**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΙΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη μιας νέας μετάλλαξης στο γονίδιο STAT3 που ενέχεται στο
σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας Hyper-IgE»**

**Αναστάσιος Παπαναστασίου
Φαρμακοποιός**

ΠΑΤΡΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΙΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη μιας νέας μετάλλαξης στο γονίδιο STAT3 που ενέχεται στο
σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας Hyper-IgE»**

Αναστάσιος Παπαναστασίου

Φαρμακοποιός

Επιβλέπων καθηγητής: Ιωάννης Κ. Ζαρκάδης

Αναπληρωτής καθηγητής

Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Πατρών

ΠΑΤΡΑ 2010

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

κ. Ζαρκάδης Ιωάννης (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

κ. Λυγερού Ζωή

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

κ. Μανταγός Στέφανος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

• κ. Γώγος Χαράλαμπος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

• κ. Δραΐνας Διονύσιος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

• κ. Ζαρκάδης Ιωάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

• κ. Ζούμπος Νικόλαος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

• κ. Λυγερού Ζωή

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

• κ. Μανταγός Στέφανος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

• κ. Μουζάκη Αθανασία

Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

...στον πατέρα μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών, σε συνεργασία με την Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Εφαρμογές στις Βασικές Ιατρικές Επιστήμες, υπο την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή Ι.Κ. Ζαρκάδη, κατά τα έτη 2006 – 2010.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή καθηγητή Ιωάννη Ζαρκάδη. Από την πρώτη στιγμή, μου έδειξε απεριόριστη εμπιστοσύνη, στηρίζοντας κάθε μου προσπάθεια. Όλο αυτό το χρονικό διάστημα ήταν πάντα διαθέσιμος, να ακούσει, να λύσει, αλλά κυρίως να συζητήσει όλα τα εμπόδια και προβλήματα που συνάντησα στον ερευνητικό μας χώρο.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωή Λυγερού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Ιατρικής, και τον Καθηγητή Ιατρικής, κ. Στέφανο Μανταγό, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή μου, αλλά κυρίως για τις συμβουλές τους και την πραγματικά μεγάλη βοήθεια που προσέφεραν σε όλη τη διάρκεια αυτού του διδακτορικού.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών, γιατί από την πρώτη στιγμή με έκαναν να αισθανθώ καλοδεχούμενος στο χώρο ενώ παράλληλα διευκόλυναν με κάθε τρόπο την ενσωμάτωσή μου στο έμπνηχο δυναμικό του εργαστηρίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους μεταπτυχιάκους φοιτητές του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, για τη συνεργασία τους, την συμπαράστασή τους αλλά κυρίως την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που έδειξαν στο πρόσωπό μου. Ιδιαίτερα ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Χαρούλα Σιρινιάν, στη Μαρία Δημάκη, στη Μαρία Ηλιού, στο Βασίλη Ρούκο, στη Μαρία Χονδρού, στον Πέτρο Κόκκινο, στην Αντιγόνη Φωκά, στην Άννα-Λιζα Δελαστίκ, στον Παναγιώτη Κωτσαντή, στη Δάφνη Πεφάνη, στο Νικόλα Καρατζέλη, στην Ελεάννα Συμεωνίδου, στο Μπάμπη Παπαθεοδώρου, στη Χρυσανγή Τουμπέκη, στη Βίκυ Σταματοπούλου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου Σπύρο, γιατί χωρίς αυτούς τίποτα απ' αυτά δεν θα μπορούσε να είχε γίνει.

Τάσος Παπαναστασίου
Μάιος, 2010
Πάτρα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Ανοσοανεπάρκειες	9
1.1.A. Ανοσία.....	9
1.1.B. Πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες.....	10
1.2. Σύνδρομο Hyper IgE.....	20
1.3. Μοριακή αιτιοπαθογένεια του συνδρόμου Hyper IgE.....	25
1.4. Μοριακή παθοφυσιολογία και ανεπάρκεια των Th 17 κυττάρων.....	28
1.5. Γονιδιακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με το σύνδρομο Hyper IgE	31
 2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	33
 3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
 3.1. Ασθενής.....	36
3.2. Κύτταρα και Κυτταροκαλλιέργειες.....	37
3.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων του περιφερικού αίματος.....	37
3.2.2. Απομόνωση ινοβλαστών δέρματος.....	38
3.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	38
3.2.4 Ψύξη κυττάρων.....	39
3.2.5. Απόψυξη κυττάρων.....	41
3.3. Διέγερση κυττάρων σε κυτταρικές καλλιέργειες.....	41
3.3.1. Διέγερση κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).....	41
3.3.2. Διέγερση ινοβλαστών δέρματος.....	41
3.4. Ανάλυση πρωτεϊνών	
3.4.1. Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ανθρώπινα κύτταρα σε καλλιέργεια.....	42
3.4.2. Ανοσοστύπωμα (ανάλυση Western).....	42
3.4.3. Ανοσοφθορισμός.....	43

3.5. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.....	44
3.5.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (<i>DNA και RNA απομόνωση</i>).....	44
3.5.2. Σύνθεση συμπληρωματικού <i>DNA (cDNA)</i>	45
3.5.3. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας <i>DNA (Sequencing)</i>	45
3.5.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (<i>PCR</i>).....	45
3.5.3.2. Απομόνωση προϊόντων <i>DNA από PCR</i>	48
3.5.3.3. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας <i>DNA (Sequencing)</i>	48
3.5.4. <i>Real-Time PCR (RT-PCR)</i>	48
3.6. Ενζυμική μέθοδος ανίχνευσης αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών.....	50
4. Υλικά και Διαλύματα.....	51
 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	 57
 4.1. Προσδιορισμός της νέας μετάλλαξης στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα <i>STAT3</i>	 58
4.2 Ανάλυση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης <i>STAT3</i> της ασθενούς.....	61
4.2.1. Ανάλυση με ανοσοστίπωμα <i>western</i> και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.....	61
4.2.2. Ανάλυση της ικανότητας της πρωτεΐνης <i>STAT3</i> να δεσμεύεται σε ολιγονουκλεοτίδια <i>DNA</i> στόχους (<i>in vitro</i>).....	63
4.2.3. Ανάλυση με της ικανότητας της πρωτεΐνης <i>STAT3</i> της ασθενούς να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων σε κύτταρα του περιφερικού αίματος (<i>in vivo</i>).....	65
 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	 67
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	72
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

1.1. Α. Ανοσία

Το ανοσοποιητικό σύστημα συγκροτείται από εξειδικευμένα κύτταρα, μόρια και όργανα, τα οποία συνεργάζονται προκειμένου ο οργανισμός να αμυνθεί έναντι ενός ευρέως φάσματος παθογόνων (βακτήρια, ιοί και μύκητες, πρωτόζωα και πολυκύτταρα παράσιτα), που δύναται να προκαλέσουν βλάβες. Επομένως, η διατήρηση της καλής κατάστασης του οργανισμού εξαρτάται από την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει, να απωθεί και να καταστρέφει τους επικίνδυνους εισβολείς.

Οι περισσότεροι ζωικοί οργανισμοί έχουν μηχανισμούς αντίστασης έναντι των παθογόνων. Η αντίσταση που παρέχεται μέσω των μηχανισμών αυτών ονομάζεται ανοσία. Υπάρχουν δύο βασικοί βραχίονες ανοσίας: Η φυσική ή μη-ειδική ή έμφυτη και η προσαρμοστική ή ειδική ή επίκτητη.

Η φυσική ανοσία απορρέει από φυσικούς φραγμούς όπως το δέρμα και οι επιθηλιακές μεμβράνες, τα δάκρυα, το σίελο και η φλεγμονώδης διεργασία. Οι μηχανισμοί αυτοί παρεμποδίζουν τόσο την είσοδο, όσο και τη διάδοση των παθογόνων, ωστόσο αδυνατούν να περιορίσουν εξολοκλήρου την προκαλούμενη βλάβη.

Παρόλ' αυτά, εάν κάποιος μικροοργανισμός καταφέρει να ξεπεράσει τους φραγμούς της φυσικής ανοσίας, τότε οι ανώτεροι ζωικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να επιστρατεύσουν πιο αποτελεσματικούς μηχανισμούς ανοσίας, οι οποίοι διακρίνονται από την ικανότητα της ανοσολογικής μνήμης. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να «θυμούνται» τους εισβολείς και να ανταποκρίνονται ταχύτερα και αποτελεσματικότερα στο μέλλον. Το σύνολο των μηχανισμών αυτών συγκροτεί την ειδική ή αλλιώς προσαρμοστική ανοσία.

Η αδυναμία του ανοσοποιητικού συστήματος να ανταποκριθεί στην ανάγκη για προστασία του οργανισμού έναντι ενός ευρέως φάσματος παθογόνων, καλείται ανοσοανεπάρκεια. Η ανοσοανεπάρκεια μπορεί να διακριθεί σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή, ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα. Στην πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια το έλλειμμα βρίσκεται σε κάποιο συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ ανεπάρκεια Β κυττάρων), ενώ στην δευτεροπαθή ανοσοανεπάρκεια το

έλλειμμα ανοσίας εμφανίζεται ως επιφανόμενο μιας πρωτεύουσας διαταραχής, με ενδογενή ή εξωγενή αίτια (HIV λοίμωξη, φάρμακα) [1].

1.1.B. Πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι ένα ετερογενές σύνολο νοσημάτων που, ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς, χαρακτηρίζονται από διαφορετικού κάθε φορά βαθμού ανοσολογικό έλλειμμα, το οποίο μπορεί να εντοπίζεται στα Β ή/και στα Τ-κύτταρα, στα φαγοκύτταρα ή στο συμπλήρωμα. Περισσότερα από 120 γονίδια έχουν αναγνωριστεί, οι ανωμαλίες των οποίων προκαλούν πάνω από 150 μορφές πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στον άνθρωπο. Οι ανεπάρκειες αυτές, σύμφωνα με την τελευταία κατάταξη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) [2,3], διακρίνονται σε:

A. Συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες Τ- και Β-κυττάρων.

B. Πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των ανοσοσφαιρινών.

Γ. Άλλα σαφώς καθοριζόμενα σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας.

Δ. Διαταραχές στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ε. Συγγενείς διαταραχές στον αριθμό ή/και στη λειτουργία των φαγοκυττάρων.

ΣΤ. Ελλείμματα στον βραχίονα της φυσικής ανοσίας.

Ζ. Αυτοφλεγμονώδεις διαταραχές (autoinflammatory disorders).

Η. Ανεπάρκειες του συμπληρώματος.

Συνοπτικά οι παραπάνω κατηγορίες έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

A. Συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες Τ- και Β-κυττάρων.

Στην κατηγορία αυτή ανήκει μια ποικιλία νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια τόσο των Τ όσο και των Β-κυττάρων [4-7]:

1. Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, με έλλειψη Τ- και Β-κυττάρων (T⁻ B⁻ SCID, Severe Combined ImmunoDeficiency). Οφείλετε σε μεταλλάξεις των γονιδίων RAG1/2, Artemis (DCLRE1C), ADA.

2. Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια με έλλειψη T-κυττάρων ($T^{-} B^{+}$ SCID, Severe Combined ImmunoDeficiency). Μεταλλάξεις στα γονίδια γC , Jak3, $IL-7R\alpha$, CD45, CD3δ/ε/ζ έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση του φαινοτύπου της ανοσοανεπάρκειας.
3. Σύνδρομο Omenn. Οφείλετε σε ετερόζυγες μεταλλάξεις στα γονίδια RAG1/2, Artemis, $IL-7R\alpha$.
4. Ανεπάρκεια της DNA λιγάσης IV.
5. Ανεπάρκεια του XLF/Cernunos.
6. Ανεπάρκεια του CD40 και του CD40L.
7. Ανεπάρκεια πουρινικής νουκλεοτιδικής φωσφορυλάσης (PNP).
8. Ανεπάρκεια CD3γ.
9. Ανεπάρκεια CD8.
10. Ανεπάρκεια ZAP-70.
11. Ανεπάρκεια διαύλων ασβεστίου.
12. Ανεπάρκεια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I και II (MHC I MHC II).
13. Ανεπάρκεια του γονιδίου *FOXN1* (Winged helix deficiency).
14. Ανεπάρκεια CD25.
15. Ανεπάρκεια STAT5b.

B. Πρωτοπαθείς ανεπάρκειες των ανοσοσφαιρινών.

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διαταραχές που χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια στη σύνθεση είτε όλων των ανοσοσφαιρινών, είτε κάποιας συγκεκριμένης τάξης ή υποτάξης [8-10].

1. Σοβαρή μείωση σε όλες τις τάξεις ανοσοσφαιρινών του ορού, με σημαντικά ελαττωμένα ή απόντα κυκλοφορούντα B κύτταρα.
 - α. Ανεπάρκεια Btk.
 - β. Ανεπάρκεια μ βαρέων αλυσών.
 - γ. Ανεπάρκεια λ5.
 - δ. Ανεπάρκεια Igα και Igβ.
 - ε. Ανεπάρκεια BLNK.

στ. Θύμωμα με ανοσοανεπάρκεια.

ζ. Μυελοδυσπλασία.

2. Σοβαρή μείωση των ανοσοσφαιρινών τάξης IgG και IgA, με κανονικά ή χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούντων B κυττάρων.

α. Ανεπάρκεια του ICOS.

β. Ανεπάρκεια του CD19

3. Σοβαρή μείωση των ανοσοσφαιρινών τάξης IgG και IgA, με κανονική ή αυξημένη IgM και κανονικά επίπεδα κυκλοφορούντων B κυττάρων.

α. Ανεπάρκεια του CD40 και του CD40L (έχει προαναφερθεί).

β. Ανεπάρκεια της AID.

γ. Ανεπάρκεια της UNG.

4. Ανεπάρκειες των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών ή των ελαφρών αλυσίδων, με κανονικά επίπεδα κυκλοφορούντων B κυττάρων.

α. Ελλείμματα της βαριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών.

β. Ανεπάρκεια της κ αλυσού.

γ. Ανεπάρκεια μεμονωμένων υποτάξεων IgG.

δ. Ανεπάρκεια IgA σχετιζόμενη με ανεπάρκεια υποτάξης IgG.

ε. Εκλεκτική ανεπάρκεια IgA.

5. Παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της βρεφικής ηλικίας, με κανονικά επίπεδα κυκλοφορούντων B κυττάρων.

Γ. Άλλα σαφώς καθοριζόμενα σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας.

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται διαταραχές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (ανοσοανεπάρκειες) οι οποίες έχουν καλώς καθορισμένη μοριακή παθολογία και επιπλέον έχουν παθολογικές εκδηλώσεις και από άλλα συστήματα [11-16].

1. Σύνδρομο Wiskott-Aldrich. Μεταλλάξεις στο γονίδιο WASP, οι οποίες προκαλούν κυτταροσκελετικές διαταραχές που επηρεάζουν την ωρίμανση των προγονικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος (Haematopoietic Stem Cell's).

2. Διαταραχές στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (DNA repair). Άλλες από αυτές που έχουν αναφερθεί στην παραγραφο Α.

α. Ατάξια-τηλεαγγειεκτασία. Μεταλλάξεις στο γονίδιο ATM οι οποίες προκαλούν διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση θραύσεων του DNA (DNA double-strand break repair).

β. Διαταραχή παρόμοια της Ατάξια-τηλεαγγειεκτασίας. Υπομορφικές μεταλλάξεις στο γονίδιο MRE11. Εμφανίζονται διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση θραύσεων του DNA (DNA double-strand break repair).

γ. Σύνδρομο θραύσεων Nijmegen (Nijmegen breakage syndrome). Υπομορφικές μεταλλάξεις στο γονίδιο NBS1 (Nibrin). Εμφανίζονται διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση θραύσεων του DNA (DNA double-strand break repair).

δ. Σύνδρομο Bloom. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BLM το οποίο είναι μια RecQ-like ελικάση. Εμφανίζονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ανεπάρκεια του μυελού των οστών, λευχαιμία, λεμφώματα, κοντό ανάστημα.

3. Ανωμαλίες του θύμου. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το σύνδρομο Di George. Συνδέεται με χρωμοσωμικά ελλείμματα του 22q11-pter και μεταλλάξεις στον μεταγραφικό παράγοντα TBX1. Το σύνδρομο εμφανίζεται με ελαττωματική ανάπτυξη του θύμου, υποπαραθυρεοειδισμό, διαμαρτίες των μεγάλων αγγείων της καρδιάς, χαρακτηριστικό προσώπείο.

4. Συνδυασμένες δυσπλασίες του ανοσοποιητικού και του ερειστικού συστήματος (Immuno-osseous dysplasias).

α. Υποπλασία χόνδρων και τριχών (Cartilage - hair hypoplasia). Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο RMRP (RNase MRP RNA) το οποίο φυσιολογικά παίζει ρόλο στη σύνθεση του μιτοχondριακού DNA και του ριβοσωμικού RNA. Εμφανίζει νανισμό, αναιμία, ουδετεροπενία, προδιάθεση για λεμφώματα και άλλους καρκίνους.

β. Σύνδρομο Schimke. Σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο SMARCA1, και χαρακτηρίζεται από κοντό ανάστημα, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και νεφροπάθεια.

5. Σύνδρομο Hyper-IgE (HIES).

α. Αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο Hyper-IgE (Job Syndrome). Οφείλεται σε ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου STAT3. Χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα σταφυλοκοκκικά αποστήματα του δέρματος και πνευμόνων, σκελετικές ανωμαλίες, και εκσεσημασμένη ηωσηνοφιλία.

β. Αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο Hyper-IgE, με μυκοβακτηριδιακές και ιογενείς λοιμώξεις. Έχει αναφερθεί ένα μόνο περιστατικό στη διεθνή βιβλιογραφία με μία ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο TYK2. Το σύνδρομο σε αυτή τη μορφή χαρακτηρίζεται από προδιάθεση για λοιμώξεις από ενδοκυττάρια βακτήρια, μύκητες και ιούς, ενώ δεν εμφανίζει ανωμαλίες από τον ερειστικό και συνδετικό ιστό.

6. Χρόνια βλεννογοδερματική καντιντίαση. Χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη απάντηση των Τ κυττάρων στην *Candida Albicans*. Η μοριακή αιτιοπαθογένεια παραμένη άγνωστη.

Δ. Διαταραχές στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

1. Ανοσοανεπάρκεια [17].

α. Σύνδρομο Chediak-Higashi. Οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο LYST, οι οποίες προκαλούν ανωμαλίες στη διαμετακόμιση των λυσοσωματίων. Χαρακτηρίζεται από οφθαλμο-δερματικό αλφισμό, γιγάντια κοκκία όλων των εμπύρηνων κυττάρων και ελαττωμένη δραστικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (NK) και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTL).

β. Σύνδρομο Hermansky-Pudlak. Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο AP3B1, το οποίο κωδικοποιεί για την β υπομονάδα του AP-3 συμπλόκου. Εκδηλώνεται με αλφισμό, ουδετεροπενία, ελαττωμένη δραστικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (NK) και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTL) και αιμορραγική τάση.

2. Οικογενή σύνδρομα αιμοφαγοκυτταρικής ιστοκύττωσης (Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis syndromes) [18-19]. Σε αυτή την ομάδα νοσημάτων συμπεριλαμβάνονται οι ανεπάρκειες της περφορίνης (perforin) και της συνταξίνης

(syntaxin), οι οποίες οφείλονται σε μεταλλάξεις στα αντίστοιχα γονίδια, PRF1 και STX11. Χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη δραστικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (NK) και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTL).

3. Λεμφοϋπερπλαστικό X-φυλοσύνδετο σύνδρομο [20]. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν δύο διαταραχές (XLP1 και XLP2) με τον ίδιο κλινικό φαινότυπο οι οποίες προκαλούνται από μεταλλάξεις στα γονίδια SH2D1A (ρυθμίζει ενδοκυττάρια σήματα) και XIAP (αναστέλλει την απόπτωση) αντίστοιχα. Χαρακτηρίζονται από ανωμαλίες της ανοσίας σχετιζόμενες με λοίμωξη από EBV, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν σπληνομεγαλία, ηπατίτιδα και λέμφωματα.

4. Σύνδρομο συνοδευόμενα από αυτοανοσία [21]. Συνοπτικά σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο (Autimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS), το σύνδρομο με αυτοάνοση πολυενδοκρινοπάθεια, καντιντίαση και δυστροφία του εξωδέρματος (Autoimmune polyendocrinopathy with candidiasis and ectodermal dystrophy, APECED) και το X-φυλοσύνδετο σύνδρομο απορύθμισης του ανοσοποιητικού με πολυενδοκρινοπάθεια και εντεροπάθεια (IPEX).

Ε. Συγγενείς διαταραχές στον αριθμό ή/και στη λειτουργία των φαγοκυττάρων [23-26].

1. Βαριά συγγενής ουδετεροπενία. Ομάδα διαταραχών οι οποίες χαρακτηρίζονται από προσβολή των ουδετεροφίλων και οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων ELA2, GFI1, G-CSFR.

2. Σύνδρομο Kostmann. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου HAX1 το οποίο ελέγχει την απόπτωση. Προσβάλλονται τα ουδετερόφιλα.

3. Κυκλική ουδετεροπενία. Εμφανίζεται με αυξομειώσεις του αριθμού των δικτυοερυθροκυττάρων, των αιμαπεταλίων ενώ κυρίως προσβάλλονται τα ουδετερόφιλα. Οφείλεται σε ανωμαλίες του γονιδίου ELA2 που προκαλούν διαταραχές στην μετακίνηση της ελαστάσης.

4. X-φυλοσύνδετη ουδετεροπενία. Χαρακτηρίζεται από απουσία ουδεροφίλων και μονοκυττάρων/μακροφάγων. Οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο WASP, το οποίο ρυθμίζει την ακτίνη του κυτταροσκελετού.

5. Ανεπάρκεια προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων, τύπου 1. Χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη χημειοταξία, προσκόλληση και ενδοκυττάρωση των λεμφοκυττάρων. Εμφανίζονται χρόνια δερματικά έλκη, περιοδοντίτιδα, λευκοκυττάρωση, και ελαττωματική κυτταροτοξικότητα των T λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων. Προσβάλλονται τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς. Οφείλεται σε διαταραχή της β αλυσού (CD18) των LFA1, Mac1, p150.
6. Ανεπάρκεια προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων, τύπου 2. Οφείλεται σε ανεπάρκεια στη μετατροπή της GDP μαννόζης σε φουκόζη, λόγω ανωμαλιών του γονιδίου FUCT1. Χαρακτηρίζεται από προσβολή κυρίως των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων/μακροφάγων και διαταραχή στη χημειοταξία και το κύλισμα (rolling) των λευκοκυττάρων.
7. Ανεπάρκεια Rac 2. Χαρακτηρίζεται από διαταραχή στην προσκόλληση και στη χημειοταξία κυρίως των ουδετεροφίλων. Η ανωμαλία προκαλείται από μεταλλάξεις του RAC2 το οποίο ρυθμίζει την ακτίνη του κυτταροσκελετού.
8. Ανεπάρκεια της β-ακτίνης. Προσβάλλεται η κινητικότητα κυρίως των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων μακροφάγων. Συνοδεύεται από κοντό ανάστημα και νοητική καθυστέρηση.
9. Ειδική ανεπάρκεια των κοκκίων. Η διαταραχή αυτή οφείλεται σε ανωμαλίες του γονιδίου C/EBPE, το οποίο είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ειδικός της μυελικής σειράς. Χαρακτηρίζεται από ελαττωματική χημειοταξία των ουδετεροφίλων, τα οποία παρουσιάζονται με δίλοβους πυρήνες.
10. Σύνδρομο Shwachman-Diamond. Οφείλεται σε ανωμαλίες στο γονίδιο SBDS και προσβάλλονται κυρίως τα ουδετερόφιλα. Χαρακτηρίζεται από ελαττωματική χημειοταξία, αναιμία, θρομβοπενία, παγκρεατική ανεπάρκεια, χονδροδυσπλασία και υπογαμασφαιριναιμία.
11. Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος. Η διαταραχή αυτή εμφανίζεται με δύο μορφές σε ότι αφορά τη γενετική μεταβίβασή της, την X- φυλοσύνδετη και την αυτοσωμική υπολειπομένη. Στην φυλοσύνδετη μορφή, η ανωμαλία εντοπίζεται στην αλυσίδα των 91kD του κυττοχρώματος b, ενώ στην αυτοσωμική υπολειπόμενη, η ανωμαλία εντοπίζεται είτε στην αλυσίδα των 22kD του κυττοχρώματος b είτε στους παράγοντες

του κυττοχρώματος P47/P67. Και στις δύο μορφές προσβάλλονται τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα με αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής μεταβολιτών του υπεροξειδίου και κατά συνέπεια ελαττωματική μικροβιοκτονία.

12. Ανεπάρκεια της G6PD των ουδετεροφίλων. Η ανεπάρκεια αυτή προσβάλλει κυρίως τα ουδετερόφιλα αλλά και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Από τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η αιμολυτική αναιμία.

13. Ανεπάρκεια των IL-12, IL-23/IFN- γ receptor/STAT1. Η ομάδα αυτή των διαταραχών οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων IL-12p40, IFN- γ R1/R2 και STAT1. Προσβάλλονται τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα με αποτέλεσμα προδιάθεση για λοιμώξεις από μυκοβακτηρίδια, σαλμονέλα και ιούς.

ΣΤ. Ελλείμματα του βραχίονα της φυσικής ανοσίας [26-27].

1. Ανιδρωτική εξωδερματική δυσπλασία με ανοσοανεπάρκεια. Ανάλογα με τύπο κληρονομικής μεταβίβασης υπάρχουν δύο μορφές του νοσήματος, X-φυλοσύνδετη και αυτοσωμική επικρατούσα. Και στις δύο μορφές προσβάλλονται τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, ενώ η μοριακή βλάβη εντοπίζεται στο μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B. Συγκεκριμένα στη φυλοσύνδετη μορφή έχουν αναγνωριστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο του NEMO (IKBK γ), το οποίο είναι ρυθμιστής της ενεργοποίησης του NF κ B, ενώ στην αυτοσωμική επικρατούσα μορφή έχουν αναγνωριστεί ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (gain-of-function) στον παράγοντα IKBA, με αποτέλεσμα την αδυναμία ενεργοποίησης του NF κ B.

2. Ανεπάρκεια του IRAK4 (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4). Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου IRAK4, συστατικού του TLR σηματοδοτικού μονοπατιού.

3. Σύνδρομο WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis syndrome). Οφείλεται σε ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (gain-of-function) στο γονίδιο του υποδοχέα CXCR4, με αποτέλεσμα αυξημένη απόκριση στο συνδέτη CXCL12 (SDF-1). Προσβάλλονται τα λεμφοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα με συνέπεια ελαττωμένο αριθμό B κυττάρων και ουδετεροφίλων.

4. Εγκεφαλίτιδα από απλό έρπητα. Η διαταραχή αυτή εμφανίζεται είτε ως αυτοσωμική επικρατούσα είτε ως αυτοσωμική υπολειπόμενη. Η επικρατούσα μορφή της νόσου

σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο του TLR3, ενώ η υπολειπόμενη σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του UNC93B1. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες (TLR3 και UNC93B1) επάγουν την παραγωγή ιντερφερόνης- α , - β , - γ (IFN- α , - β , - γ) μέσω ενεργοποίησης των TLRs. Κλινικά η διαταραχή χαρακτηρίζεται από εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα από τον ιόν του απλού έρπητα τύπου 1.

Z. Αυτοφλεγμονώδεις διαταραχές (autoinflammatory disorders).

Οι διαταραχές της ανοσίας που συμπεριλαμβάνονται σε αυτή την κατηγορία και η μοριακή τους παθοφυσιολογία θα αναφερθούν συνοπτικά παρακάτω [28-29].

1. Οικογενής μεσογειακός πυρετός. Έχουν αναγνωριστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο MEFV (pyrin) με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ώριμης ιντερλευκίνης -1b (IL-1b) και την αναστολή της απόπτωσης των μακροφάγων.
2. Περιοδικό σύνδρομο σχετιζόμενο με τον TNF υποδοχέα (TNF receptor-associated periodic syndrome, TRAPS). Σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο TNFRSF1A, ενώ προσβάλλονται κυρίως τα πολυμορφοπύρηνα και μονοκύτταρα.
3. Σύνδρομο Hyper-IgD. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου MVK, το οποίο κωδικοποιεί μια κινάση του μεβαλονικού οξέος, επηρεάζοντας την σύνθεση χοληστερόλης. Η ακριβής παθογένεια της νόσου παραμένει άγνωστη.
4. Σύνδρομο Mucke-Wells, Οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο ψύχους, και σύνδρομο NOMID (Neonatal onset multisystem inflammatory disease) ή CINCA (Chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome). Τα παραπάνω σύνδρομα σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο CIAS1 (ή PYPAF1 ή NALP3) ενώ ο κλινικός φαινότυπος εξαρτάται από ρυθμιστική δράση άλλων γονιδίων αλλά και από την επίδραση του περιβάλλοντος.
5. Σύνδρομο PAPA (Pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, acne). Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο PSTPIP1 (C2BP1).
6. Σύνδρομο Blau. Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο NOD2 (CARD15) οι οποίες διακόπτουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF κ B.

7. Σύνδρομο Majeed (Chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anemia). Οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο LPIN2 για τις οποίες όμως δεν είναι γνωστό πως ακριβώς ενέχονται στη μοριακή παθογένεση του συνδρόμου.

H. Ανεπάρκειες του συμπληρώματος.

Η ανεπάρκεια των περισσότερων συστατικών του συμπληρώματος μπορούν να οδηγήσουν σε κάποιας μορφής ανεπάρκεια της ανοσίας [30]. Έτσι έχουμε:

Η ανεπάρκεια των C1q, C1r, C1s και C4 οδηγούν σε ένα σύνδρομο παρόμοιο του Συστηματικού Ερυθματώδους Λύκου, με εμφάνιση ρευματοπάθειας και προδιάθεση σε λοιμώξεις. Χαρακτηρίζεται από απουσία της αιμολυτικής δράσεως του συμπληρώματος και ελαττωματικό σχηματισμό του συμπλόκου λύσεως της μεμβράνης (MAC, membrane attack complex).

Η ανεπάρκεια του C2 χαρακτηρίζεται από απουσία της αιμολυτικής δράσεως του συμπληρώματος, ελαττωματικό σχηματισμό του συμπλόκου λύσεως της μεμβράνης και ελαττωματική αποδόμηση ανοσοσυμπλεγμάτων. Μπορεί να οδηγήσει σε ένα σύνδρομο παρόμοιο του Συστηματικού Ερυθματώδους Λύκου, με αγγειίτιδα, πολυμυοσίτιδα και πυογενείς λοιμώξεις.

Η ανεπάρκεια του C3 οδηγεί σε υποτροπιάζουσες πυογενείς λοιμώξεις, οι οποίες οφείλονται σε απουσία της αιμολυτικής δράσεως του συμπληρώματος, ελαττωματικό σχηματισμό του συμπλόκου λύσεως της μεμβράνης και συνολικά ελαττωματική βακτηριοκτόνο δράση του συμπληρώματος.

Οι ανεπάρκειες των C5, C6, C7, C8a/b, C9 σχετίζεται με ευπάθεια σε μηνιγγοκοκκικές λοιμώξεις και εμφάνιση Συστηματικού Ερυθματώδους Λύκου. Στον ίδιο κλινικό φαινότυπο, με εξαίρεση το ΣΕΛ, οδηγούν και οι ανεπάρκειες της προπερδίνης και του παράγοντα D.

Τέλος, οι ανεπάρκειες των παραγόντων I και H οδηγούν σε υποτροπιάζουσες πυογενείς λοιμώξεις.

1.2 ΣΥΝΔΡΟΜΟ HYPER-IgE

Το σύνδρομο Hyper-IgE (επίσης σύνδρομο Job's) με OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) #147060 και #243700 είναι ένα πολύ σπάνιο σύνδρομο πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας το οποίο σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO) κατατάσσεται στην κατηγορία *«Άλλα σαφώς καθοριζόμενα σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας»*. Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1966 από τους Davis και Wedgwood [31]. Περιέγραψαν δύο ασθενείς οι οποίοι είχαν υποτροπιάζουσες σταφυλοκοκκικές δερματικές λοιμώξεις και στους οποίους όμως απουσίαζαν οι κλασικές φλεγμονώδεις εκδηλώσεις στην περιοχή της λοίμωξης, όπως ερυθρότητα και θερμότητα. Ως εκ τούτου οι Davis και Wedgwood επινόησαν τον όρο «ψυχρά αποστήματα» για να περιγράψουν την παραπάνω κλινική οντότητα και εμπνεόμενοι από το χωρίο της Αγίας Γραφής: *«Εξήλθε δε ο διάβολος από προσώπου Κυρίου και έπαισε τον Ιώβ έλκει πονηρώ από ποδών έως κεφαλής»* (Βιβλίο Ιώβ B:7), το ονόμασαν σύνδρομο του Ιώβ (Job's syndrome). Παρόλα αυτά σήμερα χρησιμοποιείται ο περιγραφικός όρος *Hyperimmunoglobulin E syndrome* ή *Hyper-IgE Syndrome (HIES)*.

Κλινική συμπτωματολογία.

Το σύνδρομο χαρακτηρίστηκε περαιτέρω από τον Buckley [32], ο οποίος παρατήρησε ότι οι υποτροπιάζουσες σταφυλοκοκκικές δερματικές λοιμώξεις και ο σχηματισμός ψυχρών αποστημάτων, σχετίζονταν με σοβαρή δερματίτιδα και υψηλά επίπεδα IgE στον ορό. Εν συνέχεια μελέτες αποκάλυψαν την πολύ-συστηματική φύση του συνδρόμου και κατέδειξαν πως οι εκδηλώσεις του συνδρόμου δεν περιορίζονται μόνο στο ανοσοποιητικό σύστημα αλλά εκτείνονται και στο ερειστικό σύστημα. Χαρακτηριστικές εκδηλώσεις που υποδηλώνουν την πολύ-συστηματική φύση του συνδρόμου είναι το χαρακτηριστικό προσωπείο, η σκολίωση, η οστεοπόρωση, η υπερεκτασιμότητα των αρθρώσεων και η διατήρηση των νεογιλών οδόντων.

Το HIES εκδηλώνεται μέσα στις πρώτες 6 βδομάδες της ζωής, συνήθως με χρόνια βλεννογονοδερματική καντιντίαση ή με βαριά εκζεματοειδή δερματίτιδα, που επιπλέκεται με γενικευμένη δερματική λοίμωξη από τους ιούς του απλού έρπητα ή με ανεμευλογιά. Εν τω βάθει βακτηριακές λοιμώξεις εμφανίζονται μετά από την ηλικία των 6 μηνών ενώ κατά την ηλικία των 5 ετών όλοι οι ασθενείς έχουν πλέον ιστορικό

υποτροπιάζόντων δερματικών αποστημάτων, υποτροπιάζουσών πνευμονιών, χρόνιας μέσης ωτίτιδας και παραρρινοκολπίτιδας. Χαρακτηριστικό των δερματικών αποστημάτων είναι ότι δεν έχουν τις κλασικές φλεγμονώδεις εκδηλώσεις στην περιοχή της λοίμωξης, όπως ερυθρότητα και θερμότητα (ερύθημα). Επίμονες πνευματοκήλες και βρογχεκτασίες αναπτύσσονται συχνά, ως αποτέλεσμα των συνεχών επεισοδίων πνευμονίας. Άλλες, βακτηριακές λοιμώξεις, που συνήθως εμφανίζονται σε αυτούς του ασθενείς, είναι η κυτταρίτιδα, η σηπτική αρθρίτιδα και η οστεομυελίτιδα. Ο *S. aureus* είναι το κύριο παθογόνο βακτήριο. Άλλα βακτήρια που απομονώνονται είναι ο *H. influenzae*, ο στρεπτόκοκκος της ομάδας A, η *E.coli* και η ψευδομονάδα.

Συχνές, επίσης, είναι οι λοιμώξεις από μη βακτηριακά παθογόνα. Οι περισσότεροι ασθενείς πάσχουν από χρόνιες λοιμώξεις από *C. albicans*, που συνήθως προσβάλλουν το στόμα, τα νύχια και το δέρμα. Οισοφαγίτιδα, μηνιγγίτιδα και πνευμονία από *Candida* έχουν, επίσης, περιγραφεί. Συνηθισμένες, τέλος, είναι οι λοιμώξεις του δέρματος και των βλεννογόνων από τους ιούς του απλού έρπητα και του έρπητα ζωστήρα, που συχνά επιπλέκονται από ερπητική κερατοεπιπεφυκίτιδα.

Το χρόνιο εκζεματοειδές εξάνθημα αποτελεί σταθερό γνώρισμα του HIES. Πρόκειται για σαφώς αφοριζόμενο, τυπικό βλατιδώδες εξάνθημα, χωρίς ερύθημα, που συνοδεύεται από κνησμό και στους μεγαλύτερους ασθενείς λειχηνοποιείται. Κατά κανόνα, εντοπίζεται μόνιμα στο πρόσωπο και στις εκτατικές επιφάνειες του σώματος.

Οι περισσότεροι (80%) από τους ασθενείς με HIES έχουν ιδιάζουσα εμφάνιση, με αδρά τα χαρακτηριστικά του προσώπου, προέχουσα μύτη με αποπλατυσμένη ράχη και δυσανάλογες παρειές σε σύγκριση με την κάτω γνάθο. Μερικοί παρουσιάζουν αναστολή της ανάπτυξης, ως αποτέλεσμα της χρόνιας νόσου τους και ιδιαίτερα των χρόνιων αναπνευστικών προβλημάτων.

Οι ασθενείς με HIES έχουν μειωμένη οστική πυκνότητα, οι περισσότεροι με έκδηλη οστεοπόρωση που έχει ως συνέπεια υποτροπιάζοντα κατάγματα. Η ανωμαλία αυτή αποδίδεται στην ενεργοποίηση που παρουσιάζουν κύτταρα της σειράς των μονοπύρηνων μακροφάγων αυτών των ασθενών, στην οποία περιλαμβάνονται και οι οστεοκλάστες.

Μικρό ποσοστό από τους ασθενείς με HIES παρουσιάζουν αναπνευστική αλλεργία και εκδηλώνουν άσθμα ή και ρινίτιδα/επιπεφυκίτιδα. Σε ορισμένους, η υποτροπιάζουσα κερατοεπιπεφυκίτιδα συνοδεύεται από ευρήματα χαρακτηριστικά εαρινής επιπεφυκίτιδας

(χρόνια θηλώδη υπερπλασία του επιπεφυκότα του ταρσού του άνω βλεφάρου) και επιπλέκεται από έλκη του κερατοειδούς [33-35].

Κληρονομικότητα.

Οικογενής επίπτωση της νόσου έχει παρατηρηθεί σε μερικές περιπτώσεις, αλλά η πλειοψηφία των περιστατικών είναι σποραδικά. Η μεταβίβαση του νοσήματος ακολουθεί είτε τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα ή αυτοσωμικό υπολειπόμενο. Στην πρώτη περίπτωση της αυτοσωμικής επικρατούσας κληρονόμησης έχουν αναγνωρισθεί ετερόζυγες μεταλλάξεις του μεταγραφικού παράγοντα STAT3. Στην δεύτερη περίπτωση της αυτοσωμικής υπολειπόμενης κληρονόμησης η μοριακή παθογένεση της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή, αφού στη διεθνή βιβλιογραφία έχει περιγραφεί μόνο ένα περιστατικό με μία ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο TYK2 [34,36,37].

Εργαστηριακά ευρήματα.

Οι συνήθεις εργαστηριακές δοκιμασίες, που γίνονται για τη διερεύνηση των ανοσοανεπαρκειών, δεν αποκαλύπτουν αξιοσημείωτες διαταραχές στους ασθενείς με HIES. Οι συγκεντρώσεις των IgG, IgA και IgM, οι αιμολυτικοί τίτλοι του συμπληρώματος και τα επίπεδα των παραγόντων του κυμαίνονται συνήθως εντός των φυσιολογικών ορίων. Ο αριθμός των λευκοκυττάρων του αίματος είναι φυσιολογικός, όταν δεν υπάρχει λοίμωξη, αλλά αυξάνεται σημαντικά κατά τη διαδρομή των οξέων λοιμώξεων. Ουδετεροπένια ή λεμφοπενία δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ. Παρόλα αυτά κατά την ανάλυση υποομάδων T κυτταρικών πληθυσμών, διαπιστώνεται η ανεπάρκεια του Th-17 πληθυσμού των CD4⁺ T κυττάρων, με ανεπηρεάστους τους πληθυσμούς Th-1 και Th-2.

Ο αριθμός των ηωσινοφίλων του αίματος αυξάνεται θεαματικά (μέχρι 40-50%) αμέσως πριν από την εκδήλωση των λοιμώξεων, ενώ ηωσινόφιλα ανευρίσκονται στα πτύελα, κατά τη διάρκεια των οξέων επεισοδίων πνευμονίας, και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κατά της προσβολές μηνιγγίτιδας. Η τοπική ηωσινοφιλία, που επίσης παρατηρείται στα σημεία των εστιακών λοιμώξεων, φαίνεται ότι συμβάλλει στην κάθαρση των καλυμμένων με IgE-αντισώματα μικροοργανισμών.

Η εξαιρετικά αυξημένη συγκέντρωση της IgE είναι το άλλο χαρακτηριστικό εύρημα στο HIES. Από τη βρεφική ήδη ηλικία οι ασθενείς εμφανίζονται με IgE έως και 300 IU/ml (οι φυσιολογικές τιμές της IgE κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής είναι < 4

IU/ml), ενώ οι συνήθεις τιμές της IgE στους μεγαλύτερους ασθενείς είναι σταθερά > 2500 IU/ml. Ιδιαίτερη, όμως, διαγνωστική αξία για το σύνδρομο έχει η μόνιμη ανεύρεση στον ορό υψηλού τίτλου αντισταφυλοκοκκικών IgE-αντισωμάτων. Ειδικά IgE-αντισώματα ανευρίσκονται, βέβαια, και έναντι άλλων, εκτός του *S. aureus*, παθογόνων, όπως η *C. albicans*, ο *H. influenzae*, και ο *S. pneumoniae*, προφανώς λόγω των χρόνιων λοιμώξεων που οι μικροοργανισμοί αυτοί προκαλούν στους ασθενείς.

Ως αποτέλεσμα της πολυκλωνικής παραγωγής της IgE, οι ασθενείς με HIES παρουσιάζουν θετικές άμεσες δερμοαντιδράσεις σε διάφορα εισπνεόμενα και τροφικά αλλεργιογόνα, αλλά κυρίως σε αντιγόνα του *S. aureus*, *C. albicans* καθώς και άλλων βακτηρίων και μυκήτων [33-37].

Διαγνωστική προσέγγιση.

Το κυριότερο διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα, που τίθεται κατά την εμφάνιση του HIES, είναι η διάκρισή του από την τυπική ατοπική δερματίτιδα, ιδιαίτερα κατά τη νηπιακή και την πρώτη παιδική ηλικία, οπότε και τα δύο νοσήματα είναι δυνατόν να εμφανίζονται με διάχυτη, κνησμώδη δερματίτιδα, ηωσινοφιλία και εξίσου υψηλή συγκέντρωση IgE στον ορό. Τα κριτήρια στα οποία βασίζεται η διάγνωση, σε αυτές τις περιπτώσεις είναι:

α. Η ατοπική δερματίτιδα συνοδεύεται, συνήθως, από άλλες αλλεργικές καταστάσεις, όπως τροφική αλλεργία, άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα, καθώς και από οικογενειακό ιστορικό ατοπικής νόσου.

β. Το εξάνθημα, στην ατοπική δερματίτιδα, καλύπτει κυρίως τις καμπτικές επιφάνειες του σώματος και οι βλάβες περιβάλλονται από διάχυτη ερυθρηματώδη άλω, σε αντίθεση με το HIES, όπου οι βλατίδες είναι περιγεγραμμένες και δεν υπάρχει ερύθημα.

γ. Ο *S. aureus*, στην ατοπική δερματίτιδα, προκαλεί κατά κανόνα, επιφανειακές δερματικές λοιμώξεις, ενώ στο HIES οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις επεκτείνονται εν τω βάθει.

δ. Λοιμώξεις από άλλα παθογόνα, που επιπλέκουν συχνά το HIES δεν παρατηρούνται στην ατοπική δερματίτιδα.

ε. Η ατοπική δερματίτιδα εμφανίζεται, συνήθως, μετά τον 2-4^ο μήνα, ενώ οι ασθενείς με HIES παρουσιάζουν συμπτωματολογία εντός των 2 πρώτων μηνών της ζωής.

Το εύρος των τιμών της IgE στον ορό δεν παρουσιάζει διαφορά μεταξύ των ασθενών με HIES και εκείνων με βαριά ατοπική δερματίτιδα. Έχει μάλιστα περιγραφεί περίπτωση

ασθενούς με ατοπική δερματίτιδα, που είχε συγκέντρωση IgE 150.000 IU/ml. Η αντισωματική όμως ειδικότητα της IgE διαφέρει σημαντικά στις δύο καταστάσεις. Έτσι, ενώ στη βαριά ατοπική δερματίτιδα η IgE στρέφεται έναντι πλήθους εισπνεόμενων και τροφικών αλλεργιογόνων, ειδικά αντισταφυλοκοκκικά IgE-αντισώματα ανιχνεύονται μόνο στο HIES. Τα αντισώματα αυτά δεν απαντώνται ούτε στις άλλες καταστάσεις, που συνοδεύονται από υψηλή συγκέντρωση IgE στον ορό, όπως οι χρόνιες παρασιτώσεις, το σύνδρομο Wiskott-Aldrich και η οξεία GnH, ούτε σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις, όπως εκείνη με χρόνια οστεομυελίτιδα ή χρόνια κοκκιωματώδη νόσο.

Επιπλέον, το 1999 οι Grimbacher *et al.* δημοσίευσαν στο *American Journal of Human Genetics* μια κλίμακα βαθμολόγησης ασθενών με HIES, με βάση κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η ανώτατη βαθμολογία που μπορεί να λάβει ένας ασθενής είναι 109 πόντους, ενώ λαμβάνοντας από 16 και άνω θεωρείται πάσχων από HIES. Το σύστημα αυτό βαθμολόγησης έχει υιοθετήσει και το NIH (National Institute of Health), ενώ περισσότερες λεπτομέρειες βρίσκονται στην παραπάνω δημοσίευση [37].

Το 2009 στο 2^ο Πανευρωπαϊκό συνέδριο ανοσολογίας στο Βερολίνο, από τον Grimbacher (εκ μέρους του World-Wide Hyper-IgE Syndrome Study Group), προτάθηκαν τα ακόλουθα διαγνωστικά κριτήρια για το HIES (αυτοσωμική επικρατούσα μορφή).

Possible: IgE ≥ 1000 IU/mL και βαθμολόγηση κατά NIH πάνω από 28 βαθμούς.

Probable: Τα παραπάνω κριτήρια και επιπλέον απουσία Th17 κυττάρων ή επιβεβαιωμένο οικογενειακό ιστορικό HIES.

Definitive: Τα παραπάνω κριτήρια και επιπλέον ετερόζυγες μεταλλάξεις στον STAT3.

Θεραπευτική αντιμετώπιση.

Η εμπειρική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων είναι η μόνη θεραπεία που διατίθεται αυτή τη στιγμή για το HIES. Για την αντιμετώπιση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων απαιτείται συνεχής προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών, αφού 24 – 48 ώρες μετά από την διακοπή της οι ασθενείς παρουσιάζουν νέα λοίμωξη. Η δικλοξακυλλίνη είναι το αντιβιοτικό πρώτης εκλογής, ενώ για όσους αποικίζονται με ανθεκτικά στη μεθικυλλίνη στελέχη, έχει αποδειχθεί δραστική η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη. Όλες, βέβαια, οι οξείες λοιμώξεις δεν πρέπει να αποδίδονται στο *S. aureus*, όταν ιδιαίτερα όταν οι

ασθενείς βρίσκονται σε *per os* προφυλακτική αγωγή με δικλοξακυλλίνη. Η ενδοφλεβια χορήγηση των αντιβιοτικών που θα υποδείξουν οι κατάλληλες καλλιέργειες, πρέπει να αρχίζει το συντομότερο δυνατόν. Σε περίπτωση καντιντίασης χορηγείται, ανάλογα με τη βαρύτητα, αμφοτερικίνη ενδοφλεβίως ή κετοконаζόλη *per os*. Η χειρουργική διάνοιξη και παροχέτευση των αποστημάτων είναι βασική για την αντιμετώπισή τους, ενώ χειρουργική εξαίρεση των πνευματοκηλών, που ο σχηματισμός τους επιπλέκει τα επεισόδια πνευμονίας, επιβάλλεται εφόσον επιμένουν πέραν των 6 μηνών.

Η αντιμετώπιση των δερματικών βλαβών εξαρτάται από τη φύση τους. Η τοπική εφαρμογή κορτικοστεροειδών περιορίζει τη φλεγμονή και τα αντισταμινικά ελέγχουν τον κνησμό των εκζεματοειδών αλλοιώσεων. Η ταχεία, όμως, επέκταση της δερματίτιδας πρέπει αμέσως να εγείρει την υποψία βακτηριακής λοίμωξης. Η έκχυση φυσαλίδων επιβάλλει έλεγχο για ερπητική λοίμωξη, ενώ παράλληλα πρέπει να αποκλειστεί η μυκητίαση.

Η ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην αντιμετώπιση ασθενών με HIES, των οποίων οι λοιμώξεις δεν ελέγχονται με τα αντιβιοτικά [34-39].

1.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ HYPER-IgE

Παρά τα 40 χρόνια επισταμένης επιστημονικής έρευνας στο πεδίο των ανοσοανεπαρκείων και ειδικά του συνδρόμου Hyper-IgE, η μοριακή παθοφυσιολογία του HIES παρέμενε άγνωστη, μέχρι και την πρόσφατη ανακάλυψη γονιδιακών βλαβών σχετιζόμενων με το σύνδρομο. Μία από τις πρώτες ερευνητικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν το 1974 στηριζόμενη στην προδιάθεση των ασθενών σε λοιμώξεις από εξωκυττάρια βακτήρια, πρότεινε ως αιτιοπαθογενετικό μηχανισμό ανεπάρκεια της χημειοταξίας των ουδετεροφίλων [40]. Παρόλα αυτά, έγινε μεταγενέστερα φανερό πως η παρατήρηση αυτή δεν επαληθευόταν σε άλλους ασθενείς με HIES.

Στη συνέχεια και μετά την αναγνώριση των Th1 και Th2 πληθυσμών κυττάρων στους επίμυες, πολλοί ερευνητές μελέτησαν τη διαφοροποίηση Th1 και Th2 κυττάρων σε ασθενείς με HIES. Παρότι κάποιες μελέτες κατέδειξαν τη μειωμένη παραγωγή Th1 κυτταροκινών με παράλληλη αύξηση των Th2 σε ασθενείς, υποστηρίζοντας πως αυτή η

ανισορροπία προκαλεί το σύνδρομο, αυτές φάνηκε να μην μπορούν να επιβεβαιωθούν από άλλες ερευνητικές ομάδες σε βάθος χρόνου.

Περισσότερη από 250 ασθενείς έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Ένας ασθενής με HIES και διανοητική καθυστέρηση διαπιστώθηκε πως έφερε ένα έλλειμμα 15-20 cM στο χρωμόσωμα 4q [37]. Μελέτη γενετικής σύνδεσης 19 οικογενειών με 57 HIES ασθενείς έδειξε σύνδεση του συνδρόμου με περιοχή του 4q. Παρόλα αυτά στάθηκε αδύνατο να αναγνωρισθεί κάποιο γονίδιο ή κάποια συγκεκριμένη γενετική βλάβη στη περιοχή του 4q, στην οποία να μπορεί να αποδοθεί ο φαινότυπος του συνδρόμου. Τελικά και παρότι έγιναν αρκετές προσπάθειες να αναγνωρισθεί η μοριακή αιτιοπαθογένεια του συνδρόμου, η πρώτη μελέτη που συνέδεε τη μεταλλαγή ενός γονιδίου με μία μορφή του συνδρόμου Hyper-IgE, παρουσιάστηκε το 2006 [41]. Αφορούσε ένα μοναδικό ασθενή ο οποίος έφερε μια ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο TYK2, το οποίο κωδικοποιεί μία κινάση της τυροσίνης. Αυτή η πρωτεΐνη ανήκει στο ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT, το οποίο είναι ένα πολύ σημαντικό σύστημα μεταγωγής σήματος από πληθώρα υποδοχέων της μεμβράνης προς τον πυρήνα. Αποτελείται από 4 κινάσες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια (JAK1, 2, 3 και TYK2) και 7 μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν και αυτή στην ίδια οικογένεια (STAT1, 2, 3, 4, 5a/b και 6).

Τα κύτταρα του αίματος του ασθενούς με την ομόζυγη μετάλλαξη της TYK2 παρουσίαζαν σημαντικά ελλείμματα στην απόκριση σε πολλές κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένου των τύπου I ιντερφερονών (IFN α και IFN β), IL-6, IL-10, IL-12 και IL-23.

Εικόνα 1. Μοριακά μονοπάτια μετάδοσης σήματος του ανοσοποιητικού συστήματος στα οποία εμπλέκεται ο STAT3, STAT4 και TYK2.

Η αναγνώριση της μετάλλαξης στην πρωτεΐνη TYK2 σε έναν ασθενή με μια μορφή του συνδρόμου, ώθησε την έρευνα να εστιάσει σε βλάβες του μονοπατιού JAK/STAT, που να σχετίζονται με το σύνδρομο Hyper-IgE. Η έρευνα στράφηκε στη μελέτη της απόκρισης κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών με HIES, ύστερα από ενεργοποίηση με IL-6, IL-10, IL-12 και IFNα.

Η έκκριση IgM από τα B κύτταρα των ασθενών ύστερα από ενεργοποίηση με EBV και παρουσία ή απουσία IL-6, κατέδειξε πως το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-6 ήταν ελαττωματικό. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ελαττωματική αναστολή της παραγωγής TNF-α (ο οποίος επάγεται από ενεργοποίηση με LPS), λόγω της δράσης της IL-10 σε κύτταρα ασθενών, ενώ παράλληλα βρέθηκε φυσιολογική η λειτουργία των σημάτων από την IL-12 και IFNα. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν σε μια προσπάθεια να αναγνωρισθούν μόρια τα οποία συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια IL-6 και IL-10 από κοινού, αλλά δεν έχουν ρόλο στις λειτουργίες των IL-12 και IFNα.

Με το παραπάνω κατά νου, το 2007 αναγνωρίστηκαν οι πρώτες ετερόζυγες και επικρατείς μεταλλάξεις (dominant negative mutations) στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα STAT3, στην περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την δομική περιοχή της πρωτεΐνης, υπεύθυνη για την δέσμευση στο DNA (DNA-binding domain) [42,43]. Το

μοτίβο δέσμευσης στο DNA του STAT3 είναι εξαιρετικά συντηρημένο μεταξύ των οργανισμών σε ότι αφορά την αμινοξική του αλληλουχία, ενώ οι συγκεκριμένες αλλαγές που αναγνωρίστηκαν στους ασθενείς δεν εντοπίζονται σε υγιείς, αποκλείοντας το ενδεχόμενο πολυμορφισμών.

Σε μετέπειτα μελέτες αναγνωρίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του STAT3 στους περισσότερους ασθενείς με HIES. Οι πρωτεϊνικές περιοχές του STAT3 που αναγνωρίστηκαν νέες μεταλλάξεις επεκτάθηκαν πέραν της περιοχής δέσμευσης του DNA, στην περιοχή SH2 (Src homology 2 domain), στην περιοχή ενεργοποίησης (Trans-activation domain) και στην περιοχή σπειροειδούς σπειράματος (Coiled-coil domain) [44-46]. Μέχρι στιγμής δεν έχει διαφανεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της περιοχής που βρίσκεται η μετάλλαξη και συγκεκριμένου φαινοτύπου του συνδρόμου, ενώ μελετάται αν το είδος και η θέση της μετάλλαξης μπορεί να συσχετίζεται με την βαρύτητα του συνδρόμου.

Ο μεταγραφικός παράγων STAT3 έχει θέσεις δέσμευσης στους υποκινητές πληθώρας γονιδίων συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων των πρωτεϊνών οξείας φάσης. Επιπλέον, έχει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου στη δράση πολλών κυτταροκινών, όπως της IL-6, IL-10, IL-22, IL-23 και IL-27. Η απαλοιφή και των δύο αντιγράφων του γονιδίου STAT3 από το γονιδίωμα επίμυων, κατέδειξε ότι ήταν απαραίτητος για την επιβίωση των εμβρύων από την στιγμή της εμφύτευσης (E6.5-E7.5) [47]. Αντίθετα η απαλοιφή μόνο του ενός αντιγράφου δεν επηρέασε ούτε την επιβίωση ούτε των φαινότυπο των ζώων. Φαίνεται πως οι ετερόζυγες επικρατείς μεταλλάξεις που έχουν αναγνωριστεί στους ανθρώπους προξενούν την απώλεια λειτουργικότητας του μεταγραφικού παράγοντα σε τέτοιο βαθμό ώστε να εμφανίζεται παθολογικός φαινότυπος αλλά παράλληλα να επιτρέπεται η επιβίωση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως δεν υπάρχει μέχρι σήμερα κάποιο *in vivo* μοντέλο της ασθένειας, δηλαδή κάποιος επίμυας στον οποίο να έχει εισαχθεί (Knock-in) κάποια από τις μεταλλάξεις του STAT3 που προκαλούν το σύνδρομο. Τέλος, ιστοειδική απαλοιφή του γονιδίου του STAT3 σε επίμυες κατέδειξε τον κρίσιμο ρόλο του στην κυτταρική μετανάστευση, επιβίωση, πολλαπλασιασμό, απόπτωση και φλεγμονή σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους, όπως του δέρματος, του ήπατος, του θύμου, του αναπνευστικού επιθηλίου, σε νευρώνες, σε λεμφοκύτταρα και μακροφάγα [48].

1.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ Th 17 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Παρότι, η μοριακή αιτιοπαθογένεια αναγνωρίστηκε σε ένα σημαντικό βαθμό με τις μεταλλάξεις στο μεταγραφικό παράγοντα STAT3, η μοριακή παθοφυσιολογία του συνδρόμου είναι ακόμα μη κατανοητή πλήρως. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα ερωτήματα που σχετίζονται με τις εκδηλώσεις του συνδρόμου: Ποιος είναι ο μοριακός μηχανισμός πίσω από τις βλάβες των οστών και των δοντιών; Γιατί οι ασθενείς με HIES δεν εμφανίζουν σημαντική φλεγμονώδη αντίδραση σε σοβαρές λοιμώξεις; Γιατί οι ασθενείς παρουσιάζουν εκδηλώσεις ατοπίας, και τέλος γιατί προσβάλλονται κυρίως από εξωκυττάρια παθογόνα και οι λοιμώξεις περιορίζονται σε δέρμα και πνεύμονες;

Ο STAT3 φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση τόσο των οστεοβλαστών όσο και των οστεοκλαστών *in vitro*, ενώ επίμυες με απαλοιφή του γονιδίου STAT3 από τους οστεοβλάστες παρουσίασαν οστεοπορωτικό φαινότυπο [49]. Επίσης, όταν μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών HIES με STAT3 μεταλλάξεις διαφοροποιήθηκαν *in vitro* με τη δράση M-CSF1 (M-colony stimulating factor 1) και RANKL (Receptor activator of nuclear factor κB ligand) σε οστεοκλάστες, επέδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα απορρόφησης οστού σε σχέση με τα κύτταρα υγιών μαρτύρων [42]. Τα παραπάνω μπορεί να αντικατοπτρίζουν τις ανωμαλίες του σκελετού και των δοντιών που παρουσιάζονται σε ασθενείς με σύνδρομο Hyper-IgE.

Ένα ακόμα κλινικό χαρακτηριστικό των ασθενών με HIES είναι πως παρότι μπορεί να πάσχουν από σοβαρή πνευμονία ή/και δερματικές λοιμώξεις (ψυχρά αποστήματα), η γενική τους κατάσταση κρίνεται καλή, σε σχέση με την υποκείμενη παθολογία. Επιπλέον, στους ασθενείς με HIES κατά τη διάρκεια λοιμώξεων δεν παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η CRP. Ο STAT3 είχε αρχικώς αναγνωριστεί ως ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος προσδένετε στους υποκινητές γονιδίων εξαρτώμενων από την IL-6, τα οποία κωδικοποιούν της ηπατικές πρωτεΐνες οξείας φάσης, ενώ απαλοιφή του ειδικά στο ήπαρ επίμυων οδηγεί σε ελαττωματική απόκριση οξείας φάσης [50]. Ως εκ τούτου, η προφανής έλλειψη κλασσικής φλεγμονώδους αντίδρασης στους ασθενείς με σύνδρομο Hyper-IgE μπορεί να αποδοθεί σε ελαττωματική μεταγωγή σήματος του μονοπατιού της IL-6.

Σε ότι αφορά το μηχανισμό στον οποίο οφείλονται οι αυξημένοι τίτλοι αντισωμάτων IgE δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή πειραματικά δεδομένα που να δικαιολογούν τον φαινότυπο. Τελευταία δεδομένα εμπλέκουν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ξεκινάει με την IL-21. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια πρόσφατη μελέτη που καταδεικνύει τον αντίστροφο ρόλο που έχει η IL-21 σε επίμυες και ανθρώπους, υποστηρίζοντας πως στους τελευταίους η IL-21 επάγει την παραγωγή IgE μέσω ενεργοποίησης του μορίου CD40 παρθενικών β κυττάρων (naive B cells), ενώ την καταστέλλει στους επίμυες [51].

Ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3 έχει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση και ανάπτυξη του Th 17 κυτταρικού πληθυσμού, ενώ η IL-17 που παράγεται από αυτό τον πληθυσμό κυττάρων είναι απαραίτητη για την άμυνα του οργανισμού έναντι εξωκυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών [52]. Ο Th 17 πληθυσμός κυττάρων, εκτός από την IL-17, παράγει και IL-17F, IL-22. Οι λειτουργίες τους στον άνθρωπο δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρες, αλλά υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως αυτά τα κύτταρα παίζουν κρίσιμο ρόλο στην επιστράτευση των ουδετερόφιλων και στην παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων όπως της β-ντεφενσίνης 2 (β-defensin 2, BD2) και BD3 από τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα.

Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της διαφοροποίησης των T-κυττάρων σε Th1, Th2, Treg, και Th17.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ο πληθυσμός κυττάρων Th17 απουσιάζει από τους ασθενείς με HIES [53,54]. Η παρουσία, στους ασθενείς σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο που παίζουν τα Th17 κύτταρα στην προστασία έναντι του *S.aureus*, στον άνθρωπο.

Μοριακά, η διαφοροποίηση CD4+ T κυττάρων σε Th17, είναι ένα γεγονός που εξαρτάται από την δράση των IL-6, IL-21, IL-23 και TGF-β και την εν συνεχεία ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3. Ο STAT3 φωσφορυλιώνεται, διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων όπου και επάγει την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ένα πλέον σημαντικό γονίδιο του οποίου την μεταγραφή επάγει ο STAT3 είναι ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας ειδικός των T κυττάρων, ο ROR-γT (Retinoic acid - related orphan receptor γ T). Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας είναι κυρίως υπεύθυνος για την διαφοροποίηση των CD4+ T κυττάρων σε Th17. Η διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: Στάδιο διαφοροποίησης, στάδιο ενίσχυσης και στάδιο σταθεροποίησης. Ο STAT3 φαίνεται πως είναι απαραίτητος ιδιαίτερα στα στάδια της διαφοροποίησης που είναι και το εναρκτήριο, καθώς και της σταθεροποίησης των Th17 κυττάρων [55-59].

Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων κατά τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων προς Th17. Γίνεται εστίαση το στάδιο διαφοροποίησης, ενίσχυσης και σταθεροποίησης.

1.5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ HYPER IgE

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 67 μεταλλάξεις σε 50 θέσεις του γονιδίου του STAT3 σε 206 ασθενείς. Η πλειοψηφία τους είναι αντικαταστάσεις βάσεων που οδηγούν στην αντικατάσταση αμινοξέος και εντοπίζονται κύρια στην περιοχή δέσμευσης του DNA και στην περιοχή SH2 (Src homology 2 domain). Επίσης, κάποιες είναι απαλοιφές βάσεων που οδηγούν στην απαλοιφή αμινοξέων, άλλες επηρεάζουν την φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση του μορίου, ενώ άλλες εντοπίζονται σε εσόνια, στα όρια εξονίων/εσονίων, απαλείφοντας κάποιο εξόνιο. Όλες οι μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί έως σήμερα είναι ετερόζυγες.

Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του παράγοντα STAT3 και των μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί έως και σήμερα.

2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι στόχοι που τέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ήταν οι παρακάτω.

- Ο πλήρης κλινικός χαρακτηρισμός ενός ασθενούς με σύνδρομο Hyper-IgE.

Σε συνεργασία με την παιδιατρική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών έγινε πλήρης κλινικός και εργαστηριακός χαρακτηρισμός ασθενούς με πιθανό σύνδρομο Hyper-IgE.

- Η ανευρέση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων που σχετίζονται με το σύνδρομο στον ασθενή.

Ανάλυση με τεχνολογίες προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing) γονιδίων που ενέχονται στην ανοσολογική απόκριση και σχετίζονται με μορφές του συνδρόμου οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί από τη διεθνή βιβλιογραφία. Σε αυτά τα πλαίσια έγινε νουκλεοτιδική αλληλούχιση των γονιδίων STAT3, STAT4, TYK2 του ασθενούς.

- Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός της/των μεταλλάξης/ων οι οποίες αναγνωρίστηκαν στον ασθενή.

Χαρακτηρισμός της αναγνωρισθείσας μετάλλαξης (μετάλλαξεις) με *in vitro* και *in vivo* τεχνικές με σκοπό να μελετηθούν οι συνέπειές της στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και ο ρόλος που έχει στην ανάπτυξη του συνδρόμου.

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Ασθενής

Μελετήθηκε μία ασθενής με σύνδρομο Hyper-IgE η οποία αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε κλινικά στην παιδιατρική κλινική του Πανεπιστημίου Πατρών. Παράλληλα μελετήθηκαν και τρεις υγιείς μάρτυρες του ίδιου φύλου οι οποίοι ανήκαν στην ίδια ηλικιακή ομάδα.

Η ασθενής ήταν 12 ετών και είχε ιστορικό ατοπικής δερματίτιδας από την ηλικία των 6 μηνών. Επιπλέον από το ιστορικό διαπιστώθηκε πως έπασχε από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένου επαναλαμβανομένων επεισοδίων δερματικών αποστημάτων και πνευμονιών. Στον απεικονιστικό έλεγχο διαπιστώθηκε η ύπαρξη κύστεων στο δεξιό πνεύμονα οι οποίες σχετίζονταν με τα επεισόδια πνευμονιών.

Απο τη φυσική εξέταση το ύψος της βρέθηκε 118 εκατοστά (κάτωθεν της 5^{ης} εκατοστιαίας θέσης) ενώ το βάρος της 25,8 κιλά (κάτωθεν της 5^{ης} εκατοστιαίας θέσης). Είχε αδρά χαρακτηριστικά προσώπου με ασυμμετρία στη μέση γραμμή και προτεταμένο μέτωπο. Επίσης διαπιστώθηκε σκολίωση 14°.

Στον αιματολογικό έλεγχο βρέθηκε ηωσηνοφιλία (4000 κύτταρα/μl) ενώ η ανοσοσφαιρίνη E κυμαινόταν από 2000 έως και 74000 IU/ml. Όλα τα άλλα εργαστηριακά ευρήματα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια ενώ μικρή αύξηση διαπιστώθηκε στην ανοσοσφαιρίνη D του ορού. Η ανάλυση των T λεμφοκυττάρων έδειξε φυσιολογικούς πληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺ (883 και 850 κύτταρα/μl, αντίστοιχα). Σύμφωνα με το σύστημα βαθμονόμησης του NIH για το σύνδρομο Hyper-IgE, η ασθενής έλαβε 65 βαθμούς (Πίνακας 1).

Η οικογένεια της ασθενούς και οι κηδεμόνες της ενημερώθηκαν λεπτομερώς για τη μελέτη και έδωσαν ενυπόγραφη συγκατάθεση. Η ασθενής βρίσκεται υπό τακτική παρακολούθηση από την Παιδιατρική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών.

	Βαθμοί										
Κλινικά ευρήματα	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Highest serum IgE level (IU/ml)											x
Skin abscesses									x		
Pneumonia (episodes over lifetime)					x						
Parenchymal lung anomalies							x				
Retained primary teeth									x		
Scoliosis, Maximum curvature			x								
Fractures with minor trauma	x										
Highest eosinophil count (cells/μl)							x				
Characteristic face						x					
Midline anomaly						x					
Newborn rash	x										
Eczema (worst stage)			x								
Upper respiratory tract infections / year		x									
Candidiasis		x									
Other serious infections	x										
Fatal infections	x										
Hyperextensibility					x						
Lymphoma	x										
Increased nasal width		x									
High palate			x								
Young age correction	x										

Πίνακας 1. Ο συμπληρωμένος πίνακας βαθμονόμησης του NIH για την ασθενή.

3.2. Κύτταρα και Κυτταροκαλλιέργειες

3.2.1. Απομόνωση κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs)

1. Το ηπαρινισμένο περιφερικό φλεβικό αίμα (3ml) αραιώνεται 1:1 με PBS.
2. Σε αποστειρωμένο σωλήνα (15ml) τοποθετείται διάλυμα Ficoll και προστίθεται το αραιωμένο αίμα σε αναλογία 2:3 (2 μέρη Ficoll : 3 μέρη αραιωμένο αίμα). (Προσοχή

στην τοποθέτηση του αίματος αργά ώστε να σχηματιστεί ξεχωριστεί στοιβάδα πάνω από το διάλυμα Ficoll και όχι να αναμειχθεί.)

3. Μεταφορά στη φυγόκεντρο και φυγοκέντρωση στις 2700 rpm για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Μετά τη φυγοκέντρωση απομακρύνεται η στοιβάδα των μονοπύρηνων του αίματος με αποστειρωμένη πιπέτα, η οποία εντοπίζεται μεταξύ του ορού του αίματος και του διαλύματος Ficoll.

5. Τα απομονωμένα PBMCs μεταφέρονται σε καινούριο σωλήνα και συμπληρώνουμε με τετραπλάσια ποσότητα PBS.

6. Φυγοκέντρωση στις 1800 rpm και στους 4°C για 10 min. Αφαιρείται το υπερκείμενο, επαναδιαλύεται το ίζημα των κυττάρων, και επαναλαμβάνεται η διαδικασία με τις ίδιες συνθήκες όπως προηγουμένως.

7. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία τρεις φορές συνολικά.

8. Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε μικρό όγκο καλλιεργητικού υλικού RPMI-1640. 20 μl διαλύματος κυττάρων και αναμιγνύονται με 20 μl χρωστικής Trypan Blue (χρώση νεκρών κυττάρων) και με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου υπολογίζετε ο αριθμός των κυττάρων. Συμπληρώνουμε με τον κατάλληλο όγκο καλλιεργητικού υλικού και επωάζουμε στους 37°C, 5% CO₂.

3.2.2. Απομόνωση ινοβλαστών δέρματος

Οι ινοβλάστες δέρματος απομονώνονται από βιοψίες δέρματος 2 χιλιοστών υπο τοπική αναισθησία (punch biopsies). Τα τεμαχίδια ιστού που λαμβάνονται είναι περίπου διαστάσεων 1 κυβικού χιλιοστού. Εφαρμόζονται αυστηρές συνθήκες αντισηψίας ώστε να αποφευχθούν και μετέπειτα μολύνσεις στην καλλιέργεια. Τα τεμαχίδια ιστού τοποθετούνται σε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm και συμπληρώνεται καλλιεργητικό υλικό μέχρι κάλυψης του ιστοτεμαχιδίου. Επώαση στους 37°C, 5% CO₂ για τουλάχιστον 4 ημέρες χωρίς να διαταραχθεί το τρυβλίο. Εν συνεχεία ελέγχεται για εμφάνιση των ινοβλαστών περιφερειακά των ιστοτεμαχιδίων. Το καλλιεργητικό υλικό ανανεώνεται χωρίς να διαταραχθούν τα ιστοτεμαχίδια, των οποίων την περιφέρεια πιθανώς αναπτύσσονται ινοβλάστες.

3.2.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια των κυττάρων αποσκοπεί στη συνεχή παροχή του απαραίτητου προς μελέτη βιολογικού υλικού. Τα κύτταρα, όταν καλλιεργούνται σε στερεό υπόστρωμα αφήνονται κατά γενικό κανόνα να αναπτυχθούν μέχρι να καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταρικής επιφάνειας, ένα σημείο δηλαδή μέχρι το οποίο η ανάπτυξη δεν παρεμποδίζεται από την έλλειψη χώρου. Τα κύτταρα τα οποία δεν προσκολλώνται στο τρυβλίο αναπτύσσονται έως ότου η συγκέντρωσή τους προσεγγίζει το 1×10^6 /ml.

Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα είναι δυνατή α) με μηχανικό τρόπο, β) με χημικά μέσα, γ) με ενζυμική δράση. Κατά την τελευταία περίπτωση συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα.

Τα κύτταρα που δεν προσκολλώνται μεταφέρονται για ανακαλλιέργεια με την χρήση ήπιων μηχανικών μέσων αφού δεν απαιτούν αποκόλληση από το τρυβλίο, αλλά χρειάζεται η ήπια διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων.

Υλικά και διαλύματα

- Τρυψίνη/EDTA (0.05 %-0.02 % σε PBS χωρίς Ca^{2+}).
- DMEM.
- Ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS).

Πειραματική πορεία

1. Πλύσιμο των κυττάρων δύο φορές με 1x PBS.
2. Προσθήκη 0,7 ml τρυψίνης/τρυβλίο διαμέτρου 100mm και επώαση για 1 min.
3. Αμέσως μόλις πραγματοποιηθεί η αποκόλληση των κυττάρων, αναστέλλεται η τρυψίνη με την προσθήκη 10 ml θρεπτικού μέσου DMEM.
4. Ανάδευση των κυττάρων με σιφόνιο (μηχανική δράση), ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων και να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή τους.
5. Διαχωρισμός του κυτταρικού εναιωρήματος σε αναλογία 1:3

3.2.4. Ψύξη κυττάρων

Η διατήρηση των ζωικών κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο. Για την επιτυχή διατήρησή τους είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν από την ψύξη τους και για το λόγο αυτόν κατά γενικό κανόνα η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου. Επιπλέον, η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται βαθμιαία (περίπου 1°C / hour) μέχρι η θερμοκρασία τους να φτάσει ένα κρίσιμο σημείο (-20°C) προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού. Επίσης για να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων καταψύχονται παρουσία διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO).

Υλικά και διαλύματα

- DMSO (dimethylsulfoxide, διμέθυλο-σουλφοξείδιο).
- DMEM.
- Ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS).
- Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials).
- Ειδικό δοχείο ψύξης κυττάρων με ισοπροπανόλη.

Πειραματική πορεία

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων.
2. Πλύσιμο 2 φορές με 1x PBS.
3. Προσθήκη 0,7 ml τρυψίνης (1x Trypsin). Επώση για 1 min στους 37°C.
4. Προσθήκη 10 ml θρεπτικού μέσου, προκειμένου να ανασταλεί η επίδραση της τρυψίνης.
5. Ανάμιξη και μεταφορά των κυττάρων σε 15 ml falcon.
6. Φυγοκέντρωση στα 800 rpm για 4 λεπτά.
7. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος στο θρεπτικό μέσο που έχει απομείνει.
8. Προσθήκη 5 ml 1x PBS και φυγοκέντρωση ξανά στα 800 rpm για 4 min.

9. Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml παγωμένου ορού FBS/10% DMSO (φιλτραρισμένο) και μεταφορά στα κατάλληλα δοχεία ψύξης (cryovials). Το DMSO είναι κρυοπροστατευτικό και προστατεύει τα κύτταρα από την απότομη ψύξη.
10. Τοποθέτηση των ειδικών δοχείων ψύξης στους -80°C . Αποθήκευση για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, γίνεται σε υγρό άζωτο.

3.2.5. Απόψυξη κυττάρων

1. Σε τρυβλίο 100mm προστίθενται 10ml θρεπτικό μέσου.
2. Μεταφορά των ειδικών δοχείων ψύξης των κυττάρων από τους -80°C σε υδατόλουτρο των 37°C , υπό ανάδευση.
3. Μεταφορά του περιεχομένου του δοχείου ψύξης στο τρυβλίο.

3.3. Διέγερση κυττάρων σε κυτταρικές καλλιέργειες

3.3.1. Διέγερση κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).

Τα κύτταρα του περιφερικού αίματος απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά από 16 ώρες σε καλλιέργεια, στα κύτταρα προστέθηκε PHA (phytohemagglutinin) σε τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ ή 10 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) και 1 mg/ml ιονομυκίνη. Τα κύτταρα αναλύθηκαν στα χρονικά σημεία 2, 4 και 8 ωρών υπό την επίδραση διέγερσης είτε στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα χωρίς διέγερση.

3.3.2. Διέγερση ινοβλαστών δέρματος.

Η διέγερση των ινοβλαστών σε καλλιέργεια έγινε με τη χρήση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ιντερλευκίνης 6 (IL-6, Chemicon) σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml . Τα κύτταρα 8 ώρες πριν τη διέγερση καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό DMEM και αντιβιοτικών (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη), δηλαδή στερούνταν από τον ορό εμβρύου βοός (FBS). Εν συνέχεια διεγείρονταν με IL-6 για 30 min.

3.4. Ανάλυση πρωτεϊνών

3.4.1. Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ανθρώπινα κύτταρα σε καλλιέργεια.

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων από το τρυβλίο και πλύσιμο 2 φορές με 1x PBS
2. Προσθήκη 1x PBS και αποκόλληση με μηχανική δράση των προσκολλημένων στο τρυβλίο κυττάρων.
3. Συλλογή του εναιωρήματος και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές στους 4°C για 5 min.
4. Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα 50μl 1xFSB, που περιέχει SDS. Ακολουθεί θέρμανση στους 100°C για 5min, ώστε να αποδιαταχθούν πλήρως οι πρωτεΐνες. Οι αποδιαταγμένες, πλέον, πολυπεπτιδικές αλυσίδες προσδένονται στο SDS και φορτίζονται αρνητικά. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι η μετακίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων μέσα στην πηκτή θα είναι ανάλογη του μοριακού μεγέθους τους.
5. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C.

3.4.2. Ανοσοστύπωμα (ανάλυση Western)

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδιου και ακολούθησε μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF (Biorad).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραίωση	Εταιρεία/ αναφορά
<i>Πρωτογενή αντισώματα</i>			
α-STAT3	κουνέλι	1:1000	Santa Cruz
α-STAT3-pY	κουνέλι	1:500	Santa Cruz
<i>Δευτερογενή αντισώματα</i>			
α-rabbit HRP	κατσίκα	1:3000	Santa Cruz

Πίνακας 2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα Western.

3.4.3. Ανοσοφθορισμός

1. Τοποθέτηση -μια μέρα πριν το πείραμα- αποστειρωμένων καλυπτρίδων επικαλυμένων με poly-L-λυσίνη στα τρυβλία, όπου θα επιστρωθούν τα υπό μελέτη κύτταρα
2. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και πλύσιμο των κυττάρων 2 φορές με 1xPBS.
3. Προσθήκη 4% παραφορμαλδεύδης στα τρυβλία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθεί πλύσιμο δύο φορές με 1xPBS.
5. Εν συνεχεία πραγματοποιείται:
 - επώαση με 0,3% Triton σε 1xPBS για 5 min.
 - πλύσιμο 3 φορές με 1x PBS, για 5 min.
 - επώαση με διάλυμα επικάλυψης των μη ειδικών θέσεων 3% BSA/10% FBS σε 1x PBS για 1 hour.
6. Προσθήκη του πρώτου αντισώματος (περίπου 40μl σε διάλυμα επικάλυψης των μη ειδικών θέσεων) και επώαση όλη τη νύχτα στους 4⁰C.
7. Πλύσεις 3 φορές με 0,1% Tween σε PBS
8. Προσθήκη δευτέρου αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση σε 3% BSA/10% FBS σε 1xPBS και επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Πλύσεις 3 φορές με 0,1% Tween σε PBS για 5 min.
10. Πλύση με νερό.
11. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων ανάποδα πάνω σε mounting medium (Vector Laboratories) με χρωστική DAPI (βάφει τους πυρήνες μόνο) και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραίωση	Εταιρεία/ αναφορά
<i>Πρωτογενή αντισώματα</i>			
α-STAT3	Κουνέλι	1: 1000	Santa Cruz
<i>Δευτερογενή αντισώματα</i>			
α-rabbit 488	κατσίκα	1:500	Mol. Probes

Πίνακας 3. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοφθορισμού.

3.5. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

3.5.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (Απομόνωση DNA και RNA)

Η απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος έγινε από 3 ml ηπαρινισμένου αίματος με την χρήση του συστήματος Flexigene της εταιρείας Qiagen, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, ξεκινώντας από 3 ml περιφερικού φλεβικού αίματος.

Για την απομόνωση RNA από κύτταρα περιφερικού αίματος σε καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα RNeasy της εταιρείας Qiagen, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Στα κύτταρα ($\sim 1 \times 10^6$) προστίθενται 600 μ l διαλύματος RLT. Τα συσσωματώματα των κυττάρων σπάνε με καλή ανατάραξη (vortex).
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε QIAshredder κολώνα που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι χωρητικότητας 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min.
- Στην κολώνα προστίθενται 600 μ l 70% αιθανόλης.
- Το δείγμα μεταφέρεται στην RNeasy mini κολώνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 sec. 700 μ l διαλύματος RW1 προστίθενται στην κολώνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 sec. Απομακρύνεται το υγρό που πέρασε από την κολώνα.
- Έπειτα 500 μ l διαλύματος PRE προστίθενται εκ νέου στην κολώνα, η οποία φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 2 min.
- Η κολώνα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι χωρητικότητας 2 ml και στη συνέχεια στεγνώνεται με φυγοκέντρησή της στις 13000 rpm για 1 min.
- Στη συνέχεια η κολώνα μεταφέρεται σε σωληνάκι erpendorf. Σε αυτή προστίθενται 50 μ l RNase free water και το RNA εκλύεται και συλλέγεται στο erpendorf ύστερα από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.

3.5.2. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το SuperScript II, First Strand Synthesis System της Invitrogen. Ακολουθείται το πρωτόκολλο του κατασκευαστή από 500 ng

RNA και ως εκκινητές τα τυχαία εξαμερή (**Random Hexamers**). Το πρωτόκολλο του κατασκευαστή παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω.

3.5.3. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (Sequencing)

Για τη διαδικασία αυτή ακολουθήθηκαν 3 στάδια: Η ενίσχυση ειδικά του γονιδίου στόχου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η απομόνωση των προϊόντων DNA της PCR, και ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (Sequencing).

3.5.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μία in-vitro ενζυμική μέθοδος πολλαπλασιασμού αλληλουχιών του DNA. Για την ενζυμική αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια τα οποία υβριδοποιούνται με τα άκρα των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων της αλληλουχίας του DNA (cDNA) την οποία θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μέγεθος του επιλεγμένου προς πολλαπλασιασμό τμήματος DNA

ορίζεται από τη θέση που κατέχουν τα 5' άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων - εκκινητών. Η αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 95 °C.
- Πρόσδεση του ζεύγους των ολιγονουκλεοτιδίων - εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (annealing). Η θερμοκρασία σύνδεσης συνήθως είναι χαμηλότερη κατά 5 °C από τη θερμοκρασία τήξης των ολιγονουκλεοτιδίων.
- Επιμήκυνση του ανασυνδυασμένου ολιγονουκλεοτιδίου από την Taq πολυμεράση στους 72 °C για 1min/1kb DNA.

Οι κύκλοι αποδιάταξης, σύνδεσης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνονται για 25-30 φορές. Τα προϊόντα του DNA που δημιουργήθηκαν σε κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται σαν μήτρα για τον επόμενο κύκλο. Το αποτέλεσμα είναι η εκθετική συσσώρευση του επιλεγμένου τμήματος DNA.

Υλικά

Δεοξυνουκλεοτίδια: dNTPs

Taq πολυμεράση (LA Taq, TAKARA)

10X ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης

25mM MgCl₂

cDNA ή γενομικό DNA

ολιγονουκλεοτίδιο 1- νοηματικός εκκινητής (forward primer)

ολιγονουκλεοτίδιο 2-αντινοηματικός εκκινητής (reverse primer)

Στον πίνακα 4 φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

ST3GMF1	AGCCCATCTTCTCTTTCTC	Εκκινητές οι οποίοι περιβάλλουν το εξόνιο 10 του γονιδίου STAT3.
ST3GMR1	ATTTC AACCCCGCAACAGTG	
ST3CDF1	TGACTGGAAGAGGCGGCAAC	Εκκινητές οι οποίοι καλύπτουν όλο το μήκος του cDNA του γονιδίου STAT3.
ST3CDR1	TGGTGGTGGAGGAGAACTGC	
ST3CDF2	TAACATTCTGGGCACAAACAC	
ST3CDR2	TTTGGCTGTGTGAGGGGTGG	
ST3CDF3	TCGGCCTCTGCCGGAGAAAC	
TYK2F1	AGCTGCAGGTGGGGGAGGGGG	Εκκινητές οι οποίοι καλύπτουν όλο το μήκος του cDNA του γονιδίου TYK2.
TYK2F2	ATTGGGTCTGGGGGGTCTTTGG	
TYK2R1	TTAGCACAGAGTCAGACCAGC	
TYK2CDF1	TTGCTTGAGTTGACACAGGG	
TYK2CDR1	AACCCTCCTCCTTGTTACCC	
TYK2CDF2	TGACAGGCACTGGTGGCATCC	
TYK2CDR2	AGGCTGGCTGTCTCGTAGAAG	
TYK2CDF3	GCAAGATGGATGACGAGGAC	
TYK2CDR3	GGCACGTACTCCATGACCAG	
TYK2CDF4	GCTGGAAGCAGGAGATTGAC	
TYK2CDR4	ATCCCCCTCTTGGTTTCATC	
ST4CDF1	AGGGACTGTGAGGGGCGCTTC	Εκκινητές οι οποίοι καλύπτουν όλο το μήκος του cDNA του γονιδίου STAT4.
ST4CDR1	GCTGTCGCTCAACCACAAATG	
ST4CDF2	TGATCCCATTTCCAATGCAAAG	
ST4CDR2	TTCTCCGAGATGGCTTTTAC	
ST4CDF3	AGGAACGGCTGTTGCTAAAGG	
STCDR3	TCCTTTCTTGGTGCGTCAGAG	

Πίνακας 4. Εκκινητές DNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα για τη μελέτη των γονιδίων STAT3, STAT4 και TYK2.

3.5.3.2. Απομόνωση προϊόντων DNA από PCR.

Η απομόνωση των προϊόντων της PCR έγινε με το σύστημα NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Εν συντομία:

- Το σύνολο της αντίδρασης PCR αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος NT.
- Το διάλυμα που προκύπτει εισάγεται σε στήλη και φυγοκεντρείται με αποτέλεσμα τη δέσμευση του προϊόντος της PCR.

- Εν συνεχεία η στήλη πλένεται με 600 μl διαλύματος NT3.
- Τέλος, αφού η στήλη στεγνώσει, προσθέτουμε 30 μl διαλύματος έκλουσης και φυγοκεντρούμε για 1 min.

Όλες οι φυγοκεντρίσεις γίνονται στα 11000 X rpm.

3.5.3.3. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (Sequencing)

Για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA εφαρμόστηκε η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger.

Δείγματα απεστάλησαν στην εταιρεία Macrogen και αναλύθηκαν με τους κατάλληλους εκκινητές. Τα αποτελέσματα επεστράφησαν με τη μορφή χρωματογραφημάτων. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων sequencing αναλύθηκαν με τα διαδικτυακά λογισμικά Chromas, Blastn, Blast2seq (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), Expasy (<http://us.expasy.org/tools/>), PolyPhen algorithm (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), Sorting Intolerant From Tolerant program (<http://sift.jcvi.org/>).

3.5.4. Real-Time PCR (RT-PCR)

Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα Rotor-Gene 3000 της εταιρείας Corbett Research.

- Αρχικά προετοιμάζεται το master mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Αυτό περιλαμβάνει το ζεύγος των δύο εκκινητών, το SYBR Green Master Mix και H₂O. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0.5 pmol/μl.
- Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά διάφανα σωληνίδια. Σε κάθε θέση προστίθενται 18 μl από το master mix και 2 μl δείγματος cDNA. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται τρεις φορές. Επίσης χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου, δείγματα από RNA, τα οποία δεν έχουν υποστεί αντίστροφη μεταγραφή (RT-), καθώς και δείγματα στα οποία αντί cDNA προστίθεται H₂O (NTC).
- Στη συνέχεια ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιούνται 40 κύκλοι ενίσχυσης. Το πρόγραμμα που ακολουθείται αναλυτικά περιγράφεται παρακάτω:

Thermal Cycler protocol:➤ **Stage 1:** Repeats=1

Step 1: 50.0C for 2:00min

➤ **Stage 2:** Repeats=1

Step 1: 95.0C for 10:00min

➤ **Stage 3:** Repeats=40

Step 1: 95.0C for 0:15min

Step 2: 60.0C for 1:00min

Dissociation Protocol:➤ **Stage 4:** Repeats=1

Step 1: 95.0C for 0:15min

Step 2: 60.0C for 1:00min

Step 3: 95.0C for 0:15min

PRORGTF	CAGCGCTCCAACATCTTCT	Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου RORγt σε RT-PCR.
PRORGTR	CCACATCTCCCACATGGACT	
rtGAPDHF	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC	Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς GAPDH.
rtGAPDHR	ACGACCAAATCCGTTGACTC	

Πίνακας 5. Εκκινητές DNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα Real Time PCR.**3.6. Ενζυμική μέθοδος ανίχνευσης αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών**

Για τον έλεγχο και την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 με αλληλουχίες DNA οι οποίες αποτελούν στόχους του μεταγραφικού παράγοντα εφαρμόστηκε το σύστημα TransAM (STAT3) της εταιρείας Active Motif. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή με μικρές τροποποιήσεις. Εν συντομία η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε παρατίθεται παρακάτω:

- Ινοβλάστες δέρματος ασθενή και υγείων μαρτύρων διεγέρθηκαν με IL-6 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.
- Εν συνεχεία τα κύτταρα συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν τα πυρηνικά εκχυλίσματα.
- Τα εκχυλίσματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bradford και ίσες ποσότητες ασθενή και μαρτύρα αναλύθηκαν, για την ικανότητα του ενεργοποιημένου STAT3 να

προσδένεται σε ειδικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία προσομοιάζουν αλληλουχίες υποκινητών.

- Τα πυρηνικά εκχυλίσματα (5μg/well) επωάζονται για μία ώρα στους 37°C σε τρυβλίο τύπου ELISA (96-well plate) στο οποίο βρίσκονται προσκολλημένα τα ολιγονουκλεοτίδια.
- Το τρυβλίο πλένεται 3 φορές με διάλυμα Wash Buffer (1X). Ο STAT3 που έχει δεσμευτεί, παραμένει στο τρυβλίο.
- Ακολουθεί επώαση για μία ώρα με το 1^ο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το STAT3 και 3 φορές πλύσιμο με διάλυμα Wash Buffer 1X.
- Επώαση μία ώρα με 2^ο αντίσωμα το οποίο είναι HRP-conjugated και αναγνωρίζει το πρωτογενές. 4 φορές πλύσιμο με διάλυμα Wash Buffer 1X.
- Τέλος, προσθέτοντας Developing Solution 100 μl/well, μετράμε την απορρόφηση στα 450 nm.

Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές ενώ για να επιβεβαιωθεί επιπλέον η ειδικότητα του συστήματος, τόσο ένα μεταλλαγμένο όσο και ένα μη-μεταλλαγμένο αλλά ανταγωνιστικό ολιγονουκλεοτίδιο, χρησιμοποιήθηκαν σε ανεξάρτητες αντιδράσεις.

Το ειδικό ολιγονουκλειτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την πρόσδεση του STAT3 και τα πειράματα ανταγωνισμού, φαίνετε παρακάτω: GGTAGTTTTCAGTTTCCCGGAAATC. Υπογραμμισμένο είναι το ακριβές μοτίβο που αναγνωρίζει ο STAT3. Το μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο έχει την αλληλουχία: GGTAGTCGCAGAATCCCGGCCATC.

Εικόνα 5. Σχηματικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε φαίνεται παραπάνω (περιληπτικά).

4. Υλικά και Διαλύματα

Για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση καθώς και για την ηλεκτρομεταφορά των δειγμάτων των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- **Tris pH = 6.8 / 8 / 8.8 (1 M stock)**

Για την παρασκευή 1 M Tris διαλύματος, 24.22 gr Trizma-base αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 200 ml ddH₂O. Η τιμή του pH προσαρμόζεται στην επιθυμητή τιμή με χρήση διαλύματος 5 N HCl.

- **HCl (5 N stock)**

Για την παρασκευή 5 N HCl διαλύματος, 86.2 ml πυκνού HCl (~11.6 N) αραιώνονται με ddH₂O σε τελικό όγκο 200 ml διαλύματος.

- **Διάλυμα 1% (w/v) bromophenol blue**

Για την παρασκευή 1% (w/v) bromophenol blue διαλύματος, 0.25 gr Bromophenol blue χρωστικής αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 25 ml ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

- **FSB/DTT (συγκέντρωση stock διαλύματος φόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 2x)**

Η σύσταση του διαλύματος (2x) FSB-DTT έχει ως εξής: γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 20%, Tris pH 6.8 τελικής συγκέντρωσης 160 mM, SDS τελικής συγκέντρωσης 4%, Bromophenol blue τελικής συγκέντρωσης 0.01% και DTT τελικής συγκέντρωσης 0.2 M. Το DTT προστίθεται τελευταίο και μόνο στον όγκο διαλύματος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Το διάλυμα (2x) FSB (-DTT) φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ μετά την προσθήκη DTT φυλάσσεται στους -20 °C.

- **FSB/DTT (συγκέντρωση εργασίας διαλύματος φόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 1x)**

Για την παρασκευή διαλύματος εργασίας 1X FSB (+DTT), ποσότητα του stock διαλύματος 2x FSB (+DTT) αραιώνεται σε αναλογία 1:1, με ίση ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος.

- **PBS (συγκέντρωση stock ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 10x)**

Για την παρασκευή stock διαλύματος (10x) PBS, 80 gr NaCl, 2 gr KCl, 2.4 gr KH_2PO_4 και 14.4 gr Na_2HPO_4 αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 1 l ddH₂O. Ακολουθεί αποστείρωση.

- **PBS (συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας φωσφορικών, 1x)**

Για την παρασκευή διαλύματος εργασίας (1x) PBS, ποσότητα του stock διαλύματος 10X PBS αραιώνεται σε αναλογία αρχικού:τελικού όγκου, 1:10. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη μικρής ποσότητας 5 N HCl, έτσι ώστε η τιμή του να κυμαίνεται μεταξύ 7.2 και 7.4. Ακολουθεί αποστείρωση.

- **PBS (1x) - 0.1% Tween (PBS-T)**

Για την παρασκευή 0,1% PBS-Tween διαλύματος, 1 ml 50% Tween-20 διαλύματος προστίθεται σε τελικό όγκο 500 ml (1x) PBS.

- **DTT (1 M stock)**

Για την παρασκευή 1M DTT διαλύματος, 2.66 gr ουσίας αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 17.24 ml ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο μίας χρήσης (διαμέτρου 0.22 μm) και μοιράζεται σε aliquots τα οποία φυλάσσονται στους -20 °C.

- **10% SDS**

Για την παρασκευή 10% SDS διαλύματος, 10 gr ουσίας αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml ddH₂O.

- **Acrylamide/bis-Acrylamide 30% Solution, Electrophoresis reagent (A3574, Sigma)**

- CAPS (συγκέντρωση stock διαλύματος, 100mM / (10x))**
 Για την παρασκευή 10x stock διαλύματος υγρής ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών, 22.13g ουσίας CAPS αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 1 l ddH₂O. Το pH προσαρμόζεται στην τιμή 11 με προσθήκη διαλύματος NaOH (10N). Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου.
- CAPS (συγκέντρωση διαλύματος εργασίας, 10 mM / 1x)**
 Για την παρασκευή διαλύματος εργασίας (1x) CAPS, ποσότητα του stock διαλύματος (10x) CAPS αραιώνεται σε αναλογία αρχικού:τελικού όγκου, 1:10. Επιπλέον, στον τελικό όγκο προστίθεται διάλυμα μεθανόλης (100%) σε τελική αναλογία όγκου 10%.
- Ponceau S**
 Για την παρασκευή διαλύματος χρωστικής Ponceau S, 0.2 gr Ponceau (Sigma P-3504) και 3 gr (ή 3 ml) 100% TCA αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι και επαναχρησιμοποιείται.
- 10% APS**
 Για την παρασκευή 10% APS διαλύματος, 2 gr ουσίας αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 20 ml ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο μίας χρήσης (διαμέτρου 0.22 μm) και μοιράζεται σε aliquots τα οποία φυλάσσονται μακροχρόνια στους -20 °C. Το aliquot που χρησιμοποιείται φυλάσσεται στους 4 °C.
- Coomassie Brilliant Blue R-250**
 Για την παρασκευή διαλύματος χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250, 0.25gr χρωστικής (Sigma B-0630) αναδιαλύονται σε 90 ml διαλύματος μεθανόλης:H₂O (1:1, v/v) ενώ επίσης προστίθενται 10 ml glacial οξικού οξέος. Το διάλυμα φιλτράρεται με χαρτί Whatmann No.1 και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αποχρωματισμού της χρωστικής Coomassie**

Για την παρασκευή διαλύματος αποχρωματισμού της χρωστικής Coomassie, οξικό οξύ και απόλυτη αιθανόλη αραιώνονται σε ddH₂O σε αναλογίες 10% και 20% αντίστοιχα, επί του τελικού όγκου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Laemmli (συγκέντρωση stock διαλύματος, 10x)**

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης Laemmli 10x αναδιαλύονται 30.3 gr Tris-base, 144.2 gr γλυκίνης και 10 gr SDS σε τελικό όγκο 1 l ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Laemmli (συγκέντρωση διαλύματος εργασίας, 1x)**

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης Laemmli 1x ποσότητα του stock διαλύματος 10x Laemmli αραιώνεται σε αναλογία αρχικού:τελικού όγκου, 1:10.

- **BIORAD SDS-PAGE protein marker** (μάρτυρας μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών):
Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας της BIORAD (Cat. No. 161-0317) αραιώνεται σε αναλογία αρχικού:τελικού όγκου 1:10, με διάλυμα 1XFSB+DTT.

- **Διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων στην PVDF μεμβράνη:**

Για την παρασκευή διαλύματος μπλοκαρίσματος των μη ειδικών θέσεων στην PVDF μεμβράνη, ποσότητα γάλακτος σε σκόνη εμπορίου (CARNATION αποβουτυρωμένο) αναδιαλύεται σε διάλυμα (1x) PBS, 0.1% Tween (PBS-T), σε τελική συγκέντρωση 5%.

- **Αντιδραστήριο Bradford (συγκέντρωση stock διαλύματος, 5x)**

Για την παρασκευή αντιδραστηρίου Bradford συγκέντρωσης 5x, αναμειγνύονται αρχικά 52.5 ml απόλυτης αιθανόλης, 100 ml H₃PO₄ (ορθοφωσφορικού οξέος) και 47.5 ml H₂O (τελικός όγκος 200 ml). Στον παραπάνω τελικό όγκο αναδιαλύονται

0.1 gr Coomassie Brilliant Blue G-250 χρωστικής. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- **Διάλυμα τρυψίνης (συγκέντρωση διαλύματος εργασίας, 1x)**
Για την παρασκευή διαλύματος εργασίας 1x τρυψίνης, ποσότητα 1 ml stock διαλύματος 10x τρυψίνης (Biochrom AG, L2153) αραιώνεται υπό άσηπτες συνθήκες σε τελικό όγκο 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος (1x) PBS.
- **Διάλυμα παραφορμαδεΰδης 4% (PFA)**
Για την παρασκευή διαλύματος παραφορμαδεΰδης τελικής συγκέντρωσης 4%, 20 gr PFA (MERCK, Art 4005) αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 500 ml διαλύματος (1x) PBS. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 65 °C και για αρκετή ώρα, μέχρις ότου να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουσία.
- **Διάλυμα 0,3% Triton X-100**
Για την παρασκευή διαλύματος 0.3% Triton X-100, 150 μl διαλύματος 100% Triton X-100 αραιώνονται σε τελικό όγκο 50 ml διαλύματος (1x) PBS.
- **Διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων στον ανοσοφθορισμό**
Η σύσταση του διαλύματος που χρησιμοποιείται για το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στον ανοσοφθορισμό έχει ως εξής: σε διάλυμα (1x) PBS προστίθεται BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Cat. No. A-9418) σε τελική συγκέντρωση 3% και FBS σε τελική συγκέντρωση 10%.
- **DAPI mounting medium**
Για τη χρώση των κυτταρικών πυρήνων και την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε απευθείας το Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) το οποίο περιέχει χρωστική DAPI σε συγκέντρωση 1.5 μg/ml.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA

TBE 10x, pH 8.3

(0.9 M Trisbase, 0.9 M βορικό οξύ, 0.02 M EDTA)

Για την παρασκευή 1 lt:

Σε 800 ml ddH₂O διαλύονται:

- 108 gr Trisbase (MW: 121.1)
- 55 gr βορικό οξύ (MW: 61.84)
- 7.44 gr EDTA (MW: 372.2) ή 40 ml EDTA 0.5M

Το pH προσαρμόζεται στο 8.3 με HCl και ογκομετρείται στο 1 lt. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Προσδιορισμός μιας νέας μετάλλαξης στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 στην ασθενή με σύνδρομο Hyper-IgE

Με βάση την αναφορά για μεταλλάξεις στο γονίδιο TYK2 και της συσχέτισης τους με το σύνδρομο Hyper-IgE, οι πειραματικές προσπάθειες εστιάστηκαν στο σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT και στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του μονοπατιού, δηλαδή JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 και STAT1, 2, 3, 4, 5α/β, 6.

Μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και απευθείας προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων DNA μελετήθηκαν τα γονίδια TYK2 και STAT4 σε επίπεδο cDNA (mRNA) για την αναγνώριση και ταυτοποίηση πιθανών μεταλλάξεων τόσο στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης όσο και στις 5' και 3' μη μεταφράσιμες περιοχές του mRNA. Δεν εντοπίστηκε καμία νουκλεοτιδική αλλαγή στα γονίδια TYK2 και STAT4 σε κανένα σημείο του γονιδίου.

Επιπλέον, με τη χρήση ημι-ποσοτικής αντίδρασης αντίστροφης πολυμεράσης (semi quantitative RT-PCR) μελετήθηκε το επίπεδο της μεταγραφής των γονιδίων TYK2 και STAT4 σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, χωρίς να εντοπιστεί καμία διαφορά.

Εν συνεχεία και σε συνδυασμό με νέα δεδομένα από τη βιβλιογραφία, μελετήθηκε το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα STAT3. Μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και απευθείας αλληλούχισης (sequencing) των προϊόντων της αντίδρασης, μελετήθηκε ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου και ταυτοποιήθηκε μία ετερόζυγη μετάλλαξη στο cDNA (mRNA) του STAT3. Η μετάλλαξη εντοπίστηκε στο νουκλεοτίδιο 1025 με βάση την αλληλουχία NM_139276.2 της GenBank, και πρόκειται για μία ετερόζυγη αντικατάσταση βάσης από G σε A (c.1025G>A, based on NM_139276.2) (Εικόνα 5). Επιπλέον μετά από ανάλυση του γονιδιωματικού DNA της ασθενούς μας, η ετερόζυγη μετάλλαξη εντοπίστηκε στο εξόνιο 10 του γονιδίου του STAT3 (Εικόνα 5).

Για να διαπιστωθεί αν η μετάλλαξη της ασθενούς κληρονομήθηκε από τους γονείς της, πραγματοποιήθηκε απευθείας προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του εξονίου 10 σε γονιδιωματικό DNA μητρικής και πατρικής προέλευσης. Η ανάλυση έδειξε πως κανένας από τους γονείς δεν ήταν φορέας της μετάλλαξης c.1025G>A. Ως εκ τούτου η νέα αυτή μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως *de novo* (Εικόνα 5).

Εικόνα 6. Χρωματογραφήματα της νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (DNA sequencing) των προϊόντων από το mRNA (cDNA) και από το γονιδιωματικό DNA της ασθενούς καθώς και από το γονιδιωματικό DNA των γονέων. Με βέλη σημαίνονται τα σημεία της αλληλουχίας όπου αναγνωρίζεται η θέση της ετερόζυγης μετάλλαξης στην ασθενή, αλλά και το φυσιολογικό νουκλεοτίδιο στους γονείς.

Η νέα μετάλλαξη σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας προκαλεί την αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη (G) από το αμινοξύ γλουταμινικό οξύ (D) στη θέση 342 (G342D) με βάση την αλληλουχία NP_644805.1 (Εικόνα 6). Αυτό συνάγεται από τη μετάφραση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας cDNA με τη βοήθεια λογισμικού, όπως αυτή προέκυψε μετά τις αντιδράσεις νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (sequencing). Η αντικατάσταση G342D δεν είναι παρούσα ως πολυμορφισμός στη βάση dbSNP (Single Nucleotide

Polymorphism data base; www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) και ούτε έχει αναγνωρισθεί σε ασθενείς με Σύνδρομο Hyper-IgE. Επιπλέον, η αντιπαράβολή των αμινοξικών αλληλουχιών των ορθόλογων μορίων STAT3 από το αμινοξύ 320 έως και 358 μεταξύ ανθρώπου, μυ, όρνιθας και του ιχθύος *Danio rerio* έδειξε απόλυτη συντήρηση (100% identity) στην περιοχή αυτή (Εικόνα 6).

Με χρήση διαδικτυακών λογισμικών μελετήθηκαν οι πιθανές λειτουργικές συνέπειες της αντικατάστασης G342D. Τα λογισμικά PolyPhen (Polymorphism Phenotyping, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) και SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://sift.jcvi.org/>) προέβλεψαν την αντικατάσταση G342D ως «πιθανώς βλαπτική» (PSIC score difference, 1.857) και «επηρεάζουσα τη λειτουργία της πρωτεΐνης» (SIFT score 0.05), αντιστοίχως.

Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του STAT3 και η θέση της αμινοξικής αντικατάστασης. Επιπλέον, το τμήμα από το αμινοξύ 320 έως το 358 της πρωτεΐνης STAT3 στον άνθρωπο αντιπαραβάλλεται με το αντίστοιχο τμήμα των ορθόλογων πρωτεϊνών, στο μυ, στην όρνιθα και στον ιχθύ *Danio rerio*.

4.2 Ανάλυση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης STAT3 της ασθενούς.

4.2.1 Ανάλυση με ανοσοστύπωμα western και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.

Εν συνεχεία μελετήθηκε ποσοτικά και ποιοτικά η πρωτεΐνη STAT3 τόσο στην ασθενή όσο και σε υγιείς μάρτυρες. Κυτταρικά εκχυλίσματα ινοβλαστών αναλύθηκαν σε ανοσοστύπωμα western για τον έλεγχο της ποσότητας της πρωτεΐνης STAT3 στην ασθενή και σε υγιή μάρτυρα (Εικόνα 7). Από την ανάλυση διαπιστώθηκε πως δεν υπήρχε διαταραχή στην ποσότητα της πρωτεΐνης της ασθενούς σε σχέση με τον υγιή μάρτυρα. Επιπλέον, για τον έλεγχο της ικανότητας του STAT3 της ασθενούς να ενεργοποιείται ύστερα από ειδικό ερέθισμα, ινοβλάστες ενεργοποιήθηκαν με ιντερλευκίνη 6 (IL-6) για 30 λεπτά και είτε τα κύτταρα λύθηκαν και τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα western για την φωσφορυλιωμένη μορφή του STAT3 (pY-STAT3) (Εικόνα 7), είτε με μικροσκοπία φθορισμού ελέγχθηκε η μετατόπιση του STAT3 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Εικόνα 8).

Τόσο η φωσφορύλιωση της πρωτεΐνης STAT3 της ασθενούς, όσο και η ικανότητά της να μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ύστερα από κατάλληλο ερέθισμα εμφανίζονται σε φυσιολογικά επίπεδα ύστερα από σύγκριση με υγιή μάρτυρα.

Εικόνα 8. Ανοσοστύπωμα western σε ινοβλάστες υγιούς μάρτυρα και της ασθενούς, για την πρωτεΐνη STAT3 και την φωσφορυλιωμένη της μορφή, χωρίς ενεργοποίηση και μετά απο ενεργοποίηση με ιντερλευκίνη 6 (IL-6).

Χωρίς ενεργοποίηση

Ενεργοποίηση με IL-6

Εικόνα 9. Ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης STAT3 σε ινοβλάστες υγιούς μάρτυρα και του ασθενούς, πριν και μετά την ενεργοποίηση τους με ιντερλευκίνη 6 (IL-6). Με μπλε χρώμα εμφανίζονται οι πυρήνες των κυττάρων ενώ με πράσινο η πρωτεΐνη STAT3. Στο κατώτερο τμήμα της εικόνας παρατίθεται το γράφημα σύγκρισης των STAT3 θετικών πυρήνων μετά από ενεργοποίηση των ινοβλαστών, μεταξύ υγιούς μάρτυρα και ασθενούς.

4.2.2 Ανάλυση (*in vitro*) της ικανότητας της πρωτεΐνης STAT3 να δεσμεύεται σε ολιγονουκλεοτίδια DNA στόχους (*in vitro*).

Η μετάλλαξη G342D εντοπίζεται στην περιοχή της πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 στο DNA (DNA-binding domain). Αντιπαραβάλλοντας την αμινοξική αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης του DNA (DNA-binding domain) του STAT3 του ανθρώπου (αμινοξέα από 320-465) με αυτή του STAT3 άλλων οργανισμών, διαπιστώθηκε πως τα τμήματα αυτά ήταν εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των οργανισμών. Για παράδειγμα η περιοχή αυτή παρουσιάζει 100% ταυτοσημία μεταξύ ανθρώπου και μυ (99% συνολικά), 99% ταυτοσημία με την όρνιθα και 96% με τον ιχθύ *Danio rerio* (87% συνολικά). Η υψηλή συντήρηση της συγκεκριμένης περιοχής του STAT3 μεταξύ των οργανισμών πιθανόν υποδηλώνει τη σημαντικότητα της περιοχής για τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης. Επιπλέον, από τη βάση dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism data base; www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) διαπιστώθηκε πως η περιοχή αυτή του STAT3 δεν εμφανίζει SNP πολυμορφισμούς. Τέλος, μελετώντας την τριτοταγή δομή του μορίου STAT3 όπως αυτή έχει δημοσιευθεί, διαπιστώνεται πως το αμινοξύ γλυκίνη (G) στη θέση 342 δεν φέρει φορτίο και εισέρχεται στη μεγάλη αύλακα του μορίου του DNA. Η αντικατάστασή του από το αμινοξύ γλουταμινικό (D) εισάγει στη θέση 342 ένα αμινοξύ αρνητικά φορτισμένο το οποίο αφενός επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και αφετέρου απωθεί μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων το μόριο STAT3 από το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA (Εικόνα 9).

Για να μελετηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης STAT3 της ασθενούς με το DNA χρησιμοποιήθηκε μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος ανίχνευσης αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών. Ινοβλάστες της ασθενούς και υγιών μαρτύρων λύθηκαν ύστερα από

Εικόνα 10. Αλληλεπίδραση του DNA (μπλέ) με την περιοχή δέσμευσης του DNA (πορτοκαλί) (DNA binding domain) του STAT3. Στην κορυφή της αγκύλης ab (ab loop) βρίσκεται το αμινοξικό κατάλοιπο γλυκίνης (βέλος). (με άδεια απο Macmillan Publishers Ltd.: Becker et al., 1998) [60].

ενεργοποίηση με ιντερλευκίνη 6 (IL-6), απομονώθηκαν τα πυρηνικά εκχυλίσματα τα οποία και μελετήθηκαν για την ικανότητα του STAT3 που περιέχουν, να δεσμεύεται σε ολιγονουκλεοτίδια DNA τα οποία προσομοιάζουν στις φυσικές θέσεις δέσμευσης του STAT3 στο DNA. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται πως η πρωτεΐνη της ασθενούς έχει μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης σε ολιγονουκλεοτίδια σε σύγκριση με τον υγιή μάρτυρα (Εικόνα 10). Η ικανότητα δέσμευσης στο DNA της πρωτεΐνης STAT3 της

ασθενούς σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο φαίνεται πως δεν είναι πλήρως διαταραγμένη, αλλά κυμαίνεται περί το 50% του υγιούς.

Εικόνα 11. Αναπαράσταση της σχετικής ικανότητας δέσμευσης της πρωτεΐνης STAT3 της ασθενούς σε σχέση με υγιή μάρτυρα, ύστερα από ενεργοποίηση των κυττάρων με IL-6. Οι λευκές κολόνες του γραφήματος αντιστοιχούν στις τιμές που λαμβάνονται όταν στην αντίδραση προστίθεται ένα μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο για ανταγωνισμό καθώς δεν φέρει τις θέσεις δέσμευσης του STAT3.

4.2.3 Ανάλυση (*in vivo*) της ικανότητας της πρωτεΐνης STAT3 της ασθενούς να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων σε κύτταρα του περιφερικού αίματος.

Η ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος που εμφανίζουν τα άτομα με σύνδρομο Hyper-IgE είναι σημαντικό μέρος του κλινικού φαινοτύπου και οφείλεται στην αδυναμία των T-βοηθητικών κυττάρων (Th) να διαφοροποιηθούν προς βοηθητικά κύτταρα Th17. Απαραίτητο βήμα στη διαδικασία αυτή είναι η επαγωγή από τον STAT3 του ειδικού για τα T-κύτταρα μεταγραφικού παράγοντα ROR-γτ.

Για να ελεγχθεί η ικανότητα του STAT3 να επάγει τη μεταγραφή του ROR-γτ, κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) της ασθενούς και υγιών μαρτύρων ενεργοποιήθηκαν με τη χρήση PHA ή PMA και ιονομυκίνης. Εν συνεχεία από τα κύτταρα απομονώθηκε RNA, συντέθηκε cDNA και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής του ROR-γτ με Real Time PCR, τόσο στην ασθενή όσο και στους υγιείς μάρτυρες.

Εικόνα 12. Γράφημα της σχετικής ποσοτικοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου ROR-γτ μεταξύ τριών υγιών μαρτύρων και της ασθενούς, πριν και μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων. Λαμβάνετε το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου ROR-γτ σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα υγιών μαρτύρων ως 1.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται πως τα κύτταρα της ασθενούς αφού ενεργοποιηθούν δεν εμφανίζουν άνοδο των επιπέδων του mRNA του γονιδίου ROR-γτ, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως η μεταγραφή του ROR-γτ της ασθενούς είναι περίπου στο $\frac{1}{4}$ αυτής των υγιών μαρτύρων (Εικόνα 11). Αυτό συμφωνεί και με δεδομένα τις διεθνούς βιβλιογραφίας, τα οποία και αναφέρουν πως ο μεταγραφικός παράγων STAT3 είναι ο υπεύθυνος για την επαγωγή της μεταγραφής του ROR-γτ, και την διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων σε Th-17 βοηθητικά κύτταρα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σύνδρομο Hyper-IgE (OMIM #147060 και #243700) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1966 από τους Davis και Wedgwood ενώ χαρακτηρίστηκε περαιτέρω από τον Buckley το 1972. Αρχικά ονομάστηκε σύνδρομο του Ιώβ (Job's syndrome) αλλά εν συνεχεία επικράτησε ο περιγραφικός όρος *Hyperimmunoglobulin E syndrome* ή *Hyper-IgE Syndrome (HIES)* ο οποίος και σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης τάξης E στον ορό των ασθενών [31,32].

Από τότε μέχρι και το 2006 έγιναν πολλές ερευνητικές προσπάθειες οι οποίες οδήγησαν σε σειρά επιστημονικών δημοσιεύσεων ώστε να χαρακτηριστεί σε γονιδιακό-μοριακό επίπεδο η βλάβη που προξενεί το σύνδρομο. Όλες καταδείκνυαν την σημαντική απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο σε κυτταρικό όσο και μοριακό επίπεδο, αλλά σε καμία δεν κατέστη δυνατό να ταυτοποιηθεί η γονιδιακή-μοριακή βλάβη η οποία είναι υπεύθυνη για το σύνδρομο [35].

Το 2006 μία ερευνητική εργασία σε έναν και μόνο ασθενή ο οποίος εμφάνιζε έναν κλινικό φαινότυπο ο οποίος προσομοίαζε σημαντικά στο σύνδρομο Hyper-IgE, κατέδειξε τη συσχέτιση του συνδρόμου με το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT. Ο ασθενής έφερε μία ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο της κινάσης TYK2 [41].

Έκτοτε οι ερευνητικές προσπάθειες εστιάστηκαν στο μονοπάτι JAK-STAT και το 2007 η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε πως επτά ασθενείς με την αυτοσωμική επικρατούσα μορφή του συνδρόμου Hyper-IgE έφεραν ετερόζυγες μεταλλάξεις στο μεταγραφικό παράγοντα STAT3. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 67 μεταλλάξεις σε 50 θέσεις του γονιδίου του STAT3 σε 206 ασθενείς, σε όλο τον κόσμο.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρουσιάζεται ο κλινικός χαρακτηρισμός ενός ασθενούς με σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας Hyper-IgE, καθώς και η περαιτέρω ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός μιας νέας μετάλλαξης στο γονίδιο του ασθενούς που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη STAT3, στην οποία και οφείλεται ο παθολογικός φαινότυπος. Η ταυτοποίηση της νέας αυτής μετάλλαξης στο γονίδιο της πρωτεΐνης STAT3 διευρύνει το φάσμα των μεταλλάξεων που έχουν αναγνωρισθεί παγκοσμίως και είναι υπεύθυνες για την αυτοσωμική επικρατούσα μορφή του συνδρόμου Hyper-IgE.

Η νέα αυτή μετάλλαξη βρίσκεται στην αμινοξική θέση 342 της πρωτεΐνης, μέσα στην περιοχή-μοτίβο η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της πρωτεΐνης στο DNA. Ο παράγοντας STAT3 με βάση το μοτίβο αυτό μπορεί και επιτελεί το βασικό λειτουργικό

του ρόλο, την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων στόχων. Φαίνεται πως η αντικατάσταση ενός μη-πολικού αμινοξέος όπως η γλυκίνη από ένα αρνητικά φορτισμένο όπως το γλουταμινικό επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του. Το παραπάνω συμπέρασμα ενισχύεται επιπλέον και από το μεγάλο ποσοστό ταυτοσημίας (96-100%) των αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής δέσμευσης στο DNA του STAT3 μεταξύ των ορθόλογων πρωτεϊνών οργανισμών σημαντικά απομακρυσμένων εξελικτικά, όπως ο άνθρωπος και οι ιχθύες. Η συντήρηση της περιοχής αυτής σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, αφενός υποδηλώνει τη σημαντικότητα της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης για τη λειτουργία της και αφετέρου εξηγεί τα άμεσα βλαπτικά αποτελέσματα που έχει η αντικατάσταση έστω και ενός αμινοξικού καταλοίπου στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Κατόπιν ελέγχου του γονιδιωματικού DNA και των υπόλοιπων μελών της οικογένειας της ασθενούς, διαπιστώθηκε πως δεν έφεραν τη μετάλλαξη G342D, με αποτέλεσμα η νέα αυτή μετάλλαξη να χαρακτηρίζεται *de novo*. Επιπλέον, με χρήση *in vitro* και *in vivo* πειραματικών τεχνικών ελέγχθηκε η ικανότητα του STAT3 της ασθενούς να προσδένεται σε αλληλουχίες DNA στόχους αλλά και να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων σε κύτταρα του περιφερικού αίματος. Από τα παραπάνω διαπιστώθηκε σημαντική αδυναμία του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 της ασθενούς τόσο να προσδένεται στο DNA όσο και να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων και ιδιαίτερα την μεταγραφή του ROR-γτ, παράγοντα απαραίτητου για την ανάπτυξη των κυττάρων Th-17 του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός που ετερόζυγες μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη STAT3 προκαλούν όλο το φάσμα του παθολογικού φαινοτύπου του συνδρόμου Hyper-IgE, δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Σε ότι αφορά ένα σημαντικό κομμάτι του συνδρόμου, το οποίο αποτελεί η ανοσοανεπάρκεια, φαίνεται πως σε κυτταρικό επίπεδο δικαιολογείται από την απουσία κυττάρων Th-17 ενώ σε μοριακό επίπεδο δικαιολογείται από τον μη λειτουργικό παράγοντα STAT3.

Παρόλ' αυτά, για ένα μεγάλο μέρος των συμπτωμάτων των ασθενών με σύνδρομο Hyper-IgE φαίνεται να χρειάζονται περαιτέρω ερευνητικές προσπάθειες ώστε να διαλευκανθεί πλήρως η μοριακή τους παθοφυσιολογία. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται η

οστεοπόρωση, η σκολίωση, η διατήρηση των νεογιλών οδόντων, η ιδιαίτερα συχνές λοιμώξεις ειδικά των πνευμόνων και του δέρματος, καθώς και η ειδική ευαισθησία των ασθενών στον *St. Aureus*. Επιπλέον, τα συμπτώματα όπως η υπερπαραγωγή αντισωμάτων κλάσης E, αλλά και η ηωσηνοφιλία αν και θεωρούνται απότοκα της γενικότερης απορύθμισης του ανοσοποιητικού απαιτούν περαιτέρω μελέτη ώστε να γίνει πλήρως κατανοητός ο αιτιοπαθογενετικός τους μηχανισμός αλλά και η πιθανή εμπλοκή τους σε επιπλοκές του συνδρόμου.

Μοντέλα πειραματοζώων με στοχευμένες απαλοιφές του γονιδίου STAT3 έχουν δείξει πως η απώλεια και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου οδηγεί σε πρόωρο θάνατο κατά την εμβρυϊκή ζωή ενώ η απώλεια μόνο του ενός αλληλομόρφου του γονιδίου δείχνει να μην προκαλεί κανένα παθολογικό φαινότυπο στα πειραματόζωα. Στην περίπτωση του συνδρόμου Hyper-IgE φαίνεται πως οι ετερόζυγες επικρατούσες μεταλλάξεις που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα προκαλούν μια κατάσταση μεταξύ ετερόζυγης και ομόζυγης απώλειας του STAT3. Δηλαδή, η μεταλλαγμένη (μη λειτουργική) πρωτεΐνη που προέρχεται από το μεταλλαγμένο αλληλίο επικρατεί έναντι της λειτουργικής η οποία προέρχεται από το φυσιολογικό αλληλίο. Αποτέλεσμα αυτής της επικράτησης είναι τα επίπεδα της λειτουργικής πρωτεΐνης STAT3 συνολικά μέσα στο κύτταρο, να είναι στο $\frac{1}{4}$ των φυσιολογικών, δηλαδή μεταξύ ομόζυγης απώλειας (θάνατος των πειραματοζώων) και ετερόζυγης απώλειας της πρωτεΐνης (χωρίς παθολογικό φαινότυπο στα πειραματόζωα). Παρόλ' αυτά μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ένα πειραματικό μοντέλο της ασθένειας σε επίπεδο πειραματοζώων στο οποίο να έχει εισαχθεί στοχευμένα μια ετερόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο STAT3 και να ελεγχθεί ο φαινότυπος.

Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο του STAT3 έχει οδηγήσει στην καλύτερη και βαθύτερη κατανόηση της αιτοπαθογένειας του συνδρόμου Hyper-IgE, καθώς επίσης έχει αναδείξει τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 σε ένα εξαιρετικά σημαντικό μόριο σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών σε όλους σχεδόν τους ανθρώπινους ιστούς και κύτταρα. Η παρούσα εργασία δημοσιεύτηκε στην αγγλόφωνη επιστημονική επιθεώρηση *Molecular Immunology* [61].

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Hyper-IgE χωρίς μεταλλάξεις στο γονίδιο STAT3. Αυτό αφενός υποδηλώνει τη σύνθετη φύση του συνδρόμου σε γενετικό/μοριακό επίπεδο και την

ανάγκη για περαιτέρω έρευνα που απαιτείται, αφετέρου όμως αντικατοπτρίζει και τη δυσκολία διαχωρισμού και ομαδοποίησης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών μόνο με βάση τον κλασικό κλινικο-εργαστηριακό χαρακτηρισμό των ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο Hyper-IgE (HIES) είναι μια σπάνια πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα IgE στον ορό, υποτροπιάζουσες σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις του δέρματος και επεισόδια πνευμονίας με σχηματισμό κύστεων. Επιπλέον, στο φαινότυπο του συνδρόμου περιλαμβάνονται και μη-ανοσολογικού τύπου ανωμαλίες όπως χαρακτηριστικό προσωπείο, υπερεκτασιμότητα των αρθρώσεων, σκολίωση, αυτόματα κατάγματα και διατήρηση των νεογιλών οδόντων. Προσφάτως, διαπιστώθηκε πως ετερόζυγες μεταλλάξεις στον μεταγραφικό παράγοντα STAT3, ευθύνονται για την αυτοσωμική επικρατούσα μορφή του HIES. Στην παρούσα ερευνητική εργασία ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε μια νέα μετάλλαξη στην περιοχή δέσμευση του DNA (DNA-binding domain) του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 σε έναν ασθενή με σύνδρομο Hyper IgE. Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου του STAT3 αποκάλυψε μια *de novo* ετερόζυγη αντικατάσταση βάσης από G (γουανίνη) σε A (αδενίνη), η οποία προκαλεί την αντικατάσταση στο επίπεδο της αμινοξικής αλληλουχίας του αμινοξέος γλυκίνη από το ασπαρτικό οξύ (G342D). Η ασθενής έχει φυσιολογικά επίπεδα της πρωτεΐνης STAT3, η οποία και εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων κατόπιν ενεργοποίησης με ιντερλευκίνη-6 (IL-6). Παρ' όλα αυτά, μελέτη της ικανότητας της πρωτεΐνης STAT3 να δεσμεύεται στο DNA έδειξε πως η μετάλλαξη G342D επηρεάζει σημαντικά αυτή τη λειτουργία. Επιπλέον, ανάλυση με ποσοτική RT-PCR έδειξε πως η μετάλλαξη G342D αναστέλλει την STAT3-εξαρτώμενη επαγωγή του γονιδίου ROR γt, απαραίτητου γονιδίου για την διαφοροποίηση και ανάπτυξη των Th17 κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται πως η νέα μετάλλαξη στο μεταγραφικό παράγοντα STAT3 επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργικότητά του, και προκαλεί το σύνδρομο Hyper-IgE στην ασθενή.

SUMMARY

The Hyper-IgE syndrome (HIES) is a rare primary immunodeficiency characterized by a highly elevated serum IgE, recurrent staphylococcal skin abscesses and cyst-forming pneumonia. Non-immunological abnormalities, including a distinctive facial appearance, hyperextensive joints, scoliosis, fracture following minor trauma, and the retention of primary teeth are also observed in many patients. Recently, it was shown that heterozygous mutations in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), can cause autosomal-dominant HIES. Here we identify and characterize a novel mutation in the DNA binding domain of STAT3 in a patient with hyper-IgE syndrome. Sequence analysis revealed a *de novo* heterozygous transition of a G to A, causing a substitution of a glycine residue for an aspartic acid in the translated sequence (G342D). The patient has normal levels of STAT3, which is able to translocate to the nucleus upon IL-6 stimulation. However, enzyme-linked DNA–protein interaction analysis showed that the G342D mutation affects the binding ability of STAT3 to target DNA sequences. In addition, as shown by qRT-PCR, the mutation abrogates the STAT3 dependent transcription of the retinoid-related orphan receptor γ t (ROR γ t) gene, an indispensable transcription factor for the commitment of naive CD4⁺ T cells to the Th17 lineage. These data suggest that the novel G342D mutation affects the binding of STAT3 on DNA and the STAT3 dependent expression of ROR γ t mRNA, leading to the HIES phenotype.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Immunology, 7th Edition, Authors: **David Male, Jonathan Brostoff, David Roth & Ivan Roitt**. ISBN: 9780323033992
- [2] **Geha, R.S., Notarangelo, L.D., [Co-chairs], Casanova J.L., et al.,**. The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiency Diseases (PID) Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; **120**(4): 776–794.
- [3] **Notarangelo, L.D., Fischer, A., and Geha, R.S., (Cochairs): Casanova J.L., et al.,**. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; **124**: 1161-78.
- [4] **Fischer, A.,** Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin. Exp. Immunol.* 2000; **122**(2): 143-9.
- [5] **Notarangelo, L.D., Giliani, S., Mella, P., Schumacher, R.F., Mazza, C., Savoldi, G., Rodriguez-Pérez, C., Badolato, R., Mazzolari, E., Porta, F., Candotti, F., Ugazio, A.G.,** Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gammac-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunobiology.* 2000; **202**(2): 106-19.
- [6] **Chinen, J., Shearer, W.T.,** Advances in basic and clinical immunology in 2008. *J Allergy Clin. Immunol.* 2009; **123**(2): 328-32.
- [7] **Cooper, M.D., Lanier, L.L., Conley, M.E., Puck, J.M.,** Immunodeficiency disorders. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2003:314-30.
- [8] **Kracker, S., Gardès, P., Durandy, A.,** Inherited defects of immunoglobulin class switch recombination. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; **685**: 166-74.
- [9] **Kracker, S., Gardes, P., Mazerolles, F., Durandy, A.,** Immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Clin. Immunol.* 2010; **135**(2): 193-203.

- [10] **Wood, P.**, Primary antibody deficiency syndromes. *Ann. Clin. Biochem.* 2009; **46**(Pt 2):99-108.
- [11] **Zhang, J., Dong, B., Siminovitch, K.A.**, Contributions of Wiskott-Aldrich syndrome family cytoskeletal regulatory adapters to immune regulation. *Immunol Rev.* 2009; **232**(1): 175-94.
- [12] **Wegner, R.D., Metzger, M., Hanefeld, F., Jaspers, N.G., Baan, C., Magdorf, K., Kunze, J., Sperling, K.**, A new chromosomal instability disorder confirmed by complementation studies. *Clin Genet.* 1988; **33**(1): 20-32.
- [13] **Ellis, N.A., German, J.**, Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1996; **5**:1457-63
- [14] **Sullivan, K.E.**, Chromosome 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge syndrome/velocardiofacial Syndrome. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2008; **28**(2): 353-66.
- [15] **Saraiva, J.M., Dinis, A., Resende, C., Faria, E., Gomes, C., Correia, A.J., Gil, J., da Fonseca, N.**, Schimke immuno-osseous dysplasia: case report and review of 25 patients. *J. Med. Genet.* 1999; **36**(10): 786-9.
- [16] **Mellis, C., Bale, P.M.**, Familial hepatic venoocclusive disease with probable immune deficiency. *J. Pediatr.* 1976; **88**(2): 236-42.
- [17] **Kaplan, J., De Domenico, I., Ward, D.M.**, Chediak-Higashi syndrome. *Curr. Opin. Hematol.* 2008; **15**(1): 22-9.
- [18] **Mancini, A.J., Chan, L.S., Paller, A.S.**, Partial albinism with immunodeficiency: Griscelli syndrome: report of a case and review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998; **38**: 295-300.

- [19] **Fadeel, B., Orrenius, S., Henter, J.I.**, Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk. Lymphoma*. 2001; **42**(1-2): 13-20.
- [20] **Notarangelo, L.D.**, Primary immunodeficiencies (PIDs) presenting with cytopenias. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2009: 139-43.
- [21] **Arason, G.J., Jorgensen, G.H., Ludviksson, B.R.**, Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand. J. Immunol*. 2010; **71**(5): 317-28.
- [22] **Zeidler, C., Welte. K.**, Kostmann syndrome and severe congenital neutropenia. *Semin. Hematol*. 2002; **39**(2): 82-8.
- [23] **Dokal, I., Vulliamy, T.**, Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2008; **22**(3): 141-53.
- [24] **Shimamura, A.**, Shwachman-Diamond syndrome. *Semin. Hematol*. 2006; **43**(3): 178-88.
- [25] **Rosenzweig, S.D., Holland, S.M.**, Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol. Rev*. 2005; 203: 38-47.
- [26] **Chinen, J., Shearer, WT.**, Advances in basic and clinical immunology in 2009. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010; **125**(3): 563-8.
- [27] **van de Vosse, E., van Dissel, J.T., Ottenhoff, T.H.**, Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect. Dis*. 2009; **9**(11): 688-98.
- [28] **Glaser, R.L., Goldbach-Mansky, R.**, The spectrum of monogenic autoinflammatory syndromes: understanding disease mechanisms and use of targeted therapies. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2008; **8**(4): 288-98.

- [29] **Arason, G.J., Jorgensen, G.H., Ludviksson, B.R.**, Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand. J. Immunol.* 2010; **71**(5): 317-28.
- [30] **Pettigrew, H.D., Teuber, S.S., Gershwin, M.E.**, Clinical significance of complement deficiencies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; **1173**: 108-23.
- [31] **Davis, S.D., Schaller, J. and Wedgwood, R.J.** Job's syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet* 1966; **1**:1013.
- [32] **Buckley, R.H., Wray, B.B. and Belmaker, E.Z.** Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics* 1972; **49**: 59.
- [33] **Grimbacher, B., Holland, S.M., Gallin, J.I. et al.** Hyper-IgE syndrome with recurrent infections—an autosomal dominant multisystem disorder. *N. Engl. J. Med.* 1999; **340**: 692.
- [34] **Renner, E.D., Puck, J.M., Holland, S.M. et al.** Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity. *J. Pediatr.* 2004; **144**: 93.
- [35] **Grimbacher, B., Holland, S. M., Puck, J. M.**, Hyper-IgE syndromes. *Immunol. Rev.* 2005; **203**: 244- 250.
- [36] **Grimbacher, B., Holland, S. M., Gallin, J. I., Greenberg, F., Hill, S. C., Malech, H. L., Miller, J. A. et al.,.** Hyper-IgE syndrome with recurrent infections—an autosomal dominant multisystem disorder. *N. Engl. J. Med.* 1999; **340**: 692- 702.
- [37] **Grimbacher, B., Schäffer, A. A., Holland, S. M., Davis, J., Gallin, J. I., Malech, H. L., Atkinson, T. P. et al.,** Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; **65**: 735-744.

- [38] **Ling, J. C., Freeman, A. F., Gharib, A. M., Arai, A. E., Lederman, R. J., Rosing, D. R., Holland, S. M.,** Coronary artery aneurysms in patients with hyper IgE recurrent infection syndrome. *Clin. Immunol.* 2007; **122**: 255- 258.
- [39] **Freeman, A. F., Collura-Burke, C. J., Patronas, N. J., Ilcus, L. S., Darnell, D., Davis, J., Puck, J. M., Holland, S. M.,** Brain abnormalities in patients with hyperimmunoglobulin E syndrome. *Pediatrics* 2007; **119**: e1121- e1125.
- [40] **Hill, H.R., Ochs, H.D., Quie, P.G. et al.** Defect in neutrophil granulocyte chemotaxis in Job's syndrome of recurrent "cold" staphylococcal abscesses. *Lancet* 1974; **2**: 617.
- [41] **Minegishi, Y., Saito, M., Morio, T., Watanabe, K., Agematsu, K., Tsuchiya, S., Takada, H. et al.,** Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquire immunity. *Immunity* 2006; **25**: 745- 755.
- [42] **Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N. et al.,** Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007; **448**: 1058- 62.
- [43] **Holland, S. M., DeLeo, F. R., Elloumi, H. Z., Hsu, A. P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A. F. et al.,** STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2007; **357**: 1608- 1619.
- [44] **Renner, E. D., Rylaarsdam, S., Anover-Sombke, S., Rack, A. L., Reichenbach, J., Carey, J. C., Zhu, O. et al.,** Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2008; **122**: 181- 187.

- [45] **Jiaoa, H., Tóthb, B., Erdos, M., Franssona, I., Rákóczi, E., Baloghc, I., Magyarics, Z. et al.**, Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups. *Mol. Immunol.* 2008; **46**: 202- 206.
- [46] **Kim, H. J., Kim, J. H., Shin, Y. K., Lee, S. I., Ahn, K. M.**, A novel mutation in the linker domain of the signal transducer and activator of transcription 3 gene, p.Lys531Glu, in hyper-IgE syndrome. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2009; **123**: 956- 958.
- [47] **Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W. et al.** Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 3801.
- [48] **Akira, S.** Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 2000; **19**: 2607.
- [49] **Itoh, S., Udagawa, N., Takahashi, N. et al.** A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 2006; **39**: 505.
- [50] **Wegenka, U.M., Buschmann, J., Lutticken, C., Heinrich, P.C. and Horn, F.** Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.* 1993; **13**: 276.
- [51] **Avery, D.T., Ma, C.S., Bryant, V.L. et al.** STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood* 2008; **112**:1784.
- [52] **Minegishi, Y., Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K. et al.**, Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.* 2009; **206**: 1291- 1301.

- [53] **Milner, J. D., Brenchley, J. M., Laurence, A., Freeman, A. F., Hill, B. J., Elias, K. M., Kanno, Y. *et al.***, Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper- IgE syndrome. *Nature* 2008; **452**: 773- 776.
- [54] **Ma, C. S, Chew, G. Y., Simpson, N., Priyadarshi, A., Wong, M., Grimbacher, B., Fulcher, D.A. *et al.***, Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.* 2008; **205**: 1551- 1557.
- [55] **Mangan, P. R., Harrington, L. E., O’Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D. *et al.***, Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; **441**: 231- 234.
- [56] **Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., Stockinger, B.**, TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL 17-producing T cells. *Immunity* 2006; **24**: 179- 189.
- [57] **Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., *et al.***, Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007; **448**: 480- 483.
- [58] **Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., Littman, D. R.**, The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; **126**: 1121- 1133.
- [59] **Harris, T. J., Grosso, J. F., Yen, H. R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E. L., *et al.***, Cutting edge: an in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J. Immunol.* 2007; **179**: 4313- 4317.

- [60] **Becker, S., Groner, B., Müller, C. W.,** Three-dimensional structure of the Stat3b homodimer bound to DNA. *Nature* 1998. **394**: 145- 151.
- [61] **Papanastasiou, A.D., Mantagos, S., Papanastasiou, D.A., Zarkadis, I.K.,** A novel mutation in the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gene, in hyper-IgE syndrome. *Mol. Immunol.* 2010; **47**(7-8): 1629-34