σε ασθενείς με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, αποφασίσαμε να μελετήσουμε γενετικό υλικό από ασθενείς με Sjogren και συστηματική σκλήρυνση για πιθανές μεταλλάξεις στο γονίδιο TAC1. Η επιλογή μας να συμπεριλάβουμε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση βασίστηκε στο γεγονός ότι σε τυχαίο διαγνωστικό έλεγχο του εργαστηρίου πριν μερικά χρόνια είχαν βρεθεί μεταλλάξεις σε δύο ασθενείς. Τα δεδομένα των δύο αυτών ασθενών συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη.

### Ασθενείς

Σε συνεργασία με τη Ρευματολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας, έγινε η συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος από ασθενείς με Sjogren, καθώς και καταγραφή των κλινικών δεδομένων από τους ιατρικούς φακέλους τους. Στη συνέχεια έγινε παραλαβή υλικού DNA που είχε απομονωθεί από ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση μαζί με τα κλινικά τους δεδομένα. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Χαρακτηριστικά Ασθενών	Ασθενείς με Sjogren	Ασθενείς με Σκληρόδερμα
Συνολικός Αριθμός	30	46
Φύλο (Α: Άνδρες, Γ: Γυναίκες)	3 Α, 27 Γ	7 Α, 39 Γ



Μέση Ηλικία (Εύρος)	63 (40-86)	65 (45-80)
------------------------	------------	------------

Αρχικά έγινε η συγκέντρωση φιαλιδίων περιφερικού αίματος από τους ασθενείς σε συνεργασία με τη Ρευματολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και το αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας. Έπειτα, από το αίμα έγινε απομόνωση DNA με χρήση του PureLink® Genomic DNA Kit (Qiagen & Invitrogen). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του παρασκευάσματος, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

#### *Απομόνωση DNA*

1. Σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1.5 mL προστίθενται 200 μL περιφερικού αίματος.
2. Προστίθεται 20 μL πρωτεϊνάσης K και 20 μL RNAάσης και στη συνέχεια ανάδευση και επώαση για 2 min.
3. Προστίθενται 200 μL διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer) και έπειτα ανάδευση.
4. Κατόπιν, τα διαλύματα επωάζονται στους 55o C για 40-60 min.
5. Προστίθενται 200 μL αιθανόλης 96-100% και γίνεται μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column).
6. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 1 min ακολουθούμενη από δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 1 min και στα 13.400 rpm για 3 min
7. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1,5 mL όπου και προστίθενται 100 μL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 13.400 rpm για 1 min.
8. Διατήρηση των δειγμάτων στους -20 βαθμούς έως την χρήση τους

#### *PCR για το γονίδιο TNFRSF13B/TACI*

Για τη μελέτη του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές σχεδιασμένοι από το εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του τμήματος ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη βοήθεια του προγράμματος Oligo-6 software (NBI, Plymouth, MN, USA) οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση σε γονιδιακές μελέτες του εργαστηρίου για τη μελέτη ασθενών με Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Εξόνιο του γονιδίου TACI	Αλληλουχία εκκινητών
Exon 1	Sense: 5'-gggTgTggCTgATTTACATCC-3' Antisense: 5'-CCAgAggCATCCAgACTCg-3'
Exon 2	Sense: 5'-AAAggTTgTCTgTgCgAATgT-3' Antisense: 5'-CCAgAgggTgCTCTAgggAg-3'
Exon 3	Sense: 5'-ATCAAAATgCAATgCAgCTAAA-3' Antisense: 5'-AgACTTCTggAAATgTTgCCTA-3'
Exon 4	Sense: 5'- ggggggAgTggATCAAC-3' Antisense: 5'- gTCTgCCAggATgTCTTAACC-3'
Exon 5	Sense: 5'- TggCAgACAgATAACT-3' Antisense: 5'- CTCTCTCCTCATATCTCTC-3'

Για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Veriti 96 well Thermal cycler AB Applied Biosystems. Σε κάθε δείγμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο σαν αρνητικός μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank). Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση ήταν η DFS Taq Polymerase™.

	<b>TACI EX 1, 2, 3</b>	<b>TACI EX 4</b>	<b>TACI EX 5</b>
<b>Πολυμεράση</b>	DFS	DFS	DFS
<b>Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)</b>	94C 2min	94C 2min	96C 2min
<b>Αποδιάταξη (Denaturation)</b>	94C 30 sec	94C 30 sec	96C 30 sec
<b>Υβριδισμός (Annealing)</b>	62C 30 sec	62C 30 sec	55C 30 sec
<b>Επέκταση (Extension)</b>	72C 30 sec	72C 30 sec	72C 30 sec
<b>Αριθμός Κύκλων</b>	31	36	32
<b>Τελική επέκταση (Final Extension)</b>	72C 5 min	72C 5 min	72C 5 min

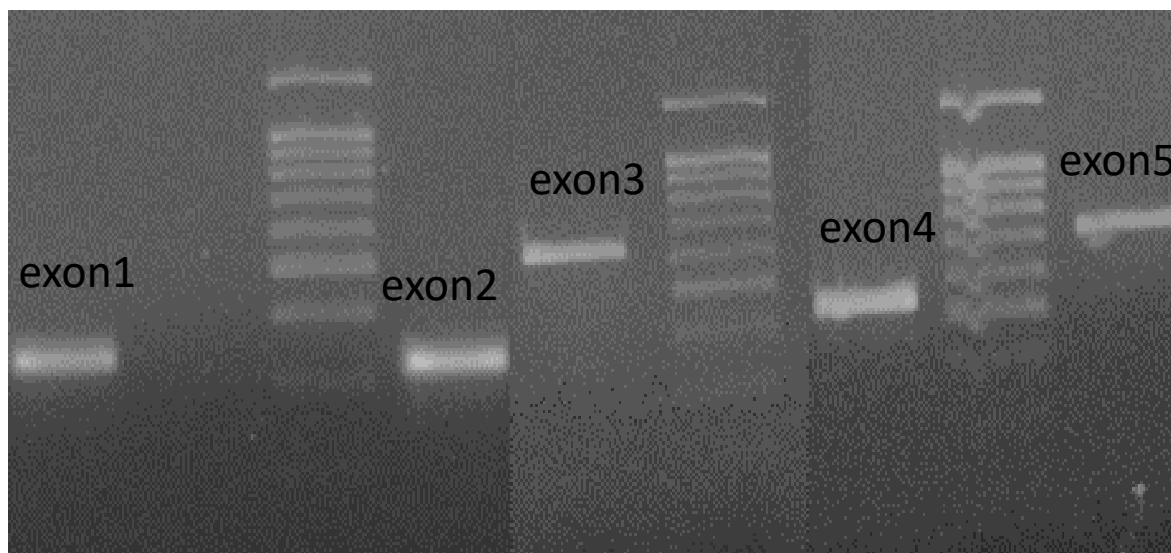
Συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 5 εξονίων του TNFRSF13B/TACI

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

#### *Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αγαρόζης*

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς και των καθαρισμένων προϊόντων έγινε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης [2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE]. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA, έγινε προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε δείγμα DNA προστέθηκε διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μL δείγματος, 1 μL χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η κίνησή τους πάνω στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της γέλης και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων έγινε χρήση του μάρτυρα μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.



Φωτογραφίες από τα PCR προϊόντα των 5 Εξονίων του γονιδίου TAC1

#### *Καθαρισμός των Προϊόντων της PCR*

Πριν την τελική διαδικασία της αλληλούχισης, τα προϊόντα της PCR πρέπει να καθαριστούν από εκκινητές, περίσσεια νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων. Ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση των

Extract ME DNA Clean-up kit της Blirt DNA GDANSK και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/Invitrogen).

Η διαδικασία ακολουθεί το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR, σε όγκο διπλάσιο από αυτόν του προϊόντος (~75 µL)
2. Μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit)
3. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης
4. Πρώτη πλύση της στήλης με προσθήκη 700 µL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer)
5. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec
6. Δεύτερη πλύση της στήλης με προσθήκη 700 µL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer)
7. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec
8. Φυγοκέντρηση (11.000 στροφές για 3 min), χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, για απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης.
9. Μεταφορά της στήλης σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προσθήκη 30 µL διαλύματος έκλουσης (10 Mm Tris-HCL, pH 8.5), επώαση για 1 min, φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.

