

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Ματθαίος Γ. Σπελέτας

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *TAC1* ΚΑΙ *CTLA4* ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΗΣ ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ**

Κάκκας Ιωάννης

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
Αναστάσιος Γερμενής, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
Ευαγγελία Φαρμάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής

ΛΑΡΙΣΑ 2022

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* (ομόζυγες, ετερόζυγες και διπλά ετερόζυγες) αποτελούν τις συχνότερες (5-15%) γνωστές γενετικές «βλάβες» οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με την Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (ΚΠΑ), η οποία είναι η πιο συχνή κλινικά σημαντική Πρωτοπαθής Αντισωματική Ανεπάρκεια (ΠΑΑ) στον άνθρωπο. Η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καλοήθους λεμφικής υπερπλασίας και αυτοάνοσης κυτταροπενίας στους συγκεκριμένους ασθενείς. Ομοίως, η παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *CTLA4* σε ασθενείς με κλινικό φαινότυπο συμβατό με ΚΠΑ, έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης λεμφικής υπερπλασίας και εκδηλώσεων αυτοάνοσης. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίπτωσης των μεταλλάξεων των γονιδίων *TACI* και *CTLA4* σε Έλληνες ασθενείς με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ, καθώς και η προσπάθεια ανάδειξης τυχόν συσχετίσεων μεταξύ των προαναφερθεισών μεταλλάξεων και του κλινικού φαινοτύπου της νόσου. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 117 Έλληνες ασθενείς με ΚΠΑ (110) και IgA ανεπάρκεια με συνοδό ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG (7). Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *TACI* και *CTLA4*, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και της αλληλούχισης βάσεων (Sequencing). Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 23.0. Σε 17 ασθενείς (14.5%) διαπιστώθηκε η παρουσία αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με την ΚΠΑ μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI*. Σε 13 ασθενείς (76.5%) οι μεταλλάξεις ήταν απλές ετερόζυγες, ενώ σε τέσσερις (23.5%) ήταν συνδυασμένες ετερόζυγες. Η συχνότερα ανιχνευθείσα μετάλλαξη ήταν η C104R (58.8%), ακολουθούμενη από τις I87N (23.5%) και A181E (11.8%), ενώ οι μεταλλάξεις R20C, C62Y, P151L, K188M και E236X ανιχνεύτηκαν μόνο σε έναν ασθενή η καθεμία. Οι ασθενείς με τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* ήταν συχνότερα άνδρες ($p: 0.011$), εμφάνιζαν συχνότερα καλοήθεις λεμφικές υπερπλασίες (σπληνομεγαλία ή/και λεμφαδενοπάθεια, $p: 0.047$ και $p: 0.002$ αντίστοιχα) και αυτοάνοσες κυτταροπενίες ($p: 0.046$), ενώ είχαν συχνότερα ιστορικό αμυγδαλεκτομής ($p: 0.015$) και αδενοειδεκτομής ($p: 0,031$). Μόνο σε τρεις ασθενείς (2,6%) ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4*. Λόγω του πολύ μικρού αριθμού τους, δεν ήταν εφικτή η διεκπεραίωση στατιστικής ανάλυσης. Η συχνότητα εμφάνισης των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με την ΚΠΑ μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* στους ασθενείς της μελέτης μας είναι συμβατή με την αναφερόμενη στην διεθνή βιβλιογραφία. Επίσης, από τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποστηρίζεται περαιτέρω η διαπίστωση ότι

παρουσία τους έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καλοήθους λεμφικής υπερπλασίας και αυτοάνοσης κυτταροπενίας στους ασθενείς με ΠΑΑ και κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ.

Λέξεις Κλειδιά: TACI, CTLA4, Μεταλλάξεις, Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες, Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια.

II.ABSTRACT

Monoallelic (heterozygous) or biallelic (homozygous or compound heterozygous) *TACI* mutations have been reported as the most common genetic defects in patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID), which is the most common clinically significant Primary Antibody Deficiency (PAD) in humans. Their presence has been correlated with an increased susceptibility to benign lymphoproliferation and autoimmune cytopenias. Likewise, the presence of *CTLA4* mutations in patients with CVID-like clinical phenotype has been correlated with an increased susceptibility to lymphoproliferation and autoimmune manifestations. The aim of our study was to evaluate the prevalence and any correlations of *TACI* and *CTLA4* defects in 117 Greek patients with CVID (110) and combined IgA and IgG subclass deficiency (7) with CVID-like clinical phenotype. *TACI* and *CTLA4* gene analysis was performed by PCR/sequencing. Statistical analysis was performed by using the SPSS program. Seventeen patients (14.5%) displayed causative *TACI* defects, four (23.5%) carried combined heterozygous and 13 (76.5%) carried single heterozygous mutations. The most frequently detected mutation was C104R (58.8%), followed by I87N (23.5%) and A181E (11.8%), while R20C, C62Y, P151L, K188M and E236X mutations were present in only one patient each. Patients with *TACI* defects were more frequently male (p: 0.011) and displayed a benign lymphoproliferation (splenomegaly and lymph node enlargement, p: 0.047 and p: 0.002, respectively), had a history of tonsillectomy (p: 0.015) and adenoidectomy (p: 0.031) and more frequently exhibited autoimmune cytopenias (p: 0.046). Only three patients (2.6%) displayed *CTLA4* mutations. Due to their very low number, no statistical analysis could be performed. Considering that accumulating evidence suggests several CVID patients have a complex rather than a monogenic inheritance, our data further supports the notion that *TACI* mutations, particularly as monoallelic defects, should be primarily considered as susceptibility co-factors and/or modifiers of PAD.

KEYWORDS: TACI, CTLA4, Mutation, Primary Antibody Deficiencies, Common Variable Immunodeficiency.

III. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ αυτονόητη υποχρέωσή μου την απόδοση ευχαριστιών σε όσους συνέβαλαν (ο καθένας με τον τρόπο του) στην εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Ματθαίο Σπελέτα, για πολύ περισσότερους από έναν λόγους. Κα' αρχήν ο κ.Σπελέτας οργάνωσε το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στο οποίο διεκπεραιώθηκε το πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης. Επίσης, διαμόρφωσε το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης και ενέταξε μεγάλο αριθμό ασθενών σε αυτήν. Τέλος, ως επιβλέπων συμπαραστάθηκε ενεργά στην εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τόσο με την ενθάρρυνση, όσο και με τις εύστοχες παρατηρήσεις του. Επίσης, ευχαριστώ θερμά:

A) Τον Ομότιμο Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Αναστάσιο Γερμενή, για την έγκριση του θέματος της παρούσας διδακτορικής διατριβής και την ανάθεσή της.

B) Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κυρία Ευαγγελία Φαρμάκη, για την ενεργό συμπράσταση και τις εύστοχες παρατηρήσεις της.

Γ) Τις Βιολόγους του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κυρία Ειρήνη Σεβδαλή και κυρία Γερασιμίνα Τσιντή, για την καθοριστική συμβολή τους στην διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης.

Δ) Τα Επιστημονικά Τμήματα των Νοσοκομείων, πέραν του ΠΓΝΠ Λάρισας και του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», τα οποία ενέταξαν ασθενείς στην συγκεκριμένη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα:

1) Την Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Ιπποκράτειο ΝΘ), 2) Την Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών, 3) Την Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική του ΓΝΑ «Λαϊκό», 4) Την Α΄ Προπαιδευτική Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του ΓΝΑ «Λαϊκό», 5) Την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Ερρίκος Ντυνάν» και 6) Την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Παπαγεωργίου» της Θεσσαλονίκης.

Ε) Την Διοικητικά και Επιστημονικά Υπεύθυνη του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός» κυρία Αλεξάνδρα Τσιρογιάννη, για την ενθάρρυνση και την ηθική συμπράστασή της. Για τον ίδιο ακριβώς λόγο οφείλω να ευχαριστήσω και τις τέως

Συντονίστριες Διευθύντριες του ιδίου Τμήματος, κυρία Χρύσα Παπαστεριάδη και κυρία Ιωάννα Οικονομίδου.

ΣΤ) Τον Ηλεκτρολόγο-Μηχανολόγο ΕΜΠ Λευτέρη Τσαλαβούτα, για την πολύτιμη βοήθειά του στην καταχώρηση και επεξεργασία των δεδομένων στο SPSS.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
II	ABSTRACT	
III	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	
	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1	ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	15
2	ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΗΣ ΥΠΟΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ	17
3	ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	20
3.1	ΚΠΑ-Γενικά στοιχεία	20
3.2	Αιτιοπαθογένεια ΚΠΑ	21
3.3	Κλινικές εκδηλώσεις ΚΠΑ	24
3.4	ΠΑΑ οι οποίες είναι δυνατόν να εμφανίσουν κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ	26
3.5	Διαφορική διάγνωση της ΚΠΑ	28
3.6	Η κλινική προσέγγιση της έγκαιρης διάγνωσης	31
3.7	Εργαστηριακή διάγνωση της ΚΠΑ και των λοιπών αντισωματικών ανεπαρκειών	32
3.8	Θεραπευτική αντιμετώπιση της ΚΠΑ	33
4	Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ TAC1	34
4.1	Δομή και συνδέτες υποδοχέα TAC1	35
4.2	Έκφραση και οδός μεταγωγής σήματος του υποδοχέα TAC1	39
4.3	Ο ρόλος του υποδοχέα TAC1 στην ομοιόσταση του ανοσιακού συστήματος.	40
4.4	Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>TAC1</i> σε ασθενείς με ΠΑΑ	41
5	ΤΟ ΣΥΝΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CTLA4	43
5.1	Γονιδιακή και πρωτεϊνική δομή του CTLA4	45
5.2	Κυτταρική έκφραση του CTLA4	46
5.3	Αλληλεπίδραση του CTLA4 με τους συνδέτες του	47
5.4	Μηχανισμοί δράσης του CTLA4	48
5.5	Μεταλλάξεις του <i>CTLA4</i> γονιδίου και συσχετίσεις τους με τις ΠΑΑ	51

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1	ΣΚΟΠΟΣ	54
2	ΥΛΙΚΟ	54
3	ΜΕΘΟΔΟΣ	55
3.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	55
3.2	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>TACI</i>	56
3.2.1	PCR για την ενίσχυση του γονιδίου <i>TACI</i>	56
3.2.2	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου <i>TACI</i> σε γέλη αгарόζης	58
3.2.3	Καθαρισμός των προϊόντων PCR του γονιδίου <i>TACI</i> προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων	60
3.2.4	Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (SEQUENCING) προϊόντων PCR του γονιδίου <i>TACI</i>	60
3.3	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>CTLA4</i>	61
3.3.1	PCR για την ενίσχυση του γονιδίου <i>CTLA4</i>	61
3.3.2	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου <i>CTLA4</i> σε γέλη αгарόζης	62
3.3.3	Καθαρισμός των προϊόντων PCR του γονιδίου <i>CTLA4</i> προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων	63
3.3.4	Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (SEQUENCING) των προϊόντων PCR του γονιδίου <i>CTLA4</i>	63
3.4	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	63
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
4.1	Χαρακτηριστικά ασθενών	64
4.1.1	Δημογραφικά στοιχεία	64
4.1.2	Κλινικά χαρακτηριστικά	64
4.1.2.1	Λοιμώξεις και επιπλοκές τους	65
4.1.2.2	Αυτοάνοσα νοσήματα	66
4.1.2.3	Σπληνομεγαλία	66
4.1.2.4	Εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό	66
4.1.2.5	Λεμφικές υπερπλασίες	66

4.1.2.6	Νεοπλασίες	67
4.2	Εργαστηριακά ευρήματα	67
4.3	Θεραπευτική αντιμετώπιση	68
	ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	69
4.4	Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του γονιδίου <i>TACI</i>	74
4.4.1	Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>TACI</i> σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ	74
4.4.2	Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>TACI</i> μη σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ	74
4.4.3	Πολυμορφισμοί του γονιδίου <i>TACI</i>	76
	ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ <i>TACI</i>	76
4.5	Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>CTLA4</i>	79
5	Συσχέτιση της ύπαρξης μεταλλάξεων του γονιδίου <i>TACI</i> αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και με τις μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ μεταλλάξεις του και τους πολυμορφισμούς του	79
5.1	Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου <i>TACI</i> σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ με το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά τους.	79
5.2	Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου <i>TACI</i> σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ με τις συνθήκες διάγνωσης της νόσου.	81
5.3	Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου <i>TACI</i> σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	83
5.4	Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου <i>TACI</i> σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών του ορού και των υποτάξεων της IgG	91
5.5	Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου <i>TACI</i> σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την παρουσία ή την απουσία των μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεών του, καθώς και των πολυμορφισμών του	92
5.6	Πολυπαραγοντική ανάλυση	94
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
7	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 101

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 115

«*TACI* mutations in Primary Antibody Deficiencies. A nationwide study in Greece

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (ΚΠΑ) ανήκει στις Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες (ΠΑΑ, Ομάδα III βάσει της ταξινόμησης της IUIS). Χαρακτηρίζεται από υπογαμμασφαιριναιμία, η οποία αφορά στο σύνολο των περιπτώσεων την IgG, στο 70-80% των περιπτώσεων και την IgA και στο 50% περίπου των περιπτώσεων και την IgM. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ΚΠΑ εμφανίζουν αδυναμία αντισωματικής απάντησης έναντι πολυσακχαριδικών (κυρίως), αλλά και πρωτεϊνικών αντιγόνων. Η ΚΠΑ είναι η δεύτερη σε συχνότητα πρωτοπαθής αντισωματική ανεπάρκεια, μετά την εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA. Η έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου μπορεί να είναι είτε πρόιμη κατά την παιδική ηλικία, είτε όψιμη κατά την ενήλικη ζωή (συνήθως μεταξύ 3^{ης} και 4^{ης} δεκαετίας της ζωής). Εκτιμάται ότι πλέον σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% οι ασθενείς με ΚΠΑ διαγιγνώσκονται κατά την ενήλικη ζωή. Το ενδεχόμενο υποκείμενης ΚΠΑ θα πρέπει να εξετάζεται κυρίως σε περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν υποτροπιάζουσες ή επίμονες λοιμώξεις του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού (ωτίτιδες, παρραρινοκολπίτιδες, βρογχίτιδες, πνευμονίες) οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά με τα συνήθη αντιβιοτικά. Επίσης, νέοι ενήλικες με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) ή και βρογχεκτασίες θα πρέπει να ελέγχονται προς αυτήν την κατεύθυνση. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί και η πιθανότητα διάγνωσης ΚΠΑ στα πλαίσια εργαστηριακής διερεύνησης και άλλων κλινικών συνδρόμων (λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, χρόνια διαρροϊκό σύνδρομο) καθώς και αυτοάνοσων κυτταροπενιών όπως η Ιδιοπαθής Θρομβοπενική Πορφύρα (ΙΘΠ) και η Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία (ΑΑΑ). Επισημαίνεται ότι ασθενείς με IgA Ανεπάρκεια και συνοδό ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG (IgG₂ ή IgG₄), είναι δυνατόν να εμφανίζουν κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Αρκετά σπανιότερα, το ίδιο ισχύει και για ασθενείς με Εκλεκτική Ανεπάρκεια των Υποτάξεων της IgG, καθώς και για ασθενείς με Αντισωματική ανεπάρκεια (αδυναμία αντισωματικής απάντησης) με φυσιολογικές τιμές ανοσοσφαιρινών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ασθενείς με ΚΠΑ εμφανίζουν σε αυξημένη συχνότητα συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό αυτοάνοσα νοσήματα και κακοήθειες (λεμφώματα και νεοπλάσματα του γαστρεντερικού). Ο επιπολασμός της εκτιμάται σε 1/25-50.000 περίπου. Σημειώνεται ότι τα επιδημιολογικά στοιχεία, όχι μόνο της ΚΠΑ, αλλά σχεδόν όλων των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφύλαξη λόγω του σημαντικού βαθμού υποδιάγνωσης τους. Στις περισσότερες των περιπτώσεων (80%

περίπου) δεν διαπιστώνεται κληρονομική μεταβίβαση. Οι υπεύθυνοι αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως για το σύνολο των ασθενών, παρά μόνο σε κάποιους στους οποίους υπήρχε κληρονομική μεταβίβαση και έγινε έλεγχος για την παρουσία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται τόσο με την διαφοροποίηση της Β-Λεμφικής σειράς, όσο και με την ενεργοποίηση των Β-Λεμφοκυττάρων. Μέχρι σήμερα, γενετικές βλάβες οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την εκδήλωση ή και για την τροποποίηση της κλινικής έκφρασης της ΚΠΑ, έχουν εντοπιστεί κυρίως στα παρακάτω γονίδια: *ICOS* (*Inducible Costimulator*), *CD19*, *TACI* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 13B*, *TNFRSF13B*), *BAFFR* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 13C*, *TNFRSF13C*) και *MSH5* (*MutS Homolog 5*). Μεταξύ αυτών, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* αποτελούν τις συχνότερες γνωστές γενετικές βλάβες οι οποίες σχετίζονται με την παθογένεση της ΚΠΑ, αν και για την πλειονότητα των περιπτώσεων η παρουσία τους (ειδικά σε ετερόζυγη μορφή) φαίνεται να μην είναι παθογενετική, αλλά να επηρεάζει κατά κύριο λόγο τον φαινότυπο της νόσου (ειδικά την εμφάνιση αυτοανοσίας ή και λεμφικής υπερπλασίας). Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *CTLA4* έχουν περιγραφεί σε υπο-ομάδα ασθενών με ΚΠΑ οι οποίοι εμφανίζουν αυτοάνοσες εκδηλώσεις και λεμφικές υπερπλασίες, γεγονός το οποίο έχει αποδοθεί στο ρόλο της *CTLA4* πρωτεΐνης στην ανοσορρύθμιση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι κατ' αρχήν η αξιολόγηση της επίπτωσης των μεταλλάξεων των γονιδίων *TACI* και *CTLA4* σε Έλληνες ασθενείς με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Εν συνεχεία, θα επιχειρηθεί η μελέτη της ύπαρξης ή όχι συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας τυχόν μεταλλάξεων των προαναφερθέντων γονιδίων, με τον κλινικό και τον εργαστηριακό φαινότυπο της νόσου. Η συλλογή του υλικού των ασθενών έγινε στα πλαίσια της Ομάδας Μελέτης Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας. Αρχικά, στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς οι οποίοι διαγνώστηκαν και παρακολουθούνται στα ιατρεία Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών ενηλίκων των Τμημάτων Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός» και του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ παράλληλα μελετήθηκαν και ασθενείς προερχόμενοι από το Παιδιατρικό Τμήμα του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Αργότερα εντάχθηκαν ασθενείς και από άλλα Τμήματα Νοσοκομείων, τα οποία θα αναφερθούν στη συνέχεια (Ειδικό μέρος, Υλικό). Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *TACI* και *CTLA4*, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της

αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και της αλληλούχισης βάσεων (Sequencing). Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 23.0.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από το γενικό και το ειδικό μέρος. Στο γενικό μέρος, αρχικά θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα δεδομένα αναφορικά με τις ΠΑΑ, με έμφαση στην ΚΠΑ και τις σχετιζόμενες με αυτήν γονιδιακές μεταλλάξεις. Εν συνεχεία, θα περιγραφούν αναλυτικά τόσο η δομή, όσο και οι λειτουργίες του κυτταρικού υποδοχέα TACI και του συνδιεγερτικού μορίου CTLA4, ενώ θα περιγραφούν η δομή των γονιδίων τους και οι μέχρι σήμερα γνωστές μεταλλάξεις τους οι οποίες σχετίζονται με τις ΠΑΑ. Στο ειδικό μέρος αρχικά θα περιγραφεί αναλυτικά η μεθοδολογία της μοριακής μελέτης των γονιδίων *TACI* και *CTLA4*. Πιο συγκεκριμένα, θα παρουσιαστούν αναλυτικά οι τεχνικές της απομόνωσης γονιδιωματικού DNA, της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και της αλληλούχισης βάσεων (Sequencing). Εν συνεχεία θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα δεδομένα του δείγματος των ασθενών (δημογραφικά στοιχεία, κλινικά χαρακτηριστικά, εργαστηριακά ευρήματα, θεραπεία, αποτελέσματα μοριακής μελέτης). Θα ακολουθήσει η αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης, στα πλαίσια της προσπάθειας διερεύνησης της ύπαρξης τυχόν συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας μεταλλάξεων στα προαναφερθέντα γονίδια (αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ) με τα δημογραφικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Τέλος, θα επιχειρηθεί η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, με τα αντίστοιχα αναλόγων μελετών από την διεθνή βιβλιογραφία. Ως παράρτημα επισυνάπτεται και η πρόσφατη ξενόγλωσση δημοσίευση: «***TACI mutations in Primary Antibody Deficiencies. A nationwide study in Greece***», στην οποία περιλαμβάνεται σημαντικό μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι ένα ετερογενές σύνολο νοσημάτων τα οποία χαρακτηρίζονται από διαφορετικού βαθμού κάθε φορά έλλειμμα, το οποίο μπορεί να αφορά συνηθέστερα την ειδική ανοσία και να εντοπίζεται είτε στα Β-Λεμφοκύτταρα, είτε στα Τ-Λεμφοκύτταρα, είτε και στους δύο προαναφερθέντες υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων. Σπανιότερα, μπορεί να ευθύνεται η μη ειδική ανοσία και πιο συγκεκριμένα τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα), τα ΝΚ-Λεμφοκύτταρα και οι ανεπάρκειες παραγόντων του συμπληρώματος. Σύμφωνα με την ταξινόμηση της International Union of Immunological Societies (IUIS) του 2004, η οποία επικαιροποιήθηκε το 2009, το 2011, το 2014 και το 2017, οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες κατηγοριοποιούνταν σε οκτώ ομάδες, ως εξής: α) **Ομάδα I:** Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων, β) **Ομάδα II:** Συγγενή σύνδρομα τα οποία συνοδεύονται από ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων, γ) **Ομάδα III:** Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, δ) **Ομάδα IV:** Διαταραχές της ειδικής ανοσιακής απάντησης, ε) **Ομάδα V:** Πρωτοπαθείς λειτουργικές ανεπάρκειες των φαγοκυττάρων (ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων), στ) **Ομάδα VI:** Διαταραχές της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης, ζ) **Ομάδα VII:** Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και η) **Ομάδα VIII:** Πρωτοπαθείς ανεπάρκειες παραγόντων του συστήματος του συμπληρώματος¹⁻⁵. Κατά την τελευταία αναθεώρηση της ταξινόμησης IUIS το 2019, προστέθηκε μία ακόμη κατηγορία νοσημάτων (**Ομάδα IX:** Σύνδρομα Μυελικής Ανεπάρκειας)⁶.

Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες διαγιγνώσκονται κατά την παιδική ηλικία. Μικρός αριθμός περιπτώσεων πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών διαγιγνώσκεται κατά την ενήλικη ζωή. Πρόκειται σχεδόν αποκλειστικά για **Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες (ΠΑΑ)**, όπως η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (ΚΠΑ), η Εκλεκτική Ανεπάρκεια της IgA, η Εκλεκτική Ανεπάρκεια Υποτάξεων της IgG και η Ανεπάρκεια αντισωματικής απάντησης. Πολύ σπάνια σε ενήλικες μπορεί να διαπιστωθούν: α) η παρουσία CD4-Λεμφοπενίας αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, και β) η παρουσία ανεπάρκειας κάποιου από τους παράγοντες του συμπληρώματος σε ασθενείς πάσχοντες από αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ)^{7,8}.

Το ενδεχόμενο υποκείμενης πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας θα πρέπει να εξετάζεται σε περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν: 1) Υποτροπιάζουσες ή επίμονες λοιμώξεις του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού (ωτίτιδες, παρραρινοκολπίτιδες, βρογχίτιδες, πνευμονίες)

οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά με τα συνήθη αντιβιοτικά. Επίσης, νέοι ενήλικες με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) ή και βρογχεκτασίες θα πρέπει να ελέγχονται προς αυτήν την κατεύθυνση. Τα παραπάνω οδηγούν τη διαγνωστική μας σκέψη συνήθως προς την κατεύθυνση της ανεπάρκειας των ανοσοσφαιρινών. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί και η πιθανότητα διάγνωσης πρωτοπαθούς αντισωματικής ανεπάρκειας (ΚΠΑ στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων) στα πλαίσια εργαστηριακής διερεύνησης και άλλων κλινικών συνδρόμων (λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, χρόνια διαρροϊκό σύνδρομο) καθώς και αυτοανώσων κυτταροπενιών όπως η Ιδιοπαθής Θρομβοπενική Πορφύρα και η Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία. 2) Ευκαιριακές λοιμώξεις (από *Candida*, *Aspergillus*, Κρυπτόκοκκο, VZV, CMV, *Pneumocystis Carinii*, κ.ά.) σε περιπτώσεις ασθενών όπου έχει αποκλεισθεί το ενδεχόμενο του AIDS. Οι περιπτώσεις αυτές συνήθως οδηγούν τη διαγνωστική μας σκέψη προς την κατεύθυνση της ανεπάρκειας της κυτταρικής ανοσίας. 3) Υποτροπιάζουσες, περιγεγραμμένες λοιμώξεις (δοθήνες, αποστήματα, συρίγγια) του δέρματος, των λεμφαδένων, των πνευμόνων, των οστών και των αρθρώσεων που αποδίδονται συνήθως στον σταφυλόκοκκο και σπανιότερα σε gram (-) βακτηρίδια και μύκητες. Οι περιπτώσεις αυτές είναι συνήθως ενδεικτικές υποκείμενης λειτουργικής ανεπάρκειας του συστήματος των φαγοκυττάρων. 4) ΣΕΛ ή αγγειίτιδες με νεφρική συμμετοχή. Τα νοσήματα αυτά είναι δυνατόν, σπάνια, να εκδηλώνονται σε έδαφος ανεπάρκειας παράγοντα του συστήματος του συμπληρώματος (συχνότερα του C₂, σπανιότερα του C₄). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι έλεγχος για υποκείμενη ανεπάρκεια παράγοντα του συστήματος του συμπληρώματος θα πρέπει να γίνεται και σε περιπτώσεις υποτροπιαζουσών ή κεραυνοβόλων μηνιγγιτιδοκοκκικών και γονοκοκκικών λοιμώξεων. Έχουν ενοχοποιηθεί ανεπάρκειες παραγόντων της εναλλακτικής οδού, καθώς και του C₃, αλλά και παραγόντων του τελικού συμπλέγματος (C₅₋₉)⁹⁻¹¹.

Τα ανοσολογικά ελλείμματα από τα οποία χαρακτηρίζονται οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, μπορεί να απαντηθούν και στις περιπτώσεις επίκτητων δευτεροπαθών ανοσοανεπάρκειών. Πολλά νοσήματα και αρκετές παθολογικές καταστάσεις αποτελούν αίτια επίκτητης δευτεροπαθούς ανοσοανεπάρκειας, ενώ οι θεραπευτικές παρεμβάσεις ίσως αποτελούν πλέον τα σημαντικότερα αίτια δευτεροπαθούς ανοσοανεπάρκειας. Εργαστηριακά, τόσο οι πρωτοπαθείς, όσο και οι δευτεροπαθείς ανοσοανεπάρκειες μπορεί να παρουσιάζονται με υπογαμμασφαιριναιμία, εκλεκτικές ανεπάρκειες ανοσοσφαιρινών ή και υποτάξεων της IgG, καταστολή της ικανότητας ειδικής αντισωματικής απάντησης, απόλυτη ή εκλεκτική λεμφοπενία,

καταστολή της ικανότητας απάντησης των Τ-Λεμφοκυττάρων έναντι μιτογόνων ή εξωγενών αντιγόνων και καταστολή της ικανότητας φαγοκυττάρωσης. Από τα προαναφερθέντα, το συχνότερο και σημαντικότερο εύρημα είναι η υπογαμμασφαιριναιμία (με ή χωρίς συνοδό λεμφοπενία). Κατόπιν τούτου, είναι προφανές ότι η προσπάθεια τεκμηρίωσης της διάγνωσης μίας πρωτοπαθούς αντισωματικής ανεπάρκειας, θα πρέπει να έπεται του αποκλεισμού όλων των πιθανών αιτιών δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας^{9,11-13}. Κατά συνέπεια, αρχικά θα παρουσιαστούν τα σημαντικότερα αίτια δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας. Θα ακολουθήσει η αναλυτική παρουσίαση της ΚΠΑ, ενώ θα ακολουθήσει μία σύντομη παρουσίαση των συχνότερων και σημαντικότερων Πρωτοπαθών Αντισωματικών Ανεπαρκειών (ΠΑΑ) των ενηλίκων, οι οποίες είναι δυνατόν να εμφανίσουν κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ.

2. ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΗΣ ΥΠΟΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ

Οι κύριες ομάδες νοσημάτων στις οποίες περιλαμβάνονται περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι είναι πιθανόν να εμφανίσουν δευτεροπαθή υπογαμμασφαιριναιμία είναι: Α) Τα συγγενή σύνδρομα, Β) Τα λοιμώδη νοσήματα, Γ) Τα νεοπλασματικά νοσήματα, Δ) Τα αυτοάνοσα νοσήματα, Ε) Τα νοσήματα που συνοδεύονται από απώλεια λευκώματος. Επίσης, θεραπευτικές παρεμβάσεις (μεταμοσχεύσεις) καθώς και φάρμακα αποτελούν αίτια δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας. Τέλος, είναι γνωστή η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία των νεογνών^{9,11,12}.

Α) Συγγενή σύνδρομα. Εκτός από τα συγγενή σύνδρομα τα οποία περιλαμβάνονται στις ταξινομήσεις της IUIS, υπάρχουν και άλλα τα οποία είναι δυνατόν να συνοδεύονται από ανοσολογικά ελλείμματα. Κάποια από αυτά τα συγγενή σύνδρομα είναι δυνατόν να εμφανίσουν υπογαμμασφαιριναιμία. Από αυτά, τα συχνότερα και γνωστότερα είναι το σύνδρομο Down και το σύνδρομο Turner. Από τα σπανιότερα, αξίζει να αναφερθούν το σύνδρομο Dandy-Walker και το σύνδρομο Teacher-Collins¹¹.

Β) Λοιμώδη νοσήματα. Από τις ιογενείς λοιμώξεις, η HIV λοίμωξη εκτός από την γνωστή CD4-Λεμφοπενία, έχει συσχετιστεί με διαταραχές όλων των συνιστωσών του ανοσιακού συστήματος. Σε αυτές σπάνια περιλαμβάνεται και η υπογαμμασφαιριναιμία. Επίσης, οι λοιμώξεις από EBV και CMV έχουν συσχετιστεί σχετικά σπάνια με CD4-Λεμφοπενία και υπογαμμασφαιριναιμία. Τέλος, στη σήψη μπορεί να προκληθεί υπογαμμασφαιριναιμία λόγω κατανάλωσης των ανοσοσφαιρινών¹¹.

Γ) Νεοπλασματικά νοσήματα. Από την συγκεκριμένη ομάδα νοσημάτων, για την πρόκληση δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας ενοχοποιούνται κατά κύριο λόγο οι αιματολογικές κακοήθειες. Τα χαμηλής κακοηθείας λεμφώματα και ιδιαίτερα η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία (ΧΛΛ) και το Οζώδες Λέμφωμα, είναι γνωστά αίτια βαριάς πολλές φορές υπογαμμασφαιριναιμίας. Το ίδιο ισχύει και για ορισμένες περιπτώσεις Πολλαπλού Μυελώματος (ελαφρών αλυσίδων και μη εκκριτικό) αλλά και Πρωτοπαθούς Ανοσοκυτταρικής Αμυλοείδωσης^{9,11-13}. Τέλος, πέρα από τις προαναφερθείσες αιματολογικές κακοήθειες, γνωστό αίτιο βαριάς υπογαμμασφαιριναιμίας είναι και το Θύμωμα¹⁴. Η υπογαμμασφαιριναιμία στις περιπτώσεις αυτές, δεν αποκαθίσταται μετά την χειρουργική εξαίρεση του όγκου.

Δ) Αυτοάνοσα νοσήματα. Σπάνια κατά τη διάγνωση Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου (ΣΕΛ), Σκληροδερμίας και Δερματομυοσίτιδας-Πολυμυοσίτιδας μπορεί να παρατηρηθεί υπογαμμασφαιριναιμία¹¹.

Ε) Νοσήματα τα οποία συνοδεύονται από απώλεια λευκώματος. Είναι γνωστό, ότι απώλεια λευκώματος από τον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να συμβεί μέσω δύο κυρίων οδών: των νεφρών και του γαστρεντερικού σωλήνα. Έτσι, υπογαμμασφαιριναιμία λόγω απώλειας λευκώματος παρατηρείται κυρίως σε περιπτώσεις νεφρωσικού συνδρόμου, φλεγμονωδών εντεροπαθειών, εντερικής λεμφαγγειεκτασίας (νόσου Waldman) και γαστροπάθειας με απώλεια λευκώματος (σύνδρομο Menetrier). Ο υποσιτισμός, μια κατάσταση η οποία σχετίζεται τόσο με ελαττωμένη πρόσληψη όσο και με αυξημένο καταβολισμό λευκωμάτων, έχει συσχετιστεί και με υπογαμμασφαιριναιμία. Τέλος, τα εκτεταμένα εγκαύματα και τραύματα έχουν συσχετιστεί σπάνια με υπογαμμασφαιριναιμία^{9,11-13}.

ΣΤ) Θεραπευτικές παρεμβάσεις. Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις (μεταμοσχεύσεις, φάρμακα) ίσως αποτελούν πλέον τα σημαντικότερα αίτια δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας.

Οι Μεταμοσχεύσεις Αιμοποιητικών Κυττάρων (ΜΑΚ) έχουν συσχετισθεί με διαταραχές όλων των συνιστωσών του ανοσιακού συστήματος. Η αυτόλογη ΜΑΚ (Αυτο-ΜΑΚ) αποτελεί πρώτη ή δεύτερης γραμμής θεραπευτική επιλογή για ασθενείς πάσχοντες από αρκετά αιματολογικά νοσήματα (Πολλαπλόν Μυέλωμα, Νόσος Hodgkin, Non Hodgkin Λεμφώματα). Η αλλογενής ΜΑΚ (Αλλο-ΜΑΚ) αποτελεί θεραπεία ίασεως για αρκετές αιματολογικές κακοήθειες, κυρίως για σημαντικό αριθμό Οξειών Λευχαιμιών σε πρώτη ή δεύτερη πλήρη ύφεση. Οι ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε ΜΑΚ λόγω του μυελοαφανιστικού σχήματος προετοιμασίας εμφανίζουν βαριά λευκοπενία, η οποία βαθμιαία αποκαθίσταται. Καθυστερεί η

αποκατάσταση των CD4 T-Λεμφοκυττάρων και των B-Λεμφοκυττάρων. Αποτέλεσμα της προαναφερθείσας παρατεταμένης B-Λεμφοπενίας είναι η εμφάνιση υπογαμμασφαιριναιμίας, η διάρκεια της οποίας στις περιπτώσεις των ασθενών οι οποίοι υποβάλλονται σε Αλλο-ΜΑΚ παρατείνεται τόσο λόγω της εντονότερης ανοσοκαταστολής του σχήματος προετοιμασίας, όσο και λόγω της χορήγησης ανοσοκατασταλτικής αγωγής για την αντιμετώπιση είτε της οξείας νόσου του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (acute GVHD), είτε της χρόνιας νόσου του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (chronic GVHD), είτε και των δύο^{11,15}.

Οι ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε *μεταμοσχεύσεις οργάνων* (κυρίως νεφρών), λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική αγωγή η οποία χορηγείται για την πρόληψη ή την θεραπευτική αντιμετώπιση της απόρριψης του μοσχεύματος. Αυτή η ανοσοκατασταλτική αγωγή έχει συσχετισθεί εκτός από λεμφοπενία και με υπογαμμασφαιριναιμία, για την οποία έχουν ενοχοποιηθεί κυρίως η αζαθειοπρίνη και τα κορτικοειδή¹¹.

Από τα *φάρμακα*, τα κορτικοειδή μάλλον ήταν τα πρώτα που συσχετίστηκαν με επίκτητη ανοσοανεπάρκεια^{9,11,12}. Η λεμφοπενία (απόλυτη ή εκλεκτική) και η υπογαμμασφαιριναιμία είναι γνωστές συνέπειες της παρατεταμένης χορήγησης κορτικοειδών. Η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του CD20 έχει συσχετισθεί τόσο με B-Λεμφοπενία, όσο και με παρατεταμένη υπογαμμασφαιριναιμία¹⁶. Το ίδιο ισχύει και για τους αναστολείς της Btk (Bruton's tyrosine kinase) οι οποίοι χορηγούνται κυρίως σε χαμηλής κακοηθείας λεμφώματα και ιδιαίτερα στην ΧΛΛ. Λιγότερο συχνά αναφέρεται εμφάνιση υπογαμμασφαιριναιμίας μετά από χορήγηση των υπολοίπων κυκλοφορούντων αναστολέων τυροσινικής κινάσης. Σημαντικός αριθμός παλαιότερων φαρμάκων έχει συσχετισθεί με δευτεροπαθή υπογαμμασφαιριναιμία, εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA και εκλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG. Τέτοια είναι κυρίως φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση συστηματικών-φλεγμονωδών νοσημάτων (σουλφασαλαζίνη, άλατα χρυσού, χλωροκίνη, D-πενικιλλαμίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη) καθώς και αντιεπιληπτικά (φαινυτοΐνη, καρβαμαζεπίνη, βαλπροϊκό νάτριο)^{9,11}.

Ζ) Ηλικία. Είναι γνωστή η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της βρεφικής ηλικίας. Συνήθως αποκαθίσταται αυτόματα μέχρι το τρίτο έτος της ζωής^{9,11-13}.

