



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πολυμορφισμοί των CD40 και CTLA4
στις Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες

Παρσοπούλου Φαίδρα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ανοσολογία

Λάρισα, Οκτώβριος 2015



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

Polymorphisms of CD40 and CTLA4
in Primary Antibody Deficiencies

By
Parsopoulou Faidra

Examining Committee:

- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology (Supervisor)
- Matthaios Speletas, Associate Professor of Laboratory Immunology
- Efthimia Peteinaki, Associate Professor of Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Immunology

Larissa, October 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΟΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ.....	15
1.1. Η ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ IgA ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (sIgAD).....	17
1.1.1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	17
1.1.2. Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ IgAD	18
1.1.3. Η ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ IgAD.....	19
1.2. Η ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (CVID)	20
1.2.1. Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ CVID.....	20
1.2.2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	21
1.2.2.1. Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΣΤΗ CVID	24
1.2.2.2. ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ CVID ...	25
2. ΤΟ ΣΥΝΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CD40 ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CD40-CD154	27
2.1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ CD40	28
2.2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΕΤΗ CD40L	29
2.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CD40.....	30
2.4. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	30
2.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ CD40	34
2.6. <i>In vitro</i> ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CD40/CD40L.....	35
2.6.1. Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	35
2.6.2. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	36
2.6.3. ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ	37
2.7. <i>In vivo</i> ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CD40-CD40L.....	40
2.7.1. ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ.....	40
2.7.2. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ	40

2.7.3.	ΦΛΕΓΜΟΝΗ	40
2.7.4.	ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ.....	41
2.8.	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. -1T/C (rs1883832).....	43
3.	ΤΟ ΣΥΝΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CTLA4 ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CTLA4/B7.....	44
3.1.	ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ CTLA4	45
3.1.1.	ΤΟ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ ΣΤΟ CTLA4	45
3.2.	ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CTLA4.....	46
3.3.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ CTLA4.....	46
3.4.	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΟΥΣ ΣΥΝΔΕΤΕΣ	48
3.5.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	50
3.5.1.	ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CTLA4	50
3.5.1.1.	ΤΟ CTLA4 ΑΝΤΑΓΩΝΙΖΕΤΑΙ ΤΟ CD28 ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΔΕΤΩΝ. 50	
3.5.1.2.	ΤΟ CTLA4 ΜΕΤΑΓΕΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ	52
3.5.1.3.	ΤΟ CTLA4 ΜΕΤΑΓΕΙ ΣΗΜΑΤΑ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΔΕΤΗ	54
3.5.1.4.	Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΟΥ CTLA4 ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	54
3.5.2.	ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CTLA4.....	55
3.5.2.1.	ΤΟ CTLA4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΙΔΟ.....	55
3.5.2.2.	ΤΟ CTLA4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΑ Τ-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.	55
3.5.2.3.	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ CTLA4.....	56
3.5.2.4.	ΤΟ CTLA4 ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΙ ΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΩΝ APCs.....	57
3.6.	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. +49A/G (rs231775)	59
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
1.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	62
2.	ΥΛΙΚΟ	63
2.1.	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	63
2.2.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	64
3.	ΜΕΘΟΔΟΣ.....	65
3.1.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ (PBL).....	65
3.2.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	66

3.2.1. PCR ΓΙΑ ΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 1 ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ CD40 ΚΑΙ CTLA4	66
3.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	67
3.2.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ	67
3.2.4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ.....	68
3.2.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ (SEQUENCING)	69
3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	69
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
4.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. -1 T/C (rs1883832).....	71
4.1.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ PADs	71
4.1.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ.....	74
4.2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. +49 A/G (p.T17A, rs231775).....	75
4.2.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ PADs	75
4.2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ.....	78
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2014 έως Σεπτέμβριος 2015, στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο ΠΜΣ με τίτλο «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες από το εργαστήριο αυτό καθώς και από συνεργαζόμενα εργαστήρια.

Για τη σημαντική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Ιδιαίτερος και από καρδιάς ευχαριστώ τον κ. Αναστάσιο Γερμενή, καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την αμέριστη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε και για την υλικοτεχνική εργαστηριακή υποδομή του εργαστηρίου που μου προσέφερε ώστε να ολοκληρώσω επιτυχώς τη μελέτη μου. Επιπρόσθετα, του είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων και τον ευχαριστώ θερμά για τη διαρκή καθοδήγηση και υποστήριξή του σε όλο αυτό το διάστημα. Η παρουσία του και η διαρκής ενθάρρυνσή του μου επέτρεψε να οραματιστώ και κατέστησε δυνατή μία μετέπειτα πορεία μου στον επιστημονικό χώρο. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Ματθαίο Σπελέτα, Αναπληρωτή Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του οποίου η καθοδήγηση και η υποστήριξη υπήρξε καθοριστική τόσο για την επιλογή του συγκεκριμένου θέματος όσο και για την πορεία που έπρεπε να ακολουθήσω ώστε να ολοκληρώσω επιτυχώς την εργασία μου, και την κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το χρόνο που αφιέρωσε να μελετήσει και να αξιολογήσει τη διπλωματική μου εργασία. Τους ευχαριστώ όλους και γιατί μοιράστηκαν μαζί μου την αγωνία και τους προβληματισμούς που προέκυπταν σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ και την κ. Ευαγγελία Φαρμάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής και Παιδιατρικής Ανοσολογίας, για το υλικό των ασθενών που μου παρείχε.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Ευαγγελία Καραμούτη για την αμέριστη βοήθεια, τη στήριξη, την ενθάρρυνση καθώς επίσης και την τεχνογνωσία που μου προσέφερε στα πρώτα βήματά μου στον χώρο αυτό. Ευχαριστώ από καρδιάς τους/τις: Γεδεών Λουλέ, Ειρήνη Σεβδαλή, Γερασιμίνα Τσιντή, Αδάμ Μολυβδά, Γεώργιο Βαλιάκο, Μαρία Ζαμανάκου, Ζωή Φλώρου, Ζωή-Ειρήνη Χριστώνη και Ευαγγελία Γραμμουστιάνου για τις χρήσιμες συμβουλές τους, την καθοδήγηση και την άπογη συνεργασία που είχα μαζί τους. Ήταν διαθέσιμοι για μένα και ιδιαίτερος προσιτοί από τις πρώτες ημέρες παρουσίας μου στο εργαστήριο αυτό. Με τη βοήθεια και τη στήριξή τους, καθώς και με τις γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου κατάφερα να φέρω εις

πέρας τις εργασίες που μου ανατέθηκαν και να ξεπεράσω τα προβλήματα που τυχόν αντιμετώπισα στην ολοκλήρωσή τους. Ολοκληρώνοντας το μεταπτυχιακό πρόγραμμα και ελπίζοντας να συνεχίσω την πορεία μου σε αυτό το χώρο, έχω μάθει από αυτούς ότι έχει τεράστια σημασία να έχει κανείς πολύτιμους συνεργάτες και συνοδοιπόρους.

Ευχαριστώ, τέλος, τη Λουκία Ποταμιάνου για τη βοήθειά της στην ανάλυση κατά Sanger, τη γραμματέα και κρίσιμο μέλος του εργαστηρίου, κ. Γεθσημανή Καραϊσκού, για την αδιάλειπτη παρουσία της στο χώρο του εργαστηρίου καθώς, επίσης, και τη γραμματέα του μεταπτυχιακού Βασιλική Νούτσου, για την προθυμία της να με βοηθήσει σε διαδικαστικά και διοικητικά θέματα.

Τέλος, κρίσιμη και σημαντική ήταν η συμβολή και η συμπαράσταση της οικογένειάς μου, ιδιαιτέρως της μητέρας μου και της αδερφής μου, Κωνσταντίνας, που αποτέλεσαν στήριγμα για μένα συμβάλλοντας στην επιτυχή διεκπεραίωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Τις ευχαριστώ για όλα όσα μου έχουν προσφέρει σε κάθε φάση της ζωής μου.

Παρσοπούλου Φαίδρα

Λάρισα, 2015

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AP (Activator protein)	Πρωτεΐνη ενεργοποίησης
AIHA (Autoimmune Hemolytic Anemia)	Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία
BAFFR (B-cell activating factor receptor)	Υποδοχέας του BAFF
BCMA (B-Cell Maturation Antigen)	Αντιγόνο ωρίμανσης των Β-κυττάρων
BcR (B-cell receptor)	Υποδοχέας των Β-κυττάρων
cAMP (Cyclic adenosine monophosphate)	Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
CD (Clusters of Differentiation)	Αντιγόνα Διαφοροποίησης
CVID (Common variable immunodeficiency)	Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
GLILD (Granulomatous- Lymphocytic Interstitial Lung Disease)	Κοκκιοματώδης Λεμφοκυτταρική Διάμεση Πνευμονική Νόσος
GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	Αυξητικός Παράγοντας κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων
GWAS (Genome-Wide Association Studies)	Μελέτες συσχέτισης Γονιδιώματος
HIGM (Hyper-IgM)	Σύνδρομο Υπερπαραγωγής IgM
HLA (Human Leukocyte Antigen)	Ανθρώπινο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο
ICOS (Inducible T-cell co-stimulator)	Επαγόμενος συνδιεγέρτης των Τ-κυττάρων
sIgAD (selective IgA Deficiency)	Εκλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης Α
ICAM (Intercellular Adhesion Molecule)	Διακυτταρικό Μόριο προσκόλλησης
IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase)	Ινδολαμίνη 2,3-διοξυγενάση
IL (Interleukin)	Ιντερλευκίνη
INF (Interferon)	Ιντερφερόνη
ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)	Αλληλουχία ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέων βασιζόμενων στην τυροσίνη
ITP (Immune thrombocytopenic purpura)	Αυτοάνοση Θρομβοπενική Πορφύρα
LFA (Lymphocyte function-associated antigen)	Αντιγόνο που σχετίζεται με τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων
LNGFR (Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor)	Υποδοχέας χαμηλής συγγένειας του αυξητικού παράγοντα των νεύρων
MAPK (Mitogen-activated protein kinases)	Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνα
MHC (Major Histocompatibility Complex)	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MSH (MutS Homolog)	Ομόλογο του MutS
NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells)	Πυρηνικός παράγοντας ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων

NF-κB (Nuclear factor-kappa B)	Πυρηνικός παράγοντας-κΒ
NK (Natural Killer)	Φυσικό κυτταροκτόνο κύτταρο
PADs (Primary Antibody Deficiencies)	Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)	Κινάση 3 της Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
PIDs (Primary Immunodeficiencies)	Πρωτοπαθείς Ανοσοανεπάρκειες
PLCγ (Phospholipase C gamma)	Φωσφολιπάση γ
RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B)	Υποδοχέας του πυρηνικού παράγοντα κΒ
RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	Πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους
RT (Room Temperature)	Θερμοκρασία δωματίου
SHP (Src homology region 2 domain-containing phosphatase)	Φωσφατάση που περιέχει την περιοχή ομόλογη της Src
SNPs (Single nucleotide polymorphisms)	Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription)	Μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής
SOCS (Suppressor of cytokine signaling)	Καταστολέας της σηματοδότησης μέσω κυταροκινών
TACI (transmembrane activator & CAML interactor)	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το CAML
TCR (T-cell Receptor)	Αντιγονικός υποδοχέας T-λεμφοκυττάρου
TGF-β (Transforming growth factor beta)	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β
Th (T-helper cell)	Βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο
TNF (Tumor Necrosis Factor)	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων
TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)	Υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων
Treg (T-regulatory cell)	Ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο
TRIM (T-cell Receptor Interacting Molecule)	Μόριο που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου
VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)	Αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1
VLA-4 (Very Late Antigen-4)	Πολύ όψιμο αντιγόνο ενεργοποίησης-4
ZAP (Z-chain Associated Protein Kinase)	Πρωτεϊνική κινάση συσχετιζόμενη με τη ζ αλυσίδα
ΣΕΛ	Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι PADs αποτελούν μία ετερογενή ομάδα συγγενών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ελλειμματική ανοσιακή απάντηση λόγω ανικανότητας παραγωγής αντισωμάτων. Λόγω της πολυπλοκότητας των νοσημάτων αυτών, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εκδήλωσή τους παραμένουν ακόμη άγνωστοι. Σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική ανοσοαπόκριση διαδραματίζουν τα συνδιεγερτικά μόρια, τα οποία μεσολαβούν τόσο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων όσο και στην επικοινωνία μεταξύ Τ και Β-λεμφοκυττάρων. Γενετικές βλάβες στα μόρια αυτά έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν και μπορεί να θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση κάποιων από αυτά τα νοσήματα, όπως η CVID ή συγκεκριμένων κλινικών εκδηλώσεων.

Πολλά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, μεταξύ των οποίων η CVID και η IgAD, παρατηρήθηκε να συνδέονται με διάφορες αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Ο πολυμορφισμός c.-1T/C (rs1883832) στην ακολουθία Kozak του *TNFRSF5*, που κωδικοποιεί το γονίδιο CD40, έχει συσχετιστεί στο παρελθόν με αυτοάνοσα νοσήματα όπως η νόσος Grave's και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Παρομοίως, ο πολυμορφισμός c.+49 A/G (p.T17A, rs231775) στο γονίδιο *CTLA4* έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι θυρεοειδοπάθειες Grave's και Hashimoto, ο διαβήτης τύπου I, ο ΣΕΛ κ.ά.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελούσε η συσχέτιση των δύο αυτών πολυμορφισμών με την εκδήλωση αυτοάνοσων φαινομένων σε ασθενείς με CVID και IgAD. Για την εκπόνησή της, χρησιμοποιήθηκε υλικό από 82 ασθενείς (CVID: 41 / IgAD: 41), ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι μοριακές τεχνικές PCR-RFLP για τον SNP rs1883832 και Sequencing για τον SNP rs231775.

Στα αποτελέσματα που λάβαμε, οι συχνότητες εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στους ασθενείς που εκδήλωσαν αυτοανοσία ήταν παρόμοιες με αυτές του συνόλου των ασθενών και συνέπιπταν, επιπλέον, με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και για τους δύο πολυμορφισμούς. Τέλος, στη στατιστική ανάλυση δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης των SNPs με την εκδήλωση αυτοανοσίας. ($p > 0.05$).

ABSTRACT

PADs represent a heterogeneous spectrum of conditions which are characterized by a problematic immune response due to deficiency in the production of antibodies. As to the development of these diseases contribute multiple factors, the molecular mechanisms that are involved in their pathogenesis are not well understood. Various costimulatory molecules expressed as receptor/ligand pairs are involved in the fine tuning of the immune response, mediating stimulatory or inhibitory signals for the growth and differentiation of B-lymphocytes or the interaction between T and B-lymphocytes. The carriage of alterations in the genes coding these molecules is probably associated with the pathogenesis of some of these diseases, like CVID, or with their phenotype.

Numerous autoimmune manifestations constitute the phenotype of many PADs, including CVID and IgAD. SNP c.-1T/C in the Kozak sequence, in *TNFRSF5*, coding CD40 has been described as a risk factor associated with the development of autoimmune diseases like Grave's disease and RA. Moreover, SNP c.+49 A/G (p.T17A, rs231775) in *CTLA4* is associated with autoimmune disorders like RA, Grave's disease, Hashimoto thyroiditis, diabetes I etc.

The aim of this study was to assess the association of the above SNPs (rs1883832, rs231775) with the susceptibility to autoimmune manifestations of patients with CVID and IgAD. The study included 82 patients (CVID: 41 / IgAD: 41) and there were used the molecular techniques PCR-RFLP for rs1883832 and Sequencing for rs231775.

The Minor Allele Frequency (MAF) and the frequency of the genotypes of the analysed patients suffering from autoimmune disorders were similar to the frequencies resulted from the total patients and to the frequencies presented in the bibliography for both SNPs. According to the statistical analysis, there were no significant associations between both SNPs and autoimmune manifestations in patients with PADs. ($p > 0.05$).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ενεργοποιούνται και αποτελούν τη βάση της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, ενώ έχουν αναγνωρισθεί και μελετηθεί συγκεκριμένα μόρια που διαβιβάζουν είτε επαγωγικά είτε ανασταλτικά σήματα με την ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών.

Για την έναρξη της ειδικής ανοσιακής απάντησης, πολλαπλά σήματα είναι απαραίτητα. Το πρώτο σήμα δίνεται από την αναγνώριση του συμπλέγματος αντιγονικού πεπτιδίου/μορίου HLA (Ag/HLA), που βρίσκεται στην επιφάνεια ενός αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, από τον TCR. Το δεύτερο σήμα προέρχεται από τη δέσμευση συνδιεγερτικών μορίων, που εκφράζονται ως ζεύγη υποδοχέων-συνδετών και προάγουν την επικοινωνία μεταξύ αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και T-λεμφοκυττάρων ή/και T-λεμφοκυττάρων και B-λεμφοκυττάρων. Επιπρόσθετα σήματα, που διαβιβάζονται από εκκρινόμενες κυτταροκίνες, είναι απαραίτητα για την ενίσχυση ή τροποποίηση της απάντησης των ανοσοδραστικών κυττάρων.

Τα συνδιεγερτικά μόρια διακρίνονται σε δύο οικογένειες, ανάλογα με τις ομολογίες που παρουσιάζουν τα μέλη που τις αποτελούν. Την οικογένεια CD28/B7 που περιλαμβάνει το μόριο CTLA4 και την οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFR Superfamily), που περιλαμβάνει το μόριο CD40. Επιπλέον, ανάλογα με τη φύση του σήματος, τα συνδιεγερτικά μόρια διακρίνονται στις κατηγορίες των μορίων που μετάγουν επαγωγικά ή ανασταλτικά σήματα. Η ισορροπία που διατηρείται μεταξύ επαγωγικών και ανασταλτικών σημάτων είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ανοχής και την πρόληψη της ανάπτυξης αυτοανοσίας.

Οι αυτοάνοσες διαταραχές επηρεάζουν 5-7% του γενικού πληθυσμού. Εξαιτίας των μεγάλων επιδημιολογικών διαστάσεών τους και του φάσματος των κλινικών εκδηλώσεων, αποτελούν ένα μεγάλο κλινικό πρόβλημα. Η αιτιοπαθογένειά τους είναι περίπλοκη, αφού γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να ευθύνονται για την ανάπτυξή τους. Πολυάριθμες μελέτες γίνονται για να κατανοηθεί το πρότυπο κληρονόμησής τους, τα αποτελέσματα των οποίων υποδεικνύουν ότι εμπλέκονται διάφορα γονίδια. Δεδομένου ότι τα συνδιεγερτικά μόρια παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ποιότητας και της έντασης της ανοσιακής απάντησης, βλάβες στα γονίδια που τα κωδικοποιούν μπορεί να σχετίζονται με γενετική προδιάθεση για την εμφάνισή τους. Σημαντικές κλινικές εκδηλώσεις αποτελούν οι αυτοάνοσες διαταραχές και στους ασθενείς με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, όπου συχνά περισσότερες από μία διαταραχές εμφανίζονται στον ίδιο ασθενή.

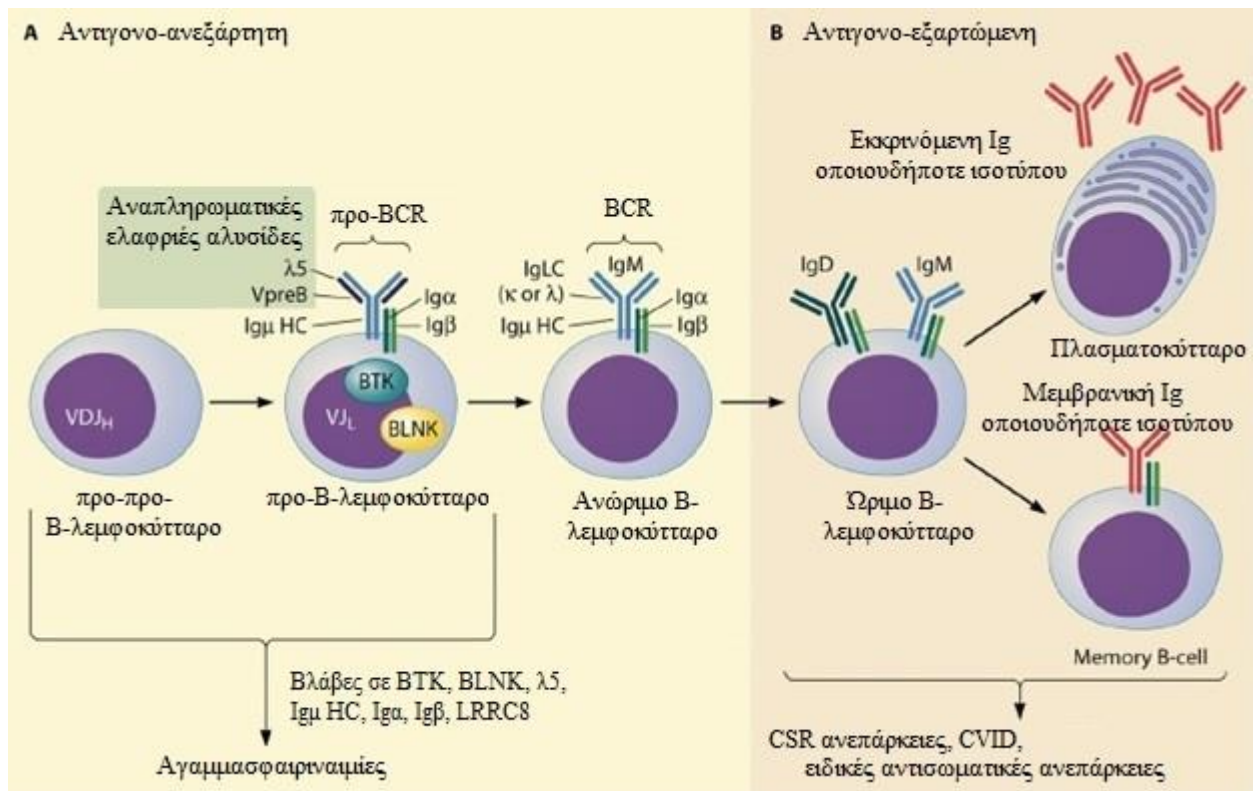
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Οι PADs αντιπροσωπεύουν τον πιο κοινό τύπο PIDs στον άνθρωπο ¹. Αποτελούν μία ετερογενή ομάδα συγγενών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ελλειμματική ανοσιακή απάντηση λόγω ανικανότητας παραγωγής αντισωμάτων έναντι διαφόρων παθογόνων. Οι διαταραχές αυτές αναγνωρίστηκαν περίπου πριν 50 χρόνια, μετά την ανάπτυξη ηλεκτροφορητικών τεχνικών που επέτρεπαν την ημιποσοτική ανάλυση ανοσοσφαιρινών στον ορό ^{2,3}. Η ελλειμματική παραγωγή αντισωμάτων προκύπτει, κατά κύριο λόγο, από διαταραχές στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων στα διάφορα στάδια αυτών. Ωστόσο, κάποιες καταστάσεις μπορεί, επίσης, να προκύψουν λόγω διαταραχών στα Τ-λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα την ανικανότητα του οργανισμού για ανοσιακή απάντηση εξαρτώμενη από αυτά ⁴.

Η ηλικία εμφάνισης των PADs ποικίλλει ενώ η συχνότητα εμφάνισής τους είναι ίδια στα δύο φύλα. Χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο φάσμα υποκείμενων βλαβών και οι εκδηλώσεις εκτείνονται από παντελή έλλειψη Β-λεμφοκυττάρων και ανοσοσφαιρινών στον ορό έως επιλεκτικά διαταραγμένες αντισωματικές απαντήσεις έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων με φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης ανοσοσφαιρινών ⁵. Παρότι έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση κάποιων από αυτές τις διαταραχές, η αιτιολογία παραμένει άγνωστη για τους περισσότερους ασθενείς. Ωστόσο, χαρακτηριστικό όλων αυτών των διαταραχών αποτελεί η αυξημένη ευαισθησία σε βακτηριακές, κυρίως, λοιμώξεις, που προσβάλλουν κυρίως το αναπνευστικό σύστημα. Η έγκαιρη διάγνωση σε συνδυασμό με αποτελεσματική θεραπεία μπορεί να μειώσει τη θνησιμότητα και να αυξήσει την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής των ασθενών ⁶.

Οι περισσότερες PADs έχουν συσχετιστεί με απλές μεταλλάξεις γονιδίων που προκαλούν ανωμαλίες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, ορισμένες μπορεί να οφείλονται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε γενετικά ευπαθή άτομα, ενώ άλλες αποδίδονται στη καθυστερημένη ανοσιακή ωρίμανση ³.



Εικόνα 1. Β-κυτταρική διαφοροποίηση και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντισωματικές ανεπάρκειες. Εξάλειψη ή μετάλλαξη στη μ H αλυσίδα, στη προσωρινή L αλυσίδα, ή στο σύμπλοκο Igα/Igβ οδηγούν σε αναστολή της Β-κυτταρικής ανάπτυξης και σοβαρή αγαμμασφαιραιμία. Όμοια, ανωμαλίες στα μονοπάτια της Β-κυτταρικής σηματοδότησης που μεσολαβούνται από την Btk και την πρωτεΐνη προσαρμογέα BLNK οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης στο προ-προ-B-κυτταρικό στάδιο, προτείνοντας ότι η συναρμολότητα ενός λειτουργικού προ-B-κυτταρικού υποδοχέα είναι κρίσιμη για τη μετάβαση από το προ-B-κύτταρο στο ώριμο Β-κύτταρο. Ωριμα Β-κύτταρα υφίστανται ισotypική μεταστροφή και σωματική υπερμετάλλαξη των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών τους προκειμένου να αυξήσουν τη συγγένεια του υποδοχέα και τη διαφοροποίηση σε μνημονικά Β-λεμφοκύτταρα ή πλασματοκύτταρα. Ανωμαλίες σε αυτές τις όγκιμες διαδικασίες της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης οδηγούν στις IgAD και CVID, αν και δεν γνωστή η ακριβής μοριακή βάση αυτών των PADs ⁴.

Παρόλο που η ανοσοανεπάρκεια και η αυτοανοσία αποτελούν δύο αντίθετες πλευρές στο φάσμα της κλινικής ανοσιακής απάντησης, στην πραγματικότητα, αυτές οι δύο συνθήκες συνδέονται συχνά. Χαρακτηριστικά, η πρώτη περίπτωση ασθενούς με PAD, που περιγράφηκε από τον Bruton, συνδέθηκε με αυτοάνοση αρθρίτιδα ⁷. Κατά τη διάρκεια των επόμενων ετών, πολλά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, μεταξύ των οποίων η IgAD και η CVID, παρατηρήθηκε να συνδέονται με διάφορες αυτοάνοσες εκδηλώσεις ⁵. Για αρκετές PADs πιθανό αίτιο της αυτοανοσίας θεωρείται ότι αποτελεί η ανικανότητα του ξενιστή να εκριζώσει μικροβιακά παθογόνα και τα αντιγόνα τους μέσω των συνηθισμένων ανοσολογικών μονοπατιών. Το

αποτέλεσμα είναι μία αντισταθμιστική, συχνά υπερβολική και χρόνια φλεγμονώδης απάντηση από λιγότερο αποτελεσματικά εναλλακτικά μονοπάτια, τα οποία προκαλούν βλάβη όχι μόνο στα μολυσμένα κύτταρα, αλλά και τον περιβάλλοντα ιστό. Έτσι, σε πολλούς ασθενείς, η αυτοανοσία δεν αποτελεί την καταστολή της ανοχής σε αυτοαντιγόνα, αλλά την καταστροφή του ιστού που προκύπτει όταν ο ξενιστής προσπαθεί να απαλλαγεί από ξένα ανοσογόνα ⁸.

1.1. Η ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ IgA ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (sIgAD)

Ως εκλεκτική IgA ανοσοανεπάρκεια ορίζεται η διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μείωση της συγκέντρωσης της IgA ανοσοσφαιρίνης σε επίπεδα χαμηλότερα του 0.07 g/L με ταυτόχρονη παρουσία φυσιολογικών επιπέδων IgG και IgM ανοσοσφαιρινών στον ορό ασθενούς με ηλικία μεγαλύτερη των 4 ετών, όταν έχουν αποκλειστεί άλλες αιτίες υπογαμμασφαιριναιμίας ⁹. Η συγκέντρωση αυτή αντιπροσωπεύει το κατώτερο ανιχνεύσιμο επίπεδο που έχει καθιερωθεί από τα περισσότερα εργαστήρια.

Η sIgAD περιγράφηκε από τους Graber και Williams το 1952. Πρόκειται για τη συνηθέστερη PAD, με συχνότητα που ποικίλλει ανάμεσα στις διάφορες εθνικές ομάδες από 1:142 έως 1:23.255, με τη μέση συχνότητα στο Δυτικό Κόσμο να είναι 1:600 και με την ίδια συχνότητα εμφάνισης στα δύο φύλα ⁵.

Η πρωτοπαθής IgAD είναι μόνιμη και τα επίπεδα κάτω του φυσιολογικού παρατηρείται ότι παραμένουν σταθερά ακόμη και μετά από 20 χρόνια παρακολούθησης. Πρόσφατη αναφορά καταγράφει μια σπάνια περίπτωση αναστροφής της νόσου. Όταν τα επίπεδα της IgA ανοσοσφαιρίνης στον ορό είναι υψηλότερα των 7 mg/dL, αλλά χαμηλότερα από τις δύο σταθερές αποκλίσεις του μέσου όρου των επιπέδων ανοσοσφαιρίνης που ορίζονται για την ηλικία του ασθενούς, η κατάσταση αναφέρεται ως μερική IgA ανοσοανεπάρκεια ^{10,11}, η οποία είναι αρκετά κοινή και τα επίπεδα της IgA ανοσοσφαιρίνης μπορεί να επανέλθουν σε φυσιολογικές τιμές με το χρόνο ¹². Αναστρέψιμη σε περισσότερους από το 50% των ασθενών είναι και η δευτεροπαθής IgAD, που προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (φάρμακα και λοιμώξεις).

1.1.1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Το 85-90% των ασθενών με IgAD είναι ασυμπτωματικοί και δεν εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων. Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, ιδιαίτερα του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος, εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς στους οποίους συνυπάρχει ανεπάρκεια των IgG υποτάξεων ή ελαττώματα σε ειδικές χυμικές απαντήσεις σε πολυσακχαριτικά αντιγόνα ¹³. Συχνά, αυτοί οι ασθενείς κατατάσσονται ορθότερα στους ασθενείς με CVID.

Στις πιο σημαντικές κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών με IgAD ανήκουν τα αυτοάνοσα φαινόμενα, με επίπτωση που κυμαίνεται από 7 έως 36%⁹ και η οποία φαίνεται να εξαρτάται από τα κριτήρια της IgAD. Αυτοαντισώματα έναντι, μεταξύ άλλων, του σουλφατιδίου, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης, του κολλαγόνου, των πυρηνικών πρωτεϊνών, των ερυθροκυττάρων και της θυρεοσφαιρίνης έχουν ανιχνευθεί σε αρκετούς ασθενείς με IgAD, ακόμη και απουσία εμφανών κλινικών εκδηλώσεων αυτοανοσίας^{14,15}. Τόσο συστηματικά όσο και οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με IgAD: αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός, νόσος Grave's, κοιλιοκάκη, πορφύρα Henoch-Schoenlein, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, χρόνια ενεργή ηπατίτιδα, αιμολυτική αναιμία και θρομβοκυτταροπενία, μεταξύ άλλων. Από τις αιματολογικές αυτοάνοσες διαταραχές, οι πιο κοινές είναι η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα και η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία¹⁴. Ισχυρή σύνδεση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ IgAD και κοιλιοκάκης, όπου η επίπτωση της IgAD σε ασθενείς με κοιλιοκάκη είναι της τάξεως του 2,6%, που είναι κατά 10 με 16 φορές μεγαλύτερη από τη συχνότητα της νόσου στο γενικό πληθυσμό. Η ανεπάρκεια του ανοσιακού συστήματος που παρουσιάζεται στην IgAD φαίνεται να δημιουργεί, επιπλέον, μία προδιάθεση για την ανάπτυξη ρευματικών νοσημάτων, συνηθέστερα συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου (ΣΕΛ) (1-5% των ασθενών) και νεανικής ιδιοπαθούς και ρευματοειδούς αρθρίτιδας (2-4% των ασθενών)¹⁶.

