

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ,
ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ,
ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ**

ΕΛΕΝΗ Α. ΦΡΑΓΚΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2017

Ημερομηνία αίτησης:

18/02/2013

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

26/03/2013

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Δημήτριος Μπούμπας (Επιβλέποντας Καθηγητής)

Δημήτριος Βασιλόπουλος

Κλειώ Μαυραγάνη

Ημερομηνία ορισμού θέματος:

21/06/2013

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:

Πέτρος Π. Σφηκάκης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Δημήτριος Μπούμπας

Δημήτριος Βλαχάκος

Ιωάννης Μπολέτης

Δημήτριος Βασιλόπουλος

Ειρήνη Γράψα

Κλειώ Μαυραγάνη

Αριστείδης Χαρώνης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη έγινε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Μπούμπα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Δάσκαλό μου για την ανάθεση του θέματος και την επίβλεψή του καθ' όλη της διάρκεια εκτέλεσης της διδακτορικής διατριβής. Θέλω να τον ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια και εκπαίδευση που μου παρείχε, για την υπομονή του, την ευγένειά του και τη συνεχή ενθάρρυνση και υποστήριξη που μου χάρισε απλόχερα. Τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του, η αξία των οποίων είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Αποτελεί, για μένα, πρότυπο δασκάλου, ανθρώπου, ιατρού και σίγουρα παράδειγμα προς μίμηση. Κυρίως, τον ευγνωμονώ που υπήρξε δίπλα μου ως μία άλλη «πατρική φιγούρα» τόσο στις επιστημονικές όσο και στις προσωπικές ανησυχίες και δυσκολίες μου.

Θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, τους: Δρ. Πάνο Βεργίνη, Δρ. Θέμιδα Αλυσσάφη, Δρ. Κατερίνα Χατζηιωάννου και, κυρίως, τον Δρ. Άγγελο Μπανό και τη Μαρία Γρηγορίου. Ευχαριστώ, επίσης, το Δρ. Γιώργο Μπερτσιά από το Πανεπιστήμιο Κρήτης και τον Καθηγητή Εμμανουήλ Δερμιτζάκη από το Πανεπιστήμιο της Γενεύης. Μεγάλη βοήθεια είχα από τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Ρίτη από το Πανεπιστήμιο Θράκης και τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Ακριβή Χρυσανθοπούλου και Δρ. Κώστα Καμπά, τους οποίους ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου. Χωρίς τη βοήθειά τους και χωρίς την υποστήριξή τους, η ολοκλήρωση των σπουδών μου δε θα ήταν εφικτή. Τους ευχαριστώ για τη συμπαράσταση, βοήθεια, απέραντη κατανόηση, υπομονή και αγάπη τους.

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το European Union Project Innovative Medicine Initiative “BTCure: Be The Cure - Inflammation - Translational Research and Adaptive Immunity”.

Στην Αιμιλία μου

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACR	American College of Rheumatology
AMPK	Adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase
ANA	Αντιπυρηνικά αντισώματα
aPC	Activated protein C
APCs	Antigen-presenting cells
APRIL	A proliferation inducing ligand
ATAC-seq	Assay for Transposase Accessible Sequencing
BAFF	B cell-activating factor of the TNF family
BANK1	B cell scaffold protein with ankyrin repeats
BCP	1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο
BLK	B lymphocyte specific tyrosine kinase
BlyS	B lymphocyte stimulator
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
CALLA	Common acute lymphoblastic leukemia antigen ή CD10
cDCs	Conventional DCs
CMA	Chaperon-Mediated Autophagy
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
CSK	C-terminal Src Kinase
CTLA8	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 8
CXCR2	CXC chemokine receptor
DAG	Διακυλ-γλυκερόλη
DAPI	4'6-diamidin-2-phenilindole
DMARDs	Disease-modifying antirheumatic drugs
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
ENCODE project	ENCyclopedia Of DNA Elements project
EPCR	Endothelial protein C receptor
FCS	Fetal culf serum
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GPCRs	G protein-coupled receptors
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HDACi	Histone deacetylase inhibitors
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMGB1	Mobility group protein B1
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN	Ιντερφερόνη
IL-17-R	IL-17 receptors
IRF	Interferon regulatory factor
IFNAR	Type I IFN receptor
IL-17	Interleukin-17
iNKT	Invariant natural killer T cells

IP3	Τρι-φωσφορική ινοσιτόλη
IRI	Ischemia-reperfusion injury
ISN	International Society of Nephrology
JAK/STAT	Janus/Signal Transducer and Activator of Transcription
LC3	Light chain 3
LPS	Λιποπολυσακχαρίδη
LN	Lupus nephritis
LTi-like cells	Lymphoid-tissue inducer-like cells
LYN	Yamaguchi sarcoma viral oncogene
LYP	Lymphoid-specific tyrosine phosphatase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolate mofetil
MPA	Mycophenolic acid
MPO	Myeloperoxidase
MSH5	Mutant S homolog 5
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NE	Neutrophil elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor-Kb
NK cells	Natural killer cells
NZB	New Zealand Black NZB
NZB/W-F1	New Zealand Black and White hybrid 1
NZW	New Zealand White
p62/SQSTM1	p62 sequestosome 1
PAD4	Peptidylarginine deiminase
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PARs	Protease activator receptors
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffer saline
PMNs	Polymorphonuclear cells
pDCs	Plasmacytoid dendritic cells
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
PLCγ2	Φωσφολιπάση γ2
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRPs	Pattern recognition receptors
PsA	Psoriatic arthritis
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase 22
RA	Rheumatoid arthritis
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
REDD1	Regulated in DNA Damage and Development 1
RNA-seq	RNA sequencing
ROR-α	Retinoid-related orphan receptor-α
RPGN	Rapidly progressive glomerulonephritis

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPS	Renal Pathology Society
ΣΕΛ	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
SKIV2L	Super viralacidic activity 2-like
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
TBE	Tris/Borate/EDTA
TF	Tissue factor
TGF-β	Transforming growth factor-β
T _H 17	T helper 17 cells
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tissue necrosis factor
TRAF6	Tumor necrosis factor-associated factor 6
Treg17	T regulatory 17 cells
T-SV40 HGECS	T-SV40 immortalized human glomerular epithelial cells
U1snRNA	U1 small nuclear RNA
vWF	Von Willebrand factor
WHO	World Health Organization
WT1	Wilm's Tumor 1
XNN	Χρόνια νεφρική νόσος
XNNTΣ	Χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ (ΣΕΛ)	13
1.1.1. Ιστορική αναδρομή	13
1.1.2. Επιδημιολογία, κλινικές εκδηλώσεις	13
1.1.3. Νεφρική νόσος στο ΣΕΛ	13
1.1.4. Παθογένεια ΣΕΛ και βλάβης τελικού οργάνου-στόχου (νεφρού)	15
1.1.4.1. Γενετική βάση στο ΣΕΛ	15
1.1.4.2. Γονιδιακή έκφραση στο ΣΕΛ	16
1.1.4.3. Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στο ΣΕΛ	18
1.1.4.4. Παθογένεια βλάβης τελικού οργάνου-στόχου	19
1.1.5. Θεραπεία	24
1.1.6. NZB/W-F1 υβρίδιο: ζωικό πρότυπο ΣΕΛ	25
1.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (TRANSCRIPTOMICS)	26
1.2.1. Μεθοδολογία RNA-sequencing	26
1.3. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	28
1.3.1. Μηχανισμοί αυτοφαγίας	28
1.3.2. Αυτοφαγία και ανοσοποιητικό σύστημα	29
1.3.2.1. Φυσική ανοσία	29
1.3.2.2. Επίκτητη ανοσία	30
1.3.3. Αυτοφαγία και ΣΕΛ	30
1.3.4. REDD1 (Regulated in DNA Damage and Development 1)	31
1.3.5. Αυτοφαγία ως θεραπευτικός στόχος	32
1.3.5.1. Υδροξυχλωροκίνη	32
1.4. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΝΕΤΩΣΗ	33
1.4.1. Μηχανισμός ΝΕΤωσης	33
1.4.2. Ουδετερόφιλα και ΣΕΛ	34
1.4.3. ΝΕΤωση και ΣΕΛ	34
1.5. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	36
1.5.1. Ιστικός παράγοντας	37
1.5.1.1. Γονίδιο, έκφραση και βιολογική δράση	37
1.5.1.2. Ο ιστικός παράγοντας στο νεφρό	37
1.5.2. Υποδοχείς ενεργοποίησης πρωτεάσης	37
1.5.3. Θρομβογένεση στο ΣΕΛ	38
1.5.4. Θρομβογένεση και ΝΕΤωση	38
1.6. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-17	40
1.6.1. Οικογένεια ιντερλευκίνης-17 και υποδοχέων ιντερλευκίνης-17	40
1.6.2. Κύτταρα που παράγουν ιντερλευκίνη-17 και άλλες πηγές ιντερλευκίνης-17	41
1.6.2.1. Ουδετερόφιλα	41
1.6.2.2. Εξωκυττάρια παγίδες ουδετεροφίλων (NETs)	42
1.6.3. Ιντερλευκίνη-17 και ΣΕΛ	42
1.6.4. Η οδός της ιντερλευκίνης-17 ως θεραπευτικός στόχος	43
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
3.1. ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ	45
3.1.1. Διασταύρωση μυών New Zealand Black (NZB) με New Zealand White (NZW)	45
3.1.2. Υβρίδια μυών NZB/W-F1	45
3.1.3. Μύες C57BL/6	45

3.2.	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	45
3.3.	ΚΥΤΤΑΡΑ	45
3.3.1.	Ανθρώπινα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα	45
3.3.2.	Ανθρώπινα σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα	46
3.3.3.	Ανθρώπινοι πνευμονικοί ινοβλάστες	46
3.4.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	47
3.5.	RNA-SEQUENCING	47
3.6.	ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ	48
3.7.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ	48
3.8.	ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	48
3.8.1.	Ανθρώπινα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα	48
3.8.2.	Ανθρώπινα σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα	48
3.8.3.	Ανθρώπινοι πνευμονικοί ινοβλάστες	48
3.9.	ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	49
3.10.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ NETs	49
3.11.	MPO-DNA complex ELISA	49
3.12.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΤΩΧΟΥ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ	49
3.13.	TAT complex ELISA	50
3.14.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	50
3.15.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NETs	50
3.16.	ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	50
3.17.	ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ	51
3.18.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ	51
3.19.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	51
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4.1.	Η ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΠΩΝ DNA ΣΤΟ ΣΕΛ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΕΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΥΠΑΘΕΙΑ, ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΚΗ ΕΞΑΡΤΗΣΗ	52
4.2.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΚΤΥΩΝ ΚΑΙ ΟΔΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	57
4.3.	ΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ	60
4.4.	ΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΝΕΤΩΣΗ, Η ΟΠΟΙΑ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	61
4.5.	Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΙΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΑ NETs ΤΟΥ ΣΕΛ, ΟΔΗΓΩΝΤΑΣ ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ	62
4.6.	Ο ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΝΕΤΩΣΗ ΣΤΑ ΥΓΙΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ	63
4.7.	Ο ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΕΛ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΙΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΑ ΥΓΙΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ NETs ΔΙΑΚΟΣΜΗΜΕΝΩΝ ΜΕ ΔΡΑΣΤΙΚΟ ΙΣΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΙ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-17	65
4.8.	ΤΑ ΔΙΑΚΟΣΜΗΜΕΝΑ ΜΕ ΙΣΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΙ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-17 NETs ΕΝΑΠΟΤΙΘΕΝΤΑΙ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΗ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ ΛΥΚΟΥ	66
4.9.	ΤΑ TF- ΚΑΙ IL-17-ΔΙΑΚΟΣΜΗΜΕΝΑ NETs ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΩΝ) ΚΑΙ ΑΥΞΑΝΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΣΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ	67
4.10.	Η ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΤΟ C5a ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΕΛ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ ΟΔΟ HIF-1/ REDD1 ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ, Η ΟΠΟΙΑ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	68
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
5.1.	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ	73
6.	ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ	75
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	108
8.	Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	129

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (ΣΕΛ) είναι το πρωτότυπο συστημικό χρόνια αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από απώλεια ανοχής στα πυρηνικά αντιγόνα εαυτού, παθολογικές απαντήσεις Β και Τ λεμφοκυττάρων και εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων σε διάφορα όργανα όπως, δέρμα, αρθρώσεις, νεφρούς και νευρικό σύστημα. Τα τελευταία χρόνια η θνητότητα έχει βελτιωθεί όμως, ακόμα παραμένει υψηλότερη σε σχέση με τη θνητότητα του γενικού πληθυσμού. Η παθογένειά του είναι πολύπλοκη και, παρά τις εντατικές ερευνητικές προσπάθειες ακόμα παραμένει αδιευκρίνιστη. Θεωρείται ότι, ο ΣΕΛ προκαλείται από αλληλεπίδραση γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. **Σκοπός της μελέτης** ήταν η περαιτέρω **διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών του ΣΕΛ μέσω συγκριτικής μελέτης μεταγραφώματος** των ζωικών προτύπων λύκου NZB/W-F1 και των υγιών προτύπων C57BL/6, χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης RNA νέας γενεάς (RNA-sequencing).

Θηλυκά NZB/W-F1 ζωικά πρότυπα λύκου θυσιάστηκαν στο στάδιο προ-εφηβίας (κατά το οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες του φύλου), στο στάδιο προ-αυτοανοσίας (κατά το οποίο απουσιάζουν τα αυτοαντισώματα) και στο στάδιο της νεφρίτιδας (όπου η πρωτεϊνουρία είναι $>300\text{mg/dl}$). Οι μύες C57BL/6 χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. **Αφαιρέθηκαν σπλήνας (περιφερικό λεμφικό όργανο), νεφροί και εγκέφαλος (τελικά όργανα-στόχοι)** και, απομονώθηκε RNA. Ακολούθησε **αλληλούχηση RNA νέας γενεάς** στην πλατφόρμα Illumina HiSeq 2000. Υπολογίστηκαν επίπεδα έκφρασης RNA, διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (ΔΕΓ) ($FC>1.5$, $p<0.05$) και, με το Ingenuity Pathway Analysis αναζητήθηκαν κανονικές οδοί, ανοδικοί ρυθμιστές και κυριότερα υπερεκφραζόμενα ή υποεκφραζόμενα μόρια. Για να μελετηθεί η **γενετική ευπάθεια του ΣΕΛ**, έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ίδιων οργάνων, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6, ίδιας ηλικίας, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Στα στάδια προ-εφηβίας, προ-αυτοανοσίας και νεφρίτιδας διαπιστώθηκαν στο σπλήνα 693, 289 και 89 ΔΕΓ, στο νεφρό 63, 930 και 21 ΔΕΓ και, στον εγκέφαλο 2, 2 και 5 ΔΕΓ, αντίστοιχα. Για να μελετηθεί η **οργανοειδικότητα του ΣΕΛ στο χρόνο**, έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος διαφορετικών οργάνων των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου κατά το ίδιο στάδιο του νοσήματος. Κατά το στάδιο της προ-εφηβίας, διαπιστώθηκαν 3304 ΔΕΓ μεταξύ του εγκεφάλου και του νεφρού, 4808 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 3279 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Κατά το στάδιο της προ-αυτοανοσίας διαπιστώθηκαν 2036 ΔΕΓ μεταξύ του εγκεφάλου και του νεφρού, 4483 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 1781 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Στο στάδιο της νεφρίτιδας, διαπιστώθηκαν 3550 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού, 4810 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και 3267 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Για να διαπιστωθεί η **αναπτυξιακή βιολογία του ΣΕΛ** έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ίδιων οργάνων, ίδιων ζωικών προτύπων, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Στο σπλήνα, στον εγκέφαλο και στο νεφρό των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου διαπιστώθηκαν 277, 12 και 1 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της προ-εφηβίας και του σταδίου της προ-αυτοανοσίας; 212, 6 και 8 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου της προ-εφηβίας; και 15, 6 και 2 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου της προ-αυτοανοσίας, αντίστοιχα.

Για να επιλεγεί μία οδός προς περαιτέρω μελέτη, αναζητήθηκαν στα δεδομένα της ανάλυσης νέες κανονικές οδοί που συμμετέχουν στα ζωικά πρότυπα λύκου, τόσο στο περιφερικό λεμφικό όργανο όσο και σε τελικό όργανο-στόχο του νοσήματος. Στα ζωικά πρότυπα λύκου στο στάδιο της νεφρίτιδας διαπιστώνεται η συμμετοχή της κανονικής οδού της **ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού της πήξης**, τόσο στο σπλήνα όσο και στο νεφρό. Είναι γνωστό ότι, στη σήψη ο ιστικός παράγοντας (TF), -ο κυριότερος *in vivo* ενεργοποιητής της εξωγενούς οδού της πήξης αλλά ταυτόχρονα, μέσω υποδοχών PAR, ενεργοποιητής της φλεγμονής- εξωκυττάρωνεται από τα ουδετερόφιλα πάνω στις εξωκυττάρια παγίδες ουδετεροφίλων (NETs). Προηγούμενες μελέτες μας με μικροσυστοιχίες cDNA από μυελό των οστών και miRNA από περιφερικά μονοκύτταρα αίματος ασθενών με ενεργό και ανενεργό ΣΕΛ έδειξαν ότι, οι ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από μία γονιδιακή ταυτότητα ουδετεροφίλων αλλά και από διαταραχή γονιδίων και miRNA που ρυθμίζουν την αυτοφαγία. **Αναζητήθηκε στη βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε η εμπλοκή γονιδίων αυτοφαγίας και ουδετεροφίλων στο ζωικό πρότυπο λύκου** στα διάφορα στάδια του νοσήματος. Παρατηρήθηκε ότι, στο σπλήνα των ζωικών προτύπων λύκου, **γονίδια αυτοφαγίας και ουδετεροφίλων είναι διαφορικά εκφραζόμενα** σε σχέση με το σπλήνα υγιών προτύπων και στα τρία στάδια του νοσήματος. Επομένως, ετέθη η **επιστημονική υπόθεση** ότι, η επαγόμενη με αυτοφαγία μεταφορά του TF στα NETs μπορεί να αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται

στους ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. **Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των διακοσμημένων με TF NETs στο ΣΕΛ.**

Απομονώθηκαν ορός και ουδετερόφιλα από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με ενεργό ή ανενεργό ΣΕΛ. Έγιναν *ex vivo* καλλιέργειες ουδετεροφίλων και *in vitro* διεγέρσεις ή αναστολές τους. Αξιολογήθηκαν τα επίπεδα αυτοφαγίας, η NETωση, η διακόσμηση των NETs με τον TF και την προφλεγμονώδη IL-17 και η προθρομβωτική δραστηριότητα του TF των NETs. Ακολούθως, μελετήθηκαν νεφρικές τομές ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου ως προς την ύπαρξη NETs διακοσμημένων με TF και IL-17. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των NETs από ασθενείς με ΣΕΛ στη μορφολογία ανθρώπινων ποδοκυττάρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν τα εξής: τα ουδετερόφιλα των ασθενών με ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας σε σχέση με τα υγιή και, αυξημένη NETωση η οποία επάγεται από την αυτοφαγία. Βρέθηκε ότι, η αυτοφαγία επάγει τη μεταφορά TF στα NETs του ΣΕΛ, ο οποίος είναι προθρομβωτικός αφού παράγει θρομβίνη. Επίσης, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι, ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ επάγει την αυτοφαγία και την εξαρτώμενη από αυτοφαγία NETωση στα υγιή ουδετερόφιλα. Ταυτόχρονα, αυξάνει τα επίπεδα του TF στα υγιή ουδετερόφιλα και οδηγεί σε απελευθέρωση NETs διακοσμημένων με TF και IL-17. Όλα τα φαινόμενα που βρέθηκαν, αναστέλλονται από την υδροξυχλωροκίνη, που αποτελεί αναστολέα της αυτοφαγίας. Επίσης, η μελέτη αυτή έδειξε ότι, τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs εναποτίθενται στο νεφρό ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου. Τέλος, η επώαση ανθρώπινων ποδοκυττάρων με δομές NETs από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ τροποποίησε τη μορφολογία των ποδοκυττάρων.

Συμπερασματικά, με συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ζωικού προτύπου λύκου χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης RNA νέας γενιάς, **δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων μεταγραφώματος** που χαρακτηρίζει τη **γενετική ευπάθεια του ΣΕΛ, την οργανοειδικότητά του στο χρόνο και την αναπτυξιακή του βιολογία.** Τα ευρήματα αποτελούν **υποψήφιους βιοδείκτες** εξέλιξης του νοσήματος και προσβολής των οργάνων και, **υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους στο ΣΕΛ.** Η συνέχεια της μελέτης στον άνθρωπο έδειξε ότι, **τα NETs αποτελούν ικρυώματα συσσώρευσης βιοδραστικών παραγόντων,** μεταξύ των οποίων ο TF και η IL-17, που παραμένουν στον ιστό ακόμα και απουσία ακέραιων ουδετεροφίλων. **Η ενδοθηλίνη-1 και το C5a** στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ αποτελούν τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές που **ενεργοποιούν την οδό HIF-1/REDD1, η οποία αυξάνει την αυτοφαγία στα ουδετερόφιλα και την επαγόμενη από αυτή NETωση.** Τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs αποτελούν το **σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής** που παρατηρούνται στους ασθενείς με σοβαρό ΣΕΛ και, εξηγούν μέρος της ευεργετικής δράσης που έχει η **υδροξυχλωροκίνη** στη νεφρίτιδα λύκου. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι **τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs τροποποιούν το φαινότυπο ανθρώπινων ποδοκυττάρων και αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από τους ινοβλάστες.** Περιγράφηκαν οι ανοδικοί ρυθμιστές και τα καθοδικά μόρια της NETωσης στο ΣΕΛ και προτείνεται ένα μοντέλο πολλαπλών χτυπημάτων που χρήζει θεραπείας πολλαπλών στόχων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με επανατοποθέτηση φαρμάκων.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is the prototypic systemic autoimmune disease characterized by loss of tolerance to self-nuclear antigens, abnormal B and T cell responses and immune-complex deposition to multiple organs including the skin, joints, kidneys and nervous system. During the last years, mortality has decreased; however, it remains greater than that of the general population. SLE pathogenesis is complex and involves defective clearance of immune-complexes and debris containing nucleic acids, excessive innate immune activation involving Toll-like receptors (TLR) and type I interferons (IFN), and abnormal lymphocyte activation. Despite vigorous research its etiology remains elusive and is thought to result from the interaction of multiple genetic, epigenetic and environmental factors. **The aim of the study** was to further **investigate SLE pathogenesis through a comparative transcriptomic analysis** between NZB/W-F1 lupus-prone mice and C57BL/6 healthy mice, using next-generation sequencing technologies (RNA-sequencing).

Female NZB/W-F1 lupus-prone mice were sacrificed with perfusion at the pre-puberty, pre-autoimmunity and nephritic stage of the disease. Age-matched C57BL/6 mice were used as healthy controls. **A peripheral lymphoid organ (spleen) and target end-organs (kidneys and brain)** were removed, and total RNA was extracted. Paired-end RNA-sequencing was performed with Illumina HiSeq 2000 platform. Sequencing reads were mapped to the reference genome. The relative expression levels of the transcripts and differentially expressed genes (DEGs) ($FC > 1.5$, $p < 0.05$) were calculated. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was used to identify canonical pathways, upstream regulators and top up-regulated or down-regulated molecules. To investigate **genetic susceptibility of SLE**, a comparative transcriptome analysis was performed between same organs of NZB/W-F1 and C57BL/6 of the same age, at different stages of the disease. At the pre-puberty, pre-autoimmunity and nephritic stage of the disease, 693, 289 and 89 DEGs were identified in the spleen; 63, 930 and 21 DEGs were identified in the kidney; and 2, 2 and 5 DEGs were identified in the brain of lupus-prone vs healthy mice, respectively. To investigate **tissue-specificity in SLE**, a comparative transcriptome analysis between different organs of NZB/W-F1 lupus-prone mice of the same stage of the disease was performed. At the pre-puberty stage, 3304 DEGs were identified between the brain and the kidney; 4808 DEGs were identified between the brain and the spleen; and 3279 DEGs were identified between the kidney and the spleen of lupus-prone mice. At the pre-autoimmunity stage, 2036 DEGs were identified between the brain and the kidney; 4483 DEGs were identified between the brain and the spleen; and 1781 DEGs were identified between the kidney and the spleen of lupus-prone mice. At the nephritic stage, 3550 DEGs were identified between the brain and the kidney; 4810 DEGs were identified between the brain and the spleen; and 3267 DEGs were identified between the kidney and the spleen of lupus-prone mice. To investigate the **developmental biology of SLE**, a comparative transcriptome analysis was performed between same organs of the same mouse model at different stages of the disease. In the spleen, brain and kidney of NZB/W-F1 lupus-prone mice, 277, 6 and 8 DEGs were identified at the pre-puberty vs the pre-autoimmunity stage; 212, 6 and 8 DEGs were identified at the nephritic vs the pre-puberty stage; and 15, 6 and 2 DEGs were identified at the nephritic vs the pre-autoimmunity stage, respectively.

At the nephritic stage of the disease, the **extrinsic prothrombin activation pathway** was identified both at the spleen and the kidneys of lupus-prone mice. It is known that in sepsis, tissue factor (TF) -the main *in vivo* initiator of the extrinsic pathway of the coagulation cascade, and at the same time a trigger of inflammation- is released on neutrophil extracellular traps (NETs). Using DNA and microRNA arrays, we have previously shown that patients with active SLE express a strong neutrophil and deregulated autophagy signature. In this study, we found that **neutrophilic and autophagy-related genes** were differentially expressed in the spleens of lupus-prone mice at all stages of the disease. **We hypothesized that** autophagy-dependent delivery of TF on NETs could represent a link between increased thrombogenicity and inflammation observed in SLE. **The next aim of the study was to investigate the role of TF-decorated NETs in SLE.**

Serum and neutrophils from **healthy donors and SLE patients (active and on treatment with hydroxychloroquine)** were isolated. Cultures of *ex vivo* neutrophils, and *in vitro* stimulation or inhibition studies were performed. Autophagy levels were evaluated by confocal microscopy and immunoblotting. NET release was studied by confocal microscopy, NETs were measured by MPO-DNA complex ELISA in cell culture supernatants and in serum. TF and IL-17 expression was studied by confocal microscopy and immunoblotting. TF activity was measured with thrombin-antithrombin complex ELISA. Kidney biopsies from patients with

proliferative lupus nephritis (LN) were examined with immunofluorescence for the presence of TF-decorated NETs and IL-17-decorated NETs. Finally, the effect of SLE NETs on human cultured podocytes was investigated. We found that neutrophils from patients with active SLE expressed increased autophagy levels and increased NETosis in an autophagy-dependent manner. NETs released from patients with active SLE were decorated with IL-17 and active TF leading to thrombin generation. Serum from patients with active SLE induced autophagy in healthy neutrophils and autophagy-dependent TF-decorated NET release, suggesting that the inflammatory environment of SLE mediates these processes. Treatment of patients with hydroxychloroquine -an autophagy inhibitor- reverses these phenomena. Importantly, TF- and IL-17-decorated NETs infiltrated the kidneys (both in the glomeruli and the tubulointerstitium) of patients with proliferative LN even in the absence of intact neutrophils within the kidney. Culture of human podocytes in the presence of active SLE NETs altered the morphology of the cells.

In conclusion, this next-generation sequencing analysis of lupus-prone mice revealed a **data-base of differentially expressed transcripts that characterize genetic susceptibility, tissue-specificity and developmental biology of SLE**. These findings represent novel biomarkers of organ involvement and disease progression, and novel therapeutic targets in SLE. We also found that, **in human SLE, NETs represent scaffolds with accumulated bioactive molecules such as TF and IL-17**, that remain in target tissues even in the absence of intact neutrophils. **Endothelin-1 and C5a** represent the inflammatory mediators that **activate the HIF-1/REDD1 pathway that increases autophagy in neutrophils mediating NETosis**. **TF- and IL-17-decorated NETs alter the morphology of cultured podocytes and mediate collagen production from fibroblasts**. We described a multiple-hit model that needs a multitarget therapy that could be represented by repositioned drugs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ

Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) είναι το πρωτότυπο συστηματικό χρόνιο αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από απώλεια ανοχής στα πυρηνικά αντιγόνα εαυτού, παθολογικές απαντήσεις Β και Τ λεμφοκυττάρων και εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων σε διάφορα όργανα. Είναι μια ετερογενής νόσος με μεγάλη ποικιλομορφία στην προσβολή οργάνων και απάντηση στη θεραπεία. Η παθογένεια του ΣΕΛ είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει διαταραχή στην κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων και νεκρών συγκριμάτων/καταλοίπων που περιέχουν πυρηνικά οξέα, έντονη ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας με συμμετοχή των Toll-like receptors (TLR) και της ιντερφερόνης (IFN) τύπου Ι και, παθολογική ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων^{1,2}. Παρά τις εντατικές προσπάθειες, η αιτιολογία του ΣΕΛ ακόμα παραμένει αδιευκρίνιστη και, θεωρείται ότι προκαλείται από αλληλεπίδραση γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που περιέγραψε τις δερματικές εκδηλώσεις του ΣΕΛ ως «έρπης εσθιόμενος»³. Ο Παράκελσος, ένας ιατρός του 15^{ου} αιώνα, χρησιμοποίησε τον όρο «λύκος» για να περιγράψει τις δερματικές εκδηλώσεις του νοσήματος που προσομοιάζουν με δήγμα «πεινασμένου λύκου για φρέσκα σάρκα» ενώ, ο όρος «ερυθηματώδης» χρησιμοποιήθηκε από το Γάλλο δερματολόγο Bielt στα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Ο Sir William Osler χρησιμοποίησε τον όρο “Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος” αφού, αναγνώρισε ότι το νόσημα αυτό έχει συστηματική προσβολή⁴.

1.1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ, ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Το 1982, το Αμερικάνικο Κολλέγιο Ρευματολογίας (American College of Rheumatology, ACR) όρισε τα κριτήρια ταξινόμησης του ΣΕΛ⁵, τα οποία αναθεωρήθηκαν το 2012 από την ομάδα Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)⁶ (πίνακας 1.1.1). Βάσει των κριτηρίων, η συχνότητα του ΣΕΛ είναι 1-23 περιστατικά ανά 100000 άτομα το έτος και, ο επιπολασμός κυμαίνεται από 6,5-150 ανά 100000. Το νόσημα είναι συχνότερο στις γυναίκες, με λόγο γυναίκες προς άνδρες 9:1 και, μπορεί να εμφανιστεί σε κάθε ηλικία, με ηλικία έναρξης μεταξύ 20-55 έτη. Υψηλότερη συχνότητα του νοσήματος παρατηρείται στις μη Καυκάσιες φυλές, όπως Αφροαμερικανούς, Αμερικανούς, Ισπανούς και Ασιάτες. Τα τελευταία 60 έτη, η επιβίωση έχει σημαντικά βελτιωθεί, με την 5ετή επιβίωση να αυξάνεται από 50% το 1950 στο 95% το 2000. Όμως, η θνητότητα είναι περίπου τριπλάσια από ότι στο γενικό πληθυσμό⁷.

Ο ΣΕΛ είναι ένα χρόνιο νόσημα που χαρακτηρίζεται από εναλλαγή εξάρσεων και υφέσεων. Ξεκινά από το υποκλινικό στάδιο, το οποίο χαρακτηρίζεται από δημιουργία αυτοαντισωμάτων. Κατά το κλινικό στάδιο, η φλεγμονή οδηγεί σε προσβολή οργάνων η οποία αθροίζεται στο χρόνο. Ακολουθεί το στάδιο της συν-νοσηρότητας εξαιτίας της μακροχρόνιας πορείας του νοσήματος και των επιπλοκών της θεραπείας. Ο ασθενής συνήθως προσέρχεται με γενικευμένη συμπτωματολογία με αδυναμία, καταβολή δυνάμεων και κακουχία. Τα τυπικά συμπτώματα και σημεία είναι έλκη στόματος, αρθραλγία, φωτοευαισθησία, λεμφαδενοπάθεια, ξηρότητα οφθαλμών και στόματος, φαινόμενο Raynaud και αλωπεκία. Η νεφρική προσβολή είναι σταδιακή και χρήζει άμεσης αναγνώρισης εξαιτίας του υψηλού κινδύνου εξέλιξης σε νεφρική ανεπάρκεια. Οι νευροψυχιατρικές εκδηλώσεις του ΣΕΛ είναι συχνές και μπορούν να εμφανιστούν και μεμονωμένα. Ο ΣΕΛ μπορεί να προκαλέσει ορογονίτιδα (πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα, περιτονίτιδα), δερματική προσβολή (εξάνθημα δίκην χρυσασπίδας, φωτοευαισθησία), γαστρεντερικές διαταραχές (κοιλιακό άλγος, ανορεξία, ναυτία, εμέτους, αγγειίτιδα μεσεντερικών αγγείων, ηπατίτιδα), εκδηλώσεις από το αναπνευστικό σύστημα (πνευμονίτιδα, ενδοκυψελιδική αιμορραγία, πνευμονική υπέρταση, πνευμονική εμβολή) και, εκδηλώσεις από το καρδιαγγειακό σύστημα (περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, βαλβιδοπάθεια και στεφανιαία νόσο).

1.1.3. ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟ ΣΕΛ

Κλινική νεφρική νόσος παρατηρείται περίπου στο 38% των ασθενών με ΣΕΛ και οφείλεται κυρίως στη νεφρίτιδα λύκου. Ο επιπολασμός της νεφρίτιδας λύκου (Lupus Nephritis, LN) είναι μεγαλύτερος σε

Πίνακας 1.1.1: Κριτήρια ταξινόμησης ΣΕΛ^{5,6}. Για τη διάγνωση του ΣΕΛ είναι απαραίτητη η ύπαρξη 4/11 από τα κριτήρια σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της πορείας του νοσήματος

	Κριτήριο	Ορισμός
1	Εξάνθημα παρειών	Σταθερό ερύθημα, επίπεδα ή επηρμένο, μπροστά από τις παρειές, συνήθως δεν καλύπτει τις ρινοπαραρριχτικές αύλακες
2	Δισκοειδές εξάνθημα	Ερυθματώδεις επηρμένες κηλίδες με αποφολιδωτικές πλάκες. Σε παλαιές βλάβες, παρατηρούνται ουλές
3	Φωτοευαισθησία	Εξάνθημα δέρματος ως αποτέλεσμα ασυνήθους απάντησης στην έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία
4	Έλκη στόματος	Εξελκώσεις στόματος ή ρινοφάρυγγα, συνήθως ανώδυνες
5	Αρθρίτιδα	Συνήθως μη διαβρωτική αρθρίτιδα που προσβάλλει >2 περιφερικές αρθρώσεις Χαρακτηρίζεται από ευαισθησία και οίδημα
6	Ορογονίτιδα	(α) Πλευρίτιδα: ιστορικό πλευρικού άλγους ή επιβεβαίωση πλευρίτιδας με την κλινικοεργαστηριακή εξέταση ή (β) Περικαρδίτιδα: επιβεβαίωση με ηλεκτροκαρδιογράφημα ή υπερηχογράφημα ή με περικαρδιακό ήχο τριβής
7	Νεφρική διαταραχή	(α) Εμμένουσα πρωτεϊνουρία >500 mg/day (β) Κυτταρικοί κύλινδροι: ερυθροκυτταρικοί, αιμοσφαιριναιμικοί, κοκκώδεις, σωληναριακοί ή μεικτοί
8	Νευρολογική διαταραχή	(α) Επιληπτικές κρίσεις απουσία φαρμάκων ή μεταβολικών διαταραχών (β) Ψύχωση απουσία φαρμάκων ή μεταβολικών διαταραχών
9	Αιματολογική διαταραχή	(α) Αιμολυτική αναιμία με δικτυοερυθροκυττάρωση ή (β) Λευκοπενία: συνολικός αριθμός <4000/mm ³ σε >2 μετρήσεις ή (γ) Λεμφοπενία: <1500/mm ³ σε >2 μετρήσεις ή (δ) Θρομβοπενία <100000/mm ³ απουσία φαρμάκου
10	Ανοσοορολογική διαταραχή	(α) Κύτταρα λύκου ή (β) Θετικά anti-DNA αντισώματα ή (γ) Θετικά anti-Sm αντισώματα ή (δ) Ψευδώς θετικός ορολογικός έλεγχος σύφιλης >6 μήνες
11	Αντιπυρηνικά αντισώματα	Παθολογικός τίτλος αντιπυρηνικών αντισωμάτων με ανοσοφθορισμό απουσία φαρμάκων που προκαλούν νόσημα που προσομοιάζει με το λύκο

Αφροαμερικανούς (40-69%). Ακολουθούν οι Ασιάτες (47-53%) και οι Ισπανοί (36-61%) ενώ, ο επιπολασμός είναι μικρότερος στους Ευρωπαίους (12-33%). Ο επιπολασμός χρόνιας νόσου τελικού σταδίου (ΧΝΝΤΣ) εξαιτίας νεφρίτιδας λύκου είναι 4.9 περιστατικά ανά εκατομμύριο γενικού πληθυσμού και, είναι μεγαλύτερος στους Αφροαμερικανούς (17-20 περιστατικά ανά εκατομμύριο γενικού πληθυσμού) και Ισπανούς (6 περιστατικά ανά εκατομμύριο γενικού πληθυσμού).

Η κλινική εικόνα της νεφρίτιδας λύκου είναι ετερογενής και χαρακτηρίζεται, όπως κάθε εκδήλωση του ΣΕΛ, από εξάρσεις και υφέσεις. Η νεφρίτιδα λύκου δύναται να εμφανιστεί με ασυμπτωματική αιματουρία ή πυουρία, πρωτεϊνουρία νεφρικού ή νεφρωσικού επιπέδου, διαταραχές σωληναριακής λειτουργίας, έκπτωση νεφρικής λειτουργίας, αρτηριακή υπέρταση και ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα. Άλλες νεφρικές εκδηλώσεις του ΣΕΛ είναι η αγγειοπάθεια, η σωληναριοδιάμεση νόσος, οι ποδοκυτοπάθειες και ο φαρμακευτικός λύκος. Το 2003, η Διεθνής Εταιρία Νεφρολογίας (International Society of Nephrology, ISN) και η Εταιρεία Νεφρικής Παθολογίας (Renal Pathology Society, RPS) αναθεώρησαν την προηγούμενη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) της νεφρίτιδας λύκου^{8,9}. Οι νεφρικές εκδηλώσεις του ΣΕΛ παρατίθεται στον *πίνακα 1.1.2*.

Η έγκαιρη διάγνωση της νεφρίτιδας λύκου είναι καθοριστικής σημασίας στη διατήρηση της νεφρικής λειτουργίας. Η νεφρική λειτουργία και το ίζημα ούρων αξιολογούνται κατά την πρώτη εξέταση του ασθενούς, κατά τις εξάρσεις και σε κάθε υπόνοια έξαρσης του νοσήματος. Η πρωτεϊνουρία είναι ο πλέον ευαίσθητος δείκτης νεφρικής προσβολής και, αποτελεί βιοδείκτη έξαρσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η βιοψία νεφρού είναι απαραίτητη τόσο στη διάγνωση του ΣΕΛ και της νεφρίτιδας του, όσο και στον καθορισμό της θεραπείας. Ενδείκνυται σε ασθενείς με πρωτεϊνουρία >500 mg/day κυρίως σε συνύπαρξη με θετικό ίζημα ούρων και, παρέχει πληροφορίες για την ενεργότητα και χρονιότητα του νοσήματος.

Πίνακας 1.1.2: Νεφρική προσβολή στο ΣΕΛ

Ταξινόμηση της ανοσοσυμπλεγματικής Νεφρίτιδας Λύκου κατά ISN/RPS 2003 ^{8,9}
Τάξη I ή Ελάχιστη Μεσαγγειακή Νεφρίτιδα Λύκου
Τάξη II ή Μεσαγγειακή Υπερπλαστική Νεφρίτιδα Λύκου
Τάξη III ή Εστιακή Νεφρίτιδα Λύκου (προσβολή <50% των σπειραμάτων) • III (A) (ενεργείς βλάβες) • III (A/C) (ενεργείς και χρόνιες βλάβες) • III (C) (χρόνιες βλάβες)
Τάξη IV ή Διάχυτη Νεφρίτιδα Λύκου (προσβολή >50% των σπειραμάτων) • IV-S (τμηματική) ή IV-G (ολική) • IV (A) (ενεργείς βλάβες) • IV (A/C) (ενεργείς και χρόνιες βλάβες) • IV (C) (χρόνιες βλάβες)
Τάξη V ή Μεμβρανώδης Νεφρίτιδα Λύκου
Τάξη VI ή Προχωρημένη Σκλήρυντική Νεφρίτιδα Λύκου (>90% των σπειραμάτων με ολική σκλήρυνση χωρίς υπολειπόμενη λειτουργία)
Άλλες ιστολογικές βλάβες στο ΣΕΛ στο νεφρό
Αγγειακή προσβολή • Αγγειοπάθεια λύκου • Θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια • Αληθής αγγειίτιδα λύκου
Σωληναριο-διάμεση νόσος • Σωληναρίτιδα • Διάμεση ίνωση
Ποδοκυτοπάθεια Λύκου

1.1.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΣΕΛ ΚΑΙ ΒΛΑΒΗΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ (ΝΕΦΡΟΥ)

Η παθογένεια του ΣΕΛ είναι πολύπλοκη και, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνει διαταραχή στην κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων και νεκρών συγκριμάτων που περιέχουν πυρηνικά οξέα, έντονη ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας με συμμετοχή των Toll-like receptors (TLR) και της ιντερφερόνης (IFN) τύπου I και, παθολογική ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Παρά τις εντατικές προσπάθειες, η αιτιολογία του ΣΕΛ ακόμα παραμένει αδιευκρίνιστη και, θεωρείται ότι προκαλείται από αλληλεπίδραση γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

1.1.4.1. Γενετική βάση στο ΣΕΛ

Η γενετική συνεισφορά στην ανάπτυξη του ΣΕΛ υποστηρίζεται από την εμφάνιση του νοσήματος σε οικογένειες, από την υψηλή κληρονομικότητα (η οποία είναι >66%) και από το υψηλότερο ποσοστό αντιστοιχίας στους μονοζυγωτικούς από ότι στους διζυγωτικούς διδύμους (25-55% vs 2-5%, αντίστοιχα)¹⁰⁻¹².

Μέχρι πρόσφατα, οι γενετικές μεταβλητές (genetic variants) που συσχετίζονται με ένα φαινότυπο ή ένα νόσημα αναγνωρίζονταν με μελέτες συσχέτισης ενός υποψήφιου γονιδίου και με ανάλυση σύνδεσης πολλαπλών οικογενειών. Η εμφάνιση των νέων μεθόδων γονοτύπησης υψηλής απόδοσης και η τεράστια πρόοδος στην επιστήμη των ηλεκτρονικών υπολογιστών οδήγησε στην ανακάλυψη πολλών νέων γενετικών μεταβλητών. Κατά την τελευταία δεκαετία, οι μελέτες συσχέτισης ολικού γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS), κατάφεραν να προσδιορίσουν χιλιάδες έως εκατομμύρια πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) και πολλαπλούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου που συσχετίζονται με πολύπλοκα νοσήματα, σε χιλιάδες άτομα διαφορετικών φυλών. Οι GWAS έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να συσχετίσουν μεταβλητές της αλληλουχίας του DNA με ένα φαινότυπο ή ένα νόσημα χωρίς να προηγηθεί τοποθέτηση επιστημονικής υπόθεσης.

Μέχρι σήμερα, τα GWAS αναγνώρισαν περισσότερους από 60 γενετικούς τόπους (genetic loci) που συσχετίζονται με το ΣΕΛ. Η **περιοχή Human Leukocyte Antigen (HLA)** αναγνωρίστηκε ως η ισχυρότερη περιοχή ευπάθειας στο ΣΕΛ, ακόμα και σε άτομα που ανήκουν σε διαφορετικές φυλές. Συγκεκριμένα, κάθε αλληλίο των γονιδίων HLA-DR2 (DRB1*1501) και HLA-DR3 (DRB1*0301) τάξης II διαπιστώθηκε ότι αποδίδει διπλάσιο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης ΣΕΛ τόσο στους Ευρωπαίους όσο και στους Ασιάτες. Γενετικές

μεταβλητές της περιοχής HLA τάξης III, η οποία περιέχει τα γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος συμπλήρωμα (C) C2, C4A, C4B, CFB και TNF (tissue necrosis factor), προδιαθέτουν στην εμφάνιση του νοσήματος. Περίπου 75% των ατόμων με ανεπάρκεια C4 και 25% των ατόμων με ανεπάρκεια C2 αναπτύσσουν ΣΕΛ ή νόσημα που προσομοιάζει με το ΣΕΛ, πιθανά εξαιτίας ανεπαρκούς κάθαρσης ανοσοσυμπλεγμάτων. Είναι αξιοσημείωτο το ότι, η μείωση του αριθμού των αντιγράφων του C4A προδιαθέτει στην εμφάνιση ΣΕΛ ενώ, η αύξησή τους προσφέρει προστασία έναντι στο νόσημα. Επίσης, ανεξάρτητα του HLA τάξης II, μία περιοχή μέσα στο γονίδιο MSH5 και ένας SNP στο γονίδιο SKIPV2L του HLA τάξης III διαπιστώθηκε ότι συσχετίζονται με την εμφάνιση του νοσήματος.

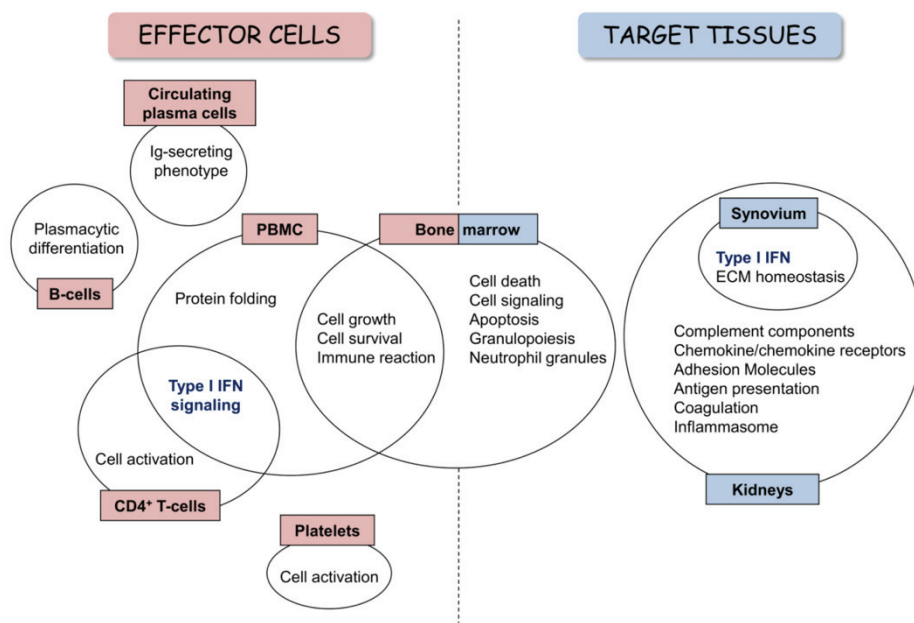
Ισχυρές περιοχές ευπάθειας αναγνωρίστηκαν, επίσης, και σε **περιοχές ανεξάρτητες του HLA**, οι περισσότερες από τις οποίες βρίσκονται μέσα ή κοντά σε γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτοί οι γενετικοί τόποι συσχετίζονται με την αποδόμηση του DNA, την απόπτωση και την κάθαρση καταλοίπων (TREX1^{13,14}, DNase1¹⁵, ATG5^{16,17}, ATG16L2¹⁸ και RAD51B^{17,19}), τη λειτουργία ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων (ITGAM^{16,19-23} και ICAM²⁴), την κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων (FCGR2A/B²⁵⁻²⁸ CR2^{29,30}, C1Q³¹⁻³³, C1R/C1S³⁴), τη σηματοδότηση TLR και IFN τύπου I (IRF7/PHRF1^{16,17}, IRF5/TNPO3^{16,19,20,35}, IRF8³⁶, IFIH1^{17,37,38} και miR146a^{17,39}), τη σηματοδότηση NF-κΒ (TNIP1^{19,40,41}, SLC15A4^{17,42}, PRKCB^{43,44}, IRAK1/MECP2^{17,45,46} και UBE2L3^{16,35,42,47-49}), και τη λειτουργία και σηματοδότηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων (BLK^{20,35,42,50}, LYN^{16,51}, ETS1^{18,35,52,53}, ELF1^{44,54}, CIITA/SOCS1¹⁷, BANK1^{17,55-57}, IL10⁴¹, RASGRP3^{35,53}, STAT4^{19,20,35,58}, IKZF1^{18,35,38}, IKZF2¹⁷, AFF1^{44,59}, CSK^{17,60}, RPTN22^{20,61-63}, TNFSF4^{19,57,64-66}, CD80⁶⁷, IL12A¹⁷, TCF7⁶⁸, PPP2CA⁶⁹, και PDHX/CD44⁷⁰). Επίσης, διαπιστώθηκαν γενετικοί τόποι που συσχετίζονται με το ΣΕΛ χωρίς, όμως, η δράση τους να είναι πλήρως διευκρινισμένη (SMG7⁷¹, PXX/ABHD6^{16,56,72,73}, NMNAT2^{16,35,71}, JAZF1^{19,41}, XKR6¹⁶, WDFY4^{17-19,35,52}, ARID5B^{17,44,67}, DHCR7/NADSYN1¹⁷, SH2B3¹⁷, PLD2¹⁷, TET3^{44,67}, GPR19⁶⁷, DRAM1^{17,67}, CXorf21¹⁴, και PRPS2^{19,74}). Τα ευρήματα αυτά προέκυψαν από μελέτη πολλών ατόμων, διαφορετικής φυλετικής προέλευσης και, αποκάλυψαν ότι, η πλειοψηφία του γενετικού κινδύνου στο ΣΕΛ είναι κοινή μεταξύ των διαφορετικών εθνοτήτων. Παρά την πληθώρα των ευρημάτων, οι γενετικές μεταβλητές που διαπιστώθηκαν εξηγούν μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της κληρονομικότητας του ΣΕΛ, αντιστοιχούν σε ένα μικρό ποσοστό της ολικής γενετικής συνεισφοράς και, συνεισφέρουν ελάχιστα στον ολικό γενετικό κίνδυνο εμφάνισης του νοσήματος. Η αναγνώριση μεταβλητών που αποτελούν «αίτιο ΣΕΛ» αποδεικνύεται δύσκολη.

Πρόσφατα, λάβαμε τα αποτελέσματα της πιλωτικής φάσης και της φάσης τεχνολογικής ανάπτυξης του ENCYClopedia Of DNA Elements (ENCODE) project που, σαν σκοπό είχε την πλήρη περιγραφή των λειτουργικών στοιχείων που αποτελούν τα ανθρώπινο γονιδίωμα. Ένα από τα πλέον εντυπωσιακά ευρήματά του ήταν ότι, το 80% του γονιδιώματος περιέχει στοιχεία τα οποία είναι συνδεδεμένα με βιοχημικές λειτουργίες, καταρρίπτοντας την άποψη ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται κυρίως από «DNA σκουπίδι» (junk DNA). Αναγνωρίστηκε ότι, οι περιοχές μεταξύ γονιδίων διαθέτουν ενισχυτές, υποκινητές και περιοχές που κωδικοποιούν μετάγραφα RNA τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά έχουν ρόλο ρυθμιστή. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι, πολλές μεταβλητές DNA που συσχετίζονται με ανθρώπινα νοσήματα βρίσκονται μέσα ή κοντά σε μη κωδικοποιητικά, αλλά λειτουργικά, στοιχεία του DNA⁷⁵. Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν ότι, τόσο τα κωδικοποιητικά όσο και τα μη κωδικοποιητικά, αλλά ρυθμιστικά, γονιδιώματα είναι σημαντικά στην εμφάνιση πολύπλοκων νοσημάτων, όπως είναι ο ΣΕΛ, των οποίων η κατανόηση θα επιτραπεί με μελέτες έκφρασης ολικού γονιδιώματος.

1.1.4.2. Γονιδιακή έκφραση στο ΣΕΛ

Η γονιδιακή έκφραση (μεταγράφωμα) αποτελεί τον ενδιάμεσο φαινότυπο μεταξύ ποικιλομορφίας DNA και φαινοτυπικής μεταβλητότητας ενός νοσήματος. Είναι κληρονομούμενη, μπορεί να επηρεαστεί τόσο στο μεταφραστικό όσο και στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο και, παρέχει πληροφορίες για το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στα κύτταρα ή στους ιστούς. Ο ρόλος του περιβάλλοντος στην παθογένεια πολύπλοκων νοσημάτων αποκαλύπτεται από το ποσοστό ασυμφωνίας μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων. Το περιβάλλον οδηγεί σε επιγενετικά φαινόμενα όπως, μεθυλίωση DNA/RNA και τροποποίηση ιστονών, τα οποία σε συνδυασμό με τα microRNAs ρυθίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Συγκρίνοντας τη γονιδιακή έκφραση μεταξύ διαφορετικών καταστάσεων μπορούμε να διαπιστώσουμε τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων και, να αποκαλύψουμε και να κατανοήσουμε οδούς που επηρεάστηκαν^{76,77}.

Στο ΣΕΛ, η σύγκριση του μεταγραφώματος των κυττάρων τελεστών και των τελικών οργάνων-στόχων του νοσήματος έγινε κυρίως μικροσυστοιχίες (εικόνα 1.1.1)⁷⁸. Η σύγκριση του μοτίβου γονιδιακής έκφρασης των **περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων αίματος** (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) ασθενών με ΣΕΛ και υγιών ατόμων αποκάλυψε διαταραχή της οδού IFN τύπου I, η οποία ονομάστηκε «υπογραφή IFN». Στα ίδια κύτταρα διαπιστώθηκε διαφορική έκφραση γονιδίων που συσχετίζονται με τα ουδετερόφιλα, τη σύνθεση ATP που κωδικοποιείται από γονίδια μιτοχονδριακού DNA, την επιδιόρθωση του DNA, την απόπτωση και την κυτταρική κίνηση⁷⁹⁻⁸⁴. Σε **απομονωμένους κυτταρικούς πληθυσμούς**, το κοινό μοτίβο έκφρασης ήταν και πάλι η «υπογραφή IFN». Στα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, τα περισσότερα διαφορικά



Εικόνα 1.1.1: Γονιδιακή έκφραση στο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο. Βιολογικές διεργασίες που αναγνωρίστηκαν με τεχνικές υψηλής απόδοσης τόσο σε κύτταρα τελεστές όσο και σε όργανα-στόχους
Από: *Eur J Clin Invest* 2013; 43: 1084-96

εκφραζόμενα μετάγραφα διέθεταν υποκινητές με θέσεις δέσμευσης των ρυθμιστικών παραγόντων IFN-3 και -7 (interferon regulatory factor, IRF)⁸⁵ και, στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα ασθενών με κακή κλινική έκβαση, η υπογραφή ήταν εμπλουτισμένη με γονίδια της οικογένειας IL-17R και της σηματοδότησης του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCR)⁸⁶. Τα B λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονταν από διαταραχή της έκφρασης γονιδίων που συσχετίζονται με φαινότυπο έκκρισης ώριμης ανοσοσφαιρίνης και από διαταραχή της έκφρασης γονιδίων που συσχετίζονται με την παραμονή των κυττάρων στην κυκλοφορία⁸⁷. Επίσης, τα αιμοπετάλια ασθενών με ΣΕΛ και ιστορικό αγγειακής νόσου χαρακτηρίζονταν και αυτά από την «υπογραφή IFN»⁸⁸. Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης των **προσβεβλημένων ιστών** έδειξαν ότι, ο αρθρικός υμένας των ασθενών με ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση γονιδίων που επάγονται από την IFN και υποέκφραση γονιδίων που συσχετίζονται με την ομοιοστασία εξωκυττάριας ουσίας⁸⁹. Προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας, που έγιναν με μικροσυστοιχίες cDNA μυελού των οστών από ασθενείς με ενεργό και ανενεργό ΣΕΛ, έδειξαν ότι, οι ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από μία ισχυρή ταυτότητα απόπτωσης και ουδετεροφίλων, υποδεικνύοντας ότι οι αυτοάνοσες απαντήσεις μπορεί να ξεκινούν ή να επιδεινώνονται από απελευθέρωση ουδετεροφιλικών κοκκίων^{90,91}. Τα σπειράματα ασθενών με νεφρίτιδα λύκου, που αφαιρέθηκαν από τον ιστό με μικροτόμο με laser, χαρακτηρίζονταν από ετερογένεια ως προς τα μοτίβα γονιδιακής έκφρασης δείχνοντας ότι, διαφορετικές μοριακές οδοί συνεισφέρουν στη διαφορετική ιστική βλάβη που χαρακτηρίζει τις τάξεις της νεφρίτιδας λύκου. Επίσης, σπειράματα που εμφάνισαν μεταγράψωμα παρόμοιο με αυτό των NK κυττάρων παρουσίασαν προστασία στη νεφρική βλάβη ενώ, τα σπειράματα ασθενών που παρουσίαζαν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης νεφρικής ίνωσης, χαρακτηρίζονταν από υπερέκφραση ομάδας γονιδίων που συσχετίζονται με την ίνωση. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά αφού δείχνουν ότι, στο ΣΕΛ, ο ίδιος ο ιστός καθορίζει την τελική του βλάβη σύμφωνα με την απάντησή του στην ενεργοποίηση της συστημικής αυτοανοσίας⁹².

Παρά την πληθώρα των ευρημάτων στην έρευνα του ΣΕΛ, πολλά ερωτήματα ακόμα παραμένουν αναπάντητα. Για παράδειγμα, δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί εάν όλες αυτές οι διαταραχές αποτελούν πρωτοπαθές ή δευτεροπαθές φαινόμενο στο νόσημα, με αποτέλεσμα τα ευρήματα να μην μπορούν εύκολα να μεταφραστούν σε στοχευμένες θεραπείες. Επίσης, ο φυλετικός διμορφισμός, η συμβολή της

αλληλεπίδρασης γονιδίου με γονίδιο ή γονιδίου με περιβάλλον και, οι παράγοντες που καθορίζουν τη ποικιλομορφία ως προς το φαινότυπο και την απάντηση στη θεραπεία δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί. Η αλληλούχηση RNA (RNA sequencing, RNA-seq) αποτελεί μια τεχνολογία αλληλούχησης RNA νέας γενιάς, η οποία επιτρέπει την ταχεία *de novo* αναγνώριση νέων γονιδίων και εξωνίων, ισομορφών εναλλακτικού ματίσματος, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων RNA, μεταγράφων σε σύντηξη, μεταγράφων διαφορετικών αλληλίων και θέσεων έναρξης της μεταγραφής. Η τεχνική αυτή, που ξεκίνησε να εφαρμόζεται και στην έρευνα του ΣΕΛ, θα μπορούσε να απαντήσει αρκετά από τα αναπάντητα ερωτήματά μας⁷⁶.

Για να αναλυθεί η έκφραση των μεταγράφων του IRF5 των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος των ασθενών με ΣΕΛ, οι *Stone RC et al.*, χρησιμοποιώντας την τεχνική της RNA-seq, αναγνώρισαν μία υπογραφή μεταγράφων εναλλακτικού ματίσματος διαφορετική από ότι στους υγιείς. Οι ισομορφές IRF5 εμφάνισαν διαφορικές ικανότητες στη ρύθμιση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών που συμμετέχουν στο ΣΕΛ⁹³. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι, τα μονοκύτταρα των ασθενών με ΣΕΛ εμφάνισαν μειωμένη έκφραση ενδογενών ρετροϊών και μικρών πυρηνικών RNA και, αυξημένη έκφραση pre-microRNAs, μοτίβων εναλλακτικού ματίσματος και γενετικών τόπων που εδράζονται στα χρωμοσώματα 18 και 8⁹⁴. Σε μελέτες RNA-seq ενός κυτταρικού τύπου, διαπιστώθηκε, στα Β λεμφοκύτταρα, διαταραχή στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ανοσοσφαιρίνες και, στα μονοκύτταρα, διαταραχή στην έκφραση δομικών ριβοσωμικών συστατικών⁹⁵. Επίσης, χρησιμοποιώντας την τεχνική της Assay for Transposase Accessible Sequencing (ATAC-seq) σε ανώριμα Β λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ διαπιστώθηκαν δίκτυα μεταγραφικών παραγόντων και μία υπογραφή που χαρακτηρίζει αυξημένη ικανότητα πρόσβασης μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη⁹⁶. Η αλληλεπίδραση γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων μπορεί να μελετηθεί συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των μελετών γονιδιακής έκφρασης με τα αποτελέσματα μελετών γονιδιώματος, συσχετίζοντας τους πολυμορφισμούς με το μεταγράψωμα. Πρόσφατα, χρησιμοποιώντας RNA-seq σε επίπεδο εξωνίου, ανακαλύφθηκαν υποψήφιες θέσεις expression Quantitative Trait Loci (eQTLs) που πιθανά αποτελούν αίτιο ΣΕΛ⁹⁷.

1.1.4.3. Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στο ΣΕΛ

Τα επίπεδα μεταγράφων του RNA επηρεάζονται από επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως οι τροποποιήσεις των ιστονών ή η μεθυλίωση του DNA, και από τα microRNAs.

Είναι γνωστό ότι, η παρατεταμένη έκθεση σε φάρμακα τα οποία **υπομεθυλιώνουν το DNA**, όπως η υδραλαζίνη και η προκαΐναμίδη, οδηγεί στην εμφάνιση εικόνας που προσομοιάζει με ΣΕΛ. Τα Τ λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από ολική ή γονιδιακή υπομεθυλίωση, η οποία φαίνεται ότι συσχετίζεται με την ενεργότητα του νοσήματος, με την υπερέκφραση γονιδίων των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων, με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και με το θάνατο μονοκυττάρων και μακροφάγων⁹⁸⁻¹⁰¹.