#### *Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων*

Η αλληλούχιση (sequencing) των ειδικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε με την τυποποιημένη μέθοδο SANGER. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχίστηκαν με χρήση του αναλυτή ABI Prism BigDye (v1.1) και αναλύθηκαν με το ABI 3100 Sequencer.

Οι εκκινητές αλληλούχισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

<b>Εξόνιο του γονιδίου TACI</b>	<b>Αλληλουχία εκκινητών</b>
Exon 1	Sense: 5'- gggTgTggCTgATTTACATCC-3'
Exon 2	Antisense: 5'- CCAgAgggTgCTCTAgggAg-3'

Exon 3	Antisense: 5'- AgACTTCTggAAATgTTgCCTA- 3'
Exon 4	5'- GTCAGAAAGGAGCCCAGCC- 3'
Exon 5	Antisense: 5'- CTCTCTCCTCATATCTCTC-3'

Η ανάλυση των χρωματογραφήματων έγινε με το σύνολο εφαρμογών βιοπληροφορικής «Tracy» και τις υποεφαρμογές «Teal» και «Indigo», τα οποία είναι διαθέσιμα ως δωρεάν διαδικτυακές εφαρμογές ανοικτού κώδικα από την EMBL (European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Genomics Core Facility/ Genome Biology Unit) (92) (93) <https://www.gear-genomics.com>. Μέσω των εφαρμογών αυτών είναι δυνατή η απεικόνιση του χρωματογραφήματος (υποεφαρμογή «Teal») και η αντιστοίχιση του με το σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος σύμφωνα με δεδομένα που προέρχονται από την Ευρωπαϊκή βάση γονιδιακών δεδομένων Ensemble.org (94) με τη δυνατότητα αυτόματης εύρεσης πολυμορφισμών και μεταλλάξεων και του αντίστοιχου κωδικού rs, σύμφωνα με τη βάση dbSNIP (υποεφαρμογή «Indigo»).

Σε όσους πολυμορφισμούς υπάρχει αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων έγινε ανάλυση με τα προγράμματα SIFT (Shorting Intolerant From Tolerant- <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) (95) και PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2-<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (96), τα οποία προβλέπουν αν μια αμινοξική αντικατάσταση επηρεάζει τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης με βάση την ομολογία της αλληλουχίας της σε σχέση με άλλες γνωστές πρωτεΐνες και με βάση τις φυσικές ιδιότητες των αμινοξέων της.

#### *Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων*

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη γλώσσα προγραμματισμού R και πιο συγκεκριμένα με το δωρεάν υπολογιστικό πακέτο jamon (97). Ως πληθυσμός αναφοράς θεωρείται ο Ευρωπαϊκός πληθυσμός και τα δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα των διάφορων πολυμορφισμών του γονιδίου λήφθηκαν από τη διεθνή βάση δεδομένων Genome Aggregation Database (gnomAD) και ειδικότερα τις εκδοχές v3 και v2.1.1 (οι οποίες συμπεριλαμβάνουν δεδομένα της ExAC και της 1000 Genomes) (98).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν καθώς και η ανάλυσή τους αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα, όπου αναγράφεται ο κωδικός κάθε πολυμορφισμού σύμφωνα με τη βάση dbSNP της NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA), η επίπτωσή του στην πρωτεΐνη, ο αριθμός ετερόζυγων/ομόζυγων ως προς τον κάθε πολυμορφισμό, η συχνότητα του αλληλίου στις δύο ομάδες των ασθενών και η συχνότητα στον ευρωπαϊκό πληθυσμό (νότιες ευρωπαϊκές χώρες).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται μία σημαντική παρουσία πολυμορφισμών του γονιδίου και στις δύο ομάδες ασθενών. Ειδικότερα:

- Στο εξόνιο 1 δεν βρέθηκαν πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις σε κανέναν ασθενή
- Στο εξόνιο 2 βρέθηκε ο εξής πολυμορφισμός:
  - Η συνώνυμη αλλαγή (χωρίς αλλαγή στην αλυσίδα των αμινοξέων) rs8072293 σε 8 ετεροζυγώτες και 17 ομοζυγώτες με σύνδρομο Sjogren και 16 ετεροζυγώτες και 24 ομοζυγώτες με συστηματική σκλήρυνση.
- Στο εξόνιο 3 βρέθηκαν οι εξής πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις:
  - Η ιντρονική αλλαγή rs2274892 σε 10 ετεροζυγώτες και 9 ομοζυγώτες με σύνδρομο Sjogren και 16 ετεροζυγώτες και 9 ομοζυγώτες με συστηματική σκλήρυνση.
  - Η συνώνυμη αλλαγή rs35062843 σε 3 ετεροζυγώτες με σύνδρομο Sjogren
  - Η μετάλλαξη rs72553877 (p.P687Asn, I87N) σε ετερόζυγη κατάσταση σε έναν ασθενή με συστηματική σκλήρυνση
- Στο εξόνιο 4 βρέθηκαν οι εξής μεταλλάξεις:
  - Η μετάλλαξη rs72553883 (p.Ala181Glu, A181E) σε ετερόζυγη κατάσταση σε δύο ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση
  - Η μετάλλαξη rs751216929 (p.Cys172Tyr, C172Y) σε ετερόζυγη κατάσταση σε έναν ασθενή με συστηματική σκλήρυνση

Πίνακας πολυμορφισμών που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα των ασθενών με Sjogren και Σκληρόδερμα:

	Exon 2		Exon 3		Exon 4		Exon 5					
<b>Rs κωδικός</b> (από τη βάση dbSNIP)	rs8072293 C>T	rs2274892 T>G	rs72553877 A>T	rs35062843 A>C	rs72553883 G>T	rs751216929 C>T	rs11078355 A>G	rs34562254 G>A	rs11652811 A>G	rs11652843 A>C	rs56063729 A>G	rs573841223 C>G
<b>Λειτουργική επίδραση</b>	Συνώνυμη	Ιντρόνιο	Μη συνώνυμη	Συνώνυμη	Μη συνώνυμη	Μη συνώνυμη	Συνώνυμη	Μη συνώνυμη	Ιντρόνιο	Ιντρόνιο	Μη συνώνυμη	Ιντρόνιο
<b>Κλινική επίπτωση*</b>	καλοήθης	καλοήθης	Polyphen: πιθανώς βλαβερή SIFT: βλαβερή	καλοήθης	Polyphen: καλοήθης/ πιθανώς βλαβερή SIFT: βλαβερή	Polyphen: πιθανώς βλαβερή SIFT: βλαβερή	καλοήθης	Polyphen: καλοήθης SIFT: ανεκτή	καλοήθης	καλοήθης	Polyphen: καλοήθης SIFT: ανεκτή	καλοήθης
<b>Αλλαγή αμινοξέων</b>	καμία	καμία	p.Ile87Asn	καμία	p.Ala181Glu	p.Cys172Tyr	καμία	p.Pro251Leu	καμία	καμία	p.Val220Ala	καμία
<b>Συχνότητα αλληλίων στο SS</b>	0.70	0.47	0.00	0.05	0.00	0.00	0.48	0.20	0.27	0.27	0.05	0.00
<b>Ετερόζυγοι (Het) Ομόζυγοι (Hom) με SS</b>	8 Het/17 Hom	10 Het/9 Hom	0/0	3Het /0 Hom	0/0	0/0	9 Het/10 Hom	10 Het/1 Hom	8 Het/4 Hom	8 Het/4 Hom	3 Het/0 Hom	0/0
<b>Συχνότητα αλληλίων στο Scl</b>	0.70	0.37	0.01	0.00	0.02	0.01	0.33	0.13	0.23	0.27	0.07	0.01
<b>Ετερόζυγοι (Het) Ομόζυγοι (Hom) με Scl</b>	16 Het/24 Hom	16 Het/9 Hom	1 Het/0 Hom	0/0	2 Het/0 Hom	1 Het/0 Hom	20 Het/5 Hom	10 Het/1 Hom	12 Het/ 5 Hom	13 Het/6 Hom	6 Het/0 Hom	1 Het/0 Hom
<b>Συχνότητα αλληλίων στον πληθυσμό<sup>^</sup></b>	0.70-0.75 (8418/11584)	0.38-0.46 (4851/11606)	0.0005 (37/64570)	0.04 (2480/64580)	0.002 (26/11588)	0.0002 (15/64576)	0.42 (4866/11526)	0.10 (6801/64552)	0.26 (17317/64468)	0.27 (17336/64502)	0.03 (294/11406)	0.006 (396/64554)
<b>Hardy-Weinberg p-value# SS</b>	0.05	0.07	Μη υπολογίσιμο	0.77	Μη υπολογίσιμο	Μη υπολογίσιμο	0.03	0.82	0.08	0.08	0.77	Μη υπολογίσιμο
<b>Hardy-Weinberg p-value# Scl</b>	0.23	0.09	0.94	Μη υπολογίσιμο	0.88	0.94	0.94	0.78	0.03	0.052	0.64	0.94