1.1.2. Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ IgAD

Η IgAD αποτελεί ένα νόσημα στην εμφάνιση του οποίου φαίνεται να συμβάλλει μία ετερογενής ομάδα γενετικών ανωμαλιών. Δεν εντοπίζεται καθορισμένη γενετική βλάβη, αλλά αποτελέσματα εντατικών μελετών υποδεικνύουν συγκεκριμένους γενετικούς τύπους που σχετίζονται με την εμφάνιση υποτύπων της. Στο 20% των περιπτώσεων υπάρχει κληρονομική μεταβίβαση της νόσου χωρίς διακριτό πρότυπο Μεντελικής κληρονομικότητας, καθώς έχουν παρατηρηθεί σωματικά υπολειπόμενα, σωματικά επικρατή και σποραδικά πρότυπα μεταβίβασης. Ωστόσο, με την ανάπτυξη της διαταραχής έχουν αναφερθεί ότι συνδέονται συγκεκριμένοι απλότυποι των MHC τάξης I, II και III μορίων^{17,18}, καθώς και γονίδια που δεν σχετίζονται με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι η IgAD δεν συνδέεται με έναν συγκεκριμένο απλότυπο, αλλά ο σχετικός κίνδυνος για την ανάπτυξη της αποδίδεται στον MHC απλότυπο HLA-A1, B8, DR3, DQ2 (8.1 απλότυπος)¹⁹, ο οποίος είναι κοινός και έχει συσχετιστεί με μία ποικιλία αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η νόσος Grave's, ο ΣΕΛ, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, η κοιλιοκάκη και πιθανόν η μυασθένεια Gravis και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Περισσότερο από το 45% των ασθενών με IgAD φέρουν τουλάχιστον ένα αντίγραφο του 8.1 απλοτύπου, ποσοστό σχεδόν τριπλάσιο σε σύγκριση με το 16% που εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό, ενώ η ομοζυγωτία ως προς αυτόν αναφέρεται ως

παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Επιπλέον απλότυποι, συμπεριλαμβανομένων των HLA-DR7, DQ2 και DR1, DQ5 συνδέονται με την IgAD. Αντιθέτως, ο DR15, DQ6 απλότυπος φαίνεται να προσδίδει σχεδόν πλήρη προστασία έναντι της IgAD. Στην περιοχή του MHC τάξης III, αλληλόμορφα του γονιδίου *MSH5* έχουν συσχετιστεί με την IgAD και τη CVID, χωρίς ωστόσο να σημαίνει ότι το γονίδιο αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την IgAD. Ωστόσο, ο HLA γονότυπος δεν καθορίζει πλήρως την ανάπτυξη της αυτοανοσίας, καθώς τα μονοζυγωτικά δίδυμα είναι πολύ πιο πιθανό να αναπτύξουν την ίδια αυτοάνοση νόσο από τα μη δίδυμα αδέλφια που εμφανίζουν πανομοιότυπο MHC-απλότυπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι γενετικοί παράγοντες ανεξάρτητοι από το MHC επηρεάζουν, επίσης, την ευαισθησία στη νόσο. Πολυμορφισμοί σε γονίδια όπως τα *IFIH1* και *CLEC16A*, έχουν πρόσφατα συνδεθεί με την IgAD σε μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος. Αλληλόμορφα των γονιδίων αυτών έχουν συσχετιστεί με διάφορες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 και ο ΣΕΛ. Πρόσφατες μεταanalύσεις έχουν εντάξει επιπλέον γενετικούς τόπους στην παθογένεια της IgAD, όπως οι *TNFAIP3*, *PVT1*, *FAS*, *CDH23* και *TM7SF3*, και ενός ακόμη μορίου που μεσολαβεί στην ισοτυπική μεταστροφή των B-λεμφοκυττάρων, του TACI¹³.

1.1.3. Η ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ IgAD

Διάφορες υποθέσεις έχουν γίνει στην προσπάθεια να εξηγηθεί η σύνδεση μεταξύ IgAD και αυτοάνοσων φαινομένων. Η απουσία της IgA ανοσοσφαιρίνης από τις επιφάνειες του βλεννογόνου φαίνεται να διευκολύνει την απορρόφηση πολλών αντιγόνων που, ενδεχομένως, θα μπορούσαν να αντιδράσουν διασταυρούμενα με αυτοαντιγόνα. Εναλλακτικά, η αδυναμία απομάκρυνσης του αντιγόνου, με αποτέλεσμα την απόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων σε πολλά όργανα έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη φλεγμονή. Επιπλέον, η παραγωγή της IgA ανοσοσφαιρίνης είναι αυστηρά εξαρτώμενη από τα T-λεμφοκύτταρα. Κατά συνέπεια, ανωμαλίες στη ρύθμιση των T-λεμφοκυττάρων, θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες τόσο για τη νόσο όσο και για την αυτοανοσία. Η ανοσοανεπάρκεια των T-λεμφοκυττάρων και η IgAD μπορεί να οδηγήσουν σε ελαττωματική άμυνα του ξενιστή κατά των ιογενών λοιμώξεων και ανώμαλη παρουσίαση των ιικών αντιγόνων που αντιδρούν διασταυρούμενα με φυσιολογικούς ιστούς⁸.

Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ένα νέο μηχανισμό που ευθύνεται, πιθανόν, για την εμφάνιση αυτοανοσίας στους ασθενείς με IgAD, ο οποίος βασίζεται σε έναν από τους 5 υποδοχείς της IgA ανοσοσφαιρίνης, τον FcαRI, που εκφράζεται σε όλους τους τύπους μυελοειδών κυττάρων, αλλά όχι σε κύτταρα του βλεννογόνου (συμπεριλαμβανομένων των εντερικών μακροφάγων). Σε φυσιολογικά άτομα, η IgA του ορού εμφανίζει μία σχετικά ισχυρή συγγένεια για τον FcαRI, σε σχέση με τον FcγR. Αυτή η μονοσθενής αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα τη μερική φωσφορυλίωση του FcαRI που είναι συνδεδεμένος με τον FcRγ, ιδίως

στο ITAM που αυτός φέρει, επάγοντας τη στρατολόγηση της SHP-1 φωσφατάσης της τυροσίνης. Αυτό οδηγεί σε καταστολή πολλών οδών ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοϋποδοχέων που φέρουν ITAM και των ITAM-ανεξάρτητων υποδοχέων, αποτρέποντας έτσι τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και την ανάπτυξη αυτοανοσίας. Ωστόσο, η ιδιοσυστατική έκφραση του FcαRI και η έλλειψη της IgA του ορού σε ασθενείς με επιλεκτική IgAD, καταστέλλει τον FcαRI-ανασταλτικό μηχανισμό εκθέτοντας τους ασθενείς αυτούς σε αυτοάνοσες καταστάσεις ²⁰.

1.2. Η ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (CVID)

Η CVID είναι η δεύτερη πιο συχνή πρωτοπαθής αντισωματική ανεπάρκεια. Κλινικά, η σοβαρότητά της είναι μέγιστη, αφού προσβάλλει χιλιάδες άτομα στην Ευρώπη και στην Αμερική ²¹. Αποτελεί μια ετερογενή ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζεται από υπογαμμασφαιριναιμία, αδυναμία παραγωγής ειδικών αντισωμάτων, υποτροπιάζουσες ή και χρόνιες λοιμώξεις και αυξημένη επίπτωση λεμφοϋπερπλαστικών και κοκκιωματωδών βλαβών, αυτοάνοσων φαινομένων και κακοήθων νοσημάτων ²¹. Παρουσιάζει έναν εξαιρετικά μεταβλητό, κλινικά και ανοσολογικά, φαινότυπο που απαντάται με την ίδια συχνότητα στα δύο φύλα ²², με επιπολασμό που κυμαίνεται από 1:10.000 έως 1:200.000.

Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Μέχρι πρότινος, εθεωρείτο ότι η εμφάνισή της ήταν συχνότερη στις ηλικίες των 1–5 και των 16–20 ετών. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε, σε μεγάλη σειρά ασθενών, ότι το πρότυπο εμφάνισης της CVID είναι συνεχές, με επικρατέστερη ηλικία εκδήλωσης των συμπτωμάτων την τρίτη δεκαετία της ζωής (μέση ηλικία 26,3 και διάμεση 24 έτη). Η διάγνωση της CVID βασίζεται στον αποκλεισμό άλλων νόσων που σχετίζονται με υπογαμμασφαιριναιμία. Ένα σημαντικό ποσοστό, ωστόσο, των ασθενών δε διαγιγνώσκεται, ενώ υπάρχει μία έλλειψη αντιστοιχίας μεταξύ των κλινικών συμπτωμάτων και των συνολικών επιπέδων ανοσοσφαιρίνης ²³.

1.2.1. Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ CVID

Η παθογένεια της CVID δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Μελέτες των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος σε ασθενείς με CVID αποκάλυψαν ποικίλες δυσλειτουργίες των λεμφοκυττάρων. Οι περισσότεροι ασθενείς φαίνεται να έχουν φυσιολογικό αριθμό Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία, όμως, αποτυγχάνουν να ωριμάσουν σε πλασματοκύτταρα και έτσι παραμένουν ανίκανα να παράγουν τους διαφορετικούς τύπους ανοσοσφαιρινών ^{21,24}. Σε άλλους ασθενείς δεν εντοπίζονται βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική αντισωματική απάντηση. Σχεδόν στο 60% των ασθενών με CVID παρουσιάζεται μειωμένη απάντηση και πολλαπλασιασμός μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα του Τ-λεμφοκυττάρου και μειωμένη έκφραση IL-4, IL-5 και INFγ. Οι ασθενείς έχουν σχετική CD4+ λεμφοπενία,

μειωμένο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και μειωμένη παραγωγή ή έκφραση IL-2. Έχει, επίσης, αναφερθεί θετική ρύθμιση του TNF-α, ιδιαίτερα στις κατηγορίες των ασθενών με κοκκιώματα, καθώς και ένας υπέρμετρος αριθμός κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Τα επίπεδα της INFγ είναι μειωμένα, σε αντίθεση με αυτά του TNF-α που είναι αυξημένα. Τυπικά, οι παραπάνω συνθήκες όταν συνυπάρχουν, χαρακτηρίζουν ένα πρότυπο φλεγμονής τύπου Th1, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει πιθανότητα να αναπτύσσονται κι άλλες φλεγμονώδεις και T-κυτταρικές απαντήσεις. Τελικά, η CVID έχει, πιθανότατα, μία ποικιλία αιτιών και δε φαίνεται να προκύπτει από μία μοναδική γενετική ανωμαλία ²¹.

1.2.2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας των ασθενών με CVID είναι οι βαριές, ασυνήθεις, υποτροπιάζουσες και χρονίζουσες λοιμώξεις. Οι ασθενείς έχουν αυξημένη ευαισθησία σε μικροβιακές, κυρίως, λοιμώξεις από ασυνήθη παθογόνα που απαιτούν συχνή ή παρατεταμένη χρήση αντιβιοτικών, ενώ μπορεί να προκαλέσουν και βλάβες ή δυσλειτουργία των προσβαλλόμενων οργάνων. Συχνότερες είναι οι λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού από πυογόνα μικρόβια, συνηθέστερα από *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* και *Staphylococcus aureus* ²¹. Οι μισοί από τους πάσχοντες από CVID έχουν ιστορικό ενός τουλάχιστον επεισοδίου πνευμονίας, ενώ οι υπόλοιποι παρουσιάζουν υποτροπιάζουσα βρογχίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα ή και μέση πυώδη ωτίτιδα, οι οποίες οδηγούν συχνά στην εμφάνιση επιπλοκών, όπως οι βρογχεκτασίες, η χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια, το εμπύημα του θώρακα και η μαστοειδίτιδα. Οι βρογχεκτασίες αποτελούν και τη συχνότερη αιτία θανάτου και χρόνιων προβλημάτων υγείας σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες ²⁵. Οι λοιμώξεις μπορεί να αφορούν, επίσης, τη γαστρεντερική οδό, το δέρμα, τα μάτια, το σκελετό και το κεντρικό νευρικό σύστημα ²⁶. Οι ευκαιριακές λοιμώξεις από ιούς, πρωτόζωα και μύκητες είναι σπάνιες. Εξαιρεση αποτελούν οι μυκοπλασματικές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και των αρθρώσεων που, συχνά, προκαλούν σημαντική καταστροφή των ιστών, καθώς και τα εντερογενή νοσήματα, όπως η λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος από εντεροϊό ²⁷. Μέχρι στιγμής δεν έχει καταστεί σαφές αν οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται σε ανεπάρκεια της T-κυτταρικής σειράς. Ωστόσο, από την ανάλυση των δεδομένων δύο μεγάλων σειρών ^{27,28} παρατηρήθηκε ότι ποσοστά 5,2% και 8,9%, αντίστοιχα, ασθενών με CVID, στους οποίους η νόσος εκδηλώθηκε κατά την ενήλικη ζωή, παρουσίαζαν ευκαιριακές λοιμώξεις ανάλογες εκείνων που παρατηρούνται στις ανοσοανεπάρκειες της T-κυτταρικής σειράς (λοιμώξεις από ασπέργιλλο, πνευμονοκύστη, κυτταρομεγαλοϊό, κρυπτοσπορίδια κ.λπ.).

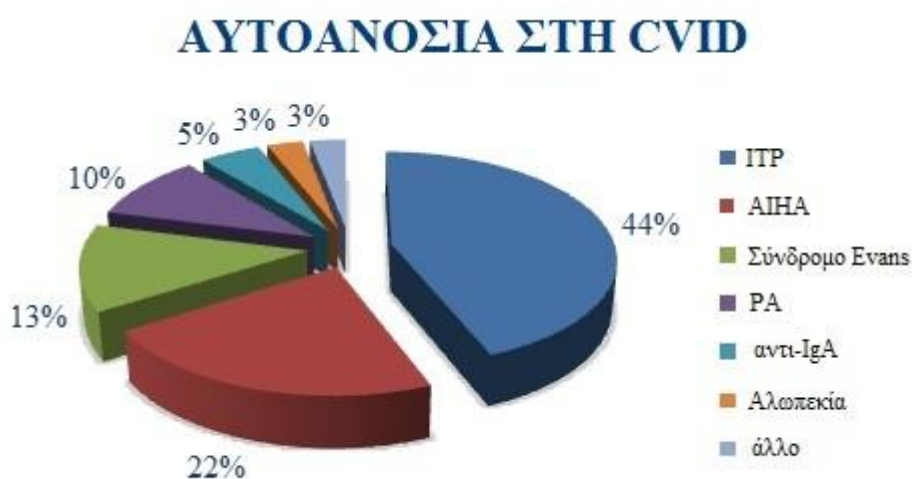
Οι λοιμώξεις αποτελούν τη μοναδική κλινική εκδήλωση της CVID στο 30% περίπου των περιπτώσεων. Στους υπόλοιπους ασθενείς, την κλινική πορεία της νόσου, εκτός από τις

λοιμώξεις, χαρακτηρίζει η εμφάνιση μιας ποικιλίας φλεγμονωδών ή και αυτοάνοσων διαταραχών²⁷. Η συχνότερη από τις φλεγμονώδεις διαταραχές που συνοδεύουν τη COVID είναι η προϊούσα πνευμονική νόσος, που παρατηρείται στο 1/3 περίπου των περιπτώσεων και μπορεί να είναι αποτέλεσμα των υποτροπιάζουσών λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Στο 10% περίπου των ασθενών ανευρίσκονται, ανεξάρτητες από τις λοιμώξεις, λεμφοκυτταρικές ή και κοκκιωματώδεις πνευμονικές βλάβες που εκδηλώνονται ως λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία, λεμφοζιδιακή βρογχιολίτιδα ή λεμφοϋπερπλασία. Οι βλάβες αυτές φέρονται υπό τον όρο GLILD και φαίνεται ότι επιταχύνουν την εμφάνιση της αναπνευστικής ανεπάρκειας^{29,30}.

Οι διάχυτες πολυκλωνικές λεμφοϋπερπλαστικές βλάβες αποτελούν γενικότερο χαρακτηριστικό της COVID. Η λεμφαδενοπάθεια είναι σύνηθες εύρημα και κατά κανόνα αφορά στους αυχενικούς ή και στους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου και της κοιλιάς. Σπληνομεγαλία απαντάται στο 30% των περιπτώσεων και σε ορισμένους ασθενείς αποτελεί σταθερό εύρημα καθ' όλη την πορεία της νόσου. Η σπληνομεγαλία ή και ο υπερσπληνισμός, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη παρουσία αυτοάνοσης θρομβοπενίας ή και αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας, οδηγούν σημαντικό ποσοστό ασθενών σε σπληνεκτομή, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη θνητότητα³¹. Σε ποσοστό 8–20% των περιπτώσεων, στους λεμφικούς ιστούς αναπτύσσονται, επίσης, μη τυροειδοποιούμενα κοκκιώματα, ανάλογα εκείνων που χαρακτηρίζουν τη σαρκοείδωση³². Εκτός από τους πνεύμονες, η κοκκιωματώδης νόσος μπορεί να εντοπίζεται στους λεμφαδένες, στο σπλήνα, στο ήπαρ και στο δέρμα, αλλά και σε οποιονδήποτε άλλον ιστό, ακόμη και στο χοριοειδή χιτώνα των οφθαλμών³³. Για ανεξήγητους λόγους, η συχνότητα των αυτοάνοσων διαταραχών είναι πολύ μεγαλύτερη στους ασθενείς με COVID και κοκκιωματώδη νόσο⁵. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, το γεγονός ότι ασθενείς με COVID που είναι επιρρεπείς σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις λόγω αδυναμίας παραγωγής αντισωμάτων, είναι επιρρεπείς, επιπλέον, και σε αυτοάνοσες διαταραχές.

Πολλαπλά αντισώματα έναντι αυτοαντιγόνων έχουν αναφερθεί στη COVID, αλλά σε σύγκριση με άλλες ανοσοανεπάρκειες (π.χ. sIgAD), η εμφάνισή τους είναι λιγότερο συχνή³⁴. Η αυτοανοσία συναντάται σε ένα ποσοστό περίπου 22% των ασθενών με COVID (με μία ελαφριά επικράτηση στις γυναίκες)²⁷. Είναι ενδιαφέρον ότι οι αυτοάνοσες αιματολογικές εκδηλώσεις φαίνεται να προηγούνται της διάγνωσης της COVID σε ποσοστό 14–54%, ενώ στο 2% περίπου των ασθενών αποτελούν το μοναδικό σύμπτωμα κατά την εμφάνιση της νόσου. Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες, κυρίως η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και η αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα, που εμφανίζονται σε ένα 60% των περιπτώσεων, αποτελούν τις πιο κοινές μορφές αυτοανοσίας στη COVID¹⁴, με εξαίρεση τα παιδιά. Στις αιματολογικές αυτοάνοσες διαταραχές ανήκουν, επίσης, η αυτοάνοση ουδετεροπενία, η λεμφοπενία και η κακοήθης αναιμία^{14,35}. Αρκετά άλλα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία σε ασθενείς με COVID.

Σε αυτά συγκαταλέγονται διάφορες μορφές αρθρίτιδας, ο ΣΕΛ, η αγγειίτιδα, αυτοάνοσες νευρολογικές διαταραχές (σύνδρομο Guillain-Barré)³⁶, χρόνια ενεργός ηπατίτιδα (που συχνά σχετίζεται με τον ιό της ηπατίτιδας C) και αυτοάνοσες ενδοκρινοπάθειες (π.χ. του θυρεοειδούς)³². Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων διαταραχών στη CVID υποδηλώνει ότι πιο πολύπλοκες ανωμαλίες, πέραν της ποσοτικά και ποιοτικά ανώμαλης παραγωγής αντισωμάτων³⁷, πιθανώς διέπουν τη μεγάλη ποικιλομορφία των κλινικών εκδηλώσεων της ανοσοανεπάρκειας. Ταυτόχρονα, προτείνουν ένα σημαντικό ρόλο της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης στην παθογένεση της αυτοανοσίας σε ασθενείς με CVID.



Εικόνα 2. Αυτοανοσία στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια. Από 473 ασθενείς, 134 (28,6%) εμφάνισαν αυτοανοσία. Τα κύρια αυτοάνοσα νοσήματα παρουσιάζονται στο γράφημα. Στην κατηγορία «άλλο» περιλαμβάνονται η ουδετεροπενία, η κακοήθης αναιμία, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, η εμφάνιση αντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ιριδοκυκλίτιδα, η πολλαπλή σκλήρυνση, ο ΣΕΛ, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η αγγειίτιδα, η λεύκη και η ψωρίαση³⁸.

Τέλος, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών εμφανίζει κακοήθη νοσήματα και συμπτώματα από το πεπτικό σύστημα, όπως χρόνια διάρροια που μπορεί να προκληθεί από διάφορους λοιμώδεις παράγοντες, όπως οι *Giardia lamblia* ή *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*⁵. Σε αυτό το πλαίσιο, αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν, επίσης, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα σε ένα ποσοστό 19-32%. Στη βιοψία εντέρου, οι ασθενείς με CVID εμφανίζουν συνήθως μη ειδική ατροφία των εντερικών θηλών, καθώς και οζώδη λεμφική υπερπλασία, με υπεροχή των Β-λεμφοκυττάρων και ελαττωμένα πλασματοκύτταρα, η οποία μπορεί να συνοδεύεται από δυσασπορρόφηση^{39,40}.

1.2.2.1. Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΣΤΗ CVID

Ο προσδιορισμός της γενετικής βάσης της νόσου έχει καταστεί δύσκολος εξαιτίας της ετερογένειάς της. Αν και η CVID είναι συνήθως σποραδική, οικογενειακή συρροή με σωματικό επικρατητικό πρότυπο μεταβίβασης εμφανίζεται στο 20% των ασθενών ⁴¹. Επιπλέον, η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της sIgAD σε συγγενείς ασθενών με CVID, υποδηλώνει τη γενετική σύνδεση μεταξύ των δύο νοσημάτων ²⁷, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις εξέλιξης της sIgAD σε CVID ⁴². Υπάρχουν ακόμη στοιχεία ότι μέλη των οικογενειών ατόμων με CVID έχουν αυξημένη επίπτωση εμφάνισης αυτοανοσίας. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, αρκετές γενετικές βλάβες έχουν αναγνωρισθεί σε ασθενείς με CVID.

Μελέτες γενετικής συσχέτισης και ανάλυση απλοτύπων έχουν δείξει σύνδεση της CVID με ορισμένα HLA αλληλόμορφα (π.χ. HLA-A1-B8-DR3 απλότυπος), μερικά από τα οποία μάλιστα έχουν συσχετιστεί και με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Πιο πρόσφατα, η CVID έχει συνδεθεί με γενετικές βλάβες σε γονίδια που εμπλέκονται στην τελική Β-κυτταρική διαφοροποίηση, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταστροφής τάξης και της παραγωγής μνημονικών Β-λεμφοκυττάρων, όπως τα μόρια ICOS ⁴³, BAFFR ⁴⁴, TACI ^{45,46}, CD19 ⁴⁴ και MSH5 ⁴⁷.

Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ICOS, μόριο που εντάσσεται στην οικογένεια των συνδεδεμένων μορίων του CD28 και CTLA-4, φαίνεται να προκαλούν αντισωματική ανεπάρκεια στους πάσχοντες, ενώ ασθενείς με CVID που αποδόθηκε σε ανωμαλία στην έκφραση του ICOS εμφανίζουν Β-λεμφοπενία και σημαντικά μειωμένα επίπεδα μνημονικών CD19+/CD27+ Β-λεμφοκυττάρων. Αυτό το εργαστηριακό εύρημα, ωστόσο, δεν είναι χαρακτηριστικό για τις μεταλλάξεις στο ICOS αφού πάνω από το 75% των ασθενών με CVID έχουν μειωμένο αριθμό μνημονικών Β-λεμφοκυττάρων στα οποία έχει προηγηθεί ιστοτυπική μεταστροφή CD19+/CD27+/IgM-. Η ανεπάρκεια του ICOS, ωστόσο ήταν το πρώτο παράδειγμα σωματικής επικρατητικής διαταραχής που παρατηρείται σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών με CVID (περίπου 2%).

Ένα από τα συνδεδεμένα σήματα που είναι απαραίτητα για την ιστοτυπική μεταστροφή στα Β-λεμφοκύτταρα και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών δίνεται από τις αλληλεπιδράσεις υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια των TNFRs, όπως οι BAFF-R και TACI, με τους αντίστοιχους συνδέτες. Μεταλλάξεις, ομόζυγες ή ετερόζυγες, στο γονίδιο *TNFRSF13b* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα TACI, επηρεάζουν το μόριο του TACI τόσο στην εξωκυττάρια όσο και στην κυτταροπλασματική περιοχή και φαίνεται να συσχετίζονται με την εμφάνιση PADs. Αυτό υποδηλώνει ότι η εμφάνιση βλάβης στον υποδοχέα TACI μπορεί να παίζει ρόλο σε σωματικά επικρατή ή υπολειπόμενα χαρακτηριστικά τόσο στην οικογενειακή όσο και στη σποραδική εμφάνιση της CVID. Ωστόσο, η εμφάνιση των συμπτωμάτων στη CVID φαίνεται να

επιηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, γενετικούς και περιβαλλοντικούς, αφού το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στο *TNFRSF13b* αντιστοιχεί σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό το γεγονός ότι η βλάβη στο *TNFRSF13b* μπορεί να αντιπροσωπεύει μία κοινή γενετική βλάβη για τη CVID και την IgAD, το οποίο προκύπτει από κλινικές παρατηρήσεις σε οικογένειες CVID/IgAD. Η εμφάνιση μεταλλάξεων στο *TNFRSF13b* εκτιμάται στο 5-10% των ασθενών με CVID ⁴⁵.

Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι η πρόωμη έναρξη κλινικών συμπτωμάτων και αυτοανοσίας στη CVID σχετίζεται με κάποια αλληλόμορφα του γονιδίου της συνδεόμενης με τη μαννόζη λεκτίνης, υποδηλώνοντας κάποιο πιθανό ρόλο της φυσικής ανοσίας στην παθογένεση της νόσου.

1.2.2.2. ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ CVID

Η αδυναμία του ανοσιακού συστήματος των ασθενών με CVID να εξαλείψει αποτελεσματικά εξωγενή αντιγόνα και υπεραντιγόνα έχει ως αποτέλεσμα μία χρόνια φλεγμονώδη απάντηση, που μπορεί να οδηγήσει σε ιστική βλάβη, λόγω απόθεσης ανοσοσυμπλεγμάτων, σχηματισμό αντισωμάτων έναντι ιστών και διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ υγιών ιστών και ξένων αντιγόνων. Ένας αριθμός ανοσιακών βλαβών έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στο φαινότυπο της CVID· η κύρια φαινοτυπική βλάβη αντανακλάται σε μια αποτυχία διαφοροποίησης των πρώιμων και όψιμων Β-κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκκριση ανοσοσφαιρινών οποιουδήποτε ισότυπου (εξού και ο όρος δυσγαμμασφαιριναιμία). Τα Β-λεμφοκύτταρα των ασθενών με CVID χαρακτηρίζονται από ελαττωματική ανοδική ρύθμιση δεικτών ενεργοποίησης και βλάβες στις σωματικές υπερμεταλλάξεις, οδηγώντας κατ' επέκταση στην παραγωγή αντισωμάτων με μειωμένη ή μηδαμινή συγγένεια για το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους ⁴⁸. Το ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό άωρων Β-κυττάρων στους ασθενείς αυτούς έχει προταθεί ως μια πιθανή αιτιολογία για την αυτοανοσία, ενισχύοντας την άποψη ότι τα άωρα Β-λεμφοκύτταρα μπορούν να παράγουν αυτοαντισώματα, ενώ βρίσκονται στο μυελό των οστών ⁴⁹. Όσον αφορά τον αριθμό των κυκλοφορούντων Β-κυττάρων, αυτός είναι συνήθως φυσιολογικός στη CVID, σε αντίθεση με τους πληθυσμούς των IgM+ CD27+ μνημονικών κυττάρων, των μεταστροφής τάξης IgD- IgM- CD27+ μνημονικών Β-κυττάρων και των πλασματοκυττάρων που είναι σημαντικά μειωμένοι ⁵⁰, ενώ αυξημένα είναι τα ποσοστά των αδιαφοροποίητων Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών, υποδηλώνοντας σοβαρά ελαττώματα στην ωρίμανσή τους ⁵¹.

Η Τ-κυτταρική λειτουργία φαίνεται να είναι αρκετά μεταβλητή στη CVID. Μείωση του απόλυτου αριθμού των Τ-λεμφοκυττάρων έχει παρατηρηθεί στο 1/3 των ασθενών αυτών, με μία ανεστραμμένη αναλογία CD4+/CD8+ κυττάρων ⁵², είτε λόγω μείωσης των CD4+ CD45RA+

παρθένων λεμφοκυττάρων είτε λόγω αύξησης των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης όπως τον HLA-DR. Η αύξηση των CD8⁺ κυττάρων συνοδεύεται από αύξηση των CD8⁺ CD28⁻ κυττάρων, που σχετίζονται με μία ταχεία μείωση των αναδιατάξεων του TCR, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του ρεπερτορίου του, υποδηλώνοντας μία ανωμαλία στο διαμέρισμα των παρθένων T-λεμφοκυττάρων⁵³. Η T-λεμφοπενία αποδίδεται σε βλάβες στη θυμοποίηση, στην παραγωγή της IL-2, στην ομοίωση που εξαρτάται από την IL-7 και σε αυξημένη απόπτωση, όπως υποδηλώνεται και από τα επίπεδα των FAS και FASL. Μία μείωση, επίσης, των CD4⁺CD25^{high} Treg, ενός κύριου ανοσορρυθμιστικού πληθυσμού έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αυτοανοσίας σε ασθενείς με CVID⁵⁴.

Τέλος, ανωμαλίες στη φυσική ανοσία φαίνεται να περιπλέκουν ακόμη περισσότερο το φαινότυπο της CVID, καθώς μειώνουν την ικανότητα του οργανισμού να εξαλείψει εξωγενή αντιγόνα. Η αδυναμία των δενδριτικών κυττάρων να διαφοροποιηθούν, να ωριμάσουν και να εκφράσουν συνδιεγερτικά μόρια (όπως τα CD80, CD86, HLA-DR), οι μειωμένοι αριθμοί NK κυττάρων καθώς και βλάβες στην εξαρτώμενη από NK-κύτταρα κυτταροτοξικότητα έχουν επίσης αναφερθεί στη CVID⁵⁵.

2. ΤΟ ΣΥΝΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CD40 ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CD40-CD154

Το μόριο CD40 ανακαλύφθηκε το 1985⁵⁶ σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης και στη συνέχεια σε Β-λεμφοκύτταρα με τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος που αναγνώριζε μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa⁵⁷. Έκτοτε, η μοριακή παθοφυσιολογία του συστήματος CD40/CD40L απασχολεί την επιστημονική κοινότητα. Οι πρώτες μελέτες κατέδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του μορίου ποικίλλουν ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων στην πορεία τους μέσα στον κυτταρικό κύκλο καθώς και με την επιβίωση και διαφοροποίησή τους μετά την πρόσδεση ενός, άγνωστου ακόμα, συνδέτη⁵⁸. Κατοπινές μελέτες έδειξαν ότι αυτή η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων απαιτούσε την άμεση επαφή με Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και την «εκ του μηδενός» πρωτεϊνική σύνθεση, ενώ ακολουθούσε την ενεργοποίηση με αντι-CD3 αντισώματα, εστέρες του φορβολικού οξέος (PMA) ή κονκαναβαλίνη Α⁵⁹. Τελικά, αυτή η εξαρτώμενη από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων ήταν πολυκλωνική, μη αντιγονοειδική και δεν περιοριζόταν στα μόρια MHC, ενώ κινητοποιούνταν από ένα μη πολυμορφικό μόριο επιφανείας του οποίου η ταυτότητα αναγνωρίστηκε μετά από την κλωνοποίηση του συνδέτη του CD40, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια και το οποίο ονομάστηκε CD154 (ή CD40L) και το οποίο θεωρήθηκε αρχικά ότι εκφράζεται μόνο στα ενεργοποιημένα CD4+ Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα⁶⁰⁻⁶³. Περαιτέρω μελέτες για τη λειτουργία του ζεύγους υποδοχέα/συνδέτη χαρακτήρισαν τις αλληλεπιδράσεις του ως ουσιαστικής σημασίας για την Τ-εξαρτώμενη Β-κυτταρική διαφοροποίηση και ενεργοποίηση⁶⁴. Περισσότερο πειστικές ενδείξεις για το συμπέρασμα αυτό δόθηκαν από μελέτες με χρήση αντισωμάτων τα οποία εμπόδιζαν την ανοσιακή απόκριση σε Τ-κυτταροεξαρτώμενα αντιγόνα^{64,65} και το σχηματισμό μνημονικών Β-λεμφοκυττάρων και βλαστικών κέντρων⁶⁴. Σε συμφωνία με την πρωτογενή λειτουργία του συστήματος CD40/CD154 έρχεται το γεγονός ότι μεταλλάξεις στο συνδέτη που παρεμπόδιζαν την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα αναγνωρίστηκαν ως η αιτία του φυλοσύνδετου συνδρόμου υπερπαραγωγής IgM (HIGM)⁶⁶, μίας νόσου που σχετίζεται με σημαντική ή πλήρη αναστολή της Τ-εξαρτώμενης χυμικής ανοσίας.