Σε απάντηση σε περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες, οι μετα-μεταφραστικές **τροποποιήσεις των ιστονών**, όπως η ακετυλίωση και η μεθυλίωση, επηρεάζουν τη μεταγραφική πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων. Μονοκύτταρα και CD4⁺ λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ και σπληνοκύτταρα από ζωικά πρότυπα λύκου εμφανίζουν ολική ή γονιδιακή ακετυλίωση των ιστονών-3 και -4, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων που συσχετίζονται με τις οδούς IFN τύπου Ι, TNF-α, IL-6, IL-10 και IL-17F. Επίσης, η χορήγηση αναστολέων της απο-ακετυλάσης των ιστονών σε ζωικά πρότυπα λύκου, βελτίωσε την κλινική τους εικόνα¹⁰²⁻¹⁰⁸. Χρησιμοποιώντας RNA-seq σε μονοκύτταρα ασθενών με ΣΕΛ διαπιστώθηκε διαταραχή στο επιγονιδίωμα στο ΣΕΛ αφού, παρατηρήθηκαν διαταραχές της ακετυλ-τρανσφεράσης και της απο-ακετυλάσης ιστονών, αλλά και αλληλεπιδράσεις του IRF-1 με τις ακετυλ-τρασφεράσες¹⁰⁹. Ο συνδυασμός της αλληλούχησης χρωματίνης από ανοσοκατακρήμνιση (chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) και αλληλούχησης RNA αποκάλυψε τη θέση tri-methylated histone-3 lysine 4 (H3K4me3) καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής ως μία ιδιαίτερα σημαντική θέση ρύθμισης των μεταφραστικών τροποποιήσεων στο ΣΕΛ¹¹⁰.

Η διαταραχή της **έκφρασης των microRNAs** (που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε αποδομώντας το στόχο mRNA, είτε αναστέλοντας τη μετάφρασή του) εμπλέκεται στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων. Μία ειδική για το ΣΕΛ υπογραφή microRNAs στοχεύει γονίδια της οδού της IFN τύπου Ι και, γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, απόπτωση των κυττάρων και ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων. Επίσης, στο ΣΕΛ αρκετά microRNAs στοχεύουν γονίδια που συσχετίζονται με επιγενετικές τροποποιήσεις (όπως το γονίδιο της μεθυλτρανσφεράσης 1) και ιστική βλάβη (όπως η καλλικρεΐνη-4).

1.1.4.4. Παθογένεια βλάβης τελικού οργάνου-στόχου

Όπως όλες οι εκδηλώσεις του ΣΕΛ, έτσι και η νεφρική νόσος προκαλείται από την αλληλεπίδραση πολλαπλών γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Παρά τις εντατικές προσπάθειες για τη διαπίστωση της παθογένειάς του, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Για λόγους κατανόησης, η παθογένεια της LN χωρίζεται σε δύο φάσεις, οι οποίες είναι μεταξύ τους ξεχωριστές αλλά αλληλένδετες: τη φάση της ενεργοποίησης της συστημικής αυτοανοσίας (φάση I) και τη φάση νεφρικής απάντησης στην ανοσολογική βλάβη (φάση II).

Φάση I: ενεργοποίηση συστημικής αυτοανοσίας

Το 1989, το «μοντέλο του ξένου» (the stranger model) πρότεινε ότι, το ανοσοποιητικό σύστημα δημιουργήθηκε με σκοπό να προφυλάξει τον οργανισμό από την εισβολή ξένων παθογόνων. Τα μοριακά μοτίβα που συσχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (pattern recognition receptors, PRPs) των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (antigen-presenting cells, APCs). Τα APCs ενεργοποιούνται και κινητοποιούνται στα λεμφικά όργανα, όπου παρουσιάζουν τα ξένα αντιγόνα στα Τ λεμφοκύτταρα μέσω του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Λίγα χρόνια αργότερα, έγινε αντιληπτό ότι, η ανοσολογική αντίδραση των Τ λεμφοκυττάρων μπορούσε να ενεργοποιηθεί και σε απάντηση σε όγκους ή μοσχεύματα και σε αυτοάνοσα νοσήματα. Διατυπώθηκε, έτσι, το «μοντέλο του κινδύνου» (the danger model) σύμφωνα με το οποίο, η επαγόμενη από Τ λεμφοκύτταρα ανοσία προκαλείται από μοριακά μοτίβα που συσχετίζονται με βλάβη (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Τα DAMPs απελευθερώνονται από νεκρά κύτταρα και αναγνωρίζονται από DAMP-υποδοχείς των APCs. Η αποφυγή της ενεργοποίησης της ανοσιακής απάντησης έναντι στα αντιγόνα εαυτού επιτυγχάνεται αφού, τα DAMPs του οργανισμού παραμένουν κρυμμένα μέσα στο ενδοκυττάριο τμήμα, απομονωμένα εξαιτίας της κυτταρικής μεμβράνης. Τα αποπτωτικά κύτταρα διατηρούν και αυτά την ικανότητα αποφυγής ενεργοποίησης της ανοσιακής απάντησης έναντι στα αντιγόνα εαυτού αφού, τα DAMPs που απελευθερώνουν παραμένουν κρυμμένα γύρω από τα αποπτωτικά κυστίδια, τα οποία γρήγορα φαγοκυτταρώνονται¹¹¹.

Διαταραχή της απομάκρυνσης συγκριμάτων που περιέχουν πυρηνικά οξέα

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί του οργανισμού φροντίζουν ώστε, τα πυρηνικά οξέα που απελευθερώνονται κατά την απόπτωση ή τη νέκρωση των κυττάρων να μην ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς αναγνώρισης πυρηνικών οξέων. Η συστημική αυτοανοσία εμφανίζεται όταν ο συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων διαταράσσει τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς επιτρέποντας στα πυρηνικά αντιγόνα εαυτού να ενεργοποιήσουν την ανοσιακή απάντηση. Είναι πλέον γνωστό ότι, γενετικές μεταβλητές που εμπλέκονται στην απόπτωση, την αποδόμηση του DNA, την οψωνιοποίηση και τη φαγοκυττάρωση συσχετίζονται με το ΣΕΛ.

Στην πρωτογενή ή δευτερογενή νέκρωση, κατά την οποία εισέρχεται το κύτταρο όταν τα αποπτωτικά συγκρίματα δεν καθαιρεθούν ταχέως, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης διασπάται, τα ενδοκυττάρια DAMPs απελευθερώνονται και, χάνεται η ανοσιακή ανοχή¹¹². Έχει αποδειχθεί ότι, οι πολυμορφισμοί των αποπτωτικών γονιδίων FAS, FASL, BCL2 και BAX συσχετίζονται με ευπάθεια και κλινική εξέλιξη στο ΣΕΛ. Συγκεκριμένα, το αλληλίο FASL -844C που συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση FasL, συνέβαλε στην αυξημένη απόπτωση και στην απώλεια ανοσολογικής ανοχής ενώ, ο γονότυπος BAX -248GA και το -248A αλληλίο, που συσχετίζονταν με χαμηλότερη έκφραση του BAX, προστάτευαν από την εμφάνιση ΣΕΛ.

Η ανεπαρκής αποδόμηση του DNA οδηγεί σε αύξηση του εξωκυττάριου πυρηνικού οξέος εαυτού, που αναγνωρίζεται από τους DAMP-υποδοχείς των APCs. Έχει αποδειχθεί ότι, τα εξωκυττάρια νουκλεοσώματα ανθίστανται στην αποδόμησή τους επειδή έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τη δραστικότητα της DNase I⁸¹. Διαπιστώθηκε ότι, μεταλλάξεις στο γονίδιο της DNase I συσχετίζονται με το ΣΕΛ¹⁵ και, ποντίκια με έλλειψη DNase I χαρακτηρίζονται από συσσώρευση αποπτωτικών κυττάρων και συγκριμάτων που περιέχουν πυρηνικά οξέα και, από ύπαρξη θετικών αντιπυρηνικών αντισωμάτων (antinuclear antibodies, ANA), εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στα σπειράματα και σπειραματονεφρίτιδα¹¹³. Μελέτες οικογενειών με προσβεβλημένα αδέλφια αποκάλυψαν την ύπαρξη ομόζυγης 1-bp εξάλειψης στο γονίδιο της DNASE1L3, που κωδικοποιεί ένα από τα τρία ανθρώπινα ομόλογα της DNase I, η οποία κληρονομείται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα¹¹⁴. Σπάνιες οικογενείς περιπτώσεις ΣΕΛ συσχετίστηκαν με μεταλλάξεις στο γονίδιο TREX1, που κωδικοποιεί την 3'-5' DNA

εξωνουκείαση TREX1. Μεταβλητές στο γονίδιο TREX1 συσχετίζονται με κυτταροπλασματική συσσώρευση μονής έλικας DNA που προέρχεται από ενδογενείς ρετροϊούς και αυξημένο κίνδυνο σποραδικού ΣΕΛ^{115,116}.

Η κάθαρση συγκριμάτων που περιέχουν πυρηνικά οξέα διευκολύνεται από το σύστημα του συμπληρώματος μέσω οψωνινοποίησης. Ομόζυγη έλλειψη των C1q ή C2 ή C4 συσχετίζεται με ΣΕΛ στο 90% ή 33% ή 75% των περιπτώσεων, αντίστοιχα¹¹⁷ και, οι πολυμορφισμοί των γονιδίων του C1q συσχετίζονται με ΣΕΛ ή εικόνα που προσομοιάζει με ΣΕΛ πιθανά εξαιτίας ανεπαρκούς κάθαρσης ανοσοσυμπλεγμάτων¹¹⁸. Η μείωση του αριθμού των αντιγράφων του C4A προδιαθέτει στην εμφάνιση ΣΕΛ ενώ, η αύξησή τους προσφέρει προστασία έναντι στο νόσημα. Επίσης, ποντίκια με έλλειψη της TAM οικογένειας των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης, που εκφράζεται στα μακροφάγα, χαρακτηρίζονται από ανεπαρκή φαγοκυττάρωση αποπτωτικών συγκριμάτων που οδηγεί σε παραγωγή αυτοαντισωμάτων, αρθρίτιδα, δερματικές εκδηλώσεις και νεφρίτιδα. Ποντίκια με έλλειψη του milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8), που συμμετέχει στη φαγοκυττάρωση παρέχοντας γέφυρα μεταξύ φαγοκυττάρων και αποπτωτικών κυττάρων, χαρακτηρίζονται από παραγωγή αυτοαντισωμάτων, σπληνομεγαλία και πρωτεϊνουρία¹¹⁹ ενώ, πολυμορφισμοί της κωδικοποιητικής περιοχής του γονιδίου MFG-E8 συσχετίζονται με προδιάθεση στην εμφάνιση ΣΕΛ¹²⁰. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, οι μεταβλητές που συσχετίζονται με την οψωνινοποίηση και τη φαγοκυττάρωση οδηγούν σε παθολογική κάθαρση πυρηνικών καταλοίπων και συσχετίζονται ισχυρά με την παθογένεια του ΣΕΛ.

Μία άλλη πηγή εξωκυττάριας χρωματίνης που κυκλοφορεί είναι οι εξωκυττάρια παγίδες ουδετεροφίλων (neutrophil extracellular traps, NETs). Τα NETs είναι ινίδια χρωματίνης διακοσμημένα με δραστικές πρωτεΐνες και ένζυμα των ουδετεροφιλικών κοκκίων, που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα όταν αυτά πεθάνουν με τη νέα μορφή κυτταρικού θανάτου που λέγεται NETωση. Στο ΣΕΛ, τα ουδετερόφιλα είναι ευπαθή στην απελευθέρωση NETs, των οποίων η αποδόμηση είναι μειωμένη. Η αύξηση των NETs συσχετίζεται με δημιουργία anti-dsDNA αντισωμάτων και εμφάνιση νεφρίτιδας λύκου⁸². Τα NETs ενεργοποιούν τα πλασματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα (plasmacytoid dendritic cells, pDCs) μέσω πρόσληψης DNA εαυτού από τους υποδοχείς FcγRIIa και TLR9 και, οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή IFNα, ενεργοποίηση T και B λεμφοκυττάρων και παραγωγή αυτοαντισωμάτων⁸³.

Συμπερασματικά, η ανεπαρκής ή καθυστερημένη κάθαρση των αποπτωτικών συγκριμάτων που περιέχουν πυρηνικά οξέα εαυτού οδηγεί σε δευτερογενή νέκρωση και επακόλουθη αύξηση της εξωκυττάριας χρωματίνης που κυκλοφορεί. Ταυτόχρονα με τα NETs, η ελεύθερη εξωκυττάρια χρωματίνη ενεργοποιεί την ανοσιακή απάντηση μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων αναγνώρισης των APCs.

Ενεργοποίηση φυσικής ανοσίας

Είναι γνωστό ότι, τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και μακροφάγα των ασθενών με ΣΕΛ παρουσιάζουν μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα κάθαρσης των αποπτωτικών κυττάρων¹²¹. Το ITGAM κωδικοποιεί την αλυσίδα της αΜβ2-integrin (CD11b) που συμμετέχει στην προσκόλληση λευκών και στη φαγοκυττάρωση. Έχει αποδειχθεί ότι, πολυμορφισμοί στις περιοχές ITGAM και ITGAM-ITGAX συσχετίζονται με το ΣΕΛ με, συγκεκριμένα, τον SNP rs9888739 να παρουσιάζει την ισχυρότερη συσχέτιση. Ο πολυμορφισμός R77H συσχετίζεται με μείωση της προσκόλλησης των κυττάρων της μυελικής σειράς και της επαγόμενης από το C3b φαγοκυττάρωσης, οδηγώντας σε μειωμένη κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων^{21,122-124}. Τα γονίδια FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A και FCGR3B κωδικοποιούν τους χαμηλής συγγένειας υποδοχείς FcγRs, που οδηγούν σε ανοσοσυμπλεγματοκή κάθαρση. Σε διάφορες φυλετικές ομάδες, αρκετές λειτουργικές μεταβλητές των γονιδίων FCGR συσχετίστηκαν με ευπάθεια στο ΣΕΛ. Οι μικροί αριθμοί αντιγράφων του FCGR3B, ο οποίος αποτελεί ένα ουδετεροφιλικό IgG υποδοχέα ανοσοσυμπλεγμάτων, αποτελούν παράγοντα κινδύνου εμφάνισης ΣΕΛ και, συσχετίζεται με μειωμένη προσκόλληση ουδετεροφίλων στα ανοσοσυμπλέγματα. Επίσης, οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο FCGR3B χαρακτηρίζονται από μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα^{25,125-133}. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι, επιπρόσθετα της ανεπαρκούς κάθαρσης αποπτωτικών καταλοίπων που περιέχουν πυρηνικά αντιγόνα εαυτού, τα άτομα με γενετική προδιάθεση στο ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από αύξηση της ελεύθερης εξωκυττάριας χρωματίνης εξαιτίας γενετικών μεταβλητών που προδιαθέτουν σε φαγοκυτταρικές διαταραχές της κάθαρσης των ανοσοσυμπλεγμάτων.

Τα νεκρά κύτταρα απελευθερώνουν ενδογενείς πρωτεΐνες που δεσμεύουν DNA (όπως η mobility group protein B1, HMGB1) και αντιμικροβιακά πεπτίδια (όπως η LL37), τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με την εξωκυττάρια χρωματίνη. Με ενδοκυττάρωση μέσω FcγR, τα σύμπλοκα DNA και RNA δεσμεύουν τους υποδοχείς TLR9 and TLR7 των DCs, αντίστοιχα. Έχει αποδειχθεί ότι, τα PBMCs ασθενών με ΣΕΛ εκφράζουν

υψηλά επίπεδα TLR7 and TLR9, τα οποία συσχετίζονται με την έκφραση της IFN α ^{134,135}. Είναι γνωστό ότι, το U1 small nuclear RNA (U1snRNA) του συμπλέγματος U1snRNP δρα ως ενδογενής προσδέτης των TLR7 των pDCs, επάγοντας την παραγωγή IFN α και IL-6¹³⁶. Στο ζωικό πρότυπο λύκου που επάγεται από την pristane, ο TLR7 οδήγησε σε παραγωγή snRNP αντισωμάτων¹³⁷. Ο διπλασιασμός του γονιδίου TLR7 του μοντέλου επιτάχυνσης αυτοανοσίας που συνδέεται με το χρωμόσωμα Y, αύξησε την επίδραση της pristane¹³⁸ και, συσχετίστηκε με αυτοδραστικές απαντήσεις των B λεμφοκυττάρων και επιτάχυνση του νοσήματος στα ποντίκια BXSB¹³⁹. Σημαντικό είναι το ότι, η έλλειψη του TLR7 μείωσε την παραγωγή IFN α και IL-6 από τα pDCs και, βελτίωσε της αυτοάνοσες εκδηλώσεις στα ποντίκια MRL/lpr¹⁴⁰. Σε αντίθεση με τον TLR7, η απάλειψή του TLR9 δε βελτίωσε τις κλινικές εκδηλώσεις ζωικών προτύπων με λύκο όμως, η ταυτόχρονη φαρμακολογική αναστολή των TLR7 και TLR9 βελτίωσε την παραγωγή IFN και τη σπειραματονεφρίτιδά τους¹⁴¹. Η δέσμευση των ενδοσωμικών TLR από συμπλέγματα πυρηνικών οξέων εαυτού ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF- κ B και IRF των pDCs. Πρόσφατα, διάφορες μεταβλητές γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια που συμμετέχουν στις οδούς TNF και NF- κ B διαπιστώθηκε ότι συσχετίζονται με το ΣΕΛ. Συγκεκριμένα, πολυμορφισμοί του TNFAIP3 που κωδικοποιεί το ένζυμο ουμπικουϊτίνωσης A20, του TRAF6 που κωδικοποιεί την tumor necrosis factor receptor-associated kinase 6, του IRAK1 που κωδικοποιεί την IL-1 receptor-associated kinase 1 και, του TNIP1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη προσαρμογής του A20 συσχετίστηκαν με το ΣΕΛ, πιθανά, εξαιτίας μείωσης της αναστολής του NF- κ B στα DCs^{19,57,64-66}. Η δέσμευση των TLR από συμπλέγματα πυρηνικών οξέων ενεργοποιεί τα pDCs προς μία ταχεία παραγωγή IFN τύπου I και τα συμβατικά DCs (conventional DCs, cDCs) προς παρουσίαση των αντιγόνων εαυτού στα T λεμφοκύτταρα μέσα από μία διεργασία που διευκολύνεται από την IFN τύπου I.

Ο ρόλος της IFN τύπου I στην παθογένεια του ΣΕΛ μελετήθηκε εκτενώς. Όπως προαναφέρθηκε, μελέτες γονιδιακής έκφρασης ολόκληρου γονιδιώματος έδειξαν ότι, τα PBMCs ασθενών με ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από μία «υπογραφή IFN», η οποία είναι περισσότερο έκδηλη σε ασθενείς με μεγάλη ενεργότητα και σοβαρής μορφής νόσημα. Οι IRFs, που αποτελούν οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμίζουν τα καθοδικά της IFN γονίδια. Οι IRF5 και IRF7 είναι απαραίτητοι στην αύξηση της IFN που επάγεται από την πρόσδεση των RNA ή DNA συμπλεγμάτων στους TLR7 και TLR9 των pDCs, αντίστοιχα¹⁴²⁻¹⁴⁵. Παρατηρήθηκε ότι, ο IRF5 αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα προδιαθεσικά για το ΣΕΛ γονίδια και, οι πολυμορφισμοί του IRF5 σε διαφορετικές φυλές συνεισφέρει στο νόσημα, πιθανά, εξαιτίας θετικής ανατροφοδότησης της IFN α ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Στα κύτταρα της μυελικής σειράς, η IFN τύπου I δεσμεύει τον υποδοχέα IFN τύπου I (type I IFN receptor, IFNAR) και, ενεργοποιεί την οδό JAK/STAT (Janus/Signal Transducer and Activator of Transcription) μέσω της TYK2 (που κωδικοποιεί την Tyrosine Kinase 2) και του STAT4. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο TYK2 και STAT4 συσχετίζονται με το ΣΕΛ και, πολυμορφισμοί του IKZF, που ρυθμίζει τον STAT4, συσχετίζονται με το ΣΕΛ και τη νεφρίτιδα λύκου σε Κινέζικους και Ευρωπαϊκούς Πληθυσμούς^{35,41}. Είναι σημαντικό το ότι, άτομα με το SNP rs7574865 του STAT4 εμφανίζουν σε μεγαλύτερες συχνότητες LN και, χαρακτηρίζονται από διάγνωση του νοσήματος σε νεαρή ηλικία¹⁴⁹. Η IFN τύπου I οδηγεί σε ωρίμανση των μονοκυττάρων σε ώριμα DCs, των T λεμφοκυττάρων σε T_H1 κύτταρα και, των B λεμφοκυττάρων σε εκκριτικά πλασματοκύτταρα. Επίσης, η IFN τύπου I υπερεκφράζει τα μόρια MHC τάξης II, τις πρωτεΐνες συνδιέγερσης (όπως την TNFSF4), τα μόρια προσκόλλησης (όπως το ITGAM) και, τις κυτοκίνες με τους υποδοχείς τους (όπως τις IL-10 και IL-12RB2)¹⁵⁰.

Συμπερασματικά, επιπρόσθετα της αύξησης της ελεύθερης εξωκυττάριας χρωματίνης, τα άτομα που είναι ευπαθή στο ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από φαγοκυτταρικές διαταραχές στην κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων, τα οποία δεσμεύουν υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων των DCs. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B και IRFs, με αποτέλεσμα την ταχεία παραγωγή IFN τύπου I από τα pDCs και τον παρουσιασμό αντιγόνων εαυτού στα T λεμφοκύτταρα.

Ενεργοποίηση επίκτητης ανοσίας

Τόσο τα T όσο και τα B λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για την εμφάνιση ΣΕΛ. Η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας οδηγεί σε εμμένουσα ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν κυτοκίνες και αυτοαντισώματα, και των T λεμφοκυττάρων, τα οποία γίνονται κύτταρα τελεστές διηθώντας όργανα-στόχους. Σε διάφορους φυλετικούς πληθυσμούς, η ισχυρότερη περιοχή ευπάθειας στο ΣΕΛ διαπιστώθηκε ότι είναι η **περιοχή HLA**. Όπως προαναφέρθηκε, κάθε αλληλίο του γονιδίου HLA-DR2 (DRB1*1501) και του HLA-DR3 (DRB1*0301) τάξης II συνεισφέρει διπλάσιο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης ΣΕΛ, τόσο σε Ευρωπαίους όσο και σε Ασιάτες. Οι απλότυποι DR2 and DR3 συσχετίζονται με τα anti-Sm και anti-Ro

αντισώματα, αντίστοιχα^{41,52,151-153}. Γενετικές μεταβλητές του HLA τάξης III, όπως του γονιδίου MSH5 (mutant S homolog 5) και SKIV2L (super viralacidic activity 2-like) επίσης προδιαθέτουν στην εμφάνιση ΣΕΛ¹⁵⁴. Ο **αντιγονοπαρουσιασμός στον TCR** αποτελεί το **σήμα 1 της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων**. Μειωμένη σηματοδότηση κατά μήκος του TCR μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης αυτοανοσίας. Παρατηρήθηκε ότι, οι ασθενείς με ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκφραση της αλυσίδας ζ του TCR, που προκαλείται από μία γενετική μεταβλητή που ταυτόχρονα αυξάνει την έκφραση της IFN γ και μειώνει την έκφραση της IL-2. Όλα μαζί συνεισφέρουν στην ανάπτυξη νεφρίτιδας λύκου¹⁵⁵. Ο πολυμορφισμός R620W, που παρατηρείται κυρίως σε οικογενείς περιπτώσεις ΣΕΛ, οδηγεί σε αυξημένη λειτουργία της protein tyrosine phosphatase 22 (PTPN22) διαταράσσοντας τη ρύθμιση του TCR. Ο πολυμορφισμός R263Q του PTPN22, που οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης, χαρακτηρίζεται από προστατευτική δράση έναντι στο ΣΕΛ, εξαιτίας αλλαγής του ορίου ενεργοποίησης του TCR^{156,157}. Μεταβλητές σε **μόρια συνδιέγερσης**, τα οποία **αποτελούν το σήμα 2 της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων**, επίσης συσχετίζονται με εμφάνιση ΣΕΛ. Γενετικές μεταβλητές της κυτταροτοξικής πρωτεΐνης 4 που σχετίζεται με τα λεμφοκύτταρα (T-lymphocyte associate protein-4, CTLA4) συσχετίζονται με LN. Μία μετα-ανάλυση των GWAS για το ΣΕΛ σε Κινέζικους πληθυσμούς Han διαπίστωσε ότι, το CD80 (που κωδικοποιεί το B7-1 και αποτελεί τον μεμβρανικό υποδοχέα των APCs που δεσμεύει το CTLA4 των Τ λεμφοκυττάρων) αποτελεί γονίδιο ευπάθειας στο ΣΕΛ με τιμή $p < 5 \times 10^{-8}$ και, επάγει τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών⁶⁷. Ο TNFSF4 των APCs, που ονομάζεται και OX-40L, και ο υποδοχέας TNFSFR4 των Τ λεμφοκυττάρων ανήκουν στην οικογένεια του TNF. Ένας απλότυπος ανοδικά του TNFSF4 συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση του TNFSF4 και εμφάνιση ΣΕΛ, πιθανά εξαιτίας αύξησης της συνδιέγερσης⁶⁵. Οι μεταβλητές rs844648 και rs2205960 του TNFSF4 επιβεβαιώθηκαν ως γενετικοί τόποι κινδύνου στους Κινέζους⁵⁷. Άλλες μεταβλητές των μορίων συνδιέγερσης που συσχετίζονται με το ΣΕΛ είναι των γονιδίων που κωδικοποιούν το CD40L/CD154¹⁵⁸ και το PDL1/PD1¹⁵⁹. Αυτές οι γενετικές μεταβλητές οδηγούν σε έκπτυξη των Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται σε τύπου 1 Τ βοηθητικά κύτταρα (T_H1), τύπου 17 Τ λεμφοκύτταρα (T_H17) και CD4⁺CD8⁻ Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία ταυτόχρονα με τα Β λεμφοκύτταρα διηθούν όργανα-στόχους του νοσήματος.

Τα Β λεμφοκύτταρα, που λειτουργούν τόσο ως APCs όσο και ως κύτταρα τελεστές, ενεργοποιούνται μετά από δέσμευση του υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων (B cell receptor, BCR). Η **σηματοδότηση του BCR** οδηγεί σε φωσφορύλιωση της πρωτεΐνης όχημα BANK1 (B cell scaffold protein with ankyrin repeats) που με τη φωσφορύλιωση γ2 (PLC γ 2) οδηγεί σε έκφραση τρι-φωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και διακυλ-γλυκερόλης (DAG). Έτσι, ενεργοποιούνται τα καθοδικά μόρια PRKCB και RasGRP3. Τρεις τυροσινικές κινάσες της οικογένειας Src, οι BLK (B lymphocyte specific tyrosine kinase), LYN (Yamaguchi sarcoma viral oncogene) και CSK (C-terminal Src Kinase) συμμετέχουν στη σηματοδότηση BCR. Έχει αποδειχθεί ότι, μεταβλητές των γονιδίων της σηματοδότησης BCR συνεισφέρουν στην ευπάθεια στο ΣΕΛ.

Το BANK1, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων, συσχετίζεται με παραγωγή αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με ΣΕΛ¹⁶⁰. Η διασταύρωση ενός ζωικού προτύπου λύκου που υπερεκφράζει τον TLR7 και ενός ζωικού προτύπου με πλήρη απαλειφή του BANK1 έδειξε ότι, το BANK1 ρυθμίζει την παραγωγή IgG διά της σηματοδότησης του TLR7, οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή IFN τύπου Ι από τα Β λεμφοκύτταρα¹⁶¹. Δύο γενετικές μεταβλητές που συσχετίστηκαν με διαφορική έκφραση του BANK1 συσχετίστηκαν με την εμφάνιση ΣΕΛ και, μία μετα-ανάλυση Ευρωπαίων έδειξε γενετική και φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ BANK1 και BLK¹⁶². Επίσης, ο πολυμορφισμός rs10516487 της θέσης πρόσδεσης του BANK1 παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με το ΣΕΛ αφού, δημιουργεί ένα εναλλακτικό ενισχυτή που αυξάνει την έκφραση του BANK και τη συγγένεια δέσμευσής του με τον υποδοχέα IP3R⁵⁵. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός rs10028805 του ιντρονίου 2 του BANK1 αποτελεί eQTL στο ΣΕΛ¹⁶³.

Το BLK, που επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ BANK1 και PLC γ 2, ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Η σηματοδότηση διά του BLK στα βλαστικά κέντρα είναι απαραίτητη στην παύση της ανάπτυξης και στην απόπτωση καθοδικά του BCR. Η μείωση της BLK διαταράσσει την οδό του BCR και, οδηγεί σε ανάπτυξη αυτοδραστικών Β λεμφοκυττάρων. Παρά το ότι, τα ποντίκια με πλήρη απαλειφή του BLK δεν εμφανίζουν ιδιαίτερο φαινότυπο, η μειωμένη έκφραση του BLK οδήγησε σε νεφρική νόσο σε ζωικά πρότυπα λύκου¹⁶⁴. Πολυμορφισμοί του BLK συσχετίζονται με μειωμένη έκφρασή του και εμφάνιση ΣΕΛ σε Ευρωπαϊκούς, Κινέζικους και Ιαπωνέζικους πληθυσμούς. Επίσης, ρυθμιστικές μεταβλητές κοντά στο γονίδιο του BLK διαπιστώθηκε ότι ρυθμίζουν την έκφραση BLK στα Β λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΣΕΛ^{16,20,52,165}.

Το LYN, που αλληλεπιδρά με τον BCR επάγοντας ανασταλτικά σήματα διά της φωσφορυλίωσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών, είναι μειωμένος σε ασθενείς με ΣΕΛ¹⁶⁶. Διαπιστώθηκε ότι, ποντίκια με έλλειψη LYN αναπτύσσουν αυτοανοσία εξαιτίας υπερδραστικότητας των Β λεμφοκυττάρων και, δημιουργία αυτοαντισωμάτων και ανοσοσυμπλεγματογενή σπειραματονεφρίτιδα¹⁶⁷. Σε γυναικείο Ευρωπαϊκό πληθυσμό με ΣΕΛ, διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση του rs6983130 στο LYN. Επίσης, ασθενείς με ΣΕΛ εμφανίζουν ένα αλληλίο κινδύνου στη CSK, που οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της LYN^{51,60}.

Επιπρόσθετα, η αλληλούχηση νέας γενεάς σε οικογένεια με προσβεβλημένα μέλη έδειξε ομοζυγωτία στη μετάλλαξη G510S που απενεργοποιούσε το γονίδιο PRKCD, οδηγώντας σε αντίσταση στην επαγόμενη από τον BCR απόπτωση και επακόλουθη αύξηση του πολλαπλασιασμού των Β λεμφοκυττάρων¹⁶⁸. Επίσης, ο rs13385731 του γονιδιακού τόπου RasGRP3 συσχετίστηκε με ΣΕΛ και μειωμένη έκφραση της RasGRP3, καταστέλλοντας την ανασταλτική της δράση στον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων.

Δρώντας ως APCs, τα Β λεμφοκύτταρα ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των Τ λεμφοκυττάρων και, παράγουν αντισώματα, αφού πρώτα ωριμάσουν σε εκκριτικά πλασματοκύτταρα. Ο μεταγραφικός παράγοντας ETS1 ρυθμίζει αρνητικά τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι, τα PBMCs ασθενών με ΣΕΛ υποεκφράζουν τον ETS1 εξαιτίας ενός πολυμορφισμού στην περιοχή του γονιδίου που δε μεταφράζεται (untranslated region). Επίσης, ποντίκια με έλλειψη ETS1 χαρακτηρίζονται από φαινότυπο που προσομοιάζει με λύκο δείχνοντας ότι, οι διαταραχές της έκφρασης του ETS1 συνεισφέρουν στην παθολογική διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων σε εκκριτικά πλασματοκύτταρα^{20,35,52}. Η ομοιοστασία των Β λεμφοκυττάρων, η διαφοροποίησή τους και η αλλαγή της τάξης IgG ρυθμίζονται από **μεσολαβητές και μιτογόνα** που παράγονται από τα μυελικά και τα ενεργοποιημένα λεμφικά κύτταρα. Σε αυτούς ανήκουν ο παράγοντας της οικογένειας TNF που ενεργοποιεί τα λεμφοκύτταρα BAFF (B cell-activating factor of the TNF family) που, επίσης ονομάζεται ενεργοποιητής των Β λεμφοκυττάρων BlyS (B lymphocyte stimulator), ο συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό (a proliferation inducing ligand, APRIL) και το murine double minute-2. Διαπιστώθηκε ότι, τα επίπεδα των BAFF και APRIL levels είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΣΕΛ. Τα αυξημένα επίπεδα συσχετίζονται με μέτριας έως σοβαρής μορφής έξαρσης του νοσήματος. Οι Αфро-Αμερικάνοι με ΣΕΛ εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα BAFF σε σχέση με άλλες φυλές. Όμως, οι περισσότεροι SNPs που διαπιστώθηκαν στις θέσεις του γονιδίου TNFSF13B, που αποτελεί το ανθρώπινο γονίδιο BAFF, δε συσχετίστηκαν με το ΣΕΛ. Εξαίρεση αποτελούν ένας πολυμορφισμός του υποκινητή του γονιδίου του BAFF που συσχετίστηκε με ΣΕΛ σε Αιγύπτιους. Επίσης, πολυμορφισμός στο ανθρώπινο γονίδιο APRIL συσχετίστηκε με ΣΕΛ στους Ιαπωνέζους¹⁶⁹.

Συμπερασματικά, τόσο τα Τ όσο και τα Β λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για την εμφάνιση ΣΕΛ. Ισχυρότερη περιοχή ευπάθειας στο ΣΕΛ ότι είναι η περιοχή HLA. Γενετικές μεταβλητές στα γονίδια του σήματος 1 και 2 της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων, της σηματοδότησης BCR και των μιτογόνων των Β λεμφοκυττάρων συσχετίζονται με ευπάθεια στο νόσημα.

Φάση II: Νεφρική απάντηση στην ανοσιακή βλάβη

Στη LN, διαφορετικά γονίδια συνεισφέρουν στην αυτοανοσία και τη βλάβη τελικού οργάνου ανεξάρτητα αλλά αλληλένδετα. Ο συνδυασμός συστημικής αυτοανοσίας και απάντησης του τελικού οργάνου στη βλάβη είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση της LN που, χαρακτηρίζεται από εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στα σπειράματα ή στα περισκληνιακά τριχοειδή. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, οι απαντήσεις των τελικών οργάνων στόχων στην ανοσιακή βλάβη αντιστοιχούν στα διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης και καθορίζουν την έκβαση του νοσήματος.

Η συστημική αυτοανοσία ενάντια στους νεφρούς

Η παθολογική εναπόθεση κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων δεν έχει επιβεβαιωθεί. Μάλλον, τα ανοσοσυμπλέγματα δημιουργούνται *in situ* με δέσμευση αυτοαντισωμάτων είτε στα σπειραματικά αντιγόνα, όπως τις annexin II ή laminin, είτε στα εξωκυττάρια νουκλεοσώματα που υπάρχουν μέσα στο νεφρό. Πηγές ελεύθερων πυρηνικών αντιγόνων είναι τα νεκρωτικά νεφρικά κύτταρα ή η χρωματίνη που απελευθερώνεται από τα ουδετερόφιλα διά του θανάτου τους με NETωση¹⁷⁰⁻¹⁷³. Τα ανοσοσυμπλέγματα μπορούν να δημιουργηθούν μέσα στο μεσάγγειο, στον υπενδοθηλιακό χώρο ή μέσα στα περισκληνιακά τριχοειδή. Ανάλογα με τη θέση δημιουργίας τους, τα ανοσοσυμπλέγματα προκαλούν βλάβες χαρακτηριστικές της κάθε τάξης της LN.

Τα ανοσοσυμπλέγματα ενεργοποιούν τον καταρράκτη του συμπληρώματος προκαλώντας άμεσα νεφρική βλάβη. Γενετικές μεταβλητές των γονιδίων του συμπληρώματος διασπούν τους μηχανισμούς κάθαρσης των νεκρών συγκριμάτων και αυξάνουν την έκθεση της εξωκυττάριας χρωματίνης στο ανοσιακό σύστημα^{174,175}. Τα ανοσοσυμπλέγματα προκαλούν νεφρική βλάβη μετά από δέσμευσή τους στα κύτταρα που εκφράζουν FcR και, γενετικές μεταβλητές του FcR επηρεάζουν την κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων από τη σπειραματική εξωκυττάρια ουσία¹⁷⁶. Μέσω TLR, τα μεσαγγειακά, σπειραματικά ενδοθηλιακά ή περισκληριακά ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται και παράγουν μόρια προσκόλλησης, κυτοκίνες και χυμοκίνες, τοπικά¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. Επίσης, τεράστιες ποσότητες IFN παράγονται τοπικά, δημιουργώντας σκληροκυτταρικό έγκλειστο, που αποτελούν δομές χαρακτηριστικές της σηματοδότησης IFN¹⁸¹. Πυρηνικά αντιγόνα και ανοσοσυμπλέγματα ενεργοποιούν τους TLRs των νεφρικών μακροφάγων και DCs, επιδεινώνοντας τη φλεγμονή και δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο¹⁸².

Οι χυμοκίνες που παράγονται κινητοποιούν τα φλεγμονώδη κύτταρα μέσα στο νεφρό. Ανάλογα με τη χυμοκίνη που παράγεται, συγκεκριμένοι κυτταρικοί τύποι κατευθύνονται διά διαφορετικών υποδοχέων σε διαφορετικά τμήματα του νεφρού. Τα CCR2⁺ μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα κινητοποιούνται μέσα στα σπειράματα και στο διάμεσο χώρο ενώ, τα CCR1⁺ κύτταρα κινητοποιούνται μόνο στο διάμεσο χώρο^{183,184}. Τα κινητοποιημένα λεμφοκύτταρα μπορούν να σχηματίσουν *de novo* τριτογενή λεμφικά όργανα και, τα B λεμφοκύτταρα, που εκπύσσονται με κλωνικό τρόπο, πολλαπλασιάζονται, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν αυτοαντισώματα που οδηγούν σε τοπική φλεγμονή¹⁸⁵. Άλλα κύτταρα που συμβάλλουν στη νεφρική βλάβη είναι τα T_H1, T_H17, CD4⁺CD8⁻ T λεμφοκύτταρα και ένας τύπος υβριδίου νεφρικού μακροφάγου που πρόσφατα έχει περιγραφεί^{186,187}.

Ευπάθεια και απάντηση τελικού οργάνου-στόχου (νεφρού) στη βλάβη

Η ρόλος της αντίστασης του τελικού οργάνου στην έκβαση της ανοσοσυμπλεγματικής LN διαφαίνεται από δύο πρόσφατα ευρήματα. Πρώτον, η καταστροφική σπειραματονεφρίτιδα μπορεί να παρατηρηθεί απουσία κυκλοφορούντων ANA, anti-dsDNA ή αντισωμάτων κατά των νουκλεοσωμάτων. Δεύτερον, οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης νεφρών από ζωικά πρότυπα λύκου έδειξαν ότι ο γενετικός έλεγχος της οξείας και της χρόνιας σπειραματονεφρίτιδας είναι ξεχωριστός. Με αυτά διαπιστώνεται ότι, (α) η απώλεια ανοχής στα πυρηνικά αντιγόνα δεν είναι απαραίτητα το πρώτο συμβάν στη LN και, (β) η ενεργοποίηση των γονιδίων που συμμετέχουν στη συστηματική αυτοανοσία είναι ανεξάρτητη αλλά αλληλένδετη με τα γονίδια που συμμετέχουν στη βλάβη του τελικού οργάνου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε οργανο-ειδική παραγωγή αντισωμάτων και οργανο-ειδική παραγωγή T λεμφοκυττάρων, τα οποία περαιτέρω επιδεινώνουν τη φλεγμονή και απάντηση στην αυτοανοσία. Επομένως, σε άτομα γενετικά ανθεκτικά στη βλάβη τελικού οργάνου, η ενεργοποίηση της συστηματικής αυτοανοσίας μπορεί να μην προκαλέσει ανοσοσυμπλεγματική ή κυτταρική νεφρική βλάβη. Άρα, η αντίσταση τελικού οργάνου ή η ευπάθειά του στη βλάβη βρίσκεται κάτω από γενετικό έλεγχο, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη εξατομικευμένης θεραπείας του νοσήματος^{188,189}.

1.1.5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία του ΣΕΛ τίθεται μετά από αξιολόγηση της σοβαρότητας του νοσήματος, η οποία μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση διαφόρων δεικτών ενεργότητας, όπως οι Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) και οι νεότερες τροποποιήσεις τους. Σε ΣΕΛ με ήπια σοβαρότητα, π.χ. σε νεφρίτιδα λύκου τάξης I ή II, δεν τίθεται ανοσοκατασταλτική αγωγή αλλά, τηρούνται γενικά μέτρα αντιμετώπισης της ΧΝΝ και χορηγούνται αντιρευματικά τροποποιητικά φάρμακα (disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs), όπως η υδροξυχλωροκίνη. Η θεραπεία του ΣΕΛ μέτριας ή σοβαρής μορφής αποτελείται από δύο φάσεις, τη θεραπεία εφόδου και τη θεραπεία συντήρησης. Η θεραπεία εφόδου αποτελείται από εντατική ανοσοκατασταλτική αγωγή χορηγούμενη για μικρό χρονικό διάστημα και, έχει σαν στόχο τον έλεγχο της υπέρμετρης δραστηριότητας του ανοσοποιητικού συστήματος, την τροποποίηση της ιστικής βλάβης και τη βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας. Μετά την επίτευξη ύφεσης του νοσήματος, ακολουθεί η θεραπεία συντήρησης, η οποία περιλαμβάνει ηπιότερα ανοσοκατασταλτικά σχήματα αλλά μεγαλύτερης διάρκειας και, έχει σαν στόχο τη διατήρηση της ύφεσης και την αποφυγή νέας έξαρσης του νοσήματος (πίνακας 1.1.3). Η διαπίστωση νέων μοριακών οδών που συμμετέχουν στην παθογένεια του ΣΕΛ και της νεφρίτιδας λύκου καθιστά δυνατή τη χρήση νεότερων θεραπειών, όπως τη στόχευση του B ή T λεμφοκυττάρου ή τη στόχευση κυτοκινών.

1.1.6. ΥΒΡΙΔΙΟ NZB/NZW-F1: ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΕΛ

Τα υβρίδια ποντίκια F1 (NZB/W-F1) αποτελούν το κλασσικό πειραματικό πρότυπο ΣΕΛ που παρατηρείται στον άνθρωπο και, προέρχονται από τη διασταύρωση ποντικών New Zealand Black (NZB) και New Zealand White (NZW). Παρά το ότι τα NZB και τα NZW παρουσιάζουν ήπια αυτοανοσία, τα NZB/W-F1 αναπτύσσουν αυτόματα φαινότυπο που προσομοιάζει με τον ΣΕΛ. Ο φαινότυπος περιλαμβάνει λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, αυξημένο τίτλο ANA και anti-dsDNA-IgG και, ανοσοσυμπλεγματική σπειραματονεφρίτιδα η οποία γίνεται εμφανής στους 5-6 μήνες ζωής και, οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο στους 10-12 μήνες ζωής. Όπως και στον άνθρωπο, παρατηρείται υπεροχή στο θήλυ φύλο κυρίως εξαιτίας των οιστρογόνων ενώ, αντίθετα με τον άνθρωπο, τα NZB/W-F1 δεν παρουσιάζουν αυτοαντισώματα κατά συμπλεγμάτων που περιέχουν RNA. Επιπρόσθετα, για την πλήρη έκφραση της νόσου στα NZB/W-F1, απαραίτητη είναι η συμβολή γονιδίων και από τους δύο γονείς αφού, κανένας από αυτούς δεν εμφανίζει φαινότυπο που προσομοιάζει με τον ΣΕΛ. Μέχρι σήμερα, έχει διαπιστωθεί ότι, 12 γενετικοί τόποι των στελεχών NZB και NZW είναι σε γενετική σύνδεση (linkage) με τα χαρακτηριστικά (traits) του ΣΕΛ και, οι πιο πιθανοί γενετικοί τόποι σύνδεσης ως προς τη νεφρίτιδα λύκου εδράζονται στα Χρωμοσώματα 1, 4, 7 και 17^{190,191}.

Πίνακας 1.1.3: Κατευθυντήριες οδηγίες EULAR/ERA-EDTA¹⁹² για τη θεραπεία της νεφρίτιδας λύκου. ACE inhibitor: αναστολέας μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης, ARB: ανταγωνιστής υποδοχέων αγγειοτενσίνης II, DMARDs: αντιρευματικά φάρμακα που τροποποιούν τη νόσο, MMF: mycophenolate mofetil, MPA: Mycophenolic Acid, Cyc: Cyclophosphamide, CNI: Calcineurin Inhibitor, CsA: κυκλοσπορίνη Α

Θεραπεία Νεφρίτιδας Λύκου Τάξης I, II (ήπια σοβαρότητα νοσήματος)	
Πρωτεϊνουρία <1 g/day	Πρωτεϊνουρία >1 g/day
ACE inhibitor / ARB DMARDs	ACE inhibitor / ARB DMARDs Χαμηλή δόση pos κορτικοστεροειδών ή pos CsA
Θεραπεία Νεφρίτιδας Λύκου Τάξης III _{A, A/C} , IV _{A, A/C} (μέτρια σοβαρότητα νοσήματος)	
Θεραπεία εφόδου	Θεραπεία συντήρησης
(α) 3 methylprednisolone pulses 500-750 mg/day και ακολούθως pos 0.5 mg/kg prednisolone για 4 βδομάδες (β) pos MMF 3g/day για 6 μήνες (ή αντίστοιχη δόση MPA) ή χαμηλή δόση pos Cyc 3 gr σε 3 μήνες	(α) pos 5-7.5 mg/day prednisolone για >3 έτη (β) pos MMF 2g/day για >3 έτη (ή αντίστοιχη δόση MPA) ή pos Azathioprine 2 mg/kg/day για >3 έτη
Θεραπεία Νεφρίτιδας Λύκου Τάξης III _{A, A/C} , IV _{A, A/C} (μεγάλη σοβαρότητα νοσήματος)	
Θεραπεία εφόδου	Θεραπεία συντήρησης
(α) 3 methylprednisolone pulses 500-750 mg/day και ακολούθως pos 0.5 mg/kg prednisolone για 4 βδομάδες (β) υψηλή δόση iv Cyc 0.75-1 gr/m ² για 6 μήνες ή pos Cyc 2-2.5 mg/kg για 3 μήνες	(α) pos 5-7.5 mg/day prednisolone για >3 έτη (β) pos MMF 2g/day για >3 έτη (ή αντίστοιχη δόση MPA) ή pos Azathioprine 2 mg/kg/day για >3 έτη
Θεραπεία Νεφρίτιδας Λύκου Τάξης V	
Θεραπεία εφόδου	Θεραπεία συντήρησης
(α) pos 0.5 mg/kg prednisolone (β) pos MMF 3g/day για 6 μήνες (ή αντίστοιχη δόση MPA) ή pos CNI ή iv Rituximab	(α) pos 5-7.5 mg/day prednisolone για >3 έτη (β) pos MMF 2g/day για >3 έτη (ή αντίστοιχη δόση MPA) ή pos Azathioprine 2 mg/kg/day για >3 έτη ή pos CNI
Θεραπεία Ανθεκτικής Νεφρίτιδας Λύκου	
Αλλαγή MMF σε Cyc Αλλαγή Cyc σε MMF Rituximab	

1.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (TRANSCRIPTOMICS)

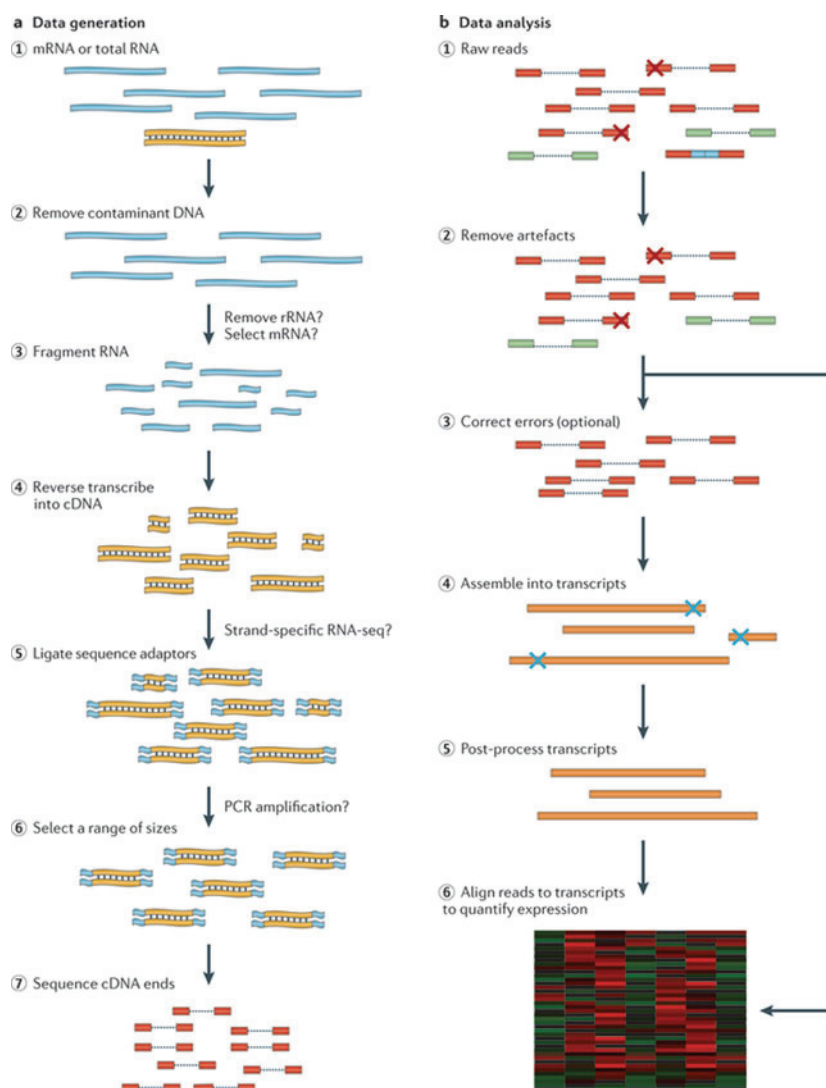
Η γενετική πληροφορία μεταφέρεται από το DNA στις πρωτεΐνες με το mRNA. Τα προηγούμενα χρόνια, ορίζαμε γονίδιο την περιοχή του DNA της οποίας το RNA κωδικοποιούσε μία πρωτεΐνη. Το υπόλοιπο DNA θεωρούσαμε ότι δε μεταγράφεται, δε διαθέτει κάποιο ρόλο και, το ονομάζαμε DNA σκουπίδι (junk DNA). Όμως, όπως προαναφέρθηκε (κεφάλαιο 1.1.5.1.), τα τελευταία χρόνια, τα αποτελέσματα των GWAS και κυρίως του ENCYClopedia Of DNA Elements (ENCODE) Project⁷⁵ έδειξαν ότι, αυτό που προηγουμένως θεωρούσαμε ως DNA «σκουπίδι» αποτελεί DNA που μεταγράφεται και, μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι τα μεταγράφα του ασκούν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι, το 76% του γονιδιώματος μεταγράφεται και ότι >90% των μεταβλητών που συσχετίζονται με πολύπλοκα νοσήματα βρίσκονται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του DNA. Επομένως, έγινε αντιληπτό ότι, τα μη κωδικοποιητικά, αλλά ρυθμιστικά, γονιδιώματα είναι εξίσου σημαντικά στην εμφάνιση των νοσημάτων. Ο χαρακτηρισμός των κωδικοποιητικών και των μη κωδικοποιητικών, αλλά ρυθμιστικών, γονιδιωμάτων που γίνεται με τη μελέτη ολικού μεταγραφώματος (transcriptome analysis), είναι απαραίτητος στην κατανόηση της παθογένειας των πολύπλοκων νοσημάτων, όπως είναι ο ΣΕΛ^{76,193}.

Η γονιδιακή έκφραση ή μεταγράψωμα (transcriptome) είναι ο ενδιάμεσος φαινότυπος μεταξύ DNA και φαινοτύπου των νοσημάτων. Είναι κληρονομούμενη, επηρεάζεται τόσο στο μεταφραστικό όσο και στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο και, παρέχει πληροφορίες για την αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στα κύτταρα ή στους ιστούς. Η μελέτη ολικού μεταγραφώματος ή γονιδιακής έκφρασης (transcriptome analysis, gene expression analysis) γίνεται με τη μελέτη του συνόλου και της ποσότητας των μεταγράφων (RNA transcripts) ενός βιολογικού δείγματος σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή και, επιτρέπει την ερμηνεία των λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος, τη συσχέτιση των γενετικών παραλλαγών με το φαινότυπο και, την κατανόηση του μηχανισμού εμφάνισης του φαινοτύπου^{194,195}. Αποτελεί μία αμερόληπτη προσέγγιση, η οποία δεν προϋποθέτει τη θέσπιση επιστημονικής ερώτησης, στη διερεύνηση πολύπλοκων νοσημάτων. Η σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης δειγμάτων μπορεί να αποκαλύψει μεταγραφικές διαφορές και διαταραχές μοριακών και κυτταρικών οδών στο δείγμα που μας ενδιαφέρει. Παραδοσιακός τρόπος μελέτης του μεταγραφώματος είναι οι μικροσυστοιχίες, οι οποίες βασίζονται σε τεχνικές υβριδοποίησης των δειγμάτων. Αποτελούν τεχνική υψηλής απόδοσης και χαμηλού κόστους, έχουν, όμως, αρκετά μειονεκτήματα. Η αλληλούχηση του RNA (RNA-Sequencing, RNA-seq) αποτελεί μια μέθοδο ανάλυσης του μεταγραφώματος νέας γενεάς, η οποία αλληλουχεί και, στη συνέχεια, χαρτογραφεί τα μικρά τμήματα που αναγνώστηκαν (reads) στο γονιδίωμα αναφοράς. Η RNA-Seq επιτρέπει την αναγνώριση εξωνίων και ιντρονίων, χαρτογραφεί τα όριά τους αλλά και τα 5'- και 3'- άκρα των γονιδίων. Αναγνωρίζει τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής και τις νέες παραλλαγές που προέρχονται από το εναλλακτικό μάτισμα (alternative RNA splicing). Ποσοτικοποιεί ακόμα και την ελάχιστη έκφραση εξωνίων και ισομορφών από εναλλακτικό μάτισμα. Αναλύει, σε επίπεδο νουκλεοτιδίου, την εξαρτώμενη από αλληλία έκφραση γονιδίων και την μετα-μεταφραστική τροποποίηση του RNA (RNA editing) και, επιτρέπει την αναγνώριση νέων γεγονότων εναλλακτικού ματίσματος και μεταγράφων σύντηξης (fusion transcripts). Μπορεί να μελετήσει το σύνολο των μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, για παράδειγμα τα miRNAs και τα pi-RNAs και, επίσης, μπορεί να μελετήσει γενετικές παραλλαγές που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε πολύπλοκα και πολυπαραγοντικά νοσήματα¹⁹⁶⁻²⁰⁰.

1.2.1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ RNA-SEQUENCING

Ένα πείραμα RNA-Sequencing αποτελείται από τη φάση δημιουργίας δεδομένων και τη φάση ανάλυσης δεδομένων (εικόνα 1.2.1). Κατά τη φάση δημιουργίας δεδομένων, το ολικό RNA ή mRNA θρυμματίζεται και αντιγράφεται αντίστροφα σε συμπληρωματικό DNA ώστε να δημιουργηθεί μία βιβλιοθήκη cDNA. Ακολουθεί πρόσδεση προσαρμογέα (adaptor) αλληλούχησης και, ανάγνωση των μικρών τμημάτων από το ένα ή και τα δύο άκρα του θραύσματος του cDNA, με τη χρήση πλατφόρμας αλληλούχησης νέας γενεάς. Η πλατφόρμα διαθέτει διαφορετικές «γραμμές» για τις αντιδράσεις αλληλούχησης, οι οποίες ολοκληρώνονται σε περίπου 1.5-12 ημέρες, ανάλογα με το συνολικό μήκος ανάγνωσης. Κατά τη φάση ανάλυσης δεδομένων, δημιουργούνται αρχεία FASTQ-format που περιέχουν τμήματα ανάγνωσης, τα οποία στοιχίζονται στο γονιδίωμα αναφοράς με τη χρήση εργαλείων στοίχισης, όπως τα TopHat, GSNAP και MapSplice. Ακολούθως, τα χαρτογραφημένα αναγνώσματα ομαδοποιούνται σε μεταγράφα. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγράφων γίνεται με τη χρήση εργαλείων υπολογιστών, όπως τα Cufflinks, FluxCapacitor και MISO, τα οποία υπολογίζουν τον αριθμό των αναγνώσεων που χαρτογραφούνται

σε μετάγραφα ολικού μήκους. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται το HTSeq, το οποίο ποσοτικοποιεί των αριθμό των αναγνώσεων που χαρτογραφούνται ανά εξώνιο. Ο ακριβής προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνεται μετά την κανονικοποίηση του αριθμού των αναγνώσεων ανά κιλοβάση μεταγράφων ανά εκατομμύριο χαρτογραφημένων αναγνώσεων (reads per kilobase of transcripts per million mapped reads, RPKM). Η μελέτη της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων γίνεται με στατιστική μεθοδολογία ειδικά σχεδιασμένη για δεδομένα RNA-seq, όπως το Cuffdiff και το edgeR^{194,197,201–205}



Εικόνα 1.2.1: Πείραμα RNA-seq. (Α.) Data generation: Κατά τη φάση δημιουργίας δεδομένων, το ολικό RNA ή mRNA θρυματίζεται και αντιγράφεται αντίστροφα σε συμπληρωματικό DNA ώστε να δημιουργηθεί μία βιβλιοθήκη cDNA. Ακολουθεί πρόσδεση προσαρμογέα (adaptor) αλληλούχησης και, ανάγνωση των μικρών τμημάτων από το ένα ή και τα δύο άκρα του θραύσματος του cDNA **(Β.) Data analysis:** Κατά τη φάση ανάλυσης δεδομένων, δημιουργούνται αρχεία με τα τμήματα ανάγνωσης, τα οποία στοιχίζονται στο γονιδίωμα αναφοράς με τη χρήση εργαλείων στοίχισης. Ακολούθως, τα χαρτογραφημένα αναγνώσματα ομαδοποιούνται σε μετάγραφα, τα οποία ποσοτικοποιούνται. Η μελέτη της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων γίνεται με στατιστική μεθοδολογία ειδικά σχεδιασμένη για δεδομένα RNA-seq.

Από: *Nat Rev Genet* 2011; 12: 671-82

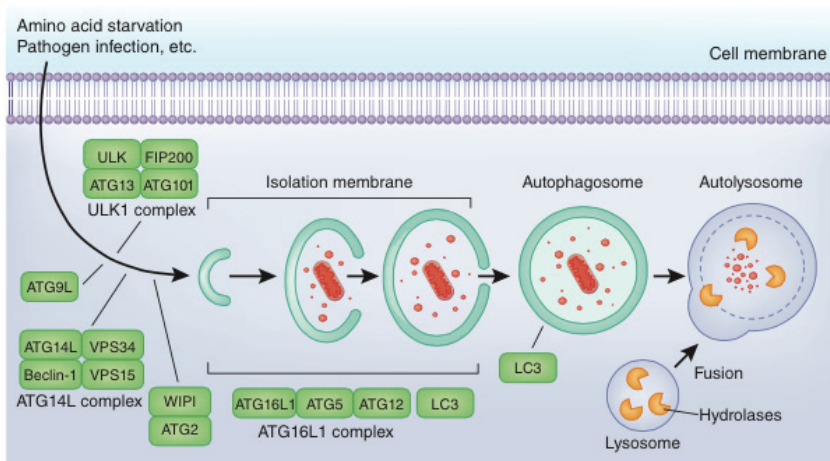
1.3. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Ο όρος αυτοφαγία προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «εαυτός» και «φαγεῖν» και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1967 από τον C. De Duve, όταν παρατήρησε στα λυσοσώματα κυττάρων την αποδόμηση μιτοχονδρίων και άλλων ενδοκυττάρων δομών²⁰⁶. Αυτοφαγία ορίζεται η συντηρημένη, κατά την εξέλιξη, κυτταρική καταβολική διεργασία αποδόμησης ανεπιθύμητων κυτταρικών συστατικών στα λυσοσώματα. Αποτελεί μηχανισμό επιβίωσης σε συνθήκες κυτταρικού στρες αφού, είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας μέσω της αναδόμησης πρωτεϊνών, της απομάκρυνσης κατεστραμμένων οργανιδίων, της ανακύκλωσης θρεπτικών συστατικών και της παρεμπόδισης της άθροισης τοξικών πρωτεϊνών. Η αυτοφαγία αποτελεί φυσιολογική διεργασία και, συμμετέχει στη ρύθμιση της ανάπτυξης, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ανάπτυξη των οργάνων και τον κυτταρικό θάνατο²⁰⁷⁻²¹⁰. Στις ημέρες μας, έχει πλέον αποδειχθεί η συμμετοχή της αυτοφαγίας στην παθογένεια μιας σειράς παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, τα μεταβολικά, πνευμονολογικά, νευροεκφυλιστικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, η γήρανση και τα λοιμώδη και αυτοάνοσα νοσήματα²¹¹.

1.3.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ

Η αυτοφαγία ενεργοποιείται σε απάντηση στην παρατεταμένη αιτία, σε υποξία, συσσώρευση πρωτεϊνών και αυξητικών παραγόντων, στρες ενδοπλασματικού δικτύου και λοιμώξεις. Αρχικά, λειτουργεί ως μηχανισμός επιβίωσης παρεμποδίζοντας τον κυτταρικό θάνατο. Η διαταραχή της όμως, οδηγεί παράδοξα σε «αυτοκαταστροφή» και κυτταρικό θάνατο.