Από τα προαναφερθέντα, καθίσταται σαφές ότι για τους ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν υπογαμμασφαιριναιμία πρωταρχικό μέλημα θα πρέπει να είναι ο αποκλεισμός όλων των πιθανών αιτιών δευτεροπαθούς ανοσοανεπάρκειας.

3. ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

3.1 ΚΠΑ-Γενικά στοιχεία. Η ΚΠΑ χαρακτηρίζεται από υπογαμμασφαιριναιμία η οποία αφορά στο σύνολο των περιπτώσεων την IgG, στο 70-80% των περιπτώσεων και την IgA και στο 50% περίπου των περιπτώσεων και την IgM. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ΚΠΑ εμφανίζουν αδυναμία αντισωματικής απάντησης έναντι πολυσακχαριδικών (κυρίως), αλλά και πρωτεϊνικών αντιγόνων. Η ΚΠΑ είναι η δεύτερη σε συχνότητα πρωτοπαθής αντισωματική ανεπάρκεια, μετά την εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA. Ο επιπολασμός της εκτιμάται μεταξύ 1/25.000 και 1/50.000 περίπου. Σημειώνεται ότι τα επιδημιολογικά στοιχεία, όχι μόνο της ΚΠΑ, αλλά σχεδόν όλων των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφύλαξη λόγω του σημαντικού βαθμού υποδιάγνωσής τους. Στις περισσότερες των περιπτώσεων (80% περίπου) δεν διαπιστώνεται κληρονομική μεταβίβαση. Οι υπεύθυνοι αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως για το σύνολο των ασθενών, παρά μόνο σε κάποιους (20% περίπου) στους οποίους διαπιστώθηκε παρουσία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των Β-Λεμφοκυττάρων. Η έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου μπορεί να είναι είτε πρόωμη κατά την παιδική ηλικία, είτε όψιμη κατά την ενήλικη ζωή (συνήθως μεταξύ 3^{ης} και 4^{ης} δεκαετίας της ζωής). Εκτιμάται ότι πλέον σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% οι ασθενείς με ΚΠΑ διαγιγνώσκονται κατά την ενήλικη ζωή. Το ενδεχόμενο υποκείμενης ΚΠΑ θα πρέπει να εξετάζεται κυρίως σε περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν υποτροπιάζουσες ή επίμονες λοιμώξεις του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού (ωτίτιδες, παρραρινοκολπίτιδες, βρογχίτιδες, πνευμονίες) οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά με τα συνήθη αντιβιοτικά. Επίσης, νέοι ενήλικες με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) ή και βρογχεκτασίες θα πρέπει να ελέγχονται προς αυτήν την κατεύθυνση. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί και η πιθανότητα διάγνωσης ΚΠΑ στα πλαίσια εργαστηριακής διερεύνησης και άλλων κλινικών συνδρόμων (λεμφοαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, χρόνια διαρροϊκό σύνδρομο) καθώς και αυτοάνοσων κυτταροπενιών όπως η Ιδιοπαθής Θρομβοπενική Πορφύρα και η Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ασθενείς με ΚΠΑ εμφανίζουν σε αυξημένη συχνότητα συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό αυτοάνοσα νοσήματα και κακοήθειες (λεμφώματα και νεοπλάσματα του γαστρεντερικού). Η στρατηγική της θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών με ΚΠΑ δεν θα πρέπει να εξαντλείται μόνο στην αγωγή υποκατάστασης με ανοσοσφαιρίνη (χορηγούμενη

ενδοφλέβια ή υποδόρια), αλλά να στοχεύει και: α) Στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των λοιμώξεων και β) Στην συστηματική παρακολούθηση των ασθενών προκειμένου να διαγνωσθούν όσο πιο έγκαιρα γίνεται λεμφώματα και νεοπλάσματα του γαστρεντερικού. Σε ότι αφορά το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με ΚΠΑ, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δύο σχετικά πρόσφατα δημοσιευμένων μεγάλων αναδρομικών μελετών, προέκυψε ότι οι ασθενείς με ΚΠΑ οι οποίοι εμφανίζουν μόνο λοιμώξεις, έχουν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με αυτούς οι οποίοι εμφανίζουν (και) κάποια από τις υπόλοιπες κλινικές εκδηλώσεις της ΚΠΑ¹⁷⁻²¹. Για την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΚΠΑ απαιτείται κατ' αρχήν, ο αποκλεισμός κάθε πιθανού αιτίου δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας, ενώ είναι δυνατόν να απαιτηθεί και η διάκρισή της από άλλες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, όπως: α) Η Φυλοσύνδετη Αγαμμασφαιριναιμία^{22,23}, β) Η Αντισωματική ανεπάρκεια με αυξημένη IgM (Hyper-IgM Syndrome)²⁴⁻²⁶ και γ) Φυλοσύνδετο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο (X-Linked Lymphoproliferative Syndrome, XLP)²⁷.

3.2 Αιτιοπαθογένεια ΚΠΑ. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι υπεύθυνοι αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί της ΚΠΑ δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως για το σύνολο των ασθενών, παρά μόνο σε κάποιους (20% περίπου) στους οποίους διαπιστώθηκε παρουσία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των Β-Λεμφοκυττάρων, όπως σχηματικά παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**²⁸. Βιβλιογραφικές αναφορές για μεταλλάξεις γονιδίων αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με την ΚΠΑ (*ICOS*, *TACI*), εμφανίστηκαν για πρώτη φορά το 2003. Από τότε μέχρι σήμερα, έχουν παρουσιαστεί στην βιβλιογραφία σε ασθενείς με κλινική εικόνα συμβατή με ΚΠΑ μεταλλάξεις σε περισσότερα από 30 γονίδια²⁹⁻³⁷. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις (όπως θα αναφερθεί παρακάτω) όταν συσχετίζονται με υπογαμμασφαιριναιμία ορίζουν διακριτές οντότητες (πέραν της ΚΠΑ), οι οποίες περιλαμβάνονται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019⁶. Ακολούθως, θα υπάρξει παρουσίαση των γονιδίων στα οποία, σε ασθενείς με κλινική εικόνα συμβατή με ΚΠΑ, έχει αναφερθεί παρουσία μεταλλάξεων από το 2003 μέχρι πρόσφατα (2019).

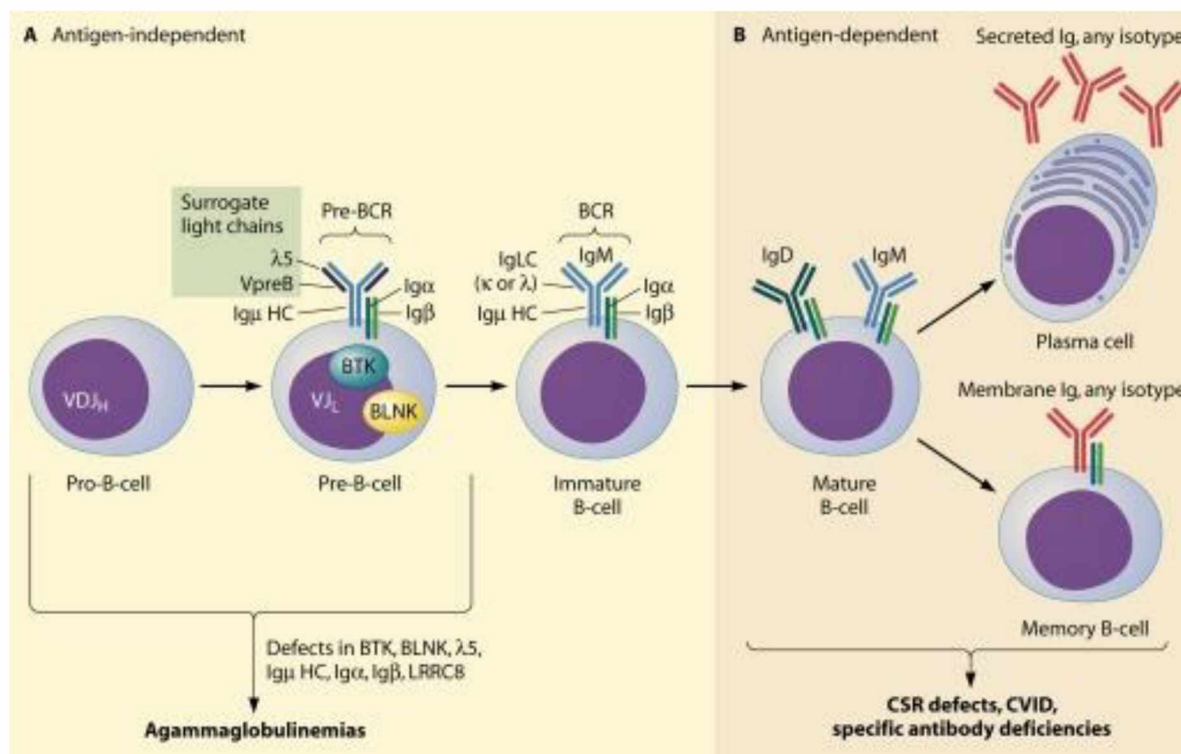
A) Γονίδια τα οποία κωδικοποιούν υποδοχείς και συνδέτες (ligands) υποδοχέων.

1) *ICOS* (Χρωμόσωμα 2q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα I: Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων**)^{6,31}.

- 2) **TACI** (Χρωμόσωμα 17p). Η κληρονομική μεταβίβαση μπορεί να είναι τόσο αυτοσωματική υπολειπόμενη, όσο και αυτοσωματική επικρατούσα. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*, είναι οι με διαφορά συχνότερα απαντώμενες σε ασθενείς με ΚΠΑ (5-15%)^{32,33}.
- 3) **BAFF-R** (Χρωμόσωμα 22q). Η κληρονομική μεταβίβαση μπορεί να είναι τόσο αυτοσωματική υπολειπόμενη, όσο και αυτοσωματική επικρατούσα^{29,30,34}.
- 4) **TWEAK** (Χρωμόσωμα 17p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 5) **CD19** (Χρωμόσωμα 16p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30,35}.
- 6) **CD81** (Χρωμόσωμα 11p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.
- 7) **CD21** (Χρωμόσωμα 1q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.
- 8) **CD20** (Χρωμόσωμα 11q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.
- 9) **CD27** (Χρωμόσωμα 12p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα IV: Διαταραχές της ειδικής ανοσιακής απάντησης**)^{6,30}.
- 10) **IL21** (Χρωμόσωμα 4q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα I: Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων**)^{6,30}.
- 11) **IL21-R** (Χρωμόσωμα 16p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα I: Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων**)^{6,30}.
- 12) **LRBA** (Χρωμόσωμα 4q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα IV: Διαταραχές της ειδικής ανοσιακής απάντησης**)^{6,30}.
- 13) **CTLA-4** (Χρωμόσωμα 2q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα IV: Διαταραχές της ειδικής ανοσιακής απάντησης**)^{6,30,36}.
- B) Γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μόρια σχετιζόμενα με την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος.
- 1) **PRKCD** (Χρωμόσωμα 3p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα IV: Διαταραχές της ειδικής ανοσιακής απάντησης**)^{6,30}.

- 2) *PLCG2* (Χρωμόσωμα 16q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα. Πλέον περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 ως διακριτή οντότητα (**Ομάδα VII**: Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα)^{6,30}.
- 3) *NFKB2* (Χρωμόσωμα 10q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 4) *NFKB1* (Χρωμόσωμα 4q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 5) *PIK3CD* (Χρωμόσωμα 1p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 6) *PIK3R1* (Χρωμόσωμα 5q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 7) *VAV1* (Χρωμόσωμα 19p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 8) *RAC2* (Χρωμόσωμα 22q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.
- 9) *BLK* (Χρωμόσωμα 8p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 10) *ICAROS* (Χρωμόσωμα 7p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα. Περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση της IUIS του 2019 επιπρόσθετα και ως διακριτή οντότητα στην **Ομάδα I** (Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων)^{6,30}.
- 11) *IRF2BP2* (Χρωμόσωμα 1q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 12) *PTEN* (Χρωμόσωμα 10q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 13) *TRNT1* (Χρωμόσωμα 3p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.
- 14) *ATP6AP1* (Χρωμόσωμα Χq). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι φυλοσύνδετη^{6,30}.
- 15) *ARHGEF1* (Χρωμόσωμα 19q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.
- 16) *SH3KBP1* (Χρωμόσωμα Χp). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι φυλοσύνδετη^{6,30}.
- 17) *SEC61A1* (Χρωμόσωμα 3q). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική επικρατούσα^{6,30}.
- 18) *MOGS* (Χρωμόσωμα 2p). Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη^{6,30}.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TAC1* είναι οι με διαφορά συχνότερα απαντώμενες σε ασθενείς με ΚΠΑ (5-15%). Από τις υπόλοιπα γονίδια τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως, συχνότερες θεωρούνται οι μεταλλάξεις των *PIK3CD* και *BAFF-R* (σε ποσοστά όμως που δεν υπερβαίνουν το 1% σε σειρές ασθενών με ΚΠΑ^{6,30}).



Εικόνα 1. Β-Λεμφική διαφοροποίηση και μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε αντισωματικές ανεπάρκειες. (από Fried and Bonilla, 2009)²⁸

3.3 Κλινικές εκδηλώσεις ΚΠΑ

A) Κλινικές εκδηλώσεις ΚΠΑ από το αναπνευστικό. Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού αποτελούν τις συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις (70% περίπου) της ΚΠΑ και σε ένα σημαντικό ποσοστό (30% περίπου) τις μοναδικές. Τέλος, σε ότι αφορά το αναπνευστικό, δεν είναι σπάνια η ανάδειξη της παρουσίας διηθημάτων, με τις απλές ακτινογραφίες θώρακος συνήθως. Τα συγκεκριμένα διηθήματα συνήθως αντιστοιχούν σε μη ειδικά κοκκιώματα (ανάγκη διαφορικής διάγνωσης από σαρκοείδωση), ενώ σπανιότερα αντιπροσωπεύουν μη κακοήθεις λεμφοκυτταρικές διηθήσεις³⁸⁻⁴⁴.

B) Κλινικές εκδηλώσεις ΚΠΑ από το πεπτικό. Θα πρέπει να αναφερθεί και η σημαντική πιθανότητα διάγνωσης ΚΠΑ (10-40% των περιπτώσεων) στα πλαίσια εργαστηριακής διερεύνησης χρόνιων διαρροϊκών συνδρόμων συνήθως λοιμώδους αιτιολογίας (Salmonella, Shigella, Cambylobacter, Cryptosporidium, Giardia Lamblia)³⁸. Σε ορισμένες περιπτώσεις

χρόνιων διαρροϊκών συνδρόμων η διαφορική διάγνωση μεταξύ ΚΠΑ και νοσημάτων όπως η νόσος Crohn, η Ελκώδης Κολίτιδα και η Κοιλιοκάκη εάν αυτά συνοδεύονται από υπογαμμασφαιριναιμία, είναι εξαιρετικά δύσκολη. Σχετικά συχνή είναι και η συνύπαρξη ΚΠΑ και οζώδους λεμφικής υπερπλασίας του λεπτού εντέρου. Λιγότερο συχνή είναι η συνύπαρξη ΚΠΑ και ατροφικής γαστρίτιδας, με ή χωρίς συνοδό Μεγαλοβλαστική Αναιμία. Η ηπατική συμμετοχή δεν είναι ιδιαίτερα συχνή στην ΚΠΑ και συνήθως σχετίζεται με: α) Παρουσία μη ειδικών κοκκιωμάτων, β) Παρουσία όζων στα πλαίσια Οζώδους Αναγεννητικής Ηπατίτιδας και γ) Παρουσία ιστολογικής εικόνας συμβατής με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση⁴⁵⁻⁵⁰.

Γ) Αιματολογικές εκδηλώσεις ΚΠΑ. Οι αιματολογικές εκδηλώσεις της ΚΠΑ είναι αρκετά συχνές. Σπληνομεγαλία αναφέρεται στο 30% περίπου των περιπτώσεων ΚΠΑ, ενώ λεμφαδενοπάθεια στο 10-20% περίπου. Οφείλονται στην ανάπτυξη είτε μη κακοήθων λεμφοκυτταρικών διηθήσεων, είτε κοκκιωμάτων. Σε ότι αφορά τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες, εμφάνιση Ιδιοπαθούς Θρομβοπενικής Πορφύρας (ΙΘΠ) αναφέρεται στο 10-30% περίπου των περιπτώσεων ΚΠΑ. Σπανιότερη είναι η εμφάνιση Αυτοάνοσης Αιμολυτικής Αναιμίας (ΑΑΑ), Συνδρόμου Evans και Αυτοάνοσης Ουδετεροπενίας^{51,52}.

Δ) Αυτοάνοσα νοσήματα και ΚΠΑ. Σε ότι αφορά τις αυτοάνοσες εκδηλώσεις (πέραν των προαναφερθεισών αυτοανόσων κυτταροπενιών), κατά την παρακολούθηση ασθενών με ΚΠΑ έχει αναφερθεί η εμφάνιση: α) Αυτοάνοσης Θυρεοειδίτιδας, β) Μη ειδικής αρθρίτιδας με κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας, γ) Συστηματικού Ερυθρηματώδους Λύκου (ΣΕΛ) και δ) Δερματομυοσίτιδας-Πολυμυοσίτιδας^{51,52}.

Ε) Άλλες κλινικές εκδηλώσεις ΚΠΑ. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ΚΠΑ έχει σπάνια συσχετιστεί και με την εμφάνιση: α) Ατοπικών (αλλεργικών) εκδηλώσεων, β) Λοιμώξεων και διαφόρων εκφυλιστικών νοσημάτων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, γ) Λοιμώξεων του ουροποιητικού, δ) Ευκαιριακών λοιμώξεων, ε) Δερματολογικών εκδηλώσεων (λοιμώξεις, κοκκιώματα) και στ) Σηπτικής αρθρίτιδας ή και Οστεομυελίτιδας¹⁷⁻²¹.

ΣΤ) Νεοπλασίες και ΚΠΑ. Οι ασθενείς με ΚΠΑ εμφανίζουν σε αυξημένη συχνότητα νεοπλάσματα του γαστρεντερικού συστήματος (κυρίως αδενοκαρκίνωμα του στομάχου) και λεμφώματα (ιδιαίτερα του εντέρου). Εκτιμάται ότι στους ασθενείς με ΚΠΑ, η συχνότητα εμφάνισης αδενοκαρκινώματος του στομάχου είναι περίπου 50 φορές μεγαλύτερη και η συχνότητα εμφάνισης λεμφωμάτων περίπου 30 φορές μεγαλύτερη από αυτή του γενικού πληθυσμού.

Από τα προαναφερθέντα καθίσταται σαφές ότι υπάρχουν οι παρακάτω πέντε διακριτοί κλινικοί φαινότυποι της ΚΠΑ⁵³⁻⁵⁶.

- 1) Χαρακτηρίζεται από την παρουσία λοιμώξεων του αναπνευστικού.
- 2) Χαρακτηρίζεται από την παρουσία χρόνιου διαρροϊκού συνδρόμου.
- 3) Χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοανώσων κυτταροπενιών.
- 4) Χαρακτηρίζεται από την παρουσία σπληνομεγαλίας η/και λεμφαδενοπάθειας.
- 5) Χαρακτηρίζεται από την παρουσία νεοπλασίας.

Οι προαναφερθέντες κλινικοί φαινότυποι φαίνεται ότι σχετίζονται με το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με ΚΠΑ. Πιο συγκεκριμένα, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δύο μεγάλων αναδρομικών μελετών προέκυψε ότι οι ασθενείς με ΚΠΑ οι οποίοι εμφανίζουν μόνο λοιμώξεις, έχουν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με αυτούς οι οποίοι εμφανίζουν (και) κάποια από τις υπόλοιπες κλινικές εκδηλώσεις της ΚΠΑ⁵⁷⁻⁶⁰.

3.4 ΠΑΑ οι οποίες είναι δυνατόν να εμφανίσουν κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ.

1) Εκλεκτική Ανεπάρκεια της IgA. Είναι η συχνότερη πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια, απαντώμενη σε συχνότητα 1/700 περίπου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Χαρακτηρίζεται από πλήρη ή σχεδόν πλήρη έλλειψη της IgA στον ορό (σύνηθες κατώτερο όριο ανίχνευσης τα 7 mg/dl) και τις εκκρίσεις. Οι τιμές των υπολοίπων τάξεων των ανοσοσφαιρινών στον ορό είναι φυσιολογικές ή και αυξημένες. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν διαπιστώνεται κληρονομική μεταβίβαση. Και εδώ ο αιτιοπαθογενετικός μηχανισμός της νόσου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, το τελικό όμως αποτέλεσμα είναι η αδυναμία διαφοροποίησης των Β-Λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα ικανά να παράγουν IgA. Στο 70-75% περίπου των περιπτώσεων, οι ασθενείς με IgA ανεπάρκεια είναι ασυμπτωματικοί. Στις περιπτώσεις όπου συνυπάρχει και ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG (συνήθως της IgG₂, σπανιότερα της IgG₄), εμφανίζονται κυρίως υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού οι οποίες οφείλονται συνήθως στον πνευμονιόκοκκο και στον αιμόφιλο. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς ωφελούνται σημαντικά από την αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (ενδοφλέβια ή υποδόρια). Συχνά, σε σημαντικό πρόβλημα για τους ασθενείς με IgA ανεπάρκεια είναι δυνατόν να εξελιχθεί ένα χρόνιο διαρροϊκό σύνδρομο. Πέραν των γνωστών λοιμωδών αιτιών, η χρόνια διάρροια στους συγκεκριμένους ασθενείς, έχει συσχετισθεί και με σύνδρομο δυσαπορρόφησης. Ειδικότερα, αναφέρεται ότι στους ασθενείς με IgA ανεπάρκεια η συχνότητα εμφάνισης της Κοιλιοκάκης είναι 10 φορές μεγαλύτερη, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του

γενικού πληθυσμού. Τέλος, στους ασθενείς με IgA ανεπάρκεια αναφέρεται αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ατοπικών (αλλεργικών) εκδηλώσεων, αυτοανώσων νοσημάτων (όπως ΣΕΛ, Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, Σύνδρομο Sjogren, Αυτοάνοση Θυρεοειδίτιδα) και κακοηθειών (κυρίως του πεπτικού)⁶¹⁻⁶⁵.

2) Εκλεκτική Ανεπάρκεια των Υποτάξεων της IgG. Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικές τιμές της IgG και των υπολοίπων τάξεων των ανοσοσφαιρινών στον ορό, αλλά από χαμηλές τιμές μιας ή περισσότερων από τις υποτάξεις της IgG (IgG₂, IgG₃ και IgG₄), εξαιρουμένης της IgG₁. Αυτό συμβαίνει διότι, από την στιγμή που η IgG₁ αποτελεί το 65-70% της IgG στον ορό, είναι πρακτικά αδύνατον η έλλειψή της να μη συνοδεύεται από υπογαμμασφαιριναιμία. Στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν διαπιστώνεται κληρονομική μεταβίβαση. Και σε αυτή την περίπτωση η αιτιοπαθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη. Φαίνεται όμως ότι σχετίζεται είτε με απαλείψεις στην περιοχή της ομάδας των γονιδίων της IgG, είτε με μεταλλάξεις στα επαγωγικά τους γονίδια. Η συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου συνδρόμου δεν μπορεί να προσδιορισθεί επακριβώς. Η ύπαρξη χαμηλών τιμών των υποτάξεων της IgG, εφόσον δεν συσχετίζεται με επεισόδια λοιμώξεων, δεν αποτελεί τεκμήριο διάγνωσης αντισωματικής ανεπάρκειας. Η ανεπάρκεια της IgG₂ όταν συνοδεύεται από αδυναμία απάντησης έναντι πολυσακχαριδικών αντιγόνων, είναι η συνηθέστερα σχετιζόμενη με κλινική συμπτωματολογία, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ανεπάρκειες υποτάξεων της IgG. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη ανεπάρκεια, συνοδεύεται από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, οφειλόμενες συνήθως στον πνευμονιόκοκκο ή στον αιμόφιλο. Αντιμετωπίζεται και αυτή με αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (ενδοφλέβια ή υποδόρια)⁹⁻¹¹.

3) Αντισωματική ανεπάρκεια με φυσιολογικές τιμές ανοσοσφαιρινών. Οι ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από το συγκεκριμένο σύνδρομο, ενώ χαρακτηρίζονται από φυσιολογικές τιμές όλων τάξεων των ανοσοσφαιρινών αλλά και των υποτάξεων της IgG στον ορό, παρουσιάζουν αδυναμία αντισωματικής απάντησης έναντι πολυσακχαριδικών αντιγόνων. Όπως είναι αναμενόμενο, η συγκεκριμένη ανεπάρκεια συνοδεύεται από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου συνήθως αναπνευστικού, οφειλόμενες κυρίως στον πνευμονιόκοκκο και στον αιμόφιλο. Δεν έχει διαπιστωθεί κληρονομική μεταβίβαση, ούτε έχει πλήρως διευκρινιστεί η αιτιοπαθογένεια του συγκεκριμένου συνδρόμου. Ο προσδιορισμός του επιπολασμού του συγκεκριμένου συνδρόμου μπορεί να θεωρηθεί από πολύ δύσκολος, έως αδύνατος. Μέχρι σήμερα, δεν έχει διευκρινιστεί εάν η αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (ενδοφλέβια ή υποδόρια), προσφέρει

βοήθεια στους συγκεκριμένους ασθενείς αναφορικά με την πρόληψη ή την αντιμετώπιση των υποτροπιάζουσών λοιμώξεων του αναπνευστικού⁶⁶.

3.5 Διαφορική διάγνωση της ΚΠΑ. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να απαιτηθεί η διάκριση της ΚΠΑ (**Ομάδα III**, Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες) από άλλες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, όπως: α) Η Φυλοσύνδετη Αγαμμασφαιριναιμία (**Ομάδα III**, Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες), β) Η Αντισωματική ανεπάρκεια με αυξημένη IgM (**Ομάδα I**: Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και των Τ-Λεμφοκυττάρων) και γ) Το Φυλοσύνδετο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο (**Ομάδα IV**: Διαταραχές της ειδικής ανοσιακής απάντησης). Στην συνέχεια, θα επιχειρηθεί μία σύντομη αναφορά στα τρία προαναφερθέντα νοσήματα. Στα πολύ σπάνια αίτια υπογαμμασφαιριναιμίας με κλινική εικόνα η οποία είναι δυνατόν να παραπέμπει σε ΚΠΑ, περιλαμβάνονται και ορισμένες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες από την **Ομάδα I** (Συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των Β και Τ-Λεμφοκυττάρων), την **Ομάδα II** (Συγγενή σύνδρομα τα οποία συνοδεύονται από ανεπάρκειες των Β και Τ-Λεμφοκυττάρων) και την **Ομάδα VI** (Διαταραχές της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης)^{6,67}. Οι αναφορές στα συγκεκριμένα νοσήματα θα είναι είτε πολύ σύντομες, είτε ονομαστικές.

1) Φυλοσύνδετη Αγαμμασφαιριναιμία (X-Linked Agammaglobulinemia, XLA, Bruton's Disease). Πρόκειται για φυλοσύνδετη διαταραχή, η οποία εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία και χαρακτηρίζεται από εκσεσημασμένη ανεπάρκεια ή και πλήρη απουσία όλων των τάξεων των ανοσοσφαιρινών. Η βαριά αυτή υπογαμμασφαιριναιμία οφείλεται σε αναστολή της διαδικασίας ωρίμανσης των προγονικών κυττάρων της Β-Λεμφικής σειράς. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται και από εκσεσημασμένη ελάττωση (μέχρι πλήρους απουσίας) των κυκλοφορούντων Β-Λεμφοκυττάρων. Το συγκεκριμένο σύνδρομο οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου το οποίο ευθύνεται για την σύνθεση της τυροσινικής κινάσης Bruton (Btk). Η Btk είναι πρωτεΐνη εμπλεκόμενη στην οδό μεταγωγής σήματος των Β-Λεμφοκυττάρων μετά τη διέγερση του υποδοχέα τους. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου εμφανίζονται συνήθως μετά τον 6^ο μήνα της ζωής και περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο βαριές λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, ενώ σπάνια όπως ήδη αναφέρθηκε, η συγκεκριμένη νόσος μπορεί να εμφανιστεί και σε ενήλικες με κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της ΚΠΑ. Η θεραπευτική αντιμετώπιση της XLA, πέρα από την επιτυχή αντιμετώπιση των λοιμώξεων, περιλαμβάνει κυρίως την αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (ενδοφλέβια ή υποδόρια)^{22,23}.

2) Αντισωματική ανεπάρκεια με αυξημένη IgM (Hyper-IgM Syndrome, HIgM).

Χαρακτηρίζεται από αυξημένη ή φυσιολογική τιμή της IgM, συνδυαζόμενη με ανεπάρκεια των IgG και IgA. Στα 2/3 περίπου των περιπτώσεων πρόκειται για φυλοσύνδετη διαταραχή και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου το οποίο ευθύνεται για τη σύνθεση του CD40L. Το συγκεκριμένο μόριο εκφράζεται στην επιφάνεια των CD4 T-Λεμφοκυττάρων και η σύνδεσή του με το CD40, το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια των B-Λεμφοκυττάρων, είναι απαραίτητη για την μετατροφή του ισοτύπου των ανοσοσφαιρινών. Στο υπόλοιπο 1/3 περίπου των περιπτώσεων HIgM συνδρόμου διαπιστώνεται αυτοσωματική υπολειπόμενη κληρονομική μεταβίβαση. Στα περιστατικά αυτά, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν: 1) Το μόριο CD40, 2) Το μόριο AID και 3) Το μόριο NEMO. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνουν κυρίως λοιμώξεις του αναπνευστικού από πυογόνους κόκκους, αλλά και ευκαιριακές λοιμώξεις αποδιδόμενες σε κρυπτόκοκκο, Pn. Carinii κλπ. Στο συγκεκριμένο σύνδρομο αναφέρεται αυξημένη επίπτωση αυτοανώσων νοσημάτων και κακοηθειών. Η θεραπευτική αντιμετώπιση, πέρα από την επιτυχή αντιμετώπιση των λοιμώξεων, περιλαμβάνει και την αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (ενδοφλέβια ή υποδόρια)²⁴⁻²⁶.

3) Φυλοσύνδετο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο (X-Linked Lymphoproliferative Syndrome, XLP).

Η αιτιοπαθογένεια του συγκεκριμένου συνδρόμου αποδίδεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου του οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SAP, η οποία λειτουργεί σαν αναστολέας της πρωτεΐνης SLAM (ενεργοποιητή της οδού μεταγωγής σήματος, τόσο των B όσο και των T-Λεμφοκυττάρων). Οι ασθενείς, φορείς της προαναφερθείσας διαταραχής, παραμένουν χωρίς προβλήματα μέχρι να προσβληθούν από τον EBV. Συνήθως εμφανίζουν βαρύ σύνδρομο του τύπου της λοιμώδους μονοπυρηνώσεως, με σημαντική θνητότητα λόγω ηπατικής ανεπάρκειας. Λιγότερο συχνά, εμφανίζουν υπογαμμασφαιριναιμία, πανκυτταροπενία στα πλαίσια απλαστικού συνδρόμου ή λεμφώματα σχετιζόμενα με τον EBV. Η παρουσία στα πλαίσια του συγκεκριμένου συνδρόμου υπογαμμασφαιριναιμίας, καθιστά επιβεβλημένη την διαφορική του διάγνωση από την ΚΠΑ. Η μόνη θεραπεία ίασεως για τους προαναφερθέντες ασθενείς είναι η Αλλο-ΜΑΚ²⁷.

4) Άλλες συνδυασμένες πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των B και T-Λεμφοκυττάρων (Ομάδα I).

Πέρα από τις περιπτώσεις HIgM και XLP, ακόμη σπανιότερα κατά την ενήλικη ζωή είναι δυνατόν να διαγνωστούν ασθενείς με συνδυασμένη μικτή ανεπάρκεια T και B-Λεμφοκυττάρων (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) η οποία οφείλεται σε μερική έλλειψη του ενζύμου

απαμινάση της αδενοσίνης (ADA) και χαρακτηρίζεται από βαριά λεμφοπενία και βαθμιαία επιδεινούμενη υπογαμμασφαιριναιμία. Οι συνδυασμένες μικτές ανεπάρκειες T και B-Λεμφοκυττάρων (Severe Combined Immunodeficiencies, SCID) περιλαμβάνουν ένα σημαντικό αριθμό συνδρόμων με φυλοσύνδετη ή αυτοσωματική υπολειπόμενη κληρονομική μεταβίβαση. Οι κλινικές εκδηλώσεις στις περιπτώσεις SCID αρχίζουν νωρίς (συνήθως πριν τον 6^ο μήνα της ζωής) και αφορούν σοβαρές λοιμώξεις, κυρίως ευκαιριακές αλλά και ιογενείς/βακτηριδιακές λοιμώξεις του αναπνευστικού ή του γαστρεντερικού από κοινά παθογόνα. Η αιτιοπαθογένειά τους είναι σχεδόν πλήρως διευκρινισμένη. Έχουν ενοχοποιηθεί κυρίως: 1) Μεταλλάξεις στο γονίδιο της γ-αλυσίδας του συμπλέγματος του υποδοχέα των Π-2, Π-4, Π-7, Π-9, Π-15 και Π-21, 2) Μεταλλάξεις στο γονίδιο της Jak-3 τυροσινικής κινάσης, 3) Μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-αλυσίδας του συμπλέγματος του υποδοχέα της Π-7, 4) Ανεπάρκεια της Πουρινικής Νουκλεοτιδικής Φωσφορυλάσης (PNP), 5) Μεταλλάξεις των γονιδίων *RAG-1* και *2*, τα οποία ελέγχουν τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και των υποδοχέων των T-Λεμφοκυττάρων, 6) Αδυναμία σύνθεσης της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA). Τα περισσότερα από τα σύνδρομα SCID αντιμετωπίζονται θεραπευτικά με Αλλο-ΜΑΚ, ενώ σε κάποια από αυτά κερδίζει έδαφος η γονιδιακή θεραπεία⁶⁸⁻⁶⁹.

5) Συγγενή σύνδρομα τα οποία συνοδεύονται από ανεπάρκειες των B και T-Λεμφοκυττάρων (Ομάδα II). Από τα συγκεκριμένα σύνδρομα, ορισμένα μπορεί να συνοδεύονται από μικρότερου ή μεγαλύτερου βαθμού υπογαμμασφαιριναιμία. Από αυτά, τα γνωστότερα και σημαντικότερα είναι τα ακόλουθα: Α) Το Σύνδρομο Wiskott-Aldrich. Η αιτιοπαθογένειά του αποδίδεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη WASP, η οποία συμμετέχει στην ενδοκυττάρια οδό μεταγωγής σήματος. Η κληρονομική μεταβίβαση είναι φυλοσύνδετη. Β) Η Αταξία-Τηλαγγειεκτασία. Αιτιοπαθογενετικά αποδίδεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ATM, η οποία συμμετέχει στη διαδικασία της μίτωσης. Η κληρονομική μεταβίβαση είναι αυτοσωματική υπολειπόμενη. Γ) Το Σύνδρομο Di George. Οφείλεται σε συγγενή ανεπάρκεια του θύμου. Η κληρονομική μεταβίβαση αυτού του συνδρόμου είναι συνήθως επικρατούσα αυτοσωματική. Από τα σπανιότερα σύνδρομα της συγκεκριμένης ομάδας αξίζει να αναφερθούν: Α) Το Σύνδρομο Nijmegen, Β) Το Σύνδρομο Bloom, Γ) Το Σύνδρομο ICF (Immunodeficiency, centromeric instability and abnormal facies)^{66,67}.

6) Διαταραχές της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης (Ομάδα VI). Από τη συγκεκριμένη ομάδα νοσημάτων αξίζει να αναφερθεί το σύνδρομο WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia,

Infection, Myelokathexis), το οποίο χαρακτηρίζεται εκτός των άλλων και από υπογαμμασφαιριναιμία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κληρονομική μεταβίβαση του συγκεκριμένου συνδρόμου είναι επικρατούσα αυτοσωματική^{6,67}.

3.6 Η κλινική προσέγγιση της έγκαιρης διάγνωσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ενδεχόμενο υποκείμενης πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας αναδεικνύεται από την παρουσία συγκεκριμένων συμπτωμάτων και κλινικών σημείων. Προσπαθώντας να διευκολύνουν την διαγνωστική σκέψη των (μη ειδικών κυρίως) ιατρών αναφορικά με τα συγκεκριμένα νοσήματα, δύο διεθνείς οργανισμοί δημιούργησαν και δημοσίευσαν καταλόγους ενδεικτικών κλινικών σημείων (warning signs) πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, το 2008 η European Society for Immunodeficiencies (ESID) παρουσίασε έναν κατάλογο έξι κλινικών σημείων ενδεικτικών υποκείμενης πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας σε ενήλικες⁷⁰. Συγκεκριμένα: 1) Εμφάνιση τεσσάρων ή περισσότερων επεισοδίων λοιμώξεων του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού κατά την διάρκεια ενός έτους, τα οποία αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά με χορήγηση αντιβιοτικών, 2) Εμφάνιση υποτροπιαζουσών λοιμώξεων ή λοιμώξεων οι οποίες αντιμετωπίζονται θεραπευτικά με παρατεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών, 3) Εμφάνιση δύο ή περισσότερων επεισοδίων σοβαρών λοιμώξεων (οστεομυελίτιδας, μηνιγγίτιδας, κυτταρίτιδας), καθώς και σήψης, 4) Εμφάνιση δύο ή περισσότερων ακτινολογικά τεκμηριωμένων επεισοδίων πνευμονίας σε χρονικό διάστημα τριών ετών, 5) Εμφάνιση λοιμώξεων από ασυνήθη παθογόνα ή με ασυνήθεις εντοπίσεις και 6) Ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών. Επίσης, το 2009 το Jeffrey Modell Foundation παρουσίασε έναν κατάλογο δέκα κλινικών σημείων ενδεικτικών υποκείμενης πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας σε ενήλικες⁷¹. Συγκεκριμένα: 1) Εμφάνιση δύο ή περισσότερων επεισοδίων ωτίτιδας κατά την διάρκεια ενός έτους, 2) Εμφάνιση δύο ή περισσότερων επεισοδίων ιγμορίτιδας κατά την διάρκεια ενός έτους, 3) Εμφάνιση ενός ή περισσότερων επεισοδίων πνευμονίας κατά την διάρκεια ενός έτους, 4) Παρουσία χρόνιου διαρροϊκού συνδρόμου με συνοδό απώλεια βάρους, 5) Εμφάνιση υποτροπιαζουσών ιογενών λοιμώξεων, 6) Εμφάνιση λοιμώξεων για την αντιμετώπιση των οποίων απαιτείται ενδοφλέβια χορήγηση αντιβιοτικών, 7) Εμφάνιση υποτροπιαζόντων αποστημάτων δέρματος, μαλακών μορίων και εσωτερικών οργάνων, 8) Εμφάνιση επίμονων και δύσκολα αντιμετωπιζόμενων λοιμώξεων του στόματος και του δέρματος, 9) Εμφάνιση λοιμώξεων από άτυπα μυκοβακτηρίδια, 10) Ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών.

