



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

**Λειτουργική έκφραση και επαγωγή  
των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στην αυτοανοσία**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΝΙΚΟΛΑΟΥ Χ. ΚΥΡΙΑΚΙΔΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΥ**

**Αθήνα, 2014**



**Ευρωπαϊκή Ένωση**  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Διδακτορική Διατριβή του Νικόλαου Χ. Κυριακίδη με θέμα : «Λειτουργική έκφραση και επαγωγή των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στην αυτοανοσία».

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Ημερομηνία αίτησης εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής: 21/3/2008**

**Ημερομηνία Έναρξης Διατριβής: 16/10/2008**

**Ημερομηνία Κατάθεσης 1<sup>ης</sup> Έκθεσης Προόδου: 14/12/2009**

**Ημερομηνία Κατάθεσης 2<sup>ης</sup> Έκθεσης Προόδου: 29/03/2013**

**Ημερομηνία Κατάθεσης 3<sup>ης</sup> Έκθεσης Προόδου: 08/01/2014**

#### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

1. Επιβλέπων Μέλος ΔΕΠ : Καθηγητής Α.Γ. Τζιούφας
2. Καθηγητής Π.Γ. Βλαχογιαννόπουλος
3. Αναπληρωτής Καθηγητής Μ.Ν. Μανουσάκης

**Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 14/1/2014**

#### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

1. Ομότιμος Καθηγητής Χ.Μ. Μουτσόπουλος
2. Καθηγητής Μ. Κουτσιλιέρης
3. Καθηγητής Α.Γ. Τζιούφας
4. Καθηγητής Β. Γοργούλης
5. Καθηγητής Π.Γ. Βλαχογιαννόπουλος
6. Αναπληρωτής Καθηγητής Μ.Ν. Μανουσάκης
7. Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Κ. Καψογεώργου

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΝΙΚΟΛΑΟΥ Χ. ΚΥΡΙΑΚΙΔΗ

#### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

---

---

<b>Όνοματεπώνυμο:</b>	Νικόλαος Κυριακίδης
<b>Όνομα πατέρα:</b>	Χρήστος
<b>Όνομα μητέρας:</b>	Αναστασία
<b>Ημερομηνία γέννησης:</b>	26 Αυγούστου 1982
<b>Τόπος γέννησης:</b>	Μαρούσι Αττικής
<b>Υπηκοότητα:</b>	Ελληνική
<b>Οικογενειακή κατάσταση:</b>	Άγαμος
<b>Διεύθυνση οικίας:</b>	Αδαμοπούλου 6, Ν. Ιωνία Αττικής, Τ.Κ.: 14232
<b>Τηλέφωνο οικίας / κινητό:</b>	+30-210-2795666 / +30-6983487675
<b>Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:</b>	nickyriakidis82@yahoo.gr

#### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

---

---

<b>1997-2000:</b>	3 <sup>ο</sup> Λύκειο Ν. Ιωνίας, βαθμός απολυτηρίου: 19,4/20
<b>2000-2007:</b>	Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Βαθμός πτυχίου: «Λίαν Καλώς»

**2008-σήμερα:** Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην Ανοσολογία με θέμα: «Λειτουργική έκφραση και επαγωγή των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στην αυτοανοσία».

Υπεύθυνος: Καθηγητής Α.Γ.Τζιούφας

Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## **ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

### **Εργασιακή εμπειρία σε διδασκαλία μαθημάτων**

2003-2007: Προετοιμασία υποψηφίων Πανελλαδικών Εξετάσεων στα μαθήματα:

Βιολογία Γενικής Παιδείας, Βιολογία Κατεύθυνσης και Χημεία Κατεύθυνσης.

### **Μεταφράσεις (από την Αγγλική στην Ελληνική γλώσσα)**

1. Μετάφραση του κεφαλαίου 1 του βιβλίου "Pathophysiology, Ivan Damjanov, Saunders Elsevier" που διδάσκεται στους τριτοετείς φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου

## **ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ**

- I. 2009: "Μελέτη της επέκτασης των αυτοάνοσων αποκρίσεων μετά από ανοσοποίηση ζωικών προτύπων με τους κύριους Β κυτταρικούς επίτοπους του αυτοαντιγόνου La/SSB " με την υποστήριξη της **Ελληνικής Ρευματολογικής Εταιρίας**.



**II.** Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας - «**Ηράκλειτος II**» για την εκπόνηση διατριβής κατά τα έτη 2010-2013

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

---

- 1997:** Πτυχίο Αγγλικής γλώσσας  
Certificate of Proficiency in English,  
University of Cambridge
- 1998:** Πτυχίο Γαλλικής γλώσσας  
Certificat Pratique de Langue Française,  
Université de Paris-Sorbonne  
1<sup>er</sup> Degré

### **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

---

- 2005-2006:** Εργαστήριο Βιολογίας Φυτικού Κυττάρου, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.  
(Διευθυντής: Καθ. Βασίλειος Γαλάτης)  
*Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με τίτλο: «Μελέτη της συμμετοχής του συστήματος της ακτινομοσοίνης στη λειτουργία των στομάτων του φυτού *Vicia faba L.*».*

*(Υπεύθυνος Καθηγητής: Βασίλειος Γαλάτης)*

**2007-σήμερα:** Εργαστήριο «Μοριακής Ανοσολογίας και Ανοσοϊστοπαθολογίας» και Εργαστήριο «Ανοσοχημείας», Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Διευθυντής: Καθ. Χ.Μ. Μουτσόπουλος)

*Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής (Επιβλέπων Καθηγητής: Α.Γ. Τζιούφας)*

## **ΓΝΩΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ**

---

### **Κυτταρικές καλλιέργειες**

- Εγκαθίδρυση και μακρόχρονη καλλιέργεια μη νεοπλασματικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών από σιελογόνους αδένες ασθενών
- Καλλιέργεια νεοπλασματικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών (όπως HeLa)
- Δοκιμασίες διέγερσης των TLRs και δοκιμασίες με επίδραση με ιντερφερόνες σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές.

### **Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων**

- Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA)
- Αντίστροφη μεταγραφή RNA (Reverse Transcription PCR)
- Ποσοτική Πραγματικού-Χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT PCR)
- Ανίχνευση αντιδράσεων μεταξύ νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) και πρωτεϊνών με δοκιμασία αλλαγής της κινητικότητας κατόπιν ηλεκτροφόρησης (EMSA)

## **Πρωτεϊνική ανάλυση**

- Απομόνωση πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων ειδικών αντισωμάτων με τη χρήση στηλών ανοσοσυγγένειας
- Προετοιμασία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (προετοιμασία ολικών, πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων από ιστούς και κύτταρα)
- Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικές (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide-Gel Electrophoresis: SDS PAGE) ή μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native Electrophoresis)
- Ανοσοαποτύπωση κατά Western (χρησιμοποιώντας την ανάπτυξη χρώματος ή ενισχυμένα συστήματα χημειοφωταύγειας)
- Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών
- Χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με ανοσοενζυματικές δοκιμασίες στερεάς φάσης (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA)
- Ανάλυση της έκφρασης και εντόπισης πρωτεϊνών σε δείγματα ιστών και κυττάρων με τη χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού

## **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

### **Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια**

1. **EULAR 2009-ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY (Copenhagen, June 10-13, 2009).** J.G. Routsias, **N. Kyriakidis**, M. Latreille, A.G. Tzioufas Pathophysiology Department, Medical School, National University of Athens,

Athens, Greece. Antibodies targeting the RNA Recognition Motif (RRM) of La/SSB cross-bind also the RNP autoantigen. Ann Rheum Dis 2009;68(Suppl3):373

2. **10<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME – (Brest, France, 1-3 October 2009).** J Routsias, N Kyriakidis, R. Clancy, J. Buyon, A.G. Tzioufas. Long-term evaluation of idiotypic and anti-idiotypic response to the major epitope of La/SSB autoantigen in pregnant women at high risk for a child with congenital heart block (CHB) enrolled in the preventive IVIg therapy for CHB study. (Oral presentation).

3. **73<sup>rd</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Philadelphia, Pennsylvania, October 17-21, 2009).** JG. Routsias, Nikolaos Kyriakidis, Carolina Llanos, Robert M. Clancy, Jill Buyon and Athanasios G. Tzioufas. Longitudinal Evaluation of Idiotypic and Anti-Idiotypic Response to the Major Epitope of La/SSB Autoantigen in Mothers Enrolled in the PITCH (Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block) Study. Arthritis & Rheumatism 60 Suppl 10 :1586  
**(ACR Notable Poster Award)**

4. **73<sup>rd</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Philadelphia, Pennsylvania, October 17-21, 2009).** Routsias John G., Kyriakidis Nikolaos, Latreille Michael, Moutsopoulos Haralampos M., Tzioufas Athanasios G. RNA Recognition Motif (RRM) of La/SSB: The Bridge for Inter-

Particle Spreading of Autoimmune Response to RNP. Arthritis & Rheumatism 60 Suppl  
10 :684

5. **30<sup>nd</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH (Bamberg, Germany, March 4-7, 2010).** J G Routsias, N C Kyriakidis, S Kotsakis, A G Tzioufas. Structural insights into antigenicity of Ro/La ribonucleoprotein: SLE related epitopes are cryptic, masked by hY1 RNA. Ann Rheum Dis 2010;69 Suppl2:A3

6. **EULAR-2010: ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY (Rome, Italy, June 2010).** N.C. Kyriakidis, S. Kotsakis, A.G. Tzioufas, J.G. Routsias. Antigenicity of Ro/La ribonucleoprotein in SLE is related to cryptic epitopes, masked by hY1 RNA. [OP0064] (Oral presentation).

7. **74<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Atlanta, Georgia, November 6–11, 2010).** John G. Routsias<sup>1</sup>, Nikos C. Kyriakidis, Stathis Kotsakis, Athanasios G. Tzioufas. Structure and Antigenicity of the Ro/La RNP Particle hY1 RNA Differentiates the Recognition of Epitopes in Systemic Lupus Erythematosus and Sjogren's Syndrome. Arthritis Rheum 62: 10 (suppl), S913, 2010.

8. **11<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Athens, Greece, 28 September-1 October 2011).** EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, NC Kyriakidis, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Cellular microRNAs

(miRNAs) and Sjögren's Syndrome: Candidate Regulators of Autoimmune Response and Autoantigen Expression. Abstract P042.

9. **11<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Athens, Greece, 28 September-1 October 2011).** NC Kyriakidis, VC Gourzi, EK Kapsogeorgou, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Effect of TLR3 stimulation on the expression of the Ro/SSA AND La/SSB mRNA molecules by Salivary Gland Epithelial Cells (SGEC). Abstract P043.

10. **11<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Athens, Greece, 28 September-1 October 2011).** VC Gourzi, NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Association between the microRNAs (miRNAs) targeting Ro/SSA and La/SSB autoantigens and autoantigen mRNA expression. Abstract P044.

11. **5<sup>th</sup> TURKISH-GREEK RHEUMATOLOGY DAYS (Belek, Antalya, Turkey, October, 14-16, 2011).** VC Gourzi, NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's syndrome: Candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression (Oral presentation).

12. **75<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Chicago, Illinois, November 4-9, 2011).** EK Kapsogeorgou, VC

Gourzi, NC Kyriakidis, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's Syndrome: Candidate Regulators of Autoimmune Response and Autoantigen Expression. (Abstract 490). Arthritis Rheum 63: 10 (suppl), S188, 2011.

13. **32<sup>nd</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH (Stockholm, Sweden, February 23-25, 2012).** VC Gourzi, EK Kapsogeorgou, NC Kyriakidis, A Morva, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. MicroRNA (miRNA) molecules as candidate regulators of Ro/SSA and La/SSB mRNA expression in Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2012;71:Suppl 1 A87.

14. **32<sup>nd</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH (Stockholm, Sweden, February 23-25, 2012).** NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. TLR3-mediated induction of Ro/SSA and La/SSB mRNA expression in salivary gland epithelial cells. Ann Rheum Dis 2012;71:Suppl 1 A87.

15. **76<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Washington, DC, November 9-14, 2012).** VC Gourzi, EK Kapsogeorgou, NC Kyriakidis, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Expression of Micornas (miRNAs) Predicted to Target Ro/SSA and La/SSB Autoantigens in Sjogren's Syndrome (SS). (Abstract 507). Arthritis Rheum 64: 10 (suppl), S222, 2012.

16. **76<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Washington, DC, November 9-14, 2012).** NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. TLR3-Signaling Induces the expression of Ro/SSA and La/SSB autoantigens in Salivary Gland Epithelial Cells (SGECs). (Abstract 508). Arthritis Rheum 64: 10 (suppl), S223, 2012.

17. **EULAR 2013-ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY (Madrid, Spain, June 12-15, 2013).** N. C. Kyriakidis, E. K. Kapsogeorgou, V. C. Gourzi, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Athens, Greece. Ro52/TRIM21 expression in Salivary Gland Epithelial Cells (SGECS) is upregulated by TLR3-signaling. [OP0083] (Oral presentation).

18. **12<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Kyoto, Japan, 9-12 October 2013).** N. C. Kyriakidis, E. K. Kapsogeorgou, V. C. Gourzi, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Athens, Greece. TLR3-signaling mediates the upregulation and nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 in Salivary Gland Epithelial Cells (SGEC). Abstract: P1-08 (page 136). (poster) (Young Travel Award).

**Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια**

1. **36<sup>ο</sup> ΕΤΗΣΙΟ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ (Αθήνα, 4-8 Μαΐου 2010)**

**N. Κυριακίδης**, Σ. Κωτσάκης, Α. Τζιούφας, Ι. Ρούτσιας. Η ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΟΠΡΩΤΕΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ro/La RNP ΑΠΟΚΑΛΥΠΤΕΙ ΟΤΙ ΟΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΙ ΚΑΘΟΡΙΣΤΕΣ ΣΤΟΝ



ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΕΙΝΑΙ ΚΡΥΠΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΚΑΛΥΠΤΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΗΥ1 RNA. Τόμος Περίληψεων: σελ. 10, Αριθμός Ανακοίνωσης: 30. (Προφορική ανακοίνωση)

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

### Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά μετά από κρίση:

1. Routsias JG, **Kyriakidis N**, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. **Mol Med. 2010 Jan-Feb;16(1-2):19-26.**
2. Routsias JG, **Kyriakidis NC**, Friedman DM, Llanos C, Clancy R, Moutsopoulos HM, Buyon J, Tzioufas AG. Association of the idiotype:antiidiotype antibody ratio with the efficacy of intravenous immunoglobulin treatment for the prevention of recurrent autoimmune-associated congenital heart block. **Arthritis Rheum. 2011 Sep;63(9):2783-9.**
3. **Kyriakidis NC**, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms. **J Autoimmun. 2013 [Invited Review, submitted].**
4. **Kyriakidis NC**<sup>1</sup>, Kapsogeorgou EK<sup>1</sup>, Gourzi VC, Baltatzis G, Tzioufas AG. TLR3-signaling increases the synthesis and nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 autoantigen in Salivary Gland Epithelial Cells (SGEC), via the Type I interferon pathway. **Manuscript In preparation**<sup>1</sup>: Authors contributed equally to the study.

## **ΧΡΗΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ**

---

- Microsoft Office 2003-2007-2010 (Word, Excel, Powerpoint)
- Paint Shop Pro
- Adobe Photoshop CS6
- Molsoft L.L.C.: ICM-Pro (software for biochemical analysis and 3D depiction of protein molecules),
- GraphPad PRISM 5.0 (statistical analysis software)
- SPSS 16 (statistical analysis software)

## **Curriculum vitae**

### **Nikolaos C. Kyriakidis**

Date & Place of Birth: August 26, 1982 - Athens, Greece

Nationality: Greek

Marital Status: Single

Home Address: Adamopoulou 6,  
N. Ionia, 14232  
Athens, Greece

Tel. +30-210-2795666 (home)  
-7462680 (work)

Mobile phone: +30-6983487675

E-mail: nickyriakidis82@yahoo.gr

### **Education-Academic Education**

1997-2000: 3<sup>rd</sup> High School, N. Ionia, Athens, Greece.

Graduation Degree: 19.4/20

2000-2007: Diploma in Biology Bachelor of Science, Biology Department, National and  
Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Graduation Degree: "Very Good"

Thesis: «Study of the participation of the actin-myosin system in the functions of stomata of the plant *Vicia faba* L.». Supervisor: Professor Basil Galatis.

2008-present: Ph.D. Candidate in Immunology, Department of Pathophysiology, Medical School, University of Athens, Greece.

Thesis: «Functional expression and induction of intracellular autoantigens in autoimmunity».

Supervisor: Professor Athanasios G. Tzioufas, MD.

### **Working Experience**

2003-2007: Private classes in Biology for accessorial preparation of High School and University Candidates students and university exams preparation of High School and University Candidates

### **Scholarships-Awards**

2009: "Study of autoimmune response spreading after immunization with major B-cell epitopes of La/SSB autoantigen" supported by the Greek Rheumatological Society.

2009: **ACR Notable Poster Award:** JG. Routsias, Nikolaos Kyriakidis, Carolina Llanos, Robert M. Clancy, Jill Buyon and Athanasios G. Tzioufas. Longitudinal Evaluation of Idiotypic and Anti-Idiotypic Response to the Major Epitope of La/SSB Autoantigen in Mothers Enrolled in the PITCH (Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block) Study. *Arthritis & Rheumatism* 60 Suppl 10 :1586. 73rd ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Philadelphia, Pennsylvania, October 17-21, 2009).

2010-2013: «**Heracleitus II**» - Research Funding Program. Investing in knowledge society through the European Social Fund. Co-financed by the European Union (European

Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF).

2013: **Young Travel Award** in the 12<sup>th</sup> International Symposium on Sjogren’s syndrome (Kyoto, Japan, 9-12 October 2013).

### **Experimental skills**

#### **Cell culture**

- Development and long-term cultivation of non-neoplastic epithelial cell lines established from human labial salivary gland
- Cultivation of neoplastic epithelial cell lines (such as HeLa)
- TLR and Interferon stimulation assays on epithelial cell lines.

#### **Nucleic acid analysis**

- Nucleic acid (DNA, RNA) isolation
- Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)
- Quantitative Real-Time polymerase chain reaction (qRT-PCR)
- Interactions between nucleic acids (DNA or RNA) and proteins by electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

#### **Protein analysis**

- Purification of proteins including specific Antibodies using Immunoaffinity Columns/  
Isolation of certain proteins, including specific antibodies, by affinity chromatography/HPLC

- Protein extraction (preparation of total, nuclear and cytoplasmic extracts from tissues and cells)
- Protein identification and characterization by Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide-Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) or Native Electrophoresis
- Western blotting and immunoblotting (using color development or enhanced chemiluminescence systems)
- Protein immunoprecipitation
- Protein quantification and characterization by Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)
- Analysis of protein expression and localization in tissues and cell samples by immunohistochemical and immunofluorescence techniques

#### **Presentations at National Scientific Meetings**

##### **1. 36<sup>th</sup> Annual Hellenic Medical Congress (Athens, May 4-8, 2010)**

**N. Kyriakidis**, S. Kotsakis, A. Tzioufas, J. Routsias. Structural study of Ro/La RNP complex antigenicity reveals that the antigenic determinants in Systemic Lupus Erythematosus are cryptic and are masked by hY1 RNA. Abstract Book: page 10, Abstract ID: 30. (*Oral presentation*)

#### **Presentations at International Scientific Meetings**

##### **1. EULAR 2009-ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY**

**(Copenhagen, June 10-13, 2009).** J.G. Routsias, **N. Kyriakidis**, M. Latreille, A.G. Tzioufas Pathophysiology Department, Medical School, National University of Athens,

Athens, Greece. Antibodies targeting the RNA Recognition Motif (RRM) of La/SSB cross-bind also the RNP autoantigen. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl3):373 (poster)

2. **10<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME – (Brest, France, 1-3 October 2009).** J Routsias, N Kyriakidis, R. Clancy, J. Buyon, A.G. Tzioufas. Long-term evaluation of idiotypic and anti-idiopathic response to the major epitope of La/SSB autoantigen in pregnant women at high risk for a child with congenital heart block (CHB) enrolled in the preventive IVIg therapy for CHB study. (Oral presentation).

3. **73<sup>rd</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Philadelphia, Pennsylvania, October 17-21, 2009).** JG. Routsias, Nikolaos Kyriakidis, Carolina Llanos, Robert M. Clancy, Jill Buyon and Athanasios G. Tzioufas. Longitudinal Evaluation of Idiotypic and Anti-Idiotypic Response to the Major Epitope of La/SSB Autoantigen in Mothers Enrolled in the PITCH (Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block) Study. *Arthritis & Rheumatism* 60 Suppl 10 :1586 (poster) (ACR Notable Poster Award)

4. **73<sup>rd</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Philadelphia, Pennsylvania, October 17-21, 2009).** Routsias John G., Kyriakidis Nikolaos, Latreille Michael, Moutsopoulos Haralampos M., Tzioufas Athanasios G. RNA Recognition Motif (RRM) of La/SSB: The Bridge for Inter-Particle Spreading of Autoimmune Response to RNP. *Arthritis & Rheumatism* 60 Suppl 10 :684 (poster)

5. **30<sup>nd</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH (Bamberg, Germany, March 4-7, 2010).** J G Routsias, N C Kyriakidis, S Kotsakis, A G Tzioufas. Structural insights into antigenicity of Ro/La ribonucleoprotein: SLE related epitopes are cryptic, masked by hY1 RNA. Ann Rheum Dis 2010;69 Suppl2:A3 (poster)

6. **EULAR-2010: ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY (Rome, Italy, June 2010).** N.C. Kyriakidis, S. Kotsakis, A.G. Tzioufas, J.G. Routsias. Antigenicity of Ro/La ribonucleoprotein in SLE is related to cryptic epitopes, masked by hY1 RNA. [OP0064] (Oral presentation).

7. **74<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Atlanta, Georgia, November 6–11, 2010).** John G. Routsias1, Nikos C. Kyriakidis, Stathis Kotsakis, Athanasios G. Tzioufas. Structure and Antigenicity of the Ro/La RNP Particle hY1 RNA Differentiates the Recognition of Epitopes in Systemic Lupus Erythematosus and Sjogren's Syndrome. Arthritis Rheum 62: 10 (suppl), S913, 2010. (poster)

8. **11<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Athens, Greece, 28 September-1 October 2011).** EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, NC Kyriakidis, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's Syndrome: Candidate Regulators of Autoimmune Response and Autoantigen Expression. Abstract P042. (poster)



9. **11<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Athens, Greece, 28 September-1 October 2011).** NC Kyriakidis, VC Gourzi, EK Kapsogeorgou, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Effect of TLR3 stimulation on the expression of the Ro/SSA AND La/SSB mRNA molecules by Salivary Gland Epithelial Cells (SGEC). Abstract P043. (poster)

10. **11<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Athens, Greece, 28 September-1 October 2011).** VC Gourzi, NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Association between the microRNAs (miRNAs) targeting Ro/SSA and La/SSB autoantigens and autoantigen mRNA expression. Abstract P044. (poster)

11. **5<sup>th</sup> TURKISH-GREEK RHEUMATOLOGY DAYS (Belek, Antalya, Turkey, October, 14-16, 2011).** VC Gourzi, NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's syndrome: Candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression (Oral presentation).

12. **75<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Chicago, Illinois, November 4-9, 2011).** EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, NC Kyriakidis, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's Syndrome: Candidate Regulators of Autoimmune

Response and Autoantigen Expression. (Abstract 490). Arthritis Rheum 63: 10 (suppl), S188, 2011. (poster)

13. **32<sup>nd</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH (Stockholm, Sweden, February 23-25, 2012).** VC Gourzi, EK Kapsogeorgou, **NC Kyriakidis**, A Morva, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. MicroRNA (miRNA) molecules as candidate regulators of Ro/SSA and La/SSB mRNA expression in Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2012;71:Suppl 1 A87. (poster)

14. **32<sup>nd</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH (Stockholm, Sweden, February 23-25, 2012).** **NC Kyriakidis**, EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. TLR3-mediated induction of Ro/SSA and La/SSB mRNA expression in salivary gland epithelial cells. Ann Rheum Dis 2012;71:Suppl 1 A87. (poster)

15. **76<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Washington, DC, November 9-14, 2012).** VC Gourzi, EK Kapsogeorgou, **NC Kyriakidis**, MN Manoussakis, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. Expression of Micrornas (miRNAs) Predicted to Target Ro/SSA and La/SSB Autoantigens in Sjogren's Syndrome (SS). (Abstract 507). Arthritis Rheum 64: 10 (suppl), S222, 2012. (poster)

16. **76<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (Washington, DC, November 9-14, 2012).** NC Kyriakidis, EK Kapsogeorgou, VC Gourzi, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas. TLR3-Signaling Induces the expression of Ro/SSA and La/SSB autoantigens in Salivary Gland Epithelial Cells (SGECs). (Abstract 508). Arthritis Rheum 64: 10 (suppl), S223, 2012. (poster)

17. **EULAR 2013-ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY (Madrid, Spain, June 12-15, 2013).** N. C. Kyriakidis, E. K. Kapsogeorgou, V. C. Gourzi, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Athens, Greece. Ro52/TRIM21 expression in Salivary Gland Epithelial Cells (SGECS) is upregulated by TLR3-signaling. [OP0083] (Oral presentation).

18. **12<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SJÖGREN'S SYNDROME (Kyoto, Japan, 9-12 October 2013).** N. C. Kyriakidis, E. K. Kapsogeorgou, V. C. Gourzi, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Athens, Greece. TLR3-signaling mediates the upregulation and nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 in Salivary Gland Epithelial Cells (SGEC). Abstract: P1-08 (page 136). (poster) (Young Travel Award).

### **Publications**

1. Routsias JG, Kyriakidis N, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med.* 2010 Jan-Feb;16(1-2):19-26.

2. Routsias JG, **Kyriakidis NC**, Friedman DM, Llanos C, Clancy R, Moutsopoulos HM, Buyon J, Tzioufas AG. Association of the idiotype:antiidiotype antibody ratio with the efficacy of intravenous immunoglobulin treatment for the prevention of recurrent autoimmune-associated congenital heart block. **Arthritis Rheum.** 2011 Sep;63(9):2783-9.
3. **Kyriakidis NC**, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms. **J Autoimmun.** 2013 [Invited Review, in press].
4. **Kyriakidis NC**<sup>1</sup>, Kapsogeorgou EK<sup>1</sup>, Gourzi VC, Baltatzis G, Tzioufas AG. TLR3 stimulation promotes Ro52/TRIM21 synthesis and nuclear redistribution in salivary gland epithelial cells, partially via Type I interferon pathway. **Submitted for publication, J Autoimmun**<sup>1</sup>: Authors contributed equally to the study.
5. Gourzi VC<sup>1</sup>, Kapsogeorgou EK<sup>1</sup>, **Kyriakidis NC**, Tzioufas AG. Expression of miRNAs that potentially regulate Ro/SSA and La/SSB mRNAs in Sjögren's Syndrome. **Manuscript in preparation**<sup>1</sup>: Authors contributed equally to the study.

### **Computing experience**

- Microsoft Office 2003-2007-2010 (Word, Excel, Powerpoint)
- Paint Shop Pro
- Adobe Photoshop CS6
- Molsoft L.L.C.: ICM-Pro (software for biochemical analysis and 3D depiction of protein molecules),
- GraphPad PRISM 5.0 (statistical analysis software)
- SPSS 16 (statistical analysis software)

## **Languages**

**1997:** English:  
Certificate of Proficiency in English,  
University of Cambridge

**1998:** French:  
Certificat Pratique de Langue Française,  
Université de Paris-Sorbonne  
1<sup>er</sup> Degré

## **ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ**

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΝΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΟ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ ΕΣΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΑΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

**ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ**  
**(απόδοση κειμένου στη νεοελληνική)**

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΠΟΥ ΒΑΖΩ ΜΑΡΤΥΡΕΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ. ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΝΩ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΦΕΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΟΤΙ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΜΙΣΘΟ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ. ΟΤΙ ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΤΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ, ΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΥΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΣΕ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΧΟΥΝ ΣΥΝΔΕΘΕΙ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΜΕ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ, ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ, ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ ΑΛΛΟ. ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΡΟΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΠΙΩΣΔΗΠΟΤΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΤΡΑ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΞΑΣΚΗΜΕΝΟΥΣ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΣ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ ΣΕ ΣΩΜΑΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Η ΔΟΥΛΩΝ. ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΠΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΣΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η πορεία που καταλήγει στην περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ξεκίνησε στο γραφείο του Επιβλέποντός μου Καθηγητού της Ιατρικής Σχολής κ. Α.Γ. Τζιούφα, ο οποίος έπειτα από αίτημά μου μου ανέθεσε τη διεκπεραίωσή της. Στον Καθηγητή κ. Α.Γ. Τζιούφα οφείλω θερμές ευχαριστίες τόσο για την επιλογή του στο πρόσωπό μου όσο και για την επίβλεψη της παρούσας εργασίας, την πρακτική και ηθική στήριξη, την ανάπτυξη κριτικής σκέψης και τη μετάδοση πολύτιμων γνώσεων από την πολύχρονη πείρα του ως διακεκριμένου επιστήμονα και ιατρού. Η μαθητεία στο πλευρό του με βοήθησε τα μέγιστα στην ανάπτυξη επιστημονικού τρόπου σκέψης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. Χ.Μ. Μουτσόπουλο, Διευθυντή της Κλινικής και του Εργαστηρίου της Παθολογικής Φυσιολογίας τον καιρό έναρξης της διατριβής μου. Ο Ομότιμος Καθηγητής κ. Χ.Μ. Μουτσόπουλος συμμετείχε σε όλες τις εργασίες της παρούσας διατριβής. Η συμβολή του ήταν θεμελιώδους σημασίας, καθώς μας μετέδιδε ιδέες για την ορθότερη προσέγγιση των ερωτημάτων που μας απασχολούσαν, συμμετείχε στην ερμηνεία, στη συζήτηση και στη συγγραφή των πειραματικών δεδομένων και έγειρε επιπλέον ερωτήματα που προέκυπταν από τα πειραματικά αποτελέσματα.

Θερμότατες ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής κ. Ευσταθία Κ. Καψογεώργου για την καθημερινή ενασχόληση με την ερμηνεία και συζήτηση των πειραματικών δεδομένων, την αμέριστη βοήθεια στο σχεδιασμό και, συχνά, και στην εκτέλεση ορισμένων πειραμάτων. Ιδιαίτερη σημασία για τον γράφοντα είχαν οι επιστημονικού περιεχομένου εκτενείς συζητήσεις μας, μέσα από τις οποίες εμπλουτίστηκαν οι γνώσεις μου τόσο σε επίπεδο θεωρητικών επιστημονικών γνώσεων όσο και σε επίπεδο αφομοίωσης εργαστηριακών τεχνικών.

Εξίσου ευχαριστώ τον Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής κ. Ιωάννη Γ. Ρούτσια, ο οποίος ήταν καθημερινά δίπλα μου στο πρώτο μισό της εργασίας μου, με καθοδηγούσε ερευνητικά και τεχνικά, ενώ βοήθησε σημαντικά και στην αρχική μου εξοικείωση με τις εργαστηριακές τεχνικές.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. Π.Γ. Βλαχογιαννόπουλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή της



Ιατρικής Σχολής κ. Μ.Ν. Μανουσάκη, για τις κριτικές παρατηρήσεις τους και την πολύτιμη συζήτηση κατά την πορεία της παρούσας διατριβής. Με αυτοκριτική διάθεση, μάλιστα, επισημαίνω ότι μετανιώνω για το γεγονός ότι δεν τους συμβουλευτήκα ακόμα συχνότερα κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Σημαντική βοήθεια με τις γνώσεις του για τη συνεστιακή μικροσκοπία προσέφερε ο κ. Γεώργιος Μπαλτατζής, Βιολόγος και χειριστής του συνεστιακού μικροσκοπίου στο Εργαστήριο Παθολογοανατομίας της Ιατρικής Σχολής, τον οποίο ευχαριστώ πολύ.

Κεφαλαιώδους σημασίας για τη συνύπαρξη τόσες πολλές ώρες στον ίδιο χώρο είναι η ύπαρξη συνεργατών μεταξύ των οποίων υπάρχει αλληλοσεβασμός. Θεωρώ εαυτόν ευτυχή που συνυπήρξα στο Εργαστήριο της Παθολογικής Φυσιολογίας με συναδέλφους οι οποίοι πέραν του υψηλού επιστημονικού τους επιπέδου είχαν και εξαιρετικό χαρακτήρα. Λυπάμαι που το περιορισμένο του χώρου δεν μου επιτρέπει να αναφέρω τον καθένα ξεχωριστά, είμαι όμως ευγνώμων γιατί πέραν της συνεργασίας μας, με τιμούν με τη φιλία τους.

Τέλος, ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένειά μου για την κατανόηση και κυρίως την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Η κάθε μου σκέψη είναι μαζί τους και το ισχυρότερο κίνητρο για να περατώσω την παρούσα εργασία με αξιοπρέπεια είναι η θέληση να σταθώ δίπλα τους αντάξιος, πρώτα σαν άνθρωπος κι έπειτα σαν επιστήμονας.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II- Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. Για το λόγο αυτό ευχαριστώ όλους τους εμπλεκόμενους φορείς που συνέβαλαν σε αυτό.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<b>Σελίδα</b>
Βιογραφικό σημείωμα .....	3
Βιογραφικό σημείωμα (στην Αγγλική) .....	15
Ιπποκράτειος όρκος (κείμενο στα αρχαία ελληνικά) .....	26
Ιπποκράτειος όρκος (απόδοση κειμένου στη νεοελληνική γλώσσα) .....	27
Ευχαριστίες .....	28
Περιεχόμενα .....	30
Περίληψη .....	33
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>39</b>
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	40
ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ .....	42
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΧΗΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ .....	47
Κεντρική ανοχή .....	48
Περιφερική ανοχή .....	49
Αυτοανοσία .....	49
ΤΑ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ Ro/La ΚΑΙ U1snRNP .....	54
Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των αυτοαντιγόνων που συγκροτούν το Ro/La ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο .....	54
Αυτοαντιγόνο Ro52/TRIM21 .....	55
Αυτοαντιγόνο Ro60/TROVE2 .....	62
Αυτοαντιγόνο La/SSB .....	64
Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των αυτοαντιγόνων που συγκροτούν το σύμπλοκο U1snRNP .....	67
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ .....	69
Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) .....	70

Σύνδρομο Νεογνικού Λύκου (ΣΝΛ) .....	75
Δίκτυο ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών (Ιδ/αντί-Ιδ) αντισωμάτων .....	78
Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη (ΕΦΑΣ) και Τρόποι Δράσης .....	81
Σύνδρομο Sjögren .....	83
• Αιτιοπαθογένεια .....	87
• Η ιστοπαθολογική βλάβη και ο ρόλος του επιθηλίου στην έναρξη και διαίωσιση των αυτοάνοσων αποκρίσεων .....	88
• Οι προσβεβλημένοι σιελογόνοι αδένες είναι περιοχές παραγωγής αυτοαντισωμάτων .....	92
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	95
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ</b> .....	99
Διεξοδική ανασκόπηση των αυτοαντισωμάτων στο πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren. Κλινικοί φαινοτύποι και ρυθμιστικοί μηχανισμοί (Άρθρο ανασκόπησης-μετάφραση στην Ελληνική) .....	115
A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms (Review article) .....	148
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	177
<b>ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ</b> .....	178
Μοτίβο Αναγνώρισης RNA (MAR) της La/SSB: Η Γέφυρα για Διασωματιακή Επέκταση της Αυτοάνοσης Απόκρισης στο U1-RNP .....	178
Συσχέτιση της αναλογίας των ιδιοτυπικών:αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων με την αποτελεσματικότητα της ενδοφλέβιας θεραπείας με ανοσοσφαιρίνη για την πρόληψη της επανεμφάνισης του συνδεδόμενου με αυτοανοσία συγγενή κολποκοιλιακού αποκλεισμού .....	202
Η σηματοδότηση μέσω του TLR3 αυξάνει τη σύνθεση και προκαλεί πυρηνική ανακατανομή του αυτοαντιγόνου Ro52/TRIM21 σε Επιθηλιακά Κύτταρα Σιελογόνων Αδένων (ΕΚΣΑ), μέσω του μονοπατιού των Ιντερφερονών Τύπου I .....	223

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

RNA Recognition Motif (RRM) of La/SSB: The Bridge for  
Interparticle Spreading of Autoimmune Response to U1-RNP

Association of the Idiotype:Antiidiotype Antibody Ratio  
With the Efficacy of Intravenous Immunoglobulin Treatment for the  
Prevention of Recurrent Autoimmune-Associated Congenital Heart Block

TLR3 stimulation promotes Ro52/TRIM21 synthesis and nuclear  
redistribution in salivary gland epithelial cells, partially via Type I interferon  
pathway

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη και επέκταση των αυτοάνοσων χυμικών αποκρίσεων θεωρείται ειδική, αντιγόνο-εξαρτώμενη και ακολουθώντας τους ίδιους κανόνες που διέπουν σε μεγάλο βαθμό και τις κανονικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα αυτοαντιγόνα παρουσιάζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο αποκρίνεται με χυμικές αποκρίσεις έναντι συγκεκριμένων επιτόπων. Ακολουθεί η ενδο- και δια-μοριακή επέκταση επιτόπων και η γενίκευση των αποκρίσεων. Η ανάπτυξη αυτοάνοσων αποκρίσεων έναντι αντιγόνων που ανευρίσκονται σε διαφορετικά πολυμοριακά σωματίδια (particles) υπονοεί ότι η επέκταση επιτόπων εκτείνεται και σε διασωματιακό επίπεδο. Οι μηχανισμοί ρύθμισης της αυτοάνοσης ανοσολογικής απόκρισης δεν είναι ακόμη ταυτοποιημένοι. Η ρύθμιση αυτή, είναι δυνατόν να γίνεται σε τρία διαφορετικά επίπεδα. Στο επίπεδο του τελικού προϊόντος, δηλαδή τα αυτοαντισώματα, είναι δυνατόν να αναπτύσσονται αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα, τα οποία αναστέλουν τη δράση των αυτοαντισωμάτων. Στο επίπεδο ενεργοποίησης του Β-λεμφοκυττάρου και της διαμοριακής επέκτασης της αυτοάνοσης απόκρισης, και τέλος στην αρχική φάση όπου η αύξηση της έκφρασης των αυτοαντιγόνων στα κύτταρα-στόχους των αυτοάνοσων αποκρίσεων και η ελευθέρωσή τους μέσω κυτταρικών σωματίδιων ή αποπτωτικού θανάτου θεωρείται ότι συμμετέχουν στην αποκάλυψη των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων και στην δημιουργία αυτοάνοσων αποκρίσεων. Στην παρούσα εργασία μελετάται η ύπαρξη μηχανισμών διασωματιακής επέκτασης επιτόπων, η δημιουργία και λειτουργική ικανότητα Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων και η ρύθμιση της έκφρασης των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB μετά από ενεργοποίηση υποδοχέων της φυσικής ανοσίας (TLR3) σε νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ), το σύνδρομο νεογνικού λύκου (ΣΝΛ) και το σύνδρομο Sjögren, αντίστοιχα.

Τα κύρια αυτοαντιγόνα έναντι των οποίων στρέφονται οι χυμικές αυτοάνοσες αποκρίσεις στον ΣΕΛ είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA, ενώ αρκετοί από τους χαρτογραφημένους επίτοπους των πρωτεϊνών αυτών εδράζονται σε συντηρημένες περιοχές δέσμευσης RNA. Το γεγονός αυτό μας ώθησε να διερευνήσουμε την πιθανότητα αυτές οι αλληλουχίες να μεσολαβούν στη διασωματιακή επέκταση των επιτόπων, δηλαδή στη «μεταπήδηση» των χυμικών αποκρίσεων από το ένα σωματίο στο άλλο. Για το σκοπό αυτό ανοσοποιήσαμε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας με ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στον επίτοπο 145–164 της La/SSB, αλληλουχία που ανήκει στο περιοχή δέσμευσης RNA της πρωτεΐνης και διερευνήσαμε την ανάπτυξη ενεργότητας έναντι του συμπλόκου U1-snRNP. Επιπλέον, εξετάστηκαν οροί 20 ασθενών που πάσχουν από ΣΕΛ κι έχουν αντί-U1-snRNP αντισώματα και οροί 26 ασθενών που πάσχουν από πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren κι έχουν αντί-La/SSB αντισώματα για την ενεργότητά τους ενάντια στον κύριο επίτοπο της La/SSB (πεπτίδιο 349–364), στο αντιγόνο U1-snRNP και τον επίτοπο 145–164 της La/SSB. Τέλος, απομονώθηκαν με στήλες ανοσοσυγγένειας ειδικά αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 από επιλεγμένους ορούς της La/SSB. Βρέθηκε ότι μετά την ανοσοποίηση των ζώων με το πεπτίδιο 145-164 αναπτύχθηκαν ειδικά αντισώματα τα οποία στόχευαν το αυτοαντιγόνο La/SSB (στις εβδομάδες 3–7 μετά την ανοσοποίηση), το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση (εβδομάδες 3–27 μετά την ανοσοποίηση), και το αυτοαντιγόνο RNP (εβδομάδες 7–20 μετά την ανοσοποίηση). Τα κεκαθαρμένα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 αναγνώριζαν τη La/SSB καθώς και ένα αυτοαντιγόνο μοριακού βάρους 70-kD σε ανοσοαποτύπωση κατά Western και επέδειξαν σημαντική ενεργότητα σε αντί-U1-snRNP ανοσοενζυματική ανίχνευση στερεάς φάσης. Επιπλέον, δείχθηκε ότι η εξάλειψη των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145-164 με τη χρήση στήλης

ανοσοσυγγένειας οδηγεί στην εξάλειψη της αντί-U1-RNP δραστικότητας των ορών από ανοσοποιημένα κουνέλια, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους ανθρώπινους ορούς. Ακόμη, το πεπτίδιο 145–164 αναγνωριζόταν σε μεγαλύτερο βαθμό από ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα που εμφάνιζαν αντί-snRNP δραστικότητα σε σύγκριση με αντί-La/SSB-θετικούς ορούς. Αντίθετα, το πεπτίδιο 349–364 της La/SSB αναγνωριζόταν σχεδόν αποκλειστικά από ορούς με αντί-La/SSB ενεργότητα. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η περιοχή RRM της La/SSB μπορεί να πυροδοτήσει διασωματιακή διαφοροποίηση της απόκρισης των Β-κυττάρων στο αυτοαντιγόνο U1-RNP-70 μέσω μοριακής μίμησης.

Η ύπαρξη παθογενετικών αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων στον ορό της εγκύου μητέρας και η μεταφορά τους μέσω του πλακούντα στο έμβρυο είναι τα γεγονότα-αίτια που εκκινούν τις διεργασίες που οδηγούν στην ανάπτυξη νεογνικού λύκου στα έμβρυα. Η πιο σημαντική και βαρεία κλινική εκδήλωση του συνδρόμου νεογνικού λύκου είναι ο συγγενής κολποκοιλιακός αποκλεισμός (ΣΚΑ). Όπως είχε δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη από το εργαστήριό μας, η ύπαρξη αντί-Id αντισωμάτων για τα αντισώματα που στρέφονται έναντι της La/SSB και η δημιουργία ενός δικτύου Id–αντί-Id αντισωμάτων μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά για το έμβρυο παρεμποδίζοντας τα παθογενετικά μητρικά αυτοαντισώματα. Δύο πρόσφατες μελέτες διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα της προληπτικής χορήγησης χαμηλών δόσεων ΕΦΑΣ σε εγκύους οι οποίες έχουν ιστορικό κύησης παιδιού με ΣΚΑ, ώστε να προληφθεί η επανεμφάνιση ΣΚΑ στα κυοφορούμενα έμβρυα. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αξιολογήθηκε η επίδραση της θεραπείας με ΕΦΑΣ στο δίκτυο Id/αντί-Id αντισωμάτων έναντι της La/SSB. Διαπιστώθηκε ότι παρά το γεγονός ότι η χορήγηση ΕΦΑΣ σε δόσεις στις οποίες χρησιμοποιείται σαν θεραπεία αντικατάστασης αντισωμάτων δεν εμποδίζει

την επανεμφάνιση ΣΚΑ σε επόμενες κήσεις, επιδρά και αλλάζει σημαντικά το δίκτυο των Ιδ/αντί-Ιδ παθογενετικών αυτοαντισωμάτων, κατά τρόπο που αυξάνεται η αντί-Ιδ απόκριση εναντίον τους. Επιπλέον, δείχθηκε ότι σε εγκυμοσύνες που κατέληξαν στη γέννηση υγιούς παιδιού, η αναλογία των Ιδ:αντί-Ιδ αντί-La/SSB αντισώματων στους ορούς των κυοφορούντων μητέρων ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την αναλογία που παρατηρήθηκε σε εγκύους που γέννησαν παιδί με νεογνικό λύκο.

Το τελευταίο μέρος της παρούσας διατριβής, μελετά τη ρύθμιση της παραγωγής των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB που αποτελούν τα πρωτεϊνικά συστατικά του Ro/La ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου, στα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με σύνδρομο Sjögren. Οι μηχανισμοί που μεσολαβούν την παρουσίαση των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η υψηλή έκφραση και η αδόκιμη παρουσίαση στο ανοσοποιητικό σύστημα θεωρείται ότι συμμετέχουν. Τα αυτοαντιγόνα του Ro/La ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου εμφανίζουν αυξημένη επιθηλιακή έκφραση στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, γεγονός που θεωρείται ότι συμμετέχει στην δημιουργία των αυτοάνοσων αποκρίσεων έναντι αυτών. Από την άλλη πλευρά, τα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων (ΕΚΣΑ) κατέχουν κεντρικό ρόλο στην έναρξη, τη διαίωσιση και τη γενικότερη ενορχήστρωση των αυτοάνοσων διεργασιών. Ανάμεσα σε πλήθος ανοσοδραστικών μορίων, τα ΕΚΣΑ εκφράζουν υψηλά επίπεδα λειτουργικών TLR3 στην κυτταρική τους μεμβράνη, ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης διαφόρων ανοσοδραστικών μορίων, κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων ιντερφερονών και στον αποπτωτικό θάνατο των ΕΚΣΑ μέσω ανοικίας. Οι ιντερφερόνες είναι γνωστοί επαγωγείς της έκφρασης του αυτοαντιγόνου Ro52/TRIM21, ενώ είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη αυτή με τη δράση της ως E3-λιγάσης



της ουβικιτίνης ρυθμίζει αρνητικά τη μεσολαβούμενη από τον TLR3 φλεγμονή. Τα δεδομένα αυτά αποτέλεσαν το έναυσμα για τη μελέτη της επίδρασης της σηματοδότησης μέσω του TLR3 στην έκφραση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB από τα ΕΚΣΑ. Σαν επιθηλιακή σειρά-μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η νεοπλασματική κυτταρική σειρά HeLa. Η επίδραση με το ανάλογο του συνδέτη του TLR3, polyI:C, αλλά όχι με το συνδέτη του TLR4, LPS, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του Ro52/TRIM21-mRNA από τα ΕΚΣΑ σε δύο βήματα, ένα αρχικό στις 6 ώρες, όπου παρατηρούνταν μια 12-πλάσια αύξηση της έκφρασης και ένα δεύτερο στις 24-48 ώρες επίδρασης με 2.5-πλάσια αύξηση. Επιπλέον, η επίδραση με polyI:C επήγαγε μία 2-πλάσια αύξηση της έκφρασης των mRNA των μορίων Ro60/TROVE2 και La/SSB στις 48 ώρες επίδρασης. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Ωστόσο, η επίδραση με polyI:C, αλλά όχι LPS, οδήγησε στην ανακατανομή της εντόπισης της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα των ΕΚΣΑ στις 48-72 ώρες μετά την επίδραση. Έτσι, ενώ στα ανεπηρέαστα ΕΚΣΑ και μέχρι τις 24 ώρες επίδρασης με polyI:C, η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 εντοπιζόνταν σε μια ή δύο δομές του πυρήνα που προσομοιάζαν σε πυρηνίσκο, στις 48-72 ώρες επίδρασης ανακατανέμονταν σε πολλαπλές αδρές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα. Η απάντηση των ΕΚΣΑ που προέρχονταν από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και μάρτυρες στην επίδραση με polyI:C ήταν παρόμοια, ενώ το τελευταίο δεν βρέθηκε να επηρεάζει την έκφραση των μελετούμενων αυτοαντιγόνων στα κύτταρα HeLa. Το γεγονός ότι στα ΕΚΣΑ η δεύτερη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 και η ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα είναι αρκετά καθυστερημένα φαινόμενα, υπονοεί ότι μεσολαβούνται από κάποιον παράγοντα που ενεργοποιείται από

το μονοπάτι σηματοδότησης του TLR3. Με βάση το γεγονός ότι η σηματοδότηση μέσω του TLR3 καταλήγει κυρίως στην παραγωγή ιντερφερονών (κυρίως τύπου I), μελετήθηκε ο ρόλος των IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  και IFN $\gamma$  στη διαμεσολαβούμενη από το polyI:C αύξηση της έκφρασης του mRNA και ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα. Αποδείχθηκε ότι τα καθυστερημένα αυτά φαινόμενα μεσολαβούνται κυρίως από την παραγωγή IFN $\beta$ , όπως καταμαρτυρείται από την έκκριση της αντίστοιχης ιντερφερόνης από τα ΕΚΣΑ και από ειδικά πειράματα αναστολής. Φαίνεται λοιπόν, ότι η σηματοδότηση μέσω του TLR3 ρυθμίζει την έκφραση των αυτοαντιγόνων από τα ΕΚΣΑ και ότι τα μονοπάτια της φυσικής ανοσίας μπορεί να εμπλέκονται στην παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα. Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία, συνεισφέρει στην κατανόηση των πολυεπίπεδων ρυθμιστικών μηχανισμών παραγωγής αυτοαντισωμάτων κατά των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, που αφορούν στην επαγωγή σύνθεσης αυτοαντιγόνων, μέσω υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, την επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης, και τέλος τη ρύθμιση των αυτοαντισωμάτων μέσω του ιδιοτυπικού/αντί-ιδιοτυπικού δικτύου. Τα ευρήματα που για πρώτη φορά περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία με τη διατριβή αυτή είναι:

1. Η εξήγηση της διασωματιακής επέκτασης επιτόπων
2. Η ρυθμιστική δράση της ΕΦΑΣ στο ιδιοτυπικό/αντί-ιδιοτυπικό δίκτυο παθογενετικών αντισωμάτων, και
3. Η δια της σηματοδότησης μέσω του TLR3, αύξηση της σύνθεσης ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων.

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

αντί-dsDNA		αυτοαντισώματα έναντι διπλής έλικας DNA
ΑΠΚ		αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
ΒΚΥ		B κυτταρικός υποδοχέας
ΕΚΣΑ		επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων
ΕΣΑ		επικουρικοί σιελογόνοι αδένες
ΕΦΑΣ		Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη
Ιδ/αντί-Ιδ αντισώματα		ιδιοτυπικά/αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα
ΜΝΣΙ		μεικτή νόσος του συνδετικού ιστού
ΜΣΙ		Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας
ΠΑΕ		Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα
ΣΕΛ		Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
ΣΚΑ		Συγγενής Κολποκοιλιακός Αποκλεισμός
ΣΝΛ		Σύνδρομο Νεογνικού Λύκου
ΤΚΥ		T κυτταρικός υποδοχέας
ACA	anti-centromere antibodies	αυτοαντισώματα έναντι κεντρομεριδίου
AMA	anti-mitochondrial antibodies	αυτοαντισώματα έναντι μιτοχονδρίων
CCP	cyclic citrullinated peptides	κυκλικά κιτρουλλινοποιημένα πεπτιδία
Fc	Fragment crystalline	το σταθερό τμήμα των ανοσοσφαιρινών
Fc <sub>γ</sub> Rn	Neonatal Fc <sub>γ</sub> receptor	νεογνικός υποδοχέας του σταθερού τμήματος των γ- ανοσοσφαιρινών
hYRNAs	human cYtoplasmic RNAs	ανθρώπινα κυτταροπλασματικά RNA
IFN	interferon	ιντερφερόνη
IgG	Immunoglobulin G	ανοσοσφαιρίνη τάξεως γ

IL	interleukin	Ιντερλευκίνη
IRES	internal ribosomal entry sites	εσωτερικές θέσεις εισόδου στα ριβοσώματα
IRFs	interferon regulatory factors	παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση ιντερφερονών
MALT	Mucosa associated lymphoma tissues	λεμφικοί ιστοί που σχετίζονται με τους βλεννογόνους
miRNAs	microRNAs	μικροRNAs
mRNA	messenger RNA	αγγελιαφόρο RNA
nm	nanometres	νανόμετρα ( $10^{-9}$ μέτρα)
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα
PRRs	pattern recognition receptors	υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων μακρομορίων
rRNA	ribosomal RNA	ριβοσωμικό RNA
RRM	RNA Recognition Motif	μοτίβο αναγνώρισης RNA
TGF-β	transforming growth factor β	αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β
TLRs	Toll-like Receptors	υποδοχείς που προσομοιάζουν με Toll

## Φυσική και επίκτητη ανοσία

Η βασική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Διακρίνεται σε μη-ειδική ή έμφυτη ανοσία (innate immunity) και ειδική ή επίκτητη ανοσίας (adaptive immunity). Η **φυσική ανοσία** αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Απαρτίζεται από: α) το δέρμα, το οποίο αποτελεί ένα φυσικό φραγμό για την είσοδο μικροοργανισμών, β) τις αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται στο δέρμα και τους βλεννογόνους, γ) τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, τα οποία επιγραμματικά είναι: τα κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα), τα δενδριτικά κύτταρα, τα σιτευτικά κύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς, δ) τις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες που ξεκινούν τους μηχανισμούς της φλεγμονής (πρωτεΐνες του συμπληρώματος, αντιμικροβιακά πεπτίδια, πρωτεΐνες οξείας φάσης), ε) τις κυτταροκίνες, οι οποίες ρυθμίζουν και συντονίζουν τη δράση των κυττάρων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας. Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν ομάδες παθογόνων ειδικά μέσω υποδοχέων που ονομάζονται «υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων» (pattern recognition receptors: PRRs). Αυτοί αναγνωρίζουν συγκεκριμένες δομές, τα «μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα» (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs), που είναι κοινά μεταξύ ομάδων μικροοργανισμών και αφορούν πρωτεϊνικές δομές, νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και λιπιδικές δομές. Οι PRRs εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων ή/και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της φυσικής ανοσίας και μόλις δεσμεύσουν τα αντίστοιχα PAMPs ενεργοποιούν μηχανισμούς μεταγωγής σήματος που προάγουν την αντιμικροβιακή και προφλεγμονώδη δράση των κυττάρων στα οποία εκφράζονται. Μία εκ των σημαντικότερων ομάδων PRRs είναι οι υποδοχείς που προσομοιάζουν με Toll (Toll-like receptors: TLRs). Η οικογένεια των μορίων TLR



που διαμεσολαβείται από αντισώματα. Η ειδική ανοσία χαρακτηρίζεται από την ειδικότητα για καθένα παθογόνο, και όχι για ομάδες παθογόνων όπως η φυσική ανοσία. Επίσης, διακρίνεται από το γεγονός ότι μπορεί να «θυμάται» τα παθογόνα που έχει συναντήσει και έτσι να αντιδρά γρηγορότερα σε δεύτερη επαφή, έχει δηλαδή μνήμη. Οι ειδοποιές διαφορές της ειδικής ανοσίας σε σχέση με τη φυσική είναι: α) η μεγάλη ειδικότητα των αποκρίσεων και β) η μνήμη, η ιδιότητα δηλαδή των κυττάρων της ειδικής ανοσίας να «θυμούνται» και να αποκρίνονται πολύ γρήγορα και πολύ πιο ισχυρά όταν ξανασυναντήσουν έναν παθογόνο μικροοργανισμό με τον οποίο είχαν έρθει προηγούμενα σε επαφή.

Τα **αντισώματα** παράγονται από ενεργοποιημένα και τελικά διαφοροποιημένα B κύτταρα (πλασματοκύτταρα) τα οποία έχουν συναντήσει το ειδικό για τους B κυτταρικούς υποδοχείς (BKY) τους αντιγόνο. Ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες είναι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσούς. Συγκεκριμένα, κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσούς και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσούς. Ο τύπος της βαριάς αλυσού καθορίζει την τάξη ή ισότυπο του αντισώματος και τις λειτουργικές του ιδιότητες. Οι ελαφρές αλυσού είναι διαφορετικές ακόμα και σε αντισώματα της ίδιας τάξης και είναι αυτές που καθορίζουν την ειδικότητα δέσμευσης του αντιγόνου. Στον άνθρωπο υπάρχουν πέντε διαφορετικές τάξεις αντισωμάτων, οι IgG, IgA, IgM, IgD και IgE που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, το φορτίο, την αμινοξική λειτουργία και την περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες. Η IgG είναι η κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη στον ανθρώπινο ορό, καθώς αντιπροσωπεύει το 70-75% της ολικής ανοσοσφαιρίνης, ενώ η IgM το 10% αυτής και η IgA το 15-20%. Η τελευταία αποτελεί την κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη των οροβλενωδών εκκρίσεων. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν ειδικά



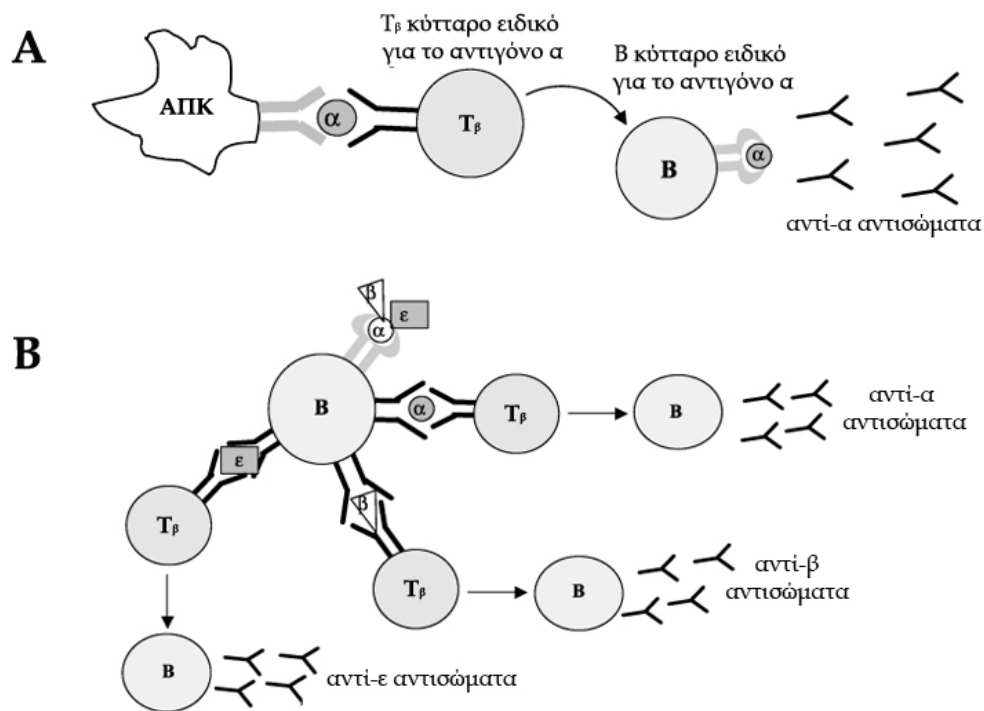
μικρού μεγέθους αλληλουχίες πρωτεϊνικών, λιπιδικών ή νουκλεϊκών μορίων. Τα μόρια αυτά ονομάζονται **αντιγόνα**, ενώ οι περιοχές αναγνώρισης από τα αντισώματα **επίτοποι** ή **αντιγονικοί καθοριστές**. Οι επίτοποι διακρίνονται ανάλογα με τη διαμόρφωση και την θέση τους στο αντιγόνο ως εξής:

α) γραμμικοί επίτοποι: αλληλουχία επάλληλων (συνεχόμενων) καταλοίπων που βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα.

β) διαμορφωτικοί επίτοποι: περιοχές που σχηματίζονται κατά την αναδίπλωση απομακρυσμένων αλληλουχιών καταλοίπων σε δευτεροταγείς, τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομές της ίδιας ή/και διαφορετικών αλυσίδων (1).

γ) κρυπτικοί επίτοποι (κρυπτότοποι): κυρίως γραμμικοί επίτοποι, οι οποίοι συνήθως βρίσκονται σε εσωτερικές δομές του αντιγόνου και υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι «ορατοί». Γίνονται προσβάσιμοι στο ανοσοποιητικό σύστημα μετά από αλλαγή της τριτοταγούς δομής του αυτοαντιγόνου η οποία συμβαίνει λόγω αποδιάταξης, κατάτμησης ή χημικής τροποποίησής του.

δ) τροποποιημένοι επίτοποι (νεοεπίτοποι): επίτοποι οι οποίοι μετατρέπονται σε ανοσογόνους μετά από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις σε ένα ή περισσότερα από τα αμινοξέα που τους απαρτίζουν. Παραδείγματα τέτοιων τροποποιήσεων είναι: η γλυκοζυλίωση καταλοίπων ασπαραγίνης, σερίνης ή θρεονίνης, η κιτρουλινοποίηση αργινών, η φωσφορυλίωση σερινών, θρεονινών ή τυροσινών και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών.



**Σχήμα 2.** Αναπαράσταση των μηχανισμών της B και T κυτταρικής επέκτασης επιτόπων. **(Α)** Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ) παρουσιάζουν πεπτίδια του εαυτού σε T βοηθητικά ( $T_{\beta}$ ) κύτταρα, τα οποία εν συνεχεία, παρέχουν βοήθεια σε αυτοδραστικά B κύτταρα. Αυτό οδηγεί σε κλωνική έκπτυξη αυτοδραστικών B κυττάρων και παραγωγή αυτοαντιγόνων. **(Β)** Τα B κύτταρα δεσμεύουν το αυτοαντιγόνο και παρουσιάζουν διαφορετικούς επιτόπους του οδηγώντας σε αύξηση της ποικιλίας των αυτοδραστικών T κυττάρων. Τελικά, τα T κύτταρα παρέχουν βοήθεια σε μία διαφορετική B κυτταρική απόκριση. Προσαρμοσμένο από Monneaux et al., *Scand J Immunol*, 2001

Κάθε αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά έναν επίτοπο, ενώ συνήθως περισσότερα από ένα αντισώματα αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο. Το τελευταίο φαινόμενο, μάλιστα, αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος, που ονομάζεται **επέκταση επιτόπων** (epitope spreading). Ο όρος αυτός πρωτοχρησιμοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 για να περιγράψει την επέκταση των ανοσολογικών αποκρίσεων από ένα συγκεκριμένο επίτοπο ενός αντιγόνου σε άλλους επιτόπους του ίδιου ή άλλων σχετιζόμενων με αυτό αντιγόνων (2). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί δύο τύποι επέκτασης επιτόπων: α) η ενδομοριακή επέκταση, κατά την οποία η ανοσολογική

απόκριση επεκτείνεται σε επιτόπους που βρίσκονται στο ίδιο αντιγονικό μόριο και β) η διαμοριακή επέκταση, η οποία περιλαμβάνει επέκταση σε διαφορετικά αντιγόνα που συνδέονται φυσικά στο ίδιο αντιγονικό σύμπλοκο (Σχήμα 2). Η επέκταση επιτόπων είναι ιδιαίτερως σημαντική για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, γιατί συμβάλλει στη διαιώνιση, ενίσχυση και αποτελεσματικότητα των ανοσολογικών αποκρίσεων. Η αναγνώριση πολλαπλών επιτόπων επιτρέπει την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση ενός παθογόνου μέσω της δέσμευσης πολλών διαφορετικών ανοσοσφαιρινών σε αυτό που στη συνέχεια οδηγούν στην εκκαθάριση του μέσω της δέσμευσης των ανοσοσυμπλεγμάτων από τους Fc υποδοχείς ανοσοσφαιρινών και την ενεργοποίηση του μηχανισμού του συμπληρώματος. Επίσης, αποτρέπει την διαφυγή παθογόνων μέσω συχνών μεταλλάξεων και επιτρέπει παράλληλα την αναγνώριση και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν παρόμοιους επιτόπους. Τέλος, οδηγεί σε ταχύτερες αποκρίσεις μέσω των κυττάρων μνήμης της επίκτητης ανοσίας σε δευτερογενείς αποκρίσεις, ενώ αυξάνεται και η πιθανότητα διατήρησης της ανοσολογικής μνήμης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα [συννοούνται στο (3)].

## **Μηχανισμοί Ανοσολογικής Ανοχής και Αυτοανοσία**

Το ανοσοποιητικό σύστημα διακρίνεται από την ικανότητα να αναγνωρίζει τα συστατικά του εαυτού του από τα ξένα και να αποκρίνεται ειδικά στα «ξένα» παθογόνα. Η ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αγνοεί τα συστατικά του ίδιου, ονομάζεται «ανοχή» (tolerance) και αποτελεί μια εκ των θεμελιωδών ιδιοτήτων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή είναι ιδιαίτερως σημαντική για την προστασία του οργανισμού από την αναίτια πυροδότηση ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του ίδιου. Η

«ανοσολογική ανοχή» είναι μια διαρκής και ενεργός διαδικασία, η οποία διακρίνεται, ανάλογα με το που επιτελείται, σε κεντρική και περιφερική.

### **1) Κεντρική ανοχή:**

Η κεντρική ανοχή λαμβάνει μέρος στο θύμο αδένα για τα T λεμφοκύτταρα και στο μυελό των οστών για τα B λεμφοκύτταρα. Πραγματοποιείται κυρίως με δύο μηχανισμούς:

α) την απάλειψη των «αυτοδραστικών» T ή B κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που αναγνωρίζουν με ισχυρή συγγένεια τα «συστατικά» του οργανισμού, κυρίως μέσω αποπτωτικού θανάτου.

β) τη μετάπτωση των κυττάρων που δεν αναγνωρίζουν κάποιο από τα ξένα αντιγόνα που παρουσιάζονται στο μικροπεριβάλλον σε κατάσταση μη λειτουργικής απόκρισης (ανέργεια).

Ειδικά για τα B κύτταρα η κλωνική απάλειψη πραγματοποιείται σε περίπτωση αποτυχίας επαναδιάταξης των BKY (4) ή στην περίπτωση που το αντιγόνο εκφράζεται σε υψηλή συγκέντρωση στο μυελό των οστών από την αναδιάταξη των BKY, ώστε να αλλάξει η ειδικότητα των αντισωμάτων που μπορούν να παράξουν (5) (διόρθωση των BKY, B cell receptor editing). Μολονότι, μεγάλο μέρος των αυτοδραστικών T και B κυττάρων απαλείφονται κεντρικά, ένας σημαντικός αριθμός T και B κυττάρων διαφεύγουν της κεντρικής ανοχής και κυκλοφορούν στην περιφέρεια. Τα αυτοδραστικά ανοσοκύτταρα καταστέλλονται και διατηρούνται υπό τον έλεγχο των μηχανισμών της περιφερικής ανοχής.

## 2) Περιφερική ανοχή

Η περιφερική ανοχή πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής στους ιστούς του οργανισμού και είναι συνεχής και ενεργή διαδικασία. Αυτή επιτελείται μέσω:

α) Του αποπτωτικού θανάτου ή της μετάπτωσης σε κατάσταση ανέργιας, λόγω της μη «αποτελεσματικής» ενεργοποίησης. Ενεργοποίηση των T κυττάρων απουσία συνδιεγερτικών μηνυμάτων ή των B κυττάρων απουσία ειδικών βοηθητικών T κυττάρων ή κατάλληλου ισοζυγίου κυτταροκινών, δεν μπορεί να υποστηρίξει την αποτελεσματική ενεργοποίησή τους. Έτσι, τα λεμφοκύτταρα δεν οδηγούνται σε έκπτυξη ή διαφοροποίηση, αλλά σε απόπτωση ή ανέργια.

β) Ρυθμιστικών μηχανισμών που αφορούν στη δράση ρυθμιστικών πληθυσμών T ή B λεμφοκυττάρων (ρυθμιστικά T ή B κύτταρα), και τη συνεπακόλουθη επικράτηση ρυθμιστικών κυτταροκινών, όπως TGF- $\beta$  και IL-10, στο μικροπεριβάλλον (3).

### **Αυτοανοσία:**

Όπως προαναφέρθηκε, η ανοσολογική ανοχή αποτελεί μια συνεχή και ενεργό διαδικασία, η οποία επιτελείται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Διαταραχή στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που διέπουν την αυτοανοχή, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αυτοάνοσων αποκρίσεων. Η διαταραχή αυτή μπορεί να οφείλεται σε ελαττωματική εξάλειψη των αυτοδραστικών T ή B κυττάρων στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, ανεπαρκή καταστολή της λειτουργίας των αυτοδραστικών T ή B κυττάρων στους περιφερικούς ιστούς ή/και σε συνεχή ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία δεν μπορεί να περιοριστεί αποτελεσματικά λόγω δυσλειτουργίας των ρυθμιστικών μηχανισμών (ρυθμιστικοί υποπληθυσμοί ανοσοκυττάρων, κυτταροκίνες και υποδοχείς της φυσικής και επίκτητης ανοσίας). Η ανάπτυξη

αυτοάνοσων αποκρίσεων δεν συνεπάγεται υποχρεωτικά την εκδήλωση αυτοάνοσης νόσου (autoimmune disease). Για να εκδηλωθεί αυτή θα πρέπει οι αυτοδραστικές αποκρίσεις να προκαλέσουν ιστική βλάβη η οποία τελικά θα οδηγήσει και σε λειτουργική βλάβη του ιστού.

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής και στην ανάπτυξη αυτοανοσίας δεν είναι πλήρως καθορισμένοι. Θεωρείται όμως, ότι πολλαπλοί παράγοντες συμμετέχουν. Αυτοί κατηγοριοποιούνται στους παρακάτω:

1. **Γενετικοί παράγοντες.** Αρκετά γονίδια, κυρίως αυτά που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ) (6) έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων. Επιπλέον, μεταλλάξεις (κυρίως πολυμορφισμοί, αλλά και έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων) σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια που εμπλέκονται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων, όπως συνδιεγερτικά μόρια, κυτταροκίνες ή χημειοκίνες, έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων [συνοψίζονται στο (7)]. Επιπρόσθετα, μελέτες μονοζυγωτικών διδύμων ή οικογενειών που δείχνουν αυξημένη επίπτωση των αυτοάνοσων νοσημάτων στις ομάδες αυτές, καθώς και πειραματικά γενετικά τροποποιημένα ζωικά πρότυπα, συνηγορούν στην εμπλοκή γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη αυτοανοσίας.
2. **Ορμονικοί παράγοντες.** Πλήθος δεδομένων υποστηρίζει τη συμμετοχή των ορμονών στην ανάπτυξη των αυτοάνοσων νοσημάτων. Παρατηρείται σημαντικά αυξημένη επίπτωση των αυτοάνοσων νοσημάτων στις γυναίκες, συγκριτικά με τους άνδρες, ενώ σε ζωικά πρότυπα τα οποία αναπτύσσουν αυτόματα αυτοάνοσα

νοσήματα, η ωοθηκεκτομή οδηγεί σε ύφεση ή ακόμα και σε μη εμφάνιση της νόσου (8, 9).

3. **Ψυχολογικοί παράγοντες.** Η έναρξη των συμπτωμάτων αυτοάνοσης νόσου έχει ισχυρά συσχετισθεί με προηγούμενη αναφορά έντονων στρεσογόνων γεγονότων, όπως θάνατος αγαπημένων προσώπων, διαζύγιο ή απώλεια εργασίας. Επίσης, η εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ψυχοσύνθεσης (10).

4. **Περιβαλλοντικοί παράγοντες.** Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση αυτοανοσίας, συμπεριλαμβανομένων της ηλιακής ακτινοβολίας, βαρέων μετάλλων και λοιμώξεων. Εκδηλώνεται μεγάλο ενδιαφέρον για το ρόλο των βακτηριακών και ιικών λοιμώξεων στην αυτοανοσία. Πληθώρα μελετών υποστηρίζει τη συσχέτιση μεταξύ βακτηριακής ή ιικής μόλυνσης και ανάπτυξης αυτοάνοσων νοσημάτων. Οι μολύνσεις αυτές συχνά έχουν θεωρηθεί ως παθογενετικός παράγοντας ή ως παράγοντας ενεργοποίησης (triggering factor) και απώλειας της αυτοανοχής. Στην τελευταία περίπτωση, οι λοιμώξεις μπορούν είτε να δρουν ανοσοσενισχυτικά, ενεργοποιώντας την σηματοδότηση μέσω TLRs και την παραγωγή πληθώρας κυτταροκινών (11, 12). ή να κάνουν ορατά στοιχεία του ίδιου του οργανισμού στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό επιτελείται με δυο μηχανισμούς, την αδόκιμη έκφραση ενδοκυττάρων αντιγόνων λόγω αυξημένου αποπτωτικού θανάτου επαγόμενου από οξεία ή χρόνια φλεγμονή και τη μοριακή μίμηση (13). **Μοριακή μίμηση** (molecular mimicry) ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο η ανοσοδραστικότητα έναντι ενός μικροοργανισμού οδηγεί στην ανοσολογική απόκριση κατά άλλων παθογόνων ή στοιχείων του εαυτού που προσομοιάζουν

στην πρωτοταγή ή/και στην τριτοταγή δομή των αρχικών μικροβιακών αντιγόνων μέσω διασταυρούμενης ανοσολογικής αναγνώρισης. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην ανάπτυξη αυτοανοσίας, όπως αποδεικνύεται από την ανάπτυξη αυτοανοσίας σε άτομα με συγκεκριμένες λοιμώξεις και μελέτες σε ζωικά πρότυπα νόσου (14).

Τα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται τόσο από κυτταρικές όσο και χυμικές αποκρίσεις. Είναι πλέον αποδεκτό, ότι οι αυτοάνοσες αποκρίσεις είναι αντιγόνο-οδηγούμενες και ακολουθούν τους μηχανισμούς ανάπτυξης των φυσιολογικών ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι των «ξένων» αντιγόνων. Αυτό, όσον αφορά στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων αποδεικνύεται από το γεγονός ότι: α) τα αυτοαντισώματα είναι συνήθως ειδικά για συγκεκριμένες αυτοάνοσες νόσους, β) η πλειονότητα των αυτοαντισωμάτων είναι τάξης IgG, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη αντιγόνο-εξαρτώμενης T-κυτταρικής βοήθειας (1), γ) οι αυτοάνοσες αποκρίσεις είναι κατά βάση πολυκλωνικές και στρέφονται έναντι πολλαπλών επιτόπων του ίδιου αυτοαντιγόνου (1) και δ) ενισχύονται και διαγιγνώσκονται με τη δράση των μηχανισμών της ενδο- και διαμοριακής επέκτασης επιτόπων (15, 16). Οι τελευταίες έχουν αποδειχθεί πειραματικά σε ζωικά πρότυπα αυτοάνοσων νοσημάτων. Έτσι, η ανοσοποίηση ζωικών προτύπων (ποντίκια) της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), η οποία αποτελεί ανάλογο της ανθρώπινης πολλαπλής σκλήρυνσης, με τον κύριο T κυτταρικό επίτοπο του κυρίου αυτοαντιγόνου, της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης, οδηγεί στην ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων έναντι διαφορετικών επιτόπων της πρωτεΐνης, υποστηρίζοντας την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων (2). Η διαμοριακή επέκταση επιτόπων δείχθηκε πειραματικά σε κουνέλια. Ανοσοποίηση των ζώων αυτών με ένα πεπτίδιο που αντιπροσωπεύει τον κύριο επίτοπο του αυτοαντιγόνου Ro60/TROVE2 οδήγησε στην



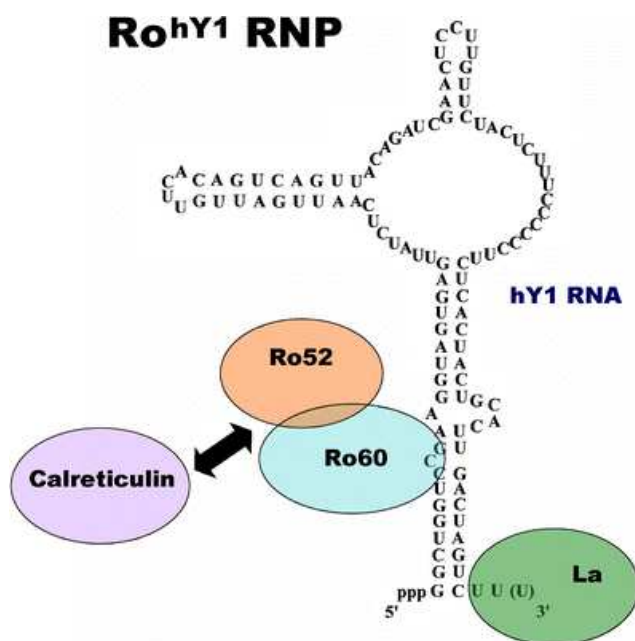
παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι πολλαπλών επιτόπων της Ro60/TROVE2, καθώς και επέκταση των χυμικών αποκρίσεων στα αυτοαντιγόνα La/SSB, Sm-B', Sm-D1, RNP-A και RNP-C, τα οποία συνδέονται φυσικά σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα και χαρακτηρίζουν τον ανθρώπινο Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (ΣΕΛ) (17).

Οι αυτοάνοσες χυμικές αποκρίσεις μπορεί να είναι γενικευμένες, που χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή ανοσοσφαιρινών, ή ειδικές με ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων στοιχείων του οργανισμού, κυρίως αντιγονικών συμπλόκων που αποτελούνται από νουκλεϊκά οξέα και πρωτεϊνικά μόρια. Τέτοια είναι το ματίσωμα (spliceosome) και το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Ro/La. Η υπερπαραγωγή αντισωμάτων συχνά οδηγεί σε δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων, η καθίζηση των οποίων έχει συνδεθεί με ιστική βλάβη ή/και δυσλειτουργία. Τα ειδικά αυτοαντισώματα συνήθως χαρακτηρίζουν συγκεκριμένες αυτοάνοσες νόσους. Δεν είναι γνωστό αν αποτελούν επιφανιόμενο, αποτέλεσμα της ιστικής βλάβης και της επακόλουθης παρουσίασης αυτοαντιγόνων, ή έχουν παθογενετικό ρόλο, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Έτσι, τα αυτοαντισώματα κατά των ριβονουκλεοπρωτεϊνών Ro/La φαίνεται να έχουν παθογενετικό ρόλο στο σύνδρομο του νεογνικού λύκου (ΣΝΛ), αλλά δεν έχει βρεθεί παθογενετική συσχέτιση με την ανάπτυξη του ΣΕΛ ή του συνδρόμου Sjogren (18). Η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων έχει υψηλή διαγνωστική, προγνωστική και κλινική αξία, ενώ συχνά περιλαμβάνονται στα διαγνωστικά κριτήρια αυτοάνοσων νοσημάτων (19-24). Μεταξύ των κύριων στόχων των αυτοάνοσων αποκρίσεων είναι τα μόρια που συγκροτούν τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα Ro/La και U1snRNP.

## Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα Ro/La και U1snRNP

### Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των αυτοαντιγόνων που συγκροτούν το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Ro/La

Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Ro/La αποτελείται από ένα εκ των τεσσάρων ανθρώπινων κυτταροπλασματικών RNA (human cytoplasmic RNAs: hYRNAs), τα οποία συνδέονται μη ομοιοπολικά με τα αυτοαντιγόνα Ro60/TROVE2 και La/SSB (25, 26). Σαν επιπλέον συστατικά του συμπλόκου έχουν περιγραφεί οι πρωτεΐνες νουκλεολίνη (27) και καλρετικουλίνη (28), καθώς και το αυτοαντιγόνο Ro52/TRIM21 (29, 30). Το τελευταίο δε συνδέεται άμεσα με το hYRNA, αλλά με τη Ro60/TROVE2 μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.



**Σχήμα 3.** Σχηματική αναπαράσταση του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου Ro/La. Οι πρωτεΐνες Ro60/TROVE2 και La/SSB συνδέονται μη ομοιοπολικά με ένα μόριο hY1-RNA. Η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη Ro60/TROVE2.

Προσαρμοσμένο από Routsias et al., *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2007

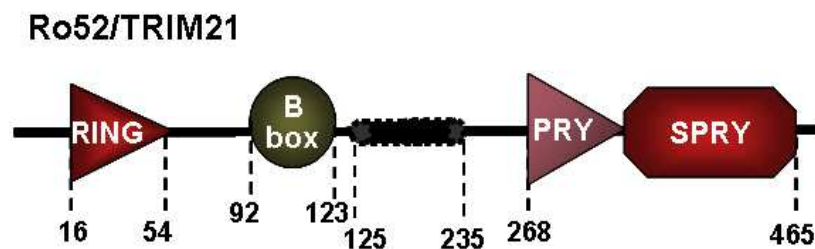
Τα τέσσερα hYRNAs (hY1, hY3, hY4, hY5) ποικίλουν σε μήκος από 83 έως 112 νουκλεοτίδια και μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III (31). Στα περισσότερα ανθρώπινα κύτταρα το hY5 RNA είναι το ριβονουκλεϊκό συστατικό του

ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου Ro/La (32). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει δύο πιθανούς μηχανισμούς εμπλοκής των hYRNAs στην αυτοανοσία. Πρώτον, με τη δράση τους σαν ανοσοενισχυτικά που προκαλείται από τη δέσμευσή τους σε υποδοχείς της φυσικής ανοσίας και την επακόλουθη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ειδικότερα, έχειδειχθεί ότι η προσθήκη κεκαθαρμένων hYRNAs σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (HEK 293) επάγει την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I και προάγει την ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων (33). Δεύτερον, έχει αναφερθεί ότι τα hYRNAs μπορεί να περιέχουν πρόδρομα microRNAs (miRNAs) τα οποία στοχεύουν γονίδια με σημαίνοντα ρόλο στις αυτοάνοσες διεργασίες (31).