Βάσει του μηχανισμού μεταφοράς των κυτταροπλασματικών συστατικών στα λυσοσώματα, διακρίνονται 3 τύποι αυτοφαγίας: η **μακροαυτοφαγία** (macroautophagy), η **μικροαυτοφαγία** (microautophagy) και, η **αυτοφαγία που επάγεται από συνοδές πρωτεΐνες** (Chaperon-Mediated Autophagy, CMA). Κατά το στάδιο έναρξης της **μακροαυτοφαγίας (γενικά αναφερόμενης ως αυτοφαγίας)**, ένα κατεστραμμένο κυτταρικό οργανίδιο ή ένα τμήμα του κυτταροπλάσματος απομονώνεται μέσα σε μία δομή που ονομάζεται μεμβράνη απομόνωσης ή φαγοφόρο. Κατά τη φάση επιμήκυνσης, το φαγοφόρο επιμηκύνεται με προσθήκη νέας μεμβράνης και, στη συνέχεια σφραγίζεται ώστε, να δημιουργήσει το αυτοφαγόσωμα. Κατά το στάδιο ωρίμανσης, το αυτοφαγόσωμα συντήκεται με το λυσόσωμα, δημιουργώντας το αυτοφαγολυσόσωμα, μέσα στο οποίο αποδομούνται και οδηγούνται για ανακύκλωση τα παγιδευμένα συστατικά (εικόνα 1.3.1). Στη μικροαυτοφαγία, τα κυτταροπλασματικά συστατικά εισέρχονται στα λυσοσώματα μέσω εκκολπωμάτων χωρίς την παρεμβολή αυτοφαγοσωμάτων ενώ, στη CMA η μετακίνηση των κυτταροπλασματικών συστατικών στο λυσόσωμα διευκολύνεται από συνοδές πρωτεΐνες και λυσοσωματικούς υποδοχείς²¹².



Εικόνα 1.3.1: Μακροαυτοφαγία είναι η συνάθροιση κυτταροπλασματικών συστατικών σε κυστίδια με διπλή μεμβράνη, τα αυτοφαγόσωμα, τα οποία στη συνέχεια συντήκονται με τα λυσοσώματα, σχηματίζοντας τα αυτοφαγολυσόσωμα. Στα αυτοφαγολυσόσωμα αποδομούνται και οδηγούνται για ανακύκλωση τα κυτταροπλασματικά συστατικά.

Από: *Nat Immunol* 2015; 16: 1014-1024

Η αυτοφαγία ρυθμίζεται από μία ομάδα πρωτεϊνών τις autophagy-related proteins (ATG) οι οποίες, στα θηλαστικά, ταξινομούνται σε 5 λειτουργικές μονάδες: το σύμπλεγμα ULK, το σύμπλεγμα PI(3)K τύπου III, το σύμπλεγμα ATG2-WIPI, το σύστημα σύζευξης ATG12 και το σύστημα σύζευξης LC3 (light chain 3). Αν και πολύπλοκη, η μοριακή οδός της αυτοφαγίας μπορεί να περιγραφεί ως εξής: το σύμπλεγμα ULK (ένα σύμπλοκο serine-threonine κινασών) και το ATG9L αποτελούν τα ανοδικά συστατικά της αυτοφαγικής οδού.

Η δραστηριότητα του συμπλέγματος ρυθμίζεται αρνητικά από το σύμπλεγμα mTORC1 και θετικά από την κινάση AMPK. Τόσο το σύμπλεγμα ULK όσο και το ATG9L είναι απαραίτητα για την κινητοποίηση του συμπλέγματος PI(3)K τύπου III, που ονομάζεται και σύμπλεγμα ATG14L. Το σύμπλεγμα ATG14L αποτελείται από το ATG14L, την καταλυτική υπομονάδα VPS34, το beclin-1 και το VPS15. Σε περιόδους αστίας, το ATG14L συσσωρεύεται στο σημείο επαφής ενδοπλασματικού δικτύου-μιτοχονδρίου και δημιουργεί τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (3P-P), η οποία αποτελεί πλατφόρμα για τη δημιουργία της μεμβράνης απομόνωσης (φαγοφόρου). Η 3P-P παρέχει θέση δέσμευσης σε πρωτεΐνες της οικογένειας WIPI (WIPI1-WIPI4), οι οποίες, με τη σειρά τους, σχηματίζουν σύμπλοκο με το ATG2. Επίσης, το WIPI2 δεσμεύεται άμεσα στο ATG16L1 και κινητοποιεί το σύμπλεγμα ATG16L στη θέση δημιουργίας του αυτοφαγοσώματος. Το σύμπλεγμα ATG16L1 αποτελείται από τις πρωτεΐνες ATG16L1, ATG5 και ATG12, εντοπίζεται στη μεμβράνη απομόνωσης μέχρι την ολοκλήρωση της δημιουργίας του αυτοφαγοσώματος και, δρα ως ένζυμο του συστήματος σύζευξης LC3. Η σύζευξη του μεμβρανικού λιπιδίου φωσφατιδυλ-αιθανολ-αμίνη (PE) στην LC3 συμβαίνει στη μεμβράνη απομόνωσης, όπου συσσωρεύεται το ATG16L. Μόρια πρόσδεσης (adaptor molecules) όπως το SQSTM1, που ονομάζεται και p62, διαθέτουν θέσεις δέσμευσης για την LC3, την οποία κινητοποιούν στη μεμβράνη απομόνωσης. Η LC3 αποτελεί δείκτη αναγνώρισης της δημιουργίας μεμβράνης απομόνωσης και αυτοφαγοσώματος. Η συζευγμένη σε PE LC3 που ονομάζεται LC3-II και, η ασύζευκτη LC3, που ονομάζεται LC3-I ανιχνεύονται με ανοσοαποτύπωση. Δείκτες αυτοφαγικής δραστηριότητας αποτελούν η LC3-II και το p62²¹³.

1.3.2. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η αυτοφαγία συμμετέχει στις απαντήσεις τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών, στην τροποποίηση αντιγόνων για την παρουσίαση στο MHC και, στη λεμφοκυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και πολλαπλασιασμό.

1.3.2.1. Φυσική ανοσία

In vitro, η μακροαυτοφαγία αποδομεί ενδοκυττάρια βακτήρια και ιούς, για παράδειγμα *Streptococcus group A*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteric*, *Listeria monocytogenes*, *HSV-1* και *Toxoplasma gondii*. Η διεργασία αυτή ονομάζεται «ξενοφαγία». *In vivo*, το αυτοφαγικό μονοπάτι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στη λοίμωξη από ενδοκυττάρια παθογόνα αφού, η γενετική απαλειφή αυτοφαγικών γονιδίων αυξάνει την ευπάθεια σε λοιμώξεις από ιούς, μύκητες και βακτήρια. Μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση της αυτοφαγίας με την αντίσταση στη λοίμωξη από φυματίωση και λέπρα^{214,215}. Στα μακροφάγα, DCs και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα η αναγνώριση των PAMPs από τους αντίστοιχους υποδοχείς PRRs οδηγεί στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας^{216,217}. Οι εξειδικευμένες πρωτεΐνες p62/SQSTM1 και NDP52 δρουν ως «γέφυρες» μεταξύ των ενδοκυττάρων μικροοργανισμών και των πρωτεϊνών της αυτοφαγίας (όπως της πρωτεΐνης LC3), διευκολύνοντας τη μεταφορά του παθογόνου στο αυτοφαγολυσόσωμα για αποδόμηση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, κάποια παθογόνα, στην προσπάθειά τους να επιβιώσουν, ανέπτυξαν μηχανισμούς αναστολής της αυτοφαγίας. Για παράδειγμα, η *Listeria monocytogenes* εκφράζει τροποποιημένες πρωτεΐνες ώστε να αποφύγει την αναγνώρισή της από το αυτοφαγικό μονοπάτι ενώ, ο ιός HIV-1 αναστέλλει την σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα²¹⁸. Επιπρόσθετα, για την αναγνώριση της μονής έλικας RNA των ιών και την επακόλουθη έκκριση IFN-α από τα DCs απαραίτητη είναι η αυτοφαγία²¹⁹, η οποία, επίσης, αναστέλλει την ενεργοποίηση του φλεγμονώσους και την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β και IL-18²²⁰⁻²²².

Όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 1.4., τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, που αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας κατά των παθογόνων μικροοργανισμών, έχουν την ικανότητα μέσω του θανάτου τους, να παγιδεύσουν και, στη συνέχεια να καταστρέψουν τους ξένους εισβολείς με τα NETs που απελευθερώνουν. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στο **θάνατο των ουδετεροφίλων με NETωση** είναι πλέον αποδεδειγμένος²²²⁻²²⁹. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι, η αναστολή της σύντηξης αυτοφαγοσωμάτων και λυσοσωμάτων στα ουδετερόφιλα αρθρικού υγρού ή περιφερικού αίματος ασθενών με οξεία ουρική αρθρίτιδα παρεμπόδιζε τη δημιουργία NETs, υποδεικνύοντας την καθοριστική σημασία της αυτοφαγίας στη διεργασία της NETωσης²²⁶.

Είναι γνωστό ότι, τα ενδογενή αντιγόνα επεξεργάζονται στο πρωτεάσωμα και, τα πεπτιδιά τους δεσμεύονται στα μόρια MHC τάξης I για να ενεργοποιήσουν τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, τα εξωγενή

αντιγόνα ενδοκυτταρώνονται ή φαγοκυτταρώνονται και, τα πεπτιδία τους δεσμεύονται στα μόρια MHC τάξης II για να ενεργοποιήσουν τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι, τα DCs, μέσω της διεργασίας διασταυρούμενης αντιγονο-παρουσίασης (cross-presentation), έχουν την ικανότητα να επεξεργάζονται εξωκυττάρια αντιγόνα για να παρουσιαστούν στα μόρια MHC τάξης I. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να επεξεργάζονται ενδοκυττάρια (πυρηνικά και κυτταροπλασματικά) αντιγόνα για να παρουσιαστούν στα μόρια MHC τάξης II^{230,231}. Η συμμετοχή της αυτοφαγίας τόσο στην **επεξεργασία αντιγόνων για την παρουσίαση των MHC** τάξης I στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα^{232,233} όσο και στην επεξεργασία ενδογενών και εξωγενών αντιγόνων για την παρουσίαση των MHC τάξης II στα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα είναι καθοριστική^{233,234}. Για παράδειγμα, κατά την προσπάθεια να χαρακτηριστούν οι προσδέτες του MHC τάξης II διαπιστώθηκε ότι, η επαγόμενη από έλλειψη τροφικών συστατικών αυτοφαγία αύξησε την παρουσίαση των ενδοκυττάρων πεπτιδίων στο MHC τάξης II²³³. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στα DCs και στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, τα αυτοφαγοσώματα συνεντοπίζονται με μόρια συσχετιζόμενα με το MHC τάξης II²³⁴ και, ποντίκια με DCs που δεν εκφράζουν το γονίδιο αυτοφαγίας ATG5 εμφανίζουν λοίμωξη από τον ιό HSV-2 με παθολογική αντιγονοπαρουσίαση στα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα²¹⁹. Σημαντικό είναι και το εύρημα ότι, κατά την εξάλειψη των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα, η αυτοφαγία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παρουσίαση των ενδογενών πεπτιδίων στα μόρια MHC τάξης II²³⁵. Ως προς τα μόρια MHC τάξης I, κατά τη διάρκεια λοιμώξεων από ιούς, τα ιικά αντιγόνα αποδομούνται από πρωτεάσες στο αυτοφαγολυσόσωμα και, τα πεπτιδία είτε επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα και αποδομούνται στο πρωτεάσωμα, είτε δεσμεύονται στα μόρια MHC τάξης I για να παρουσιαστούν στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα^{231,232}. Όλα αυτά θέτουν την αυτοφαγία σε κεντρικό σημείο στην παθογένεια της αυτοανοσίας.

1.3.2.2. Επίκτητη ανοσία

Η αυτοφαγία ρυθμίζει τις απαντήσεις των T λεμφοκυττάρων μέσω της αντιγονοπαρουσίασης στο θύμο αδένα και στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα της περιφέρειας. Επιπρόσθετα, έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας, της ενεργοποίησης και του θανάτου τόσο των B όσο και των T λεμφοκυττάρων.

Η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των **T λεμφοκυττάρων**. Η ενεργοποίηση του TCR οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της αυτοφαγίας²³⁶. Παρόλο που η διαδικασία αυτή δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως, μελέτες σε ζωικά πρότυπα με απαλειφή του Vps34 από τα T λεμφοκύτταρα, έδειξαν ότι τα T λεμφοκύτταρα διατηρούν τα επίπεδα αυτοφαγίας τους όμως, παρουσιάζουν μειωμένη επιβίωση λόγω διαταραχής στην έκφραση του υποδοχέα της IL-7²³⁷. Σε ένα άλλο ζωικό πρότυπο, η διαταραχή του Vps34 οδήγησε σε συσσώρευση μιτοχονδρίων, αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και μειωμένη επιβίωση των T λεμφοκυττάρων²³⁸. Επιπρόσθετα, η αυτοφαγία στα T λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιοστασίας των οργανιδίων τους αφού, ρυθμίζει την ανακύκλωση των συστατικών των μιτοχονδρίων κατά την ανάπτυξή τους από θυμοκύτταρα σε ώριμα λεμφοκύτταρα^{239,240} αλλά, είναι επίσης απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του ενδοπλασματικού τους δικτύου αφού, η έλλειψη αυτοφαγίας οδηγεί σε λειτουργικές διαταραχές του ενδοκυττάρου μονοπατιού του ασβεστίου²⁴¹.

Όπως και στα T λεμφοκύτταρα, η αυτοφαγία συμμετέχει στην ανάπτυξη των προγονικών και στην επιβίωση των ώριμων **B λεμφοκυττάρων**. Η απαλειφή του γονιδίου της αυτοφαγίας ATG5 από τα B λεμφοκύτταρα οδηγεί σε μείωση του αριθμού των προγονικών μορφών και σε διαταραχή της μετατροπής των προ-προ-B λεμφοκυττάρων σε προ-B λεμφοκύτταρα²⁴². Επίσης, ο ενεργοποιημένος BCR διευκολύνει την κινητοποίηση του TLR9 στα αυτοφαγοσώματα, όπου συνεντοπίζεται με αυτά²⁴³.

1.3.3. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΣΕΛ

Η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών απαντήσεων και, ο ρόλος της στο ανοσοποιητικό σύστημα υποστηρίζεται από την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων που προαναφέρθηκαν. Φυσιολογικά, η αυτοφαγία συνεισφέρει στην ισορροπία των ανοσολογικών απαντήσεων προστατεύοντας τον οργανισμό από την εμφάνιση νοσημάτων. Όμως, κάθε διαταραχή της αυτοφαγίας οδηγεί σε δυσπροσαρμοστικές απαντήσεις και τελικά σε εμφάνιση νοσημάτων.

Όπως προαναφέρθηκε, η γενετική συνεισφορά στο ΣΕΛ είναι μεγάλη και, μέχρι σήμερα, διαπιστώθηκαν >60 περιοχές/τόποι γονιδιώματος που συσχετίζονται με ευπάθεια στον ΣΕΛ. Μεταξύ αυτών, πολυμορφισμοί του γονιδίου της αυτοφαγίας ATG5 συσχετίστηκαν με ευπάθεια στο ΣΕΛ τόσο σε Καυκάσιους όσο και σε Κινέζικους πληθυσμούς^{16,35,41,78,244}. Σε προηγούμενες μελέτες μας, για να διερευνήσουμε περαιτέρω την αιτιοπαθογένεια του ΣΕΛ, συγκρίναμε τη γονιδιακή έκφραση μονοπυρήνων κυττάρων από

μυελό των οστών και μονοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών με ΣΕΛ και υγιών εθελοντών, με μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA. Διαπιστώσαμε ότι, οι ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση των γονιδίων της αυτοφαγίας και από διαφορική έκφραση microRNAs που στοχεύουν γονίδια αυτοφαγίας^{90,91}.

Η αυτοφαγία διαδραματίζει ρόλο στις λοιμώξεις και στην επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Η λοιμώδης μονοκυττάρωση είναι μία από τις συχνότερες λοιμώξεις των ασθενών με ΣΕΛ. Η πρωτεΐνη LMP1 (EBV-encoded latent membrane protein 1) ενεργοποιεί την αυτοφαγία και ρυθμίζει τη λειτουργία των μολυσμένων από EBV Β λεμφοκυττάρων. Επίσης, η επαγόμενη από τον EBV παραγωγή IFN τύπου Ι από τα DCs απαιτεί τη λειτουργία της αυτοφαγίας μέσω των TLR9 και TLR7, η οποία επάγει την αντιγονοπαρουσίαση του ενδογενούς πυρηνικού αντιγόνου 1 του EBV, EBNA1, στα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα^{245,246,247}. Η υπερϊώδης ακτινοβολία UVA2 και UVB επιδεινώνει την προσβολή του δέρματος σε ασθενείς με ΣΕΛ και, έχει διαπιστωθεί ότι, οι διαταραχές στην αυτοφαγία επάγουν τη συσσώρευση πρωτεϊνών και ελευθέρων ριζών οξυγόνου εξαιτίας βλάβης του DNA²⁴⁸.

Στο ΣΕΛ, η εμμένουσα υπερπόλωση των μιτοχονδρίων των Τ λεμφοκυττάρων οδηγεί σε νέκρωσή τους όταν αυτά ενεργοποιηθούν, με συνέπεια την απελευθέρωση καταλοίπων τα οποία ενεργοποιούν τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας και κυρίως τα DCs^{249,250}. Τα αποπτωτικά κύτταρα του ΣΕΛ αθροίζονται στους λεμφαδένες, όπου τα κατάλοιπά τους δεσμεύονται στην επιφάνεια των DCs. Η αυτοφαγία, πιθανά, διευκολύνει την διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση στα μόρια MHC τάξης Ι στα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα αφού, σε ζωικό πρότυπο λύκου έχει αποδειχθεί η αυξημένη απάντηση των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων μετά από αυξημένη διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση των δενδριτικών κυττάρων^{251,252}. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη σημασία της IFN τύπου Ι στην παθογένεια του ΣΕΛ, μελετήθηκαν DCs με απαλειφή του γονιδίου ATG5 ως προς την απάντηση σε λοίμωξη από ιό με παραγωγή IFN-α και, διαπιστώθηκε ότι, τα κύτταρα αυτά αδυνατούν να παράγουν IFN-α μετά από λοίμωξη από τον ιό VSV. Το ίδιο εύρημα επιβεβαιώθηκε και σε DCs τα οποία επώαστηκαν με αναστολέα της αυτοφαγίας²¹⁹, υποδεικνύοντας τη σημασία της στη φυσική ανοσία. Επίσης, στο ΣΕΛ έχει αποδειχθεί η σημασία που έχουν τα NETs στη σχέση μεταξύ παραγωγής IFN-α και θανάτου των ουδετεροφίλων. Η IFN-α ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα προς NETωση και, τα NETs αποτελούνται, μεταξύ άλλων, από ανοσοσυμπλέγματα που περιλαμβάνουν αντιγόνα εαυτού. Τα ανοσοσυμπλέγματα ενεργοποιούν τη σηματοδότηση του TLR9 και την περαιτέρω σύνθεση IFN-α από τα DCs. Η σημασία της αυτοφαγίας στη NETωση είναι καθοριστική αφού, η καταστολή της παρεμποδίζει την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και την επένδυση των NETs με πρωτεΐνες και μόρια των ουδετεροφιλικών κοκκίων²²⁷.

Η αυτοφαγία είναι, επίσης, απαραίτητη στη ρύθμιση της λειτουργίας, της ενεργοποίησης και του θανάτου των Τ και Β λεμφοκυττάρων. Σε δύο διαφορετικά ζωικά πρότυπα λύκου, η αυτοφαγία εμφανίζεται διαταραγμένη και, πιο συγκεκριμένα, τα περιφερικά Τ λεμφοκύτταρα εμφανίζουν συσσώρευση αυτοφαγικών κενωτοπίων²⁵³. Τόσο σε ποντίκια όσο και στον άνθρωπο, τα Τ λεμφοκύτταρα του λύκου εμφανίζουν «μεγα-μιτοχόνδρια», αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων και αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας, η οποία πιθανά επάγει την επιβίωση των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων²⁵⁴. Τα ανωτέρω συνηγορούν υπέρ του ρόλου της αυτοφαγίας στην παθογένεια του ΣΕΛ και, η ακριβής κατανόηση της μοριακής της βάσης θα οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και στοχευμένων θεραπευτικών μέσων.

1.3.4. REDD1 (REGULATED IN DNA DAMAGE AND DEVELOPMENT 1)

Ο REDD1 (Regulated in DNA Damage and Development 1), γνωστός και ως Dig2/RTP801/DDIT4, είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 25 kDa που ανήκει σε μία οικογένεια συντηρημένων πρωτεϊνών και εκφράζεται σε αρκετούς ανθρώπινους ιστούς. Επάγεται σε καταστάσεις κυτταρικού στρες, όπως υποξία, οξειδωτικό στρες, στρες ενδοπλασματικού δικτύου και βλάβη του DNA²⁵⁵⁻²⁵⁷.

Ο REDD1 αναστέλλει τη σηματοδότηση του mammalian target of rapamycin (mTOR), κυρίως μέσω της οδού του συμπλέγματος mTOR complex1. Πιο συγκεκριμένα. Ο REDD1 απομακρύνει την τουμπερίνη (tuberin, TSC2) από τις πρωτεΐνες-οχήματα 14-3-3, επιτρέποντάς της να αναστείλει τον mTOR, γεγονός που τον καθιστά ενδογενή ρυθμιστή κυτταρικών λειτουργιών. Επίσης, το υποκινητής του γονιδίου του REDD1 διαθέτει στοιχείο απάντησης στην υποξία (hypoxia response element), το οποίο αναγνωρίζεται από τον παράγοντα που επάγεται από την υποξία-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)²⁵⁵⁻²⁵⁷.

Σε κύτταρα με απαλειφή του REDD1, οι μειωμένες κυτταροπλασματικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οδηγούν σε υπερδραστικότητα της ενδοπεπτιδάσης ATG4B, με αποτέλεσμα την απολίπωση της LC3 και τη

διαταραχή του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων. Επίσης, η απαλειφή του REDD1 ανέστειλε την αυτοφαγία σε υπερτροφικά μυοακριακά κύτταρα²⁵⁸. Στον οικογενή μεσογειακό πυρετό, διαπιστώθηκε ότι, ο REDD1 αποτελεί ανοδικό ρυθμιστή της πυρίνης, που ρυθμίζει τη συσσώρευση του NALP3 φλεγμονοσώματος στα αυτοφαγολυσώματα.

1.3.5. Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ

Σήμερα, η θεραπευτική στόχευση της αυτοφαγίας στα ανθρώπινα νοσήματα είναι περιορισμένη εξαιτίας της αδιευκρίνιστης συμμετοχής της στην παθογένεια των νοσημάτων. Οι φαρμακευτικές ουσίες αυτές αναστέλλουν ή ενεργοποιούν την αυτοφαγία είτε παρεμβαίνουν σε αυτή.

Η Βιταμίνη D, οι ενεργοποιητές της AMPK (adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase) και η rapamycin αποτελούν βασικούς ενεργοποιητές της αυτοφαγίας. Η rapamycin (sirolimus) αναστέλλει το σύμπλοκο mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) και, έτσι, ενεργοποιεί την αυτοφαγία. Τόσο σε ζωικά πρότυπα λύκου όσο και στον άνθρωπο, η rapamycin μείωσε την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στο σπείραμα και την πρωτεϊνουρία. Το πεπτίδιο P140 μέσω καταστολής του αυτοφαγικού μονοπατιού μειώνει τη σταθερότητα των μορίων MHC τάξης II στα Β λεμφοκύτταρα, μειώνει την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και, αποδεικνύεται προστατευτικό σε ζωικό πρότυπο λύκου. Οι αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών (Histone deacetylase inhibitors, HDACi) και η χλωροκίνη και υδροξυχλωροκίνη καταστέλλουν την οξινοποίηση των λυσοσωμάτων ενώ, οι τελευταίες αναστέλλουν και τη λειτουργία του φαγοσώματος²⁵⁹.

1.3.4.1. Υδροξυχλωροκίνη

Η υδροξυχλωροκίνη είναι ένα ανθελονοσιακό φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται και ως DMARD. Ανήκει στις 4-αμινο-κινολόνες και, αποτελεί ανάλογο της χλωροκίνης μετά από β-υδροξυλίωση μιας Ν-αιθυλομάδας. Απορροφάται μετά από ροή χορήγησης από το γαστρεντερικό σύστημα κατά 70-80% και, ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 40-50 ημέρες επομένως, θεραπευτικά επίπεδα στο πλάσμα επιτυγχάνονται μετά από 6 περίπου μήνες χορήγησης. Αποβάλλεται κατά 25% από τους νεφρούς και η υπόλοιπη έχει ηπατικό καταβολισμό. Εναποτίθεται σε ιστούς σε μεγάλη συγκέντρωση και άρα, η απομάκρυνσή της με την αιμοκάθαρση δεν είναι εφικτή. Ο μηχανισμός δράσης της υδροξυχλωροκίνης δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί. Είναι λιπόφιλη ασθενής βάση και, έτσι διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και τα όξινα ενδοκυττάρια κυστίδια, όπως τα λυσοσώματα. Τροποποιεί το pH και τη σταθερότητα των λυσοσωμάτων και, έτσι αναστέλλει την αυτοφαγία. Καταστέλλει τον αντιγονοπαρουσιασμό, αναστέλλει τη σύνθεση προσταγλανδινών και κυτοκινών, αναστέλλει τη σηματοδότηση των TLR, μειώνει τα μόρια προσκόλλησης και τη δραστηριότητα μεταλλοπρωτεϊνών και ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην απόπτωση που επάγεται από το Fas. Η χορήγηση της υδροξυχλωροκίνης στο ΣΕΛ συσχετίζεται με βελτίωση της επιβίωσης και της ενεργότητας του νοσήματος και, έχει καρδιοπροστατευτική και αντινεοπλασματική δράση. Στη νεφρίτιδα λύκου, η χορήγησή της συσχετίζεται με μείωση της χρήσης κορτικοστεροειδών, μείωση της ενεργότητας του νοσήματος, παράταση της διάρκειας νεφρικής ύφεσης και αύξηση του χρόνου μέχρι την εμφάνιση ΧΝΝΤΣ. Το προφίλ ασφάλειάς της είναι άριστο και, οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές. Απαιτείται βυθοσκόπηση μετά από 5 έτη χορήγησής της για τον αποκλεισμό αμφιβληστροειδοπάθειας και, μείωση στη δοσολογία της σε ασθενείς με έκπτωση νεφρικής λειτουργίας²⁶⁰.

1.4. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΝΕΤΩΣΗ

Τα **πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα**, τα πολυπληθέστερα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα που ανήκουν στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, είναι σφαιρικά κύτταρα διαμέτρου 12-15 μm με πολυλοβωτό πυρήνα. Το κυτταρόπλασμά τους φέρει κοκκία, τα οποία περιέχουν μικροβιοκτόνα μόρια και οξειδωτικά ένζυμα όπως, μυελο-υπεροξειδάση (myeloperoxidase, MPO), καθεψίνη G, ελαστάση (neutrophil elastase, NE), καθελιδίνη (cathelisin ή LL-37) και άλλα. Αναπτύσσονται στο μυελό των οστών και, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα με χρόνο ημίσειας ζωής 1-8 ώρες²⁶¹⁻²⁶⁴.

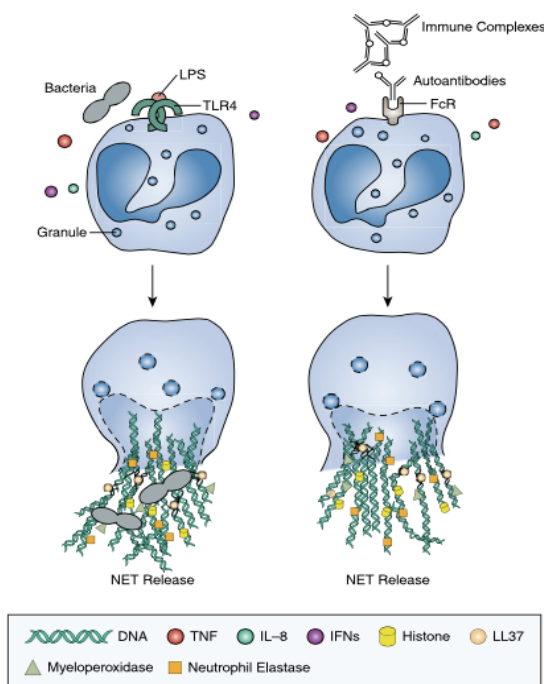
Μετά την κινητοποίησή τους στη θέση ιστικής βλάβης ή λοίμωξης, τα ουδετερόφιλα προσκολλώνται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, εξαγγειώνονται και μεταναστεύουν προς τη φλεγμονώδη εστία όπου, καταστρέφουν τους ξένους εισβολείς²⁶³. Η φαγοκυττάρωση του παθογόνου ακολουθείται από την αποδόμησή του από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια των κοκκίων, (όπως τη MPO και την NE), τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinase, MMP) και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που προέρχονται από την ενεργοποίηση του συμπλέγματος NADPH-οξειδάση. Ο ρόλος του ουδετεροφίλου στην επίκτητη ανοσία είναι επίσης σημαντικός αφού, η πρόσληψη των αποπτωτικών ουδετεροφίλων από τα DCs αυξάνει τα επίπεδα του αντιγονοπαρουσιασμού^{265,266}. Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούν τα CD8^+ και γδ λεμφοκύτταρα, αναστέλλουν διά των ενζύμων τους την παραγωγή των κυτοκινών που ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα (όπως την IL-2 και IL-6), συμμετέχουν στη μείωση της έκφρασης της ζ αλυσίδας του TCR, οδηγούν στην απόπτωση των T λεμφοκυττάρων και, συνθέτουν απαραίτητες για την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων κυτοκίνες BAFF και APRIL. Στο σπλήνα, τα ουδετερόφιλα λειτουργούν ως βοηθητικά κύτταρα των B λεμφοκυττάρων²⁶⁷. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ένας νέος τρόπος καταστροφής των μικροοργανισμών από τα ουδετερόφιλα μέσω παγίδευσής τους σε ινίδια χρωματίνης τα οποία είναι διακοσμημένα με δραστικές πρωτεΐνες και ένζυμα των ουδετεροφιλικών κοκκίων. Τα διακοσμημένα ινίδια χρωματίνης ονομάζονται εξωκυττάρια παγίδες ουδετεροφίλων (neutrophil extracellular traps, NETs) και, απελευθερώνονται κατά την «αυτοκτονία» των ουδετεροφίλων στην προσπάθειά τους να εξοντώσουν τον ξένο εισβολέα. Αυτός ο νέος τρόπος κυτταρικού θανάτου του ουδετεροφίλου, που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2004 από τους Brinkmann *et. al.*²⁶⁸, ονομάζεται NETωση.

1.4.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΝΕΤΩΣΗΣ

Η **ΝΕΤωση του ουδετεροφίλου** επάγεται *in vitro* ή *in vivo* μετά από έκθεσή του σε λοιμώδη (βακτήρια, μύκητες, παράσιτα, ιούς) ή ειδικά άσηπτα ερεθίσματα (κυτοκίνες, αυτοαντισώματα, ανοσοσυμπλέγματα, IL-8, phorbol 12-myristate 13-acetate ή PMA και άλλα)²⁶⁸. Μετά την ενεργοποίηση του ουδετεροφίλου, παρατηρείται ενεργοποίηση των οδών της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)²⁶⁹ και ERK1/2²⁷⁰, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στην ενεργοποίηση της οξειδάσης της NADPH και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου²⁷¹. Το ουδετερόφιλο αποκοκκιώνεται και η NE, με τη βοήθεια της MPO, μετακινείται στον πυρήνα όπου διασπά τις ιστόνες²⁷². Ταυτόχρονα, παρατηρείται αποσυμπύκνωση της χρωματίνης με τη δράση του ενζύμου απαμινάση της πεπετυδυλ-αργινίνης-4 (peptidylarginine deiminase, PAD4), η οποία αλλάζει τις θετικά φορτισμένες αργινίνες των ιστονών σε ουδέτερα κιτρουλινοποιημένα κατάλοιπα²⁷³. Οι μεμβράνες των κοκκίων και η πυρηνική μεμβράνη διασπώνται και, το περιεχόμενό τους αναμειγνύεται στο κυτταρόπλασμα^{274,275}. Το δίκτυο χρωματίνης, που είναι πλέον διακοσμημένο με τα κυτταροπλασματικά συστατικά, αποβάλλεται από το κύτταρο μετά από λύση του και, καλύπτει μία επιφάνεια 10-15 φορές μεγαλύτερη από την επιφάνεια του κυττάρου που το απέβαλε (εικόνα 1.4.1). Τελικά, τα NETs αποδομούνται από την DNase I, μία ενδονουκλεάση που διασπά τη χρωματίνη των NETs¹⁷⁰.

Καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της NETωσης διαδραματίζει η **αυτοφαγία**. Στην προσπάθειά τους να διερευνήσουν τα ενδοκυττάρια γεγονότα της NETωσης, οι Remijnsen *Q et al.*²²⁷, διαπίστωσαν ότι η κενοτοπία που προκαλεί το PMA στα ουδετερόφιλα συσχετίζεται με την αυτοφαγία αφού, παρατηρήθηκαν πρόδρομες αυτοφαγοσωματικές δομές που περικύκλωναν τα ουδετεροφιλικά κοκκία και ριβοσώματα. Οι δομές αυτές δεν ήταν αυτοφαγοσώματα, αλλά κατάλοιπα του πυρηνικού φακέλου επενδυμένα με πρωτεΐνες των κοκκίων, που τελικά απελευθερώνονταν ως NETs. Η φαρμακολογική αναστολή της αυτοφαγίας με wortmannin οδήγησε στην αναστολή της κενοτοπίας και της αποσυμπύκνωσης της

χρωματίνης, δείχνοντας τον καθοριστικό ρόλο της αυτοφαγίας στη NETωση ανεξάρτητα από την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου²²⁷.



Εικόνα 1.4.1: Ουδετερόφιλο και NETωση. Μετά την ενεργοποίησή του, το ουδετερόφιλο αποκοκκιώνεται και η ΝΕ, με τη βοήθεια της ΜΡΟ, μετακινείται στον πυρήνα όπου διασπά τις ιστόνες. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αποσυμπύκνωση της χρωματίνης με τη δράση του ενζύμου PAD4. Οι μεμβράνες των κοκκίων και η πυρηνική μεμβράνη διασπώνται και, το περιεχόμενό τους αναμειγνύεται στο κυτταρόπλασμα. Το δίκτυο χρωματίνης, που είναι πλέον διακοσμημένο με τα κυτταροπλασματικά συστατικά, αποβάλλεται από το κύτταρο μετά από λύση του.

Από: *J Immunol* 2012; 189: 2689-2695

4.4.2. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΣΕΛ

Ο ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από μια πληθώρα ουδετεροφιλικών διαταραχών. Είναι γνωστό ότι, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΣΕΛ, σε κάποια φάση της φυσικής εξέλιξης του νοσήματος, θα παρουσιάσει ουδετεροπενία με, τα ουδετερόφιλά του να χαρακτηρίζονται από μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα και διαταραχή της οξειδωτικής δραστηριότητας²⁷⁶⁻²⁷⁹. Στους ασθενείς με ΣΕΛ παρατηρείται ένας ξεχωριστός κυτταρικός πληθυσμός ουδετεροφίλων, τα «κοκκιοκύτταρα χαμηλής πυκνότητας» (low density

granulocytes, LDG), που απομονώνονται από τα μονοπύρρηνα με διαχωρισμό σε κλίση πυκνότητας. Τα LDGs είναι ιδιαίτερα τοξικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχουν αυξημένη ικανότητα σύνθεσης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, μεταξύ των οποίων η IFN τύπου I και, απελευθερώνουν NETs με αυτοαντιγόνα και ανοσοτροποποιητικά μόρια, όπως η IL-17^{173,280-282}. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης έδειξαν ότι, τα LDGs χαρακτηρίζονται από διαταραχές της μεθυλίωσης των γονιδίων της «υπογραφής IFN» και, από αυξημένο αριθμό αντιγράφων και απώλειες ετεροζυγωτίας²⁸³. Όπως προαναφέρθηκε, προηγούμενες μελέτες μας με μικροσυστοιχίες cDNA μυελού των οστών έδειξαν ότι, ο μυελός των οστών ασθενών με ενεργό ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από μία ισχυρή γονιδιακή ταυτότητα ουδετεροφίλων^{90,91}. Πρόσφατα, οι *Banchereau R et al.*, μελέτησαν το μεταγραφικό προφίλ 158 παιδιατρικών ασθενών με ΣΕΛ και, διαπίστωσαν ότι τα μεταγράφα των ουδετεροφίλων ήταν πλούσια σε ασθενείς με ενεργή νεφρική νόσο, εύρημα που δεν παρατηρήθηκε σε άλλες εκδηλώσεις του ΣΕΛ. Τα ευρήματα αυτά χάθηκαν μετά τη θεραπεία με mycophenolate mofetil (MMF) στους ασθενείς με υπερπλαστική LN αλλά όχι σε αυτούς με μεμβρανώδη LN, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα εξατομίκευσης της ανοσορύθμισης των ασθενών²⁸⁴.

1.4.3. NETΩΣΗ ΚΑΙ ΣΕΛ

Φυσιολογικά, η NETωση αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας του ξενιστή έναντι σε ξένους εισβολείς όμως, έχει αποδειχθεί ότι η διαταραχή της συμμετέχει σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, κακοήθειες, αθηροσκλήρυνση και θρομβώσεις²⁸⁵.

Οι *Hakkim A. et al.*¹⁷⁰, ήταν οι πρώτοι που συνέδεσαν τη NETωση με το ΣΕΛ αφού, στην προσπάθειά τους να μελετήσουν την παθογένεια της LN διαπίστωσαν ότι, στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ τα NETs δεν μπορούσαν να αποδομηθούν εξαιτίας μειωμένης δραστηριότητας της ενδονουκλεάσης DNase I λόγω ύπαρξης αναστολέων της. Ταυτόχρονα, παρατήρησαν αυτοαντισώματα κατά των NETs που εμποδίζουν την πρόσβαση της DNase I στα NETs. Τα ευρήματα αυτά συσχετίστηκαν με νεφρική προσβολή¹⁷⁰. Οι *Leffler J. et al.*²⁸², διαπίστωσαν ότι, οι ασθενείς που παρουσίασαν μειωμένη αποδόμηση NETs ήταν αυτοί με μεγάλη ενεργότητα ΣΕΛ και καταναλωμένα C3 και C4 στον ορό. Διαπίστωσαν ότι, *in vitro* τα NETs είχαν την ικανότητα να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και ότι, το C1q των NETs ανέστειλε την αποδόμησή τους εξαιτίας άμεσης αναστολής της DNase I. Τα δεσμευμένα στα NETs αυτοαντισώματα ανέστειλαν την αποδόμηση των NETs και, οδήγησαν σε περαιτέρω αύξηση της εναπόθεσης του C1q, δείχνοντας ότι τα NETs αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές του συστήματος του συμπληρώματος²⁸². Επίσης, διαπιστώθηκε ότι, τα ουδετερόφιλα

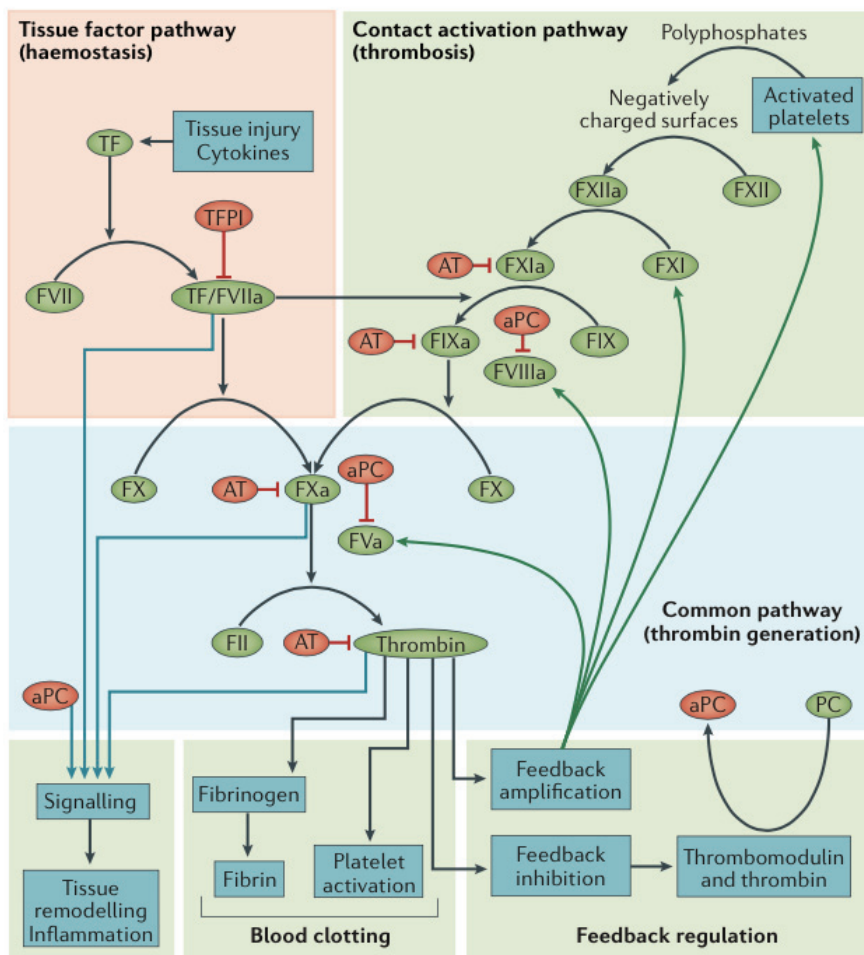
μπορούν άμεσα να ενεργοποιήσουν τα pDCs απελευθερώνοντας NETs που περιέχουν συμπλέγματα DNA εαυτού με αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία αποτελούσαν τον πυρήνα των ανοσοσυμπλεγμάτων που απαιτείται για την ενεργοποίηση των TLR9 των pDCs. Ταυτόχρονα, οι ασθενείς εμφάνισαν αυτοαντισώματα κατά των αντιμικροβιακών πεπτιδίων των συμπλεγμάτων²⁸⁰. Σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΣΕΛ βρέθηκε ότι, τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται *in vivo* από την IFN τύπου Ι και, πεθαίνουν απελευθερώνοντας NETs μετά από έκθεσή τους σε αντισώματα κατά των ριβονουκλεοπρωτεϊνών ασθενών με ΣΕΛ. Τα NETs που ήταν διακοσμημένα με ουδετεροφιλικές πρωτεΐνες ενεργοποίησαν μέσω TLR9 τα pDCs προς παραγωγή IFNα²⁸¹. Για να διερευνηθεί ο ρόλος των NETs στη φλεγμονή, οι *Kahlenberg JM. et al.*²⁸⁶, μελέτησαν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος σε απάντηση στα NETs και, διαπίστωσαν ότι, τα NETs ενεργοποιούν την κασπάση-1 στα μακροφάγα, οδηγώντας σε παραγωγή IL-1β και IL-18, που περαιτέρω ενεργοποιούσαν τη NETωση στο ΣΕΛ²⁸⁶. Επίσης, τα LDGs των ασθενών με ΣΕΛ απελευθερώνουν NETs διακοσμημένα με βακτηριοκτόνες πρωτεΐνες, αλαρμίνες και αυτοαντισώματα όπως, LL-37, IL-17 και dsDNA και, μπορούν να προκαλέσουν το θάνατο σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι προσβεβλημένοι ιστοί, όπως το δέρμα και οι νεφροί, εμφάνισαν αυξημένο αριθμό NETωτικών ουδετεροφίλων με LL-37 και dsDNA, αποτέλεσμα που δείχνει τον πιθανό παθογενετικό ρόλο των NETs στο νόσημα¹⁷³. Για να διαπιστωθεί ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλούν ενδοθηλιακή βλάβη τα NETs ασθενών με ΣΕΛ, μελετήθηκε η ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή αορτής τρωκτικών και, βρέθηκε ότι, η ενεργοποίηση MMP των NETs συσχετιζόταν με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, στον ορό ασθενών με ΣΕΛ παρατηρήθηκαν ανοσοσυμπλέγματα MMP-9 που οδηγούσαν σε αυξημένη NETωση²⁸⁷.

Για να μελετηθεί η **αναστολή της NETωσης** ως πιθανός θεραπευτικός στόχος στο ΣΕΛ, οι *Knight JS. et al.*²⁸⁸, χορήγησαν στα ζωικά πρότυπα λύκου New Zealand Mixed 2328 Cl-amidine, που αποτελεί αναστολέα των PAD. Παρατήρησαν ότι, η χορήγηση ανέστειλε την *in vivo* δημιουργία των NETs, τροποποίησε το προφίλ των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων και του συμπληρώματος και, μείωσε την εναπόθεση IgG στα σπειράματα. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της διαφοροποίησης των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων του μυελού των οστών, βελτίωση της ενδοθηλιο-εξαρτώμενης αγγειοδιαστολής και καθυστέρηση στην εμφάνιση αρτηριακής θρόμβωσης²⁸⁸. Η ίδια ομάδα, μελέτησε το αποτέλεσμα της χορήγησης Cl-amidine και της BB-Cl-amidine, που αποτελεί νεότερο αναστολέα PAD, στο ζωικό πρότυπο λύκου MRL/lpr και, διαπίστωσαν ότι, η αναστολή των PAD βελτίωσε την ενδοθηλιακή λειτουργία, τροποποίησε την έκφραση των γονιδίων της IFN τύπου Ι, μείωσε την πρωτεϊνουρία και την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στο νεφρό και, προστάτευσε τα ζώα από την εμφάνιση δερματικών εκδηλώσεων²⁸⁹.

Το αποτέλεσμα της αναστολής της NETωσης στον άνθρωπο, δεν έχει εξακριβωθεί.

1.5. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η πήξη είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας και ομοιοστασίας και, περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του καταρράκτη της πήξης. Η πρωτογενής αιμόσταση αποτελεί την αρχική φάση δημιουργίας βύσματος από αιμοπετάλια στη θέση βλάβης του αγγείου. Η δευτερογενής αιμόσταση επιτυγχάνεται μετά από ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης, ο οποίος αποτελεί ένα σύστημα διαδοχικών πρωτεολυτικών αντιδράσεων που αποτελείται από δύο οδούς: την οδό του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) ή εξωγενή οδό και, την οδό επαφής ή ενδογενή οδό. Και οι δύο οδοί καταλήγουν σε ένα κοινό μονοπάτι, το οποίο δημιουργεί θρομβίνη²⁹⁰. Η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της πήξης προλαμβάνεται εξαιτίας διαφόρων φυσιολογικών αντιπηκτικών μηχανισμών όπως, της αναστολής των παραγόντων ή συμπλόκων της πήξης από την οδό του αναστολέα του ιστικού παράγοντα και την αντιθρομβίνη, ή της απενεργοποίησης των ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (activated protein C, aPC). Το τελικό βήμα στην αιμόσταση αποτελεί η ινωδόλυση, μία πρωτεολυτική διεργασία που στοχεύει τη θρομβίνη και την εξωκυττάρια ουσία. Η φυσιολογική αιμόσταση απαιτεί αυστηρή ρύθμιση των πρωτεασών της πήξης αφού, η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης οδηγεί σε υπέρμετρη δημιουργία θρόμβων.



Εικόνα 1.5.1: Το σύστημα της πήξης του αίματος αποτελείται από την οδό του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) ή εξωγενή οδό και, την οδό επαφής ή ενδογενή οδό. Και οι δύο οδοί καταλήγουν σε ένα κοινό μονοπάτι, το οποίο δημιουργεί θρομβίνη.

Από: *Nat. Rev Nephrol* 2016; 12: 94-109

Στην οδό του ιστικού παράγοντα του καταρράκτη της πήξης (εικόνα 1.5.1), η ιστική βλάβη και οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες επάγουν την έκφραση του TF στην επιφάνεια των κυττάρων. Ο TF δε διαθέτει εσωτερική πρωτεολυτική ικανότητα αλλά, δεσμεύεται στον παράγοντα πήξης VII ή VIIa οδηγώντας σε ενεργοποίησή του και αύξηση της καταλυτικής του

ικανότητας. Το σύμπλοκο TF/VIIa ενεργοποιεί τον παράγοντα πήξης X, ο οποίος μετατρέπει τον παράγοντα πήξης II σε θρομβίνη (IIa). Στην οδό επαφής, οι αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες, όπως τα φωσφολιπίδια και τα πολυφωσφορικά μόρια, ενεργοποιούν τον παράγοντα πήξης XII, με αποτέλεσμα την πυροδότηση μίας αλληλουχίας γεγονότων που οδηγούν στην ενεργοποίηση του παράγοντα X και στη δημιουργία θρομβίνης^{290,291}. Η θρομβίνη ενεργοποιεί το ινωδογόνο προς τη δημιουργία ινικής και, τα αιμοπετάλια διά των υποδοχέων ενεργοποίησης πρωτεασών (protease activator receptors, PARs) προς τη δημιουργία θρόμβων από συσσωματώματα αιμοπεταλίων-ινικής. Ταυτόχρονα, η θρομβίνη ξεκινά μία θετική ανατροφοδότηση ώστε να διασφαλίσει την τοπική παραγωγή αιμοστατικών συγκεντρώσεων θρομβίνης. Επίσης, ασκεί κυτταρική σηματοδότηση διά των PARs ώστε να ρυθμίσει την ιστική αναδιαμόρφωση και φλεγμονή²⁹².

1.5.1. ΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Ο ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF), γνωστός και ως θρομβοπλαστίνη ή CD142 ή παράγοντας πήξης III) αποτελεί τον κυριότερο *in vivo* ενεργοποιητή του καταρράκτη της πήξης. Είναι μία επιφανειακή διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας 47 kDa και 263 αμινοξέων. Ανήκει στις μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και διαθέτει 3 τμήματα (domains): ένα εξωκυττάριο N-άκρο 219 αμινοξέων, ένα διαμεμβρανικό τμήμα 23 αμινοξέων και ένα βραχύ ενδοκυττάριο C-άκρο 21 αμινοξέων. Το εξωκυττάριο τμήμα του είναι ομόλογο με τους υποδοχείς των ισομορφών IFN τύπου α και β και, επομένως ο TF ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων των κυτοκινών τάξης II^{292,293}.

1.5.1.1. Γονίδιο, έκφραση και βιολογική δράση

Ο TF κωδικοποιείται από ένα γονίδιο 12.4 kb που εδράζεται στο χρωμόσωμα 1. Έχει 6 εξώνια που χωρίζονται με 5 ιντρόνια. Στη θέση του υποκινητή υπάρχουν πολλαπλές θέσεις δέσμευσης, γεγονός που υποδεικνύει την πολυδραστικότητα της έκφρασής του σε διαφορετικά κύτταρα και υπό διαφορετικά ερεθίσματα²⁹⁴. Ο TF δεν παρουσιάζει ομοιόμορφη ιστική κατανομή αφού, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, πνεύμονα και πλακούντα, σε ενδιάμεσα επίπεδα στην καρδιά, νεφρούς, έντερο, μήτρα και όρχεις και, σε χαμηλά επίπεδα στο σπλήνα, θύμο, σκελετικούς μύες και ήπαρ²⁹⁵.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο TF εκφράζεται στον υπενδοθηλιακό χώρο του αγγειακού τοιχώματος, όπως στις λείες μυικές ίνες, ινοβλάστες και περικύτταρα²⁹⁵⁻²⁹⁷. Επίσης, ανιχνεύεται στο πλάσμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μέσα επίπεδα 149-172 pg/ml). Στην κυκλοφορία του αίματος, ο κυκλοφορούν TF, αλλιώς ο προερχόμενος από το αίμα TF (blood-borne TF), εκφράζεται στα μονοκύτταρα, στα κοκκιοκύτταρα και στα μικροσωματίδια που απελευθερώνονται από τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, στην κυκλοφορία μπορεί να απαντηθεί και μία διαλυτή εναλλακτική ισομορφή του, της οποίας η *in vivo* δραστικότητα δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί²⁹⁸. Επομένως, ο TF έρχεται σε επαφή με το αίμα μετά από ενδοθηλιακή βλάβη ή μετά από επαγωγή της έκφρασής του στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή στα λευκά αιμοσφαίρια. Η επαγωγή του παρατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις, εξαιτίας φλεγμονωδών ερεθισμάτων όπως, των TNFα²⁹⁹, IL-1β³⁰⁰, IL-8 και C5a³⁰¹. Στη σήψη, ενεργός TF μπορεί να απελευθερωθεί σε μεγάλες ποσότητες από το ενδοκυττάριο τμήμα των ουδετεροφίλων υπό τη μορφή των NETs, αποδεικνύοντας την ύπαρξη TF προερχόμενου από τα NETs (NET-borne TF)²²⁸.

Ζωικά πρότυπα με ολική απαλειφή του TF πεθαίνουν κατά την εμβρυική ζωή την ημέρα 10.5, εξαιτίας αιμορραγίας του εμβρυικού σάκου³⁰²⁻³⁰⁴ ενώ, η υπερέκφρασή του οδηγεί σε θρομβωτικές καταστάσεις. Εκτός από το ρόλο του στην αιμόσταση και θρόμβωση (εικόνα 1.5.1), ο TF συμμετέχει, διά της ενεργοποίησης των υποδοχέων PAR των κυττάρων, στη φλεγμονή αποτελώντας, έτσι, ένα μοριακό σύνδεσμο μεταξύ πήξης και φλεγμονής³⁰⁵.

1.5.1.2. Ο ιστικός παράγοντας στο νεφρό

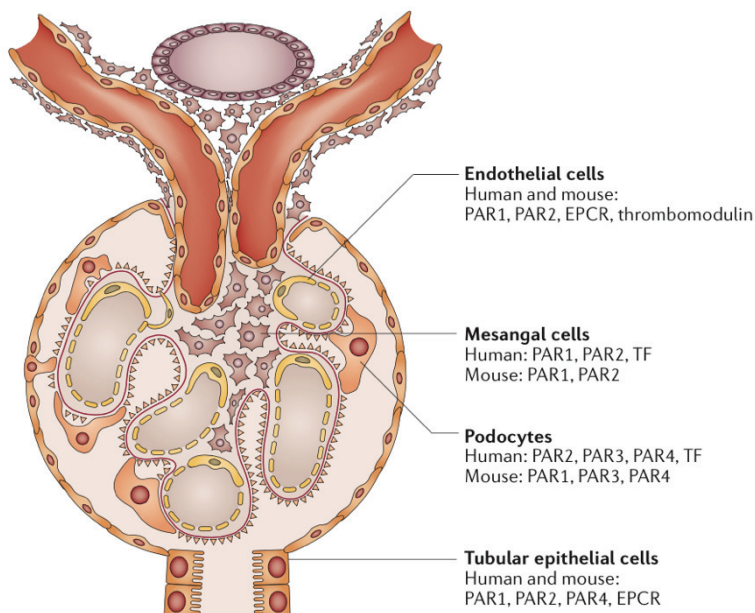
Τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο, η σπειραματική έκφραση του TF παρατηρείται στα ποδοκύτταρα, στα τοιχωματικά επιθηλιακά και στα μεσαγγειακά κύτταρα^{292,305,306}. Ποντίκια που δεν εκφράζουν το κυτταροπλασματικό τμήμα του TF εμφανίζουν σύντηξη των ποδοειδών εκβλαστήσεων και αλβουμινουρία³⁰⁷. Σε οξεία και χρόνια νεφρική νόσο των τρωκτικών και των ανθρώπων, ο TF φαίνεται να υπερεκφράζεται³⁰⁸⁻³¹⁰. Σε πειραματική και ανθρώπινη ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα (rapidly progressive glomerulonephritis, RPGN), η αυξημένη έκφραση του TF συσχετίστηκε με εναπόθεση ινικής στα σπειράματα και νεφρική ανεπάρκεια³¹¹. Η χορήγηση anti-TF σε ζωικά πρότυπα διόρθωσε τις βλάβες χωρίς να τροποποιηθεί η διήθηση του ιστού από τα μακροφάγα³¹². Η αναστολή της θρομβίνης με χορήγηση ρουδίνης διόρθωσε τους μηνοειδείς σχηματισμούς, τη διήθηση του ιστού από μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα και, την αύξηση της κρεατινίνης³¹³. Επιπρόσθετα, σε νεφριδικά ποντίκια με απαλειφή των υποδοχέων PAR1 και PAR2 φαίνεται ότι, οι πρωτεάσες που ενεργοποιούνται καθοδικά του TF συμμετέχουν στην εμφάνιση RPGN ανεξάρτητα από τη δημιουργία ινικής^{313,314}. Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν το ρόλο του νεφρικού TF στην εμφάνιση νεφρικής βλάβης, ο οποίος είναι ανεξάρτητος των θρομβωτικών του λειτουργιών αλλά εξαρτώμενος από τους υποδοχείς PAR.

1.5.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΑΣΗΣ

Οι υποδοχείς ενεργοποίησης πρωτεάσης (Protein Activator Receptors, PARs) ανήκουν στην οικογένεια A των G protein-coupled receptors (GPCRs) που προσομοιάζουν με ροδοψίνη και υπάρχουν

οργανωμένοι μέσα σε σχεδίες λιπιδίων. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί 4 διαφορετικοί τύποι PARs, οι PAR1, PAR2, PAR3 και PAR4³¹⁵.

Η έκφραση των PARs είναι ιδιαίτερα ετερογενής με, περισσότερο από ένα PAR να εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Οι PARs εκφράζονται στα αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, λείες μυικές ίνες, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα, νευρώνες, γλοία και νεφρικά κύτταρα όπως, ποδοκύτταρα, μεσαγγειακά, σπειραματικά ενδοθηλιακά και νεφρικά σωληναριακά κύτταρα (εικόνα 1.5.2)^{292,305}.



Εικόνα 1.5.2: Έκφραση των υποδοχέων των πρωτεϊνών (PARs) του συστήματος πήξης στα νεφρικά κύτταρα

Από: *Nat Rev Nephrol.* 2016;12: 94-109.

Οι PARs λειτουργούν είτε ως πρωτομερή είτε ως ετεροδιμερή. Είναι μοναδικοί υποδοχείς αφού, κουβαλούν το δικό τους συνδέτη, ο οποίος παραμένει κρυμμένος μέχρι την αποκάλυψή του από τη διάσπαση του υποδοχέα^{305,316}. Η διάσπαση του υποδοχέα γίνεται από πρωτεάσες της πήξης και άλλες πρωτεάσες. Ο υποδοχέας PAR1 ενεργοποιείται κυρίως από τη θρομβίνη, τον ενεργοποιημένο παράγοντα πήξης X (FXa), την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (aPC), τον

ενδοθηλιακό υποδοχέα της πρωτεΐνης C (endothelial protein C receptor, EPCR) και την πλασμίνη. Ο υποδοχέας PAR2 ενεργοποιείται από τον TF, το σύμπλεγμα TF-FVIIa και τον FXa. Ο υποδοχέας PAR3 ενεργοποιείται από τη θρομβίνη, FXa και aPC και, ο PAR4 ενεργοποιείται από τη θρομβίνη, FXa και την πλασμίνη³¹⁶. Επιπρόσθετα της πηκτικής της δράσης, η σηματοδότηση των PAR συσχετίζεται με ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της οδού mitogen-activated protein kinase (MAPK), της οδού της οικογένειας Src που επάγει την PI3K/AKT και, της οδού JAK2/STAT5, που όλες μαζί συμμετέχουν σε πολλαπλές διεργασίες των κυττάρων, που κυμαίνονται από τη μίτωση μέχρι τη μετανάστευση και την κυτταρική επιβίωση^{317,318}. Οι PARs αποτελούν τους υποδοχείς που δίνουν τη δυνατότητα στον TF να αντιπροσωπεύει το μοριακό σύνδεσμο μεταξύ πήξης και φλεγμονής.

Έμβρυα με απαλειφή του PAR1 πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή μέρα 10.5 με φαινότυπο που ομοιάζει με αυτό των εμβρύων με απαλειφή TF ενώ, η ανεπάρκεια των PAR2, PAR3 και PAR4 δε φαίνεται να επηρεάζει την εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά, τις αναμενόμενες απαντήσεις των αιμοπεταλίων στη θρομβίνη^{319,320}.

1.5.3. ΘΡΟΜΒΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ ΣΕΛ

Είναι γνωστό ότι, το σύστημα της πήξης του αίματος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη σπειραματική νόσο των ασθενών με LN. Σπειραματικοί θρόμβοι ανιχνεύονται συχνά σε νεφρικές βλάβες και³²¹, τόσο αυτοί όσο και οι υπενδοθηλιακές εναποθέσεις προβλέπουν την ανάπτυξη σπειραματικής σκλήρυνσης. Η προδιάθεση των ασθενών με ΣΕΛ στη θρομβογένεση δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί και, θεωρείται ότι συσχετίζεται με τοπικές αλλαγές της έκφρασης προπηκτικών ή ινωδολυτικών γονιδίων.

Το 1997, οι Yamamoto K και Loskutoff DJ³²² διαπίστωσαν αύξηση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και του TF στους νεφρούς των ζωικών προτύπων αυτοανοσίας MRL *lpr/lpr*, η οποία συσχετίστηκε με εξέλιξη της LN και, αυτόματη σπειραματική και περισωληναριακή εναπόθεση ινικής στο νεφρό, προτείνοντας ότι η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών επάγει τη δημιουργία μικροθρόμβων³²².

1.5.4. ΘΡΟΜΒΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΝΕΤΩΣΗ

Είναι αποδεδειγμένο ότι, τα NETs αποτελούν συστατικό των θρόμβων, συμμετέχουν ως ικρύνματα παγίδευσης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων και ερυθροκυττάρων και, σταθεροποιούν το θρόμβο αφού δεσμεύουν πρωτεΐνες όπως ινωδογόνο, ινωδογονεκτίνη και von Willebrand factor (vWF). Σε ζωικά πρότυπα,

η χορήγηση ουσιών που αναστέλλουν τη NETωση, όπως η χορήγηση DNase ή ουσιών που καταστέλλουν την PAD4, συσχετίστηκε με μείωση της θρόμβωσης^{288,323-326}.