\* από ClinVar, <sup>^</sup> στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό και συγκεκριμένα non-Finnish European (ο αριθμός στην παρένθεση αφορά ειδικότερα την υποομάδα Southern European-SE, όταν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για αυτή την πληθυσμιακή ομάδα), σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων GnomAD v.2.1.1, GnomAD v.3.0 και ExAC 1.0, # τιμές p<0,05 είναι σημάδι μη τήρησης της αναμενόμενης κατανομής στον πληθυσμό. (Οι ιντρονικές περιοχές καταγράφονται στον πίνακα σύμφωνα με το εξόνιο στο οποίο βρίσκονται πιο κοντά. Για παράδειγμα οι πολυμορφισμοί rs11652811 και rs11652843 βρίσκονται ανάμεσα στα Εξόνια 4 και 5, λίγο πριν την αρχή της περιοχής του Εξονίου 5). SS: Sjogren Syndrome, Scl: Scleroderma

- Στο εξόνιο 5 βρέθηκαν οι εξής πολυμορφισμοί:
  - Η συνώνυμη αλλαγή rs11078355 σε 9 ετεροζυγώτες και 10 ομοζυγώτες με σύνδρομο Sjogren και 20 ετεροζυγώτες και 5 ομοζυγώτες με συστηματική σκλήρυνση.
  - Η ιντρονική αλλαγή rs11652811 σε 8 ετεροζυγώτες και 4 ομοζυγώτες με σύνδρομο Sjogren και 12 ετεροζυγώτες και 5 ομοζυγώτες με συστηματική σκλήρυνση.
  - Η ιντρονική αλλαγή rs11652843 σε 8 ετεροζυγώτες και 4 ομοζυγώτες με σύνδρομο Sjogren και 13 ετεροζυγώτες και 6 ομοζυγώτες με συστηματική σκλήρυνση.
  - Η ιντρονική αλλαγή rs573841223 σε ετερόζυγη κατάσταση σε έναν ασθενή με συστηματική σκλήρυνση.
  - Η μη συνώνυμη αλλαγή (αλλαγή του αμινοξέος στην πρωτεΐνη) rs34562254 (p.Pro251Leu, P251L) σε 10 ετεροζυγώτες και έναν ομοζυγώτη με σύνδρομο Sjogren και 10 ετεροζυγώτες και έναν ομοζυγώτη με συστηματική σκλήρυνση.
  - Η μη συνώνυμη αλλαγή rs56063729 (p.Val220Ala, V220A) σε 3 ετεροζυγώτες με σύνδρομο Sjogren και 6 ετεροζυγώτες με συστηματική σκλήρυνση.

Στους παρακάτω πίνακες απεικονίζεται η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, όπου έγινε σύγκριση της ολικής συχνότητας των τριών μεταλλάξεων που βρέθηκαν στο δείγμα των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (4/46, 8.7%) με τη συχνότητα εύρεσής τους στον πληθυσμό των νότιων ευρωπαϊκών χωρών, σύμφωνα με τα δεδομένα της genomeAD v2.1 (145/32285, 0,45%). Η διαφορά στις συχνότητες ύπαρξης έστω και μίας μετάλλαξης από αυτές τις τρεις, δηλαδή η διαφορά της συχνότητας των ατόμων που είναι ετεροζυγώτες σε κάποια από αυτές τις μεταλλάξεις και έχουν συστηματική σκλήρυνση σε σχέση με τους ετεροζυγώτες στον υγιή πληθυσμό, είναι 8,3% (95% CI: 3% - 20%), αριθμός ο οποίος είναι στατιστικά σημαντικός σύμφωνα με το τεστ  $\chi^2$  ( $p < 0.01$ , Yates continuity correction  $p < 0.01$ ).

	Με μετάλλαξη	Χωρίς Μετάλλαξη	Total N	Συχνότητα	95 % CI	
					Lower	Upper
Ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση	4	42	46	0.0870	0.0343	0.2032
Υγιής Πληθυσμός	145	32140	32285	0.0045	0.0038	0.0053
Διαφορά συχνότητων	.	.	.	0.0825	0.0298	0.1988

	Value	df	p
$\chi^2$	68.1	1	< .001
$\chi^2$ continuity correction	51.3	1	< .001
N	32331		

Στατιστική ανάλυση της συχνότητας των τριών μεταλλάξεων που βρέθηκαν στο δείγμα των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (4/46, 8.7%) με τη συχνότητα εύρεσής τους στον πληθυσμό των νότιων ευρωπαϊκών χωρών από δεδομένα της βάσης genomeAD v2.1. CI: Confidence Intervals

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη έγινε ανάλυση του γονιδίου TNFRSF13B/TAC1 σε 30 ασθενείς με σύνδρομο Sjogren και 46 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση/σκληρόδερμα με στόχο την ανίχνευση τυχόν



μεταλλάξεων. Ύστερα από την ανάλυση της αλληλουχίας των πέντε εξονίων του γονιδίου σε όλους τους ασθενείς, βρέθηκαν αρκετοί φυσιολογικοί πολυμορφισμοί στους περισσότερους ασθενείς και των δύο ομάδων καθώς και ετερόζυγες μεταλλάξεις σε τέσσερις ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ενώ καμία μετάλλαξη δεν βρέθηκε στους ασθενείς με σύνδρομο Sjogren.

Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν δεν έχουν συσχετιστεί έως τώρα στη βιβλιογραφία με νόσο, έχοντας ως σημείο αναφοράς την κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια, με την οποία μέχρι τώρα έχουν συσχετιστεί οι περισσότερες γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου. Αυτό συμβαίνει διότι πολλοί από τους πολυμορφισμούς αφορούν ιντρονικές περιοχές ή είναι συνώνυμες αλλαγές μίας νουκλεοτιδικής βάσης, όπου δηλαδή η αλλαγή του νουκλεοτιδίου συμβαίνει στην τρίτη βάση της τριάδας που καθορίζει κάποιο αμινοξύ και τυχαίνει να οδηγεί στην έκφραση του ίδιου αμινοξέος. Τέτοιες συνώνυμες αλλαγές προκύπτουν στους πολυμορφισμούς rs8072293 του εξονίου 2, rs35062843 του εξονίου 3 και rs11078355 του εξονίου 5. Η αλληλουχία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη που προκύπτει με αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν έχει καμία διαφορά από την αντίστοιχη του συχνότερου αλληλίου (wild type), του αλληλίου δηλαδή που βρίσκεται πιο συχνά στον πληθυσμό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όσοι πολυμορφισμοί βρίσκονταν σε ιντρονικές περιοχές (ο πολυμορφισμός rs2274892 του εξονίου 3 και οι πολυμορφισμοί rs11652811, rs11652843 και rs573841223 του εξονίου 5) είχαν αρκετά σημαντική απόσταση (>10 βάσεις) από τις πλευρικές περιοχές των πλησιέστερων εξονίων, επομένως η πιθανότητα να επηρεάσουν το εναλλακτικό μάτισμα ορισμένων μεταγράφων είναι εξαιρετικά μικρή και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται από τα προγράμματα πρόβλεψης ως καλοήθειες.