Ήδη από το τέλος της δεκαετίας του 1960 είχαν αναφερθεί σε ορούς ασθενών με ΣΕΛ και σύνδρομο Sjögren αντιπυρηνικά αντισώματα τα οποία στρέφονταν έναντι ενός αυτοαντιγόνου που ονομαζόταν Ro ή SSA (Sjögren's Syndrome antigen A: αντιγόνο A του συνδρόμου Sjögren) (34-36). Αν και τα αντί-Ro/SSA αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για δεκαετίες σαν διαγνωστικοί δείκτες για το σύνδρομο Sjögren και τον ΣΕΛ, η μοριακή ταυτότητά τους δεν είχε διασαφηνιστεί. Σχεδόν τρεις δεκαετίες αργότερα, φάνηκε ότι τα αυτοαντιγόνα Ro/SSA αποτελούν, στην πραγματικότητα, δύο διαφορετικές πρωτεϊνικές οντότητες, τα αυτοαντιγόνα Ro52/TRIM21 και Ro60/TROVE2. Τα δύο αυτοαντιγόνα κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ οι κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες διαφέρουν ως προς την αμινοξική αλληλουχία και τις βιολογικές δράσεις (26, 29, 37).

**Αυτοαντιγόνο Ro52/TRIM21.** Κωδικοποιείται από το γονίδιο *trim21*, το οποίο στον άνθρωπο βρίσκεται στο 11<sup>ο</sup> χρωμόσωμα (38). Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 475 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 52 kDaltons. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που περιέχουν TRIM (TRIPartite Motif: τριμερές μοτίβο) (38). Το τριμερές

μοτίβο αποτελείται από τρεις περιοχές (Σχήμα 4), μία αμινοτελική δομή RING, ένα B-box μοτίβο και μία περιοχή σπειροειδούς πηνίου (coiled-coin region). Η περιοχή RING αποτελείται από τα κατάλοιπα αμινοξέων 15-58 στον άνθρωπο και είναι ένα μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνες, το οποίο έχει δύο θέσεις δέσμευσης μορίων ψευδαργύρου και συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Το μοτίβο B-box (κατάλοιπα αμινοξέων 91-128) έχει μία θέση πρόσδεσης μορίων ψευδαργύρου (39). Στο μέσο της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 (κατάλοιπα αμινοξέων 125-235) βρίσκεται η περιοχή του σπειροειδούς πηνίου, στην οποία εμπεριέχεται ένα φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper). Τέλος, το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (κατάλοιπα αμινοξέων 286-465) περιέχει μία περιοχή PRYSPRY (επίσης αναφέρεται ως B30.2) η οποία απαντάται σε αρκετά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών TRIM (40-42). Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερας ση-



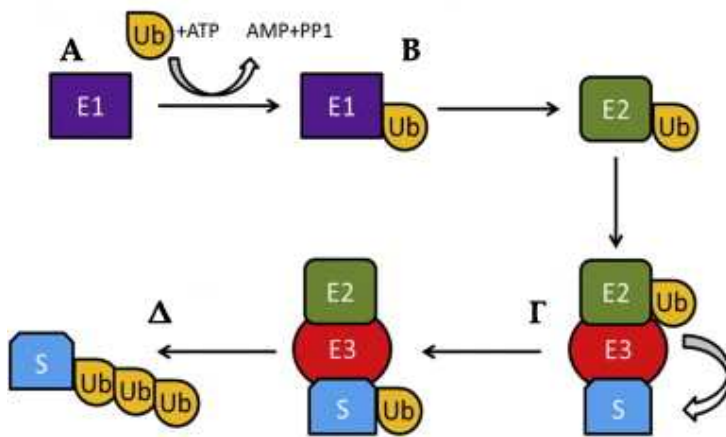
**Σχήμα 4.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21.

μαντική για την κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, και σε χαμηλότερα επίπεδα στον πυρήνα (43, 44). Η απαλοιφή της περιοχής του σπειροειδούς πηνίου, και ειδικότερα του φερμουάρ λευκίνης, οδήγησε στην μετατόπιση της έκφρασής της από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων HeLa, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή αυτής της περιοχής στην κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης (45). Αντίθετα, η επιπλέον απαλοιφή της περιοχής B30.2 επανέφερε την κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας το ρόλο της

στην πυρηνική μετατόπιση (46). Η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 δεν έχει κάποια περιοχή με χαρακτηριστικά πεπτιδίου-οδηγού πυρηνικής εντόπισης. Αυτό υπονοεί ότι η μετατόπιση της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα πραγματοποιείται είτε δια της μεταμεταφραστικής τροποποίησης της που οδηγεί στη δημιουργία ενός πεπτιδίου-οδηγού ή μέσω κάποιου μορίου-συνοδού, το οποίο αλληλεπιδρά με την περιοχή B30.2 (47). Τέλος, έχει αναφερθεί ένα εναλλακτικό μετάγραφο της πρωτεΐνης, το οποίο ονομάζεται Ro52β και οδηγεί στην παραγωγή μιας ισομορφής της πρωτεΐνης, από την οποία απουσιάζει η περιοχή του φερμουάρ λευκίνης, εμφανίζοντας έτσι αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση (48).

Η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, όπως αποδείχθηκε με πειράματα *in situ* υβριδισμού (38, 49-52). Πειράματα με ανασυνδυασμένη με ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (E-GFP) πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 σε ποντικούς έδειξαν ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης της ανιχνεύονται σε όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως οι λεμφαδένες ο σπλήνας και ο θύμος αδένας. Ανάμεσα στις υποομάδες λευκών αιμοσφαιρίων παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση του αυτοαντιγόνου σε T-κύτταρα, T-κύτταρα φυσικούς φονιάδες, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, ενώ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης ανιχνεύθηκαν σε B-κύτταρα και σε κοκκιοκύτταρα (53). Η απαλοιφή του γονιδίου *trim21* σε πειραματικά πρότυπα ποντικών δεν επηρέασε σημαντικά το φαινότυπό τους, υποδεικνύοντας ότι δεν συμμετέχει δραστικά στην ανάπτυξή τους. Ωστόσο, όταν στα αυτιά των ποντικών αυτών περάστηκαν μεταλλικές ταυτότητες, τα ζώα ανέπτυξαν σοβαρή φλεγμονή του δέρματος, η οποία σταδιακά επεκτάθηκε. Επιπλέον, τα ζώα αυτά ανέπτυξαν υπεργαμμασφαιριναιμία στον ορό, αντί-DNA αυτοαντισώματα, πρωτεϊνουρία και παθολογία των νεφρών, χωρίς ταυτόχρονη φλεγμονή στους σιελογόνους αδένες,

συμπτώματα που προσομοιάζουν στον ανθρώπινο ΣΕΛ. Τέλος, παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, οι οποίες βρίσκονται υπό τον έλεγχο παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση ιντερφερονών (IRFs: interferon regulatory factors), όπως η ιντερλευκίνη 6, η ιντερλευκίνη 12/ιντερλευκίνη 23 και η ιντερλευκίνη 17 (54). Οι IRFs αποτελούν μία ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων των ιντερφερονών τύπου I και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται σε ανοσολογικές αποκρίσεις. Αυτό υπέδειξε ότι η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21, η οποία μέχρι την τελευταία δεκαετία ήταν αγνώστου λειτουργίας, μπορεί να έχει παρόμοιο ρόλο με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας TRIM. Αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και ιδιαιτέρως των αποκρίσεων έναντι των ιών και γενικότερα, της φυσικής ανοσίας (55, 56). Πρόκειται για λιγάσες της ουβικιτίνης, οι οποίες στοχεύουν μόρια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την επιβίωση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (57). Η ουβικιτινυλίωση είναι ένας μηχανισμός μεταμεταφραστικής τροποποίησης των πρωτεϊνών, μέσω της οποίας οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί ελέγχουν βιολογικές διαδικασίες, όπως η αποδόμηση πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα, η ανακύκλωση αμινοξέων και η διακίνηση πρωτεϊνών (58). Η διαδικασία της ουβικιτινυλίωσης είναι ένα μονοπάτι τριών βημάτων και απαιτεί τη δαπάνη ATP. Στο πρώτο βήμα δεσμεύεται και ενεργοποιείται ένα μόριο ουβικιτίνης από ένα ένζυμο E1 που ονομάζεται «ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης». Στο δεύτερο βήμα το ενεργοποιημένο μόριο της ουβικιτίνης μεταφέρεται σε ένα ένζυμο E2 («ένζυμο που προσδένει το μόριο ουβικιτίνης»). Τέλος, στο τρίτο βήμα, ένα ένζυμο E3 που ονομάζεται «λιγάση της ουβικιτίνης» διαμεσολαβεί τη μεταφορά της ουβικιτίνης στην πρωτεΐνη-στόχο (Σχήμα 5) (59). Πράγματι, η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 αποτελεί μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης με την περιοχή RING του μορίου να παίζει κρίσιμο ρόλο σε αυτή τη λειτουργία (60, 61). Η Ro52/TRIM21 έχει δειχθεί ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει τόσο



**Σχήμα 5.** Το μονοπάτι της ουβικιτινυλίωσης των πρωτεϊνών. Ένα μόριο ουβικιτίνης (Ub) ενεργοποιείται και συνδέεται με το ένζυμο E1 (A), στη συνέχεια μεταφέρεται στο ένζυμο E2 (B) και τέλος, το ένζυμο E3 διευκολύνει τη σύνδεσή της στο υπόστρωμα (S) (Γ). Αρκετά μόρια ουβικιτίνης μπορούν να συνδεθούν με το υπόστρωμα (Δ). Προσαρμοσμένο από Oke et al., *J Autoimmun*, 2012.

με κυτταροπλασματικά, όσο και με πυρηνικά ένζυμα E2. Με την ιδιότητα της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, το μόριο Ro52/TRIM21 ρυθμίζει την έκφραση των IRFs, συμπεριλαμβανομένων των IRF3, IRF5, IRF7 και IRF8 (49, 54, 60, 62, 63). Από την άλλη πλευρά, οι IRFs και οι ιντερφερόνες ρυθμίζουν την έκφραση της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21. Στον υποκινητή του γονιδίου *trim21* υπάρχει ένα ρυθμιστικό στοιχείο που ενεργοποιείται από IRFs, και έχει δειχθεί ότι οι IRF1 και IRF2 προάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου *trim21*, ενώ οι IRF4 και IRF8 την καταστέλλουν (7). Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύνολο των παραπάνω δεδομένων έχει μελετηθεί σε *in vitro* συστήματα και μένει να αποδειχθεί η *in vivo* δράση της πρωτεΐνης στις αποκρίσεις της φυσικής ανοσίας. Επιπλέον, οι ιντερφερόνες τύπου I (ιδιαίτερα η IFNβ) και II (IFNγ) είναι ισχυροί επαγωγείς της έκφρασης της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 σε διάφορους τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (64). Έτσι, σε περίπτωση φλεγμονής, η παραγωγή ιντερφερονών επάγει την έκφραση του μορίου Ro52/TRIM21, το οποίο στη συνέχεια ρυθμίζει την έκφραση των IRFs και καταστέλλει την παραγωγή ιντερφερονών και άλλων κυτταροκινών, οδηγώντας στον έλεγχο και τερματισμό της φλεγμονής (65) (Σχήμα 6).





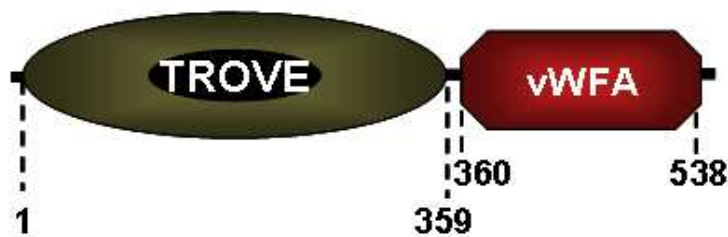
αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης μετά από ενεργοποίηση του μορίου CD40 (60). Τέλος, φαίνεται ότι αποτελεί έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα του σταθερού τμήματος (Fc) των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών. Οι αρχικές ενδείξεις για την ιδιότητα αυτή προήλθαν από την παρατήρηση ότι οροί υγιών ατόμων μπορούν να κατακρημνίσουν τη Ro52/TRIM21 (67). Ακολούθησαν μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες που ανέφεραν ότι η Ro52/TRIM21 προσδένεται στο σταθερό τμήμα (Fc) των ανθρώπινων IgG μέσω της B30.2 περιοχής της με μεγαλύτερη συγγένεια από οποιονδήποτε άλλο υποδοχέα της ανοσοσφαιρίνης τάξεως γ (IgG) (68-70). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Ro52/TRIM21 δεσμεύει ιικά σωματίδια τα οποία είναι ωψονοποιημένα με IgG και εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Ακολούθως τα σωματίδια αυτά οδηγούνται σε κατάτμηση στο πρωτεάσωμα μέσω της δράσης της Ro52/TRIM21 ως E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (71). Με πειράματα διαμόλυνσης δείχθηκε ότι η Ro52/TRIM21 μπορεί να εξουδετερώσει ορισμένες ικές λοιμώξεις, δρώντας σαν κυτταροπλασματικός υποδοχέας συμπλόκων IgG με πρωτεΐνες των ικών σωματίων. Βέβαια, ακόμα δεν έχει διασαφηνιστεί το πώς μπορεί το πρωτεάσωμα να διαχειριστεί τόσο μεγάλα σύμπλοκα (72).

Το γεγονός ότι αποτελεί κύριο αντιγονικό στόχο των αυτοάνοσων χυμικών αποκρίσεων έστρεψε πολύ γρήγορα το ενδιαφέρον στη χαρτογράφηση των κύριων επιτόπων του με τη χρήση ανασυνδυασμένων ισομορφών της πρωτεΐνης από τις οποίες αφαιρούνταν συγκεκριμένες δομικές περιοχές (73-75). Έτσι, φάνηκε ότι σχεδόν όλοι οι οροί που περιείχαν αυτοαντισώματα έναντι της ριβονουκλεοπρωτεΐνης Ro52/TRIM21 αναγνώριζαν την κεντρική περιοχή του μορίου (κατάλοιπα αμινοξέων 190-245) ανεξάρτητα από το ποια νόσο είχαν οι αντίστοιχοι ασθενείς-δότες (74). Σε επόμενη μελέτη ταυτοποιήθηκε ένας επίτοπος που βρίσκεται στην ίδια περιοχή (κατάλοιπα

αμινοξέων 200-239) ο οποίος περιέχει ολόκληρο το μοτίβο του φερμουάρ λευκίνης (76). Μάλιστα, η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι αυτού του επιτόπου συσχετίστηκε με την ανάπτυξη του ΣΝΛ και την κλινική εκδήλωση συγγενούς κολποκοιλιακού αποκλεισμού (ΣΚΑ) (77), καθώς φαίνεται ότι τα αντισώματα αυτά συνδέονται στην επιφάνεια μυοκαρδιακών κυττάρων του εμβρύου και προκαλούν διαταραχές στην ομοιόσταση του ασβεστίου των κυττάρων αυτών οδηγώντας τα, τελικά, σε απόπτωση.

**Αυτοαντιγόνο Ro60/TROVE2.** Κωδικοποιείται από το γονίδιο *trove2*, το οποίο στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1. Το ανθρώπινο γονίδιο *trove2* μεταγράφεται σε πέντε εναλλακτικά μετάγραφα (μετάγραφα 1-5), τα οποία κωδικοποιούν για τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης (η μετάφραση των εναλλακτικών μεταγράφων 2 και 5 οδηγεί στην παραγωγή της ίδιας ισομορφής). Οι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης δεν φαίνεται να έχουν διαφορετικές βιολογικές δράσεις, καθώς διαφέρουν μεταξύ τους κατά λίγα αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο των μορίων που είναι απομακρυσμένο από τις λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 60 kDaltons, είναι εξελικτικά συντηρημένη και απαντάται σε όλα τα σπονδυλωτά, σε ορισμένα βακτήρια και στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* (78). Οι δομικές ιδιότητες της πρωτεΐνης Ro60/TROVE2 έχουν μελετηθεί κυρίως στον βάτραχο *Xenopus laevis* που εμφανίζει 78% ταυτότητα με την ανθρώπινο μόριο. Η πρωτεΐνη έχει δύο κύριες δομικές περιοχές (Σχήμα 7) (79). Η πρώτη

## Ro60/TROVE2



**Σχήμα 7.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης Ro60/TROVE2.

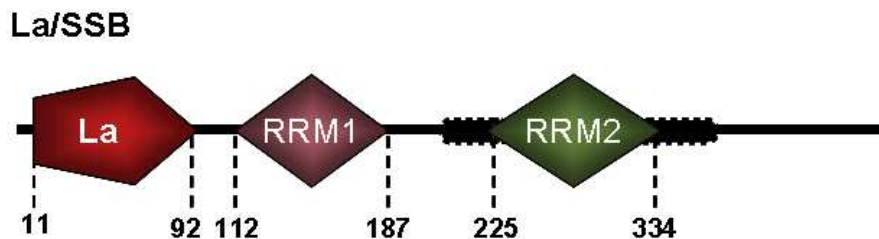
μοιάζει με περιοχή τύπου παράγοντα-A του von Willebrand (vWFA), η οποία συναντάται σε μόρια προσκόλλησης που εντοπίζονται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Η δεύτερη προσομοιάζει σε ντόνατ και αποτελείται από μία σειρά επαναλαμβανόμενων α-ελίκων οι οποίες είναι οργανωμένες σφαιροειδώς γύρω από μια εσωτερική οπή διαμέτρου 10-15 Å που ονομάζεται περιοχή TROVE (Telomerase, Ro and Vault Elements: περιοχή που απαντάται στα μόρια τελομεράσης, στην πρωτεΐνη Ro60/TROVE2 και σε Vault στοιχεία) (80). Ο βιολογικός της ρόλος δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένος, αν και φαίνεται να σχετίζεται με τον ποιοτικό έλεγχο των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων της RNA πολυμεράσης III, όπως είναι τα πρόδρομα μόρια του ριβοσωμικού RNA (rRNA). Μελέτες έχουν δείξει ότι το αυτοαντιγόνο Ro60/TROVE2 δεσμεύει τα μη σωστά πτυχωμένα μόρια RNA μικρού μοριακού βάρους στην εσωτερική οπή της περιοχής TROVE και τα οδηγεί σε αποδόμηση (78). Αντίθετα, τα hYRNAs συνδέονται σε συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα στο εξωτερικό της ίδιας περιοχής. Μία επιπλέον ιδιότητα που έχει πρόσφατα αποδοθεί στην Ro60/TROVE2, κι ενδεχομένως σχετίζεται με τον ποιοτικό έλεγχο των νεοσυντιθέμενων RNA, είναι ο προστατευτικός της ρόλος στην επιβίωση κυττάρων μετά από έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η δράση αυτή έχει μελετηθεί τόσο στο βακτήριο *Deinococcus radiodurans* (81) όσο και σε κύτταρα ποντικών στους οποίους δεν παράγεται η Ro60/TROVE2 (82).

Η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Ro60/TROVE2 σε πειραματικά πρότυπα ποντικών, είχε ως αποτέλεσμα θνησιμότητα στο 28% των ποντικών μέχρι ενός έτους, σε αντίθεση με ένα αντίστοιχο ποσοστό 4% των ποντικών άγριου τύπου. Σε ηλικίες μεγαλύτερες των 5 μηνών, ανιχνεύθηκαν υψηλοί τίτλοι αντιπυρηνικών αντισωμάτων και αυτοαντισωμάτων έναντι μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, ιστονών ή/και νουκλεοσωμάτων. Άνω των 6 μηνών ανέπτυξαν υπεργαμμασφαιριναιμία στον ορό και εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων στο νεφρό, με τη συντριπτική πλειονότητα των ποντικών να εμφανίζει ιστολογικές ενδείξεις μεμβρανοϋπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας. Όλα αυτά τα κλινικά ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα ποντίκια στα οποία απαλείφεται το μόριο Ro60/TROVE2 εκδηλώνουν ένα φαινότυπο που προσομοιάζει στον ανθρώπινο ΣΕΛ.

Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν περιγράψει τους επιτόπους της Ro60/TROVE2 με τη βοήθεια τεχνικών χαρτογράφησης επιτόπων χρησιμοποιώντας συνθετικά πεπτίδια. Δύο από τους κύριους επιτόπους είναι αυτοί που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα 169-190 (περιοχή σύνδεσης με τα hYRNAs) και 211-232 της πρωτεΐνης και περιγράφηκαν στο εργαστήριό μας (83). Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι του πρώτου επιτόπου ανευρίσκεται πιο συχνά σε ασθενείς με ΣΕΛ, ενώ του δεύτερου με σύνδρομο Sjögren (84).

**Αυτοαντιγόνο La/SSB.** Η ανθρώπινη πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *ssb* στο χρωμόσωμα 2. Πρόκειται για μια φωσφοπρωτεΐνη 408 αμινοξέων με μοριακό βάρος 47 kDaltons. Η πρωτεΐνη La/SSB περιέχει τέσσερις κύριες θέσεις φωσφορυλίωσης, που εντοπίζονται στα κατάλοιπα σερίνης 366 και θρεονίνης 302, 362 και 389 (85). Η ανθρώπινη La/SSB αποτελείται από τις παρακάτω δομικές περιοχές: ένα υψηλά συντηρημένο La μοτίβο, το οποίο προσδένει RNA στο αμινοτελικό της άκρο, ένα τυπικό

μοτίβο αναγνώρισης RNA (MAR) στην κεντρική περιοχή του μορίου, ένα άτυπο MAR κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, ενώ ακολουθούν ένα μακρύ εύκαμπτο πολυπεπίδιο το οποίο περιέχει ένα μικρό βασικό μοτίβο, μία ρυθμιστική θέση φωσφορυλίωσης στη σερίνη 366 και, τέλος, ένα σήμα πυρηνικής εντόπισης (Σχήμα 8).



**Σχήμα 8.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης La/SSB.

Από τη μελέτη της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης φαίνεται ότι τόσο το μοτίβο La, όσο και το γειτονικό του MAR, είναι απαραίτητα για τη δέσμευση με υψηλή συγγένεια των μορίων RNA που φέρουν πολύ-U ουρά. Επιπλέον, το τελικό MAR σε συνδυασμό με το μικρό βασικό μοτίβο που ακολουθεί, συμμετέχουν στη δέσμευση μορίων RNA που δεν έχουν πολύ-U ουρά, όπως είναι τα ιικά RNA (86). Λόγω των συγκεκριμένων ιδιοτήτων, η La/SSB μπορεί να δεσμεύσει την πολύ-U ουρά που υπάρχει στο 3'-άκρο όλων σχεδόν των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων της RNA πολυμεράσης III (5S RNA, tRNA, 7S RNA και hYRNAs) (87). Επίσης, δεσμεύει μέρος του RNA του συμπλόκου της τελομεράσης, καθώς και ιικά RNA που περιέχουν εσωτερικά στοιχεία εισόδου στα ριβοσώματα (IRES: internal ribosome entry site) (88). Έτσι έχει δειχθεί η αλληλεπίδρασή της με διάφορους ιούς, συμπεριλαμβανομένων του αδενοϊού VA, του ιού Epstein-Barr και των ιών Coxsackie (89).

Η La/SSB είναι μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Εντοπίζεται κυρίως πυρηνικά, ενώ έχει αναφερθεί ότι μετατόπισή της στο

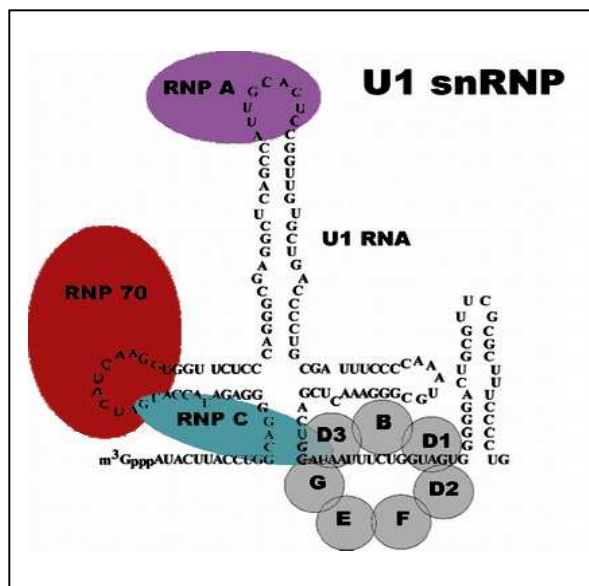
κυτταρόπλασμα επάγεται από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ. φωσφορυλιώσεις) ή κατάτμησή της έπειτα από αλληλεπίδρασή της με ιούς ή θρυμματίνες (granzymes). Ειδικά, έχει δειχθεί ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 366 επηρεάζει την κυτταρική εντόπιση και λειτουργία της πρωτεΐνης (90). Απάλειψη του γονιδίου της La/SSB σε πειραματικά πρότυπα ποντικών έδειξε ότι είναι απαραίτητη για την οντογένεση, υποδεικνύοντας το κεντρικό ρόλο της. Πράγματι, οι βιολογικές της δράσεις είναι πολυποίκιλες. Η κύρια δράση της είναι να «συνοδεύει» τα πρόδρομα μόρια RNA (πρωτεΐνη-συνοδός, chaperone) με τα οποία δεσμεύεται ειδικά και να τα προστατεύει από τη δράση εξωνουκλεασών, ρυθμίζοντας έτσι τη μετέπειτα επεξεργασία τους. Επίσης, πληθώρα άλλων δράσεων έχει αποδοθεί στη La/SSB: διατήρηση των πρόδρομων μορίων RNA στον πυρήνα, δράση ελικάσης του RNA, καθώς και η προαγωγή της ανεξάρτητης από το 5'-κάλυμα μετάφρασης ιικών ή ανθρώπινων αγγελιοφόρων RNA τα οποία περιέχουν IRES (87). Πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η La/SSB ρυθμίζει την έκφραση των miRNAs μέσω της αναγνώρισης των χαρακτηριστικών δομών μίσχου-θηλιάς των πρόδρομων miRNAs και προστατεύει τα μόρια αυτά από κατάτμηση από νουκλεάσες. Στη διαδικασία αυτή φαίνεται να συμμετέχουν και τα τρία RRM's που περιέχει η La/SSB (91).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαπέντε ετών χαρτογραφήθηκαν στο εργαστήριό μας οι B κυτταρικοί επίτοποι της La/SSB. Ορισμένοι επίτοποι εντοπίστηκαν στις λειτουργικές περιοχές του αυτοαντιγόνου, όπως π.χ. στο κεντρικό MAR. Η δέσμευση των hYRNAs στη θέση αυτή δεν φάνηκε να επηρεάζει τη δέσμευση αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν στον αντίστοιχο επίτοπο. Ως επίτοποι που εμφανίζουν την υψηλότερη αντιγονικότητα ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές που εκτείνονται στα αμινοξικά κατάλοιπα: 147-154 (κεντρικό MAR του μορίου), 291-302, 301-318, 349-364 (92). Ο επίτοπος που

εκτείνεται στα κατάλοιπα αμινοξέων 349-364 εμφανίζει τη μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία στην αναγνώριση αντί-La/SSB αντισωμάτων (ποσοστά άνω του 90%).

### Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των αυτοαντιγόνων που συγκροτούν το σύμπλοκο U1snRNP

Το σύμπλοκο U1snRNP είναι το κύριο συστατικό του ματισώματος. Το τελευταίο είναι ένα μακρομοριακό σύμπλοκο που καταλύει το μάτισμα των πρόδρομων mRNA σε ώριμα. Το σύμπλοκο U1snRNP (Σχήμα 9) αποτελείται από τις πρωτεΐνες snRNP 70, RNP A, RNP C και Sm με το U1RNA, το οποίο έχει μήκος 164 νουκλεοτιδίων. Οι πρωτεΐνες snRNP 70 και RNP A συνδέονται άμεσα με το U1RNA μέσω των τυπικών τους MAR, ενώ η RNP C συνδέεται μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με την RNP 70 και με μία ή περισσότερες Sm πρωτεΐνες (93). Οι επτά Sm πρωτεΐνες (B/B', D1, D2, D3, E, F, G) σχηματίζουν έναν επταμερή δακτύλιο διαμέτρου ~20 nm, ενώ το U1RNA περνάει από το μέσο αυτού (94).



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου U1snRNP. Προσαρμοσμένο από Routsias et al., Crit Rev Clin Lab Sci, 2006.

Το αντιγόνο snRNP 70 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 70 kDaltons και το γονίδιο που την κωδικοποιεί εδράζεται στο 19<sup>ο</sup> χρωμόσωμα στον άνθρωπο. Το μόριο έχει τρεις

κύριες δομικές περιοχές, ένα κεντρικό MAR και δύο περιοχές σπειροειδούς πηνίου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το μόριο snRNP A βρίσκεται στο 15<sup>ο</sup> χρωμόσωμα στον άνθρωπο. Η πρωτεΐνη snRNP A έχει μοριακό βάρος 31 kDaltons και περιέχει δύο MAR, ένα στο αμινοτελικό κι ένα στο καρβοξυτελικό της άκρο. Αντίστοιχα, το γονίδιο που κωδικοποιεί για το αντιγόνο snRNP C βρίσκεται στο 6<sup>ο</sup> χρωμόσωμα στον άνθρωπο. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 17,5 kDaltons και περιέχει μία δομή που προσομοιάζει με δάκτυλο ψευδαργύρου στο αμινοτελικό της άκρο. Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου είναι δομές που μπορούν να προσδέσουν τόσο RNA όσο και DNA. Συνήθως αποτελούν δομικές περιοχές πρωτεϊνών που έχουν δράση μεταγραφικών παραγόντων, συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταφορά μορίων mRNA ή σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό.

Οι κύριες αντιγονικές θέσεις των πρωτεϊνών snRNP 70 και RNP A εντοπίζονται στις δομές MAR που περιέχουν. Οι κύριοι επίτοποι στο αντιγόνο snRNP 70 είναι ως επί το πλείστον διαμορφωτικοί. Έπειτα από τη σύνδεση της snRNP 70 με το U1RNA, δημιουργείται ένας τεταρτοταγής διαμορφωτικός επίτοπος στη περιοχή MAR του αντιγόνου, που αναγνωρίζεται από αντισώματα ασθενών με μεικτή νόσο του συνδετικού ιστού (MNΣΙ) (95). Ωστόσο, έχει αναφερθεί κι ένας γραμμικός επίτοπος που αποτελείται από κατάλοιπα αμινοξέων 119-126. Ο επίτοπος που εντοπίζεται στο MAR του αυτοαντιγόνου snRNP A (κατάλοιπα αμινοξέων 35-58) εμφανίζει υψηλή ειδικότητα για τους ασθενείς με MNΣΙ, καθώς αναγνωρίζεται από το 94% των θετικών σε αντί-U1snRNP αυτοαντισώματα ορών σε σύγκριση με το 19% του αντίστοιχου υποπληθυσμού ασθενών με ΣΕΛ (96). Ο κύριος επίτοπος της snRNP C εντοπίζεται στην περιοχή που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων 119-125 που περιέχει μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνες (97). Ο συγκεκριμένος επίτοπος εμφανίζει μεγάλη



ομολογία με αντίστοιχους, πλούσιους σε προλίνη επιτόπους που βρίσκονται στα μόρια snRNP A και SmB/B' και μπορεί να αναγνωριστεί διασταυρούμενα από αντισώματα που στρέφονται έναντι των επιτόπων αυτών (98).

Τα επτά αυτοαντιγόνα Sm ποικίλουν σε μοριακό βάρος από 8,5-25 kDaltons. Το βασικό αυτοαντιγόνο είναι η πρωτεΐνη SmB/B', της οποίας οι κύριοι επίτοποι περιλαμβάνουν δύο πλούσιες σε προλίνες περιοχές. Τα αυτοαντισώματα που στοχεύουν τους επίτοπους αυτούς μπορούν να αναγνωρίσουν με διασταυρούμενη αντίδραση κι άλλους επίτοπους μέσα στο σύμπλοκο U1snRNP (99). Επίσης, σαν κύριοι επίτοποι ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μεταμεταφραστικά τροποποιημένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που υπάρχουν στις SmB/B', SmD1 και SmD3 πρωτεΐνες και μπορούν να αναγνωριστούν από τα ίδια αυτοαντισώματα (100).

## **Αυτοάνοσα νοσήματα**

Τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι χρόνια. Χαρακτηρίζονται από κυτταρικές και χυμικές αποκρίσεις, ενώ ποικίλουν πολύ ως προς την σοβαρότητα και τη συστημικότητα των εκδηλώσεων. Μπορούν αδρά να κατηγοριοποιηθούν βάσει των κλινικοπαθολογικών τους χαρακτηριστικών σε οργανοειδικά, όπου οι ανοσολογικές αποκρίσεις στρέφονται ειδικά έναντι ενός συγκεκριμένου οργάνου, και συστηματικά, στα οποία η αυτοάνοση απόκριση στρέφεται σε περισσότερα του ενός οργάνου. Δύο από τα πιο συχνά και πιο χαρακτηριστικά αυτοάνοσα νοσήματα είναι ο ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren. Τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, τυπικές κυτταρικές και χυμικές αυτοάνοσες αποκρίσεις και συνιστούν άριστα πρότυπα για τη μελέτη της αυτοανοσίας. Μάλιστα, ο ΣΕΛ είναι ιδανικό πρότυπο για τη μελέτη των

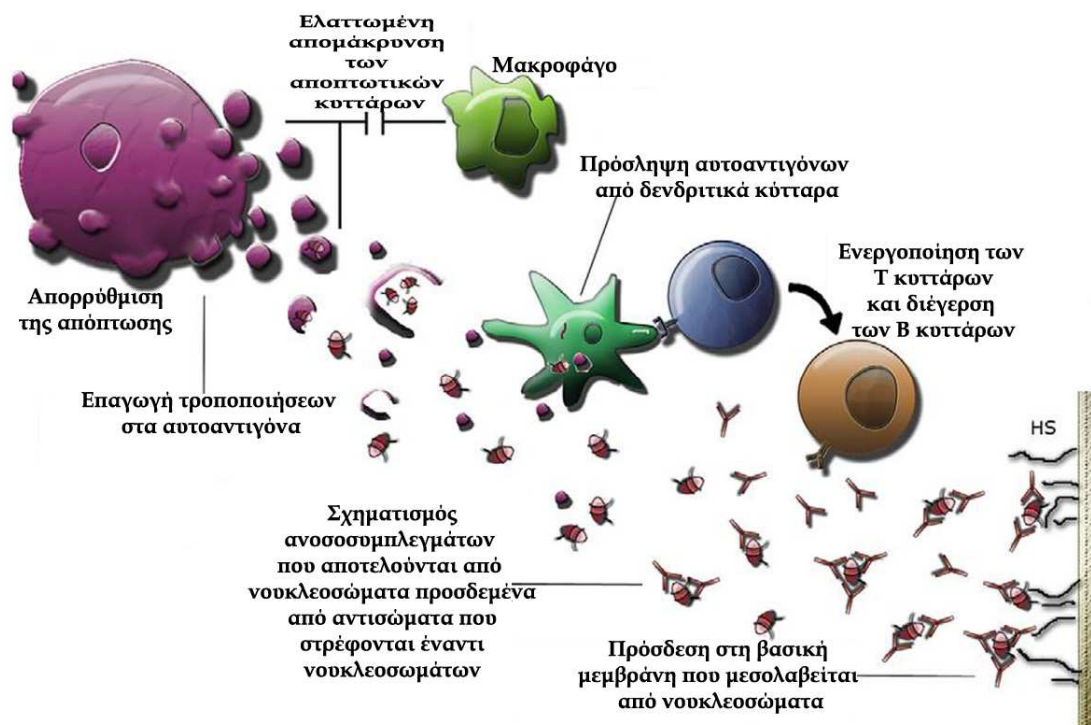
συστηματικών αυτοάνοσων φλεγμονωδών αποκρίσεων και την εμπλοκή πολλαπλών οργάνων, ενώ το σύνδρομο Sjögren είναι κυρίως εντοπισμένο στους εξωκρινείς αδένες (κυρίως σιελογόνους και δακρυϊκούς), αν και συχνά οι αποκρίσεις επεκτείνονται σε συστηματικές, ενώ συσχετίζεται και με την ανάπτυξη Β-κυτταρικής νεοπλασίας.

### **Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ)**

Ο ΣΕΛ είναι μία χρόνια αυτοάνοση νόσος, κλινικά ετερογενής, στην παθογένεια της οποίας συμβάλλουν διάφοροι γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ορμονικοί παράγοντες. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου ποικίλουν από την εμφάνιση ήπιων δερματικών βλαβών και αρθρίτιδας έως την βαριά προσβολή των νεφρών, την πνευμόνων ή/και του κεντρικού νευρικού συστήματος (101). Η επίπτωσή του στον γενικό πληθυσμό είναι κατά προσέγγιση 3%. Το ποσοστό αυτό ποικίλει ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται, με τη νόσο να εμφανίζει μεγαλύτερη επίπτωση σε Αφροαμερικανούς και Ασιάτες από ότι σε Καυκάσιους (102). Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα της νόσου είναι αρκετά υψηλές, με τα ποσοστά δεκαετούς επιβίωσης να εκτείνονται από 70%-92% (103, 104).

Θεωρείται πρότυπη χρόνια συστηματική αυτοάνοση νόσος. Η παθογένειά της δεν είναι γνωστή. Όπως σε όλα τα αυτοάνοσα νοσήματα, θεωρείται ότι συμμετέχουν πολλαπλοί παράγοντες. Η απώλεια της ανοσολογικής ανοχής και η απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι το αποτέλεσμα της συνύπαρξης δυσμενών γενετικών παραγόντων [με τις πιο πρόσφατες μελέτες να αναφέρουν την εμπλοκή τουλάχιστον 30 γενετικών τόπων που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου (105-108)], περιβαλλοντικών παραγόντων και στοχαστικών γεγονότων. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου διαδραματίζει

η απορύθμιση των αποκρίσεων της φυσικής ανοσίας, όπως φαίνεται από την υπέρμετρη έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών οι οποίες συμβάλλουν στην πρόκληση ιστικής βλάβης και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση αυτοδραστικών T- και B-κυττάρων. Οι ισχυρές χυμικές αποκρίσεις με τη σειρά τους οδηγούν στο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων, στην ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης και στην πρόκληση τοπικής ιστικής βλάβης και αυξημένου αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των ιστικών κυττάρων (109, 110). Ο αυξημένος ρυθμός και η ελλιπής απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων ευοδώνει την ανάπτυξη αυτοάνοσων αποκρίσεων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζουν τα υπολείμματα των αποπτωτικών κυττάρων (111). Τα αυτοαντισώματα και τα νουκλεϊκά οξέα που απελευθερώνονται από τα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα, τα οποία ευνοούν περαιτέρω την ενεργοποίηση των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων και των κυττάρων της φυσικής ανοσίας λόγω της πρόσδεσής τους από Fc-υποδοχείς. Επίσης, τα νουκλεϊκά οξέα των ανοσοσυμπλεγμάτων ή άλλων ριβονουκλεοπρωτεϊνικών αντιγόνων μπορούν να δράσουν σαν «ενδογενή ανοσοενισχυτικά» μέσω της δέσμευσής τους στους TLRs που τα αναγνωρίζουν (33). Τέλος, η καθίζηση των ανοσοσυμπλεγμάτων στα αγγεία ή στους ιστούς με την επακόλουθη ενεργοποίηση των υποδοχέων των Fc τμημάτων ανοσοσφαιρινών και του συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει στην ιστική δυσλειτουργία και βλάβη (112) (Σχήμα 10).



**Σχήμα 10** Γενική υπόθεση για την παθογένεια του ΣΕΛ. Η αυξημένη παραγωγή αποπτωτικών σωματίων ή/και η μειωμένη κάθαρση των αποπτωτικών φυσαλίδων μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση χρωματίνης στην κυκλοφορία. Η παρουσία της χρωματίνης σε κυκλοφορία οδηγεί στην ενεργοποίηση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (ΑΠΚ) και στο σχηματισμό των παθογενετικών ανοσοσυμπλεγμάτων που προκαλούν τη σπειραματονεφρίτιδα. Προσαρμοσμένο από Munoiz et al., *Lupus*, 2008.

Η ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων αποτελεί χαρακτηριστικό της νόσου, ενώ η ανίχνευση συγκεκριμένων τύπων συμπεριλαμβάνεται στα διαγνωστικά κριτήρια του ΣΕΛ (19, 21). Τα αυτοαντισώματα έναντι της διπλής έλικας του DNA (αντί-dsDNA) είναι τα πιο συχνά ανευρισκόμενα σε ασθενείς με ΣΕΛ και έχουν υψηλή διαγνωστική και κλινική σημασία για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Η συχνότητα εμφάνισής τους στον ΣΕΛ ποικίλει από 60-95% ανάλογα με τη μέθοδο ανίχνευσης (113), ενώ έχουν υψηλή ειδικότητα για τη νόσο [95-100% σε περιπτώσεις ενεργής νόσου (114)]. Ένας ακόμη

συχνός στόχος των αυτοάνοσων αποκρίσεων στο ΣΕΛ είναι το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Ro/La. Αυτοαντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Ro/SSA ανιχνεύονται πολύ συχνά σε ασθενείς με ΣΕΛ και συγκεκριμένα σε ποσοστό 10-50% των ασθενών ανάλογα με τη μέθοδο ανίχνευσης (115), ενώ στον Ελληνικό πληθυσμό το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 52%. Οι μελέτες των αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Ro/SSA δεν διέκριναν την ειδικότητα τους ως προς τις πρωτεΐνες Ro52/TRIM21 και Ro60/TROVE2 και έτσι η επίπτωση των αντισωμάτων έναντι της καθεμιάς δεν είναι γνωστή. Τα αυτοαντισώματα έναντι του αντιγόνου La/SSB εμφανίζονται στον ορό του 10-20% των ασθενών με ΣΕΛ. Στον Ελληνικό πληθυσμό, αντί-La/SSB αυτοαντισώματα ανιχνεύονται στο 10% των ασθενών με ΣΕΛ. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι τα αυτοαντισώματα έναντι της ριβονουκλεοπρωτεΐνης La/SSB θεωρούνται πιο ειδικά για το σύνδρομο Sjögren. Συχνά, οι ασθενείς με ΣΕΛ που αναπτύσσουν αντί-La/SSB αυτοαντισώματα έχουν υποκείμενο δευτεροπαθές σύνδρομο Sjögren σε ποσοστό που φτάνει το 50% (116, 117). Επιπλέον, η ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνικών συστατικών του συμπλόκου U1snRNP, τα οποία έχουν γενικά συνδεθεί με τη ΜΝΣΙ, παρατηρείται και στο ΣΕΛ. Έτσι, αυτοαντισώματα έναντι του αυτοαντιγόνου snRNP 70 ανιχνεύονται στο 12% των ασθενών με ΣΕΛ, ενώ κατά του snRNP A ή snRNP C στο 23% (118). Τα αντί-Sm αυτοαντισώματα παρουσιάζουν ποσοστά ειδικότητας για το ΣΕΛ που πλησιάζουν το 100% (119), αλλά έχουν πολύ χαμηλή ευαισθησία αφού ανιχνεύονται στον ορό του 15-25% των ασθενών με ΣΕΛ (120, 121). Αυτά έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση νεφρίτιδας του λύκου (122-124).

Η εμφάνιση των αυτοαντισωμάτων προηγείται της νόσου και συσχετίζεται με την έναρξη και τη βαρύτητα αυτής. Σε μελέτη ορών 130 ατόμων ασθενών με ΣΕΛ που είχαν ληφθεί πριν τη διάγνωση της νόσου (125) βρέθηκε ότι τουλάχιστον ένα από τα επτά μελετώμενα

αυτοαντισώματα (αντιπυρηνικά αντισώματα, αντί-dsDNA, αντί-Ro/SSA, αντί-La/SSB, αντί-Sm, αντί-snRNP, αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα) ανιχνεύονταν στο 88% των ατόμων πριν τη διάγνωση της νόσου. Μάλιστα, η πρώτη ενεργότητα ανιχνεύθηκε έως και 9.4 χρόνια πριν την έναρξη της νόσου, με το μέσο όρο ανίχνευσης να είναι 3.3 χρόνια πριν την έναρξη της νόσου. Τα ποσοστά εμφάνισης των μελετώμενων αυτοαντισωμάτων κατά τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου ήταν 78% για τα αντιπυρηνικά αντισώματα (σε αραιώση 1:120 ή περισσότερη), 55% για τα αντί-dsDNA, 47% για τα αντί-Ro/SSA, 34% για τα αντί-La/SSB, 32% για τα αντί-Sm, 26% για τα αντί-snRNP και 18% για τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Τα αυτοαντισώματα δεν εμφανίζονταν όλα ταυτόχρονα, υπονοώντας την επέκταση των αυτοάνοσων χημικών αποκρίσεων στο ΣΕΛ. Έτσι, τα αντιπυρηνικά, αντί-Ro/SSA, αντί-La/SSB και αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα εμφανίζονταν νωρίτερα (3.4 χρόνια πριν τη διάγνωση της νόσου κατά μέσο όρο) από τα αντί-Sm και αντί-snRNP (1.2 χρόνια πριν τη διάγνωση), ενώ τα αντί-dsDNA αντισώματα εντοπίζονταν κατά μέσο όρο 2.2 χρόνια πριν τη διάγνωση του ΣΕΛ. Ο ρυθμός εμφάνισης νέων αυτοαντισωμάτων αυξανόταν σταδιακά και ολοκληρωνόταν στη διάγνωση της νόσου, με τους ασθενείς να εμφανίζουν κατά μέσο όρο αυτοαντισώματα έναντι τριών διαφορετικών αυτοαντιγόνων κατά την έναρξη της νόσου. Το ποσοστό ατόμων που ανέπτυσαν αυτοαντισώματα κατά των Sm και snRNP άξανε δραματικά κατά τον τελευταίο χρόνο πριν τη διάγνωση με ΣΕΛ, υποδηλώνοντας ότι η εμφάνιση αυτών των αυτοαντισωμάτων ήταν προάγγελος της κλινικής έναρξης της νόσου.

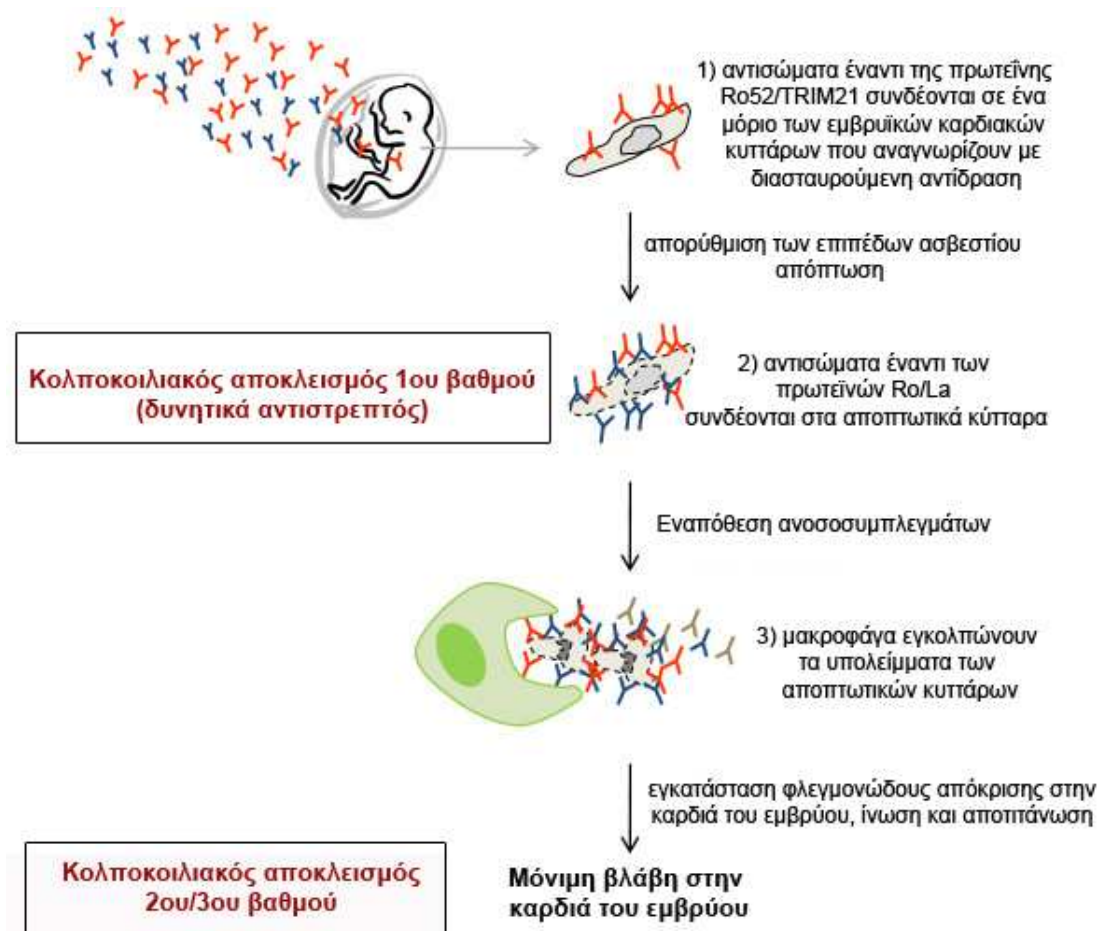
## **Σύνδρομο Νεογνικού Λύκου (ΣΝΛ)**

Το ΣΝΛ είναι μία αυτοάνοση διαταραχή που εμφανίζεται σε βρέφη των οποίων οι μητέρες έχουν αυτοαντισώματα έναντι των ριβονουκλεοπρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 ή/και La/SSB και πολύ σπάνια σε μητέρες θετικές μόνο για αντί-U1RNP αντισώματα (126). Αποτελεί τυπική διαταραχή παθητικά μεταφερόμενης αυτοανοσίας, όπου τα μητρικά αυτοαντισώματα, τα οποία μεταφέρονται μέσω του πλακούντα, προκαλούν ιστικές βλάβες στο έμβρυο. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου περιορίζονται στο δέρμα στο περίπου 50% των βρεφών με ΣΝΛ. Σε αυτές τις περιπτώσεις εμφανίζεται δερματικό εξάνθημα που προσομοιάζει στις βλάβες του υποξέος δερματικού ερυθματώδους λύκου κατά τη γέννα ή, συνηθέστερα, μερικές εβδομάδες μετά από αυτή (127). Οι βλάβες αυτές σχετίζονται με την παρουσία αντί-Ro52/TRIM21, αντί-Ro60/TROVE2 και αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων και παύουν να υφίστανται μετά τον έκτο μήνα ζωής που αναλώνονται τα μητρικά αντισώματα. Ιστοπαθολογικά είναι παρόμοιες με αυτές του υποξέος δερματικού ερυθματώδους λύκου και χαρακτηρίζονται από βλάβες της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, ήπιες περιαγγειακές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις και εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων (128). Ηπατική, αιματολογική ή νευρολογική συμμετοχή είναι σπάνια και επίσης παροδική.

Η πιο επικίνδυνη για το νεογνό εκδήλωση της νόσου είναι η ανάπτυξη **συγγενούς κολποκοιλιακού αποκλεισμού (ΣΚΑ)**. Αυτός σχετίζεται με φλεγμονή, αποτιτάνωση, ινωτικά φαινόμενα, εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στην καρδιά του εμβρύου και επακόλουθη παρεμπόδιση της μεταγωγής σήματος στον φλεβόκομβο. Οι κλινικές εκδηλώσεις του ΣΚΑ συνήθως εμφανίζονται ανάμεσα στη 18<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Η ανάπτυξη του ΣΚΑ είναι σταδιακή. Συνήθως είναι τρίτου βαθμού, ο οποίος είναι πλήρης, μη αντιστρεπτός, κολποκοιλιακός αποκλεισμός και εμφανίζει υψηλά

ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας (20-30%) (129, 130). Η πλειονότητα των νεογνών με ΣΚΑ χρειάζεται τοποθέτηση μόνιμου βηματοδότη (131, 132). Η παθογένεια του ΣΚΑ δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένη, αλλά γενικά θεωρείται ότι είναι μια σταδιακή διαδικασία που μεσολαβείται από τα μητρικά αυτοαντισώματα. Υπάρχουν δύο επικρατείς θεωρίες για το ρόλο των μητρικών αυτοαντισωμάτων στην ανάπτυξη του κολποκοιλιακού αποκλεισμού στο έμβρυο. Σύμφωνα με την πρώτη, τα μητρικά αυτοαντισώματα αντιδρούν διασταυρούμενα με τα κανάλια ασβεστίου L-τύπου στα μυοκαρδιακά κύτταρα του εμβρύου (μοριακή μίμηση) και προκαλούν απορύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση (133). Η άλλη υπόθεση υποστηρίζει πως κατά τη απόπτωση κυττάρων του μυοκαρδίου, η οποία συμβαίνει στα πλαίσια της αναδόμησης του καρδιακού ιστού, τα ενδοκυττάρια αυτοαντιγόνα Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB μετατοπίζονται στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων. Εκεί αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από τα μητρικά αυτοαντισώματα (134) καταλήγοντας στην οψωνινοποίηση των εμβρυικών μυοκαρδιακών αποπτωτικών κυττάρων. Αυτό οδηγεί σε μία προφλεγμονώδη/προϊνωτική απόκριση μεσολαβούμενη από μακροφάγα που καταλήγει σε ιστική βλάβη (Σχήμα 11) (135). Τελευταίες μελέτες υποδηλώνουν ότι η ύπαρξη χαμηλών τίτλων αντί-Ro/SSA



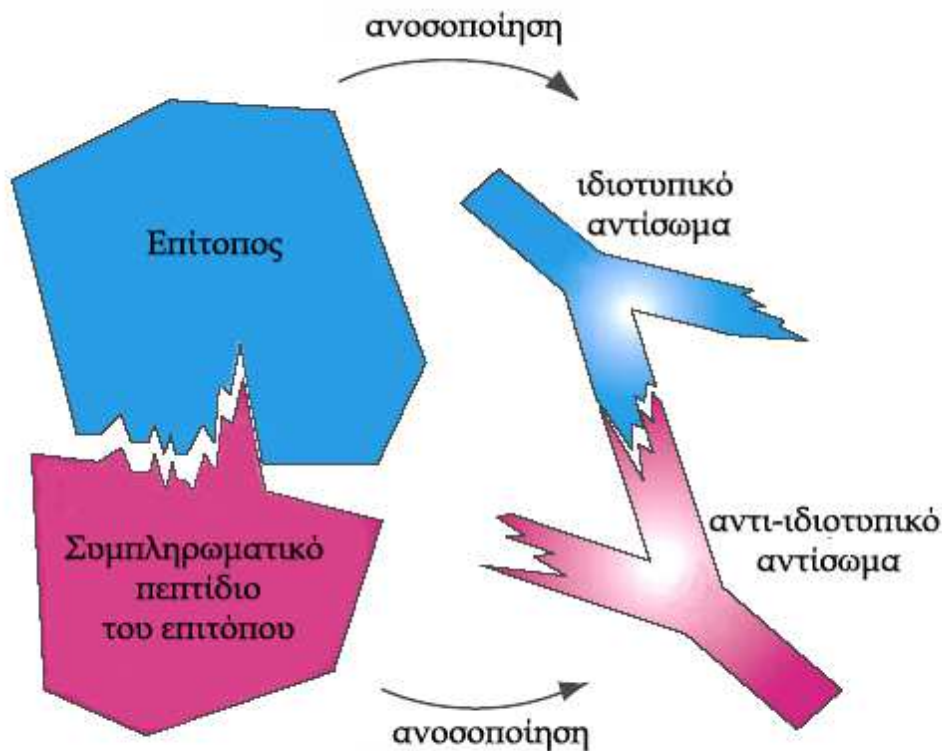


**Σχήμα 11.** Ένα μοντέλο δύο βημάτων για την ανάπτυξη ΣΚΑ. Αυτοαντισώματα της μητέρας μεταφέρονται στο έμβryo μέσω του πλακούντα κατά τη διάρκεια της κύησης. Στο πρώτο βήμα, αντισώματα έναντι της Ro52/TRIM21 αναγνωρίζουν με διασταυρούμενη αντίδραση ένα μόριο σε εμβρυϊκά καρδιακά κύτταρα, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές της αγωγιμότητας της καρδιάς, οι οποίες συνιστούν τον κολποκοιλιακό αποκλεισμό 1<sup>ου</sup> βαθμού. Η παρατεταμένη διατάραξη της ομοιόστασης του ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της απόπτωσης στην εμβρυϊκή καρδιά και σε επακόλουθη έκθεση/παρουσίαση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB σε κυκλοφορούντα μητρικά αυτοαντισώματα (2). Η εγκόλπωση των οψωνιοποιημένων υπολειμμάτων των αποπτωτικών κυττάρων από μακροφάγα μπορεί εν συνεχεία να οδηγήσει στην παραγωγή προφλεγμονωδών και προϊνωτικών κυτταροκινών. Αυτές, σε συνδυασμό με τις εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων και τη στρατολόγηση συστατικών του συμπληρώματος, προκαλούν μία εμμένουσα φλεγμονώδη απόκριση στην καρδιά του εμβρύου, και τελικά, μόνιμη βλάβη και πλήρη κολποκοιλιακό αποκλεισμό. Προσαρμοσμένο από Ambrosi et al., *Arthritis Res Ther*, 2012.

αυτοαντισωμάτων στη μητέρα δεν είναι ικανή να προκαλέσει κολποκοιλιακό αποκλεισμό. Για την εμφάνιση καρδιακών επιπλοκών απαιτείται υψηλός τίτλος αντί-Ro/SSA αυτοαντισωμάτων (136). Ένας παράγοντας που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΚΑ κατά 5% σε σχέση με τις μητέρες που έχουν αντί-Ro/SSA αυτοαντισώματα, είναι η ταυτόχρονη ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης La/SSB (137). Επιπλέον, εάν υπάρχει προηγούμενη κύηση εμβρύου με ΣΚΑ, το ποσοστό επανεμφάνισής της διαταραχής σε επόμενη κύηση αυξάνεται στο 17%. Από τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι τα μητρικά αυτοαντισώματα κατά των μορίων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 ή La/SSB έχουν σαφή παθογενετικό ρόλο στο ΣΚΑ. Τα χαμηλά ποσοστά του ΣΚΑ (2%) στις κύσεις μητέρων θετικών για αντί-Ro/SSA αυτοαντισώματα που κυοφορούν για πρώτη φορά ή έχουν προηγούμενη γέννηση υγιούς βρέφους (138) υπονοούν ότι και άλλοι μηχανισμοί λαμβάνουν μέρος. Την τελευταία δεκαετία έχει αναφερθεί η συσχέτιση συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών με τη νόσο (139, 140), ενώ έχουν προκύψει δεδομένα που υπονοούν την ύπαρξη επιπρόσθετων ρυθμιστικών μηχανισμών για την προστασία των εμβρύων από τη δράση των μητρικών αυτοαντισωμάτων

#### **Δίκτυο ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών (Ιδ/αντί-Ιδ) αντισωμάτων**

Πρόσφατα, προτάθηκε ότι η δημιουργία ενός δικτύου **ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών (Ιδ/αντί-Ιδ) αντισωμάτων** σε μητρικούς ορούς μπορεί να «αδρανοποιεί» τη δράση των παθογενετικών μητρικών αυτοαντισωμάτων (141). Η θεωρία της δημιουργίας δικτύου Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων προτάθηκε από τον βραβευμένο με Νόμπελ ανοσολόγο Niels Jerne τη δεκαετία του 1970 (142). Ο Jerne πρότεινε ότι τα αντισώματα μπορούν να δράσουν σαν αντιγόνα προάγοντας την παραγωγή αντισωμάτων που θα στρέφονται έναντι των περιοχών δέσμευσης του αντιγόνου των αρχικών αντισωμάτων. Τα τελευταία αντισώματα ονομάστηκαν «αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα» («ιδιότυποι» καλούνται οι



**Σχήμα 12.** Η ανοσοποίηση ζωικών προτύπων με ένα πεπτίδιο ενός επίτοπου οδηγεί στην παραγωγή τόσο ιδιοτυπικών αντισωμάτων έναντι του επίτοπου όσο και στην συνεπακόλουθη ανάπτυξη αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων τα οποία στρέφονται έναντι των αρχικών αντισωμάτων. Αντίστοιχα, η ανοσοποίηση ζωικών προτύπων με τα συμπληρωματικό πεπτίδιο του επίτοπου οδηγεί επίσης στην παραγωγή αντι-ιδιοτυπικών όσο και ιδιοτυπικών, για τον αρχικό επίτοπο, αντισωμάτων.

περιοχές δέσμευσης αντιγόνου ενός αντισώματος) (Σχήμα 12).

Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αναπτύσσεται μία ισορροπία στο ποσοστό των κυκλοφορούντων Ιδ και αντί-Ιδ αντισωμάτων, η οποία καταλήγει στην αδρανοποίηση των Ιδ αυτοαντισωμάτων από τα αντί-Ιδ και στην ελάττωση των χυμικών αυτοάνοσων αποκρίσεων. Η ύπαρξη αντί-Ιδ αντισωμάτων έναντι αυτοαντισωμάτων έχει αποδειχθεί στο ΣΕΛ (143) για τα αντί-dsDNA και στο σύνδρομο Sjögren (144) για τα αντί-La/SSB αυτοαντισώματα (145-148). Ειδικότερα για το σύνδρομο Sjögren, μελέτες που διεξήχθησαν κατά την τελευταία δεκαετία με τη χρήση συμπληρωματικών πεπτιδίων

έναντι του κύριου επιτόπου του αυτοαντιγόνου La/SSB (αμινοξέα 349-364 της πρωτεΐνης). Τα συμπληρωματικά πεπτίδια ενός επιτόπου έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τα αντί-Ιδ αντισώματα των Ιδ που στρέφονται έναντι του αρχικού επίτοπου, κι επομένως είναι χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη του δικτύου Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων (145, 146). Υπό αυτή την έννοια, τα συμπληρωματικά πεπτίδια του κύριου επίτοπου του αυτοαντιγόνου La/SSB θα δεσμεύουν τα αντίστοιχα αντί-Ιδ αντισώματα. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι: α) σε ορούς ασθενών με σύνδρομο Sjögren υπάρχει ένα ενεργό δίκτυο Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων της La/SSB (144), β) η ανοσοποίηση ζωικών προτύπων με τον κύριο επίτοπο της La/SSB ή με τα συμπληρωματικά του πεπτίδια προκαλεί την παραγωγή τόσο Ιδ όσο και αντί-Ιδ αντισωμάτων (147, 148), και γ) η ανίχνευση ενός σημαντικού ποσοστού αντισωμάτων έναντι του κύριου επίτοπου της La/SSB δεν είναι δυνατή με τις συμβατικές ανοσολογικές μεθόδους καθώς οι θέσεις δέσμευσής τους καλύπτονται από τα αντί-Ιδ αντισώματα (144). Επίσης, φαίνεται ότι και στο ΣΝΛ ειδικά αντί-Ιδ αντισώματα δημιουργούν δίκτυο με τα αντίστοιχα Ιδ μητρικά αυτοαντισώματα, εξουδετερώνοντας τη δράση τους και τη πρόκληση βλαβών στο έμβryo. Έτσι, δείχθηκε ότι μητέρες θετικές σε αντί-La/SSB αντισώματα που γέννησαν υγιές παιδί είχαν υψηλότερους τίτλους αντί-Ιδ αντισωμάτων, σε σχέση με τις μητέρες που γέννησαν παιδί με ΣΝΛ. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα αντί-Ιδ αντισώματα δρουν προστατευτικά, πιθανά δεσμεύοντας τα παθογενετικά αντί-La/SSB αντισώματα και παρεμποδίζοντας τη διέλευσή τους μέσω του πλακούντα στην εμβρυική κυκλοφορία (141). Επίσης, τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι η ταυτοποίηση των τίτλων των αντί-Ιδ αντισωμάτων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο για τη γέννηση παιδιού με ΣΝΛ. Η ανάπτυξη μεθόδων για την πρόβλεψη των «επικίνδυνων» κήσεων και θεραπευτικών μέσων για την αποφυγή του ΣΝΛ, και ιδιαίτερος του ΣΚΑ, ελκύει το επιστημονικό

ενδιαφέρον. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χορήγηση ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (ΕΦΑΣ) στην πρόληψη (149, 150) και θεραπεία (151, 152) του ΣΚΑ.

### **Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη (ΕΦΑΣ) και Τρόποι Δράσης**

Τα ενδοφλέβια χορηγούμενα σκευάσματα περιέχουν φυσικές, πολυκλωνικές, πολυδραστικές ανοσοσφαιρίνες, κυρίως τάξης γ, αλλά και σε μικρό ποσοστό (~1-2%) α και μ. Οι ανοσοσφαιρίνες προέρχονται από δεξαμενή ανοσοσφαιρινών από ~10.000 υγιείς δότες, οι οποίες υπόκεινται σε χημική ή θερμική κατεργασία για την καταστροφή τυχόν επιμολυνόντων παθογόνων, όπως οι ιοί της ηπατίτιδας Β, της ηπατίτιδας C και της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας. Η δεξαμενή αυτή των ανοσοσφαιρινών καλείται “φυσικά αντισώματα”, καθώς παράγονται απουσία ξένων αντιγόνων ή εσκεμμένης ανοσοποίησης των δοτών (153). Η ΕΦΑΣ αρχικά χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά σε ασθενείς με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες ως θεραπεία αναπλήρωσης αντισωμάτων (154). Στη συνέχεια, λόγω της ανοσοτροποποιητικής της δράσης χορηγήθηκε σε διάφορες αυτοάνοσες διαταραχές (155), με κυριότερη την αυτοάνοση θρομβοπενία όπου τα ποσοστά απόκρισης στη θεραπεία αγγίζουν το 75%. Από την πλειάδα των θεωρούμενων μηχανισμών δράσης της ΕΦΑΣ (156-158), δύο υπονοούν ότι θα μπορούσε να έχει προφυλακτική δράση για την αποτροπή του ΣΚΑ. Ο πρώτος αφορά στον κορεσμό των νεογνικών υποδοχέων του σταθερού τμήματος των γ-ανοσοσφαιρινών ( $Fc\gamma Rn$ ) που εντοπίζονται στον πλακούντα και βοηθούν στη μεταφορά των γ-ανοσοσφαιρινών από τη μητέρα στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Επιπλέον, αναστέλλουν τον καταβολισμό των γ-ανοσοσφαιρινών που είναι δεσμευμένες σε αυτούς. Επομένως, ο κορεσμός του συγκεκριμένου υποδοχέα από τις ανοσοσφαιρίνες της χορηγούμενης ΕΦΑΣ, θα μπορούσε να εμποδίζει τη μεταφορά των παθογενετικών μητρικών αντί-Ro52/TRIM21, αντί-Ro60/TROVE2 και αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων μέσω του

πλακούνται στους ιστούς του εμβρύου ή/και να προκαλεί τον αυξημένο καταβολισμό τους, αφού δεν θα είναι δεσμευμένες σε αυτούς (159, 160). Ο δεύτερος μηχανισμός δράσης αφορά στην προαγωγή των αντιφλεγμονωδών αποκρίσεων μέσω της αύξησης της έκφρασης του ανασταλτικού υποδοχέα του σταθερού τμήματος των  $\gamma$ - ανοσοσφαιρινών ΠΒ (Fc $\gamma$ RIIB) στα μακροφάγα (161, 162).

Σε αυτό το πλαίσιο, έγιναν δύο μεγάλες, παράλληλες, πολυκεντρικές, προοπτικές μελέτες, μία στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (149) και μία στην Ευρώπη (150), της δράσης της ΕΦΑΣ στην αντιμετώπιση του ΣΚΑ. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκαν μικρές δόσεις ΕΦΑΣ (400mg/kg σώματος) σε μητέρες θετικές για αντί-Ro/SSA αντισώματα και προηγούμενη γέννηση παιδιού με ΣΝΛ ανά τρεις εβδομάδες, από την 12<sup>η</sup> έως την 24<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά, αναφέρθηκε επανεμφάνιση προχωρημένου κολποκοιλιακού αποκλεισμού (2<sup>ο</sup> ή 3<sup>ο</sup> βαθμού) στο 18% του πληθυσμού (3 από τις 18 μητέρες στις ΗΠΑ και 3 από τις 15 στην Ευρώπη). Ένα πιθανό αίτιο για την αποτυχία προφυλακτικής δράσης της ΕΦΑΣ θεωρήθηκε η χαμηλή δόση στην οποία χορηγήθηκε, η οποία ήταν στο εύρος της δόσης της θεραπείας αναπλήρωσης αντισωμάτων (300-500 mg/kg σώματος), ενώ προτάθηκε ότι έπρεπε να δοθεί στις δόσεις που ευοδώνουν την αντιφλεγμονώδη δράση της (1-3 g/kg σώματος).

### **Σύνδρομο Sjögren**

Το σύνδρομο Sjögren είναι μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες (αναλογία γυναικών/ανδρών: 9/1) μέσης ηλικίας. Ανευρίσκεται στο 0.1-4.8% του πληθυσμού (163). Η νόσος χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που εκτείνονται από οργανοειδικές, όπως η βλάβη των εξωκρινών αδένων,

σε συστηματικές και νεοπλασία. Ο κύριος στόχος των αυτοάνοσων αποκρίσεων είναι οι εξωκρινείς αδένες, κυρίως οι σιελογόνοι και οι δακρυϊκοί, με αποτέλεσμα τα συνηθέστερα συμπτώματα να είναι η ξηροστομία και ξηροφθαλμία. Η δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων σχετίζεται με την ανάπτυξη περιεπιθηλιακών λεμφοκυτταρικών διηθήσεων. Οι εξωαδενικές εκδηλώσεις του συνδρόμου μπορούν αδρά να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες, αυτές που σχετίζονται με βλάβες παρεγχυματικών οργάνων (πνεύμονες, ήπαρ, νεφρά) και αυτές που οφείλονται σε εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων ή/και αγγειιτιδική συμμετοχή (πορφύρα, περιφερική νευρίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα) (10). Το σύνδρομο Sjögren εμφανίζεται είτε ως πρωτοπαθές, χωρίς άλλο υποκείμενο αυτοάνοσο νόσημα, είτε ως δευτεροπαθές, σε συνδυασμό με άλλες αυτοάνοσες νόσους, όπως ο ΣΕΛ, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η συστηματική σκλήρυνση. Γενικώς, θεωρείται ως καλοήθης νόσος με ήπια εξέλιξη, εκτός συγκεκριμένων περιπτώσεων όπου ο ασθενής παρουσιάζει σοβαρή συστηματική νόσο ή/και δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες για την ανάπτυξη λεμφώματος. Οι τελευταίοι είναι είτε κλινικοί (ύπαρξη ψηλαφητής πορφύρας, εμμένουσα διόγκωση των σιελογόνων αδένων, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία) ή ορολογικοί (χαμηλά επίπεδα του συστατικού C4 του συμπληρώματος, κρυσφαιριναιμία, ουδετεροπενία) (164, 165). Η πιο συχνή μορφή λεμφώματος στο σύνδρομο Sjögren είναι το Β-κυτταρικό MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue: λεμφικός ιστός που σχετίζεται με τους βλεννογόνους) λέμφωμα. Η επίπτωση του είναι περίπου 5%, ποσοστό που αυξάνει με το χρόνο παρακολούθησης, ενώ μαζί με τη σπειραματονεφρίτιδα αποτελούν τις κύριες αιτίες της αύξησης της θνητότητας του συνδρόμου (166).

Εκτός από την ανάπτυξη λεμφοκυτταρικών διηθήσεων στα προσβεβλημένα όργανα, το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από υπερδραστηριότητα των Β κυττάρων, όπως υποδηλώνεται

από την παρουσία υπεργαμμασφαιριναιμίας, καθώς και πληθώρας αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί άμεσος παθογενετικός ρόλος των αυτοαντισωμάτων στο σύνδρομο Sjögren. Τα αυτοαντισώματα έναντι των ριβονουκλεοπρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB κατέχουν εξέχοντα διαγνωστικό ρόλο. Τα κυριότερα αυτοαντισώματα που συναντώνται στο σύνδρομο, η επικράτησή τους στους ασθενείς, καθώς και οι κύριες κλινικές συσχετίσεις αυτών παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 και 2.



**Πίνακας 1.** Κύρια αυτοαντισώματα στο σύνδρομο Sjögren

<b>Αυτοαντισώματα</b>	<b>Συχνότητα Εμφάνισης (%)</b>
αντί-Ro52/TRIM21	66.7
αντί-Ro60/TROVE2	52.1
αντί-La/SSB	49
αντί-U1RNP	2
Ρευματοειδής Παράγων	36-74
Κρυσφαιρίνες	9-15
αντί-Κεντρομεριδίου (ACA)	4-17
αντί-Μιτοχονδριακά (AMA)	1.7-27
αντί-Λείων μυών	30
αντί-κυκλικών κιτρογλινοποιημένων πεπτιδίων (αντί-CCP)	3-10
αντί-Καλρετικουλίνης	20
αντί-Μουσκαρινικού υποδοχέα 3	11
αντί-καρβονικής ανυδράσης	12.5-20.8

**Πίνακας 2.** Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με κλινικά χαρακτηριστικά στο σύνδρομο Sjögren

<b>Αυτοαντισώματα</b>	<b>Κλινικές συσχετίσεις</b>
αντί-Ro52/TRIM21	<ul style="list-style-type: none"><li>• νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση και μεγαλύτερη διάρκεια νόσου</li><li>• υπολειτουργία εξωκρινών αδένων που επικυρώνεται από λειτουργικές δοκιμασίες</li></ul>
αντί-Ro60/TROVE2	<ul style="list-style-type: none"><li>• σοβαρή διήθηση των σιελογόνων αδένων</li><li>• διόγκωση των σιελογόνων αδένων</li><li>• εξωαδενικές εκδηλώσεις</li></ul>
αντί-La/SSB	<ul style="list-style-type: none"><li>• υπεργαμμασφαιριναιμία, κρυσφαιριναιμία</li><li>• Νεογνικός Λύκος-ΣΚΑ</li></ul>
αντί-U1RNP	σύνδρομο Sjögren επικαλυπτόμενο με ΜΝΣΙ
Ρευματοειδής Παράγων	<ul style="list-style-type: none"><li>• νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση</li><li>• εξωαδενικές εκδηλώσεις</li></ul>
Κρυσφαιρίνες	<ul style="list-style-type: none"><li>• νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση</li><li>• διόγκωση των σιελογόνων αδένων</li><li>• εξωαδενικές εκδηλώσεις</li><li>• MALT λέμφωμα</li><li>• Χαμηλό συμπλήρωμα</li><li>• υπεργαμμασφαιριναιμία</li></ul>
αντί-Κεντρομεριδίου (ACA)	<ul style="list-style-type: none"><li>• σύνδρομο Sjögren επικαλυπτόμενο με συστηματική σκλήρυνση</li><li>• Ήπια νόσος</li><li>• Αρνητική συσχέτιση αντί-Ro/SSA, αντί-La/SSB αντισώματα</li></ul>
αντί-Μιτοχονδριακά (AMA)	Πρωτοπαθής χολική κίρρωση
αντί-Λείων μυών	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα
αντί-κυκλικών κιτρογλινοποιημένων πεπτιδίων (αντί-CCP)	Αρθρικές εκδηλώσεις
αντί-Μουσκαρινικού υποδοχέα 3	Συμπτώματα ξηρότητας
αντί-καρβονικής ανυδράσης	Νεφρική σωληναριακή οξέωση

Το κύριο όργανο-στόχος των αυτοάνοσων αποκρίσεων στο σύνδρομο Sjögren είναι οι των επικουρικοί σιελογόνοι αδένες, η βιοψική εξέταση των οποίων έχει υψηλή διαγνωστική αξία. Η ευκολία λήψης του οργάνου-στόχου των αυτοάνοσων αποκρίσεων σε συνδυασμό με τα κλινικά χαρακτηριστικά καθιστούν το σύνδρομο Sjögren ως ιδανικό μοντέλο για την μελέτη της οργάνο-ειδικής και συστηματικής αυτοανοσίας, αλλά και της ανάπτυξης των αποκρίσεων έναντι των αυτοαντιγόνων και το μετασχηματισμό σε νεοπλασία.

**Αιτιοπαθογένεια.** Αν και τις τελευταίες δεκαετίες αρκετοί παθογενετικοί μηχανισμοί έχουν αποκαλυφθεί, η αιτιοπαθογένεια της νόσου δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Όπως και στα υπόλοιπα αυτοάνοσα νοσήματα γενετικοί, περιβαλλοντικοί, ορμονικοί και ψυχολογικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί. Ο σημαντικός ρόλος του γενετικού υπόβαθρου καταδεικνύεται από μελέτες σε οικογένειες ασθενών με σύνδρομο Sjögren που δείχνουν μεγαλύτερη επίπτωση του συνδρόμου και επικράτηση των ορολογικών χαρακτηριστικών του μεταξύ των μελών της οικογένειας συγκριτικά με μάρτυρες κανονικοποιημένους ως προς το φύλο και την ηλικία (10). Ακόμα, έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια με κυριότερα αυτά που κωδικοποιούν για τα μόρια του ΜΣΙ, HLA-B8, HLA-DW3 και HLA-DR3 (167, 168), μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγή και τη σηματοδότηση των ιντερφερονών τύπου I και II, όπως τα IRF5 και STAT4, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά εμφάνισης του συνδρόμου Sjögren (169-172).

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες, και κυρίως κάποια ιική μόλυνση, συμμετέχουν στην παθογένεια του συνδρόμου. Ιικές λοιμώξεις από συγκεκριμένους ιούς, όπως ο ιός της ηπατίτιδας C και της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, συσχετίζονται με την ανάπτυξη σιαλαδενίτιδας που προσομοιάζει

στο σύνδρομο Sjögren, αλλά δεν χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Κατά καιρούς διάφοροι ιοί, μεταξύ των οποίων ο ιός Epstein-Barr, ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ανθρώπινος ερπητοϊός 6 (HHV6) και 8 (HHV8), ο T λεμφοτρόπος ιός 1 (HTLV-1) και εντεροϊικές αλληλουχίες από ιούς Coxsackie έχουν ενοχοποιηθεί. Η υπερπαραγωγή ιντερφερονών τύπου I και II στους προσβεβλημένους σιελογόνους αδένες και στην περιφέρεια των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, κάτι που περιγράφεται ως «σφραγίδα ιντερφερόνης» (interferon signature) (64, 173), πλέον υποστηρίζει την συμμετοχή κάποιας ιικής μόλυνσης.

Η ισχυρά συχνότερη εμφάνιση του συνδρόμου σε γυναίκες, καθώς και η συχνή ανάπτυξή του μετά την εμμηνόπαυση συνηγορούν στην εμπλοκή ορμονικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένειά του. Επιπλέον, η συμμετοχή των ορμονών του φύλου στη παθογένεια του συνδρόμου υποστηρίζεται από πληθώρα μελετών. Έτσι, έχουν βρεθεί χαμηλότερα ποσοστά δεϋδροεπιανδροστερόνης σε ιστούς σιελογόνων αδένων από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren σε σχέση με μάρτυρες (174), ενώ η έλλειψη υποδοχέων οιστρογόνων σε ποντίκια τα προστατεύει από το να εμφανίσουν φαινότυπο που προσομοιάζει στο σύνδρομο Sjögren (175).

Τέλος, όσον αφορά στη συμβολή του ψυχολογικού παράγοντα, έχειδειχθεί ότι οι ασθενείς με σύνδρομο Sjögren σε αρμονία με δεδομένα που είναι γνωστά για άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, είχαν αντιμετωπίσει τουλάχιστον ένα δυσμενές, έντονα αγχωτικό γεγονός πριν την έναρξη της νόσου (176).