3.7 Εργαστηριακή διάγνωση της ΚΠΑ και των λοιπών αντισωματικών ανεπαρκειών. Όπως ήδη αναφέρθηκε, πρωταρχικό μέλημα κατά την διαγνωστική προσέγγιση ενός ασθενούς με υπογαμμασφαιριναιμία θα πρέπει να είναι ο αποκλεισμός όλων των πιθανών αιτίων δευτεροπαθούς ανοσοανεπάρκειας. Στη συνέχεια, θα πρέπει να διερευνηθεί το ενδεχόμενο υποκείμενης πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας. Ο εργαστηριακός έλεγχος για την διερεύνηση της παρουσίας ή όχι της ΚΠΑ και των λοιπών αντισωματικών ανεπαρκειών με ανάλογο κλινικό φαινότυπο, αλλά και για την τεκμηρίωση της διάγνωσής τους περιλαμβάνει τα ακόλουθα.

A) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού και ποσοτικό προσδιορισμό ανοσοσφαιρινών, ποσοτικό προσδιορισμό των υποτάξεων της IgG, προσδιορισμό του τίτλου των αντί-A και αντί-B ισοαιμοσυγκολλητινών, έλεγχο ικανότητας αντισωματικής απάντησης των ασθενών έναντι πρωτεϊνικών και πολυσακχαριδικών αντιγόνων^{9,11,21}.

B) Προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού του συνόλου των λεμφοκυττάρων. Μέτρηση των απολύτων τιμών του B, T και NK-Λεμφοκυττάρων μετά από σήμανσή τους με μονοκλωνικά αντισώματα (CD19, CD3 και CD16/CD56) με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Επίσης έλεγχο υποπληθυσμών T και B-Λεμφοκυττάρων [CD4(+), CD8(+), CD4(+)/CD45RO(+), CD4(+)/CD45RA(+), CD19(+)/CD27(+/-), CD19(+)/CD21(+/-)] με την χρήση της ίδιας τεχνικής. Τέλος, έλεγχο της παρουσίας ή της απουσίας του CD40L (CD154) με την χρήση της ίδιας τεχνικής^{9,11,21,72}.

Γ) Ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Btk, SAP) με την τεχνική Western blot, βάσει της κατεύθυνσης που μας δίνουν ευρήματα του λοιπού εργαστηριακού ελέγχου^{9,11,21}.

Δ) Έλεγχος για την παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια (*Btk*, *SH2D1A*, *CD40L*) με μοριακές τεχνικές, βάσει των ενδείξεων που έχουμε από τον συνδυασμό λοιπών εργαστηριακών ευρημάτων και πιθανώς αποτελεσμάτων ελέγχου για την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνών με Western blot. Ο προαναφερθείς έλεγχος συμβάλει στην διάκριση της ΚΠΑ από άλλες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (Φυλοσύνδετη Αγαμμασφαιριναιμία, Αντισωματική ανεπάρκεια με αυξημένη IgM και Φυλοσύνδετο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο) εφόσον αυτό κρίνεται αναγκαίο^{9,11,21}.

3.8 Θεραπευτική αντιμετώπιση της ΚΠΑ. Η στρατηγική της θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών με ΚΠΑ βασίζεται κυρίως στην αγωγή υποκατάστασης με ανοσοσφαιρίνη (χορηγούμενη ενδοφλέβια ή υποδόρια). Όμως, δεν θα πρέπει να εξαντλείται μόνο σε αυτή, αλλά

και να στοχεύει: α) Στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των λοιμώξεων και β) Στην συστηματική παρακολούθηση των ασθενών προκειμένου να διαγνωσθούν όσο πιο έγκαιρα γίνεται νεοπλάσματα του γαστρεντερικού και λεμφώματα. Τα επιθυμητά, σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, επίπεδα της IgG στον ορό ασθενών με αγαμμασφαιριναιμία ή υπογαμμασφαιριναιμία οι οποίοι λαμβάνουν αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης είναι άνω των 700 ή 800 mg/dl. Οι γενικοί θεραπευτικοί στόχοι της αγωγής υποκατάστασης με ανοσοσφαιρίνη, συνίστανται στην μείωση της συχνότητας ή και στην εξαφάνιση των σοβαρών λοιμώξεων (στόχος ο οποίος συνήθως επιτυγχάνεται με τα προαναφερθέντα επίπεδα της IgG στον ορό των ασθενών), στην μείωση ή και στην εξαφάνιση της ανάγκης νοσοκομειακής νοσηλείας λόγω αυτών και κατά συνέπεια στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των συγκεκριμένων ασθενών. Δυστυχώς, η αγωγή υποκατάστασης με ανοσοσφαιρίνη δεν φαίνεται να αντιμετωπίζει ή να βελτιώνει αποτελεσματικά την συμπτωματολογία ασθενών με ΚΠΑ, οι οποίοι εμφανίζουν κλινικούς φαινότυπους άλλους πέραν αυτού ο οποίος περιλαμβάνει τους ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν μόνο λοιμώξεις⁷³⁻⁷⁷.

Η ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης για την θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΚΠΑ και άλλες αντισωματικές ανεπάρκειες, ξεκίνησε την δεκαετία του 1970 και έτυχε ευρύτερης εφαρμογής από την δεκαετία του 1980, βελτιώνοντας δραματικά την πρόγνωση, την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής των συγκεκριμένων ασθενών. Η συνήθως χορηγούμενη δόση είναι 400-600 mg/kg ΣΒ ανά τρεις ή τέσσερις εβδομάδες. Η αναφερόμενη στην βιβλιογραφία ελάχιστη χορηγούμενη δόση ανοσοσφαιρίνης στα πλαίσια αγωγής υποκατάστασης είναι 200 mg/kg ΣΒ ανά τρεις ή τέσσερις εβδομάδες, ενώ η μέγιστη 1 g/kg ΣΒ ανά τρεις ή τέσσερις εβδομάδες⁷³⁻⁷⁷. Ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης αναφέρονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40% των ασθενών στις περισσότερες μελέτες^{76,77}. Εκτιμάται ότι το 1/3 περίπου των αντιδράσεων συμβαίνει κατά την πρώτη έγχυση. Οι περισσότερες παρενέργειες έχουν συσχετιστεί με την ταχύτητα της έγχυσης και αφορούν το 5-15% του συνόλου των εγχύσεων. Αντιδράσεις κατά τις αλλαγές σκευάσματος αναφέρονται στο 15-20% των περιπτώσεων. Η χορήγηση ακετομιφαίνης ή παρακεταμόλης, μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών, αντιϊσταμινικών και υδροκορτιζόνης αντιμετωπίζει αλλά και προλαμβάνει την εκδήλωση των περισσότερων ανεπιθύμητων ενεργειών^{76,77}. Τέλος, η καλή ενυδάτωση είναι πιθανό να συμβάλει στην πρόληψη αρκετών ανεπιθύμητων ενεργειών. Οι παρενέργειες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης διακρίνονται σε:

A) Συνήθεις: κεφαλαλγία, μυαλγίες, αρθραλγίες, οσφυαλγία, πυρετός με ή χωρίς ρίγος, ερυθρότητα προσώπου ή γενικευμένη, κνησμός, αίσθημα καταβολής ή κακουχίας, υπνηλία, ναυτία-έμετος, διάρροια, υπόταση, υπέρταση, ταχυκαρδία, δύσπνοια^{76,77}.

B) Σχετικά σπάνιες: έντονη κεφαλαλγία, άσηπτη μηνιγγίτιδα, κνίδωση, βαριά αλλεργική αντίδραση, νεφρική δυσλειτουργία, αιμόλυση, θρομβοεμβολικά επεισόδια^{76,77}.

Γ) Αρκετά σπάνιες: αρθρίτιδα, διαταραχές καρδιακού ρυθμού, ουδετεροπενία, θρομβοπενία, γενικευμένο έκζεμα, εικόνα νευροεκφυλιστικής νόσου^{76,77}.

Το 2005 ξεκίνησε η αγωγή υποκατάστασης με υποδόρια χορηγούμενη ανοσοσφαιρίνη (Subcutaneous, SCIgG). Η συνήθως χορηγούμενη δόση είναι 100-200 mg/kg ΣΒ εβδομαδιαίως⁷⁷. Τέλος, το 2014 ξεκίνησε η αγωγή υποκατάστασης με υποβοηθούμενη υποδόρια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (facilitated, fSCIg). Στην fSCIg, προηγείται της υποδόριας χορήγησης ανοσοσφαιρίνης τοπική έγχυση υαλουρονιδάσης. Η συνήθως χορηγούμενη δόση είναι 400-600 mg/kg ΣΒ ανά τρεις ή τέσσερις εβδομάδες⁷⁷. Σχεδόν το σύνολο των ασθενών (ποσοστό > 90%) οι οποίοι λαμβάνουν υποδόρια χορηγούμενη ανοσοσφαιρίνη εμφανίζουν τοπικές ανεπιθύμητες ενέργειες (ερυθρότητα, οίδημα). Οι προηγουμένως αναφερθείσες συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες εμφανίζονται σε χαμηλότερα ποσοστά και με χαμηλότερη ένταση στους ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν υποδόρια χορηγούμενη ανοσοσφαιρίνη⁷⁷. Τα πλεονεκτήματα της αγωγής υποκατάστασης με υποδόρια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης συνίστανται στην βελτίωση της σχετιζόμενης με την υγεία ποιότητας ζωής (Health Related Quality of Life) των ασθενών και στην μείωση του συνολικού κόστους της θεραπείας των ασθενών, λόγω της έλλειψης ανάγκης (ημερήσιας) νοσοκομειακής νοσηλείας⁷⁷.

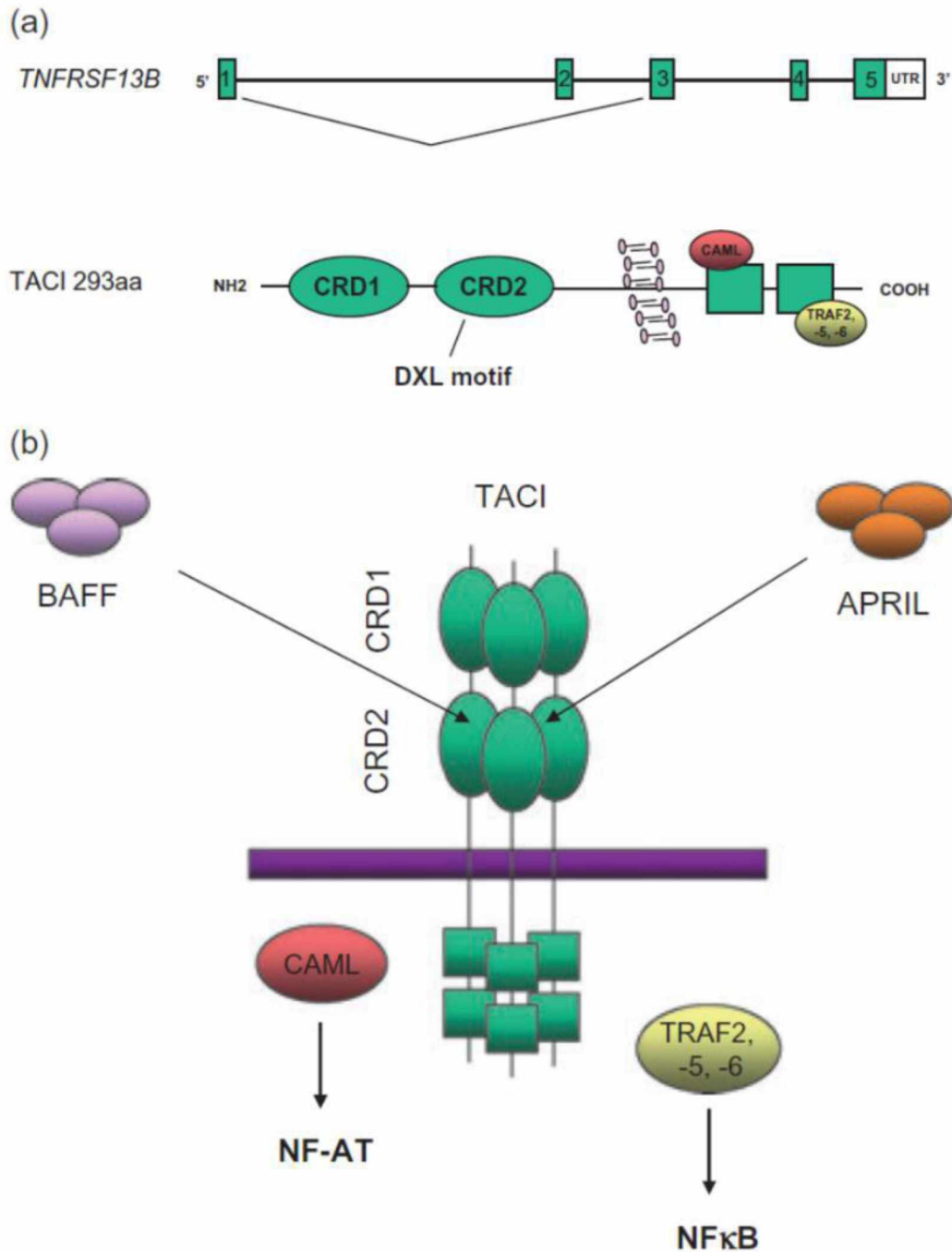
4. Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ TACI

Ο υποδοχέας TACI (Transmembrane Activator και CAML Interactor, TNFRSF13B, CD267), καθώς και ο BAFFR (BAFF receptor, TNFRSF13C, CD268) ανήκουν στην υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των Β-Λεμφοκυττάρων. Το γονίδιο *TNFRSF13B*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI (293 αμινοξέων), εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p11.2) και αποτελείται από πέντε exons τα οποία κωδικοποιούν το προαναφερθέν πρωτεϊνικό μόριο ως εξής. exon 1: αμινοξέα 1-20, exon 2: αμινοξέα 21-66, exon

3: αμινοξέα 67-148, exon 4: αμινοξέα 149-210 και exon 5: αμινοξέα 211-293⁷⁸⁻⁸¹.

4.1 Δομή και συνδέτες του υποδοχέα TACI.

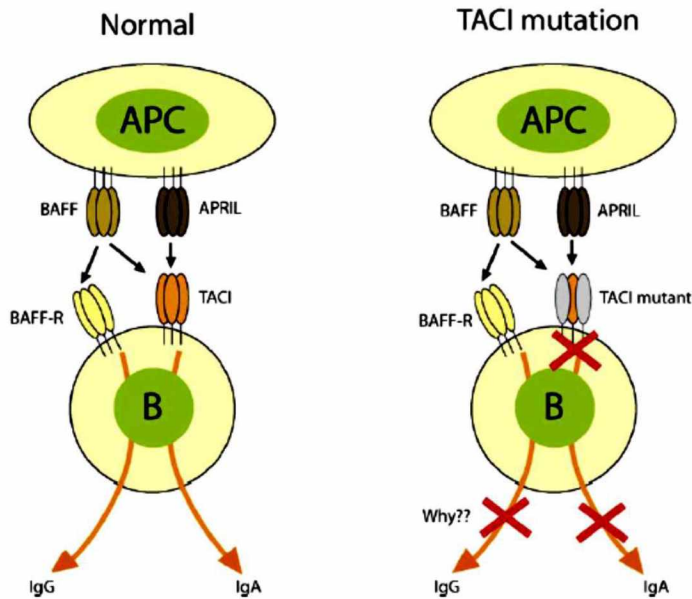
Ο υποδοχέας TACI είναι μια τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη, στην οποία το αμινοτελικό άκρο είναι εξωκυττάριο. Ειδικότερα, ο υποδοχέας αποτελείται από εξωκυττάριο τμήμα συνολικού μεγέθους 166 αμινοξέων, διαμεμβρανικό μεγέθους 20 αμινοξέων (167-186) και ενδοκυττάριο τμήμα μεγέθους 107 αμινοξέων (187-293). Το εξωκυττάριο τμήμα χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο τμημάτων πλούσιων σε κυστεΐνες (Cysteine Residues, CRDs), χαρακτηριστικές της TNF οικογένειας υποδοχέων. Το πρώτο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-1) εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 32 και 67. Το συγκεκριμένο τμήμα λείπει από μια ισομορφή του TACI και είναι αυτό το οποίο συμμετέχει στον πολυμερισμό (τριμερισμό για την ακρίβεια) του υποδοχέα. Το δεύτερο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-2), εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 68 και 106, και είναι αυτό στο οποίο προσδένονται οι συνδέτες του υποδοχέα με υψηλή συγγένεια. Με εναλλακτικό splicing προκύπτει μια μικρότερου μεγέθους TACI πρωτεΐνη (short TACI), η οποία περιέχει μόνο μια επανάληψη κυστεΐνης (CRD-2), αλλά οδηγεί σε ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος (οδός του NF-κB). Τα μόρια B-Cell Activating Factor (**BAFF**, TNFSF13C, CD257) και A-Proliferation Inducing Ligand (**ARIL**, TNFSF13A, CD256) είναι οι κύριοι συνδέτες του υποδοχέα TACI, εμφανίζοντας έναντι αυτού αυξημένη ισχύ σύνδεσης και ειδικότητα⁷⁸⁻⁸². Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται αναλυτικά στην **Εικόνα 2** που ακολουθεί.



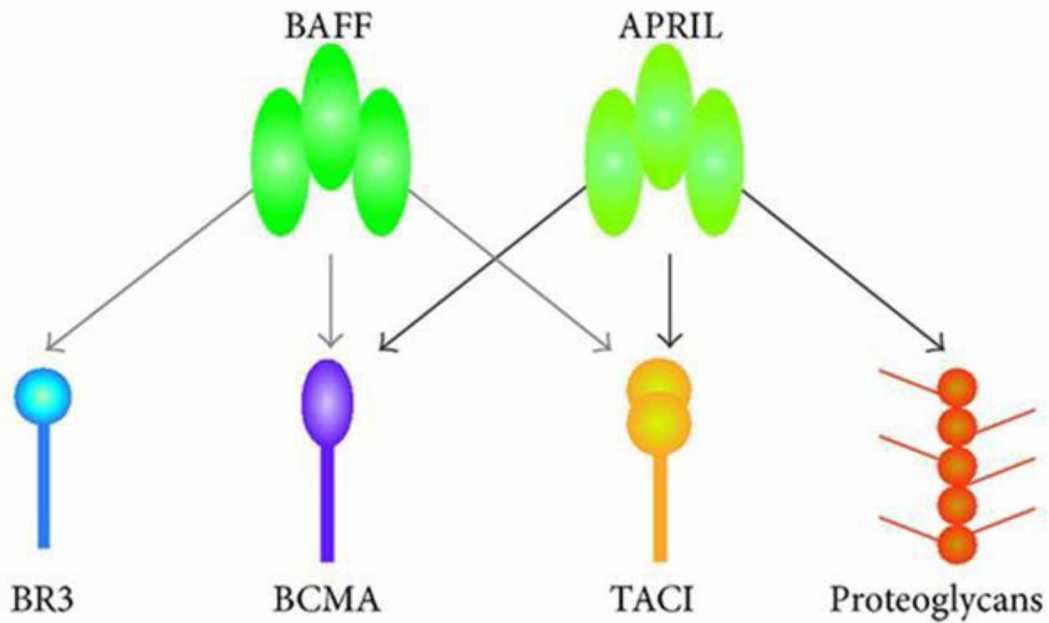
Εικόνα 2: Η γονιδιακή οργάνωση και η δομή της πρωτεΐνης TACI (Bacchelli et al, 2007)⁸³

Ο BAFF (γνωστός παλαιότερα και ως B-Lymphocyte Stimulator, BLyS) είναι κυρίως αναγκαίος για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Β-Λεμφοκυττάρων. Ο APRIL επάγει

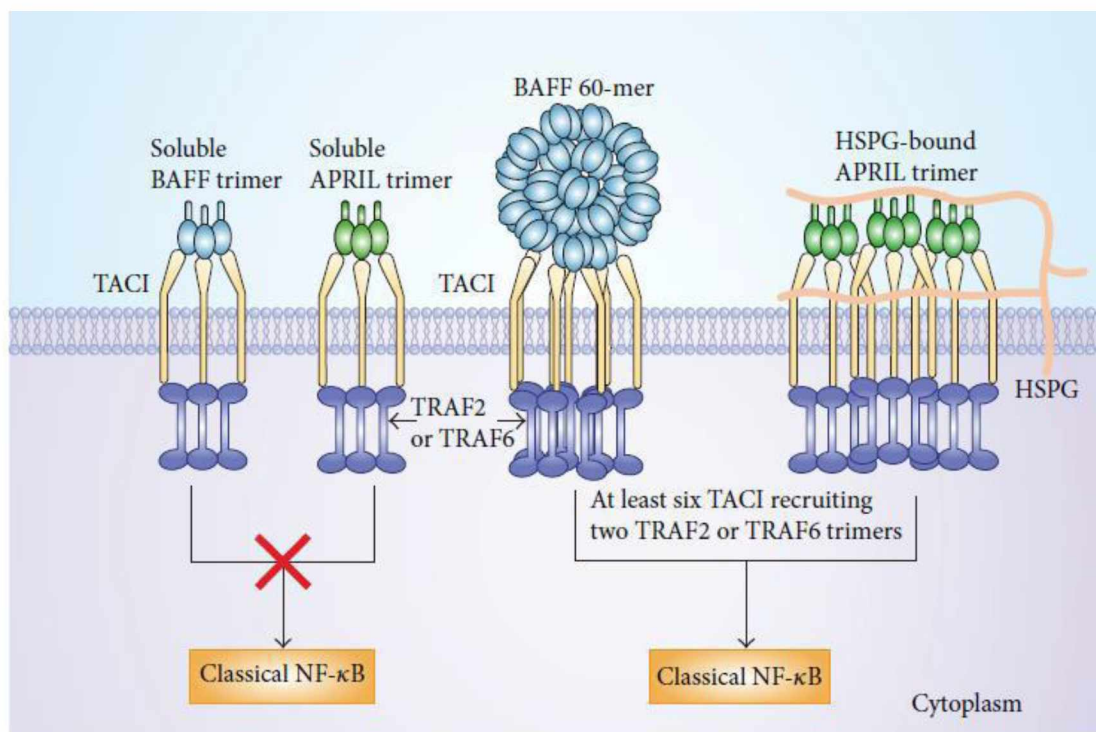
κυρίως την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών, όπως σχηματικά παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3**. Τα μόρια του BAFF, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η οδός μεταγωγής σήματος (του NF-κB), θα πρέπει να συνδεθούν με τριμερή του TACI ως 60μερή (20 τριμερή). Τα μόρια του ARIL, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η οδός μεταγωγής σήματος (του NF-κB), θα πρέπει να συνδεθούν με τριμερή του TACI ως τριμερή συνδεδεμένα στις πλευρικές αλυσίδες της πρωτεογλυκάνης (heparan sulphate proteoglycan, HSPG) syndecan-2. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ισχύς σύνδεσης των BAFF και ARIL στον υποδοχέα TACI είναι παρόμοια, ενώ επιπρόσθετα, ετεροτριμερή των BAFF και ARIL μπορούν να ενεργοποιήσουν την οδό μεταγωγής σήματος του συγκεκριμένου υποδοχέα. Τα BAFF/APRIL ετεροτριμερή μπορούν να συνδέονται με τον TACI, αλλά όχι με τους άλλους δύο παρόμοιους υποδοχείς BCMA (B Cell Maturation Antigen) ή BAFF-Receptor (BAFF-R), στους οποίους τα μόρια APRIL και BAFF μπορούν επίσης να συνδεθούν⁸³⁻⁹³. Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 4** και στην **Εικόνα 5**.



Εικόνα 3: Ο υποδοχέας TACI και η συμμετοχή του στην ισοτυπική μεταστροφή (Berglund et al, 2006)⁹¹



Εικόνα 4: Οι υποδοχείς των BAFF και APRIL. Ο BAFF συνδέεται κυρίως με τον BAFFR αλλά επίσης και με τον BCMA και τον TACI. Ο APRIL συνδέεται με τον TACI και τον BCMA, αλλά όχι με τον BAFFR (Tobon et al, 2013)⁹²



Εικόνα 5: Οι μορφές των συνδετών οι οποίοι ενεργοποιούν τον υποδοχέα TACI (Zhang et al, 2015)⁹³

4.2 Έκφραση και οδός μεταγωγής σήματος του υποδοχέα TACI.

Ο υποδοχέας TACI εκφράζεται κυρίως στα ώριμα Β-Λεμφοκύτταρα. Αρχικά είναι ανιχνεύσιμος στα μεταβατικά T1 σταδίου (transitional) Β-Λεμφοκύτταρα, η έκφρασή του αυξάνεται στα Β-Λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (marginal zone), ενώ μειώνεται μέχρι εξαφανίσεως στα πλασματοκύτταρα. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι ο TACI υποδοχέας μπορεί να ανιχνευθεί και σε μονοκύτταρα, στα οποία ο BAFF μπορεί να επάγει την επιβίωση και την ενεργοποίησή τους, οδηγώντας στην τελική διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι ο TACI υποδοχέας προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του NF-κΒ, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα άλλα μέλη της οικογένειας των TNF υποδοχέων. Επίσης, ο υποδοχέας TACI μπορεί να ενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-AT. Τα ευρήματα αυτά, προσδίδουν έναν κομβικό ρόλο στον TACI υποδοχέα για ποικίλες ανοσιακές απαντήσεις. Συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση του συνδέτη (BAFF ή APRIL), επάγεται τριμερισμός του TACI υποδοχέα, με τον οποίο ακολούθως προσδένονται TNF Receptor

Associated Factors (TRAF μόρια) στο ενδοκυττάριο τμήμα του. Ειδικότερα, προσδένονται τα TRAF-2, -5 και -6 σε ένα διαφορετικό σημείο πρόσδεσης από αυτό του Calcium Modulating Ligand (CAML πρωτεΐνη). Η τελευταία, εμπλέκεται τόσο στην εισροή ιόντων Ca²⁺, όσο και στην διαδικασία διακίνησης υποδοχέων (receptor trafficking), δηλαδή την μετακίνηση του υποδοχέα στο κύτταρο, με στόχο την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίησή του, ή ακόμα και την αποικοδόμηση του. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της CAML πρωτεΐνης στη οδό μεταγωγής σήματος μετά την ενεργοποίηση του TACI, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Σε πρόσφατες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι ο BAFF σχηματίζει δύο σταθερές και υψηλής οργάνωσης δομές με τις οποίες προσδένεται στον υποδοχέα TACI, μια τριμερή και μία πολυμερή (60μερή, αποτελούμενη από 30 20μερή), οργανωμένη σε ένα σύμπλεγμα τύπου ιού. Αν και οι δύο δομές μπορούν να συνδεθούν με τον TACI υποδοχέα, ωστόσο μόνο η 60-μερής ενεργοποιεί την οδό μεταγωγής σήματος του NF-κB⁹⁴⁻¹⁰⁰. Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται σχηματικά στις **Εικόνες 2, 4 και 5**.

4.3 Ο ρόλος του υποδοχέα TACI στην ομοίωση του ανοσιακού συστήματος.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον ρόλο του BAFF στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Β-Λεμφοκυττάρων, θα περίμενε κανείς ότι σε διαγονιδιακούς επίμυες οι οποίοι δεν εκφράζουν TACI (TACI^{-/-}), η έκφραση των Β-Λεμφοκυττάρων θα επηρεαζόταν αρνητικά. Αντίθετα όμως, TACI^{-/-} διαγονιδιακοί επίμυες παρουσίασαν υπερπλασία των Β-Λεμφοκυττάρων με διπλάσιο αριθμό τους στο περιφερικό αίμα και τον σπλήνα, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και ανάπτυξη λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου. Παράλληλα, η απουσία έκφρασης του TACI υποδοχέα οδήγησε σε διαταραχή της θυμοανεξάρτητης παραγωγής ανοσοσφαιρινών (σε απόκριση σε πολυσακχαριδικά αντιγόνα, όπως αυτά της κάψας του πνευμονιοκόκκου), την στιγμή που οι T-εξαρτώμενες αποκρίσεις ήταν φυσιολογικές. Επίσης, το γεγονός ότι ο υποδοχέας TACI υπερεκφράζεται έπειτα από διέγερση των Β-Λεμφοκυττάρων, οδήγησε στην διαπίστωση ότι η σηματοδότηση μέσω του TACI είναι κομβικής σημασίας όχι τόσο για την επιβίωση των Β-Λεμφοκυττάρων, όσο κυρίως για την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών, όπως έχει παρουσιαστεί στην **Εικόνα 3**. Η επιβεβαίωση ήρθε αργότερα, όταν αποδείχθηκε ότι η διέγερση του TACI με τον συνδέτη APRIL, παρουσία πρωτεογλυκανών, προκαλούσε παραγωγή IgA ανοσοσφαιρίνης. Τα παραπάνω ευρήματα, συσχετίστηκαν με την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *TNFRSF13B* (το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί κωδικοποιεί τον TACI υποδοχέα) σε ασθενείς με ΚΠΑ, οι οποίοι ως γνωστόν παρουσιάζουν διαταραχή της ισοτυπικής μεταστροφής.

Ωστόσο, είναι γεγονός ότι υπάρχουν ασάφειες όσον αφορά τον ακριβή βιολογικό ρόλο του TACI, δεδομένου ότι έχει αναφερθεί τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση της διέγερσης του υποδοχέα¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

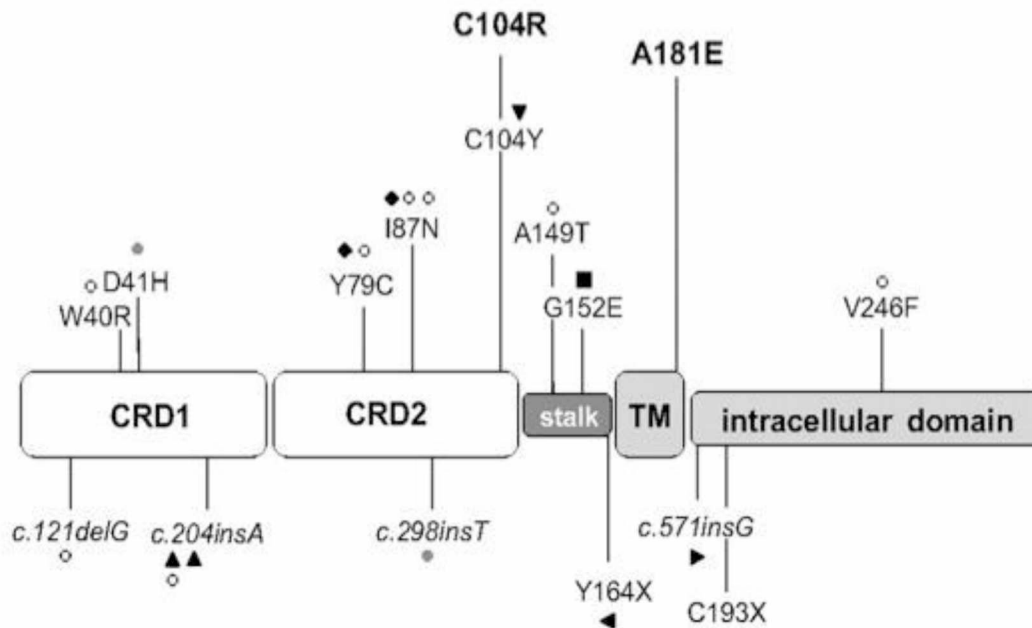
4.4 Μεταλλάξεις του γονιδίου TACI σε ασθενείς με ΚΠΑ.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* διαπιστώθηκαν σε ασθενείς με ΚΠΑ και συσχετίστηκαν (ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή) με την ανάπτυξη της νόσου. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον, ότι αρχικά περιγράφηκαν αρκετές μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* οι οποίες συσχετίστηκαν με τη νόσο. Ωστόσο, τα ίδια κέντρα που πρωτοπεριέγραψαν το 2005 μεταλλάξεις του γονιδίου ως παθογενετικές του νοσήματος, δύο χρόνια αργότερα αναθεώρησαν τη θέση αυτή, δεδομένου ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις εντοπίστηκαν και σε φυσιολογικά άτομα^{106,107}. Ωστόσο, δύο από αυτές τις μεταλλάξεις, οι A181E και C104R, φαίνεται πλέον ότι συνδέονται ισχυρά με την εμφάνιση της ΚΠΑ. Επίσης, η παρουσία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων σχετίζεται με την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σπληνομεγαλίας και αυτοανοσίας στους ασθενείς με ΚΠΑ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Ειδικά για την C104R μετάλλαξη, διαπιστώθηκε ότι παρεμποδίζει την πρόσδεση στον TACI υποδοχέα των συνδετών του, ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή¹¹¹. Πιο συγκεκριμένα, η μετάλλαξη C104R (η οποία τροποποιεί την αλληλουχία της CRD-2 περιοχής) επιδρά αρνητικά στην ικανότητα σύνδεσης του TACI υποδοχέα με τα πολυμερή των APRIL και BAFF. Το ίδιο συμβαίνει και με μία λιγότερο συχνή μετάλλαξη, την I87N¹¹². Σε ότι αφορά την μετάλλαξη A181E, αυτή τροποποιώντας την αλληλουχία της διαμεμβρανικής περιοχής επιδρά αρνητικά στην ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος, μετά την σύνδεση του TACI υποδοχέα με τα πολυμερή των APRIL και BAFF¹¹². Επίσης, μεταλλάξεις (όπως η K188M και η E236Ter) οι οποίες τροποποιούν την αλληλουχία της ενδοκυττάριας περιοχής, επιδρούν αρνητικά στην ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος μετά την σύνδεση του TACI υποδοχέα με τους συνδέτες του¹¹². Πέραν των προαναφερθεισών, σε Έλληνες ασθενείς έχουν αναφερθεί δύο ακόμη μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* οι οποίες έχουν συσχετιστεί αιτιοπαθογενετικά με την ΚΠΑ, η R20C και η C62Y¹¹³. Σε ότι αφορά τις μη αιτιοπαθογενετικές σχετιζόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* με την ΚΠΑ (non causative, polymorphic variant), σε Έλληνες ασθενείς με ΚΠΑ έχει αναφερθεί η παρουσία της V220A και της P251L. Επίσης, στους ίδιους ασθενείς έχει αναφερθεί και η παρουσία των πολυμορφισμών T27, P97 και S277. Τέλος, στους Έλληνες ασθενείς με ΚΠΑ έχει αναφερθεί και η παρουσία τριών πολυμορφισμών σε introns (A24625C, T33402G και T33482C)¹¹³.

Αναλυτικά, οι εντοπίσεις των προαναφερθεισών μεταλλάξεων και των προαναφερθέντων πολυμορφισμών έχουν ως εξής.

- 1) R20C (exon 1). Εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI.
- 2) C62Y (exon 2). Εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI, CRD-1 περιοχή.
- 3) I87N (exon 3). Εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI, CRD-2 περιοχή.
- 4) C104R (exon 3). Εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI, CRD-2 περιοχή.
- 5) A181E (exon 4). Διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα TACI.
- 6) K188M (exon 4). Ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI.
- 7) E236Ter (exon 5). Ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI.
- 8) V220A (exon 5). Ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI.
- 9) P251L (exon 5). Ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TACI.
- 10) T27 (exon 2).
- 11) P97 (exon 3).
- 12) S277 (exon 5).
- 13) A24625C (intron 3).
- 14) T33402G (intron 4).
- 15) T33482C (intron 4).

Στο γράφημα που ακολουθεί (**Εικόνα 6**), παρουσιάζονται σχηματικά οι εντοπίσεις ορισμένων από τις μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα TACI, οι οποίες έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς πάσχοντες από ΠΑΑ.