Οι πολυμορφισμοί rs11078355, rs11652811 και rs11652843 ακολουθούν στο δείγμα χαρακτηριστικά συν-κληρονόμησης, κάτι που φαίνεται από τη μεγάλη συχνότητα συνύπαρξής τους στα ίδια άτομα και από τις χαμηλές ή οριακά φυσιολογικές τιμές  $p$  με τη μέθοδο  $\chi^2$  στην εξίσωση Hardy-Weinberg- η οποία χρησιμοποιείται για να ελέγξει την ύπαρξη κανονικής κατανομής του δείγματος σύμφωνα με τον πληθυσμό αναφοράς. Σε περιπτώσεις που είναι  $<0.05$  πρόκειται για το λεγόμενο «linkage disequilibrium» όπου οι πολυμορφισμοί κληρονομούνται μαζί.

Οι πολυμορφισμοί rs34562254 και rs56063729 του εξονίου 5 παρόλο που είναι μη συνώνυμες αλλαγές, δηλαδή οδηγούν σε αλλαγή του αντίστοιχου αμινοξέος στην πρωτεΐνη, φαίνεται να μην έχουν σημαντική επίδραση στη λειτουργία της, σύμφωνα με τα προγράμματα πρόβλεψης PolyPhen και SIFT. Ειδικότερα, ο rs34562254 οδηγεί σε αντικατάσταση κυτοσίνης σε θυμίνη (C>T, CCC/CTC) στην κωδική αλυσίδα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα στη διαδικασία της μετάφρασης η προλίνη στη θέση 251 της αμινοξικής αλυσίδας, η οποία σύμφωνα με τη βάση UniProt.org

βρίσκεται στην ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης, να αντικατασταθεί από λευκίνη (p.Pro251Leu, P251L). Κάτι αντίστοιχο ισχύει με τον πολυμορφισμό rs56063729, όπου υπάρχει αντικατάσταση θυμίνης σε κυτοσίνης (GTG/GCG) στην κωδική αλυσίδα, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της βαλίνης από αλανίνη στην ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης (p.Val220Ala, V220A). Στο δείγμα των ασθενών με Sjogren 5% είχαν τον πολυμορφισμό V220A και 20% τον P251L, ενώ οι αντίστοιχες συχνότητες για τους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση ήταν 7% και 13%.

Οι παραπάνω πολυμορφισμοί δεν είναι ιδιαίτερα σπάνιοι στον ευρωπαϊκό υγιή πληθυσμό και ειδικότερα στον ελληνικό, όπως φαίνεται τόσο από τις βάσεις δεδομένων GnomeAD, ExAC και 1000Genomes, όσο και από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (80)(77). Συγκεκριμένα, 10% του ευρωπαϊκού πληθυσμού έχει το αλληλίο rs34562254 (16.41% στην Ελλάδα) και 3% το αλληλίο rs56063729 (4.63% στην Ελλάδα).

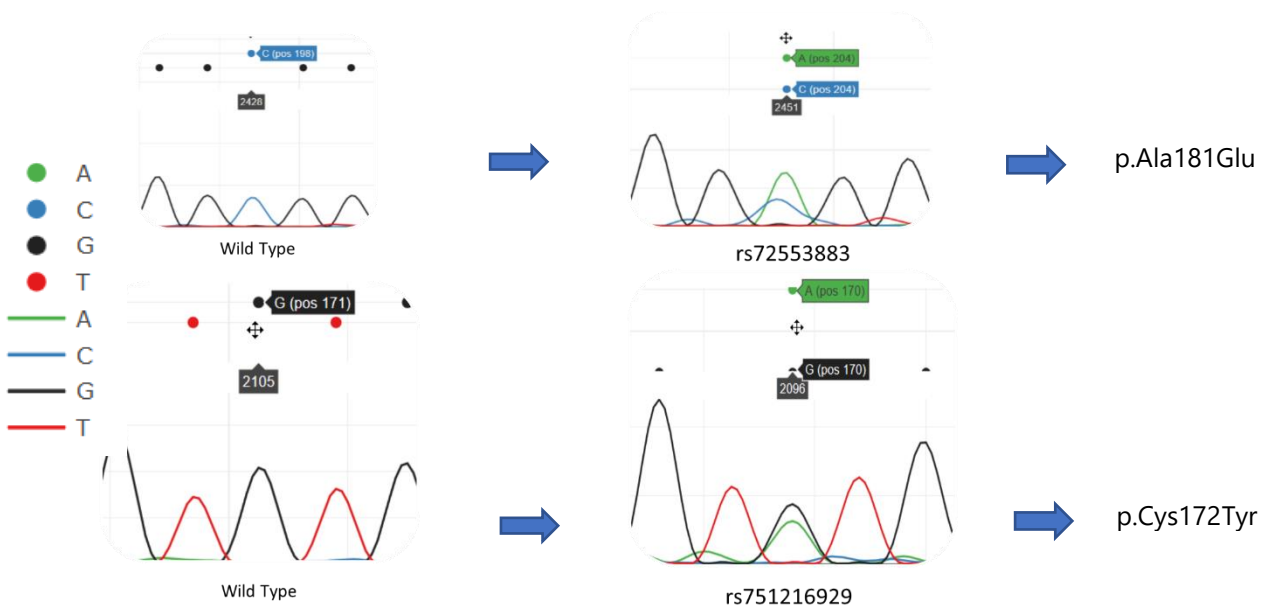
Όσον αφορά τις μεταλλάξεις που οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργίας της πρωτεΐνης, προς έκπληξή μας βρέθηκαν τέσσερις μεταλλάξεις σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (4/46, 8.7%) και καμία στους ασθενείς με Sjogren, εύρημα μη αναμενόμενο σύμφωνα με την υπόθεση της δυσλειτουργίας του TACI στο σύνδρομο Sjogren.

Ένας ασθενής είχε τη μετάλλαξη rs72553877 στο εξόνιο 3, η οποία αφορά την αλλαγή θυμίνης σε αδενίνη (ATC/AAC) στην κωδική αλυσίδα με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της ισολευκίνης από ασπαραγίνη (p.Ple87Asn, I87N) στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης. Παρόλο που η μετάλλαξη αυτή παρατηρείται και στον υγιή πληθυσμό (0.05%, 37/64570 σε νότιες ευρωπαϊκές χώρες), υπάρχουν μελέτες που έχουν αποδείξει *in vitro* ότι οδηγεί σε απώλεια λειτουργικότητας, ακόμα και σε ετερόζυγη κατάσταση (86). Σε μία πρόσφατη μελέτη με τη χρήση στοχευμένης αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) το 2018 έγινε συσχέτιση αυτής της μετάλλαξης με έναν ασθενή με ανοσοανεπάρκεια (99), ευρήματα που συμφωνούν με παλαιότερες δημοσιεύσεις με μεθόδους αλληλούχισης κατά Sanger.

Δύο ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση είχαν τη μετάλλαξη rs72553883, μία από τις πιο χαρακτηριστικές μεταλλάξεις στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (86)(100), όπου μία κυτοσίνη στην κωδική αλυσίδα αντικαθίσταται από αδενίνη (GCG>GAG), με αποτέλεσμα η αλανίνη στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης να αντικαθίσταται από βαλίνη (p.Ala181Val, A181E). Η μετάλλαξη είναι σχετικά σπάνια στον πληθυσμό (0,2%, 26/11588 σε νότιες ευρωπαϊκές χώρες) και οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας σύμφωνα με τα προγράμματα πρόβλεψης, ενώ έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια σχεδόν σε όλες τις μεγάλες μελέτες πάνω σε αυτή την ομάδα ασθενών στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία.

