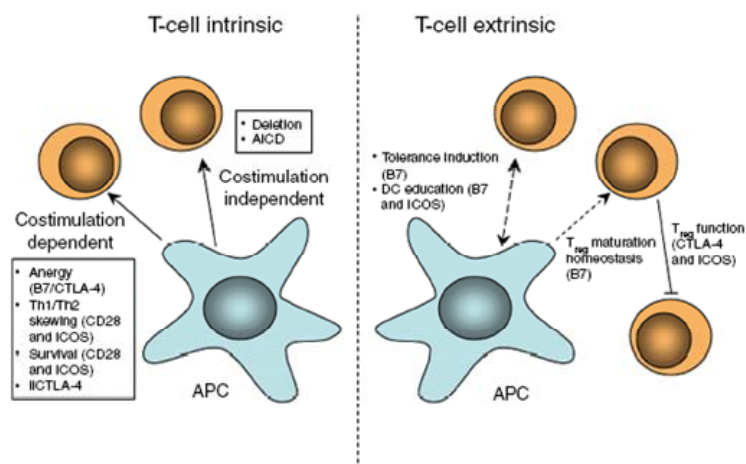


**ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ PD-1 (PROGRAMMED DEATH-1) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ  
ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ**

**Εργασία για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Master's), Μεταπτυχιακό  
Πρόγραμμα Σπουδών «Γενετική και Κυτταρική Αιτιολογία, Διαγνωστική και Θεραπευτική των  
Ασθενειών του Ανθρώπου»**

**Γεώργιος Μπερτσιάς**

**Ερευνητικό Εργαστήριο Ρευματολογίας, Κλινικής Ανοσολογίας και Αλλεργιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης**



**Μελέτη Πολυμορφισμών και Έκφρασης του Ανοσορρυθμιστικού Υποδοχέα PD-1 (Programmed Death-1) σε Ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο**

Εργασία για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Master's), Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Γενετική και Κυτταρική Αιτιολογία, Διαγνωστική και Θεραπευτική των Ασθενειών του Ανθρώπου»

Γεώργιος Μπερτσιάς, Ιατρός

Ερευνητικό Εργαστήριο Ρευματολογίας, Κλινικής Ανοσολογίας και Αλλεργιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέποντες:

Δημήτριος Τ. Μπούμπας, Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Γουλιέλμος, Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μηχανισμοί περιφερικής ανοσολογικής ανοχής είναι σημαντικοί για τον λειτουργικό περιορισμό αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων που διαφεύγουν από κεντρικά λεμφικά όργανα. Ο υποδοχέας PD-1 (programmed death-1) εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T- και B-λεμφοκύτταρα και πρόσδεσή του από ειδικούς συνδέτες (PD-1 ligands) οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό, μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών και ανέργεια. Ευρήματα σε ποντικούς υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο του PD-1 στη διατήρηση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής και διαγονιδιακά στελέχη με γενετική απαλοιφή του PD-1 εμφανίζουν αυτοάνοσες διαταραχές. Ο Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (Σ.Ε.Λ.) είναι το πρότυπο αυτοάνοσης νόσου στον άνθρωπο και χαρακτηρίζεται από αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα και παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Εξετάσαμε τη συχνότητα μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου του PD-1 σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. με PCR-RFLP, καθώς επίσης την έκφραση του PD-1 σε υποπληθυσμούς περιφερικών λεμφοκυττάρων σε ηρεμία και μετά από ενεργοποίηση με PMA-ιονομυκίνη με κυτταρομετρία ροής. Ο πολυμορφισμός PD1.3 (7146G/A) – αλλά όχι ο PD1.5 (7765C/T) – βρέθηκε σε αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (33% έναντι 18%,  $p=0.005$ ). Ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και ενεργό νόσο είχαν αυξημένο ποσοστό περιφερικών PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $2.4 \pm 0.2\%$  έναντι  $1.8 \pm 0.2\%$  σε υγιείς μάρτυρες,  $p=0.029$ ) και αυξημένο ποσοστό ενεργοποιημένων PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $3.4 \pm 0.4\%$  έναντι  $2.1 \pm 0.2\%$ ,  $p=0.019$ ) και PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $4.6 \pm 0.6\%$  έναντι  $3.2 \pm 0.3\%$ ,  $p=0.06$ ). Αντιθέτως, η έκφραση του PD-1 ligand 1 σε περιφερικά T-, B-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα δε διέφερε μεταξύ ασθενών με Σ.Ε.Λ. και υγιών μαρτύρων. Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. που φέρουν τον πολυμορφισμό PD1.3 είχαν μειωμένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $1.3 \pm 0.3\%$  έναντι  $2.4 \pm 0.5\%$ ,  $p=0.09$ ) και PD-1<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων ( $4.2 \pm 0.9\%$  έναντι  $2.0 \pm 0.6\%$ ,  $p=0.07$ ) σε σχέση με ασθενείς χωρίς τον πολυμορφισμό. Πειράματα κινητικής έκφρασης του PD-1 σε περιφερικά T λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση με PMA-ιονομυκίνη έδειξαν αυξημένη έκφραση του PD-1 σε ασθενείς που φέρουν τον PD1.3 πολυμορφισμό. Η παρούσα εργασία υποστηρίζει σημαντικό ρόλο για το μονοπάτι PD-1/PD-1 ligands στη ρύθμιση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και αποτελεί αφετηρία για τη διερεύνηση πιθανών διαταραχών στην έκφραση και λειτουργία του PD-1 σε ασθενείς με αυτοανοσία.

## ABSTRACT

Peripheral immune tolerance is important for the functional restriction of autoreactive lymphocytes that escape from central lymphoid organs. Programmed death-1 (PD-1) is expressed on activated T- and B-lymphocytes and results in decreased proliferation, cytokine production and anergy upon engagement with its specific ligands (PD-1 ligands). Murine studies have indicated a crucial role for PD-1 in maintenance of peripheral tolerance and transgenic strains that lack PD-1 (PD-1 knock-out) develop various autoimmune disorders. Systemic lupus erythematosus (SLE) is the prototype of autoimmune disease in humans and is characterized by autoreactive lymphocytes and production of autoantibodies. We examined the frequency of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the PD-1 gene in patients with SLE by PCR-RFLP, and the expression of PD-1 on peripheral blood mononuclear cells (resting and activated) by flow cytometry. An increased frequency of the PD1.3 (7146G/A) – but not the PD1.5 (7765C/T) SNPs was found in SLE patients compared to healthy controls (33% versus 18%,  $p=0.005$ ). Patients with active SLE had increased percentage of peripheral PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes ( $2.4 \pm 0.2\%$  versus  $1.8 \pm 0.2\%$  in healthy controls,  $p=0.029$ ) and increased percentage of activated PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes ( $3.4 \pm 0.4\%$  versus  $2.1 \pm 0.2\%$ ,  $p=0.019$ ) and PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T lymphocytes ( $4.6 \pm 0.6\%$  versus  $3.2 \pm 0.3\%$ ,  $p=0.06$ ). In contrast, expression of PD-1 ligand 1 on peripheral T-, B-lymphocytes and monocytes did not differ between SLE patients and healthy controls. SLE patients with active disease who carried the PD1.3 polymorphism had decreased percentage of PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T lymphocytes ( $1.3 \pm 0.3\%$  versus  $2.4 \pm 0.5\%$ ,  $p=0.09$ ) and PD-1<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B lymphocytes ( $4.2 \pm 0.9\%$  versus  $2.0 \pm 0.6\%$ ,  $p=0.07$ ), compared to patients who did not. Stimulation of peripheral T lymphocytes with PMA-ionomycin demonstrated increased expression of PD-1 in SLE patients who carried the PD1.3 polymorphism. Our results indicate an important role for the PD-1/PD-1 ligands pathway in regulation of peripheral tolerance in patients with SLE and form the basis for the study of possible defects in expression and function of PD-1 in patients with autoimmune disease.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή
  - 1.1. Περιφερική ανοσολογική ανοχή και αυτοανοσία
    - 1.1.1. Μηχανισμοί περιφερικής ανοσολογικής ανοχής
    - 1.1.2. Διαταραχή των μηχανισμών περιφερικής ανοσολογικής ανοχής και αυτοανοσία
  - 1.2. Ο ρόλος του υποδοχέα PD-1 στην περιφερική ανοσολογική ανοχή και αυτοανοσία
    - 1.2.1. PD-1 και περιφερική ανοσολογική ανοχή
      - 1.2.1.1. Έκφραση του υποδοχέα PD-1 και των συνδετών του (PD-1 ligands)
      - 1.2.1.2. Μηχανισμός δράσης του PD-1
      - 1.2.1.3. Ο υποδοχέας PD-1 ως ανασταλτικός υποδοχέας της δράσης των λεμφοκυττάρων
    - 1.2.2. Ο ρόλος του PD-1 στην αυτοανοσία
      - 1.2.2.1. Μελέτες σε ποντικούς
      - 1.2.2.2. Μελέτες σε ανθρώπους
2. Σκοπός της μελέτης
  - 2.1. Συστηματικός ερυθματώδης λύκος και διαταραχή των μηχανισμών περιφερικής ανοσολογικής ανοχής
  - 2.2. Ρόλος του συστήματος PD-1/PD-1 ligands στην παθογένεια του συστηματικού ερυθματώδη λύκου;
3. Υλικό και μέθοδοι
  - 3.1. Ασθενείς
  - 3.2. Αντισώματα
  - 3.3. Απομόνωση γενωμικού DNA και ανάλυση για πολυμορφισμούς του γονιδίου του PD-1
  - 3.4. Απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων και κυτταρομετρία ροής
  - 3.5. Μελέτη κινητικής του υποδοχέα PD-1 μετά από ενεργοποίηση με PMA/Ιονομυκίνη
  - 3.6. Στατιστική ανάλυση
4. Αποτελέσματα
  - 4.1. Αυξημένη συχνότητα του πολυμορφισμού PD1.3 – αλλά όχι του πολυμορφισμού PD1.5 – σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο
  - 4.2. Ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και ενεργό νόσο έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1+ περιφερικών λεμφοκυττάρων
  - 4.3. Φυσιολογική έκφραση του PD-1 ligand 1 (PD-L1) σε περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο
  - 4.4. Έκφραση του PD-1 σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο που φέρουν τον πολυμορφισμό PD1.3A
  - 4.5. Μελέτη της κινητικής έκφρασης του υποδοχέα PD-1 σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο
5. Συζήτηση – Συμπεράσματα
6. Βιβλιογραφία
7. Ευχαριστίες

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Περιφερική ανοσολογική ανοχή και αυτοανοσία

#### 1.1.1. Μηχανισμοί περιφερικής ανοσολογικής ανοχής

Το ανοσολογικό σύστημα των θηλαστικών διαθέτει την ικανότητα να αναγνωρίζει οποιαδήποτε χημική δομή προέρχεται από παθογόνους μικροοργανισμούς/εισβολείς μέσω ειδικών υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των B- και T- λεμφοκυττάρων. Η ποικιλία αυτή στους υποδοχείς των λεμφοκυττάρων πηγάζει από τον σωματικό ανασυνδυασμό των αντίστοιχων γονιδίων που συμβαίνει αποκλειστικά στα λεμφοκύτταρα, σε κεντρικά λεμφικά όργανα όπως ο μυελός των οστών (B κύτταρα) και ο θύμος αδένας (T κύτταρα). Ακολουθούν διαδικασίες σωματικής υπερμεταλλαγής (somatic hypermutation) που λαμβάνουν χώρα σε περιφερικούς λεμφικούς ιστούς για την τελική τροποποίηση της ειδικότητας των υποδοχέων. Ως «παρενέργεια» αυτών των διαδικασιών, ένα σημαντικό ποσοστό των υποδοχέων των λεμφοκυττάρων (20-50% μετά τη διαδικασία ανασυνδυασμού) αναγνωρίζουν δυνητικά κάποιο από τα αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού (αυτοαντιγόνα) (1). Παρόλα αυτά, το ανοσολογικό σύστημα διαθέτει κατάλληλους μηχανισμούς ελέγχου και περιορισμού των «αυτοδραστικών» λεμφοκυττάρων οι οποίοι συνιστούν τη λεγόμενη «ανοσολογική ανοχή». Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής επαρκούν για τον έλεγχο των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων με συνέπεια μόνο το 3-8% του πληθυσμού να εμφανίζει κάποια μορφή αυτοάνοσης νόσου (2).

Η ανοσολογική ανοχή αποτελείται από ένα «κεντρικό» και ένα «περιφερικό» σκέλος. Το κεντρικό σκέλος (κεντρική ανοσολογική ανοχή) λαμβάνει χώρα σε μείζονα λεμφικά όργανα, όπως ο μυελός των οστών (για τα B κύτταρα) και ο θύμος (για τα T κύτταρα). Σε αυτά τα όργανα, ωριμάζουν τα λεμφοκύτταρα και έρχονται σε επαφή με αντιγόνα του εαυτού (αυτοαντιγόνα). Όσοι κλώνοι λεμφοκυττάρων διαθέτουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια αυτοαντιγόνα περνούν σε διαδικασία αποπτωτικού θανάτου («αρνητική επιλογή»). Ορισμένα αυτοδραστικά T κύτταρα στο θύμο αδένα διαφοροποιούνται προς «ρυθμιστικά» κύτταρα (regulatory T cells) που διαφεύγουν προς την περιφέρεια και αναστέλλουν ανοσολογικές αποκρίσεις προς αντιγόνα του εαυτού (3).