**Η ιστοπαθολογική βλάβη και ο ρόλος του επιθηλίου στην έναρξη και διαίωσιση των αυτοάνοσων αποκρίσεων.** Όπως προαναφέρθηκε, η δυσλειτουργία των προσβεβλημένων οργάνων στο σύνδρομο Sjögren σχετίζεται με την ανάπτυξη

περιεπιθηλιακών λεμφοκυτταρικών διηθήσεων ποικίλου βαθμού. Η σύσταση των διηθούτων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών ποικίλει ανάλογα με το βαθμό της διήθησης. Γενικά, οι φλεγμονώδεις διηθήσεις των σιελογόνων αδένων των ασθενών με σύνδρομο Sjögren αποτελούνται κυρίως από T και B κύτταρα. Σε ήπιες διηθήσεις επικρατούν τα T κύτταρα, ενώ στις σοβαρές τα B κύτταρα. Ο επικρατής T κυτταρικός υποπληθυσμός είναι τα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα, των οποίων το ποσοστό μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα από τη σοβαρότητα των διηθήσεων, σε αντίθεση με τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα τα οποία παραμένουν αμετάβλητα (177-180). Επιπλέον, μεταξύ των διηθούτων μονοπύρηνων κυττάρων υπάρχουν μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και NK-κύτταρα, η συχνότητα των οποίων συσχετίζεται με τη σοβαρότητα των βλαβών (178, 180-182). Πληθώρα κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων ιντερφερονών τύπου I και II και διαφόρων ιντερλευκινών, όπως η ιντερλευκίνη 12, 17 και 18, έχει περιγραφεί στις φλεγμονώδεις βλάβες των σιελογόνων αδένων των ασθενών με σύνδρομο Sjögren (10). Στην πλειονότητα των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις στους σιελογόνους αδένες είναι πλήρως σχηματισμένες κατά τη διάγνωση, ενώ το μέγεθος και η σύσταση τους δεν αλλάζουν με τη πάροδο του χρόνου. Εξαίρεση αποτελεί η ανάπτυξη MALT-λεμφώματος σε ασθενείς με δυσμενείς ορολογικούς δείκτες (183). Η διατήρηση της φλεγμονής υπονοεί ότι οι μηχανισμοί που πυροδοτούν και διατηρούν τις αυτοάνοσες αποκρίσεις στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren παραμένουν ενεργοί και σταθεροί. Παρά τις έντονες μελέτες, οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν αποκαλυφθεί. Θεωρείται, όμως, πλέον γενικώς αποδεκτό, ότι τα επιθήλια που είναι ο φλεγμένον ιστός στο σύνδρομο Sjögren παίζουν κεντρικό ρόλο στην προσέλκυση και διαιώνιση των φλεγμονωδών κυττάρων στα προσβεβλημένα όργανα. Μελέτες της τελευταίας εικοσαετίας, επιβεβαίωσαν τον κεντρικό ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στην ανορρήστρωση και διατήρηση των αυτοάνοσων αποκρίσεων του συνδρόμου

Sjögren, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, υποστηρίζοντας τη μετονομασία του συνδρόμου σε αυτοάνοση επιθηλιτίδα (184).

Η δυσλειτουργία των οργάνων στις αδενικές και εξωαδενικές (σε παρεγχυματικά όργανα) εκδηλώσεις στο σύνδρομο Sjögren συνδέονται με την ανάπτυξη περιεπιθηλιακών λεμφοκυτταρικών διηθήσεων. Συχνά μάλιστα παρατηρήθηκε ότι τα ανοσοκύτταρα ήταν σε άμεση γειτνίαση και συχνά διαπερνούσαν τις επιθηλιακές δομές, υποδηλώνοντας κάποιο είδους «επικοινωνίας» των διηθούτων ανοσοκυττάρων με τα επιθηλιακά κύτταρα (184). Ακόλουθες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων των ασθενών με σύνδρομο Sjögren εξέφραζαν πλήθος ανοσοδραστικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων μορίων του ΜΣΙ, συνδιεγερτικών μορίων της οικογενείας B7 και CD40, μορίων προσκόλλησης (ICAM-1/CD54, VCAM/CD106, E-selectin), αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, καθώς και διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών που συμμετέχουν στη στρατολόγηση, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων που διηθούν τον ιστό και στο σχηματισμό έκτοπων βλαστικών κέντρων (182, 185-200). Η μακρόχρονη καλλιέργεια μη νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων σιελογόνων αδένων (ΕΚΣΑ) από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και μάρτυρες σε ένα σύστημα όπου απουσιάζει η επίδραση των ανοσοκυττάρων και του φλεγμονώδους ιστικού μικροπεριβάλλοντος (201), κατέδειξε ότι τα ΕΚΣΑ των ασθενών εκφράζουν συστατικά όλα τα παραπάνω ανοσοδραστικά μόρια και μάλιστα σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από τα ΕΚΣΑ των μαρτύρων (185, 189, 194, 197, 202-206). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ΕΚΣΑ μπορούν να επικοινωνούν με τα ανοσοκύτταρα και να ρυθμίζουν την προσέλκυση, ενεργοποίηση και διαφοροποίησή τους. Επιπλέον, το μικροπεριβάλλον του ιστού θα μπορούσε να επηρεάσει περαιτέρω την έκφραση των

παραπάνω μορίων, όπως αποδεικνύεται από την εξωγενή χορήγηση κυτταροκινών ή διεγέρτες των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας σε ΕΚΣΑ (10, 207, 208). Η υψηλή έκφραση των ανοσοδραστικών μορίων στα ΕΚΣΑ των ασθενών με σύνδρομο Sjögren υποδεικνύει τη λειτουργία μηχανισμών ενδογενούς ενεργοποίησης σε αυτά, όπως περιγράφεται στην ανασκόπηση (208). Αν και οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι γνωστοί, η επιθηλιακή ενεργοποίηση θα μπορούσε να αποδοθεί σε μόνιμη ιική μόλυνση (208). Επιπλέον, τα ΕΚΣΑ φαίνεται ότι είναι κατάλληλα εξοπλισμένα για να μεσολαβούν στην παρουσίαση των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω απόπτωσης και απελευθέρωσης αποπτωτικών σωματίων εμπλουτισμένων σε αυτοαντιγόνα (209, 210) ή έκκρισης εξωσωματίων (exosomes) που περιέχουν αυτοαντιγόνα (211). Αυξημένος αποπτωτικός θάνατος των επιθηλιακών κυττάρων έχει ανιχνευθεί στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren (212), ενώ τα καλλιεργημένα ΕΚΣΑ των ασθενών εκφράζουν υψηλά ποσοστά λειτουργικών μορίων που σχετίζονται με αποπτωτικές διεργασίες, όπως τα Fas και ο συνδέτης του Fas-Ligand (213, 214). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ισχυρή επιφανειακή έκφραση από τα ΕΚΣΑ λειτουργικών υποδοχέων TLR3, η σηματοδότηση μέσω των οποίων οδηγεί στον αποπτωτικό θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων μέσω ανοικίας (απόπτωσης που οφείλεται στην αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα) (215), υποδηλώνοντας τη συμμετοχή του μονοπατιού αυτού στην αυξημένη in-situ απόπτωση των επιθηλίων στο σύνδρομο Sjögren. Η έκκριση εξωσωματίων αποτελεί ένα φυσιολογικό μονοπάτι διακυτταρικής επικοινωνίας όλων των τύπων κυττάρων. Τα εξωσωμάτια είναι μικρά οργανίδια (30-100 nm) που προέρχονται από τη σύντηξη ενδοσωμάτων ή λυσοσωμάτων με την κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία, τη μεταφορά ή/και την απόρριψη κυτταρικού υλικού (216). Τα εξωσωμάτια που απομονώθηκαν από τη σίελο ασθενών με σύνδρομο Sjögren περιείχαν χαρακτηριστικό

πρότυπο έκφρασης miRNAs σε σύγκριση με αυτά της σιέλου υγιών μαρτύρων (217), ενώ αυτά που εκκρίνονται από τα καλλιεργημένα ΕΚΣΑ περιέχουν τα αυτοαντιγόνα Ro60/TROVE2, Ro52/TRIM21, La/SSB και Sm (211). Εξωσωμάτια πλούσια σε αυτοαντιγόνα παράγονταν εξίσου από ΕΚΣΑ ασθενών με σύνδρομο Sjögren και μαρτύρων, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για φυσιολογική διεργασία που πιθανά συμμετέχει στη διατήρηση της αυτοανοχής υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής, όπως ισχύει στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren αυτά θα μπορούσαν να δράσουν ως ανοσογόνα και να παρουσιάζουν τα αυτοαντιγόνα στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Πρόσφατη μελέτη σε ποντίκια κατέδειξε το σημαντικό ρόλο των ιστικών επιθηλίων στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων (218). Η μελέτη αυτή έγινε σε ποντίκια από τα οποία έλειπε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη IκB-ζ. Η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB ο οποίος με τη σειρά του επάγει τη μεταγραφή διάφορων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μεταξύ των οποίων και ιντερφερόνες. Τα ποντίκια αυτά παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων των δακρυϊκών τους αδένων κι έναν φλεγμονώδη φαινότυπο που ομοιάζει στο σύνδρομο Sjögren, με δακρυοαδενίτιδα κι εμφάνιση λεμφοκυτταρικών διηθήσεων στον ιστό. Επιπρόσθετα, υπήρχε παραγωγή αντί-Ro/A και αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων, παρουσιάζοντας με αυτό τον τρόπο μία *in vivo* θεώρηση του πώς μπορεί η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων να εκκινήσει την τοπική φλεγμονή, την προσέλκυση λεμφοκυττάρων στον ιστό και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο Sjögren.

**Οι προσβεβλημένοι σιελογόνοι αδένες είναι περιοχές παραγωγής αυτοαντισωμάτων.**

Η ύπαρξη έντονα φλεγμονωδών διεργασιών στους εξωκρινείς αδένες ασθενών με



σύνδρομο Sjögren μαζί με τη δράση των επιθηλιακών κυττάρων σαν μη επαγγελματικά ΑΠΚ *in situ* οδήγησαν στη θεωρία ότι οι σιελογόνοι αδένες θα μπορούσαν να είναι περιοχές αντιγονοπαρουσίασης και, επομένως, θέσεις έναρξης και διαιώνισης των αυτοάνοσων αποκρίσεων. Πράγματι, οι προσβεβλημένοι εξωκρινείς αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren φαίνεται να είναι περιοχές παραγωγής αυτοαντισωμάτων, γεγονός που υποστηρίζεται από τα ακόλουθα:

1. Η σίελος των ασθενών με σύνδρομο Sjögren περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ανοσοσφαιρινών IgG και επιπλέον, αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων (219-221). Επιπλέον, η συγκέντρωση των αυτοαντισωμάτων αυτών στη σίελο των ασθενών με σύνδρομο Sjögren συσχετίστηκε ισχυρά με τον αριθμό των εστιακών διηθήσεων στον ιστό (220), ενισχύοντας την πεποίθηση της ύπαρξης στενής σχέσης μεταξύ της παραγωγής αυτοαντισωμάτων και της τοπικής φλεγμονής στους σιελογόνους αδένες.
2. Οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις των σιελογόνων αδένων στο 25% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren οργανώνονται σε δομές που προσομοιάζουν σε έκτοπα βλαστικά κέντρα (181, 222, 223). Αυτές εμφανίζουν παρόμοια οργάνωση με αυτή των βλαστικών κέντρων που υπάρχουν σε δευτερογενή λεμφικά όργανα, με τα B κύτταρα και τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα να ανευρίσκονται κεντρικά και τα T κύτταρα στην περιφέρεια (181).
3. Μεγάλος αριθμός διηθούντων πλασματοκυττάρων που παράγουν αντί-Ro52/TRIM21, αντί-Ro60/TROVE2 και αντί-La/SSB αυτοαντισώματα παρατηρείται στις φλεγμονώδεις βλάβες των σιελογόνων αδένων των ασθενών με σύνδρομο Sjögren (199, 224).

4. Η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων οδηγεί στη μετατόπιση των πυρηνικών αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη (210), μετατρέποντάς τα ορατά από το ανοσοποιητικό σύστημα. Όπως προαναφέρθηκε, στα πλαίσια των έντονων αποπτωτικών φαινομένων που παρατηρούνται στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren (212), το φαινόμενο αυτό αποτελεί έναν πολύ πιθανό μηχανισμό ανάπτυξης αποκρίσεων έναντι των αυτοαντιγόνων στο σύνδρομο.

Η υπερπαραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και κυτταροκινών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και επιβίωση των διηθούντων Β-κυττάρων, όπως του BAFF, στις φλεγμονώδεις βλάβες των σιελογόνων αδένων των ασθενών με σύνδρομο Sjögren πιθανά συμμετέχουν στην ευόδωση της τοπικής παραγωγής των αυτοαντισωμάτων.

## Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα εργασία εστιάζεται στη ρύθμιση των χυμικών αυτοάνοσων αποκρίσεων στα αυτοάνοσα νοσήματα. Η μελέτη της επέκτασης και της ρύθμισης των αποκρίσεων έναντι ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων, καθώς και της έκφρασης αυτών πραγματοποιήθηκε σε τυπικά νοσήματα που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ειδικών αυτοαντισωμάτων, όπως ο ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren, και στα οποία τα αυτοαντισώματα έχουν αποδεδειγμένα παθογενετικό ρόλο, όπως το ΣΝΛ.

▪ Το πρώτο ερώτημα που εξετάστηκε αφορά τους μηχανισμούς διαμοριακής επέκτασης των χυμικών αποκρίσεων από το ένα αυτοαντιγόνο στο άλλο. Ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι χυμικές αυτοάνοσες αποκρίσεις επεκτείνονται σε γειτονικούς επίτοπους του ίδιου αντιγόνου (ενδομοριακή επέκταση) ή διαφορετικών αντιγονικών μορίων που συνδέονται σε σύμπλοκο (διαμοριακή επέκταση), δεν είναι γνωστό αν μπορούν να επεκτείνονται και σε αντιγόνα που εντοπίζονται σε διαφορετικά σύμπλοκα/σωμάτια (particles), τα οποία δεν συνδέονται φυσικά μεταξύ τους (διασωματιακή επέκταση). Όπως προαναφέρθηκε, οι αυτοάνοσες αποκρίσεις στο ΣΕΛ στρέφονται κυρίως έναντι των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων Ro/La και του ματισώματος U1-snRNP. Η χαρτογράφηση των επιτόπων των αντιγόνων αυτών πρωτεϊνών αποκάλυψε ότι αρκετοί από αυτούς εδράζονται σε συντηρημένες περιοχές δέσμευσης του RNA των πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε να διερευνήσουμε την πιθανότητα του να είναι οι αλληλουχίες αυτές που μεσολαβούν στη «μεταπήδηση» των χυμικών αποκρίσεων από το ένα σωματίο στο άλλο. Προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη της διασωματιακής επέκτασης των αυτοάνοσων αποκρίσεων από το ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο σε άλλο, μελετήθηκε η δυνατότητα της περιοχής MAR της ριβονουκλεοπρωτεΐνης La/SSB, η οποία έχει μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες δομές MAR των πρωτεϊνών του

ματισώματος, να επάγει αυτοαντισώματα έναντι του U1-snRNP. Για το σκοπό αυτό ανοσοποιήθηκαν λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας με ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στον επίτοπο της δομής MAR του αυτοαντιγόνου La/SSB και εξετάστηκε η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του U1-snRNP, ενώ ελέγχθηκε και η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι των περιοχών MAR των δυο αυτοαντιγόνων στον άνθρωπο.

▪ Το δεύτερο αντικείμενο της διατριβής ήταν η λειτουργική μελέτη και η θεραπευτική δυναμική του ιδιοτυπικού/αντί-ιδιοτυπικού δικτύου αντισωμάτων στο νεογνικό λύκο. Πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριό μας υποστηρίζουν την αδρανοποίηση των αυτοαντισωμάτων έναντι της ριβονουκλεοπρωτεΐνης La/SSB με τη δημιουργία ενός δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων (144). Μάλιστα, η δημιουργία του δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων φαίνεται να δρα προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης ΣΝΛ στο κυοφορούμενο έμβρυο, παρεμποδίζοντας την παθογενετική δράση των ιδιοτυπικών αντί-La/SSB αντισωμάτων (141). Σε μια προσπάθεια να προληφθεί η εμφάνιση ΣΝΛ, πραγματοποιήθηκαν δύο πολυκεντρικές μελέτες (149, 150) όπου χορηγήθηκαν ως προφυλακτική θεραπεία για την ανάπτυξη ΣΚΑ, χαμηλές δόσεις ΕΦΑΣ σε μητέρες που είχαν ιστορικό γέννησης παιδιού με νεογνικό λύκο. Στο πλαίσιο της ανοσορρυθμιστικής δράσης της ΕΦΑΣ και της ύπαρξης σε αυτή φυσικών αυτοαντισωμάτων και δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων, ελέγχθηκε στις μητέρες που συμμετείχαν στις δύο μελέτες η επίδραση της θεραπείας με ΕΦΑΣ στο δίκτυο ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης La/SSB. Έτσι, ελέγχθηκε η ενεργότητα των ιδιοτυπικών και αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης La/SSB σε σειριακούς ορούς των εγκύων μητέρων που λάμβαναν ΕΦΑΣ, αναλύθηκε η μεταβολή των τίτλων τους κατά τη διάρκεια της θεραπείας και συσχετίστηκε με διάφορους παράγοντες, όπως η πορεία της εγκυμοσύνης

και η περιεκτικότητα των παρασκευασμάτων ανοσοσφαιρίνης σε ιδιοτυπικά/αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα.

▪ Στο τρίτο μέρος της παρούσας διατριβής, διερευνήθηκε ο ρόλος της σηματοδότησης μέσω υποδοχέων της φυσικής ανοσίας στην έκφραση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών της φυσικής ανοσίας οδηγεί στην υπερέκφραση πολλών ανοσοδραστικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και ιντερφερονών. Οι τελευταίες έχει αναφερθεί ότι επάγουν την έκφραση του αυτοαντιγόνου Ro52/TRIM21, το οποίο στη συνέχεια με τη δράση του ως E3-λιγάση της ουβικιτίνης συμμετέχει στον έλεγχο και τερματισμό των μεσολαβούμενων από τις ιντερφερόνες αποκρίσεων. Στα επιθήλια και τις διηθήσεις των σιελογόνων αδένων των ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση των αντιγονικών μορίων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB (199, 200). Αυτή θεωρείται ότι συμμετέχει στη παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη των αυτοάνοσων χυμικών αποκρίσεων του συνδρόμου. Όπως περιγράφηκε, τα επιθηλιακά κύτταρα κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ανοχή και διατήρηση των αυτοάνοσων αποκρίσεων στο σύνδρομο Sjögren. Μακροχρόνια καλλιεργημένα, μη νεοπλασματικά, ΕΚΣΑ από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης, μεταξύ των οποίων η έκφραση του υποδοχέα της φυσικής ανοσίας TLR3, χάρει ιδιαίτερης προσοχής. Εμφανίζει υψηλή επιφανειακή έκφραση και η σηματοδότηση μέσω αυτού προκαλεί αποπτωτικό θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων λόγω ανοικίας. Επίσης, ενεργοποίηση του TLR3 στα ΕΚΣΑ οδηγεί στην παραγωγή ιντερφερονών τύπου I, οι οποίες θα μπορούσαν επακόλουθα να δρουν ως ενισχυτές της έκφρασης των αυτοαντιγόνων. Έτσι, διερευνήθηκε η επίδραση της ενεργοποίησης των υποδοχέων της

φυσικής ανοσίας TLR, με έμφαση στον TLR3, στην έκφραση και εντόπιση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ**

1. Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43(3):203-48.
2. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992;358(6382):155-7.
3. James JA, Harley JB. B-cell epitope spreading in autoimmunity. *Immunol Rev* 1998;164:185-200.
4. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006;24:571-606.
5. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2006;6(10):728-40.
6. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 2009;27:363-91.
7. Sjostrand M, Ambrosi A, Brauner S, Sullivan J, Malin S, Kuchroo VK, et al. Expression of the immune regulator tripartite-motif 21 is controlled by IFN regulatory factors. *J Immunol* 2013;191(7):3753-63.
8. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun* 2012;38(2-3):J109-19.
9. Sammaritano LR. Menopause in patients with autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2012;11(6-7):A430-6.
10. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):4-8.
11. Bach JF. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:74-80.
12. Chervonsky AV. Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol* 2011;11(1):28-35.
13. Barzilai O, Ram M, Shoenfeld Y. Viral infection can induce the production of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(6):636-43.
14. Fourneau JM, Bach JM, van Endert PM, Bach JF. The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Mol Immunol* 2004;40(14-15):1095-102.
15. Routsias JG, Kyriakidis N, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med* 2010;16(1-2):19-26.
16. Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM, et al. Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol* 2000;121(3):551-6.
17. McClain MT, Scofield RH, Kurien BT, Gross TF, James JA. Selective small antigenic structures are capable of inducing widespread autoimmunity which closely

mimics the humoral fine specificity of human SLE. *Scand J Immunol* 2002;56(4):399-407.

18. Lindop R, Arentz G, Thurgood LA, Reed JH, Jackson MW, Gordon TP. Pathogenicity and proteomic signatures of autoantibodies to Ro and La. *Immunol Cell Biol* 2012;90(3):304-9.

19. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.

20. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, Baer A, Challacombe S, Lanfranchi H, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(4):475-87.

21. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25(11):1271-7.

22. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61(6):554-8.

23. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N, et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987;317(5):265-71.

24. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum* 1990;33(5):634-43.

25. Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 1981;211(4480):400-2.

26. Wolin SL, Steitz JA. The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(7):1996-2000.

27. Fouraux MA, Bouvet P, Verkaart S, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* 2002;320(3):475-88.

28. Cheng ST, Nguyen TQ, Yang YS, Capra JD, Sontheimer RD. Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *J Immunol* 1996;156(11):4484-91.

29. Ben-Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988;167(5):1560-71.

30. Slobbe RL, Pluk W, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J Mol Biol* 1992;227(2):361-6.



31. Verhagen AP, Pruijn GJ. Are the Ro RNP-associated Y RNAs concealing microRNAs? Y RNA-derived miRNAs may be involved in autoimmunity. *Bioessays* 2011;33(9):674-82.
32. Maraia R, Sakulich AL, Brinkmann E, Green ED. Gene encoding human Ro-associated autoantigen Y5 RNA. *Nucleic Acids Res* 1996;24(18):3552-9.
33. Kelly KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J, et al. "Endogenous adjuvant" activity of the RNA components of lupus autoantigens Sm/RNP and Ro 60. *Arthritis Rheum* 2006;54(5):1557-67.
34. Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 1975;55(5):1067-73.
35. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB, Jr. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969;102(1):117-22.
36. Mattioli M, Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum* 1974;17(4):421-9.
37. Ben-Chetrit E, Fox RI, Tan EM. Dissociation of immune responses to the SS-A (Ro) 52-kd and 60-kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990;33(3):349-55.
38. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* 2001;20(9):2140-51.
39. Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 1991;87(1):68-76.
40. Nardi N, Brito-Zeron P, Ramos-Casals M, Aguiló S, Cervera R, Ingelmo M, et al. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin Rheumatol* 2006;25(3):341-6.
41. Patarca R, Freeman GJ, Schwartz J, Singh RP, Kong QT, Murphy E, et al. rpt-1, an intracellular protein from helper/inducer T cells that regulates gene expression of interleukin 2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(8):2733-7.
42. Takahashi M, Inaguma Y, Hiai H, Hirose F. Developmentally regulated expression of a human "finger"-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene. *Mol Cell Biol* 1988;8(4):1853-6.
43. Peek R, Pruijn GJ, van der Kemp AJ, van Venrooij WJ. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci* 1993;106 ( Pt 3):929-35.
44. Simons FH, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol* 1994;125(5):981-8.

45. Pourmand N, Blange I, Ringertz N, Pettersson I. Intracellular localisation of the Ro 52kD auto-antigen in HeLa cells visualised with green fluorescent protein chimeras. *Autoimmunity* 1998;28(4):225-33.
46. Espinosa A, Oke V, Elfving A, Nyberg F, Covacu R, Wahren-Herlenius M. The autoantigen Ro52 is an E3 ligase resident in the cytoplasm but enters the nucleus upon cellular exposure to nitric oxide. *Exp Cell Res* 2008;314(20):3605-13.
47. Oke V, Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):77-82.
48. Chan EK, Di Donato F, Hamel JC, Tseng CE, Buyon JP. 52-kD SS-A/Ro: genomic structure and identification of an alternatively spliced transcript encoding a novel leucine zipper-minus autoantigen expressed in fetal and adult heart. *J Exp Med* 1995;182(4):983-92.
49. Kong HJ, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Tailor P, et al. Cutting edge: autoantigen Ro52 is an interferon inducible E3 ligase that ubiquitinates IRF-8 and enhances cytokine expression in macrophages. *J Immunol* 2007;179(1):26-30.
50. Sabile A, Meyer AM, Wirbelauer C, Hess D, Kogel U, Scheffner M, et al. Regulation of p27 degradation and S-phase progression by Ro52 RING finger protein. *Mol Cell Biol* 2006;26(16):5994-6004.
51. Wada K, Kamitani T. UnpEL/Usp4 is ubiquitinated by Ro52 and deubiquitinated by itself. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(1):253-8.
52. Wada K, Tanji K, Kamitani T. Oncogenic protein UnpEL/Usp4 deubiquitinates Ro52 by its isopeptidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(3):731-6.
53. Yoshimi R, Chang TH, Wang H, Atsumi T, Morse HC, 3rd, Ozato K. Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts. *J Immunol* 2009;182(12):7527-38.
54. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* 2009;206(8):1661-71.
55. Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(10):799-808.
56. Yap MW, Nisole S, Lynch C, Stoye JP. Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29):10786-91.
57. McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol* 2011;23(1):46-56.
58. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 1983;258(13):8206-14.
59. Clague MJ, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* 2010;143(5):682-5.
60. Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K, et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol* 2006;176(10):6277-85.

61. Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(1):415-21.
62. Higgs R, Lazzari E, Wynne C, Ni Gabhann J, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, et al. Self protection from anti-viral responses--Ro52 promotes degradation of the transcription factor IRF7 downstream of the viral Toll-Like receptors. *PLoS One* 2010;5(7):e11776.
63. Higgs R, Ni Gabhann J, Ben Larbi N, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* 2008;181(3):1780-6.
64. Hall JC, Casciola-Rosen L, Berger AE, Kapsogeorgou EK, Cheadle C, Tzioufas AG, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(43):17609-14.
65. Yoshimi R, Ishigatsubo Y, Ozato K. Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Rheumatol* 2012;2012:718237.
66. Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Yamochi T, Iwata S, et al. SS-A/Ro52, an autoantigen involved in CD28-mediated IL-2 production. *J Immunol* 2003;170(7):3653-61.
67. Buyon JP, Slade SG, Reveille JD, Hamel JC, Chan EK. Autoantibody responses to the "native" 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndromes, systemic lupus erythematosus, and Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1994;152(7):3675-84.
68. James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(15):6200-5.
69. Rhodes DA, Trowsdale J. TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain. *Mol Immunol* 2007;44(9):2406-14.
70. Yang Y, Eversole T, Lee DJ, Sontheimer RD, Capra JD. Protein-protein interactions between native Ro52 and immunoglobulin G heavy chain. *Scand J Immunol* 1999;49(6):620-8.
71. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(46):19985-90.
72. McEwan WA, Mallery DL, Rhodes DA, Trowsdale J, James LC. Intracellular antibody-mediated immunity and the role of TRIM21. *Bioessays* 2011;33(11):803-9.
73. Blange I, Ringertz NR, Pettersson I. Identification of antigenic regions of the human 52kD Ro/SS-A protein recognized by patient sera. *J Autoimmun* 1994;7(2):263-74.
74. Dorner T, Feist E, Wagenmann A, Kato T, Yamamoto K, Nishioka K, et al. Anti-52 kDa Ro(SSA) autoantibodies in different autoimmune diseases preferentially recognize epitopes on the central region of the antigen. *J Rheumatol* 1996;23(3):462-8.

75. Kato T, Sasakawa H, Suzuki S, Shirako M, Tashiro F, Nishioka K, et al. Autoepitopes of the 52-kd SS-A/Ro molecule. *Arthritis Rheum* 1995;38(7):990-8.
76. Salomonsson S, Dorner T, Theander E, Bremme K, Larsson P, Wahren-Herlenius M. A serologic marker for fetal risk of congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2002;46(5):1233-41.
77. Salomonsson S, Sonesson SE, Ottosson L, Muhallab S, Olsson T, Sunnerhagen M, et al. Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. *J Exp Med* 2005;201(1):11-7.
78. Chen X, Wolin SL. The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J Mol Med (Berl)* 2004;82(4):232-9.
79. Stein AJ, Fuchs G, Fu C, Wolin SL, Reinisch KM. Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. *Cell* 2005;121(4):529-39.
80. Bateman A, Kickhoefer V. The TROVE module: a common element in Telomerase, Ro and Vault ribonucleoproteins. *BMC Bioinformatics* 2003;4:49.
81. Chen X, Quinn AM, Wolin SL. Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2000;14(7):777-82.
82. Xue D, Shi H, Smith JD, Chen X, Noe DA, Cedervall T, et al. A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7503-8.
83. Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Epitope mapping of the Ro/SSA60KD autoantigen reveals disease-specific antibody-binding profiles. *Eur J Clin Invest* 1996;26(6):514-21.
84. Routsias JG, Sakarellos-Daitsiotis M, Tsikaris V, Sakarellos C, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Structural, molecular and immunological properties of linear B-cell epitopes of Ro60KD autoantigen. *Scand J Immunol* 1998;47(3):280-7.
85. Chambers JC, Kenan D, Martin BJ, Keene JD. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol Chem* 1988;263(34):18043-51.
86. Maraia RJ, Intine RV. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* 2001;21(2):367-79.
87. Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annu Rev Biochem* 2002;71:375-403.
88. Routsias JG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta* 2004;340(1-2):1-25.
89. Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Lejbkowitz F, Kenan DJ, Chan EK, et al. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol* 1993;67(7):3798-807.
90. Intine RV, Tenenbaum SA, Sakulich AL, Keene JD, Maraia RJ. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol Cell* 2003;12(5):1301-7.

91. Liang C, Xiong K, Szulwach KE, Zhang Y, Wang Z, Peng J, et al. Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition. *J Biol Chem* 2012;288(1):723-36.
92. Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos-Daitsiotis M, Routsias JG, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping, and characterization. *Clin Exp Immunol* 1997;108(2):191-8.
93. van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr Opin Immunol* 1995;7(6):819-24.
94. Mura C, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg DS. The crystal structure of a heptameric archaeal Sm protein: Implications for the eukaryotic snRNP core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(10):5532-7.
95. Henriksson EW, Pettersson I. Autoepitope-mapping of the U1-70K protein with human-Drosophila chimeric proteins. *J Autoimmun* 1997;10(6):559-68.
96. Welin Henriksson E, Wahren-Herlenius M, Lundberg I, Mellquist E, Pettersson I. Key residues revealed in a major conformational epitope of the U1-70K protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(25):14487-92.
97. James JA, Harley JB. Peptide autoantigenicity of the small nuclear ribonucleoprotein C. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13(3):299-305.
98. Rokeach LA, Hoch SO. B-cell epitopes of Sm autoantigens. *Mol Biol Rep* 1992;16(3):165-74.
99. Williams DG, Sharpe NG, Wallace G, Latchman DS. A repeated proline-rich sequence in Sm B/B' and N is a dominant epitope recognized by human and murine autoantibodies. *J Autoimmun* 1990;3(6):715-25.
100. Pettersson I. Methods of epitope mapping. *Mol Biol Rep* 1992;16(3):149-53.
101. Vlachoyiannopoulos PG, Karassa FB, Karakostas KX, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Systemic lupus erythematosus in Greece. Clinical features, evolution and outcome: a descriptive analysis of 292 patients. *Lupus* 1993;2(5):303-12.
102. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 1974;134(6):1027-35.
103. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003;82(5):299-308.
104. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39(4):257-68.
105. Bronson PG, Chaivorapol C, Ortmann W, Behrens TW, Graham RR. The genetics of type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 2012;24(5):530-7.
106. Delgado-Vega A, Sanchez E, Lofgren S, Castillejo-Lopez C, Alarcon-Riquelme ME. Recent findings on genetics of systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2010;22(6):698-705.

107. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(12):683-92.
108. Taylor KE, Chung SA, Graham RR, Ortmann WA, Lee AT, Langefeld CD, et al. Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet* 2011;7(2):e1001311.
109. Craft JE. Dissecting the immune cell mayhem that drives lupus pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011;3(73):73ps9.
110. Kimberly RP. Immune complexes in the rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 1987;13(3):583-96.
111. Munoz LE, Gaipl US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, et al. SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(9):1101-7.
112. Schiffer L, Sinha J, Wang X, Huang W, von Gersdorff G, Schiffer M, et al. Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. *J Immunol* 2003;171(1):489-97.
113. Swaak A, Smeenk R. Clinical aspects of antibodies to double-stranded DNA. *Autoantibody Manual* 1996;C2.1:1-17.
114. Smeenk R, Hylkema M. Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. *Mol Biol Rep* 1992;17(1):71-9.
115. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, Arnett FC, Bias WB, Provost TT, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine (Baltimore)* 1985;64(5):285-95.
116. Andonopoulos AP, Skopouli FN, Dimou GS, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990;17(2):201-4.
117. Moutsopoulos HM, Klippel JH, Pavlidis N, Wolf RO, Sweet JB, Steinberg AD, et al. Correlative histologic and serologic findings of sicca syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1980;23(1):36-40.
118. Craft JE, Hardin JA. Lupus Erythematosus. 1993:216-224.
119. Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M, Bauer R, Bieber T, Boehm I. Antibodies targeting extractable nuclear antigens: historical development and current knowledge. *Br J Dermatol* 2001;145(6):859-67.
120. Field M, Williams DG, Charles P, Maini RN. Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using purified peptide antigens. *Ann Rheum Dis* 1988;47(10):820-5.
121. Sanchez-Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, Schur PH. Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39(6):1055-61.
122. Barada FA, Jr., Andrews BS, Davis JSt, Taylor RP. Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation of Sm antibody titers with disease activity and other laboratory parameters. *Arthritis Rheum* 1981;24(10):1236-44.

123. Homma M, Mimori T, Takeda Y, Akama H, Yoshida T, Ogasawara T, et al. Autoantibodies to the Sm antigen: immunological approach to clinical aspects of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol Suppl* 1987;14 Suppl 13:188-93.
124. Winn DM, Wolfe JF, Lindberg DA, Fristoe FH, Kingsland L, Sharp GC. Identification of a clinical subset of systemic lupus erythematosus by antibodies to the SM antigen. *Arthritis Rheum* 1979;22(12):1334-7.
125. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349(16):1526-33.
126. Sheth AP, Esterly NB, Ratoosh SL, Smith JP, Hebert AA, Silverman E. U1RNP positive neonatal lupus erythematosus: association with anti-La antibodies? *Br J Dermatol* 1995;132(4):520-6.
127. Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P, Gilliam JN. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982;97(5):664-71.
128. McCauliffe DP. Neonatal lupus erythematosus: a transplacentally acquired autoimmune disorder. *Semin Dermatol* 1995;14(1):47-53.
129. Boh EE. Neonatal lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 2004;22(2):125-8.
130. Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M, et al. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(7):1658-66.
131. Eronen M, Siren MK, Ekblad H, Tikanoja T, Julkunen H, Paavilainen T. Short- and long-term outcome of children with congenital complete heart block diagnosed in utero or as a newborn. *Pediatrics* 2000;106(1 Pt 1):86-91.
132. Waltuck J, Buyon JP. Autoantibody-associated congenital heart block: outcome in mothers and children. *Ann Intern Med* 1994;120(7):544-51.
133. Karnabi E, Boutjdir M. Role of calcium channels in congenital heart block. *Scand J Immunol* 2010;72(3):226-34.
134. Clancy RM, Alvarez D, Komissarova E, Barrat FJ, Swartz J, Buyon JP. Ro60-associated single-stranded RNA links inflammation with fetal cardiac fibrosis via ligation of TLRs: a novel pathway to autoimmune-associated heart block. *J Immunol* 2010;184(4):2148-55.
135. Buyon JP, Clancy RM. Autoantibody-associated congenital heart block: TGFbeta and the road to scar. *Autoimmun Rev* 2005;4(1):1-7.
136. Jaeggi E, Laskin C, Hamilton R, Kingdom J, Silverman E. The importance of the level of maternal anti-Ro/SSA antibodies as a prognostic marker of the development of cardiac neonatal lupus erythematosus a prospective study of 186 antibody-exposed fetuses and infants. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(24):2778-84.
137. Gordon P, Khamashta MA, Rosenthal E, Simpson JM, Sharland G, Brucato A, et al. Anti-52 kDa Ro, anti-60 kDa Ro, and anti-La antibody profiles in neonatal lupus. *J Rheumatol* 2004;31(12):2480-7.

138. Brucato A, Frassi M, Franceschini F, Cimaz R, Faden D, Pisoni MP, et al. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum* 2001;44(8):1832-5.
139. Clancy RM, Backer CB, Yin X, Kapur RP, Molad Y, Buyon JP. Cytokine polymorphisms and histologic expression in autopsy studies: contribution of TNF-alpha and TGF-beta 1 to the pathogenesis of autoimmune-associated congenital heart block. *J Immunol* 2003;171(6):3253-61.
140. Clancy RM, Marion MC, Kaufman KM, Ramos PS, Adler A, Harley JB, et al. Identification of candidate loci at 6p21 and 21q22 in a genome-wide association study of cardiac manifestations of neonatal lupus. *Arthritis Rheum* 2010;62(11):3415-24.
141. Stea EA, Routsias JG, Clancy RM, Buyon JP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Anti-La/SSB antiidiotypic antibodies in maternal serum: a marker of low risk for neonatal lupus in an offspring. *Arthritis Rheum* 2006;54(7):2228-34.
142. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 1974;125C(1-2):373-89.
143. Abdou NI, Wall H, Lindsley HB, Halsey JF, Suzuki T. Network theory in autoimmunity. In vitro suppression of serum anti-DNA antibody binding to DNA by anti-idiotypic antibody in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1981;67(5):1297-304.
144. Routsias JG, Touloupi E, Dotsika E, Mouliou A, Tsikaris V, Sakarellos C, et al. Unmasking the anti-La/SSB response in sera from patients with Sjogren's syndrome by specific blocking of anti-idiotypic antibodies to La/SSB antigenic determinants. *Mol Med* 2002;8(6):293-305.
145. Routsias JG, Tzioufas AG. B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response. *J Autoimmun* 2010;35(3):256-64.
146. Weathington NM, Blalock JE. Rational design of peptide vaccines for autoimmune disease: harnessing molecular recognition to fix a broken network. *Expert Rev Vaccines* 2003;2(1):61-73.
147. Pendergraft WF, 3rd, Pressler BM, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA. Autoantigen complementarity: a new theory implicating complementary proteins as initiators of autoimmune disease. *J Mol Med (Berl)* 2005;83(1):12-25.
148. Routsias JG, Dotsika E, Touloupi E, Papamattheou M, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, et al. Idiotype-anti-idiotypic circuit in non-autoimmune mice after immunization with the epitope and complementary epitope 289-308aa of La/SSB: implications for the maintenance and perpetuation of the anti-La/SSB response. *J Autoimmun* 2003;21(1):17-26.
149. Friedman DM, Llanos C, Izmirly PM, Brock B, Byron J, Copel J, et al. Evaluation of fetuses in a study of intravenous immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block: Results of a multicenter, prospective, open-label clinical trial. *Arthritis Rheum* 2010;62(4):1138-46.
150. Pisoni CN, Brucato A, Ruffatti A, Espinosa G, Cervera R, Belmonte-Serrano M, et al. Failure of intravenous immunoglobulin to prevent congenital heart block: Findings of a multicenter, prospective, observational study. *Arthritis Rheum* 2010;62(4):1147-52.



151. Ruffatti A, Milanese O, Chiandetti L, Cerutti A, Gervasi MT, De Silvestro G, et al. A combination therapy to treat second-degree anti-Ro/La-related congenital heart block: a strategy to avoid stable third-degree heart block? *Lupus* 2011;21(6):666-71.
152. Trucco SM, Jaeggi E, Cuneo B, Moon-Grady AJ, Silverman E, Silverman N, et al. Use of intravenous gamma globulin and corticosteroids in the treatment of maternal autoantibody-mediated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(6):715-23.
153. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 1991;12(5):154-9.
154. Durandy A, Wahn V, Petteway S, Gelfand EW. Immunoglobulin replacement therapy in primary antibody deficiency diseases--maximizing success. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136(3):217-29.
155. Looney RJ, Huggins J. Use of intravenous immunoglobulin G (IVIg). *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19(1):3-25.
156. Clynes R. IVIG therapy: interfering with interferon-gamma. *Immunity* 2007;26(1):4-6.
157. Emmi L, Chiarini F. The role of intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune and inflammatory disorders. *Neurol Sci* 2002;23 Suppl 1:S1-8.
158. Hartung HP. Advances in the understanding of the mechanism of action of IVIg. *J Neurol* 2008;255 Suppl 3:3-6.
159. Hansen RJ, Balthasar JP. Intravenous immunoglobulin mediates an increase in anti-platelet antibody clearance via the FcRn receptor. *Thromb Haemost* 2002;88(6):898-9.
160. Ni H, Chen P, Spring CM, Sayeh E, Semple JW, Lazarus AH, et al. A novel murine model of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: response to intravenous IgG therapy. *Blood* 2006;107(7):2976-83.
161. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 2011;475(7354):110-3.
162. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* 2008;26:513-33.
163. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoeidemiology of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2010;9(5):A305-10.
164. Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary Sjogren syndrome: clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine (Baltimore)* 2009;88(5):284-93.
165. Tzioufas AG, Voulgarelis M. Update on Sjogren's syndrome autoimmune epithelitis: from classification to increased neoplasias. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21(6):989-1010.
166. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29(5):296-304.

167. Fye KH, Terasaki PI, Michalski JP, Daniels TE, Opelz G, Talal N. Relationship of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1978;21(3):337-42.
168. Mann DL, Moutsopoulos HM. HLA DR alloantigens in different subsets of patients with Sjogren's syndrome and in family members. *Ann Rheum Dis* 1983;42(5):533-6.
169. Korman BD, Alba MI, Le JM, Alevizos I, Smith JA, Nikolov NP, et al. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 2008;9(3):267-70.
170. Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):3989-94.
171. Miceli-Richard C, Gestermann N, Ittah M, Comets E, Loiseau P, Puechal X, et al. The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2009;60(7):1991-7.
172. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 2009;10(1):68-76.
173. Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Cajander S, Eloranta ML, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1185-95.
174. Laine M, Porola P, Udby L, Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N, et al. Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen-regulated cysteine-rich secretory protein 3 levels in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56(8):2575-84.
175. Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, et al. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(34):12628-33.
176. Karaiskos D, Mavragani CP, Makaroni S, Zinzaras E, Voulgarelis M, Rabavilas A, et al. Stress, coping strategies and social support in patients with primary Sjogren's syndrome prior to disease onset: a retrospective case-control study. *Ann Rheum Dis* 2009;68(1):40-6.
177. Adamson TC, 3rd, Fox RI, Frisman DM, Howell FV. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjogren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983;130(1):203-8.
178. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34(4):400-7.
179. Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1991;18(2):210-4.
180. Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999;118(1):154-63.

181. Jonsson MV, Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 2008;37(9):515-21.
182. Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou EK, Kavantzias N, Ziakas P, et al. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):3977-88.
183. Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, et al. Minor salivary gland inflammatory lesions in sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol* 2013;40(9):1566-71.
184. Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72(2):162-5.
185. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjogren's syndrome patients indicating their intrinsic activation. *Clin Exp Immunol* 2002;127(2):386-92.
186. Manoussakis MN, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Xanthou G, Paikos S, Polihronis M, et al. Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42(2):229-39.
187. Moutsopoulos HM, Hooks JJ, Chan CC, Dalavanga YA, Skopouli FN, Detrick B. HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1986;45(8):677-83.
188. Thrane PS, Halstensen TS, Haanaes HR, Brandtzaeg P. Increased epithelial expression of HLA-DQ and HLA-DP molecules in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome compared with obstructive sialadenitis. *Clin Exp Immunol* 1993;92(2):256-62.
189. Kapsogeorgou EK, Dimitriou ID, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Activation of epithelial and myoepithelial cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome: high expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM.1) in biopsy specimens and cultured cells. *Clin Exp Immunol* 2001;124(1):126-33.
190. Amft N, Bowman SJ. Chemokines and cell trafficking in Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2001;54(1-2):62-9.
191. Barone F, Bombardieri M, Rosado MM, Morgan PR, Challacombe SJ, De Vita S, et al. CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and MALT lymphoma: association with reactive and malignant areas of lymphoid organization. *J Immunol* 2008;180(7):5130-40.
192. Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther* 2004;6(5):R447-56.

193. Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1995;34(4):326-33.
194. Bourazopoulou E, Kapsogeorgou EK, Routsias JG, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Functional expression of the alpha 2-macroglobulin receptor CD91 in salivary gland epithelial cells. *J Autoimmun* 2009;33(2):141-6.
195. Cuello C, Palladinetti P, Tedla N, Di Girolamo N, Lloyd AR, McCluskey PJ, et al. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1998;37(7):779-83.
196. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1994;152(11):5532-9.
197. Katsiogiannis S, Kapsogeorgou EK, Manoussakis MN, Skopouli FN. Salivary gland epithelial cells: a new source of the immunoregulatory hormone adiponectin. *Arthritis Rheum* 2006;54(7):2295-9.
198. Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum* 2001;44(2):408-18.
199. Tzioufas AG, Hantoumi I, Polihronis M, Xanthou G, Moutsopoulos HM. Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs). *J Autoimmun* 1999;13(4):429-34.
200. Barcellos KS, Nonogaki S, Enokihara MM, Teixeira MS, Andrade LE. Differential expression of Ro/SSA 60 kDa and La/SSB, but not Ro/SSA 52 kDa, mRNA and protein in minor salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2007;34(6):1283-92.
201. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci* 2002;110(1):21-30.
202. Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J, Lavie F, Lazure T, Ba N, et al. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2006;8(2):R51.
203. Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Functional expression of a costimulatory B7.2 (CD86) protein on human salivary gland epithelial cells that interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4. *J Immunol* 2001;166(5):3107-13.
204. Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. A novel B7-2 (CD86) splice variant with a putative negative regulatory role. *J Immunol* 2008;180(6):3815-23.
205. Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2007;147(3):497-503.

206. Tsunawaki S, Nakamura S, Ohyama Y, Sasaki M, Ikebe-Hiroki A, Hiraki A, et al. Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2002;29(9):1884-96.
207. Kyriakidis NC, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjogren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms. *J Autoimmun* 2013.
208. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;35(3):219-24.
209. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267-93.
210. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2002;56(5):456-69.
211. Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1517-21.
212. Polihronis M, Tapinos NI, Theocharis SE, Economou A, Kittas C, Moutsopoulos HM. Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol* 1998;114(3):485-90.
213. Abu-Helu RF, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjogren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. *J Autoimmun* 2001;17(2):141-53.
214. Ping L, Ogawa N, Sugai S. Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2005;52(2):573-81.
215. Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun* 2010;35(3):212-8.
216. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):569-79.
217. Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63(2):535-44.
218. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, et al. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity* 2013;38(3):450-60.
219. Ben-Chetrit E, Fischel R, Rubinow A. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in serum and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1993;12(4):471-4.

220. Halse AK, Marthinussen MC, Wahren-Herlenius M, Jonsson R. Isotype distribution of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2000;29(1):13-9.
221. Horsfall AC, Rose LM, Maini RN. Autoantibody synthesis in salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *J Autoimmun* 1989;2(4):559-68.
222. Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol* 2005;25(3):189-201.
223. Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M, et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003;48(11):3187-201.
224. Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1998;41(12):2238-48.

## Διεξοδική ανασκόπηση των αυτοαντισωμάτων στο πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren.

### Κλινικοί φαινοτύποι και ρυθμιστικοί μηχανισμοί

Νικόλαος Χ. Κυριακίδης, BSc<sup>1</sup>, Ευσταθία Κ. Καψογεώργου, PhD<sup>1</sup>, Αθανάσιος Γ. Τζιούφας, MD<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>: Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο Sjögren είναι μία συστηματική αυτοάνοση νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από περιεπιθηλιακές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις στους προσβεβλημένους ιστούς και από την παραγωγή πληθώρας αυτοαντισωμάτων. Ανάμεσα τους, κυρίαρχη σημασία έχουν οι αυτοάνοσες αποκρίσεις έναντι των Ro/SSA και La/SSB αυτοαντιγόνων καθώς η ανίχνευσή τους χρησιμοποιείται στην καθημέρα πράξη για τη διάγνωση και κλινική ταξινόμηση της νόσου. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί που υπόκεινται της παθογένειας της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητοί, είναι εδραιωμένος ο σημαντικός ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων σιελογόνων αδένων (ΕΚΣΑ) στην έναρξη και την εξέλιξη των τοπικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Τα ΕΚΣΑ έχουν επιπλέον την ικανότητα να μεσολαβούν την έκθεση των αυτοαντιγόνων Ro/SSA και La/SSB στο ανοσολογικό σύστημα μέσω της αυξημένης απόπτωσης και της απελευθέρωσης αυτοαντιγόνων στα αποπτωτικά σωματίδια ή/και μέσω της έκκρισης εξωσωματίων που περιέχουν αυτοαντιγόνα. Η έκφραση των αυτοαντιγόνων αυτών στα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να υπόκειται σε στενή ρύθμιση. Μέχρι σήμερα, η σηματοδότηση μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, όπως ο TLR3, έχει εμπλακεί στη ρύθμιση της έκφρασης των Ro/SSA και La/SSB από τα ΕΚΣΑ, ενώ η απορύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs τα οποία προβλέπεται ότι στοχεύουν τα παραπάνω αυτοαντιγόνα σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού ρυθμιστικής ανάδρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στην περιφέρεια, οι χυμικές αυτοάνοσες αποκρίσεις ρυθμίζονται επιπλέον μέσω της ανάπτυξης ενός ενεργού δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων. Η πληθώρα των ρυθμιστικών μηχανισμών υποδηλώνει ότι οι αυτοάνοσες χυμικές αποκρίσεις στο σύνδρομο Sjögren είναι στενά εγχόμενες. Στην παρούσα ανασκόπηση, θα συζητηθούν οι κύριες χυμικές αυτοάνοσες αποκρίσεις, οι πρόσφατες εξελίξεις στο ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων για την ανάπτυξη των αποκρίσεων αυτών, όπως και οι πιθανοί ρυθμιστικοί τους μηχανισμοί.

## **ΣΗΜΕΙΑ ΕΜΦΑΣΗΣ**

- Στο σύνδρομο Sjögren τα αυτοαντισώματα χαρακτηρίζουν κλινικές υποομάδες και φαινότυπους.
- Οι προσβεβλημένοι εξωκρινείς αδένες είναι περιοχές ενεργοποίησης αυτοδραστικών B κυττάρων και παραγωγής αυτοαντισωμάτων.
- Το επιθηλιακό κύτταρο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων.
- Η ρύθμιση της αυτοάνοσης απόκρισης σε επίπεδο ιστού, επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης και της απόπτωσης του επιθηλιακού κυττάρου, και σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω ενός ενεργού δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων.
- Οι μειωμένες αντί-ιδιοτυπικές αποκρίσεις έναντι των αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων σε μητρικούς ορούς έχουν συσχετισθεί με εμφάνιση Νεογνικού Λύκου.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνδρομο Sjögren είναι μια χρόνια συστηματική αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ κλινικό φάσμα, το οποίο εκτείνεται από την εντοπισμένη εξωκρινιπάθεια μέχρι την ανάπτυξη ποικίλων εξωαδενικών, συστηματικών εκδηλώσεων που προσβάλουν διάφορα όργανα (π.χ. τους πνεύμονες, το ήπαρ, τους νεφρούς, το κεντρικό νευρικό σύστημα). Η καταστροφή των προσβεβλημένων ιστών (κυρίως των σιελογόνων και δακρυϊκών αδένων) σχετίζεται με την ύπαρξη πυκνών λεμφοκυτταρικών διηθήσεων. Επιπρόσθετα, χαρακτηριστικό της νόσου είναι η υπερδραστικότητα των Β κυττάρων, όπως πιστοποιείται από την αθρόα παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Τα κύρια αυτοαντισώματα στο σύνδρομο Sjögren στοχεύουν τα ενδοκυττάρια αντιγόνα Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, τα οποία αποτελούν τα πρωτεϊνικά συστατικά συμπλόκων ριβονουκλεοπρωτεϊνών-RNA [1].

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι των ενδοκυττάρων αντιγόνων είναι σημαντική για την πρόγνωση, τη διάγνωση και για την κλινική ταξινόμηση των ασθενών με αυτοάνοσες διαταραχές. Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων θεωρείται ότι αποτελεί μια αντιγονο-οδηγούμενη διαδικασία, καθώς: α) ορισμένα αυτοαντισώματα είναι ειδικά για συγκεκριμένες νόσους, β) η πλειονότητα των αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύονται είναι τάξης IgG, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη αντιγονο-εξαρτώμενης T κυτταρικής βοήθειας [2], γ) οι αυτοάνοσες αποκρίσεις είναι ως επί το πλείστον πολυκλωνικές, στοχεύοντας πολλαπλούς επιτόπους μέσα στο ίδιο ή σε αλληλεπιδρώντα αυτοαντιγόνα [2], και δ) η ανοσοποίηση πειραματικών ζωικών προτύπων με τμήματα των αυτοαντιγόνων οδηγεί σε ενδο- και δια-μοριακή επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται μετά από την ανοσοποίηση με ξένα αντιγόνα [3, 4]. Παρά την ύπαρξη εκτεταμένων μελετών, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην έκθεση

ορισμένων ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα παραμένουν ασαφείς. Η διαλεύκανση των παθογενετικών μηχανισμών του συνδρόμου Sjögren αποκάλυψε τον κρίσιμο ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στην έναρξη και ρύθμιση των αυτοάνοσων αποκρίσεων. Τα τελευταία μπορεί ακόμα να εμπλέκονται στην ανάπτυξη αυτοάνοσων αποκρίσεων έναντι των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB.

Σε αυτήν την ανασκόπηση συζητούνται οι πρόσφατες εξελίξεις σχετικά με τη διαγνωστική σημασία των αυτοαντισωμάτων στο σύνδρομο Sjögren, η περιγραφή των αυτοάνοσων βλαβών στο σύνδρομο Sjögren, ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων στην παθογένεια της νόσου και οι πιθανοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί σχετικά με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων.

## **Η ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΒΛΑΒΗ**

Οι πιο κοινές κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου Sjögren είναι η ξηροστομία και η ξηροφθαλμία, οι οποίες οφείλονται στη δυσλειτουργία των σιελογόνων και των δακρυϊκών αδένων, αντίστοιχα. [1]. Η δυσλειτουργία των σιελογόνων αδένων συχνά συσχετίζεται με την ανάπτυξη περιεπιθηλιακών λεμφοκυτταρικών διηθήσεων ποικίλου βαθμού. Η πλειοψηφία των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων στις φλεγμονώδεις βλάβες των επικουρικών σιελογόνων αδένων (ΕΣΑ) ασθενών με σύνδρομο Sjögren αποτελείται από T και B κύτταρα, με το ποσοστό τους να ποικίλει ανάλογα με τη σοβαρότητα των διηθήσεων. Σε ήπιες βλάβες υπερισχύουν τα T κύτταρα, ενώ σε σοβαρές τα B κύτταρα [5, 6]. Η πλειοψηφία των διηθούντων T κυττάρων φέρουν τον CD4 φαινότυπο και φαίνεται ότι είναι ενεργοποιημένα [5, 7, 8]. Το ποσοστό των CD4<sup>+</sup>-T

κυττάρων μειώνεται αυξανόμενης της σοβαρότητας της βλάβης, ενώ το ποσοστό των CD8<sup>+</sup>-T κυττάρων παραμένει σταθερό [5]. Παρομοίως, το ποσοστό των ρυθμιστικών T κυττάρων σχετίζεται με τη σοβαρότητα της βλάβης, με τα μεγαλύτερα ποσοστά να παρατηρούνται στις ενδιάμεσες βλάβες [7]. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς και τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, αποτελούν ένα μικρό, αλλά σημαντικό τμήμα των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων, και το ποσοστό τους συσχετίζεται με το βαθμό των βλαβών [5, 9-11]. Επιπλέον, στην πλειονότητα των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, ο βαθμός και η σύνθεση των φλεγμονωδών βλαβών των ΕΣΑ έχουν αναπτυχθεί πλήρως κατά τη στιγμή της διάγνωσης, και παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητες μετέπειτα. Η μόνη εξέλιξη που παρατηρείται αφορά στην ανάπτυξη MALT-λεμφώματος σε ορισμένους ασθενείς με σύνδρομο Sjögren, στους οποίους ανιχνεύονται δυσμενείς ορολογικοί προγνωστικοί παράγοντες (όπως χαμηλά επίπεδα του C4 συστατικού του συμπληρώματος και κρυσφαιριναιμία) [6]. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι αυτοάνοσες αποκρίσεις των ασθενών με σύνδρομο Sjögren μπορούν να διακριθούν βάσει του κυρίαρχου πληθυσμού των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων σε αυτοάνοσες αποκρίσεις οδηγούμενες από T- ή B κύτταρα. Η διάκριση αυτή είναι μείζονος σημασίας για την επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

Οι παράγοντες ή τα κύτταρα που εμπλέκονται στη στρατολόγηση και τη συσσώρευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στους «φλεγμαινόντες» σιελογόνους αδένες δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Τα δεδομένα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των τελευταίων είκοσι ετών, έδειξαν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα, που αποτελούν τον κύριο στόχο των τοπικών αυτοάνοσων αποκρίσεων, δεν είναι «αθώοι παρατηρητές» (“passive bystander targets”), αλλά οι βασικοί ρυθμιστές των τοπικών ανοσολογικών

αποκρίσεων γεγονός που υποδηλώνει ότι η ασθένεια είναι στην πραγματικότητα μια «αυτοάνοση επιθηλίτιδα» [1, 12, 13]. Οι πρώτες ενδείξεις για το ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στην παθογένεια του συνδρόμου Sjögren προέκυψαν από κλινικές και ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις, οι οποίες ανέφεραν ότι οι φλεγμονώδεις βλάβες στα προσβεβλημένα όργανα αναπτύσσονται γύρω από τα επιθήλια [13]. Οι ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις ιστών από ΕΣΑ ασθενών με σύνδρομο Sjögren αποκάλυψαν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα κοντά ή σε απόσταση από τις φλεγμονώδεις βλάβες εκφράζουν πολυάριθμα ανοσορυθμιστικά μόρια, όπως κυτταροκίνες ή χημειοκίνες, οι οποίες μεσολαβούν τη στρατολόγηση, την παραμονή και τη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Β και Τ κυττάρων, καθώς επίσης και μόρια που βοηθούν στο σχηματισμό βλαστικών κέντρων, μόρια προσκόλλησης, μόρια του ΜΣΙ, συνδιεγερτικά μόρια Β7 και CD40, μόρια που εμπλέκονται στο θάνατο λόγω απόπτωσης, καθώς και αυτοαντιγόνα και λειτουργικούς υποδοχείς της φυσικής ανοσίας [1, 14]. Όλα τα προηγούμενα δεδομένα υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Ο ρόλος αυτός επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με μεταγενέστερα ευρήματα που ελήφθησαν από τη μελέτη μακροχρόνια καλλιεργημένων, μη νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων σιελογόνων αδένων (ΕΚΣΑ) από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και από μάρτυρες οι οποίοι προσήλθαν παραπονούμενοι για συμπτώματα ξηρότητας, αλλά είχαν αρνητική βιοψία. Τα κύτταρα αυτά στερούνται του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος του ιστού και της «συνομιλίας» τους με λεμφοκύτταρα [15]. Έτσι, δείχθηκε ότι τα μακροχρόνια καλλιεργημένα ΕΚΣΑ από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren εκφράζουν λειτουργικά όλα τα προαναφερθέντα μόρια που εμπλέκονται τόσο στη φυσική όσο και στην επίκτητη ανοσία, όπως κυτταροκίνες και χημειοκίνες, μόρια προσκόλλησης και συνδιεγερτικά μόρια, υποδοχείς κυτταρικού θανάτου, καθώς επίσης και τους υποδοχείς που εμπλέκονται στη φυσική

ανοσία, συμπεριλαμβανομένων του CD91 και διαφόρων TLRs.[1, 12, 16-18]. Τα επίπεδα συστατικής έκφρασης αυτών των μορίων στα ΕΚΣΑ ασθενών με σύνδρομο Sjögren βρέθηκε ότι παραμένουν σταθερά ακόμα και μετά από παρατεταμένο διάστημα καλλιέργειας και ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα των ΕΚΣΑ που προέρχονταν από μάρτυρες, γεγονός που υποδηλώνει μια ενδογενή ενεργοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων των σιελογόνων αδένων [12]. Έτσι, τα ΕΚΣΑ φαίνεται ότι είναι εξοπλισμένα με το πλήρες οπλοστάσιο των επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, γεγονός που τα καθιστά ικανά να ενορχηστρώνουν τις τοπικές αυτοάνοσες αποκρίσεις. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα ΕΚΣΑ είναι ικανά να διαμεσολαβούν την έκθεση των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα μέσω δύο μονοπατιών. Κατά πρώτον, με τα αυξημένα επίπεδα κυτταρικού θανάτου λόγω απόπτωσης και με την επακόλουθη απελευθέρωση αποπτωτικών κυστιδίων που περιέχουν αυτοαντιγόνα [12, 19-21], και κατά δεύτερον, μέσω της έκκρισης εξωσωματίων, τα οποία φέρουν μεγάλες ποσότητες αυτοαντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων των Ro/SSA και La/SSB [22]. Στο σύνολό τους, οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι σιελογόνοι αδένες είναι περιοχές παραγωγής αυτοαντισωμάτων, μια υπόθεση η οποία θα συζητηθεί εκτενώς αργότερα.

## **ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ**

Η υπερδραστικότητα των Β κυττάρων είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου Sjögren και κατά κύριο λόγο εκδηλώνεται σαν σοβαρή υπεργαμμασφαιριναιμία και με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι διαφόρων αυτοαντιγόνων, τα οποία συνοψίζονται στον Πίνακα -1. Αντιπυρηνικά αντισώματα (Antinuclear antibodies: ANA) ανιχνεύονται στον ορό ενός ποσοστού 59-85% ασθενών με σύνδρομο Sjögren [23], ενώ τα αντισώματα έναντι των αυτοαντιγόνων Ro/SSA και

La/SSB είναι τα κύρια αυτοαντισώματα που εμφανίζονται στο σύνδρομο και αποτελούν ένα διαγνωστικό εργαλείο για τη νόσο, όπως ορίζεται από τα Αμερικάνικα-Ευρωπαϊκά κριτήρια ταξινόμησης για το σύνδρομο [24].

Τα αντί-Ro/SSA αντισώματα αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικές οντότητες αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν δύο μη ομόλογες πρωτεΐνες, τη Ro52/TRIM21 και τη Ro60/TROVE2, αντίστοιχα. Η Ro52/TRIM21 είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει ένα τριμερές μοτίβο και έχει δειχθεί ότι δρα α) σαν ενδοκυτταρικός υποδοχέας του Fc τμήματος ανοσοσφαιρινών και β) σαν E3 λιγάση που συνδέει μόρια ουβικιτίνης σε πρωτεΐνες-στόχους και εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στον επαγόμενο από ενεργοποίηση κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον εμπλέκεται στη ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω TLRs και την επακόλουθη παραγωγή ιντερφερονών καθώς συμμετέχει στην αποδόμηση των IRFs που μεσολαβείται από την ουβικιτινιλύωσή τους [25]. Η πρωτεΐνη Ro60/TROVE2 είναι ένα μόριο με μορφή δακτυλίου που μπορεί να συνδέεται με RNA και συμμετέχει στον ποιοτικό έλεγχο νεοσυντιθέμενων μεταγράφων, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης λανθασμένα πτυχωμένων ή ελαττωματικών μορίων RNA τα οποία προωθεί προς αποδόμηση [26]. Επιπλέον, η Ro60/TROVE2 έχει δειχθεί ότι προάγει την επιβίωση των κυττάρων μετά από την επίδραση υπερϊόδους ακτινοβολίας, πιθανά συμμετέχοντας στην αποδόμηση των μορίων RNA που έχουν υποστεί βλάβη [26]. Από την άλλη πλευρά, η La/SSB φαίνεται ότι είναι κι αυτή μια πρωτεΐνη που δεσμεύει μόρια RNA, και συμμετέχει σε διάφορες πτυχές του μεταβολισμού μορίων RNA. Συνοδεύει ή προσδένει πρόδρομα μόρια RNA, προκειμένου να τα προστατεύσει από τη δράση νουκλεασών και να διευκολύνει τη σωστή επεξεργασία τους, την αναδίπλωση και την ωρίμανσή τους από ειδικές ριβονουκλεάσες [27]. Εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της έκφρασης των μικροRNAs (miRNAs)

προστατεύοντας και σταθεροποιώντας τα πρόδρομα miRNAs από τη δράση νουκλεασών [28]. Άλλες λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στην πρωτεΐνη La/SSB είναι: α) η προαγωγή της ανεξάρτητης από το 5'-κάλυμα μετάφρασης ικών ή ανθρώπινων mRNAs που περιέχουν εσωτερικές θέσεις εισόδου σε ριβοσώματα (internal ribosome entry sites: IRES) ή 5'-τελικά μοτίβα ολιγοπυριμιδινών που κωδικοποιούν για ριβοσωμικές υπομονάδες και μεταφραστικούς παράγοντες, πιθανά μέσω της δράσης της σαν πρωτεΐνη-συνοδός μορίων RNA, β) η αποτελεσματική αποσιώπηση της «παρεμβολής του RNA» (RNA interference) και των μεταθετών στοιχείων, όπως και η αντί-ικκή άμυνα, μέσω της διευκόλυνσης της απελευθέρωσης του κατατμημένου mRNA από το σύμπλοκο RISC, προωθώντας με αυτό τον τρόπο την ταχύτερη λειτουργία του συμπλόκου RISC, γ) η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της εξέλιξης όγκων, μέσω της προώθησης της εξαρτώμενης από IRES μετάφρασης της πρωτεΐνης κυκλίνη D1 (CCND1) [27-29].

Μελέτες που διεξήχθησαν πριν από περισσότερα από είκοσι χρόνια δεν διαχώριζαν τα αντί-Ro52/TRIM21 και αντί-Ro60/TROVE2 αντισώματα και, παρότι αυτοαντισώματα έναντι και των δύο πρωτεϊνών Ro52/TRIM21 και Ro60/TROVE2 συνυπάρχουν σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών, διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά φαίνεται να σχετίζονται με κάθε ειδικότητα αυτοαντισωμάτων [30, 31]. Τα αντί-Ro52/TRIM21 φαίνεται να είναι η πιο κοινή ειδικότητα σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren (66,7%), ενώ τα αντί-Ro60/TROVE2 και αντί-La/SSB αντισώματα ανιχνεύονται στο 52,1% και το 49% των ορών με σύνδρομο Sjögren, αντίστοιχα [25, 32]. Ανίχνευση αυτών των αυτοαντισωμάτων σε ορούς ασθενών έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερη διάρκεια νόσου πριν από τη διάγνωση, εκτεταμένη λεμφοκυτταρική διήθηση των ΕΣΑ, σοβαρή δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων και υποτροπιάζουσες διογκώσεις των παρωτίδων.

Επιπλέον, σχετίζονται με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης εξωαδενικών εκδηλώσεων, η πιο αξιοσημείωτη από τις οποίες είναι η αγγειίτιδα [33-35]. Επιπρόσθετα, τα παραπάνω αυτοαντισώματα έχουν συσχετιστεί ισχυρά με την ανάπτυξη συνδρόμου νεογνικού λύκου, όπου θεωρείται ότι έχουν άμεσο παθογενετικό ρόλο. Στο σύνδρομο αυτό, αυτοαντισώματα τάξεως γ της μητέρας περνούν στην κυκλοφορία του εμβρύου μέσω του πλακούντα και προκαλούν βλάβες στα προσβεβλημένα όργανα [36].

Μία άλλη ομάδα αυτοαντισωμάτων με υψηλό επιπολασμό στους ασθενείς με σύνδρομο Sjögren είναι ο ρευματοειδής παράγοντας και οι κρυσφαιρίνες, με τον πρώτο να ανιχνεύεται στο 36-74% και τις δεύτερες στο 9-15% των ορών των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, αντίστοιχα [37-39]. Και οι δύο παραπάνω τύποι αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με εξωαδενικές εκδηλώσεις και νεαρότερη ηλικία κατά τη διάγνωση. Η ανίχνευση κρυσφαιρινών σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για φτωχή έκβαση της νόσου και εμφάνιση λεμφώματος [40, 41].

Τα αντισώματα έναντι του κεντρομεριδίου (ACA), τα οποία έχουν μεγάλη αξία για τη διάγνωση της περιορισμένης μορφής της συστηματικής σκλήρυνσης, ανιχνεύονται επίσης και στο 4-17% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren. Ασθενείς με σύνδρομο Sjögren οι οποίοι είναι θετικοί για ACA θεωρείται ότι αποτελούν μία διακριτή κλινική υποομάδα, με επικαλυπτόμενες κλινικές εκδηλώσεις με τη συστηματική σκλήρυνση και με ηπιότερη νόσο συγκριτικά με αρνητικούς για ACA ασθενείς με σύνδρομο Sjögren ή με ασθενείς που πάσχουν από συστηματική σκλήρυνση [42-45].

Μια πρόσθετη ομάδα αυτοαντισωμάτων που χρήζει προσοχής είναι τα αυτοαντισώματα έναντι κυκλικών κιτρουλλινοποιημένων πεπτιδίων (αντί-CCP). Μολονότι θεωρούνται ειδικοί δείκτες για την πρόγνωση και διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, ο



επιπολασμός τους σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren έχει εκτιμηθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 3-10% [46-49]. Η ύπαρξη αντί-CCP σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren έχει συσχετισθεί με μη διαβρωτική αρθρίτιδα, ενώ υπάρχει διχογνωμία για το αν σχετίζονται με υμενίτιδα [47-50].

Τα αντισώματα έναντι μιτοχονδρίων (AMA), τα οποία χρησιμεύουν σαν ορολογικός διαγνωστικός δείκτης της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, στοχεύουν τα συστατικά του συμπλόκου της κετοξικής αφυδρογονάσης και κυρίως (το 95% των ορών Νοτιοαμερικάνων και Ευρωπαίων που πάσχουν από πρωτοπαθή χολική κίρρωση) την υπομονάδα της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού [51]. Τα AMA έχει αναφερθεί ότι ανιχνεύονται στο 1.7-13% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, με το ποσοστό να ανέρχεται στο 3-27% ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδο [52]. Η ανίχνευση AMA σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren έχει σχετισθεί με ηπατική συμμετοχή [52]. Το ιστοπαθολογικό προφίλ των βλαβών του ήπατος και των σιελογόνων αδένων είναι παρόμοιο. Σε αμφότερες τις διαταραχές, η βλάβη του ιστού χαρακτηρίζεται από περιπορικές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις, οι οποίες αποτελούνται κυρίως από CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα. Επιπλέον, και στις δύο οντότητες, οι ιστοπαθολογικές βλάβες παρουσιάζουν αργή ή καθόλου εξέλιξη κατά την πορεία της νόσου [53], ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν αδόκιμα ανοσορυθμιστικά μόρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι και οι δύο νόσοι εκδηλώνονται σαν “αυτοάνοση επιθηλίτιδα”.

Αντισώματα έναντι μουσκαρινικών υποδοχέων που ανιχνεύονται με λειτουργικές μεθόδους ή με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων, έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς (MRs ή mAChRs) είναι υποδοχείς ακετυλοχολίνης που σχηματίζουν σύμπλοκα πρωτεΐνης G-υποδοχέα στις κυτταρικές μεμβράνες ορισμένων νευρώνων ή άλλων κυττάρων. Οι λειτουργίες τους είναι πολλές,

με την πιο αξιολογούμενη να είναι η δράση τους σαν οι κύριοι υποδοχείς που διεγείρονται από ακετυλοχολίνη, η οποία απελευθερώνεται από τις μεταγαγγλιακές ίνες στο παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα [54, 55]. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς έλαβαν το όνομά τους από την υψηλότερη συγγένεια που παρουσιάζουν έναντι της μουσκαρίνης σε σύγκριση με τη νικοτίνη και κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε πέντε υποομάδες (M1R-M5R) ανάλογα με την αλληλεπίδρασή τους με διάφορους εκλεκτικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές. Πριν από δύο δεκαετίες, δείχθηκε ότι μεσολαβούμενη από τη δράση αγωνιστών διέγερση των M3R σε σιελογόνους αδένες αρουραίων οδηγούσε στην παραγωγή σιέλου [56] ενώ επόμενες μελέτες αποκάλυψαν ότι ο M3R, παρά ο M1R, ήταν απαραίτητος για τη ρύθμιση της έκκρισης σιέλου από το παρασυμπαθητικό [57]. Περαιτέρω μελέτες που προσπάθησαν να συνδέσουν το ρόλο των αυτοαντισωμάτων έναντι των M3R σε ορούς ασθενών με σύνδρομο Sjögren με την ελαττωματική παραγωγή σιέλου βασίστηκαν σε λειτουργικές δοκιμασίες παρά σε δοκιμασίες στερεάς φάσης. Δείχθηκε ότι τα αντισώματα έναντι των M3R σε ορούς ασθενών με σύνδρομο Sjögren ρυθμίζουν λειτουργικά την μεσολαβούμενη από τον M3R παραγωγή σιέλου [58]. Περαιτέρω λειτουργικές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα αντισώματα έναντι των M3R συμβάλλουν στις εκδηλώσεις ξηρότητας, ενδεχομένως μέσω της άμεσης παρεμπόδισης της νευροδιαβίβασης [59]. Επόμενες λειτουργικές αναλύσεις με τη χρήση ορών ασθενών με σύνδρομο Sjögren [60], την εφαρμογή μεθόδων βιοπληροφορικής και τη χρήση χημικά συνθετικών πεπτιδίων οδήγησε στην ταυτοποίηση των πιθανών αντιγονικών στόχων στο μόριο του M3R, χαρακτηρίζοντας έτσι τη δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά του M3R ως τον κυριότερο στόχο των αυτοάνοσων αποκρίσεων έναντι των M3R [28, 61]. Παρ'όλα αυτά, οι διαφορές σε δοκιμασίες στερεάς φάσης (ELISA) [62] και οι δυσκολίες που παρατηρήθηκαν στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των M3R με τις

συμβατικές ανοσολογικές τεχνικές [63] οδήγησαν στην αποτυχία συσχέτισης των αντισωμάτων έναντι των M3R με την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων.

Οι καρβονικές ανυδράσες περιλαμβάνουν μία οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη μετατροπή διοξειδίου του άνθρακα και νερού σε δισόξινο ανθρακικό άλας και πρωτόνια και αντίστροφα. Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται σαν μεταλοπρωτεάσες, καθώς το ενεργό κέντρο τους περιέχει ένα ιόν ψευδαργύρου και εμπλέκονται κυρίως στη ρύθμιση της ισορροπίας οξέος/βάσης στο αίμα και σε άλλους ιστούς και στην υποβοήθηση της μεταφοράς διοξειδίου του άνθρακα εκτός των ιστών. Τα αυτοαντισώματα που στοχεύουν την καρβονική ανυδράση II (αντί-CAII) υπάρχουν στο 12,5 - 20,8% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren [64, 65]. Επιπλέον, η πειραματική ανοσοποίηση ποντικών PL/J με ανθρώπινη καρβονική ανυδράση II προκαλεί πειραματική αυτοάνοση σιαλαδενίτιδα στα ποντίκια αυτά, υποδηλώνοντας ότι τα αντισώματα έναντι της CAII θα μπορούσαν να έχουν ένα ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου Sjögren [66]. Η ύπαρξη αντί-CAII αντισωμάτων έχει σχετισθεί με νεφρική σωληναριακή οξέωση [67].

Τέλος, μία ακόμη ομάδα αυτοαντισωμάτων που μπορούν να ανιχνευθούν σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren είναι τα αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (anti-smooth muscle antibodies: ASMA). Ο επιπολασμός τους στο σύνδρομο Sjögren είναι περίπου 30% [68]. Γενικά, η ταυτόχρονη ύπαρξη ASMA και ANA είναι ενδεικτική αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου 1 [69], ωστόσο, η κλινική αξία τους στο σύνδρομο Sjögren δεν είναι σαφής. Έχει αναφερθεί ότι η ύπαρξη ASMA σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren έχει συσχετισθεί με αυτοάνοση ηπατίτιδα [70-72], αν και αυτή η συσχέτιση δεν επιβεβαιώθηκε από άλλη μελέτη [23]. Τα παραπάνω αυτοαντισώματα και η συσχέτισή τους με κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου Sjögren συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

## **ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ**

Παρόμοια με τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι των ξένων αντιγόνων, οι αυτοάνοσες αντιδράσεις υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση. Τα προαναφερθέντα στοιχεία, καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που θα συζητηθούν στην παρούσα ενότητα, παρέχουν ενδείξεις για την ύπαρξη πληθώρας πιθανών ρυθμιστικών μηχανισμών που λειτουργούν κατά την ανάπτυξη των αυτοάνοσων αποκρίσεων. Αυτοί περιλαμβάνουν: α) μηχανισμούς που μεσολαβούνται αποκλειστικά από συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η ύπαρξη ενός ιδιοτυπικού/αντί-ιδιοτυπικού δικτύου αντισωμάτων, β) στοιχεία της φυσικής ανοσίας, όπως η έκφραση των TLRs από τα φλεγμαίνοντα επιθήλια, γ) κυτταρικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την έκφραση μορίων, εν προκειμένω την έκφραση των αυτοαντιγόνων, όπως είναι τα miRNAs.

### **Οι σιελογόνοι αδένες είναι περιοχές παρουσίασης αυτοαντιγόνων και έναρξης της ανοσολογικής απόκρισης**

Παρά τις εντατικές μελέτες, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων, καθώς επίσης και οι περιοχές στις οποίες αυτά παράγονται, δεν έχουν πλήρως καθοριστεί. Οι προσβεβλημένοι εξωκρινείς αδένες φαίνεται ότι αποτελούν μία κύρια περιοχή παραγωγής αυτοαντισωμάτων. Αυτό υποστηρίζεται από τα ακόλουθα ευρήματα: α) οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις σε ένα ποσοστό περίπου 20% των ασθενών με σύνδρομο Sjogren σχηματίζουν συναθροίσεις που προσομοιάζουν σε βλαστικά κέντρα στους σιελογόνους αδένες [73, 74] και περιέχουν αυτοδραστικά B κύτταρα, β) η σίελος των ασθενών με σύνδρομο Sjogren περιέχει υψηλά επίπεδα IgG, καθώς και αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αυτοαντισώματα, και γ) πολλά από τα διηθούντα

πλασματοκύτταρα περιέχουν κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες με αντί-Ro/SSA ενεργότητα [75]. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι τα πυρηνικά αυτοαντιγόνα κατά την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων μετατοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και, στη συνέχεια, στην κυτταρική μεμβράνη [20]. Σε συμφωνία με την τοπική παραγωγή αυτοαντισωμάτων στους σιελογόνους αδένες, είναι η αυξημένη έκφραση του BAFF από τα επιθήλια, καθώς και η αυξημένη έκφραση διάφορων χημειοκινών που ρυθμίζουν την επιβίωση και διαφοροποίηση των B κυττάρων από ΕΚΣΑ. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα ΕΚΣΑ επιδεικνύουν ιδιότητες αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, και έτσι είναι σε θέση να συντονίζουν τις τοπικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Ένας επιπλέον σημαντικός ρόλος, που έχει αποδοθεί στα ΕΚΣΑ είναι η έκθεση των ενδοκυττάρων αντιγόνων και η παρουσίασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Φαίνεται ότι αυτό επιτυγχάνεται με δύο μεθόδους, τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και την απελευθέρωση των εξωσωματίων. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος έχει δείχθει ότι προκαλεί την έκθεση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB μέσω της απελευθέρωσης αποπτωτικών φυσαλίδων οι οποίες είναι εμπλουτισμένες με αυτά τα αυτοαντιγόνα [12, 20]. Μολονότι τα καλλιεργημένα ΕΚΣΑ έχουν βρεθεί να είναι ανθεκτικά σε απόπτωση που μεσολαβείται από το μόριο Fas, μπορούσαν να καταστούν ευαίσθητα με την ταυτόχρονη ύπαρξη ενός δεύτερου σήματος, όπως η σηματοδότηση μέσω του CD40 [19, 76]. Επίσης, δείχθηκε ότι τα ΕΚΣΑ μετά από διέγερση του TLR3 υπόκεινται σε απόπτωση που επάγεται από την αποκόλλησή τους από το υπόστρωμά τους (ανοικία) [14]. Τα δεδομένα από *in vitro* πειράματα που υποδηλώνουν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα πεθαίνουν με απόπτωση υποστηρίζονται περαιτέρω από πολυάριθμες μελέτες που δείχνουν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στα επιθήλια των σιελογόνων αδένων ασθενών με σύνδρομο Sjögren [1]. Τα εξωσωμάτια είναι μικρά μεμβρανώδη κυστίδια ενδοσωματικής προέλευσης με διάμετρο μεταξύ 30 και 100 nm

που εκκρίνονται από σχεδόν κάθε κυτταρικό τύπο. Εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανταλλαγής και της απελευθέρωσης ενδοκυτταρικού υλικού. Έχει αποδειχθεί ότι παίζουν κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις μεσολαβώντας την ενεργοποίηση των T κυττάρων και τη μεταφορά των αντιγόνων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα καλλιεργημένα ΕΚΣΑ απελευθερώνουν εξωσωμάτια που περιέχουν τα κύρια αυτοαντιγόνα Ro/SSA, La/SSB και Sm κι εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια του ΜΣΙ, υποδηλώνοντας ότι είναι ικανά να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα [22].