Ασθενείς με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων νουκλεοσωμάτων και ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων³²⁷. Σε δείγματα φλεβικής θρομβοεμβολής διαπιστώθηκαν NETs μέσα στους οργανωμένους θρόμβους³²⁸. Η πειραματική στένωση της λαγόνιας φλέβας σε μπαμπούνους³²³ ή της κάτω κοίλης φλέβας σε τρωκτικά^{324,329} οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του DNA στο πλάσμα και στη δημιουργία θρόμβων που περιείχαν NETs. Επίσης, η έγχυση ιστονών αύξησε το μέγεθος των θρόμβων και τα επίπεδα του vWF στο πλάσμα, οδηγώντας σε ενεργοποίηση και κινητοποίηση αιμοπεταλίων. Όπως και η χορήγηση DNase, η αφαίρεση ουδετεροφίλων οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των θρόμβων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε ζωικά πρότυπα με έλλειψη PAD4, στα οποία η θρόμβωση μπόρεσε να διασωθεί μετά από έγχυση ουδετεροφίλων^{324,326,329}. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν τον εξαρτώμενο από την PAD4 ρόλο των NETs στη θρόμβωση.

Σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, τα επίπεδα του κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA και ο αριθμός των NETωτικών δεικτών μπορούσαν να προβλέψουν τη σοβαρότητα του νοσήματος³³⁰. Σε ζωικά πρότυπα αθηροσκλήρυνσης, τα NETs εντοπίστηκαν μέσα σε πλάκες καρωτίδων ενώ, η αναστολή της PAD4 με Cl-amidine ανέστειλε τη δημιουργία των NETs και μείωσε την αθηροσκληρυντική επιφάνεια³²⁵. Σε στεφανιαίους θρόμβους, τα NETs που διαπιστώθηκαν ήταν επενδυμένα με IL-17A/F³³¹ ή δραστικό TF, ο οποίος οδηγούσε σε παραγωγή θρομβίνης και σε ενεργοποίηση αιμοπεταλίων *ex vivo*³³², υποδεικνύοντας τη σημασία των NETs και των συστατικών τους στην παθογένεια της αρτηριακής θρόμβωσης.

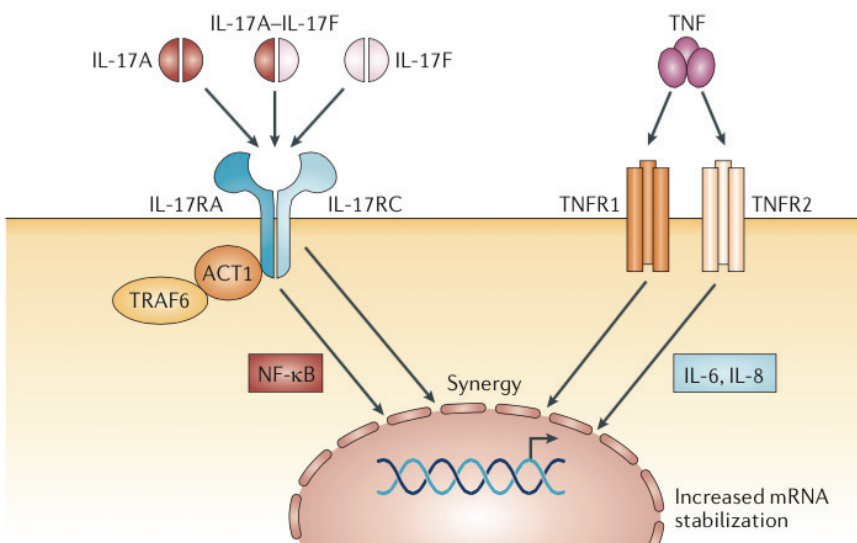
1.6. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-17

Η ιντερλευκίνη-17 (interleukin-17, IL-17) είναι μία προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη³³³⁻³³⁵ που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι εξωκυττάρων βακτηρίων και μυκήτων, επάγοντας φλεγμονώδεις αντιδράσεις από ουδετερόφιλα. Η διαταραχή της παραγωγής IL-17 οδηγεί σε υπέρμετρη έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και σε χρόνια φλεγμονή, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ιστικής βλάβης και αυτοάνοσων νοσημάτων^{336,337}. Πρόσφατα, το FDA ενέκρινε τη χορήγηση μονοκλωνικών anti-IL-17 αντισωμάτων για τη θεραπεία της ψωριασικής αρθρίτιδας και, σήμερα, βιολογικά μόρια τα οποία άμεσα ή έμμεσα αναστέλλουν την οδό της IL-17 μελετώνται σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα^{338,339}.

1.6.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-17 ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-17

Η IL-17, που πλέον ονομάζεται IL-17A, αναγνωρίστηκε το 1993 ως προϊόν ενός κυταροτοξικού υβριδισμού των T λεμφοκυττάρων τρωκτικού, παίρνοντας, έτσι, το όνομα «κυταροτοξικό αντιγόνο-8 συσχετιζόμενο με τα T λεμφοκύτταρα» (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 8, CTLA8)³³⁵. Είναι μία διμερής εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 35kDa και 155 αμινοξέων και, είναι το πρωτότυπο μόριο της οικογένειας IL-17³⁴⁰.

Η οικογένεια IL-17 αποτελείται από 6 μέλη, τις IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (ονομάζεται και IL-25) και την IL-17F, τα οποία εμφανίζουν ελάχιστη ομολογία με άλλες οικογένειες κυτοκινών³⁴¹⁻³⁴⁴. Η IL-17A και η IL-17F είναι τα μέλη με την υψηλότερη ομολογία και έχουν παρόμοιες προ-φλεγμονώδεις δράσεις. Το μόριο της IL-17 αποτελείται από μονομερή IL-17A ή IL-17F τα οποία συνδέονται μεταξύ τους ώστε να δημιουργήσουν είτε ομοδιμερή IL-17A ή IL-17F, είτε ετεροδιμερή IL-17A/IL-17F. Η έναρξη της σηματοδότησης επιτυγχάνεται όταν ο διμερής συνδέτης προσδένεται στο σύμπλεγμα υποδοχέα της IL-17^{337,340,345-347}.



Εικόνα 1.6.1: Δομή της IL-17 και αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της IL-17R. Τα μονομερή IL-17A και IL-17F σχηματίζουν είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή, τα οποία δεσμεύονται στο σύμπλεγμα IL-17R που αποτελείται από αλυσίδες IL-17RA και IL-17RC.

Από: *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:763-76

Οι υποδοχείς της IL-17 (IL-17 receptors, IL-17-R) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I, που ανήκουν σε μία οικογένεια υποδοχέων κυτοκινών που αποτελείται από 5 μέλη, τους IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD και IL-17RE. Οι IL-17-R εκφράζονται σε πολλούς ιστούς και πολλούς κυτταρικούς τύπους με, τον IL-17RA να εκφράζεται κυρίως στον αιμοποιητικό ιστό και, τον IL-17RC σε μη αιμοποιητικά κύτταρα. Οι λειτουργικοί υποδοχείς υπάρχουν ως συμπλέγματα διμερών. Ο IL-17RA αποτελεί την κοινή αλυσίδα όλων των συνδετών, με εξαίρεση τον IL-17B³⁴⁸⁻³⁵¹.

Η δέσμευση του IL-17A- ή του IL-17F- ομοδιμερούς ή του IL-17A/IL-17F ετεροδιμερούς στο σύμπλεγμα του υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης πρόσδεσης ACT³⁵², του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (nuclear factor-κΒ, NF-κΒ)^{353,354} και του συσχετιζόμενου με τον TNF παράγοντα 6 (tumor necrosis factor-associated factor 6, TRAF6)³⁵⁵. Αυτά οδηγούν στη μεταγραφή της IL-6^{348,354,356-358} μίας κυτοκίνης απαραίτητης στη φλεγμονή και την άμυνα έναντι ξένων εισβολέων και, της IL-8, μίας χυμοκίνης που δεσμεύεται στον υποδοχέα CXCR2 (CXCR2 chemokine receptor, CXCR2) που επάγει την κινητοποίηση των ουδετεροφίλων στους ιστούς³⁵⁹⁻³⁶² (Εικόνα 1.6.1). Η IL-17 οδηγεί σε έκκριση κοκκιοποιητικών παραγόντων από τα επιθήλια όπως, του παράγοντα ενεργοποίησης των αποικιών των κοκκιοκυττάρων (granulocyte colony

stimulating factor, G-CSF) και του παράγοντα ενεργοποίησης των αποικιών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF). Επίσης, αυξάνει την έκφραση υποδοχέων GM-CSF³⁵⁹⁻³⁶² και αντιμικροβιακών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως φυσικά αντιβιοτικά (όπως της β-defensin και των πρωτεϊνών S100)^{363,364}. Δρώντας στα κύτταρα του αρθρικού υμένα των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή σε καλλιεργημένους ινοβλάστες, η IL-17 οδηγεί στην παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας (metalloproteinase, MMP)^{333,334,365}. Σε οστεοβλάστες, η IL-17 οδηγεί σε υπερέκφραση του ενεργοποιητή του υποδοχέα του προσδέτη NF-κΒ (receptor activator of NF-κΒ ligand, RANKL)³⁶⁶. Η ενεργοποίηση της οδού υπογραμμίζει το σημαντικό ρόλο της IL-17 ως συνδετικό μόριο μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας.

1.6.2. ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-17 ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-17

Κυριότερη πηγή IL-17 είναι ένας υπότυπος των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων, που ονομάζονται Τ βοηθητικά 17 λεμφοκύτταρα (T helper 17 cells, T_H17). Υπάρχουν 3 διαφορετικοί υπότυποι των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων, οι T_H1, T_H2 και T_H17, που προέρχονται από τα ανώριμα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα σε απάντηση σε κυτοκίνες των APCs^{348,367-370}. Η ανάπτυξη των T_H17 κυττάρων ενεργοποιείται από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως τις IL-11, IL-6 και τον transforming growth factor-β (TGF-β), που παράγονται σε απάντηση σε βακτήρια και μύκητες³⁷¹⁻³⁷⁴. Συνδυασμοί αυτών των κυτοκινών ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες retinoid-related orphan receptor-α (ROR-α) και ROR-γτ (γνωστός ως RORC στον άνθρωπο), με αποτέλεσμα την έκφραση της IL-17 και του υποδοχέα της IL-23 στα T_H17 κύτταρα. Η IL-23, που παράγεται από τα APCs, αυξάνει την παραγωγή IL-17 και σταθεροποιεί τα T_H17 κύτταρα. Ο TGF-β έμμεσα επάγει τις απαντήσεις των T_H17, καταστέλοντας τα κύτταρα T_H1 και T_H2 cells και, η IL-21, που παράγεται από τα κύτταρα T_H17, μεγιστοποιεί όλες τις απαντήσεις³⁷⁵⁻³⁸⁰.

Επειδή, η οδός της IL-17 επάγεται μέσα σε ώρες μετά την ενεργοποίηση των PRRs ή την επιθηλιακή βλάβη, γίνεται αντιληπτό ότι και άλλα κύτταρα, επιπρόσθετα των T_H17 συμμετέχουν στην παραγωγή της³⁸¹⁻³⁸³. Άλλες κυτταρικές πηγές IL-17, κυρίως κατά τα αρχικά στάδια απάντησης της φυσικής ανοσίας, είναι τα γδ Τ κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK cells), τα πανταχού παρόντα NK κύτταρα (invariant natural killer T cells, iNKT), τα κύτταρα που προσομοιάζουν με αυτά που διεγείρουν το λεμφικό ιστό (lymphoid-tissue inducer-like cells, LTi-like), τα κύτταρα Paneth, τα μαστοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα³⁸⁴.

1.6.2.1. Ουδετερόφιλα

Η πρώτη απόδειξη ότι τα ουδετερόφιλα παράγουν IL-17 ήρθε από τους Ferretti S. et al.³⁸⁵ το 2003, όταν έδειξαν σε ζωικό πρότυπο πνευμονικής φλεγμονής από λιποπολυσακχαρίδη (LPS) ότι, η ενδορινική θεραπεία με εξουδετερωτικό anti-IL-17 αντίσωμα ανέστειλε την τελική φάση ουδετεροφιλίας, η οποία συσχετιζόταν με αυξημένα επίπεδα IL-17. Ποντίκια SCID με έλλειψη Τ και Β λεμφοκυττάρων επίσης ανέπτυξαν ουδετεροφιλική απάντηση μετά από ενεργοποίηση με LPS, η οποία συσχετιζόταν με παραγωγή IL-17 και κινητοποίηση ουδετεροφίλων στους αεραγωγούς³⁸⁵. Η παραγωγή IL-17 επιβεβαιώθηκε σε αρκετές *in vitro* μελέτες, σε μελέτες σε ζωικά πρότυπα και σε ανθρώπινες μελέτες.

Οι Hoshino A. et al.³⁸⁵ έδειξαν ότι, *in vitro* τα περιτοναϊκά ουδετερόφιλα τρωκτικών παράγουν IL-17Α και IL-23 σε απάντηση στην MPO-ANCA ενεργοποίησης διά της κλασσικής οδού του συμπληρώματος³⁸⁵. *In vitro*, περιτοναϊκά ουδετερόφιλα που ενεργοποιήθηκαν με *Aspergillus fumigatus* έδειξαν ότι εκφράζουν IL-17Α ενδοκυττάρια. Επίσης, κατά την λοίμωξη με μύκητες, η παραγωγή IL-17Α στους πνεύμονες φάνηκε ότι επάγεται από τα ουδετερόφιλα με ένα τρόπο που εξαρτάται από την Dectin-1 και την IL-23³⁸⁶. Κατά τη διερεύνηση της συσχέτισης της έκφρασης του TLR9 με τη παραγωγή IL-17 από τα ουδετερόφιλα κατά τη σηπτική περιτονίτιδα, οι Ren Y. et al.³⁸⁷ διαπίστωσαν ότι, τόσο οι TLR9 όσο και η IL-17 εκφράζονταν στα ουδετερόφιλα που διηθούσαν την περιτοναϊκή κοιλότητα σε ποντίκια που μολύνθηκαν με *Escherichia coli*³⁸⁷.

Για να διερευνηθεί η συμμετοχή των IL-23/IL-17 στη φυσική ανοσία και η αλληλεπίδραση της IL-17Α και της IFN-γ στη νεφρική βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση (kidney ischemia-reperfusion injury, IRI), οι Li L. et al.³⁸⁸ μελέτησαν ζωικά πρότυπα IRI και διαπίστωσαν ότι οι οδοί τόσο της IL-12/IFN-γ όσο και της IL-23/IL-17 είναι ενεργοποιημένες. Επίσης, διαπίστωσαν ότι, τα ουδετερόφιλα που παράγουν IL-17Α δρουν ανοδικά της οδού IL-12/IFN-γ και είναι απαραίτητα για την παραγωγή IFN-γ³⁸⁸. Στο ζωικό πρότυπο αρθρίτιδας K/BxN, παρατηρήθηκε έξαρση της αρθρίτιδας μετά από έγχυση φυσιολογικών ουδετεροφίλων αλλά όχι μετά από έγχυση ουδετεροφίλων με απαλειφή της IL-17. Επίσης, η *in vitro* ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων με

ανοσοσυμπλέγματα οδήγησε σε παραγωγή IL-17³⁸⁹. Η προστασία έναντι λοιμώξεων κερατοειδούς από *Aspergillus fumigatus* και *Fusarium oxysporum* σε ποντίκια φάνηκε να συσχετίζεται με προσωρινή κινητοποίηση ουδετεροφίλων που παράγουν IL-17³⁹⁰. Πρόσφατα, οι Cai S. et al³⁹¹ έδειξαν ότι, τα ουδετερόφιλα παράγουν ομοδιμερή IL-17A σε πνεύμονες τρωκτικών μετά από λοίμωξη με *Legionella pneumophila*, η οποία οδήγησε σε παρακρινική αύξηση της IFN-γ. Ανθρώπινα ουδετερόφιλα που διεγέρθηκαν με *Legionella pneumophila* αύξησαν την έκφραση της IL-17A, δείχνοντας την εμπλοκή τους στην αντιβακτηριακή άμυνα³⁹¹.

Στον άνθρωπο, η παραγωγή IL-17 από τα ουδετερόφιλα διαπιστώθηκε σε ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα (ankylosing spondylarthritis, AS), ρευματοειδή αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA), ψωριασική αρθρίτιδα (psoriatic arthritis, PsA) και αλλεργικό άσθμα. Στις αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης, η συχνότητα των κυττάρων που εκκρίνουν IL-17 ήταν στατιστικά σημαντικότερη σε ασθενείς με AS παρά σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα. Ο ανοσοφθορισμός έδειξε ότι, τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα ήταν θετικά στη μυελοπεροξειδάση και ότι ήταν CD15⁺ ουδετερόφιλα³⁹². Επίσης, στο φλεγμονώδη υμένα ασθενών με RA ή PsA η έκφραση της IL-17A ήταν εντοπισμένη στα CD15⁺ ουδετερόφιλα³⁹³. Σε ασθενείς με αλλεργικό άσθμα, τα IL17⁺CD177⁺ ουδετερόφιλα ήταν αυξημένα κυρίως σε ασθενείς με αλλεργία σε μύκητες, δείχνοντας ότι η απελευθέρωση της IL-17 συμβάλλει στην εμφάνιση του νοσήματος³⁹⁴.

Συμπερασματικά, οι μελέτες αυτές υπογραμμίζουν το σημαντικό ρόλο των ουδετεροφίλων στη σηματοδότηση της οδού της IL-17 τόσο κατά την άμυνα έναντι ξένων εισβολέων όσο και στην εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων.

1.6.2.2. Εξωκυττάρειες παγίδες ουδετεροφίλων (NETs)

Σε ψωριασικές δερματικές βλάβες, οι Lin AM. et al διαπίστωσαν ουδετερόφιλα που εκφράζουν IL-17, την οποία απελευθερώνουν στο δέρμα με τα NETs³⁹⁵. NETs διακοσμημένα με IL-17A- και IL-17F ανευρέθηκαν επίσης σε θρόμβους οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου³³¹. Στο ΣΕΛ, τα κοκκιοκύτταρα χαμηλής πυκνότητας (LDGs), που αποτελούν ένα παθολογικό υπότυπο ουδετεροφίλων της στιβάδας των PBMCs, έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν NETs με IL-17¹⁷³. Επίσης, σε ασθενείς με RA διαπιστώθηκε ότι, η IL-17A αποτελούσε ερέθισμα για απελευθέρωση NETs³⁹⁶. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι, τα συσσωματώματα ουδετεροφίλων των παγκρεατικών πόρων προκαλούσαν παγκρεατίτιδα μετά από μεταφορά IL-17A με τα NETs³⁹⁷. Προηγούμενη μελέτη των Chrysanthopoulou A. et al³⁹⁸ έδειξε ότι, η IL-17 που εκφράζεται στα NETs προκαλεί στους διαφοροποιημένους πνευμονικούς ινοβλάστες ένα ινωτικό φαινότυπο, εξαιτίας υπερέκφρασης αυξητικών παραγόντων του συνδετικού ιστού και παραγωγής κολλαγόνου. Επίσης, σε τομές πνευμόνων από ασθενείς με μη ειδική διάμεση πνευμονία και σε τομές από δέρμα ινωτικών βλαβών διαπιστώθηκαν NETs που είναι διακοσμημένα με IL-17³⁹⁸. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, τα ουδετερόφιλα μπορούν να επάγουν τη χρόνια φλεγμονή και την ιστική βλάβη διά της απελευθέρωσης διακοσμημένων με IL-17 NETs. Επίσης, δείχνουν ότι, η NETωση μπορεί να αποτελεί ένα νέο θεραπευτικό στόχο στα φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα.

1.6.3. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-17 ΚΑΙ ΣΕΛ

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι, η IL-17 είναι αυξημένη στον ορό ζωικών προτύπων λύκου και σε ασθενείς με ΣΕΛ, LN ή νευροψυχιατρική εκδήλωσή του. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι, τα επίπεδα της IL-17 συσχετίζονται με την ενεργότητα του νοσήματος όμως, δε διαπίστωσαν συσχέτιση με ιστική προσβολή³⁹⁹⁻⁴⁰⁶. Η IL-17 είναι υψηλότερη σε ασθενείς με ενεργό LN τάξης III, IV και V που εμμένει μετά την ανοσοκατασταλτική αγωγή δείχνοντας ότι, τα αρχικά επίπεδα IL-17 πριν τη έναρξη θεραπείας μπορούν να προβλέψουν την κακή έκβαση του νοσήματος. Επίσης, σε σοβαρή LN διαπιστώθηκαν υψηλά επίπεδα IL-17 στα ούρα των ασθενών⁴⁰⁷.

Τα κυκλοφορούντα T_H17 κύτταρα, που αποτελούν την κυριότερη πηγή IL-17, ήταν περισσότερα σε ασθενείς με ΣΕΛ και LN και, η συχνότητά τους συσχετίστηκε με τους δείκτες SLEDAI, νεφρικού SLEDAI και ιστολογικής ενεργότητας⁴⁰⁸. Τα διπλά αρνητικά (CD4⁻CD8⁻) T λεμφοκύτταρα ήταν αυξημένα στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΕΛ, τα οποία διαπιστώθηκε ότι αποτελούσαν πηγή IL-17. Τα διπλά αρνητικά (CD4⁻CD8⁻) T λεμφοκύτταρα των MRL/lpr ζωικών προτύπων λύκου παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα IL-17. Με την εξέλιξη του νοσήματος, η έκφραση της IL-17 και των υποδοχέων της IL-23 των λεμφοκυττάρων ήταν αυξημένη. Τα IL-17⁺ T λεμφοκύτταρα ήταν αυξημένα σε νεφρικές τομές ασθενών με LN και, υψηλότερα επίπεδα IL-17 και IL-

23 παρατηρήθηκαν σε νεφρικές τομές ασθενών με LN τάξης IV⁴⁰⁹. Ποντίκια με έλλειψη IL-17 ή IL-17F δεν εμφάνισαν λύκο μετά από pristane^{410,411}. Επίσης, ποντίκια με έλλειψη IL-17RA εμφάνισαν προστασία έναντι της σπειραματονεφρίτιδας με μηνοειδείς σχηματισμούς που εξαρτάται από την IFN τύπου I ενώ, η διήθηση του ιστού με ενεργοποιημένα μακροφάγα ήταν μειωμένη⁴¹². Ποντίκια MRL/lpr mice με έλλειψη του υποδοχέα της χυμοκίνης CXCR3, που είναι απαραίτητη στη συσσώρευση των T_H1 κυττάρων στον ιστό που φλεγμαίνει, παρουσίασαν μειωμένη διήθηση T_H1 κυττάρων και κυττάρων που παράγουν IL-17 στο νεφρικό ιστό⁴¹³. Για να διερευνηθεί ο ρόλος της IL-17 στην καταστροφική νεφρίτιδα λύκου, οι Pisitkin P. et al⁴¹⁴ μελέτησαν το ζωικό πρότυπο λύκου που παρουσιάζει έλλειψη του FcγR2b και, διαπίστωσαν ότι, η απώλεια CIKS που αναστέλλει τη σηματοδότηση όλων των IL-17 και, σε λιγότερο βαθμό η απώλεια IL-17A βελτίωσε την επιβίωση των ζώων και παρείχε προστασία έναντι της εμφάνισης σπειραματονεφρίτιδας, εξαιτίας εξάλειψης της κινητοποίησης των φλεγμονωδών κυττάρων και, κυρίως των ουδετεροφίλων. Στους νεφρούς αυτών των ζωικών προτύπων διαπιστώθηκαν NETs, τα οποία απουσίαζαν στην έλλειψη των κυτοκινών της σηματοδότησης της IL-17⁴¹⁴. Οι μελέτες αυτές δείχνουν τη σημασία της IL-17 και του άξονα IL23/T_H17 στην παθογένεια του ΣΕΛ και της ενδονεφρικής προσβολής και, αναγνωρίζουν το ρόλο που διαδραματίζουν τα NETs στην παθογένεια της καταστροφικής LN, η οποία μπορεί να προκαλείται από την απελευθέρωση της IL-17.

Για να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των CNVs των γονιδίων των T_H17 κυττάρων και του κινδύνου εμφάνισης ΣΕΛ, οι Yu B et al.⁴¹⁵ ανέλυσαν το γενωμικό DNA και RNA 938 ασθενών με ΣΕΛ και 1017 υγιών ατόμων και διαπίστωσαν ότι, ο γονότυπος και οι συχνότητες αλληλίων των αντιγράφων των IL-17F, IL-21 και IL-22 ήταν στατιστικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΣΕΛ δείχνοντας ότι, οι CNVs των IL-17F, IL-21 και IL-22 συσχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης ΣΕΛ. Επιπρόσθετα, ο πολυμορφισμός rs2275913 του γονιδίου της IL-17A και, οι rs763780 και rs2397084 του γονιδίου της IL-17F αναγνωρίστηκαν ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου του Νεανικού ΣΕΛ και της νεφρίτιδας του⁴¹⁵.

Πρόσφατες μελέτες αναγνώρισαν ένα εξειδικευμένο υπότυπο των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων, το Treg17 κύτταρο, που ρυθμίζει αρνητικά τις παθογενετικές απαντήσεις των T_H17. Η απουσία των Treg17 κυττάρων συσχετίστηκε με αυξημένη θνητότητα και προσβολή οργάνων στο λύκο. Στο ζωικό πρότυπο λύκου που επάγεται από την pristane, η κατάργηση της ενεργοποίησης των RORγt στα RORγt⁺Foxp3⁺ Treg17 κύτταρα κατέστειλε την αγγειίτιδα πνευμόνων και τη νεφρίτιδα λύκου. Ποντίκια με εκλεκτική ανεπάρκεια των RORγt στα Foxp3⁺ Tregs, που είναι ο κυριότερος ρυθμιστής των T_H17, παρουσίασαν προστασία έναντι εμφάνισης πνευμονικής αγγειίτιδας και μικρότερη ιστολογική νεφρική βλάβη, δείχνοντας ότι η αναστολή του RORγt θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο θεραπευτικό στόχο στο ΣΕΛ.

1.6.4. Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-17 ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ

Στην παρούσα φάση, δεν υπάρχουν μελέτες στο ΣΕΛ που να αξιολογούν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της αναστολής της σηματοδότησης IL-17/T_H17 και του άξονα IL-23/T_H17. Η οδός της IL-17 μπορεί να στοχευθεί χρησιμοποιώντας (α) μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μελών της οικογένειας IL-17 (β) μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του συμπλέγματος IL-17R (γ) αναστολείς της διαφοροποίησης των T_H17 κυττάρων και (δ) αναστολείς του σήματος καθοδικά του IL-17R. Σύμφωνα με την υπηρεσία Κλινικών Μελετών (*ClinicalTrials.gov*) του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (U.S National Institute of Health) η στόχευση της IL-17 μελετήθηκε και εξακολουθεί να μελετάται σε αρκετά νοσήματα, κυρίως στην PsA και τη ψωρίαση και, σε άλλα όπως RA, AS, νόσος Crohn's disease, ρευματική πολυμυαλγία, πολλαπλή σκλήρυνση και ουδετεροφιλικό άσθμα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, στη νόσο του Crohn's αρκετές κλινικές μελέτες τερματίστηκαν πριν την ολοκλήρωσή τους. Κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια της αναστολής της οδού της IL-17 είναι ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης λοιμώξεων από εξωκυττάρια βακτήρια και μύκητες εξαιτίας ουδετεροπενίας. Επειδή η οδός του IL-17R αλληλεπιδρά τόσο με τις οδούς της IL-1R και των TLR, θα πρέπει να τονιστεί ότι, απαιτείται καλύτερη κατανόηση των λειτουργιών των T_H17 λεμφοκυττάρων και της σηματοδότησης της IL-17 ώστε να εξακριβωθούν τα γεγονότα που αποδίδονται αποκλειστικά στη δράση της IL-17. Περαιτέρω μελέτες (βασικής έρευνας και κλινικές) απαιτούνται ώστε να αναγνωριστεί η βιολογία της IL-17 στο ΣΕΛ και να αναγνωριστεί η ομάδα ασθενών των οποίων η βλάβη τελικών οργάνων αποδίδεται στη δράση της IL-17.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Παρά τις εντατικές ερευνητικές προσπάθειες, η παθογένεια του ΣΕΛ παραμένει αδιευκρίνιστη και, θεωρείται ότι προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Σκοπός της μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών του ΣΕΛ μέσω συγκριτικής μελέτης μεταγραφώματος των ζωικών προτύπων λύκου NZB/W-F1 και των υγιών προτύπων C57BL/6, χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης RNA νέας γενεάς (RNA-sequencing), ώστε να αλληλουχηθεί και να ποσοτικοποιηθεί το σύνολο των μεταγράφων, κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών, ενός περιφερικού λεμφικού οργάνου (σπλήνα) και δύο τελικών οργάνων-στόχων (εγκέφαλος και νεφροί) του ΣΕΛ σε διαφορετικά στάδια της φυσικής εξέλιξης του νοσήματος. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων μεταγραφώματος που χαρακτηρίζει τη γενετική ευπάθεια του ΣΕΛ, την οργανοειδικότητά του στο χρόνο και την αναπτυξιακή του βιολογία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πρωτόκολλο της μελέτης ήταν σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Οι διαδικασίες έλαβαν έγκριση από την επιτροπή Βιοηθικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.1. ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

Όλες οι διεργασίες έγιναν στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.1.1. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΜΥΩΝ NEW ZEALAND BLACK ΚΑΙ NEW ZEALAND WHITE

Θηλυκοί μύες New Zealand Black (NZB) διασταυρώθηκαν με αρσενικούς μύες New Zealand White (NZW) ώστε να αναπαραχθούν υβρίδια NZB/W-F1, τα οποία αποτελούν το ζωικό πρότυπο ΣΕΛ.

3.1.2. ΥΒΡΙΔΙΑ ΜΥΩΝ NZB/W-F1

Θηλυκά υβρίδια NZB/W-F1 (n=3) θυσιάστηκαν στο στάδιο της προ-εφηβίας (ηλικίας 1 μήνα) κατά το οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες του φύλου, στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας (ηλικίας 3 μηνών) κατά το οποίο απουσιάζουν τα αυτοαντισώματα και, στο στάδιο της νεφρίτιδας κατά το οποίο παρατηρείται πρωτεϊνουρία >300 mg/dl για 3 συνεχόμενες ημέρες (ηλικίας 6-9 μηνών). Για να μελετηθεί περιφερικό λεμφικό όργανο, αφαιρέθηκε ο σπλήνας των ζώων και, για να μελετηθούν τελικά όργανα-στόχοι του νοσήματος αφαιρέθηκαν νεφροί και εγκέφαλος. Τα όργανα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

3.1.3. C57BL/6 ΜΥΕΣ

Θηλυκοί C57BL/6 μύες (n=3) θυσιάστηκαν στις αντίστοιχες ηλικίες των υβριδίων NZB/W-F1 και, ελήφθησαν τα αντίστοιχα όργανα για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Τα όργανα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

3.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Στη μελέτη εντάχθηκαν n=21 ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ και n=11 ασθενείς με ΣΕΛ σε ύφεση. Αντίστοιχης ηλικίας υγιείς εθελοντές (n=15) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Επίσης, μελετήθηκαν βιοψίες νεφρού (n=10) από ασθενείς με νεφρίτιδα λύκου τάξης III και IV. Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα για απομόνωση ορού, πλάσματος και ουδετεροφίλων. Η διάγνωση του ΣΕΛ έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια ταξινόμησης της ACR 1997 και τα κριτήρια SLICC 2012. Η διάγνωση της νεφρίτιδας λύκου έγινε σύμφωνα με την ταξινόμηση της ISN/RPS 2003^{5,8,9}. Στην ομάδα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εντάχθηκαν ασθενείς που πληρούσαν ένα από τα δύο κριτήρια: (1) Σοβαρό νόσημα που ορίζεται ως νέα εμφάνιση ή έξαρση ή επιμονή έξαρσης με (α) ενεργό νεφρίτιδα ή (β) ενεργό φλεγμονώδη νόσο του νευρικού ή (γ) μυοσίτιδα ή μυοκαρδίτιδα λύκου ή (δ) πνευμονίτιδα λύκου ή (ε) μέτρια ή σοβαρή ορογονίτιδα λύκου ή (στ) μέτρια ή σοβαρή κυτταροπενία ή (ζ) δερματική προσβολή >9% της επιφάνειας σώματος (2) κλινικός δείκτης SLEDAI-2K >8. Στην ομάδα των ασθενών με ανενεργό ΣΕΛ εντάχθηκαν οι ασθενείς που πληρούσαν και τα 3 κριτήρια (1) Προηγούμενο ιστορικό ενεργού νοσήματος που στην εξέταση ήταν κλινικά σε ύφεση, (2) κλινικό SLEDAI-2K <2 και (3) (α) σταθερή δόση θεραπείας συντήρησης ή (β) λήψη pos prednisone <7.5 mg/day ή (γ) διάρκεια ύφεσης τουλάχιστον 6 μήνες. Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν η λήψη αντιπηκτικών, εγκυμοσύνη, ενεργός λοίμωξη και κακοήθεια.

3.3. ΚΥΤΤΑΡΑ

3.3.1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ

Απομονώθηκαν ανθρώπινα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (polymorphonuclear cells, PMNs) από περιφερικό αίμα ασθενών που συλλέχθηκε σε φιαλίδια με K₃EDTA. Ο διαχωρισμός των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση διπλής κλίσης πυκνότητας ως εξής: συνολική ποσότητα 3-6 ml από περιφερικό αίμα αραιωμένο σε ίσο όγκο φυσιολογικού ορού τοποθετήθηκαν σε 3 ml Ficoll-histopaque-1009 (Sigma-Aldrich), τα οποία ήταν τοποθετημένα σε 3 ml Ficoll-histopaque-1119 (Sigma-Aldrich). Η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε 500g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η στιβάδα των ουδετεροφίλων απομονώθηκε, πλύθηκε με phosphate buffer saline (PBS) σε συνολικό όγκο 10 ml και, φυγοκεντρήθηκε σε 300g για 10 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο PBS και συλλέχθηκαν τα ουδετερόφιλα. Η καθαρότητα (>98%) και ζωτικότητα τους (>95%) αξιολογήθηκε με τις χρώσεις Giemsa και Trypan Blue, αντίστοιχα. Τα ουδετερόφιλα επαναιωρήθηκαν σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Aldrich) ώστε ο τελικός διορθωμένος αριθμός να είναι σε 4×10^6 κύτταρα/ml²²⁸.

3.3.2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα αθανатоποιημένα ανθρώπινα σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα (immortalized human glomerular epithelial cells, T-SV40 HGECS) που χορηγήθηκαν ευγενικά από τις Δρ. Γαρυφαλιά Δροσοπούλου και Δρ. Έφη Τσιλιμπάρη. Τα T-SV40 HGECS αποτελούν ανθρώπινη καλλιέργεια αθανатоποιημένων σπλαχνικών σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν από νεφρό ηλικίας ενός μήνα και διαμολύνθηκαν με ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τα κλωνοποιημένα ογκογονίδια T-SV40 και H-ras. Τα κύτταρα διατηρούν το φαινότυπο και τη μορφολογία των αρχικών σπλαχνικών σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (ποδοκυττάρων). Εκφράζουν τους δείκτες νεφρίνη, ποδοκαλυσίνη, WT1 (Wilm's Tumor 1), το δείκτη επιθηλιακής διαφοροποίησης κυτοκερατίνη, το ειδικό για ανθρώπινα σπλαχνικά επιθηλιακά κύτταρα αντιγόνο CALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen ή CD10) και το ειδικό για σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα αντιγόνο PHM5. Δεν εκφράζουν δεσμίνη και το αντιγόνο που συσχετίζεται με τον παράγοντα VIII, γεγονός που τα διαφοροποιεί από τα ενδοθηλιακά κύτταρα⁴¹⁶.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστήρα κυττάρων θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα. Καλλιεργήθηκαν σε φιάλες καλλιέργειας των 75cm² ή 25cm² με καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο που περιείχε DMEM-4% glucose (Invitrogen)/HAM's F12 (Invitrogen) (1:1), 10mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, 1% θερμικά απενεργοποιημένο ορό εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS), 2 mM γλουταμίνη, 5 μg/ml αποτρανσφερίνη, 5 μg/ml ινσουλίνη, 5 ng/ml σεληνιώδες νάτριο, 5 nM δεξαμεθαζόνη, 100 U/ml πενικιλίνη, 100 mg/ml στρεπτομυκίνη και 25mg/ml αμφοτερικίνη. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με θρυψινοποίηση στις 3 περίπου ημέρες όταν, δηλαδή, η ανάπτυξή τους ήταν περίπου στο 80-90% της επιφάνειας της φιάσκας. Συγκεκριμένα, αφαιρέθηκε το προηγούμενο θρεπτικό μέσο και, τα κύτταρα επώαστηκαν σε 2mL διαλύματος θρυψίνης 0.05% (w/v)/Na₂EDTA 0.02% (w/v) ανά φιάλη καλλιέργειας 75cm² για 3 λεπτά στους 37°C και 5% CO₂. Στη συνέχεια, προστέθηκε ίσος όγκος ορού FCS και, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου falcon των 15mL. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 300g για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, διάλυση των κυττάρων σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και, μοίρασμα των κυττάρων σε νέες φιάλες καλλιέργειας. Στις νέες φιάλες καλλιέργειας μοιράστηκε το 25% του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού.

3.3.3. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

Η απομόνωση ινοβλαστών πραγματοποιήθηκε από τεμάχια 2-3 mm πνευμονικού ιστού που απομονώθηκαν μετά από πνευμονεκτομή. Η απομόνωση έγινε από περιοχή μακριά από τη θέση αρχικής βλάβης. Αρχικά, έγιναν 3 πλύσεις του ιστού με Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) που περιείχε ασβέστιο, μαγνήσιο και αντιβιοτικά/αντιμυκητιασικά, με ελαφρά ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του ιστού στις 1400 rpm, αφαίρεση του υπερκείμενου και 3 πλύσεις με HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1400 rpm και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Ο ιστός επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με 1 mM αποδιατακτικού παράγοντα διθειοθρεϊτόλη (DTT), πλύθηκε 3 φορές με HBSS και φυγοκεντρήθηκε στις 1400 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Ακολούθησε επώαση στους 37°C με 1 mM EDTA για 30 λεπτά. Το δείγμα αναδευόταν κάθε 10 λεπτά σε αναδευτήρα τύπου vortex. Η επώαση επαναλήφθηκε 3 φορές με μεσολάβηση πλυσίματος με HBSS. Τα τμήματα του ιστού μεταφέρθηκαν σε φιάλες καλλιέργειας των 75 cm². Προστέθηκαν 12 μl καλλιεργητικού υλικού RPMI με 200 μονάδες/ml αντιβιοτικών/αντιμυκητιασικών και 10% FBS. Η φιάλη καλλιέργειας παρέμενε στον επωαστήρα στους 37°C με 5% CO₂. Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε 72 περίπου ώρες. Μόλις εμφανίστηκαν 4-6 αποικίες κυττάρων, ο ιστός αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS. Η απομάκρυνση των ινοβλαστών έγινε με 0.05% θρυψίνης/EDTA για 5 λεπτά. Προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1400 rpm για 10 λεπτά. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέα φιάλης καλλιέργειας και, ο πολλαπλασιασμός τους συνέχισε σε DMEM με 100 U/ml αντιβιοτικά/αντιμυκητιασικά με τελική συγκέντρωση 100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 0.5 μg/ml fungizone, 10% FBS και 1% (v:v) μη βασικά αμινοξέα. Η πρώτη γενεά κυττάρων καλλιεργήθηκε μέχρι να καλύψει το 100% της επιφάνειας της φιάλης καλλιέργειας. Ποσοστό της δεύτερης γενεάς κυττάρων καλλιεργήθηκε σε νέα φιάλη και το

υπόλοιπο αποθηκεύτηκε στους -80°C σε διάλυμα κρυοσυντήρησης με 10% DMSO και FBS³⁹⁸. Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των κυττάρων έγινε με αSMA, desmin και vimentin (Invitrogen). Οι ινοβλάστες είναι θετικοί σε αSMA ενώ, είναι αρνητικοί σε desmin και vimentin.

3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Τμήμα ιστού ή κύτταρα διαλύθηκαν σε 1 ml αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen) με συνεχείς συνθλίψεις ή αναδεύσεις. Το δείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου οπότε και προστέθηκε 0.1 ml 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο (BCP). Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και, το δείγμα αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 1800g στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια στα οποία προστέθηκαν 0.5 ml ισοπροπυλ-αλκοόλης για την καθίζηση του RNA. Μετά από 10 λεπτά παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 1800g στους 4°C, ώστε να ιζηματοποιηθεί το RNA. Στο ίζημα προστέθηκε 1 ml 75% αιθανόλης, ακολούθησε έντονη ανάδευση, φυγοκέντρηση σε 1800g στους 4°C και, το βήμα αυτό επαναλήφθηκε. Το δείγμα αφέθηκε να στεγνώσει και, στη συνέχεια διαλύθηκε σε 40 μl νερού ελεύθερου RNase, οπότε και θερμάνθηκε για 10 λεπτά στους 55-60°C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε με προσδιορισμό της απορρόφησής του στα 260nm και 280 nm στο σπεκτροφωτόμετρο NanoDrop (ThermoSCIENTIFIC). Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε βάσει του τύπου $[RNA \mu g/\mu l] = A_{260} \times 40 \times \text{αραίωση διαλύματος} / 1000$. Για την καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκε ο λόγος απορρόφησής του στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280nm. Η τιμή του λόγου 1.7-2 αντιπροσώπευε επιθυμητό RNA. Η ακεραιότητα του RNA αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1/100 σε Tris/Borate/EDTA TBE) με 5% βρωμιούχο αιθίδιο. Το RNA φορτώθηκε με διάλυμα φόρτωσης (αρχική συγκέντρωση διαλύματος 6x 1.25% bromophenol blue και 40% (w/v) sucrose σε διπλά απιονισμένο νερό) και για δείκτης χρησιμοποιήθηκε DNA ladder 1 kb. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100 V και διεκόπη σύμφωνα με το μέτωπο πορείας της. Το πήκτωμα σαρώθηκε σε σύστημα οπτικοποίησης για πήκτωμα αγαρόζης Dolphin DOC (Wealtec). Ακέραιο RNA ήταν αυτό στο οποίο διακρίνονταν ζώνες που αντιστοιχούσαν στο 18S rRNA (750 bp) και 28S rRNA (1500 bp). Ακολούθησε πρόσμειξη με RQ1 DNase (Promega) και επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Ακολούθως, η DNase απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 65°C για 10 λεπτά.

3.5. RNA-SEQUENCING

Ποσότητα 1 μg από το κάθε δείγμα ολικού RNA αλληλουχίστηκε με τμήματα των 37-bp και από τα δύο άκρα (37-bp paired end) σε μία λωρίδα αλληλούχησης (sequencing lane) στην πλατφόρμα Illumina HiSeq 2000 στο Τμήμα Γενετικής Ιατρικής και Ανάπτυξης της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Γενεύης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε. Δερμιτζάκη. Η δημιουργία βιβλιοθήκης cDNA ανά δείγμα έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Illumina TruSeq RNA Sample Prep Kit v2. Τα ανεπεξέργαστα αρχεία που δημιουργήθηκαν (.bcl files) μετατράπηκαν σε αρχεία .FASTQ και, ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος με FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/Help/3%20Analysis%20Modules/>) ως προς την ποιότητα αλληλούχησης ανά βάση (per base sequence quality), το ποιοτικό σκορ ανά αλληλούχηση (per sequence quality score), το περιεχόμενο ανά βάση αλληλούχησης (per base sequence content), το περιεχόμενο GC ανά βάση (per base GC content), το περιεχόμενο GC ανά αλληλουχία (per sequence GC content), το περιεχόμενο N ανά βάση (per base N content), την κατανομή ανά μήκος αλληλούχησης (sequence length distribution), τις διπλές αλληλουχίες (duplicate sequences), τις υπερεκφραζόμενες αλληλουχίες (overrepresented sequences) και τα υπερεκφραζόμενα Kmers (overrepresented Kmers). Ενδεικτικός ποιοτικός έλεγχος της αλληλούχησης RNA απεικονίζεται στο συμπληρωματικό περιεχόμενο (συμπληρωματική εικόνα 3.5.1). Τα τμήματα που αναγνώστηκαν, στοιχήθηκαν και χαρτογραφήθηκαν για γνωστά εξώνια και γονίδια στο γένωμα μύς (mouse alignment στο mm9 July NCBI build 37) με τη χρήση του TopHat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>), που αποτελεί δωρεάν και ανοιχτό software ανάλυσης δεδομένων RNA-Seq. Τα αρχεία στοίχισης, που δόθηκαν υπό τη μορφή BAM files, ταξινομήθηκαν και μετατράπηκαν σε SAM files με το SAM tools (<http://samtools.sourceforge.net>). Οι αναγνώσεις που στοιχήθηκαν, αναλύθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το HTSeq (<https://pypi.python.org/pypi/HTSeq>). Τα αρχεία στοίχισης μαζεύτηκαν σε μετάγραφα, τα οποία συγχωνεύτηκαν και, υπολογίστηκε η έκφραση των μεταγράφων σε Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped (FPKM). Ακολούθως, οι αναγνώσεις και η συγχώνευση αναλύθηκαν με το edgeR και, υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης και ελέγχθηκε η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών. Υπολογίστηκαν τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια

(ΔΕΓ) με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$ μεταξύ (α) ίδιων οργάνων, διαφορετικού ζωικού στελέχους, ίδιας ηλικίας, (β) ίδιων οργάνων, ίδιου ζωικού στελέχους, διαφορετικής ηλικίας και (γ) διαφορετικών οργάνων, ίδιου ζωικού στελέχους, ίδιας ηλικίας. Τα αρχεία της ανάλυσης μετατράπηκαν σε αντικείμενα οπτικοποίησης με το CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>). Τέλος, οι λίστες με τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια αναλύθηκαν με το Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

3.6. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (RT-qPCR)

Για τη σύνθεση cDNA, χρησιμοποιήθηκε 1 μ g ολικού RNA από ουδετερόφιλα μετά από *in vitro* διέγερση και το kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Το RNA με 1 μ M από κάθε τριφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο (rNTP), 10 pmoles ολιγο-δεοξυθυμιδίνης (oligodT) και 20 μονάδων αναστολέα ριβονουκλεασών (RNase inhibitor, Ribolock, Fermentas) θερμάνθηκε στους 65°C για 5 λεπτά και, ακολούθως, ψύχθηκε στους 4°C για 1 λεπτό. Προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl, 65mM KCl και 3 mM $MgCl_2$), 5 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) και 200 μονάδες Superscript III Reverse Transcriptase. Το μείγμα επωάστηκε στους 25°C για 5 λεπτά και, στη συνέχεια, στους 50°C για 50 λεπτά. Το ένζυμο απενεργοποιήθηκε στους 70°C για 15 λεπτά.

Ως εκκινητής (primer) του γονιδίου REDD1 χρησιμοποιήθηκε ο Fw 5' GAGGAAGACACGGCTTAG 3' και ο Rv 5' GCATCAGGTTGGGCACAC 3'. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH με εκκινητές τον Fw 5' GGGAAGCTTGTCATCAATGG 3' και τον Rv 5' CATCGCCCCACTTGATTG 3'. Οι εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων σχεδιάστηκαν με Beacon DesignerTM ver. 4.0. Η qPCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας SYBR Green qPCR Master Mix (2x) γονιδιακής έκφρασης (Fermentas) στον Chromo4TM Real-Time Detector (Bio-Rad). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 52°C για 5 λεπτά, 95°C για 2 λεπτά, 35 κύκλοι εναλλαγής 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 51°C για 40 δευτερόλεπτα, 52°C για 5 λεπτά και, ακολούθησε ανάλυση Multing Curve.

Η ποσοτική αντίδραση επαναλήφθηκε σε ουδετερόφιλα μετά από *in vitro* διέγερσή τους, 30 λεπτά μετά από προεπώασή τους με bosentan 10 μ M τελική συγκέντρωση (για αναστολή της ενδοθηλίνης), ή με C5aR antagonist ή με L-ascorbic acid ή με πεπτίδιο FLLRN 500 mM τελική συγκέντρωση (για αναστολή των PAR-1 υποδοχέων).

3.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδιο πήγματος και φυγοκεντρήθηκε σε 1400g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ο ορός, που αντιστοιχεί στο υπερκείμενο, συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

3.8. ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.8.1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ

Η *ex vivo* καλλιέργεια ουδετεροφύλων έγινε σε RPMI (500 ή 1000 μ l) συμπληρωμένο με 2% υγιή ορό σε 5% CO_2 στους 37°C. Οι *in vitro* διεγέρσεις ή αναστολές έγιναν με 6% ορό ΣΕΛ σε 5% CO_2 στους 37°C. Η διάρκεια της ενεργοποίησης ήταν ανάλογη της δοκιμασίας: 45 λεπτά για αυτοφαγία, 180 λεπτά για προσδιορισμό του p62/SQSTM1 και 3-4 ώρες για δημιουργία NETs. Για την αναστολή της αυτοφαγίας τα ουδετερόφιλα προ-επωάστηκαν με wortmannin (100nM; Sigma-Aldrich Co) ή υδροξυχλωροκίνη (50 μ M; Sigma-Aldrich Co) για 30 λεπτά. Για την αναστολή του TF χρησιμοποιήθηκε το IgG1 mouse anti-human TF μονοκλωνικό αντίσωμα (10 mg/ml; American Diagnostica). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το IgG1 anti-CD19 mAb (DAKO)^{226,228,417}.

3.8.2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα T-SV40 HGECS διεγέρθηκαν με δομές NETs σε συγκέντρωση 10% για 24 ώρες. Οι δομές NETs απομονώθηκαν από ουδετερόφιλα που επωάστηκαν με υγιή ορό ή ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ ή με PMA. Σαν NETs της ομάδας ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δομές από αδιέγερτα ουδετερόφιλα.

3.8.3. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

Οι ανθρώπινοι πνευμονικοί ινοβλάστες διεγέρθηκαν με δομές NETs σε συγκέντρωση 10% για 48 ώρες. Οι δομές NETs απομονώθηκαν από ουδετερόφιλα που επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ενεργό

ΣΕΛ ή με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ σε ύφεση, ή με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία DNase I (10 U/ml; Fermentas), ή με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία εξουδετερωτικού anti-TF αντισώματος (10 µg/ml; American Diagnostica) ή με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία εξουδετερωτικού anti-IL-17 αντισώματος (30 ng/ml; Biolegend). Σαν ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αδιέγερτοι ινοβλάστες.

3.9. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2x10⁶ ουδετερόφιλα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες δίσκου 24 θέσεων σε καλυπτρίδες καλυμμένες με poly-L-lysine σε 500 µl RPMI με 2% υγιή ορό και, ακολούθησε διέγερση ή αναστολή των κυττάρων όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Ακολούθησε σταθεροποίηση των κυττάρων σε 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA) διαλυμένη σε PBS για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν πάνω σε σταγόνα PBS για 5 λεπτά επί 3 φορές, ακολούθησε διάβαση κυτταρικής μεμβράνης με επώαση σε 0.5% Triton-X100 για 1 λεπτό και, 3 φορές πλύσιμο σε PBS για 1 λεπτό. Η αναστολή των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων (blocking) έγινε με 5% ορό γαϊδουριού για 30 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε πρωτογενές αντίσωμα για 1 ώρα στους 37°C. Ακολούθησαν 3 πλυσίματα με PBS επί 5 λεπτά και επώαση σε δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα στους 37°C. Το DNA χρωματίστηκε με 4'6-diamidin-2-phenylindole (DAPI) σε PBS για 2.5 λεπτά και ακολούθησε πλύσιμο σε νερό για 30 δευτερόλεπτα. Τελικά, ετέθη βάση Mowiol και, οι καλυπτρίδες αφέθηκαν να στεγνώσουν στο σκοτάδι στους 4°C. Η αξιολόγηση των πειραμάτων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Spinning Disk Andor Revolution Confocal System) σε PLAPON 6060/TIRFM-SP, NA 1.45 και UPLSAPO 100XO, NA 1.4 objectives (Olympus). Το ποσοστό των κυττάρων που απελευθερώνουν NETs αξιολογήθηκε ανά 200 κύτταρα με διπλή τυφλή μέθοδο.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: rabbit anti-citrullinated H3 (R2+R8+R17) (1/200; Abcam), rabbit anti-neutrophil elastase (NE) mAb (1/200; Santa Cruz Biotechnology Inc), IgG1 mouse anti-TF mAb (1/200; American Diagnostica), rabbit anti-Microtubule-Associated Protein 3 Light Chain Beta (LC3B) polyclonal Ab (1/200; Sigma-Aldrich Co), IL-17 monoclonal Ab (1:200; R&D Systems), και mouse antimyeloperoxidase monoclonal antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc). Το IgG1 anti-CD19 mAb (DAKO) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: πολυκλωνικό goat anti-rabbit Alexa fluor 647 ή πολυκλωνικό rabbit anti-mouse Alexa fluor 488 antibody (Invitrogen). Το DNA χρωματίστηκε με DAPI της Sigma-Aldrich Co.

3.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ NETs

1.5x10⁶ *ex vivo* ή διεγερμένα *in vitro* κύτταρα τοποθετήθηκαν σε δίσκο 6 κυψελίδων σε 1 ml RPMI (Sigma-Aldrich) για 4 ώρες στους 37°C σε 5% CO₂ σε αέρα, σε συνθήκες διέγερσης ή αναστολής. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό, η κάθε κυψελίδα πλύθηκε με 1000 µl RPMI και, 750 µl RPMI τοποθετήθηκαν εκ νέου ανά κυψελίδα. Το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε μετά από έντονη ανάδευση και φυγοκεντρήθηκε στις 20g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο, που αντιστοιχεί στις δομές NETs, αποθηκεύτηκε στους -80°C, μέχρι τη χρησιμοποίησή του⁴¹⁸.

3.11. MPO-DNA COMPLEX ELISA

Η ποσοτικοποίηση των NETs έγινε με τη μέθοδο ELISA η οποία δέσμευε MPO συνδεδεμένη σε DNA. Οι κυψελίδες δίσκου 96 θέσεων επικαλύφθηκαν με anti-MPO μονοκλωνικό αντίσωμα (5 µg/ml, Upstate) σε αραιώση 1:500 σε 50 µl για τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Μετά από 3 πλύσεις, 20 µl δείγματος προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα με 80 µl διαλύματος επώασης, το οποίο περιείχε anti-DNA μονοκλωνικό αντίσωμα ιχνηθετημένο με υπεροξειδάση σε αραιώση 1:25 (Cell Death ELISAPLUS, Roche). Ο δίσκος επώαστηκε για 2 ώρες σε 45g υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 3 πλύσεις, προσθήκη 100 µl υποστρώματος υπεροξειδάσης, επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και υπολογισμός της απορρόφησης στα 405 nm. Η δημιουργία των NETs εκφράστηκε ως ποσοστιαία αύξηση σε σχέση με τον μάρτυρα⁴¹⁹.

3.12. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΤΩΧΟΥ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδιο με κιτρικό νάτριο και, φυγοκεντρήθηκε σε 255g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε 375g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο, που αντιστοιχεί στο πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια (platelet-poor plasma, PPP), αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

3.13. TAT COMPLEX ELISA

Πτωχό σε πλάσμα αιμοπετάλια διεγέρθηκε με δομές NETs σε τελική συγκέντρωση 20%, επώαστηκε στους 37°C για 10 λεπτά και, μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο. Για τις μελέτες αναστολής, οι δομές NETs προεπώαστηκαν με εξουδετερωτικό αντίσωμα anti-TF (1:50, Sekisui Diagnostics). Ο σχηματισμός θρομβίνης από τις δομές NETs μετρήθηκε σε *in vitro* διεγερμένο PPP υγιούς μάρτυρα χρησιμοποιώντας το AssayMax Human Thrombin ELISA kit (ASSAYPRO), το οποίο υπολογίζει τη συγκέντρωση του συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT). 50 μl δείγματος και πρότυπου διαλύματος τοποθετήθηκαν σε δίσκο 96 κυψελίδων εις διπλούν και, επώαστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα, προσθήκη 50 μl βιοτινυλιωμένου αντισώματος θρομβίνης και, επώαση για 1 ώρα. Ακολούθησαν πλύσεις για απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος, προσθήκη 50 μl αντισώματος στρεπταμιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση και, επώαση για 30 λεπτά. Ξεπλύθηκε το αντίσωμα, προστέθηκε υπόστρωμα χρωμογόνου με τετραμεθυλ-βενζιδίνη για 10 λεπτά και, η χρωμοαντίδραση διεκόπη με HCl 0.5N. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρήθηκε στα 450 nm. Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση του συμπλέγματος TAT της μεθόδου ήταν τα 300 pg/ml.

3.14. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το ίζημα κυττάρων διαλύθηκε σε διάλυμα λύσης, το οποίο περιείχε 1% Triton-X100 σε 150 mM/NaCl 20 mM HEPES (pH=7.5) με αναστολείς πρωτεασών (1 tbl complete protease inhibitor tablets, Roche σε 10 ml διαλύματος λύσης). Η εκχύλιση πρωτεϊνών έγινε με διαδοχική αλλαγή της θερμοκρασίας των δειγμάτων από τους -80°C στους 0°C επί 3 φορές, με ενδιάμεση καλή ανάδευσή τους. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 300g για 7 λεπτά και, στη συνέχεια συλλέχθηκε το υπερκείμενο, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο BCA Protein Assay (ThermoFischer SCIENTIFIC) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.15. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NETs

1.5×10^6 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε δίσκο 6 κυψελίδων (Corning Incorporated) σε 1 ml RMPI (Sigma-Aldrich) για 4 ώρες στους 37°C σε συνθήκες διέγερσης ή αναστολής. Το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε 1 ml RMPI (Sigma-Aldrich) για 5 λεπτά στους 37°C, οπότε και απορρίφθηκε. Προστέθηκε εκ νέου 1 ml RMPI (Sigma-Aldrich) για 15 λεπτά στους 37°C και, ακολούθησε προσθήκη 5 U/ml DNase I (Fermentas) για 20 λεπτά στους 37°C ώστε να διασπαστούν οι εξωκυττάρια δομές DNA. Μετά από προσθήκη 1% ethylene-diamine-tetraacetic acid για τη διακοπή της δράσης της DNase I (EDTA, Applochem), το δείγμα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε σε 300g για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο, που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη των NETs, αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών των NETs έγινε με παγωμένη ακετόνη 3:1 (v/v) στους -20°C για τη διάρκεια της νύχτας. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 2100g για 15 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επώαστηκε για 20 λεπτά με 15 μl διαλύματος λύσης [1% Triton-X100 σε 150 mM/NaCl 20 mM HEPES (pH=7.5) με αναστολείς πρωτεασών (1 tbl complete protease inhibitor tablets, Roche σε 10 ml διαλύματος λύσης)]. Οι πρωτεΐνες των NETs αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

3.16. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Ετοιμάστηκαν κυτταρολύματα από $2-4 \times 10^6$ κύτταρα με διάλυμα λύσης που περιείχε 1% Triton-x100 και 150mM NaCl σε 20mM HEPES pH 7.5 με αναστολείς πρωτεασών (Complete Protease Inhibitors; Roche), τα οποία φυλάχθηκαν στους -20°C. Μετά από φυγοκέντρωση, τα υπερκείμενα αξιολογήθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη με τη χρήση της δοκιμασίας BCA Protein Assay (Pierce) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι πρωτεΐνες (90μl ανά γραμμή) αραιώθηκαν 1:1 σε διάλυμα φόρτωσης 2x SDS, θερμάνθηκαν στους 10°C για 5 λεπτά, λύθηκαν με SDS-PAGE, και ηλεκτροφορήθηκαν σε μεμβράνες polyvinylidene difluoride membrane filters (PVDF; Bio-Rad). Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε διάλυμα blocking για 2 ώρες σε 3% γάλα/TBT-T και, ακολούθησε επώαση με πρωτογενές αντίσωμα για τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Μετά από πλύσιμο σε TBS-T, οι μεμβράνες επώαστηκαν σε δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο σε HRP για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ανοσοδραστικές πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν με το σύστημα ανίχνευσης ECL (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce) και εμφανίστηκαν σε φιλμ (Fujifilm medical x-ray film; Fujifilm)]. Για τη μελέτη της αυτοφαγίας, χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό rabbit anti-human LC3B (1/1000; Sigma-Aldrich Co) και το πολυκλωνικό mouse anti-human p62/SQSTM1 (1/400; Santa

Cruz Biotechnology Inc). Για την ανίχνευση του TF, χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό goat anti-human TF polyclonal antibody (1/1000; Sekisui Diagnostics). Για την επαλήθευση της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το GAPDH (1/1000; Santa Cruz Biotechnology Inc).

3.17. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ

Αρχικά, αφαιρέθηκε η παραφίνη και ενυδατώθηκαν οι τομές των ιστών με εμβάπτιση σε ξυλόλη για 10 λεπτά επί 3 φορές, σε αιθανόλη 100% για 5 λεπτά επί 2 φορές, σε αιθανόλη 95% για 5 λεπτά επί 2 φορές, σε αιθανόλη 75% για 5 λεπτά επί 2 φορές και, τελικά σε PBS επί 3 φορές. Ακολούθησε η διαδικασία αποκάλυψης αντιγόνων με κιτρικό, κατά την οποία οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε λουτρό κιτρικού οξέος 10 mM pH 6 σε φούρνο μικροκυμάτων μέγιστης έντασης για 10 λεπτά επί 2 φορές. Στη συνέχεια, οι τομές ιστών επωάστηκαν στο κιτρικό διάλυμα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, πλύθηκαν 3 φορές σε PBS. Ακολούθησε αναστολή των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων των τομών (blocking) με 2% BSA-PBS σε 2% ορού για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, προσήκη πρωτογενούς αντισώματος παρουσία 2% BSA-PBS για τη διάρκεια της νύχτας σε υγρό σκοτεινό θάλαμο στους 4°C. Στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες προστέθηκε 2% BSA-PBS χωρίς πρωτογενές αντίσωμα. Την επόμενη ημέρα, οι τομές ιστών πλύθηκαν σε PBS για 5 λεπτά επί 4 φορές και, στη συνέχεια, επωάστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα παρουσία 2% BSA-PBS για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύσιμο των τομών με PBS για 5 λεπτά επί 4 φορές, τοποθέτηση του δεύτερου δευτερογενούς αντισώματος (αραιώση) παρουσία 2% BSA-PBS για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, πλύσιμο των τομών με PBS για 5 λεπτά επί 4 φορές. Στη συνέχεια, έγινε επώαση με DAPI σε PBS για 5-7 λεπτά και πλύσιμο σε PBS επί 3 φορές. Οι τομές ιστών ενυδατώθηκαν σε αιθανόλη 95% για 2 λεπτά και, ακολούθως σε αιθανόλη 100% για 3 λεπτά. Τελικά, στις τομές ετέθη βάση Mowiol και καλυπτρίδα και, αφέθηκαν να στεγνώσουν στο σκοτάδι στους 4°C. Η αξιολόγηση των πειραμάτων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Spinning Disk Andor Revolution Confocal System) σε PLAPON 6060/TIRFM-SP, NA 1.45 και UPLSAPO 100XO, NA 1.4 objectives (Olympus).