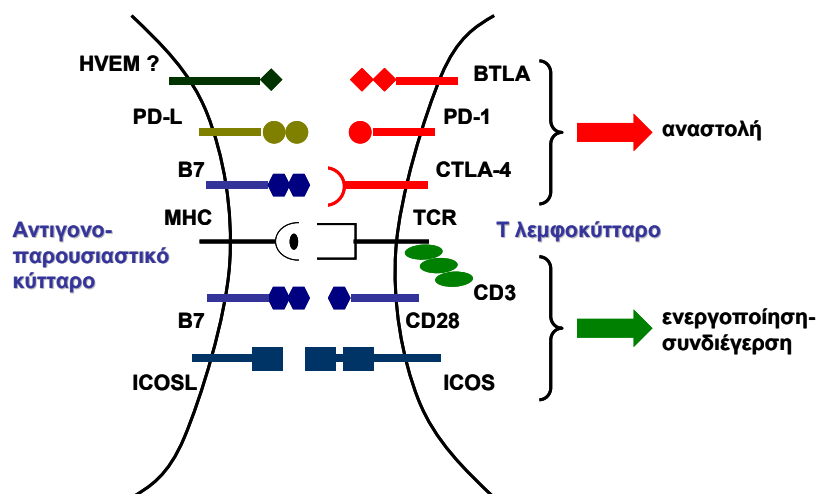
Συμπληρωματικά προς την κεντρική ανοσολογική ανοχή λειτουργούν οι μηχανισμοί της περιφερικής ανοχής, που είναι σημαντικοί για τον λειτουργικό περιορισμό των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων που διαφεύγουν από τα κεντρικά λεμφικά όργανα ή αντιδρούν σε ιστικά αντιγόνα που δεν εκφράζονται στο θύμο αδένα (4). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την ανοσολογική «άγνοια», την πρόκληση «ανέργειας» (anergy), την απαλοιφή των αυτοδραστικών κυττάρων ή την καταστολή τους από άλλα T λεμφοκύτταρα (1, 5-7) (**Πίνακας 1**). Πιο ειδικά, ανοσολογική «άγνοια» προκαλείται από το γεγονός πως διάφορα αυτοαντιγόνα βρίσκονται σε ανατομικά «απομονωμένες» περιοχές που δεν είναι προσβάσιμες στο ανοσοποιητικό σύστημα παρά μόνο μετά από ιστική βλάβη ή τραυματισμό. Η πρόκληση «ανέργειας» βασίζεται στην υπόθεση πως για την πλήρη (optimal) ενεργοποίηση των CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων

απαιτείται εκτός από την πρόσδεση του συμπλόκου του T υποδοχέα (TCR, T-cell receptor) με το αντιγόνο, ένα «δεύτερο σήμα» που προέρχεται από την αλληλεπίδραση υποδοχέων στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων με ειδικούς συνδέτες (ligands) που εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Το πλέον καλά χαρακτηρισμένο σύστημα δεύτερου «θετικού» (συνδिएγερτικού, costimulatory) σήματος

είναι αυτό που προκύπτει από την πρόσδεση του CD28 στα T λεμφοκύτταρα με τις πρωτεΐνες B7.1 (CD80) και B7.2 (CD86) στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (**Εικόνα 1**) (1, 8-10). Παρομοίως, ενίσχυση του σήματος του T υποδοχέα προέρχεται από την αλληλεπίδραση του υποδοχέα ICOS (*i*nducible *c*ostimulator) στα T λεμφοκύτταρα με τον ειδικό συνδέτη ICOS-L (ICOS-ligand ή B7h) στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Σε περιπτώσεις που τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στερούνται συνδिएγερτικών μορίων, η παρουσίαση του πεπτιδικού αντιγόνου στα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα οδηγεί σε ανέργεια. Ο βαθμός ωρίμανσης των αντιγονοπαρουσιαστικών (ιδίως των δενδριτικών) κυττάρων καθορίζει έτσι, εάν ένα αντιγόνο θα προκαλέσει ανοσολογική απόκριση ή ανοχή (4).

#### Πίνακας 1. Βασικοί μηχανισμοί περιφερικής ανοσολογικής ανοχής

- Ανοσολογική «άγνοια» (ignorance)
- Ανέργεια (anergy)
- Απαλοιφή (deletion) αυτοδραστικών κλώνων
- Λειτουργικός περιορισμός μέσω ανασταλτικών υποδοχέων
- Καταστολή από ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα



**Εικόνα 1. Ρύθμιση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής μέσω διεγερτικών και ανασταλτικών υποδοχέων των λεμφοκυττάρων.**

Ο βαθμός ενεργοποίησης του T λεμφοκυττάρων καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ «θετικών» (διεγερτικών) σημάτων που προέρχονται από το σύμπλοκο του T υποδοχέα και τους υποδοχείς CD28 και ICOS, και «αρνητικών» (ανασταλτικών) σημάτων που προέρχονται από τους υποδοχείς CTLA-4, PD-1 και BTLA.

Εκτός από τα «θετικά» (συνδिएγερτικά) δεύτερα σήματα, το T-λεμφοκύτταρα είναι δυνατό να δεχθεί «αρνητικό» (ανασταλτικό, coinhibitory) σήμα επίσης μέσω μεμβρανικών υποδοχέων που συνδέονται με ειδικούς συνδέτες στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τέτοιοι υποδοχείς στα λεμφοκύτταρα είναι το CTLA-4, το PD-1 και το BTLA που ενεργοποιούνται από ειδικούς συνδέτες που εκφράζονται σε άλλα λεμφοκύτταρα ή αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων – αντί των

συνδιεγερτικών – κατά την αντιγονοπαρουσίαση μπορεί να οδηγήσει επίσης σε ανοσολογική ανοχή (8, 11-15). Η ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών σημάτων ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων είναι σημαντική για τη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής (16).

Ένας πρόσθετος μηχανισμός περιφερικής ανοσολογικής ανοχής είναι η απαλοιφή (deletion) των αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Στην περίπτωση αυτή, η επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων οδηγεί σε έκφραση των υποδοχέων Fas και Fas-ligand (FasL) και απόπτωση μέσω κασπάσης 8 και 10 (1, 3).

Ιδιαίτερα σημαντικός μηχανισμός ανοσολογικής ανοχής είναι η καταστολή των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων μέσω ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (regulatory T cells), τα οποία διακρίνονται σε  $CD4^+CD25^+$  και Tr1 ρυθμιστικά κύτταρα (17, 18). Η προέλευση των ρυθμιστικών κυττάρων είναι τόσο από το θύμο αδένα όσο από περιφερικά λεμφικά όργανα. Τα  $CD4^+CD25^+$  ρυθμιστικά κύτταρα αποτελούν το 5-10% των  $CD4^+$  T λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο, χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση των υποδοχέων CD25 (α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2), CTLA-4, OX40, GITR και ελέγχουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με τα κύτταρα-τελεστές. Τα Tr1 ρυθμιστικά κύτταρα δρουν μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την παραγωγή της IL-10 και του TGF- $\beta$  (5, 7, 19). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά ακόμα ασαφή σημεία αναφορικά με τον ρόλο των διάφορων υποπληθυσμών των ρυθμιστικών κυττάρων και των μηχανισμών δράσης τους.

### 1.1.2. Διαταραχή των μηχανισμών περιφερικής ανοσολογικής ανοχής και αυτοανοσία

Παρά τη σημασία των μηχανισμών κεντρικής ανοχής στον περιορισμό των αυτοδραστικών λεμφοκυτταρικών κλώνων, δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για συμμετοχή τους στην παθογένεση αυτοάνοσων διαταραχών στον άνθρωπο ή τον ποντικό. Αντιθέτως, διαταραχές σε μηχανισμούς περιφερικής ανοσολογικής ανοχής έχουν συσχετισθεί με ανάπτυξη αυτοανοσίας. Για παράδειγμα, υπερέκφραση των B7 συνδιεγερτικών μορίων σε  $\beta$ -κύτταρα παγκρεατικών νησιδίων σε πειραματικό πρότυπο αυτοάνοσου διαβήτη επιτείνει τις αυτοάνοσες διαταραχές (6). Στελέχη ποντικών με γενετική απαλοιφή του αρνητικού υποδοχέα CTLA-4 ( $CTLA-4^{-/-}$ ) πεθαίνουν σε ηλικία 3-5 εβδομάδων με λεμφοϋπερπλαστική νόσο και διήθηση περιφερικών ιστών από  $CD4^+$  T λεμφοκύτταρα (20). Παρομοίως, αντιγono-ειδικά  $CTLA-4^{-/-}$  T λεμφοκύτταρα είναι ανθεκτικά στην ανάπτυξη ανοχής, ενώ η χορήγηση anti-CTLA4 αντισωμάτων ενισχύει την αυτοανοσία σε πειραματικά πρότυπα εγκεφαλομυελίτιδας (πολλαπλή σκλήρυνση) ή διαβήτη (3, 21). Αντίθετα, στην πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα η χορήγηση anti-ICOS μονοκλωνικών αντισωμάτων μετά την 9<sup>η</sup> ημέρα οδηγεί σε κλινική ύφεση και μειωμένη παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα T λεμφοκύτταρα (21).

Περαιτέρω ανάδειξη του ρόλου της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής στην παθογένεση της αυτοανοσίας προέρχεται από σπάνιες συστηματικές αυτοάνοσες διαταραχές που κληρονομούνται μονογονιδιακά στον άνθρωπο, όπως το σύνδρομο ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome, αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο) και το φυλοσύνδετο σύνδρομο υπεργαμμασφαιριναιμίας IgM (X-linked hyper-IgM syndrome). Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει μερική ή πλήρης διαταραχή στη



σηματοδότηση από τον αποπτωτικό υποδοχέα Fas με συνέπεια τον περιορισμένο θάνατο των T λεμφοκυττάρων και λεμφοϋπερπλασία (22). Στη δεύτερη περίπτωση, υπάρχει διαταραχή στη σηματοδότηση από τον συνδεδεμένο υποδοχέα CD40-Ligand με συνέπεια επίσης την ελλιπή έκφραση του Fas στα αυτοδραστικά B λεμφοκύτταρα (23).

Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα είναι σημαντικά στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και την ανάπτυξη αυτοανοσίας στους ποντικούς ενώ λιγότερες είναι οι ενδείξεις στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, ρυθμιστικά T κύτταρα που παρήχθησαν σε BDC2.5 TCR διαγονιδιακό στέλεχος χρησιμοποιώντας δονδρικά κύτταρα από το στέλεχος NOD, έχουν τη δυνατότητα να καταστείλουν την ανάπτυξη αυτοάνοσου διαβήτη (7). Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος των ρυθμιστικών κυττάρων στην παθογένεια της πειραματικής εγκεφαλομυελίτιδας σε διαγονιδιακά στελέχη με CD4<sup>+</sup> α-β TCR κύτταρα ειδικά για τη βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP, myelin basic protein). Σε αυτό το πειραματικό πρότυπο η νόσος καταστέλλεται από τη μεταφορά τόσο CD25<sup>+</sup> όσο και CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων (7). Στον άνθρωπο υπάρχουν μερικές μόνο ενδείξεις για συμμετοχή των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων στην παθογένεια αυτοάνοσων νόσων όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αυτοάνοση πολυ-ενδοκρινοπάθεια τύπου 2, κ.α. (24) Πιο ειδικά, ασθενείς με ήπια ολιγοαρθρική μορφή νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας έχουν αυξημένο αριθμό CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T ρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα σε σχέση με ασθενείς με την επιθετική πολυαρθρική μορφή της νόσου (25). Πιο πρόσφατα έχει περιγραφεί μειωμένος αριθμός ρυθμιστικών T κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με ενεργό συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο που ίσως σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία σε αποπτωτικά σήματα μέσω του υποδοχέα Fas (26).

## 1.2. Ο ρόλος του υποδοχέα PD-1 στην περιφερική ανοσολογική ανοχή και αυτοανοσία

### 1.2.1. PD-1 και περιφερική ανοσολογική ανοχή

#### 1.2.1.1. Έκφραση του υποδοχέα PD-1 και των συνδετών του (PD-1 ligands)

Ο υποδοχέας PD-1 (programmed death-1, CD279) απομονώθηκε αρχικά σε λεμφοαιμοποιητικές κυτταρικές σειρές που υπόκειντο αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (27), σύντομα όμως βρέθηκε πως η έκφρασή του δε σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο αλλά την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (28). Ο υποδοχέας PD-1 είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και παρουσιάζει 23% ομολογία με τον υποδοχέα CTLA-4 (28). Αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα IgV και ένα κυτταροπλασματικό στο οποίο εντοπίζονται ένα μοτίβο ITIM (*i*mmunoreceptor *t*yrosine-based *i*nhibiting *m*otif) και ένα ITSM (*i*mmunoreceptor *t*yrosine-based *s*witch *m*otif) τα οποία σχετίζονται με τη δράση του PD-1 ως ανασταλτικός υποδοχέας. Η πρωτεΐνη PD-1 είναι εκτενώς γλυκοζυλιωμένη και η ομολογία μεταξύ ανθρώπινης και ποντικής μορφής είναι 60% (29).

Μελέτες σε ποντικούς έχουν δείξει πως ο υποδοχέας PD-1 εκφράζεται σε μικρό ποσοστό θυμοκυττάρων, T- και B- λεμφοκυττάρων (28). Μετά από ενεργοποίηση επάγεται η έκφρασή του στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , B-κύτταρα) και μυελοειδών κυττάρων (28, 30-32). Επίσης, αυξημένη έκφραση του PD-1 παρατηρείται σε ανεργικά T λεμφοκύτταρα (33, 34) και  $CD4^+CD25^+$  T ρυθμιστικά κύτταρα (35).

Παρομοίως, η έκφραση του PD-1 στα ανθρώπινα μονοπύρηνια κύτταρα είναι ελάχιστη σε φάση ηρεμίας αλλά ενισχύεται μετά από ενεργοποίηση από διάφορους διεγέρτες όπως TPA, PMA, PMA/ιονομοκίνη (36-38). Ενεργοποίηση των  $CD4^+$  λεμφοκυττάρων με anti-CD3/anti-CD28 αντισώματα οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του PD-1 η οποία μεγιστοποιείται στις 48-72 ώρες ενεργοποίησης (36, 39).

Οι ειδικοί συνδέτες (ligands) του PD-1 είναι ο PD-L1 (B7-H1) και ο PD-L2 (B7-DC). Ο PD-L1 εκφράζεται σε T-, B-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, αλλά και ιστικά παρεγχυματικά κύτταρα, όπως ενδοθηλιακά, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, μυοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα νεφρού, παγκρεατικά νησιδιοκύτταρα, συγκιτιοτροφοβλάστη πλακούντα κλπ (15, 40-42). Ισχυρό ερέθισμα για την επαγωγή της έκφρασης του PD-L1 σε παρεγχυματικά κύτταρα είναι η IFN- $\gamma$  αλλά και ο TNF- $\alpha$ . Πιο περιορισμένη είναι η έκφραση του PD-L2, σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα ή δένδριτικά κύτταρα (31). Η ευρεία έκφραση των συνδετών του PD-1 και κυρίως το γεγονός πως μη-λεμφοειδή κύτταρα επίσης εκφράζουν PD-L1 μετά από ενεργοποίηση, αποτελούν σημαντική ένδειξη για το ρόλο του PD-1 στην περιφερική ανοσολογική ανοχή.

### 1.2.1.2. Μηχανισμός δράσης του PD-1

Σημαντικό ρόλο στη δράση του PD-1 έχουν δύο κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στο ενδοκυττάριο (κυτταροπλασματικό) τμήμα, το πρώτο κατάλοιπο (αμινοτελικό) στο μοτίβο ITIM και το δεύτερο (καρβοξυτελικό) στο μοτίβο ITSM. Πειράματα σε B κυτταρικές σειρές ποντικού έχουν δείξει ότι τα κατάλοιπα τυροσίνης φωσφορυλιώνονται πολύ γρήγορα (~8") μετά την ενεργοποίηση του B αντιγονικού υποδοχέα (BCR) (43). Ταυτόχρονα, υπάρχει αλληλεπίδραση της φωσφατάσης SHP-2 – η οποία επίσης φωσφορυλιώνεται – με τον υποδοχέα PD-1, με συνέπεια τη μείωση της απελευθέρωσης  $Ca^{+2}$  από ενδοκυττάρια αποθήκες και τον περιορισμό της φωσφορυλίωσης (= ενεργοποίησης) σειράς πρωτεϊνών και κινασών που είναι σημαντικές για τη λειτουργία των B λεμφοκυττάρων, όπως η  $Ig\beta$ , syk, PLC $\gamma$ 2, PI-3-kinase κλπ (43). Για τη λειτουργία αυτή του PD-1 βρέθηκε πως είναι σημαντικό το κατάλοιπο τυροσίνης που βρίσκεται στο ITSM και όχι αυτό που βρίσκεται στο ITIM.

