

Znaczenie receptora programowanej śmierci 1 oraz jego ligandów w układzie immunologicznym oraz nowotworach

The role of receptor programmed death-1 and its ligands in immune system and tumors

Maciej Grzywnowicz, Krzysztof Giannopoulos

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (2a): 132–145

STRZESZCZENIE

Receptor programowanej śmierci (PD-1) jest immunoreceptorem ulegającym indukowanej ekspresji zarówno na limfocytach T, jak i B. Pełni on funkcję negatywnego regulatora odpowiedzi immunologicznej. Ze względu na oddziaływanie ze swoimi ligandami: PD-L1 oraz PD-L2, wykazującymi ekspresję w wielu typach tkanek, PD-1 jest odpowiedzialny za podtrzymanie tolerancji obwodowej poprzez ograniczanie aktywacji, proliferacji i funkcji efektorowych limfocytów T. Zaburzenia funkcjonowania szlaku PD-1/PD-L prowadzą do rozwoju chorób autoimmunologicznych i są obserwowane na „wyczerpanych” limfocytach w przewlekłych infekcjach wirusowych. Ekspresja PD-1, jak i jego ligandów jest opisywana w wielu typach nowotworów, gdzie mają istotne znaczenie w modelowaniu ich mikrośrodowiska, a także może być związana z ucieczką komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego. Dotychczasowe badania wskazują na potencjalne zastosowanie terapeutyczne szlaku PD-1/PD-L, także w nowotworach hematologicznych.

Słowa kluczowe: receptor programowanej śmierci 1 (PD-1), PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B2-DC), tolerancja obwodowa, tolerancja centralna, nadzór układu immunologicznego

ABSTRACT

Programmed death-1 (PD-1) molecule is an immunoreceptor, which is inducibly expressed on both T and B lymphocytes. PD-1 is a negative regulator of the immune response. Through interactions with its ligands: PD-L1 and PD-L2, being expressed on wide range of tissue, PD-1 is responsible for maintenance of peripheral tolerance by restricting activation, proliferation and effector functions of T lymphocytes. Aberrations of the PD-1/PD-L pathway lead to autoimmune disorders and are observed on exhausted lymphocytes during chronic infections. Expression of PD-1 and its ligands is described in many tumor entities, where it modulates tumor microenvironment and might be a potential escape mechanism from immunosurveillance. There are growing evidences for potential therapeutical applications of the PD-1/PD-L pathway, including hematological malignances.

Keywords: Programmed death receptor 1 (PD-1), PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B2-DC), Peripheral tolerance, Central tolerance, Immunosurveillance

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 6.04.2012
Zaakceptowano: 13.04.2012

Samodzielna Pracownia Hematoonkologii
Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Kierownik: Dr hab. Krzysztof Giannopoulos

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:
Mgr Maciej Grzywnowicz
Samodzielna Pracownia Hematoonkologii
Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4a
20-093 Lublin
tel. 81 756 48 12
fax. 81 756 48 13
mgrzywnowicz@wp.pl

Wprowadzenie

Układ odpornościowy sprawuje niezwykle ważną funkcję w postaci zarządzania złożonymi mechanizmami ochrony organizmu przed zagrożeniami zarówno ze strony zewnętrznych patogenów, jak i komórek własnych, wykazujących niepożądane właściwości i cechy. Do takich komórek wymagających usunięcia z organizmu można zaliczyć komórki starzejące się, zainfekowane wirusami lub przechodzące

proces transformacji nowotworowej. Rozpoznawanie niepożądanych antygenów jest wysoce selektywne i wymaga wielostopniowej regulacji w celu uniknięcia reakcji przeciwko antygenom zdrowych komórek organizmu. Wiąże się to z rozwinięciem mechanizmów centralnej, jak i obwodowej tolerancji wobec własnych antygenów. Poziom selekcji odpowiedzialny za centralną tolerancję eliminuje większość autoreaktywnych komórek układu odpornościowego, jednakże

nie jest to mechanizm całkowicie szczelny i możliwe jest przedostawanie się takich komórek do narządów obwodowych [1, 2]. Do unieczynnienia autoreaktywnych komórek służą mechanizmy tolerancji obwodowej, których upośledzenie wiąże się z rozwojem chorób autoimmunologicznych. Do takich mechanizmów należą negatywne cząsteczki kostymulujące i regulatorowe limfocyty T (*T regulatory cells*) odgrywające rolę regulacji aktywacji, funkcji i proliferacji autoreaktywnych komórek.

Kluczową rolę w aktywowaniu dziewiczych limfocytów T odrywają sygnały płynące od receptora limfocytów T (TCR; *T-cell receptor*) rozpoznającego antygen oraz od receptorów kostymulujących. Funkcją tych cząsteczek jest zapewnienie delikatnej równowagi pomiędzy efektywną odpowiedzią immunologiczną, a tolerancją na autoantygenu. Molekułą odgrywającą taką regulatorową rolę w odpowiedzi immunologicznej jest receptor śmierci programowanej 1 (*programmed death receptor-1*; PD-1; CD279).

Aktywacja dziewiczych limfocytów T wymaga otrzymania przynajmniej dwóch sygnałów, które będą oddziaływać na prowadzące do niej odpowiednie czynniki transkrypcyjne [3]. Pierwszy z nich to rozpoznanie przez TCR limfocytu T antygenowego peptydu zaprezentowanego przez główny układ zgodności tkankowej (MHC; *major histocompatibility complex*). Drugi sygnał płynie od receptorów zlokalizowanych na powierzchni limfocytu łączących się z odpowiednimi molekułami na powierzchni komórek prezentujących antygen (APCs; *antigen presenting cells*). Do takich immunoreceptorów należą cząsteczki z rodziny CD28 czy CD40 [4, 5]. O istotności drugiego sygnału świadczy fakt, że limfocyt, który otrzyma jedynie sygnał płynący od receptora TCR bez sygnału kostymulującego, wejdzie w odwracalny stan anergii odznaczający się brakiem aktywacji oraz niewrażliwością na kolejne pobudzenia antygenem [6]. Charakterystyka zjawiska kostymulacji pozwoliła na identyfikację szeregu szlaków sygnałowych odpowiadających za przekazywanie impulsu promującego zjawiska przeżycia, klonalnej ekspansji, różnicowania, produkcji cytokin oraz funkcji efektorowych limfocytów T. Analogicznie do molekuł odpowiedzialnych za promocję aktywacji limfocytów T istnieją też cząsteczki regulatorowe przekazujące do wnętrza sygnał hamujący. Takim negatywnym immunoreceptorem jest cząsteczka PD-1.

Struktura PD-1

PD-1 jest białkiem kodowanym przez gen *pdc1-1* zlokalizowanym w ludzkim chromosomie 2, w którym znajduje się 5 eksonów. Podstawowy plan budowy glikoproteinowej cząsteczki PD-1 (50–55 kDa) jest podobny do pozostałych członków rodziny CD28

i jest on charakterystyczny dla transbłonowej proteiny typu I. Cząsteczkę buduje 288 aminokwasów. Od strony zewnątrzkomórkowej wyróżniamy peptyd liderowy (kodowany przez ekson 1), następnie domenę IgV-podobną (ekson 2) oraz około 20 aminokwasowy fragment oddzielający tę domenę od błony komórkowej, którą przebija domena transbłonowa (kodowana przez ekson 3). W cytoplazmie znajduje się domena wewnątrzkomórkowa kodowana przez eksony 4 i 5. W jej obrębie można wyróżnić dwie tyrozyny zlokalizowane w dwóch motywach aminokwasowych: proksymalnym ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) oraz dystalnym ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*). Badania *in vitro* wskazały, że niezbędna do zachowania funkcji PD-1 jest tyrozyna zlokalizowana w motywie ITSM, a nie ITIM [7]. Złożenie wszystkich pięciu domen skutkuje powierzchniową ekspresją w pełni funkcjonalnego białka PD-1. Nielsen i wsp. [8] opisali szereg wariantów obróbkowych kodujących białka pozbawione poszczególnych domen, w tym także transkrypt bez eksonu 3 kodujący rozpuszczalną formę PD-1.

Ze względu na podobieństwo w strukturze oraz modulującej funkcji względem limfocytów białko PD-1 zostało zakwalifikowane do rodziny CD28. Jest to ważna grupa powierzchniowych cząsteczek limfocytów należąca, ze względu na strukturę, do nadrodziny białek Ig-podobnych. Cząsteczki ligandów oddziaływujące z tymi receptorami należą do rodziny B7. W rodzinie CD28 można wyróżnić receptory stymulujące aktywację limfocytów, jak i odpowiedzialne za negatywną kostymulację, czyli hamowanie procesu aktywacji. Do pierwszej grupy należą CD28 i ICOS (CD278, AILIM) oddziaływujące z ligandami, odpowiednio, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) oraz B7-H2 (ICOS-L, B7-RP1). Do receptorów negatywnych należą antygen-4 związany z limfocytym T cytotoksycznym (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*; CTLA-4), który łączy się z tymi samymi ligandami co CD28, oraz dwa najpóźniej zakwalifikowane do rodziny CD28 receptory: PD-1 reagujący z PD-L1 (B7-H1, CD274) i PD-L2 (B7-DC, CD273), a także atenuator limfocytów B i T (*B- and T-lymphocyte attenuator*; BTLA; CD272) i jego ligand HVEM (Tnfrsf14). Obrazu rodziny CD28/B7 dopełniają dwa ligandy bez przyporządkowanych do tej pory receptorów: B7-H3 (B7RP-2, CD276) oraz B7-H4 (B7x, B7S1).

Domena IgV-podobna PD-1 dzieli 31–33% podobieństwa sekwencji aminokwasowej z CD28, CTLA-4 i ICOS. Jednakże pewne charakterystyczne cechy wyróżniają PD-1, podobnie jak BTLA, na tle pozostałych receptorów z rodziny CD28. Analizując lokalizację cytogenetyczną, można stwierdzić, że geny dla CD28, CTLA-4 i ICOS umiejscowione są w pojedynczym regionie na chromosomie (u ludzi 2q33), podczas gdy gen kodujący PD-1 znajduje się w innym

regionie (2q37). U ssaków sekwencje kodujące CD28, CTLA-4 i ICOS są silnie konserwowane, wykazując odpowiednio homologię 79%, 100% i 77% sekwencji łańcucha cytoplazmatycznego pomiędzy myszowymi i człowiekiem. PD-1 wykazuje jedynie 59% homologii dla tego fragmentu, co wskazuje na dynamiczne procesy ewolucyjne, jakim poddawana jest ta cząsteczka [9]. Jednakże sekwencja aminokwasowa otaczająca sekwencję ITSM jest całkowicie zachowana pomiędzy myszą a człowiekiem, co sugeruje ewolucyjne znaczenie tego motywu w funkcjonowaniu PD-1 [7]. Podobnie jak pozostali członkowie rodziny CD28 (CD28, CTLA-4 oraz ICOS), PD-1 nie posiada funkcji enzymatycznej, a pełni jedynie rolę adaptera przekazującego sygnał do wnętrza komórki. Cechą charakterystyczną dla łańcuchów cytoplazmatycznych CD28, CTLA-4 i ICOS jest posiadanie motywów wiążących SH2 (*Src homology 2*) oraz SH3 (*Src homology 3*). Domeny te nie występują w łańcuchu cytoplazmatycznym PD-1. Natomiast domeny ITIM i ITSM są unikatowe dla PD-1 i BTLA. W odróżnieniu od CD28, CTLA-4 i ICOS, PD-1 nie posiada cysteiny proksymalnej do błony komórkowej pozwalającej na utworzenie homodimeru, dlatego znajdujący jest w formie monomeru zarówno na powierzchni komórek, jak i w formie rozpuszczalnej [10]. Potencjalne znaczenie braku dimeryzacji nie jest określone dla PD-1, jednakże w odniesieniu do CD28 wykazano spadek siły stymulacji limfocytów T pomiędzy formą homodimeru i monomeru [11]. Z drugiej strony doświadczenie na białku fuzyjnym z domeną IgV-podobną z CD28 od myszy połączoną z ogonem cytoplazmatycznym ludzkiego PD-1 pokazało, że taka chimeryczna cząsteczka funkcjonuje w sposób zbliżony zarówno jako dimer, jak i monomer [12]. Większość cech odróżniających PD-1 na tle klasycznych białek rodziny CD28 jest podobna dla BTLA [13].

Ekspresja PD-1

PD-1 jest białkiem powierzchniowym zarówno dla limfocytów T, jak i B. PD-1 w formie niezwiązanej z błoną komórkową został wykryty w cytoplazmie limfocytów T o funkcjach regulatorowych, limfocytach regulatorowych Foxp3+ i dziewiczych limfocytach CD4+ [14]. Magazynowanie może mieć związek z nieokreśloną funkcją PD-1 w cytoplazmie lub mieć na celu akumulację cząsteczek PD-1 na wypadek aktywacji [14]. Zakres ekspresji PD-1 jest cechą wyróżniającą ten receptor w rodzinie CD28, w której ekspresja CD28, CTLA-4 i ICOS ogranicza się do limfocytów T. W sposób indukowany PD-1 ulega ekspresji w aktywowanych limfocytach T i B, monocytach i części komórek dendrytycznych [15-17]. Yamazaki i wsp. [17] wykazali również ekspresję PD-1 na świeżo izolowanych limfocytach B u myszy. PD-1 ulega kon-

stitutywnej syntezie w podwójnie ujemnych limfocytach T (CD4-CD8-) $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$, gdzie jego ekspresja jest istotna zarówno podczas negatywnej, jak i pozytywnej selekcji [18-20].

Sygnały przekazywane od receptorów TCR oraz receptora limfocytów B (BCR) indukują ekspresję PD-1 i jest ona podtrzymywana przez czynniki towarzyszące przewlekłej stymulacji antygenem [15]. Szczególnie duża ekspresja PD-1 jest obserwowana podczas przewlekłych infekcji wirusowych na limfocytach T, które stały się „wyczerpane” (*exhausted*), co wiąże się z utratą funkcji cytotoksycznych limfocytów T [21]. Cytokiny wspomagające przeżycie i proliferację limfocytów T, takie jak interleukina 2 (IL-2), IL-7, IL-15 i IL-21, mogą także stymulować ekspresję PD-1 [22]. Estrogen również powoduje zwiększenie ekspresji PD-1 w limfocytach T oraz komórkach APCs [23]. Badania nad strukturą promotora genu *pdcd-1* wskazały na istotną rolę jądrowego czynnika pobudzonych limfocytów T - c1 (*nuclear factor of activated T cells c1*; NF-ATc1) w indukcji ekspresji PD-1 w limfocytach T [24]. Specyficzna inhibicja tego czynnika poprzez zniesienie jego translokacji do jądra powodują obniżenie ekspresji PD-1, a mutacja genu kodującego NF-ATc1 prowadzi do całkowitego braku ekspresji PD-1 [24]. W limfocytach B czynniki mogące stymulować aktywację i proliferację, takie jak przeciwciała anty-IgM, anty-CD40 i LPS, powodują także indukcję PD-1 [17].

Ekspresja PD-1 w makrofagach jest pobudzana przez element odpowiedzi stymulowanej przez interferon (*interferon-sensitive response element*; ISRE), białka przekazujące sygnał i aktywatory transkrypcji - STAT1 i STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*) oraz interferon α (IFN- α), przy czym zwiększenie ekspresji PD-1 przez IFN- α jest możliwe dzięki ISRE [25]. Ekspresję PD-1 w komórkach dendrytycznych pobudza oddziaływanie z receptorami Toll-podobnymi (*Toll-like receptors*) TLR2, TLR3, TLR4 oraz wiążącą nukleotydy domeną oligomeryzacji NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), natomiast IL-4 oraz TLR9 działają hamująco w tych komórkach [26].

Struktura i ekspresja PD-L1 oraz PD-L2

Ligandami dla receptora PD-1 są transbłonowe glikoproteiny typu I, PD-L1 (B7-H1, CD274) oraz PD-L2 (B7-DC, CD273). Oba białka posiadają zewnątrzblonowe domeny IgV- i IgC-podobne [27-30]. Zbadanie krystalograficznej struktury kompleksu PD-L1/PD1 i PD-L2/PD-1 pokazało, że domena IgV-podobna ligandów jest odpowiedzialna za oddziaływanie z analogiczną domeną receptora [31, 32]. Zarówno PD-L1, jak PD-L2 nie posiadają w swoich krótkich fragmentach cytoplazmatycznych zidentyfikowanych motywów mogących służyć do przekazywania sygnału do wnętrza komórki. Sekwencja aminokwasowa pomie-

dzy PD-L1 (40 kDa) a PD-L2 (22 kDa) jest podobna w 40%, natomiast zachowanie sekwencji pomiędzy myszą a człowiekiem jest równe 70%. Identyczność sekwencji pomiędzy PD-L1 i PD-L2, a ligandami dla CD28 i CTLA-4, B7.1 i B7.2 jest równa około 20%.

Ekspresja ligandów dla receptora PD-1 jest zróżnicowana. Ekspresja PD-L1 na poziomie mRNA jest obecna w mnogich typach komórek i tkanek. Jako białko PD-L1 znajduje się na powierzchni limfocytów T i B, monocytów, komórek dendrytycznych, a jego ilość zwiększa się wraz z aktywacją tych komórek [6, 29, 33]. Część ta znajduje się także na wielu rodzajach komórek niehematopoetycznych, takich jak komórki śródbłonna naczyniowego, wysepek trzustkowych, neurony, astrocyty czy komórki trofoblastu łożyska [17, 19, 34]. Ekspresja PD-L1 w ludzkich komórkach ma przede wszystkim charakter indukowany, podczas gdy u myszy konstytutywna ekspresja jest powszechniejsza [35]. Zakres ekspresji dla PD-L2 jest dużo mniejszy i ogranicza się do komórek dendrytycznych i monocytów, jednak mRNA PD-L2 jest syntezowane również w ludzkich komórkach serca, wątroby, łożyska i trzustki [28, 30]. Doświadczenia na myszach pokazały także, że podtyp limfocytów B1 wykazuje ekspresję PD-L2 w sposób konstytutywny [36]. Znaczące jest różnicowanie ekspresji ligandów PD-1 w obrębie grasicy. PD-L1 ulega szerokiej ekspresji w komórkach kory, natomiast występowanie PD-L2 jest ograniczone do komórek zrębu rdzenia grasicy [20, 35]. Poziom ekspresji dla ligandów PD-1 jest zróżnicowany w zależności od rodzaju tkanki. Wysoki poziom ekspresji jest wykrywany w łożysku, sercu, płucach i wątrobie, a niski w śledzionie, węzłach chłonnych oraz grasicy [6, 7, 15, 31]. Jednakże poziom transkryptów nie przekłada się zawsze na poziom białka wykrywanego w komórce, szczególnie w przypadku PD-L2, który w fizjologicznych warunkach rzadko jest wykrywany w nielimfoidalnych komórkach [11, 20, 34].

Ekspresja PD-L1 oraz PD-L2 jest znacząco modyfikowana poprzez działanie cytokin i innych czynników. Ekspresja PD-L1 wzrasta po stymulacji limfocytów B przeciwciałami anti-IgM i LPS oraz interferonami (IFN) pierwszego i drugiego typu, czynnikiem nekrozy nowotworu TNF- α (*tumor necrosis factor*) oraz IL-21 [17, 22]. W przypadku limfocytów T stymulujący efekt mają przeciwciała anti-CD3, IL-2, IL-7, IL-15, interferony oraz TNF- α , GM-CSF stymuluje ligandy w makrofagach, IL-10 w monocytach, a IFN- γ , IL-4, IL-12 i GM-CSF w komórkach dendrytycznych [17, 22]. Na ekspresję PD-L2 na makrofagach wpływają IFN- γ i IL-4, na komórkach dendrytycznych IFN- γ , IL-4, IL-12 i GM-CSF [17]. Zauważono, że w makrofagach ekspresja PD-L1 jest pobudzana przez działanie IL-4 silniej niż poprzez INF- γ , podczas gdy dla PD-L2 sytuacja jest odwrotna, co może wskazywać na zróż-

nicowanie roli limfocytów Th1 i Th2 w regulacji ekspresji ligandów PD-1 [37].

Regulacja transkrypcji PD-L1 w ludzkich komórkach odbywa się poprzez wiązanie czynnika regulującego gen dla interferonu (*IFN-gene regulatory factor*; IRF-1) do dwóch miejsc w obrębie promotora [38]. Do ekspresji PD-L1 wymagane jest również białko STAT3 [39]. Translacja PD-L1 jest regulowana negatywnie przez mikro RNA - miR513, które wiąże się z regionem UTR (*untranslated region*) transkryptu RNA w cholangiocytych [40]. MiR513 jest negatywnie regulowany w obecności INF- γ [40]. Zakres wiedzy o transkrypcyjnej regulacji PD-L2 jest mniejszy w porównaniu z PD-L1. Indukcja transkrypcji poprzez INF- γ odbywa się częściowo poprzez miejsce wiązania czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) powyżej miejsca rozpoczęcia transkrypcji [20].

Inny poziom regulacji ekspresji ligandów receptora PD-1 ma związek z przekazywaniem sygnału płynącego od receptorów dla IFN w komórce. Badania nad komórkami plazmatycznymi w szpiczaku mnogim wskazały na zależność szlaku MEK/ERK oraz stymulacji ekspresji PD-L1 przez INF- γ oraz ligandy receptorów TLR [41]. Blokowanie adaptorych białek: mieloidalnego czynnika różnicowania 88 (*myeloid differentiation factor 88*; MyD88) i czynnika związanego z receptorem dla czynnika nekrozy nowotworu 6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*; TRAF6) oraz kinazy Janusowej 2 (JAK2) również wpływa na obniżenie ekspresji PD-L1 [41]. Na dodatnią potranskrypcyjną regulację ekspresji PD-L1 ma również wpływ szlak kinazy Akt (kinazy białkowej B) i kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K), który jest aktywowany po wyłączeniu funkcji fosfatazy PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), co zostało opisane w komórkach glejaka [42]. W komórkach dendrytycznych obecnych w płucach myszy opisano wpływ białka dopełniacza c5a na pozytywną regulację ekspresji obydwu ligandów PD-1 [43].

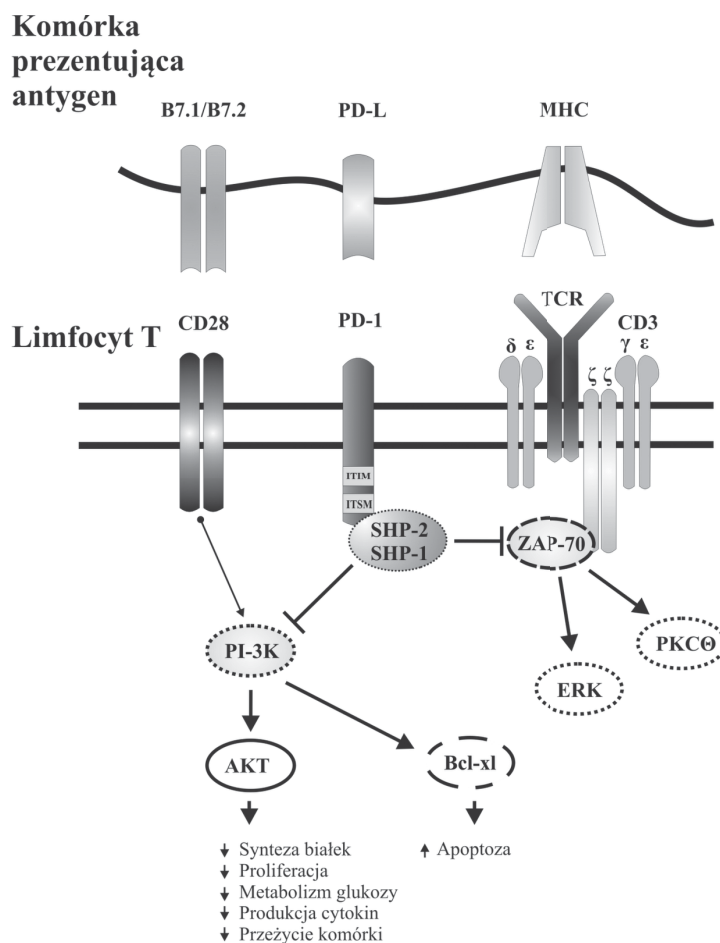
Mechanizm przekazywania sygnału PD-1

Pobudzenie receptora PD-1 rozpoczyna się od związania jednego z ligandów. Stechiometria oddziaływania w obu przypadkach jest równa 1:1, jednak mechanizm molekularny wiązania do receptora jest różny dla PD-L1 i PD-L2, ponieważ PD-L1 ulega zmianie konformacji przestrzennej podczas wiązania do PD-1 [4, 31, 44]. Dodatkowo specyficzność obu ligandów nie jest jednakowa, ponieważ PD-L1, poza wiązaniem się z PD-1, oddziałuje również z częścią CD80 (B7-1), także ulegając zmianie konformacji [44–46]. Powinowactwo do receptora obu ligandów przedstawione przez Ghiotto i wsp. [44] jest zbliżone, jednakże

Ryc. 1. Mechanizm przekazywania sygnału hamującego przez PD-1 w limfocytach T. Hamujący wpływ sygnału z receptora PD-1 na wewnętrzne szlaki sygnałowe w limfocycie T oddziaływującym z komórką prezentującą antygen.

PD-1 – receptor programowanej śmierci 1 (*programmed death 1*); ITSM – *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*; ITIM – *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*; TCR/CD3 – kompleks receptora limfocytów T z CD3; α , β , γ , δ , ζ – podjednostki CD3; PKC θ – kinaza białkowa C θ ; ERK – *extracellular-signal regulated kinase*; Bcl-xL – *B-cell lymphoma extra large*; AKT – kinaza białkowa B (PKB); MHC – główny układ zgodności tkankowej; PD-L – ligand PD-1; B7.1 i B7.2 – ligandy CD28

Fig. 1. Mechanism of PD-1 signal transduction in T lymphocytes



w wcześniejszych badaniach Youngnak i wsp. [32] wykazali trzykrotnie wyższe od PD-L1 powinowactwo PD-L2 do PD-1. Oba ligandy współzawodniczą ze sobą ilościowo o związanie z receptorem [36].

Po poznaniu struktury łańcucha cytoplazmatycznego PD-1 zakładano, że mechanizm przekazywania sygnału do wnętrza komórki jest oparty na tyrozynie w motywie ITIM, ze względu na rozpowszechnienie tego motywu wśród immunoreceptorów, w tym KIR, CD72, czy Fc RIIB. Jednakże doświadczenia *in vitro* pokazały, że dla funkcji receptora PD-1 jako inhibitora niezbędna jest tyrozyna w motywie ITSM, a nie ITIM, zarówno w przypadku limfocytów B, jak i T [6, 7]. Po związaniu ligandu PD-L1 bądź PD-L2 następuje fosforylacja tyrozyny w motywie ITSM oraz rekrutacja odpowiedniej cząsteczki sygnałowej. Dotychczasowe badania *in vitro* wykazały, że tą cząsteczką dla limfocytów B oraz T jest fosfataza fosfotyrozyny 2 zawierająca domenę homologiczną 2 do Src (SHP-2) [19, 33]. W przypadku limfocytów T zaobserwowano również słabe wiązanie z SHP-1, czego nie pokazano dla limfocytów B, co może być dowodem na odmienny mechanizm przekazywania sygnału pomiędzy limfocytami T i B [6]. Należy zaznaczyć, że do tej pory

nie wykazano rekrutacji SHP-2 lub SHP-1 do PD-1 w warunkach fizjologicznych.

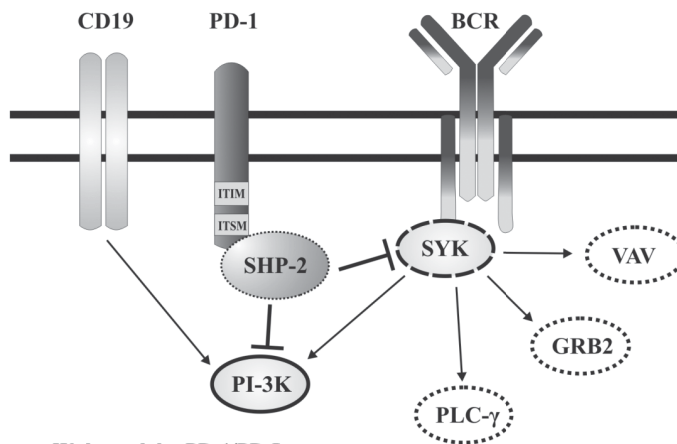
Mechanizm działania PD-1 w przypadku limfocytów T opiera się w dalszej kolejności na hamowaniu aktywacji poprzez defosforylację PI-3K, co następnie doprowadza do zahamowania aktywności kinazy Akt (Ryc. 1) [47]. Kinazy PI-3K i Akt odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji transporterów dla glukozy i stymulacji aktywności enzymów glikolitycznych, dlatego zachowanie funkcji tych kinaz przez PD-1 wiąże się z upośledzeniem metabolizmu energetycznego komórki [47]. Aktywacja PI-3K jest również niezbędna do przekazania kostymulującego sygnału od receptorów powierzchniowych CD28 i ICOS, co zapobiega różnicowaniu limfocytów T i ich funkcji efektorowej [48]. CTLA-4, inny negatywny regulator z rodziny CD28, również blokuje fosforylację Akt, jednakże z pominięciem kinazy PI-3K, poprzez aktywację białkowej fosfatazy 2 (PP2A), co pokazuje odmienny mechanizm hamowania funkcji limfocytów przez te dwa immunoreceptory mimo podobnego efektu końcowego [47]. CTLA-4, tak jak i PD-1, blokuje sygnały od cząsteczek CD28 i ICOS, jednak po porównaniu spadku ilości zależnych od

Limfocyt B

Ryc. 2. Mechanizm przekazywania sygnału hamującego w limfocytach B

Wpływ sygnał z receptora PD-1 na wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe w limfocycie B. PD-1 – receptor programowanej śmierci 1 (*programmed death 1*); ITSM – *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*; ITIM – *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*; BCR – receptor limfocytów B; PI-3K – kinazy 3-fosfatydyloinozytolu; CD19 – antygen limfocytów B odpowiedzialny za aktywację i proliferację; GRB2 – białko związane z receptorem dla czynnika wzrostu 2 (*growth factor receptor-bound protein 2*); PLC- γ – fosfolipaza C- γ ; VAV – czynnik wymieniający nukleotyd guaninę (*guanine nucleotide exchange factor*)

Fig. 2. Mechanism of PD-1 signal transduction in B lymphocytes



Wpływ szlaku PD-1/PD-L na:

- Syntezę białek
- Proliferację
- Metabolizm glukozy
- Różnicowanie
- Przeżycie komórki
- Apoptozę

też stymulacji transkryptów PD-1 okazuje się być silniejszym inhibitorem aktywacji limfocytów T obniżającym ilość transkryptów w przybliżeniu o 90%, podczas gdy CTLA-4 – o 67% [47]. W odniesieniu do mechanizmów apoptotycznych, ligacja CTLA-4 powoduje indukcję ekspresji genu *bcl-xl*, kodującego istotny czynnik białkowy Bcl-xl (*B-cell lymphoma-extra large*) umożliwiający uniknięcie programowanej śmierci, podczas gdy pobudzenie PD-1 nie wywiera takiego efektu, co może sugerować większą wrażliwość limfocytów T na apoptozę w przypadku negatywnej stymulacji PD-1 [47, 49].

Innym efektem wywoływanym przez PD-1 jest blokowanie przyłączania kinazy ZAP-70 do podjednostki CD3 ζ błonowego kompleksu CD3 poprzez zapobieganie fosforylacji obu cząsteczek, co w konsekwencji zahamowuje przekazanie sygnału płynącego od receptora TCR [50]. PD-1 blokuje również aktywację kinazy PKC θ (kinaza białkowa C θ) i kinazy Erk (*extracellular-signal regulated kinase*) [50]. Wykazano, że hamujący efekt PD-1 jest odwracalny w przypadku stymulacji CD28 oraz działania IL-2 [27, 51]. Efekt zahamowania przez PD-1 aktywacji kinazy Erk może być zniesiony poprzez działanie cytokin, szczególnie tych aktywujących STAT5, takich jak IL-2, IL-7 i IL-15 [52].

Opisany do tej pory mechanizm działania w limfocytach B, podobnie jak w przypadku limfocytów T, wiąże się z zahamowaniem aktywności kinazy PI-3K, zatrzymując tym samym przekazanie sygnału z receptora CD19 oraz hamując kinazę Syk, co blokuje sygnał z receptora BCR (Ryc. 2) [7].

Brak tych sygnałów prowadzi do braku aktywacji limfocytów B.

Funkcja receptora PD-1 i jego ligandów

Ekspresja receptora PD-1 pierwotnie została zidentyfikowana w dwóch różnych limfoidalnych liniach komórkowych (2B4.11 i LyD9) wykazujących nasiloną apoptozę, co stało się podstawą do nazwania nowo opisanego białka w związku z podejrzewaną rolą w tym procesie [53]. Późniejsze badania jednakże nie potwierdziły funkcji PD-1 w procesie apoptozy, lecz wskazały na jego właściwości jako inhibitora odpowiedzi immunologicznej oraz wykazały, że brak genu *pdccl-1* powoduje rozwinięcie poważnych zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym [15, 54, 55]. Skutek delecji alleli PD-1 u myszy był jednak inny niż brak ekspresji CTLA-4, co wskazało na odmienną od CTLA-4 funkcję PD-1 w regulacji odpowiedzi immunologicznej [56, 57]. Model delecji PD-1 u myszy, u których uzyskano cząsteczkę PD-1 z ekspresją genu odporności na neomycynę w miejsce domeny transbłonowej, nie wykazał znaczących zmian immunofenotypu, które mogłyby pomóc w określeniu funkcji tego immunoreceptora [58]. Dopiero u myszy C57BL/6 z mutacją *lpr* i delecją obu alleli *pdccl-1* uwidoczniła się rola PD-1 jako negatywnego regulatora odpowiedzi B-komórkowej oraz w regulacji tolerancji obwodowej, ze względu na zwiększoną proliferację i produkcję przeciwciał po stymulacji u tych zwierząt oraz na rozwijające się u około połowy osobników w badanej grupie auto-

immunologiczne toczeniowe zapalenie stawów oraz kłębuszkowe zapalenie nerek w późniejszym okresie życia [54, 58].

Kolejnym etapem poznania mechanizmu działania PD-1 była identyfikacja ligandów dla tego receptora, PD-L1 i PD-L2, co pozwoliło stwierdzić, że PD-1 reguluje odpowiedź immunologiczną poprzez hamowanie aktywacji limfocytów [9, 13, 22]. Pierwszy ligand, PD-L1, został zidentyfikowany niezależnie przez dwie grupy w badaczy w 1999 i 2000 roku [12, 13]. Dowiodło to roli receptora PD-1 w hamowaniu reakcji autoimmunizacyjnych poprzez negatywną regulację proliferacji i produkcji cytokin przez limfocyty T [9, 13]. W 2001 roku opisano PD-L2 jako drugi ligand dla PD-1, również wywierający hamujący efekt na limfocyty T [22, 30]. Dalsze doświadczenia na modelach myszy potwierdziły rozwój szeregu chorób autoimmunizacyjnych w przypadku braku PD-1: kardiomiopatii rozstrzeniowej u myszy BALB/c oraz ostrej cukrzycy typu I u myszy NOD (*non-obese diabetic*) i tym samym udział PD-1 w regulacji tolerancji obwodowej [55, 59].

Szlak PD-1/PD-L bierze udział w regulacji zarówno centralnej, jak i obwodowej tolerancji. PD-L1 ulega ekspresji w wysokim stopniu na tymocytach i komórkach kory grasicy, podczas gdy PD-L2 obecny jest w komórkach rdzenia [19]. PD-1 jest obecny na podwójnie ujemnych tymocytach pozbawionych CD4 oraz CD8, a jego ekspresja rozpoczyna się w momencie rearanżacji łańcucha β receptora [30]. Interakcja PD-1 i PD-L1 bierze udział w procesie pozytywnej selekcji, a brak receptora bądź ligandu skutkuje zwiększoną ilością podwójnie negatywnych tymocytów [60]. Wpływ na proces negatywnej selekcji nie został zademonstrowany, a delecja PD-1 nie powoduje zaburzenia tego procesu [61, 62]. Profiłowanie ekspresji genów u myszy NOD wskazało zaangażowanie PD-1 i PD-L1 w mechanizm centralnej tolerancji [63].

Tolerancja obwodowa jest modulowana przez szlak PD-1/PD-L w zróżnicowany sposób. Zestawiając powolną dynamikę rozwoju chorób autoimmunologicznych wywołanych upośledzeniem funkcji PD-1 z wczesnymi skutkami delecji CTL-4, można przypuszczać, że PD-1 odpowiada w większym stopniu za regulację i podtrzymanie tolerancji, a CTL-4 za jej indukcję [64]. Pobudzenie receptora PD-1 ogranicza aktywację i ekspansję autoreaktywnych limfocytów T oraz upośledza ich funkcję efektorową i tym samym negatywne zmiany w poszczególnych tkankach. Szlak ten może również zapobiegać nabytciu przez autoreaktywne dziewicze limfocyty T cech efektorowych. Badania nad rolą szlaku PD-1/PD-L w rozwoju cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym pokazały, że jest on zdolny do regulacji tolerancji obwodowej poprzez hamowanie aktywa-

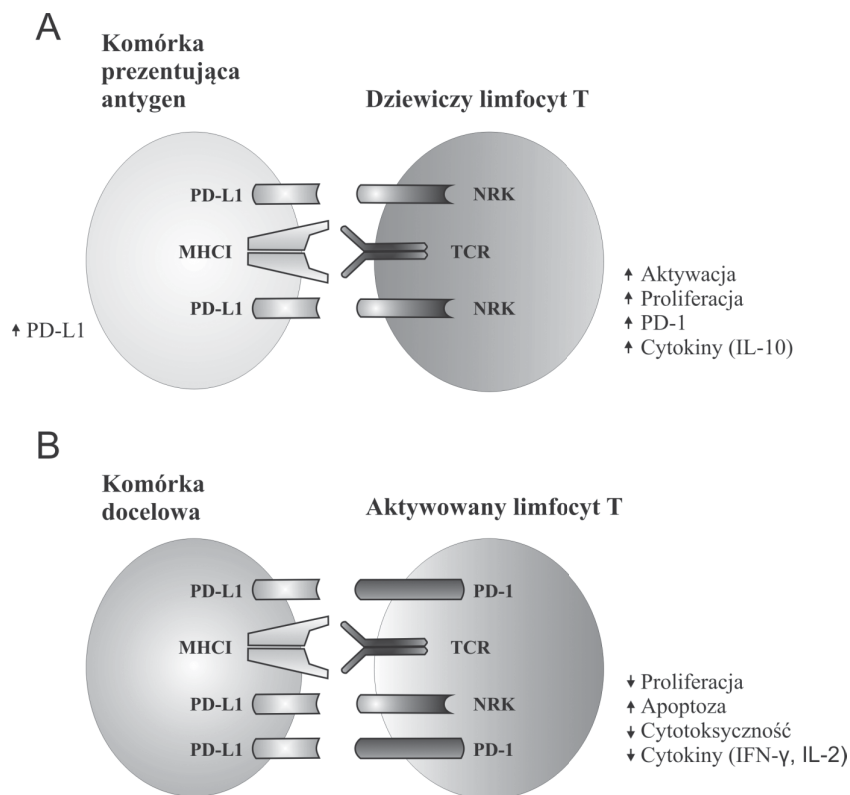
cji, ekspansji oraz funkcji efektorowych [59, 65]. Ekspresja PD-L1 i PD-L2 została opisana na tolerogennych komórkach dendrytycznych, które indukują obwodową tolerancję limfocytów CD8+ [66]. Upośledzenie ekspresji PD-1 powoduje zwiększenie odpowiedzi przeciwko antygenowi prezentowanemu przez komórki dendrytyczne [66]. Na istotne znaczenie oddziaływania PD-1 w mechanizmie tolerancji obwodowej wskazuje ekspresja jego ligandów. PD-L1 poprzez ekspresję w komórkach większości tkanek może pełnić rolę moderatora odpowiedzi immunologicznej w poszczególnych narządach. Miejscem o szczególnym znaczeniu dla odpowiedzi obwodowej są komórki śródbłonka. Wykazano, że ekspresja ligandów PD-L1 i PD-L2 na komórkach śródbłonka negatywnie wpływa na aktywację i funkcję limfocytów T z ekspresją CD8 [67]. Ponadto ekspresja PD-L1 na komórkach śródbłonkowych może ograniczać napływ limfocytów T do poszczególnych tkanek w stanach zapalnych, tym samym osłaniając je przed nadmiernym uszkodzeniem ze strony układu odpornościowego i regulując stan zapalny [68]. PD-L1 ulegający ekspresji na komórkach niehematopoetycznych tkanek również bezpośrednio hamuje reakcję immunologiczną przeciwko danym komórkom poprzez oddziaływanie na receptor PD-1 na limfocytach T [23, 60]. Upośledzenie ekspresji PD-1 na limfocytach T skutkuje z kolei wzmożonym napływem do tkanek, produkcją cytokin i proliferacją oraz obniżeniem gęstości antygeny wymaganej do aktywacji tych limfocytów, co może prowadzić do reakcji autoimmunologicznej [23].

Poza bezpośrednią kontrolą odpowiedzi immunologicznej poprzez oddziaływanie na limfocyty efektorowe, receptor PD-1 ma swój udział w regulacji oddziaływań pomiędzy komórkami efektorowymi, a limfocytami regulatorowymi. Zarówno PD-1, jak i PD-L1 ulegają ekspresji na limfocytach regulatorowych [69]. PD-L1, łącząc się z PD-1 na dziewiczych limfocytach T, może stymulować rozwój indukowanych limfocytów regulatorowych oraz podtrzymywać i regulować ich funkcję [70]. Również obecność PD-L1 na limfocytach regulatorowych może wpływać hamująco na posiadające PD-1 populacje limfocytów oraz komórki dendrytyczne.

Receptor i ligandy szlaku PD-1/PD-L mogą brać udział w regulacji odpowiedzi typu humoralnego. Wykazano ekspresję PD-1 oraz PD-L1 i PD-L2 na komórkach B w ośrodkach rozmnażania oraz limfocytach B pamięci [71]. Ekspresja PD-1 pozostawała bez wpływu na różnicowanie tych komórek oraz początkowe etapy produkcji przeciwciał, jednakże brak PD-1 powodował ograniczenie powstawania długożyjących komórek plazmatycznych oraz przeżycie limfocytów B w ośrodkach rozmnażania [71]. Ponadto PD-1 ulega silnej ekspresji na limfocytach pomocni-

Ryc. 3. Wpływ oddziaływania PD-L1 na różnych etapach aktywacji limfocyta T. Schemat prezentuje mechanizm działania szlaku PD-1/PD-L1 w dziewiczym i aktywowanym limfocycie T w momencie związania receptora limfocytów T (TCR) z częścią głównego układu zdolności tkankowej MHC oraz w aktywowanym limfocycie T: (A) na dziewiczym limfocycie T PD-1 nie ulega konstytutywnej ekspresji, co umożliwia ligację PD-L1 do niezidentyfikowanego receptora kostymulującego (NRK) różnego od PD-1; (B) w aktywowanym limfocycie T dochodzi do indukowanej ekspresji receptora PD-1, co umożliwia ligację z PD-L1 i w konsekwencji ograniczenie proliferacji, funkcji i apoptozę limfocyta.

Fig. 3 PD-L1 interactions on naive (A) and activated (B) T lymphocyte



czych T zlokalizowanych w ośrodkach rozmnażania oraz negatywnie reguluje ich liczebność i funkcje [71, 72]. Ekspresja ligandów PD-1 na limfocytach B oraz ekspresja PD-1 na limfocytach ma znaczenie w regulacji tworzenia się komórek plazmatycznych oraz limfocytów B pamięci, podczas gdy ekspresja PD-1 na limfocytach B może wpływać na powstawanie komórek pamięci oraz plazmacytów w szpiku kostnym, ale nie śledzienie [71].

Szczególną funkcję wydaje się pełnić rozpuszczalna izoforma PD-1, powstająca z wariantu obróbkowego mRNA pozbawionego domeny 3 kodującej domenę transbłonową [8]. U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów stwierdzono w osoczu pierwotnie nieznaną autoprzeciwciała przeciwko PD-L1, stymulujące proliferację limfocytów CD4 pozytywnych, które zostało zidentyfikowane jako rozpuszczalna izoforma PD-1, obecna także w mazi stawowej [73, 74]. Podwyższona ekspresja w osoczu rozpuszczalnej formy PD-1 została opisana u chorych na niedokrwistość anaplastyczną, przy jednoczesnej zwiększonej proliferacji limfocytów T [75]. Wyniki te sugerują funkcję rozpuszczalnej formy PD-1 jako potencjalnego inhibitora szlaku sygnałowego PD-1 poprzez konkurencję z błonową izoformą w wiązaniu ligandów, co zmniejsza kontrolę tego szlaku nad proliferacją limfocytów.

Podczas badań na ligandami receptora PD-1 wykazano, że są one w stanie nie tylko indukować sygnał hamujący funkcję limfocytów T, ale także promować aktywację i proliferację limfocytów T w początkowej fazie aktywacji [29]. Stymulacyjny efekt nie jest związany z oddziaływaniem z CD80, które ma wpływ hamujący poprzez wiązanie PD-L1, ale z niezidentyfikowanymi receptorami [45, 46, 76, 77]. Stymulacyjny efekt PD-L1 szczególnie odnosi się do limfocytów pomocniczych [78]. Dwoistość efektu wywołanego przez PD-L1 została pokazana u pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, gdzie wiązanie PD-L1 przez antagonistyczne przeciwciała stymulowało aktywację i proliferację spoczynkowych limfocytów T, zwiększało produkcję cytokin oraz nasilało apoptozę aktywowanych limfocytów T poprzez aktywację kaspazy 3 oraz ekspresję TRAIL [73]. W przypadku PD-L2 wykazano, że komórki dendrytyczne pozbawione tej glikoproteiny słabiej stymulują limfocyty CD4, co również może wskazywać na istnienie niezależnego od PD-1 receptora dla tego ligandu [30, 79]. Zróznicowanie wpływu PD-L1 i PD-L2 na limfocyty wydaje się być uzasadnione ze względu na rozłożenie w czasie regulacji odpowiedzi immunologicznej. Zainicjowanie aktywacji limfocytów skutkuje indukcją ekspresji powierzchniowego receptora

PD-1, co w efekcie prowadzi do hamowania funkcji i proliferacji limfocytów dopiero w późniejszym etapie odpowiedzi immunologicznej (Ryc. 3).

Szlak sygnałowy PD-1/PD-L jako potencjalny mechanizm ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego

Komórki nowotworowe w celu przeżycia potrafią wykształcać mechanizmy zapobiegające rozpoznaniu przez elementy układu odpornościowego. Wykazują również zdolność do modulowania własnego mikrośrodowiska oraz własnego fenotypu poprzez ekspresję elementów rozpuszczalnych i powierzchniowych, w celu hamowania funkcji komórek efektorowych [80]. Oddziaływanie receptora PD-1 z jego ligandami jest przykładem takiego mechanizmu ucieczki komórek nowotworowych przed układem immunologicznym poprzez nasilenie negatywnego sygnału przekazywanego do limfocytów naciekających guz upośledzającego ich funkcję [16, 81, 82]. Cechą wyróżniającą PD-1 w porównaniu z innymi cząsteczkami kostymulującymi z rodziny CD28 jest zakres ekspresji jego ligandów. Podczas gdy ligandy dla CTLA-4, również negatywnego immunoreceptora, ulegają ekspresji jedynie na komórkach dendrytycznych, monocytach i limfocytach B, to ekspresja dla PD-L1 jest dużo powszechniejsza, co wskazuje na jego szerokie znaczenie w modulacji odpowiedzi immunologicznej [16, 83]. Dodatkowo, mając na uwadze możliwość indukcji ekspresji PD-L1, wykonano wiele badań określających ekspresję ligandów PD-1 w komórkach nowotworowych [35]. Zaobserwowano ekspresję PD-L1 w wielu ludzkich nowotworach, takich jak: rak płuc, prostaty, okrężnicy, żołądka, nerki, piersi, pęcherza, nowotworach głowy i szyi oraz komórkach glioblastomy i czerniaka [34, 83, 84]. Obecność obu ligandów opisano w raku przełyku, trzustki i jajnika, co w przypadku PD-L1 stanowiło negatywną wartość prognostyczną w tych grupach chorych [85–87]. Wykazano, że wysoka ekspresja PD-L1 na komórkach raka nerki lub limfocytach T naciekających albo obu jednocześnie wiązała się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby oraz ponad czterokrotnie większym ryzykiem zgonu nią spowodowanego [88]. Zaobserwowano, że podwyższona ekspresja PD-1 na limfocytach naciekających komórki raka nerki wiąże się również z negatywnym rokowaniem dla pacjentów [89]. Podobną zależność przeżycia od ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych wykazano w raku jajnika, gdzie dodatkowo podwyższona ekspresja PD-L1 negatywnie korelowała z ilością limfocytów T CD8+ w jajniku [86]. Poza hamowaniem limfocytów T w nowotworach z ekspresją PD-L1 wykazano zwiększoną oporność na apoptozę tych komórek w momen-

cie wiązania się z limfocytami naciekającymi na zmiany neoplastyczne, co wskazuje na dodatkowy mechanizm zwiększający przeżycie komórek nowotworowych wykorzystujący szlak PD-1/PD-L [90]. Doświadczenia na modelach zwierzęcych pozwoliły zaobserwować osłabienie kontroli układu immunologicznego nad rozrostem nowotworów w przypadku nadekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych oraz indukcję apoptozy limfocytów specyficznych do komórek rakowych [81, 83].

Mechanizm, w jaki komórki nowotworowe modulują własną ekspresję PD-L1 bądź ekspresję PD-1 na limfocytach efektorowych, pozostaje niezidentyfikowany. W warunkach *in vitro* ekspresja PD-L1 ulega indukcji pod wpływem interferonu typu I (α , β) i II (γ), jak i w mniejszym stopniu TNF- α [33, 34, 83]. Ekspresja PD-L1 na komórkach nowotworowych świeżo pobranych *ex vivo* jest zdecydowanie większa niż na komórkach hodowanych *in vitro*, co ze względu na wpływ cytokin może sugerować, że mikrośrodowisko nowotworu ma wpływ na kształtowanie ekspresji elementów szlaku PD-1/PD-L [83, 91].

Charakterystyka PD-1, PD-L1 i PD-L2 w nowotworach hematologicznych

Zagadnienie ekspresji PD-1 oraz jego ligandów w nowotworach hematologicznych w przeciwieństwie do nowotworów litych i innych rodzajów tkanek jest stosunkowo słabo zbadane. Jednakże pojawiają się doniesienia wskazujące na istotną rolę szlaku PD-1/PD-L także w chorobach układu krwiotwórczego oraz na potencjalne znaczenie tego szlaku w ucieczce komórek tych nowotworów spod nadzoru układu immunologicznego. Początkowe obserwacje stwierdziły ekspresję PD-1 w obrębie migdałków na limfocytach pomocniczych T zlokalizowanych w jasnej strefie ośrodków rozmnażania [72, 92, 93]. W badaniach immunohistochemicznych PD-1 został zidentyfikowany na limfocytach CD4+CD25- w szeregu przypadków chłoniaków niezziarniczych (NHL; *non-Hodgkin lymphoma*) [94]. Dodatkowo zastosowanie przeciwciała przeciwko PD-L1 skutkowało częściowym przywróceniem potencjału proliferacyjnego tych komórek przy hodowli z dodatkiem limfocytów nowotworowych [94]. Także w przypadku białaczki/chłoniaka T-komórkowego dorosłych stwierdzono podwyższoną ekspresję PD-1 na normalnych i białaczkowych limfocytach pomocniczych, a blokowanie szlaku PD-1/PD-L1 przywracało produkcję cytokin [95]. U chorych na chłoniaka Hodgkina (HL; *Hodgkin's lymphoma*; ziarnica złośliwa) zaobserwowano zwiększoną ekspresję PD-1 wobec osób zdrowych, ale u pacjentów chorych na NHL zależności takiej nie zaobserwowano [96]. U pacjentów z HL poziom PD-1 był podwyższony zarówno na limfocytach T obwodo-

wych, jak i związanych z nowotworem w porównaniu z osobami zdrowymi, a blokowanie PD-1 przywracało produkcję IFN- γ przez te ostatnie [96]. Stwierdzono także ekspresję PD-L na komórkach Reed-Sternberga [96]. Roncador i wsp. [93] pokazali ekspresję PD-1 w angioimmunoblastycznym chłoniaku T-komórkowym (AITL). Przekrojowe immunohistochemiczne i cytometryczne badanie ekspresji PD-1 i PD-L1 wykonane przez Xerii i wsp. [97] wykazało ekspresję PD-1 jako cechę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL), chłoniaka z małych limfocytów i AITL oraz w mniejszej części próbek chłoniaka grudkowego (FL) i chłoniaka rozlanego dużych komórek B (DLBCL). W próbkach chłoniaka z komórek płaszczą, chłoniaka strefy brzeżnej, Burkitta, anaplastycznego oraz limfoblastycznego nie zaobserwowano ekspresji PD-1 i PD-L1 [97]. Fenotyp komórek HL wykazywał ekspresję PD-L1, bez obecności PD-1 [97]. Jedynym typem białaczki B-komórkowej ze stwierdzoną ekspresją PD-L1 w tym badaniu był DLBCL, jednak w ramach własnych doświadczeń wykazaliśmy, że również na komórkach PBL dochodzi do ekspresji PD-L1 na poziomie transkryptu oraz białka powierzchniowego [97, 98]. Co więcej, ekspresja PD-1 jest na komórkach PBL znacząco statystycznie większa w porównaniu z limfocytami zdrowymi i jest dodatnio regulowana w warunkach naśladujących mikrośrodowisko ośrodków rozmnażania [98].

Znaczenie prognostyczne ekspresji PD-1 wykazano do tej pory jedynie u chorych na FL, jednak uzyskane wyniki są rozbieżne. W badaniach Carreras i wsp. [99] oraz Wahlin i wsp. [100] limfocyty naciekające nowotwór z wysoką ekspresją PD-1 wydłużały przeżycie chorych na FL. Ponadto przypadki transformacji FL w DLBCL wykazały obniżenie poziomu ekspresji PD-1 [99]. Jednak w doświadczeniu Richendollar i wsp. [101] limfocyty PD-1+ naciekające FL stanowią negatywny wskaźnik przeżycia pacjentów. Niejednoznaczność rezultatów może wynikać z odmiennych kryteriów klasyfikacji pacjentów do grupy badanej, postępowania klinicznego oraz innych metod oceny PD-1+ limfocytów T.

Blokowanie szlaku sygnałowego PD-1/PD-L oraz potencjalne znaczenie terapeutyczne

W przypadku przewlekłych infekcji wirusowych PD-1 jest odpowiedzialny za wprowadzanie limfocytów efektorowych w stan wyczerpania [21]. Analogiczną sytuację przewlekłej ekspozycji na antygen, mającą miejsce w przypadku przewlekłych infekcji, można zaobserwować w momencie proliferacji i akumulacji komórek nowotworowych. Istotne jest stwierdzenie podczas przewlekłych infekcji zahamowania szlaku PD-1/PD-L1 poprzez blokowanie PD-L1 i w conse-

kwencji przywrócenie funkcji dotychczas wyczerpanych limfocytów [102]. Ze względu na częstą ekspresję PD-L1 i modulację ekspresji PD-1 w poszczególnych nowotworach szlak PD-1/PD-L stał się obiektem badań mających wskazać potencjalnie korzystne w leczeniu wykorzystanie.

W szeregu doświadczeń na modelach zwierzęcych i ludzkich komórkach wykazano, że blokowanie PD-L1 na komórkach nowotworowych oraz komórkach prezentujących antygeny (komórki dendrytyczne) wpływa korzystnie na immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową, stymuluje komórki efektorowe oraz zapobiega ucieczce spod nadzoru układu odpornościowego [35, 81, 103–105]. W mysim modelu ostrej białaczki szpikowej (AML) blokowanie szlaku PD-L1 skutkowało wydłużeniem przeżycia chorych osobników oraz zmniejszeniem liczby komórek białaczkowych we krwi i innych organach [106]. Również w modelu AML Zhou i wsp. [107] blokowanie PD-L1 w połączeniu z terapią adoptywnym transferem cytotoksycznych limfocytów T zmniejszyło obciążenie chorobą oraz wydłużało przeżycie. W przypadku użycia przeciwciała przeciwko PD-L1 w ludzkich komórkach szpiczaka mnogiego nie uzyskano wstrzymania proliferacji komórek nowotworowych, a jedynie jej wolniejsze tempo [41]. Skuteczna w ograniczeniu wzrostu komórek przerzutowych czerniaka do płuc okazała się terapia genowa z użyciem plazmidu kodujące rozpuszczalną izoformę białka PD-1 [108]. Użycie retrowirusowego wektora przenoszącego siRNA przeciwko PD-1 w mysich liniach komórkowych szpiczaków, mastocytomy oraz czerniaka skutkowało zwiększaniem efektorowych funkcji i proliferacji limfocytów T [109].

Obserwacje przedkliniczne zainicjowały badania kliniczne mające na celu sprawdzenie przydatności humanizowanego przeciwciała anti-PD-1 w terapii przeciwnowotworowej. W badaniu Berger i wsp. [110] w grupie chorych na nowotwory hematologiczne udało się uzyskać całkowitą remisję u chorego na FL oraz stabilizację choroby u dwójki chorych na PBL. Badanie Brahmer i wsp. [111] przeprowadzone na grupie 56 chorych z nowotworami litymi pozwoliło na uzyskanie jednej pełnej i dwóch częściowych odpowiedzi u chorych na czerniaka.

Podsumowanie

Dotychczasowa wiedza na temat biologii, ekspresji, a także funkcji receptora PD-1 oraz jego ligandów potwierdza istotność szlaku PD-1/PD-L w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Szczególnie znaczenie pełni on w zapobieganiu rozwijaniu się zaburzeń autoimmunologicznych poprzez negatywną regulację autoreaktywnych limfocytów. Jednakże coraz więcej wskazuje na zaburzenie funkcjonowania elementów

PD-1/PD-L podczas przedłużających się okresów ekspozycji na antygeny, co ma miejsce w czasie przewlekłych infekcji lub chorobie nowotworowej. Badania prowadzone nad szlakiem PD-1/PD-L w odniesieniu do chorób nowotworowych pokazują, że może być on jednym z istotnych mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego, i pozwalają przypuszczać, że wykorzystanie terapeutyczne tego szlaku będzie wzrastało w przyszłości.

Piśmiennictwo

- van Noort JM, van Sechel A, Boon J, Boersma WJ, Polman CH, Lucas CJ. Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells from both multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Neuroimmunol.* 1993; 46: 67-72.
- Lohmann T, Leslie RD, Londei M. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun.* 1996; 9: 385-389.
- Lafferty KJ, Andrus L, Prowse SJ. Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses. *Immunol Rev.* 1980; 51: 279-314.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 233-258.
- Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 111-135.
- Schwartz RH, Mueller DL, Jenkins MK, Quill H. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989; 54(2): 605-610.
- Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 13866-13871.
- Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol.* 2005; 235: 109-116.
- Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics.* 1994; 23: 704-706.
- Zhang X, Schwartz JC, Guo X, i wsp. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity.* 2004; 20: 337-347.
- Lazar-Molnar E, Almo SC, Nathenson SG. The interchain disulfide linkage is not a prerequisite but enhances CD28 costimulatory function. *Cell Immunol.* 2006; 244: 125-129.
- Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004; 173: 945-954.
- Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009; 229: 114-125.
- Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol.* 2006; 176: 2808-2816.
- Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, i wsp. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996; 8: 765-772.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26: 677-704.
- Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, i wsp. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol.* 2002; 169: 5538-5545.
- Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, i wsp. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol.* 1996; 8: 773-780.
- Nishimura H, Honjo T, Minato N. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J Exp Med.* 2000; 191: 891-898.
- Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, i wsp. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 2706-2716.
- Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med.* 2006; 203: 2223-2227.
- Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, i wsp. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol.* 2008; 181: 6738-6746.
- Polanczyk MJ, Hopke C, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res.* 2006; 84: 370-378.
- Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol.* 2008; 181: 4832-4839.
- Cho HY, Lee SW, Seo SK, Choi IW, Choi I. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1779: 811-819.
- Yao S, Wang S, Zhu Y, i wsp. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood.* 2009; 113: 5811-5818.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, i wsp. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192: 1027-1034.
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, i wsp. PD-L2 is a se-

- cond ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001; 2: 261–268.
29. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999; 5: 1365–1369.
 30. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, i wsp. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001; 193: 839–846.
 31. Lazar-Molnar E, Yan Q, Cao E, Ramagopal U, Nathenson SG, Almo SC. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 10483–10488.
 32. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, i wsp. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 307: 672–677.
 33. Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol.* 2002; 169: 3581–3588.
 34. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, i wsp. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002; 84: 57–62.
 35. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, i wsp. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 2003; 170: 1257–1266.
 36. Zhong X, Tumang JR, Gao W, Bai C, Rothstein TL. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 2405–2410.
 37. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 5336–5341.
 38. Lee SJ, Jang BC, Lee SW, i wsp. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* 2006; 580: 755–762.
 39. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, i wsp. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 20852–20857.
 40. Gong AY, Zhou R, Hu G, i wsp. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes. *J Immunol.* 2009; 182: 1325–1333.
 41. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, i wsp. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 2007; 110: 296–304.
 42. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, i wsp. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* 2007; 13: 84–88.
 43. Zhang X, Lewkowich IP, Kohl G, Clark JR, Wills-Karp M, Kohl J. A protective role for C5a in the development of allergic asthma associated with altered levels of B7-H1 and B7-DC on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2009; 182: 5123–5130.
 44. Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, i wsp. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol.* 2010; 22: 651–660.
 45. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007; 27: 111–122.
 46. Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol.* 2008; 45: 3567–3572.
 47. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, i wsp. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 9543–9553.
 48. Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 544–556.
 49. Blair PJ, Riley JL, Levine BL, i wsp. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol.* 1998; 160: 12–15.
 50. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, i wsp. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 2004; 574: 37–41.
 51. Carter L, Fouser LA, Jussif J, i wsp. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 634–643.
 52. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, i wsp. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 2003; 170: 711–718.
 53. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992; 11: 3887–3895.
 54. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999; 11: 141–151.
 55. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, i wsp. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science.* 2001; 291: 319–322.
 56. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995; 3: 541–547.
 57. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, i wsp. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science.* 1995; 270: 985–988.

58. Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol*. 1998; 10: 1563–1572.
59. Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, i wsp. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med*. 2003; 198: 63–69.
60. Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol*. 2007; 179: 5064–5070.
61. Blank C, Brown I, Marks R, Nishimura H, Honjo T, Gajewski TF. Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells. *J Immunol*. 2003; 171: 4574–4581.
62. Thangavelu G, Parkman JC, Ewen CL, Uwiera RR, Baldwin TA, Anderson CC. Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis. *J Autoimmun*. 2011; 36: 301–312.
63. Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity*. 2005; 22: 385–396.
64. Trabattoni D, Saresella M, Biasin M, i wsp. B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood*. 2003; 101: 2514–2520.
65. Keir ME, Liang SC, Guleria I, i wsp. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006; 203: 883–895.
66. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol*. 2005; 6: 280–286.
67. Rodig N, Ryan T, Allen JA, i wsp. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 3117–3126.
68. Grabie N, Gotsman I, DaCosta R, i wsp. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart. *Circulation*. 2007; 116: 2062–2071.
69. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25+ regulatory cells from human peripheral blood express very high levels of CD25 ex vivo. *Novartis Found Symp*. 2003; 252: 67–88; discussion 88–91, 106–114.
70. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, i wsp. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009; 206: 3015–3029.
71. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010; 11: 535–542.
72. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, i wsp. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*. 2004; 173: 68–78.
73. Dong H, Strome SE, Matteson EL, i wsp. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2003; 111: 363–370.
74. Wan B, Nie H, Liu A, i wsp. Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2006; 177: 8844–8850.
75. Wu H, Miao M, Zhang G, Hu Y, Ming Z, Zhang X. Soluble PD-1 is associated with aberrant regulation of T cells activation in aplastic anemia. *Immunol Invest*. 2009; 38: 408–421.
76. Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med*. 2003; 197: 1083–1091.
77. Saudemont A, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood*. 2005; 105: 2428–2435.
78. Tamura H, Dong H, Zhu G, i wsp. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*. 2001; 97: 1809–1816.
79. Shin T, Yoshimura K, Crafton EB, i wsp. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2005; 201: 1531–1541.
80. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331: 1565–1570.
81. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 12293–12297.
82. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54: 307–314.
83. Dong H, Strome SE, Salomao DR, i wsp. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002; 8: 793–800.
84. Zang X, Allison JP. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 5271–5279.
85. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, i wsp. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 2947–2953.

86. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, i wsp. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 3360–3365.
87. Nomi T, Sho M, Akahori T, i wsp. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2151–2157.
88. Thompson RH, Gillett MD, Chevillat JC, i wsp. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 17174–17179.
89. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, i wsp. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 1757–1761.
90. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood*. 2008; 111: 3635–3643.
91. Blank C, Brown I, Peterson AC, i wsp. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2004; 64: 1140–1145.
92. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30: 802–810.
93. Roncador G, Garcia Verdes-Montenegro JF, Tedoldi S, i wsp. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007; 92: 1059–1066.
94. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006; 107: 3639–3646.
95. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, i wsp. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer*. 2007; 121: 2585–2590.
96. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, i wsp. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008; 111: 3220–3224.
97. Xerri L, Chetaille B, Serriari N, i wsp. Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol*. 2008; 39: 1050–1058.
98. Grzywnowicz M, Zaleska J, Mertens D, i wsp. Programmed death-1 and its ligand are novel immunotolerant molecules expressed on leukemic B cells in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2012; 7 in press.
99. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, i wsp. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1470–1476.
100. Wahlin BE, Aggarwal M, Montes-Moreno S, i wsp. A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1 – positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 637–650.
101. Richendollar BG, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. Follicular programmed death 1-positive lymphocytes in the tumor microenvironment are an independent prognostic factor in follicular lymphoma. *Hum Pathol*. 2011; 42: 552–557.
102. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, i wsp. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006; 439: 682–687.
103. Curiel TJ, Wei S, Dong H, i wsp. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. 2003; 9: 562–567.
104. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, i wsp. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*. 2005; 65: 1089–1096.
105. Blank C, Kuball J, Voelkl S, i wsp. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer*. 2006; 119: 317–327.
106. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood*. 2009; 114: 1545–1552.
107. Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, i wsp. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010; 116: 2484–2493.
108. Geng H, Zhang GM, Xiao H, i wsp. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 2006; 118: 2657–2664.
109. Borkner L, Kaiser A, van de Kastele W, i wsp. RNA interference targeting programmed death receptor-1 improves immune functions of tumor-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59: 1173–1183.
110. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, i wsp. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 3044–3051.
111. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, i wsp. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3167–3175.