Ο κεντρικός ρόλος των επιθηλίων στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων έχει δειχθεί πρόσφατα σε ένα πειραματικό πρότυπο ποντικού στο οποίο δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη-μεταγραφικός ρυθμιστής IκB-ζ [77]. Πιο συγκεκριμένα, ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη IκB-ζ, είναι επιρρεπή σε απόπτωση των επιθηλίων τους και βρέθηκε ότι αναπτύσσουν αυθόρμητα δακρυοαδενίτιδα (φλεγμονή των δακρυϊκών αδένων) που ομοιάζει με αυτή του συνδρόμου Sjögren, και συσχετίζεται με την ανάπτυξη λεμφοκυτταρικών διηθήσεων στον προσβεβλημένο ιστό και με την παραγωγή υψηλών τίτλων των αυτοαντισωμάτων Ro/SSA και La/SSB. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος βρέθηκε ότι συσχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά όχι των ανοσοκυττάρων. Επιπλέον, ο φαινότυπος αυτός αντιστρεφόταν σημαντικά με τη χορήγηση αναστολέων των κασπασών, εύρημα που ενισχύει το ρόλο της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων στις αυτοάνοσες αποκρίσεις και παρέχει μια μηχανιστική εικόνα για το πώς μπορεί η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων να εκκινήσει την τοπική φλεγμονή, τη στρατολόγηση των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, φαινόμενα χαρακτηριστικά του συνδρόμου Sjögren.

## **Αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα τα οποία στοχεύουν αυτοαντιγόνα: Πιθανοί καταστολείς της αυτοανοσίας**

Μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της ανοσολογίας ήταν η θεωρία του ιδιοτυπικού/αντί-ιδιοτυπικού δικτύου αντισωμάτων που προτάθηκε πριν από τέσσερις δεκαετίες από τον βραβευμένο με Νόμπελ Δανό ανοσολόγο Niels Jerne [78]. Ο Jerne πρότεινε ότι τα αντισώματα που αναγνωρίζουν έναν ειδικό επίτοπο ενός αντιγόνου είναι εξίσου ικανά να επάγουν μια ανοσολογική απόκριση εναντίον τους, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην παραγωγή αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων. Τα τελευταία εξουδετερώνουν τη δράση των αρχικών αντισωμάτων. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η αναλογία των ιδιοτυπικών και αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων στην κυκλοφορία είναι ισορροπημένη, σχηματίζοντας έτσι ένα δίκτυο ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων. Σαν αποτέλεσμα αυτού εξουδετερώνεται η δράση των ιδιοτυπικών αντισωμάτων από τα αντί-ιδιοτυπικά, οδηγώντας τελικά στη μείωση των χυμικών αποκρίσεων.

Αυτή η ιδιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι προφανώς πολύ σημαντική στις αυτοάνοσες νόσους, δεδομένου ότι παρέχει ένα ρυθμιστικό μηχανισμό για την εξουδετέρωση των επιβλαβών επιπτώσεων των αυτοαντισωμάτων. Εντούτοις, η μελέτη του δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων έχει κάποιες εγγενείς δυσκολίες που προκύπτουν από τους ακόλουθους λόγους: 1) η αυτοάνοση απόκριση είναι ετερογενής, κατευθύνεται έναντι πολλαπλών επιτόπων, οι οποίοι ευρίσκονται εντός διαφόρων αυτοαντιγόνων, 2) τα αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα μπορούν με τη σειρά τους να εξουδετερωθούν από τα αυτοαντισώματα, 3) οι μεθοδολογίες καθαρισμού ιδιοτυπικών αντισωμάτων δεν έχουν, μέχρι στιγμής, αποκαλύψει έναν ομοιογενή πληθυσμό αντί-

ιδιοτυπικών αντισωμάτων, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτες.

Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήσαμε τα συμπληρωματικά πεπτίδια των κύριων επιτόπων της La/SSB, που εκτείνονται στα αμινοξέα 349-364 της πρωτεΐνης. Τα συμπληρωματικά πεπτίδια δεσμεύονται από τα αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα των αντί-La/SSB (349-364) αυτοαντισωμάτων και, ως εκ τούτου, είναι χρήσιμα εργαλεία για την αξιολόγηση του δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων. Πειράματα σχετικά με τα παραπάνω αποκάλυψαν τα ακόλουθα [79]:

1. Οι οροί ασθενών με σύνδρομο Sjögren περιέχουν ένα ενεργό δίκτυο ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων έναντι του αυτοαντιγόνου La/SSB.
2. Ανοσοποίηση ζωικών προτύπων είτε με επίτοπους της La/SSB ή με τα συμπληρωματικά τους πεπτίδια κατέληξε στην παραγωγή τόσο των ιδιοτυπικών όσο και των αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων.
3. Ένας σημαντικός πληθυσμός των αντί-La/SSB (349-364) αντισωμάτων είναι δεσμευμένα από τα αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα και παραμένουν κρυμμένα στις συμβατικές ανοσολογικές τεχνικές.

Η τελευταία παρατήρηση μας ώθησε να μελετήσουμε μητέρες που γέννησαν παιδιά με σύνδρομο νεογνικού λύκου (ΣΝΛ). Σε μελέτες που διεξήχθησαν τυφλά σε ορούς αντί-La/SSB θετικών μητέρων, δείχθηκε ότι οι μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί είχαν υψηλότερους τίτλους αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων, σε σύγκριση με τις μητέρες που γέννησαν ένα παιδί με ΣΝΛ, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα αντί-ιδιοτυπικά



αντισώματα δρουν προστατευτικά, πιθανότατα λόγω της δέσμευσης των παθογόνων αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων, εμποδίζοντας έτσι την είσοδο τους στην κυκλοφορία του εμβρύου [80].

### **Οι TLRs σαν ρυθμιστές των τοπικών αυτοάνοσων αποκρίσεων**

Οι TLRs είναι μια οικογένεια υψηλά συντηρημένων μεμβρανικών υποδοχέων που θεωρούνται σημαντικοί υποδοχείς της φυσικής ανοσίας και αριθμούν 12 μέλη στον άνθρωπο και 13 στα ποντίκια [81]. Αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs), τα οποία είναι μικρά μοριακά μοτίβα συντηρημένα ανάμεσα σε μια ομάδα παθογόνων και μεσολαβούν την παραγωγή αρκετών προφλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών κυτταροκινών που απαιτούνται για την ύπαρξη αποτελεσματικών αποκρίσεων της επίκτητης ανοσίας. Ιδιαίτερης προσοχής χρήζει ο TLR3 που αναγνωρίζει δίκλωνο RNA, το οποίο μπορεί να απελευθερωθεί τοπικά από ιούς ή από κατεστραμμένα κύτταρα. Μετά την πρόσδεση του δίκλωνου RNA η σηματοδότηση μέσω του TLR3 επάγει την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I [82]. Ο TLR3 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου Sjögren, δεδομένου ότι η σηματοδότηση μέσω του TLR3 έχει δειχθεί ότι μειώνει τη λειτουργικότητα των σιελογόνων αδένων σε διάφορα στελέχη ποντικών και ότι επιταχύνει σημαντικά την ανάπτυξη σιαλαδενίτιδας σε ζωικά πρότυπα που εμφανίζουν τον φαινότυπο του συνδρόμου Sjögren (ποντικοί NZB/NZW) [83-85]. Επιπλέον, η συστατική του έκφραση σε ΕΚΣΑ είναι υψηλή και εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό σημαντικής ενεργοποίησης, ενώ η σηματοδότηση μέσω του TLR3 στα ΕΚΣΑ έπειτα από επίδραση με polyI:C έχει δειχθεί ότι επάγει την έκφραση ανοσοτροποποιητικών μορίων, ιντερφερονών, καθώς και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω ανοικίας [14, 86, 87]. Από την άλλη πλευρά, έχει

δειχθεί ότι τα αυτοαντιγονικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι ικανά να ενεργοποιούν τους TLRs μέσω των μορίων RNA που συμμετέχουν στο σχηματισμό τους [88]. Επιπλέον, το αυτοαντιγόνο Ro52/TRIM21 έχει εμπλακεί στη ρύθμιση της φλεγμονής που μεσολαβείται από τους TLR3, TLR7 και TLR9, μέσω της δράσης του σαν E3 λιγάση της πρωτεΐνης-στόχου με την ουβικιτίνη [25]. Υπό αυτό το πρίσμα, επιδιώξαμε πρόσφατα να διερευνήσουμε κατά πόσον η σηματοδότηση μέσω του TLR3 θα μπορούσε να συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB [89]. Βρήκαμε ότι, όντως, η σηματοδότηση μέσω του TLR3, αλλά όχι μέσω του TLR4, αυξάνει σημαντικά την έκφραση του mRNA της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στα ΕΚΣΑ, και ότι η αύξηση αυτή επιτυγχάνεται σε δύο στάδια, ένα πρώιμο που είναι εμφανές από τις 6 ώρες επίδρασης και ένα επόμενο στις 24 έως 48 ώρες επίδρασης. Η δεύτερη αύξηση της έκφρασης του mRNA της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 συνοδεύτηκε από ανακατανομή της πρωτεΐνης στον πυρήνα, από ένα πρότυπο που προσομοιάζει σε χρώση του πυρηνίσκου σε αρκετές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα. Η επαγόμενη από τη σηματοδότηση μέσω του TLR3 δεύτερη αύξηση της έκφρασης του mRNA και η ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα βρέθηκε ότι μεσολαβούνται σε μεγάλο βαθμό από την παραγωγή IFN $\beta$ . Επιπλέον, σηματοδότηση μέσω του TLR3 στα ΕΚΣΑ βρέθηκε ότι επάγει ελαφρώς, αλλά στατιστικά σημαντικά την έκφραση των mRNAs των πρωτεϊνών Ro60/TROVE2 και La/SSB [89]. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι TLRs μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των αυτοαντιγόνων από ιστούς που δεν ανήκουν τυπικά στο ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω της δημιουργίας μεγάλων ποσοτήτων αυτοαντιγόνων στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά υπό συνθήκες παρατεταμένης διέγερσης ορισμένων υποδοχέων της φυσικής ανοσίας οδηγούνται σε απόπτωση και στην επακόλουθη έκθεση των αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα.

### **miRNAs τα οποία στοχεύουν αυτοαντιγόνα.**

Τα miRNAs είναι μικρά μη-κωδικοποιούντα μόρια μονόκλωνου RNA (μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων), τα οποία λειτουργούν σαν ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο σε φυτά και ζώα [90]. Πρόσφατα δεδομένα από πειράματα *in vitro* και *in vivo* σχετίζουν τα miRNAs με αδόκιμες ανοσολογικές αποκρίσεις και αυτοάνοσες εκδηλώσεις [91]. Παρά το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εμπλοκή των miRNAs στην αυτοανοσία, λίγες μόνο μελέτες έχουν διερευνήσει τη συμμετοχή τους στην αιτιοπαθογένεια του συνδρόμου Sjögren. Οι *Alevizos και συν.* μελέτησαν την υπογραφή των miRNAs σε σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjögren [92] και εντόπισαν 94 miRNAs που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση ανάμεσα στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjögren και μαρτύρων. Επιπλέον, το προφίλ έκφρασης αυτών των miRNAs μπορεί να διακρίνει υποομάδες ασθενών με σύνδρομο Sjögren όσον αφορά στην υπολειτουργία των σιελογόνων αδένων τους και τη βαρύτητα των λεμφοκυτταρικών τους διηθήσεων.

Μια πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριό μας αποκάλυψε μια διαφορετική πτυχή στον παθοφυσιολογικό ρόλο των miRNAs στο σύνδρομο Sjögren. Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν πιθανοί ρυθμιστές της έκφρασης των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, επιλέξαμε με μεθόδους βιοπληροφορικής μια ομάδα έντεκα miRNAs, τα οποία προβλέπεται ότι στοχεύουν τα mRNAs των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 ή/και La/SSB και αναλύσαμε την έκφρασή τους σε σιελογόνους αδένες, μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) και ΕΚΣΑ ασθενών με σύνδρομο Sjögren και μαρτύρων [93]. Επτά miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των let-7b, miR-16, miR-181a, miR-200b, miR-200b\*, miR-223 και miR-483-5p βρέθηκε ότι εκφράζονται στους σιελογόνους

αδένες, τα PBMCs και τα ΕΚΣΑ. Μεταξύ αυτών, βρέθηκε ότι τα miR-181, miR-200b και miR-223 υπερεκφράζονται στους σιελογόνους αδένες, τα ΕΚΣΑ και τα PBMCs, αντίστοιχα, από τους ασθενείς με σύνδρομο Sjögren σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Είναι αξιοσημείωτο ότι η υπερέκφραση των miR-181 και miR-16 στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren έχει παλαιότερα συσχετιστεί με μειωμένη λειτουργία του ιστού [92]. Τέλος, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του let-7b σε ΕΚΣΑ ασθενών με σύνδρομο Sjögren που είχαν αντί-Ro/SSA ή/και αντί-La/SSB αντισώματα, σε σύγκριση με ασθενείς με σύνδρομο Sjögren που δεν είχαν τα παραπάνω αυτοαντισώματα. Τα υπόλοιπα miRNAs που μελετήθηκαν βρέθηκε ότι δεν παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στις προαναφερθείσες υποομάδες ασθενών με σύνδρομο Sjögren [93]. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ποικιλία των στόχων των miRNAs και η πολυπλοκότητα της ρύθμισης της έκφρασής τους καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη την ερμηνεία των δεδομένων που αφορούν το ρόλο τους στις αυτοάνοσες αποκρίσεις.

Συνοψίζοντας, οι αυτοάνοσες αποκρίσεις στο σύνδρομο Sjögren φαίνεται ότι ελέγχονται εξαιρετικά. Αυτό υποδηλώνεται από α) την ύπαρξη πολύπλοκων μονοπατιών που εμπλέκονται στην έκφραση των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων από ιστούς που δεν ανήκουν τυπικά στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως είναι τα αδενικά επιθήλια, στα οποία παρατηρούνται τόσο οι μηχανισμοί ρύθμισης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο όσο και η κυτταρική συνομιλία που επιτελείται μέσω σημάτων της φυσικής ανοσίας και β) από τη λειτουργία μηχανισμών που εμπλέκονται στην έκθεση των παραπάνω αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη αυτοάνοσων αποκρίσεων, με κυρίαρχους τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και την απελευθέρωση από τα ΕΚΣΑ εξωσωματίων τα οποία είναι πλήρη αυτοαντιγόνων (Σχήμα-1). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται

προκειμένου να διαλευκανθούν πλήρως οι μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης των αυτοαντιγόνων, να διευκρινιστούν οι διαδικασίες που οδηγούν στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων και μεσολαβούν την παθογένεια του συνδρόμου Sjögren, και να καταστεί δυνατή η ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Τα προαναφερθέντα ευρήματα παρουσιάστηκαν στο 12<sup>ο</sup> Διεθνές Συμπόσιο για το Σύνδρομο Sjögren το οποίο διεξήχθη στο Κιότο της Ιαπωνίας, στις 9-12 Οκτωβρίου 2013. Μαζί με τις υπόλοιπες μελέτες που παρουσιάζονται σε αυτό το ειδικό τεύχος του Journal of Autoimmunity, επιχειρεί να ρίξει φως στα νέα κλινικά, παθογενετικά και θεραπευτικά δεδομένα για τη νόσο.

**Πίνακας 1.** Συχνότητα εμφάνισης των αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren.

<b>Αυτοαντισώματα</b>	<b>Συχνότητα εμφάνισης (%)</b>
αντί-Ro52/TRIM21	66.7
αντί-Ro60/TROVE2	52.1
αντί-La/SSB	49
αντί-U1RNP	2
Ρευματοειδής Παράγων	36-74
Κρυσσφαιρίνες	9-15
αντί-Κεντρομεριδίου (ACA)	4-17
αντί-Μιτοχονδριακά (AMA)	1.7-27
αντί-Λείων μυών	30
αντί-κυκλικών κιτρογλινοποιημένων πεπτιδίων (αντί-CCP)	3-10
αντί-Καλρετικουλίνης	20
αντί-Μουσκαρινικού υποδοχέα 3	11
αντί-καρβονικής ανυδράσης	12.5-20.8

**Πίνακας 2.** Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με σύνδρομο Sjögren.

<b>Αυτοαντισώματα</b>	<b>Κλινικές συσχετίσεις</b>
αντί-Ro52/TRIM21	<ul style="list-style-type: none"> <li>• νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση και μεγαλύτερη διάρκεια νόσου</li> <li>• υπολειτουργία εξωκρινών αδένων που επικυρώνεται από λειτουργικές δοκιμασίες</li> </ul>
αντί-Ro60/TROVE2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• σοβαρή διήθηση των σιελογόνων αδένων</li> <li>• διόγκωση των σιελογόνων αδένων</li> <li>• εξωαδενικές εκδηλώσεις</li> </ul>
αντί-La/SSB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• υπεργαμμασφαιριναιμία, κρυσφαιριναιμία</li> <li>• Νεογνικός Λύκος-ΣΚΑ</li> </ul>
αντί-U1RNP	σύνδρομο Sjögren επικαλυπτόμενο με ΜΝΣΙ
Ρευματοειδής Παράγων	<ul style="list-style-type: none"> <li>• νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση</li> <li>• εξωαδενικές εκδηλώσεις</li> </ul>
Κρυσφαιρίνες	<ul style="list-style-type: none"> <li>• νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση</li> <li>• διόγκωση των σιελογόνων αδένων</li> <li>• εξωαδενικές εκδηλώσεις</li> <li>• MALT λέμφωμα</li> <li>• Χαμηλό συμπλήρωμα</li> <li>• υπεργαμμασφαιριναιμία</li> </ul>
αντί-Κεντρομεριδίου (ACA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• σύνδρομο Sjögren επικαλυπτόμενο με συστηματική σκλήρυνση</li> <li>• Ήπια νόσος</li> <li>• Αρνητική συσχέτιση αντί-Ro/SSA, αντί-La/SSB αντισώματα</li> </ul>
αντί-Μιτοχονδριακά (AMA)	Πρωτοπαθής χολική κίρρωση
αντί-Λείων μυών	Αυτοάνοση ηπατίτιδα
αντί-κυκλικών κιτρουλλινοποιημένων πεπτιδίων (αντί-CCP)	Αρθρικές εκδηλώσεις
αντί-Μουσκαρινικού υποδοχέα 3	Συμπτώματα ξηρότητας
αντί-καρβονικής ανυδράσης	Νεφρική σωληναριακή οξέωση

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun*, 2012;39:4-8.
- [2] Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006;43:203-48.
- [3] Routsias JG, Kyriakidis N, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med*;16:19-26.
- [4] Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM *et al.* Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol*, 2000;121:551-6.
- [5] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010;34:400-7.
- [6] Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG *et al.* Minor salivary gland inflammatory lesions in sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol*, 2013;40:1566-71.
- [7] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol*, 2008;173:1389-96.
- [8] Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 1991;18:210-4.
- [9] Jonsson MV, Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med*, 2008;37:515-21.
- [10] Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou EK, Kavantzias N, Ziakas P *et al.* Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum*, 2007;56:3977-88.
- [11] Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1999;118:154-63.
- [12] Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010;35:219-24.
- [13] Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994;72:162-5.
- [14] Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun*, 2010;35:212-8.
- [15] Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of



- non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci*, 2002;110:21-30.
- [16] Bourazopoulou E, Kapsogeorgou EK, Routsias JG, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Functional expression of the alpha 2-macroglobulin receptor CD91 in salivary gland epithelial cells. *J Autoimmun*, 2009;33:141-6.
- [17] Kapsogeorgou EK, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cells (SGEC): carriers of exquisite B7-2 (CD86) costimulatory molecules. *J Autoimmun*, 2010;35:188-91.
- [18] Katsiogiannis S, Kapsogeorgou EK, Manoussakis MN, Skopouli FN. Salivary gland epithelial cells: a new source of the immunoregulatory hormone adiponectin. *Arthritis Rheum*, 2006;54:2295-9.
- [19] Abu-Helu RF, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjogren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. *J Autoimmun*, 2001;17:141-53.
- [20] Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*, 2002;56:456-69.
- [21] Polihronis M, Tapinos NI, Theocharis SE, Economou A, Kittas C, Moutsopoulos HM. Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol*, 1998;114:485-90.
- [22] Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum*, 2005;52:1517-21.
- [23] Nardi N, Brito-Zeron P, Ramos-Casals M, Aguilo S, Cervera R, Ingelmo M *et al*. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin Rheumatol*, 2006;25:341-6.
- [24] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE *et al*. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*, 2002;61:554-8.
- [25] Oke V, Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun*, 2012;39:77-82.
- [26] Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S *et al*. TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol*, 2009;182:3782-92.
- [27] Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annu Rev Biochem*, 2002;71:375-403.
- [28] He J, Guo JP, Ding Y, Li YN, Pan SS, Liu Y *et al*. Diagnostic significance of measuring antibodies to cyclic type 3 muscarinic acetylcholine receptor peptides in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2011;50:879-84.
- [29] Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, Reumann K, Schwartz PE, Will H *et al*. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene*, 2011;30:434-44.
- [30] Itoh K, Itoh Y, Frank MB. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J Clin Invest*, 1991;87:177-86.

- [31] Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev*, 2009;8:632-7.
- [32] Routsias JG, Tzioufas AG. Sjogren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2007;32:238-51.
- [33] Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJ, Moutsopoulos HM. Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1986;61:89-92.
- [34] Mavragani CP, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoantibodies to cellular antigens. Clinical and molecular aspects. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000;123:46-57.
- [35] Tzioufas AG, Wassmuth R, Dafni UG, Guialis A, Haga HJ, Isenberg DA *et al*. Clinical, immunological, and immunogenetic aspects of autoantibody production against Ro/SSA, La/SSB and their linear epitopes in primary Sjogren's syndrome (pSS): a European multicentre study. *Ann Rheum Dis*, 2002;61:398-404.
- [36] Friedman DM, Llanos C, Izmirly PM, Brock B, Byron J, Copel J *et al*. Evaluation of fetuses in a study of intravenous immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block: Results of a multicenter, prospective, open-label clinical trial. *Arthritis Rheum*, 2010;62:1138-46.
- [37] Fauchais AL, Martel C, Gondran G, Lambert M, Launay D, Jauberteau MO *et al*. Immunological profile in primary Sjogren syndrome: clinical significance, prognosis and long-term evolution to other auto-immune disease. *Autoimmun Rev*, 2010;9:595-9.
- [38] Martel C, Gondran G, Launay D, Lalloue F, Palat S, Lambert M *et al*. Active immunological profile is associated with systemic Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol*, 2011;31:840-7.
- [39] Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J *et al*. Primary Sjogren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)*, 2008;87:210-9.
- [40] Bournia VK, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjogren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun*, 2012;39:15-26.
- [41] Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 2010;6:529-37.
- [42] Katano K, Kawano M, Koni I, Sugai S, Muro Y. Clinical and laboratory features of anticentromere antibody positive primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2001;28:2238-44.
- [43] Kitagawa T, Shibasaki K, Toya S. Clinical significance and diagnostic usefulness of anti-centromere antibody in Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol*, 2012;31:105-12.
- [44] Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, Iwamoto N, Okada A, Tamai M *et al*. Anti-centromere antibody-seropositive Sjogren's syndrome differs from conventional subgroup in clinical and pathological study. *BMC Musculoskelet Disord*;11:140.
- [45] Bournia VK, Diamanti KD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Anticentromere antibody positive Sjogren's Syndrome: a retrospective descriptive analysis. *Arthritis Res Ther*;12:R47.
- [46] Barcelos F, Abreu I, Patto JV, Trindade H, Teixeira A. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Sjogren's syndrome. *Acta Reumatol Port*, 2009;34:608-12.

- [47] Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, Cohen-Solal J, Aucouturier F, Goetz J *et al.* Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2005;64:114-7.
- [48] Iwamoto N, Kawakami A, Tamai M, Fujikawa K, Arima K, Aramaki T *et al.* Determination of the subset of Sjogren's syndrome with articular manifestations by anticyclic citrullinated peptide antibodies. *J Rheumatol*, 2009;36:113-5.
- [49] Tobon GJ, Correa PA, Anaya JM. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2005;64:791-2.
- [50] Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Lama N, Bonacci E, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in primary Sjogren syndrome may be associated with non-erosive synovitis. *Arthritis Res Ther*, 2008;10:R51.
- [51] Bogdanos DP, Komorowski L. Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta*, 2011;412:502-12.
- [52] Selmi C, Meroni PL, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *J Autoimmun*, 2012;39:34-42.
- [53] Hatzis GS, Fragoulis GE, Karatzaferis A, Delladetsima I, Barbatis C, Moutsopoulos HM. Prevalence and longterm course of primary biliary cirrhosis in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2008;35:2012-6.
- [54] Eglén RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2006;26:219-33.
- [55] Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*, 2006;12:3573-81.
- [56] Iwabuchi Y, Masuhara T. Sialogogic activities of SNI-2011 compared with those of pilocarpine and McN-A-343 in rat salivary glands: identification of a potential therapeutic agent for treatment of Sjogren's syndrome. *Gen Pharmacol*, 1994;25:123-9.
- [57] Nakamura T, Matsui M, Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N *et al.* M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J Physiol*, 2004;558:561-75.
- [58] Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O, Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1996;104:454-9.
- [59] Li J, Ha YM, Ku NY, Choi SY, Lee SJ, Oh SB *et al.* Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjogren's syndrome. *Lab Invest*, 2004;84:1430-8.
- [60] Koo NY, Li J, Hwang SM, Choi SY, Lee SJ, Oh SB *et al.* Functional epitope of muscarinic type 3 receptor which interacts with autoantibodies from Sjogren's syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)*, 2008;47:828-33.
- [61] Kovacs L, Marczinovits I, Gyorgy A, Toth GK, Dorgai L, Pal J *et al.* Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3(213-228) in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2005;44:1021-5.
- [62] Roescher N, Kingman A, Shiota Y, Chiorini JA, Illei GG. Peptide-based ELISAs are not sensitive and specific enough to detect muscarinic receptor type 3 autoantibodies in serum from patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2011;70:235-6.
- [63] Dawson LJ, Allison HE, Stanbury J, Fitzgerald D, Smith PM. Putative anti-muscarinic antibodies cannot be detected in patients with primary Sjogren's syndrome using conventional immunological approaches. *Rheumatology (Oxford)*, 2004;43:1488-95.

- [64] Itoh Y, Reichlin M. Antibodies to carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 1992;35:73-82.
- [65] Ono M, Ono M, Watanabe K, Miyashita Y, Inagaki Y, Ueki H. A study of anti-carbonic anhydrase II antibodies in rheumatic autoimmune diseases. *J Dermatol Sci*, 1999;21:183-6.
- [66] Nishimori I, Bratanova T, Toshkov I, Caffrey T, Mogaki M, Shibata Y *et al*. Induction of experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *J Immunol*, 1995;154:4865-73.
- [67] Takemoto F, Hoshino J, Sawa N, Tamura Y, Tagami T, Yokota M *et al*. Autoantibodies against carbonic anhydrase II are increased in renal tubular acidosis associated with Sjogren syndrome. *Am J Med*, 2005;118:181-4.
- [68] Manthorpe R, Permin H, Tage-Jensen U. Auto-antibodies in Sjogren's syndrome. With special reference to liver-cell membrane antibody (LMA). *Scand J Rheumatol*, 1979;8:168-72.
- [69] Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol*, 2008;14:3374-87.
- [70] Csepregi A, Szodoray P, Zeher M. Do autoantibodies predict autoimmune liver disease in primary Sjogren's syndrome? Data of 180 patients upon a 5 year follow-up. *Scand J Immunol*, 2002;56:623-9.
- [71] Lindgren S, Manthorpe R, Eriksson S. Autoimmune liver disease in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Hepatol*, 1994;20:354-8.
- [72] Ramos-Casals M, Sanchez-Tapias JM, Pares A, Forns X, Brito-Zeron P, Nardi N *et al*. Characterization and differentiation of autoimmune versus viral liver involvement in patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2006;33:1593-9.
- [73] Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol*, 2005;25:189-201.
- [74] Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M *et al*. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2003;48:3187-201.
- [75] Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1998;41:2238-48.
- [76] Ping L, Ogawa N, Sugai S. Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005;52:573-81.
- [77] Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S *et al*. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity*, 2013;38:450-60.
- [78] Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*, 1974;125C:373-89.
- [79] Routsias JG, Tzioufas AG. B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response. *J Autoimmun*, 2010;35:256-64.

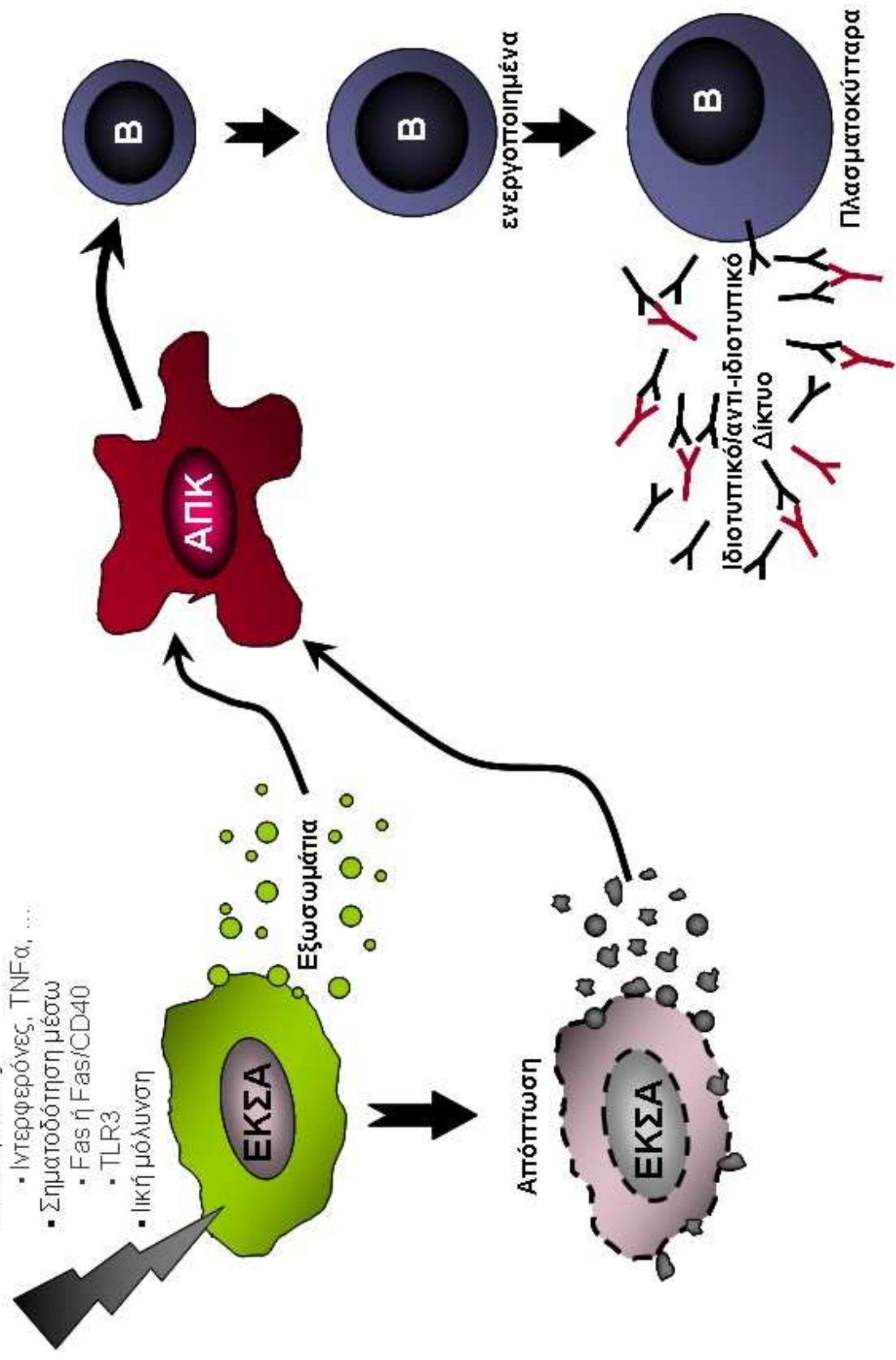
- [80] Stea EA, Routsias JG, Clancy RM, Buyon JP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Anti-La/SSB antiidiotypic antibodies in maternal serum: a marker of low risk for neonatal lupus in an offspring. *Arthritis Rheum*, 2006;54:2228-34.
- [81] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011;34:637-50.
- [82] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001;413:732-8.
- [83] Nandula SR, Dey P, Corbin KL, Nunemaker CS, Bagavant H, Deshmukh US. Salivary gland hypofunction induced by activation of innate immunity is dependent on type I interferon signaling. *J Oral Pathol Med*, 2013;42:66-72.
- [84] Nandula SR, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjogren's syndrome-like disease. *Oral Dis*, 2011;17:801-7.
- [85] Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura PR, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J Oral Pathol Med*, 2009;38:42-7.
- [86] Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, Sellam J, Eid P, Lebon P *et al*. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol*, 2008;38:1058-64.
- [87] Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG *et al*. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2007;147:497-503.
- [88] Kelly KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J *et al*. "Endogenous adjuvant" activity of the RNA components of lupus autoantigens Sm/RNP and Ro 60. *Arthritis Rheum*, 2006;54:1557-67.
- [89] Kyriakidis NC, Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. RO52/TRIM21 EXPRESSION IN SALIVARY GLAND EPITHELIAL CELLS (SGECs) IS UPREGULATED BY TLR3-SIGNALING. Annual European Congress of RHEUMATOLOGY, Madrid, Spain: *Annals of the Rheumatic Diseases*; 2013, p. 78.
- [90] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009;136:215-33.
- [91] Carissimi C, Fulci V, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity. *Autoimmun Rev*, 2009;8:520-4.
- [92] Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2011;63:535-44.
- [93] Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjogren's syndrome: candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression. *J Autoimmun*, 2011;37:129-35.

## ΥΠΟΜΝΗΜΑ

Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης και ρύθμισης των χυμικών αυτοάνοσων αποκρίσεων στο σύνδρομο Sjögren. Στους φλεγμαινόντες σιελογόνους ιστούς, η έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων του αδένου (ΕΚΣΑ) σε σήματα κινδύνου ή σήματα που προάγουν την απόπτωση τα οδηγεί στο να εκφράσουν υψηλά επίπεδα των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων, απελευθερώνοντάς τα στο μικροπεριβάλλον μέσω των εξωσωματίων ή των αποπτωτικών σωματίων. Αυτά τα πλήρη αυτοαντιγόνων σωματίδια δεσμεύονται κι επεξεργάζονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ), οδηγώντας στην ενεργοποίηση των Β κυττάρων και την έκπτυξη πλασματοκυττάρων, τα οποία παράγουν αυτοαντισώματα. Η ανίχνευση και η παθογένεια των παραγόμενων αυτοαντισωμάτων εξαρτάται από την ισορροπία των ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων και την ύπαρξη ενός δικτύου ιδιοτυπικών/αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων, το οποίο εξουδετερώνει τη δράση των παθογενετικών αυτοαντισωμάτων.

**Ερεθίσματα κινδύνου/ σήματα που επάγουν απόπτωση**

- Κυτταροκίνες
  - Ιντερφερόνες, TNFα, ...
- Σηματοδότηση μέσω
  - Fas ή Fas/CD40
  - TLR3
- Ιική μόλυνση



**A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms**

**J Autoimmun. 2013 Dec 12, [Epub ahead of print]**

Nikolaos C. Kyriakidis, BSc<sup>1</sup>, Efstathia K. Kapsogeorgou, PhD<sup>1</sup>, Athanasios G. Tzioufas, MD<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>: Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Greece.

**ABSTRACT**

Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease characterized by periepithelial lymphocytic infiltrates in affected tissues and the production of plethora of autoantibodies. Among them autoimmune responses against Ro/SSA and La/SSB are of major importance since their detection is routinely used for disease diagnosis and clinical characterization. Although the exact mechanisms underlying disease pathogenesis are not fully understood, the important role of salivary gland epithelial cells (SGEC) in the initiation and development of the local immune responses is well-established. SGECs are also capable to mediate the exposure of the Ro/SSA and La/SSB autoantigens to the immune system by elevated apoptosis and autoantigen release in apoptotic bodies and/or by the secretion of autoantigen-containing exosomes. The expression of these autoantigens in epithelial cells appears to be tightly regulated. Up-to-date, signaling of certain innate immunity receptors, such as TLR3, appear to be implicated in the regulation of Ro/SSA and La/SSB expression by SGECs, whereas the deregulated expression of certain miRNAs that are predicted to target them in SS patients suggests a regulatory feedback at the post-transcriptional level. In the periphery, the humoral autoimmune responses are further regulated by the development of an active network of idiotypic-antiidiotypic antibodies. The plethora of mechanisms suggests that autoimmune humoral responses in SS are tightly regulated. In this review, the major humoral autoimmune responses, recent advances on the role of epithelial cells in their development, as well as possible regulatory mechanisms will be discussed.



## **HIGHLIGHTS**

- Autoantibodies in SS characterize clinical subgroups and phenotypes.
- The affected exocrine glands are sites of autoreactive B-cell activation and autoantibody production.
- The epithelial cell plays an instrumental role for autoantibody production.
- Regulation of the autoimmune response is achieved at tissue level, through activation and apoptosis of the epithelial cell, and at the protein level via an active idiotypic-antiidiotypic network.
- Impaired antiidiotypic responses to anti-La/SSB in maternal sera have been associated with NLE.

## INTRODUCTION

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by a diverse clinical spectrum ranging from local exocrinopathy to extraglandular, systemic manifestations that affect several organs (eg. lungs, liver, kidneys, central nervous system). The destruction of affected tissues (mainly salivary and lacrimal glands) is associated with dense lymphocytic infiltrates. Another feature of the disease is B cell hyperactivity, as attested by abundant production of autoantibodies. The major autoantibodies in SS target the intracellular antigens Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB, which are parts of ribonucleoproteins-RNA complexes [1].

The detection of autoreactive antibodies against intracellular autoantigens is essential for disease prognosis, diagnosis and clinical classification of patients with autoimmune disorders. Over the last fifteen years, emerging data led to the characterization of autoantibody production as an antigen-driven procedure, since: a) certain autoantibodies are disease specific, b) the majority of autoantibodies detected are of the IgG class, which is suggestive of an antigen-dependent T-cell help [2], b) autoimmune responses are mainly polyclonal, targeting multiple epitopes within the same or interacting autoantigens [2], and d) immunization of experimental animals with fragments of the autoantigens results in intra- and inter-molecular spreading of the immune response, similar to that observed after immunization with foreign antigens [3, 4]. Despite extensive studies, the mechanisms operating for the exposure of certain intracellular autoantigens to the immune system remain rather elusive. The unraveling of the pathogenic mechanisms of SS revealed the crucial role of the epithelial cells in the initiation and regulation of autoimmune responses. The latter may also be implicated in the development of autoimmune responses against Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB autoantigens.

In this review, recent advances on the diagnostic significance of autoantibodies in SS, the description of SS autoimmune lesions, the role of epithelial cells in disease pathogenesis and the candidate regulatory mechanisms for autoantibody production are discussed.

## **THE PATHOLOGIC LESION**

Xerostomia (mouth dryness) and xerophthalmia (dryness of the eyes) owing to the dysfunction of the salivary and lacrimal glands, respectively, are the most common clinical manifestations of SS [1]. The dysfunction of the exocrine glands is commonly associated with the development of periepithelial lymphocytic infiltrates of variable degree. Studies investigating the inflammatory lesion of SS are mainly conducted in labial minor salivary glands (MSG). T and B cells constitute the vast majority of infiltrating mononuclear cells at the MSG inflammatory lesions of SS, with their prevalence varying according to the severity of the infiltrates. Thus, in mild lesions T cells predominate, whereas in severe B cells constitute the main population [5, 6]. The majority of infiltrating T cells bear the CD4 phenotype and appear to be activated [5, 7, 8]. The prevalence of CD4<sup>+</sup>-T cells decreases with lesion severity, whereas the prevalence of CD8<sup>+</sup>-T cells remains unchanged [5]. Likewise, the prevalence of regulatory T cells associates with lesion severity, with the higher values to be observed at intermediate lesions [7]. NK-cells and professional antigen-presenting cells, such as macrophages and dendritic cells, comprise a small, but considerable portion of the infiltrating mononuclear cells, and their percentage correlates with the grade of the lesions [5, 9-11]. Furthermore, in the majority of SS patients, the grade and the composition of the MSG inflammatory lesions are fully developed at the time of

diagnosis, remaining largely unchanged thereafter. The only evolution observed involved the development of MALT-lymphoma in certain SS patients expressing adverse serological prognostic factors (i.e. C4 hypocomplementemia and cryoglobulinemia) [6]. These findings suggest that SS patients can be distinguished according to the predominant infiltrating mononuclear cell population into T-cell or B-cell driven autoimmune responses, which is of major importance for the proper treatment selection.

The factors or the cells implicated in the recruitment and accumulation of immune cells in the “inflamed” salivary glands have not been fully elucidated. Data that emerged over the last two decades, indicated that epithelial cells, the main target of local autoimmune responses are not “passive bystander targets”, but key regulators of local immune responses supporting that the disease is in fact an “autoimmune epithelitis” [1, 12, 13]. The first evidence about the epithelial role in SS pathogenesis was raised by clinical and histopathological observations, which indicated that the inflammatory lesions at the affected organs are developed around epithelia [13]. Immunohistochemical analyses of MSG tissues of SS patients revealed that epithelial cells proximal or distal to inflammatory lesions express numerous immune-modulatory molecules, such as cytokines or chemokines that mediate the recruitment, homing and differentiation of immunocytes, including B and T cells, as well as germinal center formation, adhesion molecules, MHC molecules, B7 and CD40 costimulatory molecules, molecules implicated in death due to apoptosis, as well as autoantigens and functional innate immunity receptors [1, 14]. All the previous data suggested the significant role of epithelial cells in the regulation of immune responses that was further confirmed by subsequent findings obtained by the study of long-term cultured, non-neoplastic salivary gland epithelial cells (SGEC) established from SS patients and sicca-complaining control

individuals, devoid of the inflammatory tissue microenvironment and the lymphocytic crosstalk [15]. Thus, long-term cultured SGEC from SS patients were shown to functionally express all the aforementioned molecules implicated in both innate and adaptive immunity, such as cytokines and chemokines, adhesion and costimulatory molecules, death receptors, as well as receptors involved in innate immunity, including CD91 and various TLRs [1, 12, 16-18]. The constitutive expression of these molecules in SGEC from SS patients was found to remain stable even after prolonged cultivation and to be significantly higher than those obtained from non-SS sicca-complaining controls, a fact suggesting an intrinsic activation of salivary epithelia [reviewed in [12]]. Thus, SGEC seem to be equipped with the full armamentarium of professional antigen presenting cells, rendering them able to orchestrate the local autoimmune responses. Furthermore, SGEC were found able to mediate the exposure of intracellular autoantigens to the immune system by two pathways. First, the elevated cell-death due apoptosis and the subsequent release of autoantigen-containing apoptotic blebs [12, 19-21], and second, by the secretion of exosomes, fully loaded with autoantigenic proteins, including Ro/SSA and La/SSB [22]. Taken together, these observations have led to the assumption that salivary glands are sites of autoantibody production, a hypothesis that will be extensively discussed later.

## **SERUM AUTOANTIBODIES AND CLINICAL PHENOTYPES**

B-cell hyperactivity is a major characteristic of SS and is predominantly manifested as severe hypergammaglobulinemia and production of autoantibodies against various autoantigens that are summarized at Table-1. Antinuclear antibodies (ANA) are present

in the sera of 59-85% of patients [23], whereas antibodies against Ro/SSA and La/SSB autoantigens are the major autoantibodies in the syndrome and represent a diagnostic tool for the disease, as defined by the American-European classification criteria for SS [24].

Anti-Ro/SSA antibodies represent two distinct entities of autoantibodies that react with two non-homologous proteins, the Ro52/TRIM21 and Ro60/TROVE2, respectively. Ro52/TRIM21 is a tripartite motif containing protein that has been shown to act as an a) intracellular Fc-Receptor and b) E3-ubiquitin-protein ligase that is implicated in the regulation of cell proliferation and activation induced cell death, as well as the regulation of TLR signaling and subsequent IFN production by polyubiquitin-mediated degradation of IRFs [25]. Ro60/TROVE2 protein is a ring-shaped RNA-binding protein that participates in the quality control of nascent transcripts, including the recognition and leading of misfolded defective RNAs to degradation [26]. Furthermore, Ro60/TROVE2 has been shown to promote cell survival after ultraviolet (UV) irradiation, possibly by assisting in the decay of the UV-induced damaged RNA [26]. On the other hand, La/SSB appears to also be a RNA binding protein, involved in diverse aspects of RNA metabolism. It chaperones or binds to precursor RNA molecules, in order to protect them from nuclease-mediated decay and to facilitate their correct processing, folding and maturation by specific ribonucleases [27]. It is also involved in the regulation of micro-RNAs (miRNAs) expression by protecting and stabilizing of pre-miRNAs from nuclease activity [28]. Other functions that have been attributed to the La/SS-B are a) enhancement of cap-independent translation of viral or human mRNAs that contain internal ribosome entry sites (IRES) or 5'-terminal oligopyrimidine motifs that encode ribosome subunits and translation factors, potentially through RNA chaperone activity, b) efficient RNAi, antiviral defense and transposon silencing by facilitating the release of cleaved mRNA

from the RNA-induced silencing complex (RISC) and thus promoting the multiple-turnover of RISC catalysis, c) regulation of cell proliferation and tumor progression by promoting the IRES-dependent translation of the cyclin D1 (CCND1) protein [27-29].

Studies performed over two decades ago did not distinguish between anti-Ro52/TRIM21 and anti-Ro60/TROVE2 antibodies and although autoantibodies against both Ro52/TRIM21 and Ro60/TROVE2 proteins co-exist in a significant proportion of patients, distinct clinical features seem to be specifically associated with each specificity [30, 31]. Anti-Ro52/TRIM21 seems to be the most common specificity in patients with SS (66.7%), whereas anti-Ro60/TROVE2 and anti-La/SSB antibodies are found in 52.1% and 49% of SS sera, respectively [25, 32]. Detection of these autoantibodies in patients' sera has been correlated with longer disease duration before diagnosis, extensive lymphocytic infiltration of MSG, severe exocrine gland hypofunction and recurrent parotid gland enlargement. Moreover, they are associated with a higher prevalence of extraglandular features, the most noteworthy of which is vasculitis [33-35]. In addition, these autoantibodies have been strongly associated with the development of neonatal lupus syndrome, where they are thought to have direct pathogenic role. In this syndrome, maternal IgG autoantibodies pass through the placenta to the fetal circulation causing injuries to the affected organs [36].

Another set of autoantibodies with high prevalence in SS patients are rheumatoid factor and cryoglobulins with the former being present in 36-74% and the latter in 9-15% of SS sera, respectively [37-39]. Both types of autoantibodies are associated with extraglandular manifestations and younger age at diagnosis. The detection of cryoglobulins outlines a high risk for poor disease outcome and lymphomagenesis [40, 41].

The anti-centromere antibodies (ACA), which have high value in the diagnosis of the limited form of systemic sclerosis, are also found in 4-17% of SS patients. ACA-positive SS patients seem to comprise a distinct clinical subgroup, characterized by overlapping clinical manifestations with systemic sclerosis and milder disease compared to both ACA-negative SS patients or patients with systemic sclerosis [42-45].

An additional specificity that requires attention is the autoantibodies against cyclic citrullinated peptides (anti-CCP). Although they are considered as specific markers for the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis, their prevalence in SS patients has been estimated to range between 3-10% [46-49]. Anti-CCP reactivity is correlated with non-erosive arthritis in SS patients, whereas there is a controversy about its association with joint synovitis [47-50].

Anti-mitochondrial antibodies (AMA), which serve as a diagnostic serological marker of primary biliary cirrhosis (PBC), target the components of the ketoacid dehydrogenase complex and predominantly (in 95% of North American and European PBC sera) the pyruvate dehydrogenase subunit [51]. AMA are reportedly present in 1.7-13% of SS patients, with the rate rising to 3-27% depending on the diagnostic method applied [52]. AMA positivity in SS patients has been associated with liver involvement [52]. The histopathologic profile of liver and salivary gland lesions are comparable. In both disorders, the tissue lesion is characterized by periductal lymphocytic infiltrates, which primarily consist of CD4<sup>+</sup> T-cells. Moreover, in both entities, the histopathologic lesions present slow or no progression during disease course [53], whereas epithelial cells aberrantly express immunomodulatory molecules, suggesting that both manifest as “autoimmune epithelitis”.



Antibodies to muscarinic receptors, detected by functional methods or the use of synthetic peptides, have been described in SS patients. Muscarinic receptors (MRs or mAChRs) are acetylcholine receptors that form G protein-receptor complexes in the plasma membranes of certain neurons or other cells. Their functions are numerous, the most noteworthy being their function as the main receptors stimulated by acetylcholine released from postganglionic fibers in the parasympathetic nervous system [54, 55]. Muscarinic receptors received their name from their higher affinity to muscarine than nicotine and have been further categorized in five subgroups (M1R-M5R) depending on their reactions with several selective agonists and antagonists. Two decades ago, it was demonstrated that agonist-mediated stimulation of M3R in rat salivary glands led to saliva production [56] and subsequent studies revealed that M3R, rather than M1R, was fundamental for the parasympathetic regulation of saliva secretion [57]. Further studies attempting to associate the role of anti-M3R autoantibodies in SS sera with defective saliva production were based on functional rather than solid phase assays. It was shown that anti-M3R antibodies in SS sera functionally regulate the M3R mediated saliva production [58]. Further functional studies led to the assumption that anti-M3R antibodies contribute to sicca manifestations, potentially via direct blockade of neurotransmission [59]. Subsequent functional analyses utilizing SS sera [60], the employment of bioinformatics and chemically synthesized peptides led to the identification of possible antigenic targets on M3R molecule; thus, characterizing the second extracellular loop of M3R as the most prominent target of anti-M3R autoimmune responses [28, 61]. Nevertheless, discrepancies in solid-based assays (ie. ELISA) [62] and the difficulties observed in detecting anti-M3R antibodies by conventional immunologic techniques [63] failed to provide a consensus for the association of anti-M3R occurrence with clinical manifestations.

Carbonic anhydrases comprise a family of enzymes that catalyze the conversion of carbon dioxide and water to bicarbonate and protons and vice versa. They are classified as metalloproteases, since their active site contains a zinc ion and they are mainly involved in the regulation of acid base balance in blood and other tissues, and in aiding carbon dioxide transport out of tissues. Autoantibodies targeting carbonic anhydrase II (anti-CAII) are present in 12.5-20.8% of SS patients [64, 65]. Furthermore, experimental immunization of PL/J mice with human carbonic anhydrase II evoked experimental autoimmune sialadenitis in mice, suggesting that anti-CAII antibodies could have a role in SS pathogenesis [66]. The occurrence of anti-CAII antibodies has been associated with distal renal tubular acidosis [67].

Finally, another set of autoantibodies that can be found in SS patients are the anti-smooth muscle antibodies (ASMA). Their prevalence in SS is around 30% [68]. In general, ASMA along with ANA positivity are indicative of type-1 autoimmune hepatitis [69], however, their clinical value in SS is not clear. It has been reported that ASMA positivity in SS patients correlates with autoimmune hepatitis [70-72], but this was not corroborated [23]. The aforementioned autoantibodies and their associations with the expression of SS are summarized at Table 2.

## **REGULATION OF THE AUTOIMMUNE RESPONSE**

Similarly to immune reactions against foreign antigens, autoimmune responses are tightly regulated. The aforementioned data, as well as pathways that will be discussed in this section, provide evidence for the operation of several potential regulatory mechanisms in the development of autoimmune responses. These include either mechanisms mediated

exclusively by components of the immune system, such as the formation of idiotypic-antiidiotypic network or elements of innate immunity, namely TLR expression by inflamed epithelia, or wide cellular mechanisms that regulate molecule expression, in this case the expression of autoantigens, such as miRNAs.

### **Salivary glands are sites of autoantigen presentation and initiation of the immune response**

Despite intensive studies, the mechanisms involved in the generation, as well as the sites of autoantibody production are not defined. The affected exocrine glands appear to serve as a major site of autoantibody formation. This is supported by the following findings: a) lymphocytic infiltrates in approximately 20% of SS patients form germinal center-like aggregates in the salivary glands [73, 74] and contain autoreactive B cells, b) the saliva of SS patients contains high levels of IgG, as well as anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies, and c) many of the infiltrating plasma cells contain intracytoplasmic immunoglobulins with anti-Ro/SSA activity [75]. Finally, it has been reported that nuclear autoantigens translocate to the cytoplasm and the cellular membrane during ductal cell apoptosis [20]. In line with the local autoantibody production in the salivary glands, is the elevated epithelial expression of BAFF and various chemokines that regulate B cell survival and differentiation by SGEC. As mentioned earlier, SGEC demonstrate properties of antigen-presenting cells, thus being able to coordinate local immune responses. An additional important role that has been attributed to SGEC is the exposure of intracellular antigens and their presentation to the immune system. It appears that this is achieved by two processes, the apoptotic cell death and the release of exosomes. Apoptotic cell death has been shown to result in the exposure of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB autoantigens through the release of

autoantigen-loaded apoptotic blebs [12, 20]. Although cultured SGEC have been found resistant to Fas-mediated apoptosis, they were rendered sensitive by a second signal, such as CD40 signaling [19, 76], whereas they have been shown to undergo detachment-induced apoptosis (termed as anoikis) in response to TLR3 stimulation [14]. The in-vitro data supporting that epithelial cells die through apoptosis are further supported by numerous studies showing elevated apoptosis of the salivary gland epithelia in SS patients [reviewed in [1]]. Exosomes are small membrane vesicles of endocytic origin with a diameter between 30 and 100 nm that are secreted by almost every cell type. They are involved in diverse physiological processes, including the exchange and discharge of intracellular material. They have been proven to play a key regulatory role in immune responses by mediating T-cell activation and the transport of antigens to antigen-presenting. Cultured SGEC release exosomes that contain the major autoantigens Ro/SSA, La/SSB and Sm and express on the surface MHC molecules, indicating that they are capable to activate the immune system [22].

The pivotal role of epithelia in autoantibody production has been recently shown in an experimental mouse model lacking the transcriptional regulator I $\kappa$ B- $\zeta$  [77]. More particularly, I $\kappa$ B- $\zeta$  deficient mice, which are prompted to epithelial apoptosis, were found to spontaneously develop an SS-like inflammation, manifested as dacryoadenitis associated with the development of lymphocytic infiltrates in the affected tissue and production of high titers of the SS-associated autoantibodies Ro/SSA and La/SSB. This phenotype was found to specifically correlate with increased apoptosis of epithelial, but not the immune, cells. Furthermore, it was significantly reversed by treatment with caspase inhibitors, a finding that strengthens the role of epithelial apoptosis in autoimmune responses and provides a mechanistic insight on how the apoptosis of

epithelial cells can initiate local inflammation, lymphocytic recruitment and autoantibody production, characteristic of SS.

### **Antiidiotypic antibodies targeting autoantibodies: Possible suppressors of autoimmunity**

One of the major immunologic breakthroughs proposed by Nobel laureate N.K. Jerne four decades ago was the idiotypic-antiidiotypic network theory [78]. Jerne suggested that the antibodies recognizing a specific epitope on an antigen are also capable to induce an immune response against them, which in turn leads to the production of antiidiotypic antibodies that neutralize the former antibodies. According to this theory, the proportion of idiotypic and antiidiotypic antibodies in the circulation is balanced, forming a network of idiotypic-antiidiotypic antibodies and resulting in the neutralization of idiotypic antibodies by the antiidiotypes, leading eventually to downregulation of the humoral responses.

This property of the immune system is obviously very important in autoimmune diseases, since it provides a regulatory mechanism to neutralize the harmful effects of autoantibodies. However, the study of the idiotypic-antiidiotypic network has some inherent difficulties arising from the following reasons: 1) the autoimmune response is heterogeneous, directed against multiple epitopes within various autoantigens, 2) the antiidiotypic antibodies are blocked and neutralized by autoantibodies, 3) the purification methodologies for antiidiotypic antibodies cannot, so far, disclose a homogeneous antiidiotypic antibody population to be used for further studies.

In our laboratory we used complementary peptides to major epitopes of La/SSB, spanning amino acids (aa) 349-364 of the protein. The complementary peptides can bind

the antiidiotypic antibodies of anti-La/SSB (349-364aa) autoantibodies and, therefore, are useful tools to evaluate the idiotypic-antiidiotypic network. Experiments on this subject revealed the following [reviewed in [79]]:

4. Sera of patients with SS contain an active idiotypic-antiidiotypic network of the autoantigen La/SSB.
5. Immunization of animals with either epitopes or their complementary peptides results in the production of both idiotypic and antiidiotypic antibodies.
6. A substantial population of anti-La/SSB (349-364aa) are blocked and hidden in the conventional immunoassays, by the antiidiotypic antibodies.

The latter observation prompted us to study mothers who gave birth to children with neonatal lupus syndrome (NLS). In studies performed blindly in sera of anti-La positive mothers, it was shown that mothers who gave birth to a healthy child had higher titers of antiidiotypic antibodies, compared with mothers who gave birth to a child with NLS, leading to the assumption that antiidiotypic antibodies are protective, most probably by binding to pathogenic anti-La/SSB antibodies, thereby blocking their entrance in the fetal circulation [80].

### **TLRs as regulators of the local autoimmune responses**

TLRs are a family of highly conserved membrane receptors that are considered as major innate immunity sensors and list 12 members in humans and 13 in mice [81]. They recognize certain pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are small molecular motifs conserved within a class of pathogens and mediate the production of several proinflammatory and immunomodulatory cytokines that are required for effective

acquired responses. Of particular note is TLR3 that recognizes double-stranded RNA, which can be delivered locally from viruses or damaged cells, and upon ligation promotes the production of type-I interferons [82]. TLR3 appears to play a significant role in SS pathogenesis, since its signaling has been shown to reduce salivary gland function in several mouse strains and to significantly accelerate sialoadenitis in the NZB/NZW mouse model of SS [83-85]. Moreover, its constitutive expression on SGEC is high and localized on the cell-surface, which is indicative of a remarkable activation status, whereas TLR3 signaling on SGEC by polyI:C treatment has been shown to induce the expression of immunomodulatory molecules, interferons, as well as the apoptotic cell death via anoikis [14, 86, 87]. On the other hand, autoantigenic proteins have been shown capable of activating TLRs through the RNA molecules involved in the formation of their RNA-ribonucleoprotein complexes [88]. Furthermore, Ro52/TRIM21 autoantigen, with its E3 ubiquitin-protein ligase function has been implicated in the regulation of TLR3, TLR7 and TLR9 mediated inflammation [25]. Under this perspective, we recently sought to investigate whether TLR3 signaling could participate in the regulation of Ro52/TRIM21, as well as Ro60/TROVE2 and La/SSB, expression [89]. We found that indeed, TLR3, but not TLR4, signaling significantly upregulates the expression of Ro52/TRIM21 mRNA expression in SGECs, and that this increment is achieved in two steps, one early evident from 6-hrs and one late at 24 to 48-hrs. The late increase of Ro52/TRIM21 mRNA expression that was induced by TLR3 signaling in SGECs was accompanied by protein redistribution in the nucleus, from nucleolar-like to several dots spanning throughout nucleus. The TLR3-induced late Ro52/TRIM21 mRNA increase and protein redistribution were found to be largely mediated by IFN $\beta$  production. Furthermore, TLR3 signaling in SGECs was found to slightly, but significantly induce the expression of Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs [89]. These findings suggest that

TLRs might be implicated in the regulation of the expression of autoantigens by non-immune tissues, by creating large quantities of autoantigens within epithelial cells, which under sustained ligation are led to apoptosis and autoantigen exposure to the immune system.

### **MicroRNAs targeting autoantigens.**

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding single-stranded RNA molecules (approximately 22 nucleotides long) which function as post-transcriptional regulators of gene expression in plants and animals [90]. Recent data from *in vitro* and *in vivo* experiments implicate miRNAs in aberrant immune responses and consequently autoimmune manifestations [91]. Despite rising interest in miRNA implication in autoimmunity, only a few studies have investigated their participation in SS etiopathogenesis. Alevizos et al. explored miRNA signatures in salivary glands from SS patients [92] and has reported 94 miRNAs that are differentially expressed between salivary glands obtained from SS patients and non-SS controls. Furthermore, the expression profile of these miRNAs can discriminate different SS patients regarding to salivary hypofunction and lymphocytic infiltration severity.

A recent study from our lab revealed a different aspect in the pathophysiologic role of miRNAs in SS. In an attempt to identify possible regulators of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB expression, we selected by a computational approach a panel of eleven miRNAs that are predicted to target Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and/or La/SSB mRNAs and analyzed their expression in salivary glands (SG) tissues, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and SGEC of SS patients and non-SS controls [93]. Seven miRNAs, including let-7b, miR-16, miR-181a, miR-200b, miR-200b\*, miR-223



and miR-483-5p were found to be expressed in SGs, PBMCs and SGECs. Among these, miR-181a, miR-200b and miR-223 were found to be significantly upregulated in SGs, SGECs PBMCs, respectively, from SS patients compared to non-SS controls. It is noteworthy that miR-181a and miR-16 overexpression in SG tissues of SS patients has been previously correlated with decreased salivary function [92]. Lastly, let-7b miRNA expression was downregulated in SGECs established from SS patients that were anti-Ro/SSA positive and/or anti-La/SSB positive, as compared to anti-Ro/SSA and anti-La/SSB negative SS patients. The rest of miRNAs investigated were not found to be differentially expressed in the aforementioned two SS subgroups [93]. However, it should be noted that the multiplicity of miRNA targets and the complexity of their regulation render extremely difficult the interpretation of data concerning their role in autoimmune responses.

In summary, the autoimmune responses in SS appear to be extremely regulated. This is indicated by a) the complex pathways involved in the expression of intracellular autoantigens by non-immune tissues, such as glandular epithelia, that include the cross-talk of innate immunity signals and post-transcriptional regulation and b) the mechanisms involved in the exposure of these autoantigens in the immune system and the development of autoimmune reactions, with special attention to the apoptotic cell death and the release of autoantigen-loaded exosomes by SGECs (Figure-1). Further studies are needed to elucidate the regulation of autoantigen expression, as well as the autoantibody production and pathogenicity in SS, and to enable the development of therapeutic interventions.

The above-mentioned data were presented at the 12<sup>th</sup> International Symposium on Sjögren's Syndrome that was held at Kyoto, Japan on October 9-12, 2013. Along with the

other studies presented in this special issue of the Journal of Autoimmunity, sheds a light on the novel clinical, pathogenic and therapeutic aspects of the disease.

**Table 1.** Prevalence of autoantibodies in SS patients.

<b>Autoantibodies against</b>	<b>Prevalence (%)</b>
Ro52/TRIM21	66.7
Ro60/TROVE2	52.1
La/SSB	49
UIRNP	2
Rheumatoid factor	36-74
Cryoglobulins	9-15
Centromere (ACA)	4-17
Mitochondria (AMA)	1.7-27
Smooth muscle	30
Cyclic citrullinated peptides (anti-CCP)	3-10
Calreticulin	20
Muscarinic 3 receptor	11
Carbonic anhydrases	12.5-20.8

**Table 2.** Association of autoantibodies with clinical features of SS patients.

<b>Autoantibodies against</b>	<b>Clinical associations</b>
Ro52/TRIM21	<ul style="list-style-type: none"> <li>• younger age at diagnosis and longer disease duration</li> <li>• exocrine gland hypofunction as attested by functional tests</li> </ul>
Ro60/TROVE2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• severe infiltration of salivary glands</li> <li>• salivary gland enlargement</li> <li>• extraglandular manifestations</li> </ul>
La/SSB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hypergammaglobulinemia, Cryoglobulinemia</li> <li>• Neonatal lupus-congenital heart block</li> </ul>
UIRNP	Overlapping syndrome with MCTD
Rheumatoid factor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• younger age at diagnosis</li> <li>• extraglandular manifestations</li> </ul>
Cryoglobulins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• younger age at diagnosis</li> <li>• salivary gland enlargement</li> <li>• extraglandular manifestations</li> <li>• MALT lymphoma</li> <li>• hypocomplementemia</li> <li>• hypergammaglobulinemia</li> </ul>
Centromere (ACA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Overlap with systemic sclerosis</li> <li>• Milder disease</li> <li>• Negative correlation with anti-Ro/SSA, anti-La/SSB antibodies</li> </ul>
Mitochondria (AMA)	Primary biliary cirrhosis
Smooth muscle	Autoimmune hepatitis
Cyclic citrullinated peptides (CCP)	Articular manifestations
Muscarinic 3 receptor	Sicca symptoms
Carbonic anhydrases	Renal tubular acidosis

## REFERENCES

- [1] Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun*, 2012;39:4-8.
- [2] Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006;43:203-48.
- [3] Routsias JG, Kyriakidis N, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med*;16:19-26.
- [4] Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM *et al.* Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol*, 2000;121:551-6.
- [5] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010;34:400-7.
- [6] Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG *et al.* Minor salivary gland inflammatory lesions in sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol*, 2013;40:1566-71.
- [7] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol*, 2008;173:1389-96.
- [8] Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 1991;18:210-4.
- [9] Jonsson MV, Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med*, 2008;37:515-21.
- [10] Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou EK, Kavantzias N, Ziakas P *et al.* Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum*, 2007;56:3977-88.
- [11] Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1999;118:154-63.
- [12] Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010;35:219-24.
- [13] Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994;72:162-5.
- [14] Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun*, 2010;35:212-8.
- [15] Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of

- non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci*, 2002;110:21-30.
- [16] Bourazopoulou E, Kapsogeorgou EK, Routsias JG, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Functional expression of the alpha 2-macroglobulin receptor CD91 in salivary gland epithelial cells. *J Autoimmun*, 2009;33:141-6.
- [17] Kapsogeorgou EK, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cells (SGEC): carriers of exquisite B7-2 (CD86) costimulatory molecules. *J Autoimmun*, 2010;35:188-91.
- [18] Katsiogiannis S, Kapsogeorgou EK, Manoussakis MN, Skopouli FN. Salivary gland epithelial cells: a new source of the immunoregulatory hormone adiponectin. *Arthritis Rheum*, 2006;54:2295-9.
- [19] Abu-Helu RF, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjogren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. *J Autoimmun*, 2001;17:141-53.
- [20] Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*, 2002;56:456-69.
- [21] Polihronis M, Tapinos NI, Theocharis SE, Economou A, Kittas C, Moutsopoulos HM. Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol*, 1998;114:485-90.
- [22] Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum*, 2005;52:1517-21.
- [23] Nardi N, Brito-Zeron P, Ramos-Casals M, Aguilo S, Cervera R, Ingelmo M *et al*. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin Rheumatol*, 2006;25:341-6.
- [24] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE *et al*. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*, 2002;61:554-8.
- [25] Oke V, Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun*, 2012;39:77-82.
- [26] Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S *et al*. TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol*, 2009;182:3782-92.
- [27] Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annu Rev Biochem*, 2002;71:375-403.
- [28] He J, Guo JP, Ding Y, Li YN, Pan SS, Liu Y *et al*. Diagnostic significance of measuring antibodies to cyclic type 3 muscarinic acetylcholine receptor peptides in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2011;50:879-84.
- [29] Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, Reumann K, Schwartz PE, Will H *et al*. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene*, 2011;30:434-44.
- [30] Itoh K, Itoh Y, Frank MB. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J Clin Invest*, 1991;87:177-86.

- [31] Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev*, 2009;8:632-7.
- [32] Routsias JG, Tzioufas AG. Sjogren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2007;32:238-51.
- [33] Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJ, Moutsopoulos HM. Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1986;61:89-92.
- [34] Mavragani CP, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoantibodies to cellular antigens. Clinical and molecular aspects. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000;123:46-57.
- [35] Tzioufas AG, Wassmuth R, Dafni UG, Guialis A, Haga HJ, Isenberg DA *et al*. Clinical, immunological, and immunogenetic aspects of autoantibody production against Ro/SSA, La/SSB and their linear epitopes in primary Sjogren's syndrome (pSS): a European multicentre study. *Ann Rheum Dis*, 2002;61:398-404.
- [36] Friedman DM, Llanos C, Izmirly PM, Brock B, Byron J, Copel J *et al*. Evaluation of fetuses in a study of intravenous immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block: Results of a multicenter, prospective, open-label clinical trial. *Arthritis Rheum*, 2010;62:1138-46.
- [37] Fauchais AL, Martel C, Gondran G, Lambert M, Launay D, Jauberteau MO *et al*. Immunological profile in primary Sjogren syndrome: clinical significance, prognosis and long-term evolution to other auto-immune disease. *Autoimmun Rev*, 2010;9:595-9.
- [38] Martel C, Gondran G, Launay D, Lalloue F, Palat S, Lambert M *et al*. Active immunological profile is associated with systemic Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol*, 2011;31:840-7.
- [39] Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J *et al*. Primary Sjogren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)*, 2008;87:210-9.
- [40] Bournia VK, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjogren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun*, 2012;39:15-26.
- [41] Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 2010;6:529-37.
- [42] Katano K, Kawano M, Koni I, Sugai S, Muro Y. Clinical and laboratory features of anticentromere antibody positive primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2001;28:2238-44.
- [43] Kitagawa T, Shibasaki K, Toya S. Clinical significance and diagnostic usefulness of anti-centromere antibody in Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol*, 2012;31:105-12.
- [44] Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, Iwamoto N, Okada A, Tamai M *et al*. Anti-centromere antibody-seropositive Sjogren's syndrome differs from conventional subgroup in clinical and pathological study. *BMC Musculoskelet Disord*;11:140.
- [45] Bournia VK, Diamanti KD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Anticentromere antibody positive Sjogren's Syndrome: a retrospective descriptive analysis. *Arthritis Res Ther*;12:R47.
- [46] Barcelos F, Abreu I, Patto JV, Trindade H, Teixeira A. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Sjogren's syndrome. *Acta Reumatol Port*, 2009;34:608-12.

- [47] Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, Cohen-Solal J, Aucouturier F, Goetz J *et al.* Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2005;64:114-7.
- [48] Iwamoto N, Kawakami A, Tamai M, Fujikawa K, Arima K, Aramaki T *et al.* Determination of the subset of Sjogren's syndrome with articular manifestations by anticyclic citrullinated peptide antibodies. *J Rheumatol*, 2009;36:113-5.
- [49] Tobon GJ, Correa PA, Anaya JM. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2005;64:791-2.
- [50] Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Lama N, Bonacci E, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in primary Sjogren syndrome may be associated with non-erosive synovitis. *Arthritis Res Ther*, 2008;10:R51.
- [51] Bogdanos DP, Komorowski L. Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta*, 2011;412:502-12.
- [52] Selmi C, Meroni PL, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *J Autoimmun*, 2012;39:34-42.
- [53] Hatzis GS, Fragoulis GE, Karatzaferis A, Delladetsima I, Barbatis C, Moutsopoulos HM. Prevalence and longterm course of primary biliary cirrhosis in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2008;35:2012-6.
- [54] Eglén RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2006;26:219-33.
- [55] Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*, 2006;12:3573-81.
- [56] Iwabuchi Y, Masuhara T. Sialogogic activities of SNI-2011 compared with those of pilocarpine and McN-A-343 in rat salivary glands: identification of a potential therapeutic agent for treatment of Sjogren's syndrome. *Gen Pharmacol*, 1994;25:123-9.
- [57] Nakamura T, Matsui M, Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N *et al.* M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J Physiol*, 2004;558:561-75.
- [58] Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O, Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1996;104:454-9.
- [59] Li J, Ha YM, Ku NY, Choi SY, Lee SJ, Oh SB *et al.* Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjogren's syndrome. *Lab Invest*, 2004;84:1430-8.
- [60] Koo NY, Li J, Hwang SM, Choi SY, Lee SJ, Oh SB *et al.* Functional epitope of muscarinic type 3 receptor which interacts with autoantibodies from Sjogren's syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)*, 2008;47:828-33.
- [61] Kovacs L, Marczinovits I, Gyorgy A, Toth GK, Dorgai L, Pal J *et al.* Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3(213-228) in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2005;44:1021-5.
- [62] Roescher N, Kingman A, Shiota Y, Chiorini JA, Illei GG. Peptide-based ELISAs are not sensitive and specific enough to detect muscarinic receptor type 3 autoantibodies in serum from patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2011;70:235-6.
- [63] Dawson LJ, Allison HE, Stanbury J, Fitzgerald D, Smith PM. Putative anti-muscarinic antibodies cannot be detected in patients with primary Sjogren's syndrome using conventional immunological approaches. *Rheumatology (Oxford)*, 2004;43:1488-95.

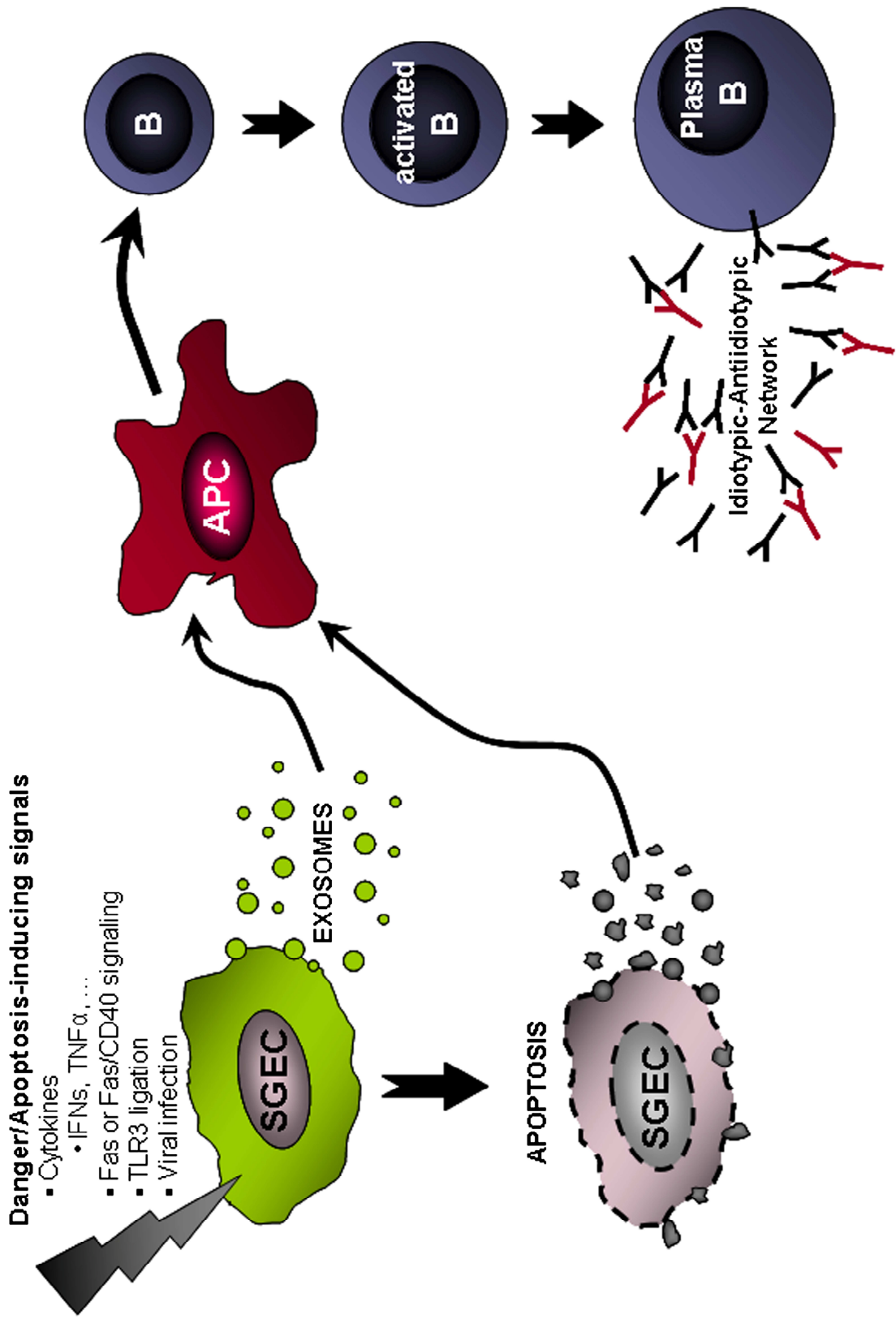


- [64] Itoh Y, Reichlin M. Antibodies to carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 1992;35:73-82.
- [65] Ono M, Ono M, Watanabe K, Miyashita Y, Inagaki Y, Ueki H. A study of anti-carbonic anhydrase II antibodies in rheumatic autoimmune diseases. *J Dermatol Sci*, 1999;21:183-6.
- [66] Nishimori I, Bratanova T, Toshkov I, Caffrey T, Mogaki M, Shibata Y *et al*. Induction of experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *J Immunol*, 1995;154:4865-73.
- [67] Takemoto F, Hoshino J, Sawa N, Tamura Y, Tagami T, Yokota M *et al*. Autoantibodies against carbonic anhydrase II are increased in renal tubular acidosis associated with Sjogren syndrome. *Am J Med*, 2005;118:181-4.
- [68] Manthorpe R, Permin H, Tage-Jensen U. Auto-antibodies in Sjogren's syndrome. With special reference to liver-cell membrane antibody (LMA). *Scand J Rheumatol*, 1979;8:168-72.
- [69] Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol*, 2008;14:3374-87.
- [70] Csepregi A, Szodoray P, Zeher M. Do autoantibodies predict autoimmune liver disease in primary Sjogren's syndrome? Data of 180 patients upon a 5 year follow-up. *Scand J Immunol*, 2002;56:623-9.
- [71] Lindgren S, Manthorpe R, Eriksson S. Autoimmune liver disease in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Hepatol*, 1994;20:354-8.
- [72] Ramos-Casals M, Sanchez-Tapias JM, Pares A, Forns X, Brito-Zeron P, Nardi N *et al*. Characterization and differentiation of autoimmune versus viral liver involvement in patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2006;33:1593-9.
- [73] Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol*, 2005;25:189-201.
- [74] Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M *et al*. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2003;48:3187-201.
- [75] Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1998;41:2238-48.
- [76] Ping L, Ogawa N, Sugai S. Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005;52:573-81.
- [77] Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S *et al*. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity*, 2013;38:450-60.
- [78] Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*, 1974;125C:373-89.
- [79] Routsias JG, Tzioufas AG. B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response. *J Autoimmun*, 2010;35:256-64.

- [80] Stea EA, Routsias JG, Clancy RM, Buyon JP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Anti-La/SSB antiidiotypic antibodies in maternal serum: a marker of low risk for neonatal lupus in an offspring. *Arthritis Rheum*, 2006;54:2228-34.
- [81] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011;34:637-50.
- [82] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001;413:732-8.
- [83] Nandula SR, Dey P, Corbin KL, Nunemaker CS, Bagavant H, Deshmukh US. Salivary gland hypofunction induced by activation of innate immunity is dependent on type I interferon signaling. *J Oral Pathol Med*, 2013;42:66-72.
- [84] Nandula SR, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjogren's syndrome-like disease. *Oral Dis*, 2011;17:801-7.
- [85] Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura PR, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J Oral Pathol Med*, 2009;38:42-7.
- [86] Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, Sellam J, Eid P, Lebon P *et al*. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol*, 2008;38:1058-64.
- [87] Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG *et al*. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2007;147:497-503.
- [88] Kelly KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J *et al*. "Endogenous adjuvant" activity of the RNA components of lupus autoantigens Sm/RNP and Ro 60. *Arthritis Rheum*, 2006;54:1557-67.
- [89] Kyriakidis NC, Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. RO52/TRIM21 EXPRESSION IN SALIVARY GLAND EPITHELIAL CELLS (SGECs) IS UPREGULATED BY TLR3-SIGNALING. Annual European Congress of RHEUMATOLOGY, Madrid, Spain: *Annals of the Rheumatic Diseases*; 2013, p. 78.
- [90] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009;136:215-33.
- [91] Carissimi C, Fulci V, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity. *Autoimmun Rev*, 2009;8:520-4.
- [92] Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2011;63:535-44.
- [93] Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjogren's syndrome: candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression. *J Autoimmun*, 2011;37:129-35.