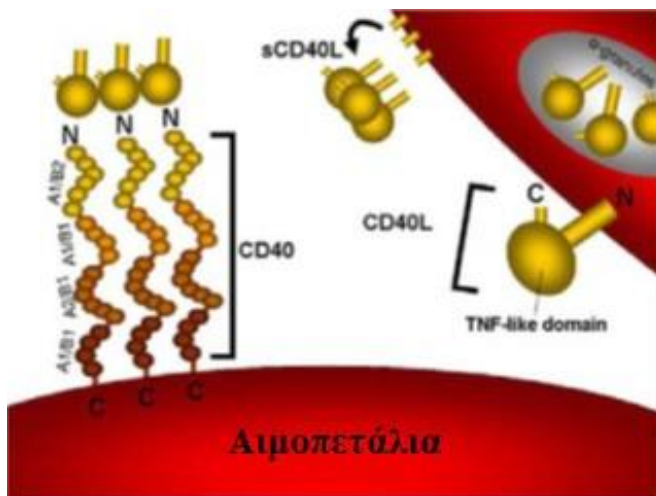
Πέρα από τη σημασία του συστήματος CD40/CD40L στις ανοσολογικές αποκρίσεις, πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ένα ευρύτερο πρότυπο έκφρασης τόσο του συνδέτη όσο και του υποδοχέα και χαρακτήρισαν τις αλληλεπιδράσεις τους ως σημαντικές για ένα ευρύτερο φάσμα φυσιολογικών και παθολογικών αποκρίσεων. Έτσι, το CD154, που αρχικά περιγράφηκε στα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, εκφράζεται και σε μη λεμφικά κύτταρα όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα αιμοπετάλια

και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ⁶⁷⁻⁷¹. Τα περισσότερα από τα κύτταρα που εκφράζουν το συνδέτη, εκφράζουν και τον υποδοχέα CD40. Η ανακάλυψη του τόσο ευρέως προτύπου έκφρασης του CD40 και CD40L ενέπλεξε το ζεύγος αυτό σε μία πληθώρα φλεγμονωδών και ανοσιακών αποκρίσεων που ευθύνονται για διάφορες νόσους όπως η αρθρίτιδα, ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση, η νεφρίτιδα του λύκου και η χρόνια μορφή της νόσου μοσχεύματος εναντίον ξενιστή.

2.1. ΓΟΝΙΑΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ CD40

Το CD40 (*TNFRSF5*) αποτελεί το πέμπτο μέλος της υπερικογένειας των TNFRs, στην οποία ανήκουν οι τύπου I (p55, CD120a) και II (p75, CD120b) υποδοχείς του TNF, ο LNGFR καθώς και τα μόρια CD27, CD30, CD95 (Fas), OX40 (*TNFRSF4*), BAFF-R (*TNFRSF13c*), TACI (*TNFRSF13b*), RANK (*TNFRSF11a*), BCMA(*TNFRSF17*) ⁷⁰⁻⁷².

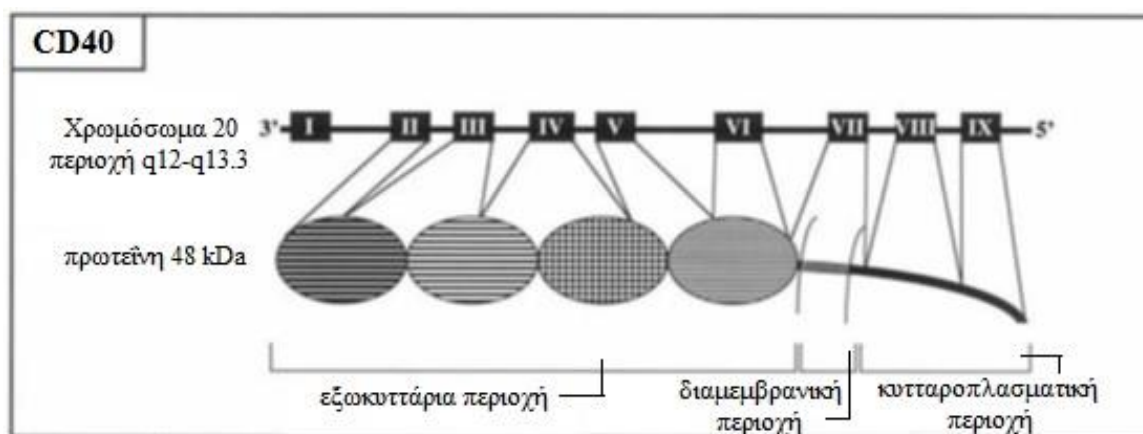
Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 277 αμινοξέων και έχει τη δομή μιας τυπικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I. Αποτελείται από μία εξωκυττάρια περιοχή 193 αμινοξέων, στην οποία συμπεριλαμβάνεται μία σηματοδοτική αλληλουχία 21 αμινοξέων, μία μονήρη διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή 22 και 62 αμινοξέων αντίστοιχα ⁷¹. Ως τυπικό μέλος της υπερικογένειας των TNFR, χαρακτηρίζεται από ένα επαναλαμβανόμενο πρότυπο αμινοξικής αλληλουχίας τεσσάρων υπομονάδων πλούσιων σε κυστεΐνη. Έτσι, στο εξωκυττάριο τμήμα του εντοπίζονται 22 κατάλοιπα κυστεΐνης χωρισμένα, ανά 6 περίπου, σε 4 υπομονάδες των 40 αμινοξέων η καθεμία, σχηματίζοντας τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς ⁷³. Βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια ως μονομερές, διμερές ή τριμερές. Είναι ήδη αποδεδειγμένο ότι η διμερής μορφή είναι απαραίτητη για τη μεταβίβαση σήματος ενώ η τριμερής ενισχύει τη σηματοδότηση αυτή ^{74,75}. Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι το CD40 εμφανίζεται μόνο στη διμερή μορφή του και τριμερίζεται μετά την πρόσδεση του CD40L, πρόσφατες μελέτες περιγράφουν ότι το CD40 μπορεί να βρεθεί σε τριμερή μορφή ανεξάρτητα από το συνδέτη ⁷⁶.



Εικόνα 3. Η πρωτεΐνη CD40 υφίσταται σε τριμερή μορφή. Η εξωκυττάρια περιοχή είναι πλούσια σε κυστεΐνες και αποτελείται από 4 περιοχές και κάθε μία χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές (A1, A2, B1, B2) ⁷⁷.

Η κυτταροπλασματική περιοχή του CD40 δεν παρουσιάζει στενή σχέση με αυτή των άλλων μελών της οικογένειας ενώ παρουσιάζει τουλάχιστον δύο μείζονα σημεία της σηματοδότησης που περιλαμβάνουν κατάλοιπα θρεονίνης στις θέσεις 227 και 234^{78,79}.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 20, στην περιοχή 20q12-q13.12. Ο γονιδιωματικός τόπος καλύπτει μια περιοχή 11kb και αποτελείται από 9 εξόνια. Απομονώθηκε από μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη από κύτταρα Raji του λεμφώματος Burkitt και παρουσιάζει εκτεταμένη ομολογία με τον LNGFR, που αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό μέλος της υπεροικογένειας. Το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μονήρες μόριο mRNA μεγέθους 1.5Kb⁸⁰.



Εικόνα 4. Η γονιδιακή (πάνω) και πρωτεϊνική (κάτω) οργάνωση του CD40. Τα εξόνια παρουσιάζονται ως μαύρα κουτιά ονομαζόμενα με τον αντίστοιχο αριθμό του εξονίου⁸¹.

2.2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΕΤΗ CD40L

Ο συνδέτης του CD40 ή CD154 είναι μία τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 32 έως 39 kDa, εξαιτίας μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που επιδέχεται. Το cDNA του ανθρώπινου CD40L κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο μήκους 261 αμινοξέων, που αποτελείται από μια κυτταροπλασματική περιοχή 22 αμινοξέων, μια διαμεμβρανική περιοχή 24 αμινοξέων και μία εξωκυττάρια περιοχή 215 αμινοξέων με 5 κατάλοιπα κυστεΐνης. Μία διαλυτή μορφή του CD40L έχει αναφερθεί να εμφανίζει τις ίδιες δραστηριότητες με τη διαμεμβρανική.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CD154 χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα X στη θέση Xq26.3-27.1. Αυτή η χαρτογράφηση οδήγησε στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε ασθενείς που έπασχαν από φυλοσύνδετο σύνδρομο υπερπαραγωγής IgM. Ο γονιδιωματικός τόπος καλύπτει περιοχή 12-13kb και αποτελείται από 5 εξόνια. Το πρώτο εξόνιο κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική, τη διαμεμβρανική και ένα μέρος της εξωκυττάριας περιοχής, ενώ τα εξόνια 2 έως 5 κωδικοποιούν την υπόλοιπη εξωκυττάρια⁷⁰.

Ο συνδέτης CD154 (CD40L) θεωρείται ότι προσδένεται στη 2η και 3η υπομονάδα του εξωκυττάριου τμήματος του CD40 και μελέτες πρόσδεσης και μεταλλαξιγένεσης έδειξαν ότι οι όξινες πλευρικές αλυσίδες στα κατάλοιπα Y82, D84, E74, E117 και N86 είναι βασικές για την πρόσδεσή του, ενώ οι πολικές αλληλεπιδράσεις στην επιφάνεια του CD40 είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση του συμπλέγματος υποδοχέα-συνδέτη ^{70,72,82,83}.

2.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CD40

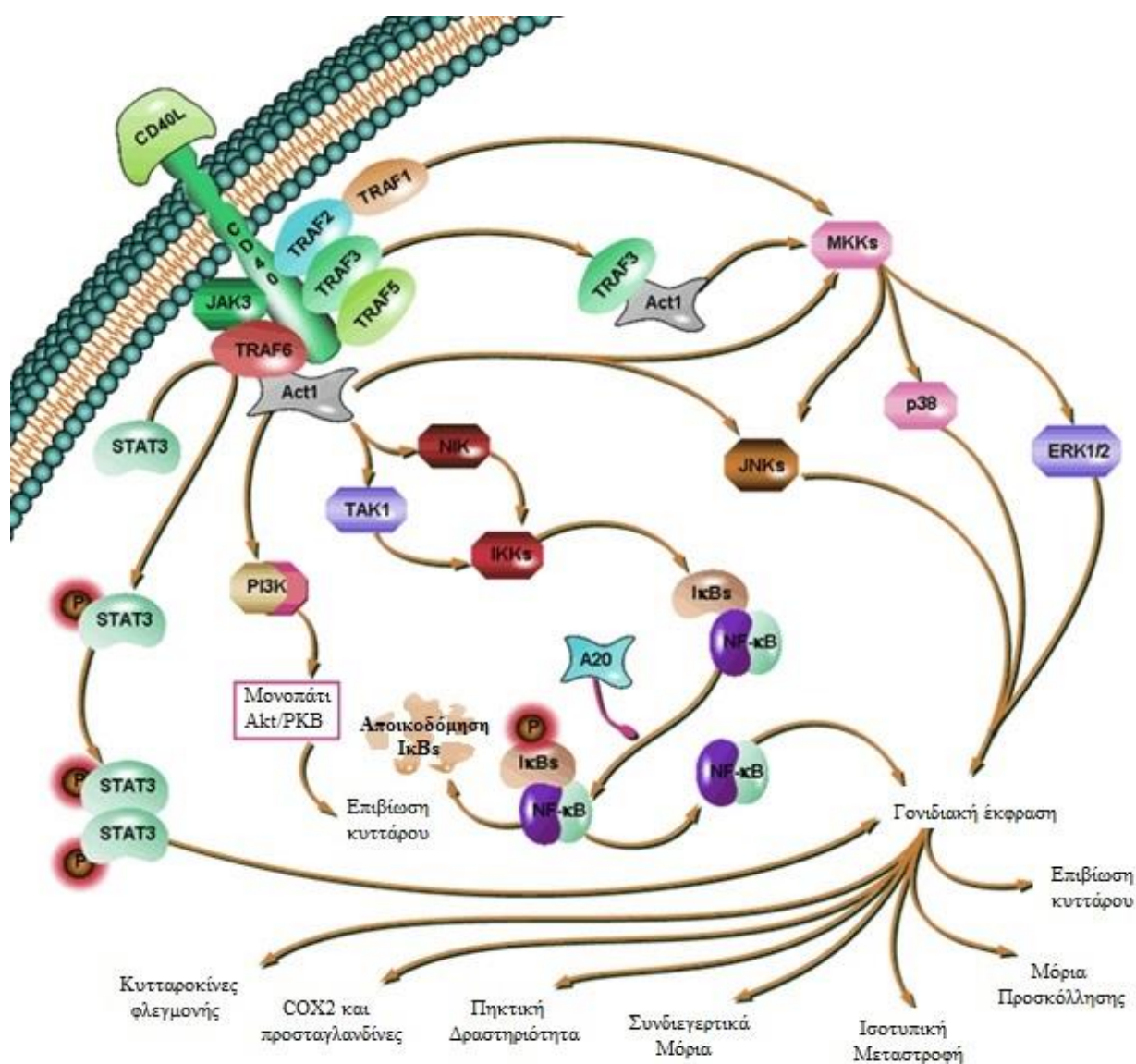
Ελάχιστες μελέτες έχουν αναλύσει τους μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζεται η ενεργοποίηση του *TNFRSF5*. Αν και η δομή του υποκινητή του γονιδίου είναι άγνωστη, η επαγωγή της έκφρασης από την IFN- γ στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκε, υποδηλώνει την παρουσία θέσης πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT. Πράγματι, η ενεργοποίηση του γονιδίου στα λεία μυϊκά κύτταρα από αυτήν την κυτταροκίνη, διαμεσολαβείται από το STAT1. Στα ίδια κύτταρα, η ενεργοποίηση του γονιδίου από τον TNF- α γίνεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B ⁸⁴. Έχει καταγραφεί και αυτοκρινής ρύθμιση του CD40 μέσω της πρόσδεσης του CD40L, η οποία όμως δε ρυθμίζεται από την p38-MAPK, ενός μεσολαβητή άλλων λειτουργιών εξαρτώμενων από το CD40 ⁸⁵. Έχει επίσης περιγραφεί ένας ενισχυτικός ρόλος στη μεταγραφική ρύθμιση από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp-1 ⁸⁶ ενώ αντίθετα ο μεταγραφικός παράγοντας SOCS-1, που αποτελεί αναστολέα του μονοπατιού JAK/STAT, αναστέλλει την έκφραση του CD40 ⁸⁶⁻⁸⁸. Γενικά, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η γονιδιακή ρύθμιση του CD40 μέσω φλεγμονωδών κυτταροκινών ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο και απαιτεί συνεχή πρωτεϊνική σύνθεση ενώ η καταστολή της έκφρασής του από κυτταροκίνες όπως ο TGF- β , συμβαίνει σε μεταμεταγραφικό επίπεδο μέσω αυξημένης αποικοδόμησης του mRNA που κωδικοποιεί το CD40 ⁸⁹.

Το CD40 ρυθμίζεται και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αν και εκφράζεται συνεχώς στους περισσότερους τύπους κυττάρων, τα πρωτεϊνικά επίπεδα μπορούν να ρυθμιστούν. Διεγερτικά ερεθίσματα αποτελούν κυτταροκίνες όπως IFN- γ , IL-1, IL-3, IL-4, TNF- α ^{80,90-97}, GM-CSF ⁹⁷, ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), η LMP1 του ιού Epstein-Barr ⁹⁸, φορβολικοί εστέρες ⁹⁹, ο βάκιλος του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης ¹⁰⁰, αντισώματα έναντι του IgM ή του CD20 ¹⁰¹ και η υπερϊώδης ακτινοβολία ¹⁰². Η επαγόμενη έκφραση του CD40 τυπικά παρατηρείται 6-12 ώρες μετά την ενεργοποίηση, φτάνει στο μέγιστο στις 24 ώρες και παραμένει για 24-72 ώρες ακόμα σε αντίθεση με την παροδική έκφραση του CD40L.

2.4. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η πρόσδεση του CD40L [είτε του μεμβρανοσύνδετου, είτε της διαλυτής μορφής (soluble CD40L, sCD40L)] στον υποδοχέα επάγει την προσέλκυση πρωτεϊνών-προσαρμογέων, γνωστών ως TRAFs. Οι πρωτεΐνες TRAF ενεργοποιούν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια

συμπεριλαμβανομένων του κανονικού και μη κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ, των MAPKs, της PI3K καθώς και το μονοπάτι της PLCγ. Ωστόσο, πρόσφατες αναφορές κάνουν λόγο και για σηματοδότηση ανεξάρτητη από τις πρωτεΐνες TRAF καθώς επίσης και μέσω της οικογένειας των κινασών Janus με την κίνηση Jak3, η οποία μπορεί να προσδένεται απευθείας στο κυτταροπλασματικό τμήμα του CD40 και να επάγει άμεσα τη φωσφορυλίωση του STAT5. Συνολικά, αυτά τα μονοπάτια οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του NF-κΒ, p50, p65, relA, cRel, c-jun και NFAT ⁷¹.



Εικόνα 5. Σηματοδότηση μέσω του CD40 εξαρτώμενη και μη εξαρτώμενη από τις πρωτεΐνες TRAF. (Από: http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=CD40_Signaling, 03/09/2015)

Η οικογένεια των TRAFs περιέχει 6 μέλη (TRAF1-TRAF6). Χαρακτηριστικό όλων είναι ένα υψηλά συντηρημένο καρβοξυλικό τμήμα, που αναφέρεται σαν επικράτεια TRAF-C. Μετά τη δέσμευση του συνδέτη, οι TRAFs στρατολογούνται από κανονικές αμινοξικές αλληλουχίες που περιλαμβάνονται στην κυτταροπλασματική περιοχή του CD40 με την επικράτεια TRAF-C να συνδέεται στην αντίστοιχη ακολουθία αμινοξέων. Οι TRAFs, με εξαίρεση την TRAF1, περιέχουν, επίσης, μία αμινοτελική περιοχή όπου βρίσκεται η επικράτεια RING και μία σειρά από δακτυλίους ψευδαργύρου. Η αφαίρεση, γενικά, της περιοχής αυτής εμποδίζει τη μεταγωγή σήματος που εξαρτάται από τη φυσιολογική TRAF, γεγονός που υποδεικνύει ότι η περιοχή είναι βασική για τη σηματοδότηση ¹⁰³.

Το CD40, άμεσα ή έμμεσα, στρατολογεί τις TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6 ^{104,105}. Αναλυτικότερα, η πρώτη κυτταροπλασματική σηματοδοτική πρωτεΐνη που φάνηκε να συσχετίζεται με το CD40 ήταν η TRAF3, παρόλο που η λειτουργία της στη σηματοδότηση μέσω του CD40 ξεκαθαρίστηκε σχεδόν 20 χρόνια αργότερα. Η TRAF2 δείχθηκε να συσχετίζεται με τους υποδοχείς του TNF και στη συνέχεια να συνδέει το CD40. Παρόλο που η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής αποκάλυψε δύο διακριτές περιοχές για τη σύνδεση των TRAF2 και 3, οι θέσεις σύνδεσής τους, τελικά, φαίνεται να αλληλεπικαλύπτονται. Η TRAF1 αρχικά ταυτοποιήθηκε την ίδια χρονική περίοδο με την TRAF2, αλλά η σχέση της με το CD40 μελετήθηκε αργότερα και φαίνεται να συνδέεται ασθενώς με τον υποδοχέα αλλά το μεγαλύτερο αποτέλεσμα να δίνεται μέσω ετεροτριμερισμού της με την TRAF2. Στοιχεία υποστηρίζουν, παρόλα αυτά, ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των υπόλοιπων πρωτεϊνών. Πιο περίπλοκα ήταν τα πράγματα στη μελέτη της TRAF5, όπου δύο ερευνητικές ομάδες, ταυτόχρονα, μελετούσαν την πρωτεΐνη. Παρόλο που η προσέγγισή τους ήταν κοινή, η μία ομάδα υποστήριζε ότι το CD40 προσδένει την TRAF5 ενώ η άλλη ότι δε φαίνεται κάποια άμεση συσχέτιση. Η TRAF4 δεν έχει αναφερθεί να συνδέεται με το CD40 ενώ ούτε το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης ούτε οι σχέσεις των μορίων με τον υποδοχέα υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός μορίου TRAF7. Έχει γίνει μία προσπάθεια αντιστοίχισης της ενεργοποίησης κάθε πρωτεΐνης της οικογενείας με συγκεκριμένα βιολογικά αποτελέσματα στα Β-λεμφοκύτταρα κυρίως, αλλά και στα υπόλοιπα κύτταρα στα οποία εκφράζεται, το αποτέλεσμα της οποίας παρουσιάζεται στον πίνακα 1 ^{70,71,106}.

TRAF	B-λεμφοκύτταρα	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα	Δενδριτικά κύτταρα	Κύτταρα εκτός του αιμοποιητικού συστήματος
TRAF 1	↓ Αποικοδόμηση της TRAF2 Συνεργασία με την TRAF2 για ενίσχυση της ενεργοποίησης των JNK και NF-κB και για παραγωγή IgM	Αδιευκρίνιστο	Παράταση σηματοδότησης μέσω του CD40 ↑ Διάρκεια παραμονής TRAF2 στη μεμβράνη	↓ Ενεργοποίηση NF- κB (νεφρικό επιθήλιο)
TRAF 2	↑ Ενεργοποίηση JNK και άλλων κινασών ↑ Ενεργοποίηση NF-κB 1 και 2 ↑ Ανοδική ρύθμιση έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων Επαγωγή αποικοδόμησης TRAF3 Παρεμπόδιση αρνητικού αποτελέσματος της TRAF3 στη συνέργεια CD40-BCR	Αδιευκρίνιστο	Αδιευκρίνιστο	↑ Ενεργοποίηση JNK Και άλλων κινασών ↑ Ενεργοποίηση NF- κB 1 και 2 (νεφρικό επιθήλιο, ινοβλάστες)
TRAF 3	↓ Ενεργοποίηση JNK ↓ Παραγωγή IgM ↓ Συνέργεια CD40-BCR ↓ Ανοδική ρύθμιση έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων	Αδιευκρίνιστο	Αδιευκρίνιστο	↑ Ενεργοποίηση NF- κB, παραγωγή RANTES (επιθήλιο πνευμόνων) ↓ Ενεργοποίηση NF- κB (νεφρικό επιθήλιο) ↓ Ενεργοποίηση AP-1, παραγωγή κυτταροκινών (αγγειακό επιθήλιο)
TRAF 5	↑ Ανοδική ρύθμιση έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων, παραγωγή IgM και πολλαπλασιασμός	Αδιευκρίνιστο	Αδιευκρίνιστο	↑ ενεργοποίηση NF- κB2 (νεφρικό επιθήλιο)
TRAF 6	↑ Ενεργοποίηση JNK, ERK ↑ Ενεργοποίηση NF-κB ↑ Παραγωγή IL-6 ↑ Μεταστροφή ισotyπου – Διαμόρφωση βλαστικών κέντρων ↑ Ανοδική ρύθμιση έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων	↑ Ενεργοποίηση ERK ↑ Ενεργοποίηση NF-κB ↑ Παραγωγή TNF, IL-6	↑ Επιφανειακών MHC II ↑ Παραγωγή IL-6, IL- 12	↑ Ενεργοποίηση JNK, ERK ↑ Ενεργοποίηση NF- κB (νεφρικό επιθήλιο)

Πίνακας 1. Ο ρόλος των πρωτεϊνών TRAF στις λειτουργίες των B-λεμφοκυττάρων που διαμεσολαβεί το CD40. Η ενεργοποίηση του CD40 κινητοποιεί μία πλειάδα γεγονότων, σημαντικών για μία αποτελεσματική χυμική ανοσιακή απόκριση. Ενεργοποιείται ο πολλαπλασιασμός των B-λεμφοκυττάρων, αυξάνεται η έκφραση μορίων επιφανείας που εμπλέκονται στην αντιγονοπαρουσίαση και στις αλληλεπιδράσεις με τα T-λεμφοκύτταρα, παράγονται αντισώματα και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ξεκινούν αναπτυξιακά προγράμματα που οδηγούν στη μεταστροφή ισotyπου και στη δημιουργία B-λεμφοκυττάρων μνήμης. Οι TRAF2, TRAF5 και TRAF6 διαμεσολαβούν σε διαφορετικές αλλά αλληλεπικαλυπτόμενες εκτελεστικές δράσεις του CD40. Η TRAF1 συνεργάζεται με την TRAF2 στην επαγωγή έκκρισης IgM ως απόκριση σε σήματα από το CD40, ενώ η TRAF3 εμποδίζει τη συνέργεια μεταξύ CD40 και αντιγονικού υποδοχέα των B-λεμφοκυττάρων (BCR) καθώς και άλλα TRAF2-εξαρτώμενα σήματα.

2.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ CD40

Η ευρεία έκφραση των μορίων CD40 και CD40L σε μία πληθώρα κυττάρων υποδηλώνει το εύρος του βιολογικού τους ρόλου, καθώς τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε ποικίλες διεργασίες σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Ειδικότερα, το σύστημα CD40/CD40L διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία τόσο στην κυτταρική όσο και στην εξαρτώμενη από το θύμο χυμική ανοσία. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των ανοσολογικά παρθένων T-λεμφοκυττάρων απαιτεί την αναγνώριση του αντιγόνου μέσω του TCR και την παροχή συνδιεγερτικών σημάτων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ένα τέτοιο συνδιεγερτικό σήμα παρέχεται από το σύστημα CD40/CD40L και συμβάλλει στη δημιουργία ειδικών για το αντιγόνο T-λεμφοκυττάρων. Αν και η πρωταρχική διέγερση (priming) των T-λεμφοκυττάρων και η ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων μπορεί να γίνει και απουσία σημάτων από το CD40, πολλές κυτταρικές και ανοσολογικές λειτουργίες είναι ελαττωματικές χωρίς αυτήν την αλληλεπίδραση, υπογραμμίζοντας έτσι το ρόλο του συστήματος αυτού στην ανάπτυξη της επίκτητης ανοσίας ¹⁰⁷.

Αρχικά, επικρατούσε η άποψη ότι η έκφραση του CD40 ήταν ειδική στα B-λεμφοκύτταρα, γι' αυτό και τα ώριμα B-λεμφοκύτταρα αποτελούν το βασικό κυτταρικό τύπο στον οποίο έχουν μελετηθεί οι λειτουργικές συνέπειες της δέσμευσής του με το συνδέτη του. Ωστόσο, *in vitro* μελέτες ενεργοποίησης έδειξαν ότι έχει σημαντικές δράσεις σε πολλά στάδια ζωής των κυττάρων αυτών, ενώ ο υποδοχέας εκφράζεται, επίσης, στα δενδριτικά κύτταρα, στα μονοκύτταρα, στα αιμοπετάλια και στα μακροφάγα καθώς και σε κύτταρα εκτός του αιμοποιητικού συστήματος, όπως οι ινοβλάστες, οι μυοϊνοβλάστες, τα επιθηλιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος, έχει αναφερθεί να εκφράζεται λειτουργικά σε νευρικά κύτταρα καθώς και στα T-λεμφοκύτταρα ^{56,67,108}.



Εικόνα 6. Ανθρώπινοι κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν CD40 και CD154 ⁷².

2.6. *In vitro* ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CD40/CD40L

2.6.1. Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων από το CD40 μιμείται, *in vitro*, την ενεργοποίησή τους μετά από αλληλεπίδραση με τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα. Έτσι, τα Β-λεμφοκύτταρα σε ηρεμία, παρουσία αντι-CD40, ενεργοποιούνται αυξάνοντας το μέγεθός τους και την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως το VLA-4, και μορίων επιφανείας, όπως το CD23, CD80/B7-1, CD86/B7-2. Επιπλέον, εισέρχονται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού ο οποίος επάγεται περαιτέρω από την παρουσία κυτταροκινών, όπως η IL-4, IL-13, IL-10¹⁰⁹⁻¹¹². Διασταυρούμενη σύνδεση του CD40 επάγει, επίσης, την παραγωγή κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, LT-α και GM-CSF. Οι παραγόμενες κυτταροκίνες λειτουργούν ως αυτοκρινείς παράγοντες ανάπτυξης και διαφοροποίησης αφού αντισώματα έναντι των TNF-α ή των IL-6 και IL-10 φαίνεται να παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών, αντίστοιχα, σε κύτταρα ενεργοποιημένα από το CD40¹¹³. Η παρουσία IL-4, IL-13, IL-10 επάγει και την έκκριση ανοσοσφαιρινών, αφού η διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων ξεκινάει με την ενεργοποίησή τους μέσω του CD40 αλλά η ειδικότητα της ανοσοσφαιρίνης καθορίζεται από την παρουσία κυτταροκινών. Η IL-10 επάγει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων IgM, IgG και IgA χωρίς την παραγωγή IgE. Επιπρόσθετα, η IL-10 δρα ως παράγοντας που επάγει την ισοτυπική μεταστροφή για την παραγωγή IgG1 και IgG3. Ο συνδυασμός IL-10 με τον TGF-β επάγει την παραγωγή IgA και οι ομόλογες IL-4 και IL-13 επάγουν τη μεταστροφή σε IgG4 και IgE, την οποία μπορεί να ενισχύσει η παρουσία IL-7⁵⁶.

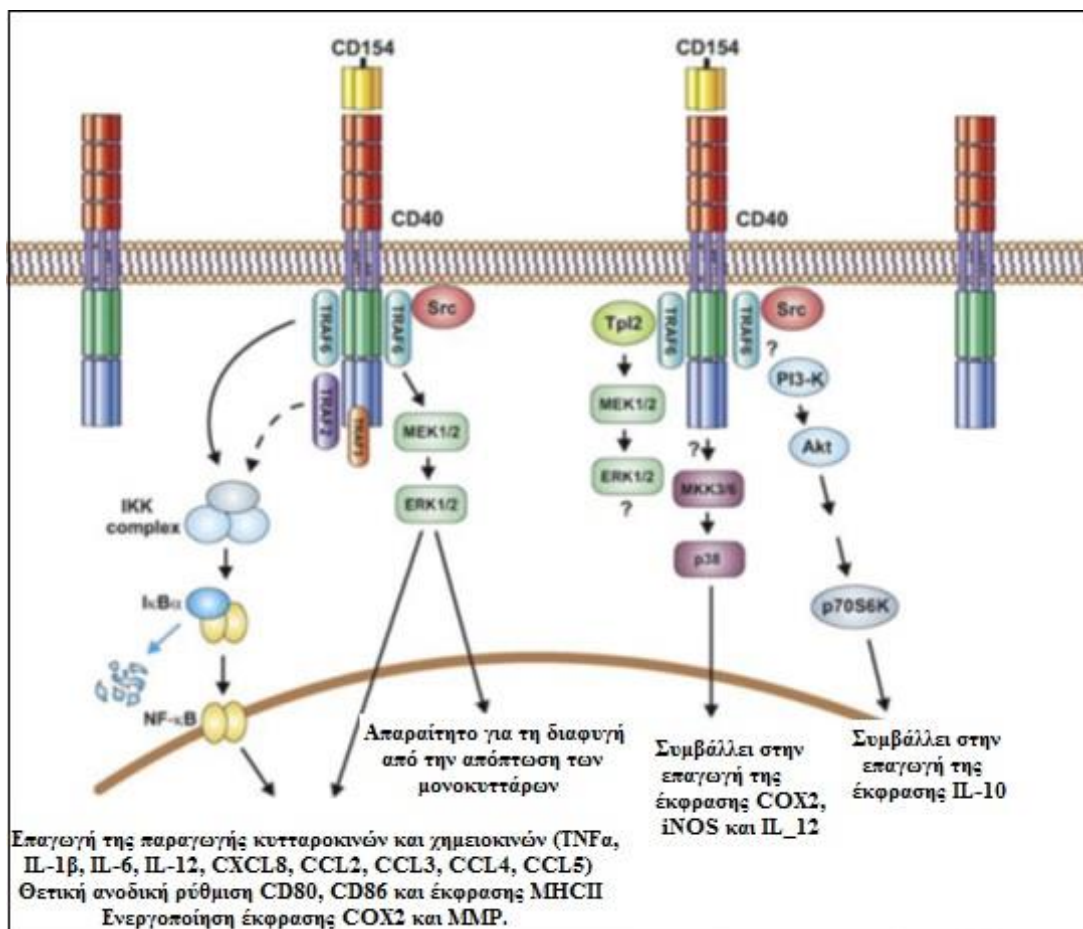
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων μέσω του CD40 έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του Fas και καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στην επαγόμενη από αυτόν απόπτωση. Κατά αυτόν τον τρόπο, με διασταυρούμενη σύνδεση του αντιγονικού υποδοχέα του BCR, αυτοί οι τρεις υποδοχείς (Fas, CD40, BCR) δημιουργούν ένα σύνθετο δίκτυο επαγωγικών και ανασταλτικών σημάτων, όπου η απάντηση του Β-λεμφοκυττάρου, η ενεργοποίηση ή ο θάνατός του καθορίζεται από το στάδιο διαφοροποίησης στο οποίο βρίσκεται^{56,114-117}. Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται να έχει το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης ενεργοποίησης του CD40 και του BCR στα Β-λεμφοκύτταρα σε ηρεμία, αφού με αυτήν επάγεται ένας φαινότυπος χαρακτηριστικός των κυττάρων που σχηματίζουν βλαστικά κέντρα (CD38+, CD95+, carboxypeptidase+, CD71+, CD86+, CD24-). Τα βλαστικά κέντρα αποτελούν τις ανατομικές θέσεις όπου τα Β-λεμφοκύτταρα υπόκεινται σε σωματική υπερμετάλλαξη, επιλογή, ισοτυπική μεταστροφή και όπου διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα ή σε κύτταρα μνήμης. Παρατεταμένη ενεργοποίηση του CD40 οδηγεί σε διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων σε κύτταρα μνήμης, ενώ διακοπή της μεταγωγής

σήματος μέσω του υποδοχέα επιτρέπει την ωρίμανση σε πλασματοκύτταρα ^{118,119}. Παρόλο που τα περισσότερα φυσιολογικά και κακοήθη Β-λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται ως απάντηση στη δέσμευση του CD40, τα πλασματοκύτταρα φαίνεται να μην αποκρίνονται ¹²⁰.

2.6.2. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η έκφραση του CD40 στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), όπως τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την ενισχυμένη επιβίωσή τους, την έκκριση κυτταροκινών (όπως IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α, MIP-1^α) ¹²¹⁻¹²⁴ και ενζύμων όπως μεταλλοπρωτεασών (MMP) ¹²⁵. Στα μονοκύτταρα, ενισχύεται, επιπλέον, η ογκοκτόνος δραστηριότητα και αυξάνεται η σύνθεση NO ^{70,110}. Επιπρόσθετα, η δέσμευση του CD40 τα καθιστά ικανότερα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω της ανοδικής ρύθμισης της έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων όπως τα CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80/B7-1, CD86/B7-2 ^{122,126-129}.

Η αλληλεπίδραση του ζεύγους CD40/CD40L έχει σημαντικές συνέπειες όχι μόνο για τη λειτουργία των ίδιων των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων αλλά και των Τ-λεμφοκυττάρων κατά την αλληλεπίδρασή τους με αυτά. Το αποτέλεσμα της διακοπής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ CD40/CD40L κατά τη διάρκεια καλλιέργειας Τ-λεμφοκυττάρων με δενδριτικά κύτταρα είναι ο μειωμένος πολλαπλασιασμός των Τ-λεμφοκυττάρων, πιθανώς ως συνέπεια τόσο της αλλαγής της σηματοδότησης μέσω του CD40 στα APCs (μειωμένη έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και κυτταροκινών), όσο και της σηματοδότησης μέσω του CD40L στα Τ-λεμφοκύτταρα ¹³⁰. Η έκκριση IL-12 από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν μέσω του CD40 επιτρέπει την ωρίμανση των Τ-λεμφοκυττάρων μέσα από το μονοπάτι των βοηθητικών Th1-λεμφοκυττάρων.



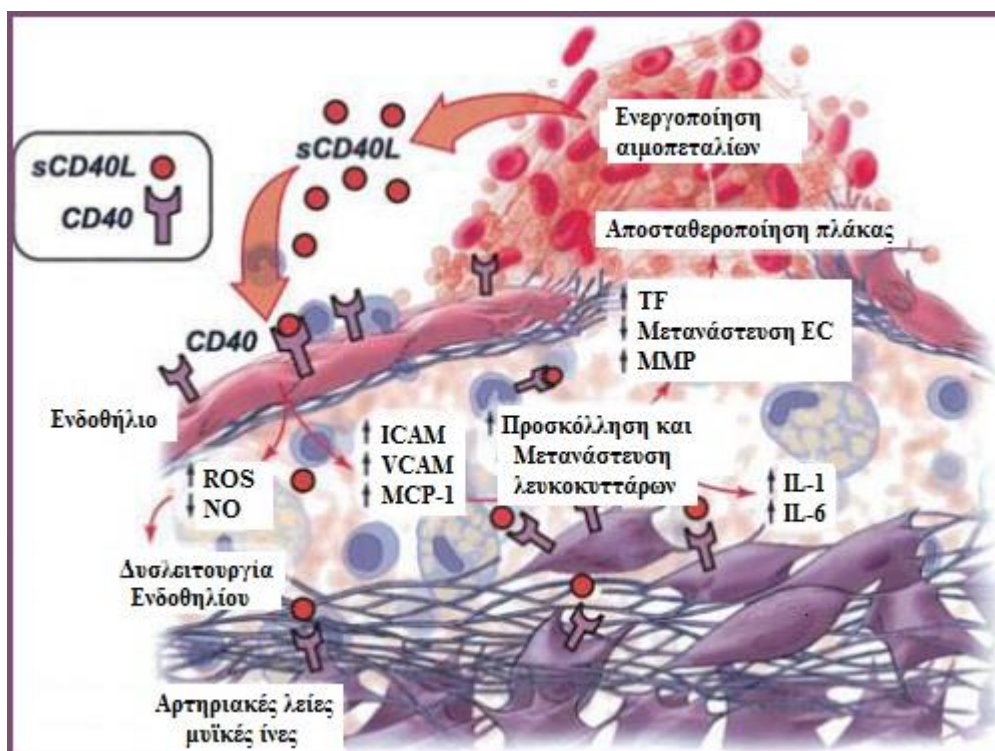
Εικόνα 7. Λειτουργικές συνέπειες της ενεργοποίησης του CD40 στα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Η TRAF6 απαιτείται και η TRAF2 συμβάλλει στην ενεργοποίηση του NF- κ B. Οι κινάσες ERK1/2 ενεργοποιούνται μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει τα Src-TRAF6. Τόσο το μονοπάτι NF- κ B αλλά και ERK1/2 συμβάλλουν σε ένα μεγάλο αριθμό κυρίως φλεγμονωδών δραστηριοτήτων στα μονοκύτταρα και μακροφάγα. Η ενεργοποίηση της ERK1/2 συμβάλλει και στην επιβίωση των κυττάρων αυτών. Η ενεργοποίηση της p38 παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της έκφρασης της iNOS και η δραστηριότητα της PI3K συμβάλλει στην παραγωγή IL-10.

2.6.3. ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

Εκτός από τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, η έκφραση του CD40 έχει αναγνωρισθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Παρόλο που η έκφρασή του είναι χαμηλή σε φυσιολογικούς ιστούς, το μόριο δέχεται ξεκάθαρα μία ανοδική ρύθμιση σε παθολογικές καταστάσεις. Παράλληλα, μετά από *in vitro* ενεργοποίηση, ισχυρή έκφραση μπορεί να παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους κυτταροκαλλιεργειών, που περιλαμβάνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Αυξημένη έκφραση έχει εντοπιστεί μετά από ενεργοποίησή τους με IL-1 ή INF- γ . Η λειτουργική συσχέτιση του μορίου αυτού στα συγκεκριμένα κύτταρα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς.

Σε ασθενείς με ΗΙgM σύνδρομο, ή σε CD40 ή CD40L knock-out ποντίκια, δεν εντοπίστηκαν σοβαρές ανωμαλίες σε όργανα που εκφράζουν το CD40. Ωστόσο, προτείνεται ότι η ανικανότητα να συνδέεται το CD40 σε επιθηλιακά κύτταρα της χολής μπορεί να συμβάλλει σε ελαττωμένη άμυνα κατά ενδοκυττάρων παθογόνων και κατ' επέκταση αυξημένη επικράτηση καρκινωμάτων σε ασθενείς με ΗΙgM σύνδρομο. Εναλλακτικά, σε κάποιους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση του CD40 έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου ¹³¹⁻¹³³.

Η έκφραση του CD40 σε κύτταρα εκτός αυτών του αιμοποιητικού συστήματος φαίνεται να είναι σχετική περισσότερο με τις φλεγμονώδεις απαντήσεις. Αρχικές *in vitro* μελέτες, που χρησιμοποιούν διάφορους κυτταρικούς τύπους, έδειξαν εμφανή αποτελέσματα στην παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών μετά από διασταυρούμενη σύνδεση του CD40. Παρομοίως, εμφανίζεται αύξηση της πηκτικής δραστηριότητας, ενώ και άλλοι μεσολαβητές της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένων των μορίων προσκόλλησης και των μεταλλοπρωτεασών, φαίνεται να παράγονται σε μεγάλες ποσότητες. Το τελευταίο θεωρείται σημαντικό σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι τα ενεργοποιημένα θρομβοκύτταρα μπορεί να εκφράζουν μία προσχηματισμένη μορφή του CD40L ¹³⁴.



Εικόνα 8. Το σύστημα CD40/CD40L επάγει τη φλεγμονή στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η έκφραση του CD40 επάγεται από την oxLDL αλλά και από κυτταροκίνες της φλεγμονής (TNF-a, IL-1, IFNγ). Η ενεργοποίησή του από το CD40L των T-λεμφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων οδηγεί σε παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, κυτταρικών μορίων προσκόλλησης και έκκριση χημειοκινών ¹³⁵.

Κυτταρικός τύπος	Λειτουργικές συνέπειες
Προ-B-κύτταρα	Πολλαπλασιασμός Έκφραση του CD23
Παρθένα ώριμα B-λεμφοκύτταρα	Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση Ισοτυπική μεταστροφή
B-λεμφοκύτταρα βλαστικών κέντρων	Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση Έκφραση Fas Επιλογή
Πλασματοκύτταρα	Παραγωγή IL-6
Μονοκύτταρα/μακροφάγα	Έκκριση κυτταροκινών Παραγωγή NO και μεταλλοπρωτεασών Πηκτική δραστηριότητα Έκφραση ιστικού παράγοντα
Δενδριτικά κύτταρα- Κύτταρα Langerhans	Ανάπτυξη και επιβίωση Έκφραση συνδιεγερτικών μορίων Ενισχυμένη παραγωγή κυτταροκινών
CD34+ πρόδρομα	Πολλαπλασιασμός Ανάπτυξη δενδριτικών κυττάρων
T- λεμφοκύτταρα	Πολλαπλασιασμός Έκφραση CD25 Παραγωγή κυτταροκινών
Ηωσινόφιλα	Παράταση επιβίωσης Παραγωγή GM-CSF
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Θετική ανοδική ρύθμιση CD54, CD62E, CD106 Αυξημένη έκφραση ιστικού παράγοντα/θρομβομοδουλίνης Πηκτική δραστηριότητα Συνδιέγερση T-λεμφοκυττάρων Αυξημένη παραγωγή LIF, IL-6, GM-CSF Αυξημένη παραγωγή IL-1, IL-6, IL-8
Αγγειακό ενδοθήλιο	
Επιθηλιακά κύτταρα	
Θύμου	Παραγωγή GM-CSF
Νεφρικό επιθήλιο	Έκκριση κυτταροκινών/χημειοκινών IL-6, LIF, GM-CSF, IL-8, MCP-1, RANTES
Κερατινοκύτταρα	Αυξημένη έκφραση CD54, Bcl-x, έκκριση IL-8
Καρκινικά κύτταρα	Αναστολή ανάπτυξης/απόπτωση
Ινοβλάστες	
Συνοβιοκύτταρα	Πολλαπλασιασμός, παραγωγή κυτταροκινών (GM-CSF, MIP-1α)
Πνευμόνων	Αυξημένη IL-6, IL-8, NF-κB Αυξημένη COX-2, PGE2
Δέρματος	Αυξημένη IL-6, IL-8, NF-κB
Θυρεοειδούς	Αυξημένη IL-6, IL-8, NF-κB
Λείες μυϊκές ίνες αγγείων	Αυξημένη παραγωγή MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-2 Ενεργοποίηση ICE (IL-1β μετατρεπτικό ένζυμο) Επαγωγή στρωμελυσίνης-3 MMP-11
Ηπατοκύτταρα	Επαγωγή έκφρασης Fas-L

Πίνακας 2. Λειτουργικές συνέπειες *in vitro* ενεργοποίησης του CD40 στους διάφορους κυτταρικούς τύπους.

2.7. In vivo ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CD40-CD40L

2.7.1. ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Η απόδειξη του κρίσιμου ρόλου της αλληλεπίδρασης του ζεύγους CD40/CD40L *in vivo*, προέκυψε από την ανακάλυψη ότι το HIgM1, οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί το CD40L¹³⁶. Εκτός από τους ασθενείς με φυλοσύνδετα κληρονομούμενο HIgM περιγράφηκαν ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια, ανοσολογικά και κλινικά μη διαφοροποιούμενη, που προκαλείται από ανεπάρκεια στη σηματοδότηση μέσω του CD40 (HIgM3), ενώ η ανάπτυξη CD40 αλλά και CD40L knockout ποντικών αποκάλυψε έναν φαινότυπο συγκρίσιμο με αυτό των ασθενών που πάσχουν από HIgM. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από σοβαρή δυσλειτουργία της T-εξαρτώμενης χυμικής ανοσίας με έλλειψη B-λεμφοκυττάρων μνήμης και χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα κυκλοφορούντων IgG, IgA και IgE ανοσοσφαιρινών. Οι ασθενείς έχουν αυξημένη ευαισθησία σε ευκαιριακές λοιμώξεις όπως πνευμονία από *Pneumocystis carinii* και διάρροια από *Cryptosporidium*. Αυτό υποδεικνύει ένα σημαντικό ρόλο των αλληλεπιδράσεων του ζεύγους CD40/CD40L στην κυτταρική ανοσιακή απάντηση. Πράγματι, CD40L knockout ποντίκια εμφανίζουν μια σημαντική βλάβη στην αντιγονοειδική ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και παρουσιάζονται ιδιαίτερα επιρρεπή σε λοίμωξη από *Leishmania*. Αυτό είναι κυρίως αποτέλεσμα ανεπαρκούς Th1 ανοσιακής απάντησης που σχετίζεται με την ανεπαρκή παραγωγή IL-12 από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα^{114,116}.

2.7.2. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Οι αλληλεπιδράσεις του ζεύγους CD40/CD40L παίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρωταρχική διέγερση των T-λεμφοκυττάρων και εμποδίζουν την επαγωγή της ανοχής. Ωστόσο, η ενεργοποίηση του CD40 φαίνεται να παρατείνει την επιβίωση πειραματικά μεταμοσχευμένων οργάνων. Τα μοντέλα που μελετήθηκαν περιορίζονται σε μεταμοσχευμένα όργανα ποντικών, αφού τα μόνα διαθέσιμα αντισώματα είναι τα αντι-CD40L για το μόριο των ποντικών. Έτσι, περιλαμβάνονται αλλομοσχεύματα καρδιάς, δέρματος, αορτής και νησίδων του παγκρέατος καθώς και ξενογενή μοσχεύματα νησίδων του παγκρέατος, καρδιάς και δέρματος¹³⁷. Θεραπεία με αντι-CD40L παρατείνει την επιβίωση, αλλά καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται από συνδυασμένη θεραπεία με κύτταρα από το σπλήνα του δότη ή αντι-CTLA4. Αποτέλεσμα της ταυτόχρονης αναστολής των μονοπατιών CD40 και CD28 ήταν η μακρόχρονη αποδοχή αλλομοσχευμάτων δέρματος και καρδιάς¹³⁸.

2.7.3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

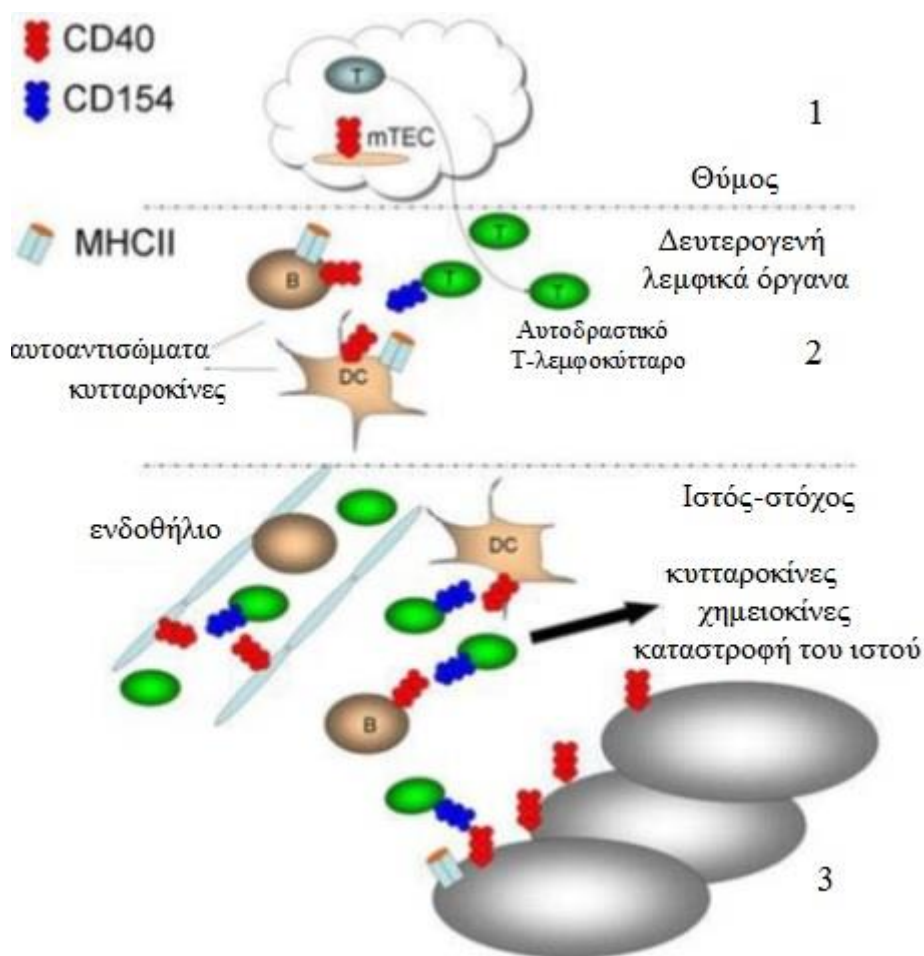
Χρόνιες φλεγμονώδεις απαντήσεις, που χαρακτηρίζουν αρκετά νοσήματα, μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές ιστολογικές βλάβες και απώλεια φυσιολογικών λειτουργιών. Γενικά, καταστάσεις

όπως η αθηρωματική θρόμβωση ή η πνευμονική ίνωση χαρακτηρίζονται από τοπική διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των T-λεμφοκυττάρων, B-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων¹³⁹. Θεραπεία με αντι-CD40L φάνηκε να μειώνει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και την έκφραση στρωμελυσίνης-3 σε ποντίκια με υπερλιπιδαιμία^{140,141} και να προλαμβάνει τη φλεγμονή στους πνεύμονες και την ίνωση, ως συνέπεια του, επαγόμενου από το οξυγόνο, συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας. Δεδομένης της ευρείας έκφρασης του CD40 και των διάφορων μεσολαβητών που παράγονται μετά την *in vitro* ενεργοποίηση του CD40, μπορεί να προβλεφθεί ότι ο ρόλος του συστήματος CD40/CD40L στη χρόνια φλεγμονή θα περιλαμβάνει τόσο την αλληλεπίδραση των T-λεμφοκυττάρων με άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος όσο και τη δράση σε κύτταρα των ιστών.

2.7.4. ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ

Εξαιτίας της κεντρικής θέσης που κατέχει το CD40 στην ανάπτυξη αποτελεσματικών ανοσολογικών αποκρίσεων, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων. Το CD40 μπορεί να αποτελέσει αιτιολογικό παράγοντα των αυτοάνοσων διαταραχών που προκύπτουν από δυσλειτουργία της T-εξαρτώμενης ανοσίας με ποικίλους τρόπους. Αρχικά, η έκφραση του CD40 δέχεται ανοδική ρύθμιση μετά την ενεργοποίηση των APCs. Αυξημένα επίπεδα CD40, ενδογενώς ή επαγόμενα μπορεί να συμβάλλουν στην αυξημένη ένταση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση του ζεύγους CD40/CD40L. Ωστόσο, έχουν εντοπιστεί και κάποιοι μηχανισμοί μέσω των οποίων το σύστημα CD40/CD40L συμμετέχει στο σχηματισμό ή τη διαφυγή αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρικων κλώνων. Ένας τέτοιος μηχανισμός βασίζεται στο γεγονός ότι η σηματοδότηση μέσω του CD40 μπορεί να λειτουργήσει στο επίπεδο της επιλογής των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο. Τα μυελώδη επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (mTECs) συμμετέχουν στην αρνητική επιλογή πιθανώς αυτοδραστικών κυττάρων εκφράζοντας αντιγόνα των περιφερικών ιστών. Ο υποδοχέας RANK, μέλος της υπερικογένειας των TNFRs, είναι κρίσιμος για την ανάπτυξη των εμβρυονικών mTECs. Με τον υποδοχέα αυτόν συνεργάζεται το CD40 προωθώντας την ανάπτυξη των mTECs μετά τη γέννησή τους και συνεπώς και την ανοχή. Διακοπή των αλληλεπιδράσεων του ζεύγους CD40/CD40L στα mTECs μπορεί να συμβάλλει στην αποτυχία της κεντρικής ανοχής¹⁴².

Επιπρόσθετα, η σηματοδότηση μέσω του CD40 έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-6, που μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων σε Th17. Ένας τρίτος μηχανισμός μπορεί να είναι η παρεκκλίνουσα έκφραση του CD40 σε ιστούς που, φυσιολογικά, δεν εντοπίζεται.



Εικόνα 9. Δυναμικοί μηχανισμοί με τους οποίους το σύστημα CD40/CD40L συμβάλλει στην αυτοανοσία.

1. Στο επίπεδο της επιλογής των T- λεμφοκυττάρων στο θύμο, επιτρέποντας τη διαφυγή αυτοδραστικών T-λεμφοκυτταρικών κλώνων.
2. Στα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπου τα T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από τα B-λεμφοκύτταρα ή άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.
3. Εντός του ιστού στόχου όπου η σηματοδότηση του CD40 οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών που συμβάλλουν στην ιστική καταστροφή και την είσοδο φλεγμονωδών κυττάρων ⁸¹.

2.8. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. -1T/C (rs1883832)

Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου που κωδικοποιεί το CD40 (*TNFRSF5*) οδήγησε σε αναγνώριση ενός λειτουργικού πολυμορφισμού στην ακολουθία Kozak στην 5'UTR' περιοχή. Η ακολουθία Kozak εντοπίζεται στα ευκαρυωτικά mRNA και ορίζεται ως (GCC)GCCRCCAUGG, με την τριπλέτα AUG που εμφανίζεται σε αυτήν να αντιστοιχεί στο κωδικόνιο έναρξης και την αδενίνη στην τριπλέτα αυτή να αντιστοιχεί στη θέση +1 ενώ τα R στη θέση -3 αντιστοιχεί σε μία πουρίνη (αδενίνη ή θυμίνη) – δεν ορίζεται θέση 0 στην ακολουθία. Η ακολουθία αυτή είναι σημαντική για την έναρξη της μετάφρασης και η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης εξαρτάται από την ισχύ της. Πήρε το όνομά της από τη Marilyn Kozak, η οποία και την μελέτησε αναλύοντας αρχικά 699 mRNA από διάφορες πρωτεΐνες. Λειτουργικές μελέτες που αφορούσαν τη μετάφραση προΐνσουλίνης και α-σφαιρίνης χαρακτήρισαν ιδιαίτερης σημασίας την ύπαρξη αδενίνης στη θέση -3, ενώ αν δεν εμφανίζεται αυτή, είναι απαραίτητη η ύπαρξη γουανίνης στη θέση +4. Λιγότερο σημαντική είναι η εμφάνιση επαναλαμβανόμενης γουανίνης στις θέσεις -3, -6, -9 ¹⁴³⁻¹⁴⁶.

Ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs1883832 χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση μία κυτοσίνης από μία θυμίνη στη θέση -1 (c. -1 T/C). Στη μελέτη 1000 γονιδιωμάτων, η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλίου είναι μόλις 22,88%. Η ύπαρξη του C αλληλίου έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη μετάφραση του mRNA του CD40, όπως προέκυψε από *in vitro* πειράματα. Η εμφάνιση του C αλληλίου, σε σύγκριση με το T αλληλίο, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του κυττάρου κατά 15-32%. Αυτό το γεγονός οδηγεί στην υπόθεση ότι αυξημένη έκφραση του CD40 στα κύτταρα που εντοπίζεται, μειώνει το κατώφλι ενεργοποίησής του δίνοντας αυξημένη ένταση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση του ζεύγους CD40/CD40L, μεταξύ των οποίων και τα αποτελέσματα που οδηγούν σε αυτοανοσία ¹⁴⁷.

Ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με νόσους όπως η νόσος Grave's ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, το λέμφωμα ^{151,152}, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ¹⁵³, η πολλαπλή σκλήρυνση ¹⁵⁴, η νόσος Behcet's ^{155,156} και με καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση ^{157,158}, ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά επεισόδια σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ¹⁵⁹, το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ¹⁶⁰, το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ¹⁶¹⁻¹⁶³, τα αυξημένα επίπεδα IgE σε ασθενείς με άσθμα ¹⁶⁴ και η αυξημένη επίπτωση αλλεργικών αντιδράσεων επαγόμενων από αντιβιοτικά ¹⁶⁵.

3. ΤΟ ΣΥΝΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CTLA4 ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CTLA4/B7

Η ισορροπία μεταξύ επαγωγικών και ανασταλτικών σημάτων αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς διατήρησης της ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος. Με αυτόν το μηχανισμό επιτυγχάνεται και η ανοχή σε αυτοαντιγόνα. Οι αυτοάνοσες διαταραχές χαρακτηρίζονται από αποτυχία του ανοσιακού συστήματος να διατηρήσει την ανοχή του σε αυτά, ενώ στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα ανασταλτικά συνδιεγερτικά μόρια είναι κρίσιμα στην ανάπτυξη αυτοανοσίας. Βλάβη ή λειτουργική απενεργοποίηση τέτοιων μορίων προάγει την αυτοανοσία ενώ πολυμορφισμοί σε γονίδια που τα κωδικοποιούν σχετίζονται με γενετική προδιάθεση για εμφάνιση αυτοάνοσων καταστάσεων¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Το CTLA4 αποτελεί ένα μόριο που εκφράζεται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων και παίζει κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη αυτοάνοσης παθολογίας. Ο μηχανισμός δράσης του αντιπροσωπεύει το καλύτερα χαρακτηρισμένο ανασταλτικό μονοπάτι ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών και την παραγωγή κυτταροκινών, είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ανοχή. Γενικά το μονοπάτι του CD28/CTLA4 είναι ένα πρωτότυπο σηματοδοτικό μονοπάτι. Όταν τα T-λεμφοκύτταρα λαμβάνουν ανεπαρκή συνδιέγερση από το CD28 μέσω της σύνδεσής του με τα μόρια CD80/B7-1 και CD86/B7-2 καθίστανται ανεργικά ή αποπίπτουν. Το CTLA4 μετάγει ανταγωνιστικό σήμα για τη συνδιέγερση μέσω του CD28, αφού συνδέει επίσης τις πρωτεΐνες της οικογένειας B7. Σε αντίθεση με το CD28, που εκφράζεται ιδιосуστατικώς στους περισσότερους πληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων, τόσο σε ηρεμία όσο και μετά την ενεργοποίησή τους, το CTLA4 δεν εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων σε ηρεμία, αλλά διατηρείται σε ενδοκυττάρια κυστίδια. Έτσι μετά την ενεργοποίηση, η έκφραση του CTLA4 προκύπτει τόσο από *de novo* σύνθεση πρωτεΐνης όσο και από απελευθέρωση και κατεύθυνση ήδη υπάρχουσας πρωτεΐνης στην επιφάνεια του κυττάρου. Η έκφραση του CTLA4 δεν επάγεται μόνο από την αναγνώριση του αντιγόνου, αλλά και από τη σηματοδότηση μέσω του CD28. Πράγματι, πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι απαιτείται πυροδότηση του CD28 για μέγιστη έκφραση και ανασταλτική λειτουργία του μορίου^{169,170}.

Η ικανότητα του CTLA4 να περιορίζει την T-εξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση το καθιστά ένα σημαντικό στόχο στη θεραπεία όγκων^{171,172}, ενώ γενετικές μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένων των διαλυτών και των ανεξάρτητων από τους συνδέτες μορφών του, συσχετίστηκαν με την αυτοανοσία¹⁷³⁻¹⁷⁵. Παρόλο που η σημασία του στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος είναι αδιαμφισβήτητη, η ανακάλυψη της λειτουργίας του αποδείχθηκε ασυνήθιστα δύσκολη. Εν μέρει, αυτό αντικατοπτρίζει την πολυπλοκότητα του συστήματος του CTLA4¹⁷⁶. Επιπλέον, το γεγονός ότι το CTLA4 εκφράζεται ιδιосуστατικώς στα Tregs έχει εγείρει το ερώτημα κατά πόσο είναι σημαντικό για τη λειτουργία τους.

3.1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ CTLA4

Το CTLA4 ή CD152 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 34kDa που ανήκει στην οικογένεια των μορίων που συνδέουν τις πρωτεΐνες B7 (CD80/B7-1 και CD86/B7-2), όπως το CD28 και το ICOS^{166,177}. Ανακαλύφθηκε κατά την επιλεκτική σάρωση cDNA βιβλιοθηκών κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων και περιγράφηκε σαν μία πρωτεΐνη 223 αμινοξέων που ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών¹⁷⁸. Το μόριο που εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου υπόκειται σε διμερισμό όπου τα δύο τμήματα του διμερούς συνδέονται με δισουλφίδια. Η περιοχή που συνδέει τις πρωτεΐνες B7 βρίσκεται στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου και κάθε διμερές μπορεί να συνδέσει δύο ανεξάρτητα ομοδιμερή B7-1 ή B7-2, σχηματίζοντας μία γραμμική δομή που ομοιάζει με φερμουάρ (zipper-like) μεταξύ μορίων B7 και ομοδιμερών CTLA4. Μονομερείς μορφές έχουν επίσης αναφερθεί¹⁷⁹⁻¹⁸³.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CTLA4 χαρτογραφήθηκε το 1988 στο χρωμόσωμα 2 στην περιοχή q33. Περιγράφηκε αρχικά να αποτελείται από 3 εξόνια. Οι 5' και 3'-UTR περιοχές στο cDNA δεν είχαν μελετηθεί επακριβώς και με την ανακάλυψη της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το πεπτίδιο σήματος, η δομή του γονιδίου αναθεωρήθηκε, με το εξόνιο 1 να κωδικοποιεί το πεπτίδιο σήματος, το εξόνιο 2 τη θέση πρόσδεσης των αντίστοιχων συνδετών και τα εξόνια 3 και 4 τη διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή του μορίου, αντίστοιχα^{184,185}. Συγκριτικές μελέτες της αλληλουχίας της ανθρώπινης πρωτεΐνης και αυτής του ποντικού, έδειξαν μεγάλη ομολογία κωδικοποιούσας και μη κωδικοποιούσας περιοχής και διατήρηση αμινοξέων στην κυτταροπλασματική περιοχή, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι το CTLA4 έχει μία κρίσιμη ρυθμιστική λειτουργία.

Στην περιοχή q33 του χρωμοσώματος 2 χαρτογραφείται και το γονίδιο που κωδικοποιεί το CD28. Η συνολική ομολογία της αλληλουχίας μεταξύ του CD28 και του CTLA4 είναι περίπου 20% αλλά εμφανίζουν ένα 31% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα CD28 και CTLA4 έχουν επίσης συνδεθεί σε μοριακό επίπεδο επειδή έχει βρεθεί ότι απέχουν μόλις 25-150 kb¹⁸⁶. Αυτές οι αξιοσημείωτες ομολογίες και η απόσταση μεταξύ των γονιδίων καταδεικνύουν ότι το CD28 και το CTLA4 είναι προϊόντα γονιδιακού διπλασιασμού. Παρόλα αυτά, φαίνεται να έχουν αρκετά διακριτούς ρόλους στη ρύθμιση των T-κυτταρικών απαντήσεων^{187,188}.

3.1.1. ΤΟ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ ΣΤΟ CTLA4

Το μετάγραφο του ανθρώπινου *CTLA4* μπορεί να υποστεί εναλλακτικό μάτισμα. Από αυτό προκύπτει ένα full-length mRNA που περιλαμβάνει τα εξόνια 1-4 (fICTLA4), ένα μετάγραφο που κωδικοποιεί τη διαλυτή μορφή του μορίου (sCTLA4), που εντοπίζεται στον ορό και δεν περιέχει το εξόνιο 3 και ένα μετάγραφο που κωδικοποιεί μόνο τα εξόνια 1 και 4. Ο χρόνος

ημιζώης του mRNA που κωδικοποιεί το sCTLA4 είναι μικρότερος από αυτόν του fCTLA4. Τα T-λεμφοκύτταρα των ποντικών μπορούν να εκφράζουν ένα ακόμη μετάγραφο που είναι γνωστό σαν «ανεξάρτητο από το συνδέτη» CTLA4 (ligand-independent CTLA-4 – liCTLA-4), που περιέχει τα εξόνια 1, 3, 4¹⁸⁹⁻¹⁹².

3.2. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CTLA4

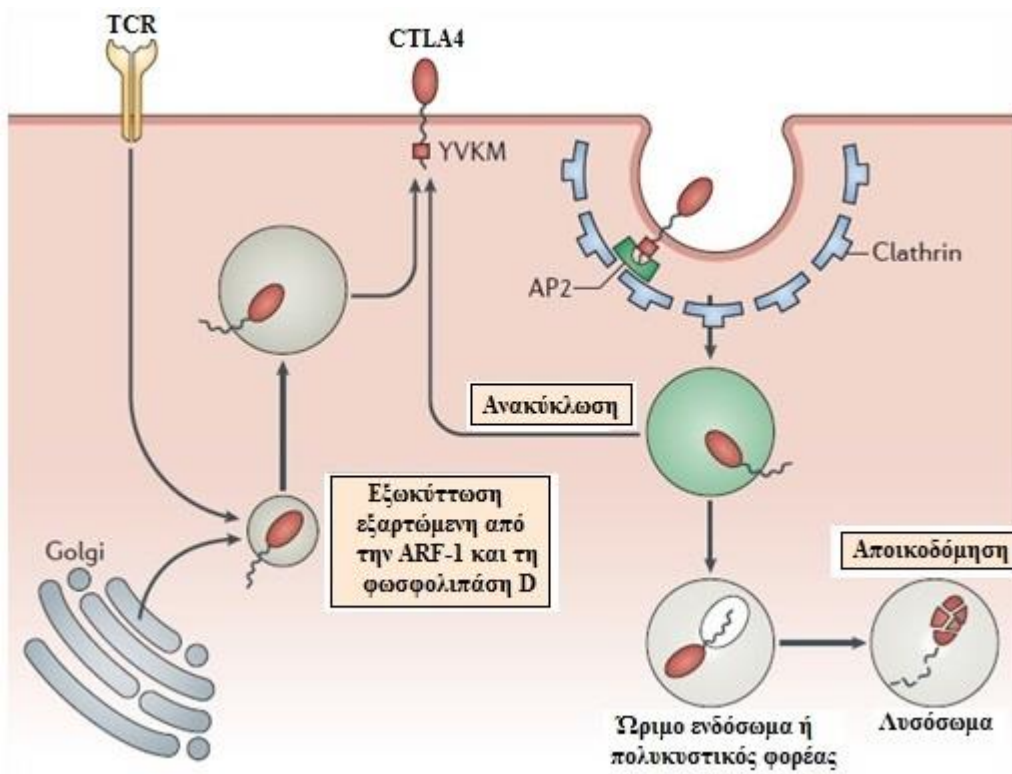
Η μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του CTLA4 είναι μόνο μερικώς γνωστή. Μπορεί να εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα NF-AT επειδή η διαμόρφωση των επιπέδων του NF-AT σχετίζεται άμεσα με την έκφραση του γονιδίου. Επιπλέον, η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-AT με κυκλοσπορίνη A προκαλεί μια αξιοσημείωτη μείωση στην μεταγραφή του γονιδίου, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα επιφέρει και η αναστολή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα mTOR από ραπαμυκίνη. Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι ο NF-AT και μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας FOXO συνδέονται στην περιοχή του υποκινητή του *CTLA4*. Τέλος, η έκφραση του *CTLA-4* επιδέχεται ανοδική ρύθμιση από την cAMP, προτείνοντας μια ρύθμιση της μεταγραφής του *CTLA-4* εξαρτώμενη από το cAMP¹⁷⁷.

3.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ CTLA4

Παρόλο που τόσο το CD28 όσο και το CTLA4 βρίσκονται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων, έχουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης. Το CD28 εκφράζεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στην πλασματική μεμβράνη των περισσότερων CD4+ και σχεδόν στο 50% των CD8+ T-λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, το CTLA4 δε φαίνεται να εκφράζεται στα T-λεμφοκύτταρα σε ηρεμία, αλλά η έκφρασή του επιδέχεται ανοδική ρύθμιση μετά την ενεργοποίηση και την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο¹⁸². Η έκφραση του CTLA4 φαίνεται να περιορίζεται στα T-λεμφοκύτταρα, παρόλο που έχει αναφερθεί και σε B-λεμφοκύτταρα και πρόσφατα εντοπίστηκε στην επιφάνεια των μονά και διπλά θετικών θυμοκυττάρων¹⁷⁸.

Το mRNA που κωδικοποιεί το CTLA4 είναι ανιχνεύσιμο μέσα σε μία ώρα από την ενεργοποίηση του κυττάρου και κορυφώνεται περίπου 24-36 ώρες όταν το CTLA4 εκφράζεται πλέον στην επιφάνεια του κυττάρου. Πιθανώς, το βασικότερο χαρακτηριστικό του CTLA4 είναι ο εντοπισμός του σε ενδοκυττάρια κυστίδια. Η αποθήκευσή του εκεί απαιτεί την αλληλεπίδρασή του με την μ2 υπομονάδα του συμπλέγματος της πρωτεΐνης-προσαρμογέα της κλαθρίνης AP2¹⁹³⁻¹⁹⁷. Μετά την ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη αυξάνει σταθερά σε συγκέντρωση και αποθηκεύεται στα κυστίδια αυτά. Παρόλο που τα κυστίδια είναι παρόμοια με τα λυσοσώματα¹⁹⁸, μπορούν να εμφανιστούν στην επιφάνεια του κυττάρου μέσα σε 8 ώρες από τη στιγμή της ενεργοποίησης¹⁷⁵. Η ενεργοποίηση του TCR προωθεί τη μετακίνηση του CTLA4 από τα ενδοκυττάρια κυστίδια στην επιφάνεια του κυττάρου και η

πρωτεΐνη είναι ανιχνεύσιμη έως και μία εβδομάδα ηρεμίας μετά. Η έκφραση στην επιφάνεια του κυττάρου δε φτάνει στο μέγιστο παρά μόνο 48-72 ώρες μετά την ενεργοποίηση. Ωστόσο, ακόμη και μετά την έκφραση στην επιφάνεια του κυττάρου, το μόριο συνεχίζει να ενδοκυτταρώνεται μέσα σε κυστίδια επικεκαλυμμένα με κλαθρίνη με αποτέλεσμα μόνο ένα μικρό ποσοστό του CTLA4 να βρίσκεται στην επιφάνεια σε κατάσταση ηρεμίας (περίπου 10%)^{194,198}. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης του CTLA4 στη θέση 164, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνδεσή του από την AP2 σαν απάντηση στην ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου¹⁹³, οδηγώντας σε σταθερή κυτταρική έκφραση στα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα ή T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα. Παρόλα αυτά, η ενδοκυττάρωση συνεχίζεται ακολουθώντας την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Η πορεία των μορίων του CTLA4 μετά την ενδοκυττάρωση παραμένει, σε μεγάλο βαθμό, άγνωστη – αρκετές μελέτες σημειώνουν το γεγονός ότι εντοπίζεται CTLA4 στα λυσοσώματα, υποστηρίζοντας ότι αποικοδομείται^{198,199}.



Εικόνα 10. Ενδοκυττάρια μεταφορά του CTLA4. Χαρακτηριστικό της έκφρασης του CTLA4 αποτελεί η μετακίνησή του από και προς την κυτταρική μεμβράνη. Ως συνέπεια αυτού, σε τυχαία στιγμή, τα περισσότερα μόρια CTLA4 βρίσκονται ενδοκυττάρια. Μετά τη σύνθεσή του, το CTLA4 μεταφέρεται από το σύστημα Golgi στην πλασματική μεμβράνη με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τα ένζυμα ARF1 και φωσφολιπάση D. Τα κυστίδια που περιέχουν CTLA4 συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη, απελευθερώνοντας CTLA4 στην επιφάνεια του κυττάρου. Στη συνέχεια, τα μόρια CTLA4 προσλαμβάνονται από κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη, αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο AP2. Η

ενδοκυττάρωση του επιφανειακού CTLA4 είναι γρήγορη, με περισσότερο από το 80% να ενδοκυτταρώνεται σε λιγότερο από 5 λεπτά. Η πορεία του CTLA4 μετά την ενδοκυττάρωση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, παρόλο που κάποια μόρια ανακυκλώνονται και επιστρέφουν στην κυτταρική μεμβράνη και κάποια αποικοδομούνται στα λυσοσώματα. Το CTLA4 που ενδοκυτταρώνεται εντοπίζεται, επίσης, σε μη λυσοσωμικά κυστίδια που βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα και μπορεί να είναι ώριμα ενδοσώματα ή πολυκυστικοί φορείς¹⁷⁰.

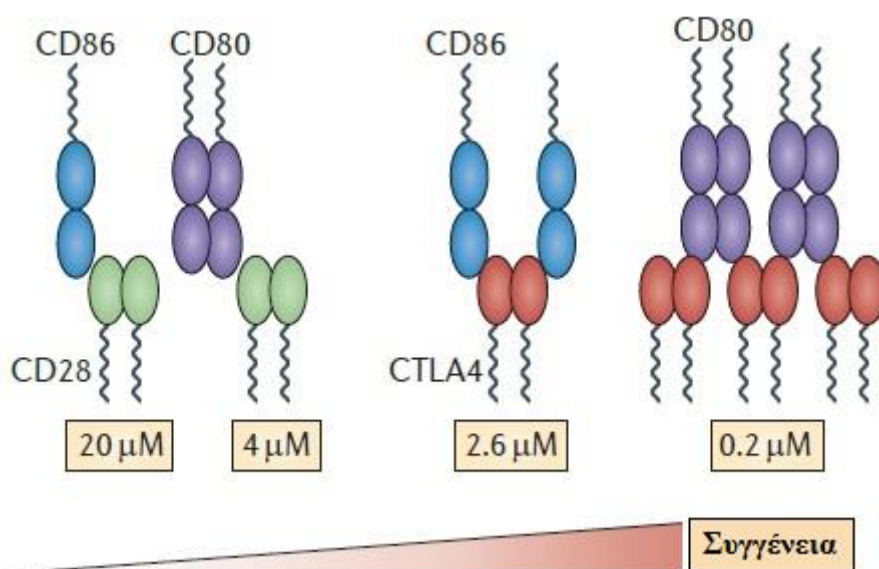
Η αυστηρή ρύθμιση της κατανομής και η περιορισμένη έκφραση του CTLA4 στην επιφάνεια του κυττάρου υποδεικνύει ότι αποτελεί σημαντικό σημείο ελέγχου για τη ρύθμιση της ανασταλτικής του λειτουργίας στα T-λεμφοκύτταρα. Μία ποσοτική αύξηση στην επιφανειακή έκφραση προτάθηκε να συσχετίζεται με τον αριθμό των κυτταρικών κύκλων²⁰⁰. Αυτό υπονοεί ότι ο μηχανισμός της μεταγραφής του CTLA4 έχει τη δυνατότητα να μετρά κυτταρικούς κύκλους και να μετατρέπει την πληροφορία σε έκφραση. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας μία ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης του CTLA4 στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων με την ευαισθησία ανίχνευσης λιγότερων από 200 μορίων ανά κύτταρο, αποδείχθηκε ότι η έκφραση είναι ανεξάρτητη του ιστορικού του πολλαπλασιασμού του κυττάρου και είναι αποκλειστικά εξαρτώμενη από το χρόνο που πέρασε από την ενεργοποίησή του, ενώ ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου δεν αποτελεί υποχρεωτική προϋπόθεση για την έκφρασή του²⁰¹.

Η λειτουργική σημασία του περίπλοκου συστήματος συνεχούς μετακίνησης του μορίου από και προς την επιφάνεια του κυττάρου μέσω κυστιδίων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Μία υπόθεση είναι ότι εμποδίζοντας την έκφρασή του στην επιφάνεια, επιτρέπει στο CD28 να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικότερα με τους συνδέτες του, προωθώντας την T-κυτταρική ενεργοποίηση. Εναλλακτικά, η δυνατότητα του κυττάρου να αλλάζει την έκφραση του CTLA4 στην επιφάνεια του κυττάρου τόσο άμεσα σαν απάντηση στην ενεργοποίηση του TCR παρέχει ένα πολύ καλά οργανωμένο ανασταλτικό σύστημα ή ακόμη, η ίδια η έκφραση του CTLA4 στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να αποτελεί ανασταλτικό σήμα, ανεξάρτητα από τη σύνδεση του μορίου με το συνδέτη¹⁷⁵. Υπάρχουν συντηρημένες αλληλουχίες στην κυτταροπλασματική περιοχή του μορίου των θηλαστικών που ρυθμίζουν αυτήν την ισορροπία. Αντιθέτως, μόρια CTLA4 από πρωτεύοντα είδη δεν εμφανίζουν αυτήν την αλληλουχία, το οποίο και οδηγεί στην άποψη ότι η ικανότητά του να ενδοκυτταρώνεται αποτελεί ένα επίκτητο χαρακτηριστικό που, εκ των υστέρων, διατηρήθηκε.

3.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΟΥΣ ΣΥΝΔΕΤΕΣ

Το CD28 και το CTLA4 μοιράζονται τους συνδέτες CD80/B7-1 και CD86/B7-2. Ακόμη και στα ενεργοποιημένα κύτταρα, η μέγιστη έκφραση του CTLA4 είναι μόνο το 2-3% αυτής του CD28.

Ωστόσο, η συγγένεια και η ισχύς σύνδεσής του με τους συνδέτες είναι έως και 2500 φορές μεγαλύτερη από αυτές του CD28²⁰²⁻²⁰⁴, ενώ γενικότερα, η συγγένεια σύνδεσης του CTLA4 με το CD80, στα 0,2 μM είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν περιγραφεί να εμφανίζονται μεταξύ των μορίων επιφανείας και των συνδετών τους. Με αυτόν τον τρόπο, παρόλη τη χαμηλή συγκέντρωση του υποδοχέα, εξαιτίας της μεγάλης συγγένειας με τους συνδέτες, θεωρείται πολύ ισχυρός ρυθμιστής της λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων. Οι κρυσταλλικές δομές, η μελέτη της κινητικής του CTLA4 και η ανάλυση της συγγένειας με την οποία προσδένει τους συνδέτες δείχνουν ότι μονομερή CD86 συνδέονται σε διμερή CTLA4, ενώ διμερή CD80 συνδέονται με δύο γειτονικά διμερή CTLA4, δημιουργώντας μια δομή που ομοιάζει με συρματοπλεγμα. Αντίθετα, το CD28 είναι μονοσθενές και είναι ικανό να συνδέει ένα μόριο CD80 ή CD86 κάθε φορά²⁰⁵⁻²⁰⁸.



Εικόνα 11. Αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων CD28 και CTLA4 με τους κοινούς συνδέτες τους. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τη σταθερά διάστασης Kd όπως αναφέρεται από τους Collins *et al*¹⁷⁰.

Οι συνδέτες εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών. Αυτή η περιορισμένη έκφραση των συνδετών επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η ρύθμιση των T-κυτταρικών απαντήσεων από τα μόρια CD28 και CTLA-4 ασκείται μόνο από εξειδικευμένα εξ' επαγγέλματος αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα CD80 και CD86 έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες²⁰⁹, παρά τις διαφορές που παρουσιάζουν στους παράγοντες που απαιτούνται για τη σύνδεσή τους, την κινητική τους και τη διαφορετική συγγένεια για το CD28 και το CTLA-4. Διαφορές στις λειτουργίες τους φαίνεται να υπάρχουν λόγω διαφορετικής κινητικής της έκφρασης στους διάφορους τύπους κυττάρων¹⁸⁷. Το CD86 εκφράζεται ιδιοσυστατικώς στα δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και B-κύτταρα και η

έκφρασή του επιδέχεται ανοδική ρύθμιση μετά την ενεργοποίηση. Το CD80 δεν εντοπίζεται στα κύτταρα σε ηρεμία και εκφράζεται μόνο μετά την ενεργοποίηση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Επειδή μόνο το CD86 εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου μετά την ενεργοποίηση του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, είναι απαραίτητο κατά την έναρξη της ανοσιακής απάντησης, πράγμα που αποδεικνύεται από δεδομένα που δείχνουν τροποποιημένη ανοσιακή ρύθμιση σε CD86 knockout ποντίκια ^{210,211}.

3.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα που περιγράφουν τους μηχανισμούς με τους οποίους το μόριο του CTLA4 επιτελεί την ανασταλτική του δράση και για την υποστήριξη καθενός από αυτά υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες. Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο αν τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης του υποδοχέα είναι άμεσα στο T-λεμφοκύτταρο ή έμμεσα, με τη μεταγωγή σημάτων σε αυτό μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών ή των Tregs ¹⁷⁰.

3.5.1. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CTLA4

3.5.1.1. ΤΟ CTLA4 ΑΝΤΑΓΩΝΙΖΕΤΑΙ ΤΟ CD28 ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΔΕΤΩΝ

Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει τον ανταγωνισμό του επαγωγικού συνδιεγερτικού σήματος που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του CD28 με τα μόρια B7. Ο ανταγωνισμός προκύπτει από το γεγονός ότι το CTLA4 έχει μεγαλύτερη συγγένεια και συνδέεται με μεγαλύτερη ισχύ με τα μόρια B7 από ότι το CD28.

Η πυροδότηση του CD28 ενισχύει τη συσσώρευση σχεδίων και μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο AP-1 και ο NF-AT στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να επάγεται ισχυρά η έκφραση IL-2 ²¹². Το CD28 ενισχύει επίσης τη σταθερότητα του mRNA γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, για παράδειγμα IL-2 και INFγ ²¹³, όπως επίσης και την έκφραση G1-κινασών, που αποτελούν προϋπόθεση για τον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον, η επαγωγή της παραγωγής IL-2 οδηγεί σε αυτοκρινή ρύθμιση της ενεργοποίησης του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου. Το σήμα από την IL-2 επάγει την αποκωδικοποίηση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p27 και την έκφραση G1-κινασών, που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων ²¹⁴. Τέλος, η σηματοδότηση μέσω του CD28 προάγει την επιβίωση των T-λεμφοκυττάρων, τη διαφοροποίηση σε T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και την ισοτυπική μεταστροφή που προκύπτει από την αλληλεπίδραση των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων με τα B-λεμφοκύτταρα.

Το CTLA4 φαίνεται να είναι ένας σημαντικός αναστολέας της T-κυτταρικής ενεργοποίησης. Ακόμη και 4 ώρες μετά την έναρξη της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων, διασταυρούμενη

σύνδεση με συγκεκριμένα αντισώματα έχει δείξει ότι εκφράζεται λειτουργικά από τουλάχιστον κάποια T-λεμφοκύτταρα και αποτρέπει την πλήρη κυτταρική ενεργοποίηση. Το κύριο αποτέλεσμα της δέσμευσης του CTLA4 είναι η αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την IL-2 εμποδίζοντας τη είσοδο του μεταγραφικού παράγοντα NFAT στον πυρήνα²¹⁴. Αυτό μπορεί να είναι συνέπεια της παρεμπόδισης της T-κυτταρικής ενεργοποίησης γενικότερα. Παρόλα αυτά, το CTLA4 αναστέλλει, επίσης, την έκφραση βασικών στοιχείων του κυτταρικού κύκλου όπως η κυκλίνη D3, η Cdk4 και Cdk6, που είναι μερικώς εξαρτώμενες από την IL-2 και επιδέχονται μερικώς ανοδική ρύθμιση, ανεξάρτητα. Η έκφραση των επαγόμενων από την ενεργοποίηση μορίων όπως ο CD69 και CD25 επίσης αναστέλλεται από τη διασταυρούμενη σύνδεση του CTLA4²¹⁵.

Ο ανασταλτικός του ρόλος αποδεικνύεται από το φαινότυπο ποντικών που δεν εκφράζουν CTLA4 και αναπτύσσουν μαζικά λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο, μία διαταραχή που χαρακτηρίζεται από πολυκλωνικό πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων και πρόωρη θνησιμότητα^{216,217}. Ο συνυποδοχέας μεταβάλλει το απαιτούμενο κατώφλι των σημάτων που χρειάζονται για την παραγωγή κυτταροκινών από τα T-λεμφοκύτταρα και τον πολλαπλασιασμό τους. Επιπλέον, η δέσμευσή του μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικά αποτελέσματα στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και να εμποδίσει τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και τον πυρηνικό παράγοντα των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (NF-AT) και AP-1.

Η αποτελεσματικότητα του ανταγωνισμού εξαρτάται από την ποσότητα κάθε συνδέτη και την έκφραση των δύο υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου. Κατά βάση, όταν το CTLA4 κορέννεται, οι συνδέτες που απομένουν θα είναι διαθέσιμοι για την ενεργοποίηση του CD28, έτσι ώστε σε περίπτωση ανοδικής ρύθμισης της έκφρασης των συνδετών να προωθείται η ενεργοποίηση του CD28¹⁷⁰.

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο το CTLA4 αποτελεί έναν ανασταλτικό ρυθμιστή της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων χωρίς στην πραγματικότητα να μετάγει κάποιο ανασταλτικό σήμα. Ένας περιορισμός αυτού του μηχανισμού δράσης αποτελεί το γεγονός ότι το CTLA4 δεν εκφράζεται από συμβατικά T-λεμφοκύτταρα πριν την ενεργοποίησή τους, συνεπώς προτού έχουν πάρει το σήμα για πολλαπλασιασμό²¹⁸⁻²²⁰. Κατά αυτόν τον τρόπο, δεν είναι πιθανό να μπορεί να γίνει αναστολή της πρωταρχικής διέγερσης (priming) των T-λεμφοκυττάρων. Παρά τον περιορισμό αυτόν, για την υποστήριξη αυτού του μοντέλου πραγματοποιήθηκαν πολυάριθμες μελέτες. Μελετήθηκαν μόρια τα οποία εμφανίζουν ελλείψεις ή μεταλλάξεις στην κυτταροπλασματική περιοχή τους και συνεχίζουν να εμφανίζουν ανασταλτική δράση. Ποντίκια στα οποία αρχικά δεν εκφραζόταν το CTLA4 και τα οποία εμφάνιζαν λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο, όταν έγινε επαγωγή της έκφρασης του μορίου που εμφάνιζε βλάβες στην κυτταροπλασματική περιοχή, παρουσίασαν βελτίωση, οδηγώντας στο

συμπέρασμα ότι τα ανασταλτικά αποτελέσματα που εμφανίζονται δεν απαιτούν ακέραιη την κυτταροπλασματική περιοχή του μορίου και επιπλέον η διαλυτή μορφή του μορίου (sCTLA4) μπορεί να είναι ικανή να παρεμποδίζει τη δέσμευση του CD28. Ωστόσο το γεγονός ότι δεν ανέστρεψε εντελώς το φαινότυπο των πειραματόζωων, ενισχύει την υπόθεση ότι η κυτταροπλασματική περιοχή απαιτείται για την εμφάνιση πλήρους δράσης. Τέλος, σε μοντέλο λιπιδιακής διπλοστοιβάδας, το CTLA4 φάνηκε να εκτοπίζει το CD28 από την περιοχή cSMAC¹, εφόσον είχε προηγηθεί στρατολόγησή του εξαρτώμενη από τους συνδέτες, ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση των συνδετών¹⁷⁰.

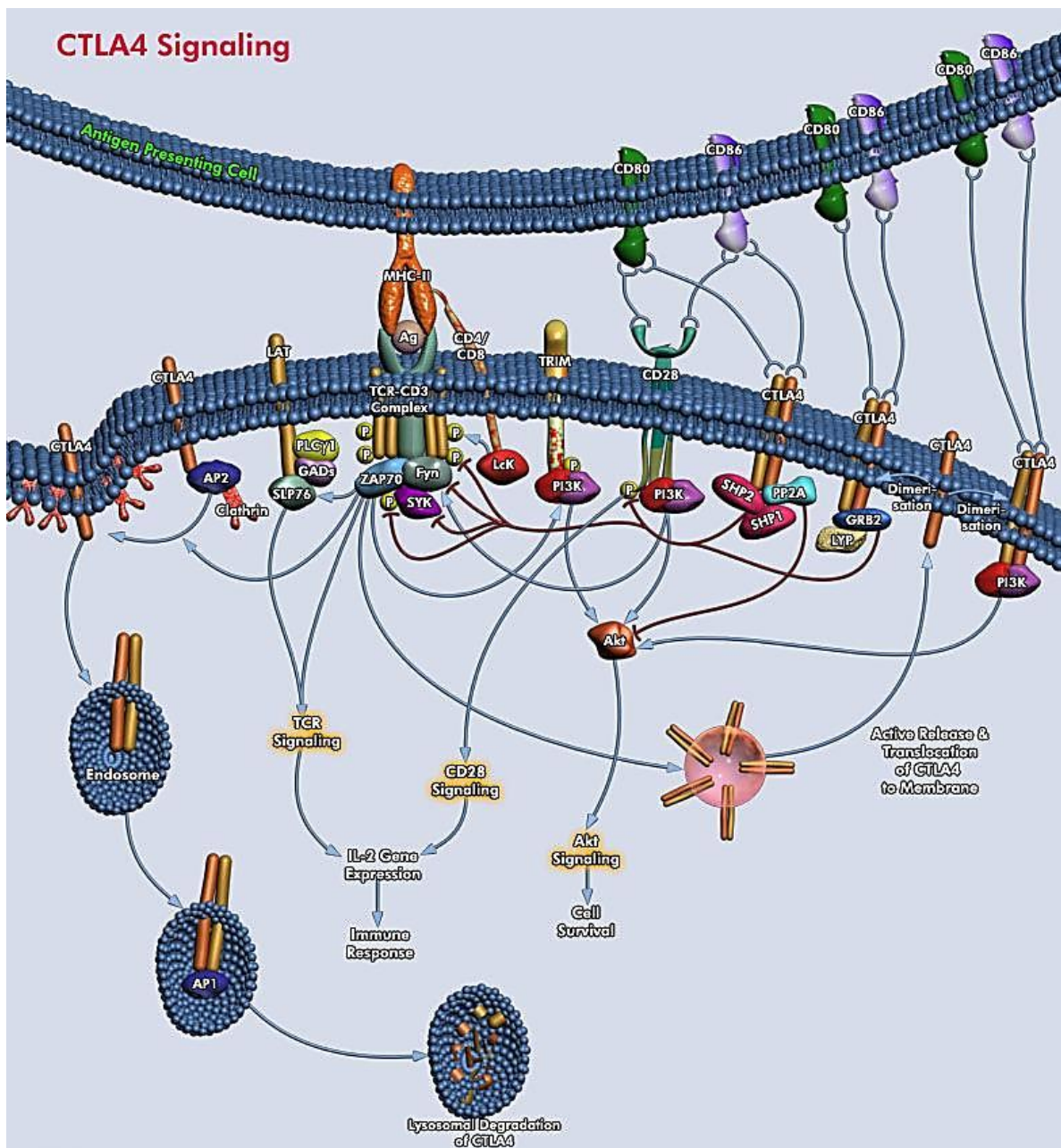
3.5.1.2. ΤΟ CTLA4 ΜΕΤΑΓΕΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Σε αυτό το μοντέλο, το CTLA-4, μετά την ενεργοποίησή του από τους συνδέτες του, φαίνεται να στρατολογεί φωσφατάσες, όπως οι SHP1 και SHP2, η PP2A και η SYP (PTPN11) και να μειώνει τη φωσφορυλίωση αρκετών πρωτεϊνών-κλειδιά στον καταρράκτη της σηματοδότησης μέσω του TCR, ενώ είναι, επίσης, ικανό να αλληλεπιδρά άμεσα με το σύμπλοκο TCR-CD3. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων από το σύμπλοκο MHCII που φέρεται στα εξ' επαγγέλματος αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι μία περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει έναν καταρράκτη γεγονότων, το πρώτο από τα οποία είναι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών κινασών PTKs που ανήκουν στις οικογένειες των Src και SYK/ZAP70. Η έναρξη της T-κυτταρικής ενεργοποίησης εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση των ITAMs στο σύμπλοκο TCR-CD3, από την Lck που βρίσκεται προσκολλημένη στο CD4 ή CD8 και την Fyn, και οι δύο από τις οποίες είναι μέλη της οικογένειας των Src. Οι φωσφορυλιωμένες ITAMs στη συνέχεια συνδέουν τις περιοχές SH2 της ZAP70/SYK. Αυτό με τη σειρά του έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ZAP70 και της SYK, που πολλαπλασιάζει τα σήματα από τον TCR μέσω της ενεργοποίησης πρωτεϊνών-προσαρμογέων όπως οι, SLP76, GADS, TRIM και ενζυματικών ενδιάμεσων όπως η PLCγ1 με σκοπό να πυροδοτηθεί η ανοσιακή απάντηση. Το CTLA4 αλληλεπιδρά με τις ITAMs που βρίσκονται στον TCR και στο CD3 και ουσιαστικά διακόπτει τον καταρράκτη βιοχημικών σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Οι ZAP70, SYK, Fyn είναι επίσης πιθανοί στόχοι άμεσης ανασταλτικής αλληλεπίδρασης του CTLA4, ενώ η έκφραση του CTLA4 φάνηκε να επηρεάζει τη διαμόρφωση ομάδων μορίων (clusters) που περιέχουν ZAP70.

Άλλες μελέτες αναφέρουν ανασταλτικά αποτελέσματα του CTLA4 που εμπλέκουν λιπιδιακές σχεδίες, προτείνοντας ότι η λειτουργία του CTLA4 εμφανίζεται σε πολύ πρώιμα στάδια της

¹ Περιοχή cSMAC: Κατά τη διάρκεια της T-κυτταρικής ενεργοποίησης, οι TCRs συγκεντρώνονται σε μια συστάδα μορίων, γνωστή σαν cSMAC, στα σημεία διεπαφής μεταξύ του T-λεμφοκυττάρου και του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. Η περιοχή cSMAC περιτοίχεται από ένα δακτύλιο LFA1, γνωστό και σαν pSMAC και αυτή η χαρακτηριστική οργάνωση των υποδοχέων (cSMAC και pSMAC) συνιστά την ώριμη ανοσολογική σύναψη.

ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων. Οι κινάσες της οικογένειας Src και οι υπόλοιπες λεμφοκυτταρικές κινάσες (RLK, γνωστές και σαν ΤΧΚ) φαίνεται να φωσφορυλιώνουν το CTLA4, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της PI3K στον υποδοχέα. Η στρατολόγηση και ενεργοποίηση της PI3K προτάθηκε να αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο στο μονοπάτι του CTLA4, επιτρέποντας στα ανεργικά κύτταρα να αποφύγουν τον αποπτωτικό θάνατο. Επιπλέον, Τ-λεμφοκύτταρα που δεν εκφράζουν CTLA4 εμφάνισαν αυξημένη δραστηριότητα ERK και JNK κινασών^{221,222}.



Εικόνα 12. Σηματοδότηση μέσω του CTLA4.

(Από: <https://www.qiagen.com/gr/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details?pwid=127>)

3.5.1.3. ΤΟ CTLA4 ΜΕΤΑΓΕΙ ΣΗΜΑΤΑ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΔΕΤΗ

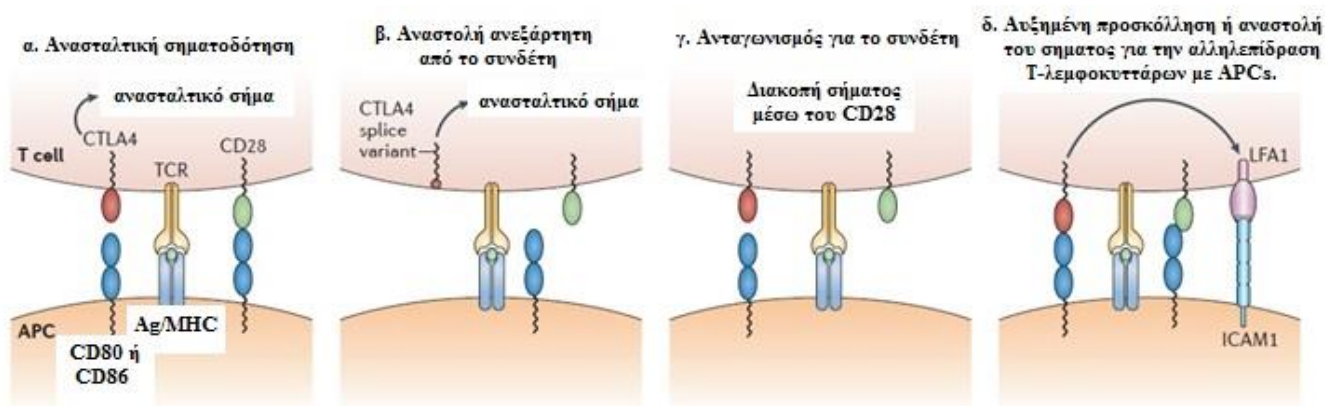
Μία παραλλαγή του μοντέλου που υποστηρίζει ότι το CTLA4 μετάγει ανασταλτικά σήματα προέκυψε από την ανακάλυψη ενός μετάγραφου στο οποίο δεν εντοπίζεται η περιοχή που κωδικοποιεί το εξόνιο 2. Στο μόριο που προκύπτει από τη μετάφραση αυτού του μετάγραφου δεν εντοπίζεται εξωκυττάρια περιοχή που να συνδέει τους συνδέτες και βρίσκεται αγκιστρωμένο στην κυτταροπλασματική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης^{173,174}. Οποιοσδήποτε ανασταλτικός ρόλος αυτού του μορίου οδηγεί σε μία υπόθεση μεταγωγής σήματος ανεξάρτητης από το συνδέτη. Αρκετές μελέτες αξιολόγησαν το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης αυτού του μετάγραφου στα T-λεμφοκύτταρα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οδηγεί σε αναστολή των T-κυτταρικών απαντήσεων και καθυστέρηση του λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου σε ποντίκια με ανεπάρκεια σε CTLA4^{174,223–225}. Έτσι, έκτοπη έκφραση της κυτταροπλασματικής περιοχής του CTLA4 φαίνεται να επιτελεί ανασταλτική λειτουργία απουσία συνδετών (CD80 και CD86).

Μειονέκτημα αυτού του μοντέλου είναι ότι προβλέπει ότι όλα τα μόρια CTLA4 με ακέραιες κυτταροπλασματικές περιοχές μετάγουν ανασταλτικά σήματα. Ωστόσο, τα ενεργοποιημένα κύτταρα εκφράζουν σημαντικά ποσά πρωτεΐνης και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται έντονα²²⁶. Έτσι, η φυσιολογική έκφραση της κυτταροπλασματικής περιοχής αυτή καθαυτή δεν μπορεί να είναι ανασταλτική. Επιπλέον, αυτό το μετάγραφο δεν έχει εντοπιστεί σε ανθρώπους, συνεπώς δεν μπορεί να συμμετέχει στη λειτουργία του CTLA4 στο ανθρώπινο ανοσιακό σύστημα.

3.5.1.4. Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΟΥ CTLA4 ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ

Για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, τα κύτταρα πρέπει να αλληλεπιδράσουν και να παραμείνουν σε επαφή με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για ικανό χρονικά διάστημα ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη σηματοδότηση. Μια πιο πρόσφατη πρόταση για το μηχανισμό δράσης του CTLA4 είναι η ιδέα ότι η δέσμευση του CTLA4 αυξάνει την προσκόλληση και τη δημιουργία συμπλεγμάτων όπου διαμεσολαβεί η LFA1 (γνωστή και σαν αLβ2 ιντεγκρίνη), ρυθμίζοντας ανοδικά την έκφραση και λειτουργία της LFA1.

Άλλες μελέτες προτείνουν ότι το CTLA4 καταργεί το σήμα που δίνεται για την παραμονή των T-λεμφοκυττάρων σε επαφή με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά να παραμένουν ενεργά αλλά να μην μπορούν να διεγερθούν¹⁷⁰.



Εικόνα 13. Ενδογενείς μηχανισμοί δράσης του CTLA4 ¹⁷⁰.

3.5.2. ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CTLA4

3.5.2.1. ΤΟ CTLA4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ IDO

Σε αυτό το μοντέλο, το CTLA4 που εκφράζεται από τα Τ-λεμφοκύτταρα μπορεί να παρέχει σήματα στα APCs μέσω του CD80 και CD86. Αυτή η σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα την ανοδική ρύθμιση της δραστηριότητας της IDO. Αυτό παρέχει στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα την ικανότητα να αποικοδομούν την τρυπτοφάνη με αποτέλεσμα να εμφανίζεται εντοπισμένη εξάντληση και επακόλουθη αναστολή του Τ-κυτταρικού πολλαπλασιασμού ²²⁷. Παρόλο που η φύση του σήματος δεν έχει διευκρινιστεί, σε αντίθεση έρχονταν δύο μελέτες για το αν η δυνατότητα της χμαιοειδούς πρωτεΐνης που αποτελείται από CTLA4 και ανοσοσφαιρίνη (CTLA4-Ig) να ενεργοποιεί την IDO εξαρτάται από την INF γ ^{228,229}. Επιπλέον, προτάθηκε ότι η CD28-Ig και η CTLA4-Ig μπορεί να εμφανίζουν αντίθετα αποτελέσματα στην ενεργοποίηση της IDO, με τη CD28-Ig να αυξάνει τη δυνατότητα των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων να ενεργοποιούν τα Τ-λεμφοκύτταρα ²³⁰. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι αντισώματα ειδικά για το CD80 και CD86 αναφέρονται να ενισχύουν τη δραστηριότητα της IDO, είναι δύσκολο να εξηγηθεί πώς ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο είναι ικανό να μετάγει αντίθετα σήματα μέσω του ίδιου υποδοχέα. Η υπόθεση αυτή περιπλέκεται ακόμη περισσότερο με την παρατήρηση ότι οι κυτταροπλασματικές περιοχές των CD80 και CD86 είναι βραχείς και η ακολουθία των αμινοξέων τους είναι ελάχιστα συντηρημένη μεταξύ των ποντικών και του ανθρώπου.

3.5.2.2. ΤΟ CTLA4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΑ Τ-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Η απλούστερη και πιο διαδεδομένη εξήγηση για τη ρύθμιση της Τ-κυτταρικής ενεργοποίησης εξωγενώς είναι η ενεργοποίηση των Tregs από το CTLA4. Τα Τ-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα αποτελούν ένα μικρό πληθυσμό (5-10%) και μπορούν να διαχωριστούν από τους άλλους πληθυσμούς επειδή εκφράζουν μία διαφορετική ισομορφή του CD45 ²³¹, καθώς και τα CD38 ²³²

και CD25²³³⁻²³⁶. Τα τελευταία χρόνια ενισχύεται πολύ η άποψη ότι η ύπαρξη του πληθυσμού αυτού είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ανοχής σε ιστούς του ίδιου οργανισμού όπως και για τη ρύθμιση των απαντήσεων σε αντιγόνα από το περιβάλλον, όπως καρκινικά αντιγόνα και μολυσματικούς παράγοντες²³⁷⁻²³⁹. Τα Tregs φαίνεται, επιπλέον, να εμπλέκονται και να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανοχής έναντι του εμβρύου κατά την κύηση²⁴⁰⁻²⁴³.

Βασικό στοιχείο στο ρυθμιστικό ρόλο των Tregs αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3, ο οποίος μετά την ενεργοποίησή του ρυθμίζει την έκφραση διάφορων γονιδίων που δίνουν στα Tregs τη δυνατότητα να επιτελέσουν τις ρυθμιστικές λειτουργίες τους. Η ομοιότητα ανάμεσα στο φαινότυπο των ποντικών με ανεπάρκεια σε FoxP3 και αυτών με ανεπάρκεια σε CTLA4 πυροδότησε το ενδιαφέρον για τη μελέτη του κατά πόσο τα δύο γονίδια λειτουργούν μέσω κοινών μονοπατιών και του ρόλου του CTLA4 στη λειτουργία των Tregs. Τελικά, ο FoxP3 φαίνεται να επάγει την έκφραση του γονιδίου *CTLA4*, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι το CTLA4 μπορεί να μεσολαβεί στην κατασταλτική λειτουργία των Tregs. Τα αποτελέσματα από μελέτες για την υποστήριξη της υπόθεσης αυτής οδήγησαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Η δέσμευση του CTLA4 από μονοκλωνικό αντίσωμα αναφέρεται να αυξάνει την παραγωγή του TGFβ και την εντόπισή του στα σημεία επαφής των κυττάρων που αλληλεπιδρούν. Το γεγονός ότι χιμαιρικά ποντίκια ως προς το μυελό των οστών δε νοσούν θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την προσπάθεια κυττάρων άγριου τύπου να ισοσταθμίσουν την έλλειψη της σύνθεσης της σε κύτταρα που στερούνται CTLA4 με την παραγωγή του TGFβ που εξαρτάται από το CTLA4. Ωστόσο, τα κύτταρα που στερούνται CTLA4 εμφανίζουν ίδια επίπεδα mRNA που κωδικοποιεί τον TGFβ σε σχέση με τα χιμαιρικά ποντίκια, ενώ παράλληλα, άλλοι ερευνητές δε φάνηκε να βρήκαν κάποια συσχέτιση του TGFβ στην καταστολή της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων όπου μεσολαβεί το CTLA4^{244,245}.

3.5.2.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ CTLA4

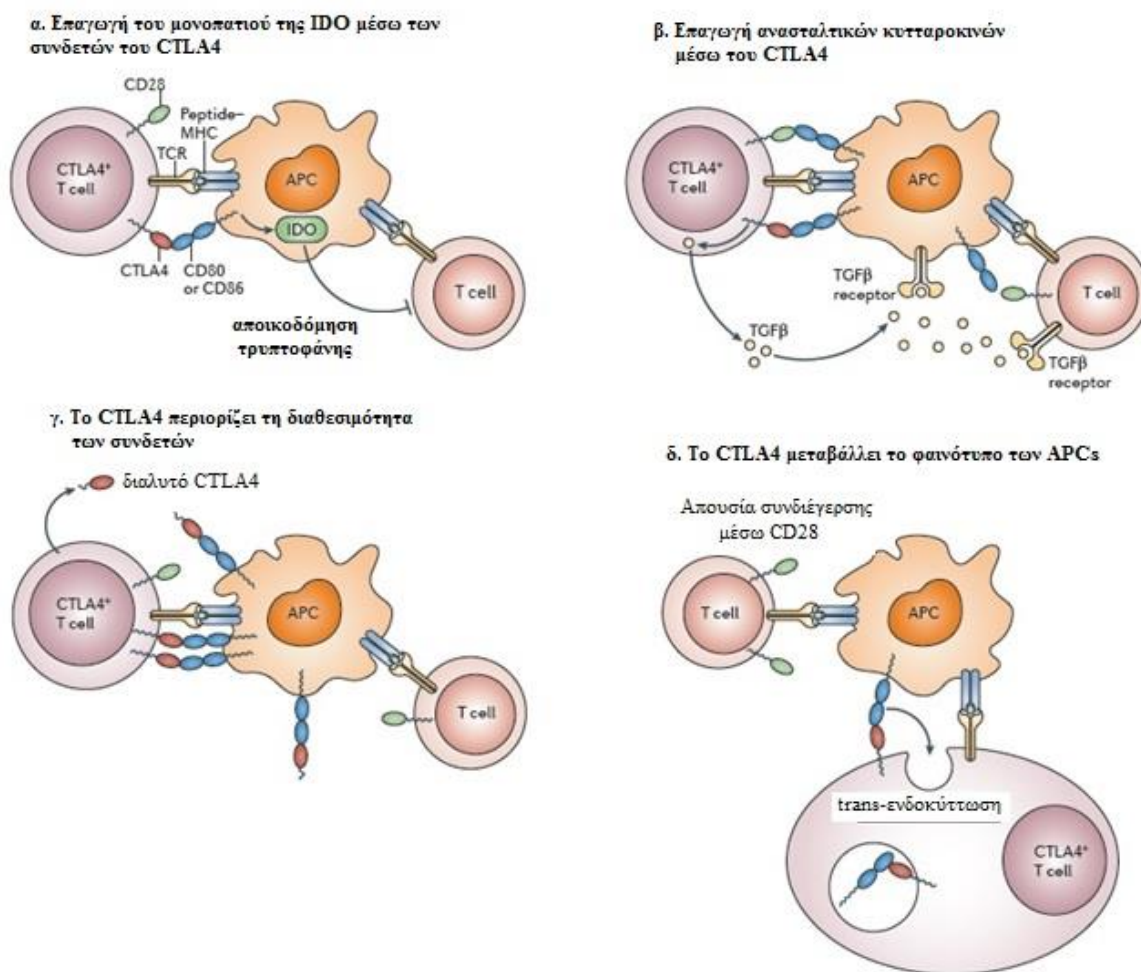
Η σκέψη ότι διαλυτά μόρια CTLA4 μπορεί να εκκρίνονται από τα T-λεμφοκύτταρα οδήγησε σε νέα προοπτική για το πώς λειτουργεί το μονοπάτι του CTLA4 και πώς η τροποποιημένη παραγωγή τέτοιων μορίων μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία σε αυτοάνοσες νόσους. Πράγματι, T-λεμφοκύτταρα από άτομα στα οποία εμφανίζεται το αλληλίο του CTLA4 που περιέχει τον CT60 πολυμορφισμό και ο οποίος συσχετίζεται με νόσο Grave's και με διαβήτη τύπου I, είχαν χαμηλότερα επίπεδα του μετάγραφου που κωδικοποιεί το διαλυτό CTLA4 σε σχέση με αυτά όπου εμφανιζόταν το φυσιολογικό αλληλίο¹⁷³. Παρά, όμως τον εντοπισμό της μειωμένης παραγωγής του, τα επίπεδα του μορίου φαίνονται αυξημένα σε άτομα με αυτοάνοσες νόσους σε σχέση με φυσιολογικά άτομα^{246,247}. Κάποιες άλλες ομάδες ερευνητών δεν κατάφεραν να συσχετίσουν την έκφραση του διαλυτού CTLA4 και του συγκεκριμένου πολυμορφισμού²⁴⁸⁻

²⁵⁰. Προς το παρόν, υπάρχει αβεβαιότητα για τους κυτταρικούς τύπους και τα συγκεκριμένα ερεθίσματα που έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ανασταλτικής ποσότητας CTLA4 και μένει να διευκρινιστεί ο ρόλος αυτής της ισομορφής στην ομοιοστάση του ανοσιακού συστήματος.

3.5.2.4. ΤΟ CTLA4 ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΙ ΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΩΝ APCs.

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν CTLA4 ή T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα μπορούν να μετάγουν σήμα για ενδοκύττωση υποδοχέων που εκφράζονται φυσιολογικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, οδηγώντας έτσι σε ανεπαρκή συνδιέγερση και επακόλουθη καταστολή των T-κυτταρικών απαντήσεων. Αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται με μία διαδικασία που καλείται trans-ενδοκύττωση, κατά την οποία η αλληλεπίδραση του CTLA4 με οποιονδήποτε από τους συνδέτες του οδηγεί σε ενδοκυττάρια μεταφορά των συνδετών από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο σε ένα κυστίδιο που περιέχει CTLA4 σε ένα T-λεμφοκύτταρο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτή η διαδικασία φαίνεται να αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης CTLA4, αφού η έκφραση του CTLA4 είναι ικανή να επιτελεί αυτή τη λειτουργία σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Μετά την ενδοκύττωση, οι συνδέτες που μεταφέρθηκαν στα κυστίδια υφίστανται αποικοδόμηση στα λυσοσώματα, όπου θα οδηγούνταν φυσιολογικά το CTLA4 που περιέχεται σε αυτά.

Το φαινόμενο της trans-ενδοκύττωσης φαίνεται να έχει περιγραφεί στον κλάδο της βιολογίας, αλλά να είναι καινούριο στην ανοσολογία. Θεωρητικά, ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει αρκετά χαρακτηριστικά της λειτουργίας του συστήματος του CTLA4 που η εξήγησή τους ήταν δύσκολη. Επιπλέον, ένας τέτοιος μηχανισμός ταιριάζει, πιθανώς, με το γεγονός ότι τα CD28 και CTLA4 μοιράζονται κοινούς συνδέτες, επιτρέποντας στο CTLA4 να αποτρέπει τη συνδιέγερση μέσω του CD28. Ουσιαστικά, μπορεί να αποτελέσει μία προέκταση του μηχανισμού ανταγωνισμού μεταξύ των υποδοχέων για τους συνδέτες, όπου το CTLA4 μπορεί, επιπρόσθετα, να απομακρύνει τους συνδέτες από την επιφάνεια του κυττάρου ή να χρησιμοποιηθεί σαν μηχανισμός δράσης των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Η CTLA4-εξαρτώμενη trans-ενδοκύττωση των συνδετών έχει αναφερθεί πρόσφατα και πρέπει να επιβεβαιωθεί από επιπλέον μελέτες, αλλά προτείνει έναν πιθανό μηχανισμό για το φαινόμενο της καθοδικής ρύθμισης των συνδετών ^{170,251}.



Εικόνα 14. Εξωγενείς μηχανισμοί δράσης του CTLA4 ¹⁷⁰.

3.6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. +49A/G (rs231775)

Ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs231775 χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση μίας αδενίνης από μία γουανίνη στη θέση +49 στο εξόνιο 1 του γονιδίου *CTLA4*. Σε μοριακό επίπεδο, έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση μίας θρεονίνης από μία αλανίνη στη θέση 17 της πρωτεΐνης (p. T17A). Η θέση αυτή αντιστοιχεί στην περιοχή του πεπτιδίου σήματος, το οποίο αργότερα κατευθύνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εκεί, η γλυκοσυλίωση του *CTLA4* είναι ανεπαρκής και το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάσει την ενδοκυττάρια μεταφορά και τη διαθεσιμότητά του στην επιφάνεια του κυττάρου, μειώνοντας την έκφρασή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν αυξημένη συσχέτιση της ύπαρξης του πολυμορφισμού με τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων. Σημαντικά αυξημένος εντοπίζεται ο T-κυτταρικός πολλαπλασιασμός όταν εμφανίζεται ομοζυγωτία για το G αλληλίο σε σχέση με την ομοζυγωτία για το A. *In vitro*, κατά τη διάρκεια χορήγησης μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του *CTLA4*, εμφανίζεται μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων, που εξαρτάται από το αλληλίο που εμφανίζεται στη θέση +49. Από την άλλη πλευρά, ο +49 GG γονότυπος έχει σαν αποτέλεσμα, εμφανώς, τη μείωση της καταστολής των T-λεμφοκυττάρων, που με τη σειρά του οδηγεί σε επέκταση αυτοδραστικών κλώνων. Επιπλέον, η παραγωγή του mRNA που κωδικοποιεί το *CTLA4* συσχετίζεται ισχυρά με την ύπαρξη του πολυμορφισμού, όσο και με την έκφραση του μορίου στην επιφάνεια του κυττάρου. Χρώση ανοσοφθορισμού των λεμφοκυττάρων αποκαλύπτει ποιοτικές διαφορές στην ενδοκυττάρια μεταφορά της πρωτεΐνης που εξαρτάται από το γονότυπο στη θέση +49. Αυξημένη παραγωγή mRNA, όσο και αυξημένη έκκριση IL-2 συσχετίστηκε με την εμφάνιση του G αλληλίου σε ομοζυγωτία.

Η ύπαρξη του πολυμορφισμού μπορεί να μην αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση αυτοανοσίας, αφού βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλους πολυμορφισμούς στην 3-UTR' περιοχή του γονιδίου. Όμως, η εμφάνιση του αλληλίου G στη θέση +49 σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα ελέγχου του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυτοάνοσων καταστάσεων όταν συγκρίνεται με την εμφάνιση του αλληλίου A. Η συχνότητα εμφάνισης του G αλληλίου είναι περίπου 42.7% και έχει χαρακτηριστεί σαν αιτιολογικός παράγοντας για νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ^{252,253}, ο διαβήτης τύπου I ^{254,255}, η νόσος Addison ¹⁶⁶, ο αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός ²⁵⁵⁻²⁵⁷ και ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ωστόσο, η συσχέτιση της ύπαρξης του A αλληλίου με την εμφάνιση κοιλιοκάκης ^{166,258,259}. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να γεννά ερωτήματα σχετικά με το πώς δύο διαφορετικά αλληλία στο γονίδιο ενός μορίου μπορεί να ευθύνονται για δύο αυτοάνοσες καταστάσεις οι οποίες συνυπάρχουν, αναμφίβολα. Πιθανότατα,

θετικά αποτελέσματα σε σημαντικούς συσχετισμούς να οφείλονται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης κάποιου πολυμορφισμού με έναν γειτονικό πάνω στο γονιδίωμα ²⁶⁰.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψη ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων ή αφορούν την επικοινωνία των Β-λεμφοκυττάρων με τα Τ-λεμφοκύτταρα παρουσιάζονται σαν αιτιολογικοί παράγοντες για την εμφάνιση ανοσοανεπαρκειών, ενώ οι πολυμορφισμοί c. -1T/C στην ακολουθία Kozak στο γονίδιο *TNFRSF5* (rs1883832) και c. +49A/G στο γονίδιο *CTLA4* (rs231775) έχουν χαρακτηριστεί σαν αιτιολογικοί παράγοντες για την εμφάνιση αυτοανοσίας, σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η συσχέτιση της εμφάνισης των πολυμορφισμών αυτών με την εμφάνιση αυτοάνοσων νόσων σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες και συγκεκριμένα σε ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) και εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (sIgAD).

2. ΥΛΙΚΟ

2.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 82 ασθενείς με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (43 άνδρες/39 γυναίκες, μέση ηλικία: 27 έτη, ηλικιακό εύρος: 2 έως 79 ετών). Τα δείγματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι ασθενείς είτε παρακολουθούνται από το ίδιο εργαστήριο είτε στάλθηκαν για ανάλυση από το Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης και από το Νοσοκομείο Παπαγεωργίου. Ειδικότερα, αξιολογήθηκαν 41 ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (21 άνδρες/20 γυναίκες, μέση ηλικία: 33 έτη, ηλικιακό εύρος: 6 έως 70 ετών) και 41 ασθενείς με sIgAD (22 άνδρες/19 γυναίκες, μέση ηλικία: 21 έτη, ηλικιακό εύρος: 2 έως 79 ετών).

Η διάγνωση της CVID έγινε με βάση τα κριτήρια, συμπεριλαμβανομένων των χαμηλών επιπέδων της IgG του ορού, και/ή μίας IgM τιμής άνω των δύο τυπικών αποκλίσεων από την μέση τιμή, μίας απουσίας ή ανώμαλης απάντησης σε εμβόλια, και του αποκλεισμού άλλων αιτιών υπογαμμασφαιριναιμίας. Για τους ασθενείς με IgAD, ισχύει ότι η διάγνωση αυτών έγινε κατά τη διάρκεια αξιολόγησης υποτροπιάζουσων λοιμώξεων και/ή αυτοανοσίας ή τυχαία

	PADs	CVID	IgAD
Αριθμός ατόμων	82	41	41
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	43/39	21/20	22/19
Ηλικία ανάλυσης (μέση τιμή, εύρος)	27, 2-79	33, 6-70	21, 2-79
Αυτοανοσία	42	21	21

Πίνακας 3. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες

2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε μία σειρά αντιδραστηρίων, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στον Πίνακα 4.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Κατασκευαστής
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A
Αγαρόζη	UltraPure™ Agarose	16500-500	Invitrogen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂	100Mm MgCl ₂	P041311-M	BIORON
Διάλυμα TBE	UltraPure™ 10X TBE Buffer	15581-044	Gibco
Μάρτυρας DNA	100 bp plus DNA Ladder	304-105	GeneON
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dATP	P/N 55082	Invitrogen
	100mM dCTP	P/N 55083	
	100mM dGTP	P/N 55084	
	100mM dTTP	P/N 55084	
Περιοστική ενδονουκλεάση NcoI	NcoI Restriction Enzyme	R0193	New England BioLabs
Πολυμεράση Taq	DFS-Taq DNA polymerase	101005	BIORON
Χρωστική	Formaldehyde Load Dye	8550G	Ambion
Kit εκχύλισης DNA	PureLink® Genomic DNA Kit	K1820-01	Invitrogen
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	PureLink® PCR Purification Kit	K3100-01	Invitrogen

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

3. ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ (PBL)

Το DNA από εμπύρηννα λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο για τις στήλες απομόνωσης της Invitrogen (PureLink® Genomic DNA Kit), η αρχή απομόνωσης του οποίου βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) και σε συνθήκες καθορισμένου pH και αλάτων. Ο κατασκευαστής εγγυάται τον καθαρισμό του DNA από προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικούς αναστολείς. Το σύστημα απομόνωσης περιλαμβάνει τέσσερις τύπους διαλυμάτων, η σύσταση των οποίων δεν αναφέρεται από την εταιρία. Στη συνέχεια, περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία, όπως αναγράφεται στο εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος απομόνωσης. Σε κωνικά σωληνάρια 1.5 mL τύπου erppendorf, μεταφέρονται 200μL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό K₃EDTA. Προστίθενται 20μL πρωτεΐνάσης K, για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις καρβοξυτελικές θέσεις των αμινοξέων και 20μL RNAάσης για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 2 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 200μL διαλύματος λύσης των κυττάρων (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer), το οποίο ενισχύει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνάσης K όσον αφορά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που οδηγεί σε αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο στους 55° C για 25 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση των δειγμάτων από το υδατόλουτρο, προστίθενται 200 μL αιθανόλης 96-100% και μετά από ανάδευση, το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column). Η αιθανόλη σε συνδυασμό με το διάλυμα λύσης επιτρέπει υψηλό βαθμό πρόσδεσης του DNA στη μεμβράνη silica της στήλης. Το μείγμα φυγοκεντρείται στα 10.000 g για 1 λεπτό και ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 1 λεπτό και στη μέγιστη ταχύτητα της φυγοκέντρου (17.000 g) για 3 min, αντίστοιχα, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις και ενζυμικοί αναστολείς. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε κωνικό σωληνάριο 1.5 mL τύπου erppendorf όπου και προστίθενται 100μL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer). Μετά από επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα της φυγοκέντρου για 1 λεπτό. Η συγκέντρωση του DNA στο τελικό διάλυμα ανέρχεται, σύμφωνα με τον κατασκευαστή περίπου στα 50-200ng/μL. Τα δείγματα DNA διατηρούνταν στους -20° C.

3.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.2.1. PCR ΓΙΑ ΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 1 ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ CD40 ΚΑΙ CTLA4

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με σκοπό την ενίσχυση του εξονίου 1 του *TNFRSF5* που κωδικοποιεί το CD40.

Οι εκκινητές προέρχονταν από τη διεθνή βιβλιογραφία και παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η νουκλεοτιδική τους σύσταση. Το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύεται είναι 217 bp.

Εκκινητές:

CD40 1F : 5'-ATAGGTGGACCGCGATTGGT- 3'

CD40 1R : 5' -TCCCAACTCCCGTCTGGT- 3'

Επιπλέον, εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR, με σκοπό την ενίσχυση του εξονίου 1 του γονιδίου *CTLA4* που κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Oligo V.6 και παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η νουκλεοτιδική τους σύσταση. Το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύεται είναι 359 bp.

Εκκινητές:

CTLA4 1F' : 5' – TTCAAGTGCCTTCTGTGTGTG – 3'

CTLA4 1R' : 5' – AATCACTGCCTTTGACTGCT – 3'

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενωμικού DNA, 210 μmol/L από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl₂ and 0.04 U/μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μL. Στους πίνακες 5 και 6 παρατίθενται οι συνθήκες στις οποίες διεξήχθη κάθε αντίδραση με τις θερμοκρασίες, τη διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και τον αριθμό των συνολικών κύκλων που εφαρμόστηκαν.

Αρχική αποδιάταξη	95° για 10 min	
Αποδιάταξη	94° για 30 sec	32 κύκλους συνολικά
Υβριδισμός	58° για 30 sec	
Επιμήκυνση	72° για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° για 10 min	

Πίνακας 5. Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του εξονίου 1 του *TNFRSF5*

Αρχική αποδιάταξη	94° για 2 min	
Αποδιάταξη	94° για 30 sec	32 κύκλους συνολικά
Υβριδισμός	59° για 30 sec	
Επιμήκυνση	72° για 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72° για 5 min	

Πίνακας 6. Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του εξονίου 1 του *CTLA4*

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας με dH₂O, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορεύεται (5 μL δείγματος, 1 μL χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού «Gel Capture» (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή αρχείου bitmap.

3.2.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ

Για τη μελέτη της παρουσίας του πολυμορφισμού rs231775 στο γονίδιο *CTLA4* πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) κάθε δείγματος, μετά από καθαρισμό των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε ακολουθώντας το

πρωτόκολλο για τις στήλες καθαρισμού της Invitrogen (PureLink PCR Purification Kit). Το σύστημα απομόνωσης αποσκοπεί στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων και βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel). Το σύστημα απομόνωσης χρησιμοποιεί τρεις τύπους διαλυμάτων. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά το πρωτόκολλο του συστήματος της Invitrogen όπως αναγράφεται στο εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος καθαρισμού. Στο πρώτο στάδιο, προστίθενται 4 όγκοι διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε έναν όγκο προϊόντος PCR και ο τελικός όγκος μεταφέρεται σε ειδικές στήλες (Spin columns/Purelink PCR Purification Kit) για την προσρόφηση του DNA στη μεμβράνη που περιέχεται σε αυτές. Συγκεκριμένα, σε όγκο 25μL προϊόντος PCR προστίθενται 100μL διάλυμα πρόσδεσης B2. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 10.000 g για 1 λεπτό και απομακρύνεται το διάλυμα φυγοκέντρωσης. Ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 650μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer) και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες επιτάχυνσης της βαρύτητας για 1 λεπτό. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος φυγοκέντρωσης, πραγματοποιείται μία επιπλέον φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα φυγοκέντρωσης (17.000 g) για 3 λεπτά, χωρίς την προηγούμενη προσθήκη διαλύματος, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης και την αποφυγή αναστολής της πολυμεράσης από αυτή στη διαδικασία της αλληλούχισης. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε κωνικό σωληνάριο 1.5 ml τύπου eppendorf, προστίθενται 30μL διαλύματος έκλουσης (10mM Tris-HCL, pH=8,5) και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 1 λεπτό. Τα καθαρισμένα προϊόντα ηλεκτροφορούνται, όπως περιγράφηκε παραπάνω για τα προϊόντα PCR, με σκοπό τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητάς τους. Τέλος, αποθηκεύονται στους -20° C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

3.2.4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA

Για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs1883832 στο γονίδιο *TNFRSF5*, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων PCR για το εξόνιο 1 με το ένζυμο περιορισμού NcoI. Για την πέψη 6μL προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 0.32 U/μL του ενζύμου, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer3, που παρέχεται από τον κατασκευαστή New England BioLabs. Ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 37° C για 8-16 ώρες. Η αλληλουχία του δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το NcoI παρουσιάζεται είναι η εξής:



Τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X. Καθώς το ένζυμο αναγνωρίζει μόνο την αλληλουχία που εμφανίζεται όταν ο ασθενείς φέρει το C αλληλίο, παρουσία μετάλλαξης σε ομοζυγωτία (γονότυπος TT), διακρίνεται μόνο μία δέσμη προϊόντος PCR στις 217 bp, που αντιστοιχεί στο προϊόν του εξονίου 1 του CD40. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας για το C αλληλίο (wild type), δημιουργείται θέση κατάτμησης, οπότε ανιχνεύονται δύο δέσμες, στις 127 και 90 bp κατά την ηλεκτροφόρηση. Για τους ετεροζυγώτες, ανιχνεύονται τρεις δέσμες στις 217, 127 και 90 bp. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο είχε επιβεβαιωθεί η παρουσία της μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

3.2.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ (SEQUENCING)

Για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs231775 στο γονίδιο *CTLA4* πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων, η οποία απαιτούσε τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

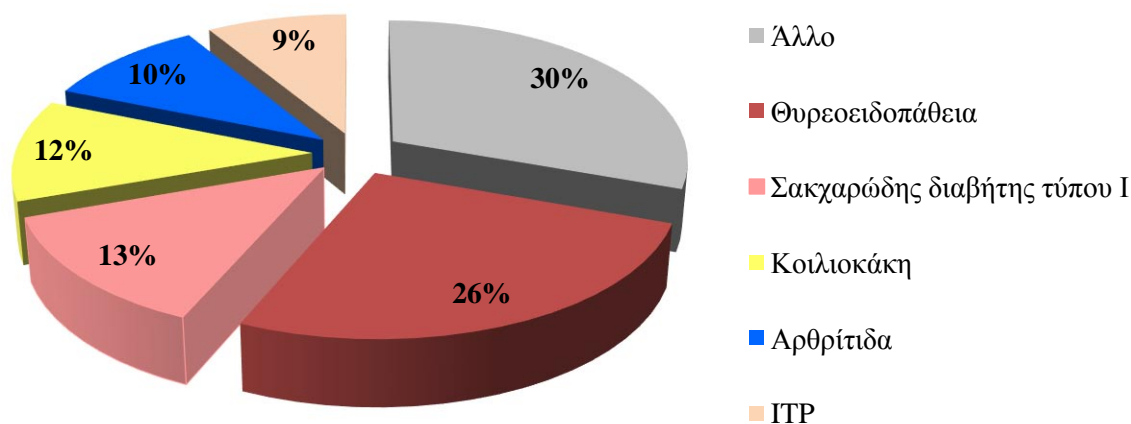
Για τη συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών, εμφάνιση πολυμορφισμού στα δύο γονίδια και εκδήλωση αυτοανοσίας σε ασθενείς με PADs, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fischer's exact test. Σημαντική θεωρήθηκε η απόκλιση όταν $p < 0,05$. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στατιστικού πακέτου για τις κοινωνικές επιστήμες (Statistical Package for the Social Sciences 22, SPSS 22)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη έγινε μία προσπάθεια συσχέτισης της παρουσίας των πολυμορφισμών c.-1T/C (rs1883832) στο γονίδιο *TNFRSF5* και c.+49 A/G (p.T17A, rs231775) στο γονίδιο *CTLA4* με την εκδήλωση αυτοανοσίας σε 82 ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες. Από τους ασθενείς αυτούς 41 ασθενείς έπασχαν από κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια και 41 ασθενείς από εκλεκτική IgA ανεπάρκεια. Η μελέτη των πολυμορφισμών αυτών κατέδειξε ότι οι συγκεκριμένες γενετικές βλάβες δεν είναι αιτιολογικές για την εκδήλωση αυτοάνοσων καταστάσεων στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες και μπορεί να επηρεάσουν το φαινότυπό τους μόνο αν συνδυαστούν με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Τα αυτοάνοσα νοσήματα αποτελούν συνήθεις εκδηλώσεις στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες. Στη μελέτη αυτή, στο σύνολο των ασθενών, 21 ασθενείς με CVID και 21 ασθενείς με sIgAD έπασχαν από ένα ή περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα. Συγκεκριμένα, 18 ασθενείς εμφάνισαν θυρεοειδοπάθεια, 7 ασθενείς αρθρίτιδα, 9 ασθενείς σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, 8 ασθενείς κοιλιοκάκη, 6 ασθενείς ITP, ενώ 22 ασθενείς εκδήλωσαν κάποιο άλλο αυτοάνοσο φαινόμενο. Στις εκδηλώσεις αυτές περιλαμβάνονται οι κυτταροπενίες, η μυελίτιδα, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, η αναιμία, τα σύνδρομα Evans και Raynaud κ.ά. Συχνά κάποιες από τις προαναφερθείσες καταστάσεις συνυπήρχαν στον ίδιο ασθενή. Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Γράφημα 1. Εκδηλώσεις αυτοανοσίας στο δείγμα των ασθενών με PADs της παρούσας μελέτης



	PADs		
	ΣΥΝΟΛΟ	CVID	IgAD
Αριθμός ατόμων, n	82	41	41
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	43/39	21/20	22/19
Ηλικία ανάλυσης (χρόνια) (μέση τιμή, εύρος)	27, 2-79	33, 6-70	21, 2-79
Αυτοάνοσες Εκδηλώσεις	42 (51.22%)	21 (51.22%)	21 (51.22%)
Θυρεοειδοπάθεια	18 (21.95%)	8 (19.51%)	10 (24.39%)
Αρθρίτιδα	7 (8.54%)	2 (4.88%)	5 (12.20%)
Κοιλιοκάκη	8 (9.76%)	4 (9.76%)	4 (9.76%)
ITP	6 (7.32%)	3 (7.32%)	3 (7.32%)
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I	9 (10.98%)	1 (2.44%)	8 (19.51%)
Άλλο	21 (25.61%)	12 (29.27%)	9 (21.95%)

Πίνακας 7. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών της παρούσας μελέτης.

*Στα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα ή καταστάσεις που εκδηλώθηκαν στους ασθενείς με PADs, ανήκουν η μυελίτιδα, η κυτταροπενία, η αναιμία, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, ο ΣΕΛ, το σύνδρομο Evans, το σύνδρομο Raynaud, η ιριδοκυκλίτιδα, η λεύκη, η αλωπεκία, το κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα και η ψωρίαση.

4.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. -1 T/C (rs1883832)

4.1.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ PADs

Ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs1883832 χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση μίας κυτοσίνης από μία θυμίνη στη θέση -1 σε σχέση με το κωδικόνιο έναρξης, στην ακολουθία Kozak του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα CD40. Η εμφάνιση του αλληλίου C οδηγεί στην αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης CD40 στην επιφάνεια των κυττάρων, στα οποία ο υποδοχέας εκφράζεται, κατά 15-32%. Η συχνότητα του αλληλίου T σύμφωνα με τη μελέτη 1000 Γονιδιωμάτων, εμφανίζεται στον παγκόσμιο πληθυσμό σε ποσοστό 22.88%. Αναλυτικότερα η συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και κάθε γονοτύπου διακριτά, εμφανίζεται στον πίνακα 8. Στον πίνακα αυτόν παρατηρούμε, επιπλέον, ότι η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου T εμφανίζεται λίγο αυξημένη στον ευρωπαϊκό πληθυσμό σε σχέση με τον παγκόσμιο και ιδιαίτερα στις δύο μεσογειακές χώρες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μελέτες όπου ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με διάφορα νοσήματα, μεταξύ των οποίων και αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η νόσος Grave's και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι ασθενείς που φέρουν το αλληλίο C, το οποίο είναι περισσότερο κοινό στο σύνολο του πληθυσμού, σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία (γονότυποι CC ή CT) εμφανίζουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης των νοσημάτων αυτών.

	Παγκόσμιος πληθυσμός n=2504	Ευρώπη n=503	Ισπανία n= 107	Τοσκάνη, Ιταλία n=107
Γονότυπος, n				
C/C WT	1521 (60.7%)	263 (52.3%)	53 (49.5%)	45 (42.1%)
C/T Het	820 (32.7%)	219 (43.5%)	45 (42.1%)	60 (56.1%)
T/T Hom	163 (6.5%)	21 (4.2%)	9 (8.4%)	2 (1.9%)
Αλληλίο C	3862 (77.1%)	745 (74.1%)	151 (70.6%)	150 (70.1%)
Αλληλίο T	1146 (22.9%)	261 (25.9%)	63 (29.4%)	64 (29.9%)

Πίνακας 8. Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στους διάφορους πληθυσμούς, σύμφωνα με τη φάση 3 της μελέτης 1000 Γονιδιωμάτων. (Από: www.ensemble.org)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης κάθε αλληλίου και κάθε γονοτύπου, αρχικά, στο σύνολο των ασθενών με PADs και, στη συνέχεια, στους ασθενείς με PADs που εκδήλωσαν αυτοανοσία. Αναλυτικά, από το σύνολο των ασθενών με CVID βρέθηκαν 20 ετεροζυγώτες και 18 ομοζυγώτες για το αλληλίο C και από τους ασθενείς με IgAD 20 ετεροζυγώτες και 16 ομοζυγώτες.

Από τους 82 ασθενείς με PADs, 42 ασθενείς εκδήλωσαν αυτοανοσία. Συγκεκριμένα, 21 ασθενείς με CVID και 21 ασθενείς με IgAD. Από αυτούς βρέθηκαν 12 ετεροζυγώτες και 8 ομοζυγώτες για το αλληλίο C και από τους ασθενείς με IgAD 10 ετεροζυγώτες και 9 ομοζυγώτες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 9 και 10. Δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στο σύνολο των ασθενών με PADs σε σχέση με το τμήμα των ασθενών οι οποίοι είχαν αυτοάνοσες εκδηλώσεις, γεγονός που δεν υποδεικνύει, αντίστοιχα, κάποια συσχέτιση κάποιου από τα δύο αλληλίου με την εκδήλωση των νοσημάτων αυτών ή των εκδηλώσεων αυτοανοσίας στα νοσήματα αυτά.

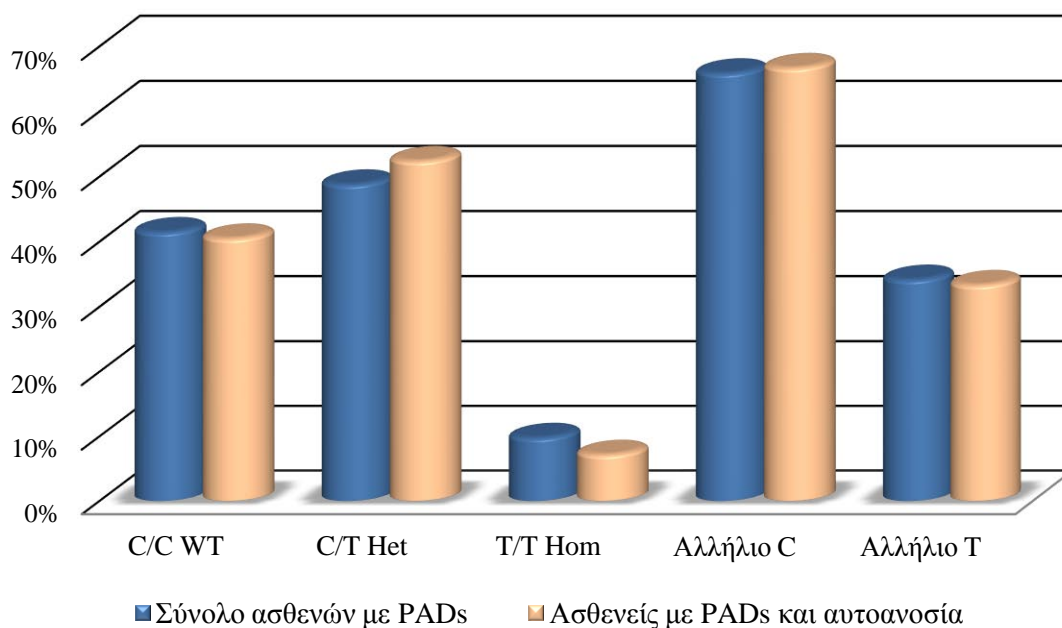
c. -1 T/C (rs1883832)	Σύνολο ασθενών v=82	Ασθενείς με CVID v=41	Ασθενείς με IgAD v=41
Γονότυπος, v			
C/C WT	34 (41,46%)	18 (43,9%)	16 (39,02%)
C/T Het	40 (48,78%)	20 (48,78%)	20 (48,78%)
T/T Hom	8 (9,76%)	3 (7,32%)	5 (12,2%)
Αλληλίο C	65,85%	68,29%	63,41%
Αλληλίο T	34,15%	31,71%	36,59%

Πίνακας 9. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες για τον πολυμορφισμό rs1883832

Ασθενείς με εκδήλωση αυτοανοσίας			
c. -1 T/C (rs1883832)	Σύνολο ασθενών v=42	Ασθενείς με CVID v=21	Ασθενείς με IgAD v=21
Γονότυπος, v			
C/C WT	17 (40.48%)	8 (38.1%)	9 (42.86%)
C/T Het	22 (52.38%)	12 (57.14%)	10 (47.62%)
T/T Hom	3 (7,14%)	1 (4.76%)	2 (9.52%)
Αλληλίο C	66,67%	66,67%	66,67%
Αλληλίο T	33,33%	33,33%	33,33%

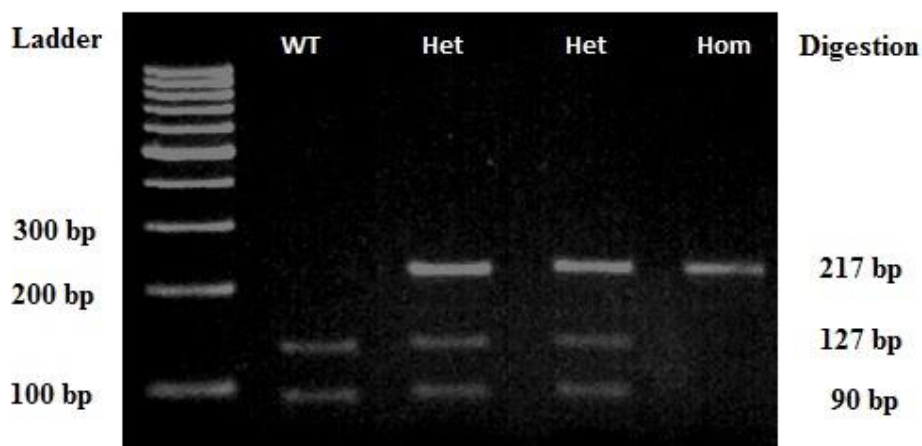
Πίνακας 10. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και συχνότητα εμφάνισης αλληλίου για τον πολυμορφισμό rs1883832 στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες που εκδήλωσαν αυτοανοσία.

Γράφημα 2.
Σύγκριση συχνότητας εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων



4.1.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ

Η συσχέτιση της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού με την εκδήλωση αυτοανοσίας σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, μελετήθηκε κατά πόσο η εμφάνιση του αλληλίου C στο γονότυπο κάποιου ασθενούς, μπορεί να αποτελεί αιτιολογικό ή προδιαθεσικό παράγοντα για την εκδήλωση αυτοανοσίας τόσο στο σύνολο των ασθενών όσο και σε κάθε μελετηθέν νόσημα διακριτά. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συσχέτιση του κάθε γονότυπου ξεχωριστά με την εκδήλωση αυτοάνοσων φαινομένων. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Fischer's exact test. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης του αλληλίου C στο γονότυπο των ασθενών και της εκδήλωσης αυτοανοσίας ($p > 0,05$). Μία οριακά στατιστική σημαντικότητα ($p = 0,093$) φαίνεται να υπάρχει στη συσχέτιση της εμφάνισης του T αλληλίου με την εκδήλωση αρθρίτιδας στους ασθενείς με IgA ανοσοανεπάρκεια.



Εικόνα 15. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από τη μελέτη του πολυμορφισμού c. -1 T/C. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3% των προϊόντων από RFLP με την περιοριστική ενδονουκλεάση NcoI. Γονότυποι: C/C WT, C/T Het, T/T Hom

4.2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ c. +49 A/G (p.T17A, rs231775)

4.2.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ PADs

Ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs231775 χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση μίας αδενίνης από μία γουανίνη στη θέση +49 στο εξόνιο 1 του γονιδίου *CTLA4*. Σε μοριακό επίπεδο, έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση μίας θρεονίνης από μία αλανίνη στη θέση 17 της πρωτεΐνης (p.T17A). Η θέση αυτή αντιστοιχεί στην περιοχή του πεπτιδίου σήματος, το οποίο αργότερα κατευθύνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εκεί, η γλυκοσυλίωση του *CTLA4* είναι ανεπαρκής και το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάσει την ενδοκυττάρια μεταφορά και τη διαθεσιμότητά του στην επιφάνεια του κυττάρου, μειώνοντας την έκφρασή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Βάσει των αποτελεσμάτων από προηγούμενες μελέτες, η ύπαρξη του πολυμορφισμού μπορεί να μην αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση αυτοανοσίας, αφού βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλους πολυμορφισμούς στην 3-UTR περιοχή του γονιδίου. Όμως, η εμφάνιση του αλληλίου G στη θέση +49 σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα ελέγχου του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυτοάνοσων καταστάσεων όταν συγκρίνεται με την εμφάνιση του αλληλίου A. Η συχνότητα εμφάνισης του G αλληλίου είναι περίπου 42.7% και έχει χαρακτηριστεί σαν αιτιολογικός παράγοντας για νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης τύπου I, η νόσος Addison, ο αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η νόσος Graves και ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ωστόσο, η συσχέτιση της ύπαρξης του A αλληλίου με την εμφάνιση κοιλιοκάκης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του G αλληλίου, καθώς και κάθε γονοτύπου, αρχικά, στο σύνολο των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες και, στη συνέχεια, στους ασθενείς με PADs που εκδήλωσαν αυτοανοσία. Αναλυτικά, από τους ασθενείς με CVID βρέθηκαν 21 ετεροζυγώτες και 3 ομοζυγώτες για το αλληλίο G, ενώ από τους ασθενείς με IgAD ήταν 19 ετεροζυγώτες και 4 ομοζυγώτες.

Από τους 82 ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες, 42 ασθενείς εκδήλωσαν αυτοανοσία. Συγκεκριμένα, 21 ασθενείς με CVID και 21 με IgAD. Από αυτούς βρέθηκαν 12 ετεροζυγώτες, ενώ δεν βρέθηκε ασθενής ομοζυγώτης για το αλληλίο G και από τους ασθενείς με IgAD 10 ετεροζυγώτες και 2 ομοζυγώτες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται, αναλυτικά, στους πίνακες 11 και 12. Δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στο σύνολο των ασθενών με PADs σε σχέση με το τμήμα των ασθενών οι οποίοι είχαν αυτοάνοσες εκδηλώσεις, γεγονός που δεν υποδεικνύει, αντίστοιχα, κάποια συσχέτιση κάποιου από τα δύο αλληλίου με την εκδήλωση των νοσημάτων αυτών ή των εκδηλώσεων αυτοανοσίας στα νοσήματα αυτά.

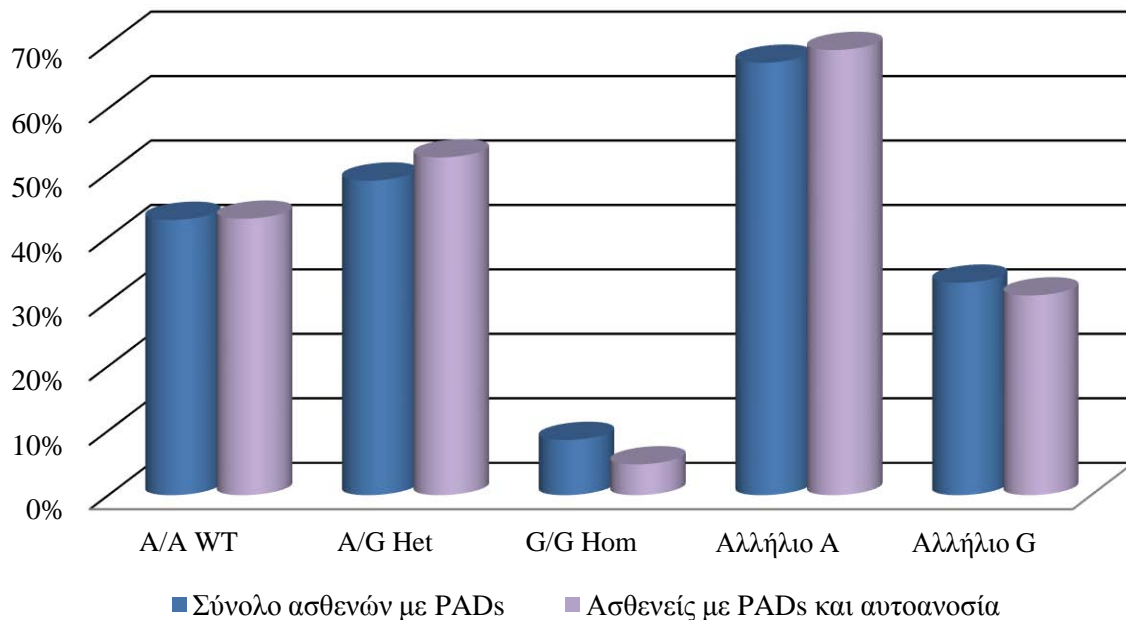
c. +49 A/G (rs231775)	Σύνολο ασθενών n=82	Ασθενείς με CVID n=41	Ασθενείς με sIgAD n=41
Γονότυπος, n			
A/A WT	35 (42,68%)	17 (41,46%)	18 (43,9%)
A/G Het	40 (48,78%)	21 (51,22%)	19 (46,34%)
G/G Hom	7 (8,54%)	3 (7,32%)	4 (9,76%)
Αλληλίο A	67,07%	67,07%	67,07%
Αλληλίο G	32,93%	32,93%	32,93%

Πίνακας 11. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες.

Ασθενείς με αυτοάνοσες εκδηλώσεις			
c. +49 A/G (rs231775)	PADs n=42	CVID n=21	sIgAD n=21
Γονότυπος, n			
A/A WT	18 (42.86%)	9 (42.86%)	9 (42.86%)
A/G Het	22 (52.38%)	12 (57.14%)	10 (47.62%)
G/G Hom	2 (4.76%)	0 (0%)	2 (9.52%)
Αλληλίο A	69,05%	71,43%	66,67%
Αλληλίο G	30,95%	28,57%	33,33%

Πίνακας 12. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες που εκδήλωσαν αυτοανοσία.

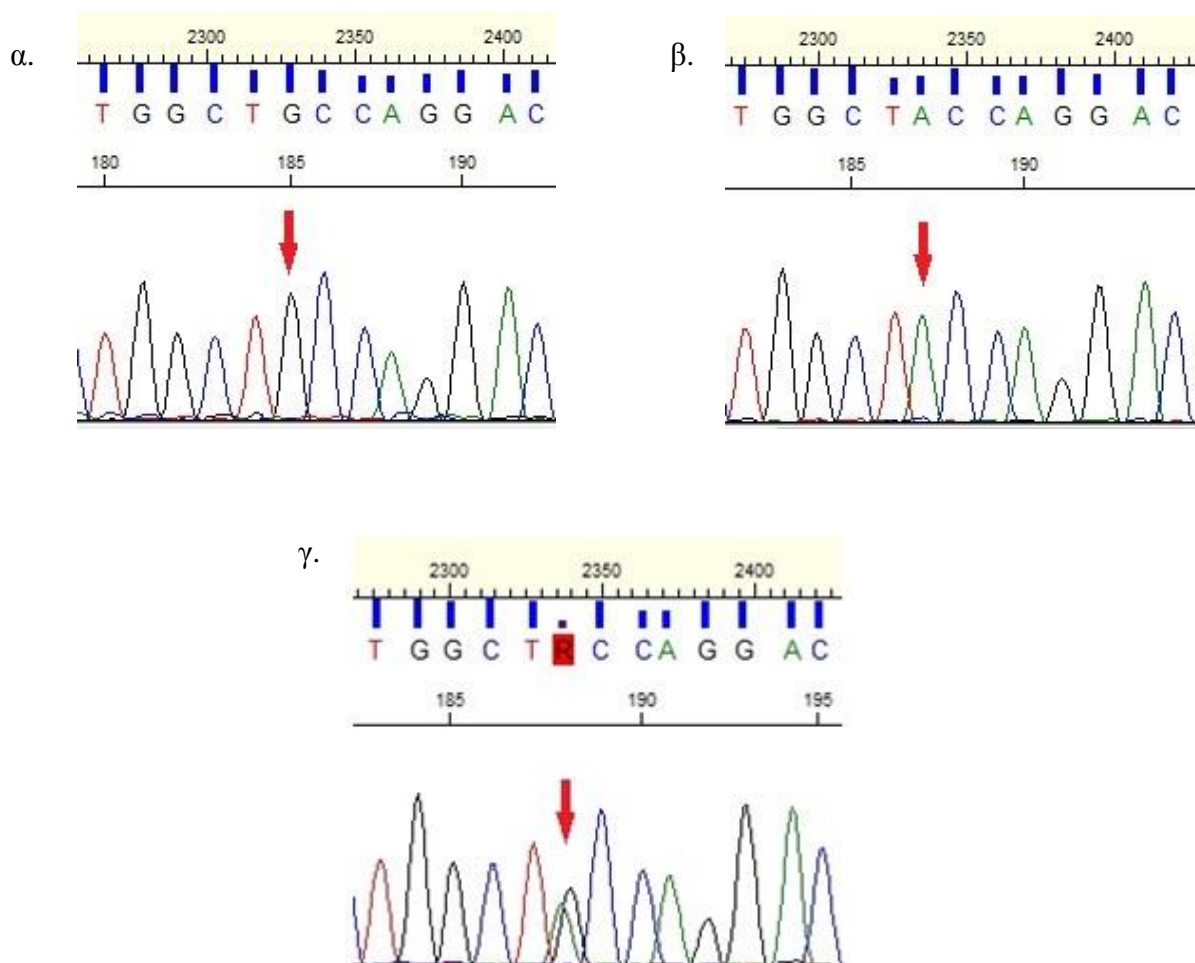
Γράφημα 3.
Σύγκριση συχνότητας εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων



4.2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ

Η συσχέτιση της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού με την εκδήλωση αυτοανοσίας σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες, έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, μελετήθηκε κατά πόσο η εμφάνιση του αλληλίου G στο γονότυπο κάποιου ασθενούς, μπορεί να αποτελεί αιτιολογικό ή προδιαθεσικό παράγοντα για την εκδήλωση αυτοανοσίας τόσο στο σύνολο των ασθενών όσο και σε κάθε μελετηθέν νόσημα διακριτά. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συσχέτιση του κάθε γονότυπου ξεχωριστά με την εκδήλωση αυτοάνοσων φαινομένων. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Fisher's exact test. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης του αλληλίου G στο γονότυπο των ασθενών και της εκδήλωσης αυτοανοσίας ($p>0,05$).

Εικόνα 16. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από τη μελέτη δειγμάτων για τον πολυμορφισμό +49A/G (rs231775) μετά από ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αλληλούχιση (Sequencing). α. Hom G/G β. WT A/A γ. Het A/G



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, μελετήθηκε ο πολυμορφισμός c.-1T/C στο *TNFRSF5*, που κωδικοποιεί το μόριο CD40, σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η εμφάνιση του πολυμορφισμού επηρεάζει την ποσότητα της πρωτεΐνης που εντοπίζεται στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων καθώς και των υπολοίπων κυττάρων στα οποία εκφράζεται το CD40, με την ποσότητα της πρωτεΐνης να εμφανίζεται αυξημένη κατά 15-32% σε ασθενείς που φέρουν το C αλληλίο σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία (CC ή CT γονότυποι). Έτσι, η παρουσία του C αλληλίου εμφανίζεται σαν προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η νόσος Grave's και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, αφού με το βιολογικό αποτέλεσμα που προκαλεί, φαίνεται να οδηγεί σε μείωση στο κατώφλι ενεργοποίησης του συστήματος CD40/CD40L, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις του συνδέτη. Δεδομένου, όμως, ότι το C αλληλίο αποτελεί, επίσης, το αλληλίο που εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στο σύνολο του πληθυσμού (77,2%) μπορούμε να υποθέσουμε ότι ίσως η εμφάνιση ομοζυγωτίας για το T αλληλίο παρέχει κάποιου είδους προστασία ως προς τα αυτοάνοσα νοσήματα. Ωστόσο, δεν έχουμε συγκεντρώσει δεδομένα που να υποδεικνύουν κάτι τέτοιο.

Λόγω της ποικιλίας αυτοάνοσων εκδηλώσεων στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες, στόχος της μελέτης αποτελούσε η συσχέτισή της εμφάνισης του πολυμορφισμού με την εκδήλωση αυτοάνοσων φαινομένων σε ασθενείς με PADs. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν, συγκεκριμένα, ήταν ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια και εκλεκτική IgA ανοσοανεπάρκεια. Βάσει των αποτελεσμάτων, η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλίου στους ασθενείς με PADs ήταν 34%, αυξημένη σε σχέση με το 22,9% που αναφέρεται να εμφανίζεται στον παγκόσμιο πληθυσμό, καθώς και με το 25,9% που εμφανίζεται στον ευρωπαϊκό πληθυσμό στο σύνολό του. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συχνότητα του T αλληλίου κυμαίνεται μεταξύ διαφορετικών ευρωπαϊκών χωρών και, συγκεκριμένα, σε μεσογειακές χώρες εμφανίζεται αυξημένη κοντά στο 30% στο φυσιολογικό πληθυσμό. Συνεπώς, δεν μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αύξηση αυτή που εντοπίζουμε στο δείγμα μας οφείλεται στην ύπαρξη των αντισωματικών ανεπαρειών, καθώς μπορεί να αποτελεί στοιχείο του υγιούς πληθυσμού. Για να μπορέσει να συσχετιστεί η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αλληλίου με την ύπαρξη των ασθενειών αυτών, είναι απαραίτητο να επεκτείνουμε τη μελέτη ενσωματώνοντας φυσιολογικούς μάρτυρες. Περαιτέρω μελέτη χρήζει, πιθανόν, η εμφάνιση του πολυμορφισμού στους ασθενείς με IgAD, όπου και μπορούμε, σε επόμενο βήμα, να αυξήσουμε το δείγμα της μελέτης μας, καθώς η συχνότητα εμφάνισης αλληλίου παρουσιάζεται στο 36.59%.

Εστιάζοντας στους ασθενείς με PADs που εκδήλωσαν αυτοάνοσα φαινόμενα, τόσο η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλίου όσο και η συχνότητα εμφάνισης κάθε γονοτύπου

συμπίπτει με αυτήν που εμφανίζεται στο σύνολο των ασθενών με PADs. Συνεπώς, δεν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η εμφάνιση του T αλληλίου, σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία συσχετίζεται με την εκδήλωση αυτοανοσίας. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι, μετά από στατιστική ανάλυση, δεν εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση της εμφάνισης του T αλληλίου ή της εμφάνισης κάποιου από τους γονότυπους με την εκδήλωση αυτοανοσίας. Γενικά, δεδομένης της πολυπλοκότητας των νοσημάτων που μελετάμε, ο πολυμορφισμός δε φαίνεται να είναι αιτιοπαθογονικός, αλλά σε συνδυασμό με βλάβες σε άλλα ανοσογονίδια θα μπορούσε να δράσει συνεργιστικά οδηγώντας στην εκδήλωση αυτοανοσίας σε ασθενείς με PADs.

Οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0.093$) εμφανίζεται μεταξύ της εμφάνισης του T αλληλίου και της εκδήλωσης αρθρίτιδας σε ασθενείς με IgA ανοσοανεπάρκεια, όπου θα ήταν ενδιαφέρον να επεκταθεί η μελέτη, προσθέτοντας σε αυτήν επιπλέον ασθενείς με IgAD.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πολυμορφισμός c.-1 T/C (rs1883832) στο *TNFRSF5* εμφανίζεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό rs4810485, ο οποίος εντοπίζεται στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου και αποτέλεσμα του οποίου είναι η αυξημένη παραγωγή mRNA που κωδικοποιεί το CD40. Συνεπώς, παρότι οι δύο πολυμορφισμοί επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου σε διαφορετικά επίπεδα, μετάφρασης και μεταγραφής αντίστοιχα, το αποτέλεσμα της ύπαρξής τους, και στις δύο περιπτώσεις, είναι η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το δεδομένο, δεν μπορούμε να διακρίνουμε ξεκάθαρα την επίδραση που έχει ο μελετηθείς πολυμορφισμός, rs1883832, σε σύγκριση με τον rs4810485, στην ποσότητα της πρωτεΐνης που, τελικώς, εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου και ποια είναι η σημασία του. Συνεπώς, σε επόμενη μελέτη θα ήταν ενδιαφέρον να αναλυθεί η σημασία της ύπαρξης του SNP rs4810485 στους μελετηθέντες ασθενείς.

Επόμενος στόχος της διπλωματικής εργασίας αποτελούσε η μελέτη του πολυμορφισμού +49 A/G (rs231775) στο εξόνιο 1 του γονιδίου *CTLA4* για τους ίδιους ασθενείς. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί επανειλημμένα, παλαιότερα, με την εμφάνιση αυτοανοσίας. Συγκεκριμένα, η εμφάνισή του σε ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια είχε μελετηθεί, προηγουμένως, στη βιβλιογραφία από τους Knight *et al* οι οποίοι δεν κατέδειξαν κάποια συσχέτιση της εμφάνισής του με την εκδήλωση αυτοανοσίας ή φλεγμονωδών επιπλοκών στο δείγμα που μελέτησαν. Η μελέτη, ωστόσο, δεν απέκλειε την πιθανότητα ο πολυμορφισμός αυτός να επηρεάζει ασθενώς την ανάπτυξη αυτών των νοσημάτων και των επιπλοκών τους. Στο δείγμα 47 ασθενών της μελέτης αυτής, παρουσιάστηκε μία τάση εμφάνισης προστασίας έναντι της αυτοανοσίας σε ασθενείς που έφεραν τον AG γονότυπο στη θέση +49. Παρόλο που το συμπέρασμα αυτό δε φάνηκε να υποστηρίζεται από ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα η ενσωμάτωση ενός μεγαλύτερου δείγματος ασθενών θα μπορούσε να επιβεβαιώσει ή όχι τα

ευρήματά ²⁶¹. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η συχνότητα εμφάνισης του A αλληλίου ήταν 67,07%, αυξημένη σε σχέση με το 57,3% που αναφέρεται να εμφανίζεται στον παγκόσμιο πληθυσμό. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης πλησιάζει το 64,1% που εμφανίζεται στον ευρωπαϊκό πληθυσμό στο σύνολό του. Ακόμη περισσότερο αυξημένη, σε ποσοστό 71,5%, εμφανίζεται η συχνότητα σε μεσογειακούς πληθυσμούς. Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της ύπαρξης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την εμφάνιση αυτοανοσίας σε ασθενείς τόσο με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια, όπου είχε μελετηθεί στο παρελθόν, όσο και στους ασθενείς με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Driessen G, Van Der Burg M. Educational paper: Primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr.* 2011;170(6):693-702.
2. Seymour B, Miles J, Haeney M. Primary antibody deficiency and diagnostic delay. *J Clin Pathol.* 2005;58(5):546-547.
3. Wood P, Stanworth S, Burton J, et al. Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: A systematic review. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):410-423.
4. Fried AJ, Bonilla F a. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):396-414.
5. Speletas M, Germenis AE Primary antibody deficiencies in adults: A contemporary clinical approach *Archives of Hellenic Medicine* 2013, 30(4):420–435
6. Jolles S, Orange JS, Gardulf a., et al. Current treatment options with immunoglobulin G for the individualization of care in patients with primary immunodeficiency disease. *Clin Exp Immunol.* 2015;179(2):146-160.
7. Bruton OC. AGAMMAGLOBULINEMIA. *Pediatrics.* 1952;9(6):722-728.
8. Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. Review article Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. *Immunodeficiency.* 2002;99(8):2694-2702.
9. Abolhassani H, Gharib B, Shahinpour S, et al. Autoimmunity in Patients With Selective IgA Deficiency. 2015;25(2):112-119.
10. Daele J, Zicot AF. Humoral immunodeficiency in recurrent upper respiratory tract infections. Some basic, clinical and therapeutic features. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):373-390.
11. Wang N, Hammarström L. IgA deficiency: what is new? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012;12(6):602-608
12. Zhang F, Tu P, Zhang Y, Zhou W, Tang FL, Kuang J. Selective IgA deficiency. *J Clin Dermatology.* 2012;41(4):211-213.
13. Ning Wang, Nan Shen, Timothy J Vyse, Vidya Anand, Iva Gunnarson, Gunnar Sturfelt, Solbritt Rantapää-Dahlqvist, Kerstin Elvin, Lennart Truedsson, Bengt A Andersson, Charlotte Dahle, Eva Örtqvist, Peter K Gregersen, Timothy W Behrens, and Lennart Hammarström. Selective IgA Deficiency in Autoimmune Diseases. *Mol Med.* 2011;17(11-12):1
14. Cunningham-Rundles C. Hematologic complications of primary immune deficiencies. *Blood Rev.* 2002;16(1):61-64.
15. Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Tolerance and Autoimmunity: Lessons at the Bedside of Primary Immunodeficiencies. *Adv Immunol.* 2007;95:51-82.

16. Cassidy JT, Kitson RK, Selby CL. Selective IgA deficiency in children and adults with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(8):647-650.
17. Cunningham-Rundles C. Physiology of Iga and Iga deficiency. *J Clin Immunol*. 2001;21(5):303-309.
18. De la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Gual L, et al. MHC susceptibility genes to IgA deficiency are located in different regions on different HLA haplotypes. *J Immunol*. 2002;169(8):4637-4643.
19. Mohammadi J, Ramanujam R, Jarefors S, et al. IgA deficiency and the MHC: Assessment of relative risk and microheterogeneity within the HLA A1 B8, DR3 (8.1) Haplotype. *J Clin Immunol*. 2010;30(1):138-143.
20. Monteiro RC. Immunoglobulin A as an anti-inflammatory agent. *Clin Exp Immunol*. 2014;178:108-110.
21. Kalha I, Sellin JH. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004;6(5):377-383.
22. Cooper M a., Pommering TL, Korányi K. Primary Immunodeficiencies. *Am Fam Physician*. 2003;68(10):2001-2008+2011.
23. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1161-1178.
24. Kopecký O, Lukešová Š. Genetic defects in common variable immunodeficiency. *Int J Immunogenet*. 2007;34(4):225-229.
25. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2008;46(10):1547-1554.
26. Ballow M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(4):581-591.
27. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34-48.
28. Malphettes M, Gérard L, Carmagnat M, et al. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis*. 2009;49(9):1329-1338.
29. Park JH, Levinson AI. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol*. 2010;134(2):97-103.
30. Fernández Pérez ER. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2012;32(4):621-632.
31. Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med*. 1993;86(1):31-42.

32. Ardeniz O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2009;133(2):198-207.
33. Pasquet F, Kodjikian L, Mura F, et al. Uveitis and Common Variable Immunodeficiency: Data from the DEF-I Study And Literature Review. *Ocul Immunol Inflamm*. 2012;20(3):163-170.
34. Gershwin ME, Blaese RM, Steinberg AD, Wistar R, Strober W. Antibodies to nucleic acids in congenital immune deficiency states. *J Pediatr*. 1976;89(3):377-381.
35. Michel M, Chanet V, Galicier L, et al. Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(4):254-263.
36. Conley ME, Park CL, Douglas SD. Childhood common variable immunodeficiency with autoimmune disease. *J Pediatr*. 1986;108(6):915-922.
37. Bloch-Michel C, Viallard J-F, Blanco P, et al. Common variable immunodeficiency: 17 observations in the adult. *Rev Med Interne*. 2003;24(10):640-650.
38. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:301-305.
39. Agarwal S, Mayer L. Gastrointestinal manifestations in primary immune disorders. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(4):703-711.
40. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(4):658-664.
41. Nijenhuis T, Klasen I, Weemaes CMR, Preijers F, De Vries E, Van der Meer JWM. Common variable immunodeficiency (CVID) in a family: An autosomal dominant mode of inheritance. *Neth J Med*. 2001;59(3):134-139.
42. Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, et al. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(2):87-92.
43. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003;4(3):261-268.
44. Van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, et al. *An Antibody-Deficiency Syndrome due to Mutations in the CD19 Gene*. The New England journal of medicine 354, 1901-1912 (2006).
45. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, et al. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol*. 2011;31(4):550-559.
46. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. 2005;37(8):829-834.
47. Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(17):7193-7198.

48. Goldacker S, Warnatz K. Tackling the heterogeneity of COVID. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(6):504-509. doi:10.1097/01.all.0000191888.97397.b3.
49. Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2005;116(1):37-41.
50. Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, et al. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol*. 2005;175(8):5498-5503.
51. Brouet JC, Chedeville a, Ferman JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol*. 2000;30(9):2516-2520.
52. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, et al. *Unravelling the Complexity of T Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency*. Vol 178. 2007.
53. Serrano D, Becker K, Cunningham-Rundles C, Mayer L. Characterization of the T cell receptor repertoire in patients with common variable immunodeficiency: oligoclonal expansion of CD8(+) T cells. *Clin Immunol*. 2000;97(3):248-258.
54. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, et al. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: Association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(3):521-525.
55. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri S V. Common variable immunodeficiency: The immune system in chaos. *Trends Mol Med*. 2005;11(8):370-376.
56. Van Kooten C, Banchereau J, Banchereaut J. Functions of CD40 on B cells , dendritic cells and other cells. *Structure*. 1997;9(3):330-337.
57. Clark E a. A Short History of the B-Cell-Associated Surface Molecule CD40. *Front Immunol*. 2014;5(September):1-5.
58. Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4494-4498.
59. Bartlett WC, McCann J, Shepherd DM, Roy M, Noelle RJ. Cognate interactions between helper T cells and B cells. IV. Requirements for the expression of effector phase activity by helper T cells. *J Immunol*. 1990;145(12):3956-3962.
60. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(14):6550-6554.
61. Graf D, Korthäuer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol*. 1992;22(12):3191-3194.
62. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992;175(4):1091-1101.

63. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357(6373):80-82.
64. Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J Exp Med*. 1993;178(5):1567-1575.
65. Van den Eertwegh AJ, Noelle RJ, Roy M, et al. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *J Exp Med*. 1993;178(5):1555-1565.
66. Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*. 1993;14(11):559-564.
67. Grewal IS, Flavell R a. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:111-135.
68. Karimi MH, Pourfathollah AA. CD40 and tolerance induction. *Iran J Allergy, Asthma Immunol*. 2012;11(1):1-13.
69. Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Sci*. 2011;73(3-4):69-78.
70. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):2-17.
71. Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009;229(1):152-172.
72. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(1):4-43.
73. Van Kooten C, Banchereau J. Immune regulation by CD40-CD40-L interactions. *Front Biosci*. 1997;2(7):d1-d11.
74. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W. CD40/CD40 Homodimers Are Required for CD40-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Expression of B7.2 by Human B Lymphocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7799-7806.
75. Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, et al. Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(27):19473-19480.
76. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000;288(5475):2351-2354.

77. Antoniadou C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 Ligand System. Linking Inflammation With Atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(8):669-677.
78. Hostager BS, Hsing Y, Harms DE, Bishop GA. Different CD40-mediated signaling events require distinct CD40 structural features. *J Immunol*. 1996;157(3):1047-1053.
79. Goldstein MD, Watts TH. Identification of distinct domains in CD40 involved in B7-1 induction or growth inhibition. *J Immunol*. 1996;157(7):2837-2843.
80. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J*. 1989;8(5):1403-1410.
81. Vazgiourakis VM, Zervou MI, Choulaki C, et al. A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2011:1-8.
82. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(2):74-79.
83. Singh J, Garber E, Van Vlijmen H, et al. The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40. *Protein Sci*. 1998;7(5):1124-1135.
84. Krzesz R, Wagner AH, Cattaruzza M, Hecker M. Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappa B and signal transducer and activate of transcription-1. *Febs Lett*. 1999;453(1-2):191-196.
85. Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol*. 1998;161(7):3225-3236.
86. Tone M, Tone Y, Babik JM, Lin CY, Waldmann H. The role of Sp1 and NF-kB in regulating CD40 gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(16):8890-8897.
87. Qin H, Wilson C a., Lee SJ, Benveniste EN. IFN-beta-induced SOCS-1 negatively regulates CD40 gene expression in macrophages and microglia. *FASEB J*. 2006;20(7):985-987.
88. Wesemann DR, Dong Y, O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits cytokine induction of CD40 expression in macrophages. *J Immunol*. 2002;169(5):2354-2360.
89. Nguyen VT, Walker WS, Benveniste EN. Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor- β *Eur J Immunol*. 1998;28:2537-2548.
90. Galy AH, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol*. 1992;149(3):775-782

91. Gormand F, Briere F, Peyrol S, Raccurt M, Durand I, Aït-Yahia S, Lebecque S, Banchereau J, Pacheco Y. CD40 expression by human bronchial epithelial cells. *Scand J Immunol.* 1999;49(4):355-361.
92. Gordon J, Millsum MJ, Guy GR, Ledbetter JA. Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling. *J Immunol.* 1988;140(5):1425-1430.
93. Paulie S, Rosén A, Ehlin-Henriksson B, et al. The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction. *J Immunol.* 1989;142(2):590-595.
94. Vallé a, Zuber CE, Defrance T, Djossou O, De Rie M, Banchereau J. Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. *Eur J Immunol.* 1989;19(017):1463-1467.
95. Clark EA, Shu GL, Luscher B, et al. Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals. *J Immunol.* 1989;143(12):3873-3880.
96. Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, et al. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol.* 1995;58(2):209-216.
97. McLellan a D, Sorg R V, Williams L a, Hart DN. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol.* 1996;26:1204-1210.
98. Wang F, Gregory C, Sample C, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol.* 1990;64(5):2309-2318.
99. Law CL, Wormann B, LeBien TW. Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursors. *Leukemia.* 1990;4(11):732-738.
100. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 1997;159(2):635-643.
101. Ledbetter JA, Shu G, Gallagher M, Clark EA. Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40). *J Immunol.* 1987;138(3):788-794.
102. Gilliam a. C, Kremer IB, Yoshida Y, et al. The human hair follicle: A reservoir of CD40+ B7-deficient langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol.* 1998;110(4):422-427.
103. Bishop G a., Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;597:131-151..
104. Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, et al. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry.* 1999;38(31):10168-10177.

105. Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TT a, Crute JJ, Kehry MR. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: Regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry*. 1998;37(34):11836-11845.
106. Bishop G a., Hostager BS. The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(3-4):297-309.
107. Bretscher P a. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(1):185-190.
108. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science*. 2002;297(5589):2060-2063.
109. Khanna R, Cooper L, Kienzle N, Moss DJ, Burrows SR, Khanna KK. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*. 1997;159(12):5782-5785.
110. Van Kooten C, Banchereau J Functional Role of CD40 and its Ligand *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:393-399
111. Burdin N, Galibert L, Garrone P, Durand I, Banchereau J, Rousset F. Inability to produce IL-6 is a functional feature of human germinal center B lymphocytes. *J Immunol*. 1996;156(11):4107-4113.
112. Burdin N, Kooten C Van, Galibert L, et al. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *Journal of immunology* 1995;154(6):2533-2544.
113. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7007-7011.
114. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or Elimination of B Cells In Vivo: Dual Roles for CD40- and Fas (CD95)-Ligands Modulated by the B Cell Antigen Receptor. *Cell*. 1996;87(2):319-329.
115. Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, et al. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature*. 1995;374(6518):163-165.
116. Galibert L, Burdin N, Barthelemy C, et al. Negative selection of human germinal center B cells by prolonged BCR cross-linking. *J Exp Med*. 1996;183(5):2075-2085.
117. Lagresle C, Mondiere P, Bella C, Krammer PH, Defrance T. Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*. 1996;183(4):1377-1388.
118. Galibert L, Burdin N, de Saint-Vis B, et al. CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype. *J Exp Med*. 1996;183(1):77-85.

119. Wheeler K, Gordon J. Co-ligation of surface IgM and CD40 on naive B lymphocytes generates a blast population with an ambiguous extrafollicular/germinal centre cell phenotype. *Int Immunol*. 1996;8(6):815-828.
120. Merville P, Déchanet J, Desmoulière A, et al. Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med*. 1996;183(1):227-236.
121. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*. 1993;178(2):669-674.
122. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994;180(4):1263-1272.
123. Shu U, Kiniwa M, Wu CY, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol*. 1995;25(4):1125-1128.
124. Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, et al. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur J Immunol*. 1996;26(2):370-378.
125. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol*. 1996;156(10):3952-3960.
126. Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark E a. The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. *Immunity*. 1994;1(4):317-325.
127. Peguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Rattis FM, Van Kooten C, Banchereau J, Schmitt D. Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol*. 1995;155(0022-1767):4241-4247.
128. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia a, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996;184(2):747-752.
129. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995;182(2):389-400.
130. Van Essen D, Kikutani H, Gray D. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*. 1995;378(6557):620-623.
131. Hess S, Engelmann H. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med*. 1996;183(1):159-167.
132. Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. CD40 and epithelial cells: across the great divide. *Immunol Today*. 1998;19(11):502-506.

133. Hirano a, Longo DL, Taub DD, et al. Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand. *Blood*. 1999;93(9):2999-3007.
134. Henn V, Slupsky JR, Gr a fe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-594.
135. Szmítko PE. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I. *Circulation*. 2003;108(16):1917-1923.
136. Notarangelo LD, Peitsch MC, Abrahamsen TG, et al. CD40Lbase: A database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*. 1996;17(11):511-516.
137. Larsen CP, Pearson TC. The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(5):641-647.
138. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*. 1996;381(6581):434-438.
139. Laman JD, De Boer M, Hart BA. CD40 in clinical inflammation: from multiple sclerosis to atherosclerosis. *Dev Immunol*. 1998;6(3-4):215-222.
140. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 1998;394(6689):200-203.
141. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 1999;189(5):843-853.
142. Peters AL, Stunz LL, Bishop G a. CD40 and autoimmunity: The dark side of a great activator. *Semin Immunol*. 2009:1-8.
143. Kozak M. The scanning model for translation:an update. 1989;108(February):229-241.
144. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 1986;44(2):283-292.
145. Kozak M. Evaluation of the fidelity of initiation of translation in reticulocyte lysates from commercial sources. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(9):2828.
146. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. 1987;196(4):947-950.
147. Maier LM, Hafler D a. Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunol Rev*. 2009;229(1):322-336.
148. Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology*. 2005;146(6):2684-2691.

149. Mukai T, Hiromatsu Y, Fukutani T, et al. A C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene is associated with later onset of Graves' disease in Japanese. *Endocr J*. 2005;52(4):471-477.
150. Jacobson EM, Huber a K, Akeno N, et al. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun*. 2007;8(3):205-214.
151. Skibola CF, Nieters A, Bracci PM, et al. A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma. *Blood*. 2008;111(8):4348-4354.
152. Nieters A, Bracci PM, de Sanjosé S, et al. A functional TNFRSF5 polymorphism and risk of non-Hodgkin lymphoma, a pooled analysis. *Int J Cancer*. 2011;128(6):1481-1485.
153. Liu Y, Liang W-B, Gao L-B, Wang Y-Y, Zhang L. Association of CD40 –1C/T polymorphism in the 5'-untranslated region and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta*. 2009;408(1-2):56-59.
154. Sokolova EA, Malkova NA, Korobko DS, et al. Association of SNPs of CD40 Gene with Multiple Sclerosis in Russians. *PLoS One*. 2013;8(4):1-8.
155. İnal EE, Rüstemoğlu A, İnanır A, et al. Associations of rs4810485 and rs1883832 polymorphisms of CD40 gene with susceptibility and clinical findings of Behçet's disease. *Rheumatol Int*. 2014;35(5):837-843.
156. Chen F, Hou S, Jiang Z, et al. CD40 gene polymorphisms confer risk of Behçet's disease but not of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in a Han Chinese population. *Rheumatology*. 2012;51(1):47-51
157. Wang C, Yan J, Yang P, Du R, Chen G. The relationship between CD40 gene polymorphism and unstable coronary atherosclerotic plaques. *Clin Cardiol*. 2010;33(6):55-60.
158. Yun Y, Ma C, Ma X. The SNP rs1883832 in CD40 Gene and Risk of Atherosclerosis in Chinese Population: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014;9(5):e97289.
159. García-Bermúdez M, González-Juanatey C, López-Mejías R, et al. Study of Association of CD40-CD154 Gene Polymorphisms with Disease Susceptibility and Cardiovascular Risk in Spanish Rheumatoid Arthritis Patients. *PLoS One*. 2012;7(11).
160. Ma Y, Wang SX, Liu Y, et al. Single nucleotide polymorphism of CD40 in the 5'-untranslated region is associated with ischemic stroke. *Gene*. 2013;529(2):257-261.
161. Yan J, Wang C, Du R, Liu P, Chen G. Association analysis of CD40 gene polymorphism with acute coronary syndrome. *Clin Exp Med*. 2010;10(4):253-258.
162. Wang M, Li Y, Li W, Xia Z, Wu Q. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case-control study. *DNA Cell Biol*. 2011;30(3):173-178.

163. Tian C, Qin W, Li L, Zheng W, Qiu F. A common polymorphism in CD40 Kozak sequence (-1C/T) is associated with acute coronary syndrome. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(3):191-194.
164. Ju HP, Hun SC, Park CS, et al. Association analysis of CD40 polymorphisms with asthma and the level of serum total IgE. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(8):775-782.
165. Kim S-H, Lee J-E, Kim S-H, et al. Allelic variants of CD40 and CD40L genes interact to promote antibiotic-induced cutaneous allergic reactions. *CEA.* 2009;39(12):1852-1856.
166. Dallos T, Kovacs L. CTLA-4 and the genetic predisposition to autoimmunity. *Bratisl Lek Listy.* 2005;106(2):55-62.
167. Watanabe N, Nakajima H. Coinhibitory molecules in autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
168. Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.* 2013;34(11):1-15.
169. Vaidya B, Pearce S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(5):619-626.
170. Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):852-863.
171. Peggs KS, Quezada S a., Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(2):206-213.
172. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996;271(5256):1734-1736.
173. Ueda H, Howson JMM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003;423(May):506-511.
174. Vijaykrishnan L, Slavik JM, Illés Z, et al. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity.* 2004;20(5):563-575.
175. Gough SCL, Walker LSK, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005;204(3):102-115.
176. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 2003;24(6):313-318.
177. Valk E, Rudd CE, Schneider H. Europe PMC Funders Group CTLA-4 trafficking and surface expression. 2014;29(6):272-279.
178. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.* 1987;328(6127):267-270.
179. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science.* 1970;169(3950):1042-1049.

180. Ledbetter J a, Imboden JB, Schieven GL, et al. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood*. 1990;75(7):1531-1539.
181. Linsley PS, Greene JL, Tan P, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992;176(6):1595-1604.
182. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol*. 1993;151(7):3489-3499.
183. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994;1(5):405-413.
184. Teft W a, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:65-97.
185. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattéi MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol*. 1991;147(3):1037-1044.
186. Balzano C, Buonavista N, Rouvier E, Golstein P. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *IntJCancer Suppl*. 1992;7:28-32.:28-32.
187. Brunner-Weinzierl MC, Hoff H, Burmester G-R. Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(2):45-54.
188. McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(1):1-10.
189. Park YJ, Chung HK, Park DJ, et al. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid*. 2000;10:453-459.
190. Kinjo Y, Takasu N, Komiya I, et al. Remission of Graves' hyperthyroidism and A/G polymorphism at position 49 in exon 1 of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2593-2596.
191. Kalantari T, Mostafavi H, Pezeshki AM, et al. Exon-1 polymorphism of ctla-4 gene in Iranian patients with Graves' disease. *Autoimmunity*. 2003;36(5):313-316.
192. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3162-3170.
193. Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, et al. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity*. 1997;6(5):583-589.
194. Chuang E, Alegre ML, Duckett CS, Noel PJ, Vander Heiden MG, Thompson CB. Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-

- independent endocytosis that limits cell surface expression. *J Immunol.* 1997;159(1):144-151.
195. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity.* 1996;4(6):535-543.
 196. Zhang Y, Allison JP. Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9273-9278.
 197. Schneider H, Martin M, Agarraberes FA, et al. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J Immunol.* 1999;163(4):1868-1879.
 198. Iida T, Ohno H, Nakaseko C, et al. Regulation of Cell Surface Expression of CTLA-4 by Secretion of CTLA-4-Containing Lysosomes Upon Activation of CD4+ T Cells. *J Immunol.* 2000;165(9):5062-5068.
 199. Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity.* 2002;16:23-35.
 200. Doyle a M, Mullen a C, Villarino a V, et al. Induction of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) restricts clonal expansion of helper T cells. *J Exp Med.* 2001;194(7):893-902.
 201. Maszyna F, Hoff H, Kunkel D, Radbruch A, Brunner-Weinzierl MC. Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CD152 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes. *J Immunol.* 2003;171(7):3459-3466.
 202. Darlington PJ, Kirchhof MG, Criado G, Sondhi J, Madrenas J. Hierarchical regulation of CTLA-4 dimer-based lattice formation and its biological relevance for T cell inactivation. *J Immunol.* 2005;175(2):996-1004.
 203. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter J a. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 1991;174(3):561-569.
 204. Van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med.* 1997;185(3):393-403.
 205. Ikemizu S, Gilbert RJ, Fennelly J a, et al. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity.* 2000;12(1):51-60.
 206. Schwartz JC, Zhang X, Fedorov a, Nathenson SG, Almo SC. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature.* 2001;410(6828):604-608.
 207. Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, et al. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature.* 2001;410(March):608-611.
 208. Collins A V, Brodie DW, Gilbert RJC, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.* 2002;17(2):201-210.

209. McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol Rev.* 1998;165:231-247.
210. Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):11054-11058.
211. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, et al. B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity.* 1997;6(3):303-313.
212. Powell JD, Ragheb J a, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev.* 1998;165:287-300.
213. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science (80-).* 1989;244(4902):339-343.
214. Brunner MC, Chambers C a, Chan FK, Hanke J, Winoto a, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol.* 1999;162:5813-5820.
215. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 1996;183(6):2533-2540.
216. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3(5):541-547.
217. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science.* 1995;270(5238):985-988.
218. Baroja ML, Luxenberg D, Chau T, et al. The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. *J Immunol.* 2000;164(1):49-55.
219. Masteller EL, Chuang E, Mullen a C, Reiner SL, Thompson CB. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol.* 2000;164(10):5319-5327.
220. Manzotti CN, Liu MKP, Burke F, Dussably L, Zheng Y, Sansom DM. Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. *Eur J Immunol.* 2006;36:1413-1422.
221. Carreno BM, Bennett F, Chau T a, et al. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol.* 2000;165(3):1352-1356.
222. Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543-9553.
223. Chikuma S, Abbas AK, Bluestone J a. B7-independent inhibition of T cells by CTLA-4. *J Immunol.* 2005;175(1):177-181.

224. Choi J-M, Kim S-H, Shin J-H, et al. Transduction of the cytoplasmic domain of CTLA-4 inhibits TcR-specific activation signals and prevents collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19875-19880.
225. Choi J-M, Ahn M-H, Chae W-J, et al. Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation. *Nat Med*. 2006;12(5):574-579.
226. Jeffery LE, Burke F, Mura M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*. 2009;183(9):5458-5467.
227. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine a, Mellor a L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999;189(9):1363-1372.
228. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3(11):1097-1101.
229. Mellor AL, Chandler P, Baban B, et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol*. 2004;16(10):1391-1401.
230. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1134-1142.
231. Powrie F, Mason D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med*. 1990;172(6):1701-1708.
232. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean a, Coffman R, Powrie F. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol*. 1998;28(11):3435-3447.
233. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). *J Immunol*. 1995;155(3):1151-1164.
234. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996;184(2):387-396.
235. Suri-Payer E, Amar a Z, Thornton a M, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160(3):1212-1218.
236. Thornton a M, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188(2):287-296.
237. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2001;182(8):18-32.

238. Shevach E, DiPaolo R, Andersson J, Zhao D, Stephens G, Thornton A. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;212:60-73.
239. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo M-G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):227-235; quiz 236-237.
240. Somerset D a., Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25 + CD4 + regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004;112(1):38-43.
241. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 2005;166(3):811-822.
242. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004;5(3):266-271.
243. Shima T, Sasaki Y, Itoh M, et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J Reprod Immunol.* 2010;85(2):121-129.
244. Bachmann MF, Köhler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol.* 1999;163(3):1128-1131.
245. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, et al. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med.* 2009;206(2):421-434.
246. Oaks MK, Hallett KM. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol.* 2000;164(10):5015-5018.
247. Toussirot E, Saas P, Deschamps M, et al. Increased production of soluble CTLA-4 in patients with spondylarthropathies correlates with disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R101.
248. Purohit S, Podolsky R, Collins C, et al. Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. *J Autoimmune Dis.* 2005;2:8.
249. Mayans S, Lackovic K, Nyholm C, et al. CT60 genotype does not affect CTLA-4 isoform expression despite association to T1D and AITD in northern Sweden. *BMC Med Genet.* 2007;8:3.
250. Berry A, Tector M, Oaks MK. Lack of association between sCTLA-4 levels in human plasma and common CTLA-4 polymorphisms. *J Negat Results Biomed.* 2008;7:8.
251. Walker LSK. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun.* 2013;45:49-57.

252. Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela a, Garcia a, Garcia-Lozano JR, Nuñez-Roldan a. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 1999;53(3):296-300.
253. Seidl C, Donner H, Fischer B, et al. CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 1998;51(1):62-66.
254. Kikuoka N, Sugihara S, Yanagawa T, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene polymorphism confers susceptibility to type 1 diabetes in Japanese children: analysis of association with HLA genotypes and autoantibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(5):597-603.
255. Donner H, Rau H, Walfish PG, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(1):143-146.
256. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(1):41-45.
257. Kotsa K, Watson PF, Weetman a P. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;46(5):551-554.
258. Popat S, Hearle N, Wixey J, et al. Analysis of the CTLA4 gene in Swedish coeliac disease patients. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(1):28-31.
259. Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougnot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut*. 1998;43(2):187-189.
260. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun*. 2000;1(3):170-184.
261. Knight AK, Serrano D, Tomer Y, Cunningham-Rundles C. CTLA-4 gene exon-1 +49 A/G polymorphism: Lack of association with autoimmune disease in patients with common variable immune deficiency. *J Clin Immunol*. 2007;27(1):95-100.