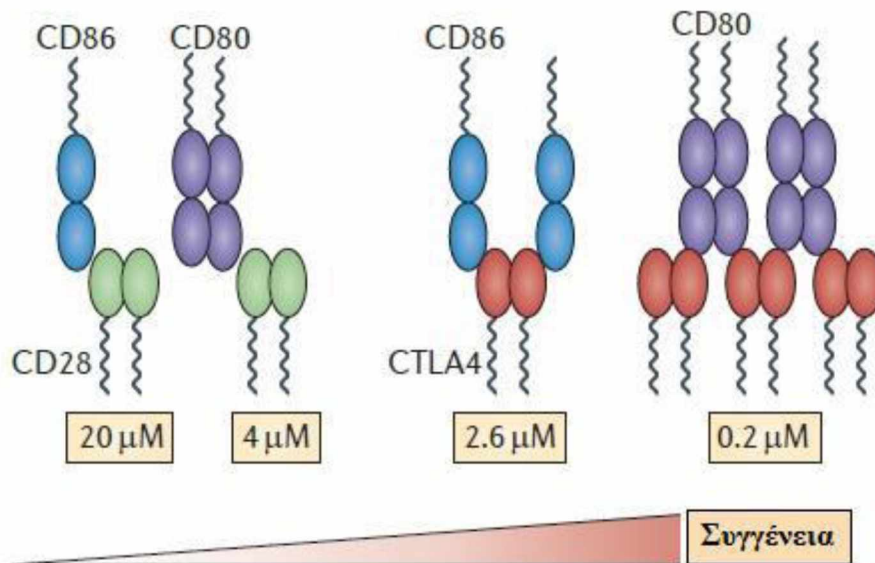


Εικόνα 6: Εντοπίσεις ορισμένων μεταλλάξεων του γονιδίου *TNFRSF13B* και οι συσχετίσεις τους με την πρωτεΐνη TAC1 (Salzer et al, 2009)¹¹⁰

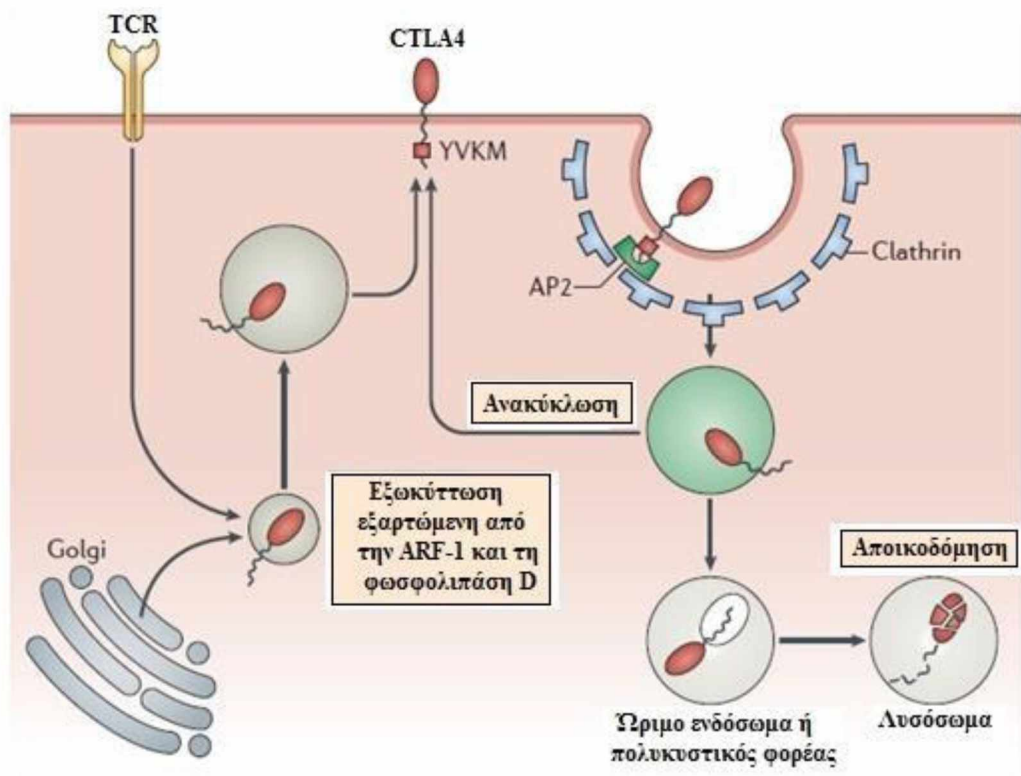
5. ΤΟ ΣΥΝΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CTLA4

Το Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 (CTLA4, CD152) μόριο εκφράζεται στην επιφάνεια τόσο των ενεργοποιημένων Τ-Λεμφοκυττάρων, όσο και των ρυθμιστικών Τ-Λεμφοκυττάρων (T regulatory cells, T regs). Συμβάλει κυρίως στην αναστολή της ενεργοποίησης των Τ-Λεμφοκυττάρων, συμμετέχοντας τόσο στην αναστολή του πολλαπλασιασμού τους, όσο και στην αναστολή της παραγωγή κυτταροκινών από αυτά. Συνδέτες του CTLA4 στην επιφάνεια των αντιγόνοπαρουσιατικών κυττάρων (Antigen Presenting Cells, APCs) είναι τα πρωτεϊνικά μόρια B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86). Τα CTLA4 μόρια προκειμένου να συνδεθούν με τα πρωτεϊνικά μόρια CD80 και CD86 στην κυτταρική επιφάνεια των APCs, έχουν να ανταγωνιστούν τα CD28 μόρια. Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 7**. Σε αντίθεση με τα CD28 μόρια τα οποία εκφράζονται ιδιосуστατικώς στα Τ-Λεμφοκύτταρα (τόσο πριν, όσο και μετά την ενεργοποίησή τους), τα CTLA4 μόρια δεν εκφράζονται στην επιφάνεια των Τ-Λεμφοκυττάρων εάν αυτά δεν έχουν ενεργοποιηθεί, αλλά παραμένουν σε ενδοκυττάρια κυστίδια. Έτσι μετά την ενεργοποίηση των Τ-Λεμφοκυττάρων, η εμφάνιση των CTLA4 μορίων στην κυτταρική τους επιφάνεια είναι

αποτέλεσμα τόσο της απελευθέρωσης και μετακίνησης προϋπαρχόντων μορίων στα προαναφερθέντα ενδοκυττάρια κυστίδια, όσο και πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 8**. Η έκφραση του CTLA4 δεν επάγεται μόνο από την αναγνώριση του αντιγόνου από τον TCR (T-Cell Receptor) υποδοχέα, αλλά και από την σύνδεση του CD28 με τα πρωτεϊνικά μόρια CD80 και CD86 στην κυτταρική επιφάνεια των APCs¹¹⁴⁻¹¹⁹.



Εικόνα 7. Αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων CD28 και CTLA4 με τους κοινούς συνδέτες τους (Collins et al 2002, Τροποποίηση: Παρσοπούλου 2015)¹¹⁴



Εικόνα 8. Ενδοκυττάρια μεταφορά του CTLA4. Χαρακτηριστικό της έκφρασης του CTLA4 αποτελεί η μετακίνησή του από και προς την κυτταρική μεμβράνη. (Collins et al 2002, Τροποποίηση: Παρσοπούλου 2015)¹¹⁴

5.1 Γονιδιακή και πρωτεϊνική δομή του CTLA4

Το CTLA4 ή CD152 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 223 αμινοξέων η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Τα μόρια τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια Τ-Λεμφοκυττάρων υπόκεινται σε διμερισμό και τα δύο τμήματα του διμερούς συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η περιοχή η οποία συνδέει τις πρωτεΐνες B7-1 και (CD80 και CD86) βρίσκεται στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου και κάθε διμερές μπορεί να συνδέσει δύο ανεξάρτητα ομοδιμερή B7-1 ή B7-2, σχηματίζοντας μία γραμμική δομή που ομοιάζει με φερμουάρ (zipper-like) μεταξύ των μορίων B7 και των ομοδιμερών CTLA4 (**Εικόνα 7**).

Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί το μόριο CTLA4 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (μακρό σκέλος, περιοχή q33). Αποτελείται από τέσσερα exons. Το exon 1 (αμινοξέα 1-36) κωδικοποιεί το πεπτιδιο οδηγό του μορίου, κατά την μετακίνησή του από τα ενδοκυττάρια κυστίδια προς την κυτταρική επιφάνεια και περιλαμβάνεται στην εξωκυττάρια περιοχή. Το exon 2 (αμινοξέα 37-

152) κωδικοποιεί την (εξωκυττάρια) περιοχή πρόσδεσης των αντίστοιχων συνδετών. Το exon 3 (αμινοξέα 153-188) κωδικοποιεί την διαμεμβρανική περιοχή του μορίου, ενώ το exon 4 (189-223) κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική περιοχή του. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περιοχή q33 του χρωμοσώματος 2 εντοπίζεται και το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί το CD28 μόριο. Το *CTLA4* γονίδιο είναι δυνατόν να υποστεί και εναλλακτικό splicing. Από αυτό προκύπτει ένα μετάγραφο το οποίο κωδικοποιεί την διαλυτή μορφή του μορίου CTLA4, η οποία εντοπίζεται στον ορό και δεν περιέχει το πρωτεϊνικό τμήμα το οποίο στο κωδικοποιείται από το exon 3.

Η μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του *CTLA4* είναι μερικώς γνωστή. Είναι πιθανό να εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-AT, επειδή η διαμόρφωση των επιπέδων του NF-AT σχετίζεται άμεσα με την έκφραση του γονιδίου. Επιπλέον, η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-AT με κυκλοσπορίνη A προκαλεί μια αξιοσημείωτη μείωση στην μεταγραφή του γονιδίου, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα επιφέρει και η αναστολή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα mTOR από ραπαμυκίνη. Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι ο NF-AT συνδέεται στην περιοχή του υποκινητή του *CTLA4*. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του *CTLA-4* επάγεται από το cAMP¹²⁰⁻¹²⁷.

5.2 Κυτταρική έκφραση του *CTLA4*

Παρά το γεγονός ότι τόσο το CD28, όσο και το CTLA4, εντοπίζονται στην επιφάνεια των T-Λεμφοκυττάρων, έχουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης. Το CD28 εκφράζεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στην κυτταρική μεμβράνη των περισσότερων CD4+ T-Λεμφοκυττάρων και σχεδόν στο 50% των CD8+ T-Λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, το CTLA4 δεν εκφράζεται στα T-Λεμφοκύτταρα όταν αυτά δεν είναι ενεργοποιημένα, αλλά η έκφρασή του επιδέχεται ανοδική ρύθμιση μετά την ενεργοποίησή τους.

Το mRNA το οποίο κωδικοποιεί το CTLA4, είναι ανιχνεύσιμο μέσα σε μία ώρα από την ενεργοποίηση ενός T-Λεμφοκυττάρου και μετά από περίπου 24-36 ώρες το CTLA4 εκφράζεται πλέον στην επιφάνεια του T-Λεμφοκυττάρου. Πιθανώς, το βασικότερο χαρακτηριστικό του CTLA4 είναι ο εντόπισή του σε ενδοκυττάρια κυστίδια. Η αποθήκευσή του εκεί απαιτεί την αλληλεπίδρασή του με την μία υπομονάδα του συμπλέγματος της πρωτεΐνης-συνδέτη της κλαθρίνης AP2. Μετά την ενεργοποίηση του T-Λεμφοκυττάρου η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη αυξάνει σταθερά σε συγκέντρωση και αποθηκεύεται στα κυστίδια αυτά. Παρόλο που τα κυστίδια είναι παρόμοια με τα λυσοσώματα, μπορούν να εμφανιστούν στην επιφάνεια του κυττάρου μέσα σε 8 ώρες από την στιγμή της ενεργοποίησης, με τελικό αποτέλεσμα την

εμφάνιση των CTLA4 μορίων στην κυτταρική επιφάνεια. Όμως, παράλληλα γίνεται και ενδοκυττάρωση CTLA4 μορίων. Η πορεία των CTLA4 μορίων μετά την ενδοκυττάρωση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, παρόλο που κάποια μόρια ανακυκλώνονται και επιστρέφουν στην κυτταρική μεμβράνη και κάποια «καταβολίζονται» στα λυσοσώματα. Το CTLA4 που ενδοκυτταρώνεται εντοπίζεται, επίσης, σε μη λυσοσωμικά κυστίδια που βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα και μπορεί να είναι ώριμα ενδοσώματα ή πολυκυστικοί φορείς. Η λειτουργική σημασία του περίπλοκου συστήματος συνεχούς μετακίνησης του μορίου από και προς την επιφάνεια του κυττάρου μέσω κυστιδίων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Μία υπόθεση είναι ότι εμποδίζοντας την έκφρασή του στην επιφάνεια, επιτρέπει στο CD28 να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικότερα με τους συνδέτες του, προωθώντας την ενεργοποίηση T-Λεμφοκυττάρων. Εναλλακτικά, η δυνατότητα του κυττάρου να αλλάζει την έκφραση του CTLA4 στην επιφάνεια του κυττάρου τόσο άμεσα σαν απάντηση στην ενεργοποίηση του TCR παρέχει ένα πολύ καλά οργανωμένο ανασταλτικό σύστημα ή ακόμη, η ίδια η έκφραση του CTLA4 στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να αποτελεί ανασταλτικό σήμα, ανεξάρτητα από την σύνδεση του μορίου με τον συνδέτη¹²⁸⁻¹³¹.

5.3 Αλληλεπίδραση του CTLA4 με τους συνδέτες του

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και παρουσιαστεί σχηματικά στην **Εικόνα 7**, το CD28 και το CTLA4 αλληλεπιδρούν με τους ίδιους συνδέτες (CD80/B7-1 και CD86/B7-2). Όμως, ακόμη και στα ενεργοποιημένα T-Λεμφοκύτταρα, ο μέγιστος αριθμός CTLA4 μορίων στην κυτταρική τους επιφάνεια αντιστοιχεί στο 2-3% του αριθμού των CD28 μορίων. Ωστόσο, η συγγένεια και η ισχύς σύνδεσής τους με τους συνδέτες είναι έως και 2500 φορές μεγαλύτερη από αυτές των CD28 μορίων, ενώ ειδικότερα η συγγένεια σύνδεσης του CTLA4 με το CD80 είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν περιγραφεί να εμφανίζονται μεταξύ των μορίων επιφανείας και των συνδετών τους. Με αυτόν τον τρόπο, παρόλη τη χαμηλή συγκέντρωση του CTLA4 υποδοχέα, εξαιτίας της μεγάλης συγγενείας του με τους συνδέτες, ο συγκεκριμένος θεωρείται πολύ ισχυρός ρυθμιστής της λειτουργίας των T-Λεμφοκυττάρων. Οι μέχρι σήμερα μελέτες έχουν δείξει ότι μονομερή CD86 συνδέονται σε διμερή CTLA4, ενώ διμερή CD80 συνδέονται με δύο γειτονικά διμερή CTLA4, δημιουργώντας μια δομή που μοιάζει με συρματόπλεγμα. Αντίθετα, το CD28 είναι μονοσθενές και είναι ικανό να συνδέει ένα μόριο CD80 ή CD86 κάθε φορά. Οι συγκεκριμένοι συνδέτες εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα CD80 και CD86 έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες, παρά τις διαφορές που

παρουσιάζουν στις συνθήκες σύνδεσής τους, την κινητική τους και τη διαφορετική συγγένεια για το CD28 και το CTLA-4. Διαφορές στις λειτουργίες τους φαίνεται να υπάρχουν λόγω διαφορετικής κινητικής της έκφρασης στους διάφορους τύπους κυττάρων. Το CD80 δεν εντοπίζεται στα μη ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και εκφράζεται σε αυτά μόνο μετά την ενεργοποίησή τους. Αντίθετα, το CD86 εκφράζεται ιδιοσυστασιακώς στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και μετά την ενεργοποίησή τους ο βαθμός έκφρασής του αυξάνεται¹³²⁻¹³⁵.

5.4 Μηχανισμοί δράσης του CTLA4

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα τα οποία περιγράφουν τους μηχανισμούς με τους οποίους το μόριο του CTLA4 επιτελεί την ανασταλτική του δράση, ενώ για την υποστήριξη καθενός από αυτά υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες. Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες (ενδογενείς, εξωγενείς). Ο διαχωρισμός τους βασίζεται στο αν τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης του υποδοχέα είναι άμεσα στο T-Λεμφοκύτταρο ή έμμεσα, με τη μεταγωγή σημάτων σε αυτό μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων ή των T regs.

A) Ενδογενείς μηχανισμοί δράσης του CTLA4

1) Το CTLA4 ανταγωνίζεται το CD28 για την πρόσδεση των συνδετών. Ο ανταγωνισμός προκύπτει από το γεγονός ότι το CTLA4 έχει μεγαλύτερη συγγένεια και συνδέεται με μεγαλύτερη ισχύ με τα μόρια B7 από ότι το CD28. Η σύνδεση του CD28 οδηγεί μέσω των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NF-AT στην ενεργοποίηση των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν κυτταροκίνες, όπως η IL-2 και η INF γ . Επιπλέον, η επαγωγή της παραγωγής IL-2 οδηγεί σε αυτοκρινή ρύθμιση της ενεργοποίησης του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου με τελικό αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των T-Λεμφοκυττάρων. Τέλος, η σηματοδότηση μέσω του CD28 προάγει την επιβίωση των T-Λεμφοκυττάρων, την διαφοροποίησή τους σε βοηθητικά T- Λεμφοκύτταρα και την ισοτυπική μεταστροφή η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των βοηθητικών T-Λεμφοκυττάρων με τα B-Λεμφοκύτταρα.

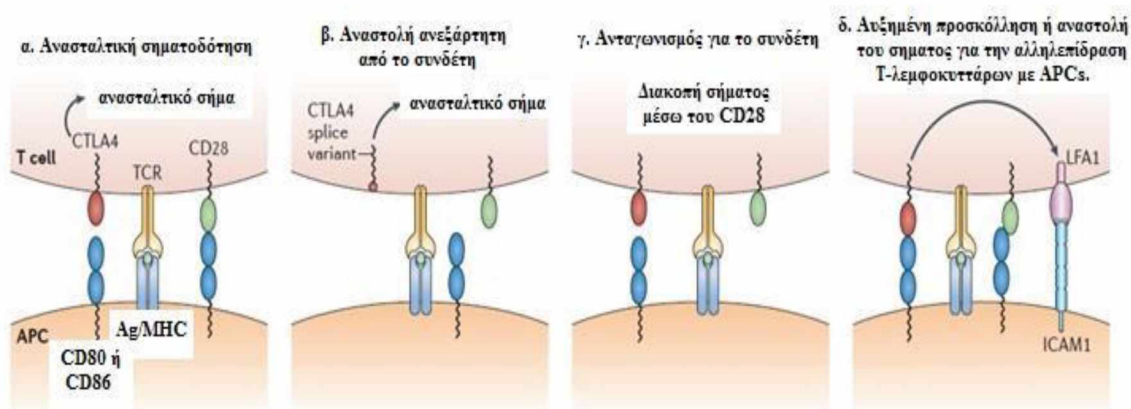
Το CTLA4 φαίνεται ότι είναι ένας σημαντικός αναστολέας της ενεργοποίησης των T-Λεμφοκυττάρων. Το κύριο αποτέλεσμα της δέσμευσης του CTLA4 είναι η αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την IL-2, εμποδίζοντας τη είσοδο του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT στον πυρήνα. Επίσης, το CTLA4 αναστέλλει την έκφραση βασικών στοιχείων του κυτταρικού κύκλου όπως η κυκλίνη D3, η Cdk4 και Cdk6. Σύμφωνα με

αυτό το μοντέλο, το CTLA4 αποτελεί έναν ανασταλτικό ρυθμιστή της ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων χωρίς στην πραγματικότητα να μεταγεί κάποιο ανασταλτικό σήμα¹³⁶⁻¹³⁸.

2) Το CTLA4 ενεργοποιεί ανασταλτικά σήματα. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το CTLA4 μετά την ενεργοποίησή του από τους συνδέτες του, φαίνεται να «ενεργοποιεί» φωσφατάσες, όπως οι SHP1 και SHP2, η PP2A και η SYP (PTPN11) και να μειώνει την φωσφορυλίωση αρκετών πρωτεϊνών-κλειδιά στον καταρράκτη της σηματοδότησης μέσω του TCR^{139,140}.

3) Η σηματοδότηση μέσω του CTLA4 επηρεάζει την προσκόλληση και την κινητικότητα των Τ-Λεμφοκυττάρων. Για την ενεργοποίηση των Τ-Λεμφοκυττάρων, αυτά πρέπει να αλληλεπιδράσουν και να παραμείνουν σε επαφή με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για ικανό χρονικά διάστημα ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη σηματοδότηση. Μια πιο πρόσφατη πρόταση για το μηχανισμό δράσης του CTLA4, είναι η ιδέα ότι η «αναστολή λειτουργίας» του CTLA4 αυξάνει την προσκόλληση και την δημιουργία συμπλεγμάτων όπου διαμεσολαβεί το μόριο LFA1 (γνωστό και σαν αLβ2 ιντεγκρίνη), επάγοντας την έκφρασή του στην επιφάνεια των Τ-Λεμφοκυττάρων^{117,119,141}.

Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 9** που ακολουθεί.



Εικόνα 9. Ενδογενείς μηχανισμοί δράσης του CTLA4 (Collins et al 2002, Τροποποίηση: Παρσοπούλου 2015)¹¹⁴

B) Εξωγενείς μηχανισμοί δράσης του CTLA4

1) Το CTLA4 ενεργοποιεί το μονοπάτι της IDO. Σε αυτό το μοντέλο, το CTLA4 που εκφράζεται από τα Τ-Λεμφοκύτταρα μπορεί να παρέχει σήματα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω της σύνδεσής του με τα CD80 και CD86. Αυτή η σηματοδότηση έχει σαν

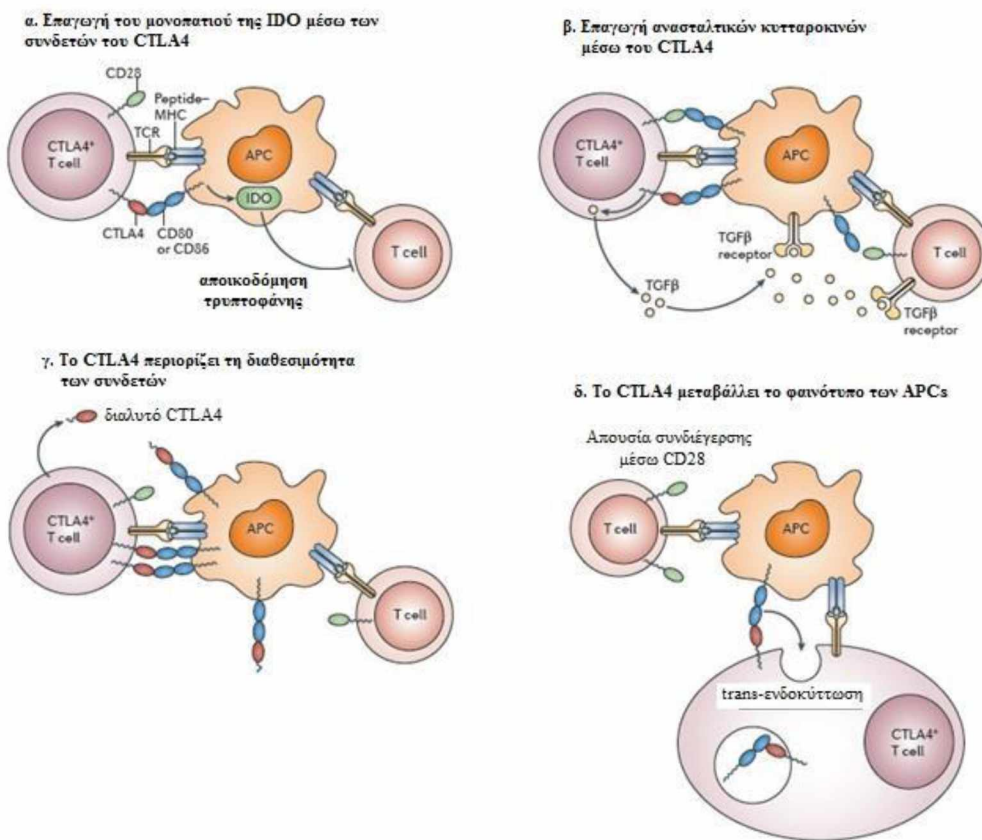
αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή του ενζύμου Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO). Αυτό παρέχει στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα την ικανότητα να αποδομούν την τρυπτοφάνη, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται εντοπισμένη εξάντληση και επακόλουθη αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-Λεμφοκυττάρων^{142,143}.

2) Το CTLA4 ενεργοποιεί τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (T regs). Η απλούστερη και πιο διαδεδομένη εξήγηση για την ρύθμιση της T-Λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης εξωγενώς, είναι η ενεργοποίηση των T regs από το CTLA4. Τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα αποτελούν ένα μικρό πληθυσμό (5-10%) και μπορούν να διαχωριστούν από τους άλλους πληθυσμούς επειδή εκφράζουν τα CD38 και CD25 αντιγόνα. Βασικό στοιχείο στον ρυθμιστικό ρόλο των T regs αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3, ο οποίος μετά την ενεργοποίησή του ρυθμίζει την έκφραση διάφορων γονιδίων που δίνουν στα T regs τη δυνατότητα να επιτελέσουν τις ρυθμιστικές λειτουργίες τους. Τελικά, ο FoxP3 φαίνεται να επάγει την έκφραση του γονιδίου *CTLA4*, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι το CTLA4 μπορεί να μεσολαβεί στην κατασταλτική λειτουργία των T regs, μέσω της αυξημένης παραγωγής του TGFβ από αυτά¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

3) Παραγωγή διαλυτού CTLA4. Όπως ήδη αναφέρθηκε, το *CTLA4* γονίδιο είναι δυνατόν να υποστεί και εναλλακτικό splicing. Από αυτό προκύπτει ένα μετάγραφο το οποίο κωδικοποιεί την διαλυτή μορφή του μορίου CTLA4, που εντοπίζεται στον ορό και δεν περιέχει το πρωτεϊνικό τμήμα το οποίο στο κωδικοποιείται από το exon 3. Τα συγκεκριμένα διαλυτά CTLA4 μόρια, είναι δυνατόν να «δεσμεύσουν» έναν μεγάλο αριθμό CD80 και CD86 μορίων, στην κυτταρική επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων¹⁴⁸.

4) Το CTLA4 μεταβάλλει τον φαινότυπο των APCs. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ενεργοποιημένα T-Λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν CTLA4 ή τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να «ενδοκυτταρώσουν» σύμπλοκα του CTLA4 με CD80 ή CD86 μόρια, οδηγώντας έτσι σε ανεπαρκή συνδιέγερση και επακόλουθη καταστολή των T-Λεμφοκυτταρικών απαντήσεων. Αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται με μία διαδικασία η οποία καλείται trans-ενδοκύττωση, κατά την οποία η αλληλεπίδραση του CTLA4 με οποιονδήποτε από τους συνδέτες του οδηγεί σε ενδοκυττάρια μεταφορά των συνδετών από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο σε ένα κυστίδιο που περιέχει CTLA4 σε ένα T-Λεμφοκύτταρο. Μετά την ενδοκύττωση, οι συνδέτες που μεταφέρθηκαν στα κυστίδια υφίστανται λυσοσωματική αποδόμηση¹⁴⁹.

Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 10** που ακολουθεί.



Εικόνα 10. Εξωγενείς μηχανισμοί δράσης του CTLA4 (Collins et al 2002, Τροποποίηση: Παρσοπούλου 2015)¹¹⁴

5.5 Μεταλλάξεις του CTLA4 γονιδίου και συσχετίσεις τους με τις ΠΑΑ. Μικρός είναι ο αριθμός των μεταλλάξεων του *CTLA4* οι οποίες έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Ορισμένες από αυτές θα παρουσιαστούν παρακάτω.

A) Μεταλλάξεις στο exon 1 το οποίο κωδικοποιεί την περιοχή του πεπτιδίου «οδηγού» του CTLA4 μορίου. Η μετάλλαξη p.T17A οφείλεται στην αντικατάσταση μίας αδενίνης από μία γουανίνη στη θέση +49 του γονιδίου *CTLA4* και έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση μίας θρεονίνης από μία αλανίνη στην αμινοξική θέση 17 της πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη αμινοξική αλλαγή του πεπτιδίου «οδηγού» του CTLA4 μορίου, φαίνεται ότι επηρεάζει την ενδοκυττάρια μεταφορά των CTLA4 μορίων προς την κυτταρική επιφάνεια των T-Λεμφοκυττάρων μειώνοντας τελικά τον αριθμό τους.

B) Μεταλλάξεις στο exon 2. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* έχουν συσχετιστεί με το exon 2, το οποίο κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης των αντίστοιχων συνδετών του. Δύο από αυτές (p.G109E, p.Y139C) έχουν συσχετιστεί με την τροποποίηση (ελάττωση) της ισχύος και της συγγένειας σύνδεσης των CTLA4 μορίων με τους συνδέτες τους. Δύο άλλες (p.R51Ter, p.Y89Ter), έχουν συσχετιστεί με αδυναμία σύνθεσης «λειτουργικών» CTLA4 μορίων.

Γ) Μεταλλάξεις στο intron 2-3. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις οδηγούν στην σύνθεση μεταγράφων τα οποία κωδικοποιούν διαλυτά μόρια CTLA4, τα οποία στερούνται το πρωτεϊνικό τμήμα το οποίο στο κωδικοποιείται από το exon 3.

Βάσει των δεδομένων της βιβλιογραφίας, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* έχουν σαφώς συσχετιστεί τόσο με αυτοάνοσες εκδηλώσεις, όσο και με υπερπλασία (πολυκλωνική ή μονοκλωνική) του λεμφικού ιστού σε διάφορες θέσεις, πιθανότατα λόγω συνεπακόλουθης «λειτουργικής ανεπάρκειας» των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Όμως, άμεση συσχέτισή τους μόνο με υπογαμμασφαιριναιμία δεν αναφέρεται. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, στις οποίες ασθενείς με υπογαμμασφαιριναιμία και μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* παρουσίαζαν αύξηση του πληθυσμού των κυκλοφορούντων «μεταβατικών» (transitional) B-Λεμφοκυττάρων, αυτοάνοσες εκδηλώσεις και λεμφικές υπερπλασίες. Τέλος, η συνεπακόλουθη λόγω των μεταλλάξεων του γονιδίου *CTLA4* «λειτουργική ανεπάρκεια» των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων θεωρείται ότι είναι δυνατόν να συσχετίζεται με «ανεπαρκή» μεταστροφή ισοτύπου (switching) του γονιδίου των ανοσοσφαιρινών. Και αυτό, λόγω ανεπαρκούς παραγωγής IL-10 (σχετίζεται με την σύνθεση της IgG) και του TGFβ (σχετίζεται με την σύνθεση της IgA)¹⁵⁰⁻¹⁵⁴.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι κατ' αρχήν η αξιολόγηση της επίπτωσης των μεταλλάξεων των γονιδίων *TACI* και *CTLA4* σε Έλληνες ασθενείς με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Εν συνεχεία, θα επιχειρηθεί η μελέτη της ύπαρξης ή όχι συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας τυχόν μεταλλάξεων των προαναφερθέντων γονιδίων, με τον κλινικό και τον εργαστηριακό φαινότυπο της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, οι κλινικές παράμετροι οι οποίες, θα αξιολογηθούν ιδιαίτερα είναι: το οικογενειακό ιστορικό ανοσοανεπάρκειας, αυτοανοσίας ή νεοπλασιών, η ηλικία έναρξης της νόσου, η αιτιολογία διάγνωσης της νόσου, η εντόπιση και η συχνότητα των λοιμώξεων πριν τη διάγνωση της νόσου, η εμφάνιση επιπλοκών των λοιμώξεων, η παρουσία αυτοάνοσων εκδηλώσεων και η πλήρης καταγραφή τους, η παρουσία κοκκιωματώδους νόσου, η εμφάνιση καλοήθους λεμφικής υπερπλασίας (σπληνομεγαλίας, ηπατομεγαλίας ή και λεμφαδενοπάθειας), η παρουσία κλινικών εκδηλώσεων από το γαστρεντερικό και η εμφάνιση νεοπλασίας. Από τα εργαστηριακά ευρήματα θα αξιολογηθούν ιδιαίτερα τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων της IgG κατά την διάγνωση της νόσου.

2. ΥΛΙΚΟ

Η συλλογή του υλικού των ασθενών έγινε στα πλαίσια της Ομάδας Μελέτης Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας. Αρχικά, στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς οι οποίοι διαγνώστηκαν και παρακολουθούνται στα ιατρεία Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών ενηλίκων των Τμημάτων Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός» και του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Παράλληλα μελετήθηκαν και ασθενείς προερχόμενοι από το Παιδιατρικό Τμήμα του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν και ασθενείς οι οποίοι διαγνώστηκαν και παρακολουθούνται στα παρακάτω Τμήματα: 1) Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών, 2) Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική του ΓΝΑ «Λαϊκό», 3) Α΄ Προπαιδευτική Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του ΓΝΑ «Λαϊκό», 4) Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Ερρίκος Ντυνάν» και 5) Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Παπαγεωργίου» της Θεσσαλονίκης. Πραγματοποιήθηκε πλήρης καταγραφή του ατομικού αναμνηστικού των ασθενών, των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών τους, καθώς και των εργαστηριακών ευρημάτων τους κατά την διάγνωση της νόσου, ενώ καταγράφηκαν και οι πιθανές μεταβολές του κλινικού φαινοτύπου κατά τη διάρκεια της παρακολούθησής τους.

3. ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *TACI* και *CTLA4*, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και της αλληλούχισης βάσεων (Sequencing). Θα προηγηθεί απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα των ασθενών με την χρήση εμπορικού kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την ανάδειξη της παρουσίας τυχόν μεταλλάξεων, τόσο του *TACI*, όσο και του *CTLA4*, θα γίνει αρχικά ενίσχυση με PCR της έκφρασης όλων των exons των προαναφερθέντων γονιδίων (πέντε και τεσσάρων αντίστοιχα). Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR θα «καθαριστούν» με την χρήση εμπορικού kit (Qiagen), ενώ θα αναλυθούν με την τεχνική της αλληλούχισης βάσεων (sequencing). Ακολούθως, θα περιγραφούν αναλυτικά τα προαναφερθέντα «βήματα» της «μοριακής ανάλυσης» των γονιδίων *TACI* και *CTLA4*.

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά συστήματα QiAamp DNA Blood Mini Kit και PureLink Genomic DNA Kit (Qiagen & Invitrogen), τα οποία βασίζονται στην επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο¹⁵⁵. Ακολούθησε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή, για την απομόνωση γενετικού υλικού από εμπύρνηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος και τον καθαρισμό του από προσμίξεις.

Περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε με βάση το PureLink Genomic DNA Kit. Το συγκεκριμένο σύστημα απομόνωσης περιλαμβάνει τέσσερις τύπους διαλυμάτων. Αρχικά, σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1.5 mL μεταφέρθηκαν 200 μL από κάθε φιαλίδιο γενικής αίματος με αντιπηκτικό K3EDTA. Μετά από προσθήκη 20 μL πρωτεϊνάσης K (για την διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις καρβοξυτελικές θέσεις των αμινοξέων) και 20 μL RNAάσης (για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα), ακολούθησε ανάδευση και επώαση για δύο λεπτά της ώρας (2 minutes, 2 min). Κατόπιν προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης (PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer) το οποίο ενισχύει τη δραστηριότητα της πρωτεϊνάσης K, στοχεύοντας έτσι στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση στην αποτελεσματική λύση των κυττάρων. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 55° C για 10 min. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 96-100% και ακολούθησε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (PureLink Spin Column). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε

φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές για 1 min και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2. Ακολούθησαν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (μία στις 10.000 στροφές για 1 min και μία στις 14.000 στροφές για 3 min), προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA, κλπ). Ακολούθως, η στήλη μεταφερόταν σε φιαλίδιο φυγοκέντρωσης των 1,5 mL, όπου μετά από προσθήκη 100 μL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) ακολουθούσε επώαση 1 min. Ακολουθούσε η τελική φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές για 1 min. Η συγκέντρωση του λαμβανομένου «καθαρού» DNA κυμαινόταν μεταξύ 50-200 ng/ μL . Τα προαναφερθέντα δείγματα DNA αποθηκεύονταν στους -20°C ¹⁵⁵.

3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TACI*

3.2.1 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *TACI*

Όπως ήδη αναφέρθηκε, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με πρόσθιους (Forward, F) και ανάστροφους ή οπίσθιους (Reverse, R) εκκινητές προερχόμενους από την διεθνή βιβλιογραφία, στοχεύοντας στην ενίσχυση της έκφρασης των πέντε exons του γονιδίου *TACI*, καθώς και τμημάτων αλληλουχιών των introns τα οποία «συνδέονται» άμεσα με τα exons (exon-intron boundaries)¹⁵⁶. Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί, παρουσιάζονται αναλυτικά οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και το μήκος των εκκινητών οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1. Εκκινητές PCR για την ενίσχυση της έκφρασης του *TAC1*

Exon	Εκκινητές	Αλληλουχία	Μήκος
1	1F	5'-TGCCTTTCATATAGCCATTG-3'	20 bp
	1R	5'-AGTCATTTTGCCTTTCATCTTT-3'	22 bp
2	2F	5'-GCAACAGAGATGACTTTTATGCATTGA-3'	26 bp
	2R	5'-CTGCATCTAAGTGAACCTCAA-3'	21 bp
3	3F	5'- AAGCCCTTTCATATAAACCACATT-3'	23 bp
	3R	5'-TGTCTCCCTGTTGGTCAAA-3'	19 bp
4	4F	5'-TGGGGGATATTCTTTTTGGTC-3	21 bp
	4R	5'-TCTAGAATTAGGCCTTGGAGATGTT-3'	25 bp
5	5F	5'- GTGTATGAAAGGCAAT GGAGAGG-3'	23 bp
	5R	5'-AGAATGCTGGCCCATTAAGATGAT-3'	25 bp

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng DNA, 210 μmol/L από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl₂ και 0.04 U/μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης ήταν 30 μL. Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες, και η διάρκεια του κάθε σταδίου της αντίδρασης (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση), καθώς και το μήκος των τελικών προϊόντων¹⁵⁶.