Ένας ασθενής με συστηματική σκλήρυνση είχε τη μετάλλαξη rs751216929, όπου μία γουανίνη μετατρέπεται σε αδενίνη (TGT/TAT) στην κωδική αλυσίδα, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της κυστεΐνης σε τυροσίνη (p.Cys172Tyr, C172Y) στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης. Πρόκειται για μία εξαιρετικά σπάνια μετάλλαξη (0.02%, 15/64576 σε νότιες ευρωπαϊκές χώρες) η οποία έχει βρεθεί σε κάποιους ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (101), όπως για παράδειγμα σε έναν ασθενή στην Ιταλία, ο οποίος εμφάνισε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (102). Παρόλα αυτά, στη βάση δεδομένων ClinVar η συγκεκριμένη μετάλλαξη παραμένει με τον χαρακτηρισμό «μη διαπιστωμένη σημαντικότητα» (Undetermined Significance) όσον αφορά τη συσχέτισή της με νόσο.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η απεικόνιση στο χρωματογράφημα στις θέσεις δύο εκ των τριών διαφορετικών μεταλλάξεων που βρέθηκαν στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, όπως αυτές ανιχνεύθηκαν και απεικονίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ανάλυσης χρωματογραφημάτων Indigo.

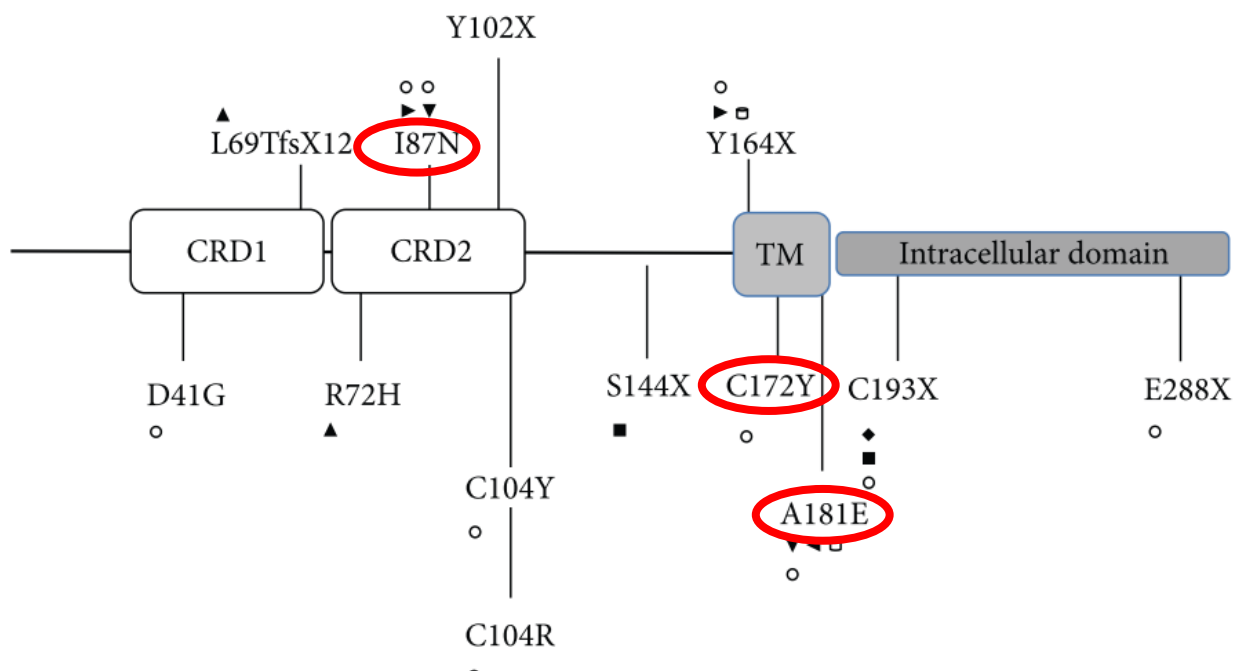


Εικόνες των χρωματογραφημάτων των ασθενών με Σκληρόδερμα οι οποίοι ήταν ετερόζυγοι ως προς τις μεταλλάξεις rs751216929 και rs72553883, οι οποίες οδηγούν σε δυσλειτουργία της πρωτεΐνης TAC1.

Σχετικά με το κατά πόσο οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης TAC1, έχει φανεί από *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες ότι η μετάλλαξη I87N έχει μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης των BAFF και APRIL, η οποία μπορεί να αντισταθμιστεί με αύξηση της συγκέντρωσής τους γύρω από το σημείο της πρόσδεσης (103). Σχετικά με τις υπόλοιπες

μεταλλάξεις, C172Y και A181E, οι οποίες αφορούν το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, παρόλο που η πρωτεΐνη συνδέεται φυσιολογικά με τα BAFF και APRIL, δεν ενεργοποιείται το υπόλοιπο σηματοδοτικό μονοπάτι, οδηγώντας πρακτικά σε μία πλήρη απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Επειδή το TACI σε φυσιολογικές καταστάσεις είναι λειτουργικό σε ολιγομερή των τριών και άνω μορίων, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώσει δραστικά τον αριθμό των λειτουργικών μορίων και, επομένως, να ασκήσει μία καθολικά αρνητική επίδραση στη λειτουργία της πρωτεΐνης ακόμα και σε ετερόζυγες περιπτώσεις.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι θέσεις των μεταλλάξεων που βρέθηκαν στους ασθενείς με προβολή τους πάνω στη δομή της πρωτεΐνης TACI.



Μερικές από τις συχνότερες μεταλλάξεις του TACI στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια και οι θέσεις τους πάνω στην πρωτεΐνη. Με κόκκινη επισήμανση είναι οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στους ασθενείς του δείγματός μας. [Ανατύπωση από Pulvirenti F. et al. Journal of Immunology Research, 2016 (102)]

Η άλλη βασική παρατήρηση που προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η πλήρης απουσία παθογόνων μεταλλάξεων στους ασθενείς με σύνδρομο Sjogren. Αν θεωρήσουμε ότι ο αριθμός των συμμετεχόντων ήταν αρκετά μεγάλος για να βρεθεί έστω και μία μετάλλαξη στο δείγμα μας εφόσον αυτή πράγματι υπάρχει-με άλλα λόγια να θεωρήσουμε ότι ο αριθμός του δείγματος είχε αρκετή δύναμη (“statistical power”) για να οδηγήσει σε στατιστικά σημαντική διαφορά συχνότητας μεταλλάξεων σε σχέση με τον υγίη πληθυσμό- τότε η πιο πιθανή αιτία για τα αρνητικά αποτελέσματα είναι η ύπαρξη κάποιας πιθανής βιολογικής εξήγησης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η υπόθεση ότι το TACI έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του συνδρόμου

Sjogren οδήγησε πρόσφατα στην έναρξη διεξαγωγής κλινικής μελέτης με τη χορήγηση μίας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TACI (RC18) σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (91). Φαίνεται πως το εγχείρημα αυτό υποστηρίζεται από την υπόθεση των ερευνητών ότι η συνθετική πρωτεΐνη θα συνδεθεί με το μόριο APRIL λειτουργώντας ως μόριο «δόλωμα» (decoy), μειώνοντας τη διαθέσιμη ποσότητα του APRIL στην περιοχή κοντά στον υποδοχέα TACI των B κυττάρων και, επομένως, καταστέλλοντας την ενεργοποίησή τους. Σύμφωνα με αυτό το υποθετικό μοντέλο, η πρωτεΐνη TACI είτε υπερεκφράζεται είτε υπερλειτουργεί σε σχέση με φυσιολογικές συνθήκες, είτε απλώς παραμένει στα φυσιολογικά της επίπεδα ως προς την έκφραση και τη λειτουργία της σε ασθενείς με Sjogren. Σε αυτή την περίπτωση, μία μετάλλαξη η οποία θα έβλαπτε την έκφραση ή τη λειτουργία της σε ασθενείς με Sjogren δεν θα ήταν αναμενόμενη.

Δύο νέες μελέτες του 2020 προσπάθησαν να ρίξουν φως στην υπόθεση της συμμετοχής του σηματοδοτικού μονοπατιού BAFF-APRIL-TACI στο Sjogren. Στην πρώτη μελέτη βρέθηκε αυξημένη έκφραση του TACI σε έκτοπα βλαστικά κέντρα από βιοψίες μικρών σιελογόνων αδένων (104) ενώ στη δεύτερη αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TACI σε ενεργοποιημένα B κύτταρα σε βιοψίες από παρωτίδες ασθενών με ενεργό φλεγμονή (105). Από προηγούμενες μελέτες της επίδρασης των συχνότερων μεταλλάξεων του TACI πάνω στη λειτουργικότητά της πρωτεΐνης, έχει φανεί ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις δεν μειώνουν τα επίπεδα έκφρασης του TACI, με εξαίρεση την C104R, η οποία είναι και από τις πιο συχνές στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια. Μάλιστα, στη μελέτη που αφορούσε υλικό από παρωτίδες βρέθηκε αυξημένη έκφραση πολλών άλλων γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού που αφορά τον NF-κB, μέρος του οποίου είναι και η σύνδεση μεταξύ BAFF-APRIL και TACI. Αυτό είναι σημαντικό διότι στις λειτουργικές δοκιμασίες του TACI έχει φανεί ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις, ανάμεσά τους αυτές που βρήκαμε στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, σχετίζονται με πλήρη διακοπή της σηματοδότησης από NF-κB/NFAT στα λεμφοκύτταρα (103). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των ασθενών από τους οποίους λήφθηκε υλικό βιοψίας ήταν παρόμοιος με το δικό μας (29 ασθενείς στην πρώτη και 44 στη δεύτερη).

Αν δεχθούμε τα δεδομένα αυτά και συγκρίνουμε τη συμμετοχή του TACI στο Sjogren με αυτή στον Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο, όπου τόσο η υπο-όσο και η υπέρ έκφραση μπορεί να αποδειχθεί επιβλαβής, τότε το πιθανότερο σενάριο είναι ότι η παθογένεση βασίζεται στην αυξημένη λειτουργία της πρωτεΐνης. Στο σενάριο αυτό η διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα είναι εντονότερη από το φυσιολογικό, οδηγώντας σε αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι σε μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση των γενετικών βλαβών που έχουν έως τώρα συνδεθεί με τη συστηματική σκλήρυνση δεν υπάρχει καμία αναφορά σε βλάβες που αφορούν το γονιδιακό τόπο του TACI (51). Η έλλειψη σχετικών αναφορών

στη βιβλιογραφία για τον ρόλο του TACI στη συστηματική σκλήρυνση, καθώς και η μεγάλη σχετικά συχνότητα των μεταλλάξεων στο δείγμα μας, αριθμός που πλησιάζει τη συχνότητα των μεταλλάξεων σε ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια, καταδεικνύει την ανάγκη για έναν ενδεδειγμένο έλεγχο του ιστορικού των ασθενών οι οποίοι βρέθηκαν ότι έχουν μεταλλάξεις, προς αποκλεισμό συνύπαρξης μιας πιθανής αδιάγνωστης ανοσοανεπάρκειας. Παρόλα αυτά, είτε πρόκειται για πρωτοπαθή αυτοανοσία είτε δευτεροπαθή σε ένα υπόβαθρο αδιάγνωστης ανοσοανεπάρκειας, η παρούσα μελέτη αποτελεί πιθανώς την πρώτη συσχέτιση της συστηματικής σκλήρυνσης με μεταλλάξεις του γονιδίου TACI.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* [Internet]. *J Autoimmun*; 2010 Nov [cited 2020 Sep 14];35(3):219–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685080/>
2. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 1994;152(11).
3. Jin JO, Shinohara Y, Yu Q. Innate Immune Signaling Induces Interleukin-7 Production from Salivary Gland Cells and Accelerates the Development of Primary Sjögren's Syndrome in a Mouse Model. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2013 Oct 17 [cited 2020 Sep 14];8(10). Available from: </pmc/articles/PMC3798297/?report=abstract>
4. Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjögren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther* [Internet]. BioMed Central; 2004 [cited 2020 Sep 14];6(5):R447. Available from: </pmc/articles/PMC546280/?report=abstract>
5. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, et al. Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* [Internet]. *Ann Rheum Dis*; 2012 Feb [cited 2020 Sep 14];71(2):295–301. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21979002/>
6. Peng B, Ling J, Lee AJ, et al. Defective feedback regulation of NF-κB underlies Sjögren's syndrome in mice with mutated κB enhancers of the IκBα promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2010 Aug 24 [cited 2020 Sep 14];107(34):15193–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20696914/>

7. Sisto M, Lisi S, Lofrumento DD, Ingravallo G, Maiorano E, D'Amore M. A failure of TNFAIP3 negative regulation maintains sustained NF-κB activation in Sjögren's syndrome. *Histochem Cell Biol* [Internet]. *Histochem Cell Biol*; 2011 Jun [cited 2020 Sep 14];135(6):615–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21604024/>
8. Sandhya P, Kurien B, Danda D, Scofield R. Update on Pathogenesis of Sjogren's Syndrome. *Curr Rheumatol Rev*. 2016;13(1):5–22.
9. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* [Internet]. *J Autoimmun*; 2010 Jun [cited 2020 Sep 14];34(4):400–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19889514/>
10. Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: A meta-analysis [Internet]. *Archives of Internal Medicine*. *Arch Intern Med*; 2005 [cited 2020 Sep 14]. p. 2337–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16287762/>
11. Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: A multicenter, retrospective, clinical study by the European concerted action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* [Internet]. *Arthritis Rheum*; 1999 Aug [cited 2020 Aug 21];42(8):1765–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10446879/>
12. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, et al. American College of rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care and Research*. 2012.
13. Sjogren's Syndrome: A Disease in Evolution [Internet]. [cited 2020 Aug 21]. Available from: <https://www.medscape.org/viewarticle/493493>
14. Vivino FB. Sjogren's syndrome: Clinical aspects. *Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;182:48–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.005>
15. Sreebny LM, Schwartz SS. A reference guide to drugs and dry mouth--2nd edition. *Gerodontology* [Internet]. 1997 Jul [cited 2020 Aug 21];14(1):33–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1741-2358.1997.00033.x>
16. Kassimos DG, Shirlaw PJ, Choy EHS, et al. Chronic sialadenitis in patients with nodal osteoarthritis. *Br J Rheumatol*. 1997 Dec;36(12):1312–7.
17. Stone JH, Zen Y, Deshpande V. Mechanisms of disease: IgG4-related disease [Internet]. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2012 [cited 2020 Aug 21]. p. 539–51. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1104650>

18. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group [Internet]. *Annals of the Rheumatic Diseases*. *Ann Rheum Dis*; 2002 [cited 2020 Aug 21]. p. 554–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12006334/>
19. Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): A user guide. *RMD Open* [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 21];1(1):22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2014-000022>
20. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. John Wiley and Sons Inc.; 2017 Jan 1 [cited 2020 Aug 21];69(1):35–45. Available from: </pmc/articles/PMC5650478/?report=abstract>
21. Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum* [Internet]. *Arthritis Rheum*; 2011 Jul [cited 2020 Aug 21];63(7):2021–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21480190/>
22. Baer AN, DeMarco MMA, Shiboski SC, et al. The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2015 Aug 1 [cited 2020 Aug 21];74(8):1557–61. Available from: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/the-ssb-positivessa-negative-antibody-profile-is-not-associated-w-7>
23. HERMANN GA, VIVINO FB, GOIN JE. Scintigraphic features of chronic sialadenitis and Sjögren's syndrome. *Nucl Med Commun* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1999 Dec 1 [cited 2020 Aug 21];20(12):1123–32. Available from: <http://journals.lww.com/00006231-199912000-00004>
24. Baldini C, Luciano N, Tarantini G, et al. Salivary gland ultrasonography: A highly specific tool for the early diagnosis of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* [Internet]. BioMed Central Ltd.; 2015 Dec 14 [cited 2020 Aug 21];17(1):146. Available from: <http://arthritis-research.com/content/17/1/146>
25. Cornec D, Jousse-Joulin S, Pers JO, et al. Contribution of salivary gland ultrasonography to the diagnosis of Sjögren's syndrome: Toward new diagnostic criteria? *Arthritis Rheum* [Internet]. *Arthritis Rheum*; 2013 Jan [cited 2020 Aug 21];65(1):216–25. Available from:



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23108632/>

26. Howlett DC, Menezes LJ, Lewis K, Moody AB, Violaris N, Williams MD. Sonographically guided core biopsy of A parotid mass. *Am J Roentgenol* [Internet]. American Roentgen Ray Society; 2007 Jan 23 [cited 2020 Aug 21];188(1):223–7. Available from: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.05.1549>
27. Fox RI. Extraglandular Manifestations of Sjögren’s Syndrome (SS): Dermatologic, Arthritic, Endocrine, Pulmonary, Cardiovascular, Gastroenterology, Renal, Urology, and Gynecologic Manifestations. In: *Sjögren’s Syndrome*. Springer New York; 2011. p. 285–316.
28. Kim SM, Park E, Lee JH, Lee SH, Kim HR. The clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in primary Sjögren syndrome. *Rheumatol Int* [Internet]. *Rheumatol Int*; 2012 Dec [cited 2020 Aug 21];32(12):3963–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22205381/>
29. Mohammed K, Pope J, Le Riche N, et al. Association of severe inflammatory polyarthritis in primary Sjögren’s syndrome: Clinical, serologic, and HLA analysis. *J Rheumatol* [Internet]. *The Journal of Rheumatology*; 2009 Sep 1 [cited 2020 Aug 21];36(9):1937–42. Available from: [www.jrheum.org](http://www.jrheum.org)
30. Stojan G, Baer AN, Danoff SK. Pulmonary Manifestations of Sjögren’s Syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. NIH Public Access; 2013 Aug [cited 2020 Aug 21];13(4):354–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393654/>
31. Papiris SA, Maniati M, Constantopoulos SH, Roussos C, Moutsopoulos HM, Skopouli FN. Lung involvement in primary Sjögren’s syndrome is mainly related to the small airway disease. *Ann Rheum Dis* [Internet]. BMJ Publishing Group; 1999 [cited 2020 Aug 21];58(1):61–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10343542/>
32. Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, et al. Primary Sjögren syndrome: Hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. *Medicine (Baltimore)*; 2002 [cited 2020 Aug 21];81(4):281–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12169883/>
33. Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Nardi N, et al. Circulating monoclonal immunoglobulins in Sjögren syndrome: Prevalence and clinical significance in 237 patients. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2020 Aug 21];84(2):90–7. Available from: <http://journals.lww.com/00005792-200503000-00003>
34. Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary sjögren syndrome: Clinical and pathophysiologic

- aspects. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. *Medicine (Baltimore)*; 2009 Sep [cited 2020 Aug 21];88(5):284–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19745687/>
35. Smedby KE, Vajdic CM, Falster M, et al. Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: A pooled analysis within the InterLymph Consortium. *Blood* [Internet]. *Blood*; 2008 Apr 15 [cited 2020 Sep 20];111(8):4029–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18263783/>
  36. Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary sjögren syndrome: Clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. *Medicine (Baltimore)*; 2009 Sep [cited 2020 Sep 14];88(5):284–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19745687/>
  37. Papageorgiou A, Voulgarelis M, Tzioufas AG. Clinical picture, outcome and predictive factors of lymphoma in Sjögren syndrome [Internet]. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2015 [cited 2020 Sep 14]. p. 641–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25808075/>
  38. Ioannidis JPA, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum* [Internet]. *Arthritis Rheum*; 2002 [cited 2020 Aug 21];46(3):741–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920410/>
  39. Nezos A, Papageorgiou A, Fragoulis G, et al. B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren’s syndrome. *J Autoimmun* [Internet]. Academic Press; 2014 [cited 2020 Sep 14];51:89–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23845207/>
  40. Tobón GJ, Saraux A, Gottenberg JE, et al. Role of Fms-like tyrosine kinase 3 ligand as a potential biologic marker of lymphoma in primary Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum* [Internet]. *Arthritis Rheum*; 2013 Dec [cited 2020 Sep 14];65(12):3218–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23982978/>
  41. Nocturne G, Boudaoud S, Miceli-Richard C, et al. Germline and somatic genetic variations of TNFAIP3 in lymphoma complicating primary Sjögren’s syndrome. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2013 [cited 2020 Sep 14];122(25):4068–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24159176/>
  42. Tapinos NI, Polihronis M, Moutsopoulos HM. Lymphoma development in Sjogren’s syndrome: Novel p53 mutations. *Arthritis Rheum* [Internet]. *Arthritis Rheum*; 1999 Jul [cited 2020 Sep 14];42(7):1466–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10403275/>

43. Tonami H, Matoba M, Kuginuki Y, et al. Clinical and imaging findings of lymphoma in patients with Sjögren syndrome. *J Comput Assist Tomogr* [Internet]. *J Comput Assist Tomogr*; 2003 Jul [cited 2020 Sep 20];27(4):517–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12886135/>
44. Foulks GN, Forstot SL, Donshik PC, et al. Clinical guidelines for management of dry eye associated with Sjögren disease. *Ocul Surf* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015 Apr 1 [cited 2020 Aug 21];13(2):118–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012415000026>
45. Carsons SE, Vivino FB, Parke A, et al. Treatment Guidelines for Rheumatologic Manifestations of Sjögren’s Syndrome: Use of Biologic Agents, Management of Fatigue, and Inflammatory Musculoskeletal Pain. *Arthritis Care Res* [Internet]. John Wiley and Sons Inc.; 2017 Apr 1 [cited 2020 Aug 21];69(4):517–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27390247/>
46. Allcock RJ, Forrest I, Corris PA, Crook PR, Griffiths ID. A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. *Rheumatology* [Internet]. Oxford Academic; 2004 May 1 [cited 2020 Aug 21];43(5):596–602. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/43/5/596/1788521>
47. Valentini G, Black C. Systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Bailliere Tindall Ltd; 2002 Dec 1;16(5):807–16.
48. Royle JG, Lanyon PC, Grainge MJ, Abhishek A, Pearce FA. The incidence, prevalence, and survival of systemic sclerosis in the UK Clinical Practice Research Datalink. *Clin Rheumatol* [Internet]. Springer London; 2018 Aug 1 [cited 2020 Aug 21];37(8):2103–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4182-3>
49. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis [Internet]. *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2017 [cited 2020 Aug 21]. p. 1685–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28413064/>
50. Hughes M, Snapir A, Wilkinson J, Snapir D, Wigley FM, Herrick AL. Prediction and impact of attacks of Raynaud’s phenomenon, as judged by patient perception. *Rheumatol (United Kingdom)* [Internet]. Oxford University Press; 2015 May 5 [cited 2020 Sep 20];54(8):1443–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752312/>
51. Chairta P, Nicolaou P, Christodoulou K. Genomic and genetic studies of systemic sclerosis: A systematic review [Internet]. *Human Immunology*. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2020 Aug 24]. p. 153–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27984087/>
52. Hughes M, Herrick AL. Systemic sclerosis. *Br J Hosp Med* Sept 2019,. 2019;80(9).
53. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis:

An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 Nov 1 [cited 2020 Aug 21];65(11):2737–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.38098>

54. Carwile LeRoy E, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis [Internet]. *Journal of Rheumatology*. 1988 [cited 2020 Aug 21]. p. 202–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3361530/>
55. Hughes M, Hodgson R, Harris J, et al. Imaging calcinosis in patients with systemic sclerosis by radiography, computerised tomography and magnetic resonance imaging. *Semin Arthritis Rheum*. W.B. Saunders; 2019 Oct 1;49(2):279–82.
56. Kahan A, Coghlan G, McLaughlin V. Cardiac complications of systemic sclerosis. [Internet]. *Rheumatology (Oxford, England)*. *Rheumatology (Oxford)*; 2009 [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19487224/>
57. Man A, Zhu Y, Zhang Y, et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: A population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. BMJ Publishing Group Ltd; 2013 Jul 1 [cited 2020 Aug 21];72(7):1188–93. Available from: <http://ard.bmj.com/>
58. Denton CP, Hughes M, Gak N, et al. BSR and BHPR guideline for the treatment of systemic sclerosis. *Rheumatol (United Kingdom)* [Internet]. Oxford University Press; 2016 Oct 1 [cited 2020 Aug 21];55(10):1906–10. Available from: [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation).
59. Denton CP, Lapadula G, Mouthon L, Müller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. [Internet]. *Rheumatology (Oxford, England)*. Oxford Academic; 2009 [cited 2020 Aug 21]. p. iii32–5. Available from: [https://academic.oup.com/rheumatology/article/48/suppl\\_3/iii32/1779571](https://academic.oup.com/rheumatology/article/48/suppl_3/iii32/1779571)
60. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*. W.B. Saunders; 2005 Aug 1;35(1):35–42.
61. Herrick AL, Pan X, Peytrignet S, et al. Treatment outcome in early diffuse cutaneous systemic sclerosis: The European Scleroderma Observational Study (ESOS). *Ann Rheum Dis* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2017 Jul 1 [cited 2020 Aug 21];76(7):1207–18. Available from: <http://ard.bmj.com/>
62. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2017 Aug 1 [cited 2020 Aug 21];76(8):1327–39. Available from: <http://ard.bmj.com/>
63. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, et al. Myeloablative autologous stem-cell