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: rabbit anti-citrullinated H3 (R2+R8+R17) (1/200; Abcam), rabbit anti-neutrophil elastase (NE) mAb (1/200; Santa Cruz Biotechnology Inc), IgG1 mouse anti-TF mAb (1:200; American Diagnostica), rabbit anti-Microtubule-Associated Protein 3 Light Chain Beta (LC3B) polyclonal Ab (1/200; Sigma-Aldrich Co), IL-17 monoclonal Ab (1:200; R&D Systems), και mouse antimyeloperoxidase monoclonal antibody (1/300; Santa Cruz Biotechnology Inc). Το IgG1 anti-CD19 mAb (DAKO) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: πολυκλωνικό goat anti-rabbit Alexa fluor 647 ή πολυκλωνικό rabbit anti-mouse Alexa fluor 488 antibody (Invitrogen). Το DNA χρωματίστηκε με DAPI της Sigma-Aldrich Co.

3.18. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ

Η μέτρηση του διαλυτού κολλαγόνου τύπου I-V που εκκρίνεται από τους ινοβλάστες στο καλλιεργητικό μέσο έγινε χρησιμοποιώντας το Sircol Collagen Assay Kit (Biocolor), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή³⁹⁸. Τα υπερκείμενα καλλιεργείων συλλέχθηκαν και επωάστηκαν στους 4°C με διάλυμα συμπύκνωσης polythelenglycol σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.6. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 μg Picro-Sirious Red, ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα κάθε δείγματος πλύθηκε με 750 μl διαλύματος όξινου άλατος (οξικό οξύ, χλωριούχο νάτριο και επιφανειοδραστικούς παράγοντες) και, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 250 μl αλκοολικού διαλύματος 0.5M sodium hydroxide και αναδεύτηκαν σε αναδευτήρα τύπου vortex. Για την ποσοτικοποίηση του κολλαγόνου κάθε δείγματος, δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη. Σαν τυφλό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε καλλιεργητικό υλικό.

3.19. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση έγινε με one-way ANOVA (Scheffe test σε ομοιόμορφη n και t -τεστ με τουλάχιστον σημαντική διαφορά σε μη ομοιόμορφη n για *post-hoc* συγκρίσεις). Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το GraphPad Prism 5.0. Οι τιμές $P < 0.05$ αξιολογήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Η ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΠΩΝ DNA ΣΤΟ ΣΕΛ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΕΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΥΠΑΘΕΙΑ, ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΚΗ ΕΞΑΡΤΗΣΗ

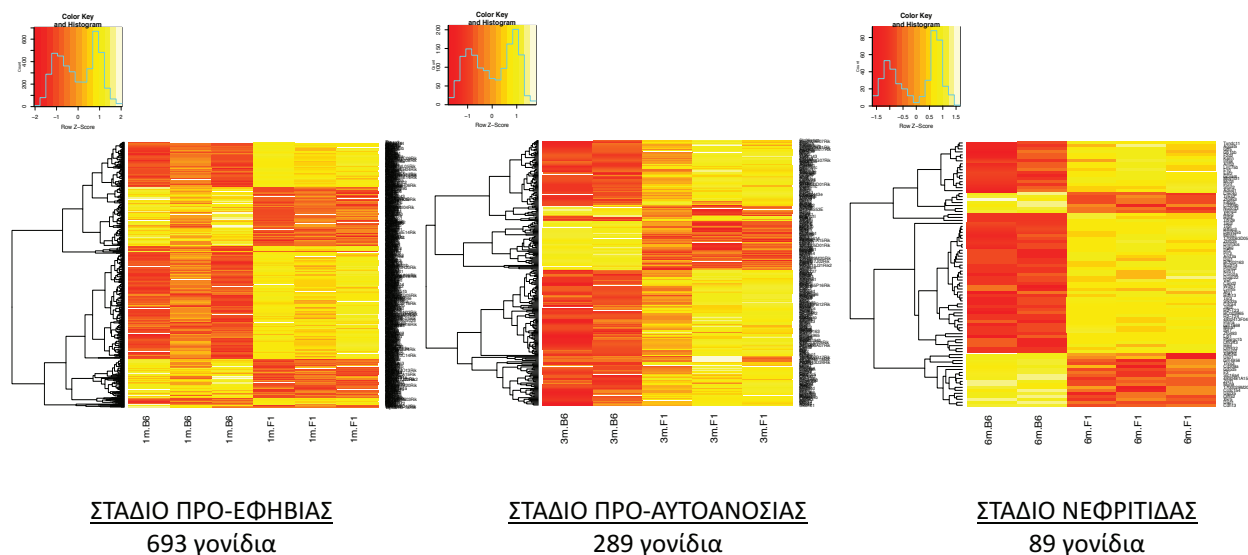
Για να μελετηθεί η γενετική ευπάθεια του ΣΕΛ, έγινε αλληλούχηση RNA νέας γενεάς και συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ίδιων οργάνων, διαφορετικών ζωικών προτύπων, ίδιας ηλικίας, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Στο σπλήνα (που αποτελεί περιφερικό λεμφικό όργανο), κατά το στάδιο της προ-εφηβίας των ζωικών προτύπων (κατά το οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες του φύλου) διαπιστώθηκαν 693 διαφορεικά εκφραζόμενοι τόποι (differentially expressed loci, DEL; αναφέρονται ως διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια, ΔΕΓ) με τροποποίηση >1.5 φορά με τιμή $p < 0.05$ μεταξύ των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου και των C57BL/6 υγιών προτύπων. Αντίστοιχα, διαπιστώθηκαν 289 ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας (κατά το οποίο απουσιάζουν τα αυτοαντισώματα) και 89 ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας (εικόνα 4.1.1, πίνακας 4.1.1). Στον εγκέφαλο (που αποτελεί τελικό όργανο-στόχο του ΣΕΛ), κατά το στάδιο της προ-εφηβίας διαπιστώθηκαν 2 ΔΕΓ, οι Arhgap30 και Plcb3, μεταξύ των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου και των C57BL/6 υγιών προτύπων. Αντίστοιχα, διαπιστώθηκαν 2 ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας, οι Clec16a και Tbc1d13 και 5 ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας, οι 9430020K01Rik, Neat1, Rdh16, Dlgap2 και Clec16a (συμπληρωματικός πίνακας 4.1.1). Στο νεφρό (που επίσης αποτελεί τελικό όργανο-στόχο του ΣΕΛ), κατά το στάδιο της προ-εφηβίας διαπιστώθηκαν 63 ΔΕΓ μεταξύ των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου και των C57BL/6 υγιών προτύπων. Αντίστοιχα, διαπιστώθηκαν 930 ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας και, 21 ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας (εικόνα 4.1.2, πίνακας 4.1.2). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι στο ΣΕΛ, η γενετική ευπάθεια του οργανισμού συσχετίζεται με διαφορετικό μεταγράφημα τόσο στα όργανα τελεστές όσο και στα τελικά όργανα-στόχους του νοσήματος, που παρατηρείται ακόμα και πριν την εμφάνιση της αυτοανοσίας.

Για να μελετηθεί η οργανοειδικότητα του ΣΕΛ στο χρόνο, έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος διαφορετικών οργάνων των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου κατά το ίδιο στάδιο του νοσήματος. Συγκεκριμένα, στα NZB/W-F1 υβρίδια λύκου διαπιστώθηκαν κατά το στάδιο της προ-εφηβίας, 3304 ΔΕΓ μεταξύ του εγκεφάλου και του νεφρού, 4808 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 3279 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Αντίστοιχα, στα NZB/W-F1 υβρίδια λύκου διαπιστώθηκαν κατά το στάδιο της προ-αυτοανοσίας, 2036 ΔΕΓ μεταξύ του εγκεφάλου και του νεφρού, 4483 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 1781 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Στο στάδιο της νεφρίτιδας, διαπιστώθηκαν στα NZB/W-F1 3550 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού, 4810 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και 3267 DEL μεταξύ νεφρού και σπλήνα (συμπληρωματική εικόνα 4.1.1-4.1.3). Για να διαπιστωθεί η συσχέτιση του διαφορικού μεταγραφώματος των οργάνων με το υπόστρωμα του ΣΕΛ, έγινε η ίδια συγκριτική μελέτη στο υπόστρωμα υγιούς προτύπου και διαπιστώθηκε ότι, στο στάδιο της προ-εφηβίας τα υγιή πρότυπα C57BL/6 παρουσιάζουν 3356 ΔΕΓ μεταξύ του εγκεφάλου και του νεφρού, 3517 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 2850 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Αντίστοιχα, στα C57BL/6 διαπιστώθηκαν κατά το στάδιο της προ-αυτοανοσίας, 2554 ΔΕΓ μεταξύ του εγκεφάλου και του νεφρού, 2260 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 2060 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα. Στο στάδιο της νεφρίτιδας, διαπιστώθηκαν στα C57BL/6 3442 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού, 3390 ΔΕΓ μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα και, 2930 ΔΕΓ μεταξύ νεφρού και σπλήνα (συμπληρωματική εικόνα 4.1.4-4.1.6). Οι λίστες των ΔΕΓ απεικονίζονται στο συμπληρωματικό περιεχόμενο (συμπληρωματικός πίνακας 4.1.2-4.1.7). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, το διαφορικό μεταγράφημα των οργάνων στα ζωικά πρότυπα λύκου υποδηλώνει οργανοειδικότητα του νοσήματος, η οποία όμως συσχετίζεται και με τη διαφορετική εμβρυική προέλευση του κάθε ιστού.

Για να διαπιστωθεί η αναπτυξιακή βιολογία του ΣΕΛ και η σχέση της με τα όργανα τελεστές ή όργανα στόχους του νοσήματος, έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ίδιων οργάνων, ίδιων ζωικών προτύπων, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Στο σπλήνα των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου διαπιστώθηκαν 277 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της προ-εφηβίας και του σταδίου της προ-αυτοανοσίας, 212 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου της προ-εφηβίας και, 15 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου της προ-αυτοανοσίας (εικόνα 4.1.3). Στον εγκέφαλο των NZB/W-F1 υβριδίων λύκου διαπιστώθηκαν 12 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της προ-εφηβίας και του σταδίου της προ-αυτοανοσίας και, 6 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου της προ-εφηβίας (συμπληρωματική εικόνα 4.1.7). Στο νεφρό των NZB/W-F1 μόνο το Ceacam2 ήταν διαφορετικά εκφραζόμενο στο στάδιο της προ-εφηβίας

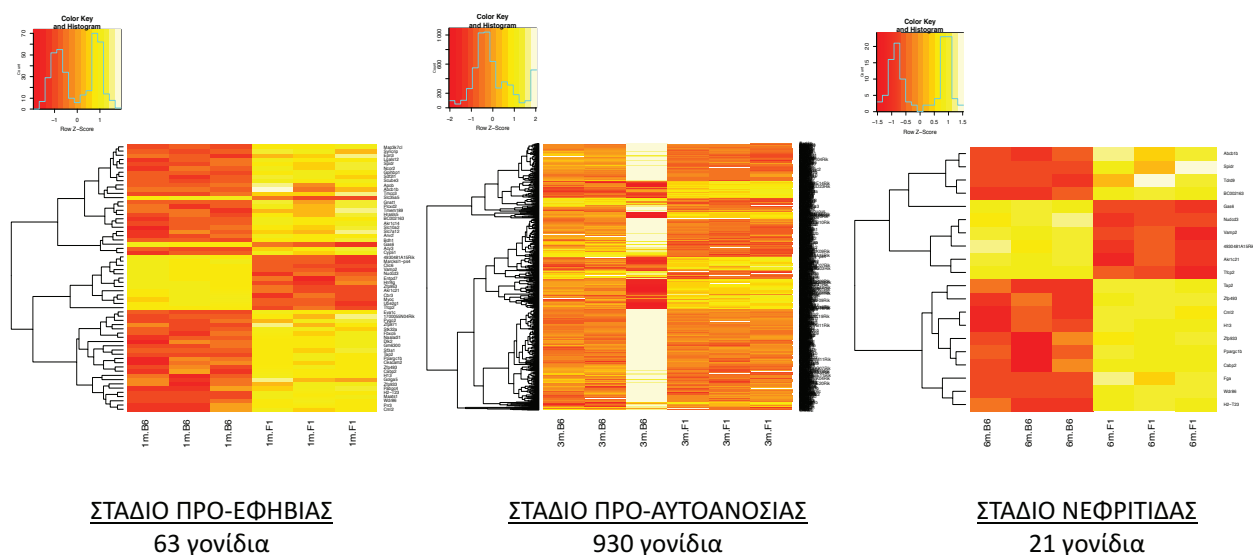
σε σχέση με το στάδιο της προ-αυτοανοσίας. Επίσης, στο νεφρό διαπιστώθηκαν 8 DEL μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου

ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΛΕΜΦΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ (ΣΠΛΗΝΑΣ)



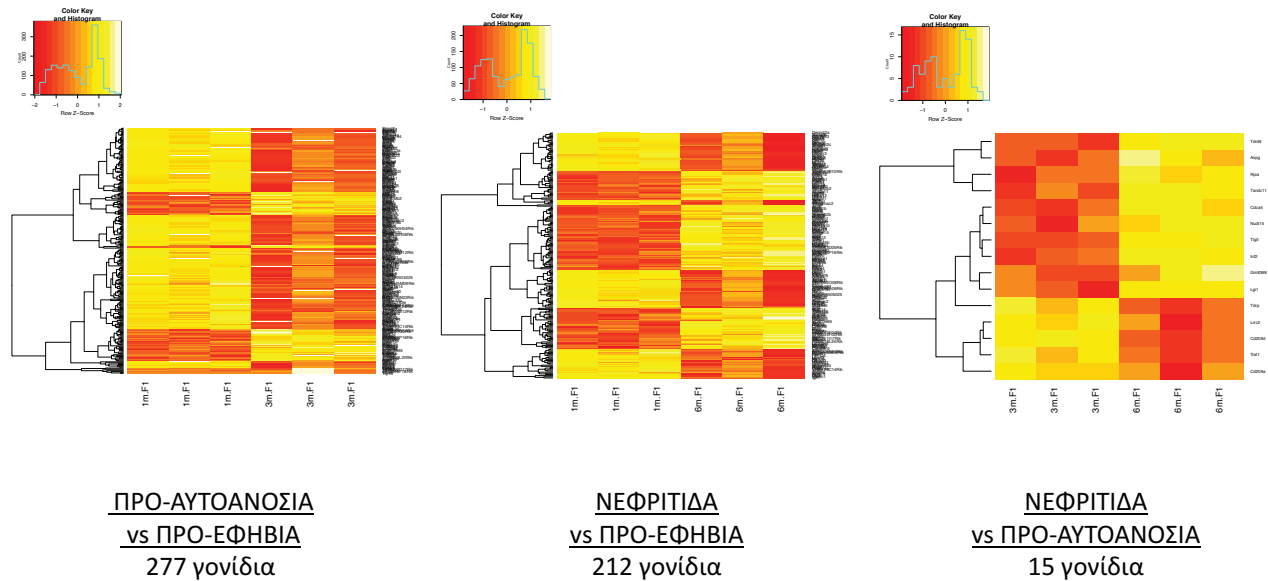
Εικόνα 4.1.1: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 στο σπλήνα (περιφερικό λεμφικό όργανο) στο στάδιο της προ-εφηβίας, προ-αυτοανοσίας και νεφρίτιδας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

ΤΕΛΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ ΣΤΟΧΟΣ (ΝΕΦΡΟΣ)



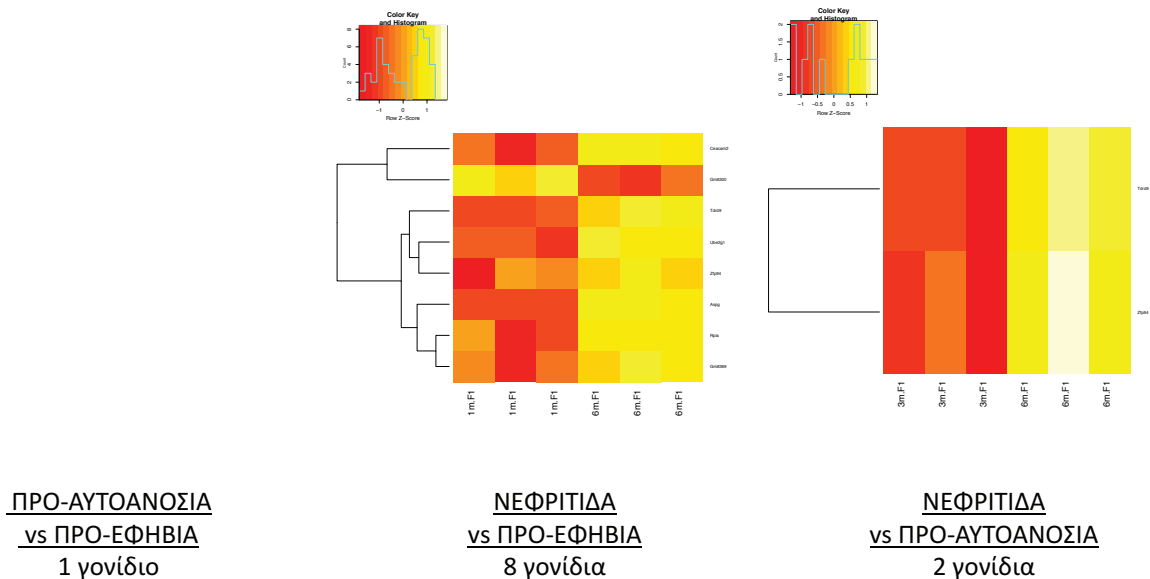
Εικόνα 4.1.2: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 στο νεφρό (τελικό όργανο στόχος) στο στάδιο της προ-εφηβίας, προ-αυτοανοσίας και νεφρίτιδας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΛΕΜΦΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ (ΣΠΛΗΝΑΣ)



Εικόνα 4.1.3: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) στο σπλήνα των NZB/W-F1 μεταξύ διαφορετικών σταδίων. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

ΤΕΛΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ ΣΤΟΧΟΣ (ΝΕΦΡΟΣ)



Εικόνα 4.1.4: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) στο νεφρό των NZB/W-F1 μεταξύ διαφορετικών σταδίων. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

Πίνακας 4.1.1: τα κυριότερα ΔΕΓ στο σπλήνα, διαφορετικών προτύπων, ίδιας ηλικίας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο σπλήνα, στο στάδιο της προ-εφηβίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6					(σύνολο = 693)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
1810007D17Rik	-12,80744117	6,184376239	12,02744005	0,00052423	0,007325291
Try10	-11,79154504	2,308884051	13,66072398	0,000218987	0,00399636
1810018F18Rik	-11,56369031	2,475899291	13,47232101	0,000242109	0,004314868
Cpa4	-8,993284171	1,983745883	9,414489641	0,002152775	0,019396502
Gm4956	-7,980149637	-0,968832183	38,79497398	4,71E-10	1,04E-07
Jakmip2	-7,023790154	1,499484493	9,893942093	0,001658238	0,016410699
Gdpd5	-6,315196634	1,986584314	161,2513916	6,03E-37	1,27E-33
Tnni3	-5,728940976	-1,366959191	19,82005831	8,51E-06	0,000421021
Mical2	-5,654956888	2,703140086	8,713906493	0,003157918	0,02549367
Nudcd3	-5,614550519	3,741969756	141,2001665	1,45E-32	1,92E-29
ΔΕΓ στο σπλήνα, στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6					(σύνολο = 289)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Tnni3	-7,858116244	-1,366959191	25,20331172	5,16E-07	4,37E-05
Vamp2	-6,782673494	3,930247607	198,4669042	4,51E-45	9,49E-42
Gdpd5	-5,497212831	1,986584314	149,5319892	2,19E-34	3,08E-31
Nudcd3	-5,314181713	3,741969756	123,5150615	1,08E-28	9,05E-26
Gm4956	-5,121902614	-0,968832183	25,27464172	4,97E-07	4,36E-05
Usp35	-4,515570042	0,580794345	71,23731407	3,17E-17	1,67E-14
Abcb8	-3,853235745	-0,607719715	10,19845403	0,001405584	0,028746705
Uso1	-3,595391835	-0,481154527	18,10501135	2,09E-05	0,000999166
Cdh13	-3,025254543	-0,86879356	23,21033511	1,45E-06	0,000103521
Dhx34	-2,84037445	3,330565304	55,63883913	8,71E-14	3,66E-11
ΔΕΓ στο σπλήνα, στο στάδιο της νεφρίτιδας μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6					(σύνολο = 89)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Tnni3	-5,350949686	-1,366959191	16,17841217	5,76E-05	0,003910722
Vamp2	-5,270274166	3,930247607	137,1430445	1,12E-31	1,57E-28
Gdpd5	-5,174784571	1,986584314	125,5889724	3,78E-29	3,98E-26
Nudcd3	-4,772170131	3,741969756	108,4728081	2,12E-25	1,78E-22
Gm4956	-4,766933776	-0,968832183	23,76335416	1,09E-06	0,000129468
Cdh13	-3,899056807	-0,86879356	32,59374376	1,14E-08	2,39E-06
Olfr52	-3,703884063	0,226095909	21,42900041	3,67E-06	0,000376668
Dad1	-3,334733554	-1,061684899	18,1364597	2,06E-05	0,001801801
Usp35	-3,188294358	0,580794345	35,40561578	2,68E-09	6,26E-07
Cd209a	-3,108439181	0,940867336	27,55062975	1,53E-07	2,22E-05

Πίνακας 4.1.2: τα κυριότερα ΔΕΓ στο νεφρό, διαφορετικών προτύπων, ίδιας ηλικίας

FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο νεφρό, στο στάδιο της προ-εφηβίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6					(σύνολο = 63)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Tfcp2	-7,613243665	2,194392844	66,18429669	4,11E-16	1,66E-12
Akr1c21	-6,0276918	3,634649074	28,84875492	7,83E-08	1,67E-05
Nudcd3	-5,296472113	3,370148627	59,71492575	1,10E-14	1,48E-11
Vamp2	-4,967738024	3,109214179	58,1563126	2,42E-14	1,96E-11
Clic6	-3,572089671	0,347831659	28,47946141	9,47E-08	1,92E-05
Marcksl1-ps4	-3,498183907	1,634785989	34,58528563	4,08E-09	1,27E-06
4930481A15Rik	-3,463310602	1,998934865	39,53872645	3,22E-10	1,08E-07
Ube2g1	-3,194603964	1,254393115	20,8800253	4,89E-06	0,000659454
Cbr3	-2,696401153	0,08103204	23,12986148	1,51E-06	0,000245059
Entpd7	-2,223599423	1,424489536	13,31756619	0,000262931	0,020773946
ΔΕΓ στο νεφρό, στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6					(σύνολο = 930)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Tfcp2	-11,79397939	2,194392844	118,4776575	1,36E-27	5,51E-24
Ormdl2	-9,681057418	0,065512948	11,47022036	0,000707203	0,006330405
Slc34a1	-9,438283544	5,421211257	32,29351184	1,33E-08	4,47E-06
Akr1c21	-9,328817195	3,634649074	54,41911419	1,62E-13	1,64E-10
Cdv3	-9,28850864	-0,570822351	16,5600598	4,71E-05	0,001102319
Tcf20	-8,950593211	-0,31274906	22,54466511	2,05E-06	0,000145737
Rab24	-8,003558691	-0,195466409	13,39296809	0,000252569	0,003235246
Sod3	-7,915066304	3,426117289	30,70811308	3,00E-08	7,55E-06
Tns1	-7,244323987	3,753181027	24,33085784	8,11E-07	7,63E-05
Oxct1	-6,993999397	4,045415549	25,12228476	5,38E-07	6,80E-05
ΔΕΓ στο νεφρό, στο στάδιο της νεφρίτιδας μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6					(σύνολο = 21)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Gm6300	-4,009010325	2,188869685	19,47758794	1,02E-05	0,010295754
Zfp94	2,900203791	-0,867272305	15,77373492	7,14E-05	0,041261499
Ube2g1	2,919897162	1,254393115	17,62118416	2,70E-05	0,021813505
Ceacam2	3,780655255	4,360421436	44,1687409	3,01E-11	6,09E-08
Rpia	4,516593161	-0,208642721	15,94228243	6,53E-05	0,041261499
Gm8369	4,54079745	-1,445014074	15,25114541	9,41E-05	0,047601018
Tdrd9	7,658535589	1,403557903	45,75226639	1,34E-11	5,43E-08
Aspg	9,170367631	0,458886333	20,09762784	7,36E-06	0,009924554

της προ-εφηβίας και, 2 ΔΕΓ μεταξύ του σταδίου της νεφρίτιδας και του σταδίου της προ-αυτοανοσίας, τα Zfp94 και Tdrd9 (εικόνα 4.1.4). Οι λίστες των ΔΕΓ απεικονίζονται στο συμπληρωματικό περιεχόμενο (συμπληρωματικοί πίνακες 4.1.8-4.1.10). Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι, η έκφραση γονιδίων σε ένα ευπαθή οργανισμό στο ΣΕΛ τροποποιείται στα διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση τροποποιήθηκε αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες εξέλιξης του νοσήματος και προσβολής οργάνου, αλλά και υποψήφιοι θεραπευτικοί στόχοι.

4.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΚΤΥΩΝ ΚΑΙ ΟΔΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Για να διαπιστωθούν κανονικές οδοί, μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες που εμπλέκονται, ανοδικοί ρυθμιστές και κυριότερα υπερεκφραζόμενα ή υποεκφραζόμενα γονίδια, τα ΔΕΓ που βρέθηκαν, αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Ingenuity Pathway Analysis.

Στο σπλήνα, στο στάδιο της προ-εφηβίας του προτύπου λύκου σε σχέση με το υγιούς προτύπου, κυριότερες κανονικές οδοί που διαπιστώθηκαν είναι η σηματοδότηση της IFN ($p=2.20E-05$), η ρύθμιση της χρωμοσωματικής αντιγραφής στον κυτταρικό κύκλο ($p=7.79E-05$) και η οδός του αντιγονοπαρουσιασμού ($p=1.56E-03$). Κυριότεροι ανοδικοί ρυθμιστές είναι οι Ifnar ($p=1.80E-05$), IL10RA ($p=1.22E-04$), HSF1 ($p=1.86E-04$), NFkB ($p=1.96E-04$) και TAPBP ($p=1.96E-04$). Τα κυριότερα ρυθμιστικά δίκτυα συμμετέχουν σε λειτουργίες που συσχετίζονται με την ενεργοποίηση των κυττάρων του αίματος, την κυτταροτοξικότητα των Τ λεμφοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.1). Κατά το **στάδιο της προ-αυτοανοσίας**, η οδός του αντιγονοπαρουσιασμού αποτελεί μία από τις κυριότερες κανονικές οδούς που διαπιστώθηκαν ($p=5.06E-04$) ενώ, κυριότερος ανοδικός ρυθμιστής εξακολουθεί να είναι ο IL10RA ($p=6.45E-05$). Τα κυριότερα ρυθμιστικά δίκτυα συμμετέχουν σε λειτουργίες που συσχετίζονται με την προσκόλληση των κυττάρων της ανοσίας (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.2). Στο **στάδιο της νεφρίτιδας**, επιπρόσθετα των αναμενόμενων κανονικών οδών, όπως της οδού του αντιγονοπαρουσιασμού ($p=5.93E-03$), διαπιστώθηκαν και οι κανονικές οδοί του συστήματος πήξης ($p=4.48E-04$), της ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού της προθρομβίνης και του ρόλου του ιστικού παράγοντα ($p=1.09E-02$). Κυριότεροι ανοδικοί ρυθμιστές είναι ο IL10RA ($p=1.53E-03$) και ο PARP14 ($p=4.04E-03$), που αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο των μεταγράφων του ιστικού παράγοντα (πίνακας 4.2.1). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι, η γονιδιακή έκφραση στο σπλήνα των ζωικών προτύπων λύκου χαρακτηρίζεται από μία ταυτότητα ενεργοποίησης IFN και αντιγονοπαρουσιασμού καθ' όλη τη φυσική πορεία του νοσήματος, ακόμα και πριν την επίδραση των ορμονών του φύλου ή την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων. Εκτός από τις αναμενόμενες οδούς, διαπιστώθηκε ότι εμπλέκονται και άλλες, όπως η οδός της ενεργοποίησης της πήξης και, συγκεκριμένα, της εξωγενούς οδού ενεργοποίησης της προθρομβίνης.

Στον εγκέφαλο, στο στάδιο της προ-εφηβίας του προτύπου λύκου σε σχέση με του υγιούς προτύπου, οι κυριότερες κανονικές οδοί που διαπιστώθηκαν είναι η οδός της βιοσύνθεσης των αλατοκορτικοειδών ($p=1.54E-02$), γλυκοκορτικοειδών ($p=1.71E-02$) και ανδρογόνων ($p=2.22E-02$). Τα κυριότερα ρυθμιστικά δίκτυα συμμετέχουν σε λειτουργίες μεταβολισμού υδατανθράκων και λιπιδίων, παραγωγής ενέργειας και κυτταρικής λειτουργίας (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.3). Στο **στάδιο της προ-αυτοανοσίας**, οι οδοί της βιοσύνθεσης αλατοκορτικοειδών ($p=1.34E-02$), γλυκοκορτικοειδών ($p=1.49E-02$) και ανδρογόνων ($p=1.94E-02$) παραμένουν ως οι κυριότερες κανονικές οδοί, στις οποίες προστίθενται οι οδοί της επιμήκυνσης τελομερούς από την τελομεράση ($p=2.08E-02$) και της αποδόμησης ισταμίνης ($p=2.23E-02$) (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.4). Στο **στάδιο της νεφρίτιδας**, οι κυριότερες κανονικές οδοί είναι της αφυδρογονάσης του συμπλέγματος των κετοξένων ($p=5.55E-03$), της αφυδρογονάσης του συμπλέγματος του πυρουβικού ($p=8.32E-03$), της βιοσύνθεσης φωσφατυδυλχολίνης I ($p=9.70E-03$) και χολίνης III ($p=1.66E-02$) και, της επιμήκυνσης των τελομερών από την τελομεράση ($p=1.93E-02$) (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.5). Τα ρυθμιστικά δίκτυα συμμετέχουν σε λειτουργίες μεταβολισμού υδατανθράκων και λιπιδίων, κυτταρικής κίνησης, συσσώρευσης πρωτεϊνών και κυτταρικής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, στον εγκέφαλο των ζωικών προτύπων λύκου, το μεταγράφημα χαρακτηρίζεται από διαφορετική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν, κυρίως, σε λειτουργίες ενδοκρινολογικές, μεταβολικές, κυτταρικής οργάνωσης και ανάπτυξης.

Στο νεφρό, στο στάδιο της προ-εφηβίας του προτύπου λύκου σε σχέση με του υγιούς προτύπου, η κυριότερη κανονική οδός που διαπιστώθηκε είναι η οδός του αντιγονοπαρουσιασμού ($p=2.86E-03$).

Πίνακας 4.2.1: Ανάλυση ΔΕΓ του σπλήνα στο στάδιο της νεφρίτιδας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Coagulation system	4.48E-04	8% 3/35
Extrinsic prothrombin activation pathway	2.09E-03	12.5% 2/16
Antigen presentation pathway	5.93E-03	7.4% 2/27
Asparagine degradation I	8.55E-03	50% 1/2
Role of tissue factor in cancer	1.09E-02	2.8% 3/107
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
IL10RA	1.53E-03	
IRF2	1.85E-03	
FLNA	1.87E-03	
IFNG	2.30E-03	
PARP14	4.04E-03	
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Hematological system development and function, cardiovascular disease, organismal injury and abnormalities		41
Connective tissue disorders, hematological disease, immunological disease		28
Neurological disease, cell-to-cell signaling and interaction, nervous system development and function		26
Developmental disorder, hereditary disorder, immunological disease		21
Cell-to-cell signaling and interaction		17
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TAP2	11.466	UP
Zfp493	10.750	UP
Olf432	7.824	UP
DLGAP2	7.673	UP
HLA-E	6.735	UP
PPARGC1B	6.524	UP
LGI1	6.288	UP
Olf243/Olf628	5.679	UP
ASPG	5.407	UP
H2-T24	5.054	UP
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TNNI3	-5.351	DOWN
VAMP2	-5.270	DOWN
GDPD5	5.175	DOWN
NUDC3	-4.772	DOWN
Gm4956	-4.767	DOWN
CDH13	-3.899	DOWN
Olf52	-3.704	DOWN
DAD1	-3.335	DOWN
USP35	-3.188	DOWN
CLEC4M	-3.108	DOWN

Πίνακας 4.2.2: Ανάλυση ΔΕΓ του νεφρού στο στάδιο της νεφρίτιδας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Antigen presentation pathway	2.57E-04	7.4% 2/27
TR/RXR activation	2.31E-03	2.5% 2/81
Bile acid biosynthesis, neutral pathway	1.06E-02	8.3% 1/12
Methylglyoxal degradation III	1.24E-02	7.1% 1/14
Extrinsic prothrombin activation pathway	1.42E-02	6.2% 1/16
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
PPARGC1A	5.25E-04	
VAMP3	8.09E-04	
HCFC1	1.62E-03	
Tap	1.62E-03	
SYP	1.62E-03	
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Lipid metabolism, molecular transport, small molecule biochemistry		43
Κυριότερες λίστες Τοx		
Όνομα	P value	Overlap
TR/RXR activation	2.31E-03	2.5% 2/81
Genes downregulated in response to chronic renal failure	8.87E-03	10.0% 1/10
Reversible glomerulonephritis biomarker panel	2.03E-02	4.3% 1/23
Renal proximal tubular toxicity biomarker panel	2.20E-02	4.0% 1/25
Positive acute phase response proteins	2.46E-02	3.6% 1/28
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
WDR86	9.448	UP
TAP2	8.996	UP
Zfp493	8.010	UP
FGA	6.538	UP
HLA-E	6.256	UP
PPARGC1B	6.175	UP
CABP2	4.687	UP
HM13	4.412	UP
Cml2	3.461	UP
BC002163	3.360	UP
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TFCP2	-8.153	DOWN
AKR1C1/AKR1C2	-7.003	DOWN
NUDCD3	-5.451	DOWN
VAMP2	-4.800	DOWN
4930481A15Rik	-2.639	DOWN
GAS6	-2.468	DOWN

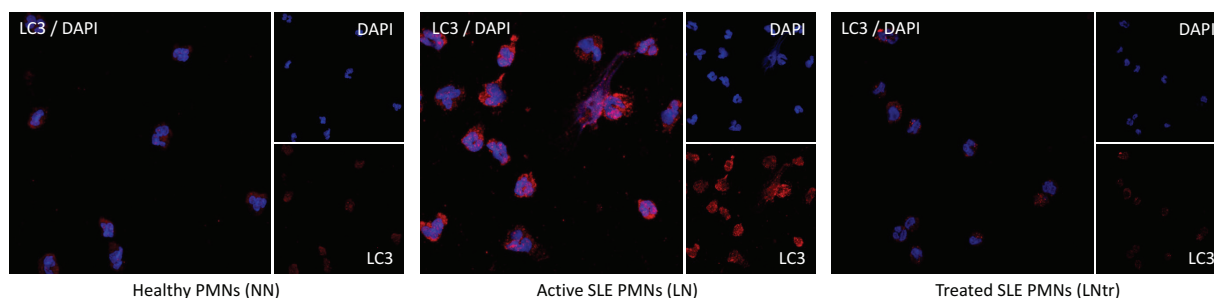
Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκαν οι οδοί της ενεργοποίησης LXR/RXR ($p=4.18E-03$), της σύνθεσης της ζυμοστερόλης ($p=1.76E-02$), της κετόλυσης ($p=2.33E-02$) και της ενεργοποίησης TR/RXR ($p=2.38E-02$). Τα κυριότερα ρυθμιστικά δίκτυα συμμετέχουν σε λειτουργίες που συσχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, το μεταβολισμό λιπιδίων και τη βιοχημεία μικρών μορίων (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.6). Στο **στάδιο της προ-αυτοανοσίας**, στις κυριότερες κανονικές οδούς είναι η οδός της φωσφορικής πεντόζης ($p=1.77E-03$), της αποδόμησης της 4-υδροξυπρολίνης ($p=2.13E-03$) και της ρύθμισης του eIF4 και p70S6K ($p=1.79E-03$). Τα ρυθμιστικά δίκτυα συμμετέχουν κυρίως σε λειτουργίες προσκόλλησης των νεφρικών κυττάρων και απόπτωσης (συμπληρωματικός πίνακας 4.2.7). Όπως και στο σπλήνα, έτσι και στο νεφρό, κατά το **στάδιο της νεφρίτιδας** διαπιστώνεται η κανονική οδός του αντιγονοπαρουσιασμού ($p=2.57E-04$), αλλά και της ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού της πήξης ($p=1.42E-02$) (πίνακας 4.2.2). Συμπερασματικά, στο νεφρό των ζωικών προτύπων με λύκο, επιπρόσθετα των αναμενόμενων οδών ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, διαπιστώνεται συμμετοχή νέων κανονικών οδών, όπως της οδού ενεργοποίησης της εξωγενούς πήξης, η οποία διαπιστώθηκε και στο σπλήνα κατά το ίδιο στάδιο του νοσήματος.

4.3. ΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ

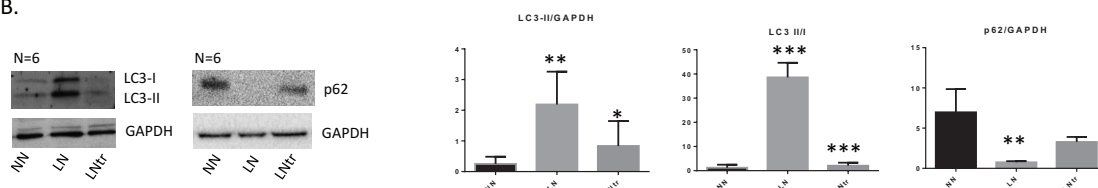
Για να επιλεγεί μία οδός προς περαιτέρω μελέτη, αναζητήθηκαν στα δεδομένα της ανάλυσης νέες κανονικές οδοί που φαίνεται ότι συμμετέχουν στα ζωικά πρότυπα λύκου, τόσο στο περιφερικό λεμφικό όργανο όσο και σε τελικό όργανο-στόχο του νοσήματος. Εκτός από τις αναμενόμενες οδούς που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της συστημικής ανοσίας (όπως η οδός της σηματοδότησης IFN και η οδός του αντιγονοπαρουσιασμού), στα ζωικά πρότυπα λύκου στο στάδιο της νεφρίτιδας διαπιστώνεται η συμμετοχή της κανονικής οδού της ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού της πήξης, τόσο στο σπλήνα όσο και στο νεφρό. Προηγούμενη μελέτη μας έδειξε ότι, ο ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF), που στα ουδετερόφιλα είναι ενδοκυττάριος, μεταφέρεται σε καταστάσεις σήψης εξωκυττάρια μέσω των εξωκυττάρων παγίδων ουδετεροφίλων (NETs). Ο TF αποτελεί τον κυριότερο *in vivo* ενεργοποιητή της εξωγενούς οδού της πήξης αλλά ταυτόχρονα, μέσω υποδοχέων PAR, ενεργοποιεί τη φλεγμονή²²⁸. Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες μεταγραφώματος της ομάδας μας με μικροσυστοιχίες cDNA από μυελό των οστών και miRNA από περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος ασθενών με ενεργό και ανενεργό ΣΕΛ έδειξαν ότι, οι ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από μία γονιδιακή ταυτότητα ουδετεροφίλων αλλά και από διαταραχή γονιδίων και miRNA που ρυθμίζουν την αυτοφαγία^{90,91}. **Αναζητήθηκε στη βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε στην παρούσα μελέτη**, η εμπλοκή γονιδίων αυτοφαγίας και ουδετεροφίλων στο ζωικό πρότυπο λύκου στα διάφορα στάδια του νοσήματος. Παρατηρήθηκε ότι, στο σπλήνα των ζωικών προτύπων λύκου, γονίδια αυτοφαγίας και ουδετεροφίλων είναι διαφορετικά εκφραζόμενα σε σχέση με το σπλήνα υγιών προτύπων και στα τρία στάδια του νοσήματος (συμπληρωματικός πίνακας 4.3.1-4.3.2). Επομένως, ετέθη η **επιστημονική υπόθεση** ότι, η επαγόμενη με αυτοφαγία μεταφορά του TF στα NETs μπορεί να αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται στους ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. **Επόμενος στόχος της μελέτης** ήταν η διερεύνηση του ρόλου των διακοσμημένων με TF NETs στο ΣΕΛ.

Για να διερευνηθεί η αυτοφαγία των ουδετεροφίλων των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, απομονώθηκαν ουδετερόφιλα από υγιείς μάρτυρες (healthy neutrophils), από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (active SLE neutrophils) και από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία με υδροξυχλωροκίνη (treated SLE neutrophils) που αποτελεί αναστολέα αυτοφαγίας. Τα επίπεδα αυτοφαγίας αξιολογήθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς την έκφραση της LC3, που αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας και, με ανοσοαποτύπωση τόσο ως προς τη μετατροπή της LC3-I στη λιπιδική LC3-II, όσο και ως προς την αποδόμηση της p62. Διαπιστώθηκε ότι, τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας σε σχέση με τα υγιή ουδετερόφιλα, όπως φαίνεται από την αυξημένη έκφραση της LC3 στον ανοσοφθορισμό και, την αυξημένη LC3-II, τον αυξημένο λόγο LC3-II/LC3-I και τη μείωση της p62 στην ανοσοαποτύπωση. Τα φαινόμενα αυτά δεν παρατηρήθηκαν στα ουδετερόφιλα των ασθενών υπό θεραπεία με υδροξυχλωροκίνη. Έτσι, υποδεικνύεται ότι, τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας σε σχέση με τα υγιή ουδετερόφιλα (εικόνα 4.3.1).

A.



B.

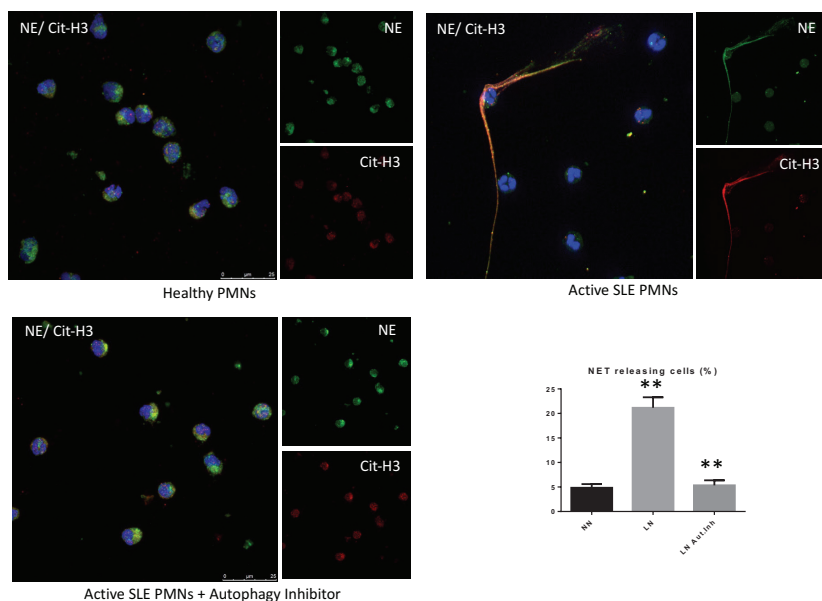


Εικόνα 4.3.1: Τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας. (Α.) Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα (healthy PMNs, NN), ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (active SLE PMNs, LN) και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία με υδροξυχλωροκίνη (treated SLE PMNs, LNtr). Τα επίπεδα αυτοφαγίας αξιολογήθηκαν με ανοσοφθορισμό ως προς την έκφραση της LC3, η οποία χρωματίστηκε με κόκκινο. Με DAPI (μπλε), χρωματίστηκε το DNA. **(Β.)** Τα επίπεδα αυτοφαγίας μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών ως προς την έκφραση της LC3-II, ως προς το λόγο LC3-II/I και ως προς την αποδόμηση της p62. Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση της GAPDH ως πρωτεΐνης αναφοράς. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

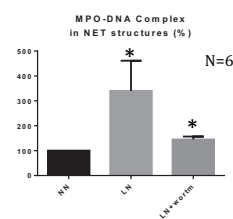
4.4. ΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΝΕΤΩΣΗ, Η ΟΠΟΙΑ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Για να μελετηθεί η απελευθέρωση των NETs στο ΣΕΛ, απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ και, καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (wortmannin ή υδροξυχλωροκίνης). Όπως διαπιστώνεται σε συνεστιακή μικροσκόπηση (α) ως προς τον συνεντοπισμό μυελοπεροξειδάσης (myeloperoxidase, MPO), που αποτελεί ένζυμο ουδετεροφιλικών κοκκίων, και εξωκυττάριου DNA (DAPI) και (β) ως προς τον συνεντοπισμό κιτρολινιοποιημένης ιστόνης-3 (citrullinated histone 3, cit-H3) και ελαστάσης των ουδετεροφίλων, που αποτελεί ένζυμο των ουδετεροφιλικών κοκκίων, τα ουδετερόφιλα των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ΝΕΤωσης σε σχέση με τα υγιή ουδετερόφιλα (εικόνα 4.4.1Α, συμπληρωματική εικόνα 4.4.1). Η απελευθέρωση των NETs από τα ουδετερόφιλα των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ αποδεικνύεται εξαρτώμενη από την αυτοφαγία, όπως φαίνεται από την αναστολή της απελευθέρωσης NETs μετά την προεπώαση των κυττάρων με αναστολείς αυτοφαγίας (εικόνα 4.4.1Α). Με τη χρήση ELISA για τη μέτρηση του συμπλόκου MPO-DNA (MPO-DNA complex) τόσο σε υπερκείμενο καλλιέργειας ουδετεροφίλων (εικόνα 4.4.1Β) όσο και σε ορό από περιφερικό αίμα (εικόνα 4.4.1Γ), διαπιστώνεται αύξηση της απελευθέρωσης NETs από τα ουδετερόφιλα ασθενών με ΣΕΛ και όμοια απελευθέρωση NETs από τα ουδετερόφιλα ασθενών με ΣΕΛ υπό θεραπεία, σε σχέση με τα υγιή ουδετερόφιλα. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι τα ουδετερόφιλα των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένη ΝΕΤωση, η οποία επάγεται από την αυτοφαγία.

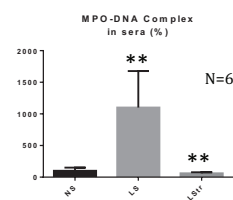
A.



B.



Γ.

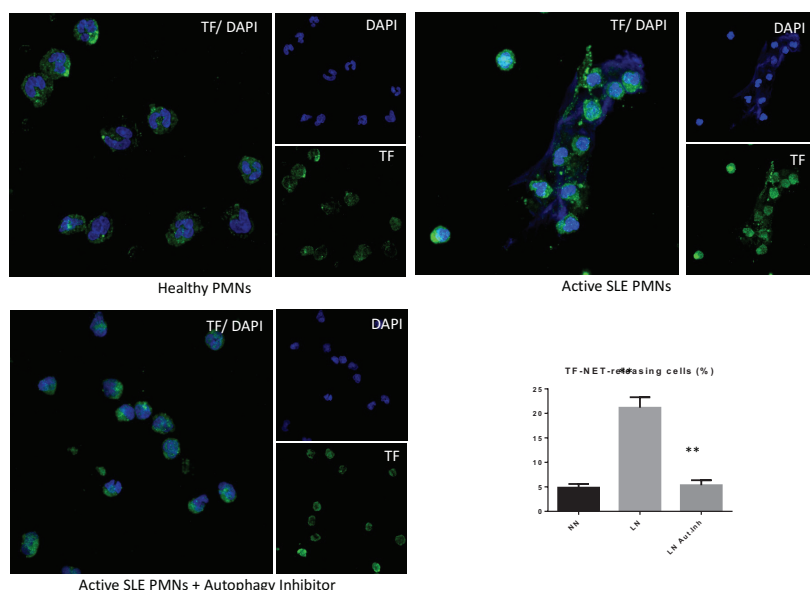


Εικόνα 4.4.1: Τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένη NETωση η οποία επάγεται από την αυτοφαγία. (Α.) Απομονώθηκαν ουδετερόφιλα από υγιείς (healthy PMNs) και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (active SLE PMNs). Τα ουδετερόφιλα ασθενών με ΣΕΛ καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (active SLE PMNs + Autophagy Inhibitor). Η NETωση αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό κιτρουλινοποιημένης ιστόνης 3 (cit-H3) (κόκκινο) με ελασάση ουδετεροφίλων (NE) (πράσινο). Το DNA χρωματίστηκε με DAPI (μπλε). **(Β.)** Απομονώθηκαν δομές NETs από υπερκείμενα καλλιέργειας ουδετεροφίλων από υγιείς (NN) και από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (LN). Τα LN καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας. Με τη μέθοδο της ELISA μετρήθηκε το σύμπλοκο μυελοπεροξειδάσης-DNA (MPO-DNA complex). **(Γ.)** Μετρήθηκε με ELISA το MPO-DNA complex σε ορό που απομονώθηκε από υγιή άτομα (NS), από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (LS) και από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία με υδροξυχλωροκίνη (LStr). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

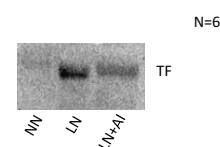
4.5. Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΙΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΑ NETs ΤΟΥ ΣΕΛ, ΟΔΗΓΩΝΤΑΣ ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Για να διαπιστωθεί εάν η επαγόμενη με αυτοφαγία μεταφορά του TF στα NETs μπορεί να αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται στους ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ, διερευνήθηκε η απελευθέρωση TF στα NETs ασθενών με ενεργό ΣΕΛ. Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ και, καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (wortmannin). Η έκφραση του TF στα ουδετερόφιλα μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό. Η απελευθέρωση του TF στα NETs μελετήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό του TF με το εξωκυττάριο DNA (DAPI) και με ανοσοαποτύπωση σε δομές NETs που απομονώθηκαν από υπερκείμενα καλλιέργειών σε συνθήκες αναστολής ή διέγερσης. Διαπιστώνεται ότι, τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα TF (εικόνα 4.5.1Α) και αυξημένη απελευθέρωση NETs διακοσμημένων με TF, η οποία επάγεται από την αυτοφαγία (εικόνα 4.5.1Α-Β). Για να διερευνηθεί η λειτουργικότητα του TF στα NETs, μετρήθηκε η παραγωγή συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT complex) σε υγιές πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια από υπερκείμενα καλλιέργειών. Διαπιστώθηκε ότι, η παραγωγή TAT complex είναι αυξημένη στα υπερκείμενα καλλιέργειών ουδετεροφίλων από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. Η αύξηση αυτή δεν παρατηρήθηκε όταν στις καλλιέργειες ετέθη εξουδετερωτικό αντίσωμα κατά του TF ή DNase I (εικόνα 4.5.1Γ). Άρα, διαπιστώνεται ότι, τα NETs ασθενών με ενεργό ΣΕΛ είναι διακοσμημένα με TF, ο οποίος είναι δραστικός και οδηγεί σε παραγωγή θρομβίνης.

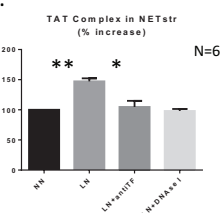
A.



B.



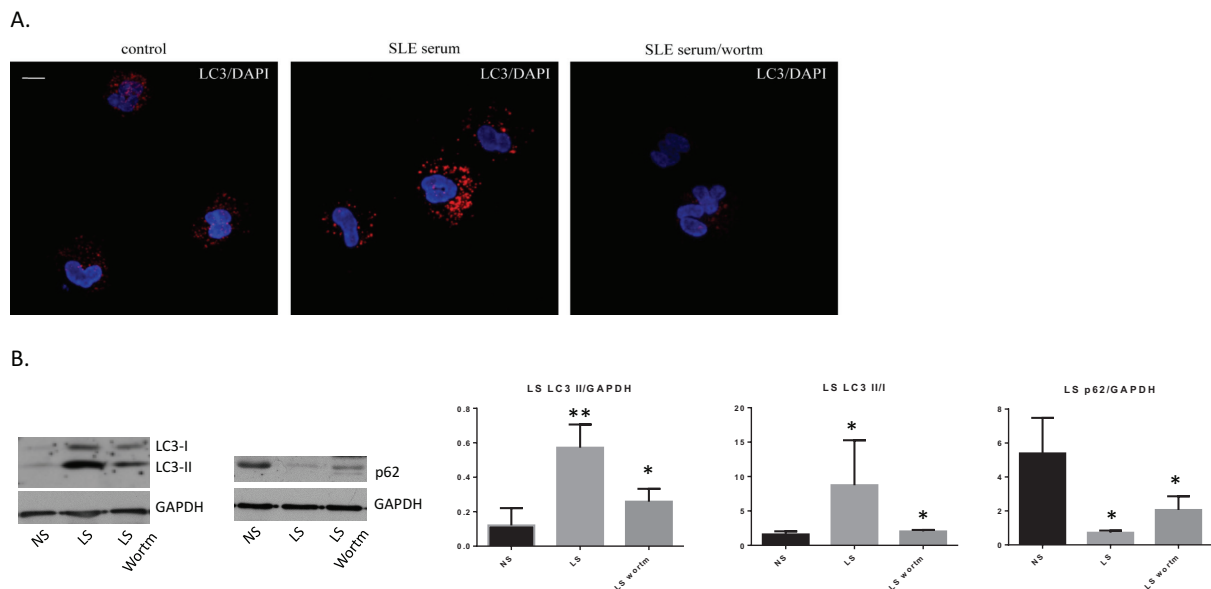
Γ.



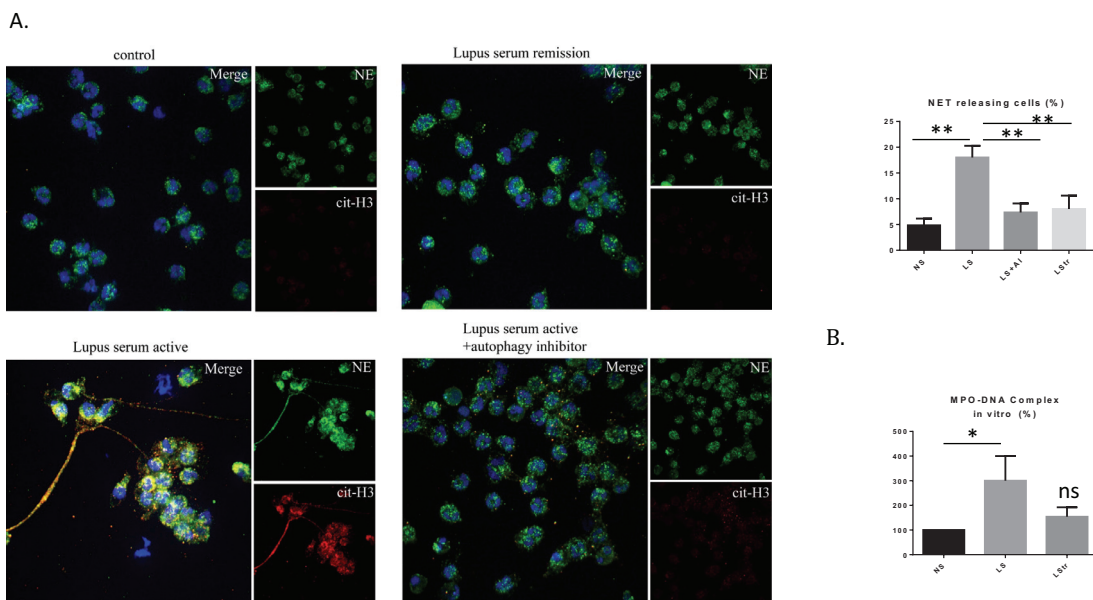
Εικόνα 4.5.1: Η αυτοφαγία επάγει τη μεταφορά δραστικού TF στα NETs του ΣΕΛ, οδηγώντας σε παραγωγή θρομβίνης. (Α.) Απομονώθηκαν ουδετερόφιλα από υγιείς (healthy PMNs) και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (active SLE PMNs). Τα ουδετερόφιλα ασθενών με ΣΕΛ καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (active SLE PMNs + Autophagy Inhibitor). Η έκφραση του TF στα NETs αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό TF και εξωκυττάριου DNA (μπλε). **(Β.)** Απομονώθηκαν δομές NETs από υπερκείμενα καλλιέργειας ουδετεροφίλων από υγιείς (NN) και από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (LN). Τα LN καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (LN+AI). Η έκφραση του TF αξιολογήθηκε με ανοσοαποτύπωση σε πρωτεΐνη που κατακρημνίστηκε. **(Γ.)** Απομονώθηκαν δομές NETs από υπερκείμενα καλλιέργειας ουδετεροφίλων από υγιείς (NN) και από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (LN). Τα LN καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (LN+AI). Με ELISA μετρήθηκε η παραγωγή του συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT complex) από τα NETs, σε υγιές πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια. Για την αναστολή του TF των NETs χρησιμοποιήθηκε εξουδετερωτικό anti-TF αντίσωμα. Για τη διάσπαση των NETs χρησιμοποιήθηκε DNase I. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4.6. Ο ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΝΕΤΩΣΗ ΣΤΑ ΥΓΙΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

Για να διαπιστωθεί εάν τα παραπάνω ευρήματα αποδίδονται σε εσωτερική κυτταρική διαταραχή των ουδετεροφίλων των ασθενών με ΣΕΛ, έγιναν *in vitro* πειράματα σε υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν με ορό ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας. Όπως διαπιστώνεται με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς την έκφραση της LC3 και με ανοσοαποτύπωση τόσο ως προς τη μετατροπή της LC3-I στη λιπιδική LC3-II, όσο και ως προς την αποδόμηση της p62, ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ οδήγησε σε υπερέκφραση των επιπέδων αυτοφαγίας στα υγιή ουδετερόφιλα (εικόνα 4.6.1). Για να μελετηθεί η NETωση, απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και επωάστηκαν είτε με υγιή ορό είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας, είτε με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία με υδροξυχλωροκίνη. Όπως διαπιστώνεται από συνεστιακή μικροσκόπηση (α) ως προς τον συνεντοπισμό μυελοπεροξειδάσης και εξωκυττάριου DNA (DAPI) και (β) ως προς τον συνεντοπισμό κιτρουλινοποιημένης ιστόνης-3 και ελαστάσης των ουδετεροφίλων, τα υγιή ουδετερόφιλα εμφανίζουν αυξημένη απελευθέρωση NETs, η οποία εξαρτάται από την αυτοφαγία. Τα επίπεδα NETωσης των ουδετεροφίλων που επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία είναι όμοια με αυτά που επωάστηκαν με υγιή ορό (εικόνα 4.6.2A, συμπληρωματική εικόνα 4.6.1). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα του MPO-DNA complex εμφανίζονται αυξημένα σε υπερκείμενα καλλιέργειας υγιών ουδετεροφίλων που επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ και, όμοια σε υπερκείμενα καλλιέργειας υγιών ουδετεροφίλων που επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό αγωγή (εικόνα 4.6.2B). Τα επίπεδα NETωσης μειώθηκαν μετά από επώαση τόσο με wortmannin όσο και με υδροξυχλωροκίνη (συμπληρωματική εικόνα 4.6.2). Επομένως, αποδεικνύεται ότι, ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ επάγει την αυτοφαγία στα υγιή ουδετερόφιλα και, οδηγεί σε εξαρτώμενη από την αυτοφαγία NETωση.



Εικόνα 4.6.1: Ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ επάγει την αυτοφαγία στα υγιή ουδετερόφιλα. (Α.) Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν είτε με υγιή ορό είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας. Τα επίπεδα αυτοφαγίας αξιολογήθηκαν με ανοσοφθορισμό ως προς την έκφραση της LC3 (κόκκινο). Με DAPI (μπλε) χρωματίστηκε το DNA. **(Β.)** Τα επίπεδα αυτοφαγίας μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών ως προς την έκφραση της LC3-II, ως προς το λόγο LC3-II/I και ως προς την αποδόμηση της p62. Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση της GAPDH ως πρωτεΐνης αναφοράς. * $P < 0.05$, ** $p < 0.005$.