Πίνακας 2. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του γονιδίου TACI

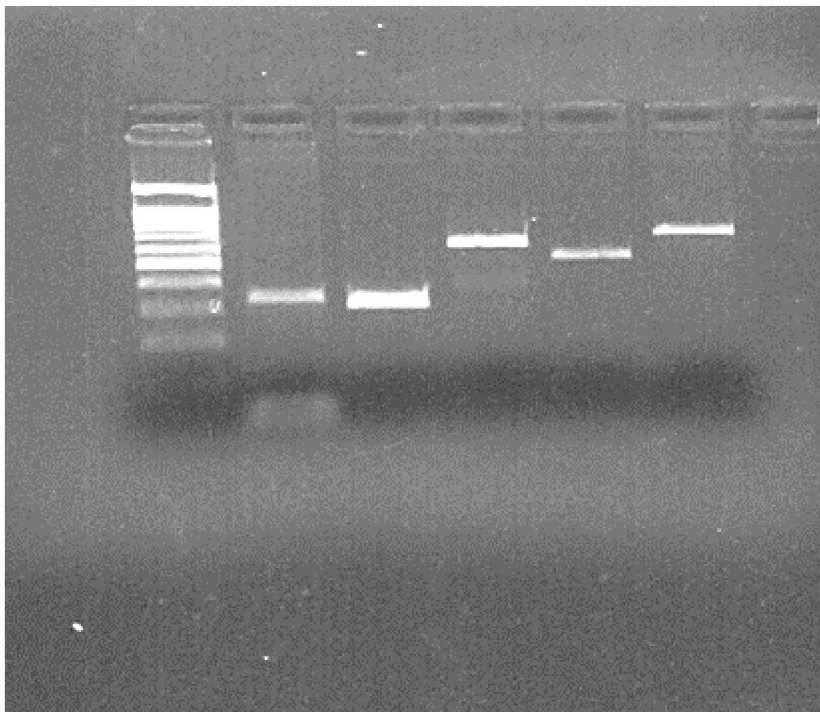
Exon	συνθήκες PCR	προϊόν PCR
1	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2min, ακολουθείται από 30 κύκλους (αποδιάταξη: 94°C για 30s, υβριδισμός: 62°C για 30s, επιμήκυνση: 72°C για 30s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min	340 bp
2	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2min, ακολουθείται από 30 κύκλους (αποδιάταξη: 94°C για 30s, υβριδισμός: 64°C για 30s, επιμήκυνση: 72°C για 30s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min	319 bp
3	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2min, ακολουθείται από 31 κύκλους (αποδιάταξη: 94°C για 30s, υβριδισμός: 62°C για 30s, επιμήκυνση: 72°C για 45s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min	635 bp
4	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2min, ακολουθείται από 35 κύκλους (αποδιάταξη: 94°C για 30s, υβριδισμός: 60°C για 30s, επιμήκυνση: 72°C για 30s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min	540 bp
5	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2min, ακολουθείται από 30 κύκλους (αποδιάταξη: 94°C για 30s, υβριδισμός: 55°C για 30s, επιμήκυνση: 72°C για 45s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min	717 bp

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Veriti 96 Well Thermacycler (Applied Biosystems) και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων¹⁵⁵. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας με απεσταγμένο ύδωρ, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η περιγραφή των συγκεκριμένων διαδικασιών ακολουθεί.

3.2.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου TACI σε γέλη αγαρόζης

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρησή τους σε γέλη αγαρόζης 2%. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα

χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μ L δείγματος, 1 μ L χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems)¹⁵⁵. Στην Εικόνα 11 που ακολουθεί, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα μιας αντιπροσωπευτικής ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR για τα πέντε exons του γονιδίου *TAC1*.



Εικόνα 11: Εικόνα ηλεκτροφόρησης των πέντε exons του γονιδίου *TAC1*. Κατά σειρά ladder, exon 1 (340bp), exon 2 (319bp), exon 3 (635bp), exon 4 (540bp) και exon 5 (717bp).

3.2.3 Καθαρισμός των προϊόντων PCR του γονιδίου *TAC1* προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων

Η τυχόν παρουσία μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών στο γονίδιο *TAC1* ελέγχθηκε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing), μετά από «καθαρισμό» των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση των Purelink PCR Purification Kit/QiA quick PCR Purification Kit και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiA quick Gel Extraction Kit (Qiagen/Invitrogen). Η χρήση συστημάτων «κάθαρσης» αποσκοπεί στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων. Βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο. Ακολουθεί περιγραφή του πρωτοκόλλου των kit της Invitrogen. Η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR σε όγκο τετραπλάσιο από τον αρχικό και κατόπιν μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit) για την προσρόφηση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης, ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 650 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer). Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και έπειτα ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (14.000 στροφές για 3 min) χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (10 Mm Tris-HCL, pH 8.5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 2 min. Τα «κεκαθαρμένα» προϊόντα PCR ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 μ l, ενώ αποθηκεύονται στους -20oC μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους¹⁵⁵.

3.2.4 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (SEQUENCING) προϊόντων PCR του γονιδίου *TAC1*

Τα «κεκαθαρμένα» προϊόντα PCR αναλύθηκαν με αλληλούχιση βάσεων (sequencing), χρησιμοποιώντας τους οπίσθιους εκκινητές για τα exons 2, 3 και 5, ενώ για τα exons 1 και 4 χρησιμοποιήθηκαν οι πρόσθιοι εκκινητές. Χρησιμοποιήθηκαν ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και το συνοδό του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems). Για την μελέτη των αλληλουχιών με στόχο την ανάδειξη τυχόν μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNA Sequencing Analysis software, version 3.4 (Applied Biosystems)^{155,156}.

3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *CTLA4*

3.3.1 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *CTLA4*

Όπως ήδη αναφέρθηκε, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με πρόσθιους (Forward, F) και ανάστροφους ή οπίσθιους (Reverse, R) εκκινητές προερχόμενους από την διεθνή βιβλιογραφία, στοχεύοντας στην ενίσχυση της έκφρασης των τεσσάρων exons του γονιδίου *CTLA4*¹⁵⁴. Στον Πίνακα 3 που ακολουθεί, παρουσιάζονται αναλυτικά οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και το μήκος των εκκινητών οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3. Εκκινητές PCR για την ενίσχυση της έκφρασης του *CTLA4*

Exon	Εκκινητές	Αλληλουχία	Μήκος
1	1F	5'-TGCCTTTCATATAGCCATTG-3'	21 bp
	1R	5'-AATCACTGCCTTTGACTGCT-3'	20 bp
2	2F	5'-GAGAGGGGAAGGGGTAAGTG-3'	20 bp
	2R	5'-AGACTGCAATGCAACAGGTG-3'	20 bp
3	3F	5'-TATTGGTGGGCTACCCATGC-3'	20 bp
	3R	5'-CCCTGCTCAGAAGCACATGA-3'	20 bp
4	4F	5'-TGGCTTCCGTATTCCTCAGT-3'	20 bp
	4R	5'-CTCCCTGCCTTTTCCTTCTT-3'	20 bp

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng DNA, 210 μmol/L από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl₂ και 0.04 U/μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης ήταν 30 μL. Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες, και η διάρκεια του κάθε

σταδίου της αντίδρασης (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση), καθώς και το μήκος των τελικών προϊόντων¹⁵⁴.

Πίνακας 4. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *CTLA4*

Exon	συνθήκες PCR	προϊόν PCR
1	Αρχική αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 2min, ακολουθείται από 30 κύκλους (αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 30s, υβριδισμός: 59 ⁰ C για 30s, επιμήκυνση: 72 ⁰ C για 60s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 5min	359 bp
2	Αρχική αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 2min, ακολουθείται από 30 κύκλους (αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 30s, υβριδισμός: 60 ⁰ C για 30s, επιμήκυνση: 72 ⁰ C για 60s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 5min	538 bp
3	Αρχική αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 2min, ακολουθείται από 31 κύκλους (αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 30s, υβριδισμός: 62 ⁰ C για 30s, επιμήκυνση: 72 ⁰ C για 60s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 5min	487 bp
4	Αρχική αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 2min, ακολουθείται από 35 κύκλους (αποδιάταξη: 94 ⁰ C για 30s, υβριδισμός: 60 ⁰ C για 30s, επιμήκυνση: 72 ⁰ C για 60s) και μια τελική επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 5min	483 bp

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Veriti 96 Well Thermacycler (Applied Biosystems) και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων¹⁵⁷. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας με απεσταγμένο ύδωρ, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η περιγραφή των συγκεκριμένων διαδικασιών ακολουθεί.

3.3.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου *CTLA4* σε γέλη αγαρόζης

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρησή τους σε γέλη αγαρόζης 2%. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα

βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιγράφηκε ήδη αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.2.

3.3.3 Καθαρισμός των προϊόντων PCR του γονιδίου *CTLA4* προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων

Η τυχόν παρουσία μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών στο γονίδιο *CTLA4* ελέγχθηκε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing), μετά από «καθαρισμό» των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση των Purelink PCR Purification Kit/QiAquick PCR Purification Kit και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/Invitrogen). Η συγκεκριμένη διαδικασία περιγράφηκε ήδη αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.3.

3.3.4 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (SEQUENCING) των προϊόντων PCR του γονιδίου *CTLA4*

Τα «κεκαθαρμένα» προϊόντα PCR αναλύθηκαν με αλληλούχιση βάσεων (sequencing), χρησιμοποιώντας τους οπίσθιους εκκινητές για τα exons 1, 2, 3 και 4 του γονιδίου *CTLA4*. Χρησιμοποιήθηκαν ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και το συνοδό του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems). Για την μελέτη των αλληλουχιών με στόχο την ανάδειξη τυχόν μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNA Sequencing Analysis software, version 3.4 (Applied Biosystems)¹⁵⁴.

3.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι μέσες τιμές (mean) και οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation, SD), καθώς και οι διάμεσες τιμές (median) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (% συχνότητες) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για την σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή το μη παραμετρικό κριτήριο Mann-Whitney. Για την σύγκριση αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test όπου ήταν απαραίτητο. Προγραμματίστηκε η διενέργεια πολυπαραγοντικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης (multiple logistic regression) με πιθανές ανεξάρτητες μεταβλητές τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών (φύλο, ηλικία, BMI), την διάγνωση, την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού ανοσοανεπάρκειας, αυτοανοσίας, νεοπλασίας, καθώς και την ύπαρξη

μετάλλαξεων *TAC1* και *CTLA4*. Σαν εξαρτημένες χρησιμοποιήθηκαν κλινικά χαρακτηριστικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών. Οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση της μεθόδου διαδοχικής ένταξης-αφαίρεσης (stepwise method) και προέκυψαν σχετικοί λόγοι (Odds ratio) με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης τους (95% ΔΕ). Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 23.0.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

4.1.1 Δημογραφικά στοιχεία. Το υλικό της μελέτης μας αποτέλεσαν 117 ασθενείς με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Από αυτούς 53 (45.3%) ήταν άνδρες και 64 (54.7%) γυναίκες, ενώ η μέση ηλικία τους (την χρονική στιγμή της τελικής αξιολόγησης) ήταν τα 44.1 έτη (εύρος: 15-76 έτη). Η μέση ηλικία κατά την διάγνωση ήταν τα 36 έτη (εύρος: 4-70 έτη), ενώ η μέση ηλικία κατά την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου ήταν τα 24.7 έτη (εύρος: 1-60 έτη). Ο διάμεσος χρόνος καθυστέρησης της διάγνωσης της νόσου ήταν 9 έτη (εύρος: 0-43 έτη). Η διάμεση διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών ήταν 6 έτη (0-40 έτη). Βάσει του ύψους και του σωματικού βάρους των ασθενών υπολογίστηκε ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) κάθε ασθενούς από τους 106 για τους οποίους υπήρχαν στοιχεία. Βάσει αυτού, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε φυσιολογικούς (55, 51.9%), υπέρβαρους (39, 36.8%) και παχύσαρκους (12, 11.3%). Η μέση τιμή του ΔΜΣ των ασθενών ήταν 25.1 μονάδες (SD: 4.7 μονάδες). Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

4.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά. Από τους 117 ασθενείς, οι 110 (94%) πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της ΚΠΑ και οι επτά (6%) της IgA ανεπάρκειας με συνοδό ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG (IgA and IgG subclasses Deficiency, IgAD+IgGsD). Οικογενειακό ιστορικό ΠΑΑ (PID) είχαν 16 ασθενείς (13,7%), αυτοανοσίας 49 ασθενείς (41,9%) και νεοπλασίας 42 ασθενείς (35,9%). Τα ποσοστά των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό PID, αυτοανοσίας και νεοπλασίας παρουσιάζονται στο γράφημα της **Εικόνας 12**.

Οι περισσότεροι ασθενείς (79, 68.1%) διαγνώστηκαν στα πλαίσια ελέγχου λόγω υποτροπιάζουσών λοιμώξεων. Από τους υπόλοιπους ασθενείς, οι περισσότεροι (23, 19.8%) διαγνώστηκαν στα πλαίσια ελέγχου λόγω εμφάνισης αυτοάνοσης κυτταροπενίας. Πιο συγκεκριμένα, 14 ασθενείς εμφάνισαν κατά την διάγνωση Ιδιοπαθή Θρομβοπενική Πορφύρα (ΙΘΠ), τρεις Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία (AAA) και έξι συγχρόνως ΙΘΠ και AAA (Σύνδρομο Evans, Σ. Evans). Οι πλείστοι των ασθενών (109, 93.2%) κατά την διάγνωση και την πορεία της νόσου εμφάνισαν λοιμώξεις. 60 ασθενείς (51.3%) παρουσίασαν σπληνομεγαλία, 26 (22.2%) ηπατομεγαλία και 47 (40.2%) λεμφαδενοπάθεια. Επίσης 10 ασθενείς (8.5%) εμφάνιζαν Οζώδη Λεμφική Υπερπλασία του λεπτού εντέρου, ενώ συνολικά 70 ασθενείς (59.8%) παρουσίαζαν λεμφική υπερπλασία σε κάποια ανατομική θέση. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι 67 ασθενείς (57.3%) εμφάνισαν αυτοάνοσα νοσήματα ή κλινικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με αυτοανοσία. Επίσης, 34 ασθενείς (29.1%) εμφάνισαν αλλεργικές εκδηλώσεις, 14 ασθενείς (12.0%) αρθραλγίες και 11 ασθενείς (9.4%) Κοκκιοματώδη νόσο. Αξίζει να σημειωθεί ότι 13 ασθενείς (11.2%) εμφάνισαν εικόνα μη λοιμώδους εντεροπάθειας. Τέλος, 10 ασθενείς (8.5%) μετά την διάγνωση της ΠΑΑ και κατά την διάρκεια της παρακολούθησής τους εμφάνισαν νεοπλασίες. Οι κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 6**. Κατά την χρονική στιγμή της ολοκλήρωσης της παρούσας μελέτης 108 ασθενείς (92.3%) ήταν εν ζωή, ενώ εννέα (7.7%) είχαν αποβιώσει.

Εν συνεχεία, θα παρουσιαστούν αναλυτικότερα οι σημαντικότερες από τις κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών της παρούσας μελέτης.

4.1.2.1 Λοιμώξεις και επιπλοκές τους. Οι περισσότεροι ασθενείς (98, 83.8%) παρουσίασαν λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού (ιγμορίτιδες, βρογχίτιδες), ενώ σημαντικός ήταν και ο αριθμός των ασθενών (73, 62.4%) οι οποίοι εμφάνισαν λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού. Σε ότι αφορά τις υπόλοιπες εντοπίσεις, 28 ασθενείς (23.9%) εμφάνισαν λοιμώξεις του γαστρεντερικού, 29 (24.8%) του ουροποιογεννητικού και 24 (20.5%) δερματικές λοιμώξεις. Τέλος, τέσσερις ασθενείς (3.4%) εμφάνισαν μηνιγγίτιδα/εγκεφαλίτιδα, δύο ασθενείς (1.7%) εμφάνισαν σηπτική καταπληξία και ένας (0.9%) κλινική εικόνα περιτονίτιδας. Χρόνιες φλεγμονές ως επιπλοκές των λοιμώξεων εμφάνισαν 56 ασθενείς (47.9%). Από αυτούς οι οποίοι εμφάνισαν λοιμώξεις αναπνευστικού, 27 (23.1%) εμφάνισαν βρογχεκτασίες, 15 (12.8%) Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονική Νόσο (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) και 20 (17.1%) Χρόνια Περιοριστική Πνευμονική Νόσο (Chronic Restrictive Pulmonary Disease,

CRPD). Τέλος, 19 ασθενείς (16.2%) παρουσίασαν χρόνια ιγμορίτιδα ή εμφάνισαν ρινικούς πολύποδες. Οι εντοπίσεις των λοιμώξεων που παρουσίασαν οι ασθενείς παρουσιάζονται στο γράφημα της **Εικόνας 13**. Τέλος, οι επιπλοκές των λοιμώξεων στους ασθενείς παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

4.1.2.2 Αυτοάνοσα νοσήματα. Αρκετοί από τους ασθενείς της μελέτης μας (67, 57.3%) εμφάνισαν αυτοάνοσα νοσήματα ή κλινικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με αυτοανοσία. Κυρίως επρόκειτο για αυτοάνοσες κυτταροπενίες (29 ασθενείς, 24.8%) και περιπτώσεις Θυρεοειδίτιδας Hashimoto (26 ασθενείς, 22.2%). Πιο συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες, 19 ασθενείς (16.2%) εμφάνισαν ΙΘΠ, τέσσερις ασθενείς (3.4%) AAA και έξι ασθενείς (5.1%) Σ. Evans. Επίσης, πέντε ασθενείς (4.3%) εμφάνισαν αρθρίτιδα με κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας (ΡΑ), ενώ επτά ασθενείς (6%) εμφάνισαν κλινική εικόνα συμβατή με ψωρίαση. Συνολικά, το 57,3% των ασθενών της μελέτης μας εμφάνισε συμπτωματολογία κάποιου αυτοανόσου νοσήματος. Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται αναλυτικά τα νοσήματα αυτά.

4.1.2.3 Σπληνομεγαλία. Όπως ήδη αναφέρθηκε, 60 ασθενείς (51.3%) εμφάνισαν σπληνομεγαλία. Από αυτούς, 16 (13.7%) είχαν κλινικές εκδηλώσεις υπερσπληνισμού. Δεκατρείς ασθενείς (11.1%) υποβλήθηκαν σε σπληνεκτομή. Σε τέσσερις περιπτώσεις αυτή έγινε για διαγνωστικούς λόγους, ενώ σε εννέα για θεραπευτικούς.

4.1.2.4 Εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό. Πέραν των ασθενών οι οποίοι όπως ήδη αναφέρθηκε εμφάνισαν λοιμώδους αιτιολογίας διαρροϊκά σύνδρομα, 13 ασθενείς (11.1%) εμφάνισαν μη λοιμώδους αιτιολογίας εντεροπάθεια. Σημειώνεται ότι ένας (0.9%) από αυτούς είχε ιστολογική και κλινική εικόνα συμβατή με κοιλιοκάκη. Επίσης έξι ασθενείς (5.1%) εμφάνισαν ατροφική γαστρίτιδα με συνοδό μεγαλοβλαστική αναιμία. Τέλος, σε ότι αφορά την ηπατική συμμετοχή, αξίζει να σημειωθεί ότι δύο ασθενείς (1.7%) εμφάνισαν Οζώδη Αναγεννητική Υπερπλασία του ήπατος.

4.1.2.5 Λεμφικές υπερπλασίες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, συνολικά 70 ασθενείς (59.8%) παρουσίασαν λεμφική υπερπλασία σε κάποια ανατομική θέση. Λεμφαδενοπάθεια εμφάνισαν 47 ασθενείς, (40.2%), ενώ 10 ασθενείς (8.5%) εμφάνισαν Οζώδη Λεμφική Υπερπλασία του λεπτού εντέρου. Σε ότι αφορά τους ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν λεμφική υπερπλασία σε κάποια ανατομική θέση, αξίζει να σημειωθεί ότι 16 ασθενείς (13.7%) υποβλήθηκαν σε αμυγδαλεκτομή, ενώ εννέα ασθενείς (7.7%) σε αδενοειδεκτομή.

4.1.2.6 Νεοπλασίες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, 10 ασθενείς (8.5%) κατά την διάρκεια της παρακολούθησής τους εμφάνισαν νεοπλασίες. Ο χρόνος εμφάνισης κυμαινόταν μεταξύ 0 και 26 ετών (διάμεση τιμή: 7 έτη) μετά την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΠΑΑ. Τρεις ασθενείς (2.6%) εμφάνισαν Non Hodgkin Λέμφωμα (NHL), ενώ δύο (1.7%) εμφάνισαν αδenoκαρκίνωμα στομάχου. Τέλος, διαγνώστηκαν ένας ασθενής (0.9%) με Λέμφωμα Hodgkin (HL), ένας (0.9%) με αδenoκαρκίνωμα θυρεοειδούς, ένας (0.9%) με αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου, ένας (0.9%) με ινοσάρκωμα και μία ασθενής με αδenoκαρκίνωμα ενδομητρίου. Όμως, ιστορικό νεοπλασίας ανέφεραν 22 συνολικά ασθενείς (18.8%). Από αυτούς, όπως είναι προφανές, οι 12 ασθενείς εμφάνισαν νεοπλασία πριν από την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΠΑΑ. Ο χρόνος εμφάνισης κυμαινόταν μεταξύ 4 και 19 ετών (διάμεση τιμή: 9 έτη) πριν από την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΠΑΑ. Τρεις ασθενείς (2.6%) εμφάνισαν Non Hodgkin Λέμφωμα (NHL), άλλοι τρεις (2.6%) αδenoκαρκίνωμα μαστού, δύο Λέμφωμα Burkitt (1.7%), ενώ άλλοι δύο (1.7%) Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL). Τέλος, διαγνώστηκαν ένας ασθενής (0.9%) με Λέμφωμα Hodgkin (HL) και μία ασθενής (0.9%) με αδenoκαρκίνωμα ενδομητρίου.

4.2 Εργαστηριακά ευρήματα. Μετρήσεις τιμών ανοσοσφαιρινών (IgG, IgA, IgM) ορού κατά την χρονική στιγμή της διάγνωσης υπήρχαν για 113 ασθενείς. Μετρήσεις τιμών των υποτάξεων της IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) ορού κατά την χρονική στιγμή της διάγνωσης υπήρχαν για 75 ασθενείς. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις όπου τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων της IgG ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης, οι μετρήσεις τους καταγράφονταν ως μηδενικές. Η μέση τιμή της IgG ήταν 298 mg/dl, ενώ η διάμεση 290 mg/dl (εύρος: 0-1360 mg/dl). Η μέση τιμή της IgA ήταν 21.4 mg/dl, ενώ η διάμεση μηδενική (εύρος: 0-332 mg/dl). Η μέση τιμή της IgM ήταν 40.9 mg/dl, ενώ η διάμεση 23.8 mg/dl (εύρος: 0-476 mg/dl). Η μέση τιμή των ολικών ανοσοσφαιρινών (άθροισμα των μετρήσεων IgG, IgA, IgM) ήταν 368 mg/dl, ενώ η διάμεση 347 mg/dl (εύρος: 0-1411 mg/dl). Η μέση τιμή της IgG₁ ήταν 234 mg/dl, ενώ η διάμεση 244 mg/dl (εύρος: 0-977 mg/dl). Η μέση τιμή της IgG₂ ήταν 73.2 mg/dl, ενώ η διάμεση 64 mg/dl (εύρος: 0-330 mg/dl). Η μέση τιμή της IgG₃ ήταν 17.4 mg/dl, ενώ η διάμεση 11.9 mg/dl (εύρος: 0-120 mg/dl). Η μέση τιμή της IgG₄ ήταν 7.3 mg/dl, ενώ η διάμεση 1 mg/dl (εύρος: 0-152 mg/dl). Οι διακυμάνσεις των τιμών των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων της IgG των ασθενών κατά την διάγνωση της ΠΑΑ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

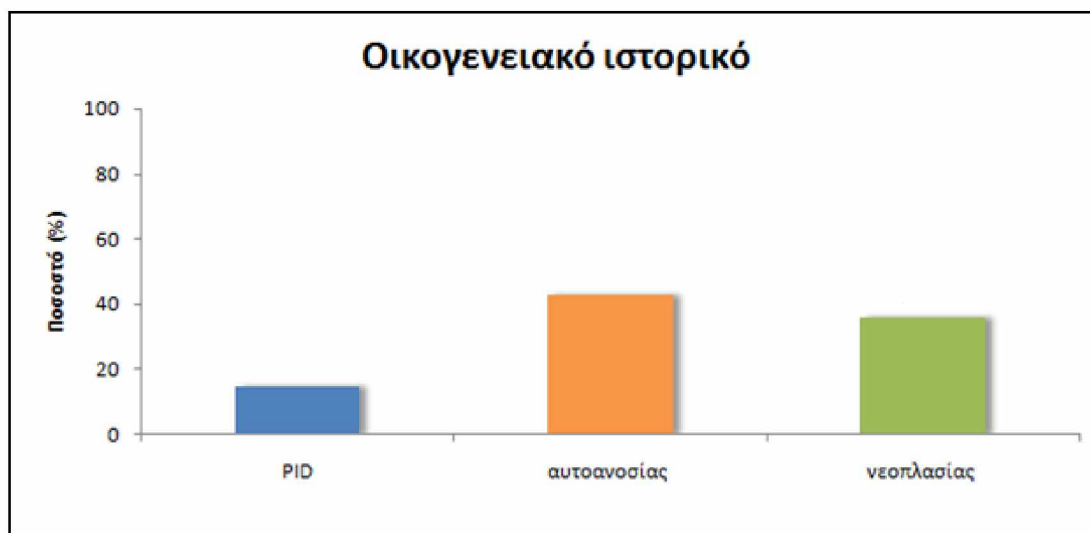
4.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση. Κατά την χρονική στιγμή της ολοκλήρωσης της μελέτης, 105 ασθενείς (89.7%) είχαν τεθεί σε αγωγή υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης. Αγωγή υποκατάστασης με ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ελάμβαναν 25 ασθενείς (23.8%). Η συνήθως χορηγούμενη δόση ήταν 500 mg/kg ΣΒ ανά τέσσερις εβδομάδες. Αγωγή υποκατάστασης με υποδόρια χορηγούμενη ανοσοσφαιρίνη (Subcutaneous, SCIgG) ελάμβαναν πέντε ασθενείς (4.7%). Η συνήθως χορηγούμενη δόση ήταν 100 mg/kg ΣΒ εβδομαδιαίως. Αγωγή υποκατάστασης με υποβοηθούμενη υποδόρια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (facilitated, fSCIg) ελάμβαναν 75 ασθενείς (71.4%). Η συνήθως χορηγούμενη δόση ήταν 500 mg/kg ΣΒ ανά τέσσερις εβδομάδες. Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται συνοπτικά στο γράφημα της **Εικόνας 14** και στον **Πίνακα 10**.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών βάσει της υποκείμενης ΠΑΑ (ΚΠΑ, IgAD+IgGsD) παρουσιάζονται συνολικά και συνοπτικά στον **Πίνακα Α**

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Πίνακας 5. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών

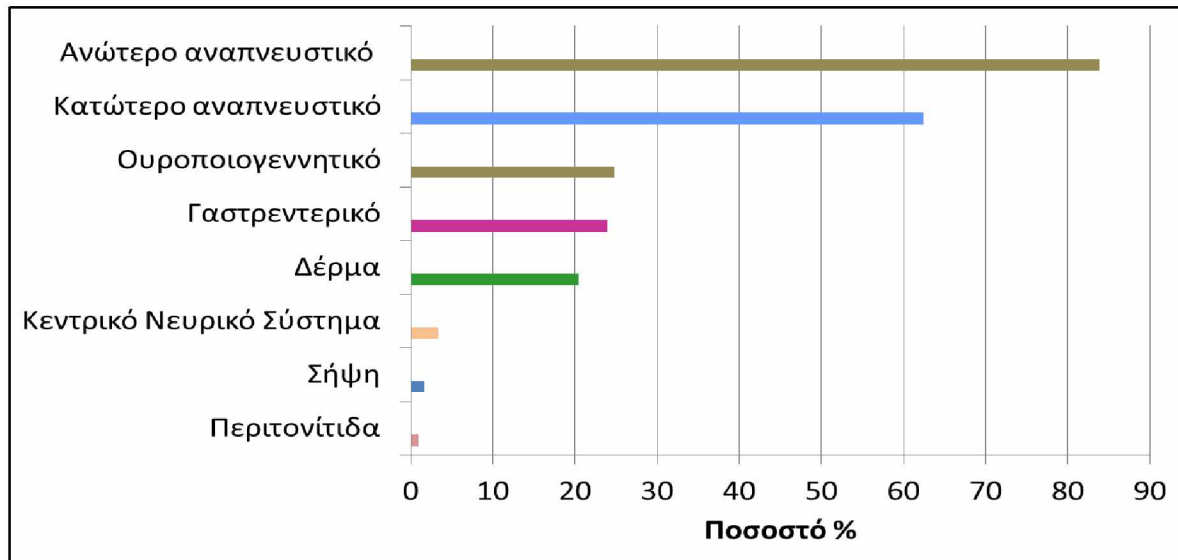
		N	%
Φύλο	Άνδρες	53	45.3
	Γυναίκες	64	54.7
Ηλικία κατά την αξιολόγηση (μέση τιμή, SD, εύρος)		44.1 έτη (15.9, 15-76)	
Ηλικία κατά την διάγνωση (μέση τιμή, SD, εύρος)		36 έτη (15.6, 4-70)	
Ηλικία κατά την έναρξη των συμπτωμάτων (μέση τιμή, SD, εύρος)		24.7 έτη (15.4, 1-60)	
BMI (μέση τιμή, SD)		25.1 (4.7)	
BMI	Φυσιολογικοί	55	51.9
	Υπέρβαροι	39	36.8
	Παχύσαρκοι	12	11.3



Εικόνα 12. Οικογενειακό ιστορικό ασθενών

Πίνακας 6. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Αριθμός ασθενών	117
Λοιμώξεις	109 (93.2%)
Σπληνομεγαλία	60 (51.3%)
Ηπατομεγαλία	26 (22.2%)
Λεμφαδενοπάθεια	47 (40.2%)
Οζώδης λεμφική υπερπλασία λεπτού εντέρου	10 (8.5%)
Λεμφικές υπερπλασίες (σύνολο)	70 (59.8%)
Αυτοάνοσες εκδηλώσεις	67 (57.3%)
Αλλεργικές εκδηλώσεις	34 (29.1%)
Αρθραλγίες	14 (12%)
Χρόνια διάρροια (μη λοιμώδους αιτιολογίας)	13 (11.2%)
Κοκκιωματώδης νόσος	11 (9.4%)
Νεοπλασίες (σύνολο)	22 (18.8%)



Εικόνα 13. Εντοπίσεις λοιμώξεων

Πίνακας 7. Επιπλοκές λοιμώξεων

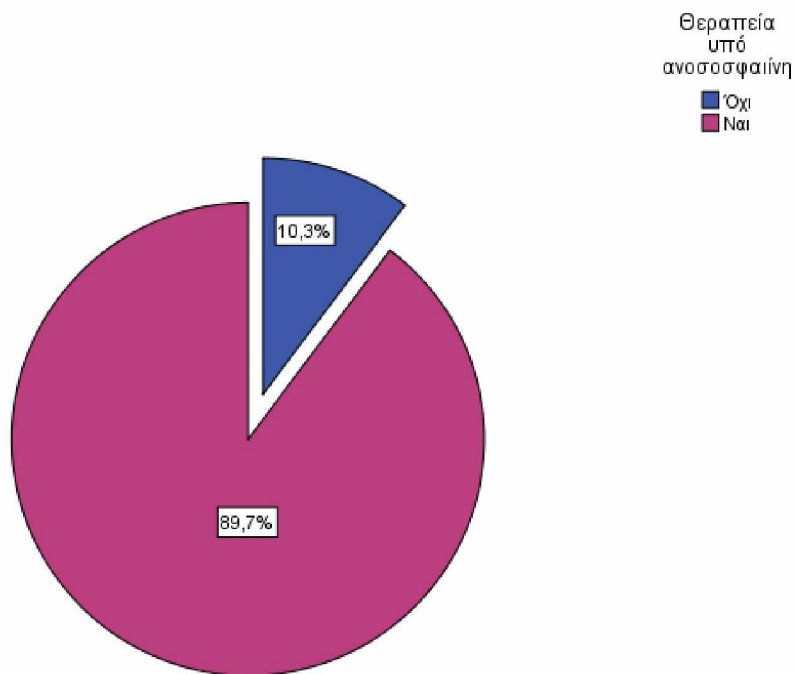
	N	%
Επιπλοκές από λοιμώξεις	56	47.9
Βρογχεκτασίες	27	23.1
COPD	15	12.8
CRPD	20	17.1
Χρόνια ιγμορίτιδα και ρινικοί πολύποδες	19	16.2

Πίνακας 8. Αυτοάνοσες εκδηλώσεις

	N	%
Αυτοανοσία	67	57.3
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto	26	22.2
Αρθρίτιδα	5	4.3
Ψωρίαση	7	6.0
ΙΘΠ	19	16.2
ΑΑΑ	4	3.4
Σύνδρομο Evans	6	5.1
Αυτοάνοσες κυτταροπενίες (σύνολικά)	29	24.8

Πίνακας 9. Τιμές ανοσοσφαιρινών και υποτάξεων της IgG κατά την διάγνωση των ΠΑΑ

	Μέση τιμή, SD	Διάμεση τιμή, εύρος
IgG	298 (242.7)	290 (0-1360)
IgA	21.4 (50.4)	0 (0-332)
IgM	40.9 (61.1)	23.8 (0-476)
Ολικές ανοσοσφαιρίνες	368 (269.7)	347 (0-1411)
IgG1	234 (181.1)	244 (0-977)
IgG2	73.2 (72.6)	64 (0-330)
IgG3	17.4 (19.4)	11.9 (0-120)
IgG4	7.3 (22.4)	1 (0-152)



Εικόνα 14. Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης

Πίνακας 10. Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης

		N	%
Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση ανοσοσφαιρίνης		105	89.7
Είδος αγωγής υποκατάστασης	IVIG	25	23.8
	SCIG	5	4.7
	FSCIG	75	71.4

Πίνακας Α. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

	Σύνολο	ΚΠΑ	IgAD+IgGsD
Αριθμός ασθενών	117	110	7
Φύλο (Ανδρες/Γυναίκες)	53/64	48/62	5/2
Ηλικία κατά την αξιολόγηση (Μέση ± SD)	44.1±15.9	44.8±15.7	32.0±13.9
Ηλικία κατά την διάγνωση (Μέση ± SD)	36.0±15.6	36.4±15.6	28.4±14.2
Ηλικία κατά την έναρξη των συμπτωμάτων (Μέση ± SD)	24.7±15.4	25.6±15.3	11.1±10.7
Λεμφική υπερπλασία	70 (59.8%)	67 (60.1%)	3 (42.9%)
Σπληνομεγαλία	60 (51.3%)	57 (51.2%)	3 (42.9%)
Λεμφαδενοπάθεια	47 (40.2%)	45 (40.9%)	2 (28.65)
Εντερική λεμφική υπερπλασία	10 (8.5%)	9 (8.2%)	1 (14.3%)
Ηπατομεγαλία	26 (22.2%)	25 (25%)	1 (14.3%)
Λοιμώξεις	109 (93.2%)	102 (92.7%)	7 (100%)
Ανώτερο Αναπνευστικό	98 (83.8%)	92 (83.6%)	6 (85.7%)
Κατώτερο Αναπνευστικό	73 (62.4%)	70 (63.6%)	3 (42.9%)
Γαστρεντερικό	28 (23.9%)	27 (24.5%)	1 (14.3%)
Ουροποιογεννητικό	29 (24.8%)	29 (26.4%)	0 (0%)
Βρογχεκτασίες	27 (23.1%)	26 (23.6%)	1 (14.3%)
Κοκκιοματώδης νόσος	11 (9.4%)	10 (9.1%)	1 (14.3%)
Αυτοάνοσες εκδηλώσεις	67 (57.3%)	61 (55.5%)	6 (85.7%)
Αυτάνοση θυρεοειδίτιδα	27 (23.1%)	24 (21.8%)	3 (42.9%)
Αυτοάνοσες κυτταροπενίες	29 (24.8%)	26 (23.6%)	3 (42.9%)
Αλλεργικές εκδηλώσεις	34 (29.1%)	33 (30.0%)	1 (14.3%)
Σπληνεκτομή	13 (11.1%)	13 (11.8%)	0 (0%)
Αδενοειδεκτομή	9 (7.7%)	7 (6.4%)	2 (28.6%)
Αμυγδαλεκτομή	16 (13.7%)	13 (11.8%)	3 (42.3%)
Νεοπλασίες	22 (18.8%)	22 (20.0%)	0 (0%)
Αγωγή υποκατάστασης	105 (89.7%)	100 (90.9%)	5 (71.4%)

4.4 Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του γονιδίου *TACI*

4.4.1 Μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ

Σε δεκαεπτά ασθενείς (14,5%) ανιχνεύτηκαν αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις του *TACI* γονιδίου. Ειδικότερα, 15 από τους 110 ασθενείς με ΚΠΑ (13,6%) και δύο από τους επτά ασθενείς με IgAD και συνοδό IgGsD (28,6%) εμφάνισαν τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις του *TACI* γονιδίου. Κανένας από αυτούς δεν ήταν ομοζυγώτης σε κάποια μετάλλαξη, ενώ τέσσερις (23,5%) ήταν διπλοί ετεροζυγώτες και οι υπόλοιποι 13 (76,5%) ετεροζυγώτες ως προς τις διαπιστωθείσες μεταλλάξεις.