Παρόμοιος είναι ο μηχανισμός δράσης του PD-1 στα T λεμφοκύτταρα. Σε ανθρώπινα φυσιολογικά  $CD4^+$  T κύτταρα οι φωσφατάσες SHP-1 και SHP-2 αλληλεπιδρούν με την τυροσίνη στο μοτίβο ITSM (39) και παρατηρείται σημαντική μείωση στη φωσφορυλιωμένη μορφή της ζ αλύσου του συμπλόκου CD3, της πρωτεΐνης ZAP70 και των κινασών PKC $\theta$  και ERK (44). Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση του PD-1 οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφή του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-xL, μειωμένη ενεργοποίηση της κινάσης Akt και μειωμένο μεταβολισμό γλυκόζης (14). Η τελευταία δράση πραγματοποιείται μέσω καταστολής της PI-3-kinase.

### 1.2.1.3. Ο υποδοχέας PD-1 ως ανασταλτικός υποδοχέας της δράσης των λεμφοκυττάρων

Η δράση του PD-1 ως αρνητικός ρυθμιστής των λεμφοκυττάρων έχει μελετηθεί σε διάφορα πειράματα *in vitro*. Ενεργοποίηση του PD-1 μέσω του PD-L1 (ή PD-L2) με ταυτόχρονη διέγερση του TCR μέσω anti-CD3 στα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και έκκριση κυτταροκινών IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  (36, 40, 45-47). Η ανασταλτική δράση του PD-1 περιορίζεται σε περιπτώσεις έντονης αντιγονικής διέγερσης μέσω του συμπλόκου TCR/CD3 και βέλτιστης (optimal) συνενεργοποίησης (costimulation) μέσω του CD28 (36, 40). Επίσης, η εξωγενής χορήγηση IL-2, IL-7 ή IL-15 περιορίζει την ανασταλτική λειτουργία του PD-1 (30, 36). Τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα εμφανίζονται περισσότερο «ευαίσθητα» στη λειτουργία του PD-1 σε σχέση με τα CD4<sup>+</sup> κάτι που ίσως δικαιολογείται από την αυξημένη παραγωγή IL-2 και την αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της IL-2 από τα τελευταία (30).

Ο ρόλος του PD-1 ως ανασταλτικός υποδοχέας της λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων έχει αναδειχθεί και σε πειράματα συγκαλλιέργειών (cocultures) με ενεργοποιημένα παρεγχυματικά κύτταρα που εκφράζουν PD-L1. Για παράδειγμα, σε καλλιέργειες νεφρικών σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν PD-L1 μετά από έκθεση σε IFN- $\gamma$  με απομονωμένα T κύτταρα, η προσθήκη αντισώματος που αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ PD-1 και PD-L1 οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και παραγωγή IL-2 από τα T κύτταρα (48-50). Παρόμοια πειράματα έχουν δείξει πως κύτταρα γλοιώματος, κερατινοκύτταρα ή ενδοθηλιακά κύτταρα καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω του συστήματος PD-1/PD-L1 (51-54).

Λιγότερο μελετημένη είναι η δράση του PD-1 στα B λεμφοκύτταρα. Σπληνικά B κύτταρα ποντικού με γενετική απαλοιφή του PD-1 (PD-1<sup>-/-</sup>) εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό μετά από ενεργοποίηση του αντιγονικού υποδοχέα σε σχέση με τα αγρίου τύπου B κύτταρα (PD-1<sup>+/+</sup>) (55). Επίσης σε ποντικούς, ενεργοποίηση του υποδοχέα των B κυττάρων μέσω anti-IgM και του PD-1 μέσω PD-L1 οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού τους κατά 30-40% (32).

## 1.2.2. Ο ρόλος του PD-1 στην αυτοανοσία

### 1.2.2.1. Μελέτες σε ποντικούς

Ο ρόλος του PD-1 ως αρνητικός ρυθμιστής της ανοσολογικής απόκρισης των λεμφοκυττάρων στην περιφερική ανοσολογική ανοχή αναδείχθηκε μέσω των ευρημάτων σε διαγονιδιακά στελέχη ποντικών με έλλειψη του PD-1 (*pdcd1*<sup>-/-</sup>). Έτσι, C57BL/6-*pdcd1*<sup>-/-</sup> στελέχη αναπτύσσουν σε ορισμένο ποσοστό και σε μεγάλη ηλικία (>8 μήνες) σπειραματονεφρίτιδα τύπου λύκου και υπερπλαστική αρθρίτιδα, με εναποθέσεις IgG3 και C3 στα νεφρικά σπειράματα (56). Πιο έντονο φαινότυπο εμφανίζουν τα BALB/c-*pdcd1*<sup>-/-</sup> στελέχη τα οποία πεθαίνουν από διατακτική μυοκαρδιοπάθεια που μεσολαβείται από παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι της καρδιακής τροπονίνης (57, 58). Σε 2C TCR διαγονιδιακά στελέχη που βρίσκονται σε αυτοδραστικό γενετικό υπόβαθρο H-2<sup>b/d</sup>, τα αυτοδραστικά T κύτταρα υφίστανται αρνητική επιλογή στο

θύμο αδένα και μόνο λίγα ξεφεύγουν στην περιφέρεια όπου εκφράζουν PD-1 στην επιφάνειά τους και έχουν φαινότυπο άωρων κυττάρων. Σε απουσία όμως του PD-1 (2C TCR-*pdcd1*<sup>-/-</sup> H-2<sup>b/d</sup>) τα αυτοδραστικά κύτταρα δεν καταστέλλονται και οι ποντικοί εμφανίζουν θανατηφόρο νόσο τύπου μοσχεύματος-έναντι-ξενιστή στις 10 εβδομάδες ζωής (56). Επίσης, η απουσία του PD-1 σε γενετικό υπόβαθρο NOD αυτοάνοσου διαβήτη, οδηγεί νωρίτερα σε ινσουλινίτιδα και διαβήτη, με εκτεταμένες λεμφοκυτταρικές διηθήσεις των παγκρεατικών νησιδίων (59). Το ίδιο αποτέλεσμα προκαλείται από τη χορήγηση αντισωμάτων έναντι του PD-1 ή του PD-L1 (όχι του PD-L2) σε στελέχη NOD (60).

Στο πειραματικό πρότυπο αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας / πολλαπλής σκλήρυνσης που προκαλείται σε στελέχη ποντικών C57Bl/6 μετά από ανοσοποίηση με γλυκοπρωτεΐνη μυελίνης ολιγοδενδροκυττάρων (MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein), ο αποκλεισμός του PD-1 οδηγεί σε επιταχυνόμενη και πιο έντονη νόσο (61). Διαπιστώνονται αυξημένες διηθήσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αυξημένο ποσοστό T κυττάρων που παράγουν IFN-γ και αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων anti-MOG στον ορρό. Επιδείνωση της εγκεφαλομυελίτιδας παρατηρήθηκε και μετά αποκλεισμό με αντίσωμα του PD-L2 αλλά όχι του PD-L1 (61).

Τα παραπάνω ευρήματα συνεπικουρούνται από αυτά που προέρχονται από διαγονιδιακά στελέχη ποντικών με έλλειψη των γονιδίων του PD-L1 ή/και PD-L2. Στελέχη NOD PD-L1<sup>-/-</sup> (αλλά όχι NOD PD-L2<sup>-/-</sup>) εμφανίζουν σε μικρότερο χρονικό διάστημα και πιο έντονο διαβήτη, με αυξημένες διηθήσεις στα νησίδια και αυξημένο αριθμό T λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN-γ σε επιχώριους παγκρεατικούς λεμφαδένες (62). Η ίδια ερευνητική ομάδα διαπίστωσε πως η έκφραση του PD-L1 στα β παγκρεατικά κύτταρα – και όχι στα λεμφοαιμοποιητικά – ήταν σημαντική για το λειτουργικό περιορισμό των παθογόνων T λεμφοκυττάρων και την αναστολή ανάπτυξης διαβήτη, αναδεικνύοντας έτσι το ρόλο του συστήματος PD-1/PD-L1 στη διατήρηση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής (62).

### 1.2.2.2. Μελέτες σε ανθρώπους

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει το ρόλο του PD-1 στην ανθρώπινη αυτοανοσία. Σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα υπάρχει αυξημένη έκφραση του PD-1 σε CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα του αρθρικού υγρού σε σχέση με ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα (37). Τα κύτταρα αυτά έχουν ανεργικό φαινότυπο (CD45RB<sup>low</sup> CTLA-4<sup>+</sup>) και παράγουν IL-10. Σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα το ποσοστό των CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος που ήταν PD-1<sup>+</sup> ήταν ~25%, έναντι 6% σε ασθενείς με νόσο Crohn ή 5% σε υγιείς μάρτυρες (63). Εξίσου αυξημένη έκφραση του PD-1 υπήρχε σε λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από προσβεβλημένες περιοχές του εντέρου σε αυτούς τους ασθενείς με φλεγμονώδη εντεροπάθεια. Αυξημένη έκφραση του PD-1 διαπιστώθηκε επίσης σε λεμφοκύτταρα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjogren's (64, 65).

Ισχυρότερες ενδείξεις για συμμετοχή του υποδοχέα PD-1 στην ανθρώπινη αυτοανοσία προέρχονται από γενετικές μελέτες συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου του PD-1 με αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Αρχικά οι Prokunina και συν. (66) περιέγραψαν ορισμένους μονο-νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs, single-nucleotide polymorphisms) σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (Σ.Ε.Λ.) με

καταγωγή από Βόρεια Ευρώπη και Λατινική Αμερική. Ιδιαίτερα ισχυρή ήταν η συσχέτιση ενός πολυμορφισμού στο intron 4 (7146G/A) του γονιδίου του PD-1 με τον κίνδυνο για Σ.Ε.Λ. (66) και νεφρίτιδα του Σ.Ε.Λ. (67). Ο εν λόγω πολυμορφισμός βρέθηκε πως παραλλάσσει μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1 στο intron 4 με πιθανή συνέπεια την τροποποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του PD-1 (66). Ο ίδιος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με νεφρίτιδα του Σ.Ε.Λ. και σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες (68), όπως επίσης με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (69), ρευματοειδή αρθρίτιδα (67) και σοβαρή ταχέως εξελισσόμενη μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (70). Παράλληλα, έχουν περιγραφεί >20 επιπλέον πολυμορφισμοί του γονιδίου του PD-1 (71) που σχετίζονται επίσης με ρευματοειδή αρθρίτιδα (71-73), νεφρίτιδα Σ.Ε.Λ. (74) και ατοπία (71).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

### 2.1. Συστηματικός ερυθματώδης λύκος και διαταραχή των μηχανισμών περιφερικής ανοσολογικής ανοχής

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (Σ.Ε.Λ.) αποτελεί το πρότυπο αυτοάνοσο νόσημα στον άνθρωπο, με συστηματικές εκδηλώσεις και προσβολή διαφόρων ιστών και οργάνων όπως το δέρμα, οι βλεννογόνοι, οι αρθρώσεις, ο αιμοποιητικός ιστός, οι νεφροί και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Βασικά παθογενετικά στοιχεία είναι η παρουσία αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, η υπερπαραγωγή αυτοαντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα και αυξημένες συγκεντρώσεις από διάφορες κυτταροκίνες όπως η IFN-α και η IL-10. Διάφοροι μηχανισμοί περιφερικής ανοσολογικής ανοχής εμφανίζονται να δυσλειτουργούν όπως ελαττωματική κάθαρση αποπτωτικών σωματιδίων, ενισχυμένη αντιγονοπαρουσίαση, αυξημένη «βοήθεια» από τα Τ- προς τα Β-λεμφοκύτταρα, μειωμένος αριθμός ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων κλπ (75, 76) (**Πίνακας 2**). Πιο ειδικά, οι διαταραχές που έχουν περιγραφεί στα Τ λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. περιλαμβάνουν αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου  $Ca^{+2}$  μετά από ενεργοποίηση, μειωμένη έκφραση της ζ αλυσού του TCR, αυξημένος βαθμός φωσφορυλίωσης, αυξημένη έκφραση των συνδιεγερτικών υποδοχέων CD40L, ICOS, TRAIL και μειωμένη παραγωγή IL-2 μετά από ενεργοποίηση (75-81).

Αναφορικά με τα Β λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ., εκτός από τη «βοήθεια» που δέχονται από τα Τ κύτταρα, σημαντική είναι η άμεση ενεργοποίησή τους από συμπλέγματα αυτοαντισωμάτων μέσω του υποδοχέα TLR-9 (toll-like receptor 9) (79). Σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι αυτό ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων

---

#### **Πίνακας 2. Διαταραχές περιφερικής ανοσολογικής ανοχής στο Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο**

---

- Ελαττωματική κάθαρση αποπτωτικών κυττάρων και έκθεση σε «κρυπτικά» αντιγόνα ή «νεο-επίτοπους»
  - Διαταραχή στην επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων
  - Αυξημένη «βοήθεια» προς Β λεμφοκύτταρα
  - Αυξημένη συνδιέγερση (CD40L, ICOS, TRAIL)
  - Διαταραχή σε κατώφλι ενεργοποίησης και ενδοκυττάριας σηματοδότησης λεμφοκυττάρων
  - Διαταραχή σε αριθμό/λειτουργία των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων
- 

διαδραματίζουν τα αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών όπως η IL-10 και ο BAFF (κυτταροκίνη που παράγεται από δένδριτικά κύτταρα σε απάντηση σε IFN-α) (79).

### 2.2. Ρόλος του συστήματος PD-1/PD-1 ligands στην παθογένεια του συστηματικού ερυθματώδη λύκου;

Το ανοσορρυθμιστικό σύστημα PD-1/PD-1 ligands είναι σημαντικό στη διατήρηση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής και η έλλειψή του οδηγεί σε αυτοάνοσες διαταραχές τύπου λύκου σε ποντικούς (13). Παράλληλα, πολυμορφισμοί του γονιδίου του PD-1 σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για Σ.Ε.Λ. ή νεφρίτιδα του λύκου σε ανθρώπους (66). Με βάση τα προηγούμενα ευρήματα, θελήσαμε να

διερευνήσουμε το πιθανό ρόλο του συστήματος PD-1/PD-1 ligands στην παθογένεια του Σ.Ε.Λ. Αρχικά, μελετήσαμε τη συχνότητα πολυμορφισμών του γονιδίου του PD-1 σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και υγιείς μάρτυρες προκειμένου να εκτιμηθεί η συνεισφορά τους σε αυξημένο κίνδυνο για Σ.Ε.Λ. Κατόπιν, προσδιορίστηκε η έκφραση του PD-1 και των συνδετών σε περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. σε φάση ηρεμίας και μετά από ενεργοποίηση, με σκοπό να διαπιστωθούν τυχόν διαταραχές στην έκφραση.

### 3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Ασθενείς

Το Ερευνητικό Εργαστήριο Ρευματολογίας σε συνεργασία με το Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης) διατηρούν βάση με γενωμικό DNA από ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, όπως συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, τύπου 1 σακχαρώδη διαβήτη κλπ. Η βάση ανανεώνεται διαρκώς με ασθενείς που επισκέπτονται τα τακτικά ιατρεία ή τις κλινικές Ρευματολογίας και Παθολογίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου). Ως υγιείς μάρτυρες χρησιμοποιούνται εθελοντές αιμοδότες (Τμήμα Αιμοδοσίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου) με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό που έχουν γονείς με Κρητική καταγωγή.

**Πίνακας 3. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (n=58) που συμμετείχαν στη μελέτη έκφρασης του PD-1.**

Φύλο (θήλυ)	93%
Ηλικία (έτη)	41 ± 14 <sup>1</sup>
Κλινικά χαρακτηριστικά	
SLEDAI score	8.5 ± 4.7 <sup>1</sup>
Ενεργός νόσος (SLEDAI ≥6)	69%
Νεφρίτιδα	32%
Αρθρίτιδα	69%
Anti-dsDNA αντισώματα	33%
Θεραπεία	
Υδροξυχλωροκίνη	48%
Γλυκοκορτικοειδή	43%
Μυκοφαινολικό	9%
Αζαθειοπρίνη	14%

<sup>1</sup> Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση

Για τα πειράματα μελέτης της έκφρασης του PD-1 πραγματοποιήθηκε αιμοληψία με φλεβοκέντηση (20 mL) από ασθενείς με Σ.Ε.Λ ή υγιείς μάρτυρες. Τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Η κλινική εκτίμηση για την ενεργότητα της νόσου πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό του δείκτη SLEDAI (SLE Disease Activity Index) (82) και «ενεργός νόσος» θεωρήθηκε η παρουσία SLEDAI ≥8. Η αιμοληψία πραγματοποιούνταν με συναίνεση των ασθενών ή μαρτύρων και μετά προφορική ή έγγραφη ενημέρωσή τους. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες έχουν εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.



### 3.2. Αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα CD3-PE, CD3-FITC (κλώνος UCHT1), CD19-PE, CD19-PC5 (J4.119), CD4-PC5 (13B8.2), CD14-PC5 (RMO52) και τα ισοτυπικά IgG1-PE και IgG1-PC5 (679.1Mc7) αγοράστηκαν από την Beckman-Coulter. Τα CD25-PE (B1.49.9) και CD69-PE (TP1.55.3) ήταν από την Immunotech, ενώ το CD25-FITC (M-A251) από την BD Pharmingen. Τα αντισώματα HLA-DR-PE (LN3), PD1-FITC (J116), PDL1-PE (MIH1), IgG1-FITC (eBM2a) ήταν από την eBioscience.

### 3.3. Απομόνωση γενωμικού DNA και ανάλυση για πολυμορφισμούς του γονιδίου του PD-1

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε από ολικό αίμα που είχε μεταφερθεί σε σωληνάρια με EDTA. Ποσότητα αίματος (300  $\mu$ L) χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA με ειδικό kit (Puregene<sup>TM</sup> Gentra Systems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η γονοτυπική ανάλυση αφορούσε τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς PD1.3 και PD1.5 και πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο PCR-RFLP (PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism). Για τον πολυμορφισμό PD1.3, ποσότητα γενωμικού DNA (5-7  $\mu$ L) χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση PCR για την ενίσχυση περιοχής του γονιδίου του PD-1 που περιβάλλει την πολυμορφική θέση, με primers (Minotech, I.T.E.) που περιγράφονται στον Πίνακα 4. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTPs, 200 nM από κάθε primer και 2.5 U *Taq* (Minotech, I.T.E.). Το πρόγραμμα της PCR ήταν το εξής: 95 °C  $\times$  10min, 45 κύκλοι (95 °C  $\times$  30sec, 60 °C  $\times$  30sec, 72 °C  $\times$  15sec), 72 °C  $\times$  5min. Ποσότητα από το προϊόν της αντίδρασης (10-15  $\mu$ L) χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού *Pst*I (12 U/αντίδραση) (Minotech, I.T.E.), στους 37 °C για 3-4 ώρες. Το προϊόν της PCR είναι 180 bp και σε περίπτωση παρουσίας του A αλληλίου (δηλαδή παρουσίας του πολυμορφισμού), δημιουργείται θέση περιορισμού που οδηγεί σε 2 προϊόντα, 130 bp και 50 bp. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ίσες ποσότητες από το PCR προϊόν που επώαστηκε ή όχι με το ένζυμο περιορισμού ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 2%.

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού PD1.5, η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 nM dNTPs, 400 nM από κάθε primer (Πίνακας 4) και 0.5 U *Taq* (Minotech, I.T.E.). Το πρόγραμμα της PCR ήταν το εξής: 95 °C  $\times$  3min, 45 κύκλοι (95 °C  $\times$  30sec, 58 °C  $\times$  30sec, 72 °C  $\times$  1min), 72 °C  $\times$  5min. Ποσότητα από το προϊόν της αντίδρασης (5-10  $\mu$ L) χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού *Pvu*II (12 U/αντίδραση) (Minotech, I.T.E.), στους 37 °C για 3-4 ώρες. Το προϊόν της PCR είναι 240 bp και σε περίπτωση παρουσίας του T αλληλίου (δηλαδή παρουσίας του πολυμορφισμού),

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών (primers) στις αντιδράσεις PCR για τη γονοτυπική ανάλυση των πολυμορφισμών PD1.3 και PD1.5		
Πολυμορφισμός PD1.3	Forward: 5'CCC CAG GCA GCA ACC TCA AT3'	$T_m = 60^\circ\text{C}$
	Reverse: 5'GAC CGC AGG CAG GCA CAT AT3'	
Πολυμορφισμός PD1.5	Forward: 5'GTG CCT GTG TTC TCT GTG GA3'	$T_m = 58^\circ\text{C}$
	Reverse: 5'CCA AGA GCA GTG TCC ATC CT3'	

δημιουργείται θέση περιορισμού που οδηγεί σε 2 προϊόντα, 180 bp και 60 bp. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ίσες ποσότητες από PCR προϊόν που επωάστηκε ή όχι με το ένζυμο περιορισμού ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2%.

### **3.4. Απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων και κυτταρομετρία ροής**

Περιφερικό αίμα αραιώθηκε σε PBS 1× (1:1) και τα μονοπύρηνια κύτταρα απομονώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση σε πήκτωμα φικόλης (Ficoll-Histopaque, Sigma), σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Μετά από δύο πλυσίματα σε διάλυμα HBSS 1× (Sigma), ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων ξεπλύθηκε σε PBS/FBS 2.5%. Τα κύτταρα ( $5 \times 10^5$  ανά χρώση) επωάστηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα για 30 λεπτά (4 °C). Ακολούθησε ένα πλύσιμο σε 3-4 mL PBS/FBS 2.5% και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500  $\mu$ L PFA 2%/PBS και αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής τύπου EPICS XL-MCL (Epics Coulter).

### **3.5. Μελέτη κινητικής του υποδοχέα PD-1 μετά από ενεργοποίηση με PMA/ιονομυκίνη**

Για τη μελέτη της κινητικής επαγωγής του υποδοχέα PD-1 στα περιφερικά T λεμφοκύτταρα, PBMCs ( $10^6$ /mL) καλλιεργήθηκαν σε 48-well plates σε θρεπτικό υλικό (RPMI-1640, 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin) παρουσία PMA (10 ng/mL, Sigma) και ionomycin (500 ng/mL, Sigma). Ο συνδυασμός PMA και ionomycin προσομοιώνει τα φαινόμενα μετά από ενεργοποίηση του T υποδοχέα και των συνδιεγερτικών υποδοχέων, μέσω ενεργοποίησης της PKC και απελευθέρωσης του ενδοκυττάρου  $Ca^{+2}$  αντίστοιχα. Σε διάφορα χρονικά σημεία (12-96 ώρες) έγινε συλλογή των κυττάρων, πλύσιμο σε PBS/FBS 2.5% και χρώση με anti-CD3-PE και anti-PD1-FITC, όπως περιγράφεται παραπάνω. Τουλάχιστον 20.000 κύτταρα καταγράφηκαν κατά την ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής.

### **3.6. Στατιστική ανάλυση**

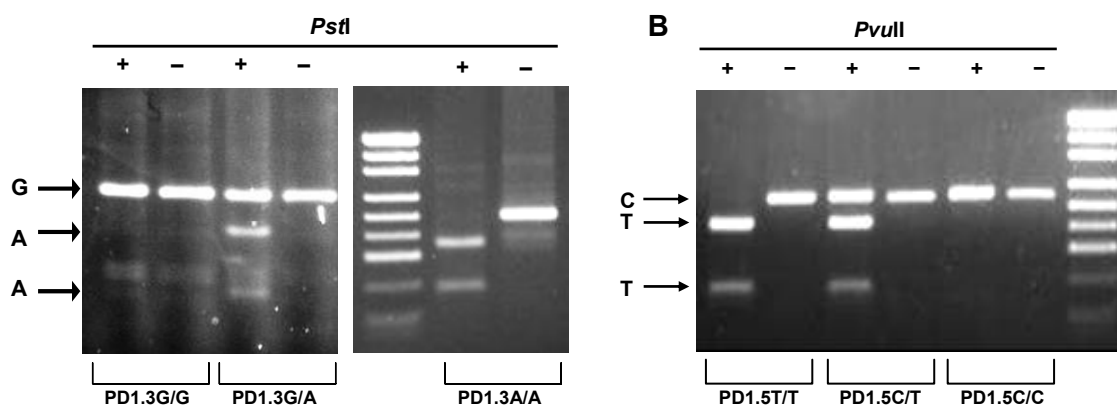
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές  $\pm$  τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών (mean  $\pm$  standard error of the mean). Η σύγκριση των μέσων τιμών πραγματοποιήθηκε με χρήση του Mann-Whitney *U* test. Για την ανάλυση της συχνότητας πολυμορφισμών ή αλληλομόρφων, δημιουργήθηκαν πίνακες 2×2 και ακολούθησε έλεγχος κατά  $\chi^2$ . Τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Αυξημένη συχνότητα του πολυμορφισμού PD1.3 – αλλά όχι του πολυμορφισμού PD1.5 – σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο

Μελετήθηκαν δύο κύριοι πολυμορφισμοί του γονιδίου του PD-1 (PD1.3 και PD1.5) σε ομάδα ασθενών με Σ.Ε.Λ. και υγιείς μάρτυρες με Κρητική καταγωγή. Η γονοτυπική ανάλυση έγινε με PCR-RFLP και στην **Εικόνα 2** παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα αλληλομόρφων για τους δύο πολυμορφισμούς. Συνολικά, αναλύθηκαν 202 ασθενείς με Σ.Ε.Λ. (190 γυναίκες [94%], μέση ηλικία  $45 \pm 16$  έτη) και 158 υγιείς μάρτυρες (93% γυναίκες, ηλικία  $36 \pm 11$  έτη). Αναφορικά με τον πολυμορφισμό PD1.3, η συχνότητα του G/G γονοτύπου ήταν 67.3%, του G/A ήταν 32.2% και του A/A 0.5% (**Πίνακας 5**). Τα αντίστοιχα ποσοστά στους μάρτυρες ήταν: 82.3%, 17.7% και 0% (έλεγχος κατά  $\chi^2$ ,  $p=0.005$ ). Με το συγκεκριμένο αριθμό ασθενών και μαρτύρων, η *post-hoc* ισχύς της μελέτης για ανίχνευση διαφοράς στον πολυμορφισμό PD1.3A της τάξεως του 15% υπολογίστηκε σε >80% ( $\alpha=0.05$ ). Στην ομάδα των υγιών μαρτύρων, οι συχνότητες των PD1.3 αλληλομόρφων βρίσκονται σε ισορροπία κατά *Hardy-Weinberg* (έλεγχος κατά  $\chi^2$  με διόρθωση κατά *Yates*,  $p=0.4$ ). Λόγω της σημαντικής διαφοράς στη μέση ηλικία των ασθενών με Σ.Ε.Λ. και των υγιών μαρτύρων, πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή επίδραση της ηλικίας. Η παρουσία του A αλληλίου στην πολυμορφική περιοχή PD1.3 σχετίστηκε με αυξημένο σχετικό κίνδυνο (odds ratio) OR=2.76 (95% διάστημα εμπιστοσύνης [Δ.Ε.], 1.45–5.19,  $p=0.002$ ) για παρουσία Σ.Ε.Λ., ανεξάρτητα από την ηλικία (OR=1.06, 95% Δ.Ε. 1.04–1.08,  $p<0.001$ ).

Η ανάλυση για τον πολυμορφισμό PD1.5 πραγματοποιήθηκε στο ίδιο δείγμα ασθενών και μαρτύρων και δεν κατέδειξε διαφορά ως προς τη συχνότητα των γονοτύπων ή αλληλίων. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με Σ.Ε.Λ. η συχνότητα του γονοτύπου C/C είναι 34.1%, του C/T 54.1% και του T/T 11.8% (**Πίνακας 5**). Τα αντίστοιχα ποσοστά στην ομάδα υγιών μαρτύρων είναι: 35.5%, 53.9% και 10.5%.



**Εικόνα 1.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα γονοτυπικής ανάλυσης για τους πολυμορφισμούς PD1.3 (A) και PD1.5 (B).

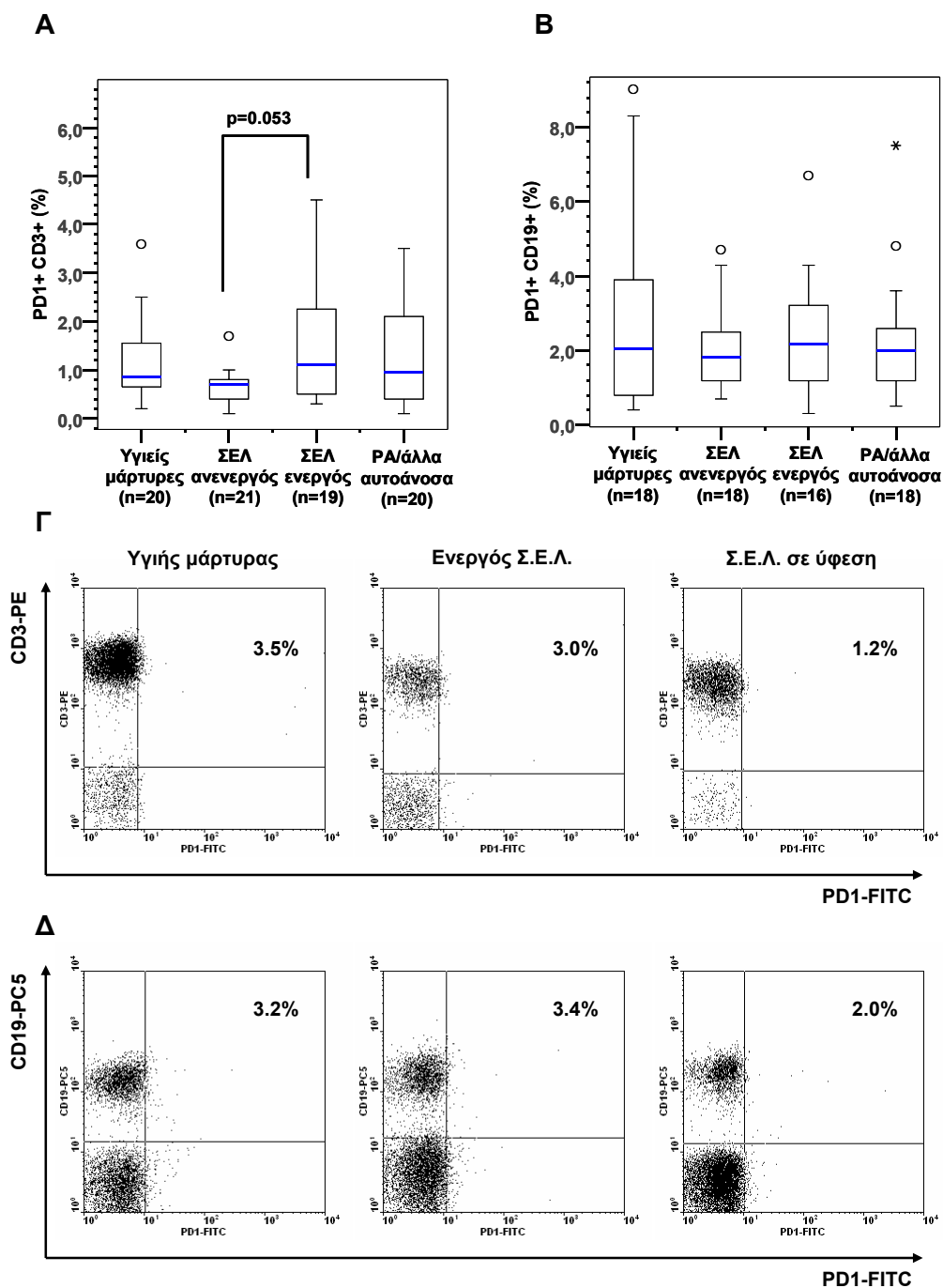
**Πίνακας 5. Συχνότητα γονοτύπων των πολυμορφισμών PD1.3 και PD1.5 σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και υγιείς μάρτυρες.**

	Ασθενείς Σ.Ε.Λ.	Υγιείς μάρτυρες	
<b>Πολυμορφισμός PD1.3</b>			
<i>Γονότυπος</i>			
G/G	136 (67.3%)	130 (82.3%)	
G/A	65 (32.2%)	28 (17.7%)	
A/A	1 (0.5%)	0 (0%)	p=0.005
<i>Αλληλίο</i>			
G	337 (83.4%)	288 (91.1%)	
A	67 (16.6%)	28 (8.9%)	p=0.002
<b>Πολυμορφισμός PD1.5</b>			
<i>Γονότυπος</i>			
C/C	69 (34.1%)	54 (35.5%)	
C/T	109 (54.1%)	82 (53.9%)	
T/T	24 (11.8%)	16 (10.5%)	p=NS
<i>Αλληλίο</i>			
C	247 (61.1%)	190 (62.5%)	
T	157 (38.9%)	114 (37.5%)	p=NS

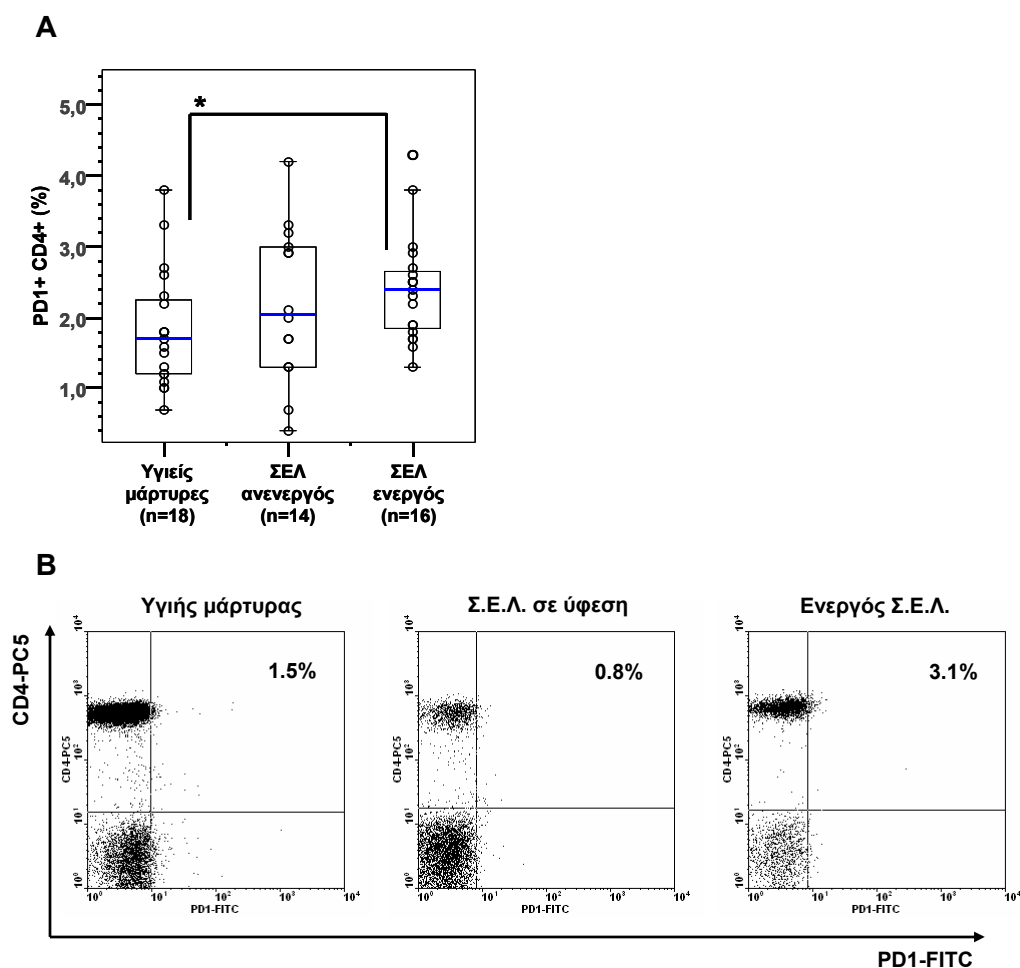
#### **4.2. Ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και ενεργό νόσο έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> περιφερικών λεμφοκυττάρων**

Η φαινοτυπική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε πως ένα μικρό μόνο ποσοστό περιφερικών T- ή B-λεμφοκυττάρων εκφράζουν τον υποδοχέα PD-1 σε κατάσταση ηρεμίας. Ωστόσο, ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και ενεργό νόσο (SLEDAI  $\geq 8$ ) είχαν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $1.5 \pm 0.3\%$ ) σε σχέση με υγιείς μάρτυρες ( $1.2 \pm 0.2\%$ ) ( $p=0.053$ ) (**Εικόνα 3A**). Παρομοίως, ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και SLEDAI  $\geq 6$  είχαν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $1.7 \pm 0.2\%$ ,  $n=25$ ) σε σχέση τόσο με υγιείς μάρτυρες ( $p=0.024$ ) όσο και με ασθενείς με SLEDAI  $< 6$  ( $0.6 \pm 0.2\%$ ,  $n=15$ ) ( $p=0.023$ ). Αντίστοιχη διαφορά στο ποσοστό των PD-1<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων δεν υπήρχε μεταξύ υγιών μαρτύρων ( $2.9 \pm 0.6\%$ ), ασθενών με ενεργό νόσο ( $2.3 \pm 0.4\%$ ) και ασθενών με ανενεργό νόσο ( $2.2 \pm 0.3\%$ ) (**Εικόνα 3B**).

Κατόπιν, αναλύθηκε η έκφραση του PD-1 σε υποπληθυσμούς βοηθητικών CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας τους δείκτες ενεργοποίησης CD69, CD25 (πρώιμη ενεργοποίηση) και HLA-DR (όψιμη ενεργοποίηση). Ασθενείς Σ.Ε.Λ. με ενεργό νόσο είχαν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $2.4 \pm 0.2\%$ ) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ( $1.8 \pm 0.2\%$ ) ( $p=0.029$ ) (**Εικόνα 4**). Παράλληλα όμως, ασθενείς με ενεργό νόσο είχαν οριακά αυξημένο ποσοστό περιφερικών CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων ( $14.7 \pm 3.1\%$  έναντι  $8.4 \pm 2.0\%$ ,  $p=0.100$ ) το οποίο θα μπορούσε να δικαιολογεί την αυξημένη έκφραση PD-1 στα λεμφοκύτταρα ασθενών καθώς το PD-1 εκφράζεται μετά από ενεργοποίηση. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν τριπλές χρώσεις κυτταρομετρίας ροής ώστε να εκτιμηθεί η έκφραση του PD-1 σε υποπληθυσμούς ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων.

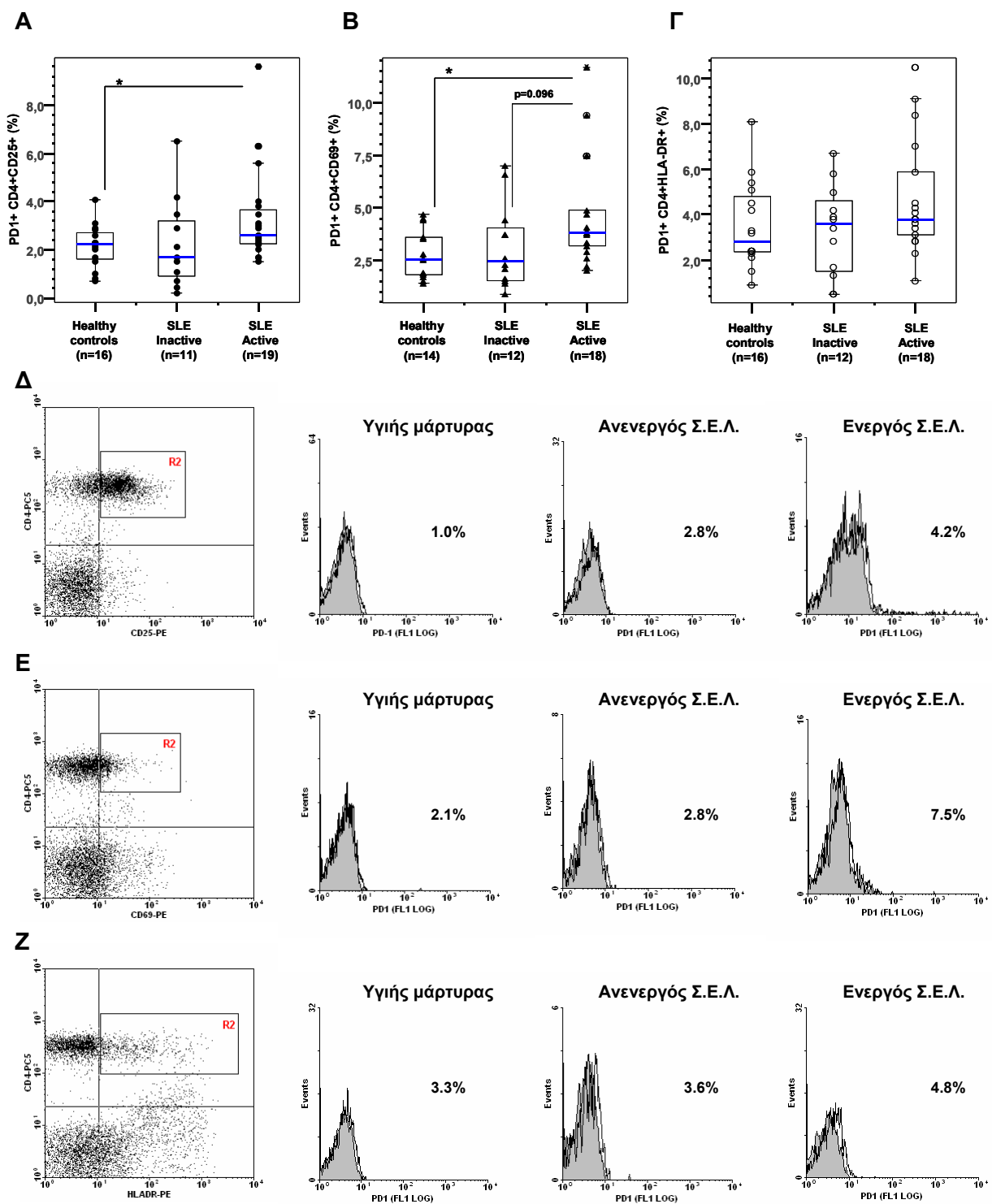


**Εικόνα 2. Έκφραση του PD-1 σε T- και B-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με Σ.Ε.Λ. (Α)** Ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε υγιείς μάρτυρες, ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε σχέση με ασθενείς με ανενεργό Σ.Ε.Λ. **(Β)** Ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκυττάρων σε υγιείς μάρτυρες, ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. **(Γ)** Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης για την έκφραση του PD-1 σε CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής. **(Δ)** Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης για την έκφραση του PD-1 σε CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής.



**Εικόνα 3. Έκφραση του PD-1 σε CD4+ T-λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. (Α)** Ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με Σ.Ε.Λ. Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. **(Β)** Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης για την έκφραση του PD-1 σε CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής.

Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. είχαν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T κυττάρων ( $3.4 \pm 0.4\%$  έναντι  $2.1 \pm 0.2\%$  σε υγιείς,  $p=0.019$ ) (**Εικόνα 5Α**), PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T κυττάρων ( $4.6 \pm 0.6\%$  έναντι  $3.2 \pm 0.3\%$ ,  $p=0.063$ ) (**Εικόνα 5Β**) και λιγότερο PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T κυττάρων ( $4.6 \pm 0.6\%$  έναντι  $3.5 \pm 0.4\%$ ,  $p=0.159$ ) (**Εικόνα 5Γ**). Συμπερασματικά, οι ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα.



**Εικόνα 4.** Έκφραση του PD-1 σε ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. (A) Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. (B) Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε σχέση με ασθενείς με ανενεργό Σ.Ε.Λ. και υγιείς μάρτυρες. (Γ) Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. (Δ) Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης έκφρασης του PD-1 σε CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα (περιοχή R2) με κυτταρομετρία ροής. (E) Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης έκφρασης του PD-1 σε CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα (περιοχή R2) με κυτταρομετρία ροής. (Z) Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης έκφρασης του PD-1 σε CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα (περιοχή R2) με κυτταρομετρία ροής.

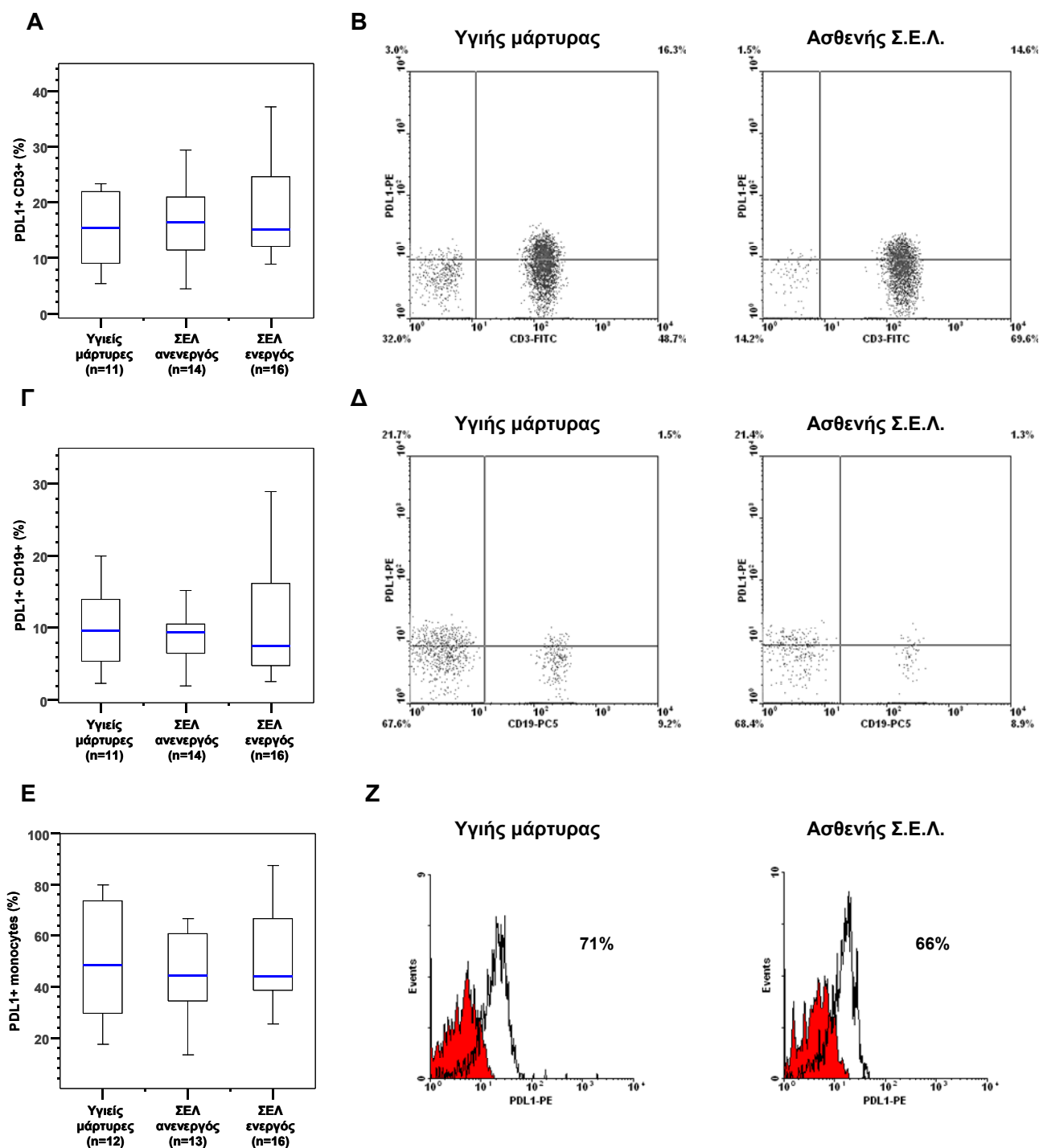
#### **4.3. Φυσιολογική έκφραση του PD-1 ligand 1 (PD-L1) σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο**

Η ενεργοποίηση του PD-1 προκειμένου να περιοριστεί η δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται μετά από πρόσδεση με τους ειδικούς συνδέτες (ligands) PD-1 ligand-1 (PD-L1) και PD-L2. Τυχόν διαταραχή στην έκφραση των συνδετών θα μπορούσε να οδηγήσει σε περιορισμένη λειτουργία του συστήματος PD-1/PD-1 ligands και επομένως διαταραχή στην περιφερική ομοίωση και ανοχή των λεμφοκυττάρων. Σε αντίθεση με τον PD-L2 του οποίου η έκφραση του περιορίζεται σε ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα, ο PD-L1 εκφράζεται σε διάφορους υποπληθυσμούς μονοπύρρηνων κυττάρων. Εξετάστηκε η έκφραση του PD-L1 σε T-, B-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα/μακροφάγα ασθενών με Σ.Ε.Λ. με κυτταρομετρία ροής. Το ποσοστό των PD-L1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ήταν παρόμοιο μεταξύ υγιών μαρτύρων ( $15.2 \pm 2.1\%$ ), ασθενών με ανενεργό νόσο ( $16.1 \pm 1.8\%$ ) και ασθενών με ενεργό νόσο ( $18.0 \pm 2.1\%$ ) (**Εικόνα 6Α**). Φυσιολογική έκφραση PD-L1 διαπιστώθηκε και στα CD19<sup>+</sup> B λεμφοκύτταρα ( $10.3 \pm 1.7\%$  σε υγιείς,  $9.2 \pm 0.9\%$  σε ανενεργό νόσο,  $11.3 \pm 2.1\%$  σε ενεργό νόσο) (**Εικόνα 6Γ**). Τα περιφερικά μονοπύρρηνα/μακροφάγα είχαν αυξημένη έκφραση PD-L1, χωρίς διαφορά μεταξύ υγιών ( $50.8 \pm 5.7\%$ ) και ασθενών με Σ.Ε.Λ. ( $45.7 \pm 4.6\%$  σε ανενεργό νόσο,  $52.1 \pm 5.1\%$  σε ενεργό νόσο) (**Εικόνα 6Ε**). Επομένως, οι ασθενείς με Σ.Ε.Λ. εμφανίζουν φυσιολογική έκφραση του συνδέτη του PD-1, PD-L1, στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα.

#### **4.4. Έκφραση του PD-1 σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο που φέρουν τον πολυμορφισμό PD1.3A**

Ο πολυμορφισμός PD1.3A στο intron 4 του γονιδίου PD-1 διαταράσσει μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1 με πιθανό αποτέλεσμα την τροποποίηση της μεταγραφής του PD-1. Καθώς ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός βρέθηκε σε αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. (32%) σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (18%), θελήσαμε να μελετήσουμε διαφοροποιήσεις στην έκφραση του PD-1 σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. που φέρουν ή όχι τον πολυμορφισμό. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν ασθενείς με αυξημένη ενεργότητα νόσο (SLEDAI  $\geq 8$ ) και τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για την έκφραση του PD-1 αναλύθηκαν με βάση τον πολυμορφισμό. Λόγω του μικρού αριθμού ασθενών σε κάθε κατηγορία (γονότυπος G/G ή G/A) και της διακύμανσης στην έκφραση του PD-1, η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές.

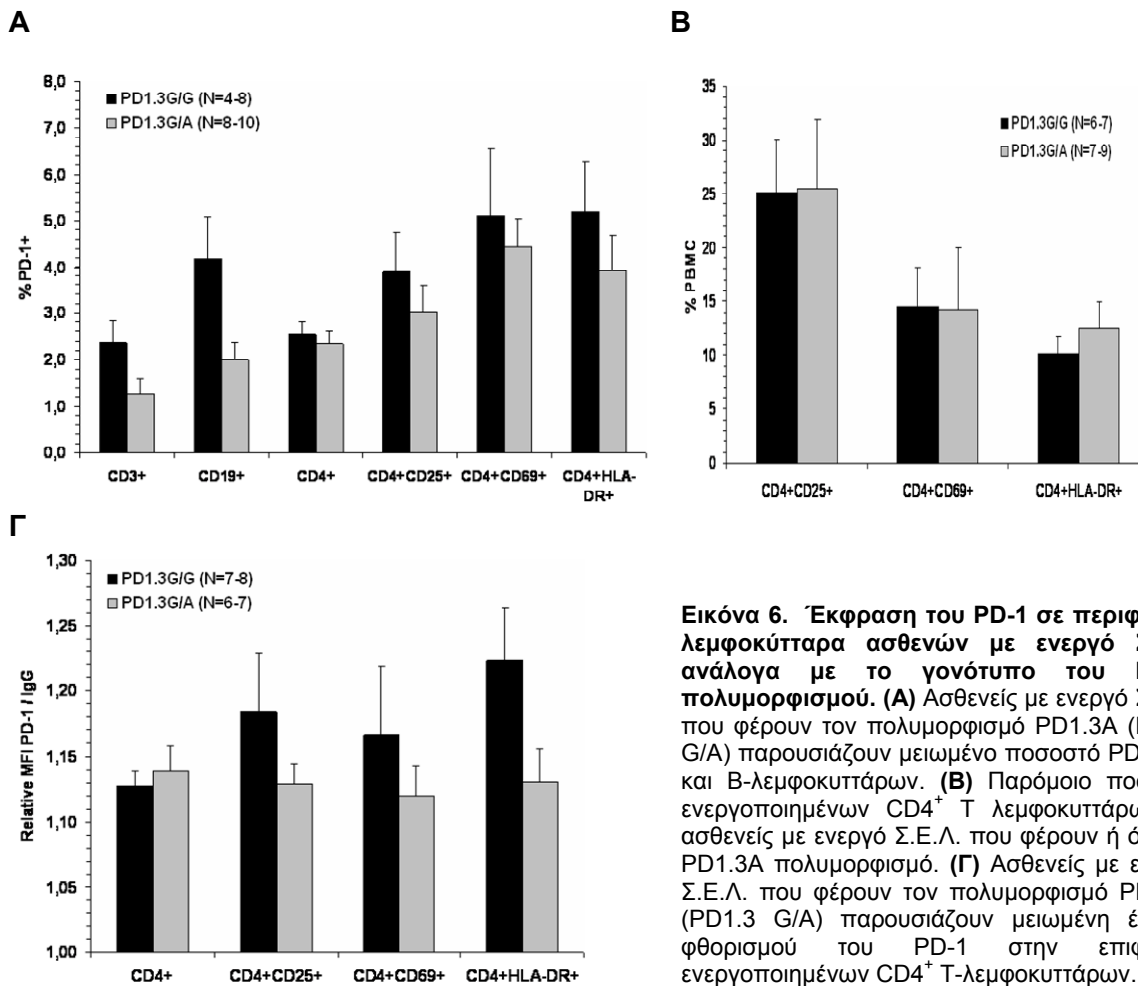




**Εικόνα 5.** Έκφραση του PD-1 ligand 1 (PD-L1) σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. (A) Ποσοστό PD-L1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με Σ.Ε.Λ. (B) Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης έκφρασης του PD-L1 σε CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής. (Γ) Ποσοστό PD-L1<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκυττάρων σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με Σ.Ε.Λ. (Δ) Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης έκφρασης του PD-L1 σε CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής. (E) Ποσοστό PD-L1<sup>+</sup> μονοκύτταρων/μακροφάγων σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με Σ.Ε.Λ. (Z) Παραδείγματα φαινοτυπικής ανάλυσης έκφρασης του PD-L1 σε μονοκύτταρα/μακροφάγα με κυτταρομετρία ροής.

Παρόλα αυτά, ασθενείς με ενεργό νόσο που φέρουν τον PD1.3A πολυμορφισμό εμφανίζουν μειωμένο ποσοστό PD1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων ( $1.3 \pm 0.3\%$  σε G/A έναντι  $2.4 \pm 0.5\%$  G/G,  $p=0.092$ ) και PD-1<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων ( $4.2 \pm 0.9\%$  σε G/G έναντι  $2.0 \pm 0.6\%$  G/A,  $p=0.070$ ) (**Εικόνα 7A**).

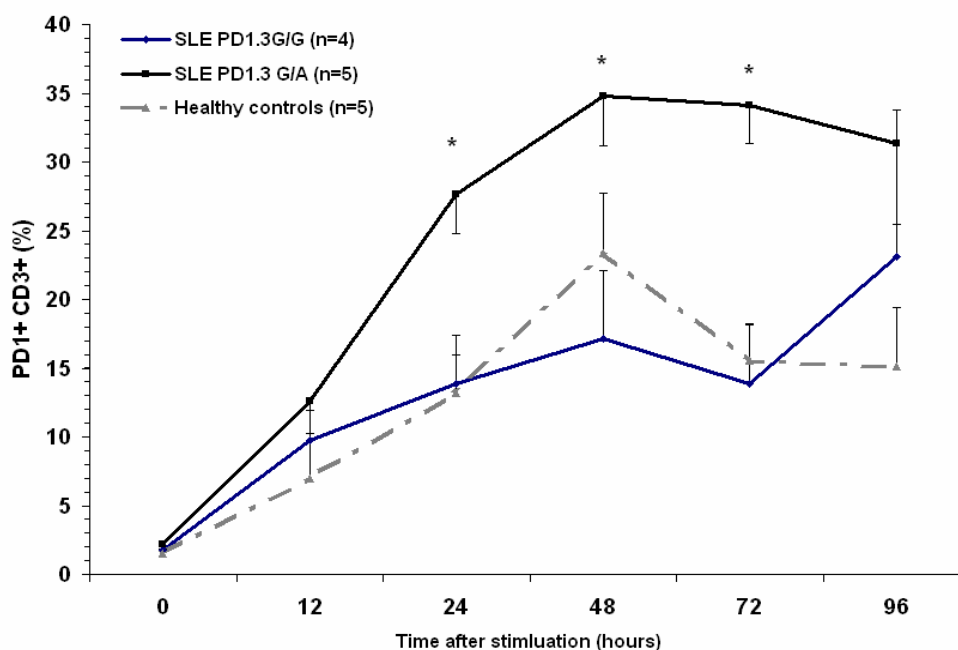
Μελετήθηκε επίσης η έκφραση του PD-1 σε υποπληθυσμούς CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με γονότυπο G/G ή G/A. Μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών δεν υπήρχε διαφορά ως προς το ποσοστό των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) (**Εικόνα 7B**). Επίσης, το ποσοστό των PD-1<sup>+</sup> ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων δε διέφερε μεταξύ G/G και G/A ασθενών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα ανάλυσης της έντασης φθορισμού (mean fluorescence intensity) του PD-1 έδειξε ότι ασθενείς με τον PD1.3A πολυμορφισμό παρουσίαζαν οριακά μικρότερη έκφραση PD-1 στα CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> κύτταρα ( $1.13 \pm 0.03$  έναντι  $1.22 \pm 0.04$  σε ασθενείς G/G,  $p=0.070$ ) (**Εικόνα 7Γ**). Συμπερασματικά, ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. που φέρουν τον πολυμορφισμό PD1.3A εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του υποδοχέα PD-1 στα περιφερικά T- και B-λεμφοκύτταρα.



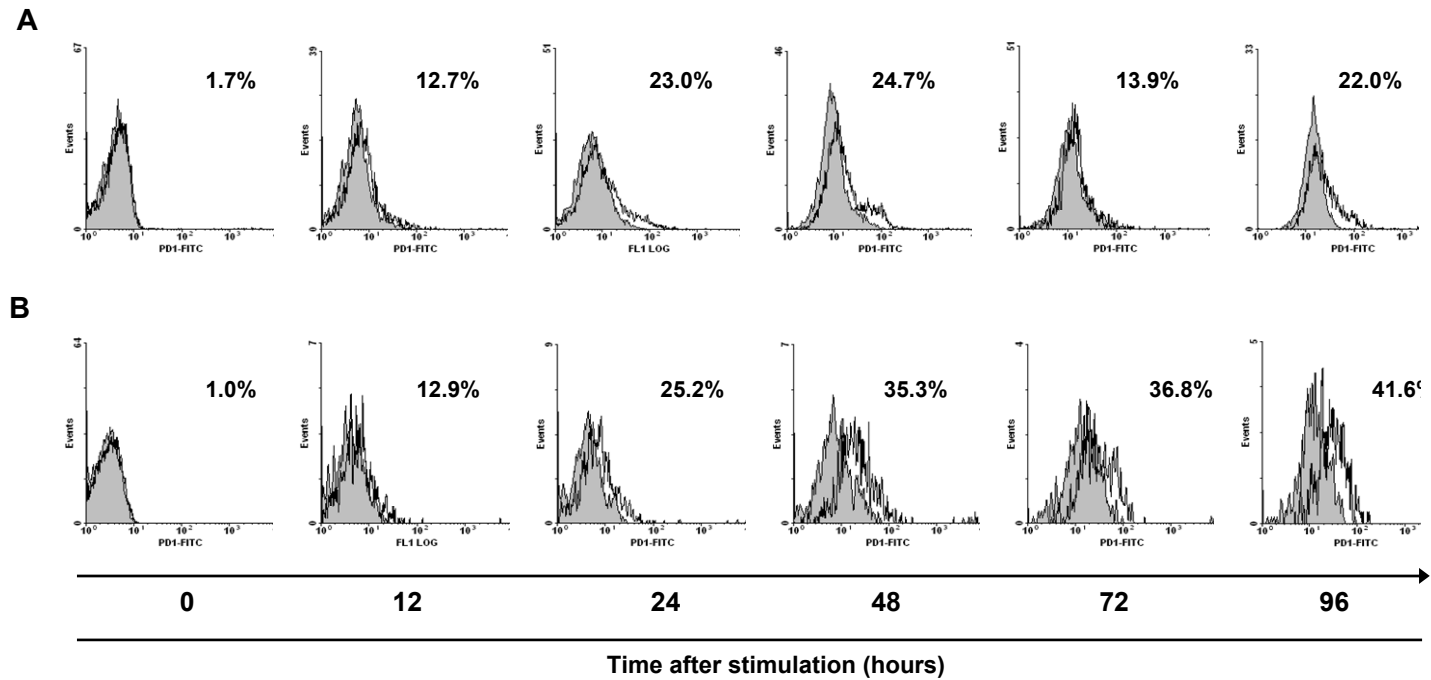
**Εικόνα 6.** Έκφραση του PD-1 σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με ενεργό Σ.Ε.Λ. ανάλογα με το γονότυπο του PD1.3 πολυμορφισμού. **(Α)** Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. που φέρουν τον πολυμορφισμό PD1.3A (PD1.3 G/A) παρουσιάζουν μειωμένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> T- και B-λεμφοκυττάρων. **(Β)** Παρόμοιο ποσοστό ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. που φέρουν ή όχι τον PD1.3A πολυμορφισμό. **(Γ)** Ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ. που φέρουν τον πολυμορφισμό PD1.3A (PD1.3 G/A) παρουσιάζουν μειωμένη ένταση φθορισμού του PD-1 στην επιφάνεια ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων.

#### 4.5. Μελέτη της κινητικής έκφρασης του υποδοχέα PD-1 σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο

Η έκφραση του υποδοχέα PD-1 είναι περιορισμένη σε κατάσταση ηρεμίας αλλά ενισχύεται σημαντικά μετά από ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με διάφορα μιτογόνα ερεθίσματα. Θελήσαμε να μελετήσουμε την κινητική επαγωγής της έκφρασης του PD-1 σε περιφερικά T-λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. μετά από ενεργοποίηση με PMA (10 ng/mL) και ionomycin (500 ng/mL), προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφοροποιήσεις στην ένταση ή τη διάρκεια έκφρασης του PD-1. Με βάση τον πιθανό ρόλο του πολυμορφισμού PD1.3A στη ρύθμιση της έκφρασης του PD-1, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ G/G και G/A ασθενών. Σε υγιείς μάρτυρες, ενεργοποίηση των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων με PMA-ionomycin οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του PD-1 στα T-λεμφοκύτταρα, με μέγιστη έκφραση στις 48 ώρες (20-30% PD-1<sup>+</sup> κύτταρα) (**Εικόνα 8**). Αντίστοιχα πειράματα κινητικής πραγματοποιήθηκαν σε n=5 ασθενείς με γονότυπο G/A (3 με ενεργό νόσο, 2 με ανενεργό νόσο) και n=4 ασθενείς με γονότυπο G/G (2 με ενεργό νόσο, 2 με ανενεργό νόσο). Διαπιστώθηκε ενισχυμένη έκφραση του PD-1 στα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με γονότυπο G/A σε σχέση με ασθενείς με γονότυπο G/G, που ήταν περισσότερο εμφανής t=24-72 ώρες μετά από ενεργοποίηση (**Εικόνες 8, 9**). Επομένως, ασθενείς Σ.Ε.Λ. με τον PD1.3A πολυμορφισμό παρά τη χαμηλότερη έκφραση PD-1 σε κατάσταση ηρεμίας, εμφανίζουν αυξημένη έκφραση μετά από ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με PMA-ionomycin.



**Εικόνα 7.** Κινητική έκφρασης του PD-1 σε περιφερικά T-λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση με PMA-ionomycin. Περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα ( $1 \times 10^6$ /mL) από υγιείς μάρτυρες (γραμμή με παύλες), ασθενείς Σ.Ε.Λ. χωρίς τον PD1.3A πολυμορφισμό (μπλέ συνεχής γραμμή), ασθενείς Σ.Ε.Λ. που φέρουν τον PD1.3A πολυμορφισμό (μαύρη συνεχής γραμμή) καλλιεργήθηκαν για 12-96 ώρες παρουσία PMA (10ng/mL) και ionomycin (500ng/mL). Στα αναφερόμενα χρονικά σημεία, μελετήθηκε η έκφραση του PD-1 στα CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής. Ασθενείς Σ.Ε.Λ. που φέρουν τον PD1.3A πολυμορφισμό παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του PD-1 σε CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση. \* p<0.05



**Εικόνα 8.** Παράδειγμα κινητικής έκφρασης του PD-1 σε Τ-λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. μετά από ενεργοποίηση με PMA-ionomycin. (A) Κινητική έκφρασης του PD-1 σε ασθενή Σ.Ε.Λ. χωρίς τον πολυμορφισμό PD1.3A (PD1.3 G/G). (B) Κινητική έκφρασης του PD-1 σε ασθενή Σ.Ε.Λ. που φέρει τον πολυμορφισμό PD1.3A (PD1.3 G/A).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μηχανισμοί περιφερικής ανοσολογικής ανοχής είναι σημαντικοί για το λειτουργικό περιορισμό των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων που διαφεύγουν από κεντρικά λεμφικά όργανα όπως ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών. Η παρουσία ενός μικρού ποσοστού τέτοιων αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων και η «ελεγχόμενη απόκρισή» τους σε αντιγόνα εαυτού είναι σημαντική για την φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, αυτοδραστικά T- και B-λεμφοκύτταρα ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα φυσιολογικών ενηλίκων (83, 84), αλλά μόνο το 3-8% αυτών αναπτύσσει κάποιας μορφής αυτοανοσία.

Ο υποδοχέας PD-1 ανήκει στην οικογένεια των B7 συνδिएεργετικών μορίων και η σηματοδότησή του οδηγεί σε λειτουργικό περιορισμό των λεμφοκυττάρων, με μειωμένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών (40). Η σημασία του PD-1 στη διατήρηση της περιφερικής ομοιόστασης και ανοσολογικής ανοχής προκύπτει από μελέτες σε διαγονιδιακά PD-1<sup>-/-</sup> στελέχη ποντικών, τα οποία εμφανίζουν φαινότυπο αυτοανοσίας ανάλογα με το γενετικό τους υπόβαθρο (σύνδρομο τύπου λύκου, αυτοάνοση μυοκαρδιοπάθεια, ή σοβαρής μορφής διαβήτη τύπου 1) (8). Ο ρόλος του PD-1 στη ρύθμιση της περιφερικής ανοχής αναδεικνύεται επιπλέον από το γεγονός πως οι συνδέτες του (PD-L1, PD-L2) – σε αντίθεση με αυτούς του CTLA-4 – εμφανίζουν ευρύ πρότυπο έκφρασης που δεν περιορίζεται στα λεμφο-αιμοποιητικά κύτταρα αλλά εκφράζονται και σε ιστικά παρεγχυματικά κύτταρα μετά από έκθεση σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (15). Τέλος, η κινητική έκφρασης του PD-1 διαφοροποιείται από αυτή του CTLA-4: το PD-1 εμφανίζει μέγιστη έκφραση 48-72 ώρες μετά από ενεργοποίηση ενώ το CTLA-4 είναι βρίσκεται προσχηματισμένο σε ενδοκυττάρια αποθήκες, εκφράζεται στη μεμβράνη των λεμφοκυττάρων σύντομα μετά από ενεργοποίηση και ακολούθως ενδοκυττάρωνεται εκ νέου.

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος αποτελεί το πρότυπο αυτοάνοσης νόσου στον άνθρωπο με παρουσία αυτοδραστικών T- και B-λεμφοκυττάρων, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και διηθήσεις ιστών με ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. Θελήσαμε να εξετάσουμε τη συμμετοχή του συστήματος PD-1/PD-1 ligands στην παθογένεια του Σ.Ε.Λ. βασιζόμενοι και στη συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου του PD-1 με την παρουσία Σ.Ε.Λ., νεφρίτιδας του Σ.Ε.Λ. ή άλλων αυτοάνοσων διαταραχών.

Μελετήσαμε τη συχνότητα των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών PD1.3 και PD1.5 σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και υγιείς μάρτυρες. Ο πολυμορφισμός PD1.3 – αλλά όχι ο PD1.5 – ήταν σημαντικά συχνότερος σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. (32% έναντι 18% στους μάρτυρες) υποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο του PD-1 ως γονίδιο που συνεισφέρει σε κίνδυνο για παρουσία Σ.Ε.Λ. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές που συσχετίζουν τον PD1.3A πολυμορφισμό με αυτοάνοσες διαταραχές (Σ.Ε.Λ, ρευματοειδής αρθρίτιδα, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, σοβαρή πολλαπλή σκλήρυνση) σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες (66-74, 85, 86). Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί η ύπαρξη σημαντικών διαφορών στη συχνότητα του πολυμορφικού αλληλίου ανάλογα με την εθνική πληθυσμιακή ομάδα μελέτης (5-12%). Χαρακτηριστικά, οι Ferreiros-Vidal και συν. (87) μελετώντας

τη συχνότητα πολυμορφισμών του γονιδίου του PD-1 σε Ισπανούς ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα διαπίστωσαν πως η παρουσία του PD1.3 G – αντί του A ! – αλληλίου σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για Σ.Ε.Λ. Ο λόγος για την ύπαρξη ενός τέτοιου αντίθετου αποτελέσματος δεν είναι πλήρως κατανοητός αλλά ίσως οφείλεται: α) στη διαφορετικότητα που εμφανίζουν οι εθνικές ομάδες ως προς γενετικά χαρακτηριστικά, β) στην πιθανή συνύπαρξη (και συν-κληρονόμηση) πολυμορφισμών στο γονίδιο του PD-1 με πολυμορφισμούς σε άλλα γονίδια κινδύνου (susceptibility genes) για εμφάνιση Σ.Ε.Λ., ή γ) στην πιθανή *πλειοτρόπο* δράση του PD-1, όχι μόνο στην περιφέρεια αλλά και σε κεντρικά ανοσολογικά όργανα, όπως ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών.

Η φαινοτυπική ανάλυση έκφρασης του PD-1 σε περιφερικά μονοπύρνα κύτταρα ανέδειξε πως ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και ενεργό νόσο (SLEDAI  $\geq 8$ ) παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αφορούσαν περισσότερο τα CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T κύτταρα αλλά παρόμοια τάση εμφανιζόταν και στα CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T κύτταρα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Για παράδειγμα, ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων στο αρθρικό υγρό (37), ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα έχουν αυξημένο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> T- και B-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα (63), ενώ ασθενείς με σύνδρομο Sjogren's εμφανίζουν διήθηση σιελογόνων αδένων με PD-1<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα (64, 65). Τα προηγούμενα ευρήματα σε συνδυασμό με τα δικά μας σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. ίσως ερμηνεύονται από το γεγονός πως το PD-1 εκφράζεται κυρίως μετά από ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και επομένως, η αυξημένη έκφραση σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα οφείλεται στην παρουσία αυξημένων αριθμών ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων.

Παρά την αυξημένη έκφραση του PD-1 σε ασθενείς με ενεργό Σ.Ε.Λ., περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση την παρουσία του πολυμορφισμού PD1.3, έδειξε πως ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό έχουν μικρότερο ποσοστό PD-1<sup>+</sup> B- και T-λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων. Αν επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αυτά σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών διαταραχής της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Θα ερμηνεύσουν επίσης το ρόλο των πολυμορφισμών του γονιδίου PD-1 στον αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη Σ.Ε.Λ. και γενικότερα αυτοανοσίας. Παρόλο που η έκφραση του PD-1 στα απομονωμένα λεμφοκύτταρα είναι περιορισμένη, ίσως είναι σημαντική για τη διατήρηση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής όπως έχει δειχθεί για τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα σε ποντικούς (88).

Τα πειράματα κινητικής έκφρασης του PD-1 σε T-λεμφοκύτταρα μετά από διέγερση με PMA-*ionomycin* έδειξαν πως ασθενείς Σ.Ε.Λ. με τον PD1.3A πολυμορφισμό έχουν αυξημένη έκφραση του PD-1 μετά από ενεργοποίηση, ιδίως στις 24-72 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως οφείλεται στη μειωμένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1 στο γονίδιο του PD-1 σε ασθενείς με τον πολυμορφισμό PD1.3A (66), με αποτέλεσμα την τροποποιημένη έκφραση του γονιδίου. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του RUNX1 στη ρύθμιση της έκφρασης του PD-1 δεν είναι γνωστός. Ο παράγοντας RUNX1 είναι σημαντικός

για την καταστολή έκφρασης του CD4 κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων (89) αλλά δεν έχει μελετηθεί στο πλαίσιο της περιφερικής ανοσολογικής λειτουργίας. Ο ρόλος του στην αυτοανοσία προκύπτει από το γεγονός ότι πολυμορφισμοί του ίδιου του RUNX1 ή θέσεων πρόσδεσής του σε άλλα γονίδια έχουν συσχετιστεί με ψωρίαση και ρευματοειδή αρθρίτιδα (89). Μια δεύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων συσχέτισης του PD1.3 πολυμορφισμού με την έκφραση του PD-1 είναι η πιθανή συνύπαρξη μιας δεύτερης γενετικής διαταραχής, η οποία είναι σημαντική για τη ρύθμιση έκφρασης του PD-1 στα λεμφοκύτταρα.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία υποστηρίζει σημαντικό ρόλο για το μονοπάτι PD-1/PD-1 ligands στη ρύθμιση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. Επιβεβαιώθηκε η αυξημένη συχνότητα του πολυμορφισμού PD1.3A στο γονίδιο του PD-1 σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και συσχετίστηκε η παρουσία του με μειωμένη έκφραση του PD-1 σε περιφερικά λεμφοκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν αφετηρία για τη μελέτη πιθανών διαταραχών στην έκφραση και λειτουργία του PD-1 σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Σ.Ε.Λ. και του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1 στη λειτουργία περιφερικών λεμφοκυττάρων.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Goodnow, C. C., J. Sprent, B. F. St. Groth, and C. G. Vinuesa. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435:590-597.
2. Jacobson, D. L., S. J. Gange, N. R. Rose, and N. M. Graham. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol* 84:223-243.
3. Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders.
4. Ohashi, P. S., and A. L. DeFranco. 2002. Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* 14:744-759.
5. Bacchetta, R., S. Gregori, and M.-G. Roncarolo. 2005. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 4:491-496.
6. Goodnow, C. C. 2001. Pathways for self-tolerance and the treatment of autoimmune diseases. *Lancet* 357:2115-2121.
7. Paust, S., and H. Cantor. 2005. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 204:195-207.
8. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-548.
9. Collins, M., V. Ling, and B. M. Carreno. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 6:223.
10. Rietz, C., and L. Chen. 2004. New B7 family members with positive and negative costimulatory function. *Am J Transplant* 4:8-14.
11. Greenwald, R. J., Y. E. Latchman, and A. H. Sharpe. 2002. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 14:391-396.
12. Nishimura, H., and T. Honjo. 2001. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 22:265-268.
13. Okazaki, T., and T. Honjo. 2006. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 27:195-201.
14. Parry, R. V., J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, and J. L. Riley. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25:9543-9553.
15. Subudhi, S. K., M. L. Alegre, and Y. X. Fu. 2005. The balance of immune responses: costimulation versus coinhibition. *J Mol Med* 83:193-202.
16. Nurieva, R., S. Thomas, T. Nguyen, N. Martin-Orozco, Y. Wang, M.-K. Kaja, X.-Z. Yu, and C. Dong. 2006. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *Embo J* 25:2623-2633.
17. O'Garra, A., P. L. Vieira, P. Vieira, and A. E. Goldfeld. 2004. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 114:1372-1378.
18. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
19. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D. A. Hafler. 2004. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16:89-97.
20. Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
21. Keir, M. E., and A. H. Sharpe. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev* 204:128-143.
22. Lenardo, M., K. M. Chan, and F. Hornung. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis - immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17:221-253.
23. Rathmell, J. C., S. E. Townsend, J. C. Xu, R. A. Flavell, and C. C. Goodnow. 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87:319-329.
24. Lan, R. Y., A. A. Ansari, Z.-X. Lian, and M. E. Gershwin. 2005. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4:351-363.
25. de Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, L. S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, W. de Jager, G. Pugayung, F. Giannoni, G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis, and B. Prakken. 2004. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 172:6435-6443.
26. Miyara, M., Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, D. Nochy, P. Debre, J.-C. Piette, and G. Gorochov. 2006. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175:8392-8400.
27. Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 11:3887-3895.
28. Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772.



29. Finger, L. R., J. Pu, R. Wasserman, R. Vibhakar, E. Louie, R. R. Hardy, P. D. Burrows, and L. G. Billips. 1997. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene* 197:177-187.
30. Carter, L., L. A. Fouser, J. Jussif, L. Fitz, B. Deng, C. R. Wood, M. Collins, T. Honjo, G. J. Freeman, and B. M. Carreno. 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32:634-643.
31. Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169:5538-5545.
32. Zhong, X., C. Bai, W. Gao, T. B. Strom, and T. L. Rothstein. 2004. Suppression of expression and function of negative immune regulator PD-1 by certain pattern recognition and cytokine receptor signals associated with immune system danger. *Int Immunol* 16:1181-1188.
33. Lechner, O., J. Lauber, A. Franzke, A. Sarukhan, H. von Boehmer, and J. Buer. 2001. *Curr Biol* 11:587-595.
34. Park, H. B., D. J. Paik, E. Jang, S. Hong, and J. Youn. 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. *Int Immunol* 16:1203-1213.
35. Raimondi, G., W. J. Shufesky, D. Tokita, A. E. Morelli, and A. W. Thomson. 2006. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol* 176:2808-2816.
36. Bennett, F., D. Luxenberg, V. Ling, I. M. Wang, K. Marquette, D. Lowe, N. Khan, G. Veldman, K. A. Jacobs, V. E. Valge-Archer, M. Collins, and B. M. Carreno. 2003. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 170:711-718.
37. Hatachi, S., Y. Iwai, S. Kawano, S. Morinobu, M. Kobayashi, M. Koshiba, R. Saura, M. Kurosaka, T. Honjo, and S. Kumagai. 2003. CD4+ PD-1+ T cells accumulate as unique anergic cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. *J Rheumatol* 30:1410-1419.
38. Vibhakar, R., G. Juan, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, and L. R. Finger. 1997. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp Cell Res* 232:25-28.
39. Chemnitz, J. M., R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, and J. L. Riley. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173:945-954.
40. Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
41. Khoury, S. J., and M. H. Sayegh. 2004. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 20:529-538.
42. Liang, S. C., Y. E. Latchman, J. E. Buhlmann, M. F. Tomczak, B. H. Horwitz, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 33:2706-2716.
43. Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13866-13871.
44. Sheppard, K. A., L. J. Fitz, J. M. Lee, C. Benander, J. A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J. M. Jussif, L. L. Carter, C. R. Wood, and D. Chaudhary. 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 574:37-41.
45. Cai, G., A. Karni, E. M. Oliveira, H. L. Weiner, D. A. Hafler, and G. J. Freeman. 2004. PD-1 ligands, negative regulators for activation of naive, memory, and recently activated human CD4+ T cells. *Cell Immunol* 230:89-98.
46. Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
47. Latchman, Y. E., S. C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R. A. Sobel, M. Klemm, V. K. Kuchroo, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10691-10696.
48. Chen, Y., J. Zhang, J. Li, L. Zou, T. Zhao, Y. Tang, and Y. Wu. 2006. Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 102:e81-92.
49. Ding, H., X. Wu, and W. Gao. 2005. PD-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *Clin Immunol* 115:184-191.
50. HAIJ, S. D., A. M. WOLTMAN, L. A. TROUW, A. C. BAKKER, S. W. KAMERLING, S. W. V. D. KOOIJ, L. CHEN, R. A. KROCZEK, M. R. DAHA, and C. V. KOOTEN. 2005. Renal tubular epithelial cells modulate T-cell responses via ICOS-L and B7-H1. *Kidney Int* 68:2091-2102.

51. Cao, Y., H. Zhou, J. Tao, Z. Zheng, N. Li, B. Shen, T. S. Shih, J. Hong, J. Zhang, and K. Y. Chou. 2003. Keratinocytes induce local tolerance to skin graft by activating interleukin-10-secreting T cells in the context of costimulation molecule B7-H1. *Transplantation* 75:1390-1396.
52. Mazanet, M. M., and C. C. Hughes. 2002. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol* 169:3581-3588.
53. Wiendl, H., M. Mitsdoerffer, D. Schneider, L. Chen, H. Lochmuller, A. Melms, and M. Weller. 2003. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *Faseb J* 17:1892-1894.
54. Wintterle, S., B. Schreiner, M. Mitsdoerffer, D. Schneider, L. Chen, R. Meyermann, M. Weller, and H. Wiendl. 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 63:7462-7467.
55. Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo. 1998. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10:1563-1572.
56. Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
57. Okazaki, T. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
58. Okazaki, T., Y. Tanaka, R. Nishio, T. Mitsuiye, A. Mizoguchi, J. Wang, M. Ishida, H. Hiai, A. Matsumori, N. Minato, and T. Honjo. 2003. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9:1477-1483.
59. Wang, J., T. Yoshida, F. Nakaki, H. Hiai, T. Okazaki, and T. Honjo. 2005. Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11823-11828.
60. Ansari, M. J., A. D. Salama, T. Chitnis, R. N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, T. Yamazaki, M. Azuma, H. Iwai, S. J. Khoury, H. Auchincloss, Jr., and M. H. Sayegh. 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 198:63-69.
61. Salama, A. D., T. Chitnis, J. Imitola, M. J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 198:71-78.
62. Keir, M. E., S. C. Liang, I. Guleria, Y. E. Latchman, A. Qipo, L. A. Albacker, M. Koulmanda, G. J. Freeman, M. H. Sayegh, and A. H. Sharpe. 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203:883-895.
63. Kanai, T., T. Totsuka, K. Uraushihara, S. Makita, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima, H. Akiba, H. Yagita, K. Okumura, U. Machida, H. Iwai, M. Azuma, L. Chen, and M. Watanabe. 2003. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 171:4156-4163.
64. Bolstad, A. I., H. G. Eiken, B. Rosenlund, M. E. Alarcon-Riquelme, and R. Jonsson. 2003. Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 48:174-185.
65. Kobayashi, M., S. Kawano, S. Hatachi, C. Kurimoto, T. Okazaki, Y. Iwai, T. Honjo, Y. Tanaka, N. Minato, T. Komori, S. Maeda, and S. Kumagai. 2005. Enhanced expression of programmed death-1 (PD-1)/PD-L1 in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 32:2156-2163.
66. Prokunina, L., C. Castillejo-Lopez, F. Oberg, I. Gunnarsson, L. Berg, V. Magnusson, A. J. Brookes, D. Tentler, H. Kristjansdottir, G. Grondal, A. I. Bolstad, E. Svenungsson, I. Lundberg, G. Sturfelt, A. Jonssen, L. Truedsson, G. Lima, J. Alcocer-Varela, R. Jonsson, U. B. Gyllensten, J. B. Harley, D. Alarcon-Segovia, K. Steinsson, and M. E. Alarcon-Riquelme. 2002. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32:666-669.
67. Prokunina, L., L. Padyukov, A. Bennet, U. de Faire, B. Wiman, J. Prince, L. Alfredsson, L. Klareskog, and M. Alarcon-Riquelme. 2004. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 50:1770-1773.
68. Johansson, M., L. Arlestig, B. Moller, and S. Rantapaa-Dahlqvist. 2005. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:1665-1669.
69. Nielsen, C., D. Hansen, S. Husby, B. B. Jacobsen, and S. T. Lillevang. 2003. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62:492-497.
70. Kroner, A., M. Mehling, B. Hemmer, P. Rieckmann, K. V. Toyka, M. Maurer, and H. Wiendl. 2005. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58:50-57.
71. James, E. S., S. Harney, B. P. Wordsworth, W. O. Cookson, S. J. Davis, and M. F. Moffatt. 2005. PDCD1: a tissue-specific susceptibility locus for inherited inflammatory disorders. *Genes Immun* 6:430-437.
72. Kong, E. K., L. Prokunina-Olsson, W. H. Wong, C. S. Lau, T. M. Chan, M. Alarcon-Riquelme, and Y. L. Lau. 2005. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 52:1058-1062.

73. Lin, S. C., J. H. Yen, J. J. Tsai, W. C. Tsai, T. T. Ou, H. W. Liu, and C. J. Chen. 2004. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:770-775.
74. Nielsen, C., H. Lastrup, A. Voss, P. Junker, S. Husby, and S. T. Lillevang. 2004. A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 13:510-516.
75. Hoffman, R. W. 2004. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 113:4-13.
76. Takeuchi, T., K. Tsuzaka, T. Abe, K. Yoshimoto, K. Shiraishi, H. Kameda, and K. Amano. 2005. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38:339-346.
77. Huttloff, A., K. Buechner, K. Reiter, H. J. Baelde, M. Odendahl, A. Jacobi, T. Doerner, and R. Kroccek. 2004. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3211-3220.
78. Kawamoto, M., M. Harigai, M. Hara, Y. Kawaguchi, K. Tezuka, M. Tanaka, T. Sugiura, Y. Katsumata, C. Fukasawa, H. Ichida, S. Higami, and N. Kamatani. 2006. Expression and function of inducible costimulator in patients with systemic lupus erythematosus: possible involvement in excessive interferon- $\gamma$  and anti-double-stranded DNA antibody production. *Arthritis Res Ther* 8:1-14.
79. Kyttaris, V. C., Y.-T. Juang, and G. C. Tsokos. 2005. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 17:518-522.
80. Kyttaris, V. C., and G. C. Tsokos. 2004. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2004.
81. Tsai, H.-F., J.-J. Lai, A.-H. Chou, T.-F. Wang, C.-S. Wu, and P.-N. Hsu. 2004. Induction of costimulation of human CD4 T cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Possible role in T cell activation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:629-639.
82. Bombardier, C., D. D. Gladman, M. B. Urowitz, D. Caron, and C. H. Chang. 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35:630-640.
83. Danke, N. A., D. M. Koelle, C. Yee, S. Beheray, and W. W. Kwok. 2004. Autoreactive T Cells in Healthy Individuals. *J Immunol* 172:5967-5972.
84. Logtenberg, T., A. Kroon, F. Gmelig-Meyling, and R. Ballieux. 1986. Antigen-specific activation of autoreactive B cells in normal human individuals. *Eur J Immunol* 16:1497-1501.
85. Mori, M., R. Yamada, K. Kobayashi, R. Kawaida, and K. Yamamoto. 2005. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 50:264-266.
86. Sanghera, D. K., S. Manzi, F. Bontempo, C. Nestlerode, and M. I. Kamboh. 2004. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. *Hum Genet* 115:393-398.
87. Ferreiros-Vidal, I., J. Gomez-Reino, F. Barros, A. Carracedo, P. Carreira, F. Gonzalez-Escribano, M. Liz, J. Martin, J. Ordi, J. Vicario, and A. Gonzalez. 2004. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum* 50:2590-2597.
88. Probst, H. C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6:280-286.
89. Alarcón-Riquelme, M. E. 2004. Role of RUNX in autoimmune diseases linking rheumatoid arthritis, psoriasis and lupus. *Arthritis Res Ther* 6:169-173.

## 7. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπούμπα για τη δυνατότητα που μου παρέιχε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Ρευματολογίας, Κλινικής Ανοσολογίας και Αλλεργιολογίας. Για την αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρέιχε και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε ως νέο ερευνητή. Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Γουλιέλμο για τη σημαντική βοήθεια στο σχεδιασμό, υλοποίηση και αξιολόγηση των πειραμάτων που περιελήφθησαν στην παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου Ρευματολογίας Χριστιάννα Χουλάκη, Εύα Παπαδημητράκη, Αμαλία Ραπτοπούλου, Μάγδα Νάκου για την καθημερινή τους συντροφιά και τη βοήθειά τους στην υλοποίηση των πειραμάτων. Επίσης, ευχαριστώ την Ελένη Κουταλά για την τεχνική υποστήριξη στην κυτταρομετρία ροής. Η εργασία αυτή δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την υποστήριξη και συνεργασία των μελών της Κλινικής Ρευματολογίας του Πα.Γ.Ν.Η. (κ. Πρόδρομο Σιδηρόπουλο, Ηρακλή Κρητικό, Αργυρώ Δημάκα, Γεώργιο Κατσικά, Χαράλαμπο Λιναρδάκη) , τους οποίους και ευχαριστώ.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος την κ. Κλειώ Μαμαλάκη (Ερευνήτρια) για την σημαντική υποστήριξή της στην πραγματοποίηση και αξιολόγηση των πειραμάτων, όπως επίσης τη Γεωργία Φουστέρη και τον Γιάννη Χατζηδάκη.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλο το διδακτικό και ερευνητικό προσωπικό που συμμετείχε στα μαθήματα και τις εργαστηριακές ασκήσεις του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, για το ζήλο που επέδειξαν στη μετάδοση των γνώσεων και γιατί βοήθησαν στην καλλιέργεια ενός νέου τρόπου κριτικής επιστημονικής σκέψης. Τέλος, ευχαριστώ τη γραμματέα του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Μαίρη Αδαμάκη για τη σημαντική της βοήθεια και υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.