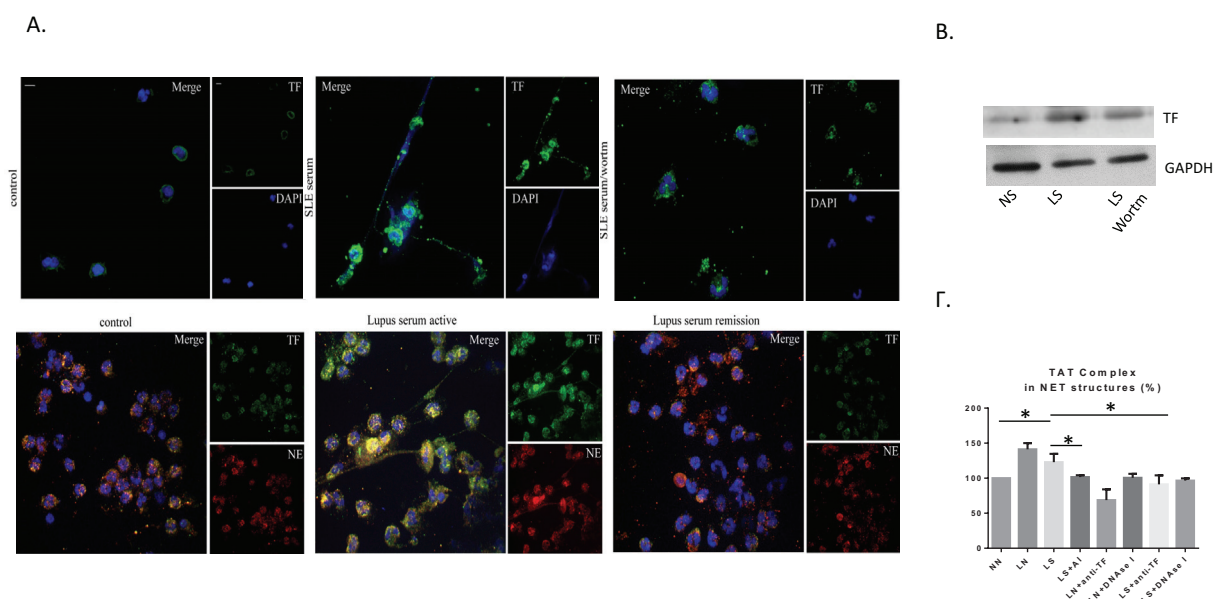


Εικόνα 4.6.2: Ο ορός από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ αυξάνει την απελευθέρωση NETs. (Α.) Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα (control), ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (Lupus serum active) και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία (Lupus serum remission). Επίσης, ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ καλλιεργήθηκαν παρουσία αναστολέα αυτοφαγίας (Lupus serum active + Autophagy Inhibitor). Η NETωση αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό κιτρουλινοποιημένης ιστόνης 3 (cit-H3) (κόκκινο) με ελασάση ουδετεροφίλων (NE) (πράσινο). Το DNA χρωματίστηκε με μπλε. **(Β.)** Απομονώθηκαν δομές NETs από υπερκείμενα καλλιεργείων με υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν είτε με φυσιολογικό ορό (NS) είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (LS), είτε με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό αγωγή (LS+AI). Με τη μέθοδο της ELISA μετρήθηκε το σύμπλοκο μυελοπεροξειδάσης-DNA (MPO-DNA complex). * $P < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4.7. Ο ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΕΛ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤF ΣΤΑ ΥΓΙΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ NETs ΔΙΑΚΟΣΜΗΜΕΝΩΝ ΜΕ ΔΡΑΣΤΙΚΟ ΤF ΚΑΙ IL-17

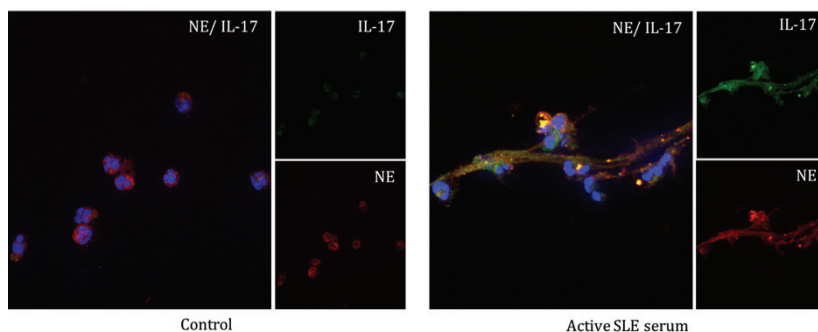
Για να μελετηθεί η επίδραση του ορού των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ στα υγιή ουδετερόφιλα, απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και επωάστηκαν με ορό ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας. Με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό του TF με την εξωκυττάρια χρωματίνη και με ανοσοαποτύπωση ως προς τον TF, διαπιστώνεται ότι, ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ αυξάνει την έκφραση των επιπέδων του TF στα ουδετερόφιλα (εικόνα 4.7.1A-B). Επίσης, με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό του TF με την ελαστάση των ουδετεροφίλων, διαπιστώνεται ότι ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ αυξάνει τη διακοσμημένη με TF NETωση στα υγιή ουδετερόφιλα, εύρημα το οποίο δεν παρατηρείται σε ουδετερόφιλα που επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία (εικόνα 4.7.1A). Σε υπερκείμενα καλλιέργειας υγιών ουδετεροφίλων που επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ διαπιστώνεται αυξημένη παραγωγή TAT complex, η οποία μειώνεται σε προεπάση της καλλιέργειας με εξουδετερωτικό αντίσωμα του TF ή με DNase I (εικόνα 4.7.1Γ).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι, η προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη IL-17 συμμετέχει στην παθοφυσιολογία του ΣΕΛ. Για να διαπιστωθεί πιθανή επιπρόσθετη ύπαρξη IL-17 στα NETs του ΣΕΛ, απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν είτε με υγιή ορό είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. Η έκφραση της IL-17 στα NETs αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό IL-17, ελαστάσης ουδετεροφίλων και εξωκυττάρου DNA. Διαπιστώθηκε ότι, τα NETs ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, επιπρόσθετα του TF, φέρουν και IL-17 (εικόνα 4.7.2). Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, το εξωτερικό περιβάλλον του ΣΕΛ ευθύνεται για την αυξημένη έκφραση του TF στα ουδετερόφιλα, για την εξαρτώμενη από την αυτοφαγία μεταφορά του στα NETs και για την έκφραση της IL-17 στα NETs.



Εικόνα 4.7.1: Ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ αυξάνει τα επίπεδα του TF στα υγιή ουδετερόφιλα και, οδηγεί σε απελευθέρωση NETs διακοσμημένων με δραστικό TF. (Α.) Άνω τμήμα εικόνας: Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και επωάστηκαν είτε με ορό από υγιείς (control), είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (SLE serum), είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία αναστολέα αυτοφαγίας (SLE serum/wortmannin). Η έκφραση του TF στα ουδετερόφιλα αξιολογήθηκε με ανοσοφθορισμό για τον TF (πράσινο). Τα διακοσμημένα με TF NETs αξιολογήθηκαν ως προς το συνεντοπισμό TF (πράσινο) με εξωκυττάρια χρωματίνη (DAPI, μπλε). **Κάτω τμήμα εικόνας:** Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και επωάστηκαν είτε με ορό από υγιείς (control), είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (SLE serum active), είτε με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό θεραπεία (SLE serum remission). Τα NETs αξιολογήθηκαν ως εξωκυττάρια δομές όπου συνεντοπίζεται κιντρουλινοποιημένη ιστόνη 3 (cit-H3) (κόκκινο) με ελαστάση ουδετεροφίλων (NE) (πράσινο). Το DNA χρωματίστηκε με μπλε. **(Β.)** Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα και επωάστηκαν είτε με ορό από υγιείς (control), είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (SLE serum), είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία αναστολέα αυτοφαγίας (SLE serum/wortmannin). Η έκφραση του TF στα ουδετερόφιλα αξιολογήθηκε με ανοσοαποτύπωση για τον TF. Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση της GAPDH ως πρωτεΐνης αναφοράς * P<0.05, ** p<0.005. **(Γ.)** Απομονώθηκαν δομές NETs από υπερκείμενα καλλιέργειας ουδετεροφίλων από υγιείς και επωάστηκαν είτε με ορό από υγιείς (NN), είτε με ορό από ασθενείς με

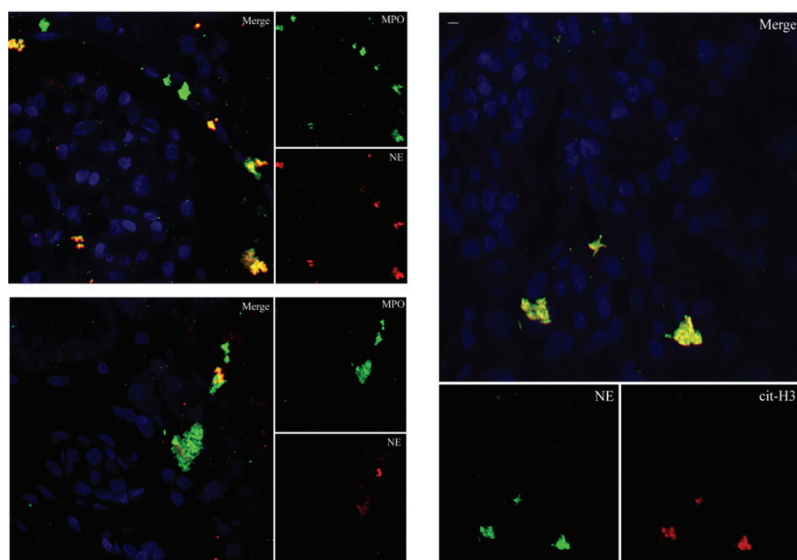
ενεργό ΣΕΛ (LS), είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία αναστολέα αυτοφαγίας (LS+AI). Με ELISA μετρήθηκε η παραγωγή του συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT complex) από τα NETs, σε πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια. Για την αναστολή του TF των NETs χρησιμοποιήθηκε εξουδετερωτικό anti-TF αντίσωμα. Για τη διάσπαση των NETs χρησιμοποιήθηκε DNase I. * $p < 0.05$.



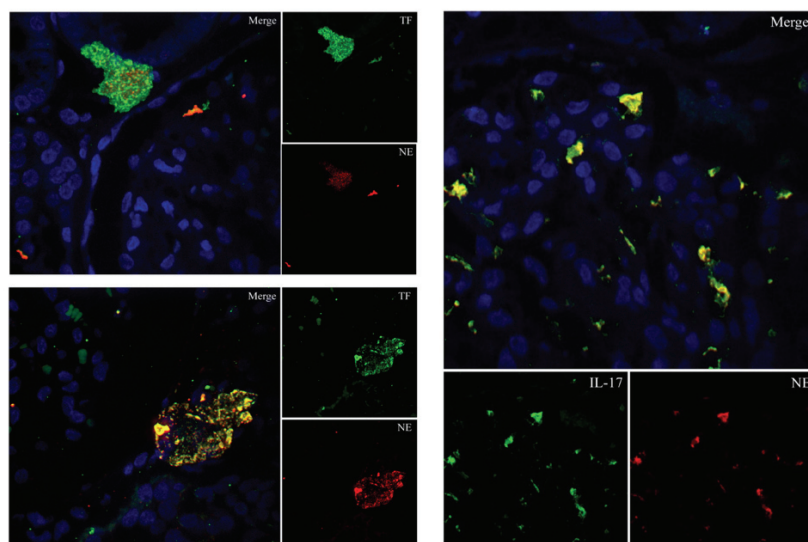
Εικόνα 4.7.2: Τα NETs του ΣΕΛ είναι διακοσμημένα με IL-17. Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επώαστηκαν είτε με υγιή ορό (control) είτε με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (active SLE serum). Η έκφραση της IL-17 στα NETs αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό της IL-17 (πράσινο) με ελαστάση ουδετεροφίλων (NE, κόκκινο) και εξωκυττάριο DNA (μπλε).

4.8. ΤΑ ΔΙΑΚΟΣΜΗΜΕΝΑ ΜΕ TF ΚΑΙ IL-17 NETs ΕΝΑΠΟΤΙΘΕΝΤΑΙ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΗ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ ΛΥΚΟΥ

Για να διερευνηθεί η συμμετοχή των διακοσμημένων με TF ή IL-17 NETs στη νεφρίτιδα λύκου, μελετήθηκε, αρχικά, η *in situ* εναπόθεση NETs σε νεφρικές βιοψίες ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου. Όπως φαίνεται σε συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς τη συνεντόπιση MPO με ελαστάση ουδετεροφίλων αλλά και της κιτρουλινοποιημένης H3 με την ελαστάση ουδετεροφίλων, παρά το ότι δε διαπιστώθηκαν ακέραια ουδετερόφιλα στον ιστό, η εναπόθεση των NETs ήταν έκδηλη τόσο στο σπείραμα όσο και στο σωληναριοδιάμεσο χώρο (εικόνα 4.8.1). Οι νεφροί αναλύθηκαν, στη συνέχεια, για την *in situ* εναπόθεση NETs διακοσμημένων με TF ή IL-17 με ανοσοφθορισμό ως προς την εξωκυττάρια συνεντόπιση του TF ή της IL-17 με την ελαστάση των ουδετεροφίλων (NE). Παρατηρήθηκαν NETs διακοσμημένα με IL-17 στα σπειράματα ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου (εικόνα 4.8.2 δεξιά τμήμα) και, NETs διακοσμημένα με TF στα σπειράματα αλλά και στο σωληναριοδιάμεσο χώρο κοντά σε νεφρικά σωληναριακά κύτταρα και στην κάψα του Bowman (εικόνα 4.8.2 αριστερό τμήμα). Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει την εναπόθεση των διακοσμημένων με TF ή IL-17 NETs στο νεφρικό παρέγχυμα ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου και, υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή τους στην παθογένεια της νεφρίτιδας λύκου. Βάσει του εντοπισμού τους, τα διακοσμημένα με TF NETs πιθανά συμμετέχουν στη ρήξη της κάψας του Bowman και στη δημιουργία μηνοειδών σχηματισμών, γεγονότα που χαρακτηρίζουν την ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα του ΣΕΛ.



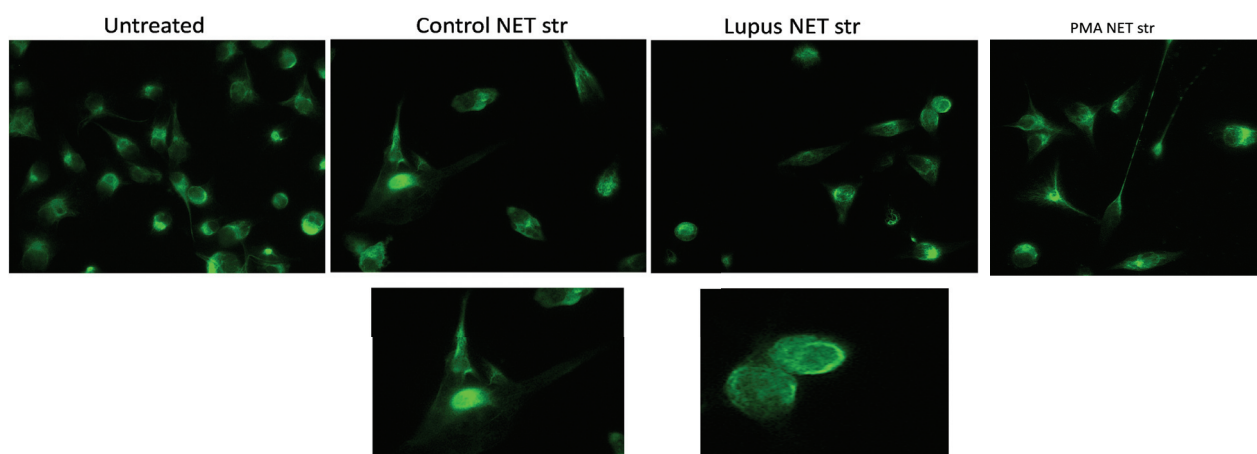
Εικόνα 4.8.1: Τα NETs εναποτίθενται στο νεφρό ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου. Η εναπόθεση NETs αξιολογήθηκε σε νεφρικές τομές ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου ως προς το συνεντοπισμό (αριστερά) της MPO (πράσινο) με NE (κόκκινο) και εξωκυττάρια DNA (DAPI με μπλε) και (δεξιά) της NE (πράσινο) με cit-H3 (κόκκινο) και εξωκυττάρια DNA (DAPI με μπλε).



Εικόνα 4.8.2: Τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs εναποτίθενται στο νεφρό ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου. **Αριστερό τμήμα εικόνας:** Η εναπόθεση NETs διακοσμημένων με TF μελετήθηκε σε νεφρικές βιοψίες ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό TF (πράσινο) με NE (κόκκινο). **Δεξί τμήμα εικόνας:** Η εναπόθεση NETs διακοσμημένων με IL-17 μελετήθηκε ως προς το συνεντοπισμό IL-17 (πράσινο) με NE (κόκκινο). Σε όλες τις τομές, το DNA χρωματίστηκε με μπλε (DAPI).

4.9. ΤΑ TF- ΚΑΙ IL-17-ΔΙΑΚΟΣΜΗΜΕΝΑ NETs ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΕΛ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΣΠΕΙΡΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΩΝ) ΚΑΙ ΑΥΞΑΝΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΣΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

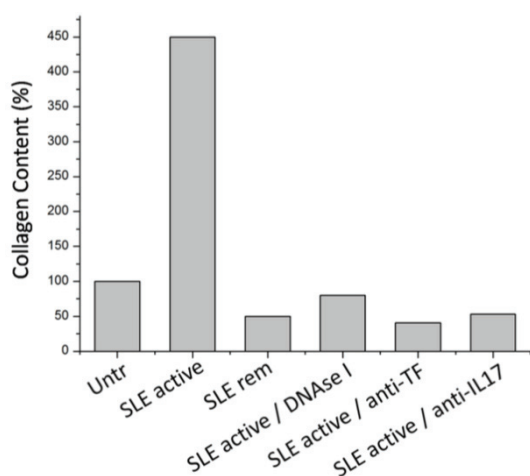
Επειδή τα TF- και IL-17-διακοσμημένα NETs εντοπίστηκαν τόσο στο σπείραμα όσο και στο σωληναριοδιάμεσο χώρο, επιλέχθηκε η μελέτη της επίδρασής τους τόσο στα ποδοκύτταρα όσο και στους ινοβλάστες. Για να διαπιστωθεί εάν τα NETs των ασθενών με ΣΕΛ επιδρούν στα νεφρικά κύτταρα, ανθρώπινα σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα) καλλιεργήθηκαν παρουσία NETs στο καλλιεργητικό υλικό. Όπως φαίνεται με ανοσοφθορισμό για την έκφραση vimentin (εικόνα 4.9.1) ή για την έκφραση του WT1 (συμπληρωματική εικόνα 4.9.1), τα ποδοκύτταρα έχασαν το ατρακτοειδές τους σχήμα, απέκτησαν σφαιρική δομή, έχασαν τις προσεκβολές τους και εμφάνισαν κενотоπίωση στο κυτταρόπλασμά τους. Τα ευρήματα αυτά δε διαπιστώθηκαν σε ποδοκύτταρα που επώαστηκαν με NETs από υγιείς ή με NETs που προήλθαν από διέγερση με τη χημική ουσία PMA, δείχνοντας ότι τα NETs του ΣΕΛ ευθύνονται για την τροποποίηση της μορφολογίας των ποδοκυττάρων.



Εικόνα 4.9.1: Τα NETs των ασθενών με ΣΕΛ τροποποιούν τη μορφολογία των ανθρώπινων επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων (ποδοκυττάρων). Ανοσοφθορισμός για vimentin. Ανθρώπινα επιθηλιακά σπειραματικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό

μέσο (Untreated) ή σε καλλιεργητικό μέσο παρουσία δομών NET από υγιείς (Control NET str), δομών NETs από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (Lupus NET str) ή δομών NETs μετά από διέγερση ουδετεροφίλων με τη χημική ουσία PMA (PMA NET str). Στο κάτω τμήμα απεικονίζεται η μεγέθυνση των άνω εικόνων.

Για να μελετηθεί η επίδραση των διακοσμημένων με TF και IL-17 NETs σε ινοβλάστες, καλλιεργήθηκαν πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες παρουσία NETs στο καλλιεργητικό υλικό. Όπως διαπιστώνεται χρησιμοποιώντας το Sircol Collagen Assay Kit, το διαλυτό κολλαγόνο I-V που εκκρίνεται από τους πνευμονικούς ινοβλάστες στο καλλιεργητικό μέσο είναι 4.5 φορές περισσότερο στους ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν παρουσία NETs από *in vitro* διέγερση ουδετεροφίλων με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ σε σχέση με αυτά από *in vitro* διέγερση με ορό από υγιείς εθελοντές ή από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. Η παραγωγή κολλαγόνου αποκαταστάθηκε όταν οι ινοβλάστες προεπώσθησαν είτε με DNase I, είτε με εξουδετερωτικό anti-TF είτε με anti-IL-17 (εικόνα 4.9.2), υποδεικνύοντας ότι ο TF και η IL-17 των NETs ευθύνεται για την αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου.



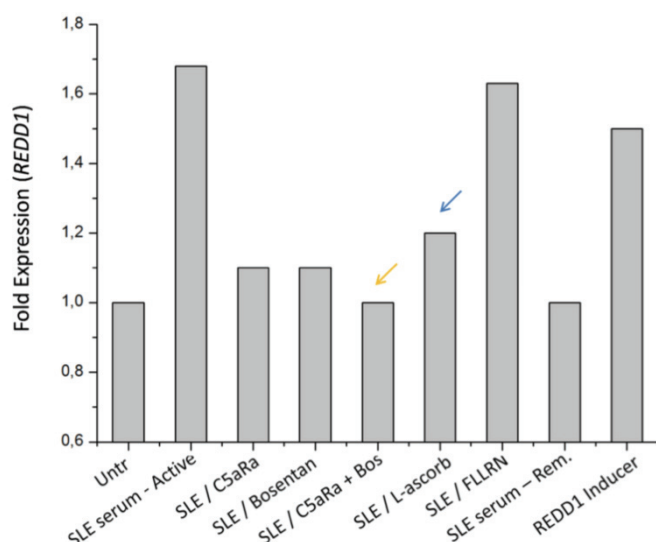
Εικόνα 4.9.2: Στο ΣΕΛ, τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από πνευμονικούς ινοβλάστες. Ποσοτικοποίηση διαλυτού κολλαγόνου I-V χρησιμοποιώντας το Sircol Collagen Assay Kit. Πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν παρουσία NETs που απομονώθηκαν μετά από *in vitro* διέγερση ουδετεροφίλων με υγιή ορό ή με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ ή με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ σε ύφεση, ή με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ μετά από προεπώαση με DNase I ή anti-TF ή anti-IL-17. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται με %.

4.10. Η ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΤΟ C5a ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΕΛ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ ΟΔΟ HIF-1/REDD1 ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ, Η ΟΠΟΙΑ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε ότι η πρωτεΐνη REDD1, που επάγεται σε καταστάσεις στρες, αυξάνει την απελευθέρωση NETs στον Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό μειώνοντας το όριο ενεργοποίησης της αυτοφαγίας των ουδετεροφίλων. Για να κατανοηθεί ο μηχανισμός αύξησης της αυτοφαγίας στα ουδετερόφιλα στο ΣΕΛ, διερευνήθηκε πιθανή συμμετοχή του REDD1 στη διεργασία. Όπως διαπιστώνεται με qPCR, τα υγιή ουδετερόφιλα που επώασθησαν με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου του REDD1 σε σχέση είτε με τα υγιή ουδετερόφιλα που επώασθησαν με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ σε ύφεση ή με ουδετερόφιλα χωρίς επώαση (εικόνα 4.10.1). Ο HIF-1α, ένας οξυγονο-ευαίσθητος μεταγραφικός παράγοντας που επιδρά σε μια πληθώρα κυττάρων του ανοσοποιητικού, εκφράζεται στους νεφρούς ασθενών με νεφρίτιδα λύκου και είναι αυξημένος στα ούρα τους. Η αύξηση του REDD1 δεν παρατηρήθηκε όταν ανεστάλη ο HIF-1 με L-ascorbic acid. Το αποτέλεσμα αυτό προτείνει ότι, το φλεγμονώδες περιβάλλον του ΣΕΛ ενεργοποιεί την οδό HIF-1/REDD1 που αυξάνει την αυτοφαγία στα ουδετερόφιλα.

Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), ένα ισχυρό αγγειοσυσπαστικό μόριο που ενεργοποιεί το σύστημα mTOR, είναι αυξημένη στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ και, συσχετίζεται με ενεργό νεφρίτιδα και δραστικότητα του νοσήματος σε ζωικά πρότυπα λύκου. Επίσης, η συμμετοχή του συμπληρώματος στην παθογένεια του ΣΕΛ είναι γνωστή. Λαμβάνοντας υπόψιν τα δεδομένα αυτά, επιλέχθηκαν η ET-1 και το C5a του ορού των ασθενών με ΣΕΛ ως πιθανοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές του ορού που ενεργοποιούν την οδό HIF-1/REDD1 στα ουδετερόφιλα. Όπως διαπιστώνεται με qPCR, η προεπώαση των ουδετεροφίλων με bosentan, ενός αναστολέα της ET-1, ή η προεπώαση με ανταγωνιστή των υποδοχέων του C5a οδήγησε σε παρεμπόδιση της αύξησης του REDD1. Η μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης του REDD1 παρατηρήθηκε σε ταυτόχρονη αναστολή της ET-1 και του C5a (εικόνα 4.10.1). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύει την ET-1 και το C5a ως

φλεγμονώδεις μεσολαβητές στον ορό των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ που ενεργοποιούν την οδό HIF-1/REDD1 στα ουδετερόφιλα των ασθενών, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αυτοφαγίας και την επακόλουθη ΝΕΤωση.



Εικόνα 4.10.1: Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), ο HIF-1α και το C5a στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ αυξάνουν την έκφραση του REDD1 στα ουδετερόφιλα, ο οποίος επάγει την αυτοφαγία. Ποσοτική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης για την έκφραση του γονιδίου REDD1 σε υγιή ουδετερόφιλα μετά από επώασή τους με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ, με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ σε ύφεση ή χωρίς επώαση. Η συσχέτιση της ET-1 του ορού των ασθενών στην έκφραση του REDD1 αξιολογήθηκε μετά από αναστολή της με bosentan. Η συσχέτιση του HIF-1α του ορού των ασθενών στην έκφραση του REDD1 αξιολογήθηκε μετά από αναστολή του με L-ascorbic acid. Η συσχέτιση του C5a του ορού των ασθενών στην έκφραση του REDD1 αξιολογήθηκε μετά από αναστολή των υποδοχέων του στα ουδετερόφιλα με ανταγωνιστή των C5Ar (C5aRa).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, με συγκριτική ανάλυση μεταγραφώματος των ζωικών προτύπων λύκου NZB/W-F1 και των υγιών προτύπων C57BL/6 χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης RNA νέας γενεάς, **δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων μεταγραφώματος** που χαρακτηρίζει τη **γενετική ευπάθεια του ΣΕΛ, την οργανοειδικότητά του στο χρόνο και την αναπτυξιακή του βιολογία**. Τα ευρήματα αποτελούν **υποψήφιους βιοδείκτες** εξέλιξης του νοσήματος και προσβολής των οργάνων και, **υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους στο ΣΕΛ**. Ακολούθως, η μελέτη έδειξε ότι, **στο ΣΕΛ η εξαρτώμενη από την αυτοφαγία μεταφορά του TF στα NETs** αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται στο νόσημα. Η **αναστολή των φαινομένων αυτών από την υδροξυχλωροκίνη** εξηγεί την ευεργετική της δράση στη νεφρίτιδα λύκου. Η **ύπαρξη NETs διακοσμημένων με TF και IL-17 στο νεφρό ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου**, ακόμα και χωρίς την ύπαρξη ακέραιων ουδετεροφίλων, προτείνει τη συμμετοχή τους στη νεφρική βλάβη. **Τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs τροποποιούν το φαινότυπο ανθρώπινων ποδοκυττάρων και αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από τους πνευμονικούς ινοβλάστες**, δείχνοντας ότι τα NETs αποτελούν ικρυώματα συσώρευσης βιοδραστικών μορίων που συμμετέχουν στη βλάβη τελικών οργάνων. Η αναστολή των ανοδικών ρυθμιστών της NETωσης και των καθοδικών μορίων της, πιθανά, αποτελεί **νέο θεραπευτικό στόχο** στη νεφρίτιδα λύκου και στη βλάβη τελικών οργάνων-στόχων του ΣΕΛ.

Πιο αναλυτικά, στην παρούσα μελέτη, για την περαιτέρω διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών του ΣΕΛ, έγινε συγκριτική ανάλυση μεταγραφώματος των ζωικών προτύπων λύκου NZB/W-F1 και των υγιών προτύπων C57BL/6 χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης RNA νέας γενεάς, ώστε να αλληλουχηθεί και να ποσοτικοποιηθεί το σύνολο των μεταγράφων, κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών, ενός περιφερικού λεμφικού οργάνου (σπλήνα) και δύο τελικών οργάνων-στόχων (εγκέφαλος και νεφροί) του ΣΕΛ σε διαφορετικά στάδια της φυσικής εξέλιξης του νοσήματος. Για να μελετηθεί η γενετική ευπάθεια του ΣΕΛ έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ίδιων οργάνων, διαφορετικών ζωικών προτύπων, ίδιας ηλικίας, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Για να μελετηθεί η οργανοειδικότητα του ΣΕΛ στο χρόνο, έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος διαφορετικών οργάνων του ζωικού προτύπου λύκου κατά το ίδιο στάδιο του νοσήματος και, για να μελετηθεί η αναπτυξιακή βιολογία του ΣΕΛ και η σχέση της με όργανα τελεστές ή τελικά όργανα-στόχους του νοσήματος, έγινε συγκριτική μελέτη μεταγραφώματος ίδιων οργάνων, ίδιων ζωικών προτύπων, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Το αποτέλεσμα ήταν η **διαπίστωση δεκάδων έως χιλιάδων ΔΕΓ μεταξύ των συγκρίσεων**, οι οποίες απεικονίστηκαν με heatmaps αλλά και περιγράφησαν μία προς μία, με σειρά στατιστική σημαντικότητας, σε καταλόγους. Για λόγους τυπογραφικού χώρου και χωρίς να αλλοιώνεται το αποτέλεσμα της μελέτης, στους πίνακες αποτελεσμάτων αναφέρονται ενδεικτικά τα πρώτα 10 κυριότερα ΔΕΓ από το σύνολο των ΔΕΓ που διαπιστώθηκαν. **Όλα τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα σε ηλεκτρονική μορφή**. Διαπιστώθηκε ότι, στο ΣΕΛ, η γενετική ευπάθεια του οργανισμού συσχετίζεται με διαφορικό μεταγράφημα τόσο στα όργανα τελεστές όσο και στα τελικά όργανα-στόχους του νοσήματος, που παρατηρείται ακόμα και πριν την εμφάνιση της αυτοανοσίας. Επίσης διαπιστώθηκε ότι, το διαφορικό μεταγράφημα των οργάνων στα ζωικά πρότυπα λύκου υποδηλώνει οργανοειδικότητα του νοσήματος, η οποία όμως συσχετίζεται και με τη διαφορετική εμβρυική προέλευση του κάθε ιστού. Επίσης, βρέθηκε ότι, η έκφραση γονιδίων σε ένα ευπαθή οργανισμό στο ΣΕΛ τροποποιείται στα διαφορετικά στάδια του νοσήματος. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση τροποποιήθηκε αποτελούν **υποψήφιους βιοδείκτες εξέλιξης του νοσήματος και προσβολής οργάνου, αλλά και υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους**.

Με τη χρήση του προγράμματος Ingenuity Pathway Analysis, επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή αναμενόμενων οδών, όπως οδών που συμμετέχουν στην ανοσιακή απάντηση αλλά και βρέθηκαν νέες κανονικές οδοί. Πιο συγκεκριμένα, στο σπλήνα των ζωικών προτύπων λύκου η γονιδιακή έκφραση χαρακτηρίζεται από μία ταυτότητα ενεργοποίησης IFN και αντιγονοπαρουσιασμού καθ' όλη τη φυσική πορεία του νοσήματος, ακόμα και πριν την επίδραση των ορμονών του φύλου ή την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων. Εκτός από τις αναμενόμενες οδούς, διαπιστώθηκε ότι εμπλέκονται και άλλες, όπως η οδός της ενεργοποίησης της πήξης και, συγκεκριμένα, της εξωγενούς οδού ενεργοποίησης της προθρομβίνης. Στον εγκέφαλο των ζωικών προτύπων λύκου, το μεταγράφημα χαρακτηρίζεται από διαφορετική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν, κυρίως, σε λειτουργίες ενδοκρινολογικές, μεταβολικές, κυτταρικής οργάνωσης και ανάπτυξης. Στο νεφρό των ζωικών προτύπων με λύκο, επιπρόσθετα των αναμενόμενων οδών

ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, διαπιστώνεται συμμετοχή νέων κανονικών οδών, όπως της οδού ενεργοποίησης της εξωγενούς πύξης, η οποία διαπιστώθηκε και στο σπλήνα κατά το ίδιο στάδιο του νοσήματος. Επομένως, η παρούσα μελέτη αποκάλυψε νέες κανονικές οδούς, ανοδικούς ρυθμιστές και, τα κυριότερα υπερεκφραζόμενα ή υποεκφραζόμενα ΔΕΓ που αποτελούν **στόχους προς περαιτέρω μελέτη της συμμετοχής τους στη παθολογία του ΣΕΛ και προς μετάφρασή τους σε στοχευμένη θεραπεία.**

Ο επόμενος στόχος της μελέτης καθορίστηκε τόσο από την επιλογή οδού από τη βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε, όσο και από τα προηγούμενα αποτελέσματα των μελετών του εργαστηρίου μας. Συγκεκριμένα, διατυπώθηκε η επιστημονική υπόθεση ότι, η επαγόμενη με αυτοφαγία μεταφορά του TF στα NETs μπορεί να αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται στους ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των διακοσμημένων με TF NETs στο ΣΕΛ. Απομονώθηκαν ορός και ουδετερόφιλα από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με ενεργό ή ανενεργό ΣΕΛ και έγιναν *ex vivo* καλλιέργειες και *in vitro* διεγέρσεις ή αναστολές τους, ώστε να μελετηθούν τα φαινόμενα της αυτοφαγίας και της NETωσης. **Η συνέχεια της μελέτης αυτής έδειξε για πρώτη φορά ότι:**

(1). Τα ουδετερόφιλα των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας. Τα επίπεδα αυτοφαγίας των ουδετεροφίλων αναλύθηκαν με ανοσοφθορισμό ως προς την έκφραση του δείκτη αυτοφαγίας LC3 και με ανοσοαποτύπωση ως προς τη μετατροπή της LC3-I στη λιπιδική LC3-II, όσο και ως προς την αποδόμηση της p62.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, ήταν γνωστό ότι, η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών απαντήσεων²¹². Μεταξύ άλλων, τα GWAS έδειξαν ότι, οι πολυμορφισμοί γονιδίων αυτοφαγίας (όπως του ATG5) συσχετίζονται με ευπάθεια στο ΣΕΛ τόσο σε Καυκάσιους όσο και σε Κινέζικους πληθυσμούς^{16,35,41,78,244}. Είναι, επίσης, γνωστό ότι, οι διαταραχές αυτοφαγίας οδηγούν στη συσσώρευση πρωτεϊνών και ελευθέρων ριζών οξυγόνου στο δέρμα ασθενών με ΣΕΛ που εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία²⁴⁸. Σε ζωικά πρότυπα λύκου, η αυτοφαγία διευκολύνει τη διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση των DCs στα μόρια MHC τάξης Ι στα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα^{251,252}. DCs με απαλειφή του γονιδίου ATG5 και DCs που επώαστηκαν με αναστολέα αυτοφαγίας αδυνατούν να παράγουν IFNα μετά από λοίμωξη από τον ιό VSV²¹⁹. Επίσης, σε ζωικά πρότυπα λύκου, τα περιφερικά Τ λεμφοκύτταρα εμφανίζουν διαταραχή της αυτοφαγίας με συσσώρευση αυτοφαγικών κενωτοπίων ενώ, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα τρωκτικά, τα Τ λεμφοκύτταρα λύκου εμφανίζουν «μεγα-μιτοχόνδρια», αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων και αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας, που επάγουν την επιβίωση των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων^{253,254}. **Τα επίπεδα αυτοφαγίας των ουδετεροφίλων των ασθενών με ΣΕΛ δεν είχαν, μέχρι σήμερα, μελετηθεί.**

(2). Τα ουδετερόφιλα των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένη NETωση η οποία επάγεται από την αυτοφαγία. Η απελευθέρωση των NETs αξιολογήθηκε με 4 διαφορετικούς τρόπους: συνεστιακή μικροσκοπία ως προς το συνεντοπισμό MPO και εξωκυττάρου DNA, συνεστιακή μικροσκοπία ως προς το συνεντοπισμό κιτρολινοποιημένης ιστόνης-3 με ελασάση ουδετροφίλων και, μέτρηση με ELISA του συμπλόκου MPO-DNA complex τόσο στα υπερκείμενα καλλιέργειών όσο και σε ορό από περιφερικό αίμα των ασθενών. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, **η μέτρηση του συμπλόκου MPO-DNA σε ορό από περιφερικό αίμα ασθενών γίνεται για πρώτη φορά.**

Στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφεται ότι, στο ΣΕΛ, τα ουδετερόφιλα είναι ευπαθή στην απελευθέρωση NETs των οποίων η αποδόμηση είναι μειωμένη εξαιτίας μειωμένης δραστηριότητας της ενδονουκλεάσης DNase I και της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων¹⁷⁰. Τα NETs στο ΣΕΛ αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές του συστήματος του συμπληρώματος²⁸² και ενεργοποιούν άμεσα, μέσω FcγRIIa και TLR9, τα pDCs προς παραγωγή IFNα^{280,281}. Στα μακροφάγα, ενεργοποιούν την κασπάση-1, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του φλεγμονώσους και στην παραγωγή IL-1β και IL-18²⁸⁶. Η αναστολή της NETωσης στο ΣΕΛ έχει μελετηθεί σε ζωικά πρότυπα λύκου ενώ, δεν έχει εξακριβωθεί το αποτέλεσμά της στον άνθρωπο. **Με τη μελέτη αυτή περιγράφεται ότι, στο ΣΕΛ η NETωση επάγεται από την αυτοφαγία.**

(3). Η αυτοφαγία επάγει τη μεταφορά δραστικού TF στα NETs του ΣΕΛ, η οποία οδηγεί στην παραγωγή θρομβίνης. Η ύπαρξη του TF στα NETs των ασθενών με ΣΕΛ αξιολογήθηκε με δύο τρόπους: με συνεστιακή μικροσκοπία ως προς το συνεντοπισμό TF με εξωκυττάριο DNA, όσο και με ανοσοαποτύπωση στις δομές NETs που απομονώθηκαν από τα υπερκείμενα των καλλιέργειών. Η δραστηριότητα του TF των NETs αξιολογήθηκε με ELISA με τη μέτρηση του συμπλόκου θρομβίνης-αντιθρομβίνης που προκαλούν οι δομές NETs των ασθενών με ΣΕΛ στο πτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα υγιών εθελοντών.

Είναι γνωστό ότι, το σύστημα της πήξης του αίματος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη σπειραματική νόσο των ασθενών με LN και, οι σπειραματικοί θρόμβοι που ανιχνεύονται συχνά σε νεφρικές βλάβες προβλέπουν την ανάπτυξη σπειραματικής σκλήρυνσης³²¹. Η προδιάθεση των ασθενών με ΣΕΛ στη θρομβογένεση δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί και, θεωρείται ότι συσχετίζεται με τοπικές αλλαγές της έκφρασης προπηκτικών ή ινωδολυτικών γονιδίων. Είναι, επίσης, γνωστό ότι, τα NETs αποτελούν συστατικό των θρόμβων αφού παγιδεύουν και συσσωρεύουν αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα^{289,323-326}. Στη μελέτη αυτή, αποδεικνύεται ότι **η αυτοφαγία οδηγεί στην απελευθέρωση προ-θρομβωτικού TF στα NETs των ασθενών με ΣΕΛ, δείχνοντας ότι ο TF αποτελεί ένα μοριακό σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θρομβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται στο νόσημα.**

(4). Ο ορός των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ επάγει την αυτοφαγία και την εξαρτώμενη από την αυτοφαγία NETωση των ουδετεροφίλων. Για να διαπιστωθεί εάν τα ανωτέρω ευρήματα αποτελούν εσωτερική διαταραχή των ουδετεροφίλων του ΣΕΛ, τα ανωτέρω πειράματα επαναλήφθηκαν, αλλά αυτή τη φορά σε υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν με ορό ασθενών με ΣΕΛ (*in vitro* μελέτες διέγερσης και αναστολής). Διαπιστώθηκε ότι, τόσο η αυξημένη αυτοφαγία όσο και η επαγόμενη από την αυτοφαγία αυξημένη NETωση **οφείλονται στο φλεγμονώδες περιβάλλον του ΣΕΛ και δεν αποτελούν εσωτερική κυτταρική διαταραχή.**

(5). Ο ορός των ασθενών με ΣΕΛ οδηγεί σε υπερέκφραση του TF των υγιών ουδετεροφίλων. Η έκφραση των επιπέδων του TF αξιολογήθηκε με δύο τρόπους: με ανοσοφθορισμό και ανοσοαποτύπωση.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο TF εκφράζεται στον υπενδοθηλιακό χώρο του αγγειακού τοιχώματος, όπως στις λείες μυικές ίνες, ινοβλάστες και περικύτταρα²⁹⁵⁻²⁹⁷. Επίσης, ανιχνεύεται στο πλάσμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην κυκλοφορία του αίματος, ο TF εκφράζεται στα μονοκύτταρα, στα κοκκιοκύτταρα και στα μικροσωματίδια που απελευθερώνονται από τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και, έρχεται σε επαφή με το αίμα μετά από ενδοθηλιακή βλάβη ή μετά από επαγωγή της έκφρασής του στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή στα λευκά αιμοσφαίρια. Η επαγωγή του παρατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις, εξαιτίας φλεγμονωδών ερεθισμάτων όπως, των TNFα²⁹⁷, IL-1β³⁰⁰, IL-8 και C5a³⁰¹. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι, **ο TF επάγεται στα ουδετερόφιλα εξαιτίας του φλεγμονώδους περιβάλλοντος του ΣΕΛ.**

(6). Ο ορός των ασθενών με ΣΕΛ οδηγεί σε διακόσμηση των NETs με βιοδραστικά μόρια, όπως προ-φλεγμονώδη IL-17 και προ-θρομβωτικό TF. Η διακόσμηση των NETs διερευνήθηκε σε *in vitro* καλλιέργειες υγιών ουδετεροφίλων που διεγέρθηκαν με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ παρουσία ή απουσία αναστολέων αυτοφαγίας. Η διακόσμηση των με IL-17 αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπηση ως προς το συνεντοπισμό IL-17 με ελαστάση ουδετεροφίλων και εξωκυττάριο DNA. Η έκφραση του TF των NETs αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπηση τόσο ως προς το συνεντοπισμό TF με εξωκυττάριο DNA όσο και με συνεντοπισμό TF με ελαστάση ουδετεροφίλων.

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρθηκε ότι, στο ΣΕΛ τα κοκκιοκύτταρα χαμηλής πυκνότητας απελευθερώνουν NETs με IL-17¹⁷³. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι, τα διακοσμημένα με IL-17 NETs προκαλούν ινωτικό φαινότυπο σε καλλιεργημένους πνευμονικούς ινοβλάστες³⁹⁸. Η παρούσα μελέτη περιγράφει την **απελευθέρωση NETs διακοσμημένων με IL-17 από υγιή ουδετερόφιλα, τα οποία ενεργοποιήθηκαν *in vitro* με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ, υποδεικνύοντας μία άλλη πηγή IL-17 στο ΣΕΛ.**

(7). Η υδροξυχλωροκίνη ανέστειλε την αυτοφαγία και την απελευθέρωση NETs από τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ. Η αξιολόγηση της επίδρασης της υδροξυχλωροκίνης στην αυτοφαγία και τη NETωση έγινε με 4 τρόπους: μελέτες σε *ex vivo* καλλιέργειες ουδετεροφίλων ασθενών υπό θεραπεία με υδροξυχλωροκίνη, μέτρηση του συμπλέγματος MPO-DNA σε ορό ασθενών με ΣΕΛ υπό αγωγή με υδροξυχλωροκίνη, μελέτες σε *in vitro* διεγέρσεις ουδετεροφίλων με ορό από ασθενείς με ΣΕΛ υπό αγωγή με υδροξυχλωροκίνη και με μελέτες σε *in vitro* διεγέρσεις ουδετεροφίλων με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία υδροξυχλωροκίνης ως αναστολέα αυτοφαγίας.

Η υδροξυχλωροκίνη, ένα ανθελανοσιακό φάρμακο που χρησιμοποιείται ως DMARD τροποποιεί το pH των λυσοσωμάτων και, έτσι θεωρείται αναστολέας αυτοφαγίας²⁶⁰. Στην παρούσα μελέτη, **εξηγείται μέρος της ευεργετικής δράσης της υδροξυχλωροκίνης στο ΣΕΛ** αφού, ως αναστολέας αυτοφαγίας αναστέλλει την αυξημένη NETωση των ουδετεροφίλων των ασθενών με ΣΕΛ. Στη διεθνή βιβλιογραφία, η αναστολή της NETωσης μελετήθηκε ως θεραπευτικός στόχος στο ΣΕΛ σε ζωικά πρότυπα. Η χορήγηση στα New Zealand Mixed 2328 της Cl-amidine, που αποτελεί αναστολέα των PAD, ανέστειλε την *in vivo* δημιουργία των NETs, τροποποίησε το προφίλ των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων και του συμπληρώματος και, μείωσε την

εναπόθεση IgG στα σπειράματα. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της διαφοροποίησης των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων του μυελού των οστών, βελτίωση της ενδοθηλιο-εξαρτώμενης αγγειοδιαστολής και καθυστέρηση στην εμφάνιση αρτηριακής θρόμβωσης²⁸⁸. Η ίδια ομάδα, μελέτησε το αποτέλεσμα της χορήγησης Cl-amidine και BB-Cl-amidine, που αποτελεί νεότερο αναστολέα PAD, στο ζωικό πρότυπο λύκου MRL/lpr και, διαπίστωσαν ότι, η αναστολή των PAD βελτίωσε την ενδοθηλιακή λειτουργία, τροποποίησε την έκφραση των γονιδίων της IFN τύπου I, μείωσε την πρωτεϊνουρία και την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στο νεφρό και, προστάτευσε τα ζώα από την εμφάνιση δερματικών εκδηλώσεων²⁸⁹. **Το αποτέλεσμα της αναστολής της NETωσης στον άνθρωπο, δεν έχει εξακριβωθεί. Στην μελέτη αυτή, παρουσιάζεται η αναστολή της NETωσης στον άνθρωπο μέσω αναστολής αυτοφαγίας που επιτυγχάνεται με τη χορήγηση υδροξυχλωροκίνης. Η αναστολή της αυτοφαγίας μειώνει τόσο τη NETωση όσο και τη διακόσμησή τους με βιοδραστικά μόρια. Η μελέτη τονίζει την αναγκαιότητα χορήγησης της υδροξυχλωροκίνης στο ΣΕΛ.**

(8). Τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs εναποτίθενται στο νεφρό ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου. Η *in situ* εναπόθεση των διακοσμημένων με TF και IL-17 NETs στο νεφρό αξιολογήθηκε σε νεφρικές τομές ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό κιτρολινοποιημένης ιστόνης-3 με ελαστάση ουδετεροφίλων και εξωκυττάριο DNA, με συνεντοπισμό TF με ελαστάση ουδετεροφίλων και εξωκυττάριο DNA και με συνεντοπισμό IL-17 με ελαστάση ουδετεροφίλων και εξωκυττάριο DNA.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, έχει περιγραφεί η ύπαρξη NETs με LL-37 και dsDNA σε νεφρούς ασθενών με ΣΕΛ¹⁷³. Η μελέτη αυτή δείχνει την ύπαρξη TF και IL-17-διακοσμημένων NETs στους νεφρούς ασθενών με υπερπλαστική νεφρίτιδα λύκου, υποδεικνύοντας τη **συμμετοχή τους στην παθογένεια του νοσήματος**. Βάσει του εντοπισμού τους, τα διακοσμημένα με TF NETs πιθανά συμμετέχουν στη ρήξη της κάψας του Bowman και στη δημιουργία μηνοειδών σχηματισμών, γεγονότα που χαρακτηρίζουν την ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα του ΣΕΛ.

(9). Τα διακοσμημένα με TF- και IL-17 NETs ασθενών με ενεργό ΣΕΛ τροποποιούν τη μορφολογία ανθρώπινων ποδοκυττάρων και αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από πνευμονικούς ινοβλάστες. Επειδή τα TF- και IL-17-διακοσμημένα NETs εντοπίστηκαν τόσο στο σπείραμα όσο και στο σωληναριοδιάμεσο χώρο, επιλέχθηκε η μελέτη της επίδρασής τους τόσο στα ποδοκύτταρα όσο και στους ινοβλάστες. Οι νεφρικοί ινοβλάστες δεν ήταν διαθέσιμοι αλλά, ταυτόχρονα, και η απομόνωσή τους από νεφρικό ιστό ήταν δύσκολη. Επειδή η συμπεριφορά των ινοβλαστών είναι ίδια στα διαφορετικά όργανα, επιλέχθηκε η μελέτη ανθρώπινων πνευμονικών ινοβλαστών. Επομένως, η επίδραση των NETs του ΣΕΛ αξιολογήθηκε μετά από επώαση καλλιέργειών ανθρώπινων επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων και πρωτογενών πνευμονικών ινοβλαστών με αυτά.

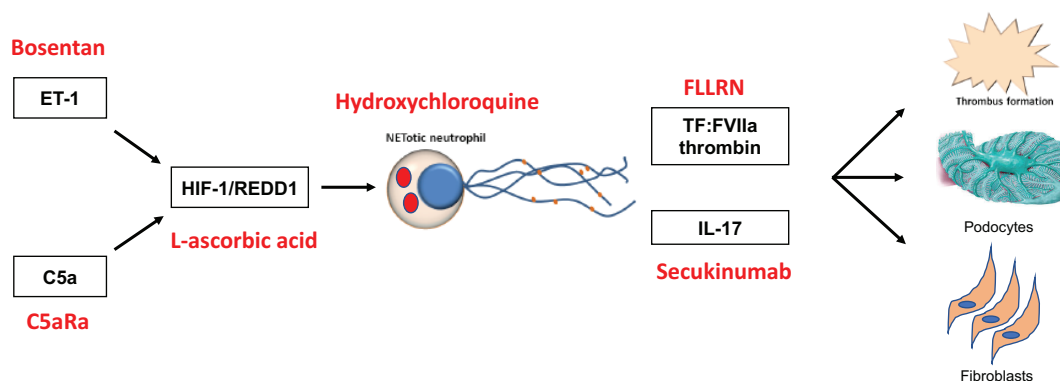
Τα NETs από ασθενείς με ΣΕΛ ενεργοποιούν τα pDCs προς παραγωγή IFNα και τα μακροφάγα προς παραγωγή IL-1β και IL-18²⁸⁶. Επίσης, προκαλούν ινωτικό φαινόμενο σε καλλιιεργημένους πνευμονικούς ινοβλάστες³⁹⁸ και θάνατο σε ενδοθηλιακά κύτταρα²⁸⁷. Στην παρούσα μελέτη, παρέχεται **ένδειξη για την επίδραση των NETs του ΣΕΛ σε νεφρικά κύτταρα και, συγκεκριμένα στα ποδοκύτταρα**, τροποποιώντας τη μορφολογία τους. Τα διακοσμημένα με TF- και IL-17-NETs ασθενών με ΣΕΛ **αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από πνευμονικούς ινοβλάστες**. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι, τα NETs αποτελούν ικριώματα συσσώρευσης βιοδραστικών μορίων που συμμετέχουν στη νεφρική βλάβη στις υπερπλαστικές νεφρίτιδες λύκου πέραν του επιπέδου των ενδοθηλιακών και μεσαγγειακών κυττάρων. Η αναστολή των NETs και των βιοδραστικών τους μορίων αποτελεί **νέο θεραπευτικό στόχο στη νεφρίτιδα λύκου**.

(10). Η ενδοθελίνη-1 και το C5a στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ ενεργοποιούν την οδό HIF-1/REDD1 στα υγιή ουδετερόφιλα, ο οποίος απάγει την αυτοφαγία και την επακόλουθη NETωση. Το αποτέλεσμα της μελέτης με qPCR αναδεικνύει την ET-1, τον HIF-1α και το C5a ως φλεγμονώδεις μεσολαβητές στον ορό των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ που υπερεκφράζουν τον REDD1 στα ουδετερόφιλα των ασθενών, με αποτέλεσμα την αύξηση της αυτοφαγίας τους. Με τη μελέτη αυτή υποδεικνύονται ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι έναντι βλάβης τελικού οργάνου-στόχου στο ΣΕΛ, το bosentan, η αναστολή του HIF-1α ή ο συνδυασμός τους (εικόνα 5.1).

5.1. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ

Θα μελετηθεί το πρωτέωμα, δηλαδή το σύνολο των πρωτεϊνών των NETs από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ. Επιπρόσθετα, από τα χαρτογραφημένα μικρά τμήματα των αναγνώσεων της αλληλούχησης RNA των ζωικών προτύπων θα αναγνωριστούν οι θέσεις έναρξης μεταγραφής και οι παραλλαγές που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα, θα αναλυθεί σε επίπεδο νουκλεοτιδίου η εξαρτώμενη από αλληλία έκφραση

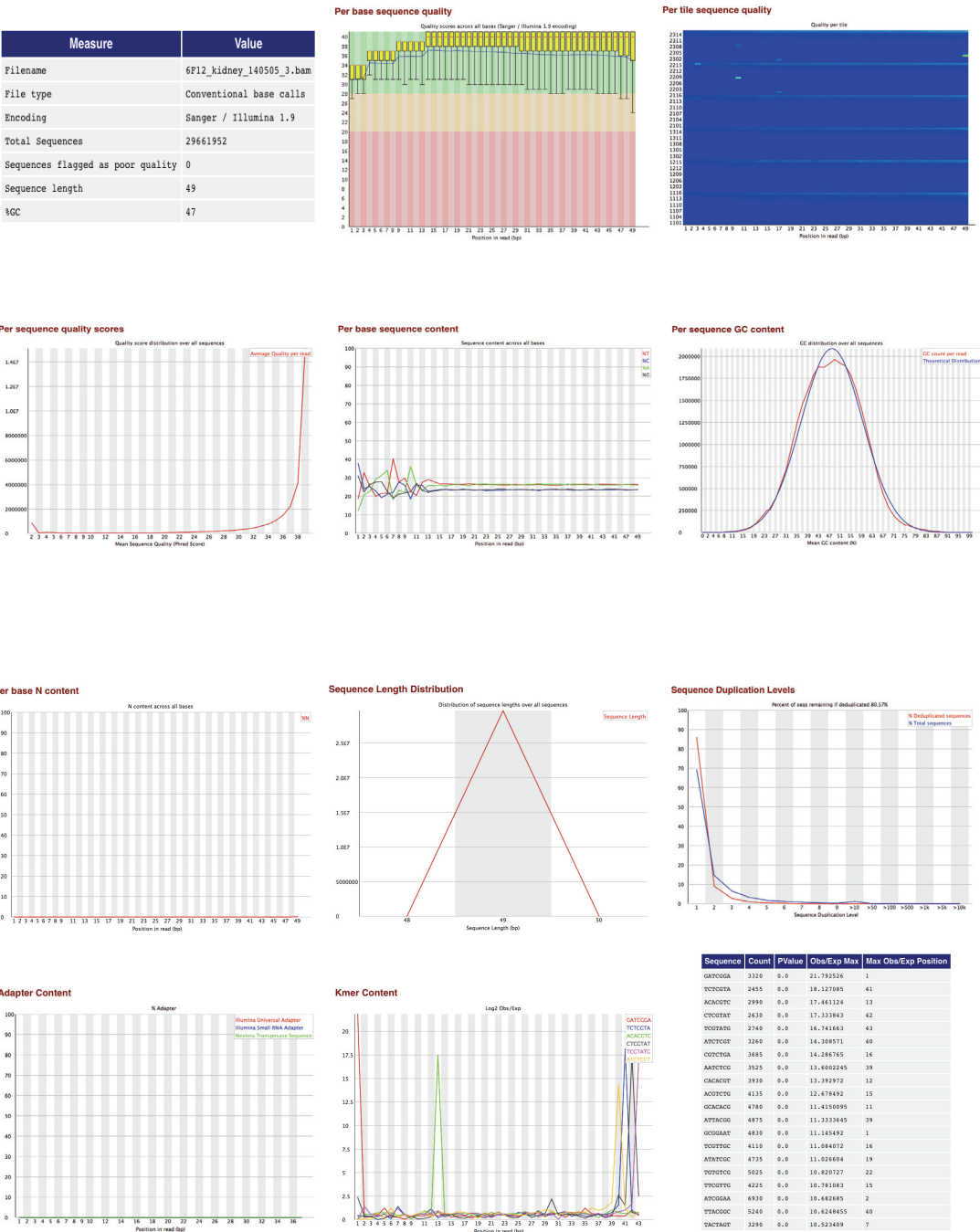
γονιδίων και η μετα-μεταφραστική τροποποίηση του RNA και, θα αναγνωριστούν νέα γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος και μετάγραφα σύντηξης. Τέλος, θα δημιουργηθούν βάσεις δεδομένων SNPs για να χαρτογραφηθούν eQTLs και, θα γίνει RNA-seq σε ανθρώπινα νεφρικά δείγματα ώστε να ανευρεθούν τα κοινά ΔΕΓ και οι κοινές οδοί, που θα αποτελέσουν νέους υποψήφιους βιοδείκτες και νέους υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους στο ΣΕΛ και στη νεφρίτιδα.



Εικόνα 5.1: Ανοδικοί ρυθμιστές της NETωσης στο ΣΕΛ και καθοδικά μόρια. Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) και το C5a στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ, ενεργοποιούν την οδό HIF-1/REDD1 η οποία αυξάνει την αυτοφαγία των ουδετεροφίλων, επάγοντας τη NETωση. Τα διακοσμημένα με TF και IL-17 NETs αποτελούν το σύνδεσμο μεταξύ αυξημένης θροβογένεσης και φλεγμονής που παρατηρούνται στις σοβαρές περιπτώσεις ΣΕΛ, αφού οδηγούν σε παραγωγή θρόμβων, τροποποίηση της μορφολογίας των ποδοκυττάρων και παραγωγή κολλαγόνου από τους ινοβλάστες. Προτείνεται ένα μοντέλο πολλαπλών χτυπημάτων το οποίο θα αντιμετωπιστεί με θεραπεία πολλαπλών στόχων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

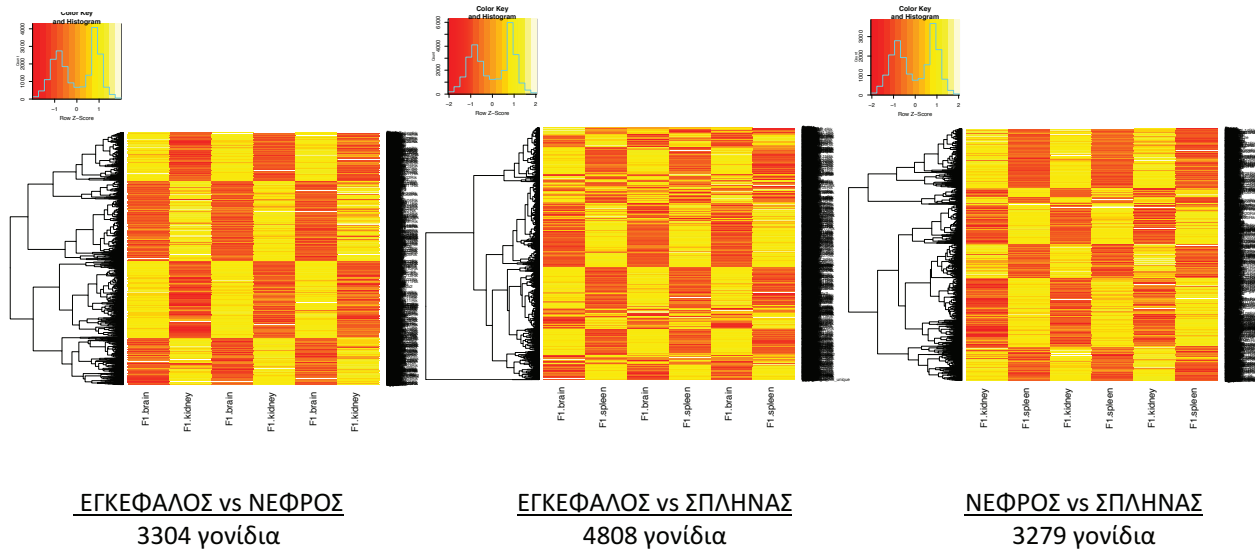
Συμπληρωματική εικόνα 3.5.1: ενδεικτικός ποιοτικός έλεγχος της αλληλούχησης RNA που απομονώθηκε από νεφρό του ζωικού πρωτύπου NZB/W-F1 στο νεφρικό στάδιο



Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.1: Τα κυριότερα ΔΕΓ στον εγκέφαλο, διαφορετικών προτύπων, ίδιας ηλικίας. FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

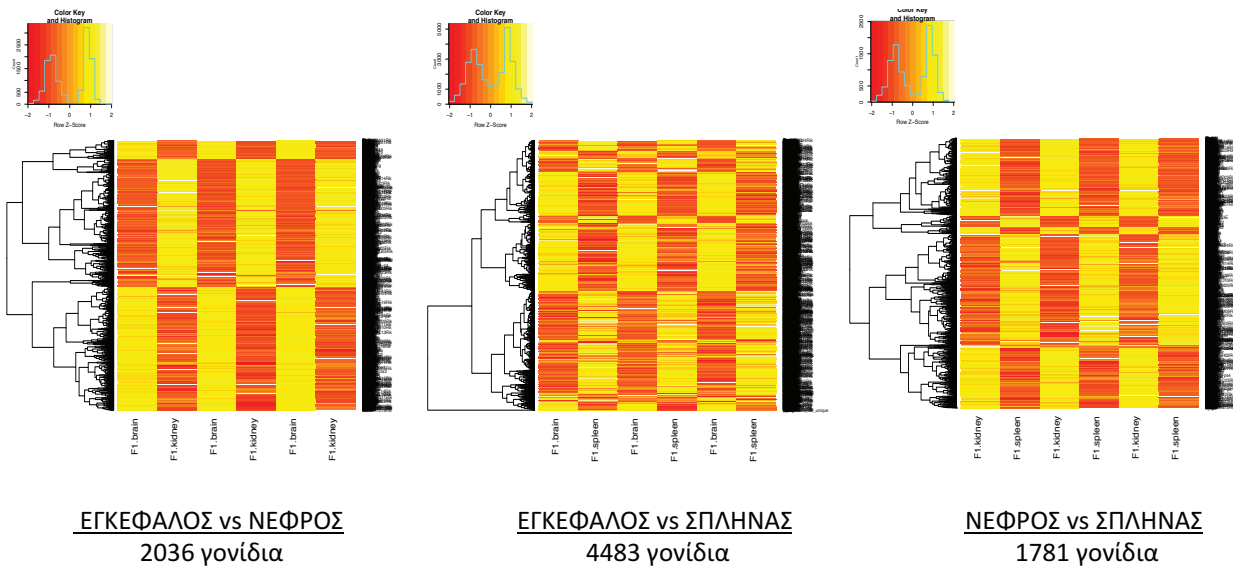
ΔΕΓ στον εγκέφαλο, στο στάδιο της προ-εφηβίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 (σύνολο = 2)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Arhgap30	-0,537980418	4,971018477	13,68301006	0,000216403	0,020514064
Plcb3	0,521058575	4,510840088	12,46503113	0,000414642	0,031444912
ΔΕΓ στον εγκέφαλο, στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 (σύνολο = 2)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Clec16a	0,465562891	5,09353431	12,01190727	0,000528617	0,045934644
Tbc1d13	0,517359129	4,664182329	11,78885639	0,000595863	0,04873227
ΔΕΓ στον εγκέφαλο, στο στάδιο της νεφρίτιδας μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 (σύνολο = 5)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
9430020K01Rik	-0,560684958	5,366534941	15,70007919	7,42E-05	0,009674252
Neat1	-0,555436382	4,77120638	12,14140375	0,000493146	0,043751806
Rdh16	-0,54047437	3,836637418	14,01850809	0,00018102	0,020406341
Dlgap2	-0,537742742	4,081905868	12,17230657	0,000485043	0,043751806
Clec16a	0,470160989	5,09353431	12,08220073	0,000509055	0,043751806

NZB/W-F1 ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟ-ΕΦΗΒΙΑΣ



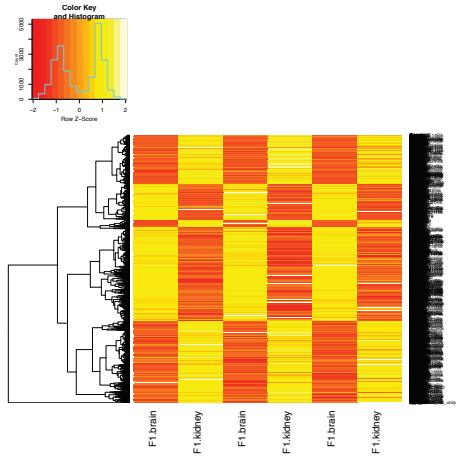
Συμπληρωματική εικόνα 4.1.1: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ διαφορετικών οργάνων στο NZB/W-F1 στο στάδιο της προ-εφηβίας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

NZB/W-F1 ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟ-ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ

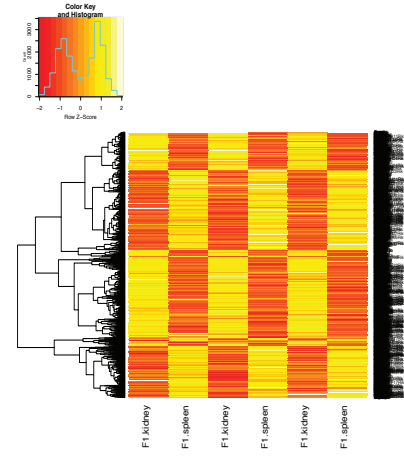


Συμπληρωματική εικόνα 4.1.2: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ διαφορετικών οργάνων στο NZB/W-F1 στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0$.