Η συχνότερα διαπιστωθείσα μετάλλαξη ήταν η C104R (rs34557412), η οποία ανιχνεύτηκε σε 10 ασθενείς (58,8%), ακολουθούμενη από την I87N (rs72553877) η οποία ανιχνεύτηκε σε τέσσερις ασθενείς (23,5%) και από την A181E (rs72553883) η οποία ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς (11,8%). Οι συχνότητες εμφάνισης των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στους ασθενείς της μελέτης μας παρουσιάζονται στο γράφημα της **Εικόνας 15**. Οι ακόλουθες μεταλλάξεις, ανιχνεύτηκαν σε έναν μόνο ασθενή η κάθε μία: R20C (rs200013015), C62Y (rs1410473109), P151L (rs200037919), K188M (rs74811083) και E236X (rs201021960). Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι η C104R (rs34557412) μετάλλαξη ανιχνεύτηκε και στις τέσσερις περιπτώσεις διπλής ετεροζυγωτίας, ενώ η A181E (rs72553883) στις δύο από αυτές. Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 11Α**. Στον **Πίνακα 12Α** παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI*, τόσο στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας, όσο και μεταξύ αυτών που εμφάνισαν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

4.4.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* μη σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ

Πρόκειται για τις μεταλλάξεις P251L (rs34562254) και V220A (rs56063729). Πιο συγκεκριμένα, η μετάλλαξη P251L (rs34562254) ανιχνεύτηκε σε 26 ασθενείς (22%). Μόνο ένας ασθενής ήταν ομοζυγώτης ως προς την συγκεκριμένη μετάλλαξη, ενώ οι υπόλοιποι 25 ήταν ετεροζυγώτες (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 27). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι 24 από αυτούς τους ασθενείς δεν εμφάνιζαν μεταλλάξεις του *TACI* σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ. Σε ότι αφορά την μετάλλαξη V220A (rs56063729), αυτή ανιχνεύτηκε σαν ετερόζυγη σε επτά ασθενείς (6%, σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 7) από τους οποίους κανείς δεν εμφάνιζε μεταλλάξεις του *TACI* σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ. Τα προαναφερθέντα

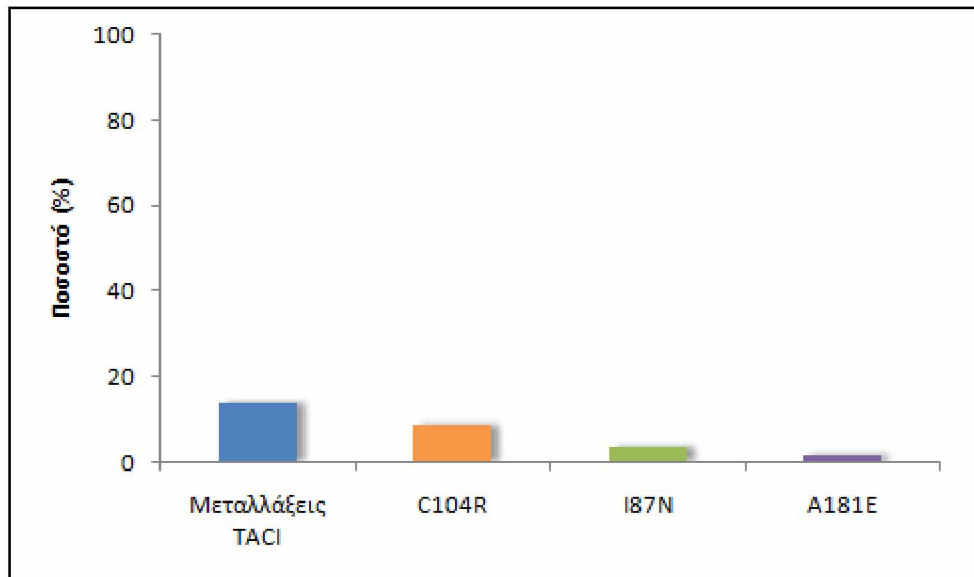
παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 11B**. Στον **Πίνακα 12B** παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1*, τόσο στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας, όσο και μεταξύ αυτών οι οποίοι εμφάνισαν τις αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *TAC1*, καθώς και μεταξύ αυτών οι οποίοι δεν εμφάνισαν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

4.4.3 Πολυμορφισμοί του γονιδίου *TAC1*

Πρόκειται για τους πολυμορφισμούς T27 (rs8072293), P97 (rs35062843) και S277 (rs11078355) οι οποίοι εντοπίζονται σε exons, καθώς και για τους πολυμορφισμούς A24625C (rs2274892), T33402G (rs11652843) και T33482C (rs11652811) οι οποίοι εντοπίζονται σε introns. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός T27 (rs8072293, exon 2) ανιχνεύτηκε σε 109 ασθενείς (93%), 52 από τους οποίους ήταν ομοζυγώτες ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ενώ 57 ήταν ετεροζυγώτες (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 161). Ο πολυμορφισμός P97 (rs35062843, exon3) ανιχνεύτηκε σε ετερόζυγη μορφή σε 10 ασθενείς (8.5%, σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 10) από τους οποίους κανείς δεν εμφάνιζε μεταλλάξεις του *TAC1* σχετιζόμενες αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ. Ο πολυμορφισμός S277 (rs11078355, exon 5) ανιχνεύτηκε σε 76 ασθενείς (65%), 20 από τους οποίους ήταν ομοζυγώτες ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ενώ 56 ήταν ετεροζυγώτες (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 96). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού S277 (rs11078355, exon 5) και της απουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ ήταν στατιστικά σημαντική ($p: 0.039$). Πιο συγκεκριμένα, 19 από τους 20 ομοζυγώτες και 50 από τους 56 ετεροζυγώτες ως προς τον πολυμορφισμό S277 (rs11078355, exon 5) δεν εμφάνιζαν μεταλλάξεις του γονιδίου *TAC1* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ. Ο πολυμορφισμός A24625C (rs2274892, intron 3) ανιχνεύτηκε σε 80 ασθενείς (68%), 21 από τους οποίους ήταν ομοζυγώτες ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ενώ 59 ήταν ετεροζυγώτες (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 101). Ο πολυμορφισμός T33402G (rs11652843, intron 4) ανιχνεύτηκε σε 64 ασθενείς (55%), 10 από τους οποίους ήταν ομοζυγώτες ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ενώ 54 ήταν ετεροζυγώτες (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 74). Ομοίως, ο πολυμορφισμός T33482C (rs11652811, intron 4) ανιχνεύτηκε σε 64 ασθενείς (55%), 10 από τους οποίους ήταν ομοζυγώτες ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ενώ 54 ήταν ετεροζυγώτες (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων: 74). Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα**

11B. Στον Πίνακα 12B παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των προαναφερθέντων πολυμορφισμών του γονιδίου *TACI*, τόσο στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας, όσο και μεταξύ αυτών οι οποίοι εμφάνισαν τις αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*, καθώς και μεταξύ αυτών οι οποίοι δεν εμφάνισαν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ *TACI*



Εικόνα 15. Συχνότερες αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις του *TACI*

Πίνακας 11. Μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*

A) Αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ (17 ασθενείς, 14,5%)	
Ομόζυγες	0 (0%)
Συνδυασμένες ετερόζυγες	4 (23.5%)
Ετερόζυγες	13 (76.5%)
C104R	10 (58.8%)
187N	4 (23.5%)
A181E	2 (11.8%)
R20C	1 (5.9%)
C62Y	1 (5.9%)
K188M	1 (5.9%)
P151L	1 (5.9%)
E236Ter	1 (5.9%)
B) Μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ και πολυμορφισμοί	
V220A	7 (6%)
P251L	26 (22%)
27T	109 (93%)
97P	10 (8.5%)
227S	76 (65%)
A24625C	80 (68.4%)
T33402G	64 (54.7%)
T33482C	64 (54.7%)

Πίνακας 12. Μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*

	Μεταλλάξεις του <i>TACI</i>			p
	Ασθενείς	Όχι	Ναι	
	117	100	17	
A) Αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ (17 ασθενείς, 14,5%)				
Ομόζυγες	0 (0.%)		0 (0.%)	
Συνδυασμένες ετερόζυγες	4 (3.4%)		4 (23.5%)	
Ετερόζυγες	13 (11.1%)		13 (76.5%)	
C104R	10 (8.5%)		10 (58.8%)	
A181E	2 (1.7%)		2 (11.8%)	
R20C	1 (0.9%)		1 (5.9%)	
C62Y	1 (0.9%)		1 (5.9%)	
I87N	4 (3.4%)		4 (23.5%)	
P151L	1 (0.9%)		1 (5.9%)	
K188M)	1 (0.9%)		1 (5.9%)	
E236X	1 (0.9%)		1 (5.9%)	
B) Μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ και πολυμορφισμοί (αριθμός αλληλίων) και συσχετίσεις τους με τις αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες (p value)				
T27	161 (68.8%)	135 (67.5%)	26 (76.5%)	0.325
97P	10 (4.3%)	10 (5%)	0 (0%)	0.365
V220A	7 (3%)	7 (3.5%)	0 (0%)	0.573
S277	96 (41%)	88 (44%)	8 (23.5%)	0.039
P251L	27 (11.5%)	25(12.5%)	2 (5.9%)	0.496
A24625C	101 (43.2%)	91 (45.5%)	10 (29.4%)	0.118
T33402G	74 (31.6%)	67 (33.5%)	7 (20.6%)	0.194
T33482C	74 (31.6%)	67 (33.5%)	7 (20.6%)	0.194

4.5 Μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4*

Μόνο σε τρεις ασθενείς (2,6%) ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4*. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τις p.Y139C, p.Y89X και p.R75Q. Από αυτές, οι δύο πρώτες έχουν ήδη παρουσιαστεί στην βιβλιογραφία^{36, 150-154}, ενώ η τρίτη ανιχνεύεται για πρώτη φορά. Και οι τρεις προαναφερθείσες μεταλλάξεις εντοπίζονται στο exon 2, το οποίο όπως ήδη έχει αναφερθεί κωδικοποιεί την εξωκυττάρια περιοχή του συνδιεγερτικού μορίου *CTLA4*. Λόγω του συγκριτικά πολύ μικρού αριθμού των ασθενών με μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας (3 σε 117), δεν ήταν εφικτή η μελέτη της πιθανότητας ύπαρξης τυχόν συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας των προαναφερθεισών μεταλλάξεων και των λοιπών χαρακτηριστικών των ασθενών. Από την μελέτη του ατομικού αναμνηστικού, των κλινικών χαρακτηριστικών και των εργαστηριακών ευρημάτων των συγκεκριμένων ασθενών, αξίζει να επισημανθούν τα ακόλουθα: Α) Οι δύο από τους τρεις ασθενείς είχαν οικογενειακό ιστορικό αυτοανοσίας και ο ένας νεοπλασίας, Β) Οι δύο από τους τρεις ασθενείς εμφάνισαν καλοήθεις λεμφικές υπερπλασίες, Γ) Κανένας από τους συγκεκριμένους ασθενείς δεν εμφάνισε αυτοάνοσες κυτταροπενίες και Δ) Σε κανέναν από τους συγκεκριμένους ασθενείς δεν ανιχνεύθηκαν αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*.

5. Συσχέτιση της ύπαρξης μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και με τις μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ μεταλλάξεις του και τους πολυμορφισμούς του.

5.1 Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ με το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά τους. Στον Πίνακα 13 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα δεδομένα του οικογενειακού ιστορικού των ασθενών και τα δημογραφικά τους χαρακτηριστικά σε σχέση με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.

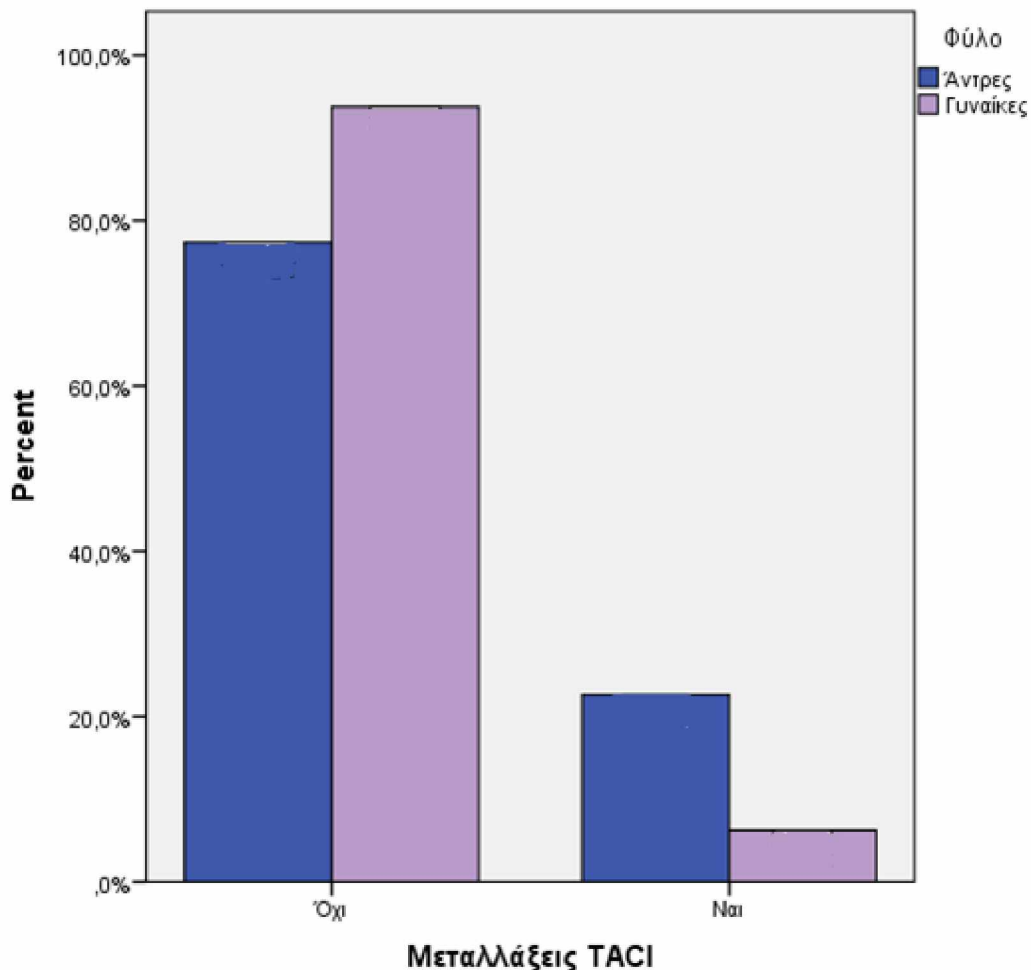
Πίνακας 13: Συσχετίσεις μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με το οικογενειακό ιστορικό και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά

		Μεταλλάξεις <i>TACI</i>				P Pearson's χ^2 test
		Όχι		Ναι		
		N	%	N	%	
Φύλο	Άνδρες	40	75.5	13	24.5	0.011
	Γυναίκες	60	93.7	4	6.3	
Ηλικία (μέση τιμή, SD)		45.1 (15.4)		37.8 (17.8)		0.086‡
BMI (μέση τιμή, SD)		25.1 (4.9)		25.5 (3.5)		0.765‡
BMI	Φυσιολογικοί	50	90.9	5	9.1	0.194
	Υπέρβαροι/ Παχύσαρκοι	42	82.4	9	17.6	
Οικογενειακό ιστορικό PID	Όχι	88	88.0	12	12.0	0.247+
	Ναι	13	76.5	4	23.5	
Οικογενειακό ιστορικό αυτοανοσίας	Όχι	59	88.1	8	11.9	0.527
	Ναι	42	84.0	8	16.0	
Οικογενειακό ιστορικό νεοπλασίας	Όχι	68	90.7	7	9.3	0.068
	Ναι	33	78.6	9	21.4	

+Fisher's exact test ‡Student's t-test

Όπως προκύπτει από την μελέτη των στοιχείων του συγκεκριμένου πίνακα, **η παρουσία των αιτοπαθονενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TACI* ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p: 0.011$) συχνότερη στους άντρες σε σύγκριση με τις γυναίκες**. Δεν διαπιστώθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την ηλικία των ασθενών, τον Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) και την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας, αυτοανοσίας και νεοπλασίας. Στο γράφημα της **Εικόνας 16** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά της απουσίας ή της παρουσίας των

μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, ανάλογα με το φύλο των ασθενών.



Εικόνα 16: Συσχετίσεις μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* με το φύλο των ασθενών

5.2 Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ με τις συνθήκες διάγνωσης της νόσου. Στον Πίνακα 14 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα δεδομένα αναφορικά με τις συνθήκες διάγνωσης της νόσου των ασθενών, σε σχέση με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.

Πίνακας 14: Συσχετίσεις μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με τις συνθήκες διάγνωσης της νόσου

		Μεταλλάξεις <i>TACI</i>				P Pearson's χ^2 test
		Όχι		Ναι		
Διάγνωση	KΠΑ	95	86.4%	15	13.6%	0.733+
	IgAD+IgGsD	5	71.4%	2	28.6%	
Ηλικία κατά τη διάγνωση (μέση τιμή, SD)		36.3 (15.4)		33.7 (17.6)		0.534‡
Ηλικία κατά την έναρξη της νόσου (μέση τιμή, SD)		25.1 (15.5)		22.3 (15.5)		0.510‡
Έτη από έναρξη νόσου μέχρι διάγνωση (μέση τιμή, SD, εύρος)		11.4 (10.6)	9 (3-15)	11.5 (13.2)	7 (0.5-18)	0,528‡‡
Διάρκεια παρακολούθησης (μέση τιμή, SD, εύρος)		8.8 (9.1)	7 (2-12)	4.2 (5.1)	2 (1-6)	0,028‡‡
Άλλα αίτια διάγνωσης εκτός από λοιμώξεις	Όχι	72	91.1	7	8.9	0,024
	Ναι	28	73.7	10	26.3	

+Fisher's exact test ‡Student's t-test ‡‡Mann-Whitney test

Όπως προκύπτει από την μελέτη των στοιχείων του συγκεκριμένου πίνακα, η παρουσία των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TACI* ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό (p : 0.024) συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι διαγνώστηκαν λόγω κλινικών εκδηλώσεων στις οποίες δεν περιλαμβάνονταν λοιμώξεις. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TACI* ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό (p : 0.028) συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι είχαν μικρότερη διάρκεια παρακολούθησης. Δεν διαπιστώθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την νόσο (ΚΠΑ-IgAD με συνοδό IgGsD), την ηλικία έναρξης της νόσου, την ηλικία διάγνωσης της νόσου και το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων και της διάγνωσης της νόσου.

5.3 Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Στον Πίνακα 15 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα δεδομένα αναφορικά με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, σε σχέση με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.

Πίνακας 15: Συσχετίσεις μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

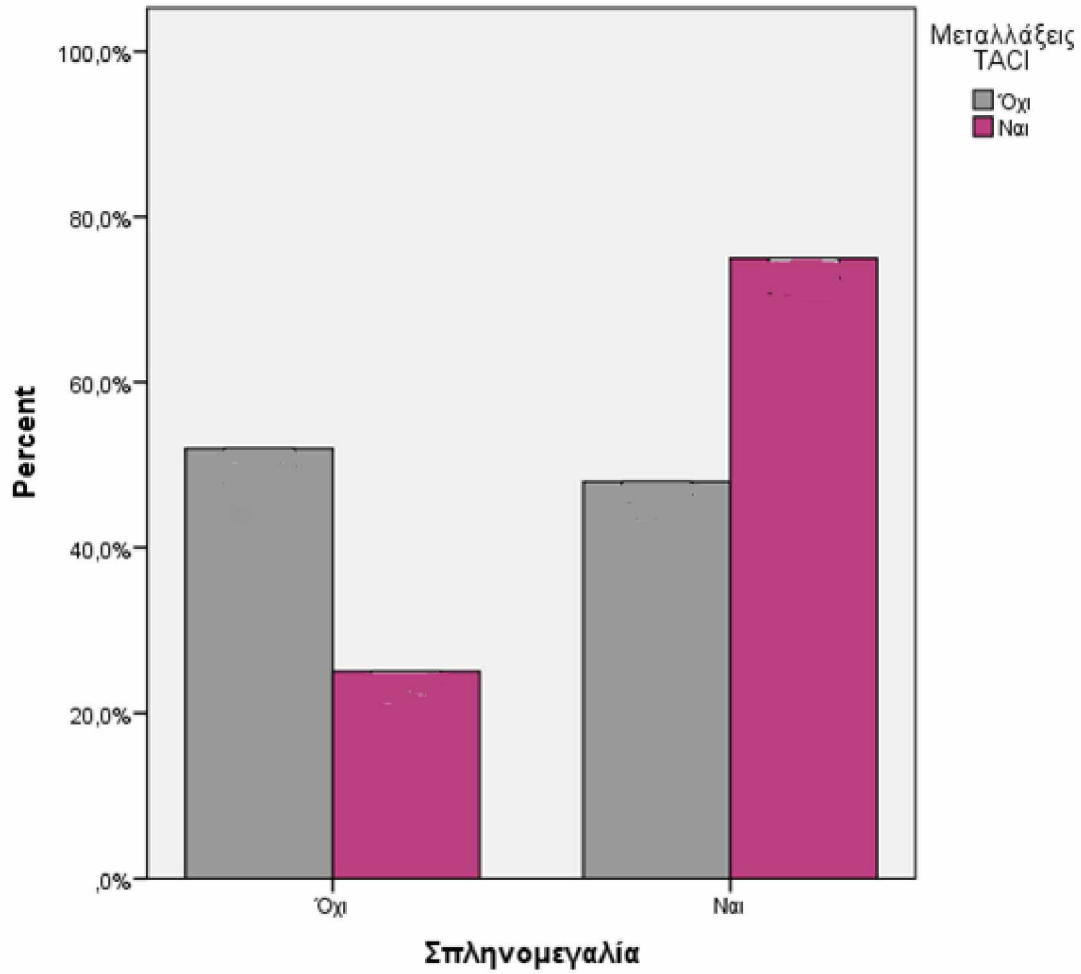
	Παρουσία μεταλλάξεων		
	Όχι	Ναι	
	100	17	
	No (%)	No (%)	P Pearson's χ^2 test
Λεμφική υπερπλασία	54 (54%)	16 (94.1%)	0.004
Σπληνομεγαλία	47 (47%)	13 (76.5%)	0.047
Λεμφαδενοπάθεια	34 (34%)	13 (76.5%)	0.002
Εντερική λεμφική υπερπλασία	9 (9%)	1 (5.9%)	0.670
Ηπατομεγαλία	21 (21%)	5 (29.1%)	0.649
Λοιμώξεις	93 (93%)	16 (94.1%)	0.866
Επιπλοκές λοιμώξεων	52 (52%)	4 (23.5%)	0.049
Απουσία επιπλοκών λοιμώξεων	48 (48%)	13 (76.5%)	0.049
Κοκκιωματώδης νόσος	10 (10%)	1 (5.9%)	0.929
Αυτοάνοσες εκδηλώσεις	56 (56%)	11 (64.7%)	0.685
Αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα	25 (25%)	2 (11.7%)	0.376
Αυτοάνοσες κυτταροπενίες	21 (21%)	8 (47.1%)	0.046
Αλλεργικές εκδηλώσεις	28 (28%)	6 (35.3%)	0.746
Σπληνεκτομή	10 (10%)	3 (17.6%)	0.610
Αδενοειδεκτομή	5 (5%)	4 (23.5%)	0.031
Αμυγδαλεκτομή	10 (10%)	6 (35.3%)	0.015
Νεοπλασίες	19 (19%)	3 (17.6%)	0.895

Όπως προκύπτει από την μελέτη των στοιχείων του συγκεκριμένου πίνακα, η παρουσία των αιτοπαθονενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TAC1* ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν ευρήματα λεμφικής υπερπλασίας (p: 0.004), λεμφαδενοπάθεια (p: 0.002), σπληνομεγαλία (p: 0.047), καθώς και αυτοάνοσες κυτταροπενίες (AAA, ΙΘΠ, Σύνδρομο Evans, p: 0.046). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των αιτοπαθονενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TAC1* ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί είτε σε αδενοειδεκτομή (p: 0.031), είτε σε αμυγδαλεκτομή (p: 0.047). Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των αιτοπαθονενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TAC1* ήταν (οριακά) σε βαθμό στατιστικά σημαντικό συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι δεν εμφάνιζαν τις προηγουμένως περιγραφείσες επιπλοκές των λοιμώξεων (p: 0.047). Δεν διαπιστώθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την παρουσία λοιμώξεων, κοκκιωματώδους νόσου, αυτοανόσων εκδηλώσεων (εξαιρουμένων των αυτοανόσων κυτταροπενιών), αλλεργικών εκδηλώσεων, ηπατομεγαλίας, οζώδους λεμφικής υπερπλασίας του λεπτού εντέρου και νεοπλασίας. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, στους ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε σπληνεκτομή, συγκριτικά με αυτούς οι οποίοι δεν είχαν υποβληθεί στην συγκεκριμένη χειρουργική επέμβαση. Στον Πίνακα 16 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών τα οποία διαπιστώθηκε ότι σχετίζονται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.

Πίνακας 16: Συσχετίσεις μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (συγκεντρωτικός πίνακας)

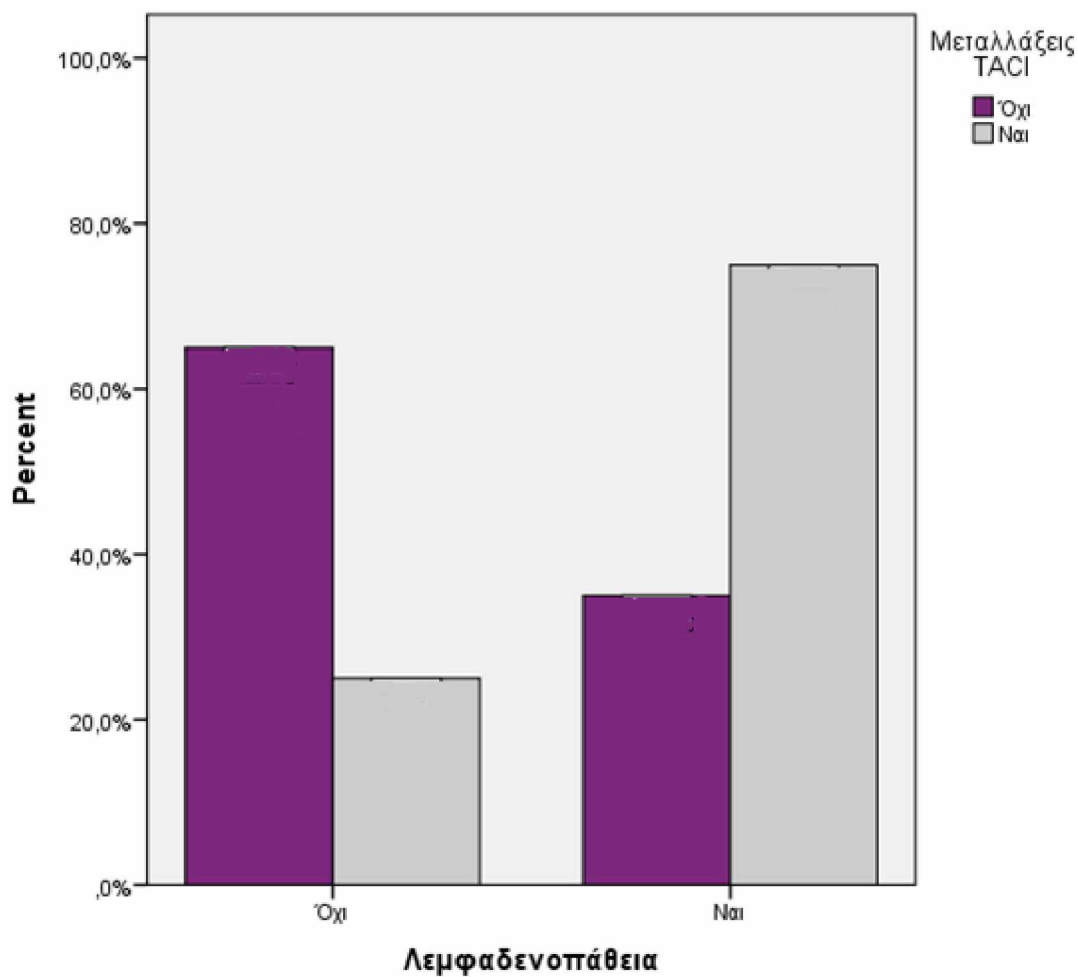
	Παρουσία μεταλλάξεων (17)	Απουσία μεταλλάξεων (100)	P Pearson's χ^2 test
Λεμφαδενοπάθεια	13 (76.5%)	34 (34%)	0.002
Σπληνομεγαλία	13 (75%)	47 (47%)	0.047
Αυτοάνοσες Κυτταροπενίες	8 (47.1%)	21 (21%)	0.046
Απουσία επιπλοκών λοιμώξεων	48 (48%)	13 (76.5%)	0.049
Αμυγδαλεκτομή	6 (35.3%)	10 (10%)	0.015
Αδενοειδεκτομή	4 (23.5%)	5 (5%)	0.031

Στο γράφημα της **Εικόνας 17** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά σπληνομεγαλίας των ασθενών, ανάλογα με την απουσία ή της παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.



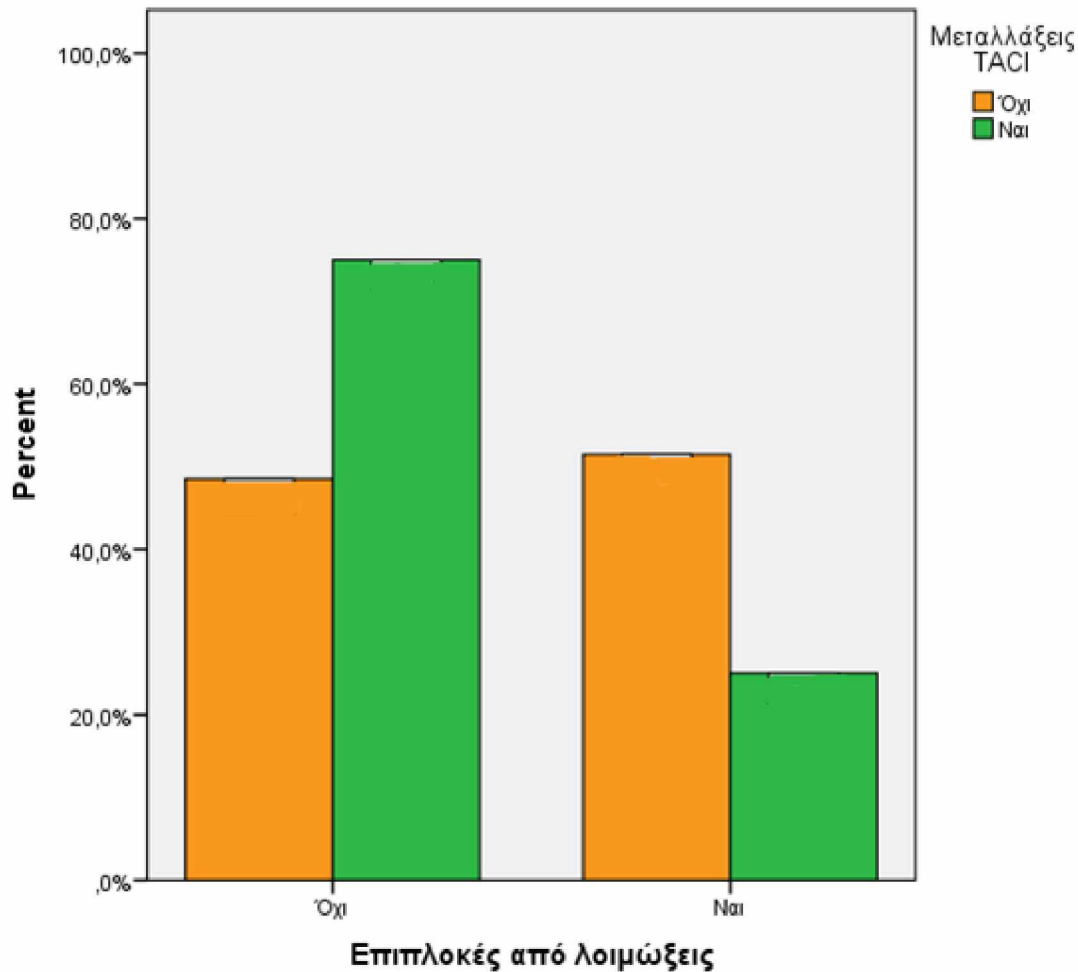
Εικόνα 17: Συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με την σπληνομεγαλία

Στο γράφημα της **Εικόνας 18** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά λεμφαδενοπάθειας των ασθενών, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.



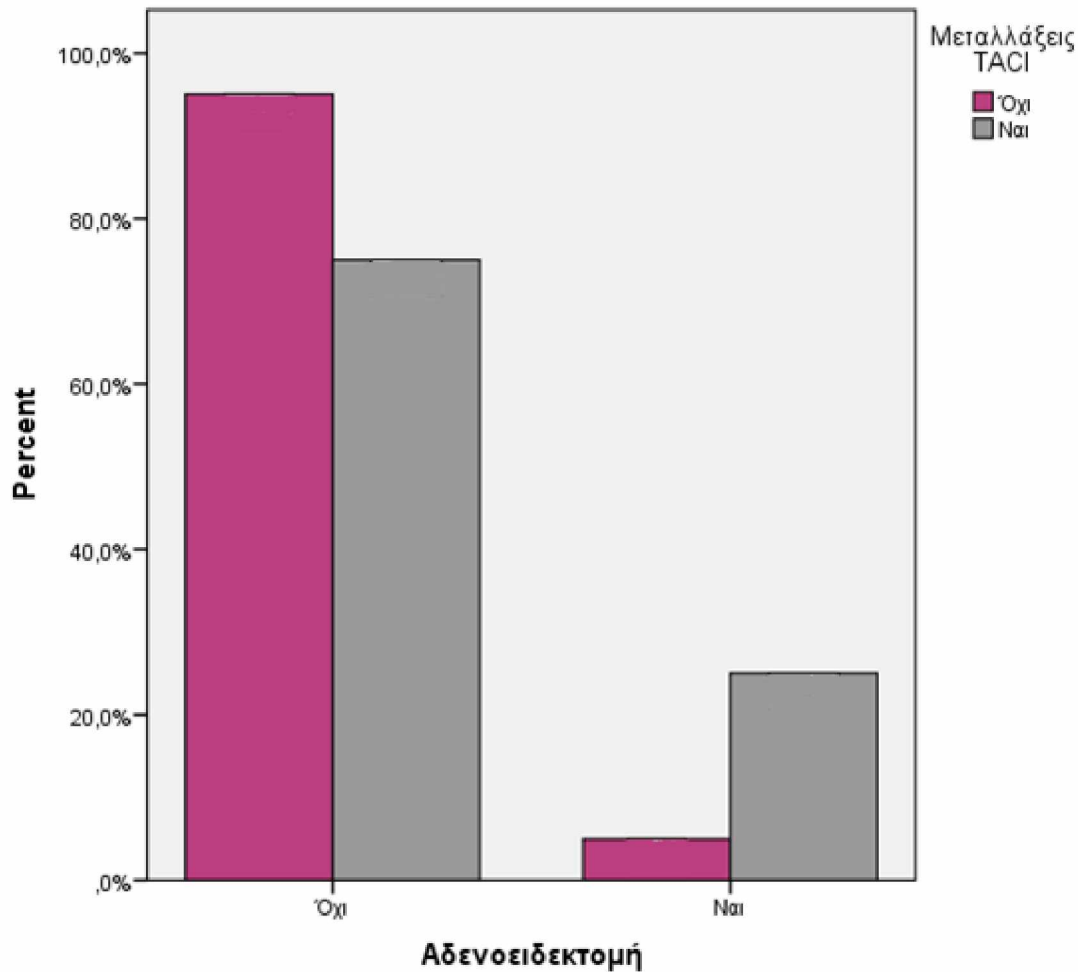
Εικόνα 18: Συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* με την λεμφαδενοπάθεια

Στο γράφημα της **Εικόνας 19** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά των επιπλοκών των ασθενών από τις λοιμώξεις, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.



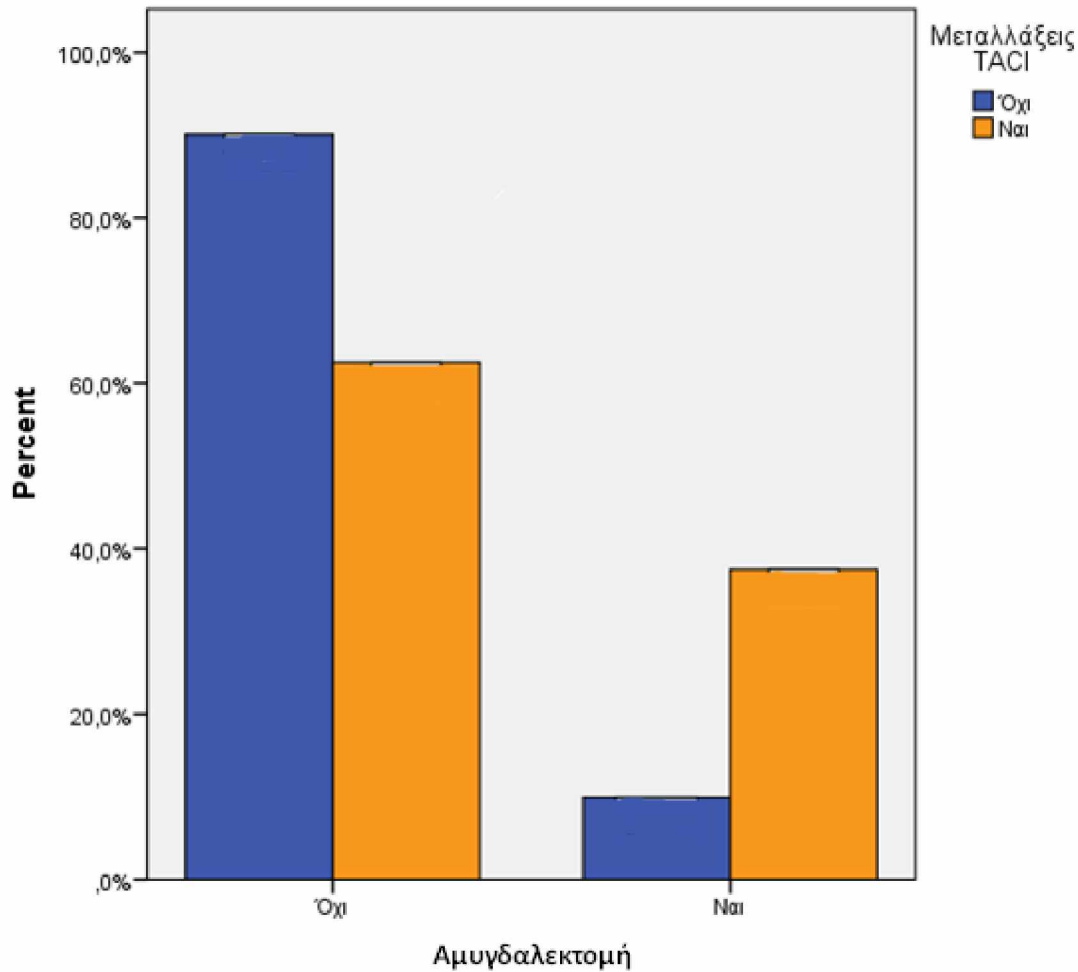
Εικόνα 19: Συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με τις επιπλοκές των λοιμώξεων

Στο γράφημα της **Εικόνας 20** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά αδενοειδεκτομής των ασθενών, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.