## **LEGEND TO FIGURE**

Schematic representation of the development and regulation of humoral autoimmune responses in SS. At inflamed salivary tissues, exposure to danger or apoptosis-inducing signals leads glandular epithelial cells (SGECs) expressing the intracellular autoantigenic proteins to discharge them to the microenvironment through exosomes or apoptotic bodies. These autoantigen-loaded vesicles are processed by antigen-presenting cells (APCs) and result to the activation of B cells and the generation of autoantibody-producing B cells. The detection and pathogenicity of the produced autoantibodies depends on the balance of idiotypic/antiidiotypic antibodies and the development of an idiotypic/anti-idiotypic network, which neutralizes the pathogenic autoantibodies.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Μοτίβο Αναγνώρισης RNA (MAR) της La/SSB: Η Γέφυρα για Διασωματιακή Επέκταση της Αυτοάνοσης Απόκρισης στο U1-RNP

Ιωάννης Γ. Ρούτσιας, Νικόλαος Χ. Κυριακίδης, Michael Latreille, Αθανάσιος Γ. Τζιούφας.

### Περίληψη

Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ποικίλων συνόλων αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν κυρίως το U1 ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίο (RNP) ή/και το Ro/La ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η διαφοροποίηση της αυτοάνοσης απόκρισης από το ένα σύμπλοκο στο άλλο (διασωματιακή διαφοροποίηση) θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω επέκτασης επιτόπων. Έως τώρα, παραμένει άγνωστο το πώς η αυτοάνοση απόκριση “μεταπηδά” από ένα σωματίο σε κάποιο άλλο. Δεδομένου ότι η πλειονότητα των πυρηνικών αυτοαντιγόνων στο ΣΕΛ είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA και οι κύριοι επίτοποί τους έχουν προηγουμένως χαρτογραφηθεί εντός των περιοχών MAR τους (μοτίβα αναγνώρισης RNA), στην πορεία της διαμοριακής και διασωματιακής διαφοροποίησης της αυτοάνοσης απόκρισης μπορεί να εμπλέκονται συντηρημένες αλληλουχίες εντός των MAR. Διερευνήσαμε τη δυνατότητα της περιοχής MAR του αυτοαντιγόνου La/SSB να επάγει την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν με διασταυρούμενη αντίδραση συστατικά του U1-RNP και επομένως την ικανότητά του MAR του να προάγει τη διασωματιακή επέκταση επιτόπων. Ανοσοποιήσαμε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας με ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στον επίτοπο 145–164 της La/SSB (αλληλουχία που ανήκει στο MAR της La/SSB), συνδεδεμένο με τέσσερα αντίγραφα ενός ικρίωματος-φορέα. Ελήφθησαν οροί από 20 ασθενείς με ΣΕΛ και αντί-U1-RNP αντισώματα και οροί 26 ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren και έχουν αντί-La/SSB αντισώματα. Όλοι οι οροί εξετάστηκαν για την ενεργότητά τους ενάντια στον κύριο επίτοπο της La/SSB (πεπτίδιο 349–364), στο αντιγόνο U1-RNP και τον σχετιζόμενο με το MAR επίτοπο της La/SSB (πεπτίδιο 145–164). Ειδικά αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 από επιλεγμένους ορούς απομονώθηκαν με στήλες ανοσοσυγγένειας. Έπειτα από την ανοσοποίηση των ζώων με το πεπτίδιο 145-164, ανιχνεύθηκαν ειδικά IgG αντισώματα, έναντι του αυτοαντιγόνου La/SSB (εβδομάδες 3–7), του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση (εβδομάδες 3–27), και του αυτοαντιγόνου RNP (εβδομάδες 7–20). Η απόκριση αυτή μειώθηκε σταδιακά φτάνοντας σε χαμηλά επίπεδα μεταξύ των εβδομάδων 27–42 μετά την ανοσοποίηση. Τα κεκαθαρμένα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 αναγνώριζαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western την πρωτεΐνη La/SSB και ένα αυτοαντιγόνο μοριακού βάρους 70-kD και επέδειξαν σημαντική ενεργότητα σε ανοσοενζυματική ανίχνευση στερεάς φάσης (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay: ELISA) έναντι της πρωτεΐνης U1-RNP. Εξάλειψη των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145-164 οδηγούσε σε απαλοιφή της δραστικότητας έναντι του U1-RNP σε ορούς ανοσοποιημένων κουνελιών, αλλά όχι σε ανθρώπινους ορούς. Ακόμη, το πεπτίδιο 145–164 αναγνωριζόταν σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτοάνοσους ορούς με αντί-RNP δραστικότητα σε σύγκριση με αντί-La/SSB-θετικούς ορούς, σε αντίθεση με το πεπτίδιο 349–364 της La/SSB, το οποίο αναγνωριζόταν σχεδόν αποκλειστικά από ορούς με αντί-La/SSB ενεργότητα. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η περιοχή MAR της La/SSB μπορεί να πυροδοτήσει διασωματιακή διαφοροποίηση της απόκρισης των B κυττάρων στο αυτοαντιγόνο U1-RNP-70 μέσω μοριακής μίμησης. Ο προσδιορισμός των βασικών αλληλουχιών που πυροδοτούν και διαιωνίζουν την αυτοάνοση διαδικασία είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών στην αυτοάνοση.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αυτοάνοσα νοσήματα, τα οποία προκαλούνται από απώλεια της αυτοανοχής, χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων και αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων. Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) θεωρείται ως πρότυπη συστηματική αυτοάνοση διαταραχή που περιλαμβάνει χυμικές και κυτταρικές επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις. Επηρεάζει το δέρμα, τις αρθρώσεις, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, το νευρικό σύστημα, τις ορογόνες μεμβράνες και σχεδόν κάθε όργανο του σώματος (1).

Ο ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι των U1-RNP και Ro/La ριβονουκλεοπρωτεϊνικών (RNP) συμπλόκων (2). Το σύμπλοκο U1-RNP είναι το κύριο συστατικό του ματισώματος, το οποίο καταλύει το μάτισμα των πρόδρομων αγγελιαφόρων RNA (mRNA) σε ώριμο mRNA. Μαζί με τις πρωτεΐνες Sm, το U1-RNP περιλαμβάνει ειδικές πρωτεΐνες (τις RNP 70, RNP A και RNP C) οι οποίες αλληλεπιδρούν με το μήκος 164-νουκλεοτιδίων U1 RNA. Οι πρωτεΐνες RNP-70 και RNP-A φέρουν κλασσικά μοτίβα αναγνώρισης RNA (RNA recognition motifs: MARs) και δεσμεύονται άμεσα στο U1 RNA, ενώ η πρωτεΐνη RNP-C συνδέεται με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης με την RNP-70 και μία ή περισσότερες εκ των Sm πρωτεϊνών (3). Παρόμοια, το Ro/La σωματίο συντίθεται από ένα από τα τέσσερα μικρά, πλούσια σε ουρακίλες hY RNAs (human cYtoplasmic RNAs: ανθρώπινα κυτταροπλασματικά RNA), τα οποία συνδέονται μη ομοιοπολικά με τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες, τα αυτοαντιγόνα Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB (4). Οι πρωτεΐνες La/SSB και Ro60/TROVE2 περιέχουν μοτίβα πρόσδεσης RNA [ένα κλασσικό MAR και ένα στοιχείο TROVE (telomerase-RO-vault-element), αντίστοιχα] επιτρέποντας την άμεση πρόσδεσή τους στο hYRNA, ενώ η Ro52/TRIM21 συμμετέχει στο σύμπλοκο μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (2,5). Η εντόπιση των

Ro/La συμπλόκων είναι κυρίως κυτταροπλασματική, αλλά η δημιουργία τους πραγματοποιείται στον πυρήνα (6,7).

Το Ro/La RNP σωματίο θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της αυτοανοσίας, καθώς τα αυτοαντισώματα που στοχεύουν το σωματίο αυτό εμφανίζονται συνήθως πριν την κλινική εκδήλωση του ΣΕΛ και νωρίτερα από τα αντί-Sm αντισώματα και τα αντισώματα έναντι πυρηνικών RNP (μέσος όρος 3.4 χρόνια έναντι 1.2 χρόνια) (8).

Το ποσοστό των ασθενών με ΣΕΛ που έχουν αντί-Sm αντισώματα ή αντισώματα έναντι πυρηνικών RNP αυξάνει δραματικά κατά το έτος που προηγείται της διάγνωσης της νόσου, υποδηλώνοντας ότι η εμφάνιση αυτών των αυτοαντισωμάτων προαναγγέλλει την κλινική εκδήλωση της νόσου (8). Συγκεκριμένα, η κλινική εκδήλωση της νόσου συμπίπτει όχι τόσο με την εμφάνιση των αντί-Sm ή αντί-RNP αντισωμάτων, αλλά με την παύση της εμφάνισης νέων αυτοαντισωμάτων. Πράγματι, ο ρυθμός εμφάνισης νέων αυτοαντισωμάτων έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σταδιακά έως τη στιγμή της διάγνωσης του ΣΕΛ και σταματά μετέπειτα (8).

Η διαφοροποίηση και ενίσχυση της αυτοάνοσης απόκρισης θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω επέκτασης επιτόπων, μια διαδικασία κατά την οποία δημιουργούνται διακριτοί επίτοποι που δεν προέρχονται από διασταυρούμενες αντιδράσεις (9,10). Έχουν περιγραφεί δύο τύποι επέκτασης επιτόπων: η ενδομοριακή επέκταση, κατά την οποία η αυτοάνοση απόκριση επεκτείνεται σε επίτοπους εντός της ίδιας πρωτεΐνης, και η διαμοριακή επέκταση, σε πρωτεΐνες που συγκροτούν το ίδιο μοριακό σύμπλοκο, όπως είναι το ματίσωμα και τα σωματία Ro/La. Δεν είναι ακόμα γνωστό το πώς και αν η αυτοάνοση απόκριση "μεταπηδά" από ένα σωματίο σε άλλο (διασωματιακή επέκταση). Δεδομένου ότι η πλειονότητα των πυρηνικών αυτοαντιγόνων στο ΣΕΛ είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA και οι κύριοί τους επίτοποι έχουν παλαιότερα χαρτογραφηθεί εντός των MAR τους (στην περίπτωση των La/SSB, RNP-A και RNP-70 αυτοαντιγόνων) (2), η



μοριακή ομοιότητα συντηρημένων αλληλουχιών εντός των MAR θα μπορούσε να συμμετέχει στις διαδικασίες διαμοριακής και διασωματιακής διαφοροποίησης της αυτοάνοσης απόκρισης. Στην εργασία αυτή, μελετήθηκε η δυνατότητα του MAR του αυτοαντιγόνου La/SSB να επάγει την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν συστατικά του σωματίου UI-RNP, κι επομένως της ικανότητάς του να προάγει τη διασωματιακή επέκταση επιτόπων.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Οροί ανθρώπων**

Ελήφθησαν οροί από 72 ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (11), 82 ασθενείς με ΣΕΛ (12), 38 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) (13) και 55 υγιή άτομα. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα Αμερικάνικα/Ευρωπαϊκά κριτήρια ταξινόμησης για τα αντίστοιχα νοσήματα (11–13). Όλοι οι οροί είχαν προηγουμένως ελεγχθεί για την ύπαρξη αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων με αντίστροφη ανοσοηλεκτροφόρηση (counterimmunoelectrophoresis: CIE) και με ανοσοαποτύπωση, όπως έχει προηγούμενα περιγραφεί (14).

### **Σύνθεση και καθαρισμός πεπτιδίων**

Ο γραμμικός Β κυτταρικός επίτοπος της La/SSB ο οποίος εντοπίζεται εντός του MAR αυτής  $^{145}$ TLHKAFKGSIFVVFDSIESA $^{164}$ , και ο κύριος επίτοπος της La/SSB  $^{349}$ GSGKGGKVQFQGKTKF $^{364}$  συντέθηκαν σε μορφή πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (multiple antigenic peptides: MAP) και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοποίησης και ELISA. Πιο συγκεκριμένα, τέσσερα αντίγραφα του πεπτιδίου συνδέθηκαν στον τετραμερή MAP σκελετό. Το πεπτίδιο-μάρτυρας IASRYDQL (που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 250–257 της γλυκοπρωτεΐνης gp63 της *Leishmania*), το οποίο επιλέχθηκε λόγω του ότι έχει το ίδιο φορτίο με το πεπτίδιο 145–

164, σε pH 7, συνδέθηκε σε μορφή MAP, όπως το πεπτίδιο 145–164 και χρησιμοποιήθηκε σαν πεπτίδιο-μάρτυρας (ctrl-pep). Ένα επιπλέον πεπτίδιο που αντιστοιχεί στον επίτοπο  $^{145}\text{TLHKAFKGSIFVVFDSIESA}^{164}$  συντέθηκε στην ελεύθερη μορφή του και χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση αντισωμάτων και αξιολόγηση της δραστικότητάς τους. Όλα τα πεπτίδια συντέθηκαν βάσει της διαδικασίας σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση, απομονώθηκαν με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεΐνης (fast protein liquid chromatography) και ελέγχθηκαν με φασματογραφία μάζας για την ταυτοποίηση της αλληλουχίας τους.

#### **Ανοσοποίηση κουνελιών**

Δέκα θηλυκά λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, 6-8 εβδομάδων, ανοσοποιήθηκαν βάσει πρωτοκόλλου το οποίο έχει παλαιότερα περιγραφεί (15). Χρησιμοποιήθηκε 0.5 mg ανοσογόνου γαλακτοποιημένου σε πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (complete Freund's adjuvant: CFA) για την πρώτη ανοσοποίηση και μη πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund για τις επόμενες ανοσοποιήσεις. Έγιναν διαδοχικές αιμοληψίες πριν την κάθε ανοσοποίηση των ζώων κατά τις εβδομάδες 0, 3, 7, 13, 20, 27, 38 και 42.

#### **Εκτίμηση της αντί-La/SSB και αντί-U1-RNP ενεργότητας**

Παράχθηκε η ανασυνδυασμένη μορφή ολόκληρου του μορίου της ανθρώπινης La/SSB πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία που έχει παλαιότερα περιγραφεί από τους Troster και συν. (16) και χρησιμοποιήθηκε σε ELISA σύμφωνα με ένα παλαιότερα δημοσιευμένο πρωτόκολλο (17) με τροποποιήσεις στις συνθήκες επίστρωσης των πλακιδίων. Πιο συγκεκριμένα, τα πλακίδια επιστρώθηκαν με ανασυνδυασμένη La/SSB παρουσία 6M ουρίας ώστε να αποδιαταχθεί το αυτοαντιγόνο και να απομακρυνθεί οποιοδήποτε μόριο RNA προκειμένου να αποκαλυφθούν οι MAR περιοχές του. Η

ενεργότητα έναντι του συμπλόκου U1-RNP μετρήθηκε με μια εμπορικά διαθέσιμη ELISA η οποία έχει σαν βάση κεκαθαρισμένο αυτοαντιγόνο (RNP ELISA; IBL, Hamburg, Germany).

#### **Δοκιμασίες ELISA με συνθετικά πεπτίδια**

Αναπτύχθηκαν ειδικές δοκιμασίες ELISA με πεπτίδια και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ορούς ανθρώπων και κουνελιών. Οι οροί από όλα τα ζωικά πρότυπα εξετάστηκαν για την ενεργότητά τους έναντι του πεπτιδίου 145–164, του πεπτιδίου 349–364 και του πεπτιδίου-μάρτυρα. Οι οροί των ασθενών εξετάστηκαν για την ενεργότητά τους έναντι του πεπτιδίου 145–164 και του πεπτιδίου 349–364. Πλακίδια πολυστυρενίου 96-πηγαδιών (Costar, Corning, NY, USA) επιστρώθηκαν με πεπτιδίο επίστρωσης διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών-διττανθρακικών (pH 9.6) σε συγκέντρωση 5 µg/mL. Η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων αναστάλη με τη χρήση διαλύματος, το οποίο αποτελείτο από αλβουμίνη βόειου ορού 2% βάρος κατ' όγκο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline: PBS) pH 7.4 (διάλυμα αλβουμίνης). Ακολούθως, προστέθηκαν οι οροί από άνθρωπο ή κουνέλι στο διάλυμα αλβουμίνης σε αραιώση 1:700 ή 1:140, αντίστοιχα. Μετά από επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, τα πλακίδια της ELISA ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS. Προστέθηκε αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρίνης ανθρώπου ή κουνελιού συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), σε αραιώση 1:1400 σε διάλυμα αλβουμίνης, στις δοκιμασίες με τους ορούς από άνθρωπο ή κουνέλι, αντίστοιχα, και τα πλακίδια επώαστηκαν για 1 ώρα. Ακολούθως, τα πηγάδια ξεπλύθηκαν και προστέθηκαν 100 µL υποστρώματος *p*-νιτροφαινόλης (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 405 nm. Η τιμή κατωφλίου για τις δοκιμασίες με τους ανθρώπινους ορούς ορίστηκε ως η μέση οπτική πυκνότητα συν τρεις τυπικές αποκλίσεις που προέκυπτε από τις μετρήσεις των ορών των 55 υγιών ατόμων.

Προκειμένου να αποκλειστεί η μη ειδική δέσμευση και να επιβεβαιωθεί η ικανότητα επίστρωσης στα πειράματα ELISA, κάθε πλακίδιο χωρίστηκε σε δύο μισά, το ένα επιστρωμένο με το πεπτίδιο 145–164 και το άλλο με φορέα-MAP και διάλυμα αλβουμίνης. Κανείς από τους ορούς κουνελιών δεν εμφάνισε σημαντική ενεργότητα έναντι του MAP-φορέα ή της αλβουμίνης. Στα πειράματα που έγιναν για τη μελέτη των ανθρώπινων ορών, 2 οροί ασθενών με ΣΕΛ εμφάνισαν σημαντική ενεργότητα έναντι του MAP φορέα ή/και της αλβουμίνης και αποκλείστηκαν από την ανάλυση των δεδομένων.

#### **Απομόνωση των ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164aa**

Με χρωματογραφία συγγένειας και τη χρήση στήλης πρωτεΐνης-A σεφαρόζης απομονώθηκε ολική IgG από τους ορούς τριών ασθενών οι οποίοι είχαν αντισώματα έναντι του επιτόπου 145–164 της La/SSB. Τα κλάσματα της IgG συμπυκνώθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε PBS. Παρασκευάστηκε μία ειδική στήλη ανοσοσυγγένειας σεφαρόζης 4B ενεργοποιημένης από βρωμιούχο κυάνιο (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), χρησιμοποιώντας 10 mg του συνθετικού πεπτιδίου 145–164. Απομονώθηκαν αντισώματα τάξεως γ έναντι του πεπτιδίου 145–164 από τα τρία κλάσματα των ανθρώπινων ολικών IgG όπως επίσης και από ορούς κουνελιών τα οποία είχαν ανοσοποιηθεί με το πεπτίδιο 145–164 χρησιμοποιώντας κλασσικές μεθόδους χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας (η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 0.1 mol/L HCl-Gly, pH 2.7). Η συγκέντρωση των αντισωμάτων μετρήθηκε με τη δοκιμασία Bradford.

#### **Ανοσοαποτύπωση κατά Western**

Εκχύλισμα από θύμο αδένων κουνελιών ηλεκτροφορήθηκε παρουσία SDS υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και ακολούθως μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα με Tris (Tris-buffered saline), pH 7.5, το οποίο περιείχε 0.1% Tween (TBS-T) και 5% γάλα χωρίς λιπαρά οξέα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, και μετά

επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C με αντιορούς κουνελιών σε αρραίωση 1:120 σε γάλα με TBS-T. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν και ακολούθησε επώαση με αντισώματα έναντι IgG κουνελιών συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση (1:1,100 σε TBS-T γάλα). Ακολούθως, οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν και χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα nitro-blue-tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) ώστε να αποκαλυφθούν οι θετικές αντιδράσεις.

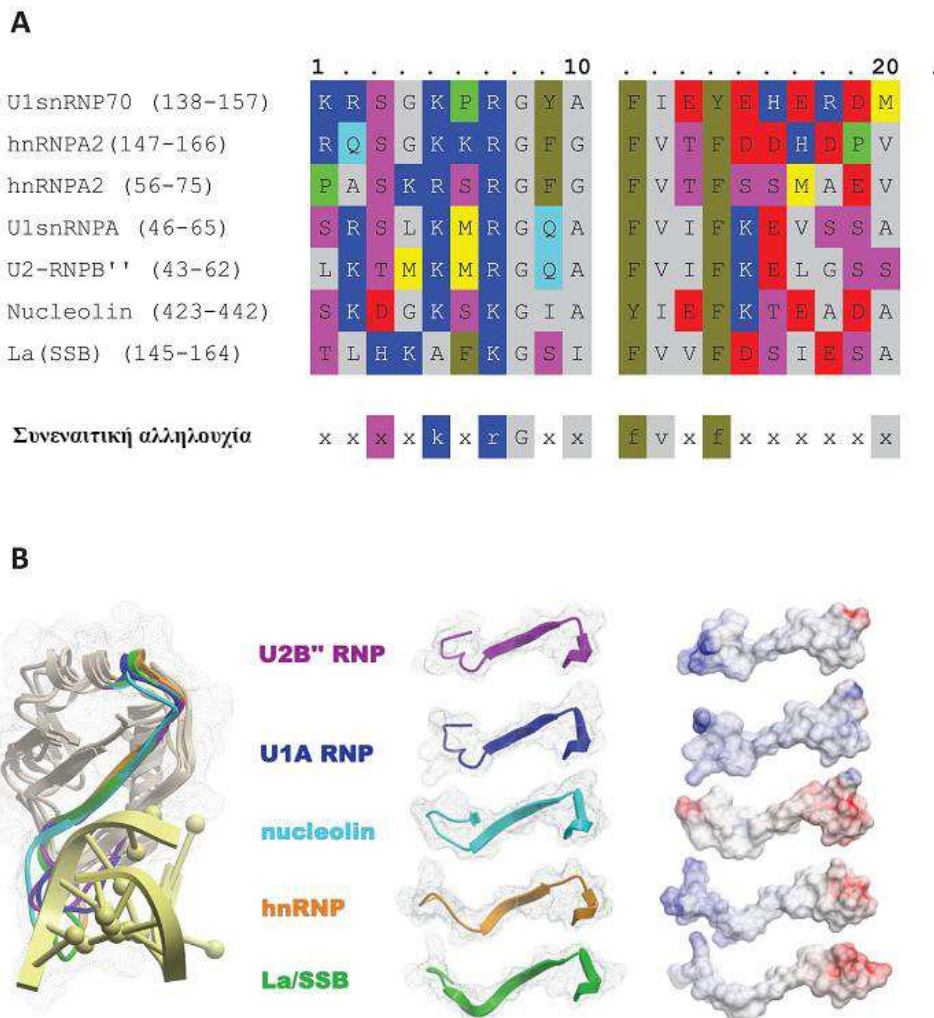
## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **Ομοιότητα στην αλληλουχία και τη δομή ανάμεσα σε MARs που ανήκουν σε διαφορετικά αυτοαντιγόνα**

Σύμφωνα με την υπόθεσή μας, μία συναινετική αλληλουχία μέσα στην περιοχή MAR η οποία είναι συντηρημένη σε πολλά αυτοαντιγόνα, θα μπορούσε να διαδραματίσει έναν ρόλο σαν επίτοπος-οδηγός για τη διαμοριακή και διασωματιακή επέκταση επιτόπων στη συστηματική αυτοανοσία. Μελετήσαμε την ομοιότητα αλληλουχίας και δομής ανάμεσα στα MARs διάφορων αυτοαντιγόνων. Ταυτοποιήθηκε μία περιοχή ομολογίας στο κεντρικό κομμάτι των MARs. Αν και ο βαθμός ομοιότητας της πρωτοταγούς τους δομής ήταν μέτριος, ποικίλλοντας από 35% έως 60% (Εικόνα 1A), όλες οι περιοχές MAR σχημάτιζαν παρόμοιες τριτοταγείς δομές (Εικόνα 1B) (18–21) οι οποίες θα μπορούσαν να ευοδώνουν τη διασταυρούμενη αναγνώρισή τους από αυτοαντισώματα. Η ομόλογη περιοχή της La/SSB (αμινοξέα 145–164) είχε παλαιότερα χαρακτηριστεί από την ομάδα μας σαν ένας B κυτταρικός επίτοπος που σχετίζεται με το ΣΕΛ (14), ο οποίος λειτουργεί και σαν T κυτταρικός επίτοπος (22) σε πειράματα ανοσοποίησης κουνελιών.

**Τα αντισώματα που παράχθηκαν σε κουνέλια ανοσοποιημένα με τον επίτοπο 145–164 της La/SSB αντιδρούν τόσο με την αντίστοιχη πρωτεΐνη όσο και με το αυτοαντιγόνο U1-RNP**

Στο μοντέλο διαφοροποίησης που προτείνουμε, το MAR της La/SSB μπορεί να εμπλέκεται στην επαγωγή της αυτοάνοσης απόκρισης έναντι του ματισώματος μέσω μοριακής μίμησης. Προκειμένου να μελετηθεί αυτή η πιθανότητα, ανοσοποιήσαμε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας με το πεπτιδίιο 145–164 της La/SSB. Οι οροί των κουνελιών

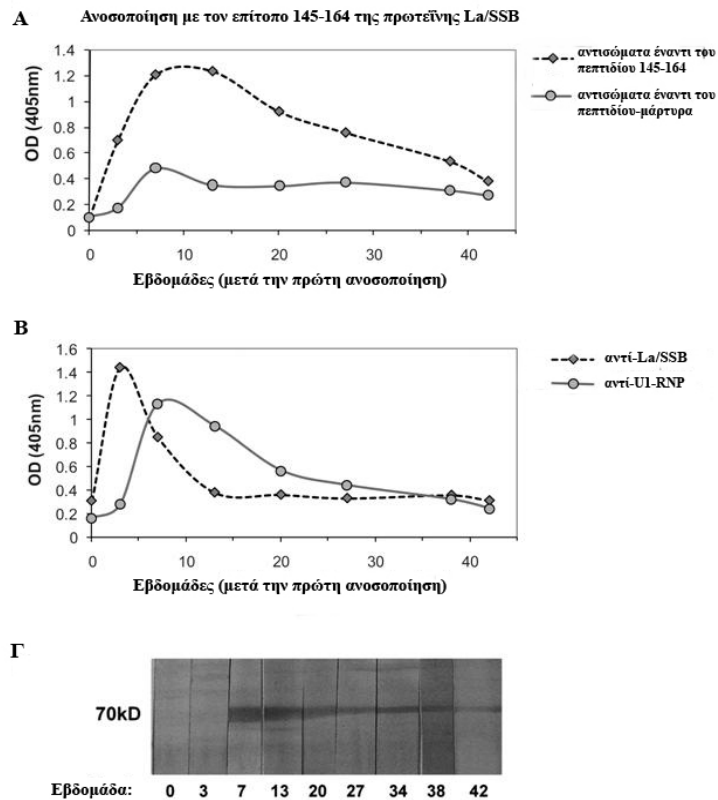


**Εικόνα 1.** (A) Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας και συντηρημένες περιοχές ανάμεσα στα μοτίβα αναγνώρισης RNA (RNP1) αυτοαντιγόνων του ματισώματος και άλλων αυτοαντιγόνων. Τα ομόλογα αμινοξέα αντιπροσωπεύονται με διαφορετικά χρώματα. Το συντηρημένο μοτίβο συναίνεσης δείχνεται κάτω από τις αλληλουχίες. (B) Δομική ομοιότητα του επίτοπου 145–164 που βρίσκεται εντός του μοτίβου RNP1 της La/SSB με άλλα αυτοαντιγόνα. Υπερτιθέμενες δομές των περιοχών RNP1 των αυτοαντιγόνων U2B'' RNP (PDB: 1A9N, [20]), U1A RNP (PDB: 1O1A, [19]), νουκλεολίνη (PDB: 1RKJ, [18]), hnRNP (PDB: 1 ×4B), και La/SSB (PDB: 1ZH5, [21]) απεικονίζονται (στα αριστερά) ευρισκόμενες σε σύμπλοκο με ένα διμερές UUU<sub>OH</sub>-RNA το οποίο έχει ληφθεί από τη δομή 1ZH5 (απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα). Οι περιοχές ομολογίας με τον επίτοπο της La/SSB απεικονίζονται σαν κορδέλες με διαφορετικά χρώματα, και το ηλεκτροστατικό τους δυναμικό απεικονίζεται στα δεξιά (θετικά φορτία με μπλε χρώμα, αρνητικά φορτία με κόκκινο, και ουδέτερες περιοχές με γκρι). Όλες οι δομές έχουν ληφθεί από τη βάση δεδομένων PDB.

συνελέχθησαν σε διάφορα χρονικά σημεία πριν και μετά την ανοσοποίηση και ελέγχθηκαν για την ενεργότητά τους τόσο έναντι του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση όσο και έναντι ενός πεπτιδίου-μάρτυρα. Βρέθηκε ότι 3 εβδομάδες μετά την πρώτη ανοσοποίηση τα κουνέλια δημιούργησαν αντισώματα έναντι του πεπτιδίου με το οποίο ανοσοποιήθηκαν, τα οποία έφτασαν στο μέγιστο της ενεργότητάς τους μεταξύ των εβδομάδων 7 και 13. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα έναντι του πεπτιδίου-μάρτυρα (Εικόνα 2Α).

Επιπλέον, μελετήσαμε κατά πόσον τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν έναντι του πεπτιδίου 145–164 της La/SSB είχαν την ικανότητα να αναγνωρίζουν την πλήρη μορφή του αντιγόνου όπως επίσης και πρωτεΐνες που βρίσκονται στο U1-RNP. Βρέθηκε ότι τα πρωτοεμφανιζόμενα αντισώματα, που ήταν ικανά να αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη La/SSB (την εβδομάδα 3 μετά την ανοσοποίηση) εξαλείφθηκαν προοδευτικά ως την εβδομάδα 13. Την εμφάνιση των αντί-La/SSB αντισωμάτων ακολούθησε η παραγωγή αντί-U1-RNP αντισωμάτων την εβδομάδα 7, τα οποία διατηρήθηκαν σε υψηλά επίπεδα μέχρι την εβδομάδα 20 (Εικόνα 2Β). Συμπερασματικά, η ανοσοποίηση με έναν επίτοπο του αυτοαντιγόνου La/SSB μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αντισωμάτων ικανών να αναγνωρίσουν συστατικά ενός άλλου αυτοαντιγονικού συμπλόκου, του U1-RNP.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα ανωτέρω ευρήματα ελέγχθηκαν οι χρονικά σειριακοί οροί των ανοσοποιημένων κουνελιών με ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι εκχυλίσματος θύμου αδένος κουνελιού. Την εβδομάδα 7, εμφανίστηκε μία ζώνη στα 70 kD, η οποία ακολουθούσε επακριβώς την κινητική των αντί-U1-RNP αντισωμάτων σε ό,τι αφορά στον χρόνο εμφάνισης και στην ένταση του σήματος (Εικόνα 2Γ).



**Εικόνα 2.** Ανοσοποίηση κουνελιών με τον επίτοπο 145–164 της La/SSB. (A) Ενεργότητα έναντι του πεπτιδίου 145–164 και του πεπτιδίου-μάρτυρα σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την ανοσοποίηση. (B) Ενεργότητα έναντι των αντιγόνων La/SSB και U1-RNP όπως μετρήθηκε με ειδικές δοκιμασίες ELISA. Η ανάπτυξη αντι-La/SSB αντισωμάτων (την εβδομάδα 3) προηγήθηκε της παραγωγής αντί-U1-RNP αντισωμάτων (εβδομάδες 7–20). (Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western (με τη χρήση εκχυλίσματος θύμου αδένος κουνελιού) όπου φαίνεται η ανάπτυξη και η εξασθένηση της αντί-70kD ενεργότητας των ορών κουνελιών έπειτα από την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο 145–164.

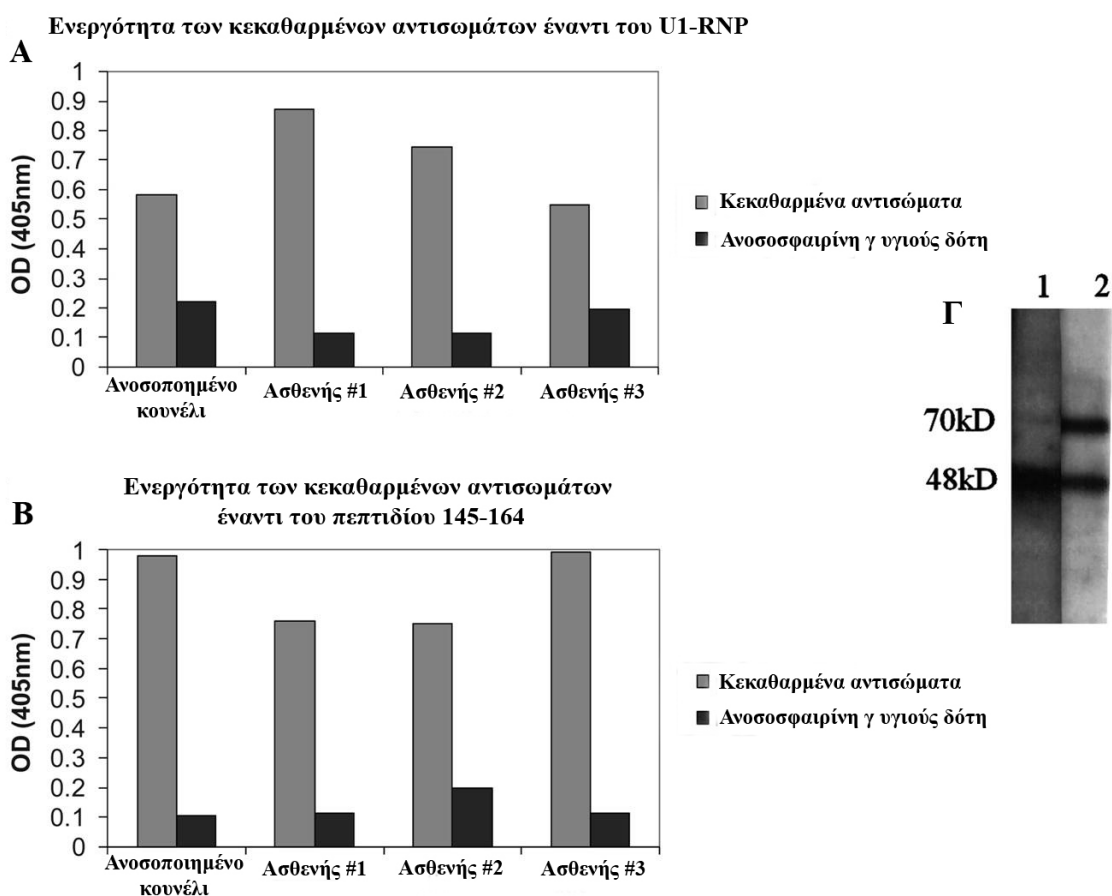
**Η απομόνωση αντισωμάτων έναντι του επίτοπου 145–164 της La/SSB αποκαλύπτει την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν το αυτοαντιγόνο U1-RNP με διασταυρούμενη αντίδραση**

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το μηχανισμό που εμπλέκεται στην αναγνώριση του αυτοαντιγόνου U1-RNP από αυτοαντισώματα στο πρότυπό μας, χρησιμοποιήσαμε το πεπτίδιο αυτό σε στήλη ανοσοσυγγένειας και προχωρήσαμε σε καθαρισμό συγγένειας των ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτού από τους ορούς των ανοσοποιημένων κουνελιών και από ορούς ασθενών με ενεργότητα έναντι του πεπτιδίου



145-164. Βρέθηκε ότι τα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 που προερχόντουσαν από τα ανοσοποιημένα κουνέλια αναγνώριζαν όχι μόνο το πεπτίδιο έναντι του οποίου καθαρίστηκαν (Εικόνα 3Α), αλλά και το αυτοαντιγόνο U1-RNP (Εικόνα 3Β). Αυτή η παρατήρηση ίσχυε και για τους ορούς ασθενών με ΣΕΛ, υποδηλώνοντας ότι ειδικά αντισώματα που προσδέονται σε έναν συντηρημένο επίτοπο της La/SSB έχουν επιπλέον την ικανότητα να αναγνωρίζουν διασταυρούμενα το αυτοαντιγόνο U1-RNP. Τα κεκαθαρμένα αντισώματα από ασθενείς με ΣΕΛ ελέγχθηκαν και σε ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa. Βρέθηκε ότι αναγνωρίζουν πρωτεΐνες μοριακού βάρους 48 kD και 70 kD (Εικόνα 3Γ). Η σύγκριση με πρότυπους ορούς έδειξε ότι αυτές οι ζώνες πιθανότατα αντιστοιχούν στα αυτοαντιγόνα La/SSB και RNP-70. Δεδομένου ότι τα κεκαθαρμένα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 αναγνωρίζουν το αντιγόνο U1-RNP, αναμένουμε ότι τα κεκαθαρμένα αντισώματα έναντι του U1-RNP θα αναγνωρίζουν αντίστοιχα το πεπτίδιο 145–164 της La/SSB. Ωστόσο, το συγκεκριμένο πείραμα δεν πραγματοποιήθηκε.

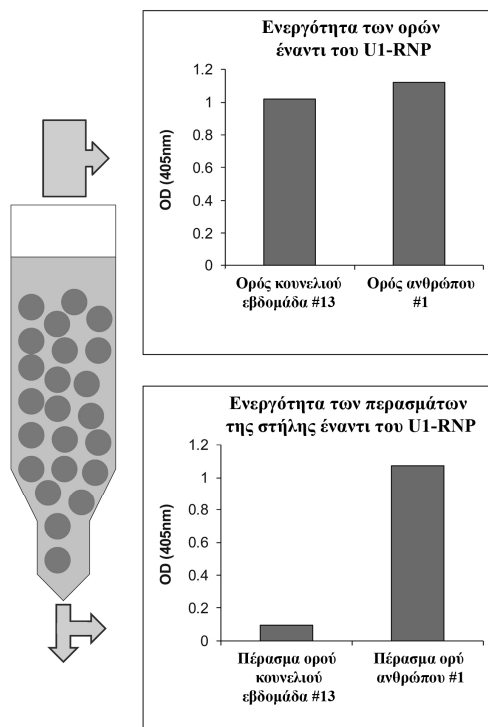
Προκειμένου να μελετηθεί εάν η αναγνώριση επιτόπων στο αυτοαντιγόνο U1-RNP εκτείνεται και εκτός της ομόλογης περιοχής του MAR, εξετάσαμε το κατά πόσον η ενεργότητα έναντι του U1-RNP σε ορούς από ανθρώπους και κουνέλια μπορεί να απορροφηθεί από το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στο MAR (σε στήλη ανοσοσυγγένειας με το πεπτίδιο 145–164). Βρέθηκε ότι έπειτα από την απαλοιφή των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164, οι οροί των ανοσοποιημένων κουνελιών έχασαν την ικανότητά να αναγνωρίζουν το αυτοαντιγόνο U1-RNP. Αντίθετα, ο ορός του ασθενούς 1, ο οποίος



**Εικόνα 3.** Εκτίμηση της ενεργότητας των κεκαθαρμένων αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 από τρεις ασθενείς και ανοσοποιημένα κουνέλια. Όλα τα κεκαθαρμένα αντισώματα αναγνώριζαν το U1-RNP (A) και το πεπτίδιο 145–164 (B) σε ELISA. Κεκαθαρμένα αντισώματα από δύο ασθενείς ελέγχθηκαν επιπλέον και σε ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι εκχυλίσματος κυττάρων HeLa (Γ) και βρέθηκε ότι αναγνωρίζουν ζώνες στα 48kD και 70kD, που αντιστοιχούν στα αυτοαντιγόνα La/SSB και RNP-70.

περάστηκε από την ίδια στήλη ανοσοσυγγένειας, διατηρούσε πλήρως την αντί-U1-RNP ενεργότητά του (Εικόνα 4). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ισχυρά ότι οι οροί των ανοσοποιημένων κουνελιών (που ελέγχθηκαν την εβδομάδα 13 μετά την πρώτη ανοσοποίηση) αναγνωρίζουν την περιοχή MAR του U1-RNP, αλλά όχι άλλους επίτοπους του ίδιου αυτοαντιγόνου. Απεναντίας, οι ανθρώπινοι οροί αναγνωρίζουν πολλαπλούς επίτοπους στο αυτοαντιγόνο U1-RNP, και έτσι η αντί-U1-RNP ενεργότητά τους δεν μπορεί να απορροφηθεί από το πεπτίδιο 145–164. Επιπρόσθετες ενδείξεις προς

αυτό ελήφθησαν από πειράματα αναστολής ELISA, τα οποία κατέδειξαν ότι η αντί-U1-RNP ενεργότητα των ορών των ανοσοποιημένων κουνελιών μπορεί να ανασταλεί (σε ποσοστό 52%–59%) όταν αυτοί επωαστούν με το πεπτιδίο 145–164 (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται).



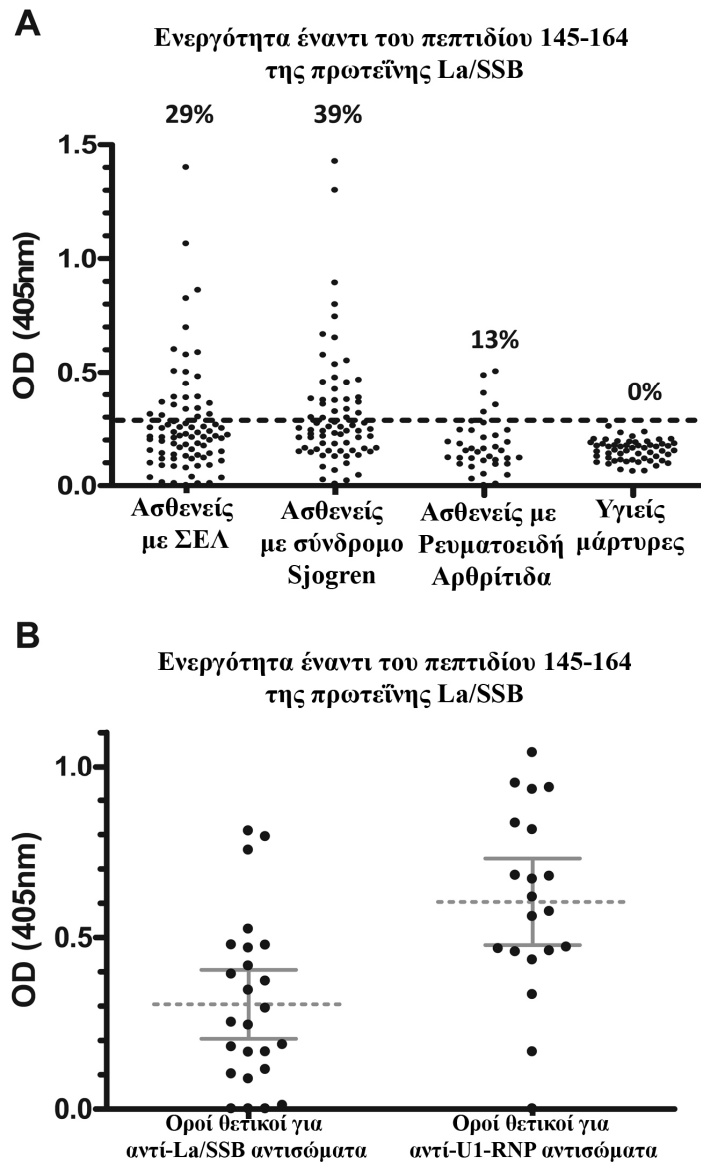
**Σχήμα 4.** Εκτίμηση της ενεργότητας των ορών πριν και μετά τον καθαρισμό συγγένειας των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164. Η απαλοιφή των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 εξάλειψε την αντί-U1-RNP ενεργότητα των ορών των ανοσοποιημένων κουνελιών (εβδομάδα 13) αλλά όχι την αντί-U1-RNP ενεργότητα του ορού του ασθενούς #1. Όλοι οι οροί και τα περάσματα από τις στήλες αραιώθηκαν κατάλληλα ώστε να περιέχουν κατά προσέγγιση 15 µg/mL IgG.

#### Συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 σε αυτοάνοσους ορούς

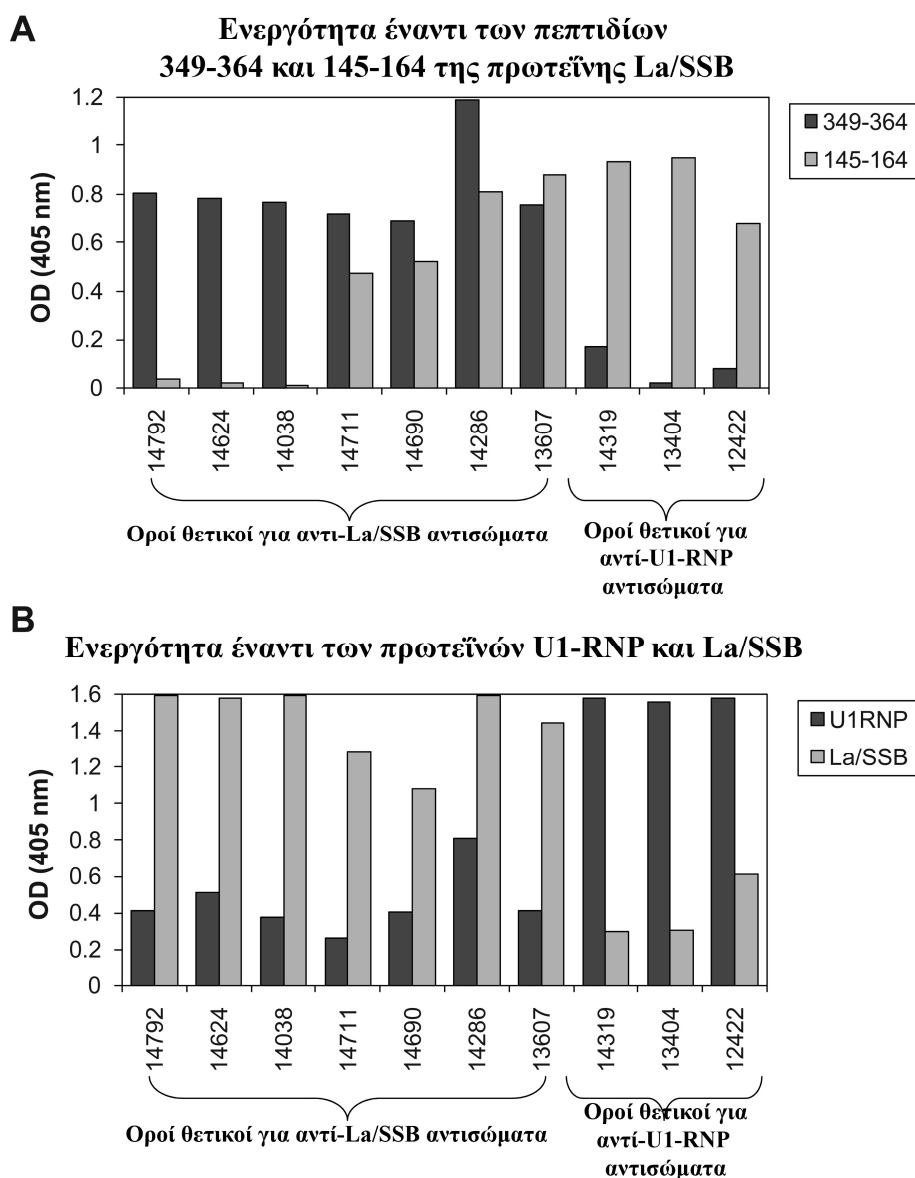
Στη συνέχεια εξετάσαμε τη συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 σε διάφορες αυτοάνοσες νόσους, όπως επίσης και σε φυσιολογικούς πληθυσμούς. Αντισώματα που αναγνωρίζουν τον επίτοπο 145–164 της La/SSB εντοπίστηκαν στο 29% των ορών από ασθενείς με ΣΕΛ, 39% των ορών από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren, και 13% των ορών από ασθενείς με ΡΑ, αλλά όχι σε ορούς φυσιολογικών ατόμων (Εικόνα 5Α). Ανάλυση με CIE των ενεργοτήτων των ορών ως προς την ειδικότητα των αυτοαντισωμάτων που είχαν έδειξε ότι αν και αυτά τα αντισώματα υπήρχαν τόσο σε αντί-La/SSB-θετικούς όσο και σε αντί-RNP-θετικούς

ορούς, η ενεργότητά τους ήταν υψηλότερη σε RNP-θετικούς ορούς ( $t = 4.07$ ,  $P = 0.0002$ ), κάτι το οποίο απαντάται κυρίως σε ασθενείς με ΣΕΛ (Εικόνα 5B).

Προκειμένου να εξεταστεί το προφίλ της ενεργότητας των αυτοαντισωμάτων στους ορούς των ασθενών με περισσότερες λεπτομέρειες, υπολογίσαμε την ενεργότητά των ορών αυτών έναντι του πεπτιδίου 145–164 της La/SSB και του σχετιζόμενου με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren κύριου επίτοπου της La/SSB (πεπτίδιο 349–364) σε σύγκριση με τις ενεργότητες που είχαν εξεταστεί με CIE. Βρέθηκε ότι οι οροί των ασθενών μπορούσαν να χωριστούν σε 3 ομάδες: (α) οροί με αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 349–364 μόνο, (β) οροί που είχαν αντισώματα τόσο έναντι του πεπτιδίου 145–164 όσο και έναντι του πεπτιδίου 349–364 και (γ) οροί που είχαν αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 μόνο (Εικόνα 6A). Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι οροί της ομάδας γ ήταν αντί-RNP θετικοί, ενώ οι οροί που ανήκαν στις ομάδες (α) και (β) ήταν αντί-La/SSB θετικοί. Επομένως, η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 χωρίς την ταυτόχρονη ύπαρξη των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 349–364 αποτελεί μοναδική ιδιότητα των αντί-RNP θετικών ορών. Η ειδικότητα των αυτοαντισωμάτων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με ειδικές αντί-La/SSB και αντί-U1-RNP δοκιμασίες ELISA (Εικόνα 6B).



**Σχήμα 5.** (A) Συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 σε αυτοάνοσους ορούς από ασθενείς που πάσχουν από ΣΕΛ, πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren, ή ΡΑ και υγιή άτομα. (B) Ανάλυση των ενεργοτήτων των ορών έναντι του πεπτιδίου 145–164 ανάλογα με την ειδικότητα των αυτοαντισωμάτων που εμφάνισαν σε CIE. Η ενεργότητα έναντι του πεπτιδίου 145–164 βρέθηκε να είναι υψηλότερη σε ορούς θετικούς για αντί-U1-RNP αντισώματα ( $P = 0.0002$ ).



**Σχήμα 6.** Ενεργότητα αντιπροσωπευτικών ορών έναντι του επίτοπου 145–164 που σχετίζεται με το MAR και του κύριου επίτοπου 349–364 της La/SSB (A) όπως επίσης και έναντι των αυτοαντιγόνων U1-RNP και La/SSB (B). Η ύπαρξη των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 χωρίς να υπάρχουν αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 349–364 είναι ένα χαρακτηριστικό που απαντάται αποκλειστικά σε ορούς θετικούς για αντι-U1-RNP αντισώματα. Οι θετικοί για αντι-La/SSB αντισώματα οροί μπορούν να περιέχουν είτε μόνο αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 349–364 είτε αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 349–364 μαζί με αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαφοροποίηση των αυτοαντισωμάτων στο ΣΕΛ έχει εν μέρει διασαφηνιστεί μέσω του προτεινόμενου μηχανισμού της ενδο- και διαμοριακής επέκτασης (9,10). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη διαφορετικών ομάδων αυτοαντισωμάτων στο ΣΕΛ (έναντι του ματισώματος και των hY ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων), αλλά όχι τη σειριακή εμφάνιση αυτοαντισωμάτων έναντι αυτοαντιγόνων που ανήκουν σε διαφορετικά μακρομοριακά σύμπλοκα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι μια συντηρημένη αλληλουχία εντός του MAR του αυτοαντιγόνου La/SSB μπορεί να επάγει αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν με διασταυρούμενη αντίδραση συστατικά του συμπλόκου U1-RNP.

Αρχικά παρατηρήσαμε ότι τα MARs που ανήκουν σε διαφορετικά αυτοαντιγόνα υιοθετούν πολύ παραπλήσιες τριτοταγείς δομές (απαραίτητες για την αλληλεπίδρασή τους με μόρια RNA) και περιέχουν μια συντηρημένη αλληλουχία στο κεντρικό τους κομμάτι. Παρότι η πρωτεΐνη Ro60/TROVE2 έχει περιοχές MAR, ο βαθμός ομοιότητας της αλληλουχίας τους με τα MARs των συστατικών του U1-RNP συμπλόκου είναι μικρότερος σε σχέση με τις αντίστοιχες περιοχές του αυτοαντιγόνου La/SSB. Επιπλέον, η συντηρημένη αλληλουχία του MAR της La/SSB έχει παλαιότερα χαρακτηριστεί από το εργαστήριό μας σαν ένας B κυτταρικός/T κυτταρικός επίτοπος που σχετίζεται με το ΣΕΛ (14,22).

Τα κουνέλια που ανοσοποιήθηκαν με το πεπτίδιο 145–164 της La/SSB παράγαγαν τόσο αντί-La/SSB όσο και αντί-U1-RNP αντισώματα σε δύο βήματα, με τα αντί-La/SSB αντισώματα να εμφανίζονται πρώτα, και να ακολουθεί η παραγωγή των αντί-U1-RNP αντισωμάτων. Λόγω του ότι οι συντηρημένες περιοχές MAR των αυτοαντιγόνων La/SSB και RNP-70 διαφέρουν σημαντικά ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία, δεν προκαλεί έκπληξη ότι απαιτείται ένα χρονικό διάστημα ώστε τα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου

145–164να προσαρμόσουν την ειδικότητά τους στο U1-RNP. Η εμφάνιση αντισωμάτων που στοχεύουν το U1-RNP μπορεί επίσης να εξηγηθεί από ένα διαφορετικό μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει την ενδομοριακή επέκταση σε κάποιον άλλο μη ταυτοποιημένο επίτοπο της La/SSB και να ακολουθεί η αναγνώριση του U1-RNP με διασταυρούμενη αντίδραση. Προκειμένου να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός αυτός, απομονώθηκαν ειδικά αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 από ανοσοποιημένα κουνέλια και βρέθηκε ότι αναγνώριζαν το U1-RNP με διασταυρούμενη αντίδραση. Επιπρόσθετα, προκειμένου να αποκτήσουμε σαφέστερη εικόνα των μηχανισμών της αυτοανοσίας, απομονώσαμε ειδικά αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164, από ορούς ασθενών με ΣΕΛ. Τα αυτοαντισώματα αυτά αναγνώριζαν επιπλέον το U1-RNP. Παρότι τόσο οι οροί από κουνέλια όσο και από ανθρώπους αναγνώριζαν το αυτοαντιγόνο U1-RNP, η ενεργότητά τους διέφερε ως προς τη δυνατότητα απορρόφησής της από το πεπτίδιο 145–164. Έτσι, οι οροί από ανοσοποιημένα κουνέλια έχαναν την ενεργότητά τους μετά το πέρασμά τους από στήλη ανοσοσυγγένειας στην οποία είχε συνδεθεί το πεπτίδιο 145–164, κάτι που δεν συνέβαινε στους ανθρώπινους ορούς. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανότατα αντικατοπτρίζουν τον περιορισμένο βαθμό αναγνώρισης επιτόπων στα κουνέλια (η οποία οφείλεται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις με την ομόλογη περιοχή των MAR) και την αναγνώριση πολλαπλών επιτόπων από τους ορούς ασθενών με ΣΕΛ. Επιπλέον, τα ευρήματα αυτά συνάδουν με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι όταν το πεπτίδιο που χρησιμοποιείται για ανοσοποίηση έχει χαμηλού βαθμού ομοιότητα αλληλουχίας με ένα αυτοαντιγόνο υπάρχει περιορισμένη αναγνώριση επιτόπων του αυτοαντιγόνου αυτού (23). Σε αυτή την περίπτωση απαιτείται ένα επιπλέον βήμα (για παράδειγμα, ωρίμανση συγγένειας των αντισωμάτων παρουσία του αυτοαντιγόνου U1-RNP) ώστε να υπάρξει διαφοροποίηση της αυτοάνοσης απόκρισης σε περισσότερους επίτοπους του U1-RNP.



Αυτοαντισώματα έναντι του πεπτιδίου 145–164 εντοπίστηκαν στο 39% των ασθενών που πάσχουν από πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren και σε μια μικρή υποομάδα ασθενών που πάσχουν από ΡΑ. Ωστόσο, οι αντί-RNP θετικοί οροί, που απαντώνται κυρίως σε ασθενείς με ΣΕΛ, έδειξαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου 145–164 σε σχέση με τους αντί-RNP αρνητικούς ορούς. Οι οροί αυτοί δεν είχαν ενεργότητα έναντι του επίτοπου 349–364, ο οποίος έχει παλαιότερα χαρακτηριστεί σαν ο κύριος επίτοπος της La/SSB και έχει συσχετισθεί με το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (14). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι αυτοί οι οροί βρέθηκαν ότι είναι αρνητικοί για αντί-La/SSB αντισώματα σε CIE, γεγονός το οποίο πιθανότατα υποδηλώνει είτε μια περιορισμένη αναγνώριση επιτόπων εντός του αυτοαντιγόνου La/SSB, η οποία δεν είναι ικανή να παράξει αντίδραση ανοσοκαθίζησης στην CIE ή κάλυψη των επιτόπων από hYRNA που είναι προσδεδεμένο στην περιοχή MAR της La/SSB, σε δοκιμασίες που χρησιμοποιούν το αντιγόνο στη φυσική του διαμόρφωση (24).

Τα πειραματικά μας δεδομένα υποστηρίζουν ισχυρά το υποθετικό πρότυπο που είχε προταθεί πριν κάποια χρόνια από τις Monneaux και Muller (9,25). Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό, μια συναινετική αλληλουχία του MAR μπορεί να οδηγήσει την επέκταση επιτόπων στις πρωτεΐνες του ματισώματος μέσω μοριακής μίμησης (25). Σε αυτό το πλαίσιο, οι Monneaux και Muller έδειξαν ότι η ανοσοποίηση κουνελιών με ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στον επίτοπο 131–151 που βρίσκεται εντός του MAR της RNP-70 μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή αντισωμάτων τα οποία αναγνώριζαν, πέραν του αντίστοιχου αντιγόνου, και τα συστατικά RNP-A, RNP-C και Sm-D του συμπλόκου U1-RNP (26). Τα αντισώματα αυτά είχαν την ικανότητα να αναγνωρίζουν με διασταυρούμενη αντίδραση πεπτίδια που αντιστοιχούν στα MARs διαφορετικών πυρηνικών αυτοαντιγόνων, όπως το RNP-70, το RNP-A και το hnRNP-A2 (26). Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό, το MAR εκκινεί την επέκταση της ανοσολογικής

απόκρισης σε ολόκληρη την πρωτεΐνη (ενδομοριακή επέκταση), ακολούθως η ανοσολογική απόκριση επεκτείνεται με συγκεκριμένο τρόπο σε άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν MAR(s) και, τελικά, σε πρωτεΐνες που δεν περιέχουν κανένα MAR αλλά συνεντοπίζονται στο ίδιο σύμπλοκο (διαμοριακή επέκταση). Μέχρι σήμερα, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα μόνο για επέκταση επιτόπων μέσω των MARs προς πρωτεΐνες του ματισώματος που συνδέονται φυσικά μεταξύ τους. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν για πρώτη φορά αποδείξεις ότι μπορεί να υπάρξει και διασωματιακή επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω των MARs. Το προτεινόμενο πρότυπο μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και σε άλλους επίτοπους “οδηγούς” όπως είναι η πλούσια σε προλίνες περιοχή PPPGMRPP που περιλαμβάνει έναν επίτοπο που αναγνωρίζεται με διασταυρούμενη αντίδραση, ο οποίος υπάρχει σε διάφορα αυτοαντιγόνα του ματισώματος και έχει πρόσφατα ταυτοποιηθεί σαν ένας αρχικός στόχος της χυμικής αυτοάνοσης απόκρισης έναντι του RNP στον ΣΕΛ (27). Σε αυτό το πλαίσιο, εκτός της ενδομοριακής και διαμοριακής επέκτασης, η αυτοάνοση απόκριση διαφοροποιείται μέσω μοριακής μίμησης κομβικών αλληλουχιών, οι οποίες είναι κοινοί στόχοι στον ΣΕΛ.

Συνολικά, τα ως άνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η περιοχή MAR της La/SSB μπορεί να πυροδοτήσει τη διασωματιακή B κυτταρική διαφοροποίηση στο U1-RNP, επιβεβαιώνοντας τη σημασία της περιοχής MAR στο μονοπάτι των γεγονότων που οδηγούν στην αυτοανοσία στον ΣΕΛ. Ο προσδιορισμός των βασικών αλληλουχιών που ενεργοποιούν και διαιωνίζουν τις αυτοάνοσες διεργασίες είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την κατανόηση των αρχικών γεγονότων στην αυτοάνοση απόκριση και το σχεδιασμό ειδικών θεραπευτικών στρατηγικών ικανών να παρεμποδίσουν τον καταρράκτη της επέκτασης της αυτοάνοσης απόκρισης (που λαμβάνει χώρα κατά την εξέλιξη της αυτοάνοσης απόκρισης).

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Οι συγγραφείς ευχαριστούν τον Καθηγητή Χ. Μ. Μουτσόπουλο για την εποικοδομητική συζήτηση του άρθρου και τις συμβουλές που παρείχε.

## **ΔΗΛΩΣΗ**

Οι συγγραφείς δηλώνουν ότι δεν έχουν ανταγωνιστικά συμφέροντα, όπως αυτά ορίζονται από το *Molecular Medicine*, ή άλλα συμφέροντα που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα και τη συζήτηση που αναφέρθηκαν σε αυτή τη δημοσίευση.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vlachoyiannopoulos PG, Karassa FB, Karakostas KX, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Systemic lupus erythematosus in Greece. Clinical features, evolution and outcome: a descriptive analysis of 292 patients. *Lupus*. 1993;2:303–12.
2. Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2006;43:203–48.
3. van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr. Opin. Immunol.* 1995;7:819–24.
4. Slobbe RL, Pluk W, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 1992;227:361–6.
5. Routsias JG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin. Chim Acta.* 2004;340:1–25.
6. Sim S, et al. The subcellular distribution of an RNA quality control protein, the Ro autoantigen, is regulated by noncoding Y RNA binding. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20:1555–64.
7. Simons FH, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell Biol.* 1994;125:981–8.
8. Arbuckle MR, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:1526–33.
9. Monneaux F, Muller S. Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1430–8.
10. Moutsopoulos NM, Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. B-cell epitopes of intracellular autoantigens: myth and reality. *Mol. Med.* 2000;6:141–51.
11. Vitali C, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 2002;61:554–8.
12. Tan EM, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271–7.
13. Arnett FC, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315–24.
14. Tzioufas AG, et al. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping, and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* 1997;108:191–8.
15. James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. *J. Exp. Med.* 1995;181:453–61.
16. Troster H, et al. One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjogren's syndrome. *J. Exp. Med.* 1994;180:2059–67.
17. Routsias JG, et al. Idiotype-anti-idiotypic circuit in non-autoimmune mice after immunization with the epitope and complementary epitope 289–308aa of La/SSB: implications for the maintenance and perpetuation of the anti-La/SSB response. *J. Autoimmun.* 2003;21:17–26.

18. Johansson C, et al. Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J. Mol. Biol.* 2004;337:799–816.
19. Nagai K, Oubridge C, Jessen TH, Li J, Evans PR. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature.* 1990;348:515–20.
20. Price SR, Evans PR, Nagai K. Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature.* 1998;394:645–50.
21. Teplova M, et al. Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Mol. Cell.* 2006;21:75–85.
22. Yiannaki E, et al. Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp. Immunol.* 2000;121:551–6.
23. Scofield RH, et al. Immunization of mice with human 60-kd Ro peptides results in epitope spreading if the peptides are highly homologous between human and mouse. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1017–24.
24. Gonzalez C, et al. Comparison and variation of different methodologies for the detection of autoantibodies to nuclear antigens (ANA) *J. Clin. Lab. Anal.* 1997;11:388–92.
25. Monneaux F, Muller S. Key sequences involved in the spreading of the systemic autoimmune response to spliceosomal proteins. *Scand J. Immunol.* 2001;54:45–54.
26. Monneaux F, Parietti V, Briand JP, Muller S. Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res. Ther.* 2007;9:R111.
27. Poole BD, et al. Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60:848–59.

## Συσχέτιση της αναλογίας των ιδιοτυπικών:αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων με την αποτελεσματικότητα της ενδοφλέβιας θεραπείας με ανοσοσφαιρίνη για την πρόληψη της επανεμφάνισης του συνδεδεμένου με αυτοανοσία συγγενή κολποκοιλιακού αποκλεισμού

Ιωάννης Γ. Ρούτσιας, Νικόλαος Χ. Κυριακίδης, Deborah M. Friedman, Carolina Llanos, Robert Clancy, Χαράλαμπος Μ. Μουτσόπουλος, Jill Buyon, Αθανάσιος Γ. Τζιούφας.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Ο Συγγενής Κολποκοιλιακός Αποκλεισμός (ΣΚΑ), αποτελεί κλινική εκδήλωση του νεογνικού λύκου, σχετίζεται με μητρικά αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αυτοαντισώματα και επανεμφανίζεται στο 18% των επόμενων κύσεων. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με σκοπό να εξετάσει την επίδραση της αναλογίας ιδιοτυπικών:αντί-ιδιοτυπικών (Ιδ:αντί-Ιδ) αντισωμάτων στη δυνατότητα που έχει η ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (ΕΦΑΣ) που χορηγείται κατά τη διάρκεια επόμενων κύσεων να προλαμβάνει την ανάπτυξη ΣΚΑ.

**Μέθοδοι:** Μελετήσαμε 16 αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB θετικές εγκύους από τη μελέτη Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block (Προληπτική Θεραπεία με ΕΦΑΣ για τον Συγγενή Κολποκοιλιακό Αποκλεισμό), οι οποίες είχαν ιστορικό γέννησης παιδιού με νεογνικό λύκο. Σε 3 από τις μητέρες, η κύηση κατέληξε στη γέννηση παιδιού με νεογνικό λύκο (2 με ΣΚΑ και 1 με ερύθημα). Ελήφθησαν σειριακά δείγματα ορών από όλες τις μητέρες ακριβώς πριν την χορήγηση της ΕΦΑΣ κατά τη διάρκεια της κύησης και αξιολογήθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του κύριου Β κυτταρικού επίτοπου (αμινοξέα 349–364) της La/SSB (ιδιότυπος) καθώς και των αντί-ιδιοτυπικών τους αντισωμάτων.

**Αποτελέσματα:** Έπειτα από τη θεραπεία με ΕΦΑΣ, ο τίτλος των αντί-La/SSB(349–364) αντισωμάτων (Ιδ) στον ορό μειώθηκε στο 80% των μητέρων, και στο 60% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε μια αύξηση των αντί-Ιδ αντισωμάτων που στρέφονται έναντι των αντί-La(349–364). Η αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε μητέρες των οποίων τα παιδιά ανέπτυξαν νεογνικό λύκο σε σχέση με τις μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί ( $P < 0.0001$ ). Η απομάκρυνση των αντί-Ιδ αντισωμάτων αύξησε σημαντικά την ενεργότητα των αντισωμάτων έναντι του επίτοπου La/SSB(349–364) στους ορούς των 5 από τις 7 μητέρες που ελέγχθηκαν. Όλα τα παρασκευάσματα ΕΦΑΣ ελέγχθηκαν για την ενεργότητα των Ιδ και αντί-Ιδ αντισωμάτων. Η ΕΦΑΣ που προερχόταν από παρασκευάσματα που χορηγήθηκαν σε μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί είχαν μία αναλογία ενεργότητας Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων  $<1$ , σε αντίθεση με αυτές που χορηγήθηκαν σε μητέρες που γέννησαν παιδί το οποίο εμφάνισε νεογνικό λύκο. Προσθήκη των παρασκευασμάτων ΕΦΑΣ στους μητρικούς ορούς αύξησε περαιτέρω την ενεργότητα των αντί-ιδιοτυπικών αντισωμάτων (έως και 4.7-φορές) σε 11 εκ των 13 ασθενών που μελετήθηκαν.

**Συζήτηση:** Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη στον άνθρωπο που δείχνει ότι η ΕΦΑΣ επηρεάζει το Ιδ/αντί-Ιδ δίκτυο ενός συγκεκριμένου παθογενετικού αυτοαντισώματος. Ειδικότερα, δείξαμε ότι η χορήγηση ΕΦΑΣ ευοδώνει την αντί-Ιδ απόκριση σε εγκύους με αντί-La/SSB αντισώματα. Μία υψηλή αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων τόσο στο παρασκεύασμα της ΕΦΑΣ όσο και στο μητρικό ορό μπορεί να εξηγήσει την απουσία επίδρασης της ΕΦΑΣ στο να εμποδίσει την επανεμφάνιση νεογνικού λύκου σε ορισμένες περιπτώσεις.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο Συγγενής Κολποκοιλιακός Αποκλεισμός (ΣΚΑ) αποτελεί μία πρότυπη κατάσταση παθητικά αποκτούμενης αυτοανοσίας, η οποία σχετίζεται ισχυρά με τη μεταφορά μητρικών ανοσοσφαιρινών τάξεως γ (IgG) έναντι των ριβονουκλεοπρωτεϊνών Ro/SSA και La/SSB μέσω του πλακούντα (1). Ο ΣΚΑ αποτελεί μία καρδιακή εκδήλωση του επονομαζόμενου συνδρόμου νεογνικού λύκου, το οποίο είναι ένα σύνολο κλινικών εκδηλώσεων που απαντάται σε νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες με αντί-Ro/αντί-La αντισώματα, και μπορεί να περιλαμβάνει δερματικό ερύθημα ή, πολύ σπάνια, αιματικές ή ηπατικές ανωμαλίες οι οποίες βελτιώνονται με την πάροδο του χρόνου (2, 3).

Ο ΣΚΑ αποτελεί την πιο σοβαρή εκδήλωση του νεογνικού λύκου και μπορεί να προκαλέσει μόνιμες και συχνά απειλητικές για τη ζωή βλάβες στην εμβρυική καρδιά. Η επίπτωση του ΣΚΑ στα παιδιά μητέρων που έχουν τα παθογενετικά αυτοαντισώματα κυμαίνεται ανάμεσα στο 1% και 2% (4, 5), αλλά το ποσοστό επανεμφάνισης σε κυήσεις που έπονται της γέννησης παιδιού με νεογνικό λύκο είναι ~18% (6–8). Φαίνεται ότι η παρουσία των μητρικών αντισωμάτων είναι μία αναγκαία, αλλά όχι ικανή, συνθήκη για την ανάπτυξη του ΣΚΑ. Το περιβάλλον της μήτρας, εμβρυικοί παράγοντες (π.χ. γονίδια, ιϊκές λοιμώξεις), και μητρικοί παράγοντες (π.χ. ύπαρξη συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων) (9) ή η απουσία ενός ενεργού αντί-ιδιοτυπικού δικτύου το οποίο στοχεύει τα παθογενετικά αυτοαντισώματα (10) έχουν προταθεί σαν συμπαραγοντες στην ανάπτυξη ΣΚΑ. Σε προηγούμενη μελέτη, σε μια προσπάθεια να διασαφηνιστεί ο ρόλος του δικτύου αυτού στην ανάπτυξη νεογνικού λύκου, αξιολογήσαμε το ιδιοτυπικό/αντί-ιδιοτυπικό (Ιδ/αντί-Ιδ) δίκτυο των αντισωμάτων που στοχεύουν τους κύριους επίτοπους της La/SSB (10). Συμπεράναμε ότι η ύπαρξη αντί-Ιδ αντισωμάτων έναντι των αντισωμάτων που

στρέφονται εναντίον της La/SSB μπορεί να προστατέψει το έμβρυο παρεμποδίζοντας τα παθογενετικά μητρικά αυτοαντισώματα.

Στην παρούσα μελέτη των μητέρων που πήραν μέρος στην μελέτη Προληπτικής Θεραπείας με ΕΦΑΣ για τον Συγγενή Κολποκοιλιακό Αποκλεισμό (Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block: PITCH study), αξιολογήσαμε την επίδραση της θεραπείας με ΕΦΑΣ στο δίκτυο των Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων έναντι της La/SSB. Βρέθηκε ότι, αν και η χορήγηση ΕΦΑΣ σε δόσεις στις οποίες χρησιμοποιείται σαν θεραπεία αντικατάστασης αντισωμάτων δεν εμποδίζει την επανεμφάνιση ΣΚΑ συνολικά (11), αλλάζει σημαντικά το δίκτυο των Ιδ/αντί-Ιδ παθογενετικών αυτοαντισωμάτων, αυξάνοντας την αντί-Ιδ απόκριση εναντίον τους. Επίσης, δείχθηκε ότι σε εγκυμοσύνες που κατέληξαν στη γέννηση υγιούς παιδιού, η αναλογία των Ιδ:αντί-Ιδ αντί-La/SSB αντισωμάτων στο μητρικό ορό ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την αναλογία που παρατηρήθηκε σε εγκύους που γέννησαν παιδί με νεογνικό λύκο.

## **ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Πληθυσμός μελέτης.**

Μεταξύ του Ιανουαρίου 2007 και του Ιανουαρίου 2009, 21 γυναίκες έλαβαν μέρος στη μελέτη PITCH, μία ανοιχτή, πολυκεντρική, προοπτική κλινική μελέτη με έδρα τις Ηνωμένες Πολιτείες, αφότου παρείχαν επί γνώσει συναίνεση. Για τη συμμετοχή στη μελέτη ήταν απαραίτητο να πληρούνται όλα τα παρακάτω κριτήρια εισαγωγής: 1) πιστοποίηση της ύπαρξης αντί-Ro/SSA ή/και αντί-La/SSB αντισωμάτων, 2) η ύπαρξη ιστορικού κύησης παιδιού με ΣΚΑ (οποιοδήποτε βαθμού, πιστοποιημένου με ηλεκτροκαρδιογράφημα εφόσον το παιδί γεννήθηκε ζωντανό ή/και με υπέρηχο καρδιάς ή/και ιστολογικά ευρήματα εάν υπήρξε εμβρυικός θάνατος) ή/και χαρακτηριστικό



ερύθημα νεογνικού λύκου (διαπιστωμένο με δερματολογική αξιολόγηση ή/και ευρήματα βιοψίας), και 3) τρέχουσα ενδομήτρια κύηση <12 εβδομάδων, με φυσιολογικό εμβρυικό καρδιακό παλμό και φυσιολογική δομή καρδιάς. Τα κριτήρια αποκλεισμού περιλάμβαναν 1) τρέχουσα λήψη πρεδνιζόνης σε δοσολογία >20 mg/ημέρα ή τρέχουσα λήψη δεξαμεθαζόνης σε οποιαδήποτε δοσολογία, 2) επίπεδα ανοσοσφαιρίνης τάξεως α κάτω των φυσιολογικών τιμών για το εργαστήριο που διενεργούσε τον έλεγχο ή 3) παρουσία οποιωνδήποτε δομικών ανωμαλιών της εμβρυικής καρδιάς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν ΣΚΑ, όπως L-μετάθεση των μεγάλων αγγείων, έλλειμμα του κολποκοιλιακού διαφράγματος (AV), ή ετεροταξία. Εκ των 21 γυναικών που συμμετείχαν, υπήρξε μία λανθασμένη επιλογή. Η συγκεκριμένη ασθενής είχε αυτόματη αποβολή 9 εβδομάδες πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου της μελέτης.

Ελήφθησαν σειριακά δείγματα ορού από τις 20 μητέρες που ολοκλήρωσαν την μελέτη PITCH. Τρία έμβρυα διαγνώστηκαν με προχωρημένο κολποκοιλιακό αποκλεισμό (κατά τις εβδομάδες κύησης 19, 20, και 25). Ένα εξ αυτών προερχόταν από μητέρα αρνητική για αντί-La/SSB αντισώματα. Από τα 17 παιδιά που δεν εμφάνισαν ΣΚΑ, ένα νεογνό (που προερχόταν από μητέρα θετική για αντί-La/SSB αντισώματα) παρουσίασε ερύθημα λόγω νεογνικού λύκου και σύνδρομο Sweet. Οι οροί των 4 μητέρων βρέθηκαν αρνητικοί για αντί-La/SSB αντισώματα (χρησιμοποιώντας μία εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία) και παρουσίαζαν ελάχιστη ενεργότητα έναντι του κύριου επιτόπου της La/SSB, κι επομένως αποκλείστηκαν από τα επόμενα πειράματα. Συνεπώς, ο τελικός πληθυσμός της μελέτης αποτελούταν από 16 μητέρες, 3 εκ των οποίων γέννησαν παιδί με νεογνικό λύκο (δύο με ΣΚΑ, ένα με χαρακτηριστικό ερύθημα). Όλοι οι οροί ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι των Ro60/TROVE2 και Ro52/TRIM21 αυτοαντιγόνων.

## **Χορήγηση ΕΦΑΣ και παρακολούθηση.**

Οι εγχύσεις ΕΦΑΣ (400 mg/κίλο σωματικού βάρους) χορηγούνταν σε χρονικά διαστήματα 3–4 ωρών στις 12, 15, 18, 21, και 24 εβδομάδες κύησης. Τα δείγματα ορού λαμβάνονταν πριν από κάθε έγχυση κι επιπλέον στις 28 και 34 εβδομάδες κύησης, και τη στιγμή της γέννας, και αναλύθηκαν τυφλά. Οι υπέρηχοι καρδιάς των εμβρύων λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα μεταξύ των εβδομάδων 16 και 26 της κύησης κι ακολούθως κάθε 2 εβδομάδες μέχρι την εβδομάδα 34 της κύησης.

## **Σύνθεση πεπτιδίων και ορισμοί.**

Συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στους κύριους Β κυτταρικούς επίτοπους της La/SSB, G<sup>349</sup>SGKGVQFQGKTKF<sup>364</sup> (La/SSB[349–364]), όπως και στον συμπληρωματικό επίτοπο, K<sup>364</sup>FRFLALKLYFSFTRP<sup>349</sup> (crep[349–364]), αγοράστηκαν από την εταιρία Biosynthesis. Είχαμε παλαιότερα δείξει ότι τα αντισώματα έναντι του συμπληρωματικού επίτοπου της La/SSB(349–364) είναι αντί-ιδιοτυπικά των αντισωμάτων που στρέφονται έναντι του επίτοπου La/SSB(349–364) (10, 12, 13), επομένως, τα αντισώματα έναντι του επίτοπου 349–364 θεωρούνται σαν ιδιοτυπικά και τα αντισώματα έναντι του συμπληρωματικού επίτοπου 349–364 σαν αντί-ιδιοτυπικά.

## **Ανοσοενζυματικές ανιχνεύσεις στερεάς φάσης (ELISAs) έναντι πεπτιδίων και έναντι συμπληρωματικών πεπτιδίων.**

Τα αντισώματα έναντι πεπτιδίων και έναντι συμπληρωματικών πεπτιδίων ανιχνεύθηκαν με ELISA η οποία είχε βελτιστοποιηθεί για κάθε συνθετικό πεπτίδιο, βάσει πρωτοκόλλου που έχει προηγουμένα περιγραφεί (10).

### **Απομόνωση των αντί-La/SSB(349–364) IgG αντισωμάτων.**

Με κλασσικές μεθόδους παράχθηκαν ειδικές στήλες ανοσοσυγγένειας σεφαρόζης 4B ενεργοποιημένες από CNBr, χρησιμοποιώντας 15 mg του πεπτιδίου La/SSB(349–364). Απομονώθηκε ολική IgG από 4 ορούς οι οποίοι αναγνώριζαν έντονα σε ELISA τον επίτοπο της La/SSB 349–364, με πρωτεΐνη A–σεφαρόζη, συμπυκνώθηκε και επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), και περάστηκε ξανά από τη στήλη ανοσοσυγγένειας για το πεπτίδιο. Ακολούθως, η στήλη εκπλύθηκε με PBS και έγινε έκλουση με 8M ουρία. Τα εκλούματα διαλύθηκαν σε PBS, συμπυκνώθηκαν, και επαναδιαλύθηκαν. Οι συγκεντρώσεις της IgG έναντι των πεπτιδίων υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Lowry (DC Protein Assay, της εταιρίας Bio-Rad).

### **Παρασκευή των τμημάτων F(ab)<sub>2</sub> των αντί-La/SSB(349–364) αντισωμάτων και δοκιμή για άμεση ανίχνευση των αντί-Ιδ αντισωμάτων.**

Κεκαθαρμένη αντί-La/SSB(349–364) IgG υποβλήθηκε σε ενζυματική αποικοδόμηση με πεψίνη και καθαρίστηκε ώστε να μην υπάρχουν ίχνη ακέραιης IgG, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (12). Κεκαθαρμένα τμήματα F(ab)<sub>2</sub> των αντί-La/SSB(349–364) αντισωμάτων [5 µg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών (pH 9.6)] επιστρώθηκαν σε υψηλής δέσμευσης πλακίδια μικροτιτλοδοτήσεως της εταιρίας Costar για 1 ώρα στους 25°C. Ακολούθως, στα πλακίδια έγινε δέσμευση των μη ειδικών θέσεων των τμημάτων F(ab)<sub>2</sub> και εκπλύθηκαν, προστέθηκαν οι οροί σε αραιώση 1:150–1:300 και επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C. Έπειτα τα πηγάδια εκπλύθηκαν και προστέθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα αναπτυγμένο σε αίγα, το οποίο στρέφεται έναντι της ανθρώπινης IgG συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (1:2,000 σε διάλυμα αναστολής της μη-ειδικής δέσμευσης, της εταιρίας Jackson ImmunoResearch). Τα πλακίδια επώαστηκαν για 1 ώρα

σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα πηγάδια του πλακιδίου εκπλύθηκαν και προστέθηκε ένα σύστημα το οποίο αυξάνει την ένταση του υποστρώματος (ELISA amplification substrate system) (της εταιρίας Invitrogen). Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 495 nm.