NZB/W-F1 ΣΤΑΔΙΟ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑΣ



ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ vs ΝΕΦΡΟΣ
3550 γονίδια

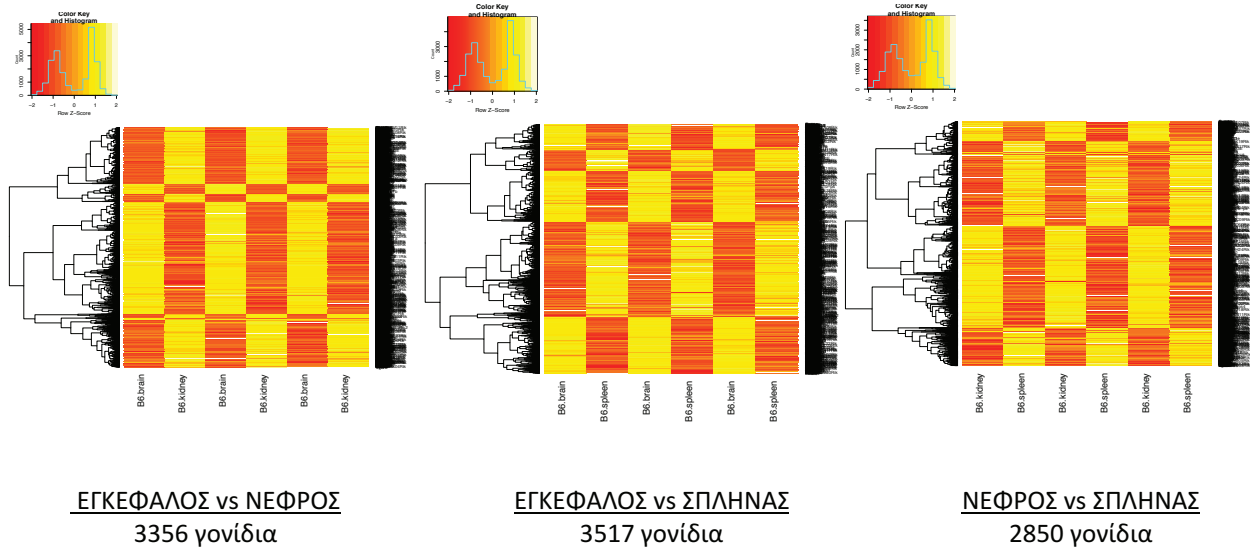


ΝΕΦΡΟΣ vs ΣΠΛΗΝΑΣ
3267 γονίδια

ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ vs ΣΠΛΗΝΑΣ
4810 γονίδια

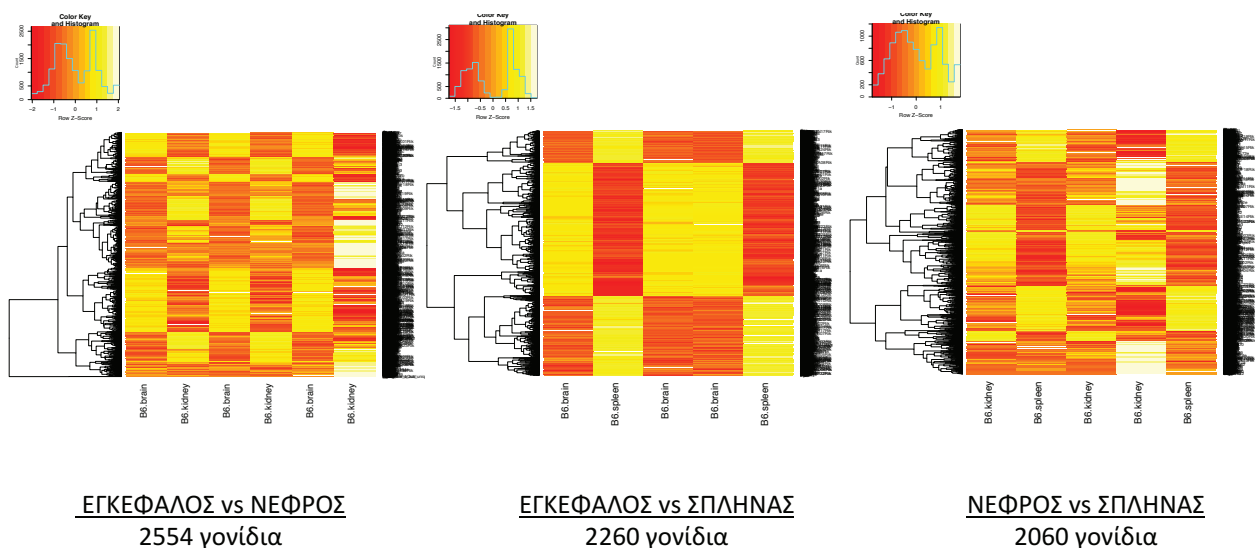
Συμπληρωματική εικόνα 4.1.3: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ διαφορετικών οργάνων στο NZB/W-F1 στο στάδιο της νεφρίτιδας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

C57BL/6 ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟ-ΕΦΗΒΙΑΣ



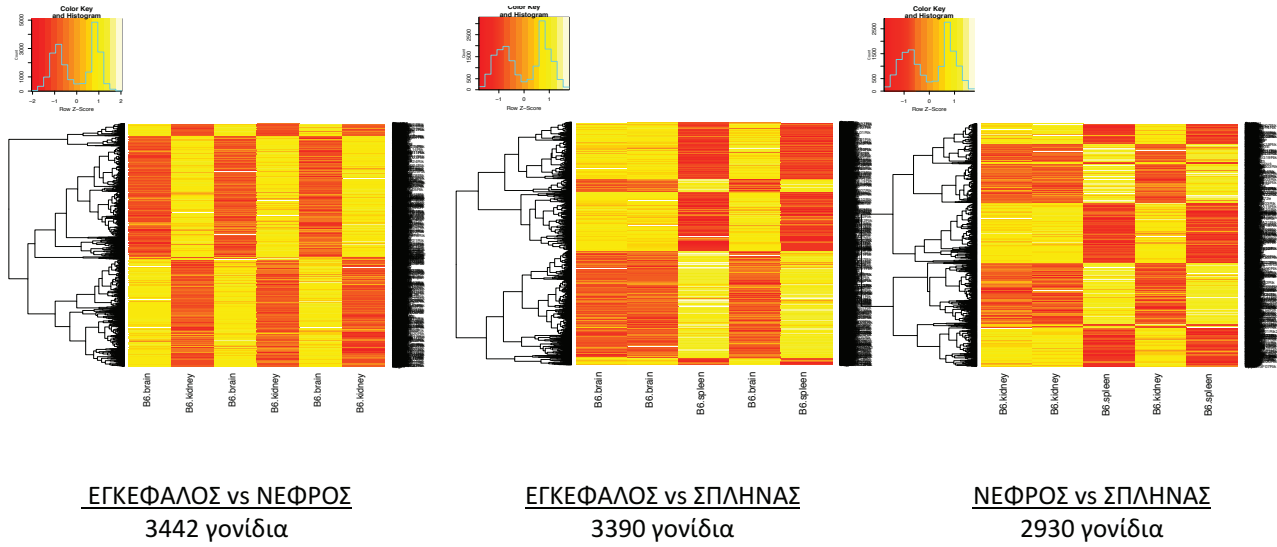
Συμπληρωματική εικόνα 4.1.4: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ διαφορετικών οργάνων στο C57BL/6 στο στάδιο της (Α.) προ-εφηβίας (Β.) προ-αυτοανοσίας (Γ.) της νεφρίτιδας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

C57BL/6 ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟ-ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ



Εικόνα 4.1.5: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ διαφορετικών οργάνων στο C57BL/6 στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

C57BL/6 ΣΤΑΔΙΟ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑΣ



Εικόνα 4.1.6: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ διαφορετικών οργάνων στο C57BL/6 στο στάδιο της νεφρίτιδας. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.2: ΔΕΓ διαφορετικών ιστών του NZB/W-F1 στο στάδιο της προ-εφηβίας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο στάδιο της προ-εφηβίας των NZB/W-F1 μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού					(σύνολο = 3304)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Rnf41	1,19E+14	4,36E+14	6,22E+14	2,61E-123	1,36E-119
Ip6k1	-1,07E+14	5,34E+14	6,06E+14	7,62E-120	1,99E-116
Sst	-1,00E+14	4,15E+13	5,93E+14	4,96E-117	8,64E-116
Gap43	-1,01E+14	4,78E+14	5,92E+14	8,44E-117	1,10E-113
Rrbp1	-8,67E+14	4,00E+14	5,83E+14	7,75E-115	8,10E-112
Hgd	1,19E+14	4,94E+14	5,62E+14	3,83E-110	3,34E-107
Hdac10	-1,13E+14	3,69E+14	5,59E+14	1,15E-109	8,60E-107
Olig1	-8,82E+14	5,00E+14	5,24E+14	7,18E-102	4,69E-100
Rnf41	1,19E+14	4,36E+14	6,22E+14	2,61E-123	1,36E-119
Ip6k1	-1,07E+14	5,34E+14	6,06E+14	7,62E-120	1,99E-116
ΔΕΓ στο στάδιο της προ-εφηβίας των NZB/W-F1 μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα					(σύνολο = 4808)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Rrbp1	-1,03E+14	4,00E+14	6,39E+14	6,15E-127	3,21E-125
Ahcyl1	-1,09E+14	4,19E+14	6,37E+14	1,52E-126	3,97E-123
Sst	-1,09E+14	4,15E+13	6,22E+14	3,31E-123	5,76E-120
Rbfox1	-9,79E+13	4,72E+14	6,17E+14	2,76E-123	3,61E-119
Ccdc183	-9,73E+14	4,22E+14	6,13E+14	2,12E-121	2,21E-119
Gap43	-9,91E+14	4,78E+14	5,98E+14	4,41E-119	3,84E-115
Olig1	-1,10E+14	5,00E+14	5,97E+14	8,38E-118	6,26E-115
Rrbp1	-1,03E+14	4,00E+14	6,39E+14	6,15E-127	3,21E-125
Ahcyl1	-1,09E+14	4,19E+14	6,37E+14	1,52E-126	3,97E-123
Sst	-1,09E+14	4,15E+13	6,22E+14	3,31E-123	5,76E-120
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των NZB/W-F1 μεταξύ νεφρού και σπλήνα					(σύνολο = 3279)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Rnf41	-1,15E+14	4,36E+14	6,80E+14	6,35E-136	3,32E-132
Dbnidd1	-9,74E+14	4,33E+14	6,78E+14	1,91E-135	4,99E-132
Mpv17l	-9,01E+14	6,17E+14	6,08E+14	3,49E-120	6,08E-117
Hgd	-1,07E+14	4,94E+14	5,99E+14	3,51E-118	4,58E-115
Matn4	-1,15E+14	3,71E+12	5,58E+14	2,71E-109	2,84E-106
Kng2	-1,04E+14	4,47E+14	5,47E+14	6,58E-107	5,73E-104
Igsf11	-8,27E+14	4,12E+14	5,22E+14	1,63E-102	1,21E-98
Paip2b	-1,24E+14	3,28E+14	5,05E+13	6,87E-98	4,49E-95
Rnf41	-1,15E+14	4,36E+14	6,80E+14	6,35E-136	3,32E-132
Dbnidd1	-9,74E+14	4,33E+14	6,78E+14	1,91E-135	4,99E-132

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.3: ΔΕΓ διαφορετικών ιστών του NZB/W-F1 στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας των NZB/W-F1 μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού (σύνολο = 2036)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Slc22a12	1,07E+13	6,99E+14	1,95E+14	2,59E-30	1,42E-26
Slc7a12	1,48E+14	4,72E+14	1,74E+14	1,07E-25	2,93E-22
Hgd	1,05E+14	4,94E+14	1,69E+14	1,11E-25	2,03E-21
Sst	-1,08E+14	4,16E+13	1,60E+14	9,31E-23	1,27E-20
Apob	1,05E+14	4,06E+14	1,59E+13	1,87E-22	2,05E-19
Knk2	1,12E+14	4,84E+14	1,55E+14	1,30E-21	1,19E-18
Acy3	9,04E+14	7,08E+14	1,55E+14	1,54E-21	1,21E-18
Cadm2	-1,00E+14	4,84E+14	1,50E+14	2,16E-20	1,48E-17
Slc22a12	1,07E+13	6,99E+14	1,95E+14	2,59E-30	1,42E-26
Slc7a12	1,48E+14	4,72E+14	1,74E+14	1,07E-25	2,93E-22
ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας των NZB/W-F1 μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα (σύνολο = 4483)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Sst	-1,17E+14	4,16E+13	1,69E+14	1,51E-25	8,25E-21
Gap43	-1,10E+14	4,85E+14	1,60E+14	1,43E-22	3,92E-19
2900011008Rik	-1,05E+14	4,70E+14	1,54E+14	1,96E-21	3,58E-18
Raly1	-1,27E+14	3,04E+14	1,51E+14	1,34E-20	1,83E-17
Olig1	-1,12E+14	4,54E+14	1,50E+14	1,76E-21	1,93E-18
Vsnl1	-1,02E+14	3,53E+14	1,45E+14	2,37E-19	2,16E-17
Rbfox1	-7,93E+14	4,82E+14	1,44E+14	3,18E-19	2,49E-16
Pclo	-9,07E+14	5,13E+14	1,40E+14	2,31E-18	1,58E-15
Sst	-1,17E+14	4,16E+13	1,69E+14	1,51E-25	8,25E-21
Gap43	-1,10E+14	4,85E+14	1,60E+14	1,43E-22	3,92E-19
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των NZB/W-F1 μεταξύ νεφρού και σπλήνα (σύνολο = 1781)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Slc22a12	-1,11E+14	6,99E+14	1,99E+14	3,77E-31	2,06E-27
Hgd	-1,09E+14	4,94E+14	1,69E+14	1,30E-24	3,54E-21
Apob	-1,22E+13	4,06E+14	1,66E+14	6,04E-24	1,10E-20
Acy3	-9,11E+14	7,08E+14	1,55E+14	1,09E-21	1,49E-18
Mpv17l	-9,61E+14	7,17E+14	1,53E+13	3,06E-21	3,35E-18
Slc7a12	-1,13E+14	4,72E+14	1,51E+14	1,15E-20	1,05E-17
Knk2	-1,05E+14	4,84E+14	1,45E+14	1,86E-19	1,46E-16
Usp8	-1,05E+14	3,29E+14	1,45E+14	2,24E-19	1,53E-16
Slc22a12	-1,11E+14	6,99E+14	1,99E+14	3,77E-31	2,06E-27
Hgd	-1,09E+14	4,94E+14	1,69E+14	1,30E-24	3,54E-21

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.4: ΔΕΓ διαφορετικών ιστών του NZB/W-F1 στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των NZB/W-F1 μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού (σύνολο = 3550)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Kng2	1,12E+14	5,13E+14	8,27E+14	6,07E-168	3,14E-164
Rnf41	1,20E+14	4,88E+14	7,65E+14	2,60E-154	6,70E-151
Hgd	1,02E+14	4,83E+14	7,44E+14	8,76E-151	1,51E-146
2900011O08Rik	-8,90E+14	4,65E+14	7,23E+14	3,65E-145	4,71E-142
Ceacam2	1,35E+14	3,76E+14	7,17E+14	6,29E-144	6,49E-141
Tagln3	-9,78E+14	4,29E+14	7,08E+14	4,91E-142	4,22E-139
Matn4	9,84E+14	3,99E+14	6,99E+14	4,99E-140	3,68E-137
Sst	-1,07E+13	4,14E+14	6,61E+14	7,15E-133	4,61E-129
Kng2	1,12E+14	5,13E+14	8,27E+14	6,07E-168	3,14E-164
Rnf41	1,20E+14	4,88E+14	7,65E+14	2,60E-154	6,70E-151
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των NZB/W-F1 μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα (σύνολο = 4810)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
2900011O08Rik	-1,06E+14	4,65E+14	8,16E+14	1,60E-166	8,25E-162
Ccdc183	-9,95E+14	4,17E+14	7,77E+14	6,62E-157	1,71E-153
Tagln3	-1,01E+14	4,29E+14	7,66E+14	1,27E-154	2,19E-151
Rpia	1,09E+14	4,78E+14	7,62E+14	8,02E-154	1,03E-150
Gap43	-1,08E+14	4,84E+14	7,60E+14	2,56E-153	2,64E-150
Abhd3	-7,67E+14	4,24E+14	7,26E+14	5,29E-147	4,55E-143
Sst	-1,18E+14	4,14E+14	7,22E+14	6,02E-145	4,44E-143
Olig1	-1,02E+14	4,37E+14	7,03E+13	8,28E-141	5,34E-138
2900011O08Rik	-1,06E+14	4,65E+14	8,16E+14	1,60E-166	8,25E-162
Ccdc183	-9,95E+14	4,17E+14	7,77E+14	6,62E-157	1,71E-153
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των NZB/W-F1 μεταξύ νεφρού και σπλήνα (σύνολο = 3267)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Kng2	-1,46E+13	5,13E+14	8,43E+14	2,64E-171	1,36E-167
Rnf41	-1,26E+14	4,88E+14	7,56E+14	1,96E-152	5,06E-150
Dbnidd1	-9,52E+14	4,96E+14	7,55E+14	3,02E-152	5,20E-149
Hgd	-1,04E+14	4,83E+14	7,32E+14	3,28E-147	4,23E-144
Matn4	-1,35E+14	3,99E+14	7,20E+14	1,43E-144	1,48E-141
Ceacam2	-1,35E+14	3,76E+14	6,99E+14	5,72E-140	4,93E-138
Abhd3	-7,10E+13	4,24E+14	6,14E+12	1,80E-121	1,32E-118
Apob	-1,44E+14	4,83E+14	5,78E+14	1,11E-113	7,17E-111
Kng2	-1,46E+13	5,13E+14	8,43E+14	2,64E-171	1,36E-167
Rnf41	-1,26E+14	4,88E+14	7,56E+14	1,96E-152	5,06E-150

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.5: ΔΕΓ διαφορετικών ιστών του C57BL/6 στο στάδιο της προ-εφηβίας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο στάδιο της προ-εφηβίας των C57BL/6 μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού (σύνολο = 3356)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Hgd	10,19724187	4,942187923	639,8607808	3,58E-141	1,87E-137
Rrbp1	-10,60172202	4,003872073	610,7926017	7,52E-135	1,97E-131
Rnf41	9,535747781	4,360304091	603,6548203	2,68E-133	4,68E-130
Ip6k1	-10,34664318	5,344145379	598,4736856	3,60E-132	4,70E-129
Knq2	11,66185871	4,471800811	597,5233879	5,79E-132	6,05E-129
Gap43	-12,0516609	4,775585873	581,2641562	1,99E-128	1,73E-125
Sst	-9,323045205	4,147678186	572,8523487	1,35E-126	1,00E-123
Paip2b	10,1489317	3,282824632	569,2975292	7,98E-126	5,21E-123
Hgd	10,19724187	4,942187923	639,8607808	3,58E-141	1,87E-137
Rrbp1	-10,60172202	4,003872073	610,7926017	7,52E-135	1,97E-131
ΔΕΓ στο στάδιο της προ-εφηβίας των C57BL/6 μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα (σύνολο = 3517)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Rrbp1	-1,03E+14	4,00E+14	6,43E+14	8,25E-128	4,31E-124
Sst	-1,10E+14	4,15E+13	6,36E+14	2,25E-126	5,88E-123
Ahcyl1	-9,83E+14	4,19E+14	6,29E+14	6,48E-125	1,13E-121
Ccdc183	-8,73E+14	4,22E+14	6,04E+14	2,23E-119	2,91E-116
Ip6k1	-9,65E+14	5,34E+14	5,99E+14	3,04E-118	3,18E-115
Olig1	-1,09E+14	5,00E+14	5,89E+13	4,25E-116	3,70E-114
Gap43	-8,82E+14	4,78E+14	5,47E+14	4,47E-107	3,34E-104
Suv39h1	-8,25E+14	4,07E+14	5,25E+14	3,13E-102	2,05E-99
Rrbp1	-1,03E+14	4,00E+14	6,43E+14	8,25E-128	4,31E-124
Sst	-1,10E+14	4,15E+13	6,36E+14	2,25E-126	5,88E-123
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των C57BL/6 μεταξύ νεφρού και σπλήνα (σύνολο = 2850)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Hgd	-9,94E+14	4,94E+14	6,02E+14	5,90E-119	3,08E-115
Rnf41	-1,16E+14	4,36E+14	5,95E+14	2,09E-117	5,45E-114
Knq2	-1,05E+14	4,47E+14	5,47E+13	5,08E-107	8,85E-104
Paip2b	-1,03E+14	3,28E+14	5,31E+14	2,02E-103	2,64E-100
Dbn1d1	-7,60E+14	4,33E+14	4,98E+14	2,31E-96	2,41E-93
Scn5a	-6,80E+14	4,61E+14	4,93E+14	3,43E-95	2,99E-92
Dnase1	-7,34E+14	6,14E+14	4,92E+14	5,92E-95	4,42E-92
Matn4	-9,43E+14	3,71E+12	4,86E+14	1,35E-93	8,80E-91
Hgd	-9,94E+14	4,94E+14	6,02E+14	5,90E-119	3,08E-115
Rnf41	-1,16E+14	4,36E+14	5,95E+14	2,09E-117	5,45E-114

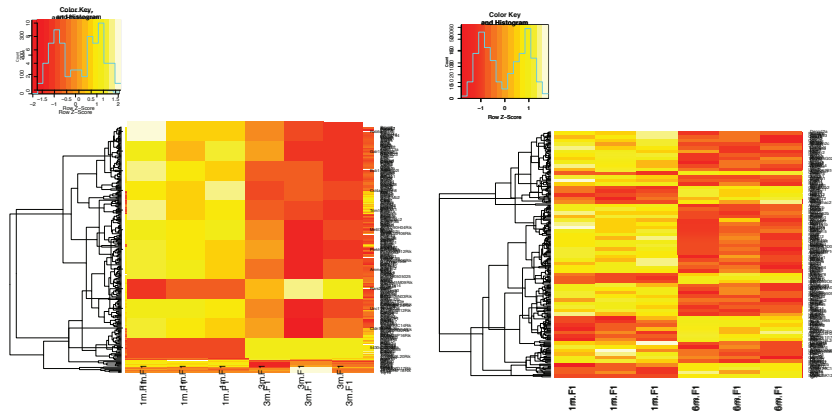
Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.6: ΔΕΓ διαφορετικών ιστών του C57BL/6 στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας των C57BL/6 μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού (σύνολο = 2554)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Hgd	1,22E+14	4,94E+14	1,86E+14	1,85E-28	1,01E-24
Sst	-1,21E+14	4,16E+13	1,69E+14	1,52E-24	4,17E-21
Gap43	-1,12E+14	4,85E+14	1,62E+14	5,20E-23	9,48E-20
Slc22a12	9,12E+14	6,99E+14	1,61E+14	7,48E-23	1,02E-19
Knng2	1,11E+14	4,84E+14	1,55E+14	1,22E-21	1,33E-18
2900011008Rik	-1,04E+14	4,70E+14	1,51E+14	1,06E-20	9,67E-18
Slc7a12	1,11E+14	4,72E+14	1,47E+13	6,64E-20	5,19E-17
Olig1	-1,09E+14	4,54E+14	1,43E+14	6,35E-19	4,34E-16
Hgd	1,22E+14	4,94E+14	1,86E+14	1,85E-28	1,01E-24
Sst	-1,21E+14	4,16E+13	1,69E+14	1,52E-24	4,17E-21
ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας των C57BL/6 μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα (σύνολο = 2260)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Fcer2a	8,73E+14	4,27E+14	1,53E+14	3,27E-21	1,79E-17
Kif26a	9,21E+14	6,53E+14	1,43E+12	4,86E-19	1,33E-15
Ciita	7,48E+14	4,13E+14	1,30E+14	4,16E-16	7,58E-13
Tmem151a	-9,57E+14	5,16E+14	1,23E+13	1,19E-14	1,63E-11
Btla	1,02E+13	4,82E+13	1,22E+14	1,87E-14	2,05E-11
Kif21b	8,04E+14	3,86E+14	1,18E+13	1,90E-13	1,73E-10
Cfb	7,36E+13	4,85E+14	1,17E+13	3,51E-13	2,75E-10
Rasl10b	9,16E+14	2,69E+14	1,15E+13	8,31E-13	5,66E-10
Fcer2a	8,73E+14	4,27E+14	1,53E+14	3,27E-21	1,79E-17
Kif26a	9,21E+14	6,53E+14	1,43E+12	4,86E-19	1,33E-15
ΔΕΓ στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας των C57BL/6 μεταξύ νεφρού και σπλήνα (σύνολο = 2060)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Fcer2a	1,04E+14	4,27E+14	1,71E+14	5,26E-25	2,88E-21
B3gnt5	9,74E+14	3,67E+14	1,59E+14	2,13E-22	5,81E-19
Slc22a12	-1,04E+14	6,99E+14	1,24E+13	8,33E-16	1,52E-11
Hgd	-1,15E+14	4,94E+14	1,19E+14	8,98E-14	1,23E-10
Kif26a	7,73E+14	6,53E+14	1,13E+14	2,23E-12	2,44E-09
Knng2	-1,22E+13	4,84E+14	1,08E+14	3,11E-11	2,84E-09
Acy3	-8,90E+14	7,08E+14	1,01E+14	7,60E-11	5,94E-07
Slc7a12	-1,18E+14	4,72E+14	1,00E+14	1,24E-09	8,49E-07
Fcer2a	1,04E+14	4,27E+14	1,71E+14	5,26E-25	2,88E-21
B3gnt5	9,74E+14	3,67E+14	1,59E+14	2,13E-22	5,81E-19

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.7: ΔΕΓ διαφορετικών ιστών του C57BL/6 στο στάδιο της νεφρίτιδας
FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των C57BL/6 μεταξύ εγκεφάλου και νεφρού (σύνολο = 3442)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Kng2	9,84E+14	5,13E+14	7,96E+14	4,84E-161	2,50E-157
Hgd	1,03E+14	4,83E+14	7,90E+14	6,35E-160	1,64E-156
Matn4	1,10E+14	3,99E+14	7,22E+14	4,47E-145	7,68E-142
Gap43	-9,81E+14	4,84E+14	7,12E+14	7,91E-143	1,02E-139
2900011O08Rik	-8,31E+14	4,65E+14	6,97E+14	1,49E-139	1,53E-138
Sst	-1,07E+14	4,14E+14	6,69E+14	1,67E-133	1,43E-130
Tagln3	-7,72E+14	4,29E+14	6,68E+14	2,30E-133	1,69E-130
Rnf41	8,77E+12	4,88E+14	6,66E+14	7,01E-133	4,17E-130
Kng2	9,84E+14	5,13E+14	7,96E+14	4,84E-161	2,50E-157
Hgd	1,03E+14	4,83E+14	7,90E+14	6,35E-160	1,64E-156
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των C57BL/6 μεταξύ εγκεφάλου και σπλήνα (σύνολο = 3390)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Rpia	9,91E+14	4,78E+14	5,19E+14	6,07E-101	3,13E-97
2900011O08Rik	-1,00E+14	4,65E+14	5,08E+14	1,98E-98	5,12E-95
Tagln3	-9,08E+14	4,29E+14	4,89E+14	2,26E-94	3,88E-91
Gap43	-1,03E+14	4,84E+14	4,84E+14	2,33E-93	3,01E-90
Olig1	-9,88E+14	4,37E+14	4,62E+14	2,04E-88	2,11E-85
Ccdc183	-9,39E+14	4,17E+14	4,60E+14	4,33E-88	3,73E-85
Rrbp1	-1,12E+14	4,30E+14	4,52E+14	2,54E-86	1,87E-83
Ahcyl1	-1,35E+14	4,03E+14	4,48E+14	1,68E-85	1,08E-82
Rpia	9,91E+14	4,78E+14	5,19E+14	6,07E-101	3,13E-97
2900011O08Rik	-1,00E+14	4,65E+14	5,08E+14	1,98E-98	5,12E-95
ΔΕΓ στο στάδιο της νεφρίτιδας των C57BL/6 μεταξύ νεφρού και σπλήνα (σύνολο = 2930)					
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Kng2	-1,45E+14	5,13E+14	5,30E+14	3,58E-103	1,85E-99
Hgd	-1,44E+14	4,83E+14	5,14E+14	8,15E-100	2,10E-96
Dbnidd1	-9,67E+14	4,96E+14	4,99E+14	1,24E-96	2,13E-93
Rnf41	-1,07E+14	4,88E+14	4,49E+14	1,37E-85	1,76E-82
Matn4	-1,34E+14	3,99E+14	4,43E+14	2,39E-84	2,47E-81
Abhd3	-6,78E+13	4,24E+14	4,01E+13	2,72E-75	2,34E-72
Steap2	-6,63E+14	4,63E+14	3,94E+14	1,06E-73	6,94E-72
Sec24b	-1,16E+14	4,51E+14	3,94E+14	1,08E-73	6,94E-72
Kng2	-1,45E+14	5,13E+14	5,30E+14	3,58E-103	1,85E-99
Hgd	-1,44E+14	4,83E+14	5,14E+14	8,15E-100	2,10E-96

ΤΕΛΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ ΣΤΟΧΟΣ (ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ)



ΠΡΟ-ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ
vs ΠΡΟ-EΦΗΒΙΑ
12 γονίδια

ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ
vs ΠΡΟ-EΦΗΒΙΑ
6 γονίδια

Συμπληρωματική εικόνα 4.1.7: Heatmaps των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) στον εγκέφαλο των NZB/W-F1 μεταξύ διαφορετικών σταδίων. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με το HTSeq. Με το edgeR, διαπιστώθηκαν τα ΔΕΓ με τροποποίηση >1.5 φορά (fold change >1.5) που εμφάνιζαν τιμή $p < 0.05$.

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.8: ΔΕΓ ίδιων οργάνων, ίδιων ζωικών προτύπων, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο σπλήνα των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου προ-εφηβίας και προ-αυτοανοσίας					(σύνολο = 277)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Igll1	-6,750502447	-1,206095985	43,22997736	4,87E-11	1,16E-07
Vpreb1	-4,87573277	-1,325840107	24,78155894	6,42E-07	0,000540125
Sebox	-4,022610424	-1,33129368	14,27751495	0,000157738	0,010530883
Gpatch8	-3,773285862	4,436640804	12,2938265	0,000454459	0,017157334
Abcb8	-3,617054857	-0,607719715	9,847699815	0,001700442	0,035589342
Rsad1	-3,615401146	-0,525419413	13,18986438	0,000281467	0,013255805
Dlg4	-3,393942109	-1,671109443	12,39521765	0,000430435	0,016919709
Sh3pxd2b	-3,1406075	0,464403018	12,81691097	0,0003435	0,01489446
Igll1	-6,750502447	-1,206095985	43,22997736	4,87E-11	1,16E-07
Vpreb1	-4,87573277	-1,325840107	24,78155894	6,42E-07	0,000540125
ΔΕΓ στο σπλήνα των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου νεφρίτιδας και προ-εφηβίας					(σύνολο = 212)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Igll1	-6,018772929	-1,206095985	40,41165633	2,06E-10	8,75E-08
Vpreb1	-4,364857471	-1,325840107	22,48100016	2,12E-06	0,000343327
Sh3pxd2b	-3,383191653	0,464403018	14,59455934	0,000133299	0,008244925
Stat2	-2,983332181	-0,140113271	15,86318249	6,81E-05	0,005024366
Dlg4	-2,834175485	-1,671109443	9,524618222	0,002027338	0,043284172
Acsf2	-2,549889346	-0,921231839	14,3776876	0,000149564	0,008880739
Xkr5	-2,416388374	-0,468986711	16,62701979	4,55E-05	0,003986781
Rbp2	-2,277287244	-0,233247732	14,1368908	0,000169977	0,009661149
Igll1	-6,018772929	-1,206095985	40,41165633	2,06E-10	8,75E-08
Vpreb1	-4,364857471	-1,325840107	22,48100016	2,12E-06	0,000343327
ΔΕΓ στο σπλήνα των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου νεφρίτιδας και προ-αυτοανοσίας					(σύνολο = 15)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Cd209a	-2,419878045	0,940867336	19,10242481	1,24E-05	0,005789671
Trat1	-2,217337483	-0,116684432	17,25585636	3,27E-05	0,013740541
Lrrc2	-1,616842948	0,881912529	14,99831611	0,000107607	0,032328263
Tdrp	-1,552819737	2,577555182	22,22008872	2,43E-06	0,001460784
Cd209d	-1,458174016	0,07086125	17,00768319	3,72E-05	0,014234964
Txndc11	1,064711775	4,146281263	15,88507116	6,73E-05	0,021776582
Tigit	1,586063279	0,566815105	28,98806714	7,28E-08	0,000102101
Lgi1	1,799601582	-0,458530509	14,33197798	0,00015324	0,042968379

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.9: ΔΕΓ ίδιων οργάνων, ίδιων ζωικών προτύπων, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στον εγκέφαλο των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου προ-εφηβίας και προ-αυτοανοσίας					(σύνολο = 12)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Cldn14	-3,28377595	-1,011150023	17,77945311	2,48E-05	0,017243439
Ammecr1l	-1,346234825	2,531025466	36,87450079	1,26E-09	2,63E-06
Bub1	-1,268912077	5,173588257	33,71220988	6,39E-09	7,53E-06
Unc119	-1,227948387	0,488723849	16,80383277	4,14E-05	0,021610734
Trim10	-1,103844496	3,402823964	33,47378349	7,22E-09	7,53E-06
Mettl7b	-0,916373582	1,621131065	17,42497596	2,99E-05	0,017808557
Galr1	-0,915358666	5,992825564	14,94183243	0,000110877	0,042042542
Plekhj1	-0,901259159	1,569630997	15,7219864	7,34E-05	0,03060113
Rab5c	-0,822013475	6,30814653	19,16308161	1,20E-05	0,010011416
Col4a2	-0,688109821	3,723373557	16,53232638	4,78E-05	0,022165474
Rars2	1,045813216	0,974288673	14,53027914	0,000137925	0,047940366
5430425K12Rik	7,438800559	-1,312245774	38,94364462	4,36E-10	1,82E-06
Cldn14	-3,28377595	-1,011150023	17,77945311	2,48E-05	0,017243439
Ammecr1l	-1,346234825	2,531025466	36,87450079	1,26E-09	2,63E-06
ΔΕΓ στον εγκέφαλο των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου νεφρίτιδας και προ-εφηβίας					(σύνολο = 6)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Dnajb11	-0,565388259	4,073067739	11,4940187	0,000698205	0,044124447
Itga7	-0,554272491	3,158199178	13,45766751	0,000244007	0,02678297
Myadm	-0,466094637	4,766710493	12,78226368	0,000349921	0,029786152
Map3k12	0,470430886	4,110848686	11,54283723	0,000680108	0,043641988
Cldn7	0,483228923	4,21373118	13,33221933	0,000260885	0,027388929
Copg1	0,52903273	4,765863683	14,0494056	0,00017807	0,021257028

Συμπληρωματικός πίνακας 4.1.10: ΔΕΓ ίδιων οργάνων, ίδιων ζωικών προτύπων, σε διαφορετικά στάδια του νοσήματος. FC=Fold Change; CPM=Counts Per Million reads; LR=Likelihood Ratio; FDR=False Discovery rate

ΔΕΓ στο νεφρό των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου προ-εφηβίας και προ-αυτοανοσίας					(σύνολο = 1)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Ceacam2	2,816435884	4,360421436	26,53538002	2,59E-07	0,001046925
ΔΕΓ στο νεφρό των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου νεφρίτιδας και προ-εφηβίας					(σύνολο = 8)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Gm6300	-4,009010325	2,188869685	19,47758794	1,02E-05	0,010295754
Zfp94	2,900203791	-0,867272305	15,77373492	7,14E-05	0,041261499
Ube2g1	2,919897162	1,254393115	17,62118416	2,70E-05	0,021813505
Ceacam2	3,780655255	4,360421436	44,1687409	3,01E-11	6,09E-08
Rpia	4,516593161	-0,208642721	15,94228243	6,53E-05	0,041261499
Gm8369	4,54079745	-1,445014074	15,25114541	9,41E-05	0,047601018
Tdrd9	7,658535589	1,403557903	45,75226639	1,34E-11	5,43E-08
Aspg	9,170367631	0,458886333	20,09762784	7,36E-06	0,009924554
Gm6300	-4,009010325	2,188869685	19,47758794	1,02E-05	0,010295754
Zfp94	2,900203791	-0,867272305	15,77373492	7,14E-05	0,041261499
ΔΕΓ στο νεφρό των NZB/W-F1 μεταξύ σταδίου νεφρίτιδας και προ-αυτοανοσίας					(σύνολο = 15)
Gene	logFC	logCPM	LR	P Value	FDR
Zfp94	3,270752684	-0,867272305	18,37603973	1,81E-05	0,036681809
Tdrd9	6,355505495	1,403557903	36,67684633	1,39E-09	5,64E-06

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.1: Ανάλυση ΔΕΓ του σπλήνα στο στάδιο της προ-εφηβίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Interferon signaling	2.20E-05	22.6% 7/31
Cell cycle control of chromosomal replication	7.59E-05	23.1% 6/26
Axonal guidance signaling	9.93E-05	6.4% 27/424
Antigen presentation pathway	9.06E-04	18.5% 5/27
Molecular mechanisms of cancer	1.56E-03	5.9% 21/357
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
Ifnar	1.80E-05	Activated
IL10RA	1.22E-04	
HSF1	1.86E-04	
NFkB (complex)	1.96E-04	
TAPBP	1.96E-04	
Κυριότερα Ρυθμιστικά Δίκτυα		
Ταυτότητα Ρυθμιστών	Νοσήματα και λειτουργίες	Consistency score
FOXO1, Ifnar, IRF1	Activation of blood cells	6.03
Ifnar, Interferon alpha	Cytotoxicity of T cells	3.13
FOXO1	Proliferation of blood cells	-4.899
Interferon alpha	Proliferation of B cells	-5.814
Ifnar, IRF1	Infection of tumor cell lines	-13
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Cell morphology, cell movement, nervous system development and function		47
Cell-to-cell signaling and interaction, nervous system development and interaction, visual system development and function		40
Cell-to cell signaling and interaction, cellular compromise, neurological disease		36
Carbohydrate metabolism, drug metabolism, lipid metabolism		36
Cellular assembly and organization, DNA replication, recombination and repair, cell cycle		36
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
Decrease transmembrane potential of mitochondria and mitochondrial membrane	1.00E-03	9.3% 10/107
Increases renal proliferation	1.44E-02	6.8% 9/133
Vasopressin-induced genes in inner medullary renal collecting duct cells	2.05E-02	25% 2/8
Renal necrosis/cell death	2.39E-02	4.5% 22/486
Long-term renal injury pro-oxidative response panel	5.19E-02	15.4% 2/13
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TAP2	10.131	UP
HLA-E	6.652	UP
PPARGC1B	6.208	UP
Olf432	6.081	UP
H2-T24	4.939	UP
LGI1	4.715	UP
NAALADL1	4.574	UP
ATP1A2	4.326	UP
Διαφορά υποέκφρασης		

Μόρια	Τιμή	
1810007D17Rik	-12.807	DOWN
PRSS1	-11.792	DOWN
1810018F18Rik	-11.564	DOWN
CPA4	-8.993	DOWN
Gm4956	-7.980	DOWN
JAKMIP2	-7.024	DOWN
GDPD5	-6.315	DOWN
TNNI3	-5.729	DOWN
MICAL2	-5.655	DOWN
NUDCD3	-5.615	DOWN

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.2: Ανάλυση ΔΕΓ του σπλήνα στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Colorectal cancer metastasis signaling	4.35E-04	4.7% 11/232
Antigen presentation pathway	5.06E-04	14.8% 4/27
Role of macrophages, fibroblasts, and endothelial cells in Rheumatoid Arthritis	2.36E03	3.8% 11/286
Hepatic fibrosis/ Hepatic stellate cell activation	3.36E03	4.5% 8/176
Epithelial adherence junction signaling	3.55E03	5% 7/140
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
IL10RA	6.45E-05	
PPAP2B	1.75E-04	
COL18A1	1.80E-04	
COL4A3	2.59E-04	
MKNK1	3.27E-04	
Κυριότερα Ρυθμιστικά Δίκτυα		
Ταυτότητα Ρυθμιστών	Νοσήματα και λειτουργίες	Consistency score
CD44, Hsp90, RETNLB, TWIST1	Adhesion of immune cells	14.849
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Dermatological diseases and conditions, developmental disorder, hereditary disorder		31
Cardiovascular disease, cardiovascular system development and function, organismal injury and abnormalities		31
Cell morphology, cellular function and maintenance, nervous system development and function		29
Embryonic development, organismal development, tissue development		25
Lipid metabolism, molecular transport, small molecule biochemistry		23
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
Hepatic fibrosis	2.27E-03	6.2% 6/96
Genes associated with chronic allograft nephropathy (human)	2.97E-03	14.3% 3/21
Increases liver steatosis	6.12E-03	6.0% 5/83
Positive acute phase response proteins	6.81E-03	10.7% 3/28
RAR activation	1.62E-02	3.7% 7/187
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
1819997D17Rik	16.023	UP
TAP2	14.334	UP
CPA4	12.164	UP
1810018F18Rik	11.949	UP
PRSS1	11.446	UP
MICAL2	8.414	UP
JAKMIP2	8.311	UP
Olf432	7.819	UP
1700013D24Rik	7.232	UP
PPARGC1B	7.123	UP
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TNNI3	-7.858	DOWN

VAMP2	-6.783	DOWN
GDPD5	-5.497	DOWN
NUDCD3	-5.314	DOWN
Gm4956	-5.122	DOWN
USP35	-4.516	DOWN
ABCB8	-3.853	DOWN
USO1	-3.595	DOWN
CDH13	-3.025	DOWN
DHX34	-2.840	DOWN

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.3: Ανάλυση ΔΕΓ του εγκεφάλου στο στάδιο της προ-εφηβίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Airway pathology in chronic obstructive pulmonary disease	1.2E-02	14.3% 1/7
Mineralocorticoid biosynthesis	1.54E-02	11.1% 1/9
Role of lipids/lipid rafts in the pathogenesis of influenza	1.71E-02	10% 1/10
Glucocorticoid biosynthesis	1.71E-02	10% 1/10
Adrogen biosynthesis	2.22E-02	7.7% 1/13
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
TFAM	4.44E-04	
CIDEA	8.76E-04	
NR1H4	1.19E-03	
S100A4	1.57E-03	
VAMP3	1.57E-03	
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Carbohydrate metabolism, lipid metabolism, small molecule biochemistry		24
Organismal functions, energy production, nutritional disease		21
Cellular function and maintenance, molecular transport, cellular assembly and organization		11
Cancer, endocrine system disorders, gastrointestinal disease		3
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
Genes associated with chronic allograft nephropathy	3.56E-02	4.8% 1/21
LPS-IL-10 mediated inhibition of RXR function	5.81E-02	0.9% 2/227
Hepatic fibrosis	1.53E-01	1% 1/96
Fatty acid metabolism	1.72E-01	0.9% 1/109
RAR activation	2.77E-01	0.5% 1/187
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
PPARGC1B	4.744	UP
PRR3	4.665	UP
STK32A	3.507	UP
BC002163	2.854	UP
Aldh3b2	2.498	UP
GIGYF1	1.862	UP
TMEM87A	1.848	UP
WDFY1	1.676	UP
VPS39	1.475	UP
SDF2L1	1.424	UP
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
VAMP2	-5.893	DOWN
NRM	-3.127	DOWN
FABP5	-2.306	DOWN
Hsd3b4	-2.225	DOWN
BRD7	-2.182	DOWN
PPP1R18	-1.857	DOWN
DAD1	-1.572	DOWN
IZUMO4	-1.482	DOWN

Zfp953	-1.274	DOWN
LPIN2	-1.195	DOWN

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.4: Ανάλυση ΔΕΓ του εγκεφάλου στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Mineralocorticoid biosynthesis	1.34E-02	11.1% 1/9
Glucocorticoid biosynthesis	1.49E-02	10.0% 1/10
Androgen biosynthesis	1.94E-02	7.7% 1/13
Telomere extension by telomerase	2.08E-02	7.1% 1/14
Histamine degradation	2.23E-02	6.7% 1/15
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
FOLR1	2.80E-04	
VAMP3	1.36E-03	
FSHR	2.11E-03	
HCFC1	2.73E-03	
SYP	2.73E-03	
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Cellular function and maintenance, molecular transport, cell death and survival		33
Lipid metabolism, small molecule biochemistry, energy production		24
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
Renal proximal tubule toxicity biomarker panel	3.69E-02	4% 1/25
LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function	4.53E-02	0.9% 2/227
Decreases transmembrane potential of mitochondria and mitochondrial membrane	1.49E-01	0.9% 1/107
RAR activation	2.46E-01	0.5% 1/187
Cardiac hyperthrophy	4.53E-01	0.3% 1/397
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
PPARGC1B	5.320	UP
PRR3	3.818	UP
BC002163	3.432	UP
Aldh3b2	2.856	UP
5430425K12Rik	2.850	UP
WDFY1	2.070	UP
STK32A	2.016	UP
TMEM87A	1.723	UP
MPDZ	1.464	UP
ADARB2	1.277	UP
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
NRM	-4.950	DOWN
VAMP2	-4.614	DOWN
BRD7	-3.235	DOWN
FABP5	-2.305	DOWN
PPP1R18	-2.071	DOWN
TNKS2	-1.788	DOWN
Hsd3b4	-1.444	DOWN
ANKRD63	-1.433	DOWN
JAGN1	-1.335	DOWN

DAD1	-1.310	DOWN

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.5: Ανάλυση ΔΕΓ του εγκεφάλου στο στάδιο της νεφρίτιδας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Branched-chain –keto acid dehydrogenase complex	5.55E-03	25% 1/4
Acetyl-CoA biosynthesis I (pyruvate dehydrogenase complex)	8.32E-03	16.7% 1/6
Phosphatidylcholine biosynthesis I	9.70E-03	14.3% 1/7
Choline biosynthesis III	1.66E-02	8.3% 1/12
Telomere extension by telomerase	1.93E-02	7.1% 1/14
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
VAMP3	1.31E-03	
HCFC1	2.63E-03	
SYP	2.63E-03	
APPL1	2.63E-03	
NDUFAB1	2.63E-03	
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Carbohydrate metabolism, cellular assembly and organization, cellular movement		28
Organismal functions, infectious diseases, lipid metabolism		22
Molecular transport, protein trafficking, cellular growth and proliferation		3
Cancer, endocrine system disorders, gastrointestinal disease		3
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function	3.94E-02	0.9% 2/227
Decreases transmembrane potential of mitochondria and mitochondrial membrane	1.39E-01	0.9% 1/107
RAR activation	2.30E-01	0.5% 1/187
Cardiac hyperthrophy	4.28E-01	0.3% 1/397
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
PPARGC1B	5.66	UP
BC002163	3.494	UP
5430425K12Rik	3.183	UP
PRR3	3.160	UP
Aldh3b2	2.943	UP
STK32A	2.460	UP
WDFY1	2.209	UP
SVIP	2.208	UP
CCL25	1.791	UP
MPDZ	1.789	UP
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
NRM	5.726	DOWN
VAMP2	5.441	DOWN
BRD7	4.446	DOWN
PPP1R18	2.705	DOWN
TNKS2	2.275	DOWN
FABP5	2.021	DOWN
PCDHB12	1.558	DOWN
AMZ2	1.427	DOWN

PCDHB11	1.335	DOWN
PALS1	1.298	DOWN

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.6: Ανάλυση ΔΕΓ του νεφρού στο στάδιο της προ-εφηβίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Antigen presentation pathway	2.86E-03	7.4% 2/27
LXR/RXR activation	4.18E-03	2.7% 3/110
Zymosterol synthesis	1.76E-02	16.75 1/6
Ketolysis	2.33E-02	12.5% 1/8
TR/RXR activation	2.38E-02	2.5% 2/81
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
IL10RA	1.36E-03	
FGF19	1.48E-03	
GNA15	2.05E-03	
VAMP3	2.68E-03	
FECH	3.12E-03	
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Cell death and survival, cellular compromise, developmental disorder		33
Cancer, organismal injury and abnormalities, cellular assembly and organization		31
Lipid metabolism, molecular transport, small molecule biochemistry		18
RNA post-transcriptional modification, cellular development, tissue development		10
Behavior, cancer, cardiovascular disease		2
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
LXR/RXR activation	4.40E-03	2.7% 3/112
TR/RXR activation	2.38E-02	2.5% 2/81
Genes downregulated in response to chronic renal failure	2.91E-02	10% 1/10
Cytochrome P450 panel –substrate is a sterol	4.05E-02	7.1% 1/14
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
SF3A1	10.377	
Gm6300	10.046	
TAP2	9.576	
HLA-E	7.957	
MAATS1	7.533	
Zfp493	6.584	
DLK2	6.529	
WDR86	6.494	
Hm13	6.355	
GOLGA5	5.785	
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TFCP2	-7.613	
AKR1C1/AKR1C2	-6.028	
NUDCD3	-5.296	
VAMP2	-4.968	
CLIC6	-3.572	
Marcks1-ps4	-3.498	
4930481A15Rik	-3.463	
UBE2G1	-3.195	
CBR3	-2.696	

ENTPD7	-2.224	

Συμπληρωματικός πίνακας 4.2.7: Ανάλυση ΔΕΓ του νεφρού στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας, μεταξύ NZB/W-F1 και C57BL/6 με το Ingenuity Pathway Analysis

Κυριότερες Κανονικές Οδοί		
Όνομα	P-value	Overlap
Germ cell-Sertoli cell junction signaling	2.31E-04	11.8% 18/152
Breast cancer regulation by Stathmin 1	3.38E-04	10.9% 20/184
Pentose Phosphate pathway (non-oxidative branch)	1.77E-03	50.0% 3/6
Regulation of eIF4 and p70S6K	1.79E-03	10.9% 15/138
4-hydroxyproline degradation I	2.13E-03	100% 2/2
Κυριότερος Ανοδικός Ρυθμιστής		
Ανοδικός ρυθμιστής	P-value of overlap	Predicted activation
ESR1	4.37E-05	
AGT	9.51E-05	Inhibited
HSF1	1.26E-04	
SYVN1	1.62E-04	Inhibited
mir-1	2.96E-04	Activated
Κυριότερα Ρυθμιστικά Δίκτυα		
Ταυτότητα Ρυθμιστών	Νοσήματα και λειτουργίες	Consistency score
ALDH1A2	Adenocarcinoma, apoptosis of tumor cell lines	10.429
AGT, EPAS1, IKBKG, PPARG, TGFB1	Adhesion of kidney cells	10.206
AGT, EPAS, NFKBIA, TGFB1	Cell movement of Schwann cells	6.957
CD44, NFE2L2, SP1, SYVN1	Apoptosis of tumor cell lines	5.316
AGT, CD3, EPAS1	Abdominal cancer, adenocarcinoma	4.4
Λειτουργίες Κυριότερων Δικτύων		
		Score
Cellular assembly and organization, developmental disorder, skeletal and muscular disorders		45
Organ morphology, skeletal and muscular development, developmental disorder		43
Hereditary disorder, metabolic disease, organismal injury and abnormalities		40
DNA replication recombination and repair, embryonic development, tissue morphology		40
RNA post-transcriptional modification, DNA replication recombination and repair, cancer		40
Κυριότερες λίστες Tox		
Όνομα	P value	Overlap
Fatty acid metabolism	1.54E-03	11.9% 13/109
Increases cardiac dilation	8.41E-03	17.9% 5/28
Glutathione depletion – CYP induction and reactive metabolites	1.23E-02	27.3% 3/11
Genes upregulated in response to chronic renal failure	1.94E-02	40.0% 2/5
NRF2-mediated oxidative stress response	2.19E-02	7.9% 17/215
Κυριότερα μόρια		
Διαφορά υπερέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
SCG2	7.775	UP
GAL	7.402	UP
TNFSF8	5.994	UP
Adam3	5.849	UP
Defa3	5.151	UP
PLG	5.147	UP
4933406F09Rik	4.447	UP
TPTE2	4.328	UP
Zfp493	4.185	UP
RXFP4	4.129	UP

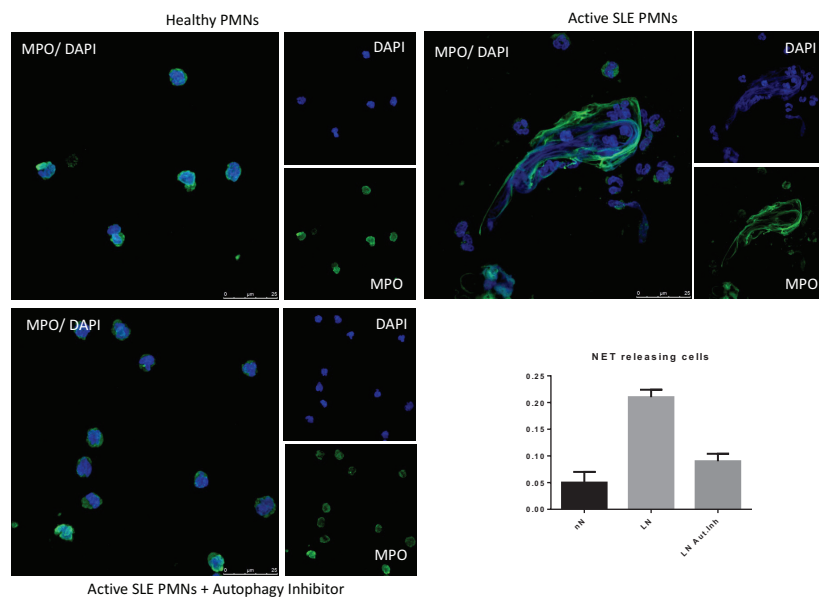
Διαφορά υποέκφρασης		
Μόρια	Τιμή	
TFCP2	-11.794	DOWN
ORMDL2	-9.681	DOWN
SLC34A1	-9.438	DOWN
AKR1C1/AKR1C2	-9.329	DOWN
CDV3	-9.289	DOWN
TCF20	-8.951	DOWN
RAB24	-8.004	DOWN
SOD3	-7.915	DOWN
TNS1	-7.244	DOWN
OXCT1	-6.994	DOWN

Συμπληρωματικός πίνακας 4.3.1: Διαφορική έκφραση γονιδίων αυτογαφίας στα ζωικά πρότυπα λύκου

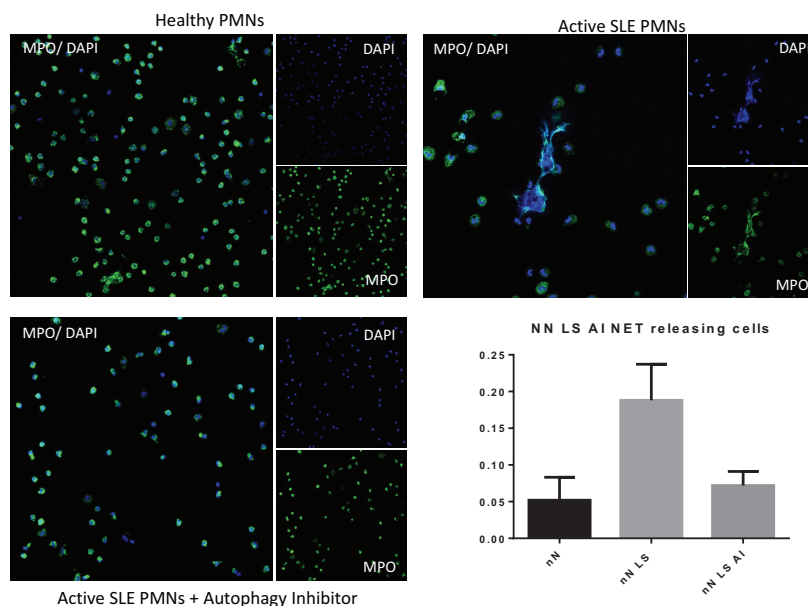
Περιφερικό λεμφικό όργανο: σπλήνας		
1mo NZB/W-F1 vs 1mo C57BL/6	3mo NZB/W-F1 vs 3mo C57BL/6	6mo NZB/W-F1 vs 6mo C57BL/6
ATG9A	Vps52	PPARGC1b
PPARGC1b	Vps39	
Vps52	ULK3	
Vps25	AKT1	
Vps37b	PPARGC1b	
Deptor		
Vps18		
3mo NZB/W-F1 vs 1mo NZB/W-F1	6mo NZB/W-F1 vs 1mo NZB/W-F1	6mo NZB/W-F1 vs 3mo NZB/W-F1
ATG9A	ATG9A	
Vps37B	Vps37B	
PIK3c2b	PIK3c2b	
	Deptor	
Τελικό όργανο-στόχος: νεφρός		
1mo NZB/W-F1 vs 1mo C57BL/6	3mo NZB/W-F1 vs 3mo C57BL/6	6mo NZB/W-F1 vs 6mo C57BL/6
PPARGC1b	Vps25	PPARGC1b
	Vps13a	
	Vps4a	
	Vps33a	
	Vps39	
	PPARGC1b	
	AMBRA1	

Συμπληρωματικός πίνακας 4.3.2: Διαφορική έκφραση γονιδίων ουδετεροφίλων στα ζωικά πρότυπα λύκου

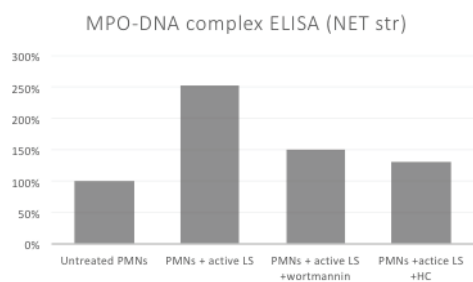
Περιφερικό λεμφικό όργανο: σπλήνας		
1mo NZB/W-F1 vs 1mo C57BL/6	3mo NZB/W-F1 vs 3mo C57BL/6	6mo NZB/W-F1 vs 6mo C57BL/6
PIK3c2B	Src	
PLCb2		
PLCb3		
RAB6b		
Τελικό όργανο-στόχος: νεφρός		
1mo NZB/W-F1 vs 1mo C57BL/6	3mo NZB/W-F1 vs 3mo C57BL/6	6mo NZB/W-F1 vs 6mo C57BL/6
PLCxd2	Rho	



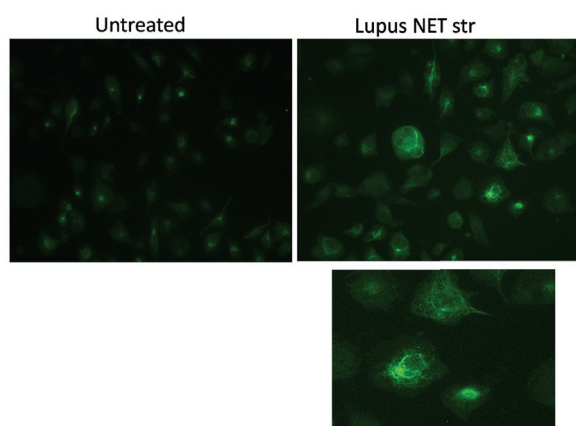
Συμπληρωματική εικόνα 4.4.1: Τα ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένη NETωση η οποία επάγεται από την αυτοφαγία. Απομονώθηκαν ουδετερόφιλα από υγιείς (healthy PMNs) και ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (active SLE PMNs). Τα ουδετερόφιλα ασθενών με ΣΕΛ καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία αναστολέα αυτοφαγίας (active SLE PMNs + Autophagy Inhibitor). Η NETωση αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό μυελοπεροξειδάσης (MPO) (πράσινο) με εξωκυττάριο DNA (μπλε).