Εικόνα 20: Συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με την αδενοειδεκτομή

Στο γράφημα της **Εικόνας 21** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά αμυγδαλεκτομής των ασθενών, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.



Εικόνα 21: Συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* με την αμυγδαλεκτομή

5.4 Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών του ορού και των υποτάξεων της IgG. Στον Πίνακα 17 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα δεδομένα αναφορικά με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών του ορού και των υποτάξεων της IgG, σε σχέση με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.

Πίνακας 17: Συσχετίσεις μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών του ορού και των υποτάξεων της IgG

	Μεταλλάξεις <i>TACI</i>		P Mann-Whitney test
	Όχι	Ναι	
	Μέση τιμή, SD	Μέση τιμή, SD	
IgG	286 (239)	375 (256)	0.163
IgA	22.2 (53.7)	16.7 (22.8)	0.606
IgM	41.1 (63.8)	39.8 (43.1)	0.467
Total Igs	357 (270)	432 (268)	0.225
IgG1	228 (185)	270 (166)	0.281
IgG2	67.9 (67.6)	101 (93.3)	0.289
IgG3	16.9 (20.4)	20.3 (13.5)	0.118
IgG4	3.4 (7.2)	27.8 (50.4)	0.555

Όπως προκύπτει από την μελέτη των στοιχείων του συγκεκριμένου πίνακα, δεν διαπιστώθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με τις τιμές των ανοσοσφαιρινών του ορού και των υποτάξεων της IgG κατά την χρονική στιγμή της διάγνωσης της νόσου.

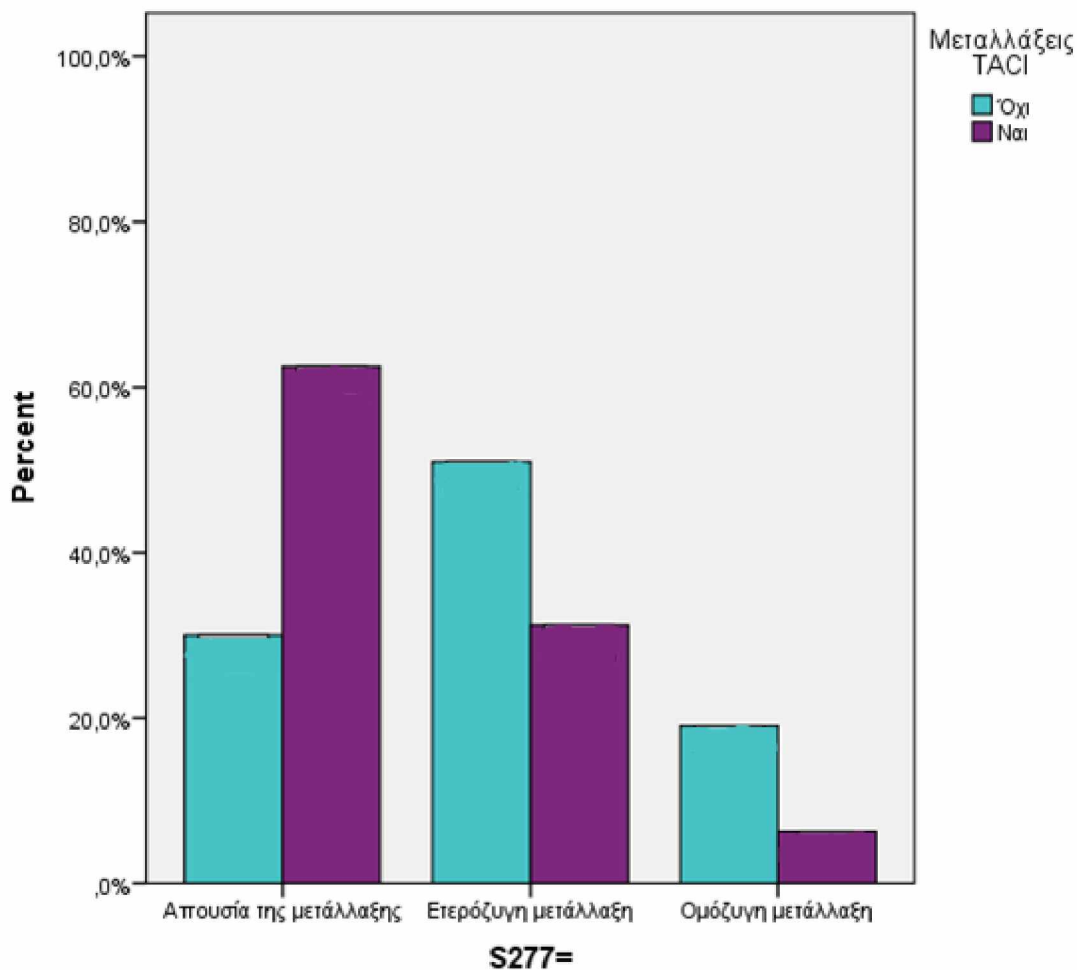
5.5 *Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου TAC1 σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την παρουσία ή την απουσία των μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεών του, καθώς και των πολυμορφισμών του.* Στον Πίνακα 18 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα δεδομένα αναφορικά με την παρουσία ή την απουσία των μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του γονιδίου TAC1, καθώς και των πολυμορφισμών του, σε σχέση με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.

Πίνακας 18: Συσχετίσεις αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του TAC1 με τους πολυμορφισμούς του και τις μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις

	Μεταλλάξεις του TAC1			p
	Ασθενείς	Όχι	Ναι	
	117	100	17	
Συσχετίσεις μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων και πολυμορφισμών του TAC1 με τις αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες				
T27	161 (68.8%)	135 (67.5%)	26 (76.5%)	0.325
97P	10 (4.3%)	10 (5%)	0 (0%)	0.365
V220A	7 (3%)	7 (3.5%)	0 (0%)	0.573
S277	96 (41%)	88 (44%)	8 (23.5%)	0.039
P251L	27 (11.5%)	25(12.5%)	2 (5.9%)	0.496
A24625C	101 (43.2%)	91 (45.5%)	10 (29.4%)	0.118
T33402G	74 (31.6%)	67 (33.5%)	7 (20.6%)	0.194
T33482C	74 (31.6%)	67 (33.5%)	7 (20.6%)	0.194

Όπως προκύπτει από την μελέτη των στοιχείων του συγκεκριμένου πίνακα, η **συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού S277 (rs11078355, exon 5) και της απουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου TAC1 σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ ήταν στατιστικά σημαντική (p: 0.039)**. Δεν διαπιστώθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου TAC1 οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την παρουσία ή την απουσία των μη

αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του P251L (rs34562254) και V220A (rs56063729). Επίσης, δεν διαπιστώθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό διαφορά μεταξύ της απουσίας ή της παρουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, με την παρουσία ή την απουσία των πολυμορφισμών T27 (rs8072293), P97 (rs35062843), S277 (rs11078355), A24625C (rs2274892), T33402G (rs11652843) και T33482C (rs11652811). Στο γράφημα της **Εικόνας 22** που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα ποσοστά του πολυμορφισμού S277 του γονιδίου *TACI* στους ασθενείς, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ.



Εικόνα 22: Συσχέτιση αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TACI* με τον πολυμορφισμό του S277

5.6 Πολυπαραγοντική ανάλυση

Μετά την ολοκλήρωση της μονοπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης, έγινε ανάλυση λογαριθμικής παλινδρόμησης με ανεξάρτητη μεταβλητή την παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ. Σαν εξαρτημένες χρησιμοποιήθηκαν η παρουσία σπληνομεγαλίας, λεμφαδενοπάθειας, λεμφικής υπερπλασίας, αυτοάνοσης κυτταροπενίας, η απουσία εμφάνισης επιπλοκών από τις λοιμώξεις, η ύπαρξη ιστορικού αδενοειδεκτομής και αμυγδαλεκτομής, καθώς και η παρουσία του πολυμορφισμού S277. Οι αναλύσεις έγιναν με την χρήση της μεθόδου διαδοχικής ένταξης-αφαίρεσης (stepwise method) και έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

A) Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την εμφάνιση σπληνομεγαλίας (**p: 0.035**). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είχαν 3.59 (OR: 1.02-11.79) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης σπληνομεγαλίας, σε σύγκριση αυτών οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν.

B) Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την εμφάνιση λεμφαδενοπάθειας (**p: 0.004**). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είχαν 6.21 (OR: 1.88-20.52) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης λεμφαδενοπάθειας, σε σύγκριση αυτών οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν.

Γ) Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την εμφάνιση λεμφικής υπερπλασίας (**p: 0.014**). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είχαν 13.33 (OR: 1.70-104.40) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης λεμφικής υπερπλασίας, σε σύγκριση αυτών οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν.

Δ) Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την εμφάνιση αυτοάνοσης κυτταροπενίας (**p: 0.027**). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είχαν 3.34 (OR: 1.15-9.72) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αυτοάνοσης κυτταροπενίας, σε σύγκριση αυτών οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν.

Ε) Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την ύπαρξη ιστορικού αδενοειδεκτομής (**p: 0.016**). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είχαν 5.84 (OR: 1.39-24.59) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ύπαρξης ιστορικού αδενοειδεκτομής, σε σύγκριση αυτούς οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν.

ΣΤ) Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την ύπαρξη ιστορικού αμυγδαλεκτομής (**p: 0.009**). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είχαν 4.91 (OR: 1.49-16.14) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ύπαρξης ιστορικού αμυγδαλεκτομής, σε σύγκριση αυτούς οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν.

Τα προαναφερθέντα παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 19** που ακολουθεί.

Πίνακας 19: Συσχετίσεις των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση

	Μεταλλάξεις <i>TACI</i>	OR (95% ΔΕ)+	P
Σπληνομεγαλία	Ναι	3.59 (1.02 – 11.79)	0.035
Λεμφαδενοπάθεια	Ναι	6.21 (1.88 – 20.52)	0.004
Λεμφική υπερπλασία	Ναι	13.33 (1.70 – 104.40)	0.014
Αδενοειδεκτομή	Ναι	5.84 (1.39 – 24.59)	0.016
Αμυγδαλεκτομή	Ναι	4.91 (1.49 – 16.14)	0.009
Αυτοάνοσες κυτταροπενίες	Ναι	3.34 (1.15 – 9.72)	0.027

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση λογαριθμικής παλινδρόμησης με ανεξάρτητη μεταβλητή την παρουσία των μεταλλάξεων του *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, δεν ανέδειξε την ύπαρξη συσχετίσεων με την απουσία επιπλοκών από τις λοιμώξεις και την παρουσία του πολυμορφισμού S277.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναζήτηση γονιδίων οι μεταλλάξεις των οποίων σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ και κυρίως με την ΚΠΑ, βρίσκεται σε εξέλιξη κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα *TACI*, *ICOS*, *BAFF-R*, *CD19*, *CD20* και *MSH5*, έχουν αναφερθεί ως αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ και ειδικότερα με την ΚΠΑ³⁰⁻³⁷. Μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*, πέραν των ΠΑΑ, έχουν εντοπιστεί και σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από ποικίλα άλλα νοσήματα, όπως Σαρκοείδωση, Υπερτροφία Αδενοειδών Εκβλαστήσεων, Υπερτροφία Αμυγδαλών, Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και αρκετά σπανιότερα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα^{92,93,158,159}. Σε ότι αφορά τις ΠΑΑ, η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *TACI* έχει ελεγχθεί σε αρκετές ομάδες ασθενών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, κυρίως σε ασθενείς με ΚΠΑ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Από την άλλη πλευρά, αν και κάποιες ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* έχει αποδειχθεί σε μελέτες «in vitro» ότι έχουν «παθογενετική» δράση, παρουσία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων έχει διαπιστωθεί και σε συγγενείς ασθενών με ΠΑΑ, καθώς και σε υγιή άτομα^{106,107,109,164}. Τα συγκεκριμένα ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αιτιοπαθογένεια των ΠΑΑ είναι πολυπαραγοντική, καθώς και ότι οι ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* είναι δυνατόν να λειτουργούν είτε ως προδιαθεσικοί παράγοντες, είτε ως επαγωγείς της εμφάνισης των ΠΑΑ. Για πρώτη φορά σε πειραματική μελέτη η οποία δημοσιεύτηκε το 2003, διαπιστώθηκε ότι *TACI* knock-out ποντίκια εμφάνιζαν ευρήματα λεμφικής υπερπλασίας και εκδηλώσεις αυτοανοσίας¹⁰⁴. Κατόπιν τούτου, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η δυσλειτουργία του υποδοχέα *TACI* (λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων), σε ασθενείς πάσχοντες από ΚΠΑ, είναι δυνατόν να ευθύνεται για τις συγκεκριμένες κλινικές εκδηλώσεις. Οι Zhang et al και Salzer et al ήταν οι πρώτοι οι οποίοι διαπίστωσαν υψηλότερο επιπολασμό αυτοάνοσων κυτταροπενιών και καλοήθων λεμφικών υπερπλασιών σε ασθενείς πάσχοντες από ΚΠΑ οι οποίοι εμφάνιζαν μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI*, σε σύγκριση με αυτούς οι οποίοι δεν τις εμφάνιζαν¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

Στην βιβλιογραφία, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ και κυρίως με την ΚΠΑ, κυμαίνεται μεταξύ 5-15%¹⁰⁶⁻¹¹³. Δύο από αυτές τις μεταλλάξεις, η C104R (rs34557412) και η A181E (rs72553883), είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενες σε ασθενείς πάσχοντες από ΚΠΑ. Πέραν των προαναφερθεισών, έχουν αναφερθεί και άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* οι οποίες έχουν συσχετιστεί αιτιοπαθογενετικά με την ΚΠΑ¹⁰⁶⁻¹¹³. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για την R20C

(rs200013015), την C62Y (rs14104731090), την I87N (rs72553877), την K188M (rs74811083), την P151L (rs200037919) και την E236X (rs201021960). Σε ότι αφορά τις μη αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *TAC1* με την ΚΠΑ (non causative, polymorphic variant), έχει αναφερθεί η παρουσία της V220A (rs56063729) και της P251L (rs34562254). Επίσης, στους ίδιους ασθενείς έχει αναφερθεί και η παρουσία των πολυμορφισμών T27 (rs8072293), P97 (rs35062843) και S277 (rs11078355). Τέλος, στους ασθενείς με ΚΠΑ έχει αναφερθεί και η παρουσία τριών πολυμορφισμών σε introns, του A24625C (rs2274892), του T33402G (rs11652843) και του T33482C (rs11652811). Υπάρχει μια γενική ομοφωνία στην βιβλιογραφία, αναφορικά με το γεγονός ότι η παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, συσχετίζεται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την εμφάνιση αυτοανόσων κυτταροπενιών και καλοήθων λεμφικών υπερπλασιών στους συγκεκριμένους ασθενείς και κυρίως στους πάσχοντες από ΚΠΑ^{109,110}. Κατόπιν τούτων, θεωρήθηκε σκόπιμο να επιχειρηθεί τόσο η μελέτη της επίπτωσης των μεταλλάξεων των γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ σε Έλληνες ασθενείς με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ, όσο και η διερεύνηση τυχόν συσχετίσεων της παρουσίας των προαναφερθεισών μεταλλάξεων με τον κλινικό ή εργαστηριακό φαινότυπο των συγκεκριμένων ασθενών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μελέτη μας περιελάμβανε 117 ασθενείς με ΠΑΑ οι οποίοι εμφάνιζαν κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Από αυτούς, οι 110 (94%) πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της ΚΠΑ. Οι υπόλοιποι επτά (6%) έπασχαν από ανεπάρκεια της IgA με συνοδό ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG, με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Σε 17 ασθενείς (14.5%) διαπιστώθηκε η παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ. Πιο συγκεκριμένα, οι 15 από αυτούς τους ασθενείς (15/110, 13.6%) έπασχαν από ΚΠΑ, ενώ οι υπόλοιποι δύο (2/7, 28.6%) από ανεπάρκεια της IgA με συνοδό ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG, με κλινικό φαινότυπο ΚΠΑ. Όπως είναι προφανές, η ανευρεθείσα στην μελέτη μας συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, ήταν συμβατή με την αναφερόμενη στην διεθνή βιβλιογραφία. Δεν ανιχνεύτηκε ομόζυγη μετάλλαξη του γονιδίου *TAC1* σε κανέναν ασθενή. Στους τέσσερις από τους 17 ασθενείς (23.5%) οι οποίοι εμφάνιζαν μεταλλάξεις του γονιδίου *TAC1* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με τις ΠΑΑ, αυτές ήταν συνδυασμένες ετερόζυγες, ενώ στους υπόλοιπους ασθενείς (13, 75%) ήταν ετερόζυγες. Μεταξύ των ασθενών της μελέτης μας στους οποίους διαπιστώθηκε η παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ, η συχνότερα

ανευρεθείσα μετάλλαξη ήταν η C104R (rs34557412), η οποία ανιχνεύτηκε σε 10 (58.8%) από αυτούς και η συχνότητα εμφάνισής της μεταξύ αυτών των ασθενών ήταν συμβατή με την αναφερόμενη στην διεθνή βιβλιογραφία. Η επόμενη σε συχνότητα εμφάνισης μετάλλαξη στους ασθενείς της μελέτης μας, δεν ήταν η A181E (rs72553883) όπως αναφέρεται στις περισσότερες μελέτες της βιβλιογραφίας (ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς, 11.8%), αλλά η I87N (rs72553877), η οποία ανιχνεύτηκε σε τέσσερις ασθενείς (23.5% των περιπτώσεων ασθενών με παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ). Οι ακόλουθες μεταλλάξεις, ανιχνεύτηκαν σε έναν μόνο ασθενή η κάθε μία: R20C (rs200013015), C62Y (rs1410473109), P151L (rs200037919), K188M (rs74811083) και E236X (rs201021960). Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι η C104R (rs34557412) μετάλλαξη ανιχνεύτηκε και στις τέσσερις περιπτώσεις διπλής ετεροζυγωτίας, ενώ η A181E (rs72553883) στις δύο από αυτές.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η παρουσία των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TACI* ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p: 0.010$) συχνότερη στους άντρες ασθενείς σε σύγκριση με τις γυναίκες. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p: 0.024$) συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι διαγνώστηκαν λόγω κλινικών εκδηλώσεων στις οποίες δεν περιλαμβάνονταν λοιμώξεις. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί και η διαπίστωση ότι υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού S277 (rs11078355, exon 5) και της απουσίας μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* σχετιζόμενων αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ στατιστικά σημαντική ($p: 0.039$). Σε ότι αφορά τις συσχετίσεις των αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ μεταλλάξεων του *TACI* με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης μας, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν ευρήματα λεμφικής υπερπλασίας ($p: 0.004$), λεμφαδενοπάθεια ($p: 0.002$), σπληνομεγαλία ($p: 0.047$), απουσία επιπλοκών λοιμώξεων ($p: 0.049$), καθώς και αυτοάνοσες κυτταροπενίες (AAA, ΙΘΠ, Σύνδρομο Evans, $p: 0.046$). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων ήταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό συχνότερη στους ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί είτε σε αδενοειδεκτομή ($p: 0.031$), είτε σε αμυγδαλεκτομή ($p: 0.015$). Με την πολυπαραγοντική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ, σχετιζόταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την παρουσία σπληνομεγαλίας ($p: 0.035$), με την παρουσία λεμφαδενοπάθειας ($p: 0.004$), με την παρουσία λεμφικής υπερπλασίας ($p: 0.014$), με την

εμφάνιση αυτοάνοσης κυτταροπενίας ($p: 0.027$), με την ύπαρξη ιστορικού αδενοειδεκτομής ($p: 0.016$) και με την ύπαρξη ιστορικού αμυγδαλεκτομής ($p: 0.009$).

Όπως είναι σαφές από τα προαναφερθέντα, στην μελέτη μας (σε πλήρη σχεδόν αντιστοιχία με τα μέχρι σήμερα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας) η παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό, τόσο με την παρουσία καλοήθων λεμφικών υπερπλασιών (σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, ιστορικό αδενοειδεκτομής ή/και αμυγδαλεκτομής), όσο και με την παρουσία αυτοανόσων κυτταροπενιών. Επιπρόσθετα, στην μελέτη μας, διαπιστώθηκε υψηλός επιπολασμός μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενων με τις ΠΑΑ, σε ασθενείς με συνδυασμένη ανεπάρκεια της IgA και υποτάξεων της IgG οι οποίοι εμφάνιζαν κλινικό φαινότυπο συμβατό με ΚΠΑ. Από όσα γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία η οποία περιγράφει μια τέτοια συσχέτιση. Προφανώς, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερους αριθμούς ασθενών προκειμένου να επιβεβαιωθεί το συγκεκριμένο εύρημα.

Τέλος, σε ότι αφορά το γονίδιο *CTLA4*, η ανευρεθείσα συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στους ασθενείς της μελέτης μας (2.6%) ήταν συμβατή με τις αναφορές της διεθνούς βιβλιογραφίας^{36,150-154}. Όπως ήδη αναφέρθηκε, λόγω του συγκριτικά πολύ μικρού αριθμού των ασθενών με μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας (3 σε 117), δεν ήταν εφικτή η μελέτη της πιθανότητας ύπαρξης τυχόν συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας των προαναφερθεισών μεταλλάξεων και των λοιπών χαρακτηριστικών των ασθενών.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά μας είναι συμβατά με αυτά προηγούμενων μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας, σύμφωνα με τα οποία οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TACI* οι οποίες σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τις ΠΑΑ εμφανίζονται στο 15% περίπου των ασθενών οι οποίοι πάσχουν από τα συγκεκριμένα νοσήματα, ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA4* στο 2.6% των συγκεκριμένων ασθενών. Επίσης, η παρουσία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* συσχετίζεται με την εμφάνιση καλοήθων λεμφικών υπερπλασιών και αυτοανόσων κυτταροπενιών. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι παρουσία των προαναφερθεισών μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI* (σε ετερόζυγη μορφή), διαπιστώνεται και σε άτομα τα οποία δεν πάσχουν από ΠΑΑ, είναι προφανές ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να τεκμηριωθεί

ισχυρότερα η αιτιοπαθογενετική συσχέτιση με τις ΠΑΑ των προαναφερθεισών μεταλλάξεων του γονιδίου *TACI*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: An Update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 114: 677-687.
- 2) Casanova JL, Chapel H, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiencies: 2009 update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124: 1161-1178.
- 3) Al-Hertz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: An Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Frontiers in Immunology* 2011; 2: 1-26.
- 4) Al-Hertz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: An Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 1-33.
- 5) Bousfiha A, Jeddane L, Picard C et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *Journal of Clinical Immunology* 2018; 38: 129-143.
- 6) Tangye SG, Al-Hertz W, Bousfiha A et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology* 2020; 40: 24-64.
- 7) Buckley R. Primary Immunodeficiency Diseases due to defects in lymphocytes. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 1313-1324.
- 8) Ress S. Immunodeficiency Diseases presenting in adults-Diagnosis and Management. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2008; 21: 1-7.
- 9) Speletas M, Germenis A. Primary antibody deficiencies in adults. A contemporary clinical approach. *Archives of Hellenic Medicine* 2013; 30: 420-435.
- 10) Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L. Antibody deficiency diseases. *European Journal of Immunology* 2008; 38: 327-333.
- 11) Κάκκας Ι. Πρωτοπαθείς και Δευτεροπαθείς Ανοσοανεπάρκειες, *Νοσοκομειακά Χρονικά* 2003; 65(συνπλ): 148-154.
- 12) Jaffe E, Lejtenyi C, Noya F, Mazer B. Secondary Hypogammaglobulinemia. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2001; 21:141-163.
- 13) Rose ME, Lang DM. Evaluating and managing hypogammaglobulinemia, *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2006; 73(2):133-144.

- 14) Kelleher P, Misbah SA. What is Good's syndrome? Immunological abnormalities in patients with thymoma. *Journal of Clinical Pathology* 2003; 56:12–16.
- 15) Toubert A. Immune reconstitution after allogeneic HSCT. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Maszi T (eds). *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, ESH, Paris, 2008; p: 234-245.
- 16) Casulo C, Maragulia J, Zelenetz AD. Incidence of hypogammaglobulinemia in patients receiving rituximab and the use of intravenous immunoglobulin for recurrent infections. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 2013; 13:106–111.
- 17) Spickett G, Farrant J, North M, Zhang J, Morgan L, Webster D. Common Variable Immunodeficiency: How many diseases? *Immunology Today* 1997; 18:325-328.
- 18) Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common Variable Immunodeficiency: Clinical and immunological features of 248 patients. *Clinical Immunology* 1999; 92:34-48.
- 19) Qinti I, Roselina A, Spadaro G, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2007; 27:308-316.
- 20) Cunningham-Rundles C. The many faces of Common Variable Immunodeficiency. *Hematology* 2012:301-305.
- 21) Common Variable Immunodeficiency in: *Primary Immunodeficiency Diseases*, Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD (editors), 2nd edition, Springer-Verlag Berlin 2017, p:197-204.
- 22) Conley M, Rother J, Minegishi Y. X-linked agammaglobulinemia. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 2000; 19:183-204.
- 23) Stewart D, Tian L, Nelson D. A case of X-linked agammaglobulinemia diagnosed in adulthood. *Clinical Immunology* 2001; 99:94-99.
- 24) Notarangelo LD, Hayward AR: X-linked Immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 120:399-405.
- 25) Lougaris V, Badolato R, Ferrari S, Plebani A. Hyper IgM syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular and immunological features. *Immunological Reviews* 2005; 203:48-66.
- 26) Durandy A, Revy P, Imai K, Fischer A. Hyper IgM syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunological Reviews* 2005; 203:67-79.

- 27) Nelson PL, Terhorst C. X-linked lymphoproliferative syndrome. *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 122:291-295.
- 28) Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis and management of Primary Antibody Deficiencies and infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22(3):396-414.
- 29) Conley ME. Genetics of hypogammaglobulinemia: What do we really know? *Current Opinion in Immunology* 2009; 21: 466-471.
- 30) Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, et al. Genes associated with Common Variable Immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics* 2016; 53(9):575-590.
- 31) Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, et al. Homozygous loss of *ICOS* is associated with adult-onset Common Variable Immunodeficiency. *Nature Immunology* 2003; 4:261-268.
- 32) Salzer U, Chapel HM, Webster AD, et al. Mutations in *TNFRSF13B* encoding TACI are associated with Common Variable Immunodeficiency in humans. *Nature Genetics* 2005; 37:820-828.
- 33) Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, et al. *TACI* is mutant in Common Variable Immunodeficiency and IgA deficiency *Nature Genetics* 2005; 37: 829-834.
- 34) Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2009; 106:13945-13950.
- 35) Van Zelm MC, Reisli I, Van Der Burg M, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the *CD19* gene. *New England Journal of Medicine* 2006; 354:1901-1912.
- 36) Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in *CTLA4*. *Science* 2014; 345:1623-1627.
- 37) Sekine H, Ferreir RC, Pan-Hammarstrom Q, et al. Role for *Msh5* in the regulation of Ig class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2007; 104:7193-7198.
- 38) Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, et al. Infections in 252 patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:1547-1554.
- 39) Park JH, Levinson AI. Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Clinical Immunology* 2010; 134:97-103.

- 40) Fernandez Perez ER. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2012; 32:621–632.
- 41) Ardeniz O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in Common Variable Immunodeficiency. *Clinical Immunology* 2009; 133:198–207.
- 42) Thickett KM, Kumararatne DS, Banerjee AK, et al. Common Variable Immune deficiency: Respiratory manifestations, pulmonary function and high-resolution CT scan findings. *QJM* 2002; 95:655–662.
- 43) Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in Common Variable Immunodeficiency. *Annals of Internal Medicine* 1997; 127:613–617.
- 44) Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in Common Variable Immunodeficiency. *Current Allergy and Asthma Reports* 2005; 5:370–375.
- 45) Lai Ping So A, Mayer L. Gastrointestinal manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Seminars in Gastrointestinal Disease* 1997; 8:22–32.
- 46) Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124:658–664.
- 47) Agarwal S, Mayer L. Gastrointestinal manifestations in primary immune disorders. *Inflammatory Bowel Diseases* 2010; 16:703–711.
- 48) Ward C, Lucas M, Piris J, et al. Abnormal liver function in Common Variable Immunodeficiency disorders due to nodular regenerative hyperplasia. *Clinical and Experimental Immunology* 2008; 153:331–337.
- 49) Malamut G, Ziol M, Suarez F, et al. Nodular regenerative hyperplasia: The main liver disease in patients with primary hypogammaglobulinemia and hepatic abnormalities. *Journal of Hepatology* 2008; 48:74–82.
- 50) Fuss IJ, Friend J, Yang Z, et al. Nodular regenerative hyperplasia in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2013; 33:748–758.
- 51) Lopes-Da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2008; 28 (Suppl 1):S46–S55.
- 52) Aragon GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: Lessons from human diseases. *Scandinavian Journal of Immunology* 2010; 71:317–328.

- 53) Vajdic CM, Mao L, Van Leeuwen MT, et al. Are antibody deficiency disorders associated with a narrower range of cancers than other forms of immunodeficiency? *Blood* 2010; 116:1228–1234.
- 54) Dhalla F, Da Silva SP, Lucas M, et al. Review of Gastric Cancer risk factors in patients with Common Variable Immunodeficiency Disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme. *Clinical and Experimental Immunology* 2011; 165:1–7.
- 55) Baron-Ruiz I, Martin-Mateos MA, Plaza-Martin AM, et al. Lymphoma as presentation of Common Variable Immunodeficiency. *Allergologia et Immunopathologia* 2009; 37:51–53.
- 56) Quinti I, Agostini C, Tabolli S, et al. Malignancies are the major cause of death in patients with adult onset Common Variable Immunodeficiency. *Blood* 2012; 120:1953–1954.
- 57) Goldacker S, Warnatz K. Tackling the heterogeneity of CVID. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005, 5: 504-509.
- 58) Bergbreiter A, Salzer U. Common Variable Immunodeficiency: A multifaceted and puzzling disorder. *Expert Review of Clinical Immunology* 2009; 5:167–180.
- 59) Chapel H, Lucas M, Lee M, et al. Common Variable Immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008; 112:277-286.
- 60) Resnick E, Moshier E, Godbold J, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in Common Variable Immune deficiency over 4 decades. *Blood* 2012; 119:1650-1657.
- 61) Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA Deficiency (SIgAD) and Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 120: 225–231.
- 62) Yel L. Selective IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2010; 30(1):10-16.
- 63) Selective IgA Deficiency in: *Primary Immunodeficiency Diseases*, Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD (editors), 2nd edition, Springer-Verlag Berlin 2017, p:218-221.
- 64) Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, et al. Progression of Selective IgA Deficiency to Common Variable Immunodeficiency. *International Archives of Allergy and Immunology* 2008; 147:87–92.
- 65) Oxelius VA, Laurell AB, Lindquist B, et al. IgG Subclasses in Selective IgA Deficiency: Importance of IgG2-IgA Deficiency. *New England Journal of Medicine* 1981; 304:1476–1477.

- 66) Boyle RJ, Le C, Balloch A, et al. The clinical syndrome of Specific Antibody Deficiency in children. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 146:486–492.
- 67) Κακκας Ι. Υπογαμμασφαιριναίμια. *Haema* 2016; 7(4):99-106.
- 68) Fisher A. Severe Combined Immunodeficiencies (SCID). *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 122:143-149.
- 69) Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Severe Combined Immunodeficiency-A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunological Reviews* 2005, 203:98-109.
- 70) www.esid.org
- 71) www.info4pi.org
- 72) Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, et al. The EURO class trial: Defining subgroups in Common Variable Immunodeficiency. *Blood* 2008; 111:77–85.
- 73) Cunningham-Rundles C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies. *Clinical and Experimental Immunology* 2011; 164 (Suppl 2):16–19.
- 74) Roifman CM, Berger M, Notarangelo LD. Management of primary antibody deficiency with replacement therapy: Summary of guidelines. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2008; 28:875–876.
- 75) Lucas M, Lee M, Lortan J, et al. Infection outcomes in patients with Common Variable Immunodeficiency disorders: Relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125:1354–1360.
- 76) Brennan VM, Salome-Bentley NJ, Chapel HM; Immunology nurses study. Prospective audit of adverse reactions occurring in 459 primary antibody-deficient patients receiving intravenous immunoglobulin. *Clinical and Experimental Immunology* 2003; 133:247–251.
- 77) Perez EE, Orange JS, Bonilla F, et al. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017; 139:S1-S46.
- 78) Λιαδάκη Κ. Μεταλλάξεις *TACI* και *ICOS*: Επιδημιολογία και κλινικές συσχετίσεις σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική νοσο, σελ:29-38. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 2011.

- 79) Τσιούμα Γ. Ανίχνευση μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες, σελ:14-23. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 2017.
- 80) Hymowitz S, Patel D, Wallweber H, et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:7218–7227.
- 81) Gordon NC, Pan B, Hymowitz SG, et al. BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry* 2003; 42:5977-5983.
- 82) Patel DR, Wallweber HJ, Yin J, et al. Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:16727-16735.
- 83) Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: Molecular defects in Common Variable Immunodeficiency. *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 149(3):401-9.
- 84) Chang SK, Arendt BK, Darce JR, et al. A role for BLyS in the activation of innate immune cells. *Blood* 2006; 108:2687-2694.
- 85) Salzer U, Jennings S, Grimbacher B. To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation. *European Journal of Immunology* 2007; 37:17-20.
- 86) Castigli E, Wilson SA, Scott S, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 201:35-39.
- 87) Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 2002; 27:19-26.
- 88) Wu Y, Bressette D, Carrell JA, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:35478-35485.
- 89) Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nature Immunology* 2002; 3:822-829.
- 90) Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001; 293:2108-2111.

- 91) Berglund LJ, Jones GJ, Murali R, Fulcher DA. *TACI* mutation with invasive polyclonal CD8⁺ T-cell lymphoproliferation in a patient with Common Variable Immunodeficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 117(4):870-7.
- 92) Tobon GJ, Izquierdo JH, Canas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases* 2013; 2013:827254.
- 93) Zhang Y, Li J, Zhang YM, et al. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research* 2015; 2015:247426.
- 94) Bischof D, ElSawa SF, Mantchev G, et al. Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* 2006; 107:3235-3242.
- 95) Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, et al. Cutting edge: B_{Ly}S enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *Journal of Immunology* 2002; 168:5993-5996.
- 96) O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* 2004; 199:91-98.
- 97) Ozcan E, Garibyan L, Lee JJ, et al. Transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor drives plasma cell differentiation in LPS-activated B cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 123:1277-1286.
- 98) Huard B, Schneider P, Mauri D, et al. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *Journal of Immunology* 2001; 167:6225-6231.
- 99) Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* 2008; 111:1004-1012.
- 100) He B, Santamaria R, Xu W, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature Immunology* 2010; 11:836-845.
- 101) Von Bülow GU, Van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 2001; 14:573-582.
- 102) Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2004; 101:3903-3908.
- 103) Sakurai D, Hase H, Kanno Y, et al. TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* 2007; 109:2961-2967.

- 104) Seshasayee D, Valdez P, Yan M, et al. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity* 2003; 18:279-288.
- 105) Yan M, Wang H, Chan B, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nature Immunology* 2001; 2:638-643.
- 106) Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, et al. Reexamining the role of *TACI* coding variants in Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency. *Nature Genetics* 2007; 39:429-430.
- 107) Castigli E, Wilson S, Garibyan L, et al. Reexamining the role of *TACI* coding variants in Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency. *Nature Genetics* 2007; 39:430-431.
- 108) Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, et al. Novel mutations in *TACI* (*TNFRSF13B*) causing Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2009; 29:777-785.
- 109) Zhang L, Radigan L, Salzer U, et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in Common Variable Immunodeficiency: Clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 120:1178-1185.
- 110) Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, et al. Relevance of biallelic versus monoallelic *TNFRSF13B* mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing *TNFRSF13B* variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009; 113:1967-1976.
- 111) Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, et al. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R *TACI* mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117:1550-1557.
- 112) Lee JJ, Jabara HH, Garibyan L, et al. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 126:1234-1241.
- 113) Speletas M, Mamara A, Iordanakis G, et al. TACI expression and mutational status in Greek patients with Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency. *European Journal of Immunology* 2009; 39:S457.