### **Αντί-La/SSB(349–364) ELISA έπειτα από την απομάκρυνση των αντί-Ιδ αντισωμάτων.**

Η ενεργότητα των αντισωμάτων έναντι του επίτοπου La/SSB(349–364) μετρήθηκε μετά την αποδιάταξη των Ιδ/αντί-Ιδ ανοσοσυμπλεγμάτων (θερμαίνοντας τα δείγματα στους 53°C) και την ακόλουθη απομάκρυνση των αντί-Ιδ αντισωμάτων χρησιμοποιώντας κεκαθαυμένα αντί-La/SSB(349–364) αντισώματα προσδεδεμένα σε σφαιρίδια πρωτεΐνης Α–σεφαρόζης. Φυσιολογική IgG προσδεδεμένη σε σφαιρίδια πρωτεΐνης Α–σεφαρόζης χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **Αύξηση της αντί-Ιδ απόκρισης από την χορήγηση ΕΦΑΣ.**

Οι τίτλοι Ιδ και αντί-Ιδ αντισωμάτων σε σειριακά δείγματα ορών από 15 από τις 16 μητέρες που ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα, συμπεριλαμβανομένων και των δύο που γέννησαν βρέφη με νεογνικό λύκο, αξιολογήθηκαν υπό τυφλές συνθήκες. Δεν ήταν διαθέσιμα σειριακά δείγματα από μία από τις μητέρες που ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα, η οποία επίσης γέννησε βρέφος που εμφάνισε νεογνικό λύκο, επομένως, η συγκεκριμένη μητέρα δε συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις που ενέχουν

σειριακά δείγματα. Βρήκαμε ότι η χορήγηση ΕΦΑΣ αύξησε την αντί-Ιδ απόκριση και παράλληλα εξασθένησε την Ιδ απόκριση, στην πλειονότητα των ορών που ελέγχθηκαν. Ειδικότερα, έπειτα από τη θεραπεία με ΕΦΑΣ ο τίτλος των αντί-Ιδ αντισωμάτων αυξήθηκε (κατά 14–620%) σε 9 μητέρες (60%), η ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων παρέμεινε ίδια όπως κατά τη στιγμή εισόδου στη μελέτη σε 2 μητέρες, και ο τίτλος των αντί-Ιδ αντισωμάτων μειώθηκε (κατά 13–78%) σε 4 μητέρες. Αντίθετα, ο τίτλος των Ιδ αντισωμάτων μειώθηκε (κατά 14–61%) σε 12 μητέρες (80%), η ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων παρέμεινε ίδια όπως κατά τη στιγμή εισόδου στη μελέτη σε 1 μητέρα, και ο τίτλος των Ιδ αντισωμάτων αυξήθηκε (κατά 38–53%) σε 2 μητέρες.

**Η αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισώματα έναντι του κύριου επιτόπου της La/SSB προβλέπει την εμφάνιση του νεογνικού λύκου σε ορούς θετικούς για αντί-LaSSB αντισώματα.**

Στις 2 μητέρες των οποίων η εγκυμοσύνη είχε ως αποτέλεσμα τη γέννηση παιδιού με νεογνικό λύκο και για τις οποίες ήταν διαθέσιμοι διαδοχικοί οροί (ασθενείς 595 και 575), οι τίτλοι των αντί-Ιδ αντισωμάτων δεν αυξήθηκαν. Αν και οι τίτλοι Ιδ αντισωμάτων σε αυτές τις 2 μητέρες μειώθηκαν κατά 32% και 42%, αντίστοιχα, οι τίτλοι αυτοί παρέμειναν 4.96- και 4.45-φορές υψηλότεροι από τους τίτλους των αντί-Ιδ αντισωμάτων. Αντίθετα, οι μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί είτε είχαν χαμηλότερο τίτλο Ιδ αντισωμάτων σε σύγκριση με τα αντί-Ιδ αντισώματα ή μια ισχυρή αύξηση των αντί-Ιδ αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ΕΦΑΣ, φέρνοντας τα επίπεδά τους πολύ κοντά στα επίπεδα των Ιδ αντισωμάτων στο τέλος της θεραπείας ( $t = 6.81, P < 0.0001$ , μέση διαφορά μεταξύ των τίτλων των Ιδ και αντί-Ιδ αντισωμάτων στις ασθενείς 595 και 575 έναντι των 13 μητέρων). Επιπλέον, και οι 3 μητέρες που ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα οι οποίες γέννησαν παιδί με νεογνικό λύκο εμφάνισαν σημαντικά

υψηλότερες αναλογίες Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων σε σύγκριση με τις μητέρες των οποίων οι κούσες δεν κατέληξαν στη γέννηση βρέφους με νεογνικό λύκο ( $t = 7.09, P < 0.0001$ ) (Εικόνα 1Α).

**Επιβεβαίωση της ανίχνευσης των αντί-Ιδ αντισωμάτων χρησιμοποιώντας κεκαθαρμένα  $F(ab')_2$  τμήματα των αντισωμάτων έναντι του επίτοπου La/SSB(349 - 364).**

Παρότι προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας αποκάλυψαν ότι τα συμπληρωματικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την ανίχνευση των αντί-La/SSB αντί-Ιδ αντισωμάτων (12), επιβεβαίωσαμε περαιτέρω την ανίχνευση των αντί-Ιδ αντισωμάτων χρησιμοποιώντας κεκαθαρμένα  $F(ab)_2$  τμήματα των αντισωμάτων (Ιδ) έναντι του επίτοπου La/SSB(349–364). Σε αυτή τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικοί οροί από 7 μητέρες που ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα. Τα μοτίβα ενεργότητας που λαμβάνονται από την άμεση ανίχνευση των αντί-Ιδ αντισωμάτων βρέθηκε ότι είναι σχεδόν ταυτόσημα με εκείνα που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας συμπληρωματικά πεπτίδια, για όλες τις σειρές των ορών που ελέγχθηκαν.

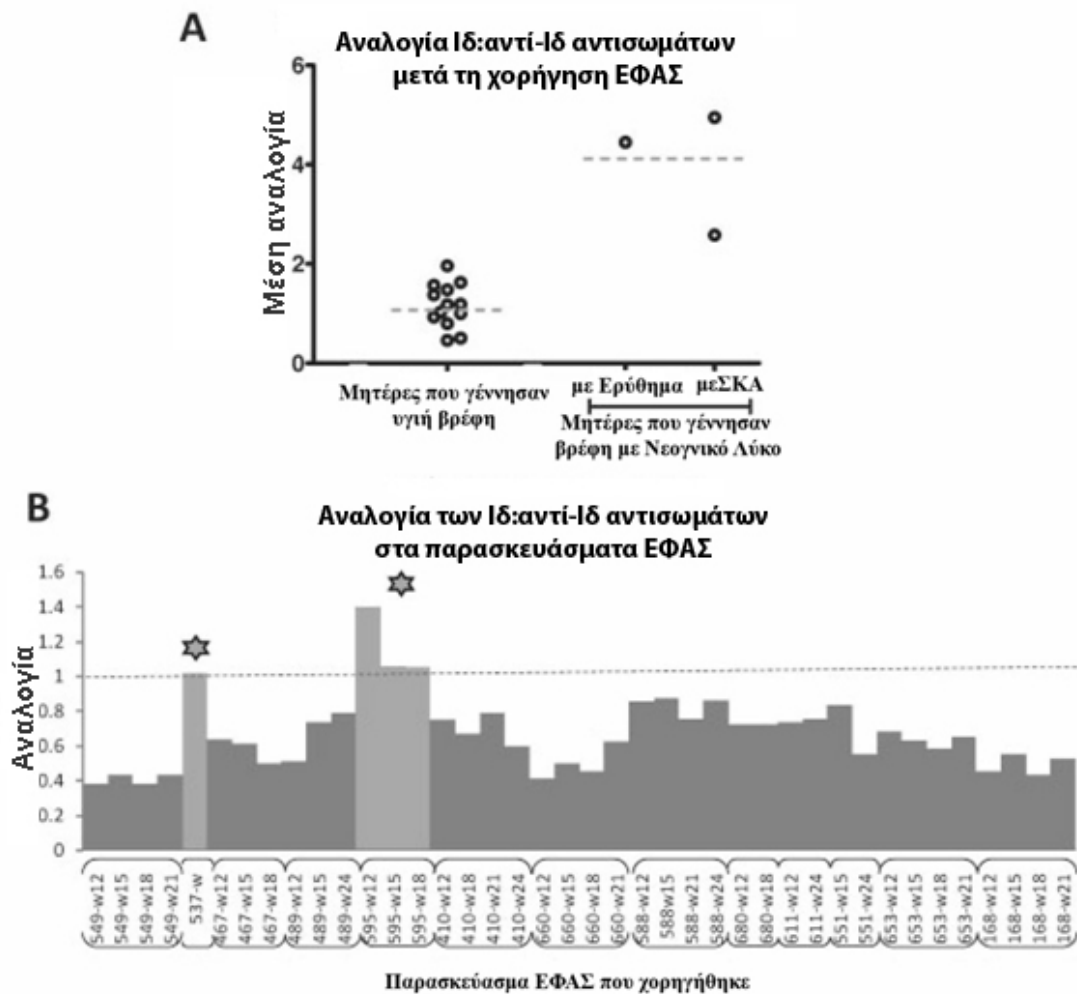
**Η απομάκρυνση των αντί-Ιδ αντισωμάτων ενισχύει την ενεργότητα των αντισωμάτων έναντι του κύριου επίτοπου της La/SSB, (349–364).**

Προηγούμενή μας μελέτη έδειξε ότι τα αντί-Ιδ αντισώματα είναι ικανά να αποκρύψουν την απόκριση έναντι της La/SSB. Η καλυμμένη ενεργότητα των αυτοαντισωμάτων αποκαλύπτονταν με την αποδιάταξη των ανοσοσυμπλεγμάτων Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων και την επακόλουθη δέσμευση των αντί-Ιδ αντισωμάτων (12). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μία παρόμοια προσέγγιση, αποδιατάσσοντας τα σύμπλοκα Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων θερμαίνοντας και απομακρύνοντας τα αντί-Ιδ αντισώματα με σφαιρίδια που έχουν καλυφθεί με αντί-La/SSB(349–364) αντισώματα. Βρήκαμε ότι η

απομάκρυνση των αντί-Ιδ αντισωμάτων αύξησε την ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων σε διαδοχικούς ορούς 5 εκ των 7 μητέρων που ελέγχθηκαν. Καμία από αυτές τις 5 μητέρες δε γέννησε παιδί με νεογνικό λύκο κατά τη διάρκεια της μελέτης. Στους σειριακούς ορούς που ελέγχθηκαν από τις υπόλοιπες δύο μητέρες, δεν υπήρχε σημαντική μεταβολή της ιδιοτυπικής δραστηριότητας. Μία από τις δύο μητέρες γέννησε παιδί με νεογνικό λύκο.

**Σε μητέρες παιδιών με νεογνικό λύκο χορηγήθηκαν παρασκευάσματα ΕΦΑΣ με ανεπαρκές περιεχόμενο αντί-Ιδ αντισωμάτων.**

Η αύξηση στην ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων που παρατηρήθηκε στην πλειοψηφία των μητέρων μετά τη χορήγηση ΕΦΑΣ θα μπορούσε να αποδοθεί στην εξωγενή προσθήκη των αντί-Ιδ αντισωμάτων τα οποία περιείχαν τα παρασκευάσματα. Επομένως, ελέγξαμε το περιεχόμενο των παρασκευασμάτων ΕΦΑΣ σε Ιδ και αντί-Ιδ αντισώματα που χορηγήθηκαν σε 13 μητέρες που ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα. Τα παρασκευάσματα ΕΦΑΣ βρέθηκε ότι περιείχαν αντί-Ιδ αντισώματα, όμως υπήρχε διακύμανση των τίτλων τους σε διαφορετικά παρασκευάσματα. Επιπλέον, οι αναλογίες της ενεργότητας των Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων της ΕΦΑΣ που χορηγήθηκε στις μητέρες που γέννησαν παιδί με νεογνικό λύκο ήταν  $\geq 1$ , αναλογία η οποία ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες αναλογίες που βρέθηκαν στα παρασκευάσματα που χορηγήθηκαν στις μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί (0.41–0.84) ( $t = 6.43$ ,  $P < 0.0001$ ). Αναλόγως, οι μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί είχαν λάβει ΕΦΑΣ που περιείχε υψηλότερη ενεργότητα αντί-Ιδ αντισωμάτων σε σχέση με την ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων, συγκριτικά με τις μητέρες που γέννησαν παιδί με νεογνικό λύκο (Εικόνα [1B](#)).

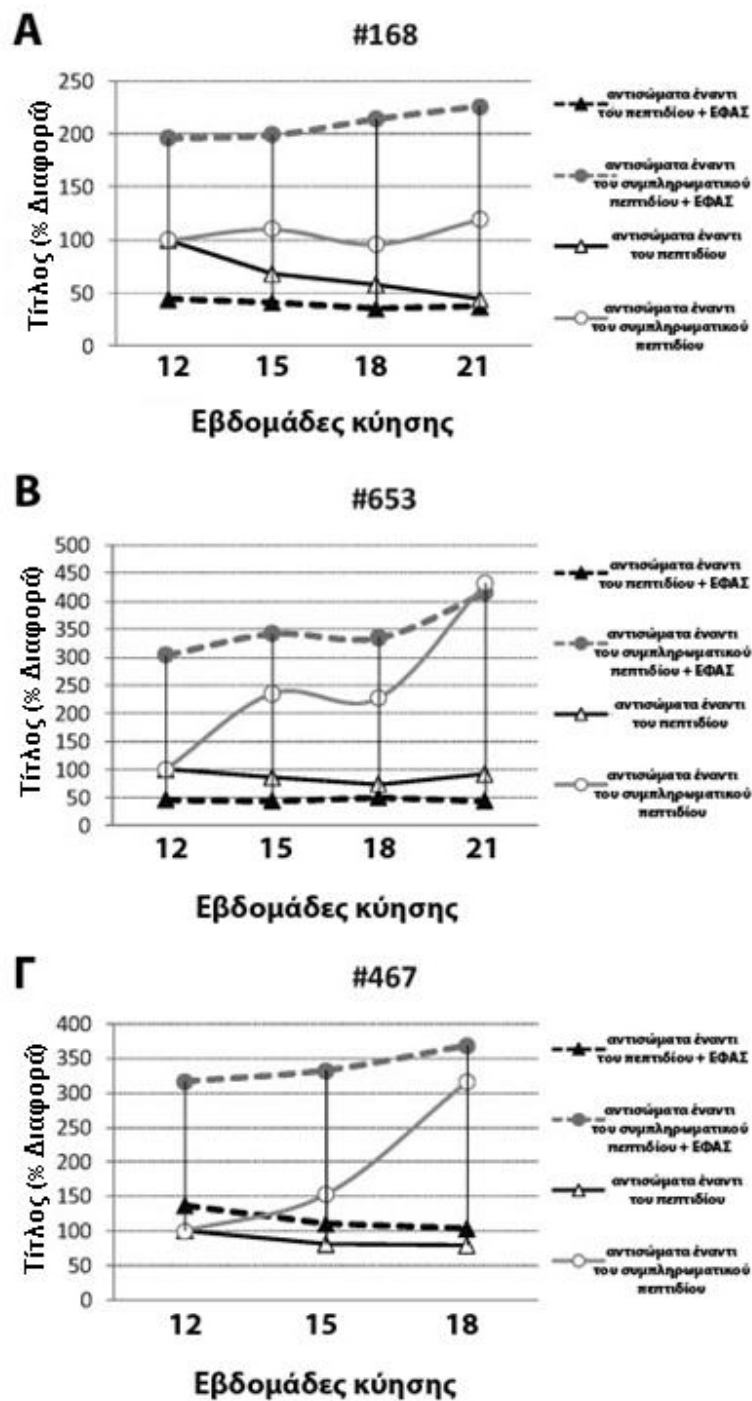


**Εικόνα 1. A**, Αναλογία ιδιοτυπικών:αντί-ιδιοτυπικών (Ιδ:αντί-Ιδ) αντισωμάτων έναντι του κύριου επίτοπου της La/SSB έπειτα από χορήγηση ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (ΕΦΑΣ) (IVIg), σε μητέρες που γέννησαν παιδιά με νεογνικό λύκο και μητέρες που γέννησαν υγιές παιδιά. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τη μέση τιμή. Η μέση τιμή της αναλογίας των Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερη στις μητέρες που γέννησαν παιδιά με νεογνικό λύκο από ότι σε αυτές που γέννησαν υγιές παιδιά ( $P < 0.0001$ ). ΣΚΑ: Συγγενής κολποκοιλιακός αποκλεισμός. **B**, Αναλογίες Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων στα παρασκευάσματα ΕΦΑΣ που ελήφθησαν από 13 εκ των 16 μητέρων. Η αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων στην ΕΦΑΣ που ελήφθησαν από μητέρες που γέννησαν παιδιά με νεογνικό λύκο (αστερίσκοι) ήταν  $\geq 1$ , και η μέση αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων στην ΕΦΑΣ που ελήφθησαν από τις μητέρες αυτές ήταν υψηλότερη από τις αντίστοιχες αναλογίες στις ΕΦΑΣ που ελήφθησαν από μητέρες που γέννησαν υγιές παιδιά ( $P < 0.0001$ ). Οι αριθμοί κάτω από τις στήλες δείχνουν τον αριθμό του ασθενούς και την εβδομάδα χορήγησης της ΕΦΑΣ.



**Η εξωγενής προσθήκη ΕΦΑΣ αυξάνει περαιτέρω την ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων σε μητρικούς ορούς.**

Για να διερευνήσουμε τη δυνατότητα της ΕΦΑΣ να αυξήσει περαιτέρω την ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων στους ορούς των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε, προσθέσαμε στον ορό κάθε μητέρας (που είχαν συλλεχθεί λίγο πριν τη χορήγηση ΕΦΑΣ) 5.7 mg/ml του παρασκευάσματος της ΕΦΑΣ την οποία η συγκεκριμένη μητέρα τελικά έλαβε στη θεραπεία κατά τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Στους ορούς των 11 από τις 13 γυναίκες, η εξωγενής χορήγηση ΕΦΑΣ ενίσχυσε την ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων κατά 1.20–4.70-φορές. Η ενεργότητα σε ορούς από 3 αντιπροσωπευτικές μητέρες φαίνεται στο Εικόνα 2. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων στους ορούς των υπόλοιπων 2 μητέρων. Παράλληλα, η ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων μειώθηκε στους ορούς 9 από τις 13 μητέρες (κατά 10–53%), παρέμεινε σταθερή στον ορό μίας μητέρας, και αυξήθηκε (κατά 1.25–1.79-φορές) στους ορούς των υπόλοιπων τριών μητέρων. Συνολικά, σε 12 από τις 13 μητέρες, η εξωγενής προσθήκη της ΕΦΑΣ οδήγησε σε υψηλότερη αύξηση της ενεργότητας των αντί-Ιδ σε σχέση με τα Ιδ αντισώματα. Παραδείγματα των προτύπων δραστηριότητας είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος στον υπεύθυνο για την αλληλογραφία συγγραφέα.



**Εικόνα 2.** Άμεση επίδραση της ΕΦΑΣ στο δίκτυο Ιδ/αντί-Ιδ αντισωμάτων και τα επίπεδα των παθογενετικών αυτοαντισωμάτων σε 3 αντιπροσωπευτικούς ασθενείς (ασθενείς 168 [A], 653 [B], και 467 [Γ]). Παρασκευάσματα ΕΦΑΣ (5.7 mg/ml) προστέθηκαν εξωγενώς στους ορούς που είχαν ληφθεί κατά την κύηση ακριβώς πριν τη θεραπεία με χορήγηση ΕΦΑΣ. Η ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων (αντισώματα έναντι του συμπληρωματικού πεπτιδίου) αυξήθηκε σημαντικά, ενώ η ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων (αντισώματα έναντι του πεπτιδίου) δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Βλέπε Εικόνα 1 για λοιπούς ορισμούς.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ΣΚΑ σχετίζεται στενά με την παρουσία αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αντισωμάτων (2). Έχει υποθεθεί ότι τα μητρικά αυτοαντισώματα πυροδοτούν έναν καταρράκτη φλεγμονής ο οποίος οδηγεί σε μη αντιστρεπτή ινωτική αντικατάσταση του εμβρυικού φλεβόκομβου (3, 14). Επομένως, αφότου αναπτυχθεί ΣΚΑ (τρίτου βαθμού) στο έμβρυο, αυτή η κατάσταση δεν μπορεί να αναστραφεί με οποιαδήποτε διαθέσιμη θεραπεία. Η κατάσταση είναι θανατηφόρος σε ~20% των περιπτώσεων. Η επίπτωση του ΣΚΑ είναι 10-φορές υψηλότερη στα παιδιά μητέρων που είναι θετικές για αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αντισώματα και έχουν ιστορικό γέννησης παιδιού με νεογνικό λύκο (8), αποτελώντας την ομάδα κυήσεων υψηλού κινδύνου. Στις περιπτώσεις αυτές, μία προφυλακτική θεραπεία θα ήταν ιδιαίτερος ευεργετική.

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί για να εξηγήσουν τον τρόπο με τον οποίο η ΕΦΑΣ προλαμβάνει την ιστική βλάβη περιλαμβάνουν τους ακόλουθους: 1) αυξάνει την απαλοιφή των μητρικών αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αντισωμάτων, 2) μειώνει τη μεταφορά των αντισωμάτων διαμέσω του πλακούντα, και 3) τροποποιεί τα ανασταλτικά σήματα στα μακροφάγα, με επακόλουθη μείωση της φλεγμονώδους απόκρισης και της ίνωσης της εμβρυικής καρδιάς (15–17). Στη μελέτη PITCH, η ΕΦΑΣ χορηγήθηκε για την πρόληψη της ανάπτυξης ΣΚΑ στα έμβρυα των 20 εγκύων υψηλού κινδύνου (11). Παράλληλα, στην Ευρώπη διεξήχθη μία μελέτη που χρησιμοποιούσε ταυτόσημο πρωτόκολλο θεραπείας σε 15 εγκύους υψηλού κινδύνου (18). Και οι δύο μελέτες διακόπηκαν, καθώς εμφανίστηκε ΣΚΑ σε τρία βρέφη από τις μητέρες που συμμετείχαν (11, 18). Παρά το εύρημα ότι η χορήγηση ΕΦΑΣ σε χαμηλές δόσεις δεν προστατεύει από την επανεμφάνιση ΣΚΑ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίαζε η μελέτη του τρόπου με τον οποίο η ΕΦΑΣ τροποποιεί το δίκτυο των Ιδ/αντί-Ιδ παθογενετικών αυτοαντισωμάτων στους ορούς των μητέρων που συμμετείχαν στη μελέτη PITCH.

Προηγούμενη εργασία μας, είχε δείξει ότι η παρουσία των αντί-Ιδ αντισωμάτων που στρέφονται έναντι των αντί-La/SSB αυτοαντισωμάτων μπορεί να προστατεύσει το έμβρυο παρεμποδίζοντας τα παθογόνα αυτοαντισώματα της μητέρας (10). Η διαπίστωση αυτή μας ώθησε να διερευνήσουμε διεξοδικά το δίκτυο Ιδ/αντί-Ιδ αντί-La/SSB αντισωμάτων στις μητέρες που συμμετείχαν στην μελέτη PITCH. Δεκαέξι από τις είκοσι μητέρες που ολοκλήρωσαν τη μελέτη PITCH ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα, και τρεις γέννησαν παιδιά με νεογνικό λύκο (2 με ΣΚΑ και 1 με ερύθημα). Οι οροί των μητέρων και των τριών βρεφών που ανέπτυξαν νεογνικό λύκο είχαν μία σημαντικά υψηλότερη αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων σε σχέση με τους ορούς των μητέρων που γέννησαν υγιές παιδιά, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ανεπαρκούς αντί-ιδιοτυπικής απόκρισης μετά τη χορήγηση ΕΦΑΣ. Επομένως, η μη εξισορρόπηση των ιδιοτυπικών αντισωμάτων, που στοχεύουν τον κύριο επίτοπο της La/SSB από αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα, μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας για την εμφάνιση νεογνικού λύκου στα βρέφη μητέρων που έλαβαν θεραπεία με ΕΦΑΣ. Ωστόσο, ήταν ασαφής ο τρόπος με τον οποίο η κάθε δόση της ΕΦΑΣ τροποποιεί το αντί-Ιδ δίκτυο και επηρεάζει τα επίπεδα των Ιδ και αντί-Ιδ αντισωμάτων. Για να απαντηθεί αυτή η ερώτηση, πραγματοποιήθηκαν λεπτομερείς αναλύσεις της ενεργότητας των Ιδ και αντί-Ιδ αντισωμάτων σε μητρικούς ορούς σε κάθε χρονική στιγμή της χορήγησης ΕΦΑΣ. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση ΕΦΑΣ οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της αντί-Ιδ δραστηριότητας και μείωση της Ιδ δραστηριότητας στην πλειονότητα των περιπτώσεων, φέρνοντας τα επίπεδα των αντί-Ιδ αντισωμάτων κοντά στα επίπεδα των Ιδ αντισωμάτων. Ωστόσο, δε συνέβη το ίδιο στις μητέρες των παιδιών που εμφάνισαν νεογνικό λύκο. Στους ορούς αυτών των μητέρων, οι τίτλοι των αντί-Ιδ αντισωμάτων δεν πλησίασαν τους τίτλους των Ιδ αντισωμάτων.

Η ανεπαρκής αντί-Ιδ απόκριση έχει συσχετισθεί πρόσφατα με την εμφάνιση άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (19). Ο σακχαρώδης

διαβήτη τύπου 1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος 65 (Glutamate Decarboxylase: GAD65) (20). Τα αντισώματα έναντι της GAD65 συνήθως προαναγγέλλουν την έναρξη του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 κατά μήνες ή χρόνια και, μαζί με άλλα αυτοαντισώματα, τα οποία στρέφονται έναντι των κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος, χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την εμφάνιση της νόσου (21). Πρόσφατα, οι Oak και συν. κατέδειξαν ότι καλυμμένα αντί-GAD65 αντισώματα είναι παρόντα στον υγιή πληθυσμό και ότι ο σακχαρώδης διαβήτη τύπου 1 χαρακτηρίζεται από την απουσία ενός συγκεκριμένου αντί-Ιδ αντισώματος, παρά από την ύπαρξη των αντί-GAD65 αντισωμάτων. (19). Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, καθώς υποδηλώνουν την ύπαρξη καλυμμένων Ιδ αντισωμάτων (από αντί-Ιδ αντισώματα) στις μητέρες που γέννησαν υγιές παιδί. Ειδικότερα, βρήκαμε ότι η απαλοιφή των αντί-Ιδ αντισωμάτων από τους ορούς των μητέρων που έλαβαν θεραπεία με ΕΦΑΣ αύξησε σημαντικά την ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων σε 5 από τις 7 σειρές ορών που ελέγχθηκαν (αλλά όχι στους ορούς μίας μητέρας που γέννησε παιδί με νεογνικό λύκο). Η αύξηση της ενεργότητας των αντί-Ιδ αντισωμάτων και η μείωση της ενεργότητας των Ιδ αντισωμάτων που παρατηρείται σε πολλούς από τους μητρικούς ορούς μετά τη χορήγηση ΕΦΑΣ θα μπορούσε να αποδοθεί στην άμεση προσθήκη αντί-Ιδ αντισωμάτων στους ορούς των μητέρων. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε εξετάζοντας το περιεχόμενο σε Ιδ και αντί-Ιδ αντισώματα των διάφορων παρασκευασμάτων ΕΦΑΣ που χορηγήθηκαν σε 13 από τις 16 μητέρες, οι οποίες ήταν θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα και εισήχθησαν στη μελέτη PITCH. Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι όλες πλην 2 μητέρων είχαν λάβει παρασκευάσματα ΕΦΑΣ με υψηλότερη ενεργότητα των αντί-Ιδ αντισωμάτων σε σχέση με την ενεργότητα των Ιδ αντισωμάτων. Οι δύο μητέρες στις οποίες δεν ίσχυε αυτό γέννησαν παιδί με ΣΚΑ. Επομένως, είναι εύλογο να υποτεθεί ότι ο λόγος που η

ΕΦΑΣ δεν εμπόδισε την ανάπτυξη ΣΚΑ στις 2 μητέρες ήταν ότι τους χορηγήθηκε ΕΦΑΣ με υψηλή αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων, κι επομένως τα αντί-Ιδ αντισώματα δεν αυξήθηκαν επαρκώς.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η IVIG περιέχει αντισώματα έναντι διαφόρων αυτοαντιγόνων, καθώς και αντί-ιδιοτυπικά αντισώματα (22–25). Αυτό πιθανά οφείλεται στην παρουσία πολυδραστικών IgG αντισωμάτων και αντί-Ιδ αντισωμάτων στη δεξαμενή του πλάσματος που έχει χρησιμοποιηθεί για την κλασματοποίηση της ΕΦΑΣ (26, 27). Ωστόσο, μπορεί να αυξηθεί με διάφορες χημικές επεξεργασίες στις οποίες υποβάλλονται τα μόρια IgG κατά τη διάρκεια της διεργασίας κλασματοποίησης (22, 28). Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία παραγωγής των εμπορικών παρασκευασμάτων ΕΦΑΣ (η οποία διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών εμπορικών σκευασμάτων) περιλαμβάνει βήματα κλασματοποίησης και αδρανοποίησης ιών που περιέχουν, συχνά με επιδράσεις σε ακραίες φυσικές συνθήκες. Αυτές οι διεργασίες επηρεάζουν σημαντικά την αυτοδραστικότητα της ΕΦΑΣ (22). Επομένως, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι διαφορετικά εμπορικά σκευάσματα και διαφορετικά παρασκευάσματα ΕΦΑΣ (όπως αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη PITCH) δεν έχουν ταυτόσημο περιεχόμενο σε Ιδ και αντί-Ιδ αντισώματα.

Εξωγενής προσθήκη, στον ορό κάθε γυναίκας ξεχωριστά, των παρασκευασμάτων ΕΦΑΣ που είχαν λάβει σε κάθε χρονικό σημείο της μελέτης κατά την κύηση οδήγησε σε μεγάλη αύξηση της ενεργότητας των αντί-Ιδ αντισωμάτων και σε μικρή μείωση της ενεργότητας των Ιδ αντισωμάτων στην πλειονότητα των ορών που ελέγχθηκαν. Από αυτή την άποψη, υψηλότερες δόσεις ΕΦΑΣ (έως 2 mg/κιλό σωματικού βάρους), οι οποίες θεωρούνται ασφαλείς για την κύηση (29, 30), θα μπορούσαν να είναι πιο αποτελεσματικές για την πρόληψη του νεογνικού λύκου. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα παρασκευάσματα ΕΦΑΣ που χορηγήθηκαν σε μητέρες που γέννησαν παιδιά με νεογνικό λύκο είχαν αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ

αντισωμάτων  $\geq 1$ , ο προέλεγχος της ΕΦΑΣ και η επιλογή των παρασκευασμάτων με χαμηλή αναλογία Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων για τη χορήγηση τους σε υψηλού κινδύνου γυναίκες θα μπορούσαν να είναι πιο αποτελεσματικά στην πρόληψη του νεογνικού λύκου και του ΣΚΑ.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας δείχνει ότι τα παρασκευάσματα ΕΦΑΣ περιέχουν αντί-Ιδ αντισώματα, και η χορήγησή τους μπορεί να ενισχύσει την αντι-ιδιοτυπική απόκριση σε έγκυες που είναι θετικές για αντί-La/SSB αντισώματα. Η επιτυχία της θεραπείας με ΕΦΑΣ μπορεί να είναι συνάρτηση του περιεχομένου σε αντί-Ιδ αντισώματα του κάθε παρασκευάσματος ΕΦΑΣ, καθώς και της αναλογίας των Ιδ:αντί-Ιδ αντισωμάτων που επιτυγχάνεται στους μητρικούς ορούς μετά τη χορήγηση ΕΦΑΣ.

#### **ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΤΩΝ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ**

Όλοι οι συγγραφείς συμμετείχαν σημαντικά στη σύνταξη του ή την αναθεώρηση των σημαντικών πνευματικών περιεχομένων του άρθρου, και όλοι οι συγγραφείς ενέκριναν τη δημοσίευση της τελικής έκδοσής του. Ο Καθηγητής κ. Τζιούφας είχε πλήρη πρόσβαση σε όλα τα δεδομένα της μελέτης και αναλαμβάνει την ευθύνη για την ακεραιότητα των δεδομένων και την ακρίβεια της ανάλυσης των στοιχείων.

**Σύλληψη της μελέτης και σχεδιασμός.** Ρούτσιας, Μουτσόπουλος, Buyon, Τζιούφας.

**Λήψη των δεδομένων.** Ρούτσιας, Κυριακίδης, Friedman, Llanos, Clancy, Μουτσόπουλος, Buyon, Τζιούφας.

**Ανάλυση και ερμηνεία των δεδομένων.** Ρούτσιας, Κυριακίδης, Μουτσόπουλος, Buyon, Τζιούφας.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1) Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 33: 140–54.
- 2) Buyon JP, Clancy RM. Neonatal lupus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' lupus erythematosus*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1058–80.
- 3) Buyon JP, Clancy RM, Friedman DM. Autoimmune associated congenital heart block: integration of clinical and research clues in the management of the maternal/foetal dyad at risk. *J Intern Med* 2009; 265: 653–62.
- 4) Cimaz R, Spence DL, Hornberger L, Silverman ED. Incidence and spectrum of neonatal lupus erythematosus: a prospective study of infants born to mothers with anti-Ro autoantibodies. *J Pediatr* 2003; 142: 678–83.
- 5) Brucato A, Frassi M, Franceschini F, Cimaz R, Faden D, Pisoni MP, et al. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1832–5.
- 6) Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M, et al. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1658–66.
- 7) Julkunen H, Eronen M. The rate of recurrence of isolated congenital heart block: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 487–8.
- 8) Llanos C, Izmirly PM, Katholi M, Clancy RM, Friedman DM, Kim MY, et al. Recurrence rates of cardiac manifestations associated with neonatal lupus and maternal/fetal risk factors. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3091–7.
- 9) Strandberg L, Winqvist O, Sonesson SE, Mohseni S, Salomonsson S, Bremme K, et al. Antibodies to amino acid 200-239 (p200) of Ro52 as serological markers for the risk of developing congenital heart block. *Clin Exp Immunol* 2008; 154: 30–7.
- 10) Stea EA, Routsias JG, Clancy RM, Buyon JP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Anti-La/SSB antiidiotypic antibodies in maternal serum: a marker of low risk for neonatal lupus in an offspring. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2228–34.
- 11) Friedman DM, Llanos C, Izmirly PM, Brock B, Byron J, Copel J, et al. Evaluation of fetuses in a study of intravenous immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block: results of a multicenter, prospective, open-label clinical trial. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1138–46.
- 12) Routsias JG, Touloupi E, Dotsika E, Moulia A, Tsikaris V, Sakarellos C, et al. Unmasking the anti-La/SSB response in sera from patients with Sjögren's syndrome by



specific blocking of anti-idiotypic antibodies to La/SSB antigenic determinants. *Mol Med* 2002; 8: 293–305.

13) Routsias JG, Dotsika E, Touloupi E, Papamattheou M, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, et al. Idiotype–anti-idiotypic circuit in non-autoimmune mice after immunization with the epitope and complementary epitope 289–308aa of La/SSB: implications for the maintenance and perpetuation of the anti-La/SSB response. *J Autoimmun* 2003; 21: 17–26.

14) Clancy RM, Kapur RP, Molad Y, Askanase AD, Buyon JP. Immunohistologic evidence supports apoptosis, IgG deposition, and novel macrophage/fibroblast crosstalk in the pathologic cascade leading to congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 173–82.

15) Yu Z, Lennon VA. Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases. *N Engl J Med* 1999; 340: 227–8.

16) Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol* 1996; 157: 3317–22.

17) Miranda-Carus ME, Askanase AD, Clancy RM, Di Donato F, Chou TM, Libera MR, et al. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF- $\alpha$  by macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 5345–51.

18) Pisoni CN, Brucato A, Ruffatti A, Espinosa G, Cervera R, Belmonte-Serrano M, et al. Failure of intravenous immunoglobulin to prevent congenital heart block: findings of a multicenter, prospective, observational study. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1147–52.  
Direct Link:

19) Oak S, Gilliam LK, Landin-Olsson M, Torn C, Kockum I, Pennington CR, et al. The lack of anti-idiotypic antibodies, not the presence of the corresponding autoantibodies to glutamate decarboxylase, defines type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5471–6.

20) Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151–6.

21) Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45: 926–33.

22) Djoumerska I, Tchorbanov A, Pashov A, Vassilev T. The autoreactivity of therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations depends on the fractionation methods used. *Scand J Immunol* 2005; 61: 357–63.

- 23) Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. A V region-connected autoreactive subfraction of normal human serum immunoglobulin G. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1701–6.
- 24) Vassilev TL, Bineva IL, Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Variable region-connected, dimeric fraction of intravenous immunoglobulin enriched in natural autoantibodies. *J Autoimmun* 1995; 8: 405–13.
- 25) Djoumerska IK, Tchorbanov AI, Donkova-Petrini VD, Pashov AD, Vassilev TL. Serum IgM, IgG and IgA block by F(ab')<sub>2</sub>-dependent mechanism the binding of natural IgG autoantibodies from therapeutic immunoglobulin preparations to self-antigens. *Eur J Haematol* 2005; 74: 101–10.
- 26) Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 812–8.
- 27) Saenko VA, Kabakov AE, Poverenny AM. Hidden high-avidity anti-DNA antibodies occur in normal human gammaglobulin preparations. *Immunol Lett* 1992; 34: 1–5.
- 28) Bouvet JP, Stahl D, Rose S, Quan CP, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents. *J Autoimmun* 2001; 16: 163–72.
- 29) Branch DW, Peaceman AM, Druzin M, Silver RK, El-Sayed Y, Silver RM, et al, for the Pregnancy Loss Study Group. A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 122–7.
- 30) Berkowitz RL, Lesser ML, McFarland JG, Wissert M, Primiani A, Hung C, et al. Antepartum treatment without early cordocentesis for standard-risk alloimmune thrombocytopenia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 249–55.

## **Η σηματοδότηση μέσω του TLR3 αυξάνει τη σύνθεση και προκαλεί πυρηνική ανακατανομή του αυτοαντιγόνου Ro52/TRIM21 σε Επιθηλιακά Κύτταρα Σιελογόνων Αδένων (ΕΚΣΑ), μέσω του μονοπατιού των Ιντερφερονών Τύπου Ι**

Νικόλαος Χ. Κυριακίδης, BSc<sup>1\*</sup>, Ευσταθία Κ. Καψογεώργου, PhD<sup>1\*</sup>, Βασιλική Χ. Γουρζή, MD<sup>1</sup>, Γεώργιος Ε. Μπαλτατζής, PhD<sup>2</sup>, Αθανάσιος Γ. Τζιούφας, MD<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>: Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

<sup>2</sup>: Τμήμα Παθολογοανατομίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

\* Οι συγγραφείς συνέβαλαν ισότιμα στη μελέτη

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**Θεωρητικό Υπόβαθρο:** Σε Επιθηλιακά Κύτταρα Σιελογόνων Αδένων (ΕΚΣΑ) ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren έχει περιγραφεί αυξημένη έκφραση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB. Τα ΕΚΣΑ, τα οποία αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές των αυτοάνοσων αποκρίσεων στο σύνδρομο Sjögren, εκφράζουν υψηλά επίπεδα λειτουργικών TLR3 στην κυτταρική τους μεμβράνη, ενώ η Ro52/TRIM21 ρυθμίζει αρνητικά τη μεσολαβούμενη από τον TLR3 φλεγμονή. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την επίδραση της σηματοδότησης μέσω του TLR3 στην έκφραση των αυτοαντιγόνων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, από τα ΕΚΣΑ.

**Μέθοδοι:** Η επίδραση της διέγερσης του TLR3 ή του TLR4 στην έκφραση των αυτοαντιγόνων αξιολογήθηκε με την επίδραση με polyI:C ή LPS, αντίστοιχα, σε σειρές ΕΚΣΑ (10 από ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren, 12 από μάρτυρες που δεν πάσχουν από σύνδρομο Sjögren) ή σε κύτταρα HeLa, την οποία ακολούθησε ανάλυση της έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης.

**Αποτελέσματα:** Η επίδραση με polyI:C, αλλά όχι με LPS, κατέληξε στην επαγωγή της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 από τα ΕΚΣΑ σε δύο βήματα, μία 12-πλάσια αύξηση στις 6-ώρες επίδρασης την οποία ακολούθησε μία 2.5-πλάσια αύξηση στις 24-48 ώρες, ενώ προκάλεσε μία καθυστερημένη 2-πλάσια αύξηση της έκφρασης των mRNA των Ro60/TROVE2 και La/SSB στις 48 ώρες επίδρασης. Παρότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά, η καθυστερημένη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 συνοδεύτηκε από ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα, από ένα πρότυπο που προσομοιάζει σε χρώση του πυρηνίσκου σε αρκετές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα. Τα καθυστερημένα αυτά φαινόμενα μεσολαβούνται κυρίως από την παραγωγή IFNβ, όπως καταμαρτυρείται από την έκκριση της αντίστοιχης ιντερφερόνης από τα ΕΚΣΑ και από ειδικά πειράματα αναστολής. Η σηματοδότηση μέσω του TLR3 είχε παρόμοια επίδραση σε ΕΚΣΑ που είχαν ληφθεί από ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren και σε

μάρτυρες, ενώ δεν επηρέασε την έκφραση αυτών των αυτοαντιγόνων σε κύτταρα HeLa.

**Συμπέρασμα:** Η σηματοδότηση μέσω του TLR3 ρυθμίζει την έκφραση των αυτοαντιγόνων από ΕΚΣΑ εμπλέκοντας τα μονοπάτια της φυσικής ανοσίας στην αύξηση της έκφρασης των αυτοαντιγόνων αυτών στους φλεγμαίνοντες ιστούς και πιθανά και στην έκθεσή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνδρομο Sjögren αποτελεί μια χρόνια συστηματική αυτοάνοση νόσο η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων που στρέφονται έναντι του πρωτεϊνικών συστατικών των ενδοκυττάρων συμπλόκων ριβονουκλεοπρωτεϊνών-RNA και πιο συγκεκριμένα τις πρωτεΐνες Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB.

Οι μηχανισμοί που μεσολαβούν την παρουσίαση των ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα όπως και την παραγωγή μεγάλου αριθμού αυτοαντισωμάτων είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Από την κριτική ανασκόπηση των δημοσιευμένων μελετών φαίνεται ότι η αυτοάνοση απόκριση είναι αντιγονο-οδηγούμενη, καθώς: α) η πλειονότητα των αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύεται είναι τάξεως γ, υποδηλώνοντας ότι παρέχεται αντιγονοεξαρτώμενη T κυτταρική βοήθεια (1), β) οι αυτοάνοσες αποκρίσεις είναι κυρίως πολυκλωνικές, στοχεύοντας πολλαπλούς επιτόπους εντός του αυτοαντιγόνου (1), και γ) η ανοσοποίηση πειραματικών ζωικών προτύπων με κομμάτια των αυτοαντιγόνων καταλήγει στην ενδο- και δια-μοριακή επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης, με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που παρατηρείται μετά από την ανοσοποίηση με ξένα αντιγόνα (2, 3). Οι προσβεβλημένοι εξωκρινείς αδένες φαίνεται ότι αποτελούν την κύρια θέση παραγωγής αυτοαντισωμάτων, καθώς α) η σίελος ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren περιέχει υψηλά επίπεδα IgG καθώς και αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αυτοαντισώματα, β) παρατηρούνται έκτοπα βλαστικά κέντρα τα οποία περιέχουν

αυτοδραστικά Β κύτταρα στους σιελογόνους αδένες περίπου 20% των ασθενών, και γ) πολλά από τα διηθούντα πλασματοκύτταρα περιέχουν κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες με αντι-Ro/SSA ενεργότητα (4, 5). Σε αυτό το περιβάλλον, φαίνεται ότι το επιθηλιακό κύτταρο διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο. Πράγματι, το κύριο χαρακτηριστικό της ανοσοπαθολογικής βλάβης στο σύνδρομο Sjögren είναι η ενεργοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων. Τα Επιθηλιακά Κύτταρα των Σιελογόνων Αδένων (ΕΚΣΑ) είναι ισχυροί ρυθμιστές των τοπικών αποκρίσεων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας, καθώς διαθέτουν το πλήρες και λειτουργικό οπλοστάσιο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, μεταξύ άλλων μόρια ΜΣΙ-τάξης II, ενώ παρουσιάζουν φαινόμενα μετατόπισης των πυρηνικών αυτοαντιγόνων στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη. Ακόμα, εκφράζουν μια πληθώρα λειτουργικών ανοσοτροποποιητικών μορίων, όπως συνδιεγερτικά μόρια, κυτταροκίνες, χημειοκίνες και TLRs. Ιδιαίτερης προσοχής αξίζει η έκφραση του TLR3, καθώς: α) η συστατική του έκφραση από τα ΕΚΣΑ είναι υψηλή και, αντίθετα με την κυτταροπλασματική του εντόπιση που έχει περιγραφεί σε μη διεγερμένα ανοσοκύτταρα, στα ΕΚΣΑ εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού στα κύτταρα αυτά β) είναι λειτουργικός, καθώς στα ΕΚΣΑ η επίδραση με polyI:C στον TLR3 οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης διάφορων ανοσοτροποποιητικών μορίων, όπως επίσης και κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από ανοικία (6-8), και γ) ο φυσικός του συνδέτης είναι το δίκλωνο RNA, το οποίο μπορεί να ελευθερωθεί τοπικά είτε από ιούς είτε από κατεστραμμένα κύτταρα (9).

Η Ro52/TRIM21 έχει εμπλακεί στην αρνητική ρύθμιση της μεσολαβούμενης από τον TLR3 φλεγμονής ευοδώνοντας την ουβικιτινυλίωση και την επακόλουθη αποδόμηση των παραγόντων 3, 5, 7 και 8 που ρυθμίζουν την έκφραση ιντερφερονών (IRFs) στο

πρωτεάσωμα (10, 11). Από την άλλη πλευρά, οι ιντερφερόνες (IFNs), οι οποίες παράγονται σαν αποτέλεσμα της αναγνώρισης του TLR3 με το συνδέτη του, έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση της Ro52/TRIM21 (12, 13). Παρότι ο ρυθμιστικός ρόλος της Ro52/TRIM21 στη σηματοδότηση μέσω του TLR3 είναι αποδεδειγμένος, η αντίστροφη επίδραση δεν έχει μελετηθεί ως τώρα.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε την επίδραση της σηματοδότησης μέσω του TLR3 στην έκφραση της Ro52/TRIM21, και στα υπόλοιπα δύο αυτοαντιγόνα Ro60/TROVE2 και La/SSB του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου Ro/La hY-RNA, σε μη-νεοπλασματικά μακροχρόνια καλλιεργημένα ΕΚΣΑ, καθώς και σε νεοπλασματικά επιθηλιακά HeLa κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρική-σειρά μάρτυρας. Η σηματοδότηση μέσω TLR3, αλλά όχι μέσω TLR4, βρέθηκε ότι οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 από τα ΕΚΣΑ σε δύο βήματα, ενώ η έκφραση των mRNA της Ro60/TROVE2 και της La/SSB αυξήθηκε σε μικρότερο –αλλά σημαντικό– βαθμό. Η δεύτερη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 συνοδευόταν από ανακατανομή της πρωτεΐνης στον πυρήνα των ζωντανών κυττάρων. Η καθυστερημένη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 και η ανακατανομή της πρωτεΐνης στον πυρήνα μεσολαβείτο κυρίως από την παραγωγή IFN $\beta$ . Αντίθετα με τα ΕΚΣΑ, η σηματοδότηση μέσω του TLR3 σε κύτταρα HeLa δεν επηρέασε την έκφραση και κατανομή των αυτοαντιγόνων, ούτε την παραγωγή IFN, υποδηλώνοντας μια διαφορετική ρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης μεταξύ των μη-νεοπλασματικών και των νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Αντιδραστήρια.** Τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών (mAbs) έναντι των ανθρώπινων Ro60/TROVE2 (κλώνος 1F2) και La/SSB (κλώνος 1D6-H5) αγοράστηκαν από την AbD-Serotec (Oxford, UK), ενώ έναντι της β-ακτίνης (κλώνος 2F1-1) από τη Biolegend (San Diego, CA, USA). Τα μονοκλωνικά αντισώματα κουνελίων έναντι της ανθρώπινης Ro52/TRIM21, της IFNβ (για χρήση σε ιστούς σε παραφίνη) και της ιστόνης-H4 αγοράστηκαν από τη Novus-Biologicals (Cambridge, UK), τη Merck Millipore (Darmstadt, Germany) και τη Biolegend, αντίστοιχα. Τα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σαν ισοτυπικοί μάρτυρες αγοράστηκαν από τη Dako (Glostrup, Denmark). Τα mAbs για την αναστολή της δράσης της ανθρώπινης IFNα (κλώνος MMHA-2) και της αλύσου 2 του κοινού υποδοχέα των IFNα/β (κλώνος MMHAR-2) αγοράστηκαν από την PBL Interferon Source (Piscataway, NJ, USA), ενώ για την αναστολή της δράσης της ανθρώπινης IFNβ (κλώνος 76703) και της IFNγ (κλώνος 25718) τα μονοκλωνικά αντισώματα αγοράστηκαν από την R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), ενώ οι ισοτυπικοί μάρτυρες από τη BD-Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη συνεστιακή μικροσκοπία περιλάμβαναν τα goat anti-mouse IgG, DyLight<sup>TM</sup> 549-Conjugated (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG, και Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Δεύτερα αντισώματα συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση, όπως τα Pierce goat anti-mouse IgG (Thermo Scientific) και goat anti-rabbit Igs (Dako) χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης.

Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ELISA χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της παραγωγής κυτταροκινών. Οι δοκιμασίες ELISA για τις ανθρώπινες IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  και IFN $\gamma$  ήταν από τη Life Technologies, για την IL-7 από την R&D Systems, ενώ για τις IL-2, IL-4 και IL-17 από τη Biolegend.

Το ανάλογο του συνδέτη του TLR3 πολυινοσινικό:κυτιδιλικό οξύ (polyinosinic:cytidylic acid, polyI:C) και ο συνδέτης του TLR4 λιποπολυσακχαρίτης (lipopolysaccharide, LPS) από *Escherichia coli*) αγοράστηκαν από τη Sigma (St Louis, MO, USA).

**Κυτταρικές σειρές.** Μη-νεοπλασματικές, μακρόχρονα καλλιεργημένες σειρές ΕΚΣΑ εγκαταστάθηκαν με την τυπική μέθοδο της εξωβλαστικής ανάπτυξης (14) από ένα λοβίο που λαμβάνεται κατά τη βιοψία επικουρικών σιελογόνων αδένων (ΕΣΑ) από άτομα που υποβάλλονται σε διαγνωστική αξιολόγηση για σύνδρομο Sjögren. Είκοσι-δύο σειρές ΕΚΣΑ χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, δέκα προέρχονταν από ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren σύμφωνα με τα Αμερικάνικα–Ευρωπαϊκά κριτήρια ταξινόμησης για το σύνδρομο Sjögren (15) και δώδεκα από μάρτυρες οι οποίοι παρουσιάστηκαν με συμπτώματα ξηρότητας, αλλά δεν πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια, είχαν αρνητική βιοψία και δεν παρουσίαζαν ορολογικά χαρακτηριστικά που συνάδουν με το σύνδρομο Sjögren. Έξι από τους δέκα ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren ήταν θετικοί για αντί-Ro52/TRIM21, τέσσερις για αντί-Ro60/TROVE2 και τρεις για αντί-La/SSB αυτοαντισώματα. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν με έγγραφη συναίνεση των ατόμων. Η μελέτη είχε λάβει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής της Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα (Αρ. Πρωτοκόλλου: 5107). Η καθαρότητα και η επιθηλιακή προέλευση των καλλιεργημένων σειρών ΕΚΣΑ, πιστοποιήθηκε βάσει της μορφολογίας τους, της πανομοιότυπης



έκφρασης δεικτών ειδικών για επιθηλιακά κύτταρα και της απουσίας δεικτών ενδεικτικών των λεμφοκυττάρων ή μονοκυττάρων (14).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) στο οποίο έχει προστεθεί 10% ορός εμβρύου μύσγου, 2 mM L-γλουταμίνης, 100 U/ml πενικιλίνης, και 100 mg/ml στρεπτομυκίνης (όλα από τη Life Technologies).

Η απουσία επιμόλυνσης με ενδοτοξίνη επιβεβαιώνεται εξετάζοντας όλα τα αντιδραστήρια των καλλιεργειών με τη δοκιμασία ανάπτυξης χρώματος σε εκχύλισμα *Limulus amoebocyte* (Sigma, St Louis, MO, USA).

**Διέγερση των TLRs σε επιθηλιακά κύτταρα.** Τα ΕΚΣΑ ή τα κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν μέχρι πληρότητας σε πλακίδια 6-πηγαδιών ή 16-πηγαδιών στα οποία είχε στρωθεί κολλαγόνο (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) όπως έχει προηγούμενα περιγραφεί (14). Ακολουθώς, τα κύτταρα υποβάλλονταν ή όχι σε επίδραση με polyI:C (5-μg/ml, συνδέτης του TLR3) ή LPS (1-μg/ml, συνδέτης του TLR4) για διάφορες χρονικές περιόδους (6, 12, 24, 48 και 72 ώρες). Σε πρωταρχικά πειράματα, είχε μελετηθεί η επίδραση με μικρότερες από τις βέλτιστες (0.5-μg/ml) ή βέλτιστες (5-μg/ml) συγκεντρώσεις polyI:C (6). Τα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν σαν κυτταρική σειρά μάρτυρας. Η επίδραση της σηματοδότησης μέσω TLR στην έκφραση των μορίων Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB σε επίπεδο mRNA εξετάστηκε με πραγματικού-χρόνου ποσοτική PCR και σε επίπεδο πρωτεΐνης με συνεστιακή μικροσκοπία και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

**Αντίστροφη μεταγραφή-ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-qPCR).** Απομονώθηκε RNA το οποίο είχε υποστεί κατεργασία με DNάση χρησιμοποιώντας το

mirVana™ PARIST™ kit (Ambion, Applied Biosystems, USA) και το Ambion® TURBO DNA-free™ kit (Ambion). Το cDNA παράχθηκε από 0.25-μg RNA με το High Capacity RNA to DNA kit (Applied Biosystems). Τα ποσοστά έκφρασης των mRNAs των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB μετρήθηκαν με ποσοτική αληθινού-χρόνου PCR χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμους εκκινητές οι οποίοι είναι ειδικοί για κάθε μόριο (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Η ανθρώπινη HPRT1 (TaqMan® Gene Expression Assays) χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς. Όλα τα δείγματα έτρεξαν σε δυάδες. Η σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR έγινε με τη βοήθεια της μεθόδου  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (16) χρησιμοποιώντας τα κύτταρα HeLa σαν βαθμονομητή. Οι συνθήκες διεξαγωγής της PCR ήταν ίδιες για όλα τα γονίδια και περιλάμβαναν ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95 °C for 10-min, το οποίο ακολουθούσαν 50 κύκλοι στους 95 °C για 15-δευτερόλεπτα και 60 °C για 1-λεπτό.

**Συνεστιακή μικροσκοπία.** Η έκφραση και εντόπιση των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB πρωτεϊνών εκτιμήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία σε ΕΚΣΑ που είχαν καλλιεργηθεί σε πλακίδια 16-πηγαδιών (Nalge Nunc), όπως έχει παλαιότερα περιγραφεί (7). Συνοπτικά, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη για 10 λεπτά και μετά ακετόνη για 2 λεπτά στους -20 °C. Η μη ειδική δέσμευση των πρώτων αντισωμάτων παρεμποδίστηκε με επώαση σε 1.5% μη ανοσογόνου ορού από βόειο έμβρυο. Η επώαση με τα αντισώματα έναντι των ανθρώπινων πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB ή με τα αντισώματα ισοτυπικούς-μάρτυρες έγινε για τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C σε δοχείο με κορεσμένο περιβάλλον υδρατμών και ακολούθησε επώαση για 30-λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με τα κατάλληλα δεύτερα αντισώματα τα οποία ήταν συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο τύπου Olympus FV10.

**Ανοσοαποτύπωση κατά Western.** Η έκφραση των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB από ΕΚΣΑ ή κύτταρα HeLa εκτιμήθηκε και με κλασική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πυρηνικών ή κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων, την οποία ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα (17). Συνοπτικά, παράχθηκαν πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα από ΕΚΣΑ στα οποία δεν είχε ή είχε γίνει επίδραση με polyI:C/LPS με το NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Scientific), ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (Millipore). Η ανοσοαποτύπωση έγινε με ειδικά αντισώματα ή αντισώματα ισοτυπικούς-μάρτυρες τα οποία προστέθηκαν σε 1% άπαχο γάλα σε TBS/0.1% Tween-20 για 2-ώρες, και ακολούθησε επώαση για 1-ώρα με τα κατάλληλα δεύτερα αντισώματα που ήταν συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση. Η παραγωγή σήματος ανιχνεύθηκε με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα CDP-Star (Roche).

**Υπολογισμός της παραγωγής ιντερφερονών.** Η σηματοδότηση μέσω του TLR3 έχει συσχετισθεί ισχυρά με την επαγωγή της έκφρασης μορίων ιντερφερονών. Η παραγωγή ιντερφερονών σαν απόκριση στην διέγερση των TLR μελετήθηκε τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών σε ΕΚΣΑ ή σε κύτταρα HeLa στα οποία δεν είχε γίνει επίδραση ή είχε γίνει επίδραση με polyI:C ή LPS. Η έκφραση των mRNAs των IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  και IFN $\gamma$  εκτιμήθηκε με ποσοτική αληθινού-χρόνου PCR χρησιμοποιώντας τα ειδικά εμπορικά διαθέσιμα TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Η έκκριση των αντίστοιχων ιντερφερονών μελετήθηκε σε ελεύθερα-κυττάρων υπερκείμενα από καλλιεργημένα ΕΚΣΑ ή κύτταρα HeLa στα οποία δεν είχε γίνει επίδραση ή είχε γίνει επίδραση με polyI:C ή LPS με ειδικές εμπορικά διαθέσιμες ανοσοενζυμικές μεθόδους στερεάς φάσεις (enzyme-linked immunosorbent assays,

ELISA), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν στο τέλος του διαστήματος καλλιέργειας και φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έως ότου ελεγχθούν.

**Αναστολή της δράσης των ιντερφερονών.** Η εμπλοκή των ιντερφερονών στη μεσολαβούμενη από τον TLR3 ρύθμιση της έκφρασης των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB εκτιμήθηκε με την προσθήκη ειδικών αδρανοποιητικών αντισωμάτων έναντι της IFN $\alpha$  (5 $\mu\text{g/ml}$ ), της IFN $\beta$  (10 $\mu\text{g/ml}$ ), της IFN $\gamma$  (5 $\mu\text{g/ml}$ ) ή του κοινού υποδοχέα των IFN $\alpha/\beta$  (5 $\mu\text{g/ml}$ ) 30-λεπτά πριν την επίδραση με το polyI:C.

**Στατιστική ανάλυση.** Η στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη μη-παραμετρική ανάλυση Mann-Whitney, χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad-Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Αναφέρονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

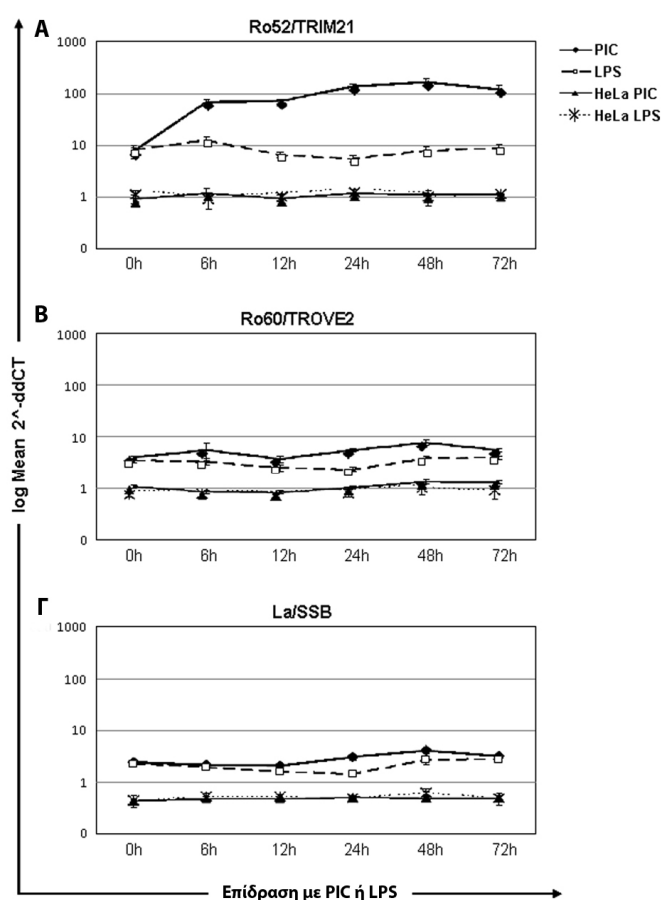
## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

**Η παρατεταμένη διέγερση του TLR3 οδηγεί ένα σημαντικό ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων σε αποπτωτικό θάνατο μέσω ανοικίας**

Σε συνάρτηση με προηγούμενα δεδομένα (6), η παρατεταμένη επίδραση με polyI:C οδήγησε τα ΕΚΣΑ σε προκαλούμενο από αποκόλληση αποπτωτικό θάνατο ή ανοικία. Το φαινόμενο αυτό ήταν εμφανές από τις 24 ώρες επίδρασης και έφτασε περίπου σε 30-40% απώλειας κυττάρων στις 72 ώρες επίδρασης. Αντίθετα, η επίδραση με LPS δεν προκάλεσε ορατή αποκόλληση των κυττάρων και τον αποπτωτικό θάνατο που ακολουθεί.

**Η επίδραση με polyI:C επάγει μια αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 σε δύο βήματα στα ΕΚΣΑ, αλλά όχι σε κύτταρα HeLa.**

Η διέγερση του TLR3 για διάφορες χρονικές περιόδους (6, 12, 24, 48, 72 ώρες) προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21, η οποία ήταν άμεσα εμφανής από τις 6 ώρες επίδρασης [μέσος όρος αύξησης±τυπικό σφάλμα (ΤΣ): 12.07±3.12, p<0.0001] (Εικόνα-1Α). Η έκφραση αυτή παρέμενε σχεδόν ίδια μέχρι τις 12 έως 24 ώρες και την ακολούθησε μία δεύτερη αύξηση η οποία κορυφώθηκε στις 48 ώρες (μέσος όρος αύξησης ±ΤΣ: 2.46±0.27, p<0.0001). Ωστόσο, η επίδραση με polyI:C βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα mRNA των Ro60/TROVE2 και La/SSB. Η έκφραση αυτών αυξήθηκε ελαφρά, αλλά στατιστικά σημαντικά, έπειτα από 48 ώρες επίδρασης (μέσος όρος αύξησης±ΤΣ: 2.00±0.23, p=0.0002 και 1.70±0.12, p=0.0014 για τα mRNAs της Ro60/TROVE2 και της La/SSB, αντίστοιχα) (Εικόνα-1B, C). Τα επίπεδα έκφρασης των mRNAs των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, όπως και το μοτίβο επαγωγής της αύξησής τους μετά από επίδραση με polyI:C, βρέθηκε ότι δεν διαφέρουν μεταξύ των σειρών ΕΚΣΑ που έχουν αναπτυχθεί από βιοψίες ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren και από μάρτυρες που δεν διαγνώστηκαν με σύνδρομο Sjögren και δε συσχετίστηκε με την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι οποιασδήποτε από αυτές τις πρωτεΐνες (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται). Από την άλλη πλευρά, η επίδραση με LPS, το οποίο είναι ο συνδέτης του TLR4, δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των mRNAs των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB από τα ΕΚΣΑ. Σε αντίθεση με τα ΕΚΣΑ, η επίδραση με polyI:C ή LPS δεν βρέθηκε να επηρεάζει την έκφραση των mRNAs των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB από νεοπλασματικά κύτταρα HeLa (Εικόνα-1).



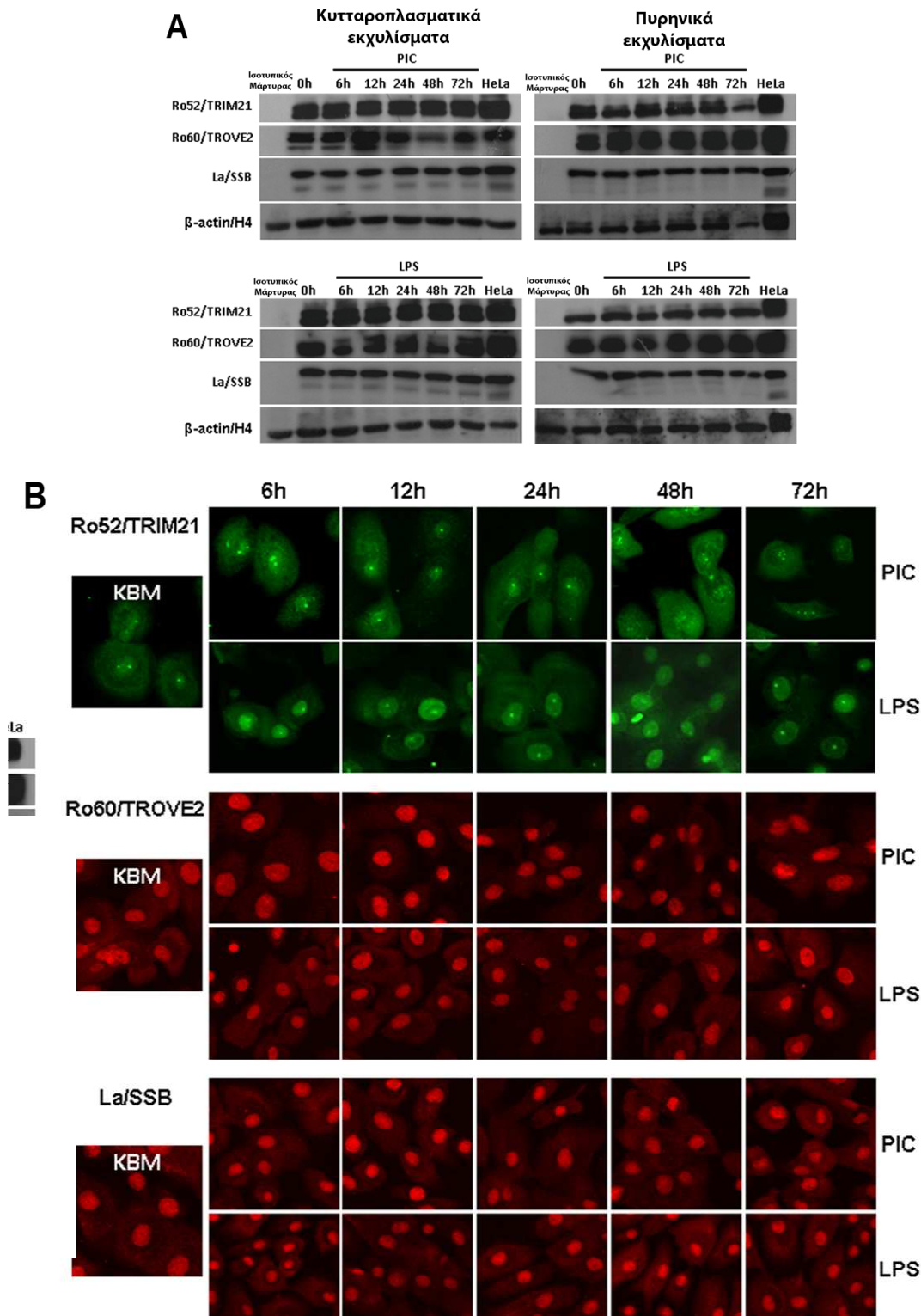
**Εικόνα 1.** Μέσος όρος αύξησης της έκφρασης mRNA μετά από επίδραση με polyI:C (PIC) ή LPS σε ΕΚΣΑ ή κύτταρα HeLa. **Α.** Στα ΕΚΣΑ, η αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 ήταν εμφανής από τις 6 ώρες της επίδρασης με polyI:C, παρέμεινε σταθερή έως τις 12 με 24 ώρες και αυξήθηκε 2.5 φορές στις 48 ώρες (έντονη συνεχής γραμμή). Το LPS δεν επηρέασε την έκφραση του mRNA της Ro52/TRIM21 (διακεκομμένη γραμμή). Ούτε το polyI:C (λεπτή συνεχής γραμμή) ούτε το LPS (γραμμή σχηματισμένη με κουκίδες) επηρέασε την έκφραση του mRNA της Ro52/TRIM21 από τα κύτταρα HeLa **Β.** Η επίδραση με polyI:C σε ΕΚΣΑ οδήγησε σε μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική, αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro60/TROVE2 στις 48 ώρες (έντονη συνεχής γραμμή), ενώ το LPS δεν είχε καμία επίδραση (ασυνεχής γραμμή). Η έκφραση του mRNA της Ro60/TROVE2 σε κύτταρα HeLa δεν επηρεάστηκε από την επίδραση με polyI:C (λεπτή συνεχής γραμμή) ή LPS (γραμμή σχηματισμένη με κουκίδες). **Γ.** Ομοίως, η επίδραση με polyI:C σε ΕΚΣΑ προκάλεσε μια μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική, αύξηση της έκφρασης του mRNA της La/SSB στις 48 ώρες (έντονη συνεχής γραμμή), ενώ το LPS δεν την επηρέασε (ασυνεχής γραμμή). Σε κύτταρα HeLa, τόσο το polyI:C (λεπτή συνεχής γραμμή) όσο και το LPS (σχηματισμένη με κουκίδες) δεν επηρέασαν την έκφραση του mRNA της La/SSB. Τα Τυπικά Σφάλματα είναι αντιπροσωπευτικά και των 22 σειρών ΕΚΣΑ και, αντίστοιχα, 3 ανεξάρτητων πειραμάτων σε κύτταρα HeLa.

**Η επίδραση με polyI:C επάγει την ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στον πυρήνα των ΕΚΣΑ, αλλά όχι στα κύτταρα HeLa.**

Η επίδραση με polyI:C δεν βρέθηκε να επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB στα ΕΚΣΑ, όπως φαίνεται από πειράματα ανοσοαποτύπωσης και συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνα-2). Ωστόσο, η επίδραση με polyI:C οδήγησε σε μια καθυστερημένη (στις 48 και 72 ώρες) πυρηνική ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στα ΕΚΣΑ. Η συνεστιακή μικροσκοπία φανέρωσε μια

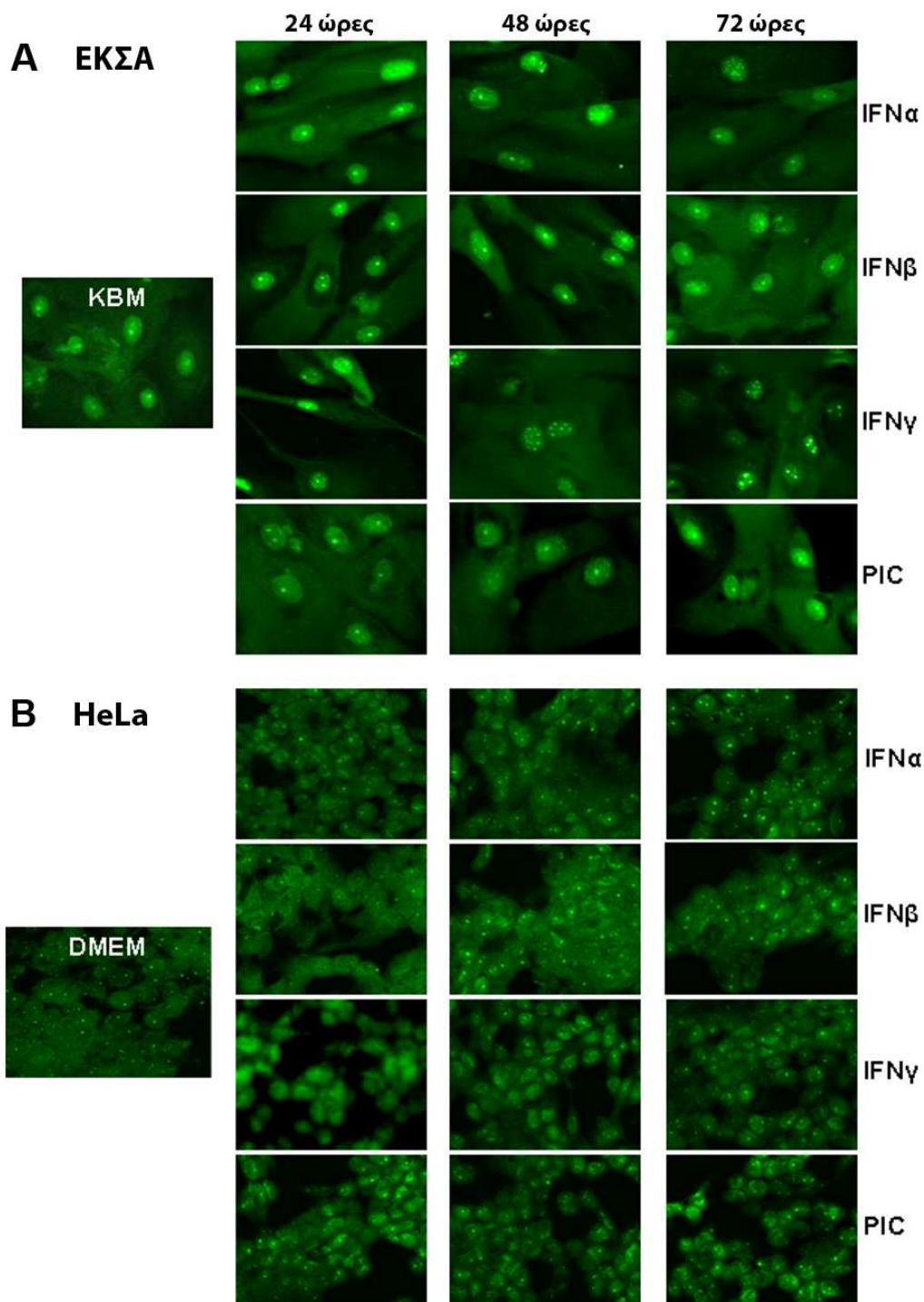
ασθενή κυτταροπλασματική και μία ισχυρή πυρηνική χρώση της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 σε ανεπηρέαστα κύτταρα. Αυτή η πυρηνική χρώση της Ro52/TRIM21 εντοπιζόταν σε μία έως τρεις πυρηνικές κουκίδες, ένα πρότυπο που προσομοιάζει σε χρώση του πυρηνίσκου. Αυτό το μοτίβο έκφρασης παρέμεινε ίδιο κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών της επίδρασης με polyI:C, ενώ άλλαξε στις πιο μακρόχρονες επιδράσεις, μετά τις 48 ώρες. Στις 48 και 72 ώρες, το πυρηνισκικού τύπου πρότυπο έκφρασης της Ro52/TRIM21 άλλαξε σε αρκετές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα (Εικόνα-2B). Η επίδραση με LPS δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση ή την κατανομή των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB (Εικόνα-2B). Όπως παρατηρήθηκε και στο επίπεδο του mRNA, οι σειρές ΕΚΣΑ που προέρχονται από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και μάρτυρες είχαν παρόμοια απόκριση. Η διέγερση του TLR3 με συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη βέλτιστη (0.5-μg/ml polyI:C) ή ίσες με τη βέλτιστη (5-μg/ml polyI:C) (6) είχαν το ίδιο αποτέλεσμα στην έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται).

Ούτε η επίδραση με polyI:C ούτε αυτή με LPS είχαν κάποια επίδραση στην πρωτεϊνική έκφραση και κατανομή των Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB στα κύτταρα HeLa. Ωστόσο, το μοτίβο συστατικής έκφρασης της Ro52/TRIM21 διέφερε από το αντίστοιχο στα ΕΚΣΑ. Η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21 εντοπιζόταν σε δομές πυρηνισκικού τύπου, αλλά κυρίως παρέμενε στο κυτταρόπλασμα και δεν επηρεαζόταν από τη σηματοδότηση μέσω TLR (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται και Εικόνα-3B).



**Εικόνα 2.** Η επίδραση με polyI:C δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 ή La/SSB, αλλά επάγει μια καθυστερημένη ανακατανομή της Ro52/TRIM21 στον πυρήνα των ΕΚΣΑ. **A.** Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western δεν αποκάλυψε αξιοσημείωτες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB είτε σε κυτταροπλασματικά (αριστερή πλευρά) είτε σε πυρηνικά (δεξιά πλευρά) εκχυλίσματα από ΕΚΣΑ υπό την επίδραση με polyI:C (PIC, άνω πλαίσιο) ή LPS (κάτω πλαίσιο). Η β-ακτίνη και η ιστόνη-H4 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες φορτώματος για τα κυτταροπλασματικά και τα πυρηνικά εκχυλίσματα, αντίστοιχα. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα 7 σειρών ΕΚΣΑ. **B.** Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η επίδραση με polyI:C επάγει την πυρηνική ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στα ΕΚΣΑ. Σε κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση, η Ro52/TRIM21 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και σε μία έως δύο κουκίδες, ένα πρότυπο που προσομοιάζει σε χρώση του πυρηνίσκου. Το πρότυπο αυτό πυρηνικής έκφρασης παρέμεινε σταθερό έως τις 24 ώρες, ενώ στις 48 και 72 ώρες η πρωτεΐνη ανακατανομήταν σε αρκετές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα. Η επίδραση με LPS δεν επηρέαζε την έκφραση και την κατανομή των πρωτεϊνών Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα 13 σειρών ΕΚΣΑ (8 από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και 5 από μάρτυρες).





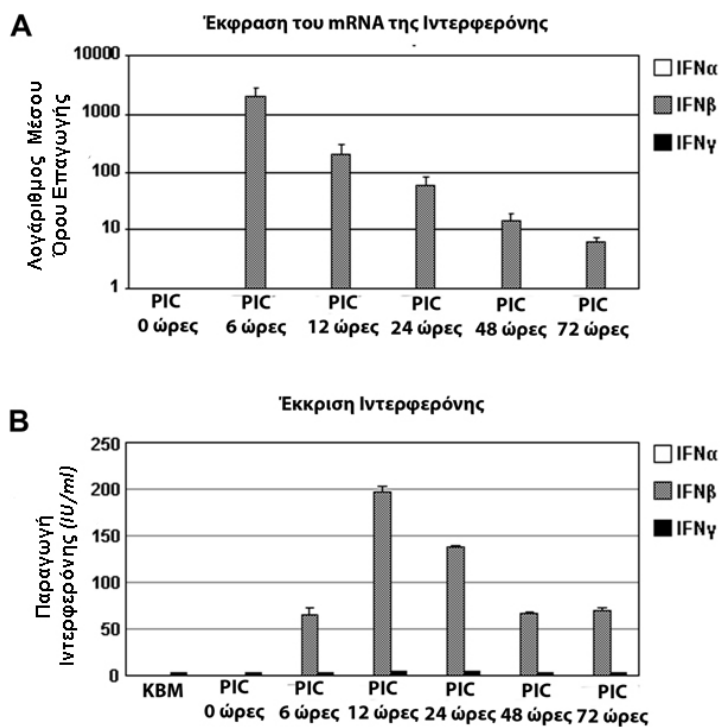
**Εικόνα 3.** Επίδραση με IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  ή IFN $\gamma$  επάγει την πυρηνική ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στα EKSΑ, αλλά όχι σε κύτταρα HeLa. **A.** Η επίδραση με ιντερφερόνη σε EKSΑ προκάλεσε την πυρηνική ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 από ένα πρότυπο που προσομοιάζει σε χρώση του πυρηνίσκου σε αρκετές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα από τις 24 ώρες. Παρατίθεται αντιπροσωπευτικό παράδειγμα από 3 σειρές EKSΑ. **B.** Η επίδραση με IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  ή IFN $\gamma$  δεν άλλαξε σημαντικά την έκφραση της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 σε κύτταρα HeLa. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές 3 διαφορετικών πειραμάτων.

**Η μεσολαβούμενη από τη δράση του polyI:C καθυστερημένη αύξηση της έκφρασης του mRNA της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 και η ανακατανομή της πρωτεΐνης στον πυρήνα στα ΕΚΣΑ μεσολαβούνται κυρίως από την παραγωγή IFNβ**

Το γεγονός ότι η δεύτερη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 καθώς και η πυρηνική της ανακατανομή στα ΕΚΣΑ που συμβαίνουν υπό την επίδραση με polyI:C είναι καθυστερημένα φαινόμενα, υποδηλώνει ότι μεσολαβούνται από κάποιον παράγοντα που παράγεται σε επόμενο στάδιο της σηματοδότησης μέσω TLR3. Λαμβάνοντας υπόψιν το ότι τα φαινόμενα αυτά δεν συνέβαιναν μετά από επίδραση με LPS, η οποία κυρίως οδηγεί στην παραγωγή TNFα, και ότι οι ιντερφερόνες, που είναι οι κύριες κυτταροκίνες που επάγονται έπειτα από διέγερση του TLR3, είναι ισχυροί επαγωγείς της έκφρασης της Ro52/TRIM21, εξετάσαμε τη συμμετοχή των ιντερφερονών στην επαγόμενη από το polyI:C αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 και την ανακατανομή της πρωτεΐνης. Όπως αναμενόταν, η εξωγενής χορήγηση των ιντερφερονών τύπου-I και II, όπως η IFNα, η IFNβ και η IFNγ, οδήγησε γρήγορα σε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της Ro52/TRIM21, φαινόμενο που παρατηρήθηκε από τις 6 ώρες επίδρασης και παρέμεινε εν πολλοίς σταθερό από εκεί και πέρα (μέσος όρος αύξησης στις 6 ώρες σε σχέση με τα ΕΚΣΑ στα οποία είχε γίνει επίδραση±ΤΣ: 3.0±0.05, 7.7±1.1 και 7.0±0.9 για την IFNα, την IFNβ και την IFNγ, αντίστοιχα). Παρόμοια, η επίδραση στα κύτταρα HeLa με IFNα, IFNβ ή IFNγ για 6 hrs οδήγησε σε αύξηση κατά 12.6±0.05, 10.7±1.2 και 5.8±1.15 φορές της συστατικής έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21, η οποία παρέμεινε ίδια από το σημείο αυτό κι έπειτα. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση της IFNα, της IFNβ ή της IFNγ σε ΕΚΣΑ, αλλά όχι σε κύτταρα HeLa, προκάλεσε την πυρηνική ανακατανομή της Ro52/TRIM21 από ένα

μοτίβο που ομοιάζει σε πυρηνισκική χρώση σε πολλαπλές αδρές κουκίδες, φαινόμενο το οποίο παρατηρούταν από τις 24-ώρες επίδρασης (Εικόνα-3).

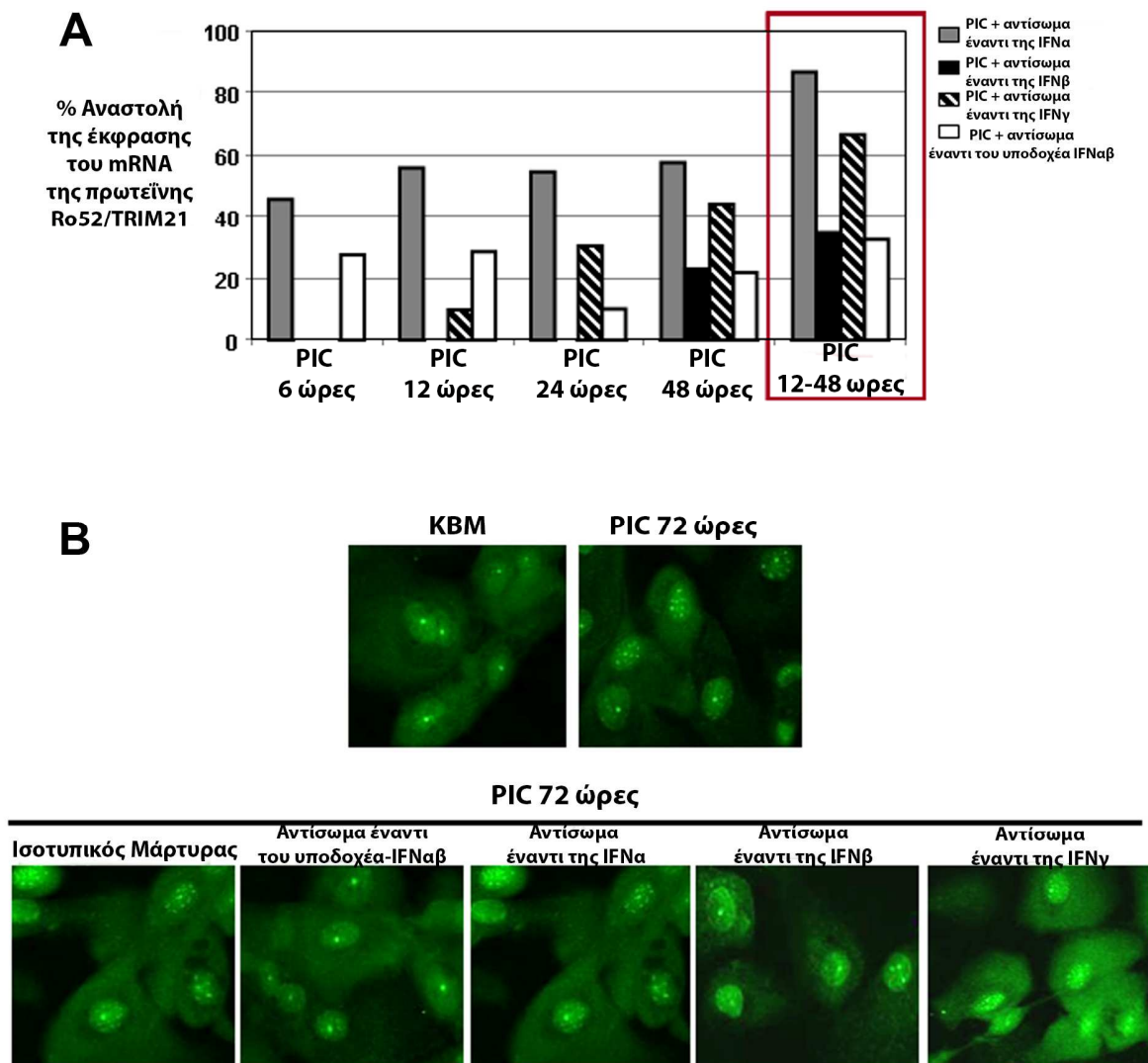
Ακολούθως, εξετάσαμε την έκφραση των ιντερφερονών σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ΕΚΣΑ στα οποία δεν είχε γίνει κάποια επίδραση και σε ΕΚΣΑ στα οποία επιδράσαμε με polyI:C. Η έκφραση του mRNA της IFN $\beta$ , αλλά όχι του mRNA της IFN $\alpha$  ή της IFN $\gamma$ , αυξήθηκε σε ΕΚΣΑ στα οποία είχαμε επιδράσει με polyI:C. Συγκεκριμένα, το mRNA της IFN $\beta$  αυξήθηκε δραματικά στις 6-ώρες της επίδρασης με polyI:C, όχι όμως και έπειτα από επίδραση με LPS (μέσος όρος αύξησης $\pm$ ΤΣ: 1972 $\pm$ 797) και μειώθηκε από το σημείο αυτό και μετά (Εικόνα-4A). Σε συμφωνία με την αύξηση των επιπέδων mRNA, ανιχνεύθηκε έκκριση της IFN $\beta$  σε υπερκείμενα καλλιεργημένων ΕΚΣΑ στα οποία είχε γίνει επίδραση με polyI:C. Η έκκριση IFN $\beta$  ανιχνεύθηκε από τις 6 ώρες επίδρασης και κορυφώθηκε στις 12 ώρες (Εικόνα-4B), υποδηλώνοντας ότι η IFN $\beta$  μπορεί να εμπλέκεται στη δεύτερη αύξηση του mRNA και την πυρηνική ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στα ΕΚΣΑ. Δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή της IFN $\alpha$ , ενώ οι σταθερές, αλλά χαμηλές ποσότητες IFN $\gamma$  που βρέθηκαν στα υπερκείμενα μη επηρεασμένων ΕΚΣΑ και ΕΚΣΑ στα οποία είχε γίνει επίδραση με polyI:C οφείλονταν στο καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε, όπως φαίνεται από τη μη ανίχνευση mRNA και την ύπαρξη παρόμοιων επιπέδων IFN $\gamma$  σε μη χρησιμοποιημένο καλλιεργητικό υλικό (Εικόνα-4B).



**Εικόνα 4.** Παραγωγή ιντερφερονών (IFN) από ΕΚΣΑ. **Α.** Τα ιστογράμματα δείχνουν την παραγωγή mRNA των IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  και IFN $\gamma$  από ΕΚΣΑ στα οποία δεν έχει γίνει καμία επίδραση ή έχει γίνει επίδραση με polyI:C (PIC). Η επίδραση με polyI:C αύξησε γρήγορα την έκφραση του mRNA της IFN $\beta$ , αλλά όχι της IFN $\alpha$  ή της IFN $\gamma$ , σε ΕΚΣΑ στις 6-ώρες και η έκφραση μειώθηκε από το σημείο αυτό και μετά. **Β.** Ιστόγραμμα που δείχνει την έκκριση ιντερφερονών από ΕΚΣΑ στα οποία δεν έχει γίνει καμία επίδραση ή έχει γίνει επίδραση με polyI:C. Η επίδραση με polyI:C μπορούσε να επάγει την έκκριση IFN $\beta$  από τις 6 ώρες με την υψηλότερη έκφραση να είναι στις 12-ώρες. Πολύ χαμηλά ποσοστά IFN $\gamma$  ανιχνεύθηκαν σε υπερκείμενα από ΕΚΣΑ στα οποία δεν έχει γίνει καμία επίδραση (0 ώρες), σε υπερκείμενα από ΕΚΣΑ στα οποία έχει γίνει επίδραση με polyI:C και σε καλλιεργητικό μέσο το οποίο δεν είχε χρησιμοποιηθεί (KBM), ενώ δεν ανιχνεύθηκε IFN $\alpha$ . Τα Τυπικά Σφάλματα αντιστοιχούν σε αποτελέσματα από 3 σειρές ΕΚΣΑ.

Ούτε η επίδραση με polyI:C, ούτε με LPS βρέθηκαν να επάγουν την έκφραση του mRNA των ιντερφερονών ή την έκκρισή τους σε κύτταρα HeLa (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται). Ακόμα, ελέγχθηκε η έκκριση των IL-2, IL-4, IL-7 και IL-17 από επιθηλιακά κύτταρα στα οποία είτε δεν είχε γίνει κάποια επίδραση είτε είχε γίνει επίδραση με polyI:C ή LPS. Όπως αναμενόταν, τόσο τα ΕΚΣΑ όσο και τα κύτταρα HeLa δεν βρέθηκαν να εκκρίνουν IL-2, IL-4 και IL-17 απουσία ή παρουσία επίδρασης. Σε συμφωνία και με προηγούμενα δεδομένα (18), το polyI:C βρέθηκε να επάγει την έκκριση IL-7 από τις 12 ώρες επίδρασης τόσο σε ΕΚΣΑ όσο και σε κύτταρα HeLa με το φαινόμενο να κορυφώνεται στις 72 ώρες επίδρασης (20-φορές και 10-φορές αύξηση σε σχέση με τη επηρεασμένα κύτταρα, αντίστοιχα). Όπως και με το polyI:C, η επίδραση με LPS προκάλεσε μία 10-πλάσια αύξηση της έκκρισης της IL-7 από κύτταρα HeLa αλλά δεν οδήγησε στην έκκρισή της από ΕΚΣΑ.

Ο ρόλος των ιντερφερονών στην επαγωγή της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 και της ανακατανομή της πρωτεΐνης στα ΕΚΣΑ επιβεβαιώθηκε επιπλέον με την παρεμπόδιση κάθε ιντερφερόνης (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  ή IFN $\gamma$ ) ή του κοινού υποδοχέα των ιντερφερονών τύπου-I (υποδοχέας-IFN $\alpha\beta$ ) με ειδικά αδρανοποιητικά αντισώματα ή τους ισοτυπικούς τους μάρτυρες. Από αυτά, τα αντισώματα έναντι της IFN $\beta$  ή του κοινού υποδοχέα-IFN $\alpha\beta$  βρέθηκαν να αναστέλλουν σημαντικά την προκαλούμενη από το polyI:C αύξηση του mRNA της Ro52/TRIM21 (αναστολή κατά 57,62% και 44,11% στις 48 ώρες επίδρασης, αντίστοιχα) ή την πυρηνική της ανακατανομή στα ΕΚΣΑ (Εικόνα-5). Πιο ειδικά, τα αδρανοποιητικά αντισώματα έναντι της IFN $\beta$  και του κοινού υποδοχέα-IFN $\alpha\beta$  ανέστειλαν κατά 66.2% και 86.5%, αντίστοιχα, τη δεύτερη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 που προκαλείται από το polyI:C (12-48 ώρες) (Εικόνα-5B).



**Εικόνα 5.** Η παρεμπόδιση των ιντερφερονών με ειδικά αδρανοποιητικά αντισώματα έδειξε ότι η προκαλούμενη από το polyI:C αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 και η ανακατανομή της πρωτεΐνης μεσολαβείται σε σημαντικό βαθμό από την IFNβ. **A.** Ιστόγραμμα που δείχνει την αναστολή της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 από ειδικά αδρανοποιητικά αντισώματα έναντι της IFNα, της IFNβ, της IFNγ ή του κοινού υποδοχέα-IFNαβ (IFNαβR) σε ΕΚΣΑ στα οποία δεν έχει γίνει καμία επίδραση ή έχει γίνει επίδραση με polyI:C (PIC). Τα αντισώματα έναντι της IFNβ και του κοινού υποδοχέα-IFNαβ ανέστειλαν σημαντικά την προκαλούμενη από το polyI:C αύξηση του mRNA, επίδραση η οποία είναι πιο εμφανής στην καθυστερημένη αύξηση (12-48 ώρες, κόκκινο περίγραμμα). **B.** Παρεμπόδιση της προκαλούμενης από polyI:C ανακατανομής της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 από αδρανοποιητικά αντισώματα έναντι της IFNα, της IFNβ, της IFNγ ή του κοινού υποδοχέα IFNαβ. Τα αντισώματα έναντι της IFNβ και του κοινού υποδοχέα IFNαβ, αλλά όχι έναντι της IFNα ή της IFNγ, παρεμποδίζουν την προκαλούμενη από polyI:C πυρηνική ανακατανομή της Ro52/TRIM21 στα ΕΚΣΑ. Παρουσιάζονται εικόνες των πειραμάτων αναστολής σε ΕΚΣΑ στα οποία έχει γίνει επίδραση με polyI:C για 72 ώρες. Οι εικόνες αυτές είναι αντιπροσωπευτικές 3 ξεχωριστών πειραμάτων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η σηματοδότηση μέσω TLR3 σε μη νεοπλασματικά ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από βιοψίες σιελογόνων αδένων (ΕΚΣΑ) οδηγεί σε ισχυρή έκφραση του αυτοαντιγόνου Ro52/TRIM21 και σε μία χαμηλή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση, των υπόλοιπων αυτοαντιγόνων του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου Ro/La hYRNA. Η αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 προκλήθηκε από τη σηματοδότηση μέσω του TLR3, αλλά όχι μέσω του TLR4, στα ΕΚΣΑ, σε δύο φάσεις: μία νωρίτερη στις 6 έως 12 ώρες, και μία καθυστερημένη, στις 24 με 48 ώρες, η οποία μεσολαβείτο κυρίως από το μονοπάτι των ιντερφερονών τύπου-I. Είναι ενδιαφέρον ότι η καθυστερημένη αύξηση της έκφρασης του mRNA της Ro52/TRIM21 στα ΕΚΣΑ συνοδεύτηκε από μία πυρηνική ανακατανομή της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 από ένα πρότυπο που προσομοιάζει σε χρώση του πυρηνίσκου σε αρκετές κουκίδες που εκτείνονται σε όλο το εύρος του πυρήνα. Η παρεμπόδιση της IFN $\beta$  οδήγησε σε μερική, αλλά σημαντική, αναστολή και των δύο καθυστερημένων φαινομένων, ενώ η σηματοδότηση μέσω του TLR3 στα ΕΚΣΑ συσχετίστηκε με την έκκριση IFN $\beta$ , αλλά όχι της IFN $\alpha$  ή της IFN $\gamma$ . Η πρωτεΐνη Ro52/TRIM21, με τη δυνατότητα δράσης της σαν E3 λιγάση της ουβικιτίνης με την πρωτεΐνη-στόχο (19, 20) μεσολαβώντας στην ουβικιτινυλίωση και την επακόλουθη αποδόμηση των ρυθμιστικών παραγόντων των ιντερφερονών (IRFs 3, 5, 7 και 8) στο πρωτεάσωμα, έχει εμπλακεί στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω των TLR3, TLR7 και TLR9 και την επακόλουθη παραγωγή ιντερφερονών τύπου-I (10, 11). Από την άλλη μεριά, διάφορα προφλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως η έκθεση σε IFN $\alpha$  ή νιτρικό οξύ, έχουν περιγραφεί ότι επάγουν την έκφραση της Ro52/TRIM21 και τη μετατόπισή της στον πυρήνα (13, 21), υποδηλώνοντας ότι, υπό τη δράση σημάτων κινδύνου, η Ro52/TRIM21 δύναται να

ουβικιτινυλιώνει πυρηνικά υποστρώματα. Ωστόσο, η σημασία της πυρηνικής εντόπισης και ανακατανομής της πρωτεΐνης Ro52/TRIM21 στα μη νεοπλασματικά ΕΚΣΑ, που μπορεί να περιλαμβάνει υποστρώματά της ή πυρηνικά στοιχεία με τα οποία μπορεί να αλληλεπιδρά, πρέπει να διαλευκανθεί. Στα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα HeLa, η απόκριση στη διέγερση του TLR3 και το μοτίβο έκφρασης των μορίων της Ro52/TRIM21 βρέθηκαν να διαφέρουν από τα αντίστοιχα στα ΕΚΣΑ, υποδηλώνοντας ότι λειτουργούν διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης σε νεοπλασματικά και μη νεοπλασματικά κύτταρα.

Τα ακριβή αιτιοπαθογενετικά μονοπάτια του συνδρόμου Sjögren παραμένουν ασαφή. Αν και η ύπαρξη ενός λοιμογόνου παράγοντα έχει ενοχοποιηθεί επί μακρῶ ως ο αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης του συνδρόμου Sjögren, καμία μελέτη δεν έχει δώσει αδιαμφισβήτητα αποτελέσματα μέχρι σήμερα. Τα επιθηλιακά κύτταρα θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες στην παθογένεια της νόσου (8). Πράγματι, κλινικές παρατηρήσεις κατέδειξαν ότι η εμπλοκή οργάνων, πέραν των εξωκρινῶν αδένων οφείλεται κυρίως σε μαζικές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις που περιβάλλουν τις επιθηλιακές δομές (22). Προσεκτική εξέταση των σιελογόνων αδένων φανερώνει ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα τα οποία περιβάλλουν τους πόρους των σιελογόνων αδένων. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι επίσης ενεργοποιημένα καθώς εκφράζουν ρυθμιστικές και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες, όπως επίσης και συνδιεγερτικά και επικουρικά μόρια τα οποία μπορούν να εκκινήσουν αυτοάνοσες αποκρίσεις. Επιπλέον, μελέτες σε μακρόχρονα καλλιεργημένα μη νεοπλασματικά ΕΚΣΑ έχουν δείξει ότι τα τελευταία είναι πλήρως εξοπλισμένα με μόρια που είναι απαραίτητα για την αντιγονική παρουσίαση, τη μετάδοση ενεργοποιητικών σημάτων σε T κύτταρα, τη στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και τη διαίωσιση των ανοσολογικών



αποκρίσεων. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι τα ΕΚΣΑ εκφράζουν συστατικά υψηλά επίπεδα διάφορων υποδοχέων Toll-like. Μεταξύ αυτών, η συστατική έκφραση του TLR3 βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένη σε καλλιεργημένα ΕΚΣΑ, σε σχέση με διάφορους άλλους τύπους κυττάρων, μεταξύ των οποίων μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (7). Ένας επιπλέον κυρίαρχος ρόλος του TLR3 στην παθογένεια της αυτοάνοσης σιαλαδενίτιδας, έχει προταθεί μετά από μελέτες που διεξήχθησαν σε ποντίκια. Έτσι, η χορήγηση polyI:C σε ποντίκια που είναι επιρρεπή στο να αναπτύξουν μία ασθένεια που ομοιάζει στο σύνδρομο Sjögren καταλήγει σε μία αντιστρεπτή, πλην όμως σημαντική, απώλεια της λειτουργίας των σιελογόνων αδένων τους η οποία συνοδεύεται από μία αύξηση διάφορων γονιδίων που αποκρίνονται σε ιντερφερόνες τύπου-I *in situ* (23). Επόμενες μελέτες της ίδιας ομάδας ανέφεραν ότι η χορήγηση polyI:C με ένεση σε ποντίκια NZB/W-F1 προκάλεσε αύξηση της παραγωγής διάφορων κυτταροκινών, την οποία ακολούθησε μια ταχεία στρατολόγηση δενδριτικών και NK κυττάρων και αργότερα Β κυττάρων στους υπογνάθιους αδένες τους (24). Τέλος, πειράματα στα οποία έγινε επίδραση με polyI:C σε διάφορα στελέχη ποντικών στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο *trim21* έδειξαν ότι μια συνδυασμένη δράση των IFNs τύπου-I και της IL-6 συμβάλει στην υπολειτουργία των σιελογόνων αδένων (25).

Όπως περιγράφεται στις πρώτες γραμμές της παρούσας μελέτης, η κύρια θέση παραγωγής αυτοαντισωμάτων είναι ο προσβεβλημένος επιθηλιακός ιστός. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει αυξημένο ρυθμό απόπτωσης στα πορικά και εκκριτικά αδενικά επιθήλια των ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren (26-29). Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος των επιθηλίων των ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren αντιπροσωπεύει έναν πιθανό μηχανισμό με τον οποίο πυρηνικά αντιγόνα, όπως τα αυτοαντιγόνα Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB, παρουσιάζονται στο

ανοσοποιητικό σύστημα με τρόπο ο οποίος επάγει ανοσολογικές αποκρίσεις (30). Κατά την πρόιμη απόπτωση, η La/SSB έχει δειχθεί ότι ανακατανέμεται διάχυτα στο κυτταρόπλασμα. Σε επόμενα στάδια, έχει δειχθεί ότι τα αυτοαντιγόνα Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La/SSB εντοπίζονται κυρίως σε αποπτωτικά σωματίδια και αποπτωτικές φυσαλίδες (31). Ομοίως, η απόπτωση είναι μια διαδικασία που θα μπορούσε να δημιουργήσει αυτοαντιγόνα που παρουσιάζονται σε αυτοδραστικά T κύτταρα. Ο ρόλος της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων στην επαγωγή του συνδρόμου Sjögren έχει δειχθεί πρόσφατα *in vivo* σε ένα πειραματικό πρότυπο ποντικού. Στο πρότυπο αυτό, η αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της IκB-ζ στα επιθηλιακά κύτταρα δακρυϊκών αδένων τα οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα απόπτωσης και στην ανάπτυξη μιας φλεγμονώδους βλάβης παρόμοιας με αυτή που παρατηρείται στο σύνδρομο Sjögren, η οποία σχετιζόταν με υψηλούς τίτλους αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB αντισωμάτων στον ορό. Η χορήγηση αναστολέων των κασπασών ανέστειλε τη διαδικασία, δείχνοντας, τελικά το σημαντικό ρόλο της απόπτωσης στην επαγωγή της νόσου (32).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι ο παράγοντας που μεσολαβεί την έκφραση των αυτοαντιγόνων στα ΕΚΣΑ είναι η IFNβ. Οι ιντερφερόνες τύπου-I και II έχουν εμπλακεί ισχυρά στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου Sjögren. Ειδικότερα, εκτός από την αρχική περιγραφή των αυξημένων επιπέδων των κυκλοφορούντων ιντερφερονών τύπου-I σε ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren και ΣΕΛ (33), ολόένα αυξανόμενα δεδομένα που παρουσιάζονται τα τελευταία χρόνια υποδεικνύουν ότι το ενεργοποιημένο μονοπάτι των ιντερφερονών τύπου-I παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου Sjögren, καθώς τα επαγόμενα από ιντερφερόνες τύπου-I γονίδια υπερεκφράζονται στους ΕΣΑ και τα περιφερικά λεμφοκύτταρα των ασθενών που

πάσχουν από σύνδρομο Sjögren (34). Επιπρόσθετα, η ανίχνευση μεγάλου αριθμού πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων που παράγουν IFN $\alpha$  στους ΕΣΑ ασθενών με σύνδρομο Sjögren συγκριτικά με αυτούς των μαρτύρων υπονοεί τη στοχευμένη εγκατάστασή τους εντός του ιστού στόχου (35-37). Σε συμφωνία με αυτό, πρόσφατα ευρήματα από μελέτες σε προσβεβλημένους σιελογόνους αδένες ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren έδειξαν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν τόσο την υπογραφή των ιντερφερονών τύπου-I όσο και την υπογραφή των ιντερφερονών τύπου-II, ενώ τα περιβάλλοντα λεμφοκύτταρα την υπογραφή των ιντερφερονών τύπου-II (38). Με μία ευρύτερη οπτική, τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι κύριες κυτταροκίνες της φυσικής ανοσίας (ιντερφερόνες τύπου-I), οι οποίες μεσολαβούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο έπειτα από την κατάλληλη διέγερση, συνυπάρχουν και πιθανότατα συλλειτουργούν με την ανοσορυθμιστική κυτταροκίνη IFN $\gamma$ , η οποία είναι ο κύριος επαγωγέας των ειδικών αποκρίσεων της επίκτητης ανοσίας στις παθολογικές βλάβες (38). Τα ακριβή αίτια πυροδότησης της παραγωγής ιντερφερονών στους ιστούς των ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Sjögren δεν είναι ακόμα γνωστά. Σε αυτά μπορεί να εμπλέκονται και ενδογενείς συνδέτες. Σε προηγούμενες μελέτες, δείχθηκε ότι αποπτωτικά σώματα σε σύμπλοκο με αντισώματα μπορούν να χρησιμεύσουν ως επαγωγείς των ιντερφερονών τύπου-I (39). Άλλες μελέτες αποκάλυψαν ότι ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία περιέχουν μικρά μόρια RNA (π.χ. hY1-RNA), τα οποία είναι κύριοι στόχοι των αυτοάνοσων αποκρίσεων στο σύνδρομο Sjögren, μπορούν επιπλέον να πυροδοτήσουν την παραγωγή ιντερφερονών μέσω της σύνδεσης των RNA συστατικών τους στον TLR3 ή τον TLR7 (40, 41). Επίσης, θεωρείται ότι η IFN $\gamma$  ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω του TLR3 και τις επακόλουθες αποκρίσεις των ιντερφερονών τύπου-I (42), οι οποίες εν συνεχεία αυξάνουν την παραγωγή αυτοαντιγόνων, την απόπτωση και τελικά την απελευθέρωση αποπτωτικών σωματίων

που είναι πλήρη αυτοαντιγόνων τα οποία θα πυροδοτήσουν επιπλέον τις αποκρίσεις που μεσολαβούνται από τη σηματοδότηση μέσω των TLRs και των ιντερφερονών, δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο και παρουσιάζοντας έναν ακόμα μηχανισμό συνεργασίας των δύο τύπων ιντερφερονών για τη ρύθμιση της ενίσχυσης και της διατήρησης των ανοσολογικών αποκρίσεων που μεσολαβούνται από TLRs (38).

Συνοψίζοντας, η διέγερση του TLR3 στα ΕΚΣΑ προκαλεί μία άμεση και μία έμμεση, εξαρτώμενη από IFN $\beta$ , αύξηση της έκφρασης της Ro52/TRIM21. Με το μηχανισμό αυτό μπορούν να παραχθούν μεγάλες ποσότητες ενδοκυττάρων αυτοαντιγόνων τα οποία γίνονται προσβάσιμα από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της επαγωγής της κυτταρικής απόπτωσης, και τις απελευθέρωσης των αυτοαντιγόνων σε αποπτωτικές φυσαλίδες. Επομένως, τα δεδομένα μας εμπλέκουν τον TLR3, ως το μόριο που βρίσκεται στο σταυροδρόμι της φυσικής με την επίκτητη ανοσία, καθώς η σύνδεσή του δεν παρέχει μόνο σήματα για την παραγωγή ιντερφερόνης, αλλά και για την ενεργό σύνθεση του ενδοκυττάρου αυτοαντιγόνου, το οποίο μπορεί τελικά να εκκινήσει ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστούμε τον Καθηγητή Χαράλαμπο Μ. Μουτσόπουλο, MD, FACP, FRCP ACR-master για την εποικοδομητική συζήτηση και καθοδήγηση και τον Καθηγητή Παθολογοανατομίας Ε. Πατσούρη για τη σημαντική συνεισφορά του στα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43(3):203-48.
2. Routsias JG, Kyriakidis N, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med* 2010;16(1-2):19-26.
3. Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM, et al. Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol* 2000;121(3):551-6.
4. Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1998;41(12):2238-48.
5. Tzioufas AG, Hantoumi I, Polihronis M, Xanthou G, Moutsopoulos HM. Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs). *J Autoimmun* 1999;13(4):429-34.
6. Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun* 2010;35(3):212-8.
7. Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2007;147(3):497-503.
8. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):4-8.
9. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-8.
10. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* 2009;206(8):1661-71.
11. Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S, et al. TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol* 2009;182(6):3782-92.
12. Rhodes DA, Ihrke G, Reinicke AT, Malcherek G, Towey M, Isenberg DA, et al. The 52 000 MW Ro/SS-A autoantigen in Sjogren's syndrome/systemic lupus erythematosus (Ro52) is an interferon-gamma inducible tripartite motif protein associated with membrane proximal structures. *Immunology* 2002;106(2):246-56.
13. Strandberg L, Ambrosi A, Espinosa A, Ottosson L, Eloranta ML, Zhou W, et al. Interferon-alpha induces up-regulation and nuclear translocation of the Ro52 autoantigen as detected by a panel of novel Ro52-specific monoclonal antibodies. *J Clin Immunol* 2008;28(3):220-31.

14. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci* 2002;110(1):21-30.
15. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61(6):554-8.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
17. Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1517-21.
18. Jin JO, Shinohara Y, Yu Q. Innate Immune Signaling Induces Interleukin-7 Production from Salivary Gland Cells and Accelerates the Development of Primary Sjogren's Syndrome in a Mouse Model. *PLoS One* 2013;8(10):e77605.
19. Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K, et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol* 2006;176(10):6277-85.
20. Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(1):415-21.
21. Espinosa A, Oke V, Elfving A, Nyberg F, Covacu R, Wahren-Herlenius M. The autoantigen Ro52 is an E3 ligase resident in the cytoplasm but enters the nucleus upon cellular exposure to nitric oxide. *Exp Cell Res* 2008;314(20):3605-13.
22. Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72(2):162-5.
23. Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura PR, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J Oral Pathol Med* 2009;38(1):42-7.
24. Nandula SR, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjogren's syndrome-like disease. *Oral Dis* 2011;17(8):801-7.
25. Nandula SR, Dey P, Corbin KL, Nunemaker CS, Bagavant H, Deshmukh US. Salivary gland hypofunction induced by activation of innate immunity is dependent on type I interferon signaling. *J Oral Pathol Med* 2013;42(1):66-72.
26. Jimenez F, Aiba-Masago S, Al Hashimi I, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK, et al. Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(3):338-42.
27. Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata KM, Masago R, et al. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;88(2):133-41.
28. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, et al. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997;40(1):87-97.
29. Manganeli P, Quaini F, Andreoli AM, Lagrasta C, Pilato FP, Zuccarelli A, et al. Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1997;24(8):1552-7.

30. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med* 1995;181(4):1557-61.
31. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2002;56(5):456-69.
32. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, et al. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity* 2013;38(3):450-60.
33. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* 1979;301(1):5-8.
34. Mavragani CP, Crow MK. Activation of the type I interferon pathway in primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;35(3):225-31.
35. Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Cajander S, Eloranta ML, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1185-95.
36. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2770-5.
37. Vogelsang P, Brun JG, Oijordsbakken G, Skarstein K, Jonsson R, Appel S. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010;69(6):1235-8.
38. Hall JC, Casciola-Rosen L, Berger AE, Kapsogeorgou EK, Cheadle C, Tzioufas AG, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(43):17609-14.
39. Bave U, Alm GV, Ronnblom L. The combination of apoptotic U937 cells and lupus IgG is a potent IFN-alpha inducer. *J Immunol* 2000;165(6):3519-26.
40. Kelly KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J, et al. "Endogenous adjuvant" activity of the RNA components of lupus autoantigens Sm/RNP and Ro 60. *Arthritis Rheum* 2006;54(5):1557-67.
41. Laurie GW, Glass JD, Ogle RA, Stone CM, Sluss JR, Chen L. "BM180": a novel basement membrane protein with a role in stimulus-secretion coupling by lacrimal acinar cells. *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 1):C1743-50.
42. Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshiba R, et al. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(51):20446-51.

# RNA Recognition Motif (RRM) of La/SSB: The Bridge for Interparticle Spreading of Autoimmune Response to U1-RNP

John G Routsias, Nikolaos Kyriakidis, Michael Latreille, and Athanasios G Tzioufas

Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Athens, Greece

Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by the production of grouped sets of autoantibodies targeting mainly the U1 ribonucleoprotein (RNP) and/or Ro/La RNP particles. Intraparticle diversification of the autoimmune response is believed to occur via epitope spreading. So far, it is not known how the autoimmune response “jumps” from one particle to another. To the extent that the majority of nuclear autoantigens in SLE are RNA binding proteins and major epitopes were previously mapped within their RRM (RNA recognition motifs), conserved sequences within RRM could be involved in the intermolecular and interparticle diversification process of the autoimmune response. We investigated the potential of RRM of the La/SSB autoantigen to induce antibodies that cross-recognize components of the U1-RNP particle and therefore its capacity to produce interparticle epitope spreading. We immunized New Zealand white rabbits with a peptide corresponding to the epitope 145–164 of La/SSB (belonging to the RRM of La/SSB), attached in four copies on a scaffold carrier. Sera were drawn from 20 sera of patients with SLE and anti-U1-RNP antibodies and 26 sera of primary Sjögren syndrome patients with anti-La/SSB antibodies. All sera were evaluated for reactivity against the major epitope of La/SSB (pep349–364), the RNP antigen and the RRM-related epitope of La/SSB (pep145–164). Specific antibodies against pep145–164 were purified with immunoaffinity columns from selected sera. After the immunization of the animals with pep145–164, a specific IgG antibody response was detected, directed against the La/SSB autoantigen (wks 3–7), the immunizing peptide (wks 3–27), and the RNP autoantigen (wks 7–20). This response gradually decreased to low levels between postimmunization wks 27–42. Purified antibodies against pep145–164 recognized La/SSB and a 70-kD autoantigen in Western blot and exhibited significant reactivity in anti-U1-RNP ELISA. Depletion of anti-pep145–164 antibodies eliminated anti-U1-RNP reactivity from immunized rabbit sera but not from human sera. In addition, pep145–164 was recognized to a greater extent by autoimmune sera with anti-RNP reactivity compared with anti-La/SSB-positive sera, in contrast to pep349–364 of La/SSB, which was recognized almost exclusively by sera with anti-La/SSB reactivity. These data suggest that the RRM region of La/SSB can trigger interparticle B-cell diversification to U1-RNP-70 autoantigen via molecular mimicry. Identification of key sequences that trigger and perpetuate the autoimmune process is particularly important for understanding pathogenetic mechanisms in autoimmunity.

© 2010 The Feinstein Institute for Medical Research, [www.feinsteininstitute.org](http://www.feinsteininstitute.org)

Online address: <http://www.molmed.org>

doi: 10.2119/molmed.2009.00106

## INTRODUCTION

Autoimmune diseases, caused by a breakdown in self tolerance, are characterized by the appearance of autoantibodies and autoreactive T lymphocytes. Systemic lupus erythematosus (SLE) is considered the prototypic systemic autoimmune disease disorder involving both humoral and cellular forms of adaptive immune response and affecting the skin, joints, kidneys, lungs, nervous system,

serous membranes and virtually every organ in the body (1).

SLE is characterized by the production of autoantibodies to ribonucleoprotein (RNP) complexes. These autoantibodies often arise in 2 grouped sets targeting the U1-RNP complex and/or Ro/La particle (2). The U1-RNP particle is a major component of the spliceosome, catalyzing pre-messenger RNA (mRNA) splicing into mRNA. Together with the Sm

proteins, U1-RNP contains specific proteins (RNP 70, RNP A and RNP C) that interact with the 164-nucleotide-long U1 RNA. The RNP-70 and RNP-A proteins bear classical RNA recognition motifs (RRMs) and bind directly to the U1 RNA, whereas RNP-C protein associates via protein-protein interactions with RNP-70 and one or more of the Sm proteins (3). Similarly, the Ro/La particle is composed of 1 of 4 small, uridine-rich hY RNAs (human cytoplasmic RNAs) non-covalently associated with at least three proteins, the Ro52, La/SSB and Ro60 autoantigens (4). La/SSB and Ro60 proteins possess RNA binding motifs (classical RRM and TROVE [telomerase-RO-vault-element], respectively) allowing their direct binding to hYRNA, whereas Ro52

---

**Address correspondence and reprint requests to** John G Routsias, Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, 75 Mikras Asias Street, 115 27 Athens, Greece. Phone: + 30-210-7462670; Fax: + 30-210-7462664; E-mail: [jroutsias@med.uoa.gr](mailto:jroutsias@med.uoa.gr).

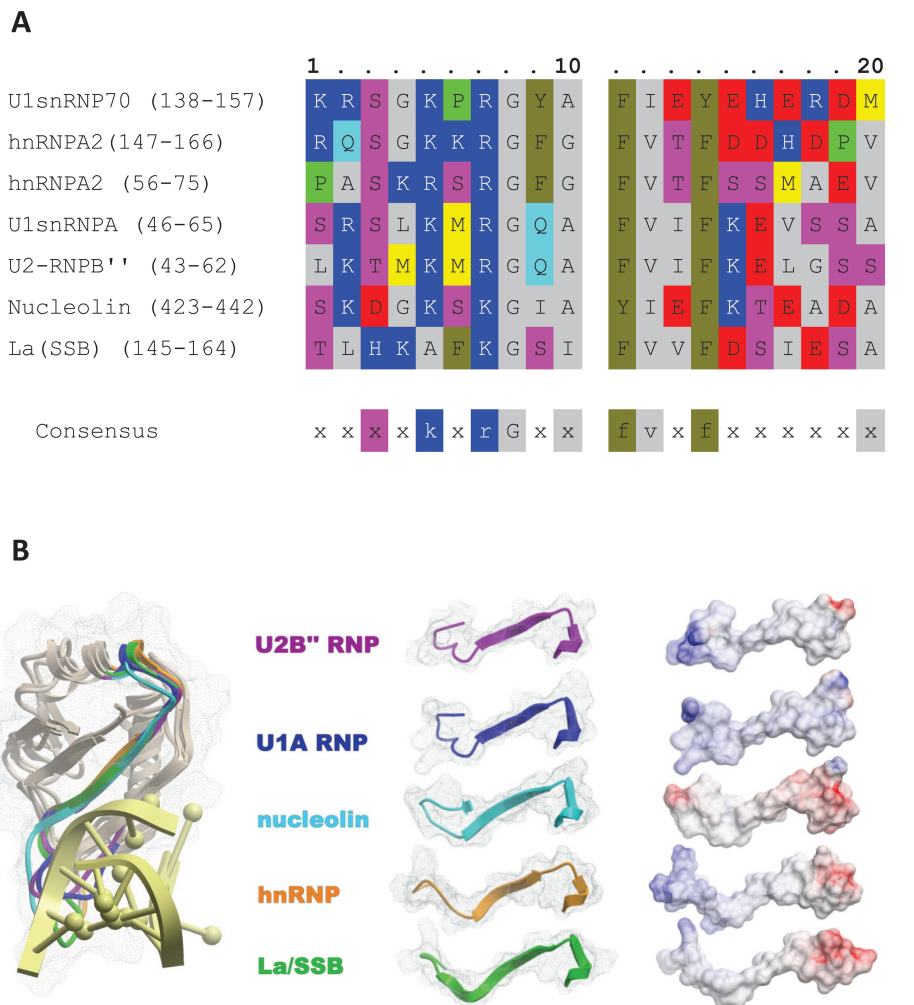
Submitted August 10, 2009; Accepted for publication October 12, 2009; Epub ([www.molmed.org](http://www.molmed.org)) ahead of print October 14, 2009.



participates in the complex via protein-protein interactions (2,5). The localization of Ro/La complexes is mainly cytoplasmic, but their assembly is performed in the nucleus (6,7).

The Ro/La RNP particle has been claimed to play an important role in the initiation of autoimmunity, because autoantibodies targeting this particle usually appear before clinical manifestations of SLE and earlier than anti-Sm and anti-nuclear RNP antibodies (mean 3.4 years versus 1.2 years) (8). The proportion of SLE patients with anti-Sm or anti-nuclear RNP antibodies increases dramatically in the year before diagnosis, indicating that appearance of these autoantibodies heralds the clinical onset of the disease (8). Specifically, the clinical onset of disease coincides not so much with the appearance of anti-Sm or RNP antibodies but with the cessation of the development of new autoantibody specificities. Indeed, the rate of appearance of new autoantibody specificities has been found to gradually increase until the diagnosis of SLE and to be halted afterward (8).

Diversification and augmentation of the autoimmune response is believed to occur via epitope spreading, a process whereby distinct and non-cross-reactive epitopes are created (9,10). Two types of epitope spreading have been described: intramolecular spreading, in which the autoimmune response spreads in epitopes within the same protein, and intermolecular spreading, which also involves other protein components physically associated within the same antigenic complex, such as a spliceosome and Ro/La particles. It is not yet known how the autoimmune response “jumps” from one particle to another. To the extent that the majority of nuclear autoantigens in SLE are RNA-binding proteins and major epitopes were previously mapped within their RRM motifs (in the case of La/SSB, RNP-A and RNP-70 autoantigens) (2), molecular similarity of conserved sequences within RRM could be involved in the intermolecular and interparticle



**Figure 1.** (A) Sequence similarity and conserved regions among the RNA recognition (RNP1) motif of several spliceosomal and other autoantigens. Homologous amino acid residues are represented in different colors. The conserved consensus pattern is shown under the sequences. (B) Structural similarity of the epitope 145–164 aa within the RNP1 motif of La/SSB with other autoantigens. Superimposed structures of the RNP1 regions of the autoantigens U2B'' RNP (PDB: 1A9N, (20)), U1A RNP (PDB: 1OIA, (19)), nucleolin (PDB: 1RKJ, (18)), hnRNP (PDB: 1x4B), and La/SSB (PDB: 1ZH5, (21)) are depicted (on the left) in complex with a  $UUU_{OH}$ -RNA dimer obtained from structure 1ZH5 (shown in yellow). The homologous regions with the La/SSB epitope are represented as ribbons with different colors, and their electrostatic potential is depicted on the right (positive charges in blue color, negative charges in red, and neutral regions in gray). All structures obtained from the PDB database.

diversification process of the autoimmune response. Here we report our exploration of the potential of the RRM of the La/SSB autoantigen to induce antibodies that recognize components of U1-RNP particle, and therefore its capacity to produce interparticle epitope spreading.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Sera

Sera were obtained from 72 patients with primary Sjögren syndrome (pSS) (11), 82 patients with SLE (12), 38 patients with rheumatoid arthritis (RA) (13) and 55 healthy subjects. All patients ful-

filled the American/European classification criteria (11–13). All sera had been previously screened for the presence of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies by counterimmunoelectrophoresis (CIE) and immunoblot, as described previously (14).

### Peptide Synthesis and Purification

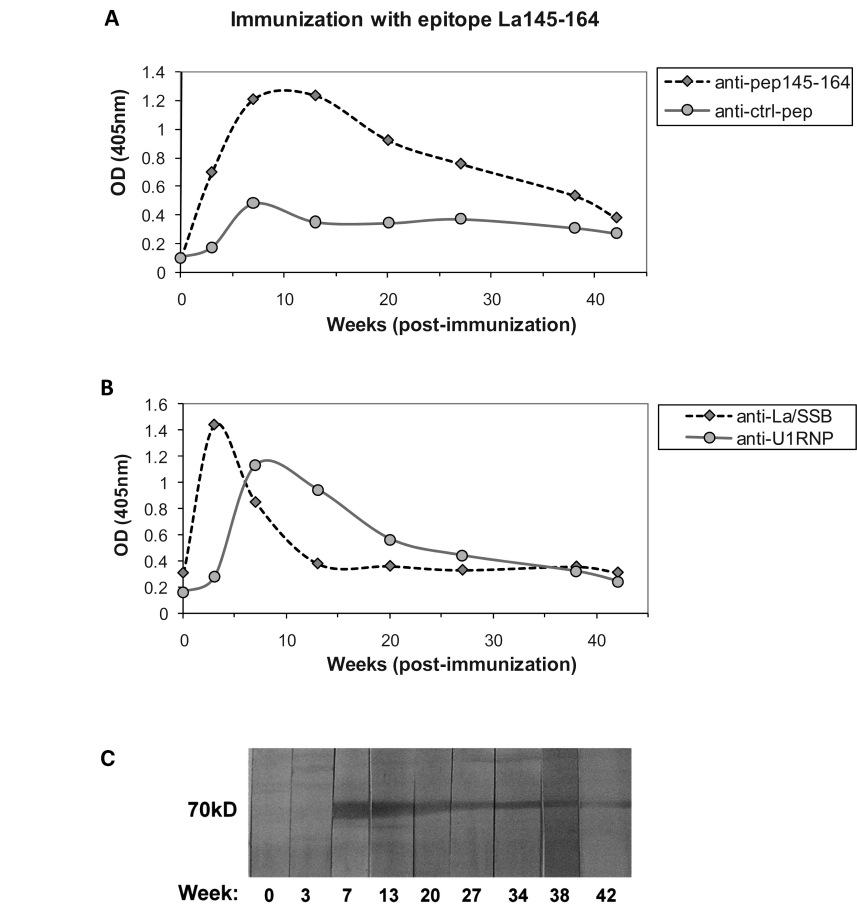
The linear B-cell epitope of La/SSB that resides within its RRM <sup>145</sup>TLHKAFKGSIFVVFDSIESA<sup>164</sup>, and the major epitope of La/SSB <sup>349</sup>GSGKGGKVVQFQGGKTKF<sup>364</sup> were synthesized as multiple antigenic peptides (MAP) attached in four copies to the tetrameric MAP backbone and used for immunization and ELISA experiments. The irrelevant peptide IASRYDQL (corresponding to the sequence 250–257aa of *Leishmania* glycoprotein gp63), selected because it has the same charge with pep145–164 at pH 7, was attached in MAP scaffold-like pep145–164 and used as control peptide (ctrl-pep). An additional peptide corresponding to the epitope <sup>145</sup>TLHKAFKGSIFVVFDSIESA<sup>164</sup> was synthesized in its free form and used for antibody purification and evaluation of their reactivity. All peptides were synthesized according to the solid-phase peptide synthesis procedure, purified with fast protein liquid chromatography and tested by mass spectrometry for confirmation of their sequence identity.

### Rabbit Immunization

Ten New Zealand White female rabbits, 6±8-wks-old, were immunized according to a previously described protocol (15), using 0.5 mg immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) for the first injection and incomplete Freund's adjuvant for the subsequent injections. Successive bleedings were performed before the immunizations of the animals at wks 0, 3, 7, 13, 20, 27, 38 and 42.

### Estimation of Anti-La/SSB and Anti-U1-RNP Reactivity

Recombinant human La/SSB whole protein was constructed using the methodology that has been previously de-



**Figure 2.** Immunization of rabbits with the epitope 145–164 aa of La/SSB. (A) Reactivity against pep145–164 and control peptide at different postimmunization time points. (B) Reactivity against La/SSB and U1-RNP antigens as assessed by specific ELISA assays. The development of anti-La/SSB antibodies (at wk 3) preceded the production of anti-U1-RNP antibodies (wk 7–20). (C) Western blot (using rabbit thymus extract) showing the development and the attenuation of anti-70kD activity of rabbit sera after immunization with pep145–164.

scribed by Troster *et al.* (16) and used in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to a previously published protocol (17) with modifications in the coating conditions. More specifically, plates were coated with recombinant La/SSB in the presence of 6M urea to denature the autoantigen and to remove any RNA that could mask its RRM domains. The anti-U1-RNP reactivity was monitored by a commercially available ELISA based on affinity purified autoantigen (RNP ELISA; IBL, Hamburg, Germany).

### ELISA Assays with Synthetic Peptides

Specific antipeptide ELISA assays were developed and performed to detect the

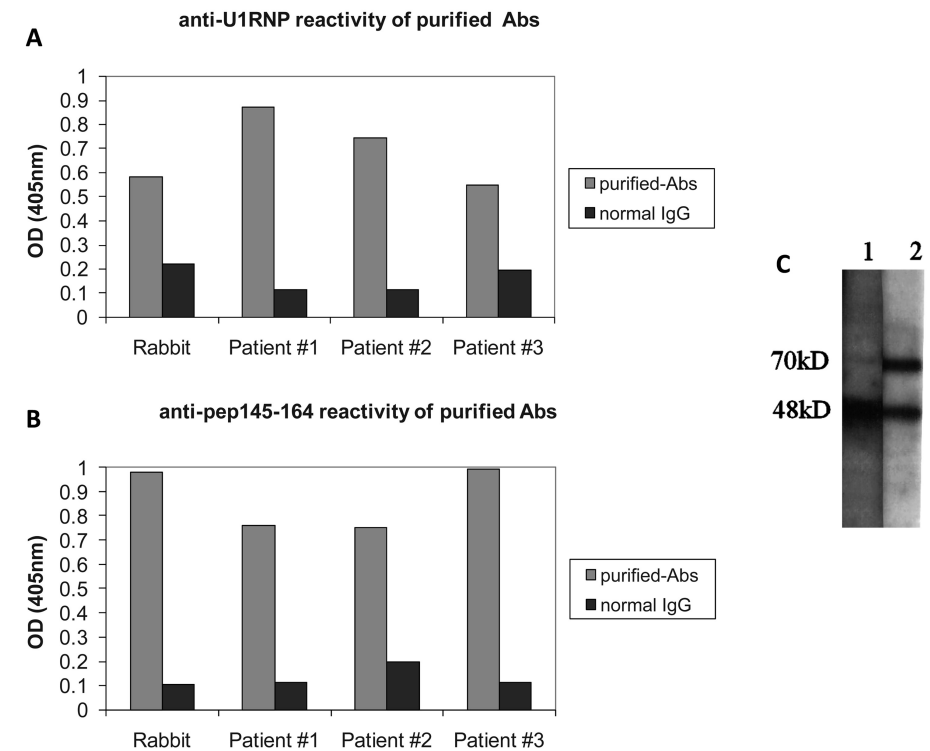
antibodies in human sera as well as in rabbit sera. Sera from all animals were tested against the peptides pep145–164, pep349–364 and ctrl-pep peptide. Sera from patients were tested for reactivity against the peptides pep145–164 and pep349–364; 96-well polystyrene plates (Costar, Corning, NY, USA) were coated with the solution of the coating peptide at a concentration of 5 µg/mL in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). Nonspecific-binding was blocked using blocking buffer consisting of bovine serum albumin 2% wt/vol in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. Afterward, rabbit sera or human sera were added to blocking buffer in a dilution of 1:700 or 1:140, re-

spectively. After an incubation period of 2 h at room temperature, the ELISA plates were washed three times with PBS. Alkaline phosphatase-conjugated antirabbit IgG or antihuman IgG (Jackson Immuno-research, West Grove, PA, USA), diluted 1:1400 in blocking buffer, was added to the assays with the rabbit or the human sera, respectively, and the plates were incubated for 1 h. Subsequently, the wells were washed and 100  $\mu$ L *p*-nitrophenol substrate (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was added, and the absorbance was measured at 405 nm. The cutoff point for the assays with human sera was set as the mean optical density values plus three standard deviations of sera from 55 healthy individuals.

To exclude background binding and verify the coating efficiency in ELISA experiments, each plate was divided into two halves, one coated with pep145–164 and one coated with MAP carrier and blocked with albumin blocking buffer. None of the rabbit sera exhibited significant reactivity with MAP carrier or albumin. In the experiments done for human sera screening, 2 SLE sera demonstrated significant binding to MAP and/or albumin and they excluded from data analysis.

#### Purification of Human Anti-pep145–164aa Antibodies

Total IgG from the sera of three patients, containing autoantibodies to the La/SSB epitope 145–164, were purified by affinity chromatography using a protein-A Sepharose 4B column. IgG fractions were concentrated and dialyzed against PBS. A specific immunoaffinity column of cyanogen bromide (CNBr)-activated Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) was generated by standard methods, using 10 mg of the synthetic pep145–164. Anti-pep145–164 IgG antibodies were purified from the three human fractions of total IgG as well as from rabbit sera immunized with pep145–164 by using standard immunoaffinity procedure (elution was performed with 0.1 mol/L HCl-Gly, pH 2.7). Antibody concentra-



**Figure 3.** Assessment of the reactivity of purified anti-pep145–164 antibodies from three patients and immunized rabbits. All purified antibodies recognized U1-RNP (A) and pep145–164 (B) in ELISA. Purified antibodies from two patients were also tested in Western Blot against HeLa extract (C) and found to recognize bands at 48kD and 70kD, corresponding to La/SSB and RNP-70 autoantigens.

tion was measured using the Bradford assay.

#### Western Blotting

Rabbit thymus extract was first subjected to electrophoresis in 12% SDS-polyacrylamide gels and then transferred to nitrocellulose. The blotted strips were saturated in Tris-buffered saline, pH 7.5, containing 0.1% Tween (TBS-T) and 5% nonfat milk for 1 h at room temperature, and then incubated with rabbit antisera diluted 1:120 in TBS-T milk overnight at 4°C. After washing, strips were incubated with alkaline-phosphatase conjugated antibodies to rabbit IgG (1:1,100 in TBS-T milk). Afterward, the strips were washed and nitro-blue-tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate substrate (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) was used to reveal positive reactions.

## RESULTS

#### Sequence and Structural Similarity between the RRM Belonging to Different Autoantigens

According to our hypothesis, a consensus sequence within the RRM domain conserved in many autoantigens, might play a role as driver epitope for intermolecular and interparticle epitope spreading in systemic autoimmunity. We examined the sequence and structural similarity among the RRM motifs of several self-proteins. A homologous region was identified in the central part of the RRM. Although the degree of similarity in its primary structure was moderate, varying between 35% and 60% (Figure 1A), all RRM regions adopted a very similar tertiary structure (Figure 1B) (18–21) that could favor a potential cross-recognition by autoanti-



bodies. The homologous region of La/SSB (aa145–164) had been previously characterized by our group as an SLE-associated B-cell epitope (14), serving also as a T-cell epitope (22) in rabbit immunization experiments.

### Antibodies Generated in Rabbits Immunized with the Epitope 145–164 of La/SSB React with the Cognate Protein and with the U1-RNP Autoantigen

In our diversification model, the RRM of La/SSB may have been involved in the induction of the antisplenic autoimmune response via molecular mimicry. To investigate this possibility, we immunized New Zealand white rabbits with pep145–164 of La/SSB. Sera from rabbits were collected at different pre- and postimmunization time points and tested for reactivity against the immunizing peptide and a control peptide. It was found that 3 wks after the first immunization rabbits produced antibodies toward the immunizing peptide, which reached their maximum reactivity between wks 7 and 13. In contrast, no reactivity against the control peptide was observed (Figure 2A).

We also investigated whether antibodies raised against peptide pep145–164 of La/SSB were able to recognize the whole cognate protein and proteins present in the U1-RNP particle. It was found that the first-appearing antibodies, capable of recognizing the La/SSB protein (at wk 3 after the immunization) were progressively eliminated at wk 13. The development of anti-La/SSB antibodies was followed by the production of anti-U1-RNP antibodies at wk 7, which remained at high levels until wk 20 (Figure 2B). Therefore, immunization with an autoepitope of La/SSB autoantigen can produce antibodies capable of recognizing components of another autoantigenic complex, the U1-RNP.

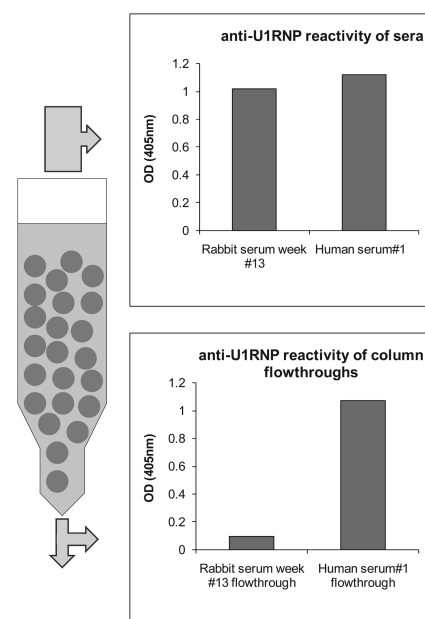
To confirm the above findings the sequential sera from immunized rabbits were tested in Western blot against a rabbit thymus extract. At wk 7, a band at 70 kD appeared, which exactly followed

the kinetics of anti-U1-RNP antibodies in terms of time and signal intensity (Figure 2C).

### Purification of Antibodies toward the Epitope 145–164 of La/SSB Reveals their Capacity to Cross-Recognize U1-RNP Autoantigen

To gain further insight into the mechanism involved in the recognition of U1-RNP autoantigen by autoantibodies in our model, we coupled the latter peptide onto an immunoaffinity column and performed affinity purification of specific antipeptide antibodies from immunized rabbit and patient sera with anti-pep145–164 reactivity. It was found that anti-pep145–164 antibodies from immunized rabbits recognized not only the peptide against which they were purified (Figure 3A) but also the U1-RNP autoantigen (Figure 3B). This observation was also true for human sera from patients with SLE, demonstrating that specific antibodies that bind to a conserved epitope of La/SSB also have the capacity to cross-recognize U1-RNP autoantigen. Purified antibodies from patients with SLE were also tested in Western Blot against HeLa extract. Specific bands at molecular weights of 48 kD and 70 kD were detected (Figure 3C). Comparison with reference sera indicated that these bands most likely correspond to La/SSB and RNP-70 autoantigens. Since purified anti-pep145–164 antibodies recognize the U1-RNP antigen, we expect that purified anti-U1-RNP antibodies will also recognize pep145–164 of La/SSB. However, this experiment has not been done.

To examine if epitope recognition on U1-RNP autoantigen is expanded beyond the RRM homologous region, we investigated whether anti-U1-RNP reactivity of human and rabbit sera could be absorbed onto the RRM peptide (pep145–164 immunoaffinity column). It was found that after the depletion of anti-pep145–164 antibodies, sera of immunized rabbits lost their capacity to recognize U1-RNP autoantigen. In contrast, the serum of human study patient 1, which was subjected to the same immunoaffinity col-



**Figure 4.** Assessment of the reactivity of sera before and after affinity purification of anti-pep145–164 antibodies. Depletion of anti-pep145–164 antibodies eliminated the anti-U1-RNP reactivity of immunized rabbit serum (wk 13) but not the anti-U1-RNP reactivity of patient #1 serum. All sera and flowthroughs were diluted properly to contain approximately 15  $\mu$ g/mL of IgG.

umn, completely retained its anti-U1-RNP reactivity (Figure 4). These observations strongly indicate that immunized rabbit sera (tested at postimmunization wk 13) react with the homologous RRM region of U1-RNP but not with other epitopes on the same autoantigen. On the other hand human sera recognize multiple epitopes on U1-RNP autoantigen, and their anti-U1-RNP reactivity cannot be absorbed onto pep145–164. Additional evidence was obtained by competitive ELISA assays, which demonstrated that anti-U1-RNP reactivity of immunized rabbit sera could be inhibited (52%–59%) by incubation with pep149–164 peptide (data not shown).

### Prevalence of Anti-pep145–164 Antibodies in Autoimmune Sera

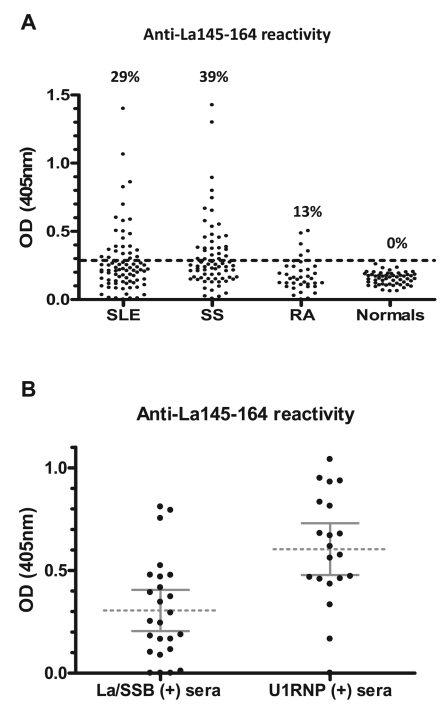
We next examined the prevalence of antibodies against pep145–164 in differ-

ent autoimmune diseases, as well as in normal populations. Antibodies recognizing the epitope 145–164 of La/SSB were detected in 29% of SLE, 39% of SS, and 13% of RA sera, but not in sera from healthy individuals (Figure 5A). Analysis of the reactivities of the sera according to their autoantibody specificity in CIE demonstrated that although these antibodies were common in both anti-La/SSB-positive and anti-RNP-positive sera, their reactivity was higher in RNP-positive sera ( $t = 4.07$ ,  $P = 0.0002$ ), which occurs mainly in patients with SLE (Figure 5B).

To examine the autoantibody reactivity profile of the patient sera in more detail, we evaluated their reactivity against the pep145–164 of La/SSB and the pSS-related major epitope of La/SSB (pep349–364) with regard to their specificity in CIE. It was found that patient sera could be divided into 3 groups: (a) sera with anti-pep349–364 antibodies alone, (b) sera with both anti-pep145–164 and anti-pep349–364 antibodies and (c) sera with anti-pep145–164 antibodies alone (Figure 6A). Notably, all sera from group c were anti-RNP-positive sera, whereas sera belonging to groups (a) and (b) were anti-La/SSB-positive sera. Therefore, the existence of anti-pep145–164 without anti-pep349–364 antibodies is an exclusive feature of anti-RNP-positive sera. The autoantibody specificity of the sera was further confirmed by anti-La/SSB and anti-U1-RNP ELISA assays (Figure 6B).

## DISCUSSION

The autoantibody diversification in SLE has been partially elucidated via the proposed mechanism of intra- and intermolecular spreading (9,10). This mechanism may explain the different clusters of autoantibodies in SLE (against spliceosome and hYRNPs), but not the sequential appearance of autoantibodies against autoantigens belonging to different macromolecular complexes. The results of the present study provide evidence that a conserved sequence within the RRM motif of the La/SSB autoantigen



**Figure 5.** (A) Prevalence of anti-pep145–164 antibodies in autoimmune sera from patients with SLE, pSS, or RA and healthy individuals (normals). (B) Analysis of the reactivities against pep145–164 of the sera according to their autoantibody specificity in CIE. Anti-pep145–164 reactivity was found to be higher in RNP-positive (+) sera ( $P = 0.0002$ ).

can induce antibodies that cross-recognize components of the U1-RNP particle.

We first noticed that the RRMs belonging to different autoantigens adopt a very similar tertiary structure (necessary for their interaction with RNA) and possess a conserved sequence in their central part. Although Ro60 protein possesses RRM domains, the degree of their sequence similarity with RRMs of the components of the U1-RNP complex is lower compared with La/SSB autoantigen. Moreover, the conserved sequence of the RRM of La/SSB has been previously characterized in our laboratory as B-cell/T-cell epitope associated with SLE (14,22).

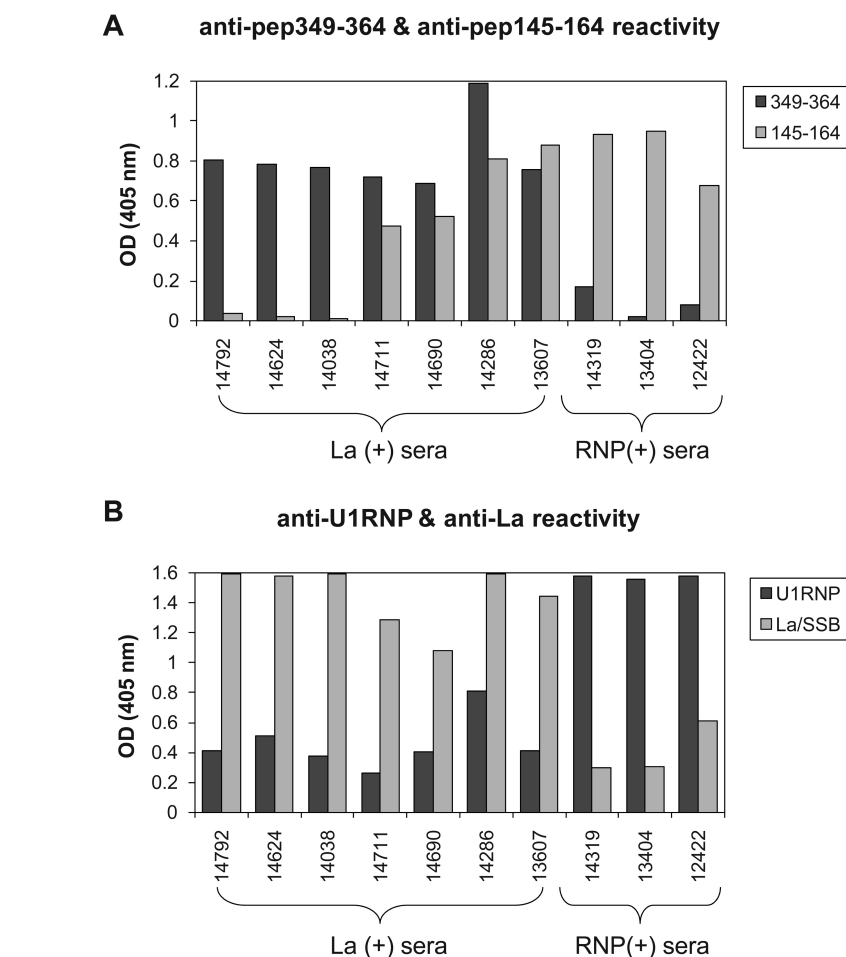
Rabbits immunized with pep145–164 of La/SSB produced both anti-La/SSB and anti-U1-RNP antibodies in a two-step pattern, with anti-La/SSB antibodies appearing first, followed by anti-U1-

RNP antibodies. Because the conserved RRM regions of La/SSB and RNP-70 autoantigens differ significantly in their amino acid sequence, it is not surprising that a period of time was required in order for anti-pep145–164 antibodies to adapt their specificity to U1-RNP. The appearance of antibodies targeting U1-RNP might also be explained by a different mechanism, involving intramolecular spreading to another unidentified epitope of La/SSB followed by cross-recognition of U1-RNP. To elucidate the mechanisms, specific anti-pep145–164 antibodies were purified from immunized rabbits and found to cross-recognize directly the U1-RNP. Furthermore, to gain insight into human disease, we also purified specific anti-pep145–164 antibodies from SLE patient sera. These antibodies also recognized U1-RNP. Although both rabbit and human sera recognized the U1-RNP autoantigen, their reactivity could be discriminated on the basis of its ability to be absorbed onto pep145–164. Thus, immunized rabbit sera lost their reactivity after passage through the pep145–164 immunoaffinity column, but human sera did not. These results most likely reflect the limited epitope recognition in rabbits (owing to the cross-reaction with the RRM homologous region) and the multiple epitope recognition by human SLE sera. These findings are also consistent with previous studies reporting that limited epitope recognition on an autoantigen occurs when the immunizing peptide has a low degree of sequence similarity with it (23). In this case an additional step is required (for example, affinity maturation of antibodies in the presence of U1-RNP autoantigen) to gain diversification of immune response to additional epitopes of U1-RNP.

Antibodies against pep145–164 were detected in 39% of patients with pSS and in a small subgroup of patients with RA. However, anti-RNP-positive sera, which occur mainly in patients with SLE, demonstrated significantly higher reactivity for anti-pep145–164 antibodies as compared with anti-RNP-negative sera.

These sera did not possess reactivity against the epitope 349–364, which has been previously characterized as the major, associated with pSS, epitope of La/SSB (14). We should also note that these sera were found to be negative for anti-La/SSB antibodies in CIE, which most likely reflects either a limited epitope recognition within La/SSB autoantigen that is insufficient to produce an immunoprecipitation reaction in CIE or an epitope masking by hY-RNA bound in the RRM region of La/SSB in assays employing the antigen in its natural conformation (24).

Our experimental data strongly reinforce the hypothetical model proposed some years ago by Monneaux and Muller (9,25). In this model, the RRM consensus sequence can drive epitope spreading in spliceosomal proteins via molecular mimicry (25). In this regard, Monneaux and Muller demonstrated that immunization of rabbits with a peptide corresponding to the epitope 131–151aa within the RRM of RNP-70 could produce antibodies that recognize, in addition to the cognate protein, the components RNP-A, RNP-C and Sm-D of the U1-RNP particle (26). These antibodies had the capacity to cross-recognize peptides corresponding to the RRMs of different nuclear autoantigens, such as RNP-70, RNP-A and hnRNP-A2 (26). According to this model, the RRM initiates spreading of the immune response to the whole protein (intramolecular spreading), then spreading proceeds in an ordered manner to other proteins containing the RRM(s) and, finally, to proteins that do not contain any RRM but are also localized in the same particle (intermolecular spreading). To date, experimental data exist only for epitope spreading via RRMs to the physically associated spliceosomal proteins. Our present data provide for the first time evidence that interparticle spreading of immune response via RRM can also occur. The proposed model can also be applied to other “driver” epitopes such as the proline-rich region PPPGMRPP that holds a cross-reactive epitope, present in several spliceo-



**Figure 6.** Reactivity of representative sera against the RRM-related epitope 145–164 and the major epitope 349–364 of La/SSB (A) as well as against U1-RNP and La/SSB autoantigens (B). The existence of anti-pep145–164 without anti-pep349–364 antibodies is a feature found exclusively in anti-RNP-positive (+) sera. Anti-La (+) sera can contain either anti-pep349–364 alone or anti-pep349–364 accompanied by anti-pep145–164 antibodies.

somal autoantigens and recently identified as an early target of RNP humoral autoimmunity in SLE (27). In this regard, in addition to intramolecular and intermolecular spreading, the autoimmune response diversifies via molecular mimicry with key sequences, common in autoantigens targeted in SLE.

Taken together, our data suggest that the RRM region of La/SSB can trigger interparticle B-cell diversification to U1-RNP, confirming the importance of the RRM region in the pathway of events leading to autoimmunity in SLE. Identification of key sequences that trigger and perpetuate the autoimmune process

is particularly important for understanding the initial events in autoimmune response and designing specific therapeutic strategies capable of blocking the cascade of spreading (taking place during the development of autoimmune response).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank H. Moutsopoulos for useful discussion and advice.

#### DISCLOSURE

The authors declare that they have no competing interests as defined by *Molecular Medicine*, or other interests that

might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

## REFERENCES

- Vlachoyiannopoulos PG, Karassa FB, Karakostas KX, Drosos AA, Moutsopoulos HM. (1993) Systemic lupus erythematosus in Greece. Clinical features, evolution and outcome: a descriptive analysis of 292 patients. *Lupus*. 2:303–12.
- Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. (2006) Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43:203–48.
- van Venrooij WJ, Pruijn GJ. (1995) Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr. Opin. Immunol.* 7:819–24.
- Slobbe RL, Pluk W, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. (1992) Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 227:361–6.
- Routsias JG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. (2004) The clinical value of intracellular autoantigen B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin. Chim. Acta.* 340:1–25.
- Sim S, et al. (2009) The subcellular distribution of an RNA quality control protein, the Ro autoantigen, is regulated by noncoding Y RNA binding. *Mol. Biol. Cell.* 20:1555–64.
- Simons FH, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. (1994) Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell Biol.* 125:981–8.
- Arbuckle MR, et al. (2003) Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 349:1526–33.
- Monneaux F, Muller S. (2002) Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum.* 46:1430–8.
- Moutsopoulos NM, Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. (2000) B-cell epitopes of intracellular autoantigens: myth and reality. *Mol. Med.* 6:141–51.
- Vitali C, et al. (2002) Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 61:554–8.
- Tan EM, et al. (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271–7.
- Arnett FC, et al. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315–24.
- Tzioufas AG, et al. (1997) Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping, and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* 108:191–8.
- James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. (1995) Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. *J. Exp. Med.* 181:453–61.
- Troster H, et al. (1994) One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjogren's syndrome. *J. Exp. Med.* 180:2059–67.
- Routsias JG, et al. (2003) Idiotype-anti-idiotypic circuit in non-autoimmune mice after immunization with the epitope and complementary epitope 289–308aa of La/SSB: implications for the maintenance and perpetuation of the anti-La/SSB response. *J. Autoimmun.* 21:17–26.
- Johansson C, et al. (2004) Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J. Mol. Biol.* 337:799–816.
- Nagai K, Oubridge C, Jessen TH, Li J, Evans PR. (1990) Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature.* 348:515–20.
- Price SR, Evans PR, Nagai K. (1998) Crystal structure of the spliceosomal U2B'-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature.* 394:645–50.
- Teplova M, et al. (2006) Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Mol. Cell.* 21:75–85.
- Yiannaki E, et al. (2000) Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin. Exp. Immunol.* 121:551–6.
- Scofield RH, et al. (1999) Immunization of mice with human 60-kd Ro peptides results in epitope spreading if the peptides are highly homologous between human and mouse. *Arthritis Rheum.* 42:1017–24.
- Gonzalez C, et al. (1997) Comparison and variation of different methodologies for the detection of autoantibodies to nuclear antigens (ANA). *J. Clin. Lab. Anal.* 11:388–92.
- Monneaux F, Muller S. (2001) Key sequences involved in the spreading of the systemic autoimmune response to spliceosomal proteins. *Scand J. Immunol.* 54:45–54.
- Monneaux F, Parietti V, Briand JP, Muller S. (2007) Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res. Ther.* 9:R111.
- Poole BD, et al. (2009) Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60:848–59.



## Association of the Idiotypic:Antiidiotypic Antibody Ratio With the Efficacy of Intravenous Immunoglobulin Treatment for the Prevention of Recurrent Autoimmune-Associated Congenital Heart Block

John G. Routsias,<sup>1</sup> Nikolaos C. Kyriakidis,<sup>1</sup> Deborah M. Friedman,<sup>2</sup> Carolina Llanos,<sup>3</sup> Robert Clancy,<sup>4</sup> Haralampos M. Moutsopoulos,<sup>1</sup> Jill Buyon,<sup>4</sup> and Athanasios G. Tzioufas<sup>1</sup>

**Objective.** Congenital heart block (CHB), a manifestation of neonatal lupus, is associated with maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies and recurs in ~18% of subsequent pregnancies. This study was undertaken to investigate the effect of the idiotypic:antiidiotypic (Id:anti-Id) antibody ratio in the ability of intravenous immunoglobulin (IVIG) administered during subsequent pregnancies to prevent CHB.

**Methods.** We studied 16 anti-Ro/SSA and anti-La/SSB-positive pregnant women from the Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block study who had previously given birth to a child with neonatal lupus. In 3 of the mothers, the study pregnancy resulted in the birth of a child with neonatal lupus (2 with CHB and 1 with rash). Sequential serum samples were obtained from all mothers immediately before the administration of IVIG during pregnancy and were evaluated for antibodies against the major B cell epitope 349–364aa of La/SSB (idiotype) and its antiidiotypic antibodies.

**Results.** Following IVIG treatment, serum titers of anti-La(349–364) (Id antibodies) decreased in 80% of the mothers, and in 60% an increase in anti-Id anti-

bodies against anti-La(349–364) was observed. The Id:anti-Id ratio was significantly higher in mothers whose offspring developed neonatal lupus compared to mothers who gave birth to a healthy child ( $P < 0.0001$ ). Removal of anti-Id antibodies substantially increased the reactivity against La(349–364) in sera from 5 of 7 mothers tested. All IVIG preparations were examined for Id and anti-Id antibody activity. IVIG from batches administered to mothers who gave birth to a healthy child had an Id:anti-Id activity ratio of  $<1$ , in contrast to that given to mothers who gave birth to a child with neonatal lupus. Addition of the IVIG preparations to the maternal sera further enhanced antiidiotypic activity (by up to 4.7-fold) in 11 of 13 patients studied.

**Conclusion.** This is the first study in humans to demonstrate that IVIG influences the Id-anti-Id network of a specific pathogenic autoantibody. Specifically, we showed that IVIG enhanced the anti-Id antibody response in pregnant women with anti-La/SSB antibodies. A high Id:anti-Id ratio in both the IVIG preparation and the maternal serum may explain the absence of an effect of IVIG in preventing recurrent neonatal lupus in some cases.

Congenital heart block (CHB) is a model of passively acquired autoimmunity that is strongly associated with the transplacental passage of maternal IgG against Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins (1). CHB is a cardiac manifestation of the so-called neonatal lupus syndromes, a constellation of clinical manifestations found in babies born to mothers with anti-Ro/anti-La antibodies, which may include a cutaneous rash or, very rarely, blood or liver abnormalities that improve over time (2,3).

CHB is the most serious manifestation of neona-

Supported in part by the Research Council of the University of Athens. Dr. Buyon's work was supported by the Alliance for Lupus Research and the NIH (grant AR-042455-16 and National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases contract AR-4-2271).

<sup>1</sup>John G. Routsias, MD, PhD, Nikolaos C. Kyriakidis, BSc, Haralampos M. Moutsopoulos, MD, FACP, FRCP, Athanasios G. Tzioufas, MD: University of Athens, Athens, Greece; <sup>2</sup>Deborah M. Friedman, MD: New York Medical College, Valhalla; <sup>3</sup>Carolina Llanos, MD: Pontificia Universidad Catolica de Chile, Santiago, Chile; <sup>4</sup>Robert Clancy, PhD, Jill Buyon, MD: New York University School of Medicine, New York, New York.

Address correspondence to Athanasios G. Tzioufas, MD, Department of Pathophysiology, Medical School, University of Athens, 75 Micras Asias Street, 11527 Athens, Greece. E-mail: agtzi@med.uoa.gr.

Submitted for publication August 9, 2010; accepted in revised form May 17, 2011.



tal lupus and can cause permanent and often life-threatening damage to the fetal heart. The incidence of CHB in the offspring of mothers with the pathologic autoantibodies ranges between 1% and 2% (4,5), but the recurrence rate in subsequent pregnancies following the birth of a child with neonatal lupus is ~18% (6–8). It appears that the presence of maternal antibodies is a necessary, but not sufficient, condition for the development of CHB. The uterine environment, fetal factors (e.g., genes, viral infections), and maternal factors (e.g., specific autoantibody profile) (9) or the absence of an active antiidiotypic network targeting pathogenic autoantibodies (10) have been proposed as possible cofactors in the development of CHB. In a previous study, in an attempt to define the role of this network in the development of neonatal lupus, we evaluated the idiotypic–antiidiotypic (Id–anti-Id) network of antibodies targeting the dominant epitopes of La/SSB (10); we concluded that the presence of anti-Id antibodies to autoantibodies against La/SSB may protect the fetus by blocking pathogenic maternal autoantibodies.

In the present study of mothers who were enrolled in the Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block (PITCH) study, we evaluated the effects of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy on the Id–anti-Id network of anti-La/SSB antibodies. We found that, although administration of intravenous immunoglobulin (IVIG) at doses consistent with replacement does not prevent the recurrence of CHB overall (11), it significantly alters the Id–anti-Id network of pathogenic autoantibodies, increasing the anti-Id response against them. We also showed that in the pregnancies resulting in the birth of a healthy child, the anti-La/SSB antibody Id:anti-Id ratio in maternal serum was significantly lower compared to the ratio observed in pregnancies resulting in the birth of a child with neonatal lupus.

## PATIENTS AND METHODS

**Study subjects.** Between January 2007 and January 2009, 21 women were enrolled in the PITCH study, a US-based multicenter, prospective, open-label clinical trial, after providing informed consent. All of the following inclusion criteria were required for study enrollment: 1) documentation of anti-Ro/SSA and/or anti-La/SSB antibody positivity; 2) a previous child with CHB (any degree, documented by electrocardiography if a live birth and/or by echocardiography and/or histologic findings if fetal death) and/or characteristic neonatal lupus rash (confirmed by dermatologic assessment and/or biopsy findings); and 3) current intrauterine pregnancy of <12 weeks' gestation, with normal fetal heartbeat and heart structure. Exclusion criteria included 1) current prednisone dosage >20 mg/day or current use of dexamethasone at any dosage;

2) IgA levels below normal values for the laboratory conducting the test; or 3) presence of any structural abnormalities of the fetal heart that could cause CHB, such as L-transposition of the great arteries, atrioventricular (AV) septal defect, or heterotaxia. Of the 21 women enrolled, there was 1 screening failure: this patient had a spontaneous miscarriage at 9 weeks, prior to initiation of the study protocol.

Sequential serum samples were obtained from the 20 mothers who completed the PITCH study. Three fetuses were diagnosed as having advanced heart block (at weeks 19, 20, and 25 of gestation). One of them was from an anti-La/SSB–negative mother. Of the 17 children without CHB, 1 neonate (from an anti-La/SSB–positive mother) presented with a neonatal lupus rash and Sweet's syndrome. Sera from 4 mothers were found to be negative for anti-La/SSB antibodies (using a commercial assay) and displayed minimal reactivity against the major epitope of La/SSB, and therefore were not included in further experiments. Therefore, the final study population consisted of 16 women, 3 of whom gave birth to children with neonatal lupus (2 with CHB, 1 with characteristic rash). All sera were positive for antibodies against Ro 60 and Ro 52 autoantigens.

**IVIG administration and followup.** IVIG infusions (400 mg/kg) were administered over periods of 3–4 hours at 12, 15, 18, 21, and 24 weeks' gestation. Blood samples were obtained before each infusion, at 28 weeks, at 34 weeks, and at the time of delivery, and analyzed under blinded conditions. Fetal echocardiograms were obtained weekly between week 16 and week 26 of gestation and then every 2 weeks thereafter until week 34.

**Peptide synthesis and definitions.** Synthetic peptides corresponding to the major B cell epitope of La/SSB, G<sup>349</sup>SGKGVQFQGGKTKF<sup>364</sup> (La[349–364]), as well as its complementary epitope, K<sup>364</sup>FRFLALKLYFSFTRP<sup>349</sup> (cpep[349–364]), were purchased from Biosynthesis. We have previously shown that antibodies against complementary epitope La(349–364) are antiidiotypic to antibodies against La(349–364) (10,12,13); thus, antibodies against epitope 349–364 were considered as idiotypic and antibodies against complementary epitope 349–364 as antiidiotypic.

**Antipeptide and anti-complementary peptide enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).** Antipeptide and anti-complementary peptide antibodies were detected with an ELISA that was optimized for each synthetic peptide, according to a previously described protocol (10).

**Isolation of anti-La(349–364) IgG antibodies.** Specific CNBr-activated Sepharose 4B immunoaffinity columns were generated by standard methods, using 15 mg of La(349–364) peptide. IgG from 4 sera that strongly recognized the La/SSB epitope 349–364 on ELISA were purified with protein A–Sepharose, concentrated, dialyzed against phosphate buffered saline (PBS), and passed through the peptide immunoaffinity column. Subsequently, the column was washed with PBS and eluted with 8M urea. The eluates were dialyzed against PBS, concentrated, and redialyzed. Antipeptide IgG concentrations were evaluated by the Lowry method (DC Protein Assay; Bio-Rad).

**Preparation of F(ab)<sub>2</sub> anti-La(349–364) fragments and assay for direct detection of anti-Id antibodies.** Purified anti-La(349–364) IgG antibodies were subjected to enzymatic degradation with pepsin and purified to be free of traces

of intact IgG, as described previously (12). Purified F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-La(349–364) antibodies (5 µg/ml in carbonate buffer [pH 9.6]) were applied in Costar high-binding microtiter plates for 1 hour at 25°C. Subsequently, the plates were blocked and washed, and sera were added at a dilution of 1:150–1:300 and incubated overnight at 4°C. The wells were then washed and alkaline phosphatase–conjugated goat anti-human IgG (1:2,000 in blocking buffer; Jackson ImmunoResearch) was added. The plates were incubated for 1 hour at room temperature. The wells were then washed and an ELISA amplification substrate system (Invitrogen) was applied. Absorbance was measured at 495 nm.

**Anti-La(349–364) ELISA after removal of anti-Id antibodies.** Anti-La(349–364) reactivity was evaluated after dissociation of Id–anti-Id immune complexes (by heating the samples at 53°C) and subsequent removal of anti-Id antibodies using anti-La(349–364) purified antibodies coupled to protein A–Sepharose beads. Normal IgG coupled to protein A–Sepharose beads was used as a negative control.

## RESULTS

**Augmentation of the anti-Id response by IVIG administration.** Id and anti-Id antibody titers in serial serum samples from 15 of 16 anti-La/SSB–positive mothers, including 2 who gave birth to children with neonatal lupus, were assessed under blinded conditions. Serial samples were not available from 1 of the anti-La/SSB–positive mothers, who also gave birth to a child with neonatal lupus; thus, this mother was not included in the analyses involving serial samples. We found that IVIG administration augmented the anti-Id response and in parallel attenuated the Id response, in the majority of sera tested. More specifically, after therapy the titer of anti-Id antibodies was increased (by 14–620%) in 9 mothers (60%), anti-Id activity remained the same as at study entry in 2 mothers, and the titer of anti-Id antibodies was decreased (by 13–78%) in 4 mothers. In contrast, the titer of Id antibodies was decreased (by 14–61%) in 12 mothers (80%), Id activity remained the same as at study entry in 1 mother, and the titer of Id antibodies was increased (by 38–53%) in 2 mothers.

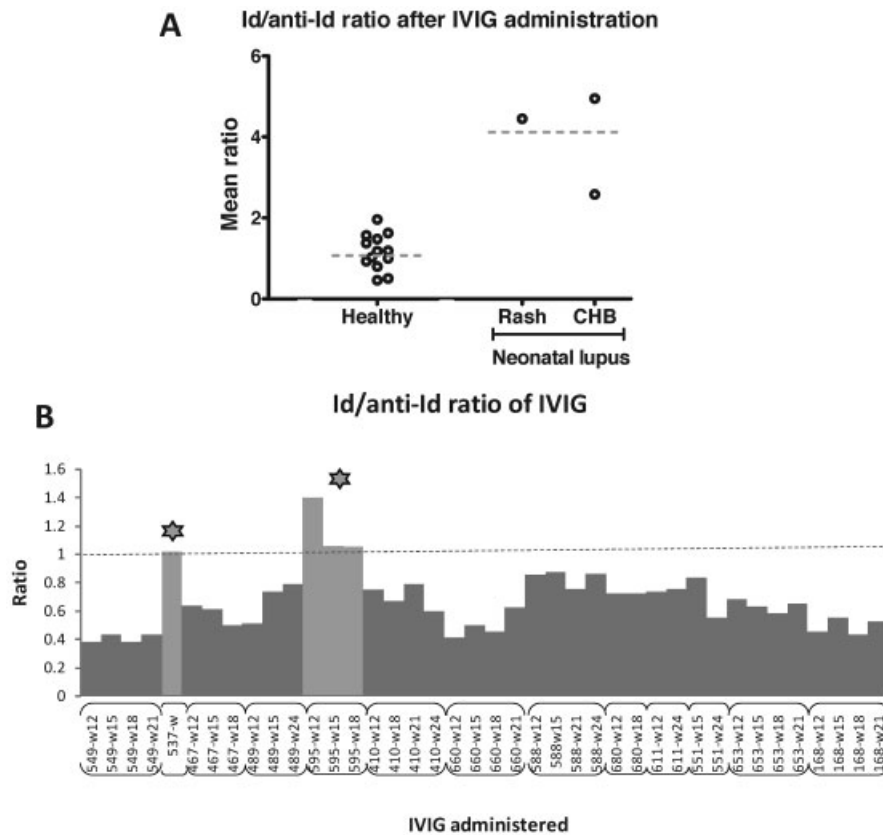
**The Id:anti-Id ratio of antibodies against the major epitope of La/SSB predicts the appearance of neonatal lupus in anti-La–positive sera.** In the 2 mothers whose study pregnancy resulted in the birth of a child with neonatal lupus and for whom sequential sera were available (patients 595 and 575), anti-Id antibody titers did not increase. Although the Id antibody titers in these 2 mothers were decreased by 32% and 42%, respectively, these titers remained 4.96- and 4.45-fold higher than the anti-Id antibody titers. In contrast, mothers who gave birth to a healthy child had either a lower titer of Id

antibodies than anti-Id antibodies or a robust increase in anti-Id antibodies during the period of IVIG treatment, bringing their levels very close to the levels of Id antibodies by the end of therapy ( $t = 6.81$ ,  $P < 0.0001$ , average difference between Id and anti-Id titer in patients 595 and 575 versus the other 13 mothers). Furthermore, all 3 anti-La–positive mothers who gave birth to a child with neonatal lupus exhibited significantly higher Id:anti-Id ratios than those in mothers whose study pregnancy did not result in the birth of a child with neonatal lupus ( $t = 7.09$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 1A).

**Confirmatory detection of anti-Id antibodies using highly purified F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-La(349–364) antibodies.** Although previous studies in our laboratory revealed that complementary peptides could be efficiently used for detection of anti-La/SSB anti-Id antibodies (12), we further confirmed detection of anti-Id antibodies using highly purified F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-La(349–364) (Id) antibodies. Sequential sera from 7 anti-La/SSB–positive mothers were used in this assay. The reactivity patterns obtained by the direct detection of anti-Id antibodies were found to be almost identical to those obtained using complementary peptides, for all series of sera tested.

**Removal of anti-Id antibodies enhances the reactivity of antibodies against the major epitope of La/SSB, La(349–364).** Our previous work showed that anti-Id antibodies are able to mask the anti-La/SSB response; and dissociation of Id–anti-Id immune complexes followed by blocking of anti-Id antibodies disclosed the hidden autoantibody activity (12). In the present study we used a similar approach, dissociating Id–anti-Id complexes by heating and removing the anti-Id antibodies with beads coated with anti-La(349–364) antibodies. We found that removal of anti-Id antibodies increased the idiotypic reactivity pattern in sequential sera from 5 of 7 mothers tested. None of these 5 mothers gave birth to a child with neonatal lupus during the study. In the serially tested sera from the remaining 2 mothers, there was no significant alteration of idiotypic activity; 1 of these 2 mothers gave birth to a child with neonatal lupus.

**Inadequate content of anti-Id antibodies in IVIG preparations administered to the mothers of children with neonatal lupus.** The increase in anti-Id activity after IVIG administration observed in the majority of mothers could be attributed to the exogenous addition of anti-Id antibodies contained in the IVIG preparation. Thus, we examined the Id and anti-Id content of the IVIG preparations given to 13 anti-La/SSB–positive mothers. IVIG preparations were found to contain

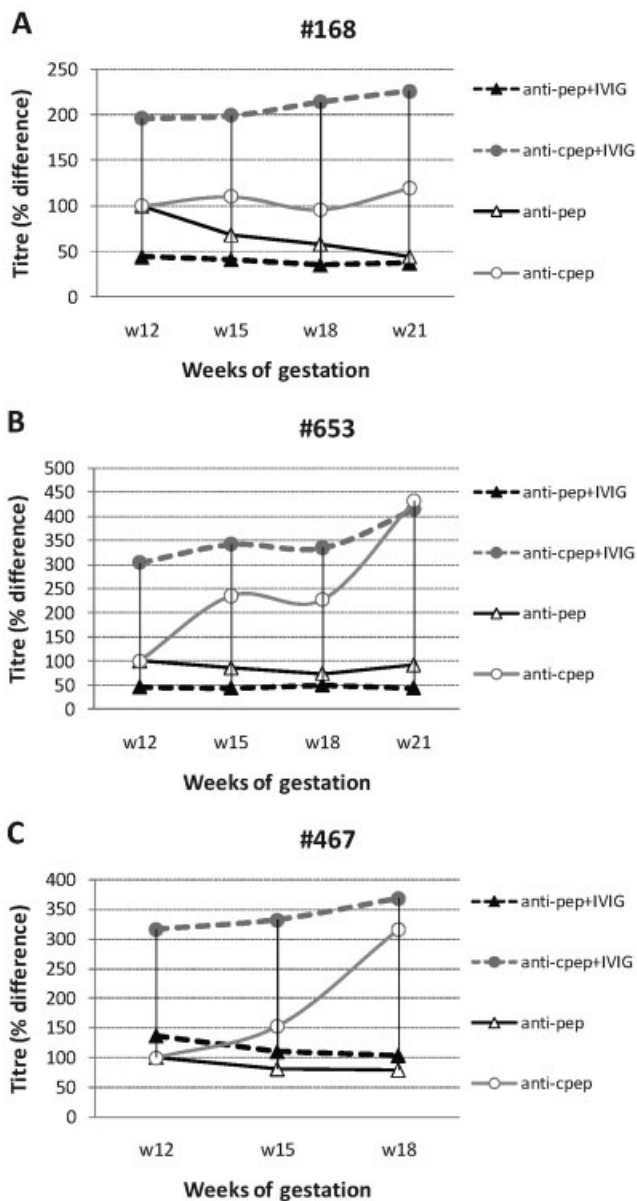


**Figure 1.** **A**, Idiotype:antiidiotype (Id:anti-Id) ratio of antibodies against the major epitope of La/SSB after intravenous immunoglobulin (IVIG) administration, in mothers who gave birth to a child with neonatal lupus and mothers who gave birth to a healthy child. Horizontal dashed bars show the mean. The mean Id:anti-Id ratio was significantly higher in the mothers who gave birth to a child with neonatal lupus than in those who gave birth to a healthy child ( $P < 0.0001$ ). CHB = congenital heart block. **B**, Id:anti-Id ratios in the IVIG preparations received by 13 of the 16 mothers. The Id:anti-Id ratio in the IVIG received by the mothers who gave birth to a child with neonatal lupus (stars) was  $\geq 1$ , and the mean Id:anti-Id ratio in the IVIG received by these mothers was higher than that in the IVIG received by mothers who gave birth to a healthy child ( $P < 0.0001$ ). Labels below the bars show the patient number and week of IVIG administration.

anti-Id antibodies, but the titers fluctuated between batches. Moreover, the ratios of Id:anti-Id activity in the IVIG administered to mothers who gave birth to a child with neonatal lupus were  $\geq 1$ , which was a higher ratio than the ratios found in the IVIG from batches administered to mothers giving birth to a healthy child (0.41–0.84) ( $t = 6.43$ ,  $P < 0.0001$ ). Accordingly, mothers who gave birth to a healthy child had received IVIG containing higher anti-Id activity in relation to Id activity compared to mothers who gave birth to a child with neonatal lupus (Figure 1B).

**Exogenous addition of IVIG increases further anti-Id reactivity in maternal sera.** To explore the potential of IVIG to further increase the anti-La/SSB

anti-Id activity in recipients' sera, we added to each mother's serum (which had been collected just prior to IVIG administration) 5.7 mg/ml of the IVIG preparation that the woman had actually received at each treatment time point. In sera from 11 of 13 women, exogenous IVIG addition enhanced anti-Id activity by 1.20–4.70-fold. Activity in sera from 3 representative patients is shown in Figure 2. No significant alteration in anti-Id activity was observed in sera from the remaining 2 women. In parallel, Id activity was reduced in sera from 9 of 13 women (by 10–53%), remained stable in serum from 1 woman, and increased (by 1.25–1.79-fold) in sera from the remaining 3 women. Overall, in 12 of 13 women, exogenous addition of IVIG led to higher



**Figure 2.** Direct effect of IVIG on the Id–anti-Id network and the level of pathogenic autoantibodies in 3 representative patients (patients 168 [A], 653 [B], and 467 [C]). Exogenous IVIG preparations (5.7 mg/ml) were added to serum that had been collected during pregnancy just prior to administration of IVIG treatments. Anti-Id activity (anti-cpep) was substantially increased, whereas Id activity (anti-pep) was not significantly affected. See Figure 1 for other definitions.

increases of antiidiotypic than of idiotypic activity. Examples of reactivity patterns are available upon request from the corresponding author.

## DISCUSSION

CHB is closely associated with the presence of anti-Ro and anti-La antibodies (2). It has been hypothesized that maternal autoantibodies trigger an inflammatory cascade that leads to irreversible fibrotic replacement of the fetal AV node (3,14). Therefore, once (third-degree) CHB develops in the fetus, it cannot be reversed with any available treatment. The condition is fatal in ~20% of cases. The incidence of CHB is 10-fold higher in the offspring of mothers who are positive for anti-Ro and anti-La antibodies and have had a child with neonatal lupus (8), comprising the group of high-risk pregnancies. In these cases, prophylactic therapy would be particularly beneficial.

Proposed mechanisms to explain how IVIG prevents tissue damage have included the following: 1) it increases elimination of maternal anti-Ro and anti-La; 2) it reduces transplacental transport of antibodies; and 3) it modulates the inhibitory signals on macrophages, with consequent reduction of the inflammatory response and fibrosis in the fetal heart (15–17). In the PITCH study, IVIG was given to prevent development of CHB in the fetuses of 20 high-risk pregnant women (11). In parallel, a study using an identical treatment protocol in 15 high-risk pregnant women was conducted in Europe (18). Both studies were discontinued after reaching the stopping rule, i.e., detection of 3 cases of CHB among the first patients who were enrolled (11,18). Despite the finding that administration of IVIG at low doses does not prevent the recurrence of CHB, it was of particular interest to study how IVIG alters the Id–anti-Id network of pathogenic autoantibodies in the sera of mothers enrolled in the PITCH study.

Our previous work suggested that the presence of anti-Id antibodies to autoantibodies against La/SSB may protect the fetus by blocking the pathogenic maternal autoantibodies (10). This finding prompted us to investigate in detail the Id–anti-Id network of anti-La/SSB antibodies among mothers enrolled in the PITCH study. Sixteen of 20 mothers who completed the PITCH study were anti-La/SSB positive, and 3 gave birth to a child with neonatal lupus (2 with CHB and 1 with rash). The sera of the mothers of all 3 infants with neonatal lupus had a significantly higher Id:anti-Id antibody ratio than those of the mothers who gave birth to a healthy child, suggesting an inadequate antiidiotypic response after IVIG administration.

Therefore, unbalanced idiotypic antibodies, targeting the major epitope of La/SSB by antiidiotypic antibodies, may be an important determinant of neona-



tal lupus occurrence in the offspring of mothers treated with IVIG. However, it was unclear how each dose of IVIG alters the anti-Id network and influences Id and anti-Id antibody levels. To address this question, we carried out detailed analyses of Id and anti-Id reactivity in maternal sera at each time point of IVIG administration. Repeated IVIG administration led to a gradual increase of anti-Id activity and a decrease of Id activity in the majority of cases, bringing the levels of anti-Id antibodies close to the levels of Id antibodies. However, this was not the case for the mothers of the affected children with neonatal lupus; in sera from these mothers, anti-Id antibody titers did not approach those of the Id antibodies.

Inadequate anti-Id response has been recently correlated with the appearance of other autoimmune diseases, such as type 1 diabetes mellitus (DM) (19). Type 1 DM is characterized by the presence of autoantibodies to glutamate decarboxylase 65 (GAD65) (20). GAD65 antibodies often herald the onset of type 1 DM by months or years and, together with other autoantibodies to islet cells, are used to predict disease (21). Recently, Oak et al demonstrated that masked GAD65 antibodies are present in the healthy population and the absence of a particular anti-Id antibody, rather than GAD65 antibodies per se, is a characteristic of type 1 DM (19). Consistent with this concept are our results, which suggest the existence of masked Id antibodies (by anti-Id antibodies) in the mothers who gave birth to a healthy child. More specifically, we found that elimination of anti-Id antibodies from the sera of mothers treated with IVIG substantially enhanced the autoantibody (Id) activity in 5 of 7 series of sera tested (but not in the sera of 1 mother who gave birth to a child with neonatal lupus).

The increase of anti-Id activity and decrease of Id activity observed in many of the maternal sera following IVIG administration could be attributed to direct addition of anti-Id antibody to the mothers' sera. This hypothesis was confirmed by examining the Id and anti-Id antibody content of the different IVIG preparations administered to 13 of the 16 anti-La/SSB-positive mothers enrolled in the PITCH study. These experiments showed that all but 2 of the mothers had received IVIG preparations with higher anti-Id activity than Id activity. The 2 mothers in whom this was not the case each gave birth to a child with CHB. Thus, it is plausible that the reason IVIG did not prevent CHB in 2 mothers was that they received IVIG with a high Id:anti-Id activity ratio, and thus anti-Id antibodies were not effectively increased.

Previous studies have indicated that IVIG exerts reactivity against different autoantigens, as well as anti-idiotypic antibodies (22–25). This reactivity is likely due to the presence of polyreactive IgG antibodies and anti-Id antibodies in the pooled plasma used for IVIG fractionation (26,27). However, it can be augmented by various chemical treatments to which the IgG molecules have been subjected during the fractionation process (22,28). More specifically, the production process of commercial IVIG preparations (which differs among brands) involves fractionation and virus inactivation steps that include, in some cases, treatment at extreme physical conditions. These procedures significantly affect the autoreactivity of IVIG (22). Therefore, it is not surprising that different brands and batches of commercial IVIG (as used in the PITCH study) do not have identical Id and anti-Id antibody content.

Exogenous addition, to individual women's serum, of the IVIG preparation that they had received at each study time point during pregnancy led to a large increase in anti-Id activity and a small decrease in Id activity in the majority of sera tested. In this respect, higher doses of IVIG (up to 2 mg/kg), which are presumed to be safe in pregnancy (29,30), might be more efficient for the prevention of neonatal lupus. Moreover, given that the IVIG preparations administered to mothers who gave birth to a child with CHB had an Id:anti-Id activity ratio of  $\geq 1$ , pretesting of IVIG and selecting preparations with low Id–anti-Id potential for administration to high-risk women might be more efficacious in preventing neonatal lupus and CHB.

In conclusion, our study demonstrates that IVIG preparations contain anti-Id antibodies, and their administration can enhance the anti-idiotypic antibody response in pregnant women who are positive for anti-La/SSB. The success of IVIG therapy may be a function of the anti-Id potential of each IVIG preparation as well as the Id:anti-Id ratio achieved in maternal sera after administration of IVIG.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Tzioufas had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study conception and design.** Routsias, Moutsopoulos, Buyon, Tzioufas.

**Acquisition of data.** Routsias, Kyriakidis, Friedman, Llanos, Clancy, Moutsopoulos, Buyon, Tzioufas.

**Analysis and interpretation of data.** Routsias, Kyriakidis, Moutsopoulos, Buyon, Tzioufas.

## REFERENCES

- Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:140–54.
- Buyon JP, Clancy RM. Neonatal lupus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' lupus erythematosus*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1058–80.
- Buyon JP, Clancy RM, Friedman DM. Autoimmune associated congenital heart block: integration of clinical and research clues in the management of the maternal/foetal dyad at risk. *J Intern Med* 2009;265:653–62.
- Cimaz R, Spence DL, Hornberger L, Silverman ED. Incidence and spectrum of neonatal lupus erythematosus: a prospective study of infants born to mothers with anti-Ro autoantibodies. *J Pediatr* 2003;142:678–83.
- Brucato A, Frassi M, Franceschini F, Cimaz R, Faden D, Pisoni MP, et al. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counter-immunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum* 2001;44:1832–5.
- Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M, et al. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1658–66.
- Julkunen H, Eronen M. The rate of recurrence of isolated congenital heart block: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2001;44:487–8.
- Llanos C, Izmirly PM, Katholi M, Clancy RM, Friedman DM, Kim MY, et al. Recurrence rates of cardiac manifestations associated with neonatal lupus and maternal/fetal risk factors. *Arthritis Rheum* 2009;60:3091–7.
- Strandberg L, Winqvist O, Sonesson SE, Mohseni S, Salomonsson S, Bremme K, et al. Antibodies to amino acid 200-239 (p200) of Ro52 as serological markers for the risk of developing congenital heart block. *Clin Exp Immunol* 2008;154:30–7.
- Stea EA, Routsias JG, Clancy RM, Buyon JP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Anti-La/SSB antiidiotypic antibodies in maternal serum: a marker of low risk for neonatal lupus in an offspring. *Arthritis Rheum* 2006;54:2228–34.
- Friedman DM, Llanos C, Izmirly PM, Brock B, Byron J, Copel J, et al. Evaluation of fetuses in a study of intravenous immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block: results of a multicenter, prospective, open-label clinical trial. *Arthritis Rheum* 2010;62:1138–46.
- Routsias JG, Touloupi E, Dotsika E, Mouliou A, Tsikaris V, Sakarellos C, et al. Unmasking the anti-La/SSB response in sera from patients with Sjögren's syndrome by specific blocking of anti-idiotypic antibodies to La/SSB antigenic determinants. *Mol Med* 2002;8:293–305.
- Routsias JG, Dotsika E, Touloupi E, Papamattheou M, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, et al. Idiotype–anti-idiotype circuit in non-autoimmune mice after immunization with the epitope and complementary epitope 289–308aa of La/SSB: implications for the maintenance and perpetuation of the anti-La/SSB response. *J Autoimmun* 2003;21:17–26.
- Clancy RM, Kapur RP, Molad Y, Askanase AD, Buyon JP. Immunohistologic evidence supports apoptosis, IgG deposition, and novel macrophage/fibroblast crosstalk in the pathologic cascade leading to congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2004;50:173–82.
- Yu Z, Lennon VA. Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases. *N Engl J Med* 1999;340:227–8.
- Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol* 1996;157:3317–22.
- Miranda-Carus ME, Askanase AD, Clancy RM, Di Donato F, Chou TM, Libera MR, et al. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF- $\alpha$  by macrophages. *J Immunol* 2000;165:5345–51.
- Pisoni CN, Brucato A, Ruffatti A, Espinosa G, Cervera R, Belmonte-Serrano M, et al. Failure of intravenous immunoglobulin to prevent congenital heart block: findings of a multicenter, prospective, observational study. *Arthritis Rheum* 2010;62:1147–52.
- Oak S, Gilliam LK, Landin-Olsson M, Torn C, Kockum I, Pennington CR, et al. The lack of anti-idiotypic antibodies, not the presence of the corresponding autoantibodies to glutamate decarboxylase, defines type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5471–6.
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347:151–6.
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996;45:926–33.
- Djoumerska I, Tchorbanov A, Pashov A, Vassilev T. The autoreactivity of therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations depends on the fractionation methods used. *Scand J Immunol* 2005;61:357–63.
- Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. A V region-connected autoreactive subfraction of normal human serum immunoglobulin G. *Eur J Immunol* 1992;22:1701–6.
- Vassilev TL, Bineva IL, Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Variable region-connected, dimeric fraction of intravenous immunoglobulin enriched in natural autoantibodies. *J Autoimmun* 1995;8:405–13.
- Djoumerska IK, Tchorbanov AI, Donkova-Petrini VD, Pashov AD, Vassilev TL. Serum IgM, IgG and IgA block by F(ab')<sub>2</sub>-dependent mechanism the binding of natural IgG autoantibodies from therapeutic immunoglobulin preparations to self-antigens. *Eur J Haematol* 2005;74:101–10.
- Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995;7:812–8.
- Saenko VA, Kabakov AE, Poverenny AM. Hidden high-avidity anti-DNA antibodies occur in normal human gammaglobulin preparations. *Immunol Lett* 1992;34:1–5.
- Bouvet JP, Stahl D, Rose S, Quan CP, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents. *J Autoimmun* 2001;16:163–72.
- Branch DW, Peaceman AM, Druzin M, Silver RK, El-Sayed Y, Silver RM, et al, for the Pregnancy Loss Study Group. A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:122–7.
- Berkowitz RL, Lesser ML, McFarland JG, Wissert M, Primiani A, Hung C, et al. Antepartum treatment without early cordocentesis for standard-risk alloimmune thrombocytopenia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2007;110:249–55.

**TLR3 stimulation promotes Ro52/TRIM21 synthesis and nuclear redistribution in salivary gland epithelial cells, partially via Type I interferon pathway**

Nikolaos C. Kyriakidis, BSc<sup>1\*</sup>, Efstathia K. Kapsogeorgou, PhD<sup>1\*</sup>, Vassiliki C. Gourzi, MD<sup>1</sup>, George E. Baltatzis, PhD<sup>2</sup>, Athanasios G. Tzioufas, MD<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>: Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Greece.

<sup>2</sup>: Department of Pathology, School of Medicine, National University of Athens, Greece.

\* Authors contributed equally to the study

**Submitted for publication: Journal of Autoimmunity**

**Correspondence address:** Athanasios G. Tzioufas, MD, Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, 75 Mikras Asias street, Athens 11527, Greece. Tel.: +30-210-7462513, Fax: +30-210-7462664, e-mail: [agtzi@med.uoa.gr](mailto:agtzi@med.uoa.gr)

**Keywords:** Sjögren's syndrome, Ro52/TRIM21 autoantigen, TLR3, type-I interferons, salivary gland epithelial cells

**Abbreviations:** SS: Sjögren's syndrome; TLR: Toll-like Receptor;

**Word count:** 4186

**Grants:** This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund–ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: “Heracleitus II: Investing in knowledge society through the European Social Fund”.

Authors have no financial or personal conflict of interest to declare.

## ABSTRACT

**Background-Objective:** Upregulated expression of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB autoantigens has been described at the salivary gland epithelial cells (SGEC) of patients with Sjögren's syndrome (SS). SGECs, the key regulators of autoimmune SS responses, express high levels of surface functional TLR3, whereas Ro52/TRIM21 negatively regulates TLR3-mediated inflammation. Herein, we investigated the effect of TLR3-signaling on the expression of Ro52/TRIM21, as well as Ro60/TROVE2 and La/SSB autoantigens, by SGECs.

**Methods:** The effect of TLR3- or TLR4-stimulation on autoantigen expression was evaluated by polyI:C or LPS treatment, respectively, of SGEC-lines (10 from SS-patients, 12 from non-SS controls) or HeLa cells, followed by analysis of mRNA and protein expression.

**Results:** PolyI:C, but not LPS, resulted in a two-step induction of Ro52/TRIM21 mRNA expression by SGECs, a 12-fold at 6-hrs followed by a 2.5-fold increment at 24-48-hrs, whereas it induced a late 2-fold upregulation of Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs at 48-hrs. Although, protein expression levels were not significantly affected, the late upregulation of Ro52/TRIM21 mRNA was accompanied by the nuclear redistribution of the protein, from nucleolar-like pattern to multiple coarse dots spanning the nucleus. These late phenomena were significantly mediated by IFN $\beta$  production, as attested by cognate secretion and specific inhibition experiments. TLR3-signaling had similar effects on SGECs obtained from SS patients and controls, whereas it did not affect the expression of these autoantigens in HeLa cells.

**Conclusion:** TLR3-signaling regulates the expression of autoantigens by SGECs, implicating innate immunity pathways in their overexpression at inflamed tissues and possibly in their exposure to immune system.



## INTRODUCTION

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies against the protein component of the human intracellular ribonucleoprotein-RNA complexes and more specifically the proteins Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB.

The mechanisms mediating the exposure of intracellular autoantigens to the immune system and the production of sufficient amounts of autoantibodies are largely unknown. The critical overview of the published data supports that autoimmune humoral responses are antigen driven, since: a) most of autoantibodies detected are of the IgG class, suggesting that an antigen-dependent T-cell help should be provided (1), b) the autoimmune responses are mainly polyclonal, targeting multiple epitopes within the autoantigen (1), and c) immunization of experimental animals with fragments of the autoantigens results in intra- and inter-molecular spreading of the immune response, similar to that observed after immunization with foreign antigens (2, 3). The affected exocrine glands appear to serve as a major site of autoantibody formation, because a) saliva of SS patients contains high levels of IgG and anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies, b) ectopic germinal centers in the salivary glands are seen in around 20% of patients and contain autoreactive B cells, and c) many of the infiltrating plasma cells contain intracytoplasmic immunoglobulins with anti-Ro/SSA activity (4, 5). In this venue, the epithelial cell appears to play a central role. Indeed, the main characteristic of the immunopathologic lesion of SS is the activation of epithelial cells; salivary gland epithelial cells (SGEC) are potent regulators of local innate and adaptive immune responses, since they bear the functional armamentarium of an antigen-presenting cell, including MHC-class II molecules and translocation of nuclear autoantigens into cytoplasm and cellular membrane. Also, they express plethora of functional immunoregulatory molecules, including costimulatory molecules, cytokines, chemokines and TLRs. TLR3 expression deserves

particular attention, since: a) its constitutive expression by SGECs is high and, in contrast to the cytoplasmic localization that is described in resting immunocytes, it is localized on the cell-surface suggesting an activation of this pathway in SGECs b) it is functional, since TLR3 stimulation on SGECs by polyI:C results in the up-regulation of several immune-modulatory molecules, as well as anoikis-induced cell death (6-8), and c) its natural ligand is dsRNA, that can be delivered locally either from viruses or damaged cells (9).

Ro52/TRIM21 has been implicated in the negative regulation of TLR3 mediated inflammation by promoting the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of interferon regulatory factors (IRFs) 3, 5, 7 and 8 (10, 11). On the other hand, interferons (IFNs), which are produced upon TLR3 ligation, have been shown to up regulate Ro52/TRIM21 expression (12, 13). Although the regulatory role of Ro52/TRIM21 in TLR3 signaling is well-established, the reciprocal interaction has never been studied.

Herein, we investigated the effect of TLR3 signaling on the expression of Ro52/TRIM21, and the other autoantigens of the Ro/La ribonucleoprotein hY-RNA complex Ro60/TROVE2 and La/SSB, in non-neoplastic long-term cultured SGECs, as well as in neoplastic epithelial HeLa cells that served as a control cell-line. TLR3, but not TLR4, signaling was found to result in a two-step induction of Ro52/TRIM21 mRNA expression by SGECs, while Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs were up-regulated to a lesser -yet significant- extent. The second step increment of Ro52/TRIM21 mRNA expression was accompanied by protein redistribution at the nucleus of the living cells. The late mRNA induction and protein redistribution were largely mediated by IFN $\beta$  production. In contrast to SGECs, TLR3 signaling in HeLa did not affect the expression and localization of autoantigens, as well as IFN production, suggesting a differential regulation of signaling pathways in non-neoplastic and neoplastic epithelial cells.

## MATERIALS & METHODS

**Reagents.** Mouse monoclonal antibodies (mAbs) against human Ro60/TROVE2 (clone 1F2) and La/SSB (clone 1D6-H5) were purchased from AbD-Serotec (Oxford, UK), whereas against  $\beta$ -actin (clone 2F1-1) from Biolegend (San Diego, CA, USA). Rabbit polyclonal antibodies against human Ro52/TRIM21, IFN $\beta$  (for use in paraffin-embedded tissues) and histone-H4 were from Novus-Biologicals (Cambridge, UK), Merck Millipore (Darmstadt, Germany) and Biolegend, respectively. The monoclonal and polyclonal isotype-matched antibody controls were from Dako (Glostrup, Denmark). Neutralizing mAbs against human IFN $\alpha$  (clone MMHA-2) and IFN $\alpha/\beta$  receptor chain2 (clone MMHAR-2) were from PBL Interferon Source (Piscataway, NJ, USA), those against human IFN $\beta$  (clone 76703) and IFN $\gamma$  (clone 25718) from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), whereas isotype-controls were from BD-Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Secondary antibodies used in confocal microscopy included goat anti-mouse IgG, DyLight<sup>TM</sup> 549-Conjugated (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG, and Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase, such as Pierce goat anti-mouse IgG (Thermo Scientific) and goat anti-rabbit Igs (Dako) were applied in immunoblotting.

Commercially available ELISA kits were used for the assessment of cytokine production. Human IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$  ELISA kits were from Life Technologies, IL-7 from R&D Systems, whereas IL-2, IL-4 and IL-17 from Biolegend.

The analogue of TLR3 ligand polyinosinic:cytidylic acid (polyI:C) and the TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli*) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

**Cell lines.** Non-neoplastic, long-term cultured SGEC lines were established by standard explant outgrowth technique (14) from a lobule of minor salivary gland (MSG) biopsy obtained from individuals undergoing diagnostic evaluation for Sjögren's syndrome (SS). Twenty-two SGEC lines were included in the study. Ten were obtained from SS patients according to the American–European SS classification criteria (15) and twelve from non-SS controls (individuals that were complaining for sicca symptoms and were not fulfilling the above-mentioned criteria, had a negative biopsy and did not exhibit serological features consistent with SS). Six out of ten SS patients were positive for anti-Ro52/TRIM21, four for anti-Ro60/TROVE2 and three for anti-La/SSB autoantibodies. All samples were gathered and used after informed consent. The study was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine, National University of Athens, Greece (Protocol No.: 5107). The purity and epithelial origin of cultured SGEC lines, was routinely verified by morphology, the uniform expression of epithelial-specific markers and the absence of markers indicative of lymphoid/monocytoid cells (14).

The neoplastic HeLa cells were cultivated in DMEM medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (all from Life Technologies).

The lack of endotoxin contamination was investigated by routinely testing all culture reagents by the chromogenic Limulus amoebocyte lysates assay (Sigma, St Louis, MO, USA).

**Stimulation of TLRs on epithelial cells.** SGECs or HeLa were cultured to confluence in collagen-treated 6-well plates or 16-well chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) as previously described (14). Subsequently, cells were exposed to medium alone or medium containing polyI:C, (5- $\mu$ g/ml, TLR3 ligand) or LPS (1- $\mu$ g/ml, TLR4 ligand) for various time-points (6, 12, 24, 48 and 72-hrs). In preliminary experiments, the effect of treatment with suboptimal (0.5- $\mu$ g/ml) or optimal (5- $\mu$ g/ml) concentrations of polyI:C (6) was

evaluated. HeLa cells served as a control epithelial cell line. The effect of TLR signaling on the expression of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB molecules at the mRNA level was examined by real-time quantitative PCR and at the protein level by confocal microscopy and immunoblotting analyses.

**Reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT–qPCR).** DNase-treated RNA was isolated using the mirVana™ PARIS™ kit (Ambion, Applied Biosystems, USA) and the Ambion® TURBO DNA-free™ kit (Ambion). cDNA was prepared from 0.25-μg RNA by the High Capacity RNA to DNA kit (Applied Biosystems). Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs were analyzed by quantitative real-time PCR using commercially available primers specific for each molecule (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Human HPRT1 (TaqMan® Gene Expression Assays) served as the reference gene. All samples were run in duplicates. The relative quantification of PCR products was performed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (16) using HeLa cells as the calibrator. The PCR conditions were the same for all genes and consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 10-min, followed by 50 cycles of 95 °C for 15-sec and 60 °C for 1-min.

**Confocal microscopy.** The expression and localization of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB proteins were assessed by confocal microscopy in SGECs grown in 16-well chamber slides (Nalge Nunc), as previously described (7). Briefly, cells were fixed with methanol for 10 min followed by acetone for 2 min at –20 °C. Nonspecific antibody binding was blocked by incubation with 1.5% non-immune fetal bovine serum. The incubation with antibodies against human Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB proteins or isotype-matched control antibodies was performed overnight at 4 °C in a humidified chamber and was followed by 30-min incubation with appropriate fluorescence-conjugated secondary antibodies at room temperature. Images were acquired by an Olympus FV1000 confocal laser scanning microscope.

**Immunoblotting analysis.** The expression of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB proteins by SGECs or HeLa cells was also evaluated by standard SDS-PAGE electrophoresis of nuclear or cytoplasmic extracts followed by immunoblotting with specific antibodies (17). Briefly, nuclear or cytoplasmic extracts of resting, polyI:C or LPS-treated SGECs were prepared by the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Scientific), electrophorized in 10% polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Millipore). Immunoblotting was performed with specific or isotype control antibodies in 1% skim milk in TBS/0.1% Tween-20 for 2-hrs, followed by an 1-hr incubation with the appropriate alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies. Signals were visualized by enhanced chemiluminescence using the CDP-Star substrate (Roche).

**Assessment of interferon production.** TLR3 signaling has been strongly associated with the induction of interferon expression. The production of interferons as a response to TLR stimulation was investigated in resting, polyI:C or LPS-treated SGECs or HeLa cells at both mRNA and protein level. The expression of IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$  mRNAs was examined by quantitative real-time PCR using commercially available specific TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems). The secretion of respective interferons was investigated in cell-free culture supernatants of resting, polyI:C or LPS-treated epithelial cells by specific commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), according to the manufacturer's instructions. Supernatants were collected at the end of cultivation period and kept at -80°C until further testing.

**Interferon blockade.** The implication of interferons in the TLR3-mediated modulation of the Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB expression was evaluated by the addition of specific neutralizing antibodies against IFN $\alpha$  (5 $\mu$ g/ml), IFN $\beta$  (10 $\mu$ g/ml), IFN $\gamma$  (5 $\mu$ g/ml) or IFN $\alpha$ / $\beta$  receptor (5 $\mu$ g/ml) 30-min before treatment with polyI:C.

**Statistical Analyses.** Statistical analyses were performed by the non-parametric Mann-Whitney test, using the GraphPad-Prism 4.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only statistically significant differences are reported.

## **RESULTS**

### **Prolonged TLR3 stimulation leads a significant proportion of epithelial cells to apoptotic cell death via anoikis**

In line with previous data (6), prolonged polyI:C stimulation resulted in the detachment-induced apoptotic cell death or anoikis of SGECs. This was evident from 24-hrs of treatment and reached approximately 30-40% cell loss at 72-hrs of treatment. On the contrary, LPS treatment did not result in detectable loss of cell anchorage and subsequent apoptotic death.

### **PolyI:C treatment induces a two step increment of Ro52/TRIM21 mRNA expression in SGECs, but not in HeLa cells.**

Stimulation of TLR3 for several time points (6, 12, 24, 48, 72 hrs) resulted in a significant upregulation of Ro52/TRIM21 mRNA expression, which was readily evident from 6-hrs [mean fold increase $\pm$ standard error (SE): 12.07 $\pm$ 3.12,  $p < 0.0001$ ] (Figure-1A). This expression remained mainly unchanged until 12- to 24-hrs and was followed by a second-step increment that peaked at 48-hrs (mean fold increase $\pm$ SE: 2.46 $\pm$ 0.27,  $p < 0.0001$ ). However, stimulation with polyI:C was not found to readily affect Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNA levels. Their expression was slightly, but statistically significantly, increased upon 48-hrs of treatment (mean fold increase $\pm$ SE: 2.00 $\pm$ 0.23,  $p = 0.0002$  and 1.70 $\pm$ 0.12,  $p = 0.0014$  for Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs, respectively) (Figure-1B, C). The levels of expression of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs, as well as their pattern of induction by polyI:C

treatment, was not found to differ between SGEC lines obtained from SS patients and non-SS controls and it did not correlate with the presence of autoantibodies against any of these proteins (data not shown). On the other hand, stimulation with LPS, which is the ligand of TLR4, had no effect on the expression levels of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNAs by SGECs. In contrast to SGECs, the expression of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 or La/SSB mRNAs by HeLa neoplastic cells was not affected by either polyI:C or LPS treatment (Figure-1).

**PolyI:C treatment induces the redistribution of Ro52/TRIM21 protein at the nucleus of SGECs, but not HeLa cells.**

PolyI:C treatment has not been found to affect the levels of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB proteins in SGECs, as attested by immunoblotting and confocal microscopy analysis (Figure-2). However, polyI:C stimulation resulted in late (48- and 72-hrs) nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 protein in SGECs. Confocal microscopy revealed low cytoplasmic and strong nuclear staining of Ro52/TRIM21 protein in resting SGECs. This nuclear Ro52/TRIM21 staining was localized in one to three nuclear dots, resembling nucleolar staining. This pattern of expression remained unchanged during the first 24-hrs of polyI:C treatment, whereas it changed in late treatments, after 48-hrs. At 48- and 72-hrs, the nucleolar-like pattern of Ro52/TRIM21 expression changed to multiple coarse dots spanning throughout the nucleus (Figure-2B). Treatment with LPS had no effect on Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB protein expression or distribution (Figure-2B). In accordance with mRNA results, SGEC lines obtained from SS patients and non-SS controls responded similarly. Suboptimal (0.5- $\mu$ g/ml polyI:C) and optimal (5- $\mu$ g/ml polyI:C) stimulation of TLR3 (6) had similar effects on Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB mRNA and protein expression (data not shown).



Neither polyI:C nor LPS stimulation had an effect on Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB protein expression or distribution in HeLa cells. However, the constitutive expression pattern of Ro52/TRIM21 was different from that of SGECs. Ro52/TRIM21 protein was localized at nucleolar-like structures, but it mainly resided at the cytoplasm and was not affected by TLR signaling (data not shown and Figure-3B).

**The late polyI:C-induced upregulation of Ro52/TRIM21 mRNA expression and protein redistribution in SGECs is mainly mediated by IFN $\beta$  production**

The fact that the second step increment of Ro52/TRIM21 mRNA and its nuclear redistribution in SGECs upon polyI:C treatment are late phenomena, suggests that they are mediated by a factor produced downstream of TLR3 signaling. Taking into consideration that these phenomena were not evident upon LPS treatment, which mainly leads to the production of TNF $\alpha$ , and that interferons, the major cytokines induced by TLR3 stimulation, are potent inducers of Ro52/TRIM21 expression, we investigated the participation of interferons in the polyI:C-induced Ro52/TRIM21 mRNA induction and protein redistribution. As expected, exogenous administration of type-I and II interferons, such as IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$ , readily resulted in significant upregulation of Ro52/TRIM21 mRNA levels, which was evident from 6-hrs of treatment and remained relatively stable thereafter (mean fold induction of 6-hrs vs untreated SGECs $\pm$ SE: 3.0 $\pm$ 0.05, 7.7 $\pm$ 1.1 and 7.0 $\pm$ 0.9 for IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$ , respectively). Similarly, treatment of HeLa cells with IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$  for 6-hrs led to a respective 12.6 $\pm$ 0.05, 10.7 $\pm$ 1.2 and 5.8 $\pm$ 1.15 fold induction of the constitutive Ro52/TRIM21 mRNA expression, which remained unchanged thereafter. Furthermore, the exogenous administration of IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  or IFN $\gamma$  in SGECs, but not in HeLa cells, caused the above-described nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 from nucleolar-like pattern to multiple coarse dots, an effect that was evident from 24-hrs of treatment (Figure-3).

Subsequently, we investigated the interferon mRNA and protein expression by resting and polyI:C-stimulated SGECs. Expression of IFN $\beta$  mRNA, but not IFN $\alpha$  or IFN $\gamma$ , was induced in polyI:C-treated SGECs. In fact, IFN $\beta$  mRNA was robustly upregulated at 6-hrs of polyI:C, but not LPS, treatment (mean fold induction $\pm$ SE: 1972 $\pm$ 797) and declined thereafter (Figure-4A). In line with mRNA induction, secretion of IFN $\beta$  protein was detected in culture supernatants of polyI:C-treated SGECs. IFN $\beta$  secretion was evident from 6-hrs of treatment and peaked at 12-hrs (Figure-4B), suggesting that it can be implicated in the second step mRNA increment and the nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 protein in SGECs. Production of IFN $\alpha$  was not detected, whereas the stable, low amounts of IFN $\gamma$  that were found in the culture supernatants of resting or polyI:C-treated SGECs were due to the culture medium used, as attested by the lack of mRNA detection and the identification of similar levels of IFN $\gamma$  in unused culture medium (Figure-4B). Neither polyI:C, nor LPS treatment were found to induce interferon mRNA expression or secretion in HeLa cells (data not shown). The secretion of IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 and IL-17 by resting, polyI:C or LPS treated epithelial cells was also investigated. As expected, resting or treated SGECs and HeLa were found to constitutively secrete significant amounts of IL-6, whereas they did not express IL-2, IL-4 and IL-17. In line with previous data (18), polyI:C was found to induce IL-7 secretion from 12-hrs in both SGECs and HeLa cells with the peak to be observed at 72-hrs (20-fold and 10-fold, respectively). Similarly to polyI:C stimulation, LPS resulted in a 10-fold upregulation of IL-7 secretion by HeLa cells but it was found unable to stimulate its production by SGECs.

The role of interferons in the induction of Ro52/TRIM21 mRNA expression and protein redistribution in SGECs was further verified by blocking each interferon (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  or IFN $\gamma$ ) or the common type-I interferon receptor (IFN $\alpha\beta$ -receptor) with specific neutralizing antibodies or isotype-controls. From these, antibodies against IFN $\beta$  or the common IFN $\alpha\beta$ -receptor were found to significantly inhibit the polyI:C-driven mRNA increment (57,62% and 44,11% inhibition at 48-hrs of treatment, respectively) or nuclear redistribution of

Ro52/TRIM21 in SGECs (Figure-5). Actually, the neutralizing antibodies to IFN $\beta$  and the common IFN $\alpha\beta$ -receptor blocked 66.2% and 86.5%, respectively, of the second step increment of polyI:C-induced Ro52/TRIM21 mRNA expression (12-48-hrs) (Figure-5B).

## **DISCUSSION**

The present study has clearly shown that TLR3 signaling in non-neoplastic human epithelial cells derived from salivary gland biopsies (SGEC) leads to a robust expression of the autoantigen Ro52/TRIM21 and a low, but statistically significant upregulation, of the other autoantigens of the Ro/La hYRNA ribonucleoprotein complex. A two step upregulation of Ro52/TRIM21 mRNA was stimulated by TLR3, but not TLR4, signaling in SGECs, in two phases; an early phase at 6 to 12-hrs, and a late phase, at 24 to 48-hrs, that was largely mediated by the type-I interferon pathway. Interestingly, the late Ro52/TRIM21 mRNA increment in SGECs was accompanied by a nuclear redistribution of the Ro52/TRIM21 protein from nucleolar-like pattern to multiple nuclear dots spanning throughout the nucleus. Both late phenomena were partially, but significantly, inhibited by IFN $\beta$  blockade, whereas TLR3 signaling in SGECs was associated with secretion of IFN $\beta$ , but not IFN $\alpha$  nor IFN $\gamma$ . Ro52/TRIM21 protein, with its capacity to act as an E3 ubiquitin-protein ligase (19, 20) that mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of interferon regulatory factors (IRFs 3, 5, 7 and 8), has been implicated in the negative regulation of TLR3, TLR7 and TLR9 signaling and subsequent type-I interferon production (10, 11). On the other hand, proinflammatory stimuli, such as exposure to IFN $\alpha$  or nitric oxide has been described to induce the expression and nuclear translocation of Ro52/TRIM21 (13, 21), suggesting that, upon danger signals, Ro52/TRIM21 may ubiquitinate nuclear substrates. However, the significance of the nuclear localization and redistribution of Ro52/TRIM21 protein in non-neoplastic SGECs, including its substrate or interacting nuclear elements, needs to be elucidated. In

neoplastic epithelial HeLa cells, the response to TLR3 stimuli and the pattern of expression of Ro52/TRIM21 molecules has been found to differ from the one in SGECs, suggesting that different pathways are operating in neoplastic and non-neoplastic cells.

The exact etiopathogenic pathways underlying SS remain unclear. Although an infectious agent has for long been suspected as the etiologic agent of SS, no study has been conclusive so far. Epithelial cells are considered as important players in the pathogenesis of the disorder (8). Indeed, clinical observations demonstrated that organ involvement, beyond the exocrine glands is mainly due to massive lymphocytic invasion, surrounding and infiltrating the epithelial structures (22). Careful examination of salivary glands reveals activated T- and B-lymphocytes surrounding the salivary ducts. Epithelial cells are also activated since they express regulatory and inflammatory cytokines, chemokines, as well as costimulatory and accessory molecules capable of inducing autoimmune responses. Furthermore, studies on long-term cultured non-neoplastic SGECs have shown that they are fully equipped with molecules necessary for antigen presentation, transmittance of activation signals to T-cells, recruitment of immune cells and perpetuation of immune responses. Moreover, SGECs have been reported to constitutively express high levels of several Toll-like receptors. Among them, the constitutive expression of TLR3 was found to be remarkably increased in cultured SGECs, as compared to various other types of cells, including macrophages and lymphocytes (7). A major role of TLR3 in the pathogenesis of autoimmune sialadenitis, has also been suggested from studies conducted in mice. In fact, the administration of polyI:C in mice prone to develop a SS-like disease results in a transient, but significant, loss of function of their salivary glands that is accompanied by an upregulation of various type I IFN-responsive genes *in situ* (23). Subsequent studies from the same group have reported that polyI:C injection to NZB/W-F1 mice led to upregulation of various chemokines, followed by an early recruitment of dendritic and NK cells and later of B cells at their submandibular glands (24). Finally, experiments conducted on several strains of

knockout mice treated with polyI:C showed that a combined action of type-I interferons and IL-6 contribute toward salivary gland hypofunction (25).

As described in the opening lines of this report, the major site for autoantibody formation is the affected epithelial tissue. Several studies have demonstrated increased rates of apoptosis at the ductal and acinar glandular epithelia of SS patients (26-29). Apoptotic cell death of SS epithelia represents a potential mechanism whereby nuclear antigens, such as Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB autoantigens, are presented to the immune system in an immunogenic fashion (30). During early apoptosis, La/SSB has been shown to redistribute diffusely to the cytoplasm. In later phases, Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB autoantigens have been shown to mainly locate on the surface of apoptotic blebs and bodies (31). Likewise, apoptosis is a procedure that could introduce autoantigens for presentation to autoreactive T cells. The role of apoptosis of epithelial cells in the induction of SS has been recently shown *in vivo* in an experimental mouse model. In this model, silencing of  $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$  expression in lacrimal epithelial cells led to increased apoptosis of the epithelial cells within the lacrimal glands and the development of a SS-like inflammatory lesion associated with high titers of serum anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies. Administration of caspase-inhibitors inhibited the process, proving, eventually the significant role of apoptosis in the induction of the disease (32).

Our data show that the mediator of the increment of the autoantigens in SGECs is  $\text{IFN}\beta$ . Type-I and II interferons have been strongly implicated in the pathophysiology of SS. More specifically, apart from the initial description of increased levels of circulating type I interferons in patients with SS and SLE (33), accumulated data presented over the last few years suggest that the activated type-I interferon pathway plays a major role in the pathogenesis of SS, since type-I IFN-inducible genes are over-expressed in MSGs and peripheral lymphocytes of SS patients [reviewed in (34)]. Moreover, the detection of a high

number of IFN $\alpha$  producing plasmacytoid dendritic cells in the MSGs of SS patients compared to control tissues suggests their preferential homing within the target tissue (35-37). In line with that, recent findings derived from the affected salivary glands in SS demonstrated that the epithelial cells display both type-I and type-II interferon signature, whereas the surrounding lymphocytes type-II (38). In a broader view, these findings suggest that the major cytokines of the innate immunity (type-I interferons), which can mediate apoptotic cell death upon the appropriate stimulation, co-exist and probably co-operate with the immunoregulatory cytokine IFN $\gamma$ , the major inducer of specific adaptive immune responses within the pathologic lesions (38). The exact triggering of interferon production in the tissues of SS patients is not yet known; endogenous ligands might very well be implicated. In previous studies, it was shown that apoptotic bodies in complex with antibodies can serve as type-I interferon inducers (39). Other studies revealed that ribonucleoprotein complexes containing small RNA molecules (e.g. hY1-RNA), which are prominent targets of the autoimmune responses in SS, can also trigger interferon production via TLR3 or TLR7 ligation of their RNA part (40, 41). Also, IFN $\gamma$  is considered to boost signaling via TLR3 and subsequent type-I interferon responses (42), which in turn augment the expression of autoantigens, apoptosis and consequently the release of apoptotic bodies fully loaded with autoantigens that will further trigger TLR and interferon responses, creating thus a vicious cycle and providing another mechanism for the co-operation of the two types of interferons in regulating the augmentation and maintenance of TLR-mediated immune responses (38).

In summary, TLR3 stimulation in SGEs causes an immediate and an indirect, IFN $\beta$ -dependent, upregulation of Ro52/TRIM21. This mechanism can create large quantities of the intracellular autoantigens that become visible to the immune system through the induction of epithelial cell apoptosis, and release of the autoantigen in the apoptotic blebs. Thus, our findings implicate TLR3, as the molecule at the crossroads of innate and adaptive immunity,

since its ligation provides not only signals for interferon production, but also active synthesis of the intracellular autoantigen that can eventually prime adaptive immune responses.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Professor Haralampos M. Moutsopoulos, MD, FACP, FRCP ACR-master for fruitful discussions and guidance and Professor of Pathology E. Patsouris for his substantial contribution in the confocal microscopy experiments.

## **REFERENCES**

1. Routsias JG, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Autoantibodies to intracellular autoantigens and their B-cell epitopes: molecular probes to study the autoimmune response. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43(3):203-48.
2. Routsias JG, Kyriakidis N, Latreille M, Tzioufas AG. RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med* 2010;16(1-2):19-26.
3. Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM, et al. Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol* 2000;121(3):551-6.
4. Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1998;41(12):2238-48.
5. Tzioufas AG, Hantoumi I, Polihronis M, Xanthou G, Moutsopoulos HM. Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs). *J Autoimmun* 1999;13(4):429-34.
6. Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun* 2010;35(3):212-8.
7. Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2007;147(3):497-503.
8. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):4-8.

9. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-8.
10. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* 2009;206(8):1661-71.
11. Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S, et al. TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol* 2009;182(6):3782-92.
12. Rhodes DA, Ihrke G, Reinicke AT, Malcherek G, Towey M, Isenberg DA, et al. The 52 000 MW Ro/SS-A autoantigen in Sjogren's syndrome/systemic lupus erythematosus (Ro52) is an interferon-gamma inducible tripartite motif protein associated with membrane proximal structures. *Immunology* 2002;106(2):246-56.
13. Strandberg L, Ambrosi A, Espinosa A, Ottosson L, Eloranta ML, Zhou W, et al. Interferon-alpha induces up-regulation and nuclear translocation of the Ro52 autoantigen as detected by a panel of novel Ro52-specific monoclonal antibodies. *J Clin Immunol* 2008;28(3):220-31.
14. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci* 2002;110(1):21-30.
15. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61(6):554-8.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
17. Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1517-21.
18. Jin JO, Shinohara Y, Yu Q. Innate Immune Signaling Induces Interleukin-7 Production from Salivary Gland Cells and Accelerates the Development of Primary Sjogren's Syndrome in a Mouse Model. *PLoS One* 2013;8(10):e77605.
19. Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K, et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol* 2006;176(10):6277-85.
20. Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(1):415-21.
21. Espinosa A, Oke V, Elfving A, Nyberg F, Covacu R, Wahren-Herlenius M. The autoantigen Ro52 is an E3 ligase resident in the cytoplasm but enters the nucleus upon cellular exposure to nitric oxide. *Exp Cell Res* 2008;314(20):3605-13.
22. Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72(2):162-5.
23. Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura PR, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J Oral Pathol Med* 2009;38(1):42-7.



24. Nandula SR, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjogren's syndrome-like disease. *Oral Dis* 2011;17(8):801-7.
25. Nandula SR, Dey P, Corbin KL, Nunemaker CS, Bagavant H, Deshmukh US. Salivary gland hypofunction induced by activation of innate immunity is dependent on type I interferon signaling. *J Oral Pathol Med* 2013;42(1):66-72.
26. Jimenez F, Aiba-Masago S, Al Hashimi I, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK, et al. Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(3):338-42.
27. Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata KM, Masago R, et al. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;88(2):133-41.
28. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, et al. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997;40(1):87-97.
29. Manganelli P, Quaini F, Andreoli AM, Lagrasta C, Pilato FP, Zuccarelli A, et al. Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1997;24(8):1552-7.
30. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med* 1995;181(4):1557-61.
31. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2002;56(5):456-69.
32. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, et al. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity* 2013;38(3):450-60.
33. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* 1979;301(1):5-8.
34. Mavragani CP, Crow MK. Activation of the type I interferon pathway in primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;35(3):225-31.
35. Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Cajander S, Eloranta ML, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1185-95.
36. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2770-5.
37. Vogelsang P, Brun JG, Oijordsbakken G, Skarstein K, Jonsson R, Appel S. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010;69(6):1235-8.
38. Hall JC, Casciola-Rosen L, Berger AE, Kapsogeorgou EK, Cheadle C, Tzioufas AG, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(43):17609-14.

39. Bave U, Alm GV, Ronnblom L. The combination of apoptotic U937 cells and lupus IgG is a potent IFN-alpha inducer. *J Immunol* 2000;165(6):3519-26.
40. Kelly KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J, et al. "Endogenous adjuvant" activity of the RNA components of lupus autoantigens Sm/RNP and Ro 60. *Arthritis Rheum* 2006;54(5):1557-67.
41. Laurie GW, Glass JD, Ogle RA, Stone CM, Sluss JR, Chen L. "BM180": a novel basement membrane protein with a role in stimulus-secretion coupling by lacrimal acinar cells. *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 1):C1743-50.
42. Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshihara R, et al. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(51):20446-51.

## LEGENDS TO THE FIGURES

**Figure 1.** Mean fold increase of mRNA expression following polyI:C (PIC) or LPS treatment of SGECs or HeLa cells. **A.** In SGECs, Ro52/TRIM21 mRNA induction was evident from 6-hrs of polyI:C treatment, remained stable until 12- to 24-hrs and raised 2.5 folds at 48-hrs (bold continuous line). LPS did not affect Ro52/TRIM21 mRNA expression (discontinuous line). Neither PolyI:C (thin continuous line) nor LPS (dotted line) affected Ro52/TRIM21 mRNA expression by HeLa cells. **B.** Treatment of SGECs with polyI:C was found to result in a slight, but statistically significant, Ro60/TROVE2 mRNA induction at 48-hrs (bold continuous line), whereas LPS had no effect (discontinuous line). Ro60/TROVE2 mRNA expression in HeLa cells was not affected by polyI:C (thin continuous line) or LPS (dotted line) treatment. **C.** Similarly, treatment of SGECs with polyI:C caused a slight, but statistically significant, La/SSB mRNA induction at 48-hrs (bold continuous line), whereas LPS had no effect (discontinuous line). In HeLa cells, neither polyI:C (thin continuous line) nor LPS (dotted line) affected La/SSB mRNA expression. Standard Errors are representative of all 22 SGEC lines and 3 different experiments on HeLa cells.

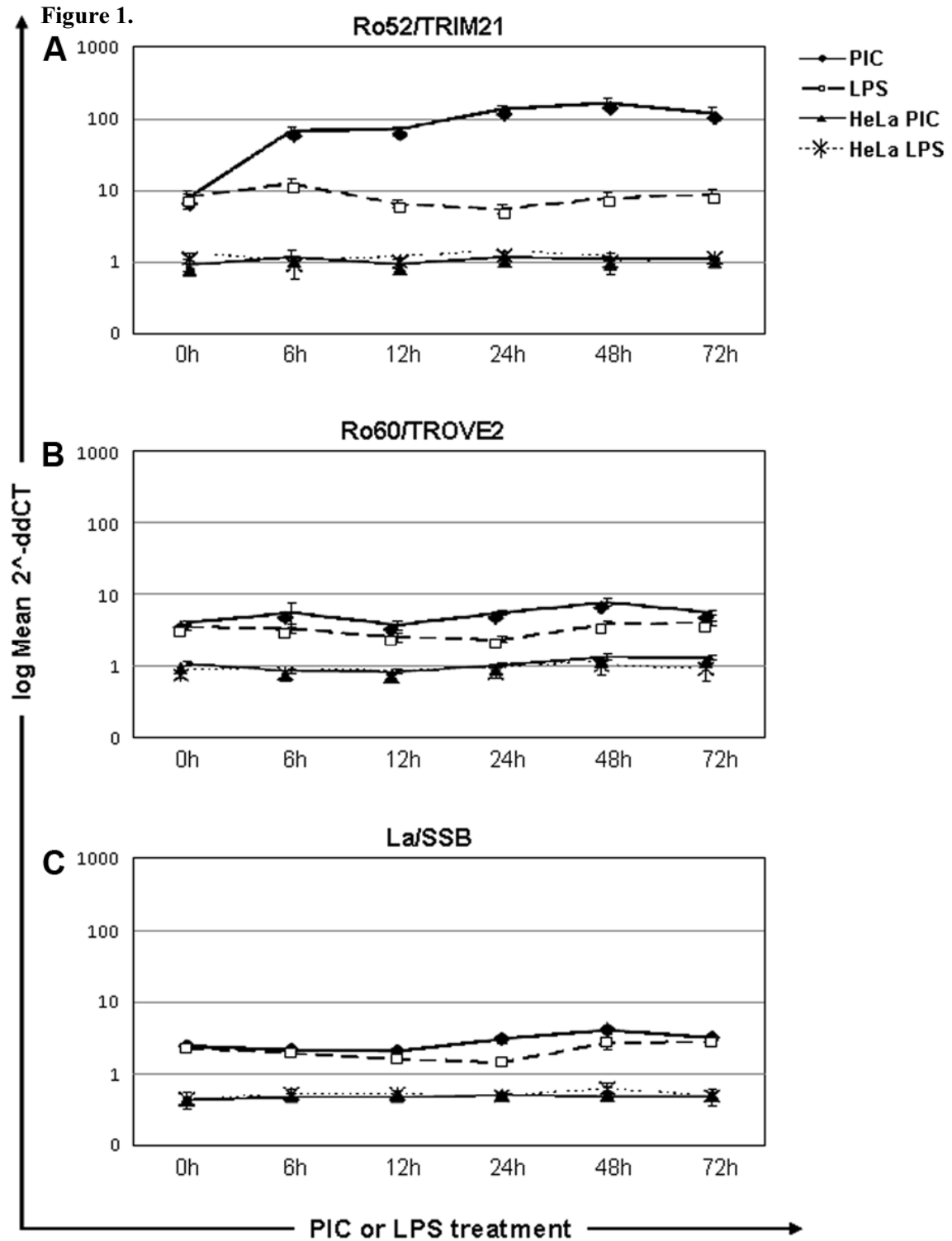
**Figure 2.** PolyI:C treatment does not affect the levels of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 or La/SSB protein expression, but induces a late redistribution of Ro52/TRIM21 in the nucleus of SGECs. **A.** Immunoblotting analysis did not reveal any notable changes in protein expression levels of Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB in either cytoplasmic (left side) or nuclear (right side) extracts of SGECs upon polyI:C (PIC; upper panel) or LPS (lower panel) treatment.  $\beta$ -actin and histone-H4 were used as loading controls for cytoplasmic and nuclear extracts, respectively. A representative example of 7 SGEC lines is shown. **B.** Confocal microscopy analysis revealed that polyI:C treatment induced a nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 protein in SGECs. In untreated cells, Ro52/TRIM21 is localized at the cytoplasm and one or two nuclear dots, resembling nucleolar staining. This pattern of nuclear expression remained stable until 24-hrs, whereas at 48- and 72-hrs it was redistributed to multiple coarse dots spanning the nucleus. LPS treatment had no effect on Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 and La/SSB protein expression or distribution. A representative example of 13 SGEC lines (8 from SS and 5 from non-SS controls) is shown.

**Figure 3.** Treatment with IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  or IFN $\gamma$  induces the nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 protein in SGECs, but not in HeLa cells. **A.** Interferon treatment of SGECs led to the nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 protein from nucleolar-like pattern to multiple coarse dots spanning throughout the nucleus from 24-hrs. Representative example of 3 SGEC lines is shown. **B.** Treatment with IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  or IFN $\gamma$  did not significantly alter the expression of Ro52/TRIM21 protein in HeLa cells. Figures are representative of 3 different experiments.

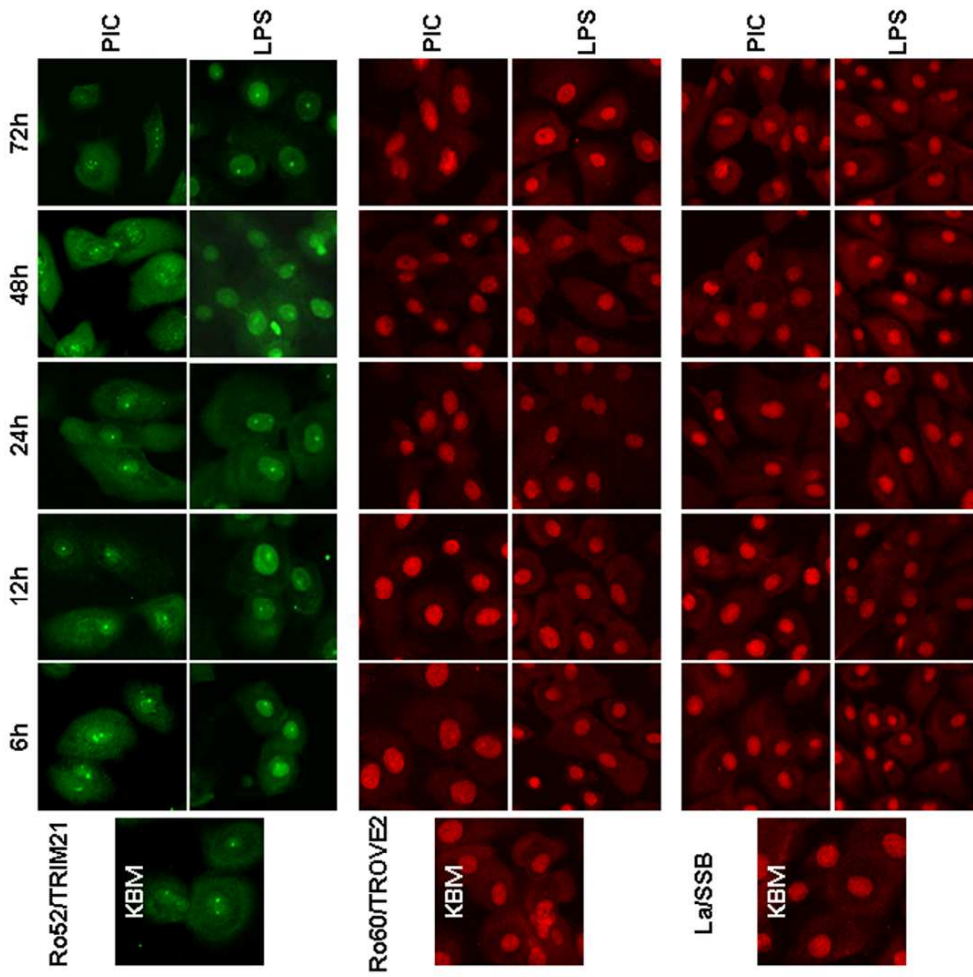
**Figure 4.** Production of interferons (IFN) by SGECs. **A.** Histogram indicating the mRNA production of IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$  by resting or polyI:C (PIC) treated SGECs. Treatment with polyI:C readily induced the expression of IFN $\beta$ , but not IFN $\alpha$  or IFN $\gamma$ , mRNA in SGECs at 6-hrs and this expression declined thereafter. **B.** Histogram indicating the secretion of interferons by resting or polyI:C treated SGECs. Treatment with polyI:C induced IFN $\beta$  secretion since 6-hrs with a peak at 12-hrs. Minute stable amounts of IFN $\gamma$  were detected in resting (0-hrs), polyI:C-treated SGECs and unused cultured medium (KBM), whereas IFN $\alpha$  was not detected. Standard Errors correspond to results from 3 SGEC lines.

**Figure 5.** Blockade of interferons by specific neutralizing antibodies revealed that the polyI:C-induced upregulation of Ro52/TRIM21 mRNA and protein redistribution is significantly mediated by IFN $\beta$ . **A.** Histogram showing the inhibition of Ro52/TRIM21 mRNA expression in resting or polyI:C (PIC) treated SGECs by specific neutralizing antibodies against IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  or the common IFN $\alpha\beta$ -receptor (IFN $\alpha\beta$ R). Antibodies against IFN $\beta$  or the common IFN $\alpha\beta$ -receptor significantly

inhibit the polyI:C-driven mRNA increment, an effect that is more evident at the late increment (12-48-hrs; red box). **B.** Blocking of polyI:C-induced redistribution of Ro52/TRIM21 protein by neutralizing antibodies against IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  or IFN $\alpha\beta$ -receptor. Antibodies against IFN $\beta$  and IFN $\alpha\beta$ -receptor, but not against IFN $\alpha$  or IFN $\gamma$ , block the polyI:C-driven nuclear redistribution of Ro52/TRIM21 in SGENCs. Figures of blocking experiments at SGENCs treated with polyI:C for 72-hrs are shown. These are representative of 3 distinct experiments.



**Figure 2.**



**B**

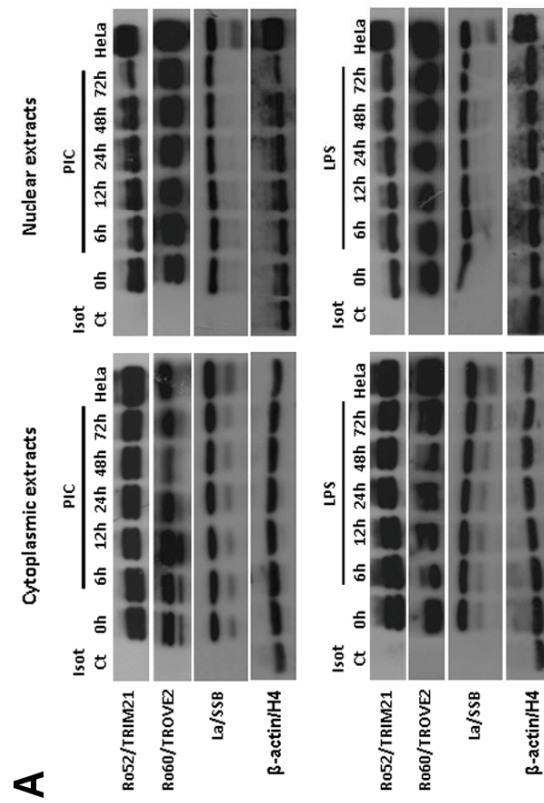
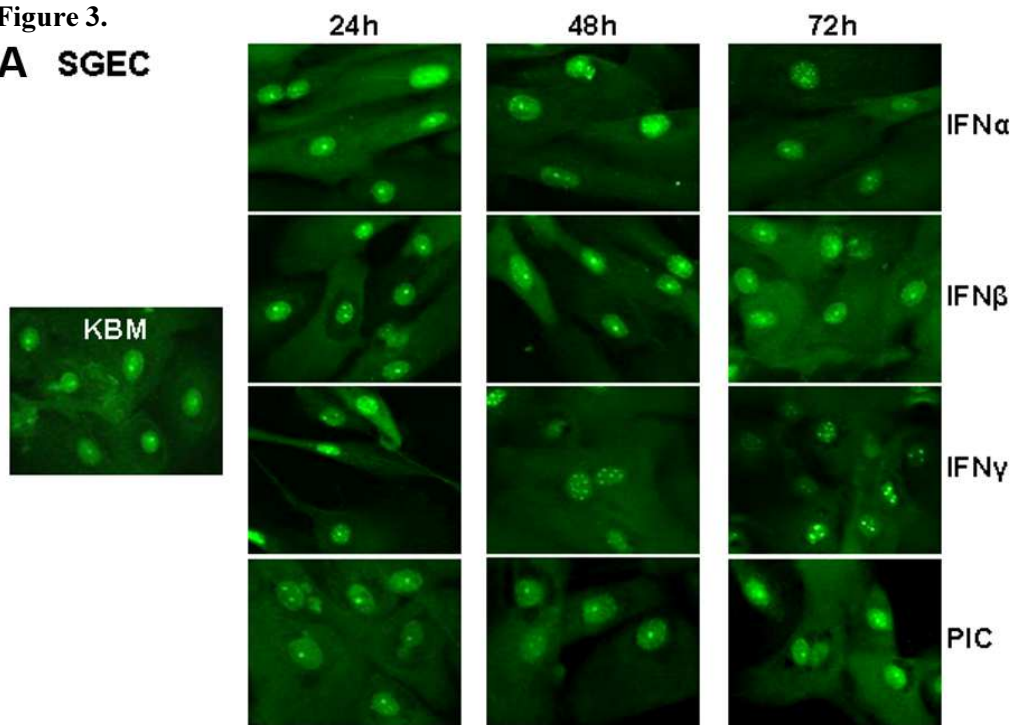


Figure 3.

**A SGC6**



**B HeLa**

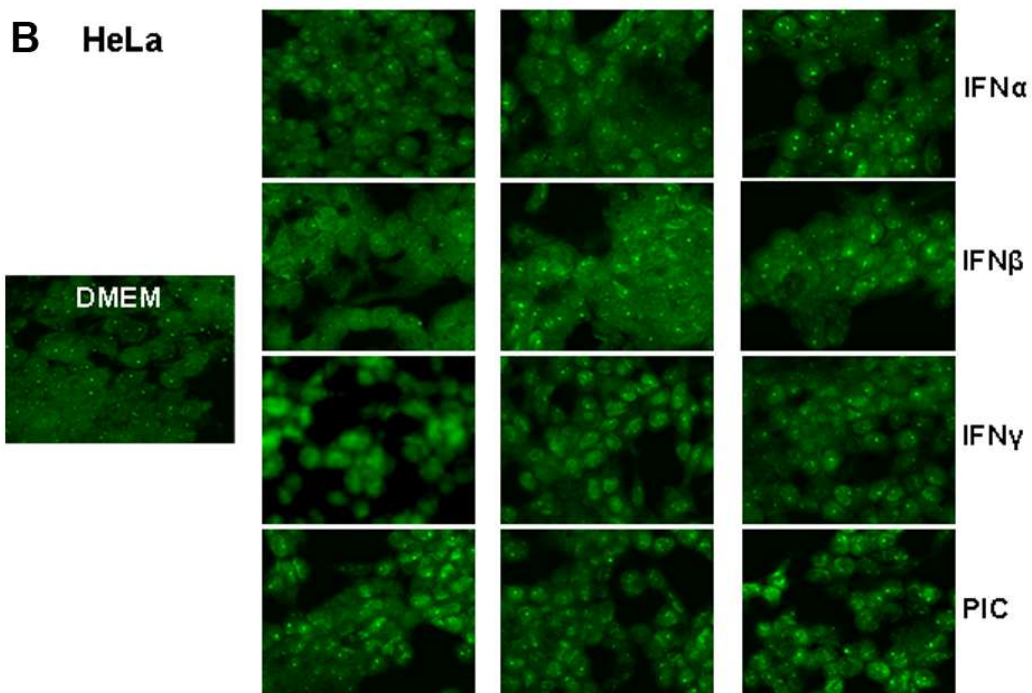


Figure 4.

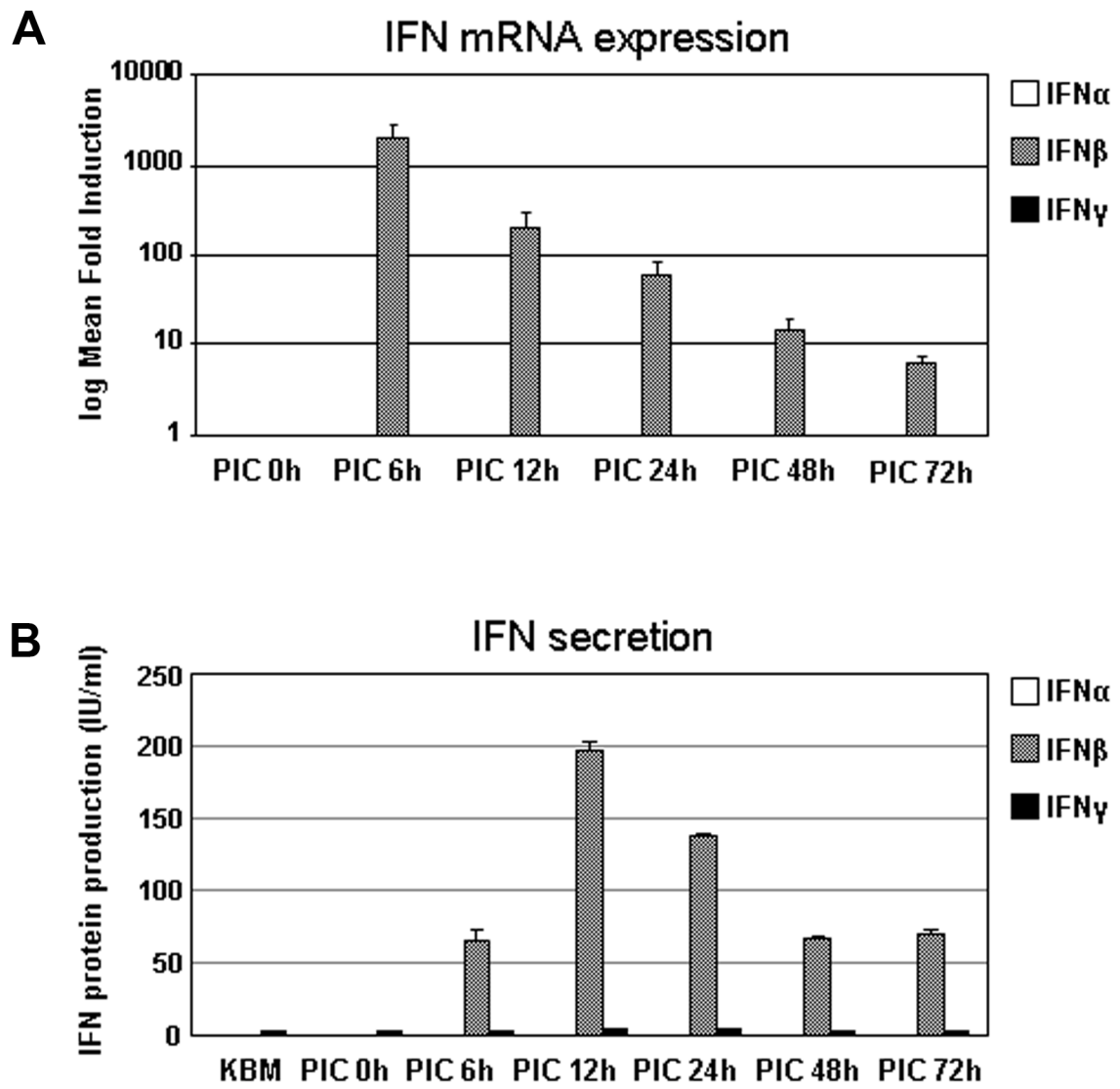


Figure 5.