Συμπληρωματική εικόνα 4.6.1: Ο ορός από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ αυξάνει την απελευθέρωση NETs. Απομονώθηκαν υγιή ουδετερόφιλα (Healthy PMNs), ουδετερόφιλα από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (Active SLE PMNs) και ουδετερόφιλα ασθενών με ενεργό ΣΕΛ τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία αναστολέα αυτοφαγίας (Active SLE PMNs + Autophagy Inhibitor). Η NETωση αξιολογήθηκε με συνεστιακή μικροσκόπηση ως προς το συνεντοπισμό MPO (πράσινο) με εξωκυττάριο DNA (μπλε).



Συμπληρωματική εικόνα 4.6.2: Απομονώθηκαν δομές NETs από υπερκείμενα καλλιιεργειών με υγιή ουδετερόφιλα (untreated PMNs), από υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (PMNs + active LS), από υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία wortmannin (PMNs + active LS + wortmannin) και από υγιή ουδετερόφιλα τα οποία επωάστηκαν με ορό από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ παρουσία υδροξυλχωροκίνης (PMNs + active LS + HC). Με τη μέθοδο ELISA μετρήθηκε το σύμπλοκο μυελοπεροξειδάσης-DNA (MPO-DNA complex).



Συμπληρωματική εικόνα 4.9.1: Τα NETs των ασθενών με ΣΕΛ τροποποιούν τη μορφολογία των ανθρώπινων επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων (ποδοκυττάρων). Ανοσοφθορισμός για WT1. Ανθρώπινα επιθηλιακά σπειραματικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλλιιεργητικό μέσο (Untreated) ή σε καλλιιεργητικό μέσο παρουσία δομών NET από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (Lupus NET str). Στο κάτω τμήμα απεικονίζεται η μεγέθυνση της άνω εικόνας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bertsias GK, Salmon JE, Boumpas DT. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1603-1611. doi:10.1136/ard.2010.135186.
2. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2110-2121. doi:S0031-3955(05)00027-1 [pii]\r10.1016/j.pcl.2005.01.010.
3. Smith CD, Cyr M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am*. 1988;14(1):1-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3041483>.
4. Konya C, Paz Z. *Systemic Lupus Erythematosus*.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-801917-7.00001-2.
5. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(11):1271-1277. doi:10.1002/art.1780251101.
6. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-2686. doi:10.1002/art.34473.
7. D'Cruz D, Khamashta M, Hughes G. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007;369(9561):587-596.
8. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int*. 2004;65(2):521-530. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x.
9. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited.[comment][erratum appears in J Am Soc Nephrol. 2004 Mar;15(3):835-6]. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(2):241-250.
10. Moser K, Kelly J, Lessard C, Harley J. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2009;10:373-379. doi:10.1038/gene.2009.39.
11. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(12):683-692. doi:10.1038/nrrheum.2010.176.
12. Guerra SG, Vyse TJ, Cunninghame Graham DS. The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):211. doi:10.1186/ar3844.
13. Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2007;39(9):1065-1067. doi:10.1038/ng2091.
14. Namjou B, Kothari PH, Kelly JA, et al. Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun*. 2011;12(4):270-279. doi:10.1038/gene.2010.73.
15. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2001;28(4):313-314. doi:10.1038/91070.
16. Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*. 2008;40(2):204-210. doi:10.1038/ng.81.
17. Bentham J, Morris DL, Cunninghame Graham DS, et al. Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2015;47(12):1457-1464. doi:10.1038/ng.3434.
18. Lessard CJ, Sajuthi S, Zhao J, et al. Identification of a Systemic Lupus Erythematosus Risk Locus Spanning ATG16L2, FCHSD2, and P2RY2 in Koreans. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(5):1197-1209. doi:10.1002/art.39548.
19. Alarcón-Riquelme ME, Ziegler JT, Molineros J, et al. Genome-Wide Association Study in an Amerindian Ancestry Population Reveals Novel Systemic Lupus Erythematosus Risk Loci and the Role of European Admixture. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(4):932-943. doi:10.1002/art.39504.
20. Hom G, Graham RR, Modrek B, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*. 2008;358(9):900-909. doi:10.1056/NEJMoa0707865.
21. Nath SK, Han S, Kim-Howard X, et al. A nonsynonymous functional variant in integrin-α(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008;40(2):152-154. doi:10.1038/ng.71.
22. Yang W, Zhao M, Hirankarn N, et al. ITGAM is associated with disease susceptibility and renal nephritis of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese and Thai. *Hum Mol Genet*.

- 2009;18(11):2063-2070. doi:10.1093/hmg/ddp118.
23. S?nchez E, Comeau ME, Freedman BI, et al. Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis Rheum*. 2011;63(11):3493-3501. doi:10.1002/art.30563.
24. Kim K, Brown EE, Choi C-B, et al. Variation in the ICAM1-ICAM4-ICAM5 locus is associated with systemic lupus erythematosus susceptibility in multiple ancestries. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1809-1814. doi:10.1136/annrheumdis-2011-201110.
25. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*. 1996;97(5):1348-1354. doi:10.1172/JCI118552.
26. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of Fc??RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997;100(5):1059-1070. doi:10.1172/JCI119616.
27. Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, et al. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun*. 1999;1(1):53-60. doi:10.1038/sj.gene.6363639.
28. Zuñiga R, Ng S, Peterson MGE, et al. Low-binding alleles of fc?? receptor types IIA and IIIA are inherited independently and are associated with systemic lupus erythematosus in hispanic patients. *Arthritis Rheum*. 2001;44(2):361-367. doi:10.1002/1529-0131(200102)44:2<361::AID-ANR54>3.0.CO;2-G.
29. Douglas KB, Windels DC, Zhao J, et al. Complement receptor 2 polymorphisms associated with systemic lupus erythematosus modulate alternative splicing. *Genes Immun*. 2009;10(5):457-469. doi:10.1038/gene.2009.27.
30. Wu H, Boackle SA, Hanvivadhanakul P, et al. Association of a common complement receptor 2 haplotype with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):3961-3966. doi:0609101104 [pii]r10.1073/pnas.0609101104.
31. Walport MJ, Davies K a, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*. 1998;199(2):265-285. doi:10.1016/S0171-2985(98)80032-6.
32. Vyse TJ, Morley BJ, Bartók I, et al. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest*. 1996;97(4):925-933. doi:10.1172/JCI118515.
33. Bowness P, Davies KA, Norsworthy PJ, et al. Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *QJM*. 1994;87(8):455-464. doi:10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068955.
34. Walport MJ, Davies KA, Morley BJ, Botto M. Complement deficiency and autoimmunity. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 815. ; 1997:267-281. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb52069.x.
35. Han JW, Zheng HF, Cui Y, et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2009;41(11):1234-1237. doi:10.1038/ng.472.
36. Lessard CJ, Adrianto I, Ice JA, et al. Identification of IRF8, TMEM39A, and IKZF3-ZBP2 as susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in a large-scale multiracial replication study. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):648-660. doi:10.1016/j.ajhg.2012.02.023.
37. Molineros JE, Maiti AK, Sun C, et al. Admixture Mapping in Lupus Identifies Multiple Functional Variants within IFIH1 Associated with Apoptosis, Inflammation, and Autoantibody Production. *PLoS Genet*. 2013;9(2). doi:10.1371/journal.pgen.1003222.
38. Graham DS, Morris DL, Bhangale TR, et al. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*. 2011;7(10). doi:10.1371/journal.pgen.1002341.
39. Ciccacci C, Perricone C, Ceccarelli F, et al. A multilocus genetic study in a cohort of Italian SLE patients confirms the association with STAT4 gene and describes a new association with HCP5 gene. *PLoS One*. 2014;9(11). doi:10.1371/journal.pone.0111991.
40. Adrianto I, Wang S, Wiley GB, et al. Association of two independent functional risk haplotypes in TNIP1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(11):3695-3705. doi:10.1002/art.34642.
41. Gateva V, Sandling JK, Hom G, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2009;41(11):1228-1233.

doi:10.1038/ng.468.

42. Zuo XB, Sheng YJ, Hu SJ, et al. Variants in TNFSF4, TNFAIP3, TNIP1, BLK, SLC15A4 and UBE2L3 interact to confer risk of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Rheumatol Int.* 2014;34(4):459-464. doi:10.1007/s00296-013-2864-3.
43. Sheng Y-J, Gao J-P, Li J, et al. Follow-up study identifies two novel susceptibility loci PRKCB and 8p11.21 for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(4):682-688. doi:10.1093/rheumatology/keq313.
44. Demirci FY, Wang X, Kelly JA, et al. Identification of a New Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus on Chromosome 12 in Individuals of European Ancestry. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2016;68(1):174-183. doi:10.1002/art.39403.
45. Sawalha AH, Webb R, Han S, et al. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2008;3(3). doi:10.1371/journal.pone.0001727.
46. Kaufman KM, Zhao J, Kelly JA, et al. Fine mapping of Xq28: both MECP2 and IRAK1 contribute to risk for systemic lupus erythematosus in multiple ancestral groups. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(3):437-444. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201851.
47. Lewis MJ, Vyse S, Shields AM, et al. UBE2L3 polymorphism amplifies NF- κ B activation and promotes plasma cell development, linking linear ubiquitination to multiple autoimmune diseases. *Am J Hum Genet*. 2015;96(2):221-234. doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.024.
48. Wang S, Adrianto I, Wiley GB, et al. A functional haplotype of UBE2L3 confers risk for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2012;13(5):380-387. doi:10.1038/gene.2012.6.
49. Agik S, Franek BS, Kumar AA, et al. The autoimmune disease risk allele of UBE2L3 in African American patients with systemic lupus erythematosus: A recessive effect upon subphenotypes. *J Rheumatol*. 2012;39(1):73-78. doi:10.3899/jrheum.110590.
50. Sanchez E, Comeau ME, Freedman BI, et al. Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis Rheum*. 2011;63(11):3493-3501. doi:10.1002/art.30563.
51. Lu R, Vidal GS, Kelly JA, et al. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2009;10(5):397-403. doi:10.1038/gene.2009.19.
52. Yang W, Shen N, Ye DQ, et al. Genome-wide association study in asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*. 2010;6(2). doi:10.1371/journal.pgen.1000841.
53. Wang C, Ahlford A, Järvinen TM, et al. Genes identified in Asian SLE GWASs are also associated with SLE in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(9):994-999. doi:10.1038/ejhg.2012.277.
54. Yang J, Yang W, Hirankarn N, et al. ELF1 is associated with systemic lupus erythematosus in Asian populations. *Hum Mol Genet*. 2011;20(3):601-607. doi:10.1093/hmg/ddq474.
55. Kozyrev S V, Abelson A-K, Wojcik J, et al. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008;40(2):211-216. doi:10.1038/ng0408-484.
56. Sanchez E, Comeau ME, Freedman BI, et al. Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis Rheum*. 2011;63(11):3493-3501. doi:10.1002/art.30563.
57. Chang YK, Yang W, Zhao M, et al. Association of BANK1 and TNFSF4 with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese. *Genes Immun*. 2009;10(5):414-420. doi:10.1038/gene.2009.16.
58. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2007;357(10):977-986. doi:10.1056/NEJMoa073003.
59. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, et al. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet*. 2012;8(1). doi:10.1371/journal.pgen.1002455.
60. Manjarrez-Orduño N, Marasco E, Chung S a, et al. CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nat Genet*. 2012;44(11):1227-1230. doi:10.1038/ng.2439.
61. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2004;75(2):330-337. doi:10.1086/422827.

62. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):504-507. doi:10.1086/423790.
63. Namjou B, Kim-Howard X, Sun C, et al. PTPN22 Association in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with Respect to Individual Ancestry and Clinical Sub-Phenotypes. *PLoS One.* 2013;8(8). doi:10.1371/journal.pone.0069404.
64. Manku H, Langefeld CD, Guerra SG, et al. Trans-Ancestral Studies Fine Map the SLE-Susceptibility Locus TNFSF4. *PLoS Genet.* 2013;9(7). doi:10.1371/journal.pgen.1003554.
65. Cunninghame Graham DS, Graham RR, Manku H, et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008;40(1):83-89. doi:10.1038/ng.2007.47.
66. Delgado-Vega a M, Abelson a-K, Sánchez E, et al. Replication of the TNFSF4 (OX40L) promoter region association with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009;10(3):248-253. doi:10.1038/gene.2008.95.
67. Yang W, Tang H, Zhang Y, et al. Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am J Hum Genet.* 2013;92(1):41-51. doi:10.1016/j.ajhg.2012.11.018.
68. Shen N, Fu Q, Deng Y, et al. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15838-15843. doi:10.1073/pnas.1001337107.
69. Tan W, Sunahori K, Zhao J, et al. Association of PPP2CA polymorphisms with systemic lupus erythematosus susceptibility in multiple ethnic groups. *Arthritis Rheum.* 2011;63(9):2755-2763. doi:10.1002/art.30452.
70. Lessard CJ, Adrianto I, Kelly JA, et al. Identification of a systemic lupus erythematosus susceptibility locus at 11p13 between PDHX and CD44 in a multiethnic study. *Am J Hum Genet.* 2011;88(1):83-91. doi:10.1016/j.ajhg.2010.11.014.
71. Deng Y, Zhao J, Sakurai D, et al. Decreased SMG7 expression associates with lupus-risk variants and elevated antinuclear antibody production. *Ann Rheum Dis.* 2016;1-7. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208441.
72. Vaughn SE, Foley C, Shen N, et al. Lupus risk variants in the PTK locus alter B-cell receptor internalization. *Front Genet.* 2014;5(DEC). doi:10.3389/fgene.2014.00450.
73. Oparina NY, Delgado-Vega AM, Martinez-Bueno M, et al. PTK locus in systemic lupus erythematosus: fine mapping and functional analysis reveals novel susceptibility gene ABHD6. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):e14. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204909.
74. Zhang Y, Zhang J, Yang J, et al. Meta-analysis of GWAS on two Chinese populations followed by replication identifies novel genetic variants on the X chromosome associated with systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.* 2015;24(1):274-284. doi:10.1093/hmg/ddu429.
75. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature.* 2011;473(7345):43-49. doi:10.1038/nature09906.
76. Costa V, Aprile M, Esposito R, Ciccociola A. RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. *Eur J Hum Genet.* 2012;21(10):134-142. doi:10.1038/ejhg.2012.129.
77. Kilpinen H, Dermitzakis ET. Genetic and epigenetic contribution to complex traits. *Hum Mol Genet.* 2012;21(R1). doi:10.1093/hmg/ddc383.
78. Frangou EA, Bertsias GK, Boumpas DT. Gene expression and regulation in systemic lupus erythematosus. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(10):1084-1096. doi:10.1111/eci.12130.
79. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2610-2615. doi:10.1073/pnas.0337679100.
80. Bennett L, Palucka a K, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003;197(6):711-723. doi:10.1084/jem.20021553.
81. Han G-M, Chen S-L, Shen N, Ye S, Bao C-D, Gu Y-Y. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun.* 2003;4:177-186.

doi:10.1038/sj.gene.6363966.

82. Rus V, Chen H, Zernetkina V, et al. Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients with active and inactive disease. *Clin Immunol*. 2004;112(3):231-234. doi:10.1016/j.clim.2004.06.005.
83. Lee H-M, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Underexpression of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):R63. doi:10.1186/ar3317.
84. Maas K, Chen H, Shyr Y, Olsen NJ, Aune T. Shared gene expression profiles in individuals with autoimmune disease and unaffected first-degree relatives of individuals with autoimmune disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14(10):1305-1314. doi:10.1093/hmg/ddi141.
85. Lyons P a, McKinney EF, Rayner TF, et al. Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1208-1213. doi:10.1136/ard.2009.108043.
86. McKinney EF, Lyons P a, Carr EJ, et al. A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease. *Nat Med*. 2010;16(5):586-591, 1p following 591. doi:10.1038/nm.2130.
87. Garaud JC, Schickel JN, Blaison G, et al. B cell signature during inactive systemic lupus is heterogeneous: Toward a biological dissection of lupus. *PLoS One*. 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023900.
88. Lood C, Amisten S, Gullstrand B, et al. Platelet transcriptional profile and protein expression in patients with systemic lupus erythematosus: Up-regulation of the type I interferon system is strongly associated with vascular disease. *Blood*. 2010;116(11):1951-1957. doi:10.1182/blood-2010-03-274605.
89. Nzeusseu Toukap A, Galant C, Theate I, et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1579-1588. doi:10.1002/art.22578.
90. Nakou M, Knowlton N, Frank MB, et al. Gene expression in systemic lupus erythematosus: Bone marrow analysis differentiates active from inactive disease and reveals apoptosis and granulopoiesis signatures. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3541-3549. doi:10.1002/art.23961.
91. Nakou M, Bertsias G, Stagakis I, et al. Gene network analysis of bone marrow mononuclear cells reveals activation of multiple kinase pathways in human systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2010;5(10). doi:10.1371/journal.pone.0013351.
92. Peterson KS, Huang JF, Zhu J, et al. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest*. 2004;113(12):1722-1733. doi:10.1172/JCI200419139.
93. Stone RC, Du P, Feng D, et al. RNA-Seq for Enrichment and Analysis of IRF5 Transcript Expression in SLE. *PLoS One*. 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0054487.
94. Shi L, Zhang Z, Yu AM, et al. The SLE transcriptome exhibits evidence of chronic endotoxin exposure and has widespread dysregulation of non-coding and coding RNAs. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0093846.
95. Dozmorov MG, Dominguez N, Bean K, et al. B-cell and monocyte contribution to systemic lupus erythematosus identified by cell-type-specific differential expression analysis in RNA-seq data. *Bioinform Biol Insights*. 2015;9:11-19. doi:10.4137/BBI.S29470.
96. Scharer CD, Blalock EL, Barwick BG, et al. ATAC-seq on biobanked specimens defines a unique chromatin accessibility structure in naïve SLE B cells. *Sci Rep*. 2016;6(February):27030. doi:10.1038/srep27030.
97. Odhams CA, Cortini A, Chen L, et al. *Mapping eQTLs With RNA-Seq Reveals Novel SLE Susceptibility Genes, Non-Coding RNAs, and Alternative-Splicing Events That Are Concealed Using Microarrays.*; 2016. doi:10.1101/076026.
98. Lu Q, Kaplan M, Ray D, et al. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002;46(5):1282-1291. doi:10.1002/art.10234.
99. Gorelik G, Fang JY, Wu A, Sawalha AH, Richardson B. Impaired T cell protein kinase C delta activation decreases ERK pathway signaling in idiopathic and hydralazine-induced lupus. *J Immunol*. 2007;179(8):5553-5563. doi:10.4049/jimmunol.179.8.5553.

100. Sawalha AH, Jeffries M, Webb R, et al. Defective T-cell ERK signaling induces interferon-regulated gene expression and overexpression of methylation-sensitive genes similar to lupus patients. *Genes Immun.* 2008;9(4):368-378. doi:10.1038/gene.2008.29.
101. Balada E, Castro-Marrero J, Felip L, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarrés M. Associations between the Expression of Epigenetically Regulated Genes and the Expression of DNMTs and MBDs in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One.* 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045897.
102. Sullivan KE, Suriano A, Dietzmann K, Lin J, Goldman D, Petri MA. The TNFalpha locus is altered in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2007;123(1):74-81. doi:10.1016/j.clim.2006.12.008.
103. Zhang Z, Song L, Maurer K, Petri MA, Sullivan KE. Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. *Genes Immun.* 2010;11(2):124-133. doi:10.1038/gene.2009.66.
104. Hu N, Qiu X, Luo Y, et al. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. *J Rheumatol.* 2008;35(5):804-810. doi:08/13/046 [pii].
105. Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J Clin Invest.* 2003;111(4):539-552. doi:10.1172/JCI200316153.
106. Garcia BA, Busby SA, Shabanowitz J, Hunt DF, Mishra N. Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. *J Proteome Res.* 2005;4(6):2032-2042. doi:10.1021/pr050188r.
107. Hedrich CM, Rauen T, Tsokos GC. cAMP-responsive element modulator (CREM)?? protein signaling mediates epigenetic remodeling of the human interleukin-2 gene: Implications in systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem.* 2011;286(50):43429-43436. doi:10.1074/jbc.M111.299339.
108. Hedrich CM, Rauen T, Kis-Toth K, Kyttaris VC, Tsokos GC. cAMP-responsive Element Modulator (CREM) Suppresses IL-17F Protein Expression in T Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *J Biol Chem.* 2012;287(7):4715-4725. doi:10.1074/jbc.M111.323261.
109. Tak Leung Y, Shi L, Maurer K, et al. Interferon regulatory factor 1 and histone H4 acetylation in systemic lupus erythematosus. *Epigenetics.* 2015;10(3):191-199. doi:10.1080/15592294.2015.1009764.
110. Zhang Z, Shi L, Dawany N, Kelsen J, Petri MA, Sullivan KE. H3K4 tri-methylation breadth at transcription start sites impacts the transcriptome of systemic lupus erythematosus. *Clin Epigenetics.* 2016;8:14. doi:10.1186/s13148-016-0179-4.
111. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(4):279-289. doi:10.1038/nri2215.
112. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi A a, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(5):280-289. doi:10.1038/nrrheum.2010.46.
113. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Moroy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet.* 2000;25(2):177-181. doi:10.1038/76032.
114. Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2011;43(12):1186-1188. doi:10.1038/ng.975.
115. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet.* 2006;38(8):917-920. doi:10.1038/ng1845.
116. Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R. Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell.* 2008;134(4):587-598. doi:10.1016/j.cell.2008.06.032.
117. Harley ITW, Kaufman KM, Langefeld CD, Harley JB, Kelly JA. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet.* 2009;10(5):285-290. doi:10.1038/nrg2571.
118. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet.* 1998;19(1):56-59. doi:10.1038/ng0598-56.
119. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science (80-).* 2004;304(5674):1147-1150.

doi:10.1126/science.1094359.

120. Hu CY, Wu CS, Tsai HF, Chang SK, Tsai WI, Hsu PN. Genetic polymorphism in milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) is associated with systemic lupus erythematosus in human. *Lupus*. 2009;18(8):676-681. doi:10.1177/0961203309103027.
121. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998;41(7):1241-1250. doi:10.1002/1529-0131(199807)41:7<1241::AID-ART15>3.0.CO;2-H.
122. Han S, Kim-Howard X, Deshmukh H, et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin- α -M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Mol Genet*. 2009;18(6):1171-1180. doi:10.1093/hmg/ddp007.
123. Rhodes B, Furnrohr BG, Roberts a. L, et al. The rs1143679 (R77H) lupus associated variant of ITGAM (CD11b) impairs complement receptor 3 mediated functions in human monocytes. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(12):2028-2034. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201390.
124. Fossati-Jimack L, Ling GS, Cortini A, et al. Phagocytosis Is the Main CR3-Mediated Function Affected by the Lupus-Associated Variant of CD11b in Human Myeloid Cells. *PLoS One*. 2013;8(2). doi:10.1371/journal.pone.0057082.
125. Yap SN, Phipps ME, Manivasagar M, Tan SY, Bosco JJ. Human Fc gamma receptor IIA (FcgammaRIIA) genotyping and association with systemic lupus erythematosus (SLE) in Chinese and Malays in Malaysia. *Lupus*. 1999;8(4):305-310. doi:10.1191/096120399678847876.
126. Chen J-Y, Wang CM, Tsao K-C, et al. Fc gamma receptor Ila, IIa, and IIb polymorphisms of systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(7):877-880. doi:10.1136/ard.2003.005892.
127. Koene HR, Kleijer M, Swaak a J, et al. The Fc gammaRIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998;41(10):1813-1818. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1813::AID-ART13>3.0.CO;2-6.
128. Lee YH, Bae SC, Seo YH, et al. Association between FCGR3B copy number variations and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Inflamm Res*. 2015;64(12):983-991. doi:10.1007/s00011-015-0882-1.
129. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*. 2006;439(February):851-855. doi:10.1038/nature04489.
130. Mueller M, Barros P, Witherden AS, et al. Genomic pathology of sle-associated copy-number variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2B locus. *Am J Hum Genet*. 2013;92(1):28-40. doi:10.1016/j.ajhg.2012.11.013.
131. Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, et al. Loss of function of a lupus-associated Fc γ RIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med*. 2005;11(10):1056-1058. doi:10.1038/nm1288.
132. Breunis WB, Van Mirre E, Geissler J, et al. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat*. 2009;30(5). doi:10.1002/humu.20997.
133. Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet*. 2007;39(6):721-723. doi:10.1038/ng2046.
134. Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, et al. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):482-487. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03646.x.
135. Lyn-Cook BD, Xie C, Oates J, et al. Increased expression of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 and other cytokines in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Ethnic differences and potential new targets for therapeutic drugs. *Mol Immunol*. 2014;61(1):38-43. doi:10.1016/j.molimm.2014.05.001.
136. Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, et al. U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood*. 2006;107(8):3229-3234. doi:10.1182/blood-2005-07-2650.

137. Savarese E, Steinberg C, Pawar RD, et al. Requirement of toll-like receptor 7 for pristane-induced production of autoantibodies and development of murine lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(4):1107-1115. doi:10.1002/art.23407.
138. Lee PY, Kumagai Y, Li Y, et al. TLR7-dependent and FcγR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J Exp Med.* 2008;205(13):2995-3006. doi:10.1084/jem.20080462.
139. Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science.* 2006;312(5780):1669-1672. doi:10.1126/science.1124978.
140. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity.* 2006;25(3):417-428. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.013.
141. Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders H-J. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1721-1731. doi:10.1681/ASN.2006101162.
142. Yasuda K, Richez C, Maciaszek JW, et al. Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *J Immunol.* 2007;178(11):6876-6885. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6876.
143. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature.* 2005;434(7030):243-249. doi:10.1038/nature03308.
144. Tsujimura H, Tamura T, Ozato K. Cutting Edge: IFN Consensus Sequence Binding Protein/IFN Regulatory Factor 8 Drives the Development of Type I IFN-Producing Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol.* 2003;170(3):1131-1135. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1131.
145. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest.* 2005;115(2):407-417. doi:10.1172/JCI200523025.
146. Graham DSC, Manku H, Wagner S, et al. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation. *Hum Mol Genet.* 2007;16(6):579-591. doi:10.1093/hmg/ddl469.
147. Kozyrev S V., Lewén S, Reddy PMVL, et al. Structural insertion/deletion variation in IRF5 is associated with a risk haplotype and defines the precise IRF5 isoforms expressed in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007;56(4):1234-1241. doi:10.1002/art.22497.
148. Kelly JA, Kelley JM, Kaufman KM, et al. Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Genes Immun.* 2008;9(3):187-194. doi:gene20084 [pii]\r10.1038/gene.2008.4.
149. He C-F, Liu Y-S, Cheng Y-L, et al. TNIP1, SLC15A4, ETS1, RasGRP3 and IKZF1 are associated with clinical features of systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *Lupus.* 2010;19(10):1181-1186. doi:10.1177/0961203310367918.
150. Flesher DL, Sun X, Behrens TW, Graham RR, Criswell LA. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(3):461-479. doi:10.1586/eci.10.8.
151. Graham RR, Ortmann WA, Langeveld CD, et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2002;71(3):543-553. doi:10.1086/342290.
152. Graham RR, Ortmann W, Rodine P, et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(8):823-830. doi:10.1038/sj.ejhg.5201827.
153. Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, et al. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet.* 2009;5(10). doi:10.1371/journal.pgen.1000696.
154. Fernando MMA, Stevens CR, Sabeti PC, et al. Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. *PLoS Genet.* 2007;3(11):2109-2121. doi:10.1371/journal.pgen.0030192.
155. Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, et al. Predominance of Th1 Immune Response in Diffuse Proliferative Lupus Nephritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2097-2106. doi:10.1002/1529-

0131(200109)44:9<2097::AID-ART360>3.0.CO;2-6.

156. Vang T, Congia M, Macis MD, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* 2005;37(12):1317-1319. doi:10.1038/ng1673.
157. Orrú V, Tsai SJ, Rueda B, et al. A loss-of-function variant of PTPN22 is associated with reduced risk of systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):569-579. doi:10.1093/hmg/ddn363.
158. Joo Y Bin, Park BL, Shin HD, Park SY, Kim I, Bae SC. Association of genetic polymorphisms in CD40 with susceptibility to SLE in the Korean population. *Rheumatol (United Kingdom).* 2013;52(4):623-630. doi:10.1093/rheumatology/kes339.
159. Bertias GK, Nakou M, Choulaki C, et al. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60(1):207-218. doi:10.1002/art.24227.
160. Chung SA, Taylor KE, Graham RR, et al. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS Genet.* 2011;7(3). doi:10.1371/journal.pgen.1001323.
161. Wu YY, Kumar R, Iida R, Bagavant H, Alarcón-Riquelme ME. BANK1 regulates IgG production in a lupus model by controlling TLR7-dependent STAT1 activation. *PLoS One.* 2016;11(5). doi:10.1371/journal.pone.0156302.
162. Castillejo-López C, Delgado-Vega AM, Wojcik J, et al. Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(1):136-142. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200085.
163. Raj P, Rai E, Song R, et al. Regulatory polymorphisms modulate the expression of HLA class II molecules and promote autoimmunity. *Elife.* 2016;5(FEBRUARY2016). doi:10.7554/eLife.12089.
164. Fan Y, Tao JH, Zhang LP, Li LH, Ye DQ. Association of BLK (rs13277113, rs2248932) polymorphism with systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2011;38(7):4445-4453. doi:10.1007/s11033-010-0573-5.
165. Ito I, Kawasaki A, Ito S, et al. Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):553-558. doi:10.1002/art.24246.
166. Liossis SN, Solomou EE, Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mavrikakis MM, Sfrikakis PP. B-cell kinase lyn deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *J Invest Med.* 2001;49(2):157-165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288756>.
167. Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell.* 1995;83(2):301-311. doi:10.1016/0092-8674(95)90171-X.
168. Belot A, Kasher PR, Trotter EW, et al. Protein kinase C?? deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):2161-2171. doi:10.1002/art.38008.
169. Vincent, FB Morand, EF Schneider, P Mackay F. The BAFF / APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(6):365-373. doi:10.1038/nrrheum.2014.33.
170. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-9818. doi:10.1073/pnas.0909927107.
171. Mortensen ES, Rekvig OP. Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):696-704. doi:10.1681/ASN.2008010112.
172. Mjelle JE, Rekvig OP, Van Der Vlag J, Fenton K a. Nephritogenic antibodies bind in glomeruli through interaction with exposed chromatin fragments and not with renal cross-reactive antigens. *Autoimmunity.* 2011;44(5):373-383. doi:10.3109/08916934.2010.541170.
173. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2011;187(1):538-552. doi:10.4049/jimmunol.1100450.
174. Sekine H, Hsieh Kinser TT, Qiao F, et al. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2011;63(4):1076-1085. doi:10.1002/art.30222.
175. Bao L, Haas M, Quigg RJ. Complement factor H deficiency accelerates development of lupus nephritis.

- J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):285-295. doi:10.1681/ASN.2010060647.
176. Niederer H a, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KGC. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:69-88. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05132.x.
 177. Flür K, Allam R, Zecher D, et al. Viral RNA induces type I interferon-dependent cytokine release and cell death in mesangial cells via melanoma-differentiation-associated gene-5: Implications for viral infection-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 2009;175(5):2014-2022. doi:10.2353/ajpath.2009.080585.
 178. Hägele H, Allam R, Pawar RD, Anders HJ. Double-stranded RNA activates type I interferon secretion in glomerular endothelial cells via retinoic acid-inducible gene (RIG)-1. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(11):3312-3318. doi:10.1093/ndt/gfp339.
 179. Fairhurst A-M, Xie C, Fu Y, et al. Type I interferons produced by resident renal cells may promote end-organ disease in autoantibody-mediated glomerulonephritis. *J Immunol.* 2009;183(10):6831-6838. doi:10.4049/jimmunol.0900742.
 180. Anders HJ, Vielhauer V, Eis V, et al. Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *FASEB J.* 2004;18(3):534-536. doi:10.1096/fj.03-0646fje.
 181. Rich SA. Human lupus inclusions and interferon. *Science.* 1981;213(4509):772-775.
 182. Allam R, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, Anders H-J. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(9):1986-1996. doi:10.1681/ASN.2008101067.
 183. Pérez de Lema G, Maier H, Franz TJ, et al. Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(5):3592-3601. doi:10.1681/ASN.2005040426.
 184. Anders H-J. Late Onset of Treatment with a Chemokine Receptor CCR1 Antagonist Prevents Progression of Lupus Nephritis in MRL-Fas(lpr) Mice. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(6):1504-1513. doi:10.1097/01.ASN.0000130082.67775.60.
 185. Espeli M, Bokkers S, Giannico G, et al. Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):296-305. doi:10.1681/ASN.2010050515.
 186. Apostolidis S a, Crispín JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus.* 2011;20(2):120-124. doi:10.1177/0961203310389100.
 187. Bethunaickan R, Berthier CC, Ramanujam M, et al. A unique hybrid renal mononuclear phagocyte activation phenotype in murine systemic lupus erythematosus nephritis. *J Immunol.* 2011;186(8):4994-5003. doi:10.4049/jimmunol.1003010.
 188. Waters ST, McDuffie M, Bagavant H, et al. Breaking tolerance to double stranded DNA, nucleosome, and other nuclear antigens is not required for the pathogenesis of lupus glomerulonephritis. *J Exp Med.* 2004;199(2):255-264. doi:10.1084/jem.20031519.
 189. Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21(5):489-494. doi:10.1097/BOR.0b013e32832efff1.
 190. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol.* 1985;37:269-390.
 191. Perry D, Sang A, Yin Y, et al. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1-19. doi:10.1155/2011/271694.
 192. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(11):1771-1782. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201940.
 193. Cooper-Knock J, Kirby J, Ferraiuolo L, Heath PR, Rattray M, Shaw PJ. Gene expression profiling in human neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(9):518-530. doi:10.1038/nrneurol.2012.156.
 194. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63. doi:10.1038/nrg2484.
 195. Montgomery SB, Dermitzakis ET. From expression QTLs to personalized transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2011;12(4):277-282. doi:10.1038/nrg2969.
 196. Majewski J, Pastinen T. The study of eQTL variations by RNA-seq: From SNPs to phenotypes. *Trends*

- Genet.* 2011;27(2):72-79. doi:10.1016/j.tig.2010.10.006.
197. Oszolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet.* 2011;12(2):87-98. doi:10.1038/nrg2934.
 198. Montgomery SB, Sammeth M, Gutierrez-Arcelus M, et al. Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature.* 2010;464(7289):773-777. doi:10.1038/nature08903.Transcriptome.
 199. Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, et al. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood.* 2011;118(14). doi:10.1182/blood-2011-03-339705.
 200. Wu C, Delano DL, Mitro N, et al. Gene set enrichment in eQTL data identifies novel annotations and pathway regulators. *PLoS Genet.* 2008;4(5). doi:10.1371/journal.pgen.1000070.
 201. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015(11):951-969. doi:10.1101/pdb.top084970.
 202. Day-Williams AG, Zeggini E. The effect of next-generation sequencing technology on complex trait research. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(5):561-567. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02437.x.
 203. Griffith M, Walker JR, Spies NC, Ainscough BJ, Griffith OL. Informatics for RNA sequencing: A web resource for analysis on the cloud. *PLOS Comp Biol.* 2015;11(8):e1004393. doi:10.1371/journal.pcbi.1004393.
 204. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562-578. doi:10.1038/nprot.2012.016.
 205. Martin J a., Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):671-682. doi:10.1038/nrg3068.
 206. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 1967;33(2):437-449. doi:10.1083/jcb.33.2.437.
 207. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:19-40. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749.
 208. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
 209. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature.* 2006;443(7113):780-786. doi:10.1038/nature05291.
 210. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):823-830. doi:10.1038/ncb0910-823.
 211. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in Human Health and Disease. *N Engl J Med.* 2013;368(7):651-662. doi:10.1056/NEJMra1205406.
 212. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004;6(4):463-477. doi:10.1016/S1534-5807(04)00099-1.
 213. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Munz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol.* 2015;16(10):1014-1024. doi:10.1038/ni.3273.
 214. Intemann CD, Thye T, Niemann S, et al. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 2009;5(9). doi:10.1371/journal.ppat.1000577.
 215. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2009;361(27):2609-2618. doi:10.1056/NEJMoa0903753.
 216. Xu Y, Jagannath C, Liu X De, Sharafkhaneh A, Kolodziejska KE, Eissa NT. Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. *Immunity.* 2007;27(1):135-144. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.022.
 217. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 2008;27(7):1110-1121. doi:10.1038/emboj.2008.31.
 218. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev.* 2011;240(1):92-104. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00995.x.
 219. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science.* 2007;315(5817):1398-1401. doi:10.1126/science.1136880.
 220. Shrivastava S, Raychoudhuri A, Steele R, Ray R, Ray RB. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology.* 2011;53(2):406-414.

doi:10.1002/hep.24073.

221. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 beta production. *Nature*. 2008;456(7219):264-U68. doi:10.1038/nature07383.
222. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2011;12(3):222-230. doi:10.1038/ni.1980.
223. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*. 2007;204(4):793-804. doi:10.1084/jem.20061301.
224. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood*. 2012;120(15):3007-3018. doi:10.1182/blood-2012-03-416156.
225. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577-582. doi:10.1038/nrmicro1710.
226. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1?? and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*. 2011;6(12). doi:10.1371/journal.pone.0029318.
227. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011;21(2):290-304. doi:10.1038/cr.2010.150.
228. Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Autophagy Mediates the Delivery of Thrombogenic Tissue Factor to Neutrophil Extracellular Traps in Human Sepsis. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045427.
229. Long EO, LaVaute T, Pinet V, Jaraquemada D. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J Immunol*. 1994;153(4):1487-1494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046228>.
230. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):109-117. doi:10.1016/j.coi.2010.01.022.
231. English L, Chemali M, Duron J, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol*. 2009;10(5):480-487. doi:10.1038/ni.1720.
232. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med*. 2009;15(3):267-276. doi:10.1038/nm0710-828b.
233. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7922-7927. doi:10.1073/pnas.0501190102.
234. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity*. 2007;26(1):79-92. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.018.
235. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*. 2008;455(7211):396-400. doi:10.1038/nature07208.
236. Li C, Capan E, Zhao Y, et al. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J Immunol*. 2006;177(8):5163-5168. doi:10.4049/jimmunol.177.8.5163.
237. McLeod IX, Zhou X, Li Q-J, Wang F, He Y-W. The class III kinase Vps34 promotes T lymphocyte survival through regulating IL-7R α surface expression. *J Immunol*. 2011;187(10):5051-5061. doi:10.4049/jimmunol.1100710.
238. Willinger T, Flavell R a. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:8670-8675. doi:10.1073/pnas.1205305109.
239. Jia W, He Y-W. Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *J Immunol*. 2011;186(9):5313-5322. doi:10.4049/jimmunol.1002404.
240. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T

- lymphocytes. *J Immunol.* 2009;182(7):4046-4055. doi:10.4049/jimmunol.0801143.
241. Jia W, Pua HH, Li Q-J, He Y-W. Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes. *J Immunol.* 2011;186(3):1564-1574. doi:10.4049/jimmunol.1001822.
242. Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, et al. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy.* 2008;4(3):309-314.
243. Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK. The B Cell Receptor Governs the Subcellular Location of Toll-like Receptor 9 Leading to Hyperresponses to DNA-Containing Antigens. *Immunity.* 2008;28(6):799-809. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.019.
244. Zhou X, Lu X, Lv J, et al. Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann Rheum diseases.* 2011;70(7):1330-1337. doi:10.1136/ard.2010.140111.
245. Lee DY, Sugden B. The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene.* 2008;27(20):2833-2842. doi:1210946 [pii]\r10.1038/sj.onc.1210946.
246. Severa M, Giacomini E, Gafa V, et al. EBV stimulates TLR- and autophagy-dependent pathways and impairs maturation in plasmacytoid dendritic cells: Implications for viral immune escape. *Eur J Immunol.* 2013;43(1):147-158. doi:10.1002/eji.201242552.
247. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 2005;307(5709):593-596. doi:10.1126/science.1104904.
248. Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2011;711(1-2):158-166. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.007.
249. Perl A, Gergely P, Nagy G, Koncz A, Banki K. Mitochondrial hyperpolarization: A checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2004;25(7):360-367. doi:10.1016/j.it.2004.05.001.
250. Nagy G, Koncz A, Perl A. T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca²⁺- and redox-dependent production of nitric oxide. *J Immunol.* 2003;171:5188-5197. doi:10.4049/jimmunol.171.10.5188.
251. Kis-Toth K, Tsokos GC. Dendritic cell function in lupus: Independent contributors or victims of aberrant immune regulation. *Autoimmunity.* 2010;43(2):121-130. doi:10.3109/08916930903214041.
252. Baumann I, Kolowos W, Voll RE, et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(1):191-201. doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<191::AID-ART10027>3.0.CO;2-K.
253. Gros F, Arnold J, Page N, et al. Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy.* 2012;8(7):1113-1123. doi:10.4161/auto.20275.
254. Caza TN, Talaber G, Perl A. Metabolic regulation of organelle homeostasis in lupus T cells. *Clin Immunol.* 2012;144(3):200-213. doi:10.1016/j.clim.2012.07.001.
255. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. *Mol Cell Biol.* 2005;25(14):5834-5845. doi:10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005.
256. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 2004;18(23):2893-2904. doi:10.1101/gad.1256804.
257. Yanagawa Y, Hiraide S, Matsumoto M, Togashi H. Rapid induction of REDD1 gene expression in macrophages in response to stress-related catecholamines. *Immunol Lett.* 2014;158(1-2):109-115. doi:10.1016/j.imlet.2013.12.015.
258. Qiao S, Dennis M, Song X, et al. A REDD1/TXNIP pro-oxidant complex regulates ATG4B activity to control stress-induced autophagy and sustain exercise capacity. *Nat Commun.* 2015;6:7014. doi:10.1038/ncomms8014.
259. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368(7):651-662. doi:10.1056/NEJMr1205406.
260. Lee S-J, Silverman E, Bargman JM. The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(12):718-729. doi:10.1038/nrneph.2011.150.
261. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 2014;15(7):602-611. doi:10.1038/ni.2921.
262. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe.*

- 2014;15(5):526-536. doi:10.1016/j.chom.2014.04.011.
263. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-175. doi:10.1038/nri3399.
 264. Borregaard N, Cowland JB, Spicer S, et al. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-3521. doi:10.1083/jcb.28.2.277.
 265. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2006;79(5):977-988. doi:10.1189/jlb.0905526.
 266. Yang C, Strong BSI, Miller MJ, Unanue ER. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol*. 2010;185(5):2927-2934. doi:10.4049/jimmunol.1001289.
 267. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(7):402-413. doi:10.1038/nrneph.2016.71.
 268. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria Brinkmann Science 2004.pdf. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385.
 269. Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1341-1378. doi:10.1152/physrev.00034.2007.
 270. Hakkim A, Fuchs T a, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol*. 2011;7(2):75-77. doi:10.1038/nchembio.496.
 271. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):278-286. doi:10.1038/nchembio.85.
 272. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010;191(3):677-691. doi:10.1083/jcb.201006052.
 273. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010;207(9):1853-1862. doi:10.1084/jem.20100239.
 274. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *J Immunol*. 2008;180(3):1895-1902. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1895.
 275. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-241. doi:10.1083/jcb.200606027.
 276. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis*. 1999;58(5):309-314. doi:10.1136/ard.58.5.309.
 277. Cairns a P, Crockard a D, McConnell JR, Courtney P a, Bell a L. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:950-955. doi:10.1136/ard.60.10.950.
 278. Donnelly S, Roake W, Brown S, et al. Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54(5):1543-1556. doi:10.1002/art.21783.
 279. Alves CMOS, Marzocchi-Machado CM, Louzada-Junior P, et al. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008;27(6):701-708. doi:10.1007/s10067-007-0768-x.
 280. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73):73ra19-73ra19. doi:10.1126/scitranslmed.3001180.
 281. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73):73ra20. doi:10.1126/scitranslmed.3001201.
 282. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol*.

- 2012;188(7):3522-3531. doi:10.4049/jimmunol.1102404.
283. Coit P, Yalavarthi S, Ognenovski M, et al. Epigenome profiling reveals significant DNA demethylation of interferon signature genes in lupus neutrophils. *J Autoimmun.* 2015;58:59-66. doi:10.1016/j.jaut.2015.01.004.
284. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell.* 2016;165(3):551-565. doi:10.1016/j.cell.2016.03.008.
285. Grayson PC, Kaplan MJ. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2015;99(February):253-264. doi:10.1189/jlb.5BT0615-247R.
286. Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J Immunol.* 2013;190:1217-1226. doi:10.4049/jimmunol.1202388.
287. Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis.* 2014;1-8. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204837.
288. Knight JS, Zhao W, Luo W, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2981-2993. doi:10.1172/JCI67390.
289. Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(12):2199-2206. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205365.
290. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5260-5264. doi:10.1073/pnas.74.12.5260.
291. Oliver J a, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(1):170-177. doi:10.1161/01.ATV.19.1.170.
292. Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(2):94-109. doi:10.1038/nrneph.2015.177.
293. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):6934-6938. doi:10.1073/pnas.87.18.6934.
294. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry.* 1989;28(4):1755-1762. doi:10.1021/bi00430a050.
295. Malý MA, Tomašov P, Hájek P, et al. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiol Res.* 2007;56(6):685-695.
296. Breitenstein A, Tanner FC, Lüscher TF. Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? *Circ J.* 2010;74(1):3-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996531>.
297. Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation.* 2006;113(5):722-731. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.567297.
298. Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis – The journey of TF through NETs. *Front Immunol.* 2012;3. doi:10.3389/fimmu.2012.00385.
299. Steffel J, Hermann M, Greutert H, et al. Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation. *Circulation.* 2005;111(13):1685-1689. doi:10.1161/01.CIR.0000160358.63804.C9.
300. Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet R, et al. Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood.* 1997;89(2):541-549. doi:10.1073/pnas.91.19.8767.
301. Ritis K, Doumas M, Mastellos D, et al. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol.* 2006;177(7):4794-4802. doi:10.1016/j.molimm.2006.07.289.
302. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996;383(6595):73-75. doi:10.1038/383073a0.
303. Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor,

- the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6258-6263. doi:10.1073/pnas.93.13.6258.
304. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*. 1996;88(5):1583-1587. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781413>.
 305. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-264. doi:10.1038/35025229.
 306. Madhusudhan T, Wang H, Straub BK, et al. Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes. *Blood*. 2012;119(3):874-883. doi:10.1182/blood-2011-07-365973.
 307. Apostolopoulos J, Moussa L, Tipping PG. The cytoplasmic domain of tissue factor restricts physiological albuminuria and pathological proteinuria associated with glomerulonephritis in mice. *Nephron - Exp Nephrol*. 2010;116(4). doi:10.1159/000319320.
 308. Cunningham MA, Ono T, Hewitson TD, Tipping PG, Becker GJ, Holdsworth SR. Tissue factor pathway inhibitor expression in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1999;55(4):1311-1318. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00352.x.
 309. Ono T, Liu N, Kasuno K, et al. Coagulation process proceeds on cultured human mesangial cells via expression of factor V. *Kidney Int*. 2001;60(3):1009-1017. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0600031009.x.
 310. Sevastos J, Kennedy SE, Davis DR, et al. Tissue factor deficiency and PAR-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion injury. *Blood*. 2007;109(2):577-583. doi:10.1182/blood-2006-03-008870.
 311. Drew a F, Tucker HL, Liu H, Witte DP, Degen JL, Tipping PG. Crescentic glomerulonephritis is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281(6):F1157-63. doi:10.1152/ajprenal.0002.2001.
 312. Craciun FL, Ajay a. K, Hoffmann D, et al. Pharmacological and genetic depletion of fibrinogen protects from kidney fibrosis. *AJP Ren Physiol*. 2014;307(4):F471-F484. doi:10.1152/ajprenal.00189.2014.
 313. Cunningham M a, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med*. 2000;191(3):455-462. doi:10.1084/jem.191.3.455.
 314. Moussa L, Apostolopoulos J, Davenport P, Tchongue J, Tipping PG. Protease-activated receptor-2 augments experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2007;171(3):800-808. doi:10.2353/ajpath.2007.061155.
 315. Russo A, Soh UJ, Paing MM, Arora P, Trejo J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6393-6397. doi:10.1073/pnas.0810687106 [pii].
 316. Rao LVM, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):47-56. doi:10.1161/01.ATV.0000151624.45775.13.
 317. Åberg M, Siegbahn A. Tissue factor non-coagulant signaling - molecular mechanisms and biological consequences with a focus on cell migration and apoptosis. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):817-825. doi:10.1111/jth.12156.
 318. Versteeg HH, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(1):24-32. doi:10.1055/s-2006-933337.
 319. Connolly a J, Ishihara H, Kahn ML, Farese R V, Coughlin SR. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*. 1996;381(6582):516-519. doi:10.1038/381516a0.
 320. Darrow AL, Fung-Leung WP, Ye RD, et al. Biological consequences of thrombin receptor deficiency in mice. *Thromb Haemost*. 1996;76(6):860-866.
 321. Zheng H, Chen Y, Ao W, et al. Antiphospholipid antibody profiles in lupus nephritis with glomerular microthrombosis: a prospective study of 124 cases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R93. doi:10.1186/ar2736.
 322. Yamamoto K, Loskutoff DJ. The kidneys of mice with autoimmune disease acquire a hypofibrinolytic/procoagulant state that correlates with the development of glomerulonephritis and

- tissue microthrombosis. *Am J Pathol.* 1997;151(3):725-734.
323. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-15885. doi:10.1073/pnas.1005743107.
 324. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10(1):136-144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
 325. Knight JS, Luo W, O'Dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(6):947-956. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303312.
 326. Martinod K, Demers M, Fuchs T a, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(21):8674-8679. doi:10.1073/pnas.1301059110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1301059110.
 327. Van Montfort ML, Stephan F, Lauw MN, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(1):147-151. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300498.
 328. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost.* 2014;12(6):860-870. doi:10.1111/jth.12571.
 329. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-835. doi:10.1084/jem.20112322.
 330. Borissoff JJ, Joosen IA, Versteijlen MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):2032-2040. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301627.
 331. de Boer OJ, Li X, Teeling P, et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2013;109(2):290-297. doi:10.1160/TH12-06-0425.
 332. Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2015;36(22):1405-1414. doi:10.1093/eurheartj/ehv007.
 333. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Human IL-17: A Novel Cytokine Derived from T Cells. *J Immunol.* 1995;155:5483-5486.
 334. Fossiez F. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183(6):2593-2603. doi:10.1084/jem.183.6.2593.
 335. Rouvier E, Luciani M-FF, Mattéi M-GG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, Cloned from an Activated T Cell, Bearing AU-Rich Messenger RNA Instability Sequences, and Homologous to a Herpesvirus Saimiri Gene. *J Immunol.* 1993;150(12):5445-5456. doi:10.1182/blood-2011-07-347237.
 336. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, et al. Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity.* 2009;30(1):108-119. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.009.
 337. Yang XO, Chang SH, Park H, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med.* 2008;205(5):1063-1075. doi:10.1084/jem.20071978.
 338. Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, et al. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med.* 2007;356(6):580-592. doi:10.1056/NEJMoa062382 [pii];10.1056/NEJMoa062382 [doi].
 339. Chandler DJ, Bewley A. Ustekinumab for the treatment of psoriatic arthritis. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2014;7(2):111-121. doi:10.1586/17512433.2014.888310.
 340. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002;71(1):1-8. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11781375&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/C6B73D07-6483-4B7C-B182-BAE723F8A26A>.
 341. Li H, Chen J, Huang A, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):773-778. doi:10.1073/pnas.97.2.773.

342. Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol.* 2001;167:4137-4140. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4137.
343. Lee J, Ho WH, Maruoka M, et al. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1660-1664. doi:10.1074/jbc.M008289200.
344. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin J, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: Structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 2001;20(19):5332-5341. doi:10.1093/emboj/20.19.5332.
345. Wright JF, Guo Y, Quazi A, et al. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13447-13455. doi:10.1074/jbc.M700499200.
346. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res.* 2007;1735:435-440. doi:10.1038/cr.2007.35.
347. Wright JF, Bennett F, Li B, et al. The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex. *J Immunol.* 2008;181(4):2799-2805. doi:10.4049/jimmunol.181.4.2799.
348. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995;3(6):811-821. doi:10.1016/1074-7613(95)90070-5.
349. Liu S, Song X, Chrnyk B a, et al. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat Commun.* 2013;4(May):1888. doi:10.1038/ncomms2880.
350. Toy D, Kugler D, Wolfson M, et al. Cutting Edge: Interleukin 17 Signals through a Heteromeric Receptor Complex. *J Immunol.* 2006;177(1):36-39. doi:10.4049/jimmunol.177.1.36.
351. Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol.* 2009;10(12):1245-1251. doi:10.1038/ni.1813.
352. Qian Y, Liu C, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol.* 2007;8(3):247-256. doi:10.1038/ni1439.
353. Maitra A, Shen F, Hanel W, et al. Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(18):7506-7511. doi:10.1073/pnas.0611589104.
354. Shen F, Hu Z, Goswami J, Gaffen SL. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24138-24148. doi:10.1074/jbc.M604597200.
355. Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med.* 2000;191(7):1233-1240. doi:10.1084/jem.191.7.1233.
356. Jovanovic D V, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998;160(7):3513-3521. <http://www.jimmunol.org/content/160/7/3513.full>.
357. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: Implications for signal transduction and therapy. *Cytokine.* 2008;41(2):92-104. doi:10.1016/j.cyto.2007.11.013.
358. Henness S, Johnson CK, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ. IL-17A augments TNF-??-induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(4):958-964. doi:10.1016/j.jaci.2004.06.023.
359. Cai XY, Gommoll CP, Justice L, Narula SK, Fine JS. Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol Lett.* 1998;62(1):51-58. doi:10.1016/S0165-2478(98)00027-3.
360. Andoh A, Yasui H, Inatomi O, et al. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced granulocyte and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor release from human colonic myofibroblasts. *J Gastroenterol.* 2005;40(8):802-810. doi:10.1007/s00535-005-1632-x.
361. Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, et al. IL-17 Stimulates Intraperitoneal Neutrophil Infiltration Through the Release of GRO Chemokine from Mesothelial Cells. *J Immunol.* 2000;165(10):5814-5821. doi:10.4049/jimmunol.165.10.5814.
362. Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J*

- Leukoc Biol.* 2004;76(1):135-144. doi:10.1189/jlb.0204065.
363. Kao C-Y, Chen Y, Thai P, et al. IL-17 Markedly Up-Regulates -Defensin-2 Expression in Human Airway Epithelium via JAK and NF- B Signaling Pathways. *J Immunol.* 2004;173(5):3482-3491. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3482.
 364. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-2279. doi:10.1084/jem.20061308.
 365. Page G, Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2307-2312. doi:10.1002/art.21211.
 366. Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, et al. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol.* 2005;167(1):141-149. doi:10.1016/S0002-9440(10)62961-6.
 367. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/ni1254.
 368. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-1141. doi:10.1038/ni1261.
 369. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(6):652-657. doi:10.1016/j.coi.2007.07.020.
 370. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity.* 2006;24(6):677-688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002.
 371. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441(7090):235-238. doi:10.1038/nature04753.
 372. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006;441(7090):231-234. doi:10.1038/nature04754.
 373. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFb in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179-189.
 374. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1390-1397. doi:10.1038/ni1539.
 375. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035.
 376. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR?? and ROR??. *Immunity.* 2008;28(1):29-39. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.016.
 377. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, RORyt and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(11):1297-1306. doi:10.1038/ni0209-223a.
 378. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* 2008;454(7202):350-352. doi:10.1038/nature07021.
 379. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol.* 2008;9(6):641-649. doi:10.1038/ni.1610.
 380. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009;10(3):314-324. doi:10.1038/ni.1698.
 381. Happel KI, Zheng M, Young E, et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol.* 2003;170:4432-4436. doi:10.4049/jimmunol.170.9.4432.

382. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*. 2005;202(6):761-769. doi:10.1084/jem.20050193.
383. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, Produced by Lymphocytes and Neutrophils, Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Airway Neutrophilia: IL-15 as a Possible Trigger. *J Immunol*. 2003;170(4):2106-2112. doi:10.4049/jimmunol.170.4.2106.
384. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):479-489. doi:10.1038/nri2800.
385. Hoshino A, Nagao T, Nagi-Miura N, et al. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via its Fc region- and complement-dependent manner. *J Autoimmun*. 2008;31(1):79-89. doi:10.1016/j.jaut.2008.03.006.
386. Werner JL, Gessner MA, Lilly LM, et al. Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a Dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection. *Infect Immun*. 2011;79(10):3966-3977. doi:10.1128/IAI.05493-11.
387. Ren Y, Hua L, Meng X, et al. Correlation of Surface Toll-Like Receptor 9 Expression with IL-17 Production in Neutrophils during Septic Peritonitis in Mice Induced by *E. coli*. *Mediators Inflamm*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/3296307.
388. Li L, Huang L, Vergis AL, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2010;120(1):331-342. doi:10.1172/JCI38702.
389. Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, et al. Neutrophils Are Essential As A Source Of IL-17 In The Effector Phase Of Arthritis. *PLoS One*. 2013;8(5). doi:10.1371/journal.pone.0062231.
390. Taylor PR, Leal SM, Sun Y, Pearlman E. Aspergillus and Fusarium corneal infections are regulated by Th17 cells and IL-17-producing neutrophils. *J Immunol*. 2014;192(7):3319-3327. doi:10.4049/jimmunol.1302235.
391. Cai S, Batra S, Langohr I, Iwakura Y, Jeyaseelan S. IFN- γ induction by neutrophil-derived IL-17A homodimer augments pulmonary antibacterial defense. *Mucosal Immunol*. 2016;9(3):718-729. doi:10.1038/mi.2015.95.
392. Appel H, Maier R, Wu P, et al. Analysis of IL-17(+) cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):R95. doi:10.1186/ar3370.
393. Moran EM, Heydrich R, Ng CT, et al. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One*. 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0024048.
394. Ramirez-Velazquez C, Castillo EC, Guido-Bayardo L, Ortiz-Navarrete V. IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013;9(1):23. doi:10.1186/1710-1492-9-23.
395. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol*. 2011;187(1):490-500. doi:10.4049/jimmunol.1100123.
396. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3005580.
397. Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat Commun*. 2016;7(July):10973. doi:10.1038/ncomms10973.
398. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014;233(3):294-307. doi:10.1002/path.4359.
399. Wong CK, Ho CY, Ko FWS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(2):177-183. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01602.x.
400. Chen XQ, Yu YC, Deng HH, et al. Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity. *J Clin Immunol*. 2010;30(2):221-225. doi:10.1007/s10875-009-9365-x.
401. Zhao X-F, Pan H-F, Yuan H, et al. Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*. 2010;37(1):81-85. doi:10.1007/s11033-009-9533-3.
402. Tanasescu C, Balanescu E, Balanescu P, et al. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Intern*

- Med.* 2010;21(3):202-207. doi:10.1016/j.ejim.2010.03.004.
403. Vincent FB, Northcott M, Hoi A, Mackay F, Morand EF. Clinical associations of serum interleukin-17 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(4):R97. doi:10.1186/ar4277.
 404. Yang XY, Wang HY, Zhao XY, Wang LJ, Lv QH, Wang QQ. Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol.* 2013;33(4):767-774. doi:10.1007/s10875-013-9878-1.
 405. Hsu H-C, Yang P, Wang J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol.* 2008;9(2):166-175. doi:10.1038/ni1552.
 406. Tshilela KA, Ikeuchi H, Matsumoto T, et al. Glomerular cytokine expression in murine lupus nephritis. *Clin Exp Nephrol.* 2015. doi:10.1007/s10157-015-1123-1.
 407. Susianti H, Iriane VM, Dharmanata S, et al. Analysis of urinary TGF- β 1, MCP-1, NGAL, and IL-17 as biomarkers for lupus nephritis. *Pathophysiology.* 2015;22(1):65-71. doi:10.1016/j.pathophys.2014.12.003.
 408. Zickert A, Amoudruz P, Sundström Y, Rönnelid J, Malmström V, Gunnarsson I. IL-17 and IL-23 in lupus nephritis - association to histopathology and response to treatment. *BMC Immunol.* 2015;16:7. doi:10.1186/s12865-015-0070-7.
 409. Zhang Z, Kyttaris VC, Tsokos GC. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J Immunol.* 2009;183(5):3160-3169. doi:10.4049/jimmunol.0900385.
 410. Amariljo G, Lourenço E V, Shi F-D, La Cava A. IL-17 Promotes Murine Lupus. *J Immunol.* 2014;193(2):540-543. doi:10.4049/jimmunol.1400931.
 411. Riedel J-H, Paust H-J, Krohn S, et al. IL-17F Promotes Tissue Injury in Autoimmune Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2016;1-12. doi:10.1681/ASN.2015101077.
 412. Ramani K, Biswas PS. Interleukin 17 signaling drives Type I Interferon induced proliferative crescentic glomerulonephritis in lupus-prone mice. *Clin Immunol.* 2016;162:31-36. doi:10.1016/j.clim.2015.10.009.
 413. Steinmetz OM, Turner J-E, Paust H-J, et al. CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J Immunol.* 2009;183(7):4693-4704. doi:10.4049/jimmunol.0802626.
 414. Pisitkun P, Ha HL, Wang H, et al. Interleukin-17 Cytokines Are Critical in Development of Fatal Lupus Glomerulonephritis. *Immunity.* 2012;37(6):1104-1115. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.014.
 415. Yu B, Guan M, Peng Y, et al. Copy number variations of interleukin-17F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1529-0131 (Electronic)):3487-3492. doi:10.1002/art.30595; 10.1002/art.30595.
 416. Delarue F, Virone A, Hagege J, et al. Stable cell line of T-SV40 immortalized human glomerular visceral epithelial cells. *Kidney Int.* 1991;40(5):906-912. doi:10.1038/ki.1991.292.
 417. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:269-277. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205958.
 418. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0032366.
 419. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2661-2671. doi:10.1172/JCI61303.

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἡγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.