- 114) Παρσοπούλου Φ. Πολυμορφισμοί των *CD40* και *CTLA4* στις Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες, σελ:44-60. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 2015.
- 115) Watanabe N, Nakajima H. Coinhibitory molecules in autoimmune diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 2012:269756.
- 116) Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology* 2013; 34(11):1-15.
- 117) Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11(12):852-863.
- 118) Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends in Immunology* 2003; 24(6):313-318.
- 119) Collins A V, Brodie DW, Gilbert RJC, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002; 17(2):201-210.
- 120) Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, et al. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood* 1990; 75(7):1531-1539.
- 121) Linsley PS, Greene JL, Tan P, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1992; 176(6):1595-1604.
- 122) Lindsten T, Lee KP, Harris ES, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *Journal of Immunology* 1993; 151(7):3489-3499.
- 123) Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5):405-413.
- 124) Teft W a, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annual Review of Immunology* 2006; 24:65-97.
- 125) Harper K, Balzano C, Rouvier, et al. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *Journal of Immunology* 1991; 147(3):1037-1044.
- 126) Brunner-Weinzierl MC, Hoff H, Burmester GR. Multiple functions for CD28 and Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis Research and Therapy* 2004; 6(2):45-54.

- 127) McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and Cell Biology* 1999; 77(1):1-10.
- 128) Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, et al. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 1997; 6(5):583-589.
- 129) Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, et al. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 1996; 4(6):535-543.
- 130) Iida T, Ohno H, Nakaseko C, et al. Regulation of Cell Surface Expression of CTLA-4 by Secretion of CTLA-4-Containing Lysosomes Upon Activation of CD4+ T Cells. *Journal of Immunology* 2000; 165(9):5062-5068.
- 131) Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 2002; 16:23-35.
- 132) Darlington PJ, Kirchhof MG, Criado G, et al. Hierarchical regulation of CTLA-4 dimer-based lattice formation and its biological relevance for T cell inactivation. *Journal of Immunology* 2005; 175(2):996-1004.
- 133) Van Der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, et al. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 185(3):393-403.
- 134) Schwartz JC, Zhang X, Fedorov AA, et al. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* 2001; 410(6828):604-608.
- 135) McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunological Reviews* 1998; 165:231-247.
- 136) Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunological Reviews* 1998; 165:287-300.
- 137) Brunner MC, Chambers C a, Chan FK, et al. CTLA4 mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *Journal of Immunology* 1999; 162:5813-5820.
- 138) Manzotti CN, Liu MKP, Burke F, et al. Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. *European Journal of Immunology* 2006; 36:1413-1422.

- 139) Carreno BM, Bennett F, Chau T, et al. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *Journal of Immunology* 2000; 165(3):1352-1356.
- 140) Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25(21):9543-9553.
- 141) Chikuma S, Abbas AK, Bluestone JA. B7-independent inhibition of T cells by CTLA-4. *Journal of Immunology* 2005; 175(1):177-181.
- 142) Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189(9):1363-1372.
- 143) Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology* 2002; 3(11):1097-1101.
- 144) Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of Immunology* 1998; 160(3):1212-1218.
- 145) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* 2001; 182(8):18-32.
- 146) Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo M-G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 120(2):227-235.
- 147) Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, et al. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(2):421-434.
- 148) Oaks MK, Hallett KM. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *Journal of Immunology* 2000; 164(10):5015-5018.
- 149) Walker LSK. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of Autoimmunity* 2013; 45:49-57.
- 150) Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, et al. *CTLA4* polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1999; 53(3):296-300.
- 151) Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. *CTLA-4* in autoimmune diseases: a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes and Immunity* 2000; 1(3):170-184.






- 152) Knight AK, Serrano D, Tomer Y, Cunningham-Rundles C. *CTLA-4* gene exon-1 +49 A/G polymorphism: Lack of association with autoimmune disease in patients with common variable immune deficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2007; 27(1):95-100.
- 153) Schubert D, Bode C, Kenefeck R, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with *CTLA4* mutations. *Nature Medicine* 2014; 20(12):1410-1416.
- 154) Sic H, Speletas M, Cornacchione V, et al. An activating Janus Kinase-3 mutation is associated with Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent Immune Dysregulation Syndrome. *Frontiers in Immunology* 2017; 8(December 15):1-14 (article 1824, doi: 10.3389/fimmu).
- 155) Τσιούμα Γ. Ανίχνευση μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες, σελ:37-42. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 2017.
- 156) Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, et al. *TNFRSF13B/TACI* alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *Journal of Clinical Immunology* 2011; 31: 550-559.
- 157) Παρσοπούλου Φ. Πολυμορφισμοί των *CD40* και *CTLA4* στις Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες, σελ:62-69. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 2015.
- 158) Speletas M, Salzer U, Florou Z et al. Heterozygous alterations of *TNFRSF13B/TACI* in Tonsillar Hypertrophy and Sarcoidosis. *Clinical and Developmental Immunology*, Volume 2013, Article ID: 532437.
- 159) Salzer U, Birmelin J, Baccheli C et al. Sequence analysis of *TNFRSF13b*, encoding TACI, in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Immunology* 2007; 27: 372-377.
- 160) Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C et al. Clinical associations of biallelic and monoallelic *TNFRSF13B* variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes. *Journal of Immunology Research*, Volume 2016, Article ID: 8390536.
- 161) Lopez-Mejias R, del Pozo N, Fernandez-Aguero M et al. Role of polymorphisms in the *TNFRSF13B (TACI)* gene in Spanish patients with immunoglobulin A deficiency. *Tissue Antigens* 2009; 74: 42-45.

- 162) Freiberg T, Ravcukova B, Grodecka L et al. Sequence variants of the *TNFRSF13B* gene in Czech CVID and IgAD patients in the context of other populations. *Human Immunology* 2012; 73: 1147-1154.
- 163) Karaca NE, Severcam EU, Cuvencu B et al. *TNFRSF13B (TACI)* alterations in Turkish patients with Common Variable Immunodeficiency and IgA Deficiency. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2018; 10: 192-195.
- 164) Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejun MB et al. *TACI* mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; 131: 468-476.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Article

TACI Mutations in Primary Antibody Deficiencies: A Nationwide Study in Greece

Ioannis Kakkas ¹, Gerasimina Tsinti ², Fani Kalala ³, Evangelia Farmaki ⁴ , Alexandra Kourakli ⁵, Androniki Kapousouzi ², Maria Dimou ⁶ , Vassiliki Kalaitzidou ⁷, Eirini Sevdali ², Athanasia-Marina Peristeri ², Georgia Tsiouma ⁸, Peristera Patiou ⁵, Eleni Papadimitriou ⁴, Theodoros P. Vassilakopoulos ⁹ , Panayiotis Panayiotidis ⁶, Anna Kioumi ⁷, Argiris Symeonidis ⁵  and Matthaïos Speletas ^{2,*} 

- ¹ Immunology and Histocompatibility Department, “Evangelismos” General Hospital, 106 76 Athens, Greece; ioankakkas@gmail.com
- ² Department of Immunology & Histocompatibility, Faculty of Medicine, University of Thessaly, 415 00 Larissa, Greece; biomintsi@gmail.com (G.T.); nikikapousouzi@gmail.com (A.K.); esevdali@hotmail.gr (E.S.); nancy.p12@hotmail.com (A.-M.P.)
- ³ Hematology Department, Henry Dunant Hospital, 115 26 Athens, Greece; fanikalala@hotmail.com
- ⁴ Pediatric Immunology and Rheumatology Referral Center, First Department of Pediatrics, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece; farmakg@auth.gr (E.F.); e.papadimitriu@gmail.com (E.P.)
- ⁵ Department of Internal Medicine, Hematology Division, Medical School—University Hospital, University of Patras, 265 04 Patras, Greece; akourakli@hotmail.com (A.K.); peripatiou@yahoo.gr (P.P.); argiris.symeonidis@yahoo.gr (A.S.)
- ⁶ Hematology Section, First Department of Propedeutic Internal Medicine, “Laikon” General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 157 72 Athens, Greece; msdimou@gmail.com (M.D.); ppanayi@med.uoa.gr (P.P.)
- ⁷ Department of Hematology, Papageorgiou General Hospital, 564 29 Thessaloniki, Greece; kalaitzidou_b@yahoo.gr (V.K.); annakioumi@gmail.com (A.K.)
- ⁸ ENT Department, “Achilloupolion” General Hospital of Volos, 382 21 Volos, Greece; gtsiouma@yahoo.gr
- ⁹ Department of Haematology and Bone Marrow Transplantation, “Laikon” General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 157 72 Athens, Greece; theopvass@hotmail.com
- * Correspondence: maspel@med.uth.gr; Tel.: +30-241-350-2173; Fax: +30-241-068-5687



Citation: Kakkas, I.; Tsinti, G.; Kalala, F.; Farmaki, E.; Kourakli, A.; Kapousouzi, A.; Dimou, M.; Kalaitzidou, V.; Sevdali, E.; Peristeri, A.-M.; et al. TACI Mutations in Primary Antibody Deficiencies: A Nationwide Study in Greece. *Medicina* **2021**, *57*, 827. <https://doi.org/10.3390/medicina57080827>

Academic Editor: Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

Received: 24 June 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 16 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Background and objectives:* Monoallelic (heterozygous) or biallelic (homozygous or compound heterozygous) TACI mutations have been reported as the most common genetic defects in patients with common variable immunodeficiency (CVID), which is the most common clinically significant primary immunodeficiency in humans. The aim of our study was to evaluate the prevalence and any correlations of TACI defects in Greek patients with primary antibody deficiencies. *Materials and Methods:* 117 patients (male/female: 53/64) with CVID (110) and a combined IgA and IgG subclass deficiency (7) with a CVID-like clinical phenotype were enrolled in the study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and the molecular analysis of the TACI gene was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) and sequencing of all 5 exons, including exon–intron boundaries. *Results:* Seventeen patients (14.5%) displayed TACI defects, four (23.5%) carried combined heterozygous mutations and 13 (76.5%) carried single heterozygous mutations. The most frequently detected mutation was C104R (58.8%), followed by I87N (23.5%) and A181E (11.8%), while R20C, C62Y, P151L, K188M and E236X mutations were present in only one patient each. Patients with TACI defects were more frequently male ($p = 0.011$) and displayed a benign lymphoproliferation (splenomegaly and lymph node enlargement, $p = 0.047$ and $p = 0.002$, respectively), had a history of tonsillectomy ($p = 0.015$) and adenoidectomy ($p = 0.031$) and more frequently exhibited autoimmune cytopenias ($p = 0.046$). *Conclusions:* Considering that accumulating evidence suggests several CVID patients have a complex rather than a monogenic inheritance, our data further support the notion that TACI mutations, particularly as monoallelic defects, should be primarily considered as susceptibility co-factors and/or modifiers of primary antibody deficiencies.

Keywords: TACI; CVID; autoimmune cytopenias; benign lymphoproliferation

1. Introduction

Primary antibody deficiencies (PAD) represent the most common types of primary immunodeficiencies in humans [1]. Among them, common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent symptomatic disorder worldwide, with an estimated prevalence of approximately 1:25,000 in the general population [1–3]. In fact, CVID represents a heterogeneous group of diseases with common clinical and laboratory findings, including hypogammaglobulinemia (IgG in all, IgA in 70–80% and IgM in approximately 50% of affected patients), weak or absent responses against polysaccharide (mainly) and protein antigens and usually very low isotype-switched memory B cell counts in the periphery [2,3]. The range of CVID clinical manifestations is broad, with infections being the most common. However, affected patients display a high frequency of benign lymphoproliferation (splenomegaly, lymph node enlargement and lymph infiltrates in the gastrointestinal track), recurrent attacks of autoimmune cytopenias, granulomatous disease as well as an enhanced risk of malignancy, especially lymphomas and gastrointestinal cancer [2–4].

Until now, 14 distinct genetic defects causing CVID have been described in the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database (<https://www.omim.org>, accessed 11 January 2021). Among them, TNFRSF13B/TACI mutations represent the most common molecular defects related to the disease [5]. Interestingly, TNFRSF13B/TACI mutations have also been reported in patients with IgA deficiency (IgAD), namely the most common immunodeficiency in the Western world, with a prevalence of approximately 1 in 700 individuals [3,6]. However, most IgAD patients are asymptomatic, and only one third of them may display recurrent infections and/or autoimmunity [3,6]. There is increased evidence that patients with combined IgA and IgG subclass (IgGs) deficiencies (usually IgG2 or IgG4) are more prone to developing CVID-like manifestations [3]. In this context, we have recently reported that patients with selective IgGs deficiency (especially of IgG4) also display an increased incidence of TNFRSF13B/TACI defects [7]. Whether these defects are a predisposition for clinical manifestations in patients with combined IgA and IgGs deficiencies is still unclear.

It is worth noting that heterozygous TACI defects have also been detected in patients' relatives who displayed no disease, as well as in healthy individuals [8,9]. Moreover, by analyzing the contribution of TACI defects to CVID pathogenesis and phenotype in 564 patients, Salzer et al. demonstrated that two mutations, namely p.C104R and p.A181E, are the most common and have a more profound effect on disease phenotype [10]. Furthermore, Salzer et al. reported that the presence of TACI mutations is mainly correlated with an increased susceptibility to splenomegaly and autoimmunity in CVID [10]. However, considering that the TACI gene is very polymorphic, the incidence and the clinical significance of its alterations may be different in other ethnic groups.

In this context, the aim of our study was to clarify the prevalence of TACI defects in Greek PAD patients, particularly those with CVID and combined IgA and IGs deficiency, in order to evaluate any potential correlations with their clinical phenotype.

2. Materials and Methods

2.1. Patients Characteristics

One-hundred and seventeen (117) patients (male/female: 53/64) with PAD from 109 families were enrolled in the study. The majority of patients (110, 94.0%) fulfilled the diagnostic criteria of CVID (low levels of serum IgG, IgA and/or IgM greater than two standard deviations from the normal mean, complete absence or poor response to polysaccharide vaccines and an exclusion of other defined causes of hypogammaglobulinemia), and seven patients (6.0%) exhibited combined IgA and IgGs deficiencies with CVID-like clinical manifestations. All patients of the latter group displayed IgA and IgG4 deficiencies, two of them also had an IgG2 deficiency, two had an IgG1 deficiency and one had an IgG3 deficiency.

The median age of patients at the time of diagnosis was 38 years (range: 4–70) and at the time of analysis was 44 years (range: 15–76). The most common clinical manifestation

(108 patients, 93.2%) was infection (mainly respiratory), while 60 patients (51.3%) had splenomegaly, 47 (40.2%) lymphadenopathy, 26 (22.2%) hepatomegaly and 29 patients (24.7%) displayed various autoimmune cytopenias (autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenia or Evans syndrome). Additionally, 11 patients (9.4%) exhibited a granulomatous disease (located on lymph nodes, spleen or skin), 35 (29.9%) had a history of atopy (commonly in antibiotic drugs), 16 (13.7%) had a history of tonsillectomy and nine (7.6%) a history of adenoidectomy. A splenectomy was performed in 13 patients (11.1%) for diagnostic (4, 30.8%) or therapeutic purposes (hypersplenism, resistant autoimmune manifestations, spontaneous rupture) (9, 69.2%). Twenty-two patients (18.8%) developed different types of neoplasia, including lymphomas (10), acute lymphoblastic leukemia (2), breast cancer (3), gastric cancer (2), colon cancer (1), uterus cancer (2), cervical cancer (1), thyroid cancer (1) and fibrosarcoma (1). Interestingly, three patients with lymphoma relapsed with another distinct type (a patient who initially developed Burkitt lymphoma relapsed with Hodgkin disease, a second one who was initially diagnosed with marginal zone lymphoma, relapsed with diffuse large B cell lymphoma, and a third patient who initially had developed Hodgkin disease relapsed with diffuse large B cell lymphoma) and another patient who initially had developed cervical cancer, progressed to gastric cancer 13 years later. At the time of analysis, 104 patients (88.9%) were subjected to immunoglobulin replacement treatment (intravenous, subcutaneous or facilitated subcutaneous); among the 13 remaining, one patient with CVID refused treatment, two patients with combined IgA and IgGs deficiency were receiving prophylactic antibiotic treatment, and 10 were still at the baseline phase of their investigation. An overview of patient characteristics is presented in Table 1.

Written informed consent was obtained from each individual or an accompanying relative, in the case of patients from whom consent was not legally applicable (e.g., children). The study was approved by the ethical committee of the University Hospital of Larissa (17831/18-4-2018) and the ethical committee of the Faculty of Medicine, University of Thessaly (10/12-2-2019) and was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration.

2.2. Molecular Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd., Crawley, UK), according to manufacturer's instructions. Afterward, a PCR amplification of all five exons (including exon–intron boundaries) of the TACI gene was performed as described [7].

2.3. Statistical Analysis

Quantitative variables are presented with mean and standard deviation (SD). Qualitative variables are presented with absolute and relative frequencies. Variables were first tested for normality with the Kolmogorov–Smirnov test. If the normality assumption was satisfied for the comparison of means between two groups, Student's t-test was used. For the comparisons of the proportions chi-square and Fisher's exact tests with Yates correction were computed. A series of stepwise multiple logistic regression analyses (p for removal was set at 0.10 and p for entry was set at 0.05) were conducted to investigate whether TACI mutations were independently associated with specific outcomes. Adjusted odds ratios with 95% confidence intervals for TACI mutation were computed from the results of the logistic regression analyses. All p values reported are two-tailed. Statistical significance was set at 0.05 and analyses were conducted using SPSS statistical software (version 23.0).

Table 1. An overview of demographic and clinical characteristics of the patients of the study.

	Total	CVID	Combined IgAD & IgGsD
No	117	110	7
Sex (male/female)	53/64	48/62	5/2
Age at analysis (mean ± SD)	44.1 ± 15.9	44.8 ± 15.7	32.0 ± 13.9
Age at diagnosis (mean ± SD)	36.0 ± 15.6	36.4 ± 15.6	28.4 ± 14.2
Age at disease onset (mean ± SD)	24.7 ± 15.4	25.6 ± 15.3	11.1 ± 10.7
Lymphoproliferation (no, %)	70 (59.8)	67 (60.1)	3 (42.9)
Splenomegaly (no, %)	60 (51.3)	57 (51.2)	3 (42.9)
Lymphadenopathy (no, %)	47 (40.2)	45 (40.9)	2 (28.6)
Intestine infiltrates (no, %)	10 (8.5)	9 (8.2)	1 (14.3)
Hepatomegaly (no, %)	26 (22.2)	25 (25.0)	1 (14.3)
Infections (no, %)	109 (93.2)	102 (92.7)	7 (100.0)
Upper respiratory (no, %)	98 (83.8)	92 (83.6)	6 (85.7)
Lower respiratory (no, %)	73 (62.4)	70 (63.6)	3 (42.9)
Gastrointestinal (no, %)	28 (23.9)	27 (24.5)	1 (14.3)
Urinary (no, %)	29 (24.8)	29 (26.4)	0 (0)
Others ^ (no, %)	27 (23.1)	27 (24.5)	0 (0)
Bronchiectasis (no, %)	27 (23.1)	26 (23.6)	1 (14.3)
Granulomatous disease (no, %)	11 (9.4)	10 (9.1)	1 (14.3)
Autoimmune manifestations (no, %)	67 (57.3)	61 (55.5)	6 (85.7)
Thyroid disease (no, %)	27 (23.1)	24 (21.8)	3 (42.9)
AHA and/or ATP and/or Evans syndrome (no, %)	29 (24.8)	26 (23.6)	3 (42.9)
Others # (no, %)	25 (21.4)	22 (20.0)	3 (42.9)
Atopy (no, %)	34 (29.1)	33 (30.0)	1 (14.3)
Splenectomy (no, %)	13 (11.1)	13 (11.8)	0 (0)
Adenoidectomy (no, %)	9 (7.7)	7 (6.4)	2 (28.6)
Tonsillectomy (no, %)	16 (13.7)	13 (11.8)	3 (42.3)
Neoplasia (no, %)	22 (18.8)	22 (20.0)	0 (0)
Other complications * (no, %)	10 (8.5)	10 (9.1)	0 (0)
Under replacement treatment (no, %)	105 (89.7)	100 (90.9)	5 (71.4)

Abbreviations: AHA, autoimmune hemolytic anemia; ATP, autoimmune thrombocytopenic purpura; CVID, Common Variable Immunodeficiency; SD, standard deviation. ^ They include skin infections, peritonitis, sepsis or meningitis. # They include psoriasis, vitiligo, pernicious anemia, myelitis, multiple sclerosis, Raynaud syndrome, lupus erythematosus, primary biliary cirrhosis. * They include nodular hyperplasia of the liver, cirrhosis and hypersplenism, portal vein thrombosis, malabsorption, spleen rupture, renal insufficiency.

3. Results

3.1. Prevalence of TACI Mutations in the Patients of the Study

Seventeen patients (14.5%) displayed TACI pathogenic defects, including 15 out of 110 patients with CVID (13.6%) and two out of seven patients with combined IgAD and IgGsD (28.6%). None of them carried a homozygous defect; four patients (23.5%) carried combined heterozygous mutations and 12 (76.5%) single heterozygous TACI mutations (Table 2). The most frequently detected mutation was the C104R (rs34557412) which was present in 10 patients (58.8%), followed by the I87N allele (rs72553877) present in four patients (23.5%) and by the A181E allele (rs72553883) present in two patients (11.8%). The following mutated alleles were present in only one patient: R20C (rs200013015), C62Y (rs1410473109), P151L (rs200037919), K188M (rs74811083) and E236X (rs201021960). In addition, the C014R defect was present in all four combined heterozygous mutations and the A181E in two of them.

Considering the common polymorphisms of the TACI gene (intronic, silent and missense mutations), the most commonly detected in our cohort was the silent mutation rs8072293 (p.T27=, allele frequency 68.8%), followed by the intronic polymorphism rs2274892 (g.24625A>C, allele frequency 43.2%), the silent mutation rs11078355 (p.S277=, allele frequency 41.0%), the intronic polymorphisms rs11652843 (g.33402T>G, allele frequency 31.6%) and rs11652811 (g.33482T>C, allele frequency 31.6%), the silent mutation

rs35062843 (p.97P=, allele frequency 4.3%) and the missense mutations (polymorphisms) rs56063729 (p.V220A, allele frequency 3.0%) and rs34562254 (p.P251L, allele frequency 10.7%). Finally, the distribution of exonic and intronic polymorphisms was similar in those patients with or without the TACI rare defects, except for the silent mutation rs11078355 (p.S227=), which was expressed less frequently in patients with TACI defects (Table 2).

Table 2. TACI defects, exonic and intronic polymorphisms in the patients of the study.

	TACI defects			<i>p</i>
	Total	No	Yes	
	117 pts	100 pts	17 pts	
	No (%)	No (%)	No (%)	
A. CVID causative/modifier mutations				
Homozygous	0 (0.0)		0 (0.0)	
Combined heterozygous	4 (3.4)		4 (23.5)	
Heterozygous	13 (11.1)		13 (76.5)	
rs34557412(p.C104R)	10 (8.5)		10 (58.8)	
rs72553883 (p.A181E)	2 (1.7)		2 (11.8)	
rs200013015 (R20C)	1 (0.9)		1 (5.9)	
rs1410473109 (C62Y)	1 (0.9)		1 (5.9)	
rs72553877 (p.I87N)	4 (3.4)		4 (23.5)	
rs200037919 (p.P151L)	1 (0.9)		1 (5.9)	
rs74811083 (p.K188M)	1 (0.9)		1 (5.9)	
rs201021960 (p.E236X)	1 (0.9)		1 (5.9)	
B. TACI exonic and intronic polymorphisms (No, allele frequencies %)				
rs8072293 (p.T27=)	161, 68.8	135, 67.5	26, 76.5	0.325
rs35062843 (p.97P=)	10, 4.3	10, 5.0	0, 0.0	0.365
rs56063729 (p.V220A)	7, 3.0	7, 3.5	0, 0.0	0.573
rs11078355 (p.S277=)	96, 41.0	88, 44.0	8, 23.5	0.039
rs34562254 (p.P251L)	25, 10.7	23, 11.5	2, 5.9	0.496
rs2274892 (g.24625A>C)	101, 43.2	91, 45.5	10, 29.4	0.118
rs11652843 (g.33402T>G)	74, 31.6	67, 33.5	7, 20.6	0.194
rs11652811 (g.33482T>C)	74, 31.6	67, 33.5	7, 20.6	0.194

Numbers in bold represent the significant differences.

3.2. Associations of TACI Defects with Clinical Manifestations of the Patients of the Study

As presented in detail in Table 3, males were more likely to have a TACI mutation as compared to females ($p = 0.011$). Moreover, patients with TACI molecular defects were more likely to have lymphoproliferation ($p = 0.004$), especially splenomegaly ($p = 0.047$) and lymphadenopathy ($p = 0.002$), as well as higher incidence of being subjected to tonsillectomy ($p = 0.015$) and adenoidectomy ($p = 0.031$). Interestingly, almost half of patients with TACI defects in our cohort exhibited recurrent attacks of autoimmune hematologic complications (autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenia or Evans syndrome), and the difference compared to patients with no mutations was also statistically significant (Table 3). Notably, the most prevalent TACI defect was that of C104R (6 out of 10 patients, 60%). Conversely, no significant correlations of TACI mutations with the presence and the type of infections (upper respiratory, $p = 0.865$; lower respiratory, $p = 0.254$; urinary, $p = 0.897$; gastrointestinal, $p = 0.727$; other locations including skin, CNS, etc., $p = 0.792$) were observed. Similarly, no significant correlations of TACI molecular defects with the presence of granulomatous disease and atopy, or the emergence of neoplasia were also found (Table 3).

Table 3. Association of TACI defects with clinical characteristics of the patients of the study.

Clinical Characteristics	TACI Molecular Defects		<i>p</i>
	No	Yes	
	100 pts No (%)	17 pts No (%)	
Diagnosis			0.593
CVID	95 (86.4)	15 (13.6)	
Combined IgAD and IgGsD	5 (71.4)	2 (28.6)	
Sex			0.011
Male	40 (75.5)	13 (24.5)	
Female	60 (93.7)	4 (6.3)	
Age of disease onset, mean (SD)	25.2 (15.5)	21.9 (15.1)	0.429
Age at diagnosis, mean (SD)	36.4 (15.4)	33.4 (17.1)	0.460
Lymphoproliferation	54 (54.0)	16 (94.1)	0.004
Splenomegaly	47 (47.0)	13 (76.5)	0.047
Lymphadenopathy	34 (34.0)	13 (76.5)	0.002
Intestine lymph infiltrates	9 (9.0)	1 (5.9)	0.670
Hepatomegaly	21 (21.0)	5 (29.1)	0.649
Infections	93 (93.0)	16 (94.1)	0.866
Bronchiectasis	25 (25.0)	2 (11.8)	0.376
Granulomatous disease	10 (10.0)	1 (5.9)	0.929
Autoimmune manifestations	56 (56.0)	11 (64.7)	0.685
Thyroid disease	25 (25.0)	2 (11.7)	0.376
AHA and/or ATP and/or Evans syndrome	21 (21.0)	8 (47.1)	0.046
Others *	21 (21.0)	4 (23.5)	0.814
Atopy	28 (28.0)	6 (35.3)	0.746
Splenectomy	10 (10.0)	3 (17.6)	0.610
Adenoidectomy	5 (5.0)	4 (23.5)	0.031
Tonsillectomy	10 (10.0)	6 (35.3)	0.015
Neoplasia	19 (19.0)	3 (17.6)	0.895
Other complications	8 (8.0)	2 (11.7)	0.965

* Other autoimmune manifestations: autoimmune hepatitis, autoimmune neutropenia, eczema, lupus, myelitis, pernicious anemia, primary biliary cirrhosis, psoriasis, Raynaud syndrome, vasculitis, vitiligo. Numbers in bold represent the significant differences.

Following the significant association of TACI pathogenic defects with benign lymphoproliferation (splenomegaly, lymphadenopathy), history of adenoidectomy and tonsillectomy as well as the presence of hematological autoimmunity in the univariate analysis (Table 3), a series of stepwise multiple logistic regression analyses were performed. These were to investigate whether the presence of TACI mutations was independently associated with the aforementioned outcomes. It was found that patients with TACI defects had 3.34 times greater odds ratio for autoimmune cytopenias (95% confidence interval [CI]: 1.15–9.72, $p = 0.027$), 13.33 times greater odds ratio for any type of lymphoproliferation (95% CI: 1.70–104.40, $p = 0.014$) and more specifically 3.59 times greater for splenomegaly (95% CI: 1.02–11.79, $p = 0.036$), 6.21 times greater for lymphadenopathy (95% CI: 1.88–20.52, $p = 0.004$), 5.84 times greater for adenoidectomy (95% CI: 1.39–4.59, $p = 0.016$) and 4.91 times greater for tonsillectomy (95% CI: 1.49–16.14, $p = 0.009$).

4. Discussion

In this study, we identified TACI mutations in 14.5% of PAD patients, and their presence was significantly associated with an increased incidence of benign lymphoproliferation (splenectomy, lymphadenectomy and medical history of tonsillectomy and/or adenoidectomy), as well as a high prevalence of autoimmune cytopenias. Thus, our results in Greek patients with PAD were rather similar to those observed in a larger study published by Salzer et al. as mentioned above [10]. Moreover, our data further support the

notion that TACI defects have a remarkable impact on autoimmunity prevalence, especially the C104R variant, in patients with CVID [11].

TACI is a receptor that binds two ligands: a proliferation inducing ligand (APRIL) and a B-cell activating factor (BAFF). It is preferentially expressed on the marginal zone and isotype-switched memory B cells and plasma cells [12]. TACI monoallelic (heterozygous) or biallelic (homozygous or compound heterozygous) defects have been reported in 5–20% of patients with CVID and IgAD in several geographic areas globally [10,13–15]. Our results clearly support this finding.

Although TACI-knockout mice did not display hypogammaglobulinemia, the absence of TACI signaling resulted in a prominent autoimmune phenotype and signs of lymphoproliferation [12,16]. Interestingly, Zhang et al. and Salzer et al. were the first to observe a higher prevalence of autoimmune cytopenias and benign lymphoproliferation in CVID patients [10,17], and our study further supports these associations. However, TACI defects have also been reported in patients with sarcoidosis and tonsillar hypertrophy [18], but not in patients with systemic lupus erythematosus or other autoimmune disorders [19]. On the other hand, although heterozygous TACI defects have been demonstrated to be pathogenic in “in vitro” studies [20], such defects have been observed in both relatives of PAD patients without overt disease and healthy individuals [7,9,18]. Therefore, considering that accumulating evidence suggests several PAD patients have a complex rather than a monogenic inheritance [5,21], the monoallelic TACI alterations should be primarily considered as susceptibility factors and/or modifiers of PAD.

In our study, we have demonstrated a high prevalence of TACI defects among Greek patients with combined IgA and IgGs deficiencies with a CVID-like phenotype. To the best of our knowledge this is the first study in the literature describing such an association. Obviously, further studies with a larger cohort of similar patients are necessary to confirm this finding.

5. Conclusions

In conclusion, our results confirmed previous studies that TACI defects are present in approximately 15% of PAD patients, and that they are associated with a benign lymphoproliferation and autoimmune cytopenias. Taking into consideration that monoallelic TACI defects are also present in non-PAD individuals, further studies analyzing a broad spectrum of causative genes are necessary in order to highlight the emergence of PAD in humans.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.; Data curation, I.K. and M.S.; Formal analysis, I.K., F.K., A.K. (Alexandra Kourakli), P.P. (Peristera Patiou), P.P. (Panayiotis Panayiotidis) and M.S.; Funding acquisition, M.S.; Investigation, G.T. (Gerasimina Tsinti), A.K. (Androniki Kapousouzi), E.S., A.-M.P. and G.T. (Georgia Tsiouma); Methodology, I.K. and M.S.; Project administration, M.S.; Resources, I.K., F.K., E.F., A.K. (Alexandra Kourakli), M.D., V.K., G.T. (Georgia Tsiouma), P.P. (Peristera Patiou), E.P., T.P.V., P.P. (Panayiotis Panayiotidis), A.K. (Anna Kioumi), A.S. and M.S.; Software, I.K. and M.S.; Supervision, M.S.; Validation, M.S.; Visualization, I.K.; Writing—original draft, I.K. and M.S.; Writing—review & editing, I.K. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by an unrestricted grant of the Hellenic Society of Hematology as well as by the standard budget provided by The Research Committee of the University of Thessaly to the Laboratory of Immunology and Histocompatibility of Medical School of the University of Thessaly.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the ethical committee of the Faculty of Medicine, University of Thessaly.

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from each individual or an accompanying relative, in the case of patients from whom consent was not legally applicable (e.g., children).

Data Availability Statement: All data being analyzed in this manuscript are available upon request to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Min, Q.; Meng, X.; Wang, J.Y. Primary antibody deficiencies. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: New York, NY, USA, 2020; Volume 1254, pp. 117–144.
2. Pescador Ruschel, M.A.; Vaqar, S. *Common Variable Immunodeficiency*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
3. Hammarström, L.; Vorechovsky, I.; Webster, D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *120*, 225–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cunningham-Rundles, C.; Bodian, C. Common variable immunodeficiency: Clinical and immunological features of 248 patients. *Clin. Immunol.* **1999**, *92*, 34–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bogaert, D.J.A.; Dullaers, M.; Lambrecht, B.N.; Vermaelen, K.Y.; De Baere, E.; Haerynck, F. Genes associated with common variable immunodeficiency: One diagnosis to rule them all? *J. Med. Genet.* **2016**, *53*, 575–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yel, L. Selective IgA Deficiency. *J. Clin. Immunol.* **2010**, *30*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Speletas, M.; Mamara, A.; Papadopoulou-Alataki, E.; Iordanakis, G.; Liadaki, K.; Bardaka, F.; Kanariou, M.; Germeris, A.E. TNFRSF13B/TACI alterations in greek patients with antibody deficiencies. *J. Clin. Immunol.* **2011**, *31*, 550–559. [[CrossRef](#)]
8. Sathkumara, H.D.; De Silva, N.R.; Handunnetti, S.; De Silva, A.D. Genetics of common variable immunodeficiency: Role of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor. *Int. J. Immunogenet.* **2015**, *42*, 239–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Martinez-Gallo, M.; Radigan, L.; Almejún, M.B.; Martínez-Pomar, N.; Matamoros, N.; Cunningham-Rundles, C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 468–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Salzer, U.; Bacchelli, C.; Buckridge, S.; Pan-Hammarström, Q.; Jennings, S.; Lougaris, V.; Bergbreiter, A.; Hagena, T.; Birmelin, J.; Plebani, A.; et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* **2009**, *113*, 1967–1976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Barroeta Seijas, A.B.; Graziani, S.; Cancrini, C.; Finocchi, A.; Ferrari, S.; Miniero, R.; Conti, F.; Zuntini, R.; Chini, L.; Chiarello, P.; et al. The impact of TACI mutations: From hypogammaglobulinemia in infancy to autoimmunity in adulthood. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2012**, *25*, 407–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Seshasayee, D.; Valdez, P.; Yan, M.; Dixit, V.M.; Tumas, D.; Grewal, I.S. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity* **2003**, *18*, 279–288. [[CrossRef](#)]
13. López-Mejías, R.; Del Pozo, N.; Fernández-Arquero, M.; Ferreira, A.; García-Rodríguez, M.C.; De La Concha, E.G.; Fontán, G.; Urcelay, E.; Martínez, A.; Núñez, C. Role of polymorphisms in the TNFRSF13B (TACI) gene in spanish patients with immunoglobulin A deficiency. *Tissue Antigens* **2009**, *74*, 42–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Freiberger, T.; Ravčuková, B.; Grodecká, L.; Pikulová, Z.; Štikarovská, D.; Pešák, S.; Kuklínek, P.; Jarkovský, J.; Salzer, U.; Litzman, J. Sequence variants of the TNFRSF13B gene in czech CVID and IgAD patients in the context of other populations. *Hum. Immunol.* **2012**, *73*, 1147–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pulvirenti, F.; Zuntini, R.; Milito, C.; Specchia, F.; Spadaro, G.; Danieli, M.G.; Pession, A.; Quinti, I.; Ferrari, S. Clinical Associations of biallelic and monoallelic TNFRSF13B variants in italian primary antibody deficiency syndromes. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 8390356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yan, M.; Wang, H.; Chan, B.; Roose-Girma, M.; Erickson, S.; Baker, T.; Tumas, D.; Grewal, I.S.; Dixit, V.M. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 638–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zhang, L.; Radigan, L.; Salzer, U.; Behrens, T.W.; Grimbacher, B.; Diaz, G.; Bussel, J.; Cunningham-Rundles, C. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: Clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *120*, 1178–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Speletas, M.; Salzer, U.; Florou, Z.; Petinaki, E.; Daniil, Z.; Bardaka, F.; Gourgoulisanis, K.I.; Skoulakis, C.; Germeris, A.E. Heterozygous alterations of TNFRSF13B/TACI in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 532437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Salzer, U.; Birmelin, J.; Bacchelli, C.; Witte, T.; Buchegger-Podbielski, U.; Buckridge, S.; Rzepka, R.; Gaspar, H.B.; Thrasher, A.J.; Schmidt, R.E.; et al. Sequence analysis of TNFRSF13b, encoding TACI, in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* **2007**, *27*, 372–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lee, J.J.; Jabara, H.H.; Garibyan, L.; Rauter, I.; Sannikova, T.; Dillon, S.R.; Bram, R.; Geha, R.S. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *126*, 1234–1241.e2. [[CrossRef](#)]
21. Sic, H.; Speletas, M.; Cornacchione, V.; Seidl, M.; Beibel, M.; Linghu, B.; Yang, F.; Sevdali, E.; Germeris, A.E.; Oakeley, E.J.; et al. An activating janus kinase-3 mutation is associated with cytotoxic t lymphocyte antigen-4-dependent immune dysregulation syndrome. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1824. [[CrossRef](#)]