- transplantation for severe scleroderma. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society; 2018 Jan 4 [cited 2020 Aug 21];378(1):35–47. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1703327>
64. Mackay F, Kalled SL. TNF ligands and receptors in autoimmunity: An update [Internet]. *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd; 2002 [cited 2020 Sep 14]. p. 783–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12413530/>
  65. Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* [Internet]. *J Exp Med*; 2005 May 2 [cited 2020 Sep 14];201(9):1375–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15851487/>
  66. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* (80- ) [Internet]. *Science*; 2001 Sep 14 [cited 2020 Sep 20];293(5537):2111–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11509691/>
  67. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development [Internet]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. *J Allergy Clin Immunol*; 2013 [cited 2020 Sep 14]. p. 959–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23465663/>
  68. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* [Internet]. *Blood*; 2008 [cited 2020 Sep 14];111(3):1004–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942754/>
  69. TNFRSF13B - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B - Homo sapiens (Human) - TNFRSF13B gene & protein [Internet]. [cited 2020 Oct 18]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/O14836>
  70. Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, et al. Age-matched Reference Values for B-lymphocyte Subpopulations and CVID Classifications in Children. *Scand J Immunol* [Internet]. *Scand J Immunol*; 2011 Nov [cited 2020 Sep 14];74(5):502–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21815909/>
  71. Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* [Internet]. *J Exp Med*; 2007 Aug 6 [cited 2020 Sep 14];204(8):1959–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17664289/>
  72. Castigli E, Geha RS. TACI, isotype switching, CVID and IgAD. *Immunol Res*. 2007;38(1–3):102–11.

73. He B, Santamaria R, Xu W, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* [Internet]. *Nat Immunol*; 2010 Sep [cited 2020 Sep 14];11(9):836–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20676093/>
74. Ahonen CL, Manning EM, Erickson LD, et al. The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* [Internet]. *Nat Immunol*; 2002 [cited 2020 Sep 14];3(5):451–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11967542/>
75. Von Bülow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* (80- ) [Internet]. *Science*; 1997 Oct 3 [cited 2020 Sep 14];278(5335):138–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9311921/>
76. Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J Immunol Res*. 2015;2015(Cvid).
77. Speletas M, Salzer U, Florou Z, et al. Heterozygous alterations of TNFRSF13B/TACI in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis. *Clin Dev Immunol* [Internet]. Hindawi Limited; 2013 [cited 2020 Sep 19];2013. Available from: </pmc/articles/PMC3727192/?report=abstract>
78. Martínez-Pomar N, Detková D, Arostegui JI, et al. Role of TNFRSF13B variants in patients with common variable immunodeficiency [Internet]. *Blood*. *Blood*; 2009 [cited 2020 Sep 20]. p. 2846–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19779048/>
79. Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* [Internet]. *Nat Genet*; 2005 Aug [cited 2020 Sep 14];37(8):820–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16007087/>
80. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, et al. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol* [Internet]. *J Clin Immunol*; 2011 Aug [cited 2020 Sep 14];31(4):550–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21547394/>
81. Von Bülow GU, Van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* [Internet]. *Immunity*; 2001 [cited 2020 Sep 20];14(5):573–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11371359/>
82. Romberg N, Chamberlain N, Saadoun D, et al. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *J Clin Invest* [Internet]. *J Clin Invest*; 2013 Oct 1 [cited 2020 Sep 14];123(10):4283–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24051380/>

83. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, et al. Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood* [Internet]. *Blood*; 2013 Feb 28 [cited 2020 Sep 14];121(9):1595–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23223361/>
84. Arumugakani G, Wood PMD, Carter CRD. Frequency of treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21<sup>lo</sup> B lymphocytes. *J Clin Immunol* [Internet]. *J Clin Immunol*; 2010 Mar [cited 2020 Sep 14];30(2):292–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19997968/>
85. Tsuji S, Stein L, Kamada N, et al. TACI deficiency enhances antibody avidity and clearance of an intestinal pathogen. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2014 Nov 3 [cited 2020 Sep 14];124(11):4857–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25271628/>
86. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* [Internet]. *Blood*; 2009 Feb 26 [cited 2020 Sep 14];113(9):1967–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18981294/>
87. Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. New York Academy of Sciences; 2005 [cited 2020 Sep 14]. p. 34–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16014518/>
88. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2006 Jan [cited 2020 Oct 22];54(1):192–201. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.21526>
89. Matsushita T, Kobayashi T, Mizumaki K, et al. BAFF inhibition attenuates fibrosis in scleroderma by modulating the regulatory and effector B cell balance. *Sci Adv*. 2018;4(7):1–13.
90. Nguyet Minh V, Tran Hau K, Takashi M, et al. Efficacy of BAFF in monitoring treatment response in early Vietnamese systemic sclerosis patients. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(2):264–8.
91. A Study of TACI-antibody Fusion Protein Injection (RC18) in Subjects With Primary Sjögren's Syndrome - Tabular View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT04078386?term=NCT04078386&draw=2&rank=1&view=record>
92. Rausch T, Fritz MHY, Untergasser A, Benes V. Tracy: Basecalling, alignment, assembly and

- deconvolution of sanger chromatogram trace files. *BMC Genomics*. *BMC Genomics*; 2020;21(1):1–9.
93. GEAR: genome analysis server [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.gear-genomics.com/>
94. Ensembl genome browser 101 [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>
95. SIFT [Internet]. [cited 2020 Oct 19]. Available from: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>
96. PolyPhen-2 [Internet]. [cited 2020 Oct 19]. Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
97. jamovi - Stats. Open. Now. [Internet]. [cited 2020 Oct 23]. Available from: <https://www.jamovi.org/>
98. TNFRSF13B | gnomAD [Internet]. [cited 2020 Oct 18]. Available from: [https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000240505?dataset=gnomad\\_r3](https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000240505?dataset=gnomad_r3)
99. Chi ZH, Wei W, Bu DF, Li HH, Ding F, Zhu P. Targeted high-throughput sequencing technique for the molecular diagnosis of primary immunodeficiency disorders. *Med (United States)*. 2018;97(40).
100. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* [Internet]. *Nat Genet*; 2005 Aug [cited 2020 Oct 21];37(8):829–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16007086/>
101. Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, et al. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* [Internet]. Springer; 2009 Nov 23 [cited 2020 Oct 21];29(6):777–85. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-009-9317-5>
102. Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C, et al. Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes. 2016 [cited 2020 Oct 21]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8390356>
103. Fried AJ, Rauter I, Dillon SR, Jabara HH, Geha RS. Functional analysis of transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI) mutations associated with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Mosby Inc.; 2011 [cited 2020 Oct 21];128(1):226-228.e1. Available from: </pmc/articles/PMC3121922/?report=abstract>
104. Carrillo-Ballesteros FJ, Palafox-Sánchez CA, Franco-Topete RA, et al. Expression of BAFF and BAFF receptors in primary Sjögren’s syndrome patients with ectopic germinal center-like structures. *Clin Exp Med* [Internet]. Springer International Publishing; 2020;20(4):615–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10238-020-00637-0>



105. Verstappen GM, Ice JA, Bootsma H, et al. Gene expression profiling of epithelium-associated FcRL4+ B cells in primary Sjögren's syndrome reveals a pathogenic signature. *J Autoimmun.* 2020;109(102439).