

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα : «Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής»

ΜΕΡΟΣ Α : «Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα PD-1 στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής»

ΜΕΡΟΣ Β : «Μελέτη βιολογικών λειτουργιών με την Μοριακή Τομογραφία Φθορισμού»

Επιβλέπουσα ερευνήτρια : Μαμαλάκη Κλειώ
Υπεύθυνος καθηγητής : Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ

Οικονομάκη Αικατερίνη

Ηράκλειο 2008

Περιεχόμενα

Abstract	2
Περίληψη	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Μέρος Α	
1.1 Ανοχή των CD8 ⁺ Τ λεμφοκυττάρων.....	4
1.2 Ο ρόλος της οικογένειας των B7/CD28 αλληλεπιδράσεων στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής.....	5
1.3 Δομή και έκφραση του PD-1 και των προσδετών του PD-L1 και PD-L2.....	7
1.4 Σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα PD-1.....	8
1.5 Ο ρόλος του υποδοχέα PD-1 στην περιφερική ανοχή των Τ λεμφοκυττάρων.....	9
2. Μέρος Β	
1.6 Μελέτη βιολογικών λειτουργιών με την μέθοδο μοριακής τομογραφίας φθορισμού.....	12
ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	
1.1 Διαγονιδιακά ποντίκια.....	14
1.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	14
1.3 Σήμανση των σπληνοκυττάρων με CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester).....	14
1.4 Χρώση με αντισώματα.....	14
1.5 In vitro πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων.....	15
1.6 Μεταφορά κυττάρων και in vivo πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων.....	15
1.7 Ενδοκυττάρια ανίχνευση παραγωγής TNF-α.....	15
1.8 Προετοιμασία των ποντικών για απεικόνιση με την Φθορίζουσα Μοριακή Τομογραφία.....	16
1.9 Μετρήσεις με την μέθοδο της Φθορίζουσας Μοριακής Τομογραφίας.....	16
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Μέρος Α	
1.1 Ο ρόλος του PD-1 στην κλωνική απαλοιφή των F531 CD8 Τ λεμφοκυττάρων.....	17
1.2 Ο ρόλος του PD-1/- στην διατήρηση της ανέργειας και της περιφερικής ανοχής των CD8 ⁺ λεμφοκυττάρων.....	19
1.3 Ο ρόλος του PD-1 στην παραγωγή κυτοκινών από τα F531PD-1/- κύτταρα.....	25
1.4 Ο ρόλος του PD-1 στον πολλαπλασιασμό των αδών F5 λεμφοκυττάρων.....	27
2. Μέρος Β	
2.1 Χρήση της Μοριακής Τομογραφίας Φθορισμού για την μελέτη οργάνων του ανοσοποιητικού.....	34
2.2 Μελέτη της δυνατότητας απεικόνισης σε μεγάλο βάθος με την μέθοδο Μοριακής Τομογραφίας Φθορισμού.....	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
Βιβλιογραφία	41

Abstract

The balance between stimulatory and inhibitory signals is required for effective immune responses to pathogens and for maintaining self-tolerance. Signals through the B7/CD28 family are major regulators of this critical balance, because the pathways in the B7/CD28 family provide second signals that can regulate the activation, inhibition, and fine-tuning of T-cell responses. To the B7/CD28 family of interactions also belong the PD-1/PD-L interactions. The PD-1 receptor is inducibly expressed on T cells after their activation and delivers inhibitory signals to them. Purpose of this research is to study the role of PD-1 in the induction and maintenance of the tolerance of the CD8 T cells. In the transgenic animal that is used the CD8 T cells express a transgenic TCR receptor (F5) which specifically recognizes the NP 366-374 protein of the influenza virus. In the same animal is also expressed the NP 366-374 protein as a self antigen. As a result the F5 T cells encounter the antigen during the development of the animal and recognize it as a normal self antigen. Therefore in the peripheral lymphoid organs F5 T cells are tolerized either by clonal deletion or anergy. In this transgenic model it is possible to follow the fate of CD8 T cell responses to self antigens in the absence and presence of PD-1 receptor.

Περίληψη

Πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση της περιφερικής ανοχής σε έναν οργανισμό παίζουν μεταξύ των άλλων και οι μη ειδικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα η ισοροπία της σηματοδότησης στα T λεμφοκύτταρα μέσω των B7/CD28 αλληλεπιδράσεων συμβάλλει στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των T λεμφοκυττάρων και επομένως στην διατήρηση ή διαταραχή της περιφερικής ανοχής. Στην κατηγορία των B7/CD28 αλληλεπιδράσεων ανήκει και η PD-1/PD-L1 αλληλεπίδραση. Ο υποδοχέας PD-1 εκφράζεται στα T λεμφοκύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους και έχει παρατηρηθεί ότι κατά την αλληλεπίδραση του με τους προσδέτες του μετάγει κατασταλτικά σήματα στα T λεμφοκύτταρα κάτι που παίζει βασικό ρόλο στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου του PD-1 υποδοχέα στην δημιουργία και διατήρηση της περιφερικής ανοχής των CD8 T λεμφοκυττάρων σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο στο οποίο τα CD8 T λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ανέργειας. Συγκεκριμένα στο μοντέλο αυτό εκφράζεται ο F5 TCR υποδοχέας στα CD8 T λεμφοκύτταρα, οποίος αναγνωρίζει την NP 366-374 νουκλεοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης. Η πρωτεΐνη NP εκφράζεται ενδογενώς ως αντιγόνο εαυτού στο ίδιο ζώο. Σε αυτό το διαγονιδιακό μοντέλο τα F5 κύτταρα έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο (πρωτεΐνη NP) κατά την ανάπτυξη του ζώου με αποτέλεσμα να την αναγνωρίζουν ως αντιγόνο εαυτού και να έχουν υποστεί κλωνική απαλοιφή ή να έχουν καταστεί άνεργα. Έτσι στο διαγονιδιακό αυτό ποντίκι έχουμε την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε τις αποκρίσεις των ανέργων CD8 T λεμφοκυττάρων παρουσία και απουσία του υποδοχέα PD-1 στα αντιγόνα του εαυτού.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α

1.1 Ανοχή των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων

Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι απαραίτητη για την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε παθογόνους μικροοργανισμούς και σε σήματα κινδύνου όπως είναι τα υπολείμματα από νεκρωτικά κύτταρα. Εξ' ίσου σημαντική διαδικασία όμως είναι και η επαναφορά του ανοσοποιητικού συστήματος στην αρχική του κατάσταση καθώς επίσης και η απομάκρυνση ή απενεργοποίηση των κυττάρων που θα μπορούσαν να επιτεθούν σε ιστούς του ίδιου του οργανισμού. Τέτοια κύτταρα ονομάζονται αυτοδραστικά και περιορίζονται είτε μέσω των μηχανισμών της κεντρικής ανοχής στο θύμο είτε μέσω μηχανισμών περιφερικής ανοχής στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Η καταστροφή των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων είναι μια σημαντική διαδικασία κατά την ανάπτυξη τους στο θύμο. Συγκεκριμένα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μυελικής προέλευσης όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν στα θυμοκύτταρα ενδογενή ή εξωγενή αντιγόνα σε σύμπλοκο με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας. Στην κεντρική ανοχή φαίνεται επίσης να παίζουν σημαντικό ρόλο και τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου τα οποία εκφράζουν εκτοπικά ενδογενή αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στα T λεμφοκύτταρα. Τα ανώριμα T λεμφοκύτταρα που εμφανίζουν ισχυρή συγγένεια με αυτά τα αντιγόνα καταστρέφονται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αρνητική επιλογή. Παρ' όλα αυτά όμως κάποια T λεμφοκύτταρα που εμφανίζουν ασθενέστερη συγγένεια στα ενδογενή αντιγόνα μπορεί να ξεφύγουν από την αρνητική επιλογή στο θύμο με αποτέλεσμα να επιβιώσουν και να εγκατασταθούν στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Εκεί τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συνεχίζουν να παρουσιάζουν ενδογενή και εξωγενή αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα. (Janeway et al., 2004)

Έχουν λοιπόν αναπτυχθεί κάποιοι μηχανισμοί προκειμένου να περιοριστούν τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα στα περιφερικά λεμφικά όργανα και να διατηρηθεί η αυτοανοχή. Συγκεκριμένα είναι πιθανό τα T λεμφοκύτταρα λόγω χαμηλής συγγένειας με το αντιγόνο να το αγνοήσουν και να μην ενεργοποιηθούν. Βέβαια κάποια στιγμή στη ζωή ενός οργανισμού τέτοια αντιγόνα μπορεί να πάψουν να αγνοούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα να διακοπεί η ανοχή, να αποκριθούν τα T λεμφοκύτταρα και να επιτεθούν στον ίδιο τον οργανισμό.

Άλλοι δυο μηχανισμοί περιορισμού των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων της περιφέρειας είναι η ανέργεια και η κλωνική απαλοιφή. Πολύ σημαντικό ρόλο στην επίτευξη και διατήρηση της ανέργειας ή της κλωνικής απαλοιφής παίζει η ποσότητα και η συχνότητα έκθεσης του οργανισμού σε κάποιο αντιγόνο καθώς επίσης και η ισχύς της αλληλεπίδρασης του TCR υποδοχέα των λεμφοκυττάρων με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC. Έχει προταθεί λοιπόν ένα μοντέλο σε ότι αφορά την κλωνική απαλοιφή και την ανέργεια των T λεμφοκυττάρων. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό όταν η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον υποδοχέα TCR του λεμφοκυττάρου και το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC είναι ασθενής τότε τα T

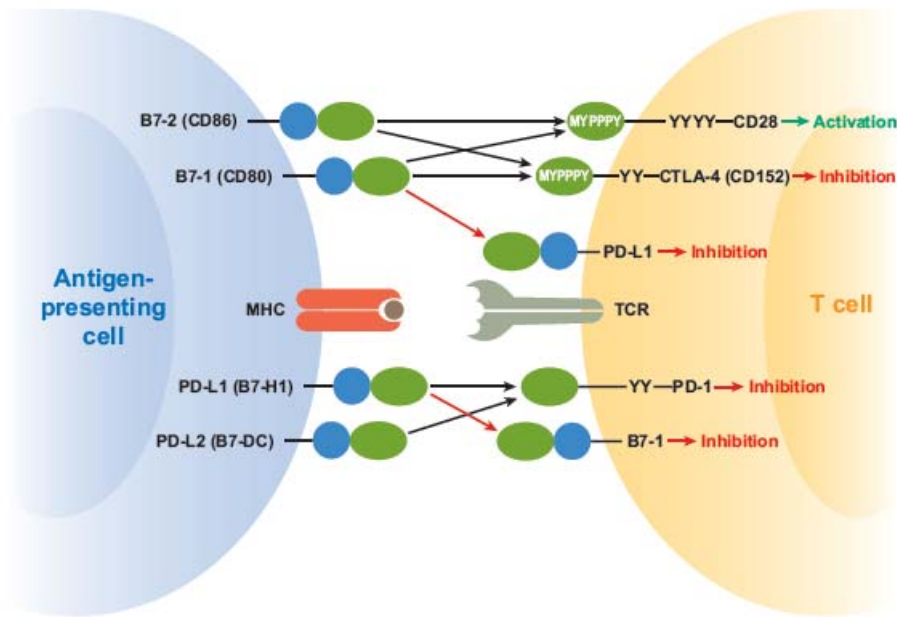
λεμφοκύτταρα υπόκεινται σε κλωνική απαλοιφή. Αντιθέτως όταν η συγγένεια του TCR υποδοχέα για το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC είναι ισχυρή ενεργοποιείται διαφορετικός μοριακός μηχανισμός ο οποίος οδηγεί τα T λεμφοκύτταρα σε ανενεργή κατάσταση. Βασική προϋπόθεση και των δυο μηχανισμών είναι το γεγονός ότι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα βρίσκονται σε μη ενεργή κατάσταση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι αντιγονοπαρουσιαστές να εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα τα συνδιεγερτικά μόρια που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων κατά την αλληλεπίδραση του TCR με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC. (Redmond et al., 2005)

1.2 Ο ρόλος της οικογένειας των B7/CD28 αλληλεπιδράσεων στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής.

Για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων έχει προταθεί ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο τα T λεμφοκύτταρα για να ενεργοποιηθούν χρειάζεται να λάβουν δύο σήματα, ένα ειδικό και ένα μη ειδικό. Το ειδικό σήμα μεταδίδεται μέσω της αλληλεπίδρασης του TCR υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων με το σύμπλοκο MHC-πεπτιδίδιο στους αντιγονοπαρουσιαστές ή στα κύτταρα των ιστών και προσδίδει εξειδίκευση στην ανοσολογική απάντηση. Το μη ειδικό σήμα μεταδίδεται στα T λεμφοκύτταρα κυρίως μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων για την διέγερση του κλωνικού πολλαπλασιασμού, της παραγωγής κυττοκινών και της κυτολυτικής ικανότητας των T λεμφοκυττάρων καθώς επίσης και της διακοπής της ανοσολογικής απόκρισης. Αυτά τα δεύτερα σήματα μπορεί να είναι είτε διεγερτικά είτε κατασταλτικά. Τόσο λοιπόν η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων όσο και η διατήρηση της περιφερικής ανοχής ελέγχονται από αυτά τα μη ειδικά σήματα.

Η οικογένεια των B7/CD28 επιφανειακών μορίων παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και την διατήρηση της περιφερικής ανοχής μέσω των μη ειδικών σημάτων ενεργοποίησης ή καταστολής που μεταδίδει στα T λεμφοκύτταρα. Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα μόρια της παραπάνω οικογένειας αποτελούν οι B7-1 και B7-2 προσδέτες που εκφράζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και έχουν κοινούς τους CD28 και CTLA-4 υποδοχείς στα T λεμφοκύτταρα. Η ισορροπία ανάμεσα στα θετικά και αρνητικά σήματα που μεταδίδονται στα T λεμφοκύτταρα μέσω των CD28 και CTLA-4 υποδοχέων αντίστοιχα φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των T λεμφοκυττάρων (Walker et al., 2002). Ακόμη ένα μέλος της οικογένειας αυτής που φαίνεται να παίζει ρόλο στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής είναι και ο υποδοχέας PD-1. Συγκεκριμένα ο PD-1 υποδοχέας μεταφέρει κατασταλτικά σήματα στα T λεμφοκύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης του με τους προσδέτες του PD-L1 και PD-L2 (Freeman et al., 2000). Το γονίδιο του PD-1 έχει 23% ομολογία με του CTLA-4 αλλά το PD-1 μόριο εκφράζεται μόνο μετά την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Επίσης οι προσδέτες του PD-1 εκφράζονται όχι μόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως οι προσδέτες του PD-1 αλλά και σε κύτταρα των ιστών. Γι αυτό και η PD-1/PD-L1 αλληλεπίδραση θα μπορούσε να θεωρηθεί σημαντική για την διατήρηση

της περιφερικής ανοχής κατά την δεύτερη επαφή των T λεμφοκυττάρων με κάποιο αντιγόνο (Freeman et al., 2000). Τέλος μια ακόμη αλληλεπίδραση που βρέθηκε τελευταία είναι εκείνη ανάμεσα στο PD-L1 και B7-1 μόριο (Butte et al., 2007). Και τα δύο αυτά μόρια εκφράζονται και στα T λεμφοκύτταρα και στους αντιγονοπαρουσιαστές και φαίνεται κατά την αλληλεπίδραση τους να μεταφέρουν κατασταλτικά σήματα αμφίδρομα στα κύτταρα από τα οποία εκφράζονται. Η ισορροπία των διεγερτικών και κατασταλτικών σημάτων που μεταγόνται μέσω αυτών των μορίων είναι μεγάλης σημασίας για την ικανότητα των T λεμφοκυττάρων να αποκριθούν σε ένα αντιγόνο ή να μείνουν άνεργα. (εικόνα 1)

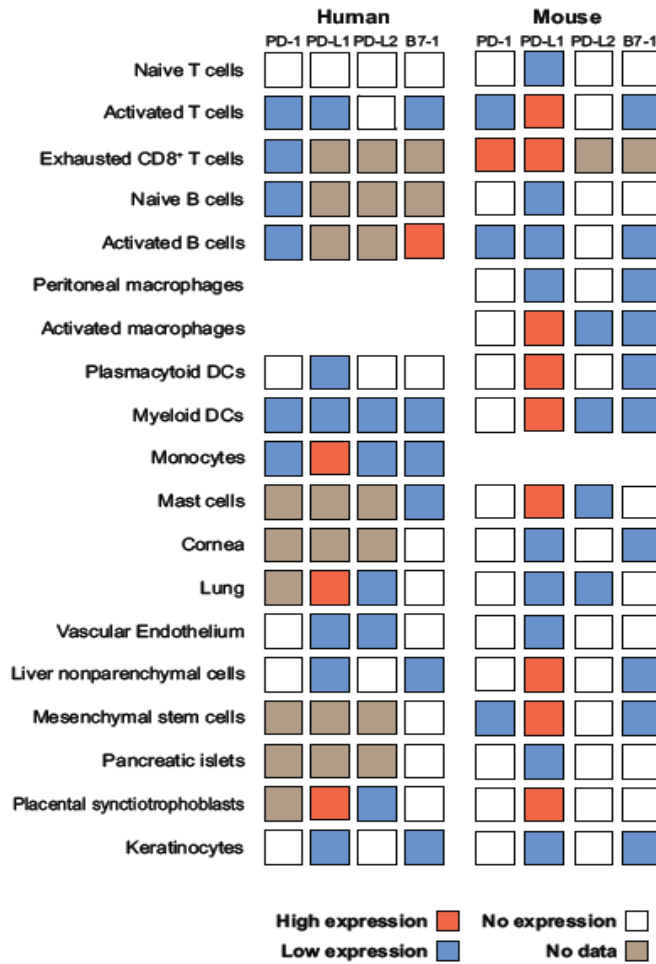


Εικόνα 1: Αλληλεπιδράσεις των μορίων της B7/CD28 οικογένειας. Τα B7-1 και B7-2 μόρια κατά την αλληλεπίδραση τους με το CD28 μεταφέρουν διεγερτικά σήματα στα T λεμφοκύτταρα ενώ κατά την αλληλεπίδραση τους με το CTLA-4 μεταφέρουν κατασταλτικά σήματα στα T λεμφοκύτταρα. Ο PD-1 των T λεμφοκυττάρων αλληλεπιδρά με τους PD-L1/2 των αντιγονοπαρουσιαστών και μεταφέρει κατασταλτικά σήματα στα T λεμφοκύτταρα. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε επίσης ότι το B7-1 μόριο των T λεμφοκυττάρων αλληλεπιδρά με το PD-L1 των αντιγονοπαρουσιαστών και μεταφέρονται αμφίδρομα κατασταλτικά σήματα. Οι IgV περιοχές απεικονίζονται με μπλε, οι IgC περιοχές με πράσινο και οι περιοχές που περιέχουν μοτίβα πλούσια σε τυροσίνη με Υ (Keir et al., Annu. Rev. Immunol., 2007)

1.3 Δομή και έκφραση του PD-1 και των προσδετών του PD-L1 και PD-L2

Ο υποδοχέας PD-1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που αποτελείται από μια εξωκυττάρια IgV περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και από μια ενδοκυττάρια περιοχή που περιέχει ένα ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based switch motif) και ένα ITSM (Immunoreceptor tyrosine switch motif) μοτίβο. Το γονίδιο του PD-1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *Pdcd1* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στα ποντίκια και στο χρωμόσωμα 2 στους ανθρώπους. Έχουν επίσης βρεθεί και εκκρινόμενες ισομορφές του PD-1. Το PD-1 μόριο εκφράζεται επαγόμενα στα T λεμφοκύτταρα μετά την αντιγονική τους διέγερση, στα NK T λεμφοκύτταρα, στα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα (εικόνα 2).

Οι προσδέτες του PD-1 είναι οι PD-L1 και PD-L2 και είναι επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I, οι οποίες αποτελούνται από μια εξωκυττάρια IgV και μια IgC περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια πολύ συντηρημένη ενδοκυττάρια περιοχή. Παρ' όλο που ο βαθμός συντήρησης των ενδοκυττάριας περιοχών των PD-L1 και PD-L2 είναι πολύ υψηλός ανάμεσα στα είδη που έχουν συγκριθεί δεν έχει βρεθεί να περιέχουν κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο και δεν έχει περιγραφεί ως τώρα κάποια συγκεκριμένη λειτουργία αυτής της κυτταροπλασματικής ουράς. Ο PD-L1 προσδέτης κωδικοποιείται από το γονίδιο *Cd274* και ο PD-L2 από το *Pdcd1lg2*. Και τα δυο γονίδια βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα που είναι το 19 για το ποντίκι και το 9 για τον άνθρωπο. Οι δυο προσδέτες διαφέρουν στο προφίλ έκφρασης τους. Συγκεκριμένα ο PD-L1 εκφράζεται συστατικά στο ποντίκι στα T και στα B λεμφοκύτταρα, στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και σε διάφορους ιστούς ενώ ο PD-L2 εκφράζεται επαγόμενα στα δενδριτικά, στα μακροφάγα και στα ιστιοκύτταρα.

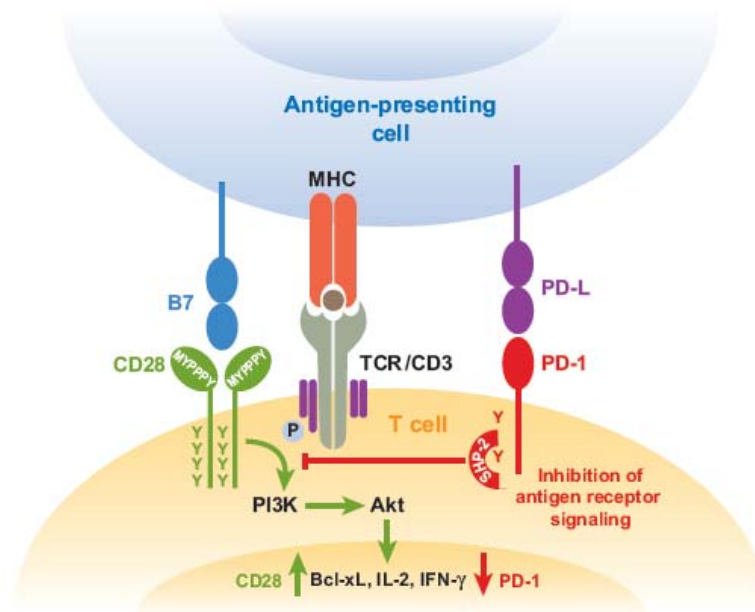


Εικόνα 2: Έκφραση των PD-1, PD-L1, PD-L2 και B7-1 στον άνθρωπο και στο ποντίκι. (Keir et al., Annu. Rev. Immunol., 2007)

1.4 Σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα PD-1.

Μετά την αλληλεπίδραση του TCR υποδοχέα με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC, ο PD-1 υποδοχέας στρατολογείται στο σημείο της σύναψης και αλληλεπιδρά με τους προσδέτες του. Στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται τα κατάλοιπα τυροσίνης των ITSM και ITIM μοτίβων του και στρατολογούνται οι SHP-1 και SHP-2 φωσφατάσες. Αυτές με την σειρά τους αποφωσφορυλιώνουν κάποια ενδιάμεσα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού του TCR, όπως το PI3K, και καταστέλλουν την έκφραση των φλεγμονωδών κυττοκινών IFN- γ , TNF- α και IL-2. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι το μονοπάτι του PD-1 μπορεί να καταστείλει και την έκφραση μορίων που προωθούν την επιβίωση του κυττάρου όπως είναι η πρωτεΐνη Bcl-xL. (εικόνα 3) Απουσία του ITSM μοτίβου είναι αδύνατη η

μετάδοση κατασταλτικών σημάτων μέσω του PD-1 υποδοχέα. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι η SHP-2 φωσφατάση αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την ενδοκυττάρια περιοχή του PD-1 υποδοχέα και είναι πιθανό να παίζει σημαντικότερο ρόλο στη μεταγωγή σημάτων. Οι PD-L1 και PD-L2 προσδέτες είναι πιθανό κατά την αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα PD-1 να επηρεάζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μεταδίδοντας κατασταλτικά σήματα και προς τα κύτταρα που εκφράζουν τα δυο αυτά μόρια. (Keir et al., 2007)



Εικόνα 3: Η σηματοδότηση του PD-1 κατά την αλληλεπίδρασή του με τους προσδέτες του οδηγεί σε καταστολή του σήματος που μεταδίδεται μέσω αλληλεπίδρασης του TCR με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC.

1.5 Ο ρόλος του υποδοχέα PD-1 στην περιφερική ανοχή των T λεμφοκυττάρων

Το PD-1/PD-L μονοπάτι φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής και στην αποφυγή ιστικής βλάβης ενός οργανισμού από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η πρώτη ένδειξη για αυτό προήλθε από τον φαινότυπο που ανέπτυξαν τα PD-1^{-/-} ποντίκια. Φαίνεται μάλιστα ότι ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο τα ποντίκια αναπτύσσουν διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα κατά την απαλοιφή του *Pdcd1* γονιδίου.

Συγκεκριμένα τα PD-1^{-/-} B6 ποντίκια εμφανίζουν αυθόρμητα και σε μεγάλη ηλικία αυτοάνοση αρθρίτιδα και σπειραματοειδή νεφρίτιδα (Nishimura et al., 1999). Επίσης τα PD-1^{-/-} Balb/c ποντίκια εμφανίζουν αυτοάνοση καρδιομυοπάθεια, η οποία οφείλεται στην παραγωγή αντισωμάτων κατά μιας επιφανειακής πρωτεΐνης του περικαρδίου (Nishimura et al., 2001).

Με αφορμή αυτά μελετήθηκε στη συνέχεια ο ρόλος της PD-1/PD-L1 αλληλεπίδρασης σε μοντέλα ποντικών, τα οποία εμφανίζουν σε κάποιο σημείο της ζωής τους αυθόρμητα κάποιο αυτοάνοσο νόσημα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και το NOD ποντίκι, το οποίο αποκτά σε προχωρημένη ηλικία (30 εβδομάδες) αυτοάνοσο σακχαρώδη διαβήτη. Στο μοντέλο αυτό έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης του PD-L1 στα κύτταρα του παγκρέατος όταν αρχίζει να εμφανίζεται η ασθένεια (Liang et al., 2003). Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της PD-1/PD-L1 αλληλεπίδρασης στην διακοπή της περιφερικής ανοχής και την εξέλιξη της ασθένειας χορηγήθηκαν αντισώματα για τις PD-1 και το PD-L1 πρωτεΐνες σε NOD ποντίκια ηλικίας 4 και 10 εβδομάδων. Παρατηρήθηκε λοιπόν διακοπή της περιφερικής ανοχής που φυσιολογικά έχουν αναπτύξει τα αγρίου τύπου NOD ποντίκια αυτής της ηλικίας, διείσδυση των T λεμφοκυττάρων στο πάγκρεας και τελικά εμφάνιση αυτοάνοσου σακχαρώδη διαβήτη (Ansari et al., 2003). Επίσης σε NOD.PD-1^{-/-} ποντίκια εμφανίζεται πρόωρα αυτοάνοσος σακχαρώδης διαβήτης. Συγκεκριμένα στις 11 εβδομάδες ζωής τους τα ζώα αποκτούν την ασθένεια με 100% διείσδυση και αυξημένη αναλογία CD8/CD4 T λεμφοκυττάρων στο πάγκρεας συγκριτικά με τα αγρίου τύπου NOD ποντίκια (Wang et al., 2005).

Άλλο ένα μοντέλο αυτοάνοσου νοσήματος στο οποίο εξετάστηκε ο ρόλος του PD-1 μορίου στη διατήρηση της περιφερικής ανοχής είναι και το μοντέλο της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE). Έχει αποδειχθεί ότι μετά την ανοσοποίηση των ποντικών με το MOG 33-35 πεπτιδίο μυελίνης και κατά την εξέλιξη της ασθένειας αυξάνεται η έκφραση του PD-1 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και του PD-L1 στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Salama et al., 2003). Παρατηρήθηκε ακόμη ότι κατά την χορήγηση αντισωμάτων για τον PD-1 υποδοχέα μετά την χορήγηση του MOG 33-35 πεπτιδίου τα ποντίκια εμφανίζουν σοβαρότερα συμπτώματα της ασθένειας (Salama et al., 2003). Έχει επίσης μελετηθεί ο ρόλος των PD-L στην εξέλιξη της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας κατά την ανοσοποίηση διαφορετικών σειρών ποντικών με το MOG 33-35 πεπτιδίο μυελίνης. Σε αυτή την μελέτη παρατηρήθηκε ότι κατά την χορήγηση αντισωμάτων για τους προσδέτες του PD-1 αυξάνεται η σοβαρότητα της ασθένειας καθώς επίσης και τα ποσοστά των ζώων που νοσούν. Επίσης παρατηρήθηκε ότι ανάλογα με την αιμομικτική σειρά ποντικών που έχει χρησιμοποιηθεί, διαφορετικός προσδέτης του PD-1 παίζει ρόλο στην συχνότητα της εμφάνισης και την σοβαρότητα της ασθένειας. Η μελέτη αυτή ενισχύει την σημασία του γενετικού υπόβαθρου στην εξέλιξη κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος απουσία του PD-1 υποδοχέα (Zhu et al., 2006).

Όπως έχει αναφερθεί ο PD-L1 προσδέτης εκφράζεται όχι μόνο σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αλλά και σε κύτταρα διαφόρων ιστών. Φαίνεται ότι για να διατηρηθεί η περιφερική ανοχή είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση του PD-1 υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων με τον PD-L1 προσδέτη του στα κύτταρα

των διαφόρων ιστών. Αυτό αποδεικνύεται σε πειράματα όπου κατασκευάστηκαν NOD ποντίκια με χιμαιρικό μυελό των οστών, στα οποία εκφράζεται το PD-L1 μόριο μόνο στους αντιγονοπαρουσιαστές. Τότε παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του PD-L1 από τα κύτταρα αυτά δεν είναι αρκετή για τον περιορισμό της απόκρισης των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την πρόωρη εμφάνιση αυτοάνοσου σακχαρώδους διαβήτη (Keir et al., 2006).

Για την μελέτη του ρόλου του PD-1 στον προσανατολισμό των CD8 T λεμφοκυττάρων προς την ενεργοποίηση τους ή την απόκτηση ανοχής πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταφοράς CD8 T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν ειδικά το HA πεπτίδιο του ιού της γρίπης σε δέκτες που το εκφράζουν ενδογενώς ως αντιγόνο εαυτού. Στο μοντέλο αυτό παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του PD-1 υποδοχέα στις αρχικές διαιρέσεις των CD8 T λεμφοκυττάρων και επίτευξη περιφερικής ανοχής. Όταν όμως χορηγήθηκαν αντισώματα για το PD-1 ή το PD-L1 μόριο τα CD8 T λεμφοκύτταρα αποκρίθηκαν στο αντιγόνο και διαφοροποιήθηκαν προς κύτταρα τελεστές. Η διακοπή δηλαδή της PD-1/PD-L1 αλληλεπίδρασης επηρέασε την κατεύθυνση της διαφοροποίησης τους προς κυτταροτοξικά (Goldberg et al., 2007). Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι κατά την χορήγηση του PD-L1 αντισώματος οι αποκρίσεις των CD8 T λεμφοκυττάρων είναι εντονότερες συγκριτικά με εκείνες κατά την χορήγηση των PD-1 αντισωμάτων. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη και κάποιου άλλου μορίου με το οποίο αλληλεπιδρά το PD-L1. Πράγματι πρόσφατα ανακαλύφθηκε η αλληλεπίδραση του PD-L1 με το B7-1, κατά την οποία μεταφέρονται κατασταλτικά σήματα αμφίδρομα προς τα κύτταρα που εκφράζουν τα μόρια αυτά (Butte et al., 2007). Κατά την χορήγηση λοιπόν αντισωμάτων για τον PD-L1 προσδέτη οι αποκρίσεις του ανοσοποιητικού δεν θα πρέπει να αποδίδονται μόνο στην αλληλεπίδραση του με τον PD-1 υποδοχέα.

Για την μελέτη του ρόλου του PD-1 στην επίτευξη και διατήρηση της περιφερικής ανοχής των CD8 T λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν και άλλα δύο μοντέλα. Στο ένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταφοράς OT-1 CD8 T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν ειδικά το OVA πεπτίδιο σε B6 ποντίκια. Για την επίτευξη της ανέργειας τα ποντίκια δέχτηκαν το OVA πεπτίδιο σε ενέσιμη μορφή. Στο μοντέλο αυτό έχει παρατηρηθεί ότι η παρεμπόδιση της PD-1/PD-L1 αλληλεπίδρασης με την χορήγηση αντισωμάτων οδηγεί σε διακοπή της ανέργειας και έντονο πολλαπλασιασμό των CD8 T λεμφοκυττάρων (Tsushima et al., 2007). Στο άλλο μοντέλο επιτυγχάνεται η περιφερική ανοχή με την μεταφορά OT-1 CD8 T λεμφοκυττάρων σε ποντίκια που εκφράζουν ενδογενώς το OVA πεπτίδιο στο πάγκρεας. Εδώ οι αποκρίσεις των PD-1^{-/-} OT-1 T λεμφοκυττάρων είναι πολύ εντονότερες σε σχέση με του αγρίου τύπου σε ότι αφορά τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή κυττοκινών (Keir et al., 2007). Επιπλέον οι δέκτες των PD-1^{-/-} CD8 T λεμφοκυττάρων εμφανίζουν αυτοάνοσο σακχαρώδη διαβήτη. Όλα αυτά δείχνουν ότι ο PD-1 υποδοχέας παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής καθώς και στην προστασία των ιστών ενός οργανισμού από τις αποκρίσεις των αυτοδραστικών CD8 T λεμφοκυττάρων.

2. ΜΕΡΟΣ Β

2.1 Μελέτη βιολογικών λειτουργιών με την μέθοδο μοριακής τομογραφίας φθορισμού

Τα τελευταία χρόνια η οπτική απεικόνιση μικρών ζώων έχει αρχίσει να αναπτύσσεται και να χρησιμοποιείται για την παρατήρηση πολύπλοκων βιολογικών λειτουργιών όπως είναι η εξάπλωση μιας βακτηριακής ή ιϊκής μόλυνσης, η ανάπτυξη και η εξάπλωση ενός όγκου, η μεταγωγή σημάτων και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ενός οργανισμού. Η *in vivo* απεικόνιση παρέχει επίσης την δυνατότητα μελέτης διάφορων ασθενειών και θεραπειών στους οργανισμούς αυτούς. Είναι δηλαδή εφικτό με αυτές τις μεθόδους να παρακολουθήσει κάποιος την εξέλιξη και εξάπλωση μιας ασθένειας σε συνάρτηση με τον χρόνο χωρίς να είναι απαραίτητο να θυσιάσει το ζώο προκειμένου να μελετήσει τις βιολογικές λειτουργίες που συμβαίνουν κατά την ασθένεια αυτή. Αυτό καθιστά την μέθοδο της οπτικής απεικόνισης ιδανική για την μελέτη φαρμάκων και τις αποκρίσεις ενός οργανισμού σε αυτό. Η οπτική απεικόνιση λοιπόν ενός ζωντανού οργανισμού θα μπορούσαμε να πούμε ότι έχει τις εφαρμογές της τόσο στην βασική έρευνα για την μελέτη βιολογικών λειτουργιών όσο και στην κλινική έρευνα για την μελέτη και καταπολέμηση ασθενειών.

Για την μακροσκοπική απεικόνιση ενός ζωντανού οργανισμού υπάρχουν τρεις βασικές τεχνικές : η απεικόνιση της βιοφωταύγειας, η επίπεδη (*planar*) φθορίζουσα απεικόνιση και η οπτική τομογραφία. Η απεικόνιση της βιοφωταύγειας στηρίζεται στη χρήση ενζύμων που κατά την μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν παράγεται φως. Για παράδειγμα χρησιμοποιούνται διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την λουσιφεράση. Χορηγείται λουσιφερίνη στο ζώο, η οποία οξειδώνεται παρουσία λουσιφεράσης και παράγεται φως. Τα φωτόνια που εκπέμπονται απεικονίζονται από μια ειδική και πολύ ευαίσθητη φωτογραