



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Α. Γ. Τζιούφας

«ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΟΣΟΔΙΕΓΕΡΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΤΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ
ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-18 ΚΑΙ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-12
ΣΕ ΒΙΟΨΙΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΕΝΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΣΙΕΛΟΓΟΝΩΝ ΑΔΕΝΩΝ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJÖGREN

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΟΡΙΝΑΣ ΜΠΟΪΟΥ
ΙΑΤΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2019

Διδακτορική διατριβή της Σορίνας Μπόϊου στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα:

«Έκφραση ανοσοδιεγερτικών μορίων από τα επιθηλιακά κύτταρα»

Μελέτη της έκφρασης των φλεγμονωδών κυτταροκινών ιντερλευκίνης-18 και ιντερλευκίνης-12 σε βιοψίες και καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων ασθενών με σύνδρομο Sjögren

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 06.12.2001
(τροποποίηση 25.06.2014)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- 1) Καθηγητής Μ. Ν. Μανουσάκης (επιβλέπων)
- 2) Καθηγητής Α. Γ. Τζιούφας
- 3) Καθηγητής Π. Βλαχογιαννόπουλος

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 29.04.2015

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

- 1) Καθηγητής Μ. Ν. Μανουσάκης
- 2) Καθηγητής Α. Γ. Τζιούφας
- 3) Καθηγητής Π. Βλαχογιαννόπουλος
- 4) Καθηγητής Μ. Κουτσιλιέρης
- 5) Αναπλ. Καθηγήτρια Κ. Μαυραγάνη
- 6) Επ. Καθηγήτρια Ε. Καψογεώργου
- 7) Αναπλ. Καθηγήτρια Ε. Κασσή

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό σημείωμα	9
Ευχαριστίες	23
Σύνοψη.....	25
Synopsis (απόδοση σύνοψης στην Αγγλική γλώσσα)	31
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
1.1. Το σύνδρομο Sjögren	37
1.1.1. Γενικά	37
1.1.2. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων στο σύνδρομο Sjögren.....	40
1.1.3. Τα χαρακτηριστικά των λεμφοκυτταρικών διηθήσεων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjögren	43
1.1.3.1. Τα T-λεμφοκύτταρα	44
1.1.3.2. Τα B-λεμφοκύτταρα	46
1.1.4. Τα κλασικά αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjögren	47
1.1.4.1. Μακροφάγα	47
1.1.4.2. Δενδριτικά κύτταρα.....	48
1.1.5. Οι κυτταροκίνες στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjögren	50
1.1.6. Λεμφοπολλαπλασιασμός στο σύνδρομο Sjögren.....	54
1.2. Η ιντερλευκίνη-18 (IL-18)	59
1.2.1. Γενικά	59
1.2.2. Βιολογική δράση	60
1.2.3. Ο υποδοχέας της IL-18.....	61
1.2.4. Η IL-18BP (IL-18 binding protein) πρωτεΐνη που προσδένεται στην IL-18	63
1.2.5. Ο ρόλος της IL-18 στην επίκτητη ανοσία	64
1.2.6. Η IL-18 στο σύνδρομο Sjögren	64

1.3.	Η ιντερλευκίνη-12 (IL-12)	65
1.3.1.	Γενικά	65
1.3.2.	Βιολογική δράση	66
1.3.3.	Ο υποδοχέας της IL-12.....	68
1.3.4.	Ο ρόλος της IL-12 στην επίκτητη ανοσία	69
1.3.5.	Η IL-12 σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα	70
1.3.6.	Η IL-12 στο σύνδρομο Sjögren.....	70
1.4.	Τα φλεγμονοσώματα	71
1.4.1.	Γενικά	71
1.4.2.	Τα κύρια μέρη του φλεγμονοσώματος.....	72
1.4.2.1.	NLRs: Υποδοχείς πρόσδεσης Νουκλεοτιδίων με επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα Λευκίνης (Nucleotide-binding and Leucin-rich repeat containing receptors)	72
1.4.2.2.	NLRs που σχηματίζουν φλεγμονοσώματα.....	73
1.4.2.3.	Πρωτεΐνες που σχηματίζουν φλεγμονοσώματα εκτός των NLRs	74
1.4.2.4.	Ο ρόλος της ASC σε φλεγμονοσώματα	74
1.4.2.5.	NLRs εμπλεκόμενα στη φλεγμονή χωρίς τον σχηματισμό φλεγμονοσώματος.....	75
1.4.3.	Τα κανονικά και μη κανονικά φλεγμονοσώματα	75
1.4.4.	Το φλεγμονόσωμα NLRP3: ενεργοποίηση και ρύθμιση.....	77
1.4.4.1.	Κλασική ενεργοποίηση	77
1.4.4.2.	Εναλλακτική ενεργοποίηση.....	80
1.4.4.3.	Το φλεγμονόσωμα NLRP3 σε μονογονιδιακά αυτοφλεγμονώδη νοσήματα	80
1.4.4.4.	Το φλεγμονόσωμα NLRP3 σε πολυπαραγοντικά χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα.....	82
1.4.4.5.	Το φλεγμονόσωμα NLRP3 στο σύνδρομο Sjögren.....	82

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	115
2.1. Εργασία 1: «Βαθμός διήθησης μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων και έκφραση ιντερλευκίνης-18 και ιντερλευκίνης-12 στις χρόνιες φλεγμονώδεις βλάβες του συνδρόμου Sjögren»	117
2.2. Εργασία 2: «Συστημική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε ασθενείς με σοβαρό πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren που πυροδοτείται από συσσώρευση φλεγμονώδους DNA».....	147
3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	151
3.1. Article 1: “Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren’s syndrome”	153
3.2. Article 2: “Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren’s syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations”	165

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΟΡΙΝΑΣ ΜΠΟΪΟΥ

A. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο:	Σορίνα Μπόϊου
Ημερομηνία γέννησης:	21 Σεπτεμβρίου 1972
Τόπος γέννησης:	Βουλκάν, Ρουμανία
Υπηκοότητα:	Ρουμανική, Ελληνική
Οικογενειακή κατάσταση:	Εγγαμη
Διεύθυνση οικίας:	Καποδιστρίου 1, 18344 Μοσχάτο, Αττική
Τηλέφωνο οικίας / κινητό:	+30-2109572535, +30-6942479718
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:	sboiu@med.uoa.gr sorina.boiu@h-fr.ch

B. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2012	Μεταπτυχιακό Πτυχίο στην Επεμβατική Ρευματολογία (Diplôme Universitaire en Rhumatologie Interventionnelle), Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Στρασβούργου, Γαλλία
2011– 2012	Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, Πανεπιστημιακό Πτυχίο στην Επεμβατική Ρευματολογία (Diplôme Universitaire en Rhumatologie Interventionnelle), Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Στρασβούργου, Γαλλία
01/2010 – 05/2012	Εξειδίκευση στην Παιδιατρική Ρευματολογία, Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades», Παρίσι, Γαλλία (Διευθυντής: Καθηγητής A. Fischer, Υπεύθυνος Μονάδας Παιδιατρικής Ρευματολογίας Καθηγητής: P. Quartier)
2010	Τίτλος Ειδικότητας Παιδιατρικής, Νομαρχία Αθηνών

- 2010 Μεταπτυχιακό Διαπανεπιστημιακό Πτυχίο στην Παιδιατρική Ρευματολογία (Diplôme Interuniversitaire en Rhumatologie Pédiatrique), Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο «Paris Descartes», Παρίσι, Γαλλία
- 2008 – 2009 Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, Διαπανεπιστημιακό Πτυχίο Παιδιατρικής Ρευματολογίας (Diplôme Interuniversitaire en Rhumatologie Pédiatrique), Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο «Paris Descartes» και Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades» Παρίσι, Γαλλία
(*Τίτλος μεταπτυχιακής εργασίας: «Assessment of the current functional status of Juvenile Idiopathic Arthritis patients followed at a tertiary care centre» ; Επιβλέπων: Καθηγήτρια C. Wouters*)
- 11/2008 – 04/2009 Ειδικευόμενη στην Παιδιατρική Ρευματολογία, Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades», Παρίσι, Γαλλία (*Διευθυντής: Καθηγητής A. Fischer, Υπεύθυνος Μονάδας Παιδιατρικής Ρευματολογίας Καθηγητής: P. Quartier*)
- 2006 – 11/2009 Ειδικευόμενη Παιδιατρικής, Α' Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Πανεπιστήμιο Αθηνών (*Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Χρούσος*)
- 2001 – σήμερα Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής
Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών (*Επιβλέπων: Καθηγητής Μ. Μανουσάκης*)
- 1997 – 1999 Ειδικευόμενη Παιδιατρικής, Νοσοκομείο Παίδων «Marie Curie», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιατρικής και Φαρμακευτικής «Carol Davila», Βουκουρέστι, Ρουμανία (*Διευθυντής: Καθηγητής F. Iordachescu*)
- 1997 Πτυχίο Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστήμιο Ιατρικής και Φαρμακευτικής «Carol Davila», Βουκουρέστι, Ρουμανία
(*Τίτλος πτυχιακής εργασίας: «The relationship between chronic bacterial and viral infections and cell-mediated immunodeficiencies»; Επιβλέπων: Ερευνητής Δρ A. Olinescu, Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Εθνικό Ινστιτούτο Έρευνας στην Μικροβιολογία και Ανοσολογία, Βουκουρέστι, Ρουμανία*)

Γ. ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2013 – 2014	Μεταπτυχιακή εκπαίδευση στους Υπερήχους Μυοσκελετικού, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιατρικής και Φαρμακευτικής «Iuliu Hatieganu» Cluj-Napoca και το Κέντρο Εκπαίδευσης και Έρευνας στην Υπερηχογραφία, Ρουμανία
2011	Πιστοποιητικό «Good Clinical Practice»
2010	Πιστοποιητικό «Joint Assessor for Pediatric Rheumatology International Trials Organization (PRINTO)»

Δ. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

06/2017 – σήμερα	Επιμελήτρια Παιδιατρικής και Παιδιατρικής Ρευματολογίας, Παιδιατρική Κλινική, Νοσοκομείο HFR, Φριβούργο, Ελβετία (Διευθυντής: Καθηγητής J. Wildhaber)
09/2017 – 08/2018	Ακαδημαϊκός Υπότροφος, Μονάδα Παιδιατρικής Ρευματολογίας, Γ' Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Νοσοκομείο «Αττικόν», Πανεπιστήμιο Αθηνών (Διευθύντρια: Καθηγήτρια Β. Παπαευναγγέλου)
07/2014 – 08/2017	Επιστημονικός Συνεργάτης, Μονάδα Παιδιατρικής Ρευματολογίας, Γ' Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Νοσοκομείο «Αττικόν», Πανεπιστήμιο Αθηνών (Διευθύντρια: Καθηγήτρια Β. Παπαευναγγέλου)
07/2014 – 06/2015	Παιδίατρος, Επικουρική Ιατρός, Α' Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Πανεπιστήμιο Αθηνών (Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Χρούσος)
06/2012 – 09/2013	Επιμελήτρια Παιδίατρος («Cheffe de Clinique»), Τμήμα Παιδοχειρουργικής, Νοσοκομείο Παίδων, Πανεπιστημιακά Νοσοκομεία της Γενεύης (Hôpitaux Universitaires de Genève, HUG), Ελβετία
06/2012 – 10/2013	Επιμελήτρια Παιδίατρος («Cheffe de Clinique»), Μονάδα Παιδιατρικής Ρευματολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, CHUV), Λωζάνη, Ελβετία (Υπεύθυνος: Καθηγητής M. Hofer)

06/2011 – 05/2012	Επιμελήτρια Παιδιατρικής και Παιδιατρικής Ρευματολογίας, Θεραπευτήριο «Metropolitan», Αθήνα
03/2011 – 05/2012	Επιστημονικός Συνεργάτης, Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Α' Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Πανεπιστήμιο Αθηνών
09/2010 – 11/2010	«Medical Research Assistant», Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades», Παρίσι, Γαλλία (ευρωπαϊκή μελέτη «Eurofever»)
03/2010 – 04/2010	«Medical Research Assistant», Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades», Παρίσι, Γαλλία (ευρωπαϊκή μελέτη «Health-e-Child»)
01/2010 – 05/2012	Εξειδίκευση στην Παιδιατρική Ρευματολογία, Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades», Παρίσι, Γαλλία (Διευθυντής: Καθηγητής A. Fischer, Υπεύθυνος Μονάδας Παιδιατρικής Ρευματολογίας Καθηγητής: P. Quartier)
2006 – 11/2009	Ειδικευόμενη Παιδιατρικής, Α' Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Πανεπιστήμιο Αθηνών (Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Χρούσος)
1997 – 1999	Ειδικευόμενη Παιδιατρικής, Νοσοκομείο Παίδων «Marie Curie», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιατρικής και Φαρμακευτικής «Carol Davila», Βουκουρέστι, Ρουμανία (Διευθυντής: Καθηγητής F. Iordachescu)

Ε. ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Θεωρητική και πρακτική εκπαίδευση στην Παιδιατρική και Παιδιατρική Ρευματολογία για τους τελειόφοιτους φοιτητές και ειδικευόμενους Παιδιατρικής της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Γενεύης, Πανεπιστημίου Φριβούργου και Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΤ. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΙΕΣ

2019 – σήμερα	International Society of Systemic Auto-inflammatory Diseases (ISSAID)
2014 – σήμερα	Pediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO)
2013 – σήμερα	Fédération Médecins Suisses (FMH) Association suisse des médecins-assistant(e)s et chef(fe)s de clinique (ASMAC)
2010 – σήμερα	Ελληνική Παιδορευματολογική Εταιρία (ιδρυτικό μέλος) Ordre des Médecins de Paris
2009 – σήμερα	Société Francophone de Rhumatologie et Médecine Interne Pédiatrique (SOFREMIP)
2008 – σήμερα	Paediatric Rheumatology European Society (PReS)
2005 – σήμερα	Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών

Ζ. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

1. Pediatric Rheumatology European Society (PReS) για τη συμμετοχή στο « First PReS Research Course - Translational and Clinical Issues in Pediatric Rheumatology », March 2012, Genoa, Italy
2. European League Against Rheumatism (EULAR) για εκπαίδευση στην Παιδιατρική Ρευματολογία, Μονάδα Ανοσολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας, Νοσοκομείο «Necker Enfants Malades», Παρίσι, Γαλλία (11/2008 – 04/2009)
3. European League Against Rheumatism (EULAR) για συμμετοχή στο ετήσιο συνέδριο της PReS και το Young Investigators Meeting (YIM), 13-17th September 2008, London, UK
4. Υπουργείο Εξωτερικών της Ελλάδος (2000 – 2005)

Η. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

Ι. Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά μετά από κρίση

1. Vakrakou A.G. *, Boiu S. *, Ziakas P.D., Xingi E., Boleti H., Manoussakis M.N. Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations. *Journal of Autoimmunity* 2018, 91:23-33. *Authors contributed equally to the study.
2. Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Chardin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S, Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A; International STAT1 Gain-of-Function Study Group. STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype: an international survey of 234 patients. *Blood* 2016, Jun 23; 127 (25): 3154-64
3. Demirkaya E, Saglam C, Turker T, Koné-Paut I, Woo P, Doglio M, Amaryan G, Frenkel J, Uziel Y, Insalaco A, Cantarini L, Hofer M, Boiu S., Duzova A, Modesto C, Bryant A, Rigante D, Papadopoulou-Alataki E, Guillaume-Czitrom S, Kuemmerle-Deschner J, Neven B, Lachmann H, Martini A, Ruperto N, Gattorno M, Ozen S. Performance of Different Diagnostic Criteria for Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry. *The Journal of Rheumatology* 2016, Jan 43(1): 154-60
4. Delaporta P., Kattamis A., Apostolakou F., Boiu S., Bartzeliotou A., Tsoukas E., Papassotiriou I. Correlation of NT-proBNP levels and cardiac iron concentration in patients with transfusion-dependent thalassemia major. *Blood Cells Mol Dis.* 2013, 50 (1): 20-4
5. Boiu S., Marniga E., Bader-Meunier B., Mouy R., Quartier P., Wouters C. Functional Status in Severe Juvenile Idiopathic Arthritis in the Biotherapy Era: an Assessment in a French Paediatric Rheumatology Referral Centre. *The Journal of Rheumatology* 2012, 51(7): 1285-92

6. Manoussakis M.N., Boiu S., Korkolopoulou P., Kapsogeorgou E.K., Kavantzias N., Patsouris E., Moutsopoulos H.M. (2007) Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells, and expression of IL-18 and IL-12 expression in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome: correlation with features of immune hyperactivity and adverse prognosis for lymphoma development. *Arthritis & Rheumatism*, 56 (12): 3977-88

II. Δημοσιεύσεις περιλήψεων παρουσιάσεων σε διεθνή συνέδρια

1. S. Boiu, A. Nezos, I. Melki, A. Dinopoulos, M. Gialitakis, E. Atsali, K. Mavragani, P. Makrythanasis, V. Papaevangelou, D. Boumpas, A. Banos. Cornelia de Lange syndrome with a novel mutation in SMC1A gene in a patient with Aicardi-Goutières syndrome. *Pediatric Rheumatology* 2018, 16(Suppl 2): P15
2. I. Muresan, S. Boiu, E. Atsali, L. Fotis, V. Papaevangelou, D. Boumpas. Survey of disease characteristics, functional status and damage in JIA patients followed in a greek tertiary Pediatric Rheumatology Center. *Pediatric Rheumatology* 2018, 16(Suppl 2): B10
3. A. Hittinger, S. Boiu, B. Bader-Meunier, C. Wouters, P. Quartier. Diversity in presentation and evolution of autoinflammatory diseases in a French pediatric cohort of Referral Center of Rheumatology. *Pediatric Rheumatology* 2018, 16(Suppl 2): P175
4. E. Atsali, E. Siomou, S.A. Alfantaki, P. Katsibri, S. Boiu, L. Fotis, I. Muresan, V. Papaevangelou, D. Boumpas. Hepatitis as the main initial manifestation of juvenile systemic lupus erythematosus - 2 case reports. *Pediatric Rheumatology* 2018, 16(Suppl 2): P127
5. S. Boiu, M. Barat-Houari, I. Touitou, D. Geneviève, V. Kontogeorgakos, E. Atsali, D. Boumpas, V. Papaevangelou. Novel mutations in PRG4 gene in one greek family with camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis (CACP) syndrome. *Pediatric Rheumatology* 2017, 15(Suppl 2): 64 (P81)
6. S. Boiu, A. Nezos, I. Melki, A. Dinopoulos, E. Atsali, C. Mavragani, V. Papaevangelou, D. Boumpas. Aicardi-Goutières syndrome with a novel mutation in SAMHD1 gene. *Pediatric Rheumatology* 2017, 15(Suppl 2): 64 (P18)
7. L. Rossi-Semerano, A. Saraux, A. Von Scheven,^[1,SEP] S. Breton, M. Bossert, S.

- Boiu, E. Chatelus, G. Durand, P. Dusser, S. Jean, L. Goumy, A. Mathiot, S. Chapelière, G. Mouterde, F. Nugues, A. Ould Hennia, B. Rey, C. Salliot, L. Sparsa, F. Hofer, S. Jousse-Joulin. Intra- and inter-observer reliability of ultrasound for the joints evaluation in children with juvenile idiopathic arthritis: the JIRECHO study. *Pediatric Rheumatology* 2017, 15(Suppl 2): 65 (P212)
8. E. Atsali, D. Kassara, P. Katsimbri, S. Boiu, D.T. Boumpas, V. Papaevangelou. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome (PFAPA) in a 17 years old girl – case report. *Pediatric Rheumatology* 2017, 15(Suppl 2): 59 (B1)
 9. E. Bountouvi, K. Theodoropoulos, E. Atsali, R. Moutsiou, C. Tsalapaki, P. Katsimbri, S. Boiu, D.T. Boumpas, V. Papaevangelou. Whole-Body Magnetic Resonance Imaging (WBMRI) revealing an extensive muscle involvement in a child presenting with Gottron’s papules and moderate muscle weakness - case report. *Pediatric Rheumatology* 2017, 15(Suppl 2): 59 (B8)
 10. E. Atsali, P. Katsimbri, A. Fanouriakis, S. Boiu, V. Papaevangelou, D. T. Boumpas. Juvenile Systemic Lupus Erythematosus (JSLE) initially diagnosed as autoimmune hepatitis (AIH) - case report. *Pediatric Rheumatology* 2017, 15(Suppl 2): 59 (B22)
 11. A.G. Vakrakou, S. Boiu, A. Papadopoulou, E. Kanavakis, M.N. Manoussakis. The Patients with Primary Sjögren's Syndrome Display Inflammasome Activation in the Peripheral Blood and the Salivary Glands that Correlates With Deficient Degradation of DNA. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: Suppl 2 100-101
 12. AG Vakrakou, S. Boiu, A. Papadopoulou, E. Kanavakis, MN Manoussakis. Activation of inflammasome correlating with the presence of non-degraded cell-free DNA in the peripheral blood and the salivary glands of patients with severe primary Sjogren’s syndrome. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: Suppl 1 A68
 13. E Demirkaya, S Ozen, C Saglam, T Turker, A Duzova, P Woo, I Konè-Paut, M Doglio, G Amarian, J Frenkel, Y Uziel, A Insalaco, L Cantarini, M Hofer, S. Boiu, C Modesto, A Bryant, D Rigante, E Papadopoulou-Alataki, S Guillaume-Czitrom, N Ruperto, M Gattorno. Results from a multicenter international registry of Familial Mediterranean Fever: validation of the new set of pediatric diagnostic criteria. *Pediatric Rheumatology* 2013, 11(Suppl 2): 197.
 14. Boiu S., Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B, Wouters C., Quartier P. Diversity in Presenting. Manifestations of

Autoinflammatory. Syndromes in a French Paediatric Rheumatology Referral Center. *Pediatric Rheumatology* 2013, Volume 11 (Suppl 1): 77

15. E. Demirkaya, S. Ozen, C. Saglam, T. Turker, A. Duzova, P. Woo, I. Konè-Paut, M. Doglio, G. Amaryan, J. Frenkel, Y. Uziel, A. Insalaco, L. Cantarini, M. Hofer, S. Boiu, C. Modesto, A. Bryant, D. Rigante, E. Papadopoulou-Alataki, S. Guillaume-Czitrom, N. Ruperto, M. Gattorno, PRINTO and Eurofever Project. Validation of pediatric diagnostic criteria in FMF. *Pediatric Rheumatology* 2013, Volume 11 (Suppl 1): 27
16. Boiu S., Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B., Quartier P. Diversity in clinical manifestations of autoinflammatory syndromes. *Pediatric Rheumatology* 2011, 9 (Suppl 1): 306
17. Boiu S., Kapsogeorgou E.K., Dimitriou I.D., Spahidou M.P., Moutsopoulos H.M., Manoussakis M.N. (2004) Elevated expression of interleukin 18 (IL-18) in Sjogren's Syndrome (SS): Distinct expression patterns of the active and proactive forms. *Arthritis Research & Therapy* 2004, 6 (Suppl 1): 22

Θ. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

I. Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

1. S. Boiu, A. Nezos, I. Melki, A. Dinopoulos, M. Gialitakis, E. Atsali, K. Mavragani, P. Makrythanasis, V. Papaevangelou, D. Boumpas, A. Banos. Cornelia de Lange syndrome with a novel mutation in SMC1A gene in a patient with Aicardi-Goutières syndrome. *PReS Congress*, 5-8th September 2018, Lisbon, Portugal
2. A. Hittinger, S. Boiu, B. Bader-Meunier, C. Wouters, P. Quartier. Diversity in presentation and evolution of autoinflammatory diseases in a French pediatric cohort of Referral Center of Rheumatology. *PReS Congress*, 5-8th September 2018, Lisbon, Portugal
3. E. Atsali, E. Siomou, S.A. Alfantaki, P. Katsibri, S. Boiu, L. Fotis, I. Muresan, V. Papaevangelou, D.T. Boumpas. Hepatitis as the main initial manifestation of juvenile systemic lupus erythematosus - 2 case reports. *PReS Congress*, 5-8th September 2018, Lisbon, Portugal
4. S. Boiu, M. Barat-Houari, I. Touitou, D. Geneviève, V. Kontogeorgakos, E.

- Atsali, D. Boumpas, V. Papaevangelou. Novel mutations in PRG4 gene in one greek family with camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis (CACP) syndrome. *PreS Congress*, 14-17th September 2017, Athens, Greece
5. S. Boiu, A. Nezos, I. Melki, A. Dinopoulos, E. Atsali, C. Mavragani, V. Papaevangelou, D. Boumpas. Aicardi-Goutières syndrome with a novel mutation in SAMHD1 gene. *PreS Congress*, 14-17th September 2017, Athens, Greece
 6. L. Rossi-Semerano, A. Saraux, A. Von Scheven, S. Breton, M. Bossert, S. Boiu, E. Chatelus, G. Durand, P. Dusser, S. Jean, L. Goumy, A. Mathiot, S. Chapelière, G. Mouterde, F. Nugues, A. Ould Hennia, B. Rey, C. Salliot, L. Sparsa, F. Hofer, S. Jousse-Joulin. Intra and inter observer reliability of ultrasound for the joints evaluation in children with juvenile idiopathic arthritis: the JIRECHO study. *PreS Congress*, 14-17th September 2017, Athens, Greece
 7. L. Rossi-Semerano, A. Saraux, A. Von Scheven, S. Breton, M. Bossert, S. Boiu, E. Chatelus, G. Durand, P. Dusser, S. Jeanne, L. Goumy, A. Mathiot, S. Chapeliere, G. Mouterde, F. Nugues, A. Ould Hennia, B. Rey, C. Salliot, L. Sparsa, F. Hofer, S. Jousse-Joulin. Reproductibilité intra et inter observateur de l'échographie articulaire dans l'arthrite juvenile idiopathique (Projet JIRECHO), *Congrès SOFREMIP*, 11-12 Mai 2017, Rouen, France
 8. A.G. Vakrakou, S. Boiu, P. Ziakas, M.N. Manoussakis. DNA accumulations in the peripheral blood and salivary gland tissues fuel inflammasome activation in patients with severe primary Sjögren's syndrome. 37th EWRR, 2-4th March 2017, Athens, Greece
 9. M. Tzanoudaki, H. Ploumi, S. Tantou, S. Boiu, V. Polaki, N. Vassilaki, M. Liatsis, M. Kanariou. TH17 enumeration as a screening test for Job's Syndrome and Chronic Mucocutaneous Candidiasis: Experience of a Greek reference Centre. *European Society for Immunodeficiencies (ESID) Biennial Meeting*, 21–24th September 2016, Barcelona, Spain
 10. S. Boiu, A.G. Vakrakou, A. Papadopoulou, E. Kanavakis, M.N. Manoussakis. Inflammasome activation in the peripheral blood monocytes and salivary gland tissue macrophages of primary Sjögren's syndrome patients: correlation with deficient DNA degradation mechanism and clinical indices of severe disease. *Turkish-Greek Rheumatology Days*, 24-27th March 2016, Istanbul, Turkey
 11. A.G. Vakrakou, S. Boiu, A. Papadopoulou, E. Kanavakis, M.N. Manoussakis The Patients with Primary Sjögren's Syndrome Display Inflammasome Activation in

- the Peripheral Blood and the Salivary Glands that Correlates With Deficient Degradation of DNA. *EULAR Congress*, 10-13th June 2015, Rome, Italy A.G. Vakrakou, S. Boiu, A. Papadopoulou, E. Kanavakis, M.N. Manoussakis. Activation of inflammasome correlating with the presence of non-degraded cell-free DNA in the peripheral blood and the salivary glands of patients with severe primary Sjogren's syndrome. *35th EWRR*, 5-7th March 2015, Budapest, Hungary
12. E. Demirkaya, S. Ozen, C. Saglam, T. Turker, A. Duzova, P. Woo, I. Konè-Paut, M. Doglio, G. Amarian, J. Frenkel, Y. Uziel, A. Insalaco, L. Cantarini, M. Hofer, S. Boiu, C. Modesto, A. Bryant, D. Rigante, E. Papadopoulou-Alataki, S. Guillaume-Czitrom, N. Ruperto, M. Gattorno. Results from a multicenter international registry of Familial Mediterranean Fever: validation of the new set of pediatric diagnostic criteria. *PreS Congress*, 25-29th September 2013, Ljubljana, Slovenia
 13. Boiu S, Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B., Wouters C., Pierre Quartier P. Diversity in Presenting Manifestations of Auto-Inflammatory Diseases in a French Paediatric Rheumatology Referral Center. *Autoinflammation 2013, 7th International Congress of FMF and AIDs of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID)*, 22-26th Mai 2013, Lausanne, Suisse
 14. E. Demirkaya, S. Ozen, C. Saglam, T. Turker, A. Duzova, P. Woo, I. Konè-Paut, M. Doglio, G. Amaryan, J. Frenkel, Y. Uziel, A. Insalaco, L. Cantarini, M. Hofer, S. Boiu, C. Modesto, A. Bryant, D. Rigante, E. Papadopoulou-Alataki, S. Guillaume-Czitrom, N. Ruperto, M. Gattorno, PRINTO and Eurofever Project. Validation of pediatric diagnostic criteria in FMF. *7th International Congress of FMF and AIDs of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID)*, 22-26th Mai 2013, Lausanne, Suisse
 15. Boiu S, Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B., Wouters C., Quartier P. Diversity in Presenting Manifestations of Auto-Inflammatory Syndromes in a French Paediatric Rheumatology Referral Center. *Young Investigator Meeting, EULAR-PreS Congress 2012*, 6-9th June 2012, Berlin, Germany
 16. Boiu S, Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B., Wouters C., Quartier P. Diversité des manifestations cliniques des maladies autoinflammatoires: l'expérience d'un centre de reference de Rhumatologie

Pédiatrique, *Congrès SOFREMIP*, 11-12 Mai 2012, Toulouse, France

17. Boiu S., Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B., Wouters C., Quartier P. Diversity in Presenting Manifestations of Autoinflammatory Syndromes in a French Paediatric Rheumatology Referral Center. *First PReS Research Course, « Translational and Clinical Issues in Paediatric Rheumatology »*, March 2012, Genoa, Italy
18. Kattamis A., Stokidis K., Delaporta P., Kyriakopoulou D., Petropoulou T., Boiu S., Ladis V. Longitudinal Changes in Iron Overload Parameters and Iron Chelation Therapy in Young Patients with Thalassemia Major. *American Society of Hematology (ASH) Congress*, 10-13th December 2011, San Diego, USA
19. Boiu S., Neven B., Compeyrot-Lacassagne S., Mouy R., Bader-Meunier B., Wouters C., Quartier P. Diversity in Presenting Manifestations of Auto-Inflammatory Syndromes in a French Paediatric Rheumatology Referral Center. *PReS Congress*, 14-18th September 2011, Bruges, Belgium
20. Kattamis A., Stokidis K., Boiu S., Delaporta P. Eculizumab in the treatment of a patient with complement C3 mutation-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *European Society of Paediatric Haematology and Immunology (ESPHI) Biennial Meeting*, 16-17th September 2011, Barcelona, Spain
21. Kattamis A., Stokidis K., Boiu S., Petropoulou T. Antineutrophil antibodies in children with neutropenia. *The European Hematology Association (EHA) Congress*, 9-12th June 2011, London, UK
22. Compeyrot-Lacassagne S., Lambot K., Elie C., Alova I., Boiu S., Bokor B., Bader-Meunier B., Mouy R., Wouters C., Bragalia C., Tantu L., Woo P., Rosendahl K., Malattia C., Damasio B., Quartier P. Tenosynovitis in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatric Rheumatology Symposium (PRSYM)*, June 2011, Miami, FL
23. Compeyrot-Lacassagne S., Lambot K., Elie C., Alova I., Boiu S., Bokor B., Bader-Meunier B., Mouy R., Wouters C., Bragalia C., Tantu L., Woo P., Rosendahl K., Malattia C., Damasio B., Quartier P. Tenosynovitis in Juvenile Idiopathic Arthritis. *European League Against Rheumatism (EULAR) Congress*, 25-28th May 2011, London, UK
24. Boiu S., Marniga E., Bader-Meunier B., Mouy R., Compeyrot-Lacassagne S., Quartier P., Wouters C. Functional Status in Severe Juvenile Idiopathic Arthritis: an Assessment in a Tertiary Paediatric Rheumatology Reference Centre. *Young*

Investigator Meeting (YIM) and Pediatric Rheumatology European Society (PReS) Congress, 9-12th September 2010, Valencia, Spain

25. Boiu S., Marniga E., Bader-Meunier B., Mouy R., Compeyrot-Lacassagne S., Quartier P., Wouters C. L'évaluation de l'état fonctionnel des patients avec arthrite juvénile idiopathique suivis dans un centre de référence. *Congrès Société Francophone pour la Rhumatologie Et les Maladies Inflammatoires en Pédiatrie (SOFREMIP)*, Mai 2010, Nancy, France
26. Kattamis A., Boiu S., Iatrakou E., Spanou F., Panagiotou I., Athanassaki C., Kafetzis D., Petropoulou T. Antineutrophil antibodies in children with neutropenia. *3rd Neutropenia Network Conference*, 26-27th September 2008, Heraklion, Crete, Greece
27. Boiu S., Korkolopoulou P., Dimitriou I.D., Kapsogeorgou E.K., Kavantzias N., Moutsopoulos H.M., Manoussakis M.N. High Expression of Interleukin-18 (IL-18) Protein by Macrophages in the Minor Salivary Gland (SG) Biopsies of Patients with Sjögren's Syndrome. *American College of Rheumatology (ACR) Annual Scientific Meeting*, 16-21th October 2004, San Antonio, Texas
28. Boiu S., Kapsogeorgou E.K., Dimitriou I.D., Spahidou M.P., Moutsopoulos H.M., Manoussakis M.N. Elevated expression of interleukin 18 (IL-18) in Sjögren's Syndrome (SS): Distinct expression patterns of the active and proactive forms. *European Workshop for Rheumatology Research (EWRR)*, 26-29th February 2004, Berlin, Germany

II. Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

1. M. Tzanoudaki, H. Ploumi, S. Tantou, S. Boiu, V. Polaki, N. Vassilaki, M. Liatsis, M. Kanariou. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των TH17 λεμφοκυττάρων στη διάγνωση της χρόνιας βλεννογονοδερματικής καντιντίασης. *10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας*, 8-10 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη
2. A.G. Vakrakou, S. Boiu, M.N. Manoussakis. Αυθόρμητη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων ασθενών με σύνδρομο Sjögren. *24^ο Συνέδριο Ελληνικής Πνευματολογικής Εταιρείας*, 11-14 Δεκεμβρίου 2014, Αθήνα
3. Delaporta P., Apostolakou F., Bartzeliotou A., Palaiologos G., Boiu S., Stokidis K., Kattamis A., Papasotiriou I. Correlation of NT-proBNP levels with cardiac

iron concentration in thalassemia patients. 22^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-26 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα

4. Stokidis K., Petropoulou T., Boiu S., Panagiotou I., Kyriakopoulou D., Kattamis A. Αντισώματα έναντι ουδετεροφίλων στα παιδιά με ουδετεροπενία. 1^ο Συνέδριο Παιδιατρικής Αιματολογίας Ογκολογίας, 11 Φεβρουαρίου 2010, Αθήνα
5. Kattamis A., Boiu S., Iatrakou E., Spanou F., Panagiotou I., Athanassaki C., Kafetzis D., Petropoulou T. Αντισώματα έναντι ουδετεροφίλων στα παιδιά με ουδετεροπενία. 46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 13-15 Ιουνίου 2008, Κέρκυρα

III. Προσκεκλημένη ομιλήτρια σε ελληνικά συνέδρια

1. 14^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών. Πολεμικό Μουσείο, Αθήνα, 3-4 Μαρτίου 2018. Υποτροπιάζοντα αυτοφλεγμονώδη εμπύρετα: διαγνωστική προσέγγιση και νεότερα δεδομένα
2. 2ο Σχολείο Συστηματικού Ερυθρηματώδη Λύκου. Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών, 1-2 Δεκεμβρίου 2017. Συνύπαρξη συνδρόμου Aicardi-Goutières με το σύνδρομο Cornelia de Lange σε έναν ασθενή.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Μ. Μουτσόπουλο για την δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω στο διεθνώς αναγνωρισμένο εργαστήριό του.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον Καθηγητή κ. Μενέλαο Ν. Μανουσάκη για την συνεχή βοήθεια, καθοδήγηση, επίβλεψη και φροντίδα για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Πηνελόπη Κορκολοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της στην διεκπεραίωση αρχικών ιστολογικών μελετών και την γενικότερη υποστήριξή της.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής και συγκεκριμένα τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιούφα και τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Βλαχογιαννόπουλο για την υποστήριξη τους στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Χρούσο που άκουσε τους προβληματισμούς μου και κατανοώντας το ενδιαφέρον μου για την ανοσολογία από τα φοιτητικά μου χρόνια, με κατεύθυνε προς το εργαστήριο του Καθηγητή κ. Χαράλαμπου Μ. Μουτσόπουλου.

Ευχαριστώ επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ευσταθία Καψογεώργου και τους Γιάννη Δημητρίου, Rasmi Abu-Helu και Αντιγόνη Τριανταφυλλοπούλου για την συνεργασία μας που ήταν σημαντική στα πρώτα βήματα της πορείας μου στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη συνάδελφο και ακούραστη ερευνήτρια Αίγλη Βακράκου, για τη σημαντική συμβολή της στην περάτωση της παρούσας διατριβής αλλά και για την φιλία της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνήτρια και φίλη Χαραλαμπία Μπολέτη για την πολλαπλή υποστήριξή της.

Ευχαριστώ το Υπουργείο Εξωτερικών της Ελλάδος, που με υποστήριξε οικονομικά και ειδικότερα τον κύριο Δέδε για την βοήθειά του.

Τέλος, θα ήταν μεγάλη παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους για την αμέριστη υπομονή και την συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια που χρειάστηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

ΣΥΝΟΨΗ

Το σύνδρομο Sjogren (SS) ή η αυτοάνοση επιθηλίτιδα είναι μια μάλλον συχνή αυτοάνοση εξωκρινοπάθεια που χαρακτηρίζεται από χρόνια δυσλειτουργία και καταστροφή των εξωκρινών αδένων (κυρίως των σιελογόνων και δακρυικών αδένων). Το SS μπορεί να υπάρχει είτε μόνο του (πρωτοπαθές SS), είτε σε συνδυασμό με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις (δευτεροπαθές ή συσχετιζόμενο SS). Η εκδήλωση του SS μπορεί να κυμαίνεται από νόσο που περιορίζεται στους εξωκρινείς αδένες (οργανο-ειδική εξωκρινοπάθεια), σε νόσο με ποικίλες εξω-αδενικές εκδηλώσεις (συστημική νόσος), έως σε νόσο με ανάπτυξη λεμφώματος B-λεμφοκυττάρων (μη-Hodgkin λέμφωμα, NHL). Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών εμφανίζουν κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά που αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφώματος NHL.

Στο παρελθόν, πολλαπλά πειραματικά δεδομένα από το εργαστήριό μας έχουν υποδείξει ότι τα πορικά επιθηλιακά κύτταρα κατέχουν κεντρικό παθογενετικό ρόλο στο SS. Επιπλέον, μια σειρά από δεδομένα υποδεικνύουν τη συμβολή τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας στην ανάπτυξη των χρόνιων φλεγμονωδών αλλοιώσεων που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο. Οι προχωρημένες λεμφο-επιθηλιακές βλάβες στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με SS χαρακτηρίζονται κυρίως από έκφραση κυτταροκινών τύπου Th1, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης παραγωγής ιντερφερόνης-γ (IFNγ), μιας κυτταροκίνης που πιθανότατα εμπλέκεται άμεσα στην καταστροφή του επιθηλίου.

Η ιντερλευκίνη-18 (IL-18) και η IL-12 είναι πλειότροπες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες με εξαιρετικά σημαντικό συνεργιστικό ρόλο στην παραγωγή IFNγ, αποτελώντας κεντρικούς ρυθμιστές της χρόνιας φλεγμονής στα αυτοάνοσα νοσήματα. Παρόμοια με την IL-1β, η IL-18 συντίθεται ως βιολογικά αδρανής πρόδρομη μορφή (pro-IL18) η οποία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα μυελοειδών και επιθηλιακών κυττάρων και χρειάζεται πρωτεολυτική διάσπαση για την έκκρισή της ως δραστική IL-18. Η διάσπαση της pro-IL18 σε ώριμη IL-18 εξαρτάται από τη δράση της κασπάσης-1, που ενεργοποιείται μετά την συγκρότηση των φλεγμονοσωμάτων (inflammasomes). Τα φλεγμονοσώματα είναι μια ομάδα πρωτεϊνικών συμπλόκων με πολλές υπομονάδες που αποτελούν μια εξαιρετικά σημαντική κυτταρική πλατφόρμα για την επαγωγή της έμφυτης ανοσολογικής

απόκρισης. Η πλατφόρμα αυτή συγκροτείται από μόρια κυτταροπλασματικών “αισθητήρων” (όπως οι πρωτεΐνες NLRP3 και AIM2), το μόριο-προσαρμοστής ASC και η κασπάση-1. Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος οδηγεί στην παραγωγή των δραστικών μορφών των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 β και IL-18, καθώς και στην ενεργοποίηση ενός ιδιαίτερα φλεγμονώδους τύπου κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται πυρόπτωση.

Προηγούμενα, έχει διαπιστωθεί ότι οι φλεγμονώδεις διηθήσεις στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες (ΕΣΑ) ασθενών με SS εμφανίζουν υψηλή έκφραση της IL-18 από τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και της IL-12 από τα Β-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, έχειδειχθεί η θετική συσχέτιση των αυξημένων ορολογικών επιπέδων IL-18 με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων anti-Ro(SSA) και anti-La(SSB) στους ασθενείς με πρωτοπαθές SS. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η κλινική σημασία της έκφρασης των πρωτεϊνών IL-18 και IL-12 στους σιελογόνους ιστούς των ασθενών με SS δεν είχε διερευνηθεί. Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα πειραματικά στοιχεία έχουν υποδείξει την συμμετοχή της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην παθογένεση του SS, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής επιτόπιας (*in-situ*) έκφρασης της κυτταροκίνης IL-1 β και της ενεργοποίησης του άξονα του φλεγμονοσώματος-P2X7R. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς και ζώικά μοντέλα με ξηροφθαλμία έχουν επίσης υποδηλώσει την εμπλοκή του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην εξωκρινοπάθεια του SS. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η κατάσταση ενεργοποίησης των φλεγμονοσωμάτων στα διάφορα βιολογικά διαμερίσματα των ασθενών με SS και η σχέση της με τις κλινικές και εργαστηριακές εκδηλώσεις της νόσου δεν είχαν διερευνηθεί.

Ο πρώτος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της IL-18 στις φλεγμονώδεις λεμφοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, καθώς και στις εκδηλώσεις της νόσου στους ασθενείς με SS. Δεδομένης της συνεργιστικής δράσης της IL-18 με την IL-12 στην παραγωγή της IFN γ , η έκφραση των δύο αυτών κυτταροκινών αξιολογήθηκε παράλληλα. Ο δεύτερος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο προσδιορισμός της κατάστασης της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στο περιφερικό αίμα και στους ιστούς σιελογόνων αδένων ασθενών με SS, καθώς και της κλινικής σημασίας αυτής.

Για τον σκοπό αυτό, η πρωτεϊνική έκφραση των pro-IL-18, IL-18 και IL-12 στα κύτταρα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες αξιολογήθηκε με ανοσοϊστοχημεία μονής και διπλής χρώσης σε δείγματα ΕΣΑ από ασθενείς με πρωτοπαθές και

δευτεροπαθές SS. Επίσης αξιολογήθηκε η έκφραση mRNA και πρωτεΐνης για ποικίλα μόρια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, σε δείγματα ορού, μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) και ΕΣΑ με τεχνικές ELISA, RT-PCR και συνεστιακή μικροσκοπία, αντίστοιχα. Επιπλέον, επινοήθηκε ένας νέος σύνθετος δείκτης για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 (αθροιστικός βαθμός έκφρασης NLRP3, που περιλαμβάνει την έκφραση διαφόρων γονιδίων σχετιζόμενων με το φλεγμονόσωμα NLRP3). Τέλος, προκειμένου να εξετάσουμε την κλινική σημασία αυτών των παραγόντων του φλεγμονοσώματος στο SS, διερευνήσαμε τη συσχέτιση της έκφρασής τους με διάφορες παραμέτρους της νόσου, συμπεριλαμβανομένων των δεικτών βαρύτητας της νόσου και της παρουσίας δυσμενών προγνωστικών δεικτών για την ανάπτυξη NHL λεμφώματος.

Οι ΕΣΑ από ασθενείς με SS (αλλά όχι από μάρτυρες νόσου) παρουσίασαν αυξημένη διήθηση από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, ισχυρή έκφραση της IL-18 από τα διηθούμενα μακροφάγα (ειδικά στις περιοχές με σημαντική παρουσία Β-λεμφοκυττάρων και στις περιοχές που προσομοιάζουν με βλαστικά κέντρα), καθώς και σημαντική έκφραση της IL-12 στις διηθήσεις από μονοπύρηνια κύτταρα. Ο βαθμός διήθησης από τα κύτταρα που εκφράζουν IL-18 συσχετίστηκε σημαντικά και θετικά με ποικίλους δείκτες της *in situ* αδενικής φλεγμονής σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS, συμπεριλαμβανομένης της βαρύτητας των συνολικών διηθήσεων από μονοπύρηνια κύτταρα, καθώς και ειδικά από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, και Β-λεμφοκύτταρα. Από την άλλη πλευρά, ο βαθμός διήθησης από τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-18 συσχετίστηκε αντίστροφα με τον βαθμό διήθησης από IL-12 θετικά κύτταρα. Επιπλέον, η έκφραση της IL-18 στους ΕΣΑ των ασθενών συσχετίστηκε θετικά με την παρουσία κλινικών και ορολογικών παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφώματος Β-λεμφοκυττάρων (όπως η διόγκωση των σιελογόνων αδένων και η παρουσία χαμηλών ορολογικών επιπέδων κλάσματος C4 του συμπληρώματος).

Σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, τα PBMC των ασθενών βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα ποικίλων μεταγράφων mRNA των γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, αλλά όχι με το AIM2. Επιπλέον, το συσσωρευτικό σκορ NLRP3 αναγνωρίστηκε ως ένας ευαίσθητος και ειδικός βιοδείκτης για την διάκριση των ασθενών με SS από τα υγιή άτομα. Στα δείγματα ορού αίματος των ασθενών με SS ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, όπως η IL-

1β, η IL-18 και η ASC. Μεταξύ αυτών, τα κυκλοφορούντα επίπεδα της IL-18 και της ASC ανευρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με σοβαρή νόσο SS, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είχαν εμφανίσει λέμφωμα NHL. Επιπλέον, τα ορολογικά επίπεδα ASC ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με SS που είχαν αναπτύξει λέμφωμα NHL σε σύγκριση με αυτούς χωρίς λέμφωμα και συσχετίστηκαν θετικά με την παρουσία δυσμενών προγνωστικών παραγόντων για την ανάπτυξη λεμφώματος, όπως η παρουσία υποσυμπληρωματιναιμίας C3 και C4 στον ορό του αίματος, ψηλαφητής πορφύρας και λεμφοπενίας. Διαπιστώθηκε ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος αποτελούν την κύρια πηγή των υψηλών επιπέδων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στον ορό του αίματος αυτών των ασθενών, καθώς και ότι είναι αυτά εμφανίζουν ενδείξεις προηγηθείσας ενεργοποίησής τους προς τούτο *in vivo* (pre-priming). Από την άλλη πλευρά, αναδείχθηκε ότι τα μακροφάγα που διηθούν τους ΕΣΑ ασθενών με σοβαρό SS εμφανίζουν *in-situ* ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, όπως υποδείχθηκε από την έκφραση σε αυτά υψηλών επιπέδων των πρωτεϊνών NLRP3, ASC και κασπάσης-1, καθώς και της χαρακτηριστικής περιπυρηνικής στικτής συσσώρευσης της πρωτεΐνης ASC (σχηματισμός speck). Επιπλέον, βρέθηκε σημαντική εξωκυττάρια συσσώρευση των ASC specks στις λεμφοκυτταρικές διηθήσεις των σιελογόνων αδένων ασθενών, το οποίο αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο για την παρουσία πυρόπτωσης.

Συμπερασματικά, στις μελέτες μας δείξαμε ότι τα μακροφάγα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες των ασθενών με SS παρουσιάζουν σημαντική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και υψηλή παραγωγή IL-18, η οποία συσχετίζεται σημαντικά με ποικίλους δείκτες αδενικής φλεγμονής, καθώς και με την παρουσία παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφώματος NHL στους ασθενείς με SS. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την σημαντική συμμετοχή της IL-18 σε ποικίλες παθολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα πλαίσια του SS, όπως η επαγωγή και οργάνωση των περιπορικών λεμφο-επιθηλιακών βλαβών, η ανώμαλη έκπτυξη των B-λεμφοκυτταρικών κλώνων, καθώς και η ανάπτυξη λεμφώματος NHL. Από την άλλη πλευρά, διαπιστώθηκε ότι στους ΕΣΑ των ασθενών με SS, η έκφραση της IL-18 συσχετίζεται αντιστρόφως με αυτή της IL-12, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει αντίθετους ρόλους στις χρόνιες φλεγμονώδεις διεργασίες της νόσου. Επιπλέον, τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών με SS αναγνωρίστηκαν ως η κύρια πηγή κυτταροκινών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος,

όπως η IL-18 και η ASC, που κυκλοφορούν σε αυξημένες ποσότητες στον ορό του αίματος των ασθενών αυτών. Μεταξύ άλλων, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι αυτές οι κυκλοφορούσες πρωτεΐνες πιθανότατα αποτελούν προγνωστικοί βιοδείκτες για το νόσημα, όπως υποδεικνύεται από την ισχυρή συσχέτιση τους με τους δείκτες σοβαρότητας αυτού. Συνολικά, τα συμπεράσματά μας καταδεικνύουν ότι η IL-18 και η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 κατέχουν ρόλο-κλειδί στην παθογένεια των σοβαρών κλινικών εκδηλώσεων του SS, όπως η ανάπτυξη λεμφώματος NHL, γεγονός το οποίο πιθανότατα καθιστά αυτά τα μόρια μελλοντικούς βιολογικούς στόχους για την θεραπευτική αντιμετώπιση του νοσήματος.

SYNOPSIS

Sjogren's syndrome (SS), or autoimmune epithelitis, is a rather common autoimmune exocrinopathy characterized by chronic dysfunction and destruction of the exocrine glands (mainly the salivary and lacrimal glands). The disorder may be found alone (primary SS) or in association with other autoimmune diseases (secondary SS or associated SS). SS may extend from disease confined to the exocrine glands (organ-specific exocrinopathy) to various extraglandular manifestations (systemic disease), as well as the development of B cell lymphoma (non-Hodgkin lymphoma; NHL). Approximately one-third of patients manifest clinical and laboratory features that represent high-risk prognostic factors for NHL development.

Glandular epithelial cells are thought to play a central pathogenetic role in SS. In addition, evidence indicates the contribution of both innate and adaptive immunity in inflammatory reactions. The advanced lymphoepithelial lesions in salivary glands of SS patients are predominantly characterized by Th1-type cytokines expression, including interferon- γ (IFN γ), a cytokine likely directly involved in the destruction of epithelia.

Interleukin-18 (IL-18) and IL-12 are pleiotropic proinflammatory cytokines with major synergistic role in IFN γ production, representing pivotal regulators of chronic inflammation in autoimmune diseases. Similarly to IL-1 β , IL-18 is produced as a biologically inactive precursor (pro-IL18) that is localized in the cytoplasm of myeloid and epithelial cells and requires proteolytic processing for secretion as active IL-18. The cleavage of pro-IL18 into mature IL-18 depends on the action of caspase1, activated upon the assembly of inflammasomes. Inflammasomes are a group of multimeric protein complexes that represent a major innate immune response platform consisted of cytoplasmic sensor molecules (such as the NLRP3 and the AIM2 proteins), the adaptor molecule ASC and caspase1. Inflammasome activation leads to the production of active pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, as well as the induction of a pro-inflammatory type of cell death termed pyroptosis.

The inflammatory infiltrates of minor salivary glands (MSG) in SS patients have been described to manifest high expression of IL-18 by macrophages and epithelial cells, as well as of IL-12 by B cells. In addition, an association of increased serum IL-

18 levels with anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) autoantibody production in patients with primary SS has been demonstrated. However, the actual clinical significance of IL-18 and IL-12 protein expression in the salivary tissues of SS patients has not been addressed. In fact, recent experimental evidence suggests the implication of inflammasome activation in the pathogenesis of SS, including the high in-situ expression of IL-1 β cytokine and the activation of P2X7R-inflammasome axis. Moreover, the involvement of NLRP3 inflammasome in SS exocrinopathy has been indirectly implied by studies in patients and animal models suffering from dry eye disease. Nevertheless, the activation status of inflammasomes in the various biologic compartments of SS patients, as well as its relationship with the disease manifestations, have not been previously addressed.

The first objective of this thesis was to investigate the role of IL-18 production in the inflammatory lymphoepithelial lesions of SS patients, as well as the correlation of such production with the disease manifestations of the disease. Given the synergistic activity of IL-18 with IL-12 in IFN γ production, the expression of both these cytokines was evaluated in parallel. The second objective of this work was to determine the status and clinical significance of inflammasome activation in the peripheral blood and the salivary tissues of SS patients.

For this purpose, the protein expression of pro-IL-18, IL-18, and IL-12 by salivary gland-infiltrating cells were assessed by single- and double-labeling immunohistochemistry in MSG specimens from primary and secondary SS patients. The mRNA and protein expression of several inflammasome-related molecules was evaluated in the sera, PBMC and MSG specimens by ELISA, RT-PCR, and confocal microscopy, respectively. Moreover, a novel composite marker for NLRP3 activation was devised (cumulative NLRP3 expression score, which involved the expression of various NLRP3 inflammasome-related genes). Finally, in order to address the clinical significance of these inflammasome-related factors in SS, we investigated the correlation of their expression with various disease parameters, including the disease severity scores and the presence of adverse predictors of lymphoma development.

The MSG from patients with SS (but not from disease controls) manifested increased infiltration by macrophages and dendritic cells, strong expression of IL-18 by macrophages (particularly in the B cell-rich areas and in the germinal center-like structures of patients), as well as expression of IL-12 by mononuclear cell infiltrates. The rate of infiltration by IL-18 expressing cells correlated strongly and positively

with several indices of in situ glandular inflammation in patients with primary SS, including the intensity of mononuclear cell infiltrates, as well as the numbers of the infiltrating macrophages, dendritic cells, and B cells. On the other hand, the rates of IL-18 expressing cells correlated inversely with the rate of infiltration by IL-12 positive cells. Moreover, IL-18 expression in the MSG of patients correlated positively with the presence of clinical and serological risk factors for B cell lymphoma development (such as the occurrence of salivary gland enlargement and C4 hypocomplementemia).

Compared to healthy individuals, patients' PBMC were found to display significantly increased levels of various NLRP3 inflammasome-related mRNA transcripts, but not of AIM2. In addition, the cumulative NLRP3 score was identified as a sensitive and specific biomarker for discriminating SS patients from healthy individuals. High amounts of the inflammasome activation-related proteins IL-1 β , IL-18 and ASC were detected in SS patients' sera. Among them, the serum levels of IL-18 and ASC proteins were found to be significantly increased in SS patients with severe disease, including those who had developed lymphoma. Moreover, ASC serum levels were significantly higher in SS patients who had developed lymphoma compared to those without, and correlated positively with the presence of several adverse predictors of lymphoma development, including C3 and C4 hypocomplementemia, palpable purpura, and lymphopenia. In addition, blood-borne monocytes were found to be a major source of the high amounts of inflammasome activation-related proteins that circulate in the sera of patients and to be aptly pre-primed *in vivo*. The MSG-infiltrating macrophages of patients with severe SS were shown to manifest high in-situ expression of NLRP3, ASC and caspase1 proteins, as well as the characteristic juxtanuclear aggregation of ASC proteins (speck formation), providing strong evidence for the *in-situ* NLRP3 activation in these cells. Finally, significant amounts of cell-free ASC specks were identified in the extra-cellular spaces of salivary gland infiltrates of patients, a fact indicative of pyroptosis.

In conclusion, we showed that the salivary gland-infiltrating macrophages of SS patients display significant in-situ NLRP3 inflammasome activation and associated high IL-18 production, which correlate highly significantly with several indices of glandular inflammation and the presence of risk indicators of B cell lymphoma development. These findings strongly suggest the involvement of IL-18 in the recruitment and organization of periductal lymphoid infiltrates of SS patients, as well

as in the aberrant B cell lymphoproliferative processes of the disease. On the other hand, IL-18 expression was found to correlate inversely with that of IL-12 in the MSG of SS patients, likely suggesting opposing roles in the chronic inflammatory processes of the disease. Moreover, blood-borne monocytes of SS patients were identified as major source of inflammasome activation-related cytokines, such as IL-18 and ASC, which are present in high amounts in patients' sera. In fact, our data indicate these circulating proteins as possible biomarkers for SS, as it was illustrated by their strong correlation with disease severity scores. Altogether, our findings strongly suggest a key role for IL-18 and NLRP3 inflammasome activation in the pathogenesis and severe clinical manifestations of SS, such as B-cell lymphoma development, and may provide novel biomarkers and new therapeutic targets for the management of these patients.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Το σύνδρομο Sjögren

1.1.1. Γενικά

Το σύνδρομο Sjögren είναι μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία και καταστροφή των εξωκρινών αδένων [1]. Οι πρώτες περιγραφές της νόσου έγιναν στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τους W.B. Haaden [2] και J. Mikulitz [3], και αργότερα από τους H. Gougerot [4] και H. Sjögren [5]. Έκτοτε, οι κλινικές, ιστοπαθολογικές, ανοσογενετικές και ορολογικές πτυχές του συνδρόμου έχουν μελετηθεί εκτενώς. Ωστόσο, κανένας ειδικός αιτιολογικός παράγοντας δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Το σύνδρομο Sjögren είναι δυνατόν να εμφανίζεται είτε μόνο του (πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren, σS) ή σε συνδυασμό με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις (δευτεροπαθές σύνδρομο Sjögren) [1], συμπεριλαμβανομένων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [6, 7], του συστηματικού σκληροδέρματος [8], του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου [9, 10], της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης [11], της μικτής νόσου του συνδετικού ιστού και της συστηματικής σκλήρυνσης [12, 13]. Αν και πολλά κλινικά, ορολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά δύνανται να διακρίνουν το πρωτοπαθές από το δευτεροπαθές σύνδρομο Sjögren, παραμένει ασαφές εάν αυτά είναι διαφορετικά ως προς την παθογένεσή τους.

Το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (σS) απαντάται σε 0.09-2.7% του γενικού πληθυσμού [14]. Προσβάλλει κατεξοχήν γυναίκες, με αναλογία γυναικών προς άνδρες 9:1 έως 20:1 [14], με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης σε ηλικίες 35-45 ετών [15]. Το κλινικό φάσμα της νόσου είναι ευρύ και κυμαίνεται από την οργανοειδική προσβολή των εξωκρινών αδένων (αυτοάνοση εντοπισμένη εξωκρινοπάθεια) έως τη δημιουργία πολυ-οργανικών βλαβών (συστηματική νόσος σε περίπου 35% των ασθενών), αλλά και την ανάπτυξη Β-λεμφοκυτταρικού λεμφώματος (σε περίπου 8% των ασθενών). Κατεξοχήν προσβάλλονται οι σιελογόνοι και οι δακρυϊκοί αδένες, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ξηροστομίας και ξηροφθαλμίας. Ωστόσο, η ξηρότητα είναι δυνατόν να αφορά όλες σχεδόν τις βλεννογονικές επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων της ρινικής, του φάρυγγα, του στομάχου και του κόλπου. Διόγκωση των μειζόνων σιελογόνων αδένων, ιδιαίτερα της παρωτίδας, απαντάται στο 25-60% των ασθενών [16]. Η ξηροφθαλμία οδηγεί σε χρόνια ερεθισμό και καταστροφή του επιθηλίου του κερατοειδούς και του επιπεφυκότος (ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα).

Οι εξωαδενικές εκδηλώσεις του συνδρόμου περιλαμβάνουν την προσβολή του ήπατος, των νεφρών και των πνευμόνων με εμφάνιση πρωτοπαθούς χολικής

κίρρωσης, διάμεσης νεφρίτιδας και λεμφοκυτταρικής βρογχίτιδας ή βρογχιολίτιδας, αντίστοιχα. Περίπου 15% παρουσιάζουν εξωεπιθηλιακές εκδηλώσεις, όπως ψηλαφητή πορφύρα, περιφερική νευροπάθεια και σπειραματονεφρίτιδα, αποτελώντας τη συστηματική μορφή της νόσου. Οι εκδηλώσεις αυτές θεωρείται ότι διαμεσολαβούνται από την εναπόθεση ανοσο-συμπλεγμάτων (π.χ κρυοσφαιρίνες τύπου II) ως αποτέλεσμα ολιγοκλωνικής ή μονοκλωνικής ανάπτυξης B-λεμφοκυττάρων. Η συστηματική μορφή του συνδρόμου συσχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα καθώς και με προδιάθεση στην ανάπτυξη λεμφώματος NHL (non-Hodgkin's lymphoma) [17].

Το σS θεωρείται αυτοάνοσο νόσημα. Η θεώρηση αυτή δικαιολογείται από την ύπαρξη των λεμφοκυτταρικών διηθήσεων στους σιελογόνους αδένες και την πληθώρα αυτοαντισωμάτων στον ορό [όπως ρευματοειδών παραγόντων (RFs), αντι-Ro (SSA) και αντι-La (SSB) αντισωμάτων, και άλλων αντιπυρηνικών αντισωμάτων] [18-20]. Επιπλέον, το σS αποτελεί μια πρότυπη προς μελέτη διαταραχή όπου μια καλοήγησ αυτοάνοση διαδικασία είναι δυνατόν να εξελιχθεί σε λεμφική κακοήθεια [21, 22], καθώς ένα ποσοστό 5-10% των ασθενών αναπτύσσουν λέμφωμα NHL, συνηθέστερα τύπου MALT [23-25].

Γενετικοί, νευροψυχολογικοί, περιβαλλοντικοί και ορμονικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν ρόλο στην παθογένεση του συνδρόμου.

Η συμβολή γενετικής προδιάθεσης στην ανάπτυξη του συνδρόμου Sjögren αναδεικνύεται από συνδυασμό αποτελεσμάτων που προκύπτουν από κλινικές και μοριακές μελέτες. Τα μέλη της οικογένειας ασθενών με σS παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του σS και των ορολογικών αυτοάνοσων διαταραχών σε σχέση με τους μάρτυρες ιδίου φύλου και ηλικίας [26]. Μελέτες του ανθρώπινου γονιδιώματος (Genome-wide association studies) έχουν επιβεβαιώσει την συμμετοχή των γονιδίων MHC, ειδικά εκείνων που κωδικοποιούν τα αντιγόνα HLA-DR και HLA-DQ, στην παθογένεση του συνδρόμου. Επιπλέον, έχουν αποκαλυφθεί σημαντικές συσχετίσεις με γονίδια που εμπλέκονται τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση, όπως γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες με ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης της IFN τύπου-I και την παραγωγή κυτταροκινών [(όπως οι Interferon Regulatory Factor 5 (*IRF5*), Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (*STAT4*), Interleukin 12A (*IL12A*) and Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3 (*NCR3*), Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22 (*PTPN22*)], τη λειτουργία των B λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων [(όπως οι B-

Lymphocyte Kinase (*BLK*), B-cell activating factor (*BAFF*), Early B-Cell Factor 1(*EBF1*), General Transcription Factor Ii (*GTF2I*), C-X-C chemokine receptor type 5 (*CXCR5*), Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 4 (*TNFSF4*)], όπως και τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού του NFκB [(όπως οι TNF-Alpha Induced Protein 3 (*TNFAIP3*), TNFAIP3- Interacting Protein 1 (*TNIP1*), Lymphotoxin- α (*LTA*), C-C motif chemokine 11 (*CCL11*)]. [26-34]. Επιπλέον, ένας πολυμορφισμός του *TNFAIP-1* (rs22310926G) συσχετίστηκε με την παρουσία λεμφώματος σε ασθενείς με σS [35]. Πρόσφατα, πολυμορφισμός (rs10774671) της 2'-5'-ολιγοαδενυλικής συνθετάσης (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, *OAS1*) συσχετίστηκε με την προδιάθεση στην ανάπτυξη σS, υποστηρίζοντας έναν εν δυνάμει ρόλο της ανεπαρκούς ικής εκθάρισης λόγω διαταραχών στην απόκριση στην IFN [36].

Πέραν της γενετικής προδιάθεσης, πιθανολογείται ότι επιγενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με τη μεθυλίωση του DNA, την ακετυλίωση ιστονών ή την έκφραση των microRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου του σS [37, 38]. Στο πλαίσιο αυτό, συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης microRNA στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, που χαρακτηρίζεται από μείωση της έκφρασης των miR-574 και miR-17-92 και αύξηση της έκφρασης των miR-768-3p και miR-150, έχει συσχετισθεί με τη νόσο [39, 40].

Στο παρελθόν, λοιμώξεις έχουν πιθανολογηθεί ως παράγοντες επαγωγής του σS. Η υπερέκφραση της IFN τύπου 1 και των γονιδίων που επάγονται από την IFN τύπου 1, όπως *ISGF3G* (Interferon stimulated transcription factor 3γ: μεταγραφικός παράγοντας 3γ που επάγεται από την IFN) και *IFITM1* (IFN-induced transmembrane proteins 1: διαμεμβρανικές πρωτεΐνες IFITM1 που επάγονται από την IFN) [41, 42], υποδεικνύουν την συμμετοχή ιογενούς λοίμωξης στην παθογένεση του σS. Λοιμώξεις από ορισμένους ιούς, όπως ο HCV ή ο HIV, συσχετίζονται με την ανάπτυξη χρόνιας σιελαδενίτιδας που μιμείται το σS, αλλά δεν χαρακτηρίζεται από παραγωγή αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB αντισωμάτων και δεν προσβάλλει κατεξοχήν γυναίκες [43, 44]. Πολλοί ιοί, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός Epstein-Barr (EBV), ρετροϊκά στοιχεία, ο ανθρώπινος ιός του έρπητα τύπων 6 (HHV-6), και 8 (HHV-8), ο ανθρώπινος T λεμφοτροπικός ιός τύπου I (HTLV-1) και ιών coxsackie έχουν ανιχνευθεί στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS [45-54].

Η μεγάλη υπεροχή που παρατηρείται στη συχνότητα εμφάνισης του σS στις γυναίκες υποδεικνύει την παρουσία φυλο-ειδικών προδιαθεσικών παραγόντων. Φαίνεται ότι έλλειψη οιστρογόνων προδιαθέτει για την ασθένεια. Αυτό υποστηρίζεται

από το γεγονός ότι στην πλειοψηφία των ασθενών η νόσος εμφανίζεται στην περιεμμηνοπαυσιακή περίοδο.

Μελέτες έχουν ανιχνεύσει υποδοχείς οιστρογόνων στους σιελογόνους αδένες και σε καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα από σιελογόνους αδένες ασθενών με σS [55-57]. Τα επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων ασθενών με σS παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη απάντηση στην δράση της 17β-οιστραδιόλης σε σχέση με τους μάρτυρες, υποδηλώνοντας μια διαταραχή στην ανοσορυθμιστική δράση των οιστρογόνων στα επιθήλια των ασθενών με σS [58].

1.1. 2. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων στο σύνδρομο Sjögren

Πολλαπλές μελέτες μη νεοπλαστικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών που προέρχονται από ασθενείς με σS έχουν υποδείξει ότι τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν «ενδογενή ενεργοποίηση» που συσχετίζεται με την διαταραγμένη έκφραση και λειτουργία πολλαπλών μορίων και σηματοδοτικών μονοπατιών [59-61]. Οι παράγοντες που προκαλούν την ενεργοποίηση του επιθηλίου δεν είναι γνωστοί. Όπως προαναφέρθηκε, εδώ και πολύ καιρό πιθανολογείται ότι λανθάνουσες ιογενείς λοιμώξεις ανήκουν σε αυτούς.

Ιστολογικά, οι ασθενείς με σS εμφανίζουν στους σιελογόνους αδένες την έτσι λεγόμενη λεμφοεπιθηλιακή σιαλαδενίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από περιτορικές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις που περιβάλλουν και διεισδύουν στους αδενικούς πόρους [62]. Οι βλάβες αυτές προκαλούν την δυσλειτουργία ή και την καταστροφή των επιθηλίων των αδένων, γεγονός για το οποίο το σS έχει προταθεί να ονομάζεται αυτοάνοση επιθηλίτιδα [63]. Δεδομένου ότι στους ασθενείς διαπιστώνονται περιτορικές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις σε ποικίλλα όργανα, υποδεικνύει ότι το επιθήλιο αποτελεί βασικό παράγοντα στην παθογένεια της νόσου.

Τα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων είναι κατάλληλα εξοπλισμένα ώστε να μπορούν να αλληλοεπιδρούν με τα ανοσοκύτταρα και να συμμετέχουν στη ρύθμιση των τοπικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν πληθώρα ανοσορυθμιστικών μορίων που εμπλέκονται τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία (Πίνακας 1) [64]. Στην πρώτη περίπτωση εμπλέκονται μόρια όπως οι υποδοχείς TLRs (Toll-like receptors) και ο υποδοχέας CD91, ενώ στη δεύτερη μόρια που συμμετέχουν στην παρουσίαση αντιγόνων και συνδιέγερση των T-λεμφοκυττάρων, καθώς και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, -6, και -8; TNF-α; adiponectin), κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων (BAFF, B cell activating factor) και T-λεμφοκυττάρων (IL-6, ICOSL), καθώς και χημειοκίνες με ρόλο στην προσέλκυση των B- και T-λεμφοκυττάρων και τον σχηματισμό βλαστικών κέντρων.

Πίνακας 1. [64]

Ανοσολογική δράση		Ανοσορυθμιστικά μόρια
Έμφυτη ανοσία	Toll-like receptors	TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-9, CD91
Homing ανοσοκυττάρων	Προσκόλληση	ICAM-1/CD54, VCAM/CD106, E-selectin
Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων	Αντιγονο-παρουσίαση	MHC class-I (HLA-ABC) MHC class-II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ)
	Συνδιέγερση	B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) PD-L1 ^[11] _{SEP} ICOS-L CD40
Επιβίωση, ωρίμανση και διαφοροποίηση B-λεμφοκυττάρων		B-cell activating factor (BAFF) CD40
Διαφοροποίηση μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων		GM-CSF
Κοκκιοκύτταρα		G-CSF
Ανάπτυξη και οργάνωση των διηθήσεων	Κυταροκίνες	IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , IFNs, IL-18 (pro-active), BAFF, adiponectin, leptin, GM-CSF, G-CSF
	Χημειοκίνες	CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , IL-8, CCL5/RANTES, CCL20/LARC, STCP-1/MDC, CXCL-9/Mig, CXCL-10/IP-10, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCR3, CCL17/TARC, CCL19/ELC CCL21/SLC/TCA
Παρουσίαση των ενδοκυτταρίων αυτο-αντιγόνων	Απόπτωση	Fas, FasL
	Εξωσωμάτια	MHC, cytokeratins, Ro/SSA, La/SSB, Sm

Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων ασθενών με σS έχουν υποδοχείς οιστρογόνων των οποίων η έκφραση είναι παρόμοια με εκείνων των μαρτύρων [55-57]. Ωστόσο, τα επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων ασθενών με σS παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη απάντηση στην δράση της 17β-οιστραδιόλης σε σχέση με τους μάρτυρες, υποδηλώνοντας μια διαταραχή στην ανοσορρυθμιστική δράση των οιστρογόνων στα επιθήλια των ασθενών αυτών [58].

Για τον "φαινότυπο ενεργοποίησης" των επιθηλιακών κυττάρων των σιελογόνων αδένων ασθενών με σS είναι δυνατόν να εμπλέκεται και μια επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι τα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των επιθηλιακών κυττάρων στις βλάβες των ελλάσσονων σιελογόνων αδένων είναι σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς με σS σε σύγκριση με τους μάρτυρες, και τα επίπεδα αυτά συσχετίζονται αρνητικά με τη σοβαρότητα της λεμφοκυτταρικής διήθησης [65]. Αντίστοιχα, έχει περιγραφεί μια υπομεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *SSB* τόσο *in situ* στους σιελογόνους αδένες όσο και *in vitro* σε μακροχρόνια καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα από ασθενείς με θετικά αντι-La/*SSB* αντισώματα, η οποία συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση του La/*SSB* [65]. Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε διαταραχές της μεθυλίωσης σε γονίδια που ρυθμίζονται από την ιντερφερόνη, του μονοπατιού του ασβεστίου (υπομεθυλίωση), και του μονοπατιού του Wnt (υπερμεθυλίωση) [37].

Τα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με σS έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν ενδοκυττάρια αυτοαντιγόνα μέσω δύο μηχανισμών: α) την αυξημένη *in-situ* απόπτωση και απελευθέρωση ενδογενών νουκλεϊκών οξέων και αυτοαντιγόνων μέσω των αποπτωτικών κυστιδίων (apoptotic blebs) [66], και β) την έκκριση εξωσωματίων (exosomes που απελευθερώνονται αυθόρμητα και περιέχουν τα αυτοαντιγόνα Ro/*SSA*, La/*SSB* και Sm) [67]. Η αυθόρμητη αυξημένη έκφραση αντι-αποπτωτικών μορίων, όπως η c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) φαίνεται να αποτελεί έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό για την διόρθωση των ιστών [68].

Εκτός από την «ενδογενή» ενεργοποίηση, τα χαρακτηριστικά των επιθηλιακών κυττάρων των ασθενών με σS ρυθμίζονται περαιτέρω από παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος των φλεγμονωδών αλλοιώσεων στους σιελογόνους αδένες των ασθενών, όπως η διέγερση από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή παθογόνους παράγοντες. Έτσι, η διέγερση με την IFNγ ή μέσω των υποδοχέων TLR3 έχει δείχθει ότι οδηγεί στην περαιτέρω έκφραση κυτταροκινών (όπως ιντερφερόνη τύπου 1 και

BAFF) [69, 70] και ανοσο-ρυθμιστικών μορίων (όπως MHC-I, CD54/ICAM-1, CD40, and CD95/Fas) [71]. Επιπλέον, η σηματοδότηση μέσω TLR3 επάγει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω apoikis [72] και αυξάνει την έκφραση των αυτοαντιγόνων Ro/SSA and La/SSB στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων ασθενών με σS [70]. Επιπλέον, τα B-λεμφοκύτταρα επάγουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των σιελογόνων αδένων μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης PKCδ [73]. Επίσης, τα B-λεμφοκύτταρα έχουν συσχετιστεί με την υπομεθλίωση στο επίπεδο των επιθηλιακών κυττάρων σιελογόνων αδένων ασθενών με σS [74], ενώ εξωσωμάτια προερχόμενα είναι δυνατόν να επηρεάζουν την σηματοδότηση ασβεστίου και την εκκριτική λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων [75]. Τα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να συμβάλουν στην παθογένεια του σS και μέσω εμπλοκής τους στην αγγειογένεση. Έτσι, τα επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων μετά από διέγερση με αντι-Ro αυτοαντισώματα μπορούν να παράγουν προ-αγγειογόνους παράγοντες όπως οι VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) και TACE (tumor necrosis factor α (TNF-α)-converting enzyme) [76].

1.1.3. Τα χαρακτηριστικά των λεμφοκυτταρικών διηθήσεων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS

Το ιστολογικό χαρακτηριστικό των σιελογόνων αδένων ασθενών με σS είναι οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις που περιβάλλουν και διεισδύουν στους αδενικούς πόρους [62]. Οι διηθήσεις αυτές παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια σε ότι αφορά την σοβαρότητα και την σύνθεσή τους, καθώς και τις βιολογικές και λειτουργικές συνέπειες της παρουσίας τους στον αδένα. Είναι εξελισσόμενες [77] και η σύσταση τους εξαρτάται από την σοβαρότητα των βλαβών. Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα επικρατούν σε ήπιες αλλοιώσεις και φέρουν τον φαινότυπο των κυττάρων μνήμης CD45 RO [78], ενώ τα B-λεμφοκύτταρα αποτελούν τον κύριο τύπο κυττάρων που παρατηρείται σε προχωρημένες αλλοιώσεις [79]. Οι σοβαρές αλλοιώσεις είναι δυνατόν να οργανωθούν σε δομές προσομοιάζουσες με λεμφοειδείς ιστούς (lymphoid-like) με βλαστικά κέντρα. Έκτοπα βλαστικά κέντρα παρατηρούνται στους σιελογόνους αδένες του 20-40% των ασθενών [80-84] και αποτελούνται από T- και B-λεμφοκύτταρα σε ένα δίκτυο θυλακωδών δενδριτικών και ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι δομές αυτές φαίνεται να παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου μέσω παραγωγής αυτο-αντισωμάτων, π.χ. αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB [80]. Στην πλειοψηφία των ασθενών η εξέλιξη αυτή είναι αργή. Ωστόσο, σε

μια υποομάδα ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες, οι διηθήσεις εξελίσσονται και αναπτύσσεται λέμφωμα NHL, κυρίως τύπου MALT. Η εξέλιξη αυτή δεν συνοδεύεται από αλλαγές στον βαθμό και τον τύπο των διηθούντων μονοκυττάρων [85].

1.1.3.1. T-λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα είναι ενεργοποιημένα και εκφράζουν αντιγόνα επιφάνειας του MHC II και διάφορα μόρια προσκόλλησης (LFA1, CD2/LFA2, CD58/LFA3, CD54/ICAM.1, CD154/CD40L), εκκρίνοντας μεγάλες ποσότητες ιντερλευκίνης-2 (IL-2) και IFN γ [78, 86-89].

Τα T-λεμφοκύτταρα θεωρείται ότι συμμετέχουν στην επαγωγή αδενικής βλάβης μέσω της παραγωγής διαλυτών μεσολαβητών όπως κυτταροκινών και νιτρικού οξέος καθώς επίσης μέσω απευθείας κυτταροτοξικών μηχανισμών συμπεριλαμβανόμενων των θρυμματινών (granzymes) [90-96]. Η IFN γ ενισχύει την παραγωγή και απελευθέρωση στοιχείων του συστήματος ενεργοποίησης πλασμινογόνου, προκαλώντας επακόλουθη βλάβη στους ιστούς [97].

Έξι τύποι T-λεμφοκυττάρων έχουν περιγραφεί στις λεμφοκυτταρικές διηθήσεις ελάσσονων σιελογόνων αδένων ασθενών με σS, τα βοηθητικά Th1, Th2, Th17 και Thf, τα ρυθμιστικά Tregs και τα διπλά αρνητικά T0.

Μολονότι τα **CD4+ T-λεμφοκύτταρα** μπορούν να παράγουν κυτταροκίνες τόσο τύπου Th1 όσο και Th2, πολλές μελέτες έχουν δείξει την υπερέκφραση των Th1 κυτταροκινών σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών [92, 98]. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα IL-1 β , IL-6, TNF α και IFN γ έχουν βρεθεί στο σάλιο ασθενών σε σύγκριση με τα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών στο σάλιο υγιών μαρτύρων. Έχει προταθεί λοιπόν ότι υπάρχει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ των δύο τύπων κυτταροκινών και ότι η Th1 απόκριση υπερισχύει στους σιελογόνους αδένες με υψηλό βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης [99].

Τα λεμφοκύτταρα Th17, που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή κυτταροκινών της οικογένειας IL-17, έχουν βρεθεί σε μεγάλους αριθμούς στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, ιδιαίτερα σε προχωρημένες βλάβες [100]. Εντοπίστηκαν επίσης αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της IL-22, παράγοντας κυρίως των Th17 λεμφοκυττάρων και μιάς υποομάδας NK κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα NKp44 [101]. Επιπλέον, τόσο η IL-7, κυτταροκίνη με ρόλο στην Th17 πόλωση, όσο και τα T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα IL-7Ra ήταν

αυξημένα στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS και τα επίπεδα τους συσχετίστηκαν με τον βαθμό της φλεγμονής [102]. Τέλος, η IL-21, ισχυρός επαγωγέας και προϊόν των Th17 [103], αλλά και μεσολαβητής κλειδί στην διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων με ρόλο στην δημιουργία βλαστικών κέντρων, εντοπίστηκε στα διηθούντα CXCR5+ T-λεμφοκύτταρα σιελογόνων αδένων και τον ορό των ασθενών με σS. Επιπλέον, τα επίπεδα IL-21 ορού συσχετίστηκαν με τα επίπεδα των σφαιρινών, των IgG και των αυτο-αντισωμάτων αντι-Ro/SSA. Η IL-21 παράγεται και από ένα άλλο τύπο T-λεμφοκυττάρων, τα **T-βοηθητικά θυλακικά λεμφοκύτταρα (T helper follicular, Tfh)** τα οποία παίζουν κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων σε λεμφοειδείς δομές και χαρακτηρίζονται από την έκφραση των μορίων CD4, CXCR5, ICOS και Bcl-6. Tfh λεμφοκύτταρα Bcl-6+, IL-21+, CXCR5+ εντοπίστηκαν μέσα και γύρω από τα έκτοπα βλαστικά κέντρα σιελογόνων αδένων ασθενών με σS [104]. Επιπλέον, μόρια που σχετίζονται με τα Th2 και τα Tfh λεμφοκύτταρα εντοπίστηκαν κυρίως στις σοβαρές διηθήσεις σιελογόνων ασθενών με σS και με έκτοπα βλαστικά κέντρα, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα των Th1 και Th17 λεμφοκυττάρων τα οποία υπερίσχυαν στις διηθήσεις χωρίς βλαστικά κέντρα [104].

Τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Tregs) χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μορίου Foxp3 και θεωρούνται ότι έχουν ανασταλτική δράση προς αυτή των Th17 λεμφοκυττάρων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αυτοανοσίας. Το ποσοστό των Tregs από τα διηθούντα μονοπύρρηνα κύτταρα συσχετίστηκε με τον βαθμό φλεγμονής και ορισμένους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφώματος. Ωστόσο, το ποσοστό των Foxp3+ T-λεμφοκυττάρων από τα CD3+ **T-λεμφοκύτταρα (Foxp3+/CD3+)** ήταν αυξημένο μόνο σε ενδιάμεσης σοβαρότητας διηθήσεις. Έχει προταθεί ότι σε μέτριες βλάβες, τα Tregs εμποδίζουν την υπερβολική ανάπτυξη των Th17 λεμφοκυττάρων, σε αντίθεση με τις σοβαρές βλάβες όπου αποτυγχάνουν [105]. Ωστόσο, οι ασθενείς με σS παρουσιάζουν φυσιολογικά λειτουργικά Tregs [106]. Επιπλέον, ένας υπότυπος T-ρρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, τα **CD4(+)CD25(low)GITR(+)** T-λεμφοκύτταρα, έχει περιγραφεί στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, υπότυπος ο οποίος είναι αυξημένος στο περιφερικό αίμα ασθενών με μη ενεργή νόσο [107].

T-λεμφοκύτταρα (CD3+CD4-CD8-) διπλά αρνητικά (double negative, DN) που εκφράζουν τον υποδοχέα ROR-γτ (RAR-related orphan receptor-γτ) και είναι σημαντικοί παραγωγοί της IL-17 εντοπίστηκαν στους σιελογόνους αδένες και στο

περιφερικό αίμα ασθενών με σS. Το ποσοστό των αβ-TCR+ DN T-λεμφοκυττάρων από τα μονοκύτταρα στο περιφερικό αίμα συσχετίστηκε θετικά με την ενεργότητα της νόσου. Επιπλέον, τα DN T-λεμφοκύτταρα των ασθενών, σε αντίθεση με αυτά των υγιών μαρτύρων, ήταν ανθεκτικά στη δράση της δεξαμεθαζόνης σε ότι αφορά την παραγωγή της IL-17 [108]. Ο αριθμός των DN T-λεμφοκυττάρων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό προσβολής του αδένα, την παρουσία των βλαστικών κέντρων και τα συμπτώματα ξηρότητας ενώ συσχετίστηκαν αρνητικά με τον αριθμό κυκλοφορούντων DN T-λεμφοκυττάρων, υποδηλώνοντας έναν ενεργό τους ρόλο στους παθογενετικούς μηχανισμούς της αδενικής δυσλειτουργίας και βλαβών αλλά και στην ανάπτυξη έκτοπης λεμφονεογέννησης [91].

1.1.3.2. B-λεμφοκύτταρα

Τα B-λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία των αυτοαντισωμάτων, των κρυοσφαιρινών, της υπεργαμμασφαιριναιμίας και του αυξημένου ρίσκου ανάπτυξης B λεμφωμάτων [109]. Αποτελούν τα κύρια συστατικά των προηγμένων ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS. Οι λεμφοκυτταρικές βλάβες σιελογόνων αδένων ασθενών με σS χαρακτηρίζονται από την παρουσία τόσο ολιγοκλωνικών όσο και μονοκλωνικών B-λεμφοκυττάρων. Αυτοαντιδραστικοί κλώνοι B-λεμφοκυττάρων με δράση ρευματοειδούς παράγοντα (RF) και αντίδραση αντι-Ro (SSA) ή/και αντι-La (SSB) έχουν περιγραφεί στους σιελογόνους αδένες ασθενών.. Επιπλέον, τα πλάσματοκύτταρα που παράγουν IgA έχουν αντικατασταθεί από πλάσματοκύτταρα που παράγουν IgG and IgM. [110][[80, 111-115].

Οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις οργανώνονται σε δόμες που προσομοιάζουν τα έκτοπα βλαστικά κέντρα στους σιελογόνους αδένες στο 20-40% των ασθενών με σS [80-84]. Ωστόσο, μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών των συσσωματωμάτων των B-λεμφοκυττάρων εκφράζουν το ένζυμο AID (Activation-Induced Cytidine Deaminase), και αποτελούν επομένως πραγματικά βλαστικά κέντρα. Τα περισσότερα από αυτά τα συσσωματώματα αποτελούνται από μεταβατικά B-λεμφοκύτταρα τύπου 2 και B-λεμφοκύτταρα που προσομοιάζουν αυτά της οριακής ζώνης τα οποία δεν εκφράζουν AID. Ωστόσο, και οι δύο τύποι συσσωματωμάτων B-λεμφοκυττάρων περιλαμβάνουν αυτο-αντιδραστικά B λεμφοκύτταρα [35, 116]. Αυτό το γεγονός μαζί με τον προγνωστικό ρόλο της παρουσίας των βλαστικών κέντρων στην ανάπτυξη του

λεμφώματος [117] υποδεικνύουν ότι διαδικασίες που λάμβανουν χώρο στα έκτοπα βλαστικά κέντρα είναι δυνατόν να συμμετέχουν στην λεμφωματογένεση.

Επιπλέον, ανωμαλίες σε ότι αφορά τους υποπληθυσμούς των B-λεμφοκυττάρων έχουν περιγραφεί στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS. **B-λεμφοκύτταρα μνήμης** CD27⁺ έχοντας χαρακτηριστικά παρόμοια με τα μεταβατικά B-λεμφοκύτταρα τύπου 2 και τα B-λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης, καθώς και **Bm5 B-λεμφοκύτταρα** συσσωρεύονται στις διηθήσεις σιελογόνων αδένων, ενώ βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο περιφερικό αίμα [118-120]. Ένα αυξημένο ποσοστό των CD27⁺ B-λεμφοκυττάρων είναι IgM CD27⁺ B-λεμφοκύτταρα μνήμης [121]. Ωστόσο, τα επίπεδα B-λεμφοκυττάρων μνήμης CD27⁺ είναι χαμηλά σε σχέση με τα επίπεδα τόσο των πλασματοβλαστών όσο και των πλασματοκυττάρων, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση τους σε πλασματοκύτταρα [122]. Τα B-λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, σε αντίθεση με τα B-λεμφοκύτταρα βλαστικών κέντρων, εκφράζουν το μόριο TLR9, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να επιτρέπει την επιβίωση αυτών των κυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα μια αυξημένη παραγωγή αυτο-αντισωμάτων [116].

1.1.4. Τα κλασικά αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjögren

1.1.4.1. Μακροφάγα

Μακροφάγα έχουν ταυτοποιηθεί στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες ασθενών με σS με χρήση διαφόρων δεικτών και αποτελούν <12% των διηθούντων κυττάρων [87, 123-126]. Μελέτες μεταγενέστερες της πρώτης εργασίας αυτής της διατριβής έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης διηθούντων μακροφάγων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS συσχετίζεται θετικά με τον βαθμό της λεμφοκυτταρικής βλάβης [79]. Τα μακροφάγα σε σιελογόνους αδένες ασθενών εκφράζουν μόρια όπως τα COX-1 [127], BAFF [128], E-cadherin [129], CHI3L1 (chitinase-3-like-1) [130] και ιντερλευκίνη-18 [84]. Επιπλέον, οι σιελογόνοι αδένες με σοβαρές βλάβες παρουσιάζουν υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τα μακροφάγα, κυρίως των *CHIT1* (chitinase-1) και *CHI3L1* (chitinase-3-like-1) αλλά και της CCL18 (PARC) [131]. Ένας φαινοτυπικός διαχωρισμός των μακροφάγων δεν ήταν εφικτός, καθώς υπερέκφραζονται γονίδια που χαρακτηρίζουν τόσο τα **κλασικά M1** (MMP12,

CXCL10, IL-12, IL-18) όσο και τα **εναλλακτικά M2** (CD163, CCL22, IL-21R, Grnmb και EMR2) **ενεργοποιημένα μακροφάγα** [131].

Τα μακροφάγα σιελογόνων αδένων ασθενών με σS μπορούν να συμμετέχουν στην καταστροφή των επιθηλιακών ιστών μέσω μεταλλοπρωτεασών και της τοπικής ενεργοποίησης του άξονα πλασμίνης [97]. Αξιοσημείωτο, σε ασθενείς με σS έχουν περιγραφεί διαταραχές της απομάκρυνσης των αποπτωτικών κυττάρων με φαγοκυττάρωση (efferocytosis) από τα μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος [132, 133]. Επιπλέον, αντισώματα αντι-SR-A (anti-scavenger receptor A) εντοπίστηκαν στον ορό του 12% από 25 ασθενείς με σS, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο τους στην διάσπαση της αυτο-ανοχής και στην παθογένεια της νόσου [134].

1.1.4.2. Δενδριτικά κύτταρα

Διάφοροι πληθυσμοί δενδριτικών κυττάρων έχουν περιγραφεί στους ασθενείς με σS χρησιμοποιώντας διαφορετικούς δείκτες για την ταυτοποίησή τους, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ερμηνεία των διαθέσιμων δεδομένων. Ωστόσο, οι υπάρχουσες μελέτες υποδηλώνουν έναν σημαντικό ρόλο των δενδριτικών κυττάρων στο σS.

Θυλακώδη δενδριτικά κύτταρα περιγράφηκαν στις φλεγμονώδεις διηθήσεις στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες [82, 135], τόσο με μορφή δικτύου αποτελούμενο από **κύτταρα CD35+ CD21+** στα έκτοπα βλαστικά κέντρα όσο και ως διάσπαρτα κύτταρα CD35+ στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες χωρίς βλαστικά κέντρα [80, 135]. Εκφράζουν τα μόρια CD35, CD11c και CD106 (VCAM-1) με έναν τρόπο παρόμοιο με αυτόν των θυλακωδών δενδριτικών κυττάρων στις αμυγδαλές. Αντιθέτως, δεν εκφράζουν ούτε CD14 ούτε CD11b [82], γεγονός που είναι δυνατόν να υποδεικνύει ότι είναι πιο ώριμα και παρουσιάζουν αποτελεσματικότερες βοηθητικές λειτουργίες ή ότι δεν είναι μυελοειδούς προέλευσης [82]. Ο υπότυπος **Fascin+ των θυλακωδών δενδριτικών κυττάρων** έχει περιγραφεί να σχηματίζει συσσωματώματα γύρω από τα αγγεία, συνήθως στην περιφέρεια των διηθήσεων αλλά και σε σοβαρές βλάβες και στα έκτοπα βλαστικά κέντρα [79].

Επιπλέον, έχει περιγραφεί διήθηση με **S100+ διαπλεκόμενα** (interdigitating) **δενδριτικά κύτταρα** (IDCs) και **CD11c+ fascin+ κλασικά δενδριτικά κύτταρα**, τα οποία εντοπίζονται κυρίως ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων [79, 136]. Κλασικά δενδριτικά κύτταρα που ανιχνεύθηκαν με χρώση είτε για CD1a (DC CD1a+) είτε για την ειδική λυσοσωμική μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη LAMP (DC

LAMP+) περιγράφηκαν γύρω από τις επιθηλιακές δομές κυρίως μέσα στις λεμφοκυτταρικές διηθήσεις [137].

Από τους διάφορους υπότυπους δένδριτικών κυττάρων, τα πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα (plasmacytoid dendritic cells, pDCs), ισχυροί παραγωγοί της IFN-α, έχουν μελετηθεί πιο συστηματικά. Πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα CD123+, BDCA2+ και TLR9+ εντοπίστηκαν στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σS, αλλά όχι σε αυτούς των μαρτύρων [42]. Μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν από το περιφερικό αίμα στους σιελογόνους αδένες [138-141]. Τα πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σS φαίνεται να είναι ενεργοποιημένα και η ενεργοποίησή τους συσχετίζεται με την παρουσία ενός αποτυπώματος IFN τύπου I, υποδεικνύοντας μια σύνδεση μεταξύ της ενεργοποίησης των πλασματοκυτταρικών δένδριτικών κυττάρων και της παραγωγής IFN τύπου I [139]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το αποπτωτικό ή το νεκρωτικό υλικό, σε συνδυασμό με τον ορό των ασθενών με αυτό-αντισώματα αντι-Ro/SSA ή αντι-La/SSB, είναι δυνατόν να ενεργοποιήσει τα πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα για να παραγάγει IFN-α [142]. Έτσι, τα πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή IFN-α και στην επακόλουθη ενεργοποίηση αρκετών φλεγμονωδών οδών. Οι ιοί, που έχουν προταθεί να παίζουν έναν ρόλο στην παθογένεση του σS, διεγείρουν τους TLRs και επάγουν την παραγωγή IFN-α, οδηγώντας στην απόπτωση και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων ενάντια στο απόπτωτικό υλικό [143]. Αυτή η αύξηση της IFN τύπου I έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω πρόσληψη των πλασματοκυτταρικών δένδριτικών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν IFN-α, οδηγώντας στην παραμονή ενός ενεργοποιημένου συστήματος IFN τύπου I το οποίο θα μπορούσε στην συνέχεια να προκαλέσει το σS. Πρόσφατα αναφέρθηκε η συσχέτιση μεταξύ των πλασματοκυτταρικών δένδριτικών κυττάρων, της διήθησης από τα B-λεμφοκύτταρα και των μακροφάγων που παράγουν CXCL13, υποδηλώνοντας ότι το ενεργοποιημένα πλασματοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην πρόσληψη B λεμφοκυττάρων μέσω της παραγωγής CXCL13 από μακροφάγα [144].

Αναφορικά με τα **μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα** υπάρχουν λίγες μελέτες. Οι Ozaki et al. (Ozaki, Amakawa et al. 2001) διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με σS είχαν χαμηλό αριθμό μυελοειδών δένδριτικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, ενώ στους σιελογόνους αδένες ανιχνεύθηκαν διάσπαρτα διηθούμενα δένδριτικά κύτταρα fascin+, CD11c+. L25+ (interdigitating) και CD83+ (ώριμα) δένδριτικά κύτταρα βρέθηκαν

διάχυτα κατανεμημένα στο παρέγχυμα αλλά και στην λεμφοκυτταρική διήθηση σε σχεδόν όλους τους ελλάσονες σιελογόνους αδένες που μελετήθηκαν. Δενδριτικά κύτταρα CD1a+ βρέθηκαν ειδικά στους ελλάσονες σιελογόνους αδένες με εστιακή λεμφοκυτταρική διήθηση [145]. Επίσης, κύτταρα Langerhans, τα οποία θεωρούνται ανώριμες μορφές των αντιγονο-παρουσιαστικών μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων, έχουν βρεθεί ανάμεσα στα μονοπύρρηνα κύτταρα στους ελλάσονες σιελογόνους αδένες ενός ασθενή με σS [146]. Σε μια άλλη μελέτη ανιχνεύτηκαν δενδριτικά κύτταρα DRC+ αποκλειστικά στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σS, κυρίως περίξ των αδενοκυψελών (periacinar) και περιπορικά, κοντά σε μεγάλες λεμφοκυτταρικές διηθήσεις με CD4+ [96]. Τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα ασθενών με σS είναι φαινοτυπικά παρόμοια σε ότι αφορά την έκφραση μορίων CD86, CD80, CD40 or CD83 και έχουν συγκρίσιμη ικανότητα επεξεργασίας αντιγόνου (antigen processing) με τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα υγιών μαρτύρων, αν και εκφράζουν υψηλότερες ποσότητες επιφανειακών μορίων HLA-DR και CCR7, που αποτελεί ένδειξη ενεργοποίησης. Επιπλέον, παράγουν υψηλά επίπεδα κυτταροκινών IL-12p40, TNFα, MIP-1α αλλά χαμηλά επίπεδα IL-7 και IFNγ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Η αυξημένη έκκριση της IL-12p40 συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση του μορίου RelB. Επιπλέον, τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα ασθενών με pSS που επωάστηκαν με έναν προσδέτη TLR7/8 εξέφρασαν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση *STAT1* σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες [147]. Συνολικά, ενώ τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα ασθενών με σS παρουσιάζουν μοριακά χαρακτηριστικά ενεργοποιημένων δενδριτικών κυττάρων, η λειτουργία τους όσον αφορά την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα είναι συγκρίσιμη με αυτή της ίδιας κατηγορίας δενδριτικών των υγιών μαρτύρων.

Όσον αφορά τη δυνατότητα επαγωγής ανοσοανοχής (tolerogenic activity) των δενδριτικών κυττάρων που προέρχονται από μονοκύτταρα ασθενών με σS, φαίνεται να έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τις ανοσοαποκρίσεις των T-λεμφοκυττάρων ειδικές για τα αντιγόνα Ro/La, παρατηρήσεις που υποδεικνύουν ότι τα «tolerogenic» δενδριτικά κύτταρα θα μπορούσαν πιθανά να αποτελέσουν μια θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς με σS και θετικά αυτο-αντισώματα [148].

1.1.5. Οι κυτταροκίνες στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS

Τα διηθούντα λεμφοκύτταρα των σιελογόνων αδένων ασθενών με σS εκφράζουν κυτταροκίνες τόσο τύπου 1 (Th1) όσο και τύπου 2 (Th2) [92, 94, 99, 149-152].

Ανοσοϊστοχημικές και *in situ* μελέτες υβριδισμού στις βιοψίες σιελογόνων αδένων έδειξαν σε διηθήσεις μονοπύρηνων κυττάρων και στο επιθήλιο την παρουσία των φλεγμονωδών κυτταροκινών ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και ιντερλευκίνης-6 (IL-6) [92, 94, 95, 152-154]. Τόσο ο TNF όσο και ο υποδοχέας του TNF (TNFR) ανιχνεύτηκαν στις φλεγμονώδεις διηθήσεις, το αγγειακό ενδοθήλιο και το πορικό επιθήλιο [155]. Παρόλο που πολλές ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αποτύχει να εντοπίσουν την έκφραση της IL-2 και του υποδοχέα της IL-2R με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, μελέτες με *in situ* RNA υβριδισμός έδειξαν υψηλή έκφραση του mRNA της IL-2 και του IL-2R στα διηθούμενα λεμφοκύτταρα των ελλασόνων σιελογόνων αδένων [92]. Άλλοι ερευνητές, χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR, έχουν δείξει ότι στους σιελογόνους αδένες τα CD4+ T- λεμφοκύτταρα εκφράζουν άφθονα mRNA των IL-2, ιντερφερόνης-γ (IFNγ), IL-1α και IL-10 αλλά ελάχιστα ή καθόλου των IL-4, IL-5 και IL-13, γεγονός που υποδηλώνει τη σχετική υπερίσχυση της ανοσο-απάντησης τύπου Th1 στο σS [94, 156]. Παρ' όλα αυτά, έχει προταθεί ότι οι κυτταροκίνες της απόκρισης τύπου Th2 κυριαρχούν στην πρώιμη φάση του σS ενώ μια στροφή προς τις κυτταροκίνες τύπου Th1 σχετίζεται με την προχωρημένη λεμφοκυτταρική διήθηση σε μεταγενέστερο στάδιο της νόσου [99].

Η **IL-15** είναι μια βασική ρυθμιστική κυτταροκίνη που μοιράζεται πολλές βιολογικές ιδιότητες με την IL-2. Η IL-15 έχει περιγραφεί στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των αδένων και των πόρων [157].

Η **IL-7** είναι μια κυτταροκίνη σημαντική για την ανάπτυξη τόσο των B-λεμφοκυττάρων όσο και των T-λεμφοκυττάρων. Αυξημένα επίπεδα IL-7 εντοπίστηκαν στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, κυρίως στην περιοχή των λεμφοκυτταρικών διηθήσεων και η έκφρασή της συσχετίστηκε με παραμέτρους τοπικής και περιφερικής νόσου, ενώ επίσης βρέθηκε ότι η IL-7 διήγηρε *in vitro* την παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών με ρόλο στην προσέλκυση και διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων [158]. Σε συμφωνία με το τελευταίο, σε άλλη μελέτη ο υποδοχέας IL-7Ra εντοπίστηκε σε πολλαπλά είδη διηθούμενων κυττάρων, κυρίως όμως στα CD4+ και τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα [159].

Όσον αφορά την **IL-17**, αυξημένα επίπεδά της έχουν ανιχνευθεί τόσο στον ορό [84], όσο και στις λεμφοκυτταρικές διηθήσεις των σιελογόνων αδένων των ασθενών με σS και η έκφραση της IL-17 συσχετίστηκε με την σοβαρότητα των βλαβών [84, 160]. Ο **TGF-β**, η **IL-6** και η **IL-23**, βασικοί παράγοντες για την διαφοροποίηση των Th17

λεμφοκυττάρων, εντοπίστηκαν επίσης στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS [161]. Τα Th17 λεμφοκύτταρα παράγουν, εκτός από την IL-17, και τις κυτταροκίνες IL-21 και IL-22. Η IL-21 είναι ένας ισχυρός επαγωγέας και προϊόν των Th17 λεμφοκυττάρων [103], αλλά και μεσολαβητής κλειδί στην διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων που υποστηρίζει τη δημιουργία βλαστικών κέντρων. Η IL-21 εντοπίστηκε στα διηθούντα CXCR5+ T-λεμφοκύτταρα σιελογόνων αδένων και στον ορό των ασθενών με σS. Τα επίπεδα της IL-21 στον ορό συσχετίστηκαν με τα επίπεδα των σφαιρινών, των IgG και των αυτο-αντισωμάτων αντι-Ro/SSA [162]. Σε ότι αφορά την IL-22, αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης έχει περιγραφεί στους σιελογόνους αδένες των ασθενών, και συσχετίστηκε με τον βαθμό της φλεγμονής. Η IL-22 εκφράζεται τόσο από τα διηθούντα μονοπύρρηνα, κυρίως τα Th17 λεμφοκύτταρα και τα NK22 κύτταρα, όσο και από τα επιθηλιακά και τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα [163]. Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της IL-22 έχουν ανιχνευθεί σε ορούς ασθενών με σS και έχουν συσχετισθεί θετικά με τη μειωμένη ροή σάλιου και την παρουσία αυτο-αντισωμάτων αντι-SSA/αντί-SSB, υπεργαμμασφαιριναιμίας και ρευματοειδούς παράγοντα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα IL-22R1 και χαμηλή έκφραση του φυσικού αναστολέα της IL-22, IL-22BP, στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS και σε ασθενείς με σS και non-Hodgkin λέμφωμα (NHL), και η έκφραση αυτή φαίνεται να ρυθμίζεται από την IL-18 [164].

Ο ρόλος των **IL-18** και **IL-12** στο σS παρουσιάζεται εκτενέστερα στην παράγραφο 1.2. και 1.3., αντίστοιχα.

Η **IL-34** είναι μια κυτταροκίνη που προάγει τη διαφοροποίηση και τη βιωσιμότητα μονοκυττάρων και μακροφάγων μέσω διέγερσης του υποδοχέα του CSF-1 (colony-stimulating factor-1). Η έκφρασή της σε επίπεδο mRNA στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS βρέθηκε αυξημένη σε σχέση με τους μάρτυρες νόσου και συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση mRNA των TNF α , IL-1 β , IL-17 και IL-23p19. Εκφράζεται από τα πορικά επιθηλιακά κύτταρα και τα περιπορικά διηθούντα μονοπύρρηνα κύτταρα και η έκφραση αυτή συσχετίστηκε θετικά με την διήθηση από τα προ-φλεγμονώδη CD14+ (φωτεινά) CD16 (+) μονοκύτταρα [165].

Η **IL-33**, μέλος της οικογένειας IL-1, προάγει την παραγωγή κυτταροκινών τύπου Th2. Η έκφραση της IL-33 και του υποδοχέα της έχει βρεθεί αυξημένη στον ορό και στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS. Η IL-33 ανιχνεύτηκε με ανοσοϊστοχημεία κυρίως στα επιθηλιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η έκφραση από τα επιθηλιακά κύτταρα αυξήθηκε μετά από διέγερση με IFN γ [166].

Η **IL-37** είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας IL-1 και αποτελεί φυσικό αναστολέα της έμφυτης ανοσίας. Τα επίπεδα IL-37 στον ορό των ασθενών με σS έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, και τα επίπεδα της συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα αυτο-αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του ρευματοειδούς παράγοντα, αντι-Ro / SSA και αντι-La / SSB και των επιπέδων των IL-18 και IL-18BP [167], υποδηλώνοντας έναν ρόλο της στη ρύθμιση παθογενετικών μηχανισμών του σS.

Ο **BAFF** εκφράζεται έντονα στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS από τα διηθούντα T-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, καθώς και από ορισμένα πορικά επιθηλιακά κύτταρα [128]. Ο BAFF φάνηκε να μειώνει την απόπτωση των B-λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με σS [80, 168], υποδηλώνοντας ότι το μονοπάτι της BAFF εμπλέκεται στην επιβίωση και την κλωνική επέκταση των B-λεμφοκυττάρων στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS. Παράλληλα, αυξημένα επίπεδα BAFF έχουν βρεθεί στον ορό των ασθενών με σS [169, 170]. Επιπλέον, γενετικές παραλλαγές του BAFF και του υποδοχέα του έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο για ανάπτυξη λεμφώματος [171, 172]. Έχει εκφραστεί η υπόθεση ότι, ενώ η ενεργοποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων στις διηθήσεις των σιελογόνων αδένων ασθενών με σS ευνοεί την δημιουργία των βλαστικών κέντρων, η δράση τους περιορίζεται από τον BAFF [173]. Αξιοσημείωτο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η BAFF είναι δυνατόν να παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων ασθενών με σS, ειδικά μετά από διέγερση με IFNα [174].

Και οι τρεις τύποι **ιντερφερονών** (I, II και III) έχουν εμπλακεί στην παθογένεση του σS. Ο ρόλος της ιντερφερόνης τύπου I (type I IFN) έχει μελετηθεί εκτενώς στο σS. Στο περιφερικό αίμα ασθενών με σS, τα μονοπύρρηνα κύτταρα (PBMCs) υπερεκφράζουν γονίδια που ρυθμίζονται από την IFN τύπου I, και το επίπεδο έκφρασής τους βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με τα αντισώματα αντί-Ro/SSA και αντί-La/SSB [175]. Στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, πολυάριθμα διηθούντα κύτταρα όπως και σπάνια αδενικά λοβία εκφράζουν IFNα, σε αντίθεση με τα λίγα ή κανένα IFNα-θετικό κύτταρο στις βιοψίες μαρτύρων [142]. Η κύρια πηγή της IFNα στις διηθήσεις είναι τα pDCs, τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά από διέγερση με σύμπλοκα που περιέχουν RNA ή άλλους παράγοντες, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα είναι οι κύριοι παραγωγοί της IFNβ, η οποία ενεργοποιείται κατόπιν σηματοδότησης μέσω TLR3 [142]. Οι IFN τύπου I ασκούν διάφορες βιολογικές λειτουργίες στα ανοσοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των B-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, NK

κυττάρων και T-λεμφοκυττάρων. Το πρότυπο έκφρασης των ιντερφερονών στους σιελογόνους αδένες ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς με σS, και είναι δυνατόν να διακριθεί σε επικρατούσα IFN τύπου I, επικρατούσα IFN τύπου II και μικτή IFN τύπου I και II [176]. Οι ασθενείς με σS χαρακτηρίζονται από ένα αποτύπωμα IFN τύπου I (interferon signature) στο περιφερικό αίμα, σε αντίθεση με το αποτύπωμα IFN τύπου II στις βιοψίες σιελογόνων αδένων. Επιπλέον, η συνύπαρξη χαμηλής έκφρασης IFN α αλλά υψηλής έκφρασης IFN γ σε επίπεδο mRNA στους σιελογόνους αδένες συσχετίστηκε με την παρουσία λεμφώματος σε αυτούς τους ασθενείς, λόγος για τον οποίο το κλάσμα έκφρασης mRNA IFN γ /IFN α έχει προταθεί ως νέος βιολογικός δείκτης στη διάγνωση λεμφώματος NHL στους ασθενείς με σS [177]. Επιπλέον, η IFN τύπου III εκφράζεται επίσης στους ελλάσσονες σιελογόνους αδένες ασθενών με σS κατά έναν παρόμοιο τρόπο με την IFN τύπου I. Παράλληλα, τα καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα σιελογόνων αδένων εκφράζουν IFN τύπου III μόνο μετά από διέγερση μέσω TLR3, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της από τα επιθηλιακά *in-situ* τους έκφραση είναι δυνατόν να αποδοθεί στο μικροπεριβάλλον [178].

1.1.6. Λεμφική υπερπλασία και νεοπλασία στο σύνδρομο Sjögren

Λέμφωμα μη-Hodgkin (NHL) αναπτύσσεται σε περίπου 5% των ασθενών με σS [179]. Ο κίνδυνος εμφάνισης του λεμφώματος NHL σε ασθενείς με σS έχει εκτιμηθεί ότι είναι 7 με 20 φορές υψηλότερο σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό [180-186]. Επιπλέον, έχει περιγραφεί ότι ο κίνδυνος εκδήλωσης λεμφώματος αυξάνεται με την διάρκεια της ασθένειας, με ένα συσσωρευτικό κίνδυνο 3.4% στα 5 έτη και 9.8% στα 15 έτη από την στιγμή της διάγνωσης [183]. Έχει προταθεί ότι στους άρρενες ασθενείς υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης λεμφώματος αλλά τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά [187, 188].

Τα λεμφώματα που απαντώνται σε ασθενείς με σS προέρχονται κατά κύριο λόγο από B-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν IgMκ στο κυτταρόπλασμά τους [22, 189-192]. Έχειδειχθεί ότι τα IgMκ, που παράγονται από τα λεμφωματώδη B-λεμφοκύτταρα ασθενών με σS και λέμφωμα των σιελογόνων αδένων, έχουν ενεργότητα RF [193]. Επιπλέον, οι Bende et al. [194] έδειξαν ότι το 41% των λεμφωμάτων MALT που εμφανίζονται στους σιελογόνους αδένες εκφράζουν υποδοχείς B-λεμφοκυττάρων (B cell antigen receptors, BCR) με CDR3 (complementarity determining region 3) με ισχυρή ομολογία με το RF. Πάντως, οι RF που εκφράζονται συχνά σε λεμφώματα τύπου MALT είναι σπάνιοι στους σιελογόνους αδένες χείλους των ασθενών με σS [195].

Για την αποτελεσματική διέγερση των RF+ B-λεμφοκυττάρων φαίνεται να απαιτούνται ανοσοσυμπλέγματα, και όχι μόνο IgG [196, 197]. Στους ασθενείς με σS, τα Ro/SSA και La/SSB είναι τα κυρίως αντιγόνα που επάγουν την χρόνια διέγερση των B-λεμφοκυττάρων με παραγωγή αντισωμάτων αντι-Ro/SSA και/ή αντι-La/SSB και στην συνέχεια τον σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων. Αντισώματα αντι-Ro/SSA ανιχνεύονται στον ορό από δύο τρίτα των ασθενών με σS ενώ οι δομές που προσομοιάζουν τα βλαστικά κέντρα στους σιελογόνους αδένες είναι δυνατόν να προάγουν την παραγωγή τους [198]. Η μόλυνση των αυτοάνοσων B-λεμφοκυττάρων με τον ιό EBV είναι δυνατόν να παίζει ρόλο στην επιμονή τους στα έκτοπα βλαστικά κέντρα των σιελογόνων αδένων [199]. Στους ασθενείς με ΣΕΛ έχειδειχθεί ότι τα αντισώματα αντι-Ro/SSA σχηματίζουν ευκολότερα ανοσοσυμπλέγματα σε σχέση με τα αντι-DNA αντισώματα [200], ενεργοποιώντας τα RF+ B-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, τα Ro/SSA ή La/SSB είναι δυνατόν να διεγείρουν λεμφωματοώδη B-λεμφοκύτταρα στους σιελογόνους αδένες χωρίς έναν ενδιάμεσο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων. Ωστόσο, δεν έχει περιγραφεί μια δραστηριότητα έναντι των αντιγόνων Ro/SSA ή La/SSB στο επίπεδο των λεμφωμάτων που εμφανίζονται ως επιπλοκή στο σS [201].

Ποικίλοι ιστολογικοί υπότυποι λεμφώματος NHL έχουν περιγραφεί στους ασθενείς με σS, συμπεριλαμβανομένων των κάτωθι: α) λέμφωμα του θυλακίου κέντρου, β) λεμφο-πλασματοκυτταρικό λέμφωμα, γ) διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-λεμφοκύτταρα (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBC), δ) λέμφωμα B-λεμφοκυττάρων οριακής ζώνης (Marginal zone B-cell lymphoma, MZBCL) συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος του λεμφικού ιστού των βλεννογόνων (Mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) και ε) λεμφώματα μονοκυτταροειδών B-λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, το MZBCL, ειδικά το MALT λέμφωμα, και το DLBC λέμφωμα αποτελούν τους συχνότερους υποτύπους [202, 203]. Το λέμφωμα MALT στους ασθενείς με σS εντοπίζεται συνήθως στους σιελογόνους αδένες (παρωτίδες και υπογνάθιους), είναι δυνατόν όμως να προσβάλλει και τους οφθαλμικούς κόγχους, το ρινο-φάρυγγα, το στομάχι, τον θυρεοειδή αδένα και τους πνεύμονες. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων εμφανίζεται ως διόγκωση των παρωτίδων. Επιπλέον, είναι δυνατόν να εντοπίζεται και στους λεμφαδένες. Γενικά η ανάπτυξη NHL στους ασθενείς με σS συσχετίζεται με καλή πρόγνωση. Μια αναδρομική μελέτη που ανέλυσε 53 περιπτώσεις NHL σε ασθενείς με σS έδειξε ότι οι ασθενείς με λεμφώματα MALT εμφανίζουν συνολική επιβίωση (overall survival) και επιβίωση χωρίς συμβάντα (event-free survival) στα 3 έτη στο 97% και 78%, αντίστοιχα [204].

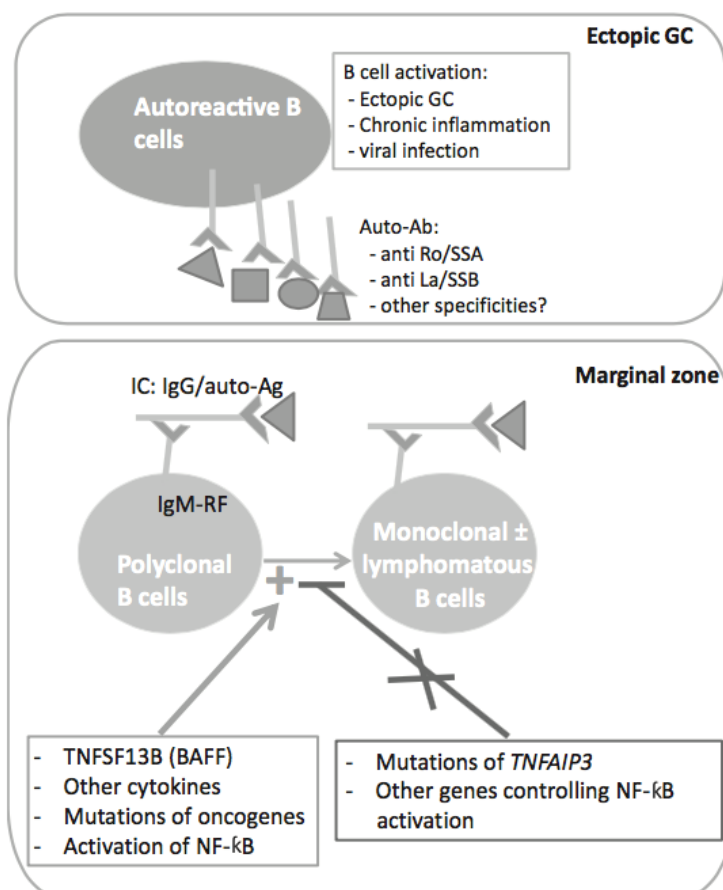
Κλασικοί παράγοντες υψηλού κινδύνου για την λεμφωματοώδη εξαλλαγή σε ασθενείς με σS είναι η επίμονη διόγκωση των παρωτίδων, η λεμφαδενοπάθεια και η πορφύρα, καθώς και η παρουσία της μικτής μονοκλωνικής κρυοσφαιριναιμίας και τα χαμηλά επίπεδα C4 ορού [24, 25, 109, 181, 183, 205]. Η παρουσία της ψηλαφητής πορφύρας και των χαμηλών επιπέδων C4 ορού στην πρώτη επίσκεψη έχει προταθεί ότι είναι δυνατόν να διαχωρίζει τους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη λεμφώματος (νόσος τύπου I ή αυξημένου ρίσκου για λέμφωμα) από αυτούς με ήπια πορεία της νόσου (νόσος τύπου II ή χαμηλού ρίσκου) [205]. Επιπλέον, κάποιες μελέτες ταυτοποίησαν την σπληνομεγαλία, τα χαμηλά επίπεδα C3 ορού, την λεμφοπενία (ειδικά των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων) και την ουδετεροπενία ως σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη λεμφώματος στους ασθενείς με σS. Αντίθετα, η αναιμία, τα αντισώματα αντι-Ro/SSA/αντι-La/SSB, τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), ο RF και η υπεργαμμασφαιριναιμία δεν συσχετίστηκαν με την παρουσία λεμφώματος [188].

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν τα πολυκλωνικά αυτο-άνοσα B-λεμφοκύτταρα σε μονοκλωνικότητα που τους εκχωρεί συμπεριφορά χαμηλού βαθμού λεμφώματος B-λεμφοκυττάρων. Η παρουσία δομών που προσομοιάζουν τα βλαστικά κέντρα στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σS, τα αυξημένα επίπεδα του BAFF και του προσδέτη FLT3L (FLT3-ligand), κυτταροκίνης που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων μορφών B-λεμφοκυττάρων [206] καθώς και γενετικές διαταραχές που σχετίζονται με το γονίδιο TNFAIP3 αποτελούν νέους προγνωστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη λεμφώματος. Δομές που προσομοιάζουν στα βλαστικά κέντρα έχουν διαπιστωθεί στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σS [207], όπου τα B-λεμφοκύτταρα υφίστανται σωματικές υπερμεταλλάξεις και αντιγονοκατευθυνόμενη επιλογή των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής των ανοσοσφαιρινών. Οι δομές αυτές είναι πιθανό να προωθήσουν τη χρόνια ενεργοποίηση των αυτοάνοσων B-λεμφοκυττάρων [80]. Η AICDA δεαμινάση της κυτοσίνης που επάγεται από την ενεργοποίηση (Activation-induced cytidine deaminase) βρέθηκε να εκφράζεται στα θυλακικά δενδριτικά κύτταρα των δομών αυτών στους ασθενείς με σS. Επιπλέον, η έκφραση της AICDA συσχετίστηκε με την παρουσία δομών που προσομοιάζουν στα βλαστικά κέντρα στα λεμφώματα MALT των ασθενών με σS [208], υποστηρίζοντας έναν λειτουργικό ρόλο-κλειδί τους στη διαδικασία της λεμφογένεσης. Οι δομές αυτές έχουν προταθεί ως προγνωστικοί δείκτες ανάπτυξης λεμφώματος στους ασθενείς με σS,

καθώς εντοπίστηκαν σε 86% από τους ασθενείς που στη συνέχεια εκδήλωσαν NHL έναντι 22% των ασθενών χωρίς ακόλουθο NHL, πάνω από 7 χρόνια πριν την εκδήλωση του λεμφώματος [117]. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο, καθώς η παρουσία των δομών που προσομοιάζουν στα βλαστικά κέντρα σε βιοψίες από σιελογόνους αδένες χείλους δεν βρέθηκε να διαφέρει ανάμεσα σε ασθενείς με σS που αναπτύσσουν λέμφωμα MALT των παρωτίδων και ασθενείς με σS που δεν εκδηλώνουν λέμφωμα [209]. Μελέτες έχουν προτείνει την εμπλοκή του BAFF στην εμφάνιση λεμφώματος στους ασθενείς με σS. Τα επίπεδα ορού του BAFF βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με λεμφοπερπλαστικά νοσήματα. Επιπλέον, τα επίπεδα του BAFF συσχετίστηκαν με την ενεργότητα της νόσου όπως αξιολογήθηκε από τον ESSDAI [European League Against Rheumatism (EULAR) Sjogren Syndrome Disease Activity Index] και με τα επίπεδα της β2-μικροσφαιρίνης ορού. Αυξημένα επίπεδα BAFF στον ορό βρέθηκαν και σε ασθενείς με προηγούμενο λέμφωμα, στις περισσότερες περιπτώσεις σε πλήρη ύφεση [170, 210]. Ένας πολυμορφισμός στον υποκινητή του *TNFSF13B* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BAFF έχει περιγραφεί να συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα BAFF, ωστόσο μια πιθανή σύνδεση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και του σS αμφισβητείται [171, 211, 212]. Τα επίπεδα της FLT3LG, η οποία βρέθηκε αυξημένη στην πλειοψηφία των λευχαιμιών [213], βρέθηκαν επίσης αυξημένα στους ασθενείς με σS συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επιπλέον, τα επίπεδα του FLT3LG ορού συνδέθηκαν με την ενεργότητα της νόσου όπως αξιολογείται με τον δείκτη ESSDAI, και υψηλά επίπεδα FLT3LG βρέθηκαν σε δύο ασθενείς που στη συνέχεια ανέπτυξαν λέμφωμα [214]. Το γονίδιο *TNFAIP3* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TNFAIP3 (A20), κεντρικό ρυθμιστή της ενεργοποίησης του NF-kB. Το TNFAIP3 είχε χαμηλότερη έκφραση στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS σε σχέση με τους μάρτυρες και τα κύτταρα με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του TNFAIP3 εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-kB [215]. Πολυμορφισμοί του *TNFAIP3* έχουν συνδεθεί με αυτοάνοσα νοσήματα [216]. Διαγραφές και μεταλλάξεις του *TNFAIP3* έχουν περιγραφεί σε μερικούς υποτύπους λεμφωμάτων, ιδιαίτερα στο λέμφωμα MALT [217]. Ένα κωδικοποιό SNP που εντοπίζεται στο εξώνιο 3 του *TNFAIP3*, το rs2230926, έχει συνδεθεί με το σS που επιπλέκεται με λέμφωμα. Επιπλέον, 60% από τους 20 ασθενείς με σS με λέμφωμα που μελετήθηκαν, παρουσίασαν μια πιθανή ανωμαλία κωδικοποίησης του *TNFAIP3*, είτε βλαστική είτε σωματική. Όταν η μελέτη εστιάσθηκε σε ασθενείς με λέμφωμα MALT, το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στα 77%. Επιπλέον, δύο από αυτές τις ανωμαλίες (ο

πολυμορφισμός rs2230926 και μια προσθήκη δύο μορίων γουανίνης στο εξόνιο 3), οδήγησαν σε λιγότερο αποτελεσματικό έλεγχο του μονοπατιού του NF-κB [35].

Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτά τα δεδομένα, προτάθηκε το 2015 ένα σενάριο για την παθοφυσιολογία του λεμφώματος που συνδέεται με το σS [201]. Η λεμφωματογένεση στο σS είναι μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων, όπου η χρόνια αντιγονική διέγερση παίζει κύριο ρόλο. Η πρώτη διέγερση εναντίον ακόμη άγνωστων αυτο-αντιγόνων (πιθανόν Ro/SSA και La/SSB) είναι δυνατόν να εμφανιστεί στα έκτοπα βλαστικά κέντρα σιελογόνων αδένων, και να οδηγήσει σε σχηματισμό ανοσυμπλεγμάτων. Τα ανοσυμπλέγματα αυτά είναι δυνατόν να διεγείρουν τα πολυκλωνικά RF+ B-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται εντός της οριακής ζώνης. Επιπρόσθετα, και άλλοι παράγοντες μπορούν να ενισχύσουν αυτό το φαινόμενο: η παρακρινής και/ή αυτοκρινής παραγωγή του BAFF, μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και υπερ-ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB. Επιπλέον, έμφυτες ή επίκτητες διαταραχές που επηρεάζουν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ενεργοποίησης του NF-κB, όπως ανωμαλίες του TNFAIP3, είναι δυνατόν να ενδυναμώσουν επιπλέον την υπερενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων. Η συσσώρευση αυτών των ανωμαλιών είναι δυνατόν να οδηγήσει τα RF+ B-λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης σε μονοκλωνική λεμφωματώδη εξαλλαγή (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σενάριο για την παθοφυσιολογία του λεμφώματος που σχετίζεται με το σύνδρομο Sjogren [201].

IC: ανοσώμπλεγμα, IgG ανοσοσφαιρίνη G, GC: βλαστικό κέντρο, RF: ρευματοειδής παράγοντας, Auto-AB: αυτο-αντίσωμα, auto-Ag: αυτο-αντιγόνο.

Πρόσθετα, στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες ασθενών με σS και λέμφωμα παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA της IFN α , αλλά υψηλότερα της IFN γ και των γονιδίων που επάγονται από την ιντερφερόνη τύπου II (interferon inducible genes, IFIG) σε σύγκριση με αυτούς από ασθενείς με σS χωρίς λέμφωμα και τους μάρτυρες. Το κλάσμα έκφρασης των μορίων mRNA IFN γ /IFN α σε βιοψίες σιελογόνων αδένων προτάθηκε ως νέος ιστοπαθολογικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της *in situ* ανάπτυξης του λεμφώματος στο πλαίσιο του σS [177]. Επιπλέον, μια ανώμαλη ενεργοποίηση, επαγόμενη από την IL-18, του μονοπατιού IL-22R1/STAT-3 προτάθηκε ως ένα ειδικό ανοσολογικό αποτύπωμα της φλεγμονής των σιελογόνων αδένων και του λεμφώματος NHL στους ασθενείς με σS [164]. Πρόσφατα, ο άξονας του φλεγμονοσώματος P2X7R προτάθηκε επίσης ως νέο πιθανό μονοπάτι σηματοδότησης που εμπλέκεται τόσο στην εξωκρινοπάθεια όσο και στην λεμφωματογένεση στο σS. Αυτό ενισχύει την υπόθεση ενός κεντρικού ρόλου της IL-18, μέσω της P2X7R διεμεσολαβούμενης παραγωγής της, στην λεμφωματογένεση, και ανοίγει νέες προοπτικές για την έγκαιρη διάγνωση των λεμφω-υπερπλαστικών επιπλοκών και την ανάπτυξη εν δυνάμει στοχευμένων θεραπειών [218].

1.2. Η ιντερλευκίνη-18 (IL-18)

1.2.1. Γενικά

Η ιντερλευκίνη 18 (interleukin-18, IL-18) αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως «παράγοντας επαγωγής της ιντερφερόνης γ » (interferon- γ , IFN γ). Είναι η μοναδική κυτταροκίνη με ικανότητα να επάγει τόσο μια Th1 όσο και μια Th2 απάντηση, ανάλογα με το ανοσολογικό περιβάλλον. Η IL-18 σχετίζεται με την οικογένεια της ιντερλευκίνης 1 (interleukin-1, IL-1) και ιδιαίτερα με την IL-1 β , με διάφορους τρόπους. Έτσι, οι ανθρώπινες IL-18 και IL-1 β παρουσιάζουν μια παρόμοια β -πτυχωτή δομή. Η IL-18, παρόμοια με την IL-1 β , συντίθεται ως αδρανής πρόδρομη μορφή η οποία στερείται πεπτιδίου σηματοδότης (signal peptide) και χρειάζεται διάσπαση με τη διαμεσολάβηση της κασπάσης-1 για να καταστεί βιολογικά ενεργή. Παρά τη δέσμευση

σε διαφορετικούς υποδοχείς, η IL-1β και η IL-18 χρησιμοποιούν τα ίδια μονοπάτια σηματοδότησης. Ωστόσο, πέρα από αυτές τις σημαντικές ομοιότητες, η IL-18 και η IL-1β φαίνεται να έχουν διαφορετική βιολογική δράση [219, 220].

1.2.2. Βιολογική δράση

Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-18 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και αποτελείται από 6 εξόνια και 5 ιντρόνια. Για την αυθόρμητη έκφραση της IL-18 είναι απαραίτητα τουλάχιστον 92 βασικά ζεύγη της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της όπως και η δέσμευση του STAT-5 [221]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες IFN consensus sequence-binding protein και PU.1 έχουν ταυτοποιηθεί ως κρίσιμοι για την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της IL-18. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL-18 έχει λίγα στοιχεία αποσταθεροποίησης του RNA, με αποτέλεσμα μια σταθερή έκφραση της κυτταροκίνης. Η μεταγραφή της πρόδρομης μορφής της IL-18 είναι δυνατόν να διεγερθεί μετά από σύνδεση των PAMPs με τους υποδοχείς TLR και ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB. Το γονίδιο της IL-18 κωδικοποιεί μια πρόδρομη μορφή (pro-IL-18) 193 αμινοξέων και 24-kDa χωρίς την σηματοδοτική αλληλουχία για έκκριση στο N-τελικό άκρο. Η μορφή αυτή συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Σε αντίθεση με την IL-1β, η pro-IL-18 απαντάται στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, τα μακροφάγα, και τα δενδριτικά κύτταρα υγιών ατόμων. Ομοίως με την IL-1α και την IL-33, η pro-IL-18 εκφράζεται αυθόρμητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα ή τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και παραμένει ενδοκυττάρια στα μεσεγχυματικά κύτταρα [221].

Όπως προαναφέρθηκε, η IL-18, όπως και η IL-1β, χρειάζεται μετα-μεταφραστική ενζυμική επεξεργασία για να είναι βιολογικά ενεργή. Έτσι, η pro-IL-18 πέπτεται ενδοκυττάρια από την κασπάση-1 (caspase-1 ή IL-1β-converting enzyme) για να δημιουργηθεί ένα βιολογικά ενεργό μόριο 18-kD. Η κασπάση-1 είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί από διάφορα φλεγμονοσώματα συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με τους υποδοχείς NOD-like, AIM2-like ή την οικογένεια TRIM, τα οποία περιέχουν μια δομική περιοχή CARD ή PYD. Μεταξύ των πλέον γνωστών φλεγμονοσωμάτων είναι το NLRP-3, το NLRC4, το NLRP-1 και το AIM2 τα οποία ανιχνεύουν διάφορα σήματα κινδύνου. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-1 έχει επίσης ως αποτέλεσμα την πυροδότηση ενός προγράμματος κυτταρικού θανάτου το οποίο ονομάζεται πυρόπτωση, η οποία προκαλεί πόρους στην μεμβράνη και απελευθέρωση ώριμης IL-1β και IL-18. Η ώριμη IL-1β είναι δυνατόν επίσης να απελευθερωθεί από τα κύτταρα μέσω εξω-

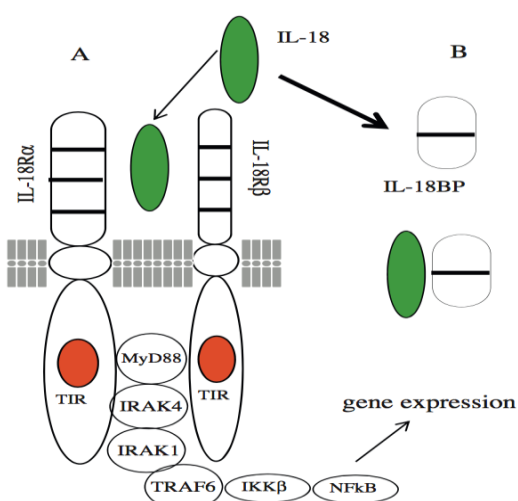
κυττάρωσης λυσοσωμάτων ή μικροκυστιδίων της μεμβράνης, αλλά δεν είναι σαφές εάν η IL-18 χρησιμοποιεί τις ίδιες οδούς [221]. Η διάσπαση της pro-IL-18 δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά από την κασπάση-1. Μια ακόμα κασπάση, η κασπάση-8, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην διάσπαση της pro-IL-18 μέσω ενεργοποίησης του Fas-ligand προσδότη στα κύτταρα Kupffer και τα μακροφάγα των μυών [222]. Η granzyme B όπως και η πρωτεϊνάση 3 (proteinase-3, PR3) μπορούν επίσης να διασπάσουν την pro-IL-18 σε βιολογικά ενεργές μορφές [223, 224]. Αντίθετα, η διάσπαση της pro-IL-18 ή της ώριμης IL-18 από την κασπάση-3 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία βιολογικά ανενεργών πεπτιδίων [225]. Τέλος, η cathepsin B είναι δυνατόν επίσης να συμμετέχει στην διάσπαση της pro-IL-18, αλλά η βιολογική σημασία αυτής της επεξεργασίας παραμένει άγνωστη [226]. Η IL-18 είναι δυνατόν να απελευθερωθεί στην πρόδρομη μορφή και να ενεργοποιηθεί εξωκυττάρια από πρωτεάσες ουδετερόφιλων όπως η PR3. Έχει περιγραφεί και μια μεμβρανική μορφή της IL-18 σε υποομάδα μακροφάγων προερχόμενων από μονοκύτταρα, μετά την διέγερση με M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) [227]. Παρόμοια με την IL-1α, η μεμβρανική IL-18 είναι μια ενεργή κυτταροκίνη μόνο μετά από διέγερση με TLR προσδέτες όπως το LPS. Η εμφάνιση της φαίνεται να σχετίζεται με την διαφοροποίηση μακροφάγων σε M2 τύπο μετά από έκθεση σε M-CSF ενώ η διαφοροποίηση μακροφάγων σε M1 τύπο μετά από διέγερση με GM-CSF δεν συνακολουθείται με έκφραση της μεμβρανικής IL-18. Επιπλέον φαίνεται ότι η απελευθέρωση ενεργής μεμβρανικής IL-18 από τα M2 μακροφάγα απαιτεί την παρουσία της κασπάσης-1 συν μιας άλλης πρωτεάσης επαγόμενης από το LPS, που πιθανόν να είναι η PR3, πρωτεάση που περιέχεται σε ανενεργή μορφή στη μεμβράνη των μακροφάγων [228].

1.2.3. Ο υποδοχέας της IL-18

Ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης 18 (IL-18 receptor, IL-18R) είναι παρόμοιος με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1 receptor, IL-1R). Είναι ένα ετεροδιμερές μόριο αποτελούμενο από μία α αλυσίδα υπεύθυνη για την εξωκυτταρική δέσμευση της IL-18 (IL-18Rα) και μια β αλυσίδα (IL-18Rβ) υπεύθυνη για την ενδοκυτταρική μετάδοση του σήματος. Η υπομονάδα IL-18Rβ δεν δεσμεύει την IL-18 αλλά είναι σημαντική στη δημιουργία ετεροτριμερούς συμπλέγματος μαζί με τις IL-18Rα και IL-18 [229]. Ο IL-18R μοιράζεται ενδοκυττάρια μονοπάτια με άλλα σημαντικά ανοσορυθμιστικά μόρια όπως αυτά των υποδοχέων TLR. Τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν την IL-18Rα, ενώ η IL-18Rβ εκφράζεται στα T-λεμφοκύτταρα και τα

δενδριτικά κύτταρα αλλά όχι σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Μετά την δημιουργία του ετεροδιμερούς μορίου ενεργοποιούνται μονοπάτια σηματοδότησης κοινά με αυτά άλλων μορίων της οικογένειας του IL-1R, όπως αυτό του υποδοχέα Toll-IL-1 (TIR), του MyD88, των τεσσάρων IRAKs και του TRAF-6 που ακολουθείται από την αποικοδόμηση του IκB και την απελευθέρωση του NF-κB. Εκτός από το NF-κB, το σύμπλοκο IL-18/IL-18Rα/IL-18Rβ έχει αποδειχθεί ότι επάγει την φωσφορυλίωση του STAT3 στα NK κύτταρα καθώς και το μονοπάτι της p38 MAP κινάσης στα ουδετερόφιλα [230-232]. Η έκφραση του συμπλέγματος IL-18R, ειδικά της IL-18Rβ, ρυθμίζεται από πολλές κυτταροκίνες και φαίνεται ότι η συνεργασία των IL-12, IL-23, IL-21, IL-1, IL-2 ή της IL-15 με την IL-18 για την επαγωγή της IFNγ οφείλεται κυρίως στην υπερ-ρύθμιση της IL-18Rβ [221].

Αξιοσημείωτο είναι ότι η IL-37, ένα νέο μέλος της οικογένειας IL-1, συνδέεται με την υπομονάδα IL-18Rα αλλά όχι με την IL-18Rβ. Στην πραγματικότητα, η IL-37 δεσμεύεται με τον υποδοχέα IL-1R8 της οικογένειας IL-1 (προηγουμένως γνωστός ως SIGIRR), ο οποίος σχηματίζει ένα τριμερές σύμπλεγμα με την IL-18Rα και επάγει μια αντιφλεγμονώδη απόκριση. Το τριμερές αυτό σύμπλεγμα IL-37/IL-18Rα/IL-1R8 ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης STAT-3, μειώνει την ενεργοποίηση των NF-κB και AP-1 και την παραγωγή IFNγ. Έτσι, οι IL-37 και IL-18 έχουν αντίθετες επιδράσεις στα κύτταρα και η IL-37 είναι δυνατόν να διαμορφώνει τις φλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-18 [233].



Εικόνα 2. Πρόσδεση της IL-18 στον υποδοχέα της και ακόλουθη μεταγωγή σήματος [234]

(Α) Η IL-18 αρχικά προσδένεται στην α-αλυσίδα του υποδοχέα της (IL-18R). Η β-αλυσίδα του IL-18R εγκαλείται για να σχηματίσει ένα ετεροδιμερές υψηλής χημικής συγγένειας. Μετά τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς, οι ενδοκυττάρειες δομικές περιοχές του υποδοχέα Toll-IL-1 receptor (TIR) ενεργοποιούν κατά προσέγγιση την πρόσδεση του παράγοντα MyD88. Μετά από φωσφορυλίωσεις του MyD88 προσελκύεται το μόριο IRAK-4 και στη συ-

νέχεια τα IRAK-1 και TRAF-6 καθώς επίσης ενεργοποιείται η IKK που ακολουθείται από μετακίνηση του NF-κB στον πυρήνα και δράση του ως μεταγραφικού παράγοντα. **(Β)** Η πρωτεΐνη IL-18BP είναι παρούσα στον εξωκυττάριο χώρο. Λόγω της υψηλής χημικής συγγένειας της IL-18, η IL-18BP προσδένεται εκλεκτικά στην IL-18 και παρεμποδίζει την πρόσδεση της στον υποδοχέα IL-18R.

1.2.4. Η IL-18BP (IL-18 binding protein) πρωτεΐνη που προσδένεται στην IL-18

Η IL-18BP είναι μια αυθόρμητα εκκρινόμενη πρωτεΐνη 38-kDa, με εξαιρετικά υψηλή συγγένεια για την IL-18, σημαντικά υψηλότερη από εκείνη της IL-18Ra [235]. Δομικά, η IL-18BP έχει μία περιοχή ανοσοσφαιρίνης (Ig) η οποία παρουσιάζει ορισμένες ομοιότητες με την τρίτη περιοχή Ig του IL-18Ra. Η IL-18BP συνδέεται με την ώριμη IL-18 με υψηλή συγγένεια, αλλά όχι με την pro-IL-18, και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, ενεργώντας ως ένας φυσικός αναστολέας [236].

Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-18BP κωδικοποιεί τέσσερις διαφορετικές ισομορφές (IL-18BP_a, b, c, d). Αυτές οι ισομορφές διαφέρουν κυρίως στην C-τερματική περιοχή τους. Η IL-18BP_a παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγγένεια για την IL-18. Η IL-18BP_a και η IL-18BP_c απενεργοποιούν >95% της IL-18. Η παραγωγή της IL-18BP φαίνεται να επάγεται από την IFN γ . Σε ανθρώπινες κυτταρικές επιθηλιακές σειρές, η IFN γ επάγει την παραγωγή και την απελευθέρωση της IL-18BP_a. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι, όπως και άλλες κυτταροκίνες, η IL-18 αυξάνει έμμεσα την παραγωγή του δικού της αναστολέα σε ένα βρόχο ανατροφοδότησης. Τα επίπεδα της IL-18BP στον ορό υγιών ατόμων κυμαίνονται από 2.000 έως 4.000 pg/mL ενώ τα επίπεδα της IL-18 στον ίδιο ορό από 80 έως 120 pg/mL. Αυξημένα επίπεδα IL-18BP έχουν περιγραφεί σε διάφορες αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις παθήσεις. Σε διάφορα συστηματικά φλεγμονώδη νοσήματα, όπως τον ΣΕΛ, τη συστηματική αρθρίτιδα, το σύνδρομο ενεργοποίησης των μακροφάγων και τη σηψαιμία, τα επίπεδα της IL-18BP καθώς και τα επίπεδα της IL-18 είναι υψηλά, φαίνεται όμως ότι τα επίπεδα της IL-18BP δεν είναι επαρκώς υψηλά ώστε να εξουδετερώνουν την IL-18 και συνεπώς η ελεύθερη IL-18 είναι υψηλότερη από ό,τι σε υγιή άτομα [221]. Δεδομένης της υψηλής συγγένειας δέσμευσης της IL-18BP για την IL-18, η IL-18BP αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή της ανοσολογικής και φλεγμονώδους απόκρισης στα νοσήματα που σχετίζονται με την IL-18.

Μια μοναδική ιδιότητα της IL-18BP είναι ότι δεσμεύει την αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-37, μειώνοντας πιθανόν την αντιφλεγμονώδη της δράση. Πράγματι, σε ζωικό μοντέλο ρευματοειδούς αρθρίτιδας σε ποντίκια, χαμηλές δόσεις IL-18BP μείωσαν την φλεγμονή, ενώ ψηλότερες δόσεις είχαν αντίθετα αποτελέσματα [237].

Η IL-18BP ρυθμίζεται από την IFN γ , η οποία αυξάνει την έκφρασή της. Με αυτόν τον τρόπο, η IFN γ συμμετέχει στην αρνητική ανατροφοδότηση της ρύθμισης

της IL-18. [238, 239].

Η σηματοδότηση μέσω του STAT1 που επάγεται από την IFN γ και οι θέσεις του STAT1 στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την IL18BP είναι κρίσιμες για την έκφραση της IL18BP. Μια άλλη κυτταροκίνη που ενεργοποιεί τον STAT1, η IL-27, επάγει την έκφραση της IL-18BP στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα *in vitro* [240].

1.2.5. Ο ρόλος της IL-18 στην επίκτητη ανοσία

Η IL-18 αποτελεί μια κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση ποικίλων υποπληθυσμών T-λεμφοκυττάρων. Σε συνδυασμό με την IL-12, η IL-18 συμμετέχει στην επαγωγή των Th1 ανοσολογικών αποκρίσεων. Αυτή η ιδιότητα της IL-18 οφείλεται στην ικανότητά της να επάγει IFN γ σε συνεργασία είτε με την IL-12 είτε με την IL-15, οι οποίες αυξάνουν την έκφραση του υποδοχέα της IL-18 (IL-18R α).

Έχειδειχτεί ότι η IL-18, σε συνδυασμό με την IL-12, επάγει την παραγωγή της IFN γ τόσο από τα CD4 $^{+}$ και τα CD8 $^{+}$ T-λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα NK-κύτταρα μέσω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης του NF- κ B από την IL-18 και του STAT4 από την IL-12. Η IL-18 ρυθμίζει επίσης την κυτταροτοξικότητα μέσω περφορίνης και FasL των NK-κυττάρων και των CD8 $^{+}$ T-λεμφοκυττάρων. Η μεμβρανική IL-18, μετά την αποδέσμευσή της, είναι δυνατόν επίσης να ενεργοποιήσει τα NK κύτταρα.

Εν απουσία IL-12 ή IL-15, η IL-18 δεν επάγει την IFN γ , αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων σε Th2 λεμφοκύτταρα που παράγουν IL-13, IL-4 και IgE. Επιπλέον, υπό την δράση της, τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-13 και IL-4.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η IL-18 κατέχει ρόλο στην ρύθμιση των Th17 CD4 $^{+}$ T-λεμφοκυττάρων καθώς και στην διαφοροποίηση των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs) FoxP3 $^{+}$ [221, 236].

1.2.6. Η IL-18 στο σύνδρομο Sjögren

Η έκφραση και η δράση της IL-18 έχουν περιγραφεί σε αρκετά αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα, όπως ο ΣΕΛ, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο ΣΔ τύπου 1, η νόσος του Crohn, η ψωρίαση, η συστηματική νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα και το

αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο. Επιπλέον, η IL-18 έχει επίσης προταθεί ότι παίζει ρόλο στο μεταβολικό σύνδρομο, την αθηροσκλήρυνση και τον καρκίνο [221].

Υψηλά επίπεδα IL-18 έχουν προηγούμενα ανιχνευθεί στον ορό αίματος ασθενών με σS, τα οποία συσχετίστηκαν ισχυρά με τους τίτλους αντισωμάτων αντι-SSA/Ro και αντι-SSB/La. Στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS, η IL-18 ανιχνεύτηκε κυρίως στα CD68-θετικά μακροφάγα αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων [84].

Στην συνέχεια, μετά την δημοσίευση της πρώτης εργασίας που αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής, περιγράφηκε στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS η έκφραση τόσο της πρόδρομης όσο και της ώριμης μορφής της IL-18 [160]. Τα επίπεδα IL-18 στον ορό των ασθενών με σS και ενεργή νόσο βρέθηκαν υψηλότερα σε σχέση με τους ασθενείς με ήπια νόσο όπως προσδιορίστηκε βάσει του δείκτη ESSDAI [241]. Επιπλέον, η έκφραση της IL-18 βρέθηκε επίσης αυξημένη σε δείγματα σάλιου από ασθενείς με σS, παράλληλα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης μορίων φλεγμονοσώματος NLRP3, ASC και κασπάσης-1 σε βιοψίες σιελογόνων αδένων [242]. Αξιοσημείωτο, τα επίπεδα ολικής IL-18 και IL-18BP στον ορό συσχετίστηκαν με τα επίπεδα ορού της of IL-37, μιας σημαντικής αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης [167].

1.3. Η ιντερλευκίνη-12 (IL-12)

1.3.1. Γενικά

Η IL-12 αρχικά περιγράφηκε ως « παράγοντας διεγέρτης των φυσικών κυττάρων φονέων» (NK cell stimulatory factor, NKSF) ή ως «παράγοντας ωρίμανσης των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων» (Cytotoxic lymphocyte maturation factor, CLMF) (Kobayashi M 1989, Stern AS 1990, Gubler U, 1991).

Η ιντερλευκίνη αυτή αποτελεί μέλος μιας οικογένειας κυτταροκινών με συναφείς δομικές ιδιότητες. Είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη με δύο υπομονάδες, τις p35 και p40. Η αλυσίδα p40 είναι κοινή για την IL-12 και την σχετιζόμενη κυτταροκίνη IL-23. Παρόμοια, η αλυσίδα p35 αποτελεί μέρος της IL-35.

Η IL-12 δρά κυρίως μέσω του STAT4 για να επάγει την παραγωγή της IFN-γ από τα T-λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα. Η IFN-γ, με τη σειρά της, προκαλεί φλεγμονώδεις δράσεις και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα T-bet. Καθώς η IL-12 εμπλέκεται στην ανάπτυξη της Th1 ανοσολογικής απόκρισης, θεωρείται ότι αντι-

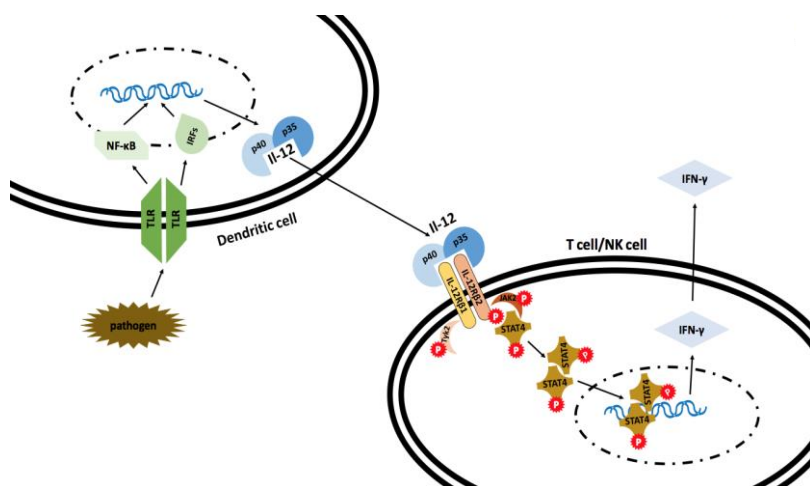
προσωπεύει έναν σημαντικό παράγοντα σύνδεσης της έμφυτης με την επίκτητη ανοσία.

1.3.2. Βιολογική δράση

Η υπομονάδα p35 (35kD, α-αλυσίδα) και η υπομονάδα p40 (40kD, β-αλυσίδα) συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς [243, 244]. Και οι δύο υπομονάδες κωδικοποιούνται από γονίδια που ρυθμίζονται ανεξάρτητα και βρίσκονται στα χρωμοσώματα 3 και 5, αντίστοιχα. Η συνέκφρασή τους οδηγεί στο σχηματισμό μιας βιολογικά ενεργούς πρωτεΐνης 70 kDa (p70) [245]. Η β-αλυσίδα παράγεται σε περίσσεια σε σχέση με την α-αλυσίδα και ως εκ τούτου μόνο το ετεροδιμερές, η ελεύθερη β-αλυσίδα και τα p40 ομοδιμερή μπορούν να ανιχνευθούν [246]. Τα ομοδιμερή p40 ρυθμίζουν την δράση της IL-12p70 *in vitro* δρώντας ανταγωνιστικά την πρόσδεσή της στον υποδοχέα της, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της p40 συμμετέχει σε μια εγγενή ρύθμιση της δράσης της IL-12 [247]. Παρόλο που η δράση αυτή έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετά πειραματικά πρότυπα ασθένειας σε ποντίκια, δεν έχει διαπιστωθεί ακόμα μια παρόμοια ρυθμιστική λειτουργία στον άνθρωπο. Επιπλέον, έχουν προταθεί κάποιες άλλες λειτουργίες του ομοδιμερούς p40, συμπεριλαμβανομένης της δράσης του ως χημειοτακτικού παράγοντα στα μακροφάγα, στην επαγωγή της μετανάστευσης των δενδριτικών κυττάρων ή στην απόρριψη αλλομοσχεύματος [248].

Η IL-12 παράγεται από τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα και τα Β-λεμφοκύτταρα και η έκκρισή της επάγεται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Το γονίδιο της IL-12p35 μεταγράφεται σταθερά σε χαμηλά επίπεδα, όμως η μετάφρασή του εμποδίζεται από έναν κωδικόνιο (codon) αναστολέα ATG στο mRNA. Όταν υπάρχει διέγερση από προϊόντα παθογόνων μικροβίων όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) χρησιμοποιούνται εναλλακτικές εναρκτήριες περιοχές μεταγραφής (alternative transcription starts) με αποτέλεσμα τη δημιουργία mRNAs χωρίς στοιχεία ATG, με επακόλουθη μετάφραση της υπομονάδας IL12-p35 [249]. Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου p35 ενισχύεται από μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NF-κB και IRFs ρυθμιστικούς παράγοντες της ιντερφερόνης (interferon regulatory factors) [250]. Από την άλλη, η ρύθμιση της παραγωγής της υπομονάδας IL-12p40 λαμβάνει χώρα κυρίως στο επίπεδο της μεταγραφής. Οι υποκινητές της p40 περιέχουν ένα αριθμό θέσεων πρόσδεσης για ακρετούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι NF-κB και Ets [251-254]. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ενεργοποιούνται κατόπιν σηματοδότησης μέσω των υποδοχέων TLRs οι οποίοι λειτουργούν ως

υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (Pattern Recognition Receptors, PRR) που προσδένονται σε μοριακά μοτίβα παθογόνων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs). Ενώ η IL-12p40 επάγεται κατόπιν ενεργοποίησης των περισσότερων TLRs, η IL-12p35 επάγεται μετά την ενεργοποίηση των TLRs 3, 4 και 8 που αναγνωρίζουν δίκλωνο DNA, λιποσακχαρίτες και μονόκλωνο RNA, αντίστοιχα. Επιπλέον, η έκφραση και των δύο υπομονάδων επάγεται από την IFN- β και την IFN- γ οι οποίες ενεργοποιούν τους IRFs 1, 7 και 8. Ωστόσο, η επίδραση των IRFs στις δύο αλυσίδες της IL-12 είναι διαφορετική μιας και οι παράγοντες IRF7 και η IRF8 επάγουν τις p40 και p35, αλλά ο IRF1 επάγει μόνο την μεταγραφή της p35. Αυτός ο διαφορετικός μηχανισμός ρύθμισης φαίνεται να συμβάλει επίσης στην εξισορόπιση της έκκρισης των διαφορετικών κυτταροκινών της οικογένειας IL-12 [250]. Επιπλέον, η έκκριση της IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα ρυθμίζεται και από την αλληλεπίδραση των T-λεμφοκυττάρων με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) μέσω των μορίων CD40/CD40L [255].



Εικόνα 3. Επισκόπηση των σταδίων έκκρισης και σηματοδότησης της κυτταροκίνης IL-12

Φαγοκύτταρα όπως τα δενδριτικά κύτταρα αντιλαμβάνονται την παρουσία παραγόντων από παθογόνα μέσω των υποδοχέων TLRs. Ακολούθως, μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι NF- κ B και IRFs ενεργοποιούνται και επάγουν την μεταγραφή των IL-12p35 και IL-12p40. Στη συνέχεια, το διμερές IL-12p70 εκκρίνεται και αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα IL-12R των κυττάρων φονέων (NK cells) και των T-λεμφοκυττάρων. Η IL-12p35 συνδέεται στην υπομονάδα IL-12R β 2 και η IL-12p40 στην IL-12R β 1. Αυτό προκαλεί την σύνδεση των κινάσων janus Tyk2 και JAK2 στις ενδοκυττάρειες δομικές περιοχές των υπομονάδων του υποδοχέα IL-12R. Η JAK2 φωσφορυλιώνεται και επιτρέπει την πρόσδεση και φωσφορυλίωση του STAT4 στην υπομονάδα IL-12R β 2. Με ομοδιμερισμό και μετατόπιση στον πυρήνα, το μόριο STAT4 συνδέεται στις αλληλουχίες υποκινητών διαφορετικών γονιδίων με πιο επικρατές αυτό της IFN- γ [256].

1.3.3. Ο υποδοχέας της IL-12

Όπως η IL-12, έτσι και ο υποδοχέας της IL-12R είναι ετεροδιμερές με δύο υπομονάδες που ονομάζονται IL-12Rβ1 και IL-12Rβ2. Αυτές είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, 100kDa και 130kDa, με μια εξωκυττάρια δομική περιοχή 516 και 595 αμινοξέων, αντίστοιχα [257, 258]. Τα γονίδια που τις κωδικοποιούν εντοπίζονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα 19 και 1, αντίστοιχα. Και οι δύο υπομονάδες σχηματίζουν αυθόρμητα ομοδιμερή και ολιγομερή, που δύνανται να προσδεθούν στην IL-12 με χαμηλή όμως χημική συγγένεια. Η συσσωμάτωση των αλυσίδων β1- και β2- οδηγεί στον σχηματισμό θέσεων πρόσδεσης υψηλής χημικής συγγένειας [259]. Ενώ η IL-12Rβ1 αλληλεπιδρά με την υπομονάδα IL-12p40, η IL-12p35 συνδέεται κυρίως με την υπομονάδα IL-12Rβ2. Αυτή η αλυσίδα του υποδοχέα είναι επίσης υπεύθυνη για την μεταγωγή του σήματος της IL-12 μέσα στο κύτταρο [258, 260]. Αντίθετα, η IL-12Rβ1 είναι υπομονάδα και του υποδοχέα IL-23R και αλληλεπιδρά και με την υπομονάδα p40 της IL-23.

Ο IL-12R εντοπίζεται κυρίως σε κύτταρα φονείς (NK-κύτταρα) και T-λεμφοκύτταρα [261]. Μετά από την επαφή των μη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (naïve T-cells) με το αντιγόνο μέσω του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (T cell receptor), αυξάνεται η έκφραση της IL-12Rβ2. Στη συνέχεια διατηρείται σε υψηλά επίπεδα μέσω διέγερσης από την IFN-γ ενώ χάνεται στην παρουσία της IL-4 [262]. Ως συνέπεια, η IL-12Rβ2 εκφράζεται από τα Th1 αλλά όχι από τα Th2 T-λεμφοκύτταρα [263], υποδηλώνοντας ότι αυτό το μέρος του υποδοχέα είναι κρίσιμο για την διαφοροποίηση των T-τελεστών λεμφοκυττάρων (T effector, T_{eff}) σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

Η σηματοδότηση μέσω του IL-12R εξαρτάται ουσιαστικά από τις κινάσες JAKs. Τα μέλη της οικογένειας JAK, οι JAK2 και Tyk2, συνδέονται με τις IL-12Rβ2 και IL-12Rβ1, αντίστοιχα. Ενώ δεν είναι γνωστός ο ρόλος της Tyk2 στην μεταγωγή σήματος της IL-12, η JAK2 φωσφορυλιώνεται μετά από την πρόσδεση της IL-12 στον υποδοχέα της IL-12R. Στην συνέχεια, η φωσφορυλιωμένη JAK2 φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο τυροσίνης Y800 της αλυσίδας IL-12Rβ2, που στη συνέχεια δρά ως θέση σύνδεσης για τις δομικές περιοχές SH2 (SRC homology domains) των μορίων STAT, ειδικά του STAT4. Τα μόρια STAT φωσφορυλιώνονται επίσης και από την JAK2 και είναι ικανά να σχηματίσουν ομο- ή ετεροδιμερή που μπορούν να μετακινηθούν στον πυρήνα των κυττάρων, όπου λειτουργούν ως υποκινητές ή καταστολείς γονιδιακής

μεταγραφής (Εικόνα 3) [258, 264, 265]. Το γονίδιο της IFN- γ έχει εντοπισθεί ενωρίτερα ως στόχος του STAT4 [266].

1.3.4. Ο ρόλος της IL-12 στην επίκτητη ανοσία

Τα κύτταρα στόχοι της IL-12 είναι τα T-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φονείς (NK cells) [267]. Χαρακτηριστικό της δράσης της IL-12 είναι η επαγωγή της παραγωγής της IFN- γ , ενισχύοντας επομένως τόσο τις έμφυτες όσο και τις επίκτητες κυτταρομεσολαβούμενες ανοσοαποκρίσεις. Μια συνεργιστική ενεργοποίηση της έκκρισης της IFN- γ είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μετά από διέγερση με την κυτταροκίνη IL-18. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η STAT4, που φωσφορυλιώνεται κατόπιν αλληλεπίδρασης της IL-12 με τον υποδοχέα της IL-12R, προσδένεται σε έναν υποκινητή του γονιδίου της IFN- γ , του οποίου η ενεργοποίηση επάγεται μέσω αυξημένης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 που επάγεται από την IL-18 [268]. Η δράση της IL-12 πάνω στα T-λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα έχει διάφορα αποτελέσματα. Η IL-12 καθοδηγεί την διαφοροποίηση των παρθένων T-λεμφοκυττάρων (naïve T cells) σε Th1 κύτταρα και παρεμποδίζει τη διαφοροποίησή τους προς Th2. Ωστόσο, η IL-12 δεν είναι αρκετή για να υποκινήσει την διαδικασία μιας και τα παρθένα T-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν την αλυσίδα IL-12R β 2. Αντ'αυτού, φαίνεται ότι η IL-27, ένα άλλο μέλος της οικογένειας IL-12 που εκκρίνεται από τα δενδριτικά κύτταρα, επάγει την Th1 απάντηση κατόπιν πρόσδεσης στον υποδοχέα IL-27R στην επιφάνεια των παρθένων T-λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται τα μόρια STAT3 και STAT1 που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων και την επαγωγή του κυρίου μεταγραφικού παράγοντα της Th1 σειράς, T-bet, καθώς και την καταστολή του GATA3, του αντίστοιχου μεταγραφικού παράγοντα στα Th2 λεμφοκύτταρα. Μετά την έκφραση του T-bet, τα T-λεμφοκύτταρα παράγουν την αλυσίδα IL-12R β 2, και ως εκ τούτου ευαισθητοποιούνται στην δράση της IL-12 που παράγεται από τα φαγοκύτταρα, με αποτέλεσμα την έκκριση της IFN- γ . Καθώς η IFN- γ σηματοδοτεί επίσης μέσω του μορίου STAT1 μετά την σύνδεσή στον υποδοχέα της στα T-λεμφοκύτταρα, η διαδικασία αυτή ενισχύεται περαιτέρω με πρόσθετη αύξηση της έκφρασης του T-bet [269-271]. Συλλογικά τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι, ενώ η IL-12 φαίνεται ότι δεν είναι δυνατόν να εκκινήσει την διαφοροποίηση σε Th1 λεμφοκύτταρα, συμβάλλει σημαντικά στην ενίσχυση και επέκταση της Th1 διαφοροποίησης μέσω ελέγχου αυτο-και παρακρινών βρόχων θετικής ανατροφοδότησης. Παράλληλα, η IL-12 προκαλεί πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων και των CD8⁺ κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων

καθώς και την αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους δια μέσου παραγωγής κυτταρολυτικών ενζύμων (granzymes, perforins). Επιπλέον, τα Β-λεμφοκύτταρα διεγείρονται και εκκρίνουν ειδικούς ισοτύπους αντισωμάτων που συνδέονται με την απόκριση τύπου Th1 [272].

1.3.5. Η IL-12 σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα

Ο ρόλος της IL-12 έχει εκτενώς μελετηθεί σε αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ψωρίαση, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ο διαβήτης τύπου 1, η σκλήρυνση κατά πλάκας και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, τα οποία χαρακτηρίζονται τουλάχιστον εν μέρει, από υπερβολική Th1 απόκριση. Επιπλέον, η ιδέα της ενίσχυσης της δράσης της IL-12 σε περιπτώσεις καρκίνου έχει διεξοδικά διερευνηθεί δεδομένου ότι μια αυξημένη Th1 απόκριση είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αυξημένη αντικαρκινική δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος [256].

1.3.6. Η IL-12 στο σύνδρομο Sjögren

Αρχικά, περιγράφηκε ότι κύτταρα που εκφράζουν την IL-12 διηθούν τους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS σε αντίθεση με τα υγιή άτομα [152, 273]. Στην συνέχεια, βιβλιογραφικά δεδομένα μεταγενέστερα της μελέτης της παρούσας διατριβής, υποστηρίζουν περαιτέρω την εμπλοκή της IL-12 στην παθογένεση του σS. Μια εκτεταμένη μελέτη γονιδιακής συσχέτισης (genome-wide association study, GWAS) τόνισε τον ρόλο της IL-12 στην παθοφυσιολογία του σS με ανεύρεση σημαντικής συσχέτισης ανάμεσα στο σS και έναν πολυμορφισμό μιας βάσης (SNP) στο γονίδιο *IL-12A* (rs485497). Οι φορείς του rs485497*A παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ορού της IL-12p70. Επιπλέον, τα επίπεδα ορού της IL-12p70 βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με σS σε σχέση με τους μάρτυρες και συσχετίστηκαν με ενεργή νόσο [274]. Επιπλέον, ποσοτική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων που προσδίδουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (expression quantitative trait loci, eQTL) αποκάλυψε αυξημένα επίπεδα mRNA της IL-12p35 στους φορείς της αλληλουχίας rs4680536*A, υποστηρίζοντας τις λειτουργικές συνέπειες αυτού του SNP που εντοπίζεται επίσης στο γονίδιο *IL-12A* (Lessard CJ, Nat Genet. 2013).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η IL-12 επάγει πόλωση προς τον Th1 φαινότυπο με αποτέλεσμα έκκριση της IFN γ ιδιαίτερα από τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα [275], μια υποομάδα κυττάρων που έχουν βρεθεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση του σS [276].

Έχει προταθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της IL-12 είναι δυνατόν να αποτελέσουν έναν δείκτη IFN τύπου 2-συσχετιζόμενης ασθένειας. Τα επίπεδα ορού της IL-12p40 συσχετίστηκαν αντίστροφα με τα επίπεδα ορού της BAFF στους ασθενείς με σS. Η IL-12p40 και η BAFF αναγνωρίστηκαν ως παράγοντες κλειδιά για την διάκριση ανάμεσα σε 2 υποομάδες ασθενών, μια με υψηλά επίπεδα IL-12p40 ορού και χωρίς βλαστικά κέντρα στις βιοψίες σιελογόνων αδένων και μια με υψηλά επίπεδα BAFF ορού και παρουσία βλαστικών κέντρων αλλά και συστημικών εκδηλώσεων και προδιάθεση για την ανάπτυξη λεμφώματος [277]. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίχθηκε και από κλινικές μελέτες [278].

1.4. Τα φλεγμονοσώματα

1.4.1 Γενικά

Τα φλεγμονοσώματα είναι ενδοκυτταρικά συμπλέγματα πρωτεϊνών που δημιουργούνται γύρω από έναν υποδοχέα, με βασικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Η δράση τους είναι δυνατόν να εξαρτάται ή να είναι ανεξάρτητη από την κασπάση-1. Τα συστατικά μόρια των φλεγμονοσωμάτων εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα έμφυτης ανοσίας όπως τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα [279], αλλά και τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα [280, 281] καθώς και σε ορισμένα άλλα κύτταρα, όπως τα κερατινοκύτταρα [282]. Η οργάνωση και η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος πυροδοτείται από ανίχνευση μικροβιακών παραγόντων (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), ενδογενή σήματα κινδύνου (danger-associated molecular patterns, DAMPs) και διαταραχές ομοιοστασίας (homeostasis-altering molecular processes, HAMPs) [283, 284]. Τα πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα των φλεγμονοσωμάτων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή ενάντια σε ενδοκυτταρικά βακτήρια και ιούς [285], καθώς και στην ρύθμιση της φλεγμονής [286, 287] μέσω της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια με ρόλο στην λειτουργία του φλεγμονοσώματος είναι υπεύθυνες για μια συνεχώς εξελισσόμενη κατηγορία νοσημάτων, τα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα [288]. Επιπλέον, διαταραχές στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος έχουν περιγραφεί σε μεταβολικά, ανοσολογικά και φλεγμονώδη νοσήματα [287, 289-292]. Οι βιοθεραπείες που στοχεύουν τις

κυτταροκίνες που παράγονται μέσω ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος και οι αναστολές που παρεμβαίνουν στην πυρήνωση και την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος αποτελούν υποσχόμενες θεραπευτικές επιλογές στους ασθενείς με φλεγμονώδη νοσήματα.

1.4.2. Τα κύρια μέρη του φλεγμονοσώματος

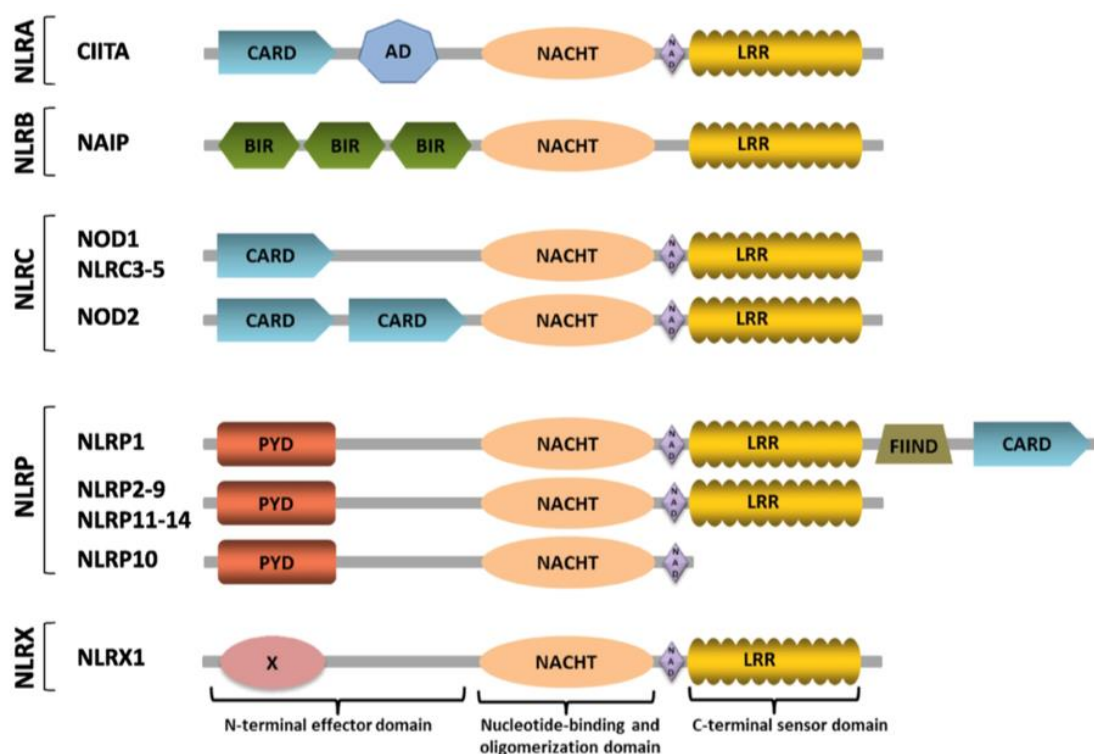
1.4.2.1. NLRs: Υποδοχείς πρόσδεσης Νουκλεοτιδίων με επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα Λευκίνης (Nucleotide-binding and Leucin-rich repeat containing receptors)

Οι NLRs είναι μια ομάδα υποδοχέων έμφυτης ανοσίας που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των ανοσοποιητικών κυττάρων [293] και εμπλέκονται σε αναγνώριση μικροβιακών παραγόντων και στην άμυνα του ξενιστή. Στους ανθρώπους, έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα 22 διαφορετικοί υποδοχείς NLRs, πολλοί από τους οποίους παίζουν ρόλο σε φλεγμονώδη νοσήματα [294].

Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από διάφορες δομικές περιοχές: μια κεντρική περιοχή NOD ή NACHT (απαιτείται για τον ATP-εξαρτώμενο αυτο-ολιγομερισμό), μια N-τελική ή NAD δομική περιοχή (NACHT-associated domain) και μια C-τελική LRR περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα λευκίνης (leucine-rich repeat) με ρόλο στην ανίχνευση του συνδέτη. Η N-τελική περιοχή είναι μεταβλητή και υποδιαιρεί την οικογένεια αυτών των υποδοχέων σε 5 τουλάχιστον ομάδες [295, 296] (Εικόνα 4).

Η ομάδα NLRA ορίζεται από την παρουσία μιας περιοχής όξινης διενεργοποίησης (acidic transactivation domain), ενώ η ομάδα NLRB περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του αναστολέα του βακουλοϊού (baculovirus inhibitor repeats, BIRs). Η ομάδα NLRC ορίζεται από την παρουσία μιας περιοχής που προσελκύει την κασπάση (caspase recruitment domain, CARD), ενώ η παρουσία μιας περιοχής πυρίνης (pyrin domain, PYD) είναι ειδική για την μεγαλύτερη ομάδα που ονομάζεται NLRP. Τέλος, η ομάδα NLRX περιέχει NLRX1, μια πρωτεΐνη που στερείται τόσο την περιοχή PYD όσο και την περιοχή CARD, με μια άτυπη N-τελική περιοχή που περιέχει μία μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης (mitochondrial-targeting sequence) [297, 298]. Η N-τελική περιοχή των NLRs συμμετέχει σε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Από την άποψη αυτή, η παρουσία μιας N-τελικής περιοχής όπως η PYD ή η CARD, μέλη της υπεροικογένειας πρωτεϊνών που περιέχουν στη δομή τους τη δομή δέσμης 6-ελίκων (six-helix death

domain-fold), είναι ζωτικής σημασίας για την σηματοδότηση στο πλαίσιο φλεγμονωδών και αποπτωτικών μονοπατιών μέσω ενεργοποίησης των κασπασών.



Εικόνα 4. Τύποι φλεγμονοσωμάτων [299]

1.4.2.2. NLRs που σχηματίζουν φλεγμονοσώματα

Μετά την ανίχνευση μιας μοριακής δομής PAMP, DAMP ή HAMP, οι NLRs σχηματίζουν φλεγμονοσώματα και διαμεσολαβούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και την έκκριση κυτταροκινών. Ένας αυξανόμενος αριθμός υποδοχέων της οικογένειας NLR έχει δείχθει να σχηματίζει φλεγμονοσώματα (Εικόνα 4). Η συγκρότηση του φλεγμονοσώματος καθοδηγείται από ομότυπες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην περιοχή PYD του υποδοχέα (συνήθως αλλά όχι αποκλειστικά από την οικογένεια NLRP) και της πρωτεΐνης προσαρμοστή ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) η οποία, μέσω αλληλεπιδράσεων περιοχών CARD, προσελκύει την πρόδρομη μορφή της κασπάσης-1 (pro-caspase-1) στο σύμπλεγμα του φλεγμονοσώματος. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1, η οποία πρωτεολύει τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1 β και IL-18 οδηγώντας στην ενεργοποίηση και έκκρισή τους (Εικόνα 5) [300, 301]. Στην περίπτωση των NLRs που περιέχουν μια δομική περιοχή CARD και μια PYD, όπως η πρωτεΐνη NLRP1, ή άλλων NLRs με μια περιοχή CARD όπως το NLRC4, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις

πρωτεΐνες NLR και την πρόδρομη μορφή της κασπάσης-1 είναι δυνατόν, σε ορισμένες περιπτώσεις, να λάβει μέρος απουσία της ASC [302-305].

1.4.2.3 Πρωτεΐνες που σχηματίζουν φλεγμονοσώματα εκτός των NLRs

Τα φλεγμονοσώματα μπορούν να σχηματισθούν επίσης γύρω από πρωτεΐνες που δεν είναι NLRs όπως η AIM2 (Absent In Melanoma-2), μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που δεν ανήκει στην οικογένεια των NLRs. Η AIM2 περιέχει μια περιοχή PYD στο N-τελικό της άκρο και είναι δυνατόν να σχηματίσει ένα φλεγμονόσωμα ως απόκριση στην παρουσία δίκλωνου DNA στο κυτταρόπλασμα [306, 307]. Αυτό συμβαίνει επίσης για τρεις άλλες πρωτεΐνες εκτός των NLRs, την IFI-16 επαγόμενη από την ιντερφερόνη (interferon-inducible protein 16) [308], την RIG-1 επαγώγιμο γονίδιο ρετινοϊκού οξέος I (retinoic acid inducible gene I) [309] και την πυρίνη [309].

1.4.2.4 Ο ρόλος της ASC σε φλεγμονοσώματα

Η ASC, επίσης γνωστή ως PYCARD, είναι μια διμερής πρωτεΐνη με δύο “death-fold” δομικές περιοχές αλληλεπίδρασης, την N-τελική PYD και την C-τελική CARD. Η μοναδική της δομή καθιστά την ASC σημαντική πρωτεΐνη προσαρμοστή που συνδέει πρωτεΐνες με δομικές περιοχές PYD και CARD [309, 310]. Η ASC εντοπίστηκε για πρώτη φορά κυτταροπλασματικά υπό μορφή συσσωματωμάτων που ονομάζονται «στίγματα» (“specks”) στην προμυελοκυτταρική σειρά HL60 που υφίσταται απόπτωση [311]. Τα «στίγματα» ASC έχουν διαστάσεις περίπου 1μm και είναι ορατά στο μικροσκόπιο. Συνήθως ανιχνεύονται ως ένας «κόκκος» ανά κύτταρο κατά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος [312-314]. Οι «κόκκοι» ASC οφείλονται στον ολιγομερισμό των μορίων της ASC μέσω των περιοχών PYD σε νημάτια τα οποία διασυνδέονται από τις περιοχές CARD. Αυτά τα ολιγομερή δημιουργούν θέσεις ενεργοποίησης της κασπάσης-1, ενισχύοντας την σηματοδότηση που διαμεσολαβείται από το φλεγμονόσωμα [315]. Από την άποψη αυτή, ο σχηματισμός «κόκκων» χρησιμοποιείται συχνά ως ένδειξη ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος [314, 316]. Ολιγομερή ASC έχουν εντοπιστεί στον εξωκυττάριο χώρο και στον ορό ασθενών με αυτό-φλεγμονώδη νοσήματα, υποδεικνύοντας ότι η ASC είναι δυνατόν να δράσει και ως «σήμα κινδύνου», ενισχύοντας την φλεγμονώδη απόκριση [317, 318].

1.4.2.5. NLRs εμπλεκόμενα στην φλεγμονή χωρίς τον σχηματισμό φλεγμονοσώματος

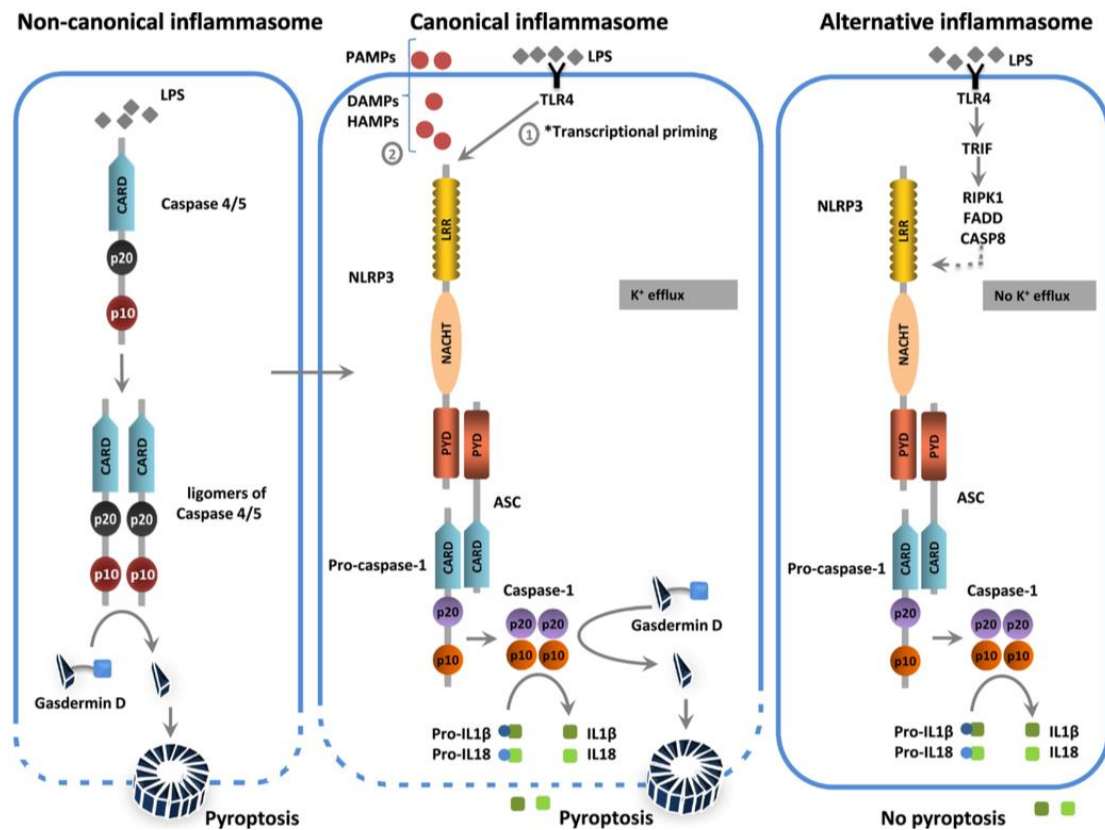
Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, αρκετές πρωτεΐνες NLRs σχηματίζουν φλεγμονοσώματα. Πάντως, μερικά μέλη της οικογένειας NLR όπως οι πρωτεΐνες NOD1/NLRC1, NOD2/NLRC2 και NLRX1 ενεργοποιούν μονοπάτια φλεγμονής μέσω εμπλοκής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor-κB), των MAPKs (mitogen-activated protein kinases) και των IRFs (interferon regulatory factors) χωρίς να συνδέονται με πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα [294]. Η NLRX1 έχει μια ξεχωριστή μιτοχονδριακή εντόπιση [297] και παρ' όλο που η N-τελική περιοχή της δεν είναι ακόμα καλά χαρακτηρισμένη, έχει δείχθει να ρυθμίζει την σηματοδότηση που επάγεται από την ιντερφερόνη και τον NF-κB [298, 319]. Επιπλέον, η NLRX1, σε αλληλεπίδραση με μια άλλη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, την TUFM (mitochondrial Tu translation elongation factor), διήγηρε την επαγωγή της αυτοφαγίας [320] ως απόκριση σε ιική μόλυνση.

1.4.3. Τα κανονικά και μη κανονικά φλεγμονοσώματα

Στο ονομαζόμενο «κανονικό φλεγμονόσωμα» (canonical inflammasome), η κασπάση-1 παίζει κεντρικό ρόλο (Εικόνα 4, μεσαίο πλαίσιο). Ο ολιγομερισμός της κασπάσης-1 που επάγεται από το φλεγμονόσωμα οδηγεί στην ενεργοποίηση και την αυτο-πρωτεόλυσή της με αποτέλεσμα τον σχηματισμό διμερών p20/p10 της κασπάσης-1 που στη συνέχεια συνθέτουν τετραμερή [321, 322]. Τα ενζυμικά ενεργά διμερή πρωτεολύουν στη συνέχεια τις pro-IL-1β και pro-IL-18 στις βιολογικά ενεργές τους μορφές. Και οι δύο κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην συστηματική φλεγμονή λόγω της ικανότητάς τους να δρουν σε διάφορα όργανα στόχους και να επάγουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την φλεγμονώδη αντίδραση [323-325]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος οδηγεί σε μια ξεχωριστή μορφή κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται πυρόπτωση. Η επαγωγή της πυρόπτωσης δείχτηκε πρόσφατα να συνδέεται με την gasdermin-D (GSDMD), μια πρωτεΐνη που σχηματίζει πόρους στις μεμβράνες [326, 327]. Η πρωτεόλυση της GSDMD από κασπάση-1 ελευθερώνει την προ-πυροπρωτική N-τελική περιοχή από την κατασταλτική αλληλεπίδραση με την C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Μόλις δημιουργηθεί, η N-τελική περιοχή της GSDMD στοχεύει την κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω της αλληλεπίδρασης της με φωσφολιπίδια όπως οι φωσφορυλιωμένες

φωσφατιδυλινοσιτόλες και η καρδιολιπίνη [327]. Η συσσώρευση και ολιγομερισμός της N-τελικής περιοχής της GSDMD οδηγεί σε σχηματισμό πόρων στην μεμβράνη [328-330]. Η συνεπακόλουθη απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας επιτρέπει την απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο μικρών ενδοκυττάρων μορίων όπως οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και διαφόρων μορίων συναγερμού (alarmins) [291, 331, 332]. Η απελευθέρωση του ενδοκυττάρου περιεχομένου αφ' ενός οδηγεί στην εκκαθάριση των παθογόνων παραγόντων [333, 334], αφετέρου η υπερβολική ενεργοποίηση της πυρόπτωσης είναι δυνατόν να είναι επιζήμια για τον ξενιστή [335].

Η παρατήρηση ότι σε μακροφάγα ποντικού, Gram-αρνητικά βακτήρια επάγουν πυρόπτωση μέσω της κασπάσης-11, χωρίς να απαιτείται η ενεργοποίηση του μονοπατιού NLRP3-ASC-κασπάση-1, άνοιξε τον δρόμο για την ανακάλυψη του μη κανονικού φλεγμονοσώματος που εξαρτάται από την κασπάση-11 [336, 337] (Εικόνα 5, αριστερό πλαίσιο). Στους ανθρώπους, το φλεγμονόσωμα που είναι ανεξάρτητο από τη δράση της κασπάσης-1 χρησιμοποιεί τις φλεγμονώδεις κασπάση-4 και -5, που είναι οι πιο κοντινά ομόλογες πρωτεΐνες στην κασπάση-11 του ποντικού [338]. Η ανίχνευση του LPS ενδοκυττάρια σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα οδηγεί σε πυρόπτωση εξαρτώμενη από την κασπάση-4 [339]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν περιγραφεί σε ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα όπως και σε κερατινοκύτταρα [337, 339-341], υποδηλώνοντας την εμπλοκή των μη-μυελοειδών κυττάρων στην ανίχνευση των παθογόνων. Από τα δομικά στοιχεία του LPS, το συντηρημένο λιπίδιο A είναι το τμήμα που θεωρείται υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του μη-κανονικού φλεγμονοσώματος μέσω της δομικής περιοχής CARD των κασπάσων-4 και -5. Η έκφραση της κασπάσης-4 στους ιστούς είναι πιο ευρεία από αυτήν της κασπάσης-5, υποδηλώνοντας ενδεχομένως κυτταρο-ειδικούς ή ιστο-ειδικούς ρόλους για κάθε κασπάση [342, 343]. Είναι άγνωστο μέχρι στιγμής αν απαιτούνται και οι δύο κασπάσες ή όχι για την ενδοκυττάρια ανίχνευση του LPS. Οι κασπάσες-4/-5 μπορούν να ρυθμίζουν και την έκκριση της IL-1α και άλλων κυτταροκινών σε κάποιους κυτταρικούς τύπους [344]. Οι ενεργές κασπάση-4 και -5 σε ανθρώπους, ή η κασπάση-11 σε ποντίκια, επάγουν επίσης την NLRP3-εξαρτώμενη έκκριση της IL-1β μέσω ενός μηχανισμού που ενεργοποιείται από την πυρόπτωση [345]. Στην περίπτωση αυτή, εγγενείς μηχανισμοί του κυττάρου όπως η εκροή ιόντων καλίου (K^+) [346, 347] ενεργοποιούν την πρωτεΐνη NLRP3, αποκαλύπτοντας έτσι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε κανονικά και μη-κανονικά φλεγμονοσώματα [348].



Εικόνα 5. Οι διαφορετικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος [299]

1.4.4. Το φλεγμονόσωμα NLRP3: ενεργοποίηση και ρύθμιση

Το φλεγμονόσωμα που δημιουργείται γύρω από τον υποδοχέα NLRP3 είναι το πιο μελετημένο μέχρι σήμερα. Το NLRP3 εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα της μυελομονοκυτταρικής σειράς [349-351] και τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του αυξάνονται στα μονοκύτταρα και μακροφάγα κατόπιν έκθεσης σε φλεγμονώδη ερεθίσματα [279]. Η έκφρασή του έχει επίσης αναφερθεί σε B- και T-λεμφοκύτταρα, σε επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν την επιφάνεια της στοματικής κοιλότητας και της γεννητικής οδού, σε κερατινοκύτταρα [352], καθώς και σε χονδροκύτταρα [349].

1.4.4.1. Κλασική ενεργοποίηση

Για τη δημιουργία ενός ενεργού φλεγμονοσώματος, απαιτείται διαδικασία δύο σταδίων (Εικόνα 5, μεσαίο πλαίσιο).

Το πρώτο στάδιο/σήμα, που είναι επίσης γνωστό ως το σήμα εκκίνησης (priming), αποτελείται συνήθως από ένα βακτηριακό συστατικό όπως το LPS που επάγει την μεταγραφή των γονιδίων *NLRP3* και *IL-1 β* . Η βασική έκφραση του NLRP3 δεν είναι αρκετή για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος σε κύτταρα εν ηρεμία. Έχειδειχτεί ότι το ποσό του mRNA του *NLRP3* ρυθμίζεται αυστηρά από το

μυελο-ειδικό microRNA-223 (miR-223) που εκφράζεται σε μονοκύτταρα και οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης NLRP3, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο το κατώφλι ενεργοποίησης του NLRP3 [353]. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του NLRP3 όπως οι τροποποιήσεις με ουβικιτίνη έχουν επίσης αναφερθεί ότι ρυθμίζουν το NLRP3 [354-357]. Οι Juliana et al. έδειξαν ότι, σε μακροφάγα ποντικού, η σηματοδότηση μέσω του TLR οδηγεί στο priming του Nlrp3 μέσω ενεργοποίησης της απο-ουβικιτινυλίσής του, που εξαρτάται από τις μιτοχονδριακές ενεργές μορφές οξυγόνου ROS. Το ATP είναι δυνατόν επίσης να επάγει την απο-ουβικιτινυλίωση του NLRP3 μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου των ROS [354]. Το Brcc3 ταυτοποιήθηκε ως μια απο-ουβικιτίνη στο ποντίκι, η οποία ρυθμίζει τον Nlrp3 μέσω αλληλεπίδρασης με την ουβικιτινυλιωμένη δομική περιοχή LRR του Nlrp3 [356]. Επιπλέον, η E3 λιγάση της ουβικιτίνης Trim 31 (E3 ubiquitin ligase Trim 31) μείωνει την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος Nlrp3 μέσω πρωτεοσωμικής αποδόμησης του Nlrp3 τόσο σε απενεργοποιημένα όσο και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα από ποντικό [357].

Το δεύτερο σήμα προωθεί την σύνδεση των συστατικών του φλεγμονοσώματος έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα λειτουργικό φλεγμονόσωμα, με μετάφραση και έκκριση της ώριμης μορφής της IL-1β [358]. Το δεύτερο σήμα είναι δυνατόν να ανήκει στην κατηγορία των PAMPS, DAMPs or HAMPs. Διάφοροι ενεργοποιητές του φλεγμονοσώματος NLRP3 έχουν ήδη ταυτοποιηθεί, όπως τα Gram-θετικά (όπως *Staphylococcus aureus* και Group B *Streptococcus*) και τα Gram-αρνητικά βακτήρια (όπως *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli*, ή *Vibrio cholerae*), ιοί (όπως ο ιός της Influenza), η βακτηριακή τοξίνη nigericin, τοξίνες που σχηματίζουν πόρους (pore-forming toxins) όπως η hemolysin και η pneumolysin, περιβαλλοντικά nanoparticles όπως πυρίτιο, άσβεστος ή στύψη, και μόρια που απελευθερώνονται από νεκρά κύτταρα όπως ATP, β-αμυλοειδές, μονονατριούχο ουρικό άλας (MSU) και κρύσταλλοι χοληστερόλης [299]. Πως ακριβώς όλα αυτά τα διαφορετικά σήματα κινδύνου πυροδοτούν τον ίδιο αισθητήρα του φλεγμονοσώματος παραμένει ασαφές. Οι σημαντικές διαφορές στην δομή τους υποδηλώνουν ότι το NLRP3 τα αντιλαμβάνεται έμμεσα. Σήματα κυτταρικού stress ή αλλαγές στην ομοιόσταση θεωρούνται ως ενδιάμεσα σήματα που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NLRP3 [283, 359]. Ο πιο επικρατής μηχανισμός ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος αφορά τις αλλαγές στη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού K⁺ [360, 361]. Υπό αυτήν την άποψη, μόρια DAMPs όπως το ATP, τα οποία εμπλέκουν τον πουρινεργικό υποδοχέα P2X7, ή

τοξίνες που σχηματίζουν πόρους (pore-forming toxins), επάγουν την εκροή του K^+ από το κυτταρόπλασμα [362, 363]. Μειωμένα επίπεδα ενδοκυττάριου K^+ πυροδοτούν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3. Ένας δεύτερος μηχανισμός αφορά την κρυσταλλική ή την σωματιδιακή δομή των DAMPs (όπως τα συσσωματώματα των β -αμυλοϊδών, το MSU και οι κρύσταλλοι χοληστερόλης) τα οποία, αφού φαγοκυτταρωθούν από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, επάγουν την λυσοσωμική διόγκωση και καταστροφή [364-367]. Η επακόλουθη απελευθέρωση των λυσοσωμικών πρωτεασών, όπως η καθεψίνη B, ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα NLRP3. Ένας τρίτος μηχανισμός υποδηλώνει έναν σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 [368-372]. Τα μιτοχονδριακά ROS ενεργοποιούν την πρωτεΐνη TXNIP (thioredoxin-interacting protein) που, με τη σειρά της, προσδένεται και ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα NLRP3 [373]. Εκτός από τη δημιουργία ROS, η κίνηση των μιτοχονδρίων κατά μήκος των μικροσωλινίσκων [374], η αλλαγή στην μιτοχονδριακή επιμήκυνση (elongation) και σχάση (fission) [375] και η ελαττωματική μιτοφαγία [376] μπορούν επίσης να ρυθμίσουν την ενεργοποίηση του φλεγμονώματος NLRP3. Ένας τέταρτος μηχανισμός συνδέει την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 με τις διαταραχές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου. Η πρωτεΐνη ομόλογη του μεταγραφικού παράγοντα C/EPB (C/EPB homologous protein, CHOP, γνωστή και ως DDIT3), που ρυθμίζει την κινητοποίηση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), ενισχύει την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος σε μακροφάγα από ποντικό που έχουν ευαισθητοποιηθεί με LPS, συνδέοντας το ER stress με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 [377]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα αισθητήρα ασβεστίου CASR (calcium-sensing receptor) ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα NLRP3 μέσω αυξημένης συγκέντρωσης ενδοκυττάριου ασβεστίου ή μειωμένης συγκέντρωσης cAMP, αυτή η ενεργοποίηση σχετίζεται με την φωσφολιπάση C η οποία, μέσω παραγωγής IP3 (inositol-1,4,5-trisphosphate) επάγει την απελευθέρωση του ασβεστίου από το ER, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NLRP3 [378]. Το ενδοκυττάριο ασβέστιο είναι σημαντικό για την αυθόρμητη έκκριση της IL-1 β σε κύτταρα από ασθενείς με σύνδρομο CAPS [378]. Επιπλέον, το εξωκυττάριο ασβέστιο είναι δυνατόν να λειτουργήσει επίσης ως DAMP και να επάγει την ενεργοποίηση του NLRP3 [379].

1.4.4.2. Εναλλακτική ενεργοποίηση

Πρόσφατα, μελέτη σε ανθρώπινα μονοκύτταρα αποκάλυψε ένα εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3 που οδηγεί στην έκκριση της IL-1β από ζωντανά κύτταρα [380]. Παρ' όλο που το εναλλακτικό φλεγμονόσωμα ενεργοποιεί το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα NLRP3-ASC-κασπάση-1, δεν εμφανίζει χαρακτηριστικά κλασικού φλεγμονοσώματος όπως η πυρόπτωση, και δεν εξαρτάται από εκκροή K^+ (Εικόνα 5, δεξιό πλαίσιο). Στο εναλλακτικό μονοπάτι ο άξονας του TLR-4 (TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-CASP8), που σηματοδοτεί πριν (upstream) το NLRP3, είναι σημαντικός για τις IL-1β αποκρίσεις σε ανθρώπινα μονοκύτταρα [381]. Πρόσθετες μελέτες υποστηρίζουν ένα εναλλακτικό φλεγμονόσωμα NLRP3. Η οξειδωμένη 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (oxPAPC), ένα συχνά απαντώμενο στην φλεγμονή οξειδωμένο λιπίδιο και μόριο καταστροφής (damage molecule) που μιμείται το LPS, είναι δυνατόν να επάγει σε δενδριτικά κύτταρα ποντικού την έκκριση της IL-1β μέσω φλεγμονοσώματος Nlrp3 εξαρτώμενου από την κασπάση-11, χωρίς να επάγει πυρόπτωση [382]. Το σάκχαρο N-acetylglucosamine (NAG), μια δομική μονάδα της πεπτιδογλυκάνης που βρίσκεται στην επιφάνεια των βακτηρίων Gram-θετικών, επάγει την έκκριση της IL-1β ανεξάρτητα από την εκκροή K^+ και πυρόπτωση, γεγονός που υποστηρίζει το εναλλακτικό φλεγμονόσωμα NLRP3. Η παρουσία του NAG στο κυτταρόπλασμα ανιχνεύεται από το γλυκολυτικό ένζυμο εξωκινάση. Μετά την ανίχνευση του NAG, η εξωκινάση αναστέλεται και αποσυνδέεται από την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, γεγονός το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και την έκκριση της IL-1β [383]. Επομένως, η εξωκινάση λειτουργεί ως υποδοχέας αναγνώρισης μοριακού προτύπου (pattern recognition receptor) ενημερώνοντας το κύτταρο για την παρουσία μικροβιακών προϊόντων στα φαγοσώματα, υποδηλώνοντας έτσι την αλληλεπίδραση μεταξύ του μεταβολισμού και της ανίχνευσης των παθογόνων.

1.4.4.3. Το φλεγμονόσωμα NLRP3 σε μονογονιδιακά αυτοφλεγμονώδη νοσήματα

Στις αρχές του 2000, πριν την ανακάλυψη του ρόλου του NLRP3 στο φλεγμονόσωμα, γενετικές μεταλλάξεις βλαστικής σειράς στο γονίδιο *NLRP3* (επίσης γνωστό ως *PYPAF1* ή *CIAS1*), που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται κρυοπυρίνη (cryopyrin), έχουν εμπλακεί σε δύο αυτοσωματικές επικρατούσες διαταραχές: το οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο εκ ψύχους (FCAS; OMIM

#120100) και το σύνδρομο Muckle-Wells (MWS; OMIM #191900) [350]. Στην συνέχεια, μεταλλάξεις στο γονίδιο *NLRP3* ταυτοποιήθηκαν επίσης στην Νεογνικής έναρξης πολυσυστημική φλεγμονώδη νόσο (Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease, NOMID), επίσης γνωστή ως Χρόνιο βρεφικό, νευρολογικό, δερματικό και αρθρικό σύνδρομο (Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular syndrome, CINCA; OMIM #607115) [349, 384]. Και οι τρεις αυτές διαταραχές που προκαλούνται από μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στο γονιδίου *NLRP3* ονομάζονται σήμερα Περιοδικά σύνδρομα που σχετίζονται με την κρυοπυρίνη (Cryopyrin- Associated Periodic Syndromes, CAPS) ή κρυοπυρινοπάθειες, και αποτελούν μέρος του φάσματος της ίδιας νόσου. Τα κύρια κλινικά συμπτώματα είναι πυρετός, κνηδωτικό εξάνθημα, αρθραλγίες, νευροαισθητηριακή βαρηκοΐα και πιθανόν αμυλοείδωση Α. Σε ότι αφορά το FCAS και το MWS υπάρχει συνήθως ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό, ενώ το NOMID είναι συνήθως σποραδικό και σχετίζεται με *de novo* μεταλλάξεις του *NLRP3*. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με CAPS είναι missense παραλλαγές που βρίσκονται στην δομική περιοχή NACHT του *NLRP3*. Ωστόσο, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου, καθώς μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν το ίδιο αμινοξικό κατάλοιπο είναι δυνατόν να συνδέονται είτε με έναν σοβαρό είτε με έναν ήπιο φαινότυπο. Επιπλέον, έχειδειχτεί ότι το NOMID και το MWS είναι δυνατόν να οφείλονται σε μεταζυγωτικές μεταλλάξεις μωσαϊκού του *NLRP3* και έχουν βρεθεί σε κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα [385-388]. Σωματικές μεταλλάξεις του *NLRP3* έχουν αναφερθεί σε λίγους ασθενείς που εμφάνισαν CAPS σε μεγαλύτερη ηλικία, πιθανώς λόγω εμφάνισης αργότερα μιας μετάλλαξης στα κύτταρα στόχους της νόσου [389, 390].

Τα PBMCs ασθενών με CAPS χαρακτηρίζονται από μόνιμα ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα, όπως αποκαλύπτεται από τα υψηλά επίπεδα της IL-1β στο υπερκείμενο [391]. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα μονοκύτταρα που έχουν μεταλλάξεις που σχετίζονται με CAPS εκκρίνουν IL-1β χωρίς προηγούμενη διέγερση. Τα προσκολλημένα μονοκύτταρα από υγιείς δότες απαιτούν 24ωρη επώαση με LPS για να εκκρίνουν IL-1β, ενώ η κινητική της έκκρισης της IL-1β από μονοκύτταρα ασθενών με CAPS είναι πιο ταχεία, ακόμα και μετά από μια σύντομη 2ωρη επώαση [392]. Ο προτεινόμενος βασικός μηχανισμός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος σχετίζεται με το γεγονός ότι αρκετές μεταλλάξεις στην περιοχή NACHT της πρωτεΐνης παρεμποδίζουν την καταστολή του *NLRP3* που συνήθως

επιτυγχάνεται με σηματοδοτικά μόρια όπως το ενδοκυτταροπλασματικό cAMP [378]. Πράγματι, υψηλά επίπεδα του cAMP έχουνδειχθεί ότι αναστέλουν το NLRP3 με τουλάχιστον 2 μηχανισμούς: (i) μέσω της ουβικιτινυλίωσης του NLRP3 και επακόλουθη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης [393], και (ii) μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A που με την σειρά της φωσφορυλιώνει την Σερίνη 295 (Ser295) που εντοπίζεται στη δομική περιοχή NACHT, αναστέλοντας έτσι την δραστικότητα ATPάσης του NLRP3 που απαιτείται για την συγκρότηση του συμπλόκου NLRP3-ASC. Παρ' όλο που οι πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων του *NLRP3* στην ουβικιτινυλίωση της κρυοπυρίνης πρέπει ακόμα να αξιολογηθούν, αρκετές μεταλλάξεις CAPS έχουνδειχθεί να παρεμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της Σερίνης 295 [394]. Πρόσφατα, η πρωτεΐνη NEK7, μέλος των NIMA (Never In Mitosis gene A)-σχετιζόμενων κινασών, έχειδειχθεί ως σημαντικός παράγοντας που μεσολαβεί στον ολιγομερισμό του NLRP3 και στο σχηματισμό των στιγμάτων ASC μετά την εκροή ιόντων K^+ [395-397]. Από αυτήν την άποψη, τα μακροφάγα από ποντικό που έχουν την συνδεόμενη με το CAPS μετάλλαξη p.R258W (p.R260W στον άνθρωπο) με φαινότυπο Muckle-Wells δεν χρειάζονται εκροή K^+ για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος [398], αλλά απαιτούν την NEK7 για την ενεργοποίηση της κασπάσης-1, υποδηλώνοντας ότι στην παρουσία αυτής της μετάλλαξης το NLRP3 συνδέεται με την NEK7 στην απουσία της εκροής K^+ [395].

1.4.4.4. Το NLRP3 σε πολυπαραγοντικά χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα

Μεταβολικά DAMPs έχουνδειχθεί να ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα NLRP3 σε πολυπαραγοντικά χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα όπως η νόσος Alzheimer's, ο διαβήτης τύπου 2 (T2D), η παχυσαρκία, η αρθρίτιδα και η αθηροσκλήρυνση [399-408].

Ενώ η εμπλοκή των μεταλλάξεων του *NLRP3* σε αυτοφλεγμονώδη νοσήματα έχει αποσαφινιστεί, ωστόσο, σε ότι αφορά τα χρόνια αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα δεν έχει σαφώς αποδειχθεί μια συσχέτιση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς του *NLRP3* και την προδιάθεση για την ανάπτυξη αυτών των νοσημάτων [409].

1.4.4.5. Το φλεγμονόσωμα NLRP3 στο σύνδρομο Sjögren

Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν έναν ρόλο του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην παθογένεση του σS.

Ο P2X7R (υποδοχέας P2X7) είναι ένας πουρινεργικός υποδοχέας που δρα σαν ένα κανάλι ιόντων ATP-gated και παίζει ρόλο στην ρύθμιση της φλεγμονής. Η έκφραση του mRNA τόσο του P2X7R όσο και των συστατικών του φλεγμονοσώματος NLRP3, ASC και κασπάση-1 περιγράφηκε σημαντικά υψηλότερη στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ αντιστοιχούσε σε μια αυξημένη έκφραση της IL-18 στο σάλιο των ασθενών με σS. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης τους συσχετίστηκαν με τον βαθμό διήθησης (focus score) των σιελογόνων αδένων και την παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων [242]. Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση του P2X7R και των συστατικών του φλεγμονοσώματος NLRP3, κασπάση-1 και IL-18 στους σιελογόνους αδένες ασθενών με σS ήταν αυξημένη στην παρουσία των βλαστικών κέντρων και υψηλότερη σε άτομα θετικά για αυτο-αντισώματα και σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς που ανέπτυξαν κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης λέμφωμα MALT-NHL. Μια συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ της αυξημένης έκφρασης τόσο του P2X7R όσο και των συστατικών του φλεγμονοσώματος και παρουσίας μερικών από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη λεμφώματος, συμπεριλαμβανομένων των χαμηλών επιπέδων του συμπληρώματος C4 στον ορό και της διόγκωσης των σιελογόνων αδένων. Η αύξηση στην έκφραση του γονιδίου και της πρωτεΐνης P2X7R ήταν ιστοειδική, καθώς δεν εντοπίστηκε καμία διαφορά στα περιφερικά λεμφομονοκύτταρα ανάμεσα στους ασθενείς με σS και λέμφωμα MALT-NHL και τους ασθενείς με σS χωρίς λέμφωμα MALT-NHL [218]. Επακολούθως, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν μια συμμετοχή του άξονα P2X7R-φλεγμονόσωμα NLRP3-κασπάση-1-IL-18 τόσο στην εξωκρινοπάθεια όσο και την λεμφοματογένεση στο πλαίσιο του σS.

Ο ρόλος του P2X7R στην παθογένεση του σS επιβεβαιώνεται με την ταυτοποίηση ενός απλοτύπου κέρδους-λειτουργίας του γονιδίου P2X7R (1405G) ο οποίος αποτέλεσε παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη οροθετικού σS και παρουσίασε μια αρνητική επιστατική αλληλεπίδραση με το HLA-DR3, κύριο γενετικό παράγοντα κινδύνου για σS [218]. Σημαντική αύξηση της έκφρασης του P2X7R στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος μετά από διέγερση με ATP παρατηρήθηκε σε ασθενείς με σS σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αύξηση η οποία συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα της IL-1β στο υπερκείμενο των κυττάρων. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του P2X7R συσχετίστηκαν θετικά με τους βαθμούς άγχους και κατάθλιψης στους ασθενείς με σS, οδηγώντας στην υπόθεση ότι ο P2X7R

είναι δυνατόν να εμπλέκεται στην παθογένεση των ψυχιατρικών διαταραχών, αποτελώντας έναν σύνδεσμο μεταξύ του νευρικού και το ανοσοποιητικού συστήματος [410]. Σε καλλιιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα από υπογνάθιο αδένες ποντικού, η ενεργοποίηση του P2X7R επάγει επίσης την συγκρότηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και την ωρίμανση και απελευθέρωση της IL-1 β , απόκριση η οποία είναι απύσα στα επιθηλιακά κύτταρα από υπογνάθιο αδένες ποντικού με έλωση P2X7Rs (P2X7R $^{-/-}$). Η διαμεσολαβούμενη από τον P2X7R έκκριση της IL-1 β από τα επιθηλιακά κύτταρα εξαρτάται από την διαμεμβρανική ροή Na $^{+}$ και/ή K $^{+}$ και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης HSP90 (heat shock protein 90), ενώ μιτοχονδριακές ROS απαιτούνται για την διαμεσολαβούμενη από τον P2X7R έκκριση της IL-1 β . Τέλος, η *in vivo* χορήγηση του ανταγωνιστή A438079 του P2X7R σε ένα CD28 $^{-/-}$, IFN γ $^{-/-}$, NOD.H-2h4 ζωικό πειραματικό πρότυπο ποντικού εξωκρινολάθειας των σιελογόνων αδένων βελτίωσε την φλεγμονή των σιελογόνων αδένων και αύξησε την έκκριση σάλιου που επάγεται από καρβαχόλη. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι το μπλοκάρισμα του P2X7R *in vivo* αποτελεί μια υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για τον περιορισμό της φλεγμονής των σιελογόνων αδένων και την βελτίωση της εκκριτικής τους λειτουργίας [411].

Επιπλέον, οι ασθενείς με σS παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση mRNA των IL-1 β , κασπάση-1 και ASC καθώς επίσης της ώριμης IL-1 β και της κασπάσης-1 σε PBMCs σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Στους ασθενείς με σS, τα επίπεδα mRNA και της πρωτεΐνης IL-1 β συσχετίστηκαν με τα επίπεδα mRNA του NLRP3. Οι βαθμοί SSDDI (SS Disease Damage Index) συσχετίστηκαν σημαντικά με τα επίπεδα πρωτεΐνης IL-18 [412].

Εκτός από τους σιελογόνους αδένες, πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ένα ρόλο για το φλεγμονόσωμα NLRP3 στην έναρξη και την ανάπτυξη της φλεγμονής στην ξηροφθαλμία. Η έκφραση σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης του NLRP3 καθώς και της κασπάσης-1 και των IL-1 β και IL-18 βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με ξηροφθαλμία σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ειδικά στους ασθενείς με σS [413].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Manoussakis, M.N., N. Talal, and H.M. Moutsopoulos, Sjogren's syndrome, in *The Autoimmune Diseases*. 1998, Academic Press: San Diego. p. 381-404.
2. Hadden, W.B., On "dry mouth" or suppression of the salivary and buccal secretions, in *Trim. Clin. Soc.* 1888: London. p. 176-182.
3. Mikulitz, J., Ueber eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Thränen und Mundspeicheldrüsen. *Beitr. Chir. Festschrift. Billroth.*, 1892(2): p. 610-630.
4. Gougerot, H., Insuffisance progressive et atrophie des glandes salivaires et muqueuses de la bouche, des conjunctives (et parfois des muqueuses nasale, laryngee, vulvaire), secheresse de la bouche, des conjunctives, etc. *Bull. Soc. Fr. Dermatol. Syphilligr.*, 1925(32): p. 376-379.
5. Sjogren, H., Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis filiformis bei hypofunktion der Tranendrüsen). *Acta Ophtalmol.*, 1933(11): p. 11-51.
6. Andonopoulos, A.P., et al., Secondary Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1987. **14**(6): p. 1098-103.
7. Andonopoulos, A.P., et al., Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis and progressive systemic sclerosis. A comparative study. *Clin Exp Rheumatol*, 1989. **7**(2): p. 203-5.
8. Drosos, A.A., et al., Sjogren's syndrome in patients with the CREST variant of progressive systemic scleroderma. *J Rheumatol*, 1991. **18**(11): p. 1685-8.
9. Andonopoulos, A.P., et al., Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 1990. **17**(2): p. 201-4.
10. Manoussakis, M.N., et al., Sjogren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(3): p. 882-91.
11. Tsianos, E.V., et al., Sjogren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 1990. **11**(5): p. 730-4.
12. Miro, J., et al., Prevalence of primary Sjogren's syndrome in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1990. **27**(5): p. 582-4.
13. Sandberg-Wollheim, M., et al., Primary Sjogren's syndrome in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 1992. **42**(4): p. 845-7.
14. Patel, R. and A. Shahane, The epidemiology of Sjogren's syndrome. *Clin Epidemiol*, 2014. **6**: p. 247-55.
15. Manthorpe, R., K. Asmussen, and P. Oxholm, Primary Sjogren's syndrome: diagnostic criteria, clinical features, and disease activity. *J Rheumatol Suppl*, 1997. **50**: p. 8-11.

16. Manoussakis, M.N. and H.M. Moutsopoulos, Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2000. **14**(1): p. 73-95.
17. Goules, A.V., et al., Clinically significant renal involvement in primary Sjogren's syndrome: clinical presentation and outcome. *Arthritis Rheum*, 2013. **65**(11): p. 2945-53.
18. Harley, J.B., Autoantibodies in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 1989. **2**(4): p. 383-94.
19. Jacobsson, L.T., et al., Dry eyes or mouth--an epidemiological study in Swedish adults, with special reference to primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 1989. **2**(4): p. 521-7.
20. Manoussakis, M.N., et al., Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. *Br J Rheumatol*, 1993. **32**(6): p. 449-55.
21. Voulgarelis, M. and H.M. Moutsopoulos, Lymphoproliferation in autoimmunity and Sjogren's syndrome. *Curr Rheumatol Rep*, 2003. **5**(4): p. 317-23.
22. Schmid, U., D. Helbron, and K. Lennert, Development of malignant lymphoma in myoepithelial sialadenitis (Sjogren's syndrome). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1982. **395**(1): p. 11-43.
23. Moutsopoulos, H.M., et al., Sjogren's syndrome (Sicca syndrome): current issues. *Ann Intern Med*, 1980. **92**(2 Pt 1): p. 212-26.
24. Tzioufas, A.G., et al., Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(5): p. 767-72.
25. Kassan, S.S., et al., Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med*, 1978. **89**(6): p. 888-92.
26. Nezos, A. and C.P. Mavragani, Contribution of Genetic Factors to Sjogren's Syndrome and Sjogren's Syndrome Related Lymphomagenesis. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 754825.
27. Nocturne, G. and X. Mariette, Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. **9**(9): p. 544-56.
28. Teos, L.Y. and I. Alevizos, Genetics of Sjogren's syndrome. *Clin Immunol*, 2017. **182**: p. 41-47.
29. Burbelo, P.D., K. Ambatipudi, and I. Alevizos, Genome-wide association studies in Sjogren's syndrome: What do the genes tell us about disease pathogenesis? *Autoimmun Rev*, 2014. **13**(7): p. 756-61.
30. Lessard, C.J., et al., Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet*, 2013. **45**(11): p. 1284-92.

31. Miceli-Richard, C., et al., Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(12): p. 3989-94.
32. Nordmark, G., et al., Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun*, 2009. **10**(1): p. 68-76.
33. Lien, C., et al., Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(10): p. 4664-8.
34. Wang, J., et al., NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication. *J Immunol*, 2010. **185**(3): p. 1720-9.
35. Nocturne, G., et al., Germline and somatic genetic variations of TNFAIP3 in lymphoma complicating primary Sjogren's syndrome. *Blood*, 2013. **122**(25): p. 4068-76.
36. Li, H., et al., Identification of a Sjogren's syndrome susceptibility locus at OAS1 that influences isoform switching, protein expression, and responsiveness to type I interferons. *PLoS Genet*, 2017. **13**(6): p. e1006820.
37. Charras, A., et al., Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2017. **76**(3): p. 625-628.
38. Imgenberg-Kreuz, J., et al., Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis*, 2016. **75**(11): p. 2029-2036.
39. Alevizos, I., et al., MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(2): p. 535-44.
40. Reale, M., et al., MicroRNA in Sjogren's Syndrome: Their Potential Roles in Pathogenesis and Diagnosis. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 7510174.
41. Hjelmervik, T.O., et al., Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(5): p. 1534-44.
42. Gottenberg, J.E., et al., Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006.
43. Mariette, X., et al., Hepatitis C virus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1993. **36**(2): p. 280-1.
44. Kordossis, T., et al., Prevalence of Sjogren's-like syndrome in a cohort of HIV-1-positive patients: descriptive pathology and immunopathology. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(6): p. 691-5.

45. Shillitoe, E.J., et al., Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjogren's syndrome. As determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum*, 1982. **25**(3): p. 260-5.
46. Venables, P.J., et al., A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. *Ann Rheum Dis*, 1985. **44**(11): p. 742-6.
47. Fox, R.I., G. Pearson, and J.H. Vaughan, Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 1986. **137**(10): p. 3162-8.
48. Saito, I., et al., Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Exp Med*, 1989. **169**(6): p. 2191-8.
49. Talal, N., et al., Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjogren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(6): p. 774-81.
50. Brookes, S.M., et al., The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br J Rheumatol*, 1992. **31**(11): p. 735-42.
51. Saito, I., et al., Detection of Epstein-Barr virus and human herpes virus type 6 in saliva from patients with lymphoproliferative diseases by the polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol*, 1991. **36**(11): p. 779-84.
52. Shattles, W.G., et al., Expression of antigen reactive with a monoclonal antibody to HTLV-1 P19 in salivary glands in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1992. **89**(1): p. 46-51.
53. Couty, J.P., et al., Study of HHV-8 in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 1997. **15**(3): p. 333-4.
54. Triantafyllopoulou, A., N. Tapinos, and H.M. Moutsopoulos, Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(9): p. 2897-902.
55. Leimola-Virtanen, R., et al., Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas*, 2000. **36**(2): p. 131-7.
56. Tsinti, M., et al., Functional estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects. *Eur J Oral Sci*, 2009. **117**(5): p. 498-505.
57. Kassi, E., et al., Oestrogen receptors in cultured epithelial cells from salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)*, 2003. **42**(9): p. 1120-2.

58. Manoussakis, M.N., et al., The salivary gland epithelial cells of patients with primary Sjogren's syndrome manifest significantly reduced responsiveness to 17beta-estradiol. *J Autoimmun*, 2012. **39**(1-2): p. 64-8.
59. Manoussakis, M.N. and E.K. Kapsogeorgou, The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010. **35**(3): p. 219-24.
60. Vakrakou, A.G., et al., Perturbation of transcriptome in non-neoplastic salivary gland epithelial cell lines derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Data Brief*, 2018. **17**: p. 194-199.
61. Vakrakou, A.G., et al., Impaired anti-inflammatory activity of PPARgamma in the salivary epithelia of Sjogren's syndrome patients imposed by intrinsic NF-kappaB activation. *J Autoimmun*, 2018. **86**: p. 62-74.
62. DiGiuseppe, J.A., R.L. Corio, and W.H. Westra, Lymphoid infiltrates of the salivary glands: pathology, biology and clinical significance. *Curr Opin Oncol*, 1996. **8**(3): p. 232-7.
63. Moutsopoulos, H.M., Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **72**(2): p. 162-5.
64. Goules, A.V., E.K. Kapsogeorgou, and A.G. Tzioufas, Insight into pathogenesis of Sjogren's syndrome: Dissection on autoimmune infiltrates and epithelial cells. *Clin Immunol*, 2017. **182**: p. 30-40.
65. Konsta, O.D., et al., Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjogren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun*, 2016. **68**: p. 30-8.
66. Ohlsson, M., R. Jonsson, and K.A. Brokstad, Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*, 2002. **56**(5): p. 456-69.
67. Kapsogeorgou, E.K., et al., Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(5): p. 1517-21.
68. Ping, L., N. Ogawa, and S. Sugai, Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(2): p. 573-81.
69. Ittah, M., et al., Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 1058-64.
70. Kyriakidis, N.C., et al., Toll-like receptor 3 stimulation promotes Ro52/TRIM21 synthesis and nuclear redistribution in salivary gland epithelial cells, partially via type I interferon pathway. *Clin Exp Immunol*, 2014. **178**(3): p. 548-60.

71. Spachidou, M.P., et al., Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(3): p. 497-503.
72. Manoussakis, M.N., M.P. Spachidou, and C.I. Maratheftis, Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun*, 2010. **35**(3): p. 212-8.
73. Varin, M.M., et al., In Sjogren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(4): p. 252-8.
74. Thabet, Y., et al., Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun*, 2013. **41**: p. 175-81.
75. Gallo, A., et al., Targeting the Ca(2+) Sensor STIM1 by Exosomal Transfer of Ebv-miR-BART13-3p is Associated with Sjogren's Syndrome. *EBioMedicine*, 2016. **10**: p. 216-26.
76. Sisto, M., et al., Sjogren's syndrome pathological neovascularization is regulated by VEGF-A-stimulated TACE-dependent crosstalk between VEGFR2 and NF-kappaB. *Genes Immun*, 2012. **13**(5): p. 411-20.
77. Jonsson, R., et al., Progression of sialadenitis in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol*, 1993. **32**(7): p. 578-81.
78. Skopouli, F.N., et al., T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 1991. **18**(2): p. 210-4.
79. Christodoulou, M.I., E.K. Kapsogeorgou, and H.M. Moutsopoulos, Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010. **34**(4): p. 400-7.
80. Salomonsson, S., et al., Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(11): p. 3187-201.
81. Stott, D.I., et al., Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*, 1998. **102**(5): p. 938-46.
82. Aziz, K.E., P.J. McCluskey, and D. Wakefield, Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjogren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles. *Ann Rheum Dis*, 1997. **56**(2): p. 140-3.
83. Barone, F., et al., Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(6): p. 1773-84.

84. Bombardieri, M., et al., Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther*, 2004. **6**(5): p. R447-56.
85. Kapsogeorgou, E.K., et al., Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol*, 2013. **40**(9): p. 1566-71.
86. Moutsopoulos, H.M. and N. Talal, New developments in Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 1989. **1**(3): p. 332-8.
87. Dalavanga, Y.A., A.A. Drosos, and H.M. Moutsopoulos, Labial salivary gland immunopathology in Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1986. **61**: p. 67-70.
88. St Clair, E.W., J.C. Angellilo, and K.H. Singer, Expression of cell-adhesion molecules in the salivary gland microenvironment of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(1): p. 62-6.
89. Fox, R.I., A.N. Theofilopoulos, and A. Altman, Production of interleukin 2 (IL 2) by salivary gland lymphocytes in Sjogren's syndrome. Detection of reactive cells by using antibody directed to synthetic peptides of IL 2. *J Immunol*, 1985. **135**(5): p. 3109-15.
90. Alpert, S., et al., Expression of granzyme A in salivary gland biopsies from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(7): p. 1046-54.
91. Alunno, A., et al., CD4CD8 T-cells in primary Sjogren's syndrome: Association with the extent of glandular involvement. *J Autoimmun*, 2014.
92. Boumba, D., F.N. Skopouli, and H.M. Moutsopoulos, Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol*, 1995. **34**(4): p. 326-33.
93. Konttinen, Y.T., et al., Role of nitric oxide in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(5): p. 875-83.
94. Fox, R.I., et al., Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 1994. **152**(11): p. 5532-9.
95. Oxholm, P., T.E. Daniels, and K. Bendtzen, Cytokine expression in labial salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome. *Autoimmunity*, 1992. **12**(3): p. 185-91.
96. Xanthou, G., et al., CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1999. **118**(1): p. 154-63.
97. Gliozzi, M., et al., A link between interferon and augmented plasmin generation in exocrine gland damage in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2013. **40**: p. 122-33.
98. Roescher, N., P.P. Tak, and G.G. Illei, Cytokines in Sjogren's syndrome. *Oral Dis*, 2009. **15**(8): p. 519-26.

99. Mitsias, D.I., et al., The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2002. **128**(3): p. 562-8.
100. Verstappen, G.M., et al., Th17 cells in primary Sjogren's syndrome: Pathogenicity and plasticity. *J Autoimmun*, 2018. **87**: p. 16-25.
101. Ciccia, F., et al., Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(2): p. 295-301.
102. Bikker, A., et al., Increased interleukin (IL)-7R α expression in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(6): p. 1027-33.
103. Wei, L., et al., IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
104. Kwok, S.K., et al., A pathogenetic role for IL-21 in primary Sjogren syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. **11**(6): p. 368-74.
105. Christodoulou, M.I., et al., Foxp3⁺ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol*, 2008. **173**(5): p. 1389-96.
106. Gottenberg, J.E., et al., CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2005. **24**(3): p. 235-42.
107. Alunno, A., et al., Characterization of a new regulatory CD4⁺ T cell subset in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. **52**(8): p. 1387-96.
108. Alunno, A., et al., IL-17-producing CD4⁺CD8⁻ T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2013. **72**(2): p. 286-92.
109. Skopouli, F.N., et al., Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*, 2000. **29**(5): p. 296-304.
110. Deacon, E.M., et al., Expression of rheumatoid factor associated cross-reactive idiotopes by glandular B cells in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1991. **83**(2): p. 280-5.
111. Fox, R.I., et al., Expression of a cross-reactive idiotype on rheumatoid factor in patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 1986. **136**(2): p. 477-83.
112. Halse, A., et al., Ro/SS-A-reactive B lymphocytes in salivary glands and peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1999. **115**(1): p. 203-7.
113. Matthews, J.B., et al., Plasma cell populations in labial salivary glands from patients with and without Sjogren's syndrome. *Histopathology*, 1993. **23**(5): p. 399-407.

114. Salomonsson, S., et al., Minor salivary gland immunohistology in the diagnosis of primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med*, 2009. **38**(3): p. 282-8.
115. Speight, P.M., A. Cruchley, and D.M. Williams, Quantification of plasma cells in labial salivary glands: increased expression of IgM in Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med*, 1990. **19**(3): p. 126-30.
116. Guerrier, T., et al., Role of Toll-like receptors in primary Sjogren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues. *J Autoimmun*. **39**(1-2): p. 69-76.
117. Theander, E., et al., Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70**(8): p. 1363-8.
118. Daridon, C., et al., Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(7): p. 2280-8.
119. Hansen, A., et al., Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(8): p. 2160-71.
120. d'Arbonne, F., et al., BAFF-induced changes in B cell antigen receptor-containing lipid rafts in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(1): p. 115-26.
121. Hansen, A., et al., Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(6): p. 1897-908.
122. Aqrawi, L.A., et al., Low number of memory B cells in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Autoimmunity*, 2012. **45**(7): p. 547-55.
123. Zeher, M., et al., Macrophage containing factor XIII subunit a in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 1991. **1**(4): p. 261-5.
124. Cuida, M., et al., Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrates in Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and osteoarthritis with special reference to calprotectin-producing cells. *Apmis*, 1996. **104**(12): p. 881-90.
125. Tapinos, N.I., et al., Sjogren's syndrome. Autoimmune epithelitis. *Adv Exp Med Biol*, 1999. **455**: p. 127-34.
126. van Blokland, S.C., et al., Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjogren's syndrome: a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Lab Invest*, 2000. **80**(4): p. 575-85.
127. Tominaga, M., et al., Expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) in labial salivary glands of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2000. **122**(3): p. 459-63.
128. Lavie, F., et al., Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *J Pathol*, 2004. **202**(4): p. 496-502.

129. Jonsson, M.V., et al., Elevated serum levels of soluble E-cadherin in patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*, 2005. **62**(6): p. 552-9.
130. Greenwell-Wild, T., et al., Chitinases in the salivary glands and circulation of patients with Sjogren's syndrome: macrophage harbingers of disease severity. *Arthritis Rheum*. **63**(10): p. 3103-15.
131. Greenwell-Wild, T., et al., Chitinases in the salivary glands and circulation of patients with Sjogren's syndrome: macrophage harbingers of disease severity. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(10): p. 3103-15.
132. Manoussakis, M.N., et al., Impaired clearance of early apoptotic cells mediated by inhibitory IgG antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e112100.
133. Hauk, V., et al., Monocytes from Sjogren's syndrome patients display increased vasoactive intestinal peptide receptor 2 expression and impaired apoptotic cell phagocytosis. *Clin Exp Immunol*, 2014. **177**(3): p. 662-70.
134. Chen, X.W., et al., Anti-class a scavenger receptor autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients impair phagocytic clearance of apoptotic cells by macrophages in vitro. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(1): p. R9.
135. Prochorec-Sobieszek, M., et al., Histopathological and immunohistochemical analysis of lymphoid follicles in labial salivary glands in primary and secondary Sjogren's syndrome. *Med Sci Monit*, 2004. **10**(4): p. BR115-21.
136. Ozaki, Y., et al., Decrease of blood dendritic cells and increase of tissue-infiltrating dendritic cells are involved in the induction of Sjogren's syndrome but not in the maintenance. *Clin Exp Immunol*, 2010. **159**(3): p. 315-26.
137. Hillen, M.R., et al., Dendritic cells, T-cells and epithelial cells: a crucial interplay in immunopathology of primary Sjogren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014. **10**(4): p. 521-31.
138. Vogelsang, P., et al., Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(6): p. 1235-8.
139. Wildenberg, M.E., et al., Systemic increase in type I interferon activity in Sjogren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(7): p. 2024-33.
140. Gottenberg, J.E., et al., Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2770-5.
141. Le, A., M. Saverin, and A.R. Hand, Distribution of dendritic cells in normal human salivary glands. *Acta Histochem Cytochem*, 2011. **44**(4): p. 165-73.

142. Bave, U., et al., Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(4): p. 1185-95.
143. Hunziker, L., et al., Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 343-9.
144. Zhao, J., et al., Association of plasmacytoid dendritic cells with B cell infiltration in minor salivary glands in patients with Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol*, 2016. **26**(5): p. 716-24.
145. van Blokland, S.C., et al., Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjogren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Lab Invest*, 2000. **80**(12): p. 1935-41.
146. Oxholm, P., et al., Langerhans cells in labial minor salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]*, 1985. **93**(2): p. 105-7.
147. Vogelsang, P., et al., Altered phenotype and Stat1 expression in Toll-like receptor 7/8 stimulated monocyte-derived dendritic cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*, 2014. **16**(4): p. R166.
148. Volchenkov, R., et al., In vitro suppression of immune responses using monocyte-derived tolerogenic dendritic cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*, 2013. **15**(5): p. R114.
149. Konttinen, Y.T., et al., T(H)1 cytokines are produced in labial salivary glands in Sjogren's syndrome, but also in healthy individuals. *Scand J Rheumatol*, 1999. **28**(2): p. 106-12.
150. Skopouli, F.N. and H.M. Moutsopoulos, Cytokines in Sjogren's syndrome. *Ann Med Interne (Paris)*, 1995. **146**(4): p. 219-22.
151. Kolkowski, E.C., et al., Th1 predominance and perforin expression in minor salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 1999. **13**(1): p. 155-62.
152. Ohyama, Y., et al., Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(8): p. 1376-84.
153. Cauli, A., et al., Cytokine and adhesion molecule expression in the minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and chronic sialoadenitis. *Ann Rheum Dis*, 1995. **54**(3): p. 209-15.
154. Sun, D., M.R. Emmert-Buck, and P.C. Fox, Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmunity*, 1998. **28**(3): p. 125-37.
155. Koski, H., et al., Tumor necrosis factor-alpha and receptors for it in labial salivary glands in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 2001. **19**(2): p. 131-7.

156. Ajjan, R.A., et al., Analysis of the T-cell receptor Valpha repertoire and cytokine gene expression in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(2): p. 179-85.
157. Sisto, M., L. Lorusso, and S. Lisi, Interleukin-15 as a potential new target in Sjogren's syndrome-associated inflammation. *Pathology*, 2016. **48**(6): p. 602-7.
158. Bikker, A., et al., Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome correlates with increased inflammation. *Arthritis Rheum*. **62**(4): p. 969-77.
159. Bikker, A., et al., Increased interleukin (IL)-7/Ralpha expression in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Ann Rheum Dis*. **71**(6): p. 1027-33.
160. Sakai, A., et al., Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol*, 2008. **181**(4): p. 2898-906.
161. Nguyen, C.Q., et al., Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjogren's syndrome: findings in humans and mice. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(3): p. 734-43.
162. Kang, K.Y., et al., Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(5): p. R179.
163. Ciccia, F., et al., Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. **71**(2): p. 295-301.
164. Ciccia, F., et al., Interleukin (IL)-22 receptor 1 is over-expressed in primary Sjogren's syndrome and Sjogren-associated non-Hodgkin lymphomas and is regulated by IL-18. *Clin Exp Immunol*, 2015. **181**(2): p. 219-29.
165. Ciccia, F., et al., IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16+ monocytes. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. **52**(6): p. 1009-17.
166. Jung, S.M., et al., The Interleukin 33/ST2 axis in patients with primary Sjogren syndrome: expression in serum and salivary glands, and the clinical association. *J Rheumatol*, 2015. **42**(2): p. 264-71.
167. Liuqing, W., et al., Elevated IL-37, IL-18 and IL-18BP serum concentrations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Investig Med*, 2017. **65**(3): p. 717-721.
168. Szodoray, P., et al., Attenuated apoptosis of B cell activating factor-expressing cells in primary Sjogren's syndrome. *Lab Invest*, 2003. **83**(3): p. 357-65.

169. Mariette, X., et al., The level of BLYS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(2): p. 168-71.
170. Quartuccio, L., et al., BLYS upregulation in Sjogren's syndrome associated with lymphoproliferative disorders, higher ESSDAI score and B-cell clonal expansion in the salivary glands. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. **52**(2): p. 276-81.
171. Nezos, A., et al., B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2014. **51**: p. 89-98.
172. Papageorgiou, A., et al., A BAFF receptor His159Tyr mutation in Sjogren's syndrome-related lymphoproliferation. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(10): p. 2732-41.
173. Youinou, P. and J.O. Pers, Disturbance of cytokine networks in Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. **13**(4): p. 227.
174. Ittah, M., et al., B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(2): p. R51.
175. Brkic, Z., et al., Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis*, 2013. **72**(5): p. 728-35.
176. Hall, J.C., et al., Molecular Subsetting of Interferon Pathways in Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(9): p. 2437-46.
177. Nezos, A., et al., Type I and II interferon signatures in Sjogren's syndrome pathogenesis: Contributions in distinct clinical phenotypes and Sjogren's related lymphomagenesis. *J Autoimmun*, 2015. **63**: p. 47-58.
178. Apostolou, E., et al., Expression of type III interferons (IFN λ s) and their receptor in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2016. **186**(3): p. 304-312.
179. Voulgarelis, M., et al., Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(8): p. 1765-72.
180. Zintzaras, E., M. Voulgarelis, and H.M. Moutsopoulos, The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med*, 2005. **165**(20): p. 2337-44.
181. Theander, E., et al., Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(6): p. 796-803.
182. Ekstrom Smedby, K., et al., Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: a pooled analysis within the InterLymph Consortium. *Blood*, 2008. **111**(8): p. 4029-38.

183. Solans-Laque, R., et al., Risk, predictors, and clinical characteristics of lymphoma development in primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*, 2011. **41**(3): p. 415-23.
184. Weng, M.Y., et al., Incidence of cancer in a nationwide population cohort of 7852 patients with primary Sjogren's syndrome in Taiwan. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(4): p. 524-7.
185. Johnsen, S.J., et al., Risk of non-Hodgkin's lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a population-based study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2013. **65**(5): p. 816-21.
186. Liang, Y., et al., Primary Sjogren's syndrome and malignancy risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(6): p. 1151-6.
187. Ramirez Sepulveda, J.I., et al., Long-term follow-up in primary Sjogren's syndrome reveals differences in clinical presentation between female and male patients. *Biol Sex Differ*, 2017. **8**(1): p. 25.
188. Nishishinya, M.B., et al., Identification of lymphoma predictors in patients with primary Sjogren's syndrome: a systematic literature review and meta-analysis. *Rheumatol Int*, 2015. **35**(1): p. 17-26.
189. Fox R. I., K., K., and Saito, I., Lymphoproliferative disorders in Sjogren's syndrome, in *Sjogren's Syndrome. State of the Art*, S.S.T.T. M. Homma, N. Miyakaka, and M. Akizuki, eds., Editor. 1994, Kugler: Amsterdam. p. 199-203.
190. Zulman, J., R. Jaffe, and N. Talal, Evidence that the malignant lymphoma of Sjogren's syndrome is a monoclonal B-cell neoplasm. *N Engl J Med*, 1978. **299**(22): p. 1215-20.
191. Shin, S.S., et al., Monocytoid B-cell lymphoma in patients with Sjogren's syndrome: a clinicopathologic study of 13 patients. *Hum Pathol*, 1991. **22**(5): p. 422-30.
192. Pavlidis, N.A., et al., Lymphoma in Sjogren's syndrome. *Med Pediatr Oncol*, 1992. **20**(4): p. 279-83.
193. Martin, T., et al., Salivary gland lymphomas in patients with Sjogren's syndrome may frequently develop from rheumatoid factor B cells. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(4): p. 908-16.
194. Bende, R.J., et al., Among B cell non-Hodgkin's lymphomas, MALT lymphomas express a unique antibody repertoire with frequent rheumatoid factor reactivity. *J Exp Med*, 2005. **201**(8): p. 1229-41.
195. Bende, R.J., et al., Stereotypic rheumatoid factors that are frequently expressed in mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas are rare in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(4): p. 1074-83.
196. Leadbetter, E.A., et al., Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002. **416**(6881): p. 603-7.

197. Sang, A., et al., Activation of rheumatoid factor-specific B cells is antigen dependent and occurs preferentially outside of germinal centers in the lupus-prone NZM2410 mouse model. *J Immunol*, 2014. **193**(4): p. 1609-21.
198. Bombardieri, M., et al., Inducible tertiary lymphoid structures, autoimmunity, and exocrine dysfunction in a novel model of salivary gland inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 2012. **189**(7): p. 3767-76.
199. Croia, C., et al., Implication of Epstein-Barr virus infection in disease-specific autoreactive B cell activation in ectopic lymphoid structures of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(9): p. 2545-57.
200. Ahlin, E., et al., Autoantibodies associated with RNA are more enriched than anti-dsDNA antibodies in circulating immune complexes in SLE. *Lupus*, 2012. **21**(6): p. 586-95.
201. Nocturne, G. and X. Mariette, Sjogren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol*, 2015. **168**(3): p. 317-27.
202. Smedby, K.E., et al., Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(1): p. 51-60.
203. Voulgarelis, M., et al., Prognosis and outcome of non-Hodgkin lymphoma in primary Sjogren syndrome. *Medicine (Baltimore)*. **91**(1): p. 1-9.
204. Voulgarelis, M., et al., Prognosis and outcome of non-Hodgkin lymphoma in primary Sjogren syndrome. *Medicine (Baltimore)*, 2012. **91**(1): p. 1-9.
205. Ioannidis, J.P., V.A. Vassiliou, and H.M. Moutsopoulos, Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(3): p. 741-7.
206. Ray, R.J., et al., Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(7): p. 1504-10.
207. Amft, N., et al., Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(11): p. 2633-41.
208. Bombardieri, M., et al., Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 2007. **179**(7): p. 4929-38.
209. Haacke, E.A., et al., Germinal centres in diagnostic labial gland biopsies of patients with primary Sjogren's syndrome are not predictive for parotid MALT lymphoma development. *Ann Rheum Dis*, 2017. **76**(10): p. 1781-1784.

210. Gottenberg, J.E., et al., Serum levels of beta2-microglobulin and free light chains of immunoglobulins are associated with systemic disease activity in primary Sjogren's syndrome. Data at enrollment in the prospective ASSESS cohort. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e59868.
211. Gottenberg, J.E., et al., No evidence for an association between the -871 T/C promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(1): p. R30.
212. Nossent, J.C., et al., Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47**(9): p. 1311-6.
213. Drexler, H.G., Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 1996. **10**(4): p. 588-99.
214. Tobon, G.J., et al., The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(11): p. 3447-56.
215. Sisto, M., et al., A failure of TNFAIP3 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in Sjogren's syndrome. *Histochem Cell Biol*, 2011. **135**(6): p. 615-25.
216. Musone, S.L., et al., Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun*, 2011. **12**(3): p. 176-82.
217. Du, M.Q., MALT lymphoma: Genetic abnormalities, immunological stimulation and molecular mechanism. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2017. **30**(1-2): p. 13-23.
218. Baldini, C., et al., The P2X7 receptor-NLRP3 inflammasome complex predicts the development of non-Hodgkin's lymphoma in Sjogren's syndrome: a prospective, observational, single-centre study. *J Intern Med*, 2017. **282**(2): p. 175-186.
219. Dinarello, C.A., et al., Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 289.
220. Dinarello, C.A., Interleukin-18. *Methods*, 1999. **19**(1): p. 121-32.
221. Kaplanski, G., Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 138-153.
222. Bossaller, L., et al., Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1beta and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *J Immunol*, 2012. **189**(12): p. 5508-12.
223. Omoto, Y., et al., Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci*, 2010. **59**(2): p. 129-35.

224. Sugawara, S., et al., Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6568-75.
225. Akita, K., et al., Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *J Biol Chem*, 1997. **272**(42): p. 26595-603.
226. Hentze, H., et al., Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(9): p. 956-68.
227. Bellora, F., et al., M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(6): p. 1618-26.
228. Dinarello, C.A., Membrane interleukin-18 revisits membrane IL-1alpha in T-helper type 1 responses. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(6): p. 1385-7.
229. Torigoe, K., et al., Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem*, 1997. **272**(41): p. 25737-42.
230. Kalina, U., et al., IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1307-13.
231. Alboni, S., et al., Interleukin 18 activates MAPKs and STAT3 but not NF-kappaB in hippocampal HT-22 cells. *Brain Behav Immun*, 2014. **40**: p. 85-94.
232. Wyman, T.H., et al., Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(2): p. 401-9.
233. Cavalli, G. and C.A. Dinarello, Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 179-190.
234. Novick, D., et al., Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol*, 2013. **25**(6): p. 439-48.
235. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, Interleukin-18. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(2): p. 213-24.
236. Nakanishi, K., et al., Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 423-74.
237. Banda, N.K., et al., Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 2100-5.
238. Muhl, H., et al., Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **267**(3): p. 960-3.

239. Hurgin, V., D. Novick, and M. Rubinstein, The promoter of IL-18 binding protein: activation by an IFN-gamma -induced complex of IFN regulatory factor 1 and CCAAT/enhancer binding protein beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(26): p. 16957-62.
240. Wittmann, M., et al., IL-27 Regulates IL-18 binding protein in skin resident cells. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38751.
241. Chen, Y., et al., High circulating level of interleukin-18 in patients with primary Sjogren's syndrome is associated with disease activity. *Mod Rheumatol*, 2016. **26**(1): p. 156-8.
242. Baldini, C., et al., The P2X7 receptor-inflammasome complex has a role in modulating the inflammatory response in primary Sjogren's syndrome. *J Intern Med*, 2013. **274**(5): p. 480-9.
243. Kobayashi, M., et al., Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*, 1989. **170**(3): p. 827-45.
244. Stern, A.S., et al., Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(17): p. 6808-12.
245. Gubler, U., et al., Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(10): p. 4143-7.
246. D'Andrea, A., et al., Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med*, 1992. **176**(5): p. 1387-98.
247. Gately, M.K., et al., Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **795**: p. 1-12.
248. Cooper, A.M. and S.A. Khader, IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol*, 2007. **28**(1): p. 33-8.
249. Babik, J.M., et al., Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit. *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 4069-78.
250. Goriely, S., M.F. Neurath, and M. Goldman, How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(1): p. 81-6.
251. Murphy, T.L., et al., Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(10): p. 5258-67.
252. Ma, X., et al., Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12 p40 gene promoter. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10389-95.

253. Becker, C., et al., Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT/enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2). *J Immunol*, 2001. **167**(5): p. 2608-18.
254. Becker, C., et al., Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest*, 2003. **112**(5): p. 693-706.
255. Stuber, E., W. Strober, and M. Neurath, Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med*, 1996. **183**(2): p. 693-8.
256. Zundler, S. and M.F. Neurath, Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. **26**(5): p. 559-68.
257. Chua, A.O., et al., Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol*, 1994. **153**(1): p. 128-36.
258. Presky, D.H., et al., A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(24): p. 14002-7.
259. Gately, M.K., et al., The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 495-521.
260. Zou, J., et al., Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem*, 1997. **272**(9): p. 6073-7.
261. Desai, B.B., et al., IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol*, 1992. **148**(10): p. 3125-32.
262. Szabo, S.J., et al., Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*, 1997. **185**(5): p. 817-24.
263. Rogge, L., et al., Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med*, 1997. **185**(5): p. 825-31.
264. Bacon, C.M., et al., Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7307-11.
265. Jacobson, N.G., et al., Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*, 1995. **181**(5): p. 1755-62.
266. Xu, X., Y.L. Sun, and T. Hoey, Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, 1996. **273**(5276): p. 794-7.

267. Thierfelder, W.E., et al., Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 1996. **382**(6587): p. 171-4.
268. Barbulescu, K., et al., IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol*, 1998. **160**(8): p. 3642-7.
269. Takeda, A., et al., Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 4886-90.
270. Mullen, A.C., et al., Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
271. Afkarian, M., et al., T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 2002. **3**(6): p. 549-57.
272. Trinchieri, G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 133-46.
273. Horiuchi, M., et al., Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjogren syndrome. *J Clin Pathol*, 1999. **52**(11): p. 833-7.
274. Fogel, O., et al., Role of the IL-12/IL-35 balance in patients with Sjogren syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 2018. **142**(1): p. 258-268 e5.
275. Macatonia, S.E., et al., Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
276. Rusakiewicz, S., et al., NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjogren's syndrome. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(195): p. 195ra96.
277. Szodoray, P., et al., Distinct profiles of Sjogren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. *Clin Immunol*, 2005. **117**(2): p. 168-76.
278. Seror, R., et al., Low numbers of blood and salivary natural killer cells are associated with a better response to belimumab in primary Sjogren's syndrome: results of the BELISS study. *Arthritis Res Ther*, 2015. **17**: p. 241.
279. Awad, F., et al., Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*, 2017. **12**(4): p. e0175336.
280. Bakele, M., et al., Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *J Biol Chem*, 2014. **289**(8): p. 5320-9.
281. Sharp, F.A., et al., Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(3): p. 870-5.
282. Feldmeyer, L., et al., The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol*, 2007. **17**(13): p. 1140-5.

283. Liston, A. and S.L. Masters, Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat Rev Immunol*, 2017. **17**(3): p. 208-214.
284. Martinon, F., Detection of immune danger signals by NALP3. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(3): p. 507-11.
285. Vanaja, S.K., V.A. Rathinam, and K.A. Fitzgerald, Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(5): p. 308-15.
286. Prochnicki, T. and E. Latz, Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. *Cell Metab*, 2017. **26**(1): p. 71-93.
287. Robbins, G.R., H. Wen, and J.P. Ting, Inflammasomes and metabolic disorders: old genes in modern diseases. *Mol Cell*, 2014. **54**(2): p. 297-308.
288. McGonagle, D. and M.F. McDermott, A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med*, 2006. **3**(8): p. e297.
289. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 707-35.
290. Guo, H., J.B. Callaway, and J.P. Ting, Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, 2015. **21**(7): p. 677-87.
291. Lamkanfi, M., L. Vande Walle, and T.D. Kanneganti, Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev*, 2011. **243**(1): p. 163-73.
292. de Zoete, M.R., et al., Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(12): p. a016287.
293. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
294. Zhong, Y., A. Kinio, and M. Saleh, Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 333.
295. Chen, G., et al., NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 365-98.
296. Ting, J.P., et al., The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 285-7.
297. Arnoult, D., et al., An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 17): p. 3161-8.
298. Moore, C.B., et al., NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*, 2008. **451**(7178): p. 573-7.
299. Awad, F., et al., Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*, 2018. **187**: p. 133-149.
300. Martinon, F. and J. Tschopp, Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 561-74.

301. Thornberry, N.A., et al., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
302. Broz, P., et al., Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1745-55.
303. Faustin, B. and J.C. Reed, Sunburned skin activates inflammasomes. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(1): p. 4-8.
304. Mariathasan, S., et al., Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 2004. **430**(6996): p. 213-8.
305. Yu, C.H., et al., Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. *J Mol Biol*, 2018. **430**(2): p. 142-152.
306. Fernandes-Alnemri, T., et al., AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 2009. **458**(7237): p. 509-13.
307. Hornung, V. and E. Latz, Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 123-30.
308. Kerur, N., et al., IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe*, 2011. **9**(5): p. 363-75.
309. Pothlichet, J., et al., Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(4): p. e1003256.
310. Gumucio, D.L., et al., Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. **20**(4 Suppl 26): p. S45-53.
311. Masumoto, J., et al., ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 33835-8.
312. Beilharz, M., et al., Measuring NLR Oligomerization II: Detection of ASC Speck Formation by Confocal Microscopy and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol*, 2016. **1417**: p. 145-58.
313. Fernandes-Alnemri, T., et al., The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(9): p. 1590-604.
314. Stutz, A., et al., ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol*, 2013. **1040**: p. 91-101.
315. Dick, M.S., et al., ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11929.
316. Jeru, I., et al., Functional consequences of a germline mutation in the leucine-rich repeat domain of NLRP3 identified in an atypical autoinflammatory disorder. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(4): p. 1176-85.

317. Baroja-Mazo, A., et al., The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol*, 2014. **15**(8): p. 738-48.
318. Franklin, B.S., et al., The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*, 2014. **15**(8): p. 727-37.
319. Tattoli, I., et al., NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep*, 2008. **9**(3): p. 293-300.
320. Lei, Y., H. Wen, and J.P. Ting, The NLR protein, NLRX1, and its partner, TUFM, reduce type I interferon, and enhance autophagy. *Autophagy*, 2013. **9**(3): p. 432-3.
321. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(6): p. 725-31.
322. Elliott, J.M., et al., Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *J Biol Chem*, 2009. **284**(10): p. 6546-53.
323. Okamura, H., et al., Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol*, 1998. **70**: p. 281-312.
324. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.
325. Dinarello, C.A., Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997. **8**(4): p. 253-65.
326. Kayagaki, N., et al., Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015. **526**(7575): p. 666-71.
327. Liu, X., et al., Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 2016. **535**(7610): p. 153-8.
328. Aglietti, R.A., et al., GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(28): p. 7858-63.
329. Ding, J., et al., Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 2016. **535**(7610): p. 111-6.
330. Sborgi, L., et al., GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J*, 2016. **35**(16): p. 1766-78.
331. Aachoui, Y., et al., Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Curr Opin Microbiol*, 2013. **16**(3): p. 319-26.
332. Fink, S.L. and B.T. Cookson, Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(11): p. 2562-70.
333. Miao, E.A., et al., Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*, 2010. **11**(12): p. 1136-42.
334. Miao, E.A., J.V. Rajan, and A. Aderem, Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*, 2011. **243**(1): p. 206-14.

335. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(2): p. 99-109.
336. Hagar, J.A., et al., Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, 2013. **341**(6151): p. 1250-3.
337. Kayagaki, N., et al., Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, 2013. **341**(6151): p. 1246-9.
338. Lamkanfi, M., et al., Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(4): p. 358-61.
339. Shi, J., et al., Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014. **514**(7521): p. 187-92.
340. Casson, C.N., et al., Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(21): p. 6688-93.
341. Knodler, L.A., et al., Noncanonical inflammasome activation of caspase-4/caspase-11 mediates epithelial defenses against enteric bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*, 2014. **16**(2): p. 249-256.
342. Lin, X.Y., M.S. Choi, and A.G. Porter, Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 39920-6.
343. Salskov-Iversen, M.L., et al., Caspase-5 expression is upregulated in lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(3): p. 670-6.
344. Yang, J., Y. Zhao, and F. Shao, Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 2015. **32**: p. 78-83.
345. Baker, P.J., et al., NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(10): p. 2918-26.
346. Ruhl, S. and P. Broz, Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(10): p. 2927-36.
347. Schmid-Burgk, J.L., et al., Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(10): p. 2911-7.
348. Lamkanfi, M. and V.M. Dixit, Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 2014. **157**(5): p. 1013-22.
349. Feldmann, J., et al., Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet*, 2002. **71**(1): p. 198-203.
350. Hoffman, H.M., et al., Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*, 2001. **29**(3): p. 301-5.

351. Manji, G.A., et al., PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11570-5.
352. Kummer, J.A., et al., Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem*, 2007. **55**(5): p. 443-52.
353. Haneklaus, M., et al., Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1beta production. *J Immunol*, 2012. **189**(8): p. 3795-9.
354. Juliana, C., et al., Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*, 2012. **287**(43): p. 36617-22.
355. Kattah, M.G., B.A. Malynn, and A. Ma, Ubiquitin-Modifying Enzymes and Regulation of the Inflammasome. *J Mol Biol*, 2017. **429**(22): p. 3471-3485.
356. Py, B.F., et al., Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell*, 2013. **49**(2): p. 331-8.
357. Song, H., et al., The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13727.
358. Bryant, C. and K.A. Fitzgerald, Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol*, 2009. **19**(9): p. 455-64.
359. Latz, E., The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(1): p. 28-33.
360. Petrilli, V., et al., Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
361. Yaron, J.R., et al., K(+) regulates Ca(2+) to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. *Cell Death Dis*, 2015. **6**: p. e1954.
362. Di Virgilio, F., Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(9): p. 465-72.
363. Munoz-Planillo, R., et al., K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 2013. **38**(6): p. 1142-53.
364. Dostert, C., E. Meylan, and J. Tschopp, Intracellular pattern-recognition receptors. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(7): p. 830-40.
365. Halle, A., et al., The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 2008. **9**(8): p. 857-65.
366. Hornung, V. and E. Latz, Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 620-3.

367. Hornung, V., et al., Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 2008. **9**(8): p. 847-56.
368. Nakahira, K., et al., Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 222-30.
369. Shimada, K., et al., Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*, 2012. **36**(3): p. 401-14.
370. Subramanian, N., et al., The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell*, 2013. **153**(2): p. 348-61.
371. Tschopp, J. and K. Schroder, NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(3): p. 210-5.
372. Zhou, R., et al., A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
373. Zhou, R., et al., Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, 2010. **11**(2): p. 136-40.
374. Misawa, T., et al., Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 2013. **14**(5): p. 454-60.
375. Park, S., et al., Defective mitochondrial fission augments NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 15489.
376. Zhong, Z., E. Sanchez-Lopez, and M. Karin, Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 2016. **34**(4 Suppl 98): p. 12-6.
377. Murakami, T., et al., Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11282-7.
378. Lee, G.S., et al., The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature*, 2012. **492**(7427): p. 123-7.
379. Rossol, M., et al., Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1329.
380. Gaidt, M.M. and V. Hornung, Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells. *Curr Opin Immunol*, 2017. **44**: p. 7-13.
381. Gaidt, M.M., et al., Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*, 2016. **44**(4): p. 833-46.
382. Zanoni, I., et al., An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science*, 2016. **352**(6290): p. 1232-6.

383. Wolf, A.J., et al., Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell*, 2016. **166**(3): p. 624-636.
384. Aksentijevich, I., et al., De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(12): p. 3340-8.
385. Nakagawa, K., et al., Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(3): p. 603-10.
386. Omoyinmi, E., et al., Brief Report: whole-exome sequencing revealing somatic NLRP3 mosaicism in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(1): p. 197-202.
387. Saito, M., et al., Somatic mosaicism of CIAS1 in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(11): p. 3579-85.
388. Tanaka, N., et al., High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(11): p. 3625-32.
389. Eroglu, F.K., et al., Genetic and clinical features of cryopyrin-associated periodic syndromes in Turkish children. *Clin Exp Rheumatol*, 2016. **34**(6 Suppl 102): p. S115-S120.
390. Zhou, Q., et al., Brief Report: Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Caused by a Myeloid-Restricted Somatic NLRP3 Mutation. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(9): p. 2482-6.
391. Janssen, R., et al., Enhanced interleukin-1beta and interleukin-18 release in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(10): p. 3329-33.
392. Agostini, L., et al., NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 2004. **20**(3): p. 319-25.
393. Yan, Y., et al., Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*, 2015. **160**(1-2): p. 62-73.
394. Mortimer, L., et al., NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nat Immunol*, 2016. **17**(10): p. 1176-86.
395. He, Y., et al., NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, 2016. **530**(7590): p. 354-7.

396. Schmid-Burgk, J.L., et al., A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*, 2016. **291**(1): p. 103-9.
397. Shi, H., et al., NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol*, 2016. **17**(3): p. 250-8.
398. Meng, G., et al., A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity*, 2009. **30**(6): p. 860-74.
399. Abderrazak, A., et al., NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, 2015. **4**: p. 296-307.
400. Freeman, L.C. and J.P. Ting, The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 2016. **136 Suppl 1**: p. 29-38.
401. White, C.S., et al., Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 2017. **27**(2): p. 223-234.
402. Grant, R.W. and V.D. Dixit, Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 50.
403. Haneklaus, M. and L.A. O'Neill, NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev*, 2015. **265**(1): p. 53-62.
404. Hoseini, Z., et al., NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(3): p. 2116-2132.
405. Ralston, J.C., et al., Fatty Acids and NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation in Metabolic Tissues. *Annu Rev Nutr*, 2017. **37**: p. 77-102.
406. Rheinheimer, J., et al., Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism*, 2017. **74**: p. 1-9.
407. Sepehri, Z., et al., Inflammasomes and type 2 diabetes: An updated systematic review. *Immunol Lett*, 2017. **192**: p. 97-103.
408. So, A.K. and F. Martinon, Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Rheumatol*, 2017. **13**(11): p. 639-647.
409. Lee, Y.H. and S.C. Bae, Association between functional NLRP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Lupus*, 2016. **25**(14): p. 1558-1566.
410. Xie, B., et al., The expression of P2X7 receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with primary Sjogren's syndrome and its correlation with anxiety and depression. *Clin Exp Rheumatol*, 2014. **32**(3): p. 354-60.
411. Khalafalla, M.G., et al., P2X7 receptor antagonism prevents IL-1 β release from salivary epithelial cells and reduces inflammation in a mouse model of autoimmune exocrinopathy. *J Biol Chem*, 2017. **292**(40): p. 16626-16637.

- 412. Kim, S.K., J.Y. Choe, and G.H. Lee, Enhanced expression of NLRP3 inflammasome-related inflammation in peripheral blood mononuclear cells in Sjogren's syndrome. *Clin Chim Acta*, 2017. **474**: p. 147-154.
- 413. Niu, L., et al., Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the Tears and Ocular Surface of Dry Eye Patients. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0126277.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**Ο βαθμός διήθησης μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων
και η έκφραση ιντερλευκίνης-18 και ιντερλευκίνης-12
στις χρόνιες φλεγμονώδεις βλάβες του συνδρόμου Sjögren**

*Συσχέτιση με δείκτες ανοσολογικής απόκρισης και παράγοντες κινδύνου
για την ανάπτυξη λεμφώματος*

**Μ. Ν. Μανουσάκης, Σ. Μπόιου, Π. Κορκολοπούλου, Ε. Κ. Καψογεώργου,
Ν. Καβαντζάς, Π. Ζιάκας, Ε. Πατσούρης, και Η. Μ. Μουτσόπουλος**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος. Η εκτίμηση έκφρασης των μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων στις φλεγμονώδεις βλάβες των επικουρικών σιελογόνων αδένων (ΕΣΑ) των ασθενών με σύνδρομο Sjögren (SS) καθώς και των ιντερλευκινών-18 (IL-18) και -12 (IL-12) και η διερεύνηση της σχέσης αυτών των παραγόντων με παραμέτρους βαρύτητας της νόσου.

Μέθοδοι. Τα μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, η πρόδρομη μορφή της IL-18, η δραστική IL-18 και η IL-12 ανιχνεύθηκαν με μονής και διπλής χρώσης ανοσοϊστοχημεία σε δείγματα ΕΣΑ από 21 ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (13 από αυτούς μελετήθηκαν για την έκφραση της IL-12), 7 ασθενείς με δευτεροπαθές σύνδρομο Sjögren και 9 ασθενείς από την ομάδα ελέγχου νόσου. Η έκφραση βιοδεικτών ελέγχθηκε εάν συσχετίζεται με διάφορες παραμέτρους της νόσου, συμπεριλαμβανομένων προγνωστικών δεικτών ανάπτυξης λεμφώματος.

Αποτελέσματα: ΕΣΑ από ασθενείς με SS (αλλά όχι από την ομάδα ελέγχου νόσου) παρουσίασαν αυξημένη διήθηση από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, σημαντική έκφραση της IL-18 από τα μακροφάγα (ειδικά στις περιοχές με σημαντική παρουσία Β-λεμφοκυττάρων και στις περιοχές που προσομοιάζουν με βλαστικά κέντρα), και έκφραση της IL-12 από τις διηθήσεις μονοπύρηνων κυττάρων. Στους

ασθενείς με πρωτοπαθές SS, η αυξημένη διήθηση από μακροφάγα συσχετίστηκε με την διόγκωση σιελογόνων αδένων ($p=0.01$). Ο βαθμός διήθησης από δενδριτικά κύτταρα συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό διήθησης από τα μακροφάγα ($p=0.04$), την εμφάνιση της διόγκωσης σιελογόνων αδένων ($p=0.03$) και την παρουσία χαμηλών επιπέδων κλάσματος C4 του συμπληρώματος ($p=0.05$) και αρνητικά με τα επίπεδα κλάσματος C4 του συμπληρώματος ($p=0.001$). Ο βαθμός διήθησης από τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-18 συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score) ($p<0.001$), μεγαλύτερες διηθήσεις των μακροφάγων ($p=0.01$), των δενδριτικών κυττάρων ($p=0.01$) και B-λεμφοκυττάρων ($p=0.02$) και την διόγκωση σιελογόνων αδένων ($p=0.02$) και αρνητικά με τα επίπεδα κλάσματος C4 του συμπληρώματος ($p=0.02$). Ο βαθμός διήθησης από τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-12 συσχετίστηκε αντίστροφα με τον βαθμό διήθησης από τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-18 ($p=0.001$), τον βαθμό βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score) ($p=0.003$), και την διόγκωση σιελογόνων αδένων ($p=0.01$) και θετικά με τα επίπεδα κλάσματος C4 του συμπληρώματος ($p=0.05$).

Συμπέρασμα: Στους ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren, η διήθηση από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και η έκφραση της IL-18 και της IL-12 πιθανότατα παίζουν ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη και την οργάνωση των βλαβών και συσχετίζονται με παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφώματος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνδρομο Sjögren (SS) ή η αυτοάνοση επιθηλίτιδα, αποτελεί μια σχετικά συχνή αυτοάνοση εξωκρινοπάθεια που χαρακτηρίζεται από χρόνια δυσλειτουργία και καταστροφή των σιελογόνων και δακρυϊκών αδένων, και σχετίζεται με περιπορικές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις και υπερδραστηριότητα των B-λεμφοκυττάρων (1, 2). Το SS μπορεί να απαντάται μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (δευτεροπαθές SS). Σε περίπου 5% των ασθενών η νόσος μπορεί να εξελιχθεί σε ανάπτυξη λεμφώματος B-λεμφοκυττάρων (3, 4). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει ορισμένα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη λεμφώματος (SS τύπου I) (5-9).

Οι λεμφοεπιθηλιακές βλάβες στους ασθενείς με SS χαρακτηρίζονται κυρίως από την έκφραση κυτταροκινών τύπου Th1 (10-12), συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης έκφρασης ιντερφερόνης γ (IFN γ) (13), κυτταροκίνης που πιθανά εμπλέκεται στην καταστροφή του επιθηλίου (14). Θεωρείται ότι τα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν έναν κεντρικό παθογενετικό ρόλο (2, 15). Ωστόσο, η συμμετοχή των έτσι ονομαζόμενων «επαγγελματικών (professional) αντιγόνο - παρουσιαστικών κυττάρων (ΑΠΚ)» (μονοκύτταρα/μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα) στις παθοφυσιολογικές διεργασίες του SS δεν έχουν επαρκώς διερευνηθεί. Από τα επαγγελματικά ΑΠΚ, τα δενδριτικά κύτταρα είναι γνωστό ότι παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην επαγωγή των πρωτοπαθών αποκρίσεων των T-λεμφοκυττάρων και στην εξαρτώμενη από τα T-λεμφοκύτταρα παραγωγή αυτοαντισωμάτων (16). Τόσο τα μακροφάγα όσο και τα δενδριτικά κύτταρα, ωστόσο, ως κεντρικά αισθητήρια συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος και πηγή διάφορων κυτταροκινών και χημειοκινών, θεωρούνται κύτταρα κατέχοντα σημαντικούς ρόλους, στην παθογένεση διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων (16, 17), πέρα από την αντιγονοπαρουσίαση.

Οι ιντερλευκίνες 18 (IL-18) και IL-12 είναι πλειοτροπικές φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, όπως και από άλλους τύπους κυττάρων (18-20). Οι κυτταροκίνες αυτές εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε πτυχή της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης της πρόσληψης των φλεγμονοδών κυττάρων, της ενίσχυσης της κυτταροτοξικότητας των T-λεμφοκυττάρων και των κυττάρων «φυσικών φονέων» (NK cells: natural killer cells) και της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Μία από τις βασικές τους δράσεις είναι η επαγωγή του φαινοτύπου Th1, και, πρακτικά, και οι δύο αυτές κυτταροκίνες αποτελούν κύριοι επαγωγείς της IFN γ , μόνες τους ή συνεργικά. Επιπλέον, η IL-18 από μόνη της έχει βρεθεί ότι είναι ικανή να επάγει κυτταροκίνες τύπου Th2, ανεξάρτητα από την IL-4 (21). Η βιολογικά δραστική πρωτεΐνη IL-18 (18 kD) δημιουργείται μετά από πρωτεολυτική διάσπαση (κυρίως από την κασπάση 1) ενός προδρόμου μορίου 24-kD (proIL-18), ενώ η IL-12 είναι ετεροδιμερής (p70) κυτταροκίνη αποτελούμενη από δύο υπομονάδες (p35 και p40) (18, 19).

Το λειτουργικό φάσμα τους υποδεικνύει τις IL-18 και IL-12 ως βασικούς ρυθμιστές της χρόνιας φλεγμονής στο πλαίσιο αυτοάνοσων νοσημάτων (19-22). Αυξημένη έκφραση αυτών των κυτταροκινών έχει αναφερθεί σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα (22-25). Αυξημένη έκφραση της IL-18 από τα μακροφάγα και επιθηλιακά

κύτταρα όπως και αυξημένη έκφραση της IL-12 από τα Β λεμφοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν βρεθεί στις φλεγμονώδεις διηθήσεις των ΕΣΑ ασθενών με πρωτοπαθές SS (26, 27). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί μια συσχέτιση ανάμεσα στα αυξημένα επίπεδα IL-18 στον ορό με την παραγωγή αντι-Ro (SSA) και αντι-La (SSB) αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS (26). Ωστόσο, στις μελέτες αυτές, η πραγματική κλινική σημασία της έκφρασης των πρωτεϊνών IL-18 και IL-12 στο SS δεν έχει πλήρως διερευνηθεί.

Στην παρούσα μελέτη επιδιώξαμε να προσδιορίσουμε την παρουσία των διηθούσων μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων, καθώς και την *in situ* έκφραση των πρωτεϊνών IL-18 και IL-12 σε δείγματα ΕΣΑ προερχόμενα από ασθενείς με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές SS. Επιπλέον, εξετάσαμε την συσχέτιση των ανωτέρω περιγραφέντων ανοσοϊστοπαθολογικών χαρακτηριστικών με διάφορες παραμέτρους της νόσου σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS, με σκοπό τη διερεύνηση της κλινικής τους σημασίας. Συγκεκριμένα διερευνήσαμε το ερώτημα εάν κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να διακρίνουν τους ασθενείς με πρωτοπαθές SS με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης λεμφώματος (5-9).

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς. Μελετήθηκαν 21 ασθενείς με πρωτοπαθές SS (19 γυναίκες και 2 άνδρες, με μέση ηλικία 49 έτη και εύρος ηλικίας 28-80 έτη) και 7 ασθενείς με δευτεροπαθές SS (3 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, 2 με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και από ένα με πρωτοπαθή χολική κίρρωση και μικτή νόσο του συνδετικού ιστού, όλες γυναίκες, με μέση ηλικία 48 έτη και εύρος ηλικίας 29-62 έτη). Οι ασθενείς διαγνώστηκαν με βάση τα αναθεωρημένα κριτήρια του American-European Consensus Group για την διάγνωση του πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς SS (28). Ως άτομα της ομάδας ελέγχου νόσου χρησιμοποιήθηκαν 9 ασθενείς (όλες γυναίκες, με μέση ηλικία 45 έτη και εύρος ηλικίας 25-65 έτη) με συμπτώματα sicca, οι οποίοι δεν πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια και δεν είχαν ούτε ιστοπαθολογικά ούτε ορολογικά στοιχεία ενδεικτικά για SS. Κανένας από τους ασθενείς ή άτομα της ομάδας ελέγχου που μελετήθηκαν δεν είχε ιστορικό ή ενδείξεις προϋπάρχοντος λεμφώματος, ηπατίτιδας Β, C ή λοίμωξης με HIV, σαρκοείδωσης ή χρήσης φαρμά-

κών που συνδέονται με συμπτώματα sicca. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, κανένας από τους ασθενείς με SS δεν είχε ενδείξεις για λέμφωμα που συνδέεται με το SS.

Μετά από ενημερωμένη συγκατάθεσή των ασθενών με SS και των ατόμων της ομάδας ελέγχου νόσου, ελήφθησαν δείγματα βιοψίας ΕΣΑ κατά τη διάρκεια της διαγνωστικής διερεύνησης για συμπτώματα ξηρότητας βλεννογόνων. Η μελέτη εγκρίθηκε από την περιφερειακή επιτροπή δεοντολογίας του νοσοκομείου. Ιστοί των αμυγδαλών ελήφθησαν επίσης από έναν ασθενή χωρίς SS που υποβλήθηκε σε αμυγδαλεκτομή. Όλα τα δείγματα βιοψίας ενσωματώθηκαν σε παραφίνη για ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις.

Τα ιατρικά αρχεία των ασθενών μελετήθηκαν αναδρομικά για διάφορες κλινικές και ορολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων των εκδηλώσεων του SS τύπου I (επίμονη ή υποτροπιάζουσα διόγκωση σιελογόνων αδένων, ψηλαφητή πορφύρα, κρυοσφαιριναιμία, επιμένοντα χαμηλά επίπεδα κλάσματος C3 και/ή C4 του συμπληρώματος ορού) (5-9). Οι ασθενείς με SS (αλλά όχι οι μάρτυρες νόσου) εμφάνισαν επίμονη ή υποτροπιάζουσα διόγκωση των σιελογόνων αδένων (3 από τους 21 ασθενείς με πρωτοπαθές SS και 3 από τους 7 με δευτεροπαθές SS), ψηλαφητή πορφύρα (3 από τους 21 με πρωτοπαθές SS), αυτοαντισώματα ορού έναντι Ro (SSA) (17 από τους 21 με πρωτοπαθές SS και 4 από τους 7 με δευτεροπαθές SS) και έναντι La (SSB) (12 από τους 21 με πρωτοπαθές SS και 1 από τους 7 με δευτεροπαθές SS), χαμηλά επίπεδα κλάσματος C3 του συμπληρώματος ορού (επίπεδα ορού του κλάσματος C3 <50 mg/dl, 2 από τους 21 με πρωτοπαθές SS), και χαμηλά επίπεδα κλάσματος C4 του συμπληρώματος ορού (επίπεδα C4 στον ορό <20 mg/dl, 10 από τους 21 με πρωτοπαθές SS και 3 από τους 7 με δευτεροπαθές SS). Εξωαδενική συμμετοχή (η οποία ορίζεται ως η παρουσία ενός από τα ακόλουθα: αρθρίτιδα, φαινόμενο Raynaud, πορφύρα, νεφρική σωληναριακή οξέωση, περιφερική νευροπάθεια και αγγειίτιδα) (1) παρατηρήθηκε σε 6 από τους 21 ασθενείς με πρωτοπαθές SS και σε 6 από τους 7 με δευτεροπαθές SS, ενώ κρυοσφαιριναιμία ανιχνεύθηκε μόνο σε 3 από τους 13 ασθενείς με πρωτοπαθές SS.

Αντισώματα. Τα αντίσωμα έναντι του CD68 (ειδικό για μακροφάγα, κλώνος PG-M1), έναντι των πρωτεϊνών S100 (ειδικό για δενδριτικά κύτταρα, τύπου Langerhans, διαμέσων (interstitial), veiled, και διαδακτυλοειδούς (interdigitating)), έναντι του CD3 (ειδικό για T-λεμφοκύτταρα), έναντι του CD20 (ειδικό για B-λεμφοκύτταρα), έναντι του χαμηλού μοριακού βάρους κυτταροκερατινών (ειδικό για τα επιθηλιακά κύτταρα, κλώνος MNF116) και έναντι του Ki-67 (δείκτης

πολλαπλασιασμού για την ανίχνευση του διαιρουμένων λεμφοειδών κυττάρων στα βλαστικά κέντρα) ήταν από την Dako (Glostrup, Δανία). Τα αντισώματα για την ανθρώπινη δραστική IL-18 (κλώνος 2D3B6) ήταν από την MD Biosciences (Ζυρίχη, Ελβετία) και τα αντισώματα για την ανθρώπινη proIL-18 και το ανθρώπινο ετεροδιμερές IL-12p70 (κλώνος 219) ήταν από την R&D Systems (Abingdon, Ηνωμένο Βασίλειο).

Ιστολογία και ανοσοϊστοχημεία. Τομές μικροτόμου προερχόμενες από δείγματα ΕΣΑ υποβλήθηκαν σε κατεργασία κυτταρικού και ανοσοϊστοχημεία για κυτταροκίνες και διάφορους κυτταρικούς δείκτες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (29). Εμβρυικός βόειος ορός και 0.5% H_2O_2 σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν για να εμποδιστεί η μη ειδική δέσμευση αντισώματος και η ενδογενής δράση υπεροξειδάσης, αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα πολυμερές συνδεδεμένο με υπεροξειδάση αγριοράπανου (horseradish-peroxidase, HRP) (EnVision) ή το σύστημα LSAB (όλα από την Dako) (για proIL-18), και αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας διαμινοβενζιδίνη ως χρωμογόνο. Για την διπλή ανοσοϊστοχημεία, διαδοχικές τομές παρασκευάστηκαν και υποβλήθηκαν σε ίδια επεξεργασία όπως αυτές μονής χρώσης, με διαδοχικές επωάσεις με HRP και αλκαλική φωσφατάση (Fast Red, Dako). Σε όλα τα πειράματα, οι χρώσεις ελέγχου (αρνητικοί μάρτυρες) πραγματοποιήθηκαν με αντικατάσταση των πρώτων αντισωμάτων με μη ειδικά αντισώματα ιδίου ισοτύπου.

Οι τομές βιοψίας κωδικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν τυφλά από 2 έμπειρους παθολογοανατόμους (ΠΚ και ΝΚ). Η σοβαρότητα της εστιακής λεμφοκυτταρικής σιελαδενίτιδας [αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τον βαθμό βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score), εύρος 1-12], καθώς και η εμφάνιση δομών που προσομοιάζουν με βλαστικά κέντρα, ορίστηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (30). Χρώσεις ανοσοϊστοχημείας για τα μόρια CD68, S100, και δραστική IL-18 διεξήχθησαν σε όλα τα άτομα της μελέτης, ενώ χρώση για την IL-12 διεξήχθη σε 13 από τους 21 ασθενείς με πρωτοπαθές SS, στους 7 ασθενείς με δευτεροπαθές SS και στους 9 ασθενείς από την ομάδα ελέγχου νόσου. Επιπλέον, η έκφραση της proIL-18 αξιολογήθηκε στα δείγματα ΕΣΑ των 18 εκ των 21 ασθενών με πρωτοπαθές SS, 4 από τους 7 ασθενείς με δευτεροπαθές SS, και 9 ασθενείς από την ομάδα ελέγχου νόσου.

Ο βαθμός διήθησης από κύτταρα θετικά σε CD68-, S100-, δραστική IL-18-, proIL-18-, και IL-12 μετρήθηκε οπτικά σε 5 διαφορετικά πεδία με αυξημένη πυκνότητα θετικών κυττάρων (μεγέθυνση 400X), και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν

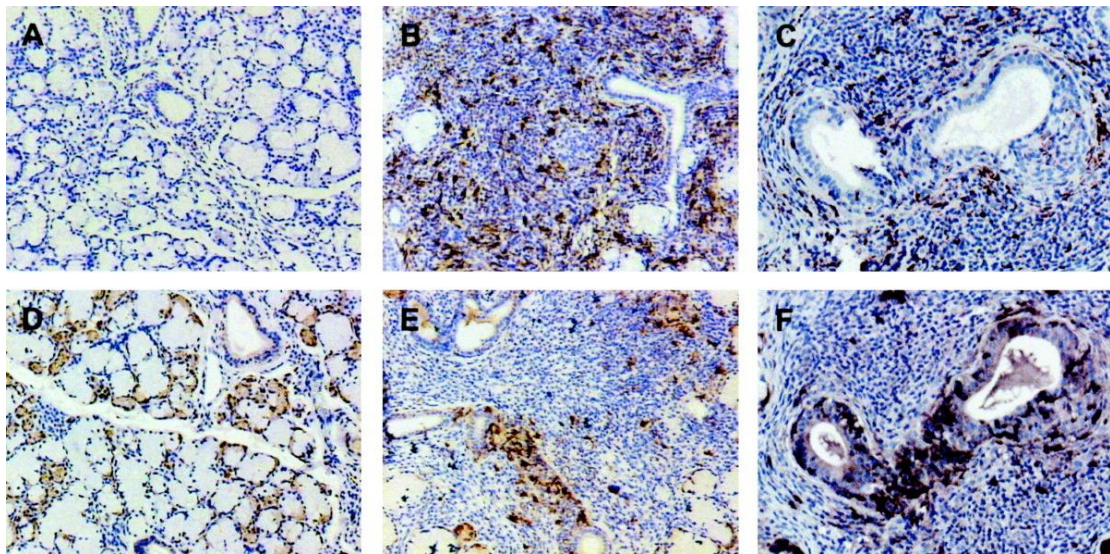
ως ο μέσος αριθμός των θετικών κυττάρων ανά πεδίο. Περιγράφηκαν επίσης τα σχετικά ποσοστά των CD3-θετικών T-λεμφοκυττάρων και των CD20-θετικών B-λεμφοκυττάρων στις λεμφοειδείς διηθήσεις όλων των ασθενών με SS. Εκτιμήσεις των αριθμών των διηθούμενων κυττάρων ελήφθησαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SigmaScan-Pro5.0 (Sigma, St. Louis, MO). Το μέγεθος της διήθησης των πορικών επιθηλιακών κυττάρων από τα ενδοεπιθηλιακά δενδριτικά κύτταρα εκφράστηκε ως ο αριθμός των πορικών ενδοεπιθηλιακών δενδριτικών κυττάρων ανά 100 πορικά επιθηλιακά κύτταρα των διηθημένων πόρων, και ως το ποσοστό των διηθημένων πόρων από τον συνολικό αριθμό των πόρων.

Στατιστική ανάλυση. Σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS, ο βαθμός διήθησης από τα θετικά σε CD68-, S100-, CD20-, δραστική IL-18-, proIL-18-, και IL-12 κύτταρα αξιολογήθηκε για τις μεταξύ τους συσχετίσεις καθώς και με τις ακόλουθες κλινικές, ορολογικές και ιστολογικές παραμέτρους: ηλικία κατά τη διάγνωση, διάρκεια των υποκειμενικών συμπτωμάτων ξηρότητας, επίπεδα κλασμάτων C3 και C4 του συμπληρώματος ορού, βαθμό βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score), παρουσία επίμονης ή υποτροπιάζουσας διόγκωσης σιελογόνων αδένων, ψηλαφητή πορφύρα, κρυοσφαιριναιμία, χαμηλά επίπεδα κλασμάτων C3 και C4 του συμπληρώματος ορού, εξωαδενική συμμετοχή, καθώς και θετικά σε αυτοαντισώματα αντι-Ro (SSA) ή αντι-La (SSB). Οι συσχετίσεις αυτές εκφράστηκαν με χρήση του Spearman's rank correlation coefficient. Οι συγκρίσεις εντός-ομάδας έγιναν με το Mann-Whitney rank sum test. Οι συσχετίσεις με κλινικο-ορολογικές εκδηλώσεις δεν αξιολογήθηκαν στην ομάδα των ασθενών με δευτεροπαθές SS, λόγω κλινικής ετερογένειας της ομάδας. Επιπλέον, τα μικρά μεγέθη δειγμάτων απέκλεισαν την πραγματοποίηση πολυπαραγοντικών αναλύσεων σε οποιαδήποτε από τις ομάδες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως διάμεση τιμή και εύρος, και αναφέρονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, που ορίζονται ως p τιμές μικρότερες από 0.05 ($p < 0.05$), και οριακά σημαντικές συσχετίσεις, που ορίζονται ως τιμές p μικρότερη από 0.10 ($p < 0.10$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανίχνευση CD68-θετικών μακροφάγων και S100-θετικών δενδριτικών κυττάρων στις βλάβες σιελογόνων αδένων. Όλα τα δείγματα βιοψιών σιελογόνων αδένων που μελετήθηκαν παρουσίασαν CD68-θετικά κύτταρα με τυπική μορφολογία μακροφάγων. Στους σιελογόνους αδένες ασθενών με SS εντοπίστηκαν άφθονα CD68-θετικά μακροφάγα στις διηθήσεις μονοπύρηνων κυττάρων, διάσπαρτα ή συγκεντρωμένα γύρω από τους πόρους στις λεμφοεπιθηλιακές βλάβες, καθώς και διάσπαρτα σε όλο το υπόλοιπο αδενικό παρέγχυμα (Εικόνα-1B). Αντίθετα, στα δείγματα σιελογόνων αδένων από δείγματα ελέγχου, τα CD68-θετικά μακροφάγα ήταν λίγα και διάσπαρτα στο αδενικό παρέγχυμα (Εικόνα-1A). Όντως, ο αριθμός των μακροφάγων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στα δείγματα ασθενών με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές SS σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0.001$ και $p = 0.011$, αντίστοιχα) (Πίνακας-1). Παρόμοια με το προφίλ στον λεμφικό ιστό αμυγδαλών, CD68-θετικά μακροφάγα με χαρακτηριστικά μακροφάγων με εγκολλωμένα σωμάτια (tingible body macrophages) παρατηρήθηκαν στις δομές έκτοπων βλαστικών κέντρων σε 4 (19%) από τα 21 δείγματα σιελογόνων αδένων ασθενών με πρωτοπαθές SS.

Τα δενδριτικά S100-θετικά κύτταρα με χαρακτηριστικές εκτενείς μεμβρανώδεις προεξοχές βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά πιο συχνά στα δείγματα σιελογόνων αδένων ασθενών με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές SS σε σχέση με τους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου νόσου ($p < 0.001$ και $p = 0.009$, αντίστοιχα) (Πίνακας-1 και Εικόνες-1D και E). Στα δείγματα από ασθενείς με SS (ιδιαίτερα από εκείνους με πρωτοπαθές SS), τα δενδριτικά κύτταρα εντοπίστηκαν πρωτίστως δίπλα ή/και εντός των πορικών επιθηλιακών δομών, κυρίως στις προηγμένες διηθήσεις (Εικόνα-1F). Αντίθετα, στα δείγματα από ομάδες ελέγχου, τα δενδριτικά κύτταρα ήταν αραιά, ενώ πολύ λίγα εντοπίστηκαν στις πορικές δομές (Εικόνα-1D). Όντως, ο βαθμός διήθησης από πορικά ενδοεπιθηλιακά δενδριτικά κύτταρα ήταν σημαντικότερος στα δείγματα ασθενών με πρωτοπαθές SS συγκριτικά με εκείνα από ασθενείς με δευτεροπαθές SS και από την ομάδα ελέγχου νόσου (και για τις δύο περιπτώσεις $p < 0.001$) (Πίνακας-1).



Εικόνα-1. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των CD68-θετικών μακροφάγων (Α-С) και S100-θετικών δενδριτικών κυττάρων (D-F) σε τομές παραφίνης από βιοψίες σιελογόνων αδένων ασθενών με μη-ειδική σιαλαδενίτιδα (που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες νόσου) (Α και D) και από ασθενείς με πρωτοπαθές SS (B, C, E και F). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά για την ελάχιστη παρουσία διάσπαρτων μακροφάγων (Α) και δενδριτικών κυττάρων (D) στους μάρτυρες νόσου, καθώς και για την βαριά διήθηση από μακροφάγα (B) και δενδριτικά κύτταρα (E) σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS. Η θετική χρώση των επιθηλιακών κυττάρων των λοβίων για S100 οφείλεται στην φυσιολογική έκφραση των S100 από τα επιθηλιακά κύτταρα (50). Επίσης, παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις που εντοπίστηκαν σε διαδοχικές τομές αδένων από ασθενείς με πρωτοπαθές SS, οι οποίες χαρακτηρίζονται από περιεπιθηλιακή διήθηση των πόρων από μακροφάγα (C) και ενδοεπιθηλιακή διήθηση των πόρων από δενδριτικά κύτταρα (F). (Μεγέθυνση x100 σε Α, Β, D και E, x 200 σε C και F.)

Πίνακας-1. Ανοσοιστοχημική ανάλυση της διήθησης από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα σε βιοψίες ΕΣΑ ασθενών με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές SS και μάρτυρες νόσου*

Ανοσοϊστολογικά χαρακτηριστικά	Πρωτοπαθές SS (21 ασθενείς)	Δευτεροπαθές SS (7 ασθενείς)	Ομάδα ελέγχου νόσου (9 ασθενείς)
Μακροφάγα			
Αριθμός κυττάρων/ πεδίο	35.3 (15.3-98.8) [†]	36.7 (16.3-65.0) [‡]	7.7 (0.0-47.0)
% των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων	12.0 (4.9-28.2)	14.1 (2.8-27.3)	NA
IL-18 θετικά μακροφάγα			
Αριθμός κυττάρων/ πεδίο	17.7 (3.0-60.0)	10.0 (0.0-14.0)	0.0
% των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων	6.9 (0.9-18.8)	1.8 (0.0-5.0)	NA
Δενδριτικά κύτταρα			
Αριθμός κυττάρων/ πεδίο	21.7 (7.8-41.3) [†]	16.0 (5.7-35.7) [§]	4.7 (0.0-8.0)
% των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων	4.6 (1.8-12.0)	4.0 (3.0-10.4)	NA
Πορικά ενδοεπιθηλιακά δενδριτικά κύτταρα			
Αριθμός κυττάρων/100 πορικά επιθηλιακά κύτταρα	8.7 (2.8-22.5) [¶]	3.9 (0.0-10.0)	1.7 (0.0-3.3)
% των θετικών πόρων	75.0 (5.0-100.0)	10.0 (0.0-30.0)	1.0 (0.0-10.0)

*Οι τιμές είναι διάμεση τιμή (εύρος). SS=σύνδρομο Sjögren, NA=not applicable, IL-18=ιντερλευκίνη-18

[†]p=0.001 σε σχέση με τους μάρτυρες

[‡]p=0.011 σε σχέση με τους μάρτυρες

[§]p=0.009 σε σχέση με τους μάρτυρες

[¶]p=0.001 σε σχέση με τους ασθενείς με δευτεροπαθές SS και από την ομάδα ελέγχου νόσου

Συσχετισμός της παρουσίας CD68-θετικών μακροφάγων και S100-θετικών δενδριτικών κυττάρων με ιστολογικές, κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους. Στους ασθενείς με πρωτοπαθές SS, ο βαθμός διήθησης από μακροφάγα συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό διήθησης τόσο από δενδριτικά κύτταρα ($p=0.04$) όσο και από τα πορικά ενδοεπιθηλιακά δενδριτικά κύτταρα ($p=0.03$) (Πίνακας-2). Επιπλέον, το ποσοστό διήθησης από τα μακροφάγα ήταν σημαντικά υψηλότερο στους ασθενείς με ιστορικό διόγκωσης των σιελογόνων αδένων σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς αυτό το χαρακτηριστικό ($p=0.01$) (Πίνακας-3). Ο βαθμός διήθησης από δενδριτικά κύτταρα στα δείγματα βιοψιών ασθενών με πρωτοπαθές SS παρουσίασε ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του συμπληρώματος C4 στον ορό ($p = 0.001$) (Πίνακας-2). Εντονότερη διήθηση από δενδριτικά κύτταρα παρατηρήθηκε σε ασθενείς με διόγκωση των σιελογόνων αδένων και χαμηλά επίπεδα C4 ορού, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν κανένα από αυτά τα χαρακτηριστικά ($p=0.03$ και $p=0.05$, αντίστοιχα) (Πίνακας-3).

Αυξημένη έκφραση της IL-18 από τα διηθούμενα CD68-θετικά μακροφάγα, αλλά όχι από τα S100-θετικά δενδριτικά κύτταρα, στους ΕΣΑ ασθενών με SS. Έντονα θετική χρώση για την δραστική IL-18 παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα βιοψιών ΕΣΑ που προήλθαν από ασθενείς με πρωτοπαθές SS ($n=21$, 100%), καθώς και στην πλειοψηφία των δειγμάτων (6 από 7, 85.7%) από ασθενείς με δευτεροπαθές SS, αλλά σε κανένα από τα 9 δείγματα που ελήφθησαν από άτομα της ομάδας ελέγχου νόσου (Πίνακας-1). Τα IL-18-θετικά κύτταρα εντοπίστηκαν αποκλειστικά στις διηθήσεις, είτε διάσπαρτα είτε σε συσσωρεύσεις κυττάρων γύρω από τους πόρους στις λεμφοεπιθηλιακές βλάβες, τόσο στους ασθενείς με πρωτοπαθές SS όσο και σε εκείνους με δευτεροπαθές SS (Πίνακας-1 και Εικόνα-2Α σε σύγκριση με την Εικόνα-2D).

Σχεδόν όλα τα κύτταρα που εξέφραζαν την δραστική IL-18 είχαν μορφολογικά χαρακτηριστικά μακροφάγων. Η ανάλυση της έκφρασης της IL-18 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα σε διαδοχικές τομές (Εικόνες-2Α-Γ), καθώς και με την διπλή ανοσοϊστοχημεική χρώση (Εικόνες-2Ε-Ζ), αποκάλυψε ότι τα IL-18-θετικά κύτταρα αποτελούν έναν υποπληθυσμό μακροφάγων, αλλά όχι δενδριτικών κυττάρων. Η έκφραση δραστικής IL-18 δεν ανιχνεύτηκε σε κανέναν άλλο τύπο κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, των πορικών και κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών.

Πίνακας-2. Συσχετίσεις διαφόρων ανοσοϊστολογικών παραμέτρων[†] και των επιπέδων C4 στον ορό ασθενών με πρωτοπαθές SS^{*†}

	IL-18+	IL-12+	Μακροφάγα	Δενδριτικά κύτταρα	B-λεμφοκύτταρα
IL-18+ κύτταρα	–	-0.79 (0.001)	0.56 (0.01)	0.56 (0.01)	0.55 (0.02)
IL-12+ κύτταρα	-0.79 (0.001)	–	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Μακροφάγα	0.56 (0.01)	ΜΣ	–	0.47 (0.04)	ΜΣ
Πορικά ενδοεπιθηλιακά δενδριτικά κύτταρα	ΜΣ	ΜΣ	0.49 (0.03)	ΜΣ	ΜΣ
Βαθμός διήθησης της βιοψίας [‡]	0.75 (<0.001)	-0.76 (0.003)	ΜΣ	ΜΣ	0.60 (0.01)
C4 ορού (mg/dl)	-0.55 (0.02)	0.60 (0.05)	-0.41 (0.09)	-0.70 (0.001)	ΜΣ

*Οι τιμές είναι Spearman's rho (p). IL-18=ιντερλευκίνη-18, IL-12=ιντερλευκίνη-12, ΜΣ =μη σημαντικό

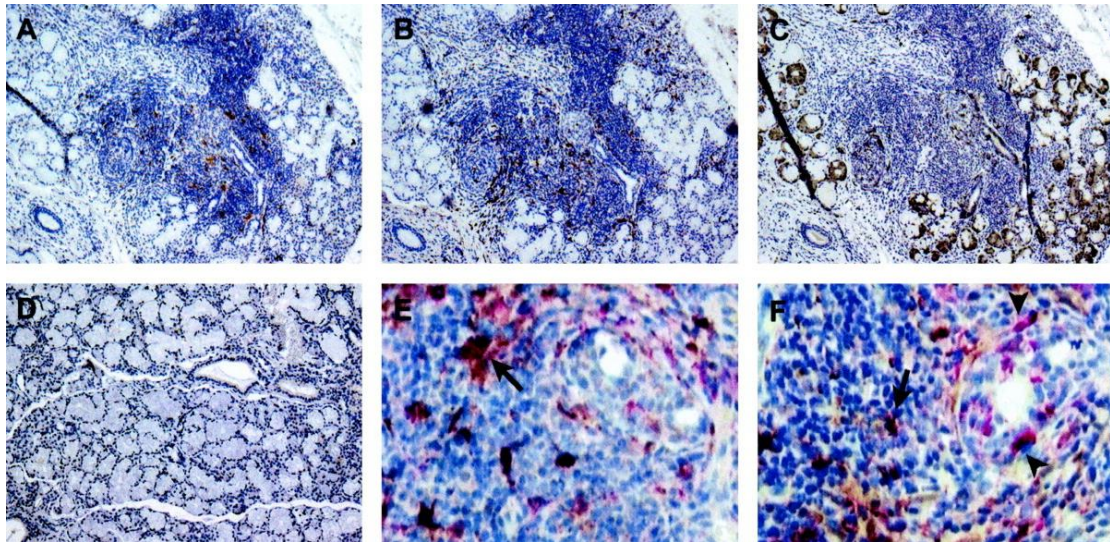
[†]Αριθμός των θετικών κυττάρων ανά μικροσκοπικό πεδίο ή, για τα IL-12-θετικά και τα B-λεμφοκύτταρα, τα ποσοστά των κυττάρων ανάμεσα στα διηθούντα μονοπύρηνα κύτταρα

[‡]βάσει του συστήματος των Daniels και Whitcher (30)

Πίνακας-3. Σύγκριση διάφορων ανοσοιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών σιελογόνων αδένων ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren με ή χωρίς δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης για την ανάπτυξη λεμφώματος*

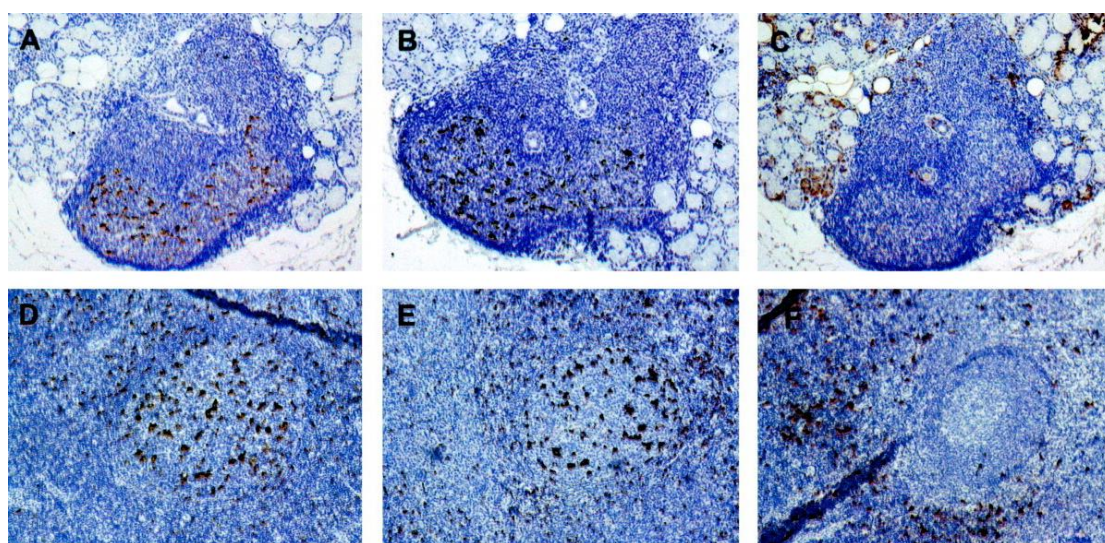
	Διόγκωση σιελογόνων αδένων			Χαμηλά επίπεδα C4 στον ορό			Πορφύρα		
Ανοσοϊστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	+	-	p	+	-	p	+	-	P
Μακροφάγα	76.3 (75.0–98.8)	34.5 (15.3–70.0)	0.01	35.0 (15.3–98.8)	28.8 (17.0–58.3)	ΜΣ	75.0 (27.6–98.8)	35.3 (15.3–76.3)	ΜΣ
Δενδριτικά κύτταρα	35.4 (26.8–41.3)	21.2 (7.8–36.0)	0.03	33.7 (13.0–41.3)	21.2 (11.5–28.7)	0.05	26.8 (11.5–41.3)	21.7 (12.3–36.0)	ΜΣ
IL-12-θετικά κύτταρα†	20.0 (9.8–19.6)	65.0 (25.0–90.0)	0.01	40.0 (9.8–90.0)	75.0 (61.0–80.0)	0.08	20.5 (19.6–21.0)	65.0 (9.8–90.0)	0.08
IL-18-θετικά κύτταρα†	46.0 (29.2–60.0)	15.5 (3.0–31.3)	0.02	28.0 (3.0–60.0)	14.7 (5.7–20.0)	0.07	29.2 (10.0–46.0)	16.0 (3.0–60.0)	ΜΣ

*Παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικής σημαντικότητας *p* τιμές (Mann-Whitney rank sum test). Η διήθηση από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και IL-18-θετικά κύτταρα παρουσιάζεται ως διάμεση τιμή (εύρος) των αριθμών των θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο, ενώ για τα IL-12-θετικά κύτταρα οι τιμές αντιστοιχούν στην διάμεση τιμή (εύρος) των ποσοστών αυτών των κυττάρων στα διηθούντα μονοπύρηννα κύτταρα.
IL-18=ιντερλευκίνη-18, IL-12=ιντερλευκίνη-12, ΜΣ =μη σημαντικό



Εικόνα-2. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της έκφρασης της δραστηκής μορφής της ιντερλευκίνης-18 (IL-18) σε τομές παραφίνης από βιοψίες ΕΣΑ από ασθενείς με πρωτοπαθές SS. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά για τους υψηλούς αριθμούς κυττάρων που εκφράζουν την IL-18 και κατανέμονται στην περιτορική διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων στους ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (A), και για την απουσία της έκφρασης της IL-18 στα διάσπαρτα μονοπύρηννα κύτταρα στα δείγματα από την ομάδα ελέγχου νόσου με ειδική σιαλαδενίτιδα (D). Ανοσοϊστοχημική χρώση για την IL-18 (A), τα CD68-θετικά μακροφάγα (B) και τα S100-θετικά δένδριτικά κύτταρα (C) σε διαδοχικές τομές ιστού από έναν ασθενή με πρωτοπαθές SS η οποία αποδεικνύει ότι τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-18 έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά και τοπογραφική διανομή με τα CD68-θετικά μακροφάγα, αλλά όχι με τα S100-θετικά δένδριτικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα διπλής ανοσοϊστοχημικής χρώσης (E και F) αποδεικνύουν τον συνεντοπισμό των IL-18 (καφέ) και CD68 (κόκκινο) μορίων σε έναν υποπληθυσμό των διηθούντων μακροφάγων (E, το βέλος δείχνει ένα παράδειγμα ενός διπλά-θετικού κυττάρου), καθώς και την έλλειψη συνεντοπισμού των IL-18 (καφέ) και S100 (κόκκινο) μορίων (F, το μεγάλο βέλος δείχνει ένα παράδειγμα ενός μονά-θετικού κυττάρου για την IL-18, ενώ το μικρό βέλος δείχνει ένα μονά-θετικό κύτταρο για S100)(Μεγέθυνση X 100).

Τα δείγματα που παρουσίασαν δομές έκτοπων βλαστικών κέντρων (4 από τα 21, 19% από τα δείγματα βιοψίας σιελογόνων αδένων από ασθενείς με πρωτοπαθές SS) περιείχαν ομοιόμορφα έντονα IL-18-θετικά μακροφάγα με μορφολογικά χαρακτηριστικά μακροφάγων τύπου tingible body (Εικόνες-3Α-Γ), ευρήματα παρόμοια με αυτά που βρέθηκαν σε λεμφοειδή ιστό αμυγδαλών ασθενούς χωρίς SS (Εικόνες-3Δ-Ζ). Ωστόσο, εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μακροφάγων, δεν υπήρχαν εμφανείς διαφορές στα συνολικά ποσοστά των IL-18-θετικών μακροφάγων μεταξύ των περιοχών με δομές ομοιάζουσες με βλαστικά κέντρα και εκείνες χωρίς αυτές (τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται).



Εικόνα-3. Τυπική ανοσοϊστοχημική χρώση σε διαδοχικές τομές παραφίνης από ιστό βιοψίας ΕΣΑ από έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με πρωτοπαθές SS (Α-Γ), σε σύγκριση με ιστό αμυγδαλών από έναν ασθενή χωρίς SS που υπεβλήθη σε αμυγδαλεκτομή (Δ-Ζ). Στο δείγμα βιοψίας σιελογόνων αδένων από ασθενή με πρωτοπαθές SS, ένα έκτοπο βλατικό κέντρο παρουσιάζει θετική χρώση για την δραστική μορφή της IL-18 (Α), τα CD68-θετικά μακροφάγα (Β) και τα S100-θετικά δένδριτικά κύτταρα (Γ), υποδεικνύοντας την παρόμοια τοπογραφική κατανομή των κυττάρων που εκφράζουν έντονα την IL-18 με αυτήν των μακροφάγων τύπου tingible body, αλλά όχι με την κατανομή των διαπλεκόμενων (interdigitating) δένδριτικών κυττάρων. Κατά παρόμοιο τρόπο, τα βλαστικά κέντρα των αμυγδαλών παρουσιάζουν θετική χρώση για την δραστική IL-18 (Δ), τα CD68-θετικά μακροφάγα (Ε), καθώς και για τα S100-θετικά δένδριτικά κύτταρα (Ζ), υποδεικνύοντας την παρουσία των έντονα IL-18-θετικών μακροφάγων τύπου tingible body στα βλαστικά κέντρα, αλλά όχι των IL-18-θετικών δένδριτικών κυττάρων στην περιφέρεια των βλαστικών κέντρων (Μεγένθυση X100).

Κατά τον ίδιο τρόπο με την δραστική IL-18, η ανοσοϊστοχημική χρώση για την proIL-18 έδειξε ισχυρή και αποκλειστική έκφραση από τα μακροφάγα, με παρόμοια κατανομή στις διηθήσεις, βλαστικά κέντρα και πόρους, σε όλα τα δείγματα βιοψιών από ασθενείς με SS (18 με πρωτοπαθές και 4 με δευτεροπαθές SS) αλλά σε κανέναν από τους μάρτυρες νόσου (τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται). Εκτός από τα ευρήματα στα μακροφάγα, ασθενής έως μέτρια χρώση για proIL-18 παρατηρήθηκε τόσο στα πορικά επιθηλιακά κύτταρα των ασθενών με SS, όσο και στους μάρτυρες νόσου (τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται).

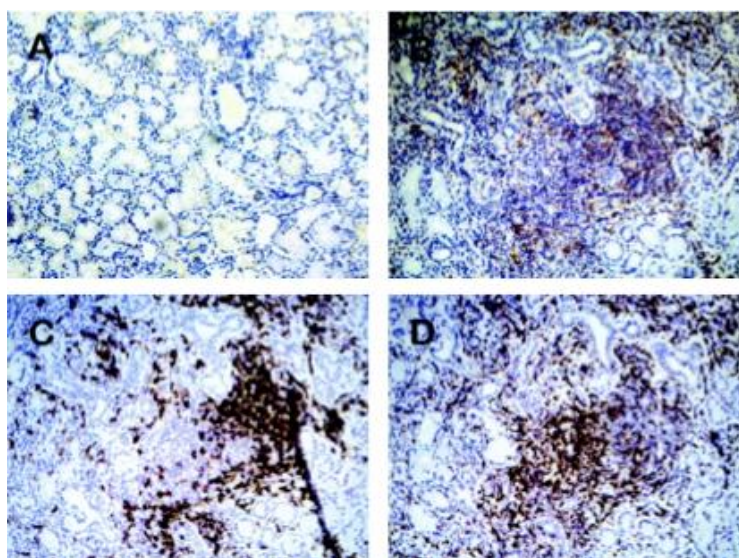
Η έκφραση της IL-18 από τα μακροφάγα στις βλάβες ΕΣΑ και η συσχέτιση με ιστολογικές, εργαστηριακές και κλινικές παραμέτρους σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS. Στα δείγματα βιοψίας σιελογόνων αδένων ασθενών με πρωτοπαθές SS, ο βαθμός διήθησης από τα κύτταρα που παράγουν την IL-18 συσχετίστηκε θετικά με την σοβαρότητα των λεμφοκυτταρικών διηθήσεων, όπως υποδεικνύεται από τον βαθμό βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score) ($p < 0.001$), καθώς και με τον βαθμό διήθησης από τα μακροφάγα ($p = 0,01$), τα δένδριτικά κύτταρα ($p = 0.01$) και τα B-λεμφοκύτταρα ($p = 0.02$) (Πίνακας 2). Αντίθετα, ο βαθμός διήθησης από τα κύτταρα που παράγουν την IL-18 συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα του συμπληρώματος C4 στον ορό ($p = 0.02$) (Πίνακας 2). Τα ποσοστά διήθησης από τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-18 συσχετίστηκε θετικά με την εμφάνιση της διόγκωσης των σιελογόνων αδένων ($p = 0.02$). Επιπλέον, σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος C4 στον ορό, οι βλάβες σιελογόνων αδένων έδειξαν μια τάση προς υψηλότερα ποσοστά διήθησης από κύτταρα που εκφράζουν την IL-18 ($p = 0.07$) (Πίνακας 3).

Η έκφραση της IL-12 στις βλάβες ΕΣΑ και η συσχέτιση της με ιστολογικές, εργαστηριακές και κλινικές παραμέτρους σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS. Η έκφραση της IL-12 ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα διηθούμενα μονοπύρρηνα κύτταρα όλων των ελεγχμένων (13) δειγμάτων ασθενών με πρωτοπαθές SS όπως επίσης και σε 4 από τα 7 (57.1%) δείγματα που ελήφθησαν από ασθενείς με δευτεροπαθές SS, αλλά μόνο σε 1 από τα 9 δείγματα μαρτύρων (και μόνο σε σπάνια διάσπαρτα μονοπύρρηνα κύτταρα) (Εικόνες 4-B). Η έκφραση της IL-12 παρουσίασε παρόμοια ένταση στους ασθενείς με πρωτοπαθές (μέση τιμή 61.0% του συνόλου των

διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων, εύρος 9.8-90.0%) και δευτεροπαθές SS (μέση τιμή 62.0% του συνόλου των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων, εύρος 0.0-93.0%).

Η έκφραση της IL-12 ανιχνεύθηκε ως μια διάχυτη, κοκκιώδης κυτταροπλασματική ή εντοπισμένη κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης χρώση, κυρίως στα B-λεμφοκύτταρα και στα πλασματοκύτταρα. Χαμηλότερη έκφραση της IL-12 ήταν εμφανής στα T-λεμφοκύτταρα, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημίας σε διαδοχικές τομές (Εικόνα 4B-D). Η θετική χρώση των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων για IL-12 δεν ήταν δυνατόν να αξιολογηθεί σωστά, λόγω του τεράστιου αριθμού των IL-12-θετικών μονοπύρηνων κυττάρων.

Στους ασθενείς με πρωτοπαθές SS, η διήθηση από τα IL-12-θετικά κύτταρα παρουσίασε μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση με αυτή των IL-18-θετικών κυττάρων ($p=0.001$), καθώς και μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τους βαθμούς βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score) των σιελογόνων αδένων ($p=0.003$). Υπήρξε έντονη τάση προς μια θετική συσχέτιση του ποσοστού της διήθησης από τα IL-12-θετικά κύτταρα με τα επίπεδα του συμπληρώματος C4 στον ορό ($p=0.05$) (Πίνακας 2). Επιπλέον, τα ποσοστά έκφρασης της IL-12 *in situ* ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ιστορικό διόγκωσης των σιελογόνων αδένων ($p=0.01$) και οριακά σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα του συμπληρώματος C4 ορού ή ψηλαφητή πορφύρα (και τα δύο $p=0.08$, σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς αυτά τα χαρακτηριστικά) (Πίνακας 3).



Εικόνα 4. Τυπική ανοσοϊστοχημική χρώση σε διαδοχικές τομές παραφίνης από ιστό βιοψίας ΕΣΑ από έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με πρωτοπαθές SS. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά για την απουσία έκφρασης της IL-12 στα σπάνια διάσπαρτα μονοπύρρηνα κύτταρα των ΕΣΑ ασθενών από την ομάδα ελέγχου νόσου με μη-ειδική σιαλαδενίτιδα (Α), καθώς και για τους υψηλούς αριθμούς περιπορικών μονοπύρηνων κυττάρων που εκφράζουν την IL-12 στους ασθενείς με πρωτοπαθές SS (Β). Η ανοσοϊστοχημική χρώση για την IL-12 (Β), τα CD20-θετικά Β-λεμφοκύτταρα (C) και τα CD3-θετικά Τ-λεμφοκύτταρα (D) σε διαδοχικές τομές ιστού από έναν ασθενή με πρωτοπαθές SS υποδεικνύει ότι τα κύτταρα που εκφράζουν την IL-12 έχουν παρόμοια τοπογραφική κατανομή με τα Β-λεμφοκύτταρα και λιγότερο με τα Τ-λεμφοκύτταρα (Μεγέθυνση X100).

Ανάπτυξη λεμφώματος στους ασθενείς με SS. Όπως προαναφέρθηκε, κανένας από τους ασθενείς με SS που μελετήθηκαν δεν είχαν διαγνωσθεί με λέμφωμα τη στιγμή που έγινε βιοψία ΕΣΑ. Ωστόσο, ένας ασθενής με πρωτοπαθές SS (μια γυναίκα ηλικίας 28 χρονών τη στιγμή της διάγνωσης του πρωτοπαθούς SS και λήψης του δείγματος βιοψίας ΕΣΑ) ανέπτυξε ένα υψηλού βαθμού MALT λέμφωμα Β-λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της μετέπειτα παρακολούθησης (41 μήνες μετά την λήψη της βιοψίας ΕΣΑ). Πριν διαγνωστεί με πρωτοπαθές SS, η ασθενής είχε ιστορικό συμπτωμάτων sicca (ξηρότητα στόματος και ματιών, επιβεβαιωμένα από αντικειμενικές δοκιμασίες) διάρκειας 36 μηνών. Στην αρχική επίσκεψη η ασθενής παρουσίαζε επίμονη αμφοτερόπλευρη διόγκωση σιελογόνων αδένων, ψηλαφητή πορφύρα στα κάτω άκρα, φαινόμενο Raynaud, χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος C4 στον ορό (4.0 mg/dl), κρυοσφαιριναιμία, θετικό ρευματοειδή παράγοντα και θετικά αντι-Ro (SSA) και αντι-La (SSB) αυτοαντισώματα, χωρίς λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία ή χαμηλά επίπεδα C3 στον ορό (C3 ορού 71.0 mg/dl). Η

ιστοπαθολογική ανάλυση της βιοψίας ΕΣΑ (ελήφθη πριν από την ανάπτυξη λεμφώματος) αποκάλυψε βαριές διηθήσεις μονοπύρηνων κυττάρων [βαθμός βαρύτητας διηθήσεων της βιοψίας (focus score) 12, χωρίς στοιχεία έκτοπων βλαστικών κέντρων], ενώ η ανοσοϊστοχημική ανάλυση αποκάλυψε σοβαρές διηθήσεις από μακροφάγα (98.8 κύτταρα / μικροσκοπικό πεδίο, 21.0% του συνόλου των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων), IL-18-θετικά μακροφάγα (46.0 κύτταρα/μικροσκοπικό πεδίο, 11.0% του συνόλου των διηθούντων μονοπυρήνων κυττάρων), και δενδριτικά κύτταρα (41.3 κύτταρα/μικροσκοπικό πεδίο, 9.9% του συνόλου των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων), αλλά μια σχετικά χαμηλή διήθηση από IL-12-θετικά μονοπύρηννα κύτταρα (97.0 κύτταρα/μικροσκοπικό πεδίο, 19.6% του συνόλου των διηθούντων μονοπύρηνων κυττάρων)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η στρατολόγηση και ενισχυμένη ενεργοποίηση μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων αποτελούν σταθερά ανοσοπαθολογικά χαρακτηριστικά διαφόρων οργανοειδικών αυτοάνοσων διαταραχών. Συγκεκριμένες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (συμπεριλαμβανομένων των IL-18 και IL-12) που παράγονται από αυτά τα κύτταρα στους ιστούς στόχους θεωρούνται ότι έχουν κρίσιμη εμπλοκή στην ανάπτυξη των χρόνιων φλεγμονωδών βλαβών (16-19). Έως σήμερα, η εμφάνιση και η κλινική σημασία των διηθούντων μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων στις λεμφοεπιθηλιακές βλάβες ασθενών με SS δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς.

Παρ' όλο που η παρουσία αυτών των κυττάρων στους ιστούς ασθενών με φλεγμονή έχει παρατηρηθεί πρωθύστερα (31-35), ο ρόλος τους στην εξέλιξη της νόσου έχει υποτιμηθεί, πιθανόν λόγω της χαμηλής πυκνότητας του πληθυσμού αυτών των κυττάρων. Πάντως, παρά τους χαμηλούς αριθμούς τους, αυτά τα κλασσικά αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ) είναι γνωστό ότι ασκούν σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους στα λεμφοειδή όργανα. Η υψηλή έκφραση των κυτταροκινών και χημειοκινών που παράγονται και προσελκύουν ΑΠΚ στις αδενικές δομές των ασθενών με πρωτογενές SS καθώς επίσης και σε πειραματικά ζωικά πρότυπα του SS σε ποντίκια (35-40) εμπλέκει έμμεσα τα ΑΠΚ στην παθογένεια του SS. Επιπλέον, σημαντική διείσδυση από κλασσικά ΑΠΚ έχει αναφερθεί στις αδενικές βλάβες στο μοντέλο ποντικού του SS, και έχει συσχετιστεί με αυξημένη έκφραση κυτταροκινών τύπου Th1 και δυσλειτουργία του ιστού (37, 41).

Η μελέτη αυτή καταδεικνύει ότι οι εκτεταμένες λεμφοεπιθηλιακές βλάβες στους επικουρικούς σιελογόνους αδένες (ΕΣΑ) ασθενών με πρωτοπαθές SS και σε εκείνους με δευτεροπαθές SS εκδηλώνουν σημαντική διήθηση από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον, ότι οι σιελογόνοι αδένες ασθενών με πρωτοπαθές SS βρέθηκαν να διατηρούν σημαντική περι-επιθηλιακή διήθηση από μακροφάγα και ενδοεπιθηλιακή διήθηση από δενδριτικά κύτταρα. Τα ευρήματα αυτά πιθανότατα υποδηλώνουν ότι στην ασθένεια αυτή υπάρχει τοπική έκφραση παραγόντων προσέλκυσης ΑΠΚ, όπως οι χημειοκίνες (35, 38, 39), και αλληλεπίδραση μεταξύ ΑΠΚ και πορικών επιθηλιακών κυττάρων.

Επιπλέον, σύμφωνα με προηγούμενα ευρήματα σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS (26, 27), η δημοσίευση αυτή αποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες IL-18 και IL-12

εκφράζονται έντονα από τα διηθούντα μακροφάγα και τα Β-λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα, στις βλάβες των ΕΣΑ σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS και σε εκείνους με δευτεροπαθές SS, αλλά όχι σε άτομα από την ομάδα ελέγχου νόσου. Η *in situ* έκφραση αυτών των κυτταροκινών ίσως να υπογραμμίζει την κυριαρχία Th1-κυττάρων και την παραγωγή της IFN σε ασθενείς με SS (10-13), και μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να είναι υπεύθυνη για τις καταστρεπτικές αλλαγές στον αδενικό επιθηλιακό ιστό.

Ωστόσο, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών (26, 27), δεν μπορέσαμε να επαληθεύσουμε την *in situ* έκφραση δραστηκής IL-18 ή IL-12 από επιθηλιακά κύτταρα ΕΣΑ. Στην πραγματικότητα, σειρές καλλιεργημένων επιθηλιακών κυττάρων από σιελογόνους αδένες βρέθηκαν ότι μπορούν να παράγουν σταθερά σημαντικές ποσότητες proIL-18, αλλά όχι την δραστηκή IL-18, γεγονός του οποίου η βιολογική σημασία αξιολογείται επί του παρόντος σε μελέτες της ομάδας μας που βρίσκονται σε εξέλιξη. Σημειωτέον, σε πειράματα ανοσοτύπωσης κατά Western με εκχυλίσματα επιθηλιακών κυττάρων έχει ανιχνευθεί proIL-18 με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της δραστηκής IL-18 (*Manoussakis MN, et al: μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις*), διαπίστωση που ενδεχομένως προσφέρει μια εξήγηση για την προηγούμενη ανίχνευση της έκφρασης δραστηκής IL-18 από το επιθήλιο ασθενών με πρωτοπαθές SS (26).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, αν και ανιχνεύθηκαν μακροφάγα σε όλους τους ιστούς ΕΣΑ ασθενών με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές SS, η έκφραση της IL-18 σε αυτά τα κύτταρα περιορίστηκε αποκλειστικά στις αλλοιώσεις των διηθημάτων του πρωτοπαθούς SS.

Το γεγονός αυτό επισημαίνει την ενεργή κατάσταση των μακροφάγων που εντοπίζονται στα όρια των διηθήσεων (26) και πιθανόν συνδέει την παρουσία αυτών των ενεργοποιημένων κυττάρων με την επέκταση των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Στην ουσία, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση ότι η έκφραση της IL-18 από τα διηθούντα μακροφάγα στις λεμφοεπιθηλιακές βλάβες των ασθενών με πρωτοπαθές SS διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προσέλκυση και οργάνωση των περιπορικών λεμφικών διηθήσεων.

Όπως αποκαλύφθηκε με λεπτομερή ποσοτική ανάλυση, η έκφραση της IL-18 από μακροφάγα συσχετίζεται ισχυρά και θετικά με διάφορους δείκτες της *in situ* αδενικής φλεγμονής σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS, συμπεριλαμβανομένης της έντασης μονοπύρηνων κυτταρικών διηθήσεων όπως και του αριθμού των διηθούντων

μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων και Β-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, υψηλή έκφραση της IL-18 ανιχνεύθηκε στα μακροφάγα τύπου tingible body των έκτοπων δομών που προσομοιάζουν με βλαστικά κέντρα και βρίσκονται σε αδενικές βλάβες ασθενών με πρωτοπαθές SS, γεγονός που έχει δημοσιευτεί πρωθύστερα (26). Ένα τέτοιο πρότυπο έκφρασης λαμβάνει χώρα με τρόπο δυσδιάκριτο από αυτόν των βλαστικών κέντρων των δευτερογενών λεμφοειδών οργάνων και πιθανόν εμπλέκει την IL-18 σε ανώμαλες Β λεμφο-πολλαπλασιαστικές διεργασίες του SS. Στο ίδιο πλαίσιο, η παρατηρούμενη συσχέτιση ανάμεσα στον βαθμό της *in situ* έκφρασης της IL-18 και της εμφάνισης κλινικο-ορολογικών δεικτών υψηλού ρίσκου για ανάπτυξη λεμφώματος Β-λεμφοκυττάρων, όπως των επίμονα χαμηλών επιπέδων συμπληρώματος C4 στον ορό (C4 hypocomplementemia) και της διόγκωσης των σιελογόνων αδένων (5-9), απαιτεί ειδική προσοχή. Κακόηθες λέμφωμα Β-λεμφοκυττάρων σε πρωτοπαθές SS, πολύ συχνά δημιουργείται στους εξωκρινείς αδένες (4), και η παθογένειά του θεωρείται σήμερα ως μια διαδικασία πολλών σταδίων που απαιτεί χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και γενετικές τροποποιήσεις (1). Στην πραγματικότητα, ασθενείς υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη λεμφώματος Β-λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν διάφορα κλινικο-εργαστηριακά σημεία χρόνιας και έντονης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της επίμονης διόγκωσης των σιελογόνων αδένων και της μείωσης του συμπληρώματος C4 στον ορό (5-9).

Από αυτά που γνωρίζουμε, η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που υποδεικνύει τη σύνδεση της παρατεταμένης μείωσης του συμπληρώματος C4 (C4 hypocomplementemia), σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS, με ανοσοϊστοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως η ένταση της διήθησης από δενδριτικά κύτταρα και η *in situ* ενεργοποίηση των μακροφάγων (όπως παρουσιάζεται με την αυξημένη έκφραση της IL-18). Τα ευρήματα αυτά, πολύ πιθανόν να υποδεικνύουν μια σύνδεση ανάμεσα στη χρόνια υπερενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και την συσσώρευση και ενεργοποίηση των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων στις βλάβες των σιελογόνων αδένων ασθενών με πρωτοπαθές SS. Ο ανοσοπαθολογικός σύνδεσμος ανάμεσα στον υψηλό αριθμό των διηθούντων αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων και η μεγαλύτερη περιφερική κατανάλωση του συμπληρώματος C3 είναι ασαφής. Παρ' ολ' αυτά, η ενεργοποίηση των κυτταρικών και διαλυτών συστατικών του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα

και το συμπλήρωμα) εμφανίζεται να παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του πρωτοπαθούς SS.

Αντίθετα, η εμπλοκή της IL-18 στη δημιουργία λεμφώματος δεν έχει ακόμα αποσαφηνισθεί (41, 42), και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να γίνει κατανοητή η εμπλοκή των μακροφάγων που εκφράζουν IL-18 στην εξάπλωση των μονοκλωνικών B-λεμφοκυττάρων που εμφανίζεται στο πρωτοπαθές SS. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι αντιδράσεις κυτταροκίνης τύπου Th2 μπορούν να επάγονται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* από την IL-18 στην απουσία της IL-12 (21, 43), και τέτοιες αποκρίσεις έχουν δείξει να εμφανίζονται σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS, με έντονη συσσώρευση B-λεμφοκυττάρων ή εμφανές λέμφωμα B-λεμφοκυττάρων στους ΕΣΑ (MSGs) (12, 44). Αξιοσημείωτο είναι ότι τα αποτελέσματά μας δείχνουν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του βαθμού έκφρασης της IL-18 σε σχέση με αυτήν της IL-12 στον φλεγμονώδη ιστό των ασθενών με πρωτοπαθές SS. Αν και δεν μπορέσαμε να αποδείξουμε κάποια συσχέτιση αυτών των παραγόντων με τη διάρκεια των συμπτωμάτων sicca ή την ηλικία των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να διευκρινιστεί αν οι ανοσοπαθολογικές βλάβες των ασθενών εξελίσσονται, με την πάροδο του χρόνου, από βλάβες στις οποίες κυριαρχεί η IL-12 σε αυτές με κυριαρχία της IL-18.

Παρ' όλ' αυτά, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν συνολικά ανάμεσα σε αυτούς τους 2 ανοσοϊστολογικούς παράγοντες και τα κλινικο-ορολογικά χαρακτηριστικά στους ασθενείς με πρωτοπαθές SS πιθανόν να αντιπροσωπεύουν 2 διαφορετικά προφίλ. Το πρώτο προφίλ χαρακτηρίζεται από υψηλή *in situ* έκφραση της IL-18 και χαμηλή *in situ* έκφραση της IL-12 και την εμφάνιση κλινικο-ορολογικών εκδηλώσεων συνδεδεμένων με υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη λεμφώματος (πρωτοπαθές SS τύπου I) (5-9), ενώ το δεύτερο χαρακτηρίζεται από συγκριτικά μικρότερη *in situ* έκφραση της IL-18 και υψηλότερη *in situ* έκφραση της IL-12 και έλλειψη εκδηλώσεων νόσου SS τύπου I. Είναι ενδιαφέρον ότι στην ομάδα ασθενών που μελετήθηκαν ο μόνος ασθενής που τελικά ανέπτυξε λέμφωμα παρουσίασε χαρακτηριστικά που ταιριάζουν τέλεια με το πρώτο προφίλ.

Αν και απαιτούνται πιο λεπτομερείς μελέτες, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ρυθμιστική δράση της IL-12 (άμεση ή έμμεση) στη χρόνια φλεγμονή που συνδέεται με το πρωτοπαθές SS. Είναι σημαντικό ότι πρόσφατα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η φυσιολογική λειτουργία της IL-12 είναι να περιορίζει την ενεργοποίηση των B-

λεμφοκυττάρων. Σε αντίθεση με την IL-18 (21, 22), η IL-12 έχειδειχθεί ότι δρα προστατευτικά σε αρκετά πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσων διαταραχών (45, 46). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ποντίκια που εμφάνιζαν ανεπάρκεια του υποδοχέα της IL-12 αναπτύχθηκαν αυθόρμητα ποικίλες αυτοάνοσες εκδηλώσεις συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών αγγειίτιδας και SS, πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και ανάπτυξης διαφόρων όγκων ανάμεσα στους οποίους και η κακοήθεια B-λεμφοκυττάρων (47). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η IL-12 παίζει κρίσιμο ρόλο και στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού και στην επιτήρηση έναντι όγκων B-λεμφοκυττάρων.

Η IL-12 έχει επίσηςδειχθεί ότι στους ανθρώπους δρα ογκοκατασταλτικά έναντι ποικίλων κακοηθειών των B-λεμφοκυττάρων, πιθανότατα μέσα από πολύπλοκα άμεσα ή έμεσα ρυθμιστικά μονοπάτια. Οι μηχανισμοί αυτοί πιθανά περιλαμβάνουν α) την ενίσχυση της αντικαρκινικής επιτήρησης από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φονείς (NK) που δρούν άμεσα αντιπολλαπλασιαστικά, β) προ-αποπτωτικές και αντι-αγγειογενετικές δράσεις και γ) ρύθμιση άλλων κυτταροκινών όπως η IL-23 και η IL-17 (20, 48). Επιπλέον, πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα έχουν ληφθεί από πρόσφατες μελέτες που περιλαμβάνουν την χορήγηση ανασυνδιασμένης IL-12 σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα λεμφώματα (49). Στο πλαίσιο αυτό, και παρ'όλο που χρειάζονται περισσότερες μελέτες προκειμένου να καθορισθεί η σημασία των ευρημάτων μας, είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η ανεπαρκής παραγωγή IL-12 στις βλάβες με εκτεταμένες διηθήσεις μπορεί να είναι ένας από τους λόγους ανάπτυξης λεμφώματος των B-λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS μετά από χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή παρέχει στοιχεία για τον ενεργό ρόλο των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων στην έκφραση των IL-18 και IL-12 που επηρεάζουν την επέκταση και οργάνωση των διηθητικών βλαβών που παρατηρούνται σε ασθενείς με πρωτοπαθές SS. Παρά τις συσχετίσεις με ορισμένα καλά αποδεκτά δυσμενή προγνωστικά για την ανάπτυξη κακοήθους λεμφοπολλαπλασιασμού, τα αποτελέσματά μας δεν αναγνωρίζουν τις διαταραχές στην έκφραση των IL-12 και IL-18 σαν άμεσο αιτιολογικό παράγοντα στην ανάπτυξη λεμφώματος στο πρωτοπαθές SS. Παρ'όλ'αυτά, οι παράγοντες αυτοί έχουν ένα ρόλο στην σοβαρή και χρόνια υπερενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος που παρατηρείται σε αρκετούς ασθενείς, αυξάνοντας την πιθανότητα ανάπτυξης κακοήθους λεμφοπλασίας. Στην πραγματικότητα, η αντίστροφη σχέση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στον βαθμό

έκφρασης των IL-18 και IL-12 στις φλεγμονώδεις βλάβες και η αντίθετη συσχέτιση αυτών των παραγόντων με δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες λεμφώματος δικαιολογεί την μελέτη αυτών των κυτταροκινών ως ιστοπαθολογικών δεικτών για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης λεμφώματος στο πρωτοπαθές SS.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Manoussakis MN, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: current concepts. *Advances in internal medicine*. 2001;47:191-217.
2. Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clinical immunology and immunopathology*. 1994;72(2):162-5.
3. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Annals of internal medicine*. 1978;89(6):888-92.
4. Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's Syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(8):1765-72.
5. Sutcliffe N, Inanc M, Speight P, Isenberg D. Predictors of lymphoma development in primary Sjogren's syndrome. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1998;28(2):80-7.
6. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2000;29(5):296-304.
7. Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(3):741-7.
8. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(6):796-803.
9. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Yague J, Akasbi M, Bautista R, Ruano M, et al. Hypocomplementaemia as an immunological marker of morbidity and mortality in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2005;44(1):89-94.
10. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1994;152(11):5532-9.
11. Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome. *British journal of rheumatology*. 1995;34(4):326-33.

12. Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Fujimura T, et al. Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(8):1376-84.
13. Dalavanga YA, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Labial salivary gland immunopathology in Sjogren's syndrome. *Scandinavian journal of rheumatology Supplement*. 1986;61:67-70.
14. Abu-Helu RF, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjogren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. *Journal of autoimmunity*. 2001;17(2):141-53.
15. Kapsogeorgou E, Manoussakis MN. The central role of epithelial cells in Sjogren's syndrome or autoimmune epithelitis. *Autoimmunity reviews*. 2004;3 Suppl 1:S61-3.
16. Ludewig B, Junt T, Hengartner H, Zinkernagel RM. Dendritic cells in autoimmune diseases. *Current opinion in immunology*. 2001;13(6):657-62.
17. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, et al. Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. *Current drug targets Inflammation and allergy*. 2003;2(2):131-6.
18. Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods (San Diego, Calif)*. 1999;19(1):121-32.
19. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual review of immunology*. 1998;16:495-521.
20. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews*. 2004;202:96-105.
21. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual review of immunology*. 2001;19:423-74.
22. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *Journal of leukocyte biology*. 2003;73(2):213-24.
23. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(10):1393-401.
24. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;162(11):6829-35.

25. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American journal of pathology*. 1997;150(3):823-32.
26. Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(5):R447-56.
27. Horiuchi M, Yamano S, Inoue H, Ishii J, Nagata Y, Adachi H, et al. Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjogren syndrome. *Journal of clinical pathology*. 1999;52(11):833-7.
28. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(6):554-8.
29. Manoussakis MN, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Xanthou G, Paikos S, Polihronis M, et al. Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(2):229-39.
30. Daniels TE, Whitcher JP. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. Analysis of 618 patients with suspected Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1994;37(6):869-77.
31. Moutsopoulos HM, Hooks JJ, Chan CC, Dalavanga YA, Skopouli FN, Detrick B. HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjogren's syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 1986;45(8):677-83.
32. Aziz KE, McCluskey PJ, Wakefield D. Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjogren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(2):140-3.
33. Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clinical and experimental immunology*. 1999;118(1):154-63.
34. van Blokland SC, Wierenga-Wolf AF, van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, et al. Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjogren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(12):1935-41.
35. Barone F, Bombardieri M, Manzo A, Blades MC, Morgan PR, Challacombe SJ, et al. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of

- lymphoid-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(6):1773-84.
36. Cuello C, Palladinetti P, Tedla N, Di Girolamo N, Lloyd AR, McCluskey PJ, et al. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome. *British journal of rheumatology*. 1998;37(7):779-83.
 37. Mustafa W, Zhu J, Deng G, Diab A, Link H, Frithiof L, et al. Augmented levels of macrophage and Th1 cell-related cytokine mRNA in submandibular glands of MRL/lpr mice with autoimmune sialoadenitis. *Clinical and experimental immunology*. 1998;112(3):389-96.
 38. Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(2):408-18.
 39. Amft N, Bowman SJ. Chemokines and cell trafficking in Sjogren's syndrome. *Scandinavian journal of immunology*. 2001;54(1-2):62-9.
 40. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(1):59-68.
 41. van Blokland SC, van Helden-Meeuwsen CG, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, et al. Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjogren's syndrome: a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(4):575-85.
 42. Airolidi I, Raffaghello L, Cocco C, Guglielmino R, Roncella S, Fedeli F, et al. Heterogeneous expression of interleukin-18 and its receptor in B-cell lymphoproliferative disorders deriving from naive, germinal center, and memory B lymphocytes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(1 Pt 1):144-54.
 43. Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, et al. IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;163(3):1230-6.
 44. De Vita S, Dolcetti R, Ferraccioli G, Pivetta B, De Re V, Gloghini A, et al. Local cytokine expression in the progression toward B cell malignancy in Sjogren's syndrome. *The Journal of rheumatology*. 1995;22(9):1674-80.

45. Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(4):493-7.
46. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1951-7.
47. Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, Sorrentino C, Fais F, Cilli M, et al. Lack of Il12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy. *Blood*. 2005;106(12):3846-53.
48. Airolidi I, Di Carlo E, Banelli B, Moserle L, Cocco C, Pezzolo A, et al. The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(11):1651-9.
49. Younes A, Pro B, Robertson MJ, Flinn IW, Romaguera JE, Hagemester F, et al. Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(16):5432-8.
50. Nakazato Y, Ishida Y, Takahashi K, Suzuki K. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and neoplastic salivary glands. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 405:299–310.

ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΥΤΕΡΗ

Συστημική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε ασθενείς με σοβαρό πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren πυροδοτούμενη από συσσώρευση φλεγμονογόνου DNA

**Αίγλη Γ. Βακράκου, MD^{1,2,*}, Σορίνα Μπόϊου, MD^{1,2,*},
Παναγιώτης Δ. Ζιάκας, MD, PhD¹, Ευαγγελία Ξύγγη, PhD³,
Χαραλαμπία Μπολέτη, PhD³, Μενελαος Ν. Μανουσάκης, MD, PhD^{1,2,4}**

- 1: Τμήμα Παθοφυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα
- 2: Εργαστήριο Μοριακής Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα
- 3: Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα
- 4: Κοινό Πρόγραμμα Ακαδημαϊκής Ρευματολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

*: Συνέβαλλαν εξίσου στην παρούσα εργασία

Συντομογραφίες: SS: Σύνδρομο Sjögren, SS-LR (Low risk): ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και χαμηλό κίνδυνο για ανάπτυξη λεμφώματος, SS-HR (High risk): ασθενείς με σύνδρομο Sjögren με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη λεμφώματος, SS-Ly= ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και non-Hodgkin's λέμφωμα τύπου MALT (MALT-NHL), HC: ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων, SG: σιελογόνοι αδένες, DNaseI: deoxyribonuclease-I, DNaseII: deoxy- ribonuclease-II, TREX1, Three Prime Repair Exonuclease-1; NLRP3, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP3); AIM2, absent in melanoma 2; PYCARD, PYD and CARD Domain Containing protein; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein, ESSDAI: EULAR δείκτης δραστηριότητας νόσου του συνδρόμου Sjögren, , cf-DNA: εξωκυττάριο DNA, cf-NA: εξωκυττάρια νουκλεϊνικά οξέα, NIG: nigericin.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ασθενείς με σύνδρομο Sjögren (SS) παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα εξωκυττάριου DNA (cf-DNA) στον ορό, φαινόμενο που σχετίζεται με μειωμένη δραστικότητα της DNAσης I. Εξωκυττάριο μη αποικοδομημένο DNA μπορεί να συσσωρευτεί στους ιστούς και να δρά ως ενεργοποιητής του φλεγμονοσώματος. Στην εργασία αυτή, διερευνήσαμε την παρουσία συσσωρεύσεων μη αποικοδομημένου DNA σε διάφορα βιολογικά διαμερίσματα στους ασθενείς με SS και την συσχέτιση αυτού με την δραστηριότητα των φλεγμονοσωμάτων NLRP3 και AIM2

Γι' αυτόν τον σκοπό έχουμε μελετήσει ορούς, μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs), κυκλοφορούντα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και σιελογόνους αδένες (SG) από διαφορετικές υποομάδες ασθενών με SS και μάρτυρες. Βρήκαμε ότι οι ασθενείς με SS με υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση λεμφώματος και η ομάδα ασθενών που είχαν ήδη εμφανίσει λέμφωμα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα cf-DNA στον ορό, σημαντική συσσώρευση εξωπυρηνικού DNA στα PBMCs και στους σιελογόνους αδένες, ένα ξεχωριστό γονιδιακό αποτύπωμα του φλεγμονοσώματος NLRP3 στα PBMCs, και σημαντικά αυξημένα επίπεδα της ιντερλευκίνης IL-18 και της πρωτεΐνης ASC στον ορό. Σε αυτούς τους ασθενείς, τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα στο περιφερικό αίμα παρουσίασαν ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και αυξημένη απόκριση σε NLRP3-ερεθίσματα, ενώ τα μακροφάγα που είχαν διηθήσει σιελογόνους αδένες (SG-infiltrating macrophages) παρουσίασαν σημεία ενεργοποίησης του NLRP3 και πυρόπτωση (pyroptosis). Εξωκυττάρια νουκλεϊνικά οξέα (cf-NA), απομονωμένα από ορούς ασθενών, πυροδότησαν επαρκώς την ενεργοποίηση των NLRP3- και AIM2-φλεγμονοσωμάτων σε μονοκύτταρα από υγιή άτομα. Οι ασθενείς με SS παρουσίασαν επίσης μειωμένη ενεργότητα DNAσης I στον ορό και μειωμένη έκφραση της DNAσης II σε PBMCs, αποτελέσματα που βρίσκονται σε αντίστροφη συσχέτιση με δείκτες ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος. Η αποσιώπηση του γονιδίου της DNAσης II σε μονοκύτταρα από υγιή άτομα οδήγησε σε εναπόθεση DNA στο κυτταρόπλασμα τους και ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με το φλεγμονόσωμα και την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 (caspase-1). Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν την παρουσία μιας συστημικής ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στους ασθενείς με SS με σοβαρή νόσο, η οποία συνδέεται με εκτεταμένη εξωπυρηνική συσσώρευση

φλεγμονογόνου (inflammagenic) DNA, και μειωμένη αποικοδόμηση DNA. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να οδηγήσουν στην ανάδειξη νέων βιοδεικτών και νέων θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση των ασθενών με SS.

Link in PubMed

Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations

Aigli G. Vakrakou^{a,b,1}, Sorina Boiu^{a,b,1}, Panayiotis D. Ziakas^a,
Evangelia Xingi^c, Haralabia Boleti^c, Menelaos N. Manoussakis^{a,b,d}

a Department of Pathophysiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

b Laboratory of Molecular Immunology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

c Light Microscopy Unit, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

d Joint Academic Rheumatology Program, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

1 Equal contribution

J Autoimmun. 2018 Jul;91:23-33. doi: 10.1016/j.jaut.2018.02.010. Epub 2018 Mar 16.

PMID: 29551295

3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Rates of Infiltration by Macrophages and Dendritic Cells and Expression of Interleukin-18 and Interleukin-12 in the Chronic Inflammatory Lesions of Sjögren's Syndrome

Correlation With Certain Features of Immune Hyperactivity and Factors Associated With High Risk of Lymphoma Development

M. N. Manoussakis, S. Boiu, P. Korkolopoulou, E. K. Kapsogeorgou, N. Kavantzias, P. Ziakas, E. Patsouris, and H. M. Moutsopoulos

Objective. To evaluate the expression profile of infiltrating macrophages and dendritic cells (DCs) as well as of interleukin-18 (IL-18) and IL-12 in the minor salivary gland (MSG) lesions of patients with Sjögren's syndrome (SS), and to assess the relationship of these factors with disease parameters.

Methods. Macrophages, DCs, T cells, B cells, proIL-18, mature IL-18, and IL-12 were detected by single- and double-labeling immunohistochemistry in MSG specimens from 21 patients with primary SS (13 of 21 tested for IL-12), 7 patients with secondary SS, and 9 disease control patients. Expression profiles were assessed for correlations with various disease parameters, including adverse predictors of lymphoma development.

Results. MSGs from patients with SS (but not from disease controls) manifested increased infiltration by macrophages and DCs, strong expression of IL-18 by macrophages (particularly in B cell-rich areas and in germinal center-like structures in primary SS), and expression of IL-12 by mononuclear cell infiltrates. In primary SS, high infiltration by macrophages correlated

with SG enlargement ($P = 0.01$). The DC infiltration rate correlated positively with the macrophage infiltration rate ($P = 0.04$), occurrence of SG enlargement ($P = 0.03$), and presence of C4 hypocomplementemia ($P = 0.05$), and inversely with serum C4 complement levels ($P = 0.001$). The rate of infiltration by IL-18-expressing cells correlated positively with biopsy focus scores ($P < 0.001$), larger infiltrates of macrophages ($P = 0.01$), DCs ($P = 0.01$), and B cells ($P = 0.02$), and SG enlargement ($P = 0.02$), and negatively with serum C4 complement levels ($P = 0.02$). The rate of infiltration by IL-12-expressing cells correlated inversely with that by IL-18-expressing cells ($P = 0.001$), biopsy focus scores ($P = 0.003$), and SG enlargement ($P = 0.01$), and positively with serum C4 complement levels ($P = 0.05$).

Conclusion. In patients with primary SS, infiltration of the SG by macrophages and DCs and expression of IL-18 and IL-12 appear to play active roles in the expansion and organization of infiltrative injuries and have a correlation with certain predictors of lymphoma development.

Sjögren's syndrome (SS), or autoimmune epithelitis, is a common autoimmune exocrinopathy that is typically characterized by chronic dysfunction and destruction of the salivary and lacrimal glands, and is associated with periductal lymphocytic infiltrates and B cell hyperreactivity (1,2). SS may be found alone (primary SS) or in association with other autoimmune diseases (secondary SS). In ~5% of patients, the disease may progress to the development of B cell lymphoma (3,4), and recent studies have indicated several clinico-

Supported by grants from the Lilian Voudouri Foundation and the Hellenic Ministry of Foreign Affairs.

M. N. Manoussakis, MD, S. Boiu, MD, P. Korkolopoulou, MD, E. K. Kapsogeorgou, PhD, N. Kavantzias, MD, P. Ziakas, MD, E. Patsouris, MD, H. M. Moutsopoulos, MD: University of Athens School of Medicine, Athens, Greece.

Address correspondence and reprint requests to M. N. Manoussakis, MD, Department of Pathophysiology, School of Medicine, University of Athens, 75 Mikras Asias Street, 11527 Athens, Greece. E-mail: menman@med.uoa.gr.

Submitted for publication July 14, 2006; accepted in revised form August 13, 2007.

serologic features that characterize patients at high risk of lymphoma development (type I SS) (5–9).

The lymphoepithelial lesions in patients with SS are predominantly characterized by Th1-type cytokine expression (10–12), including increased production of interferon- γ (IFN γ) (13), a cytokine that is likely directly involved in the destruction of epithelia (14). Glandular epithelial cells are thought to play a central pathogenetic role (2,15). However, the participation of the so-called professional antigen-presenting cells (APCs) (i.e., monocyte/macrophages and dendritic cells [DCs]) in the pathophysiologic processes of SS has not been adequately addressed. Among the professional APCs, DCs are known to play the most critical role in the initiation of primary T cell responses and in T cell-dependent autoantibody production (16). Both macrophages and DCs, however, being the central sensory components of the immune system and the source of various cytokines and chemokines, are thought to have important roles, beyond antigen presentation, in the pathogenesis of various autoimmune disorders (16,17).

Interleukin-18 (IL-18) and IL-12 are pleiotropic proinflammatory cytokines that are produced by activated macrophages and DCs, as well as other cell types (18–20). These cytokines are involved in almost every aspect of inflammation, including the recruitment of inflammatory cells, the amplification of T cell and natural killer (NK) cell cytotoxicity, and T cell activation. One of their principal actions is the induction of polarization to the Th1 phenotype, and in fact, both of these cytokines represent major IFN γ -inducing factors, alone or in synergy. In addition, IL-18 by itself has been shown capable of inducing Th2-type cytokines in an IL-4-independent manner (21). Biologically active IL-18 (18-kd) protein is generated by cleavage (mainly by caspase 1) from a 24-kd precursor molecule (proIL-18), whereas IL-12 is a heterodimeric (p70) cytokine composed of 2 disulfide-linked subunits (p35 and p40) (18,19).

Their broad spectrum of effector functions implicates IL-18 and IL-12 as pivotal regulators of chronic inflammation in autoimmune diseases (19–22). In fact, increased expression of these cytokines has been reported in various human autoimmune disorders (22–25). High IL-18 expression by macrophages and epithelial cells as well as high IL-12 expression by B cells and epithelial cells have been detected in the inflammatory infiltrates of minor salivary glands (MSGs) of patients with primary SS (26,27). In addition, an association of increased serum IL-18 levels with anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) autoantibody production in patients with

primary SS has been demonstrated (26). In these studies, however, the actual clinical significance of IL-18 and IL-12 protein expression in SS has not been thoroughly addressed.

Herein, we sought to define the occurrence of infiltrating macrophages and DCs as well as the *in situ* expression of IL-18 and IL-12 protein in MSG specimens from patients with primary SS and patients with secondary SS. In addition, we examined the correlation of the above-described immunohistopathologic features with various disease parameters in patients with primary SS, with the aim of investigating their clinical significance, and particularly whether any of these features could be used to distinguish those patients with primary SS at high risk of lymphoma development (5–9).

PATIENTS AND METHODS

Patients. The patients studied included 21 with primary SS (19 women, 2 men, median age 49 years, range 28–80 years) and 7 patients with SS associated with another autoimmune rheumatic disorder (collectively designated secondary SS, including 3 patients with rheumatoid arthritis, 2 with systemic lupus erythematosus, and 1 each with primary biliary cirrhosis and mixed connective tissue disease; all women, median age 48 years, range 29–62 years). Patients were diagnosed on the basis of the American-European Consensus Group revised classification criteria for definitive primary SS and secondary SS (28). Nine patients (all women, median age 45 years, range 25–65 years) with sicca symptoms who did not fulfill the SS classification criteria and who had no histopathologic or serologic evidence of SS served as disease controls. None of the patients or controls studied had a history or evidence of preexisting lymphoma, infection with hepatitis B virus, hepatitis C virus, or human immunodeficiency virus, sarcoidosis, or use of drugs associated with sicca manifestations. None of the patients with SS had evidence of SS-associated lymphoma at the time of the study.

MSG biopsy specimens were obtained from the patients with SS and disease controls during diagnostic evaluation for sicca symptoms, after all subjects had provided their informed consent. The study was approved by the regional hospital ethics committee. Tonsil tissue was also obtained from a patient without SS who underwent tonsillectomy. All biopsy specimens were paraffin-embedded for immunohistochemical analyses.

Patients' medical records were retrospectively evaluated for various clinical and serologic parameters, including certain manifestations of type I SS (persistent or recurrent SG enlargement, palpable purpura, cryoglobulinemia, and persistent C3 and/or C4 hypocomplementemia) (5–9). The patients with SS (but not the disease controls) displayed persistent or recurrent SG enlargement (3 of 21 patients with primary SS and 3 of 7 with secondary SS), palpable purpura (3 of 21 with primary SS), serum autoantibodies to Ro(SSA) (17 of 21 with primary SS and 4 of 7 with secondary SS) and to La(SSB) (12 of 21 with primary SS and 1 of 7 with secondary SS), C3

hypocomplementemia (serum C3 levels <50 mg/dl; 2 of 21 with primary SS), and C4 hypocomplementemia (serum C4 levels <20 mg/dl; 10 of 21 with primary SS and 3 of 7 with secondary SS). Extraglandular involvement (defined by the occurrence of any of the following: arthritis, Raynaud's phenomenon, purpura, renal tubular acidosis, peripheral neuropathy, and vasculitis) (1) was observed in 6 of 21 patients with primary SS and in 6 of 7 with secondary SS, whereas cryoglobulinemia was detected in only 3 of 13 patients with primary SS.

Primary antibodies. Antibodies against CD68 (macrophage-specific, clone PG-M1), S100 (DC-specific, Langerhans', interstitial, veiled, and interdigitating types), CD3 (T cell-specific), CD20 (B cell-specific), low molecular weight cytokeratin (epithelial cell-specific, clone MNF116), and Ki-67 (proliferation marker for detection of proliferating lymphoid cells in germinal centers) were from Dako (Glostrup, Denmark). Antibodies to human mature IL-18 (clone 2D3B6) were from MD Biosciences (Zurich, Switzerland), and antibodies to human proIL-18 and human IL-12p70 heterodimer (clone 219) were from R&D Systems (Abingdon, UK).

Histology and immunohistochemistry. Microtome sections obtained from MSG specimens were subjected to citrate treatment and stained immunohistochemically for cytokines and the various cellular markers, as previously described (29). Normal nonimmune fetal bovine serum and 0.5% H₂O₂ in methanol were used to block nonspecific antibody binding and endogenous peroxidase activity, respectively. Reactions were detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polymer (EnVision+) or the LSAB+ system (all from Dako) (for proIL-18), and developed using diaminobenzidine as chromogen. For double-labeling immunohistochemistry, sequential sections were prepared and analyzed in the same manner as for single staining, with consecutive staining using HRP and alkaline phosphatase (Fast Red; Dako). In all experiments, negative control stainings were performed by replacing primary antibodies with irrelevant isotype-matched antibodies.

Biopsy sections were coded and analyzed in a blinded manner by 2 experienced pathologists (PK and NK). The severity of focal lymphocytic sialadenitis (assessed using the biopsy focus score [range 1–12]) as well as the occurrence of germinal center–like formations were defined as previously described (30). Immunostainings for CD68, S100, and mature IL-18 were performed in all study subjects, whereas that for IL-12 was carried out in 13 of the 21 patients with primary SS and in all 7 patients with secondary SS and 9 disease control patients. In addition, proIL-18 expression was assessed in the MSG specimens of 18 of 21 patients with primary SS, 4 of 7 with secondary SS, and the 9 disease control patients.

The degree of infiltration by CD68-, S100-, mature IL-18-, proIL-18-, and IL-12–positive cells was counted manually in 5 different high-power fields with high density of positive cells (at 400× magnification), with results expressed as the median number of positive cells per microscopic field. The relative percentages of CD3-positive T cells and CD20-positive B cells were also defined in the lymphoid infiltrates of all patients with SS. Estimates of infiltrating cell numbers were obtained using the SigmaScan-Pro5.0 software (Sigma, St. Louis, MO). The magnitude of infiltration of ductal epithelial cells by intraepithelial DCs was expressed as the number of

ductal intraepithelial DCs per 100 ductal epithelial cells of the infiltrated ducts, and as the percentage of infiltrated ducts of the total number of ducts.

Statistical analysis. In the patients with primary SS, the degree of infiltration by CD68-, S100-, CD20-, mature IL-18-, proIL-18-, and IL-12–positive cells was assessed for correlations with each other as well as with the following clinical, serologic, and histologic parameters: age at diagnosis, duration of subjective sicca symptoms, serum levels of C3 and C4 complement components, biopsy focus score, and the presence of persistent or recurrent SG enlargement, palpable purpura, cryoglobulinemia, C3 or C4 hypocomplementemia, and extraglandular involvement, as well as positive test results for anti-Ro(SSA) or anti-La(SSB) autoantibodies. Correlations were expressed using the Spearman's rank correlation coefficient. Within-group comparisons were performed by Mann-Whitney rank sum test. Correlations with clinicoserologic manifestations were not assessed in the group of patients with secondary SS, due to clinical heterogeneity of the group. Moreover, the small sample sizes precluded multivariate analyses in any of the groups. Results are expressed as the median and range, and only the statistically significant correlations, defined as *P* values less than 0.05, and marginally significant correlations, defined as *P* values less than 0.10, are reported.

RESULTS

Detection of CD68-positive macrophages and S100-positive DCs in MSG lesions. All tested MSG biopsy specimens displayed CD68-positive cells that had the typical morphologic appearance of macrophages. In the MSG specimens from patients with SS, ample numbers of macrophages were detected within the mononuclear cell infiltrates, and these were scattered or aggregated around ducts in lymphoepithelial lesions as well as spread throughout the remaining glandular parenchyma (Figure 1B). In contrast, in control specimens, these cells were few, and were scattered in the glandular parenchyma (Figure 1A). In fact, macrophages were significantly more frequent in the specimens from patients with primary SS and those with secondary SS compared with disease controls (*P* < 0.001 and *P* = 0.011, respectively) (Table 1). Similar to the profile in the tonsillar lymphoid tissue, CD68-positive cells with characteristics of tingible body macrophages were observed at the germinal center–like structures in 4 (19%) of 21 MSG specimens from patients with primary SS (results not shown).

S100-positive DCs with characteristic extensive membranous processes were also significantly more frequent in the MSG specimens from patients with primary SS and from those with secondary SS compared with disease controls (*P* < 0.001 and *P* = 0.009, respectively) (Table 1 and Figures 1D and E). In samples from patients with SS (particularly those with primary SS),

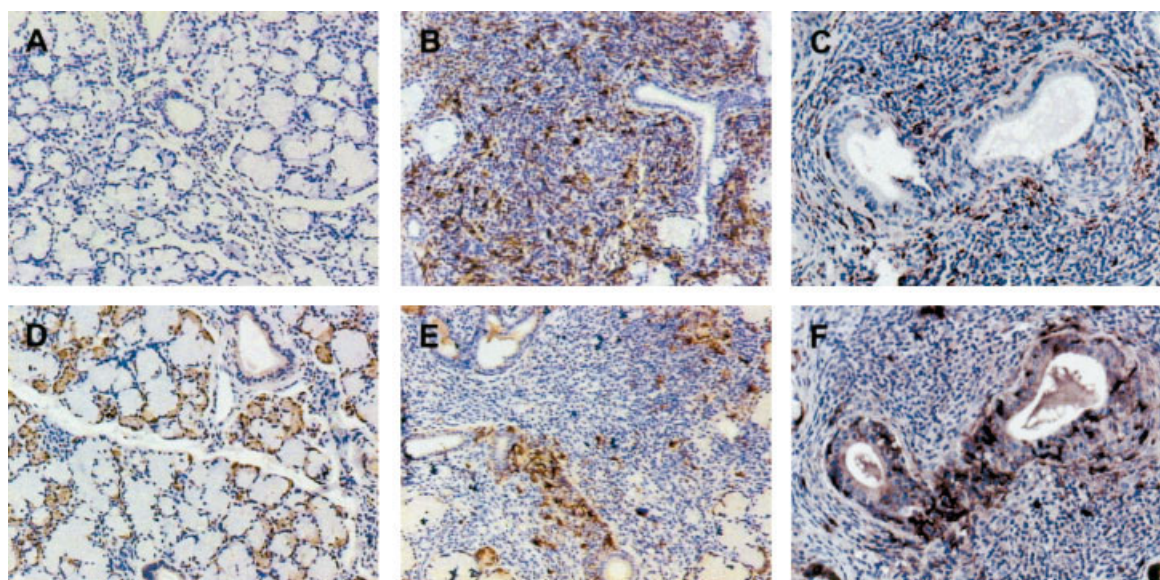


Figure 1. Immunohistochemical detection of CD68+ macrophages (A–C) and S100+ dendritic cells (DCs) (D–F) in paraffin-embedded sections of minor salivary gland biopsy samples from patients with nonspecific sialadenitis (as disease controls) (A and D) and from patients with primary Sjögren’s syndrome (SS) (B, C, E, and F). Results are representative of the minimal presence of scattered macrophages (A) and DCs (D) in disease control patients, and of the heavy infiltration by macrophages (B) and DCs (E) in patients with primary SS. The S100 positivity of acinar epithelial cells can be attributed to the physiologic S100 expression by normal acinar epithelial cells (see ref. 50). Also shown are lesions typical of those found in the serial glandular sections from patients with primary SS, characterized by periepipithelial infiltration of the duct by macrophages (C) and intraepithelial infiltration of the duct by DCs (F). (Original magnification $\times 100$ in A, B, D, and E; $\times 200$ in C and F.)

DCs were present predominantly in juxtaposition and/or within the ductal epithelial structures, mostly in advanced infiltrates (Figure 1F), whereas in control specimens, DCs were sparse, and very few were evident

within the ductal structures (Figure 1D). In fact, the degree of infiltration by ductal intraepithelial DCs was significantly more frequent in the specimens from patients with primary SS compared with those with sec-

Table 1. Immunohistopathologic analyses of infiltration by macrophages and dendritic cells in minor salivary gland biopsy samples from patients with primary SS, those with secondary SS, and disease control patients*

Immunohistologic feature	Primary SS (n = 21)	Secondary SS (n = 7)	Controls (n = 9)
Macrophages			
No. of cells/microscopic field	35.3 (15.3–98.8) [†]	36.7 (16.3–65.0) [‡]	7.7 (0.0–47.0)
% of total infiltrating MNCs	12.0 (4.9–28.2)	14.1 (2.8–27.3)	NA
IL-18–positive macrophages			
No. of cells/microscopic field	17.7 (3.0–60.0)	10.0 (0.0–14.0)	0.0
% of total infiltrating MNCs	6.9 (0.9–18.8)	1.8 (0.0–5.0)	NA
Dendritic cells			
No. of cells/microscopic field	21.7 (7.8–41.3) [†]	16.0 (5.7–35.7) [§]	4.7 (0.0–8.0)
% of total infiltrating MNCs	4.6 (1.8–12.0)	4.0 (3.0–10.4)	NA
Ductal intraepithelial dendritic cells			
No. of cells per 100 ductal epithelial cells	8.7 (2.8–22.5) [¶]	3.9 (0.0–10.0)	1.7 (0.0–3.3)
% of ducts positive	75.0 (5.0–100.0) [¶]	10.0 (0.0–30.0)	1.0 (0.0–10.0)

* Values are the median (range). SS = Sjögren’s syndrome; MNCs = mononuclear cells; NA = not applicable; IL-18 = interleukin-18.

[†] $P < 0.001$ versus controls.

[‡] $P = 0.011$ versus controls.

[§] $P = 0.009$ versus controls.

[¶] $P < 0.001$ versus patients with secondary SS and controls.

Table 2. Statistically significant and marginally significant correlations between the various immunohistopathologic parameters as well as serum C4 complement levels in patients with primary SS*

	IL-18-positive cell infiltration rate	IL-12-positive cell infiltration rate	Macrophage infiltration rate	DC infiltration rate	B cell infiltration rate†
IL-18-positive cell infiltration rate†	–	–0.79 (0.001)	0.56 (0.01)	0.56 (0.01)	0.55 (0.02)
IL-12-positive cell infiltration rate†	–0.79 (0.001)	–	NS	NS	NS
Macrophage infiltration rate†	0.56 (0.01)	NS	–	0.47 (0.04)	NS
Ductal intraepithelial DC infiltration rate†	NS	NS	0.49 (0.03)	NS	NS
MSG biopsy focus score‡	0.75 (<0.001)	–0.76 (0.003)	NS	NS	0.60 (0.01)
Serum C4 level§	–0.55 (0.02)	0.60 (0.05)	–0.41 (0.09)	–0.70 (0.001)	NS

* Values are Spearman's rho (P). SS = Sjögren's syndrome; IL-18 = interleukin-18; DC = dendritic cell; NS = not significant; MSG = minor salivary gland.

† Expressed as the number of cells per microscopic field or, for IL-12-positive cells and B cells, the percentage of cells among infiltrating mononuclear cells.

‡ Assessed according to the system of Daniels and Whitcher (30).

§ Expressed as mg/dl.

ondary SS and disease controls (both $P < 0.001$) (Table 1).

Correlation of the presence of CD68-positive macrophages and S100-positive DCs with histologic, clinical, and laboratory parameters. In patients with primary SS, the degree of infiltration by macrophages correlated positively with that by DCs ($P = 0.04$) and that by ductal intraepithelial DCs ($P = 0.03$) (Table 2). Moreover, the macrophage infiltration rate was significantly higher in patients with SG enlargement compared with patients without this feature ($P = 0.01$) (Table 3).

The degree of infiltration by DCs in the biopsy samples of patients with primary SS showed a strong negative correlation with the serum C4 complement levels ($P = 0.001$) (Table 2), whereas significantly more intense infiltration by DCs was observed in patients with SG enlargement and those with C4 hypocomplementemia compared with those without either of these features ($P = 0.03$ and $P = 0.05$, respectively) (Table 3).

Increased IL-18 protein expression by infiltrating CD68-positive macrophages, but not by S100-positive DCs, in MSG biopsy samples from patients with SS. Strongly positive staining for mature IL-18 was observed in all MSG biopsy samples (100%) obtained from patients with primary SS ($n = 21$), as well as in the majority of samples (6 [85.7%] of 7) from patients with secondary SS, but in none of the 9 disease control samples (Table 1). The IL-18-positive cells in patients with primary SS, as well as in those with secondary SS, were detected exclusively within the infiltrates, either scattered or in aggregates around ducts in the lympho-epithelial lesions (Table 1 and Figure 2A compared with Figure 2D).

Almost all of the cells that expressed mature IL-18 possessed macrophage-like morphologic features (i.e., abundant cytoplasm and vesicular retiform nuclei, with occasionally extended cytoplasmic processes). In support of this observation, analysis of the expression of

Table 3. Comparison of distinct immunohistopathologic features in patients with primary SS with and those without certain predictors of lymphoma development*

Immunohistopathologic feature	SG enlargement			C4 hypocomplementemia			Purpura		
	Present	Absent	P	Present	Absent	P	Present	Absent	P
Macrophage infiltration rate	76.3 (75.0–98.8)	34.5 (15.3–70.0)	0.01	35.0 (15.3–98.8)	28.8 (17.0–58.3)	NS	75.0 (27.6–98.8)	35.3 (15.3–76.3)	NS
DC infiltration rate	35.4 (26.8–41.3)	21.2 (7.8–36.0)	0.03	33.7 (13.0–41.3)	21.2 (11.5–28.7)	0.05	26.8 (11.5–41.3)	21.7 (12.3–36.0)	NS
IL-12-positive cell infiltration rate	20.0 (9.8–19.6)	65.0 (25.0–90.0)	0.01	40.0 (9.8–90.0)	75.0 (61.0–80.0)	0.08	20.5 (19.6–21.0)	65.0 (9.8–90.0)	0.08
IL-18-positive cell infiltration rate	46.0 (29.2–60.0)	15.5 (3.0–31.3)	0.02	28.0 (3.0–60.0)	14.7 (5.7–20.0)	0.07	29.2 (10.0–46.0)	16.0 (3.0–60.0)	NS

* Only statistically significant or marginally significant P values (by Mann-Whitney rank sum test) are shown. Rates of infiltration by macrophages, dendritic cells (DCs), and interleukin-18 (IL-18)-positive cells are the median (range) number of cells per microscopic field, while for IL-12-positive cells, the rate is the median (range) percentage of cells among infiltrating mononuclear cells. SS = Sjögren's syndrome; SG = salivary gland; NS = not significant.

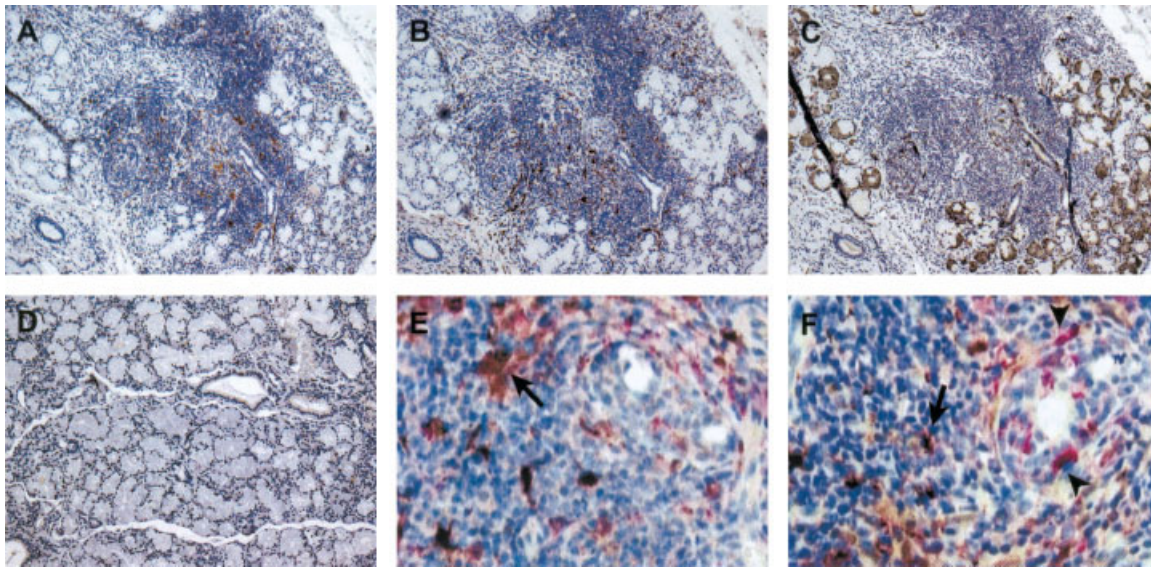


Figure 2. Immunohistochemical detection of mature-type interleukin-18 (IL-18) expression in paraffin-embedded sections of minor salivary gland biopsy tissue from patients with primary Sjögren's syndrome (SS). Results are representative of the high amounts of IL-18-expressing cells distributed within the periductal mononuclear infiltrate in patients with primary SS (A), and of the absence of IL-18 expression in scattered mononuclear cells in disease control patients with nonspecific sialadenitis (D). Immunostaining for IL-18 (A), CD68+ macrophages (B), and S100+ dendritic cells (DCs) (C) in serial tissue sections from a patient with primary SS demonstrates that IL-18-expressing cells share similar morphologic properties and topologic distribution with macrophages, but do not share these features with DCs. Double-labeling immunohistochemical results (E and F) verify the colocalization of IL-18 (brown) and CD68 (red) molecules on a subpopulation of infiltrating macrophages (arrow indicates an example of a double-positive cell) (E), and the lack of colocalization of IL-18 (brown) and S100 (red) molecules (arrow indicates a single-positive cell for IL-18; arrowhead indicates a single-positive cell for S100) (F). (Original magnification $\times 100$.)

IL-18 by macrophages and DCs in serial sections (Figures 2A–C), as well as in double-labeling immunostainings (Figures 2E and F), revealed that the IL-18-expressing cells represented a subpopulation of macrophages, but not of DCs. No expression of mature IL-18 was detected on other types of cells, including lymphocytes, ductal and acinar epithelia, and fibroblasts.

Specimens that were found to have germinal center–like structures (4 [19%] of the 21 MSG biopsy samples from patients with primary SS) uniformly contained strongly IL-18–positive macrophages that had the morphologic features of tingible body macrophages (Figures 3A–C), similar to the findings in non-SS tonsillar lymphoid tissue (Figures 3D–F). Among these specimens, however, other than the morphologic appearance of the macrophages, there were no discernible differences in the overall rates of expression of IL-18–positive macrophages between areas with germinal center–like structures and those without (results not shown).

In a manner identical to mature IL-18, the staining for proIL-18 revealed strong and exclusive expres-

sion of macrophages in all tested biopsy specimens from patients with SS (18 of 18 with primary SS, 4 of 4 with secondary SS, and none of the disease controls), with similar distribution among the infiltrates, germinal center–like structures, and ducts (results not shown). In addition to the findings in macrophages, weak to moderate staining for proIL-18 was also observed on the ductal epithelial cells from patients with SS and from disease controls (results not shown).

IL-18 expression by macrophages in MSG lesions and correlation with histologic, laboratory, and clinical parameters in patients with primary SS. Among the MSG biopsy samples from patients with primary SS, the degree of infiltration by IL-18–producing cells correlated positively with the intensity of round cell infiltrates, as indicated by the biopsy focus score ($P < 0.001$), as well as the degree of infiltration by macrophages ($P = 0.01$), DCs ($P = 0.01$), and B cells ($P = 0.02$) (Table 2). Conversely, the degree of infiltration by IL-18–producing cells correlated negatively with serum C4 complement levels ($P = 0.02$) (Table 2). The rates of infiltration by IL-18–expressing cells in the MSGs of

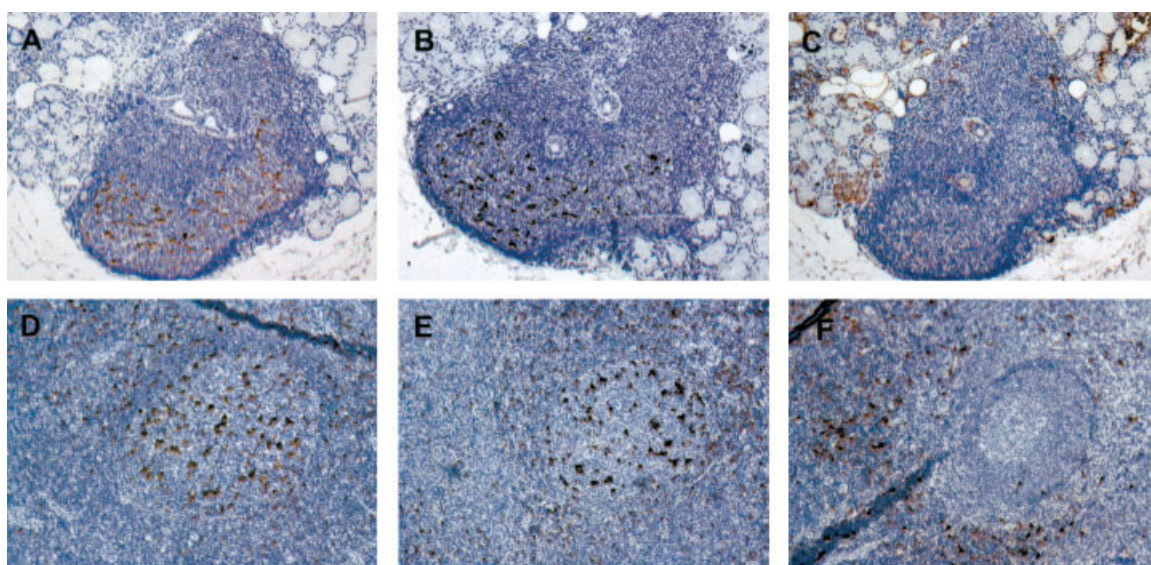


Figure 3. Immunohistochemical staining patterns in serial paraffin-embedded sections of minor salivary gland (MSG) biopsy tissue from a representative patient with primary Sjögren's syndrome (SS) (A–C), compared with tonsillar tissue from a patient without SS who underwent tonsillectomy (D–F). In the MSG biopsy sample from the patient with primary SS, an ectopic germinal center–like structure shows staining for mature-type interleukin-18 (IL-18) (A), CD68+ macrophages (B), and S100+ dendritic cells (DCs) (C), indicating the similar topologic distribution of strongly IL-18–expressing cells and macrophages with characteristics of tingible body macrophages within the germinal center–like structure, but lack of these features in the interdigitating DCs. Similar to the MSG findings, the germinal center of the tonsillar tissue also shows staining for mature-type IL-18 (D), CD68+ macrophages (E), and S100+ DCs (F), indicating the presence of strongly IL-18–positive tingible body macrophages within the germinal center, but lack of these features in the interdigitating DCs located in the periphery of the germinal center. (Original magnification $\times 100$.)

patients with primary SS correlated positively with the occurrence of SG enlargement ($P = 0.02$). In addition, in patients with C4 hypocomplementemia the MSG lesions showed a trend toward a positive correlation with higher rates of infiltration by IL-18–expressing cells ($P = 0.07$) (Table 3).

IL-12 expression in MSG lesions and correlation with histologic, laboratory, and clinical parameters in patients with primary SS. IL-12 expression was detected exclusively among the infiltrating mononuclear cells of all specimens (13 of 13 tested) from patients with primary SS and in 4 (57.1%) of the 7 specimens obtained from patients with secondary SS, whereas expression of IL-12 could be identified in only 1 of 9 disease control specimens (and only in rare cells among scattered mononuclear cells) (Figures 4A and B). IL-12 expression occurred with similar intensity in patients with primary SS (median 61.0% of total infiltrating mononuclear cells, range 9.8–90.0%) and patients with secondary SS (median 62.0% of total infiltrating mononuclear cells, range 0.0–93.0%).

The expression of IL-12 was detected in a diffuse, granular cytoplasmic pattern or localized along the cytoplasmic membrane, and was located primarily on B cells and plasma cells. Lower IL-12 expression was evident in T cells, as indicated by the results of immunophenotyping of the serial sections (Figures 4B–D). IL-12 positivity in macrophages and DCs could not be correctly assessed, due to the overwhelming number of IL-12–positive mononuclear cells.

In patients with primary SS, the rates of infiltration by IL-12–positive cells displayed a strong inverse correlation with that by IL-18–positive cells ($P = 0.001$), as well as a strong inverse correlation with the MSG biopsy focus scores ($P = 0.003$). There was a strong trend toward a positive correlation of the rate of infiltration by IL-12–expressing cells with serum C4 complement levels ($P = 0.05$) (Table 2). In addition, the rates of IL-12 expression in situ were found to be significantly lower in patients with SG enlargement ($P = 0.01$) and marginally lower in patients with C4 hypocomple-

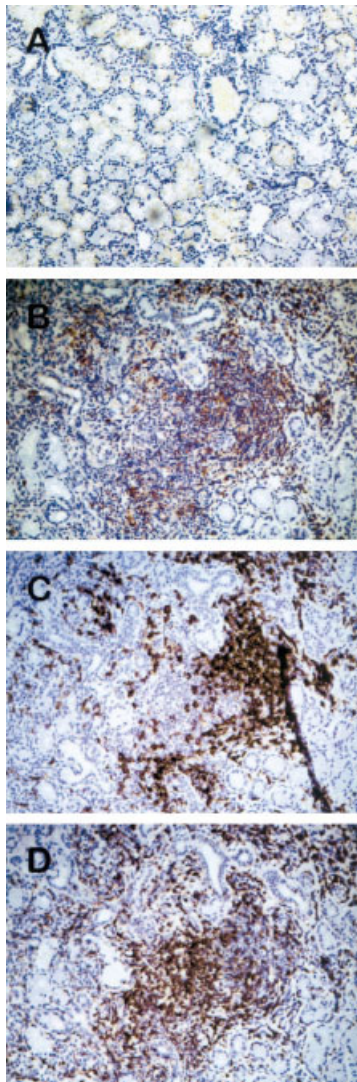


Figure 4. Immunohistochemical detection of interleukin-12 (IL-12) in paraffin-embedded sections of minor salivary gland biopsy tissue from a representative patient with primary Sjögren's syndrome (SS). Results are representative of the absence of IL-12 expression in scattered mononuclear cells in disease control patients with nonspecific sialadenitis (A), and of the high amounts of IL-12-expressing mononuclear cells within the periductal mononuclear infiltrate in patients with primary SS (B). Immunostaining for IL-12 (B), CD20+ B cells (C), and CD3+ T cells (D) in serial tissue sections from a patient with primary SS demonstrates that IL-12-expressing cells and B cells share similar topologic distribution, but fewer similarities are shared with T cells. (Original magnification $\times 100$.)

mentemia or palpable purpura (both $P = 0.08$ versus patients without these features) (Table 3).

Development of lymphoma in patients with SS.

As mentioned above, none of the patients with SS studied had evidence of lymphoma at the time of the SG

biopsy. However, 1 patient with primary SS (a female patient age 28 years at the time of diagnosis and acquisition of the MSG biopsy specimen) developed high-grade mucosa-associated lymphoid tissue B cell lymphoma during the subsequent followup (41 months after the acquisition of the MSG biopsy specimen). Prior to receiving the diagnosis of primary SS, the patient had a history of sicca symptoms (oral and eye dryness, confirmed by objective tests) that lasted 36 months.

At clinical presentation the patient was found to have persistent bilateral SG enlargement, palpable purpura of the lower extremities, Raynaud's phenomenon, C4 hypocomplementemia (C4 level of 4.0 mg/dl), cryoglobulinemia, and positive test results for rheumatoid factor and anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) autoantibodies, but did not have lymphadenopathy, splenomegaly, or low serum C3 complement levels (serum C3 level of 71.0 mg/dl). The histopathologic analysis of the MSG biopsy specimen (obtained prior to lymphoma development) revealed heavy mononuclear cell infiltrates (biopsy focus score of 12, without evidence of ectopic germinal center-like structures), whereas immunohistochemical analysis disclosed high rates of infiltration by macrophages (98.8 cells/microscopic field, 21.0% of total infiltrating mononuclear cells), IL-18-positive macrophages (46.0 cells/microscopic field, 11.0% of total infiltrating mononuclear cells), and DCs (41.3 cells/microscopic field, 9.9% of total infiltrating mononuclear cells), but a relatively low rate of infiltration by IL-12-positive mononuclear cells (97.0 cells/microscopic field, 19.6% of total infiltrating mononuclear cells).

DISCUSSION

Recruitment and enhanced activation of macrophages and DCs are consistent immunopathologic features of several organ-specific autoimmune disorders. Proinflammatory cytokines (including IL-18 and IL-12) that are produced by these cells in the target tissues are thought to be critically involved in the development of chronic inflammatory lesions (16–19). To date, the occurrence and clinical significance of macrophages and DCs that infiltrate the lymphoepithelial lesions of patients with SS have not been formally assessed.

Although the presence of these cells has previously been noted in the inflamed tissue of patients (31–35), their influence in the disease processes has been underestimated, probably due to relatively low cell densities. However, despite their low numbers, these classic APCs are known to exert strong regulatory effects in the lymphoid organs. The high expression of APC-

derived and APC-recruiting cytokines and chemokines in the inflamed glandular structures of patients with primary SS, as well as in experimental mouse models of SS (35–40), indirectly implicates APCs in the pathogenesis of SS. In addition, significant infiltration by classic APCs has been reported in the glandular lesions in mouse models of SS, and has been associated with increased expression of Th1-type cytokines and tissue dysfunction (37,41).

This study demonstrates that the advanced lymphoepithelial lesions in the MSGs of patients with primary SS and in those with secondary SS manifest considerable infiltration by macrophages and DCs. Interestingly, the salivary ducts of patients with primary SS were found to sustain significant periepithelial infiltration by macrophages and intraepithelial infiltration by DCs, findings that most probably suggest that local expression of APC-recruiting factors, such as chemokines (35,38,39), and cross-talk between APCs and ductal epithelial cells are occurring in this disease. Furthermore, in accordance with previous findings in patients with primary SS (26,27), this report demonstrates that IL-18 and IL-12 proteins are strongly expressed by infiltrating macrophages and B lymphocytes, respectively, in the MSG lesions of patients with primary SS and those with secondary SS, but not in disease controls. The *in situ* expression of these cytokines may underlie the predominance of Th1 cells and the production of IFN γ in SS (10–13), and may, at least in part, account for the destructive changes of the glandular epithelia.

However, in contrast to the results of the previous reports (26,27), we were unable to verify the *in situ* expression of mature IL-18 or IL-12 by MSG epithelial tissues. In fact, cultivated salivary gland epithelial cell lines have been found to be able to produce constitutively significant amounts of proIL-18, but not the mature form of IL-18, a fact whose actual biologic significance is currently being evaluated in ongoing studies by our group. Of note, current immunoblotting experiments using epithelial cell extracts have revealed a cross-reactive recognition of proIL-18 by a monoclonal antibody to mature IL-18 (Manoussakis MN, et al: unpublished observations), a finding that possibly offers an explanation for the previous demonstration of mature IL-18 expression by the epithelia of patients with primary SS (26).

It is noteworthy that, although macrophages were detected throughout the MSG tissue of patients with primary SS and those with secondary SS, IL-18 expression by these cells was exclusively confined within the infiltrating lesions in primary SS. This fact strongly

indicates the activated status of macrophages located within the borders of infiltrations (26), and possibly links the presence of these activated cells with the expansion of inflammatory reactions. In essence, our results further support the notion that IL-18 expression by macrophages in the lymphoepithelial lesions of patients with primary SS has a critical role in the recruitment and organization of periductal lymphoid infiltrates (26).

As revealed by detailed quantitative analyses, IL-18 expression by macrophages was found to correlate strongly and positively with several indices of *in situ* glandular inflammation in patients with primary SS, including the intensity of mononuclear cell infiltrates as well as the numbers of infiltrating macrophages, DCs, and B cells. Furthermore, high IL-18 expression was detected in the tingible body macrophages of the ectopic germinal center–like structures that are found in the glandular lesions of patients with primary SS, a fact that has also been previously reported (26). Such an expression pattern apparently occurs in a manner indistinguishable from that in the germinal centers of secondary lymphoid organs, and probably implicates IL-18 in the aberrant B lymphoproliferative processes of SS.

In the same context, the observed correlation between the rate of *in situ* IL-18 expression and the occurrence of clinicoserologic indicators of a high risk of B cell lymphoma, such as persistent C4 hypocomplementemia and SG enlargement (5–9), merits particular attention. Malignant B cell lymphoma in primary SS very often arises in the exocrine glands (4), and its pathogenesis is currently considered to be a multistep process that involves chronic immune activation together with genetic alterations (1). In fact, patients at high risk for the development of B cell lymphoma have been shown to manifest various clinicoserologic signs of chronic and intense immune system activation, including persistent SG enlargement and C4 hypocomplementemia (5–9).

To our knowledge, this study is the first to demonstrate the association of persistent C4 hypocomplementemia in patients with primary SS with immunohistopathologic features, such as the intensity of infiltration by DCs and the *in situ* activation of macrophages (as illustrated by enhanced expression of IL-18). These findings most likely point to a linkage between chronic immune system hyperactivity and the accumulation and activation of macrophages and DCs in the SG lesions of patients with primary SS. The immunopathologic link between the higher rates of infiltrating APCs and larger peripheral C4 consumption is unclear. Nevertheless, the activation of cellular and soluble compo-

nents of the innate immune system (such as macrophages, DCs, and complement) appears to play a significant role in the pathogenesis of primary SS.

In contrast, the implication of IL-18 in lymphomagenesis has not yet been clarified (41,42), and further prospective studies are needed to define the involvement of IL-18-expressing macrophages in the monoclonal B lymphocyte expansions that occur in patients with primary SS. Nevertheless, it may be of relevance that Th2-type cytokine reactions may be induced *in vitro* and *in vivo* by IL-18 in the absence of IL-12 (21,43), and such responses have been demonstrated to occur in patients with primary SS, with the intense accumulation of B cells or overt B cell lymphoma in the MSGs (12,44). Remarkably, our data indicate a reverse relationship between the rate of expression of IL-18 and that of IL-12 in the inflamed tissue of patients with primary SS. Although we could not demonstrate any correlation of these factors with the duration of sicca symptoms or patients' age at diagnosis, both larger studies and time-course studies are required to clarify whether the immunopathologic lesions in patients evolve, over time, from IL-12- to IL-18-dominated lesions.

Overall, however, the correlations observed between these 2 immunohistologic factors and clinicoserologic features in the patients with primary SS probably represent 2 distinct profiles. The first profile is characterized by high *in situ* IL-18 expression, low *in situ* IL-12 expression, and the occurrence of SS clinicoserologic manifestations associated with high risk of lymphoma development (type I primary SS) (5–9), whereas the second one is typified by comparatively lower *in situ* IL-18 expression, higher *in situ* IL-12 expression, and lack of type I SS disease manifestations. Intriguingly, in the group of patients studied, the single patient who ultimately developed lymphoma exhibited features that are a perfect match with the former profile.

Although more refined studies are needed, our findings may indicate direct and/or indirect regulatory effects of IL-12 in the chronic inflammatory processes of primary SS. Importantly, recent evidence indicates that IL-12 functions physiologically to prevent autoimmunity and to restrain aberrant B cell activation. In direct contrast to IL-18 (21,22), IL-12 has been shown to be protective in several experimental autoimmune disorders (45,46). More recently, IL-12 receptor-deficient mice were demonstrated to develop, in a spontaneous manner, various autoimmune features (including features of vasculitis and SS), lymphoproliferation, and various tumors, including B cell malignancies (47), sug-

gesting that IL-12 plays a crucial role in both immunoregulation and surveillance against B cell tumors.

In humans, IL-12 has also been shown to act as a tumor suppressor against various B cell malignancies, likely involving a complex array of direct and indirect regulatory pathways, including the amplification of antitumor surveillance by cytotoxic T cells and NK cells, direct antiproliferative and proapoptotic effects, antiangiogenic effects, and the regulation of other cytokines such as IL-23 and IL-17 (20,48). In addition, promising results have been obtained in recent studies involving the administration of recombinant IL-12 in patients with relapsed lymphomas (49). In this context, although further studies are needed to delineate the significance of our findings, it is tempting to speculate that deficient IL-12 production in the advanced infiltrating lesions may be one of the factors that underlie the development of B cell lymphoma in patients with primary SS following chronic immune activation.

In conclusion, this study provides evidence of the active role of macrophages and DCs and of the *in situ* expression of IL-18 and IL-12 in the expansion and organization of the infiltrative injuries observed in patients with primary SS. Despite the correlations with certain well-accepted adverse predictors of the development of malignant lymphoproliferation, our results cannot identify the aberrancies in the expression of IL-12 or IL-18 as direct causative agents of lymphoma development in primary SS. However, these factors apparently have a role in the severe and chronic immune system hyperactivity that occurs in certain patients, thereby increasing the likelihood that malignant lymphoproliferation will develop. In fact, the reverse relationship that was observed between the rate of expression of IL-18 and that of IL-12 in the inflammatory lesions and the contrariwise correlation of these factors with adverse predictors of lymphoma vindicate the study of these cytokines as histopathologic indicators of the risk of lymphomagenesis in primary SS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Manoussakis had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study design. Manoussakis.

Acquisition of data. Boiu, Korkolopoulou, Kapsogeorgou, Kavantzaz.

Analysis and interpretation of data. Manoussakis, Korkolopoulou, Kavantzaz.

Manuscript preparation. Manoussakis.

Statistical analysis. Ziakas.

General supervision. Patsouris, Moutsopoulos.

REFERENCES

- Manoussakis MN, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: current concepts. *Adv Intern Med* 2001;47:191–217.
- Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:162–5.
- Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med* 1978;89:888–92.
- Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, Moutsopoulos HM, and the members of the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1765–72.
- Sutcliffe N, Inanc M, Speight P, Isenberg D. Predictors of lymphoma development in primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1998;28:80–7.
- Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29:296–304.
- Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:741–7.
- Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis* 2006;65:796–803.
- Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Yague J, Akasbi M, Bautista R, Ruano M, et al. Hypocomplementaemia as an immunological marker of morbidity and mortality in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:89–94.
- Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994;152:5532–9.
- Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1995;34:326–33.
- Ohya Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Fujimura T, et al. Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1376–84.
- Dalavanga YA, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Labial salivary gland immunopathology in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl* 1986;61:67–70.
- Abu-Helu RF, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjögren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. *J Autoimmun* 2001;17:141–53.
- Kapsogeorgou E, Manoussakis MN. The central role of epithelial cells in Sjögren's syndrome or autoimmune epithelitis. *Autoimmun Rev* 2004;3 Suppl 1:61–3.
- Ludewig B, Junt T, Hengartner H, Zinkernagel RM. Dendritic cells in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2001;13:657–62.
- Kanai T, Uraushihara K, Okazawa A, Hibi T, Watanabe M. Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2:131–6.
- Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999;19:121–32.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495–521.
- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004;202:96–105.
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001;19:423–74.
- Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003;73:213–24.
- Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;104:1393–401.
- Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woratanadham J, Smith MF Jr, Foley E, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829–35.
- Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997;150:823–32.
- Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjögren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R447–56.
- Horiuchi M, Yamano S, Inoue H, Ishii J, Nagata Y, Adachi H, et al. Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjögren syndrome. *J Clin Pathol* 1999;52:833–7.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al, and the European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.
- Manoussakis MN, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Xanthou G, Paikos S, Polihronis M, et al. Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:229–39.
- Daniels TE, Whitcher JP. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca: analysis of 618 patients with suspected Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:869–77.
- Moutsopoulos HM, Hooks JJ, Chan CC, Dalavanga YA, Skopouli FN, Detrick B. HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1986;45:677–83.
- Aziz KE, McCluskey PJ, Wakefield D. Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjögren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles. *Ann Rheum Dis* 1997;56:140–3.
- Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999;118:154–63.
- Van Blokland S, Wierenga-Wolf AF, van Helden-Meeuwse CG, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, et al. Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjögren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Lab Invest* 2000;80:1935–41.
- Barone F, Bombardieri M, Manzo A, Blades MC, Morgan PR, Challacombe SJ, et al. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2005;52:1773–84.
- Cuello C, Palladinetti P, Tedla N, Di Girolamo N, Lloyd AR, McCluskey PJ, et al. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1998;37:779–83.
- Mustafa W, Zhu J, Deng G, Diab A, Link H, Frithiof L, et al. Augmented levels of macrophage and Th1 cell-related cytokine mRNA in submandibular glands of MRL/lpr mice with autoimmune sialoadenitis. *Clin Exp Immunol* 1998;112:389–96.

38. Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum* 2001; 44:408–18.
39. Amft N, Bowman SJ. Chemokines and cell trafficking in Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 2001;54:62–9.
40. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 2002;109:59–68.
41. Van Blokland SC, van Helden-Meeuwsen CG, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, et al. Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjögren's syndrome: a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Lab Invest* 2000;80:575–85.
42. Airolidi I, Raffaghello L, Cocco C, Guglielmino R, Roncella S, Fedeli F, et al. Heterogeneous expression of interleukin-18 and its receptor in B-cell lymphoproliferative disorders deriving from naive, germinal center, and memory B lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004;10:144–54.
43. Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, et al. IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *J Immunol* 1999;163:1230–6.
44. De Vita S, Dolcetti R, Ferraccioli G, Pivetta B, De Re V, Gloghini A, et al. Local cytokine expression in the progression toward B cell malignancy in Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1995;22:1674–80.
45. Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 2002;110:493–7.
46. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951–7.
47. Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, Sorrentino C, Fais F, Cilli M, et al. Lack of IL12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy [published erratum appears in *Blood* 2006; 107:45]. *Blood* 2005;106:3846–53.
48. Airolidi I, Di Carlo E, Banelli B, Moserle L, Cocco C, Pezzolo A, et al. The IL-12R β 2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. *J Clin Invest* 2004;113:1651–9.
49. Younes A, Pro B, Robertson MJ, Flinn IW, Romaguera JE, Hagemester F, et al. Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Clin Cancer Res* 2004;10:5432–8.
50. Nakazato Y, Ishida Y, Takahashi K, Suzuki K. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and neoplastic salivary glands. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985;405:299–310.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations

Aigli G. Vakra^{a, b, 1}, Sorina Boiu^{a, b, 1}, Panayiotis D. Ziakas^a, Evangelia Xingi^c, Haralabia Boleti^c, Menelaos N. Manoussakis^{a, b, d, *}

^a Department of Pathophysiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^b Laboratory of Molecular Immunology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

^c Light Microscopy Unit, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

^d Joint Academic Rheumatology Program, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2017

Received in revised form

19 February 2018

Accepted 23 February 2018

Available online xxx

Keywords:

Sjögren's syndrome

Inflammasome

DNase-I

DNase-II

Peripheral blood

Salivary glands

ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) patients manifest high cell-free DNA (cf-DNA) levels in serum, associated with impaired DNaseI activity. Undegraded DNA may accumulate in tissues and act as an inflammasome-activating signal. Herein, we investigated the occurrence of aberrant DNA build-up in various biologic compartments of SS patients and its correlation with the activity of NLRP3 and AIM2 inflammasomes. For this purpose, we evaluated sera, PBMC, circulating monocytes and salivary glands (SG) from different SS patient subgroups and controls. We found that SS patients at high risk for lymphoma and those with established lymphoma display high serum cf-DNA levels, substantial extranuclear DNA accumulations in PBMC and SG tissues, a unique NLRP3 inflammasome gene signature in PBMC, and significantly increased serum IL-18 and ASC levels. In these patients, the circulating monocytes manifested NLRP3 inflammasome activation and increased response to NLRP3 stimuli, whereas SG-infiltrating macrophages exhibited signs of NLRP3 activation and pyroptosis. Cell-free nucleic acids isolated from patients' sera competently primed the activation of both NLRP3 and AIM2 inflammasomes in healthy monocytes. SS patients also manifested diminished DNaseI activity in serum and DNaseII expression in PBMC, which inversely correlated with indices of inflammasome activation. DNaseII gene-silencing in healthy monocytes led to cytoplasmic DNA deposition and activation of inflammasome-related genes and of caspase1. Our data reveal the occurrence of systemic NLRP3 inflammasome activation in severe SS, which is associated with widespread extranuclear accumulations of inflammagenic DNA and impaired DNA degradation. These findings can provide novel biomarkers and new therapeutic targets for the management of SS patients with adverse outcomes.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: SS-LR, SS patients with low risk for lymphoma development; SS-HR, SS patients with high risk for lymphoma development; SS-Ly, SS patients complicated with mucosa-associated non-Hodgkin's lymphoma (MALT-NHL); HC, healthy controls; SG, salivary gland; DNaseI, deoxyribonuclease-I; DNaseII, deoxyribonuclease-II; TREX1, Three Prime Repair Exonuclease-1; NLRP3, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP3); AIM2, absent in melanoma 2; PYCARD, PYD and CARD Domain Containing protein; ASC, Apoptosis-associated speck-like protein; ESSDAI, EULAR Sjögren's syndrome disease activity index; cf-DNA, cell-free DNA; cf-NA, cell-free nucleic acids; NIG, nigericin.

* Corresponding author. Dpt of Pathophysiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 75 Mikras Asias str., 11527, Athens, Greece. Tel.: +30 210 7462677; fax: +30 210 7462664.

E-mail address: menman@med.uoa.gr (M.N. Manoussakis).

¹ Contributed equally.

1. Introduction

Primary Sjögren's syndrome (SS) is a relatively common autoimmune disorder that is primarily characterized by chronic lymphoepithelial inflammation in the exocrine glands, mainly the salivary and lacrimal glands [1]. SS may extend from disease confined to the exocrine glands (organ-specific exocrinopathy) to various extraglandular manifestations (systemic disease), as well as the development of non-Hodgkin's lymphoma (usually of mucosa-associated lymphoid tissue type; MALT-NHL) in 5% of patients [1]. Approximately one-third of patients manifest clinical and laboratory features that represent high-risk prognostic factors for

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.010>

0896-8411/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: A.G. Vakra^a, et al., Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations, Journal of Autoimmunity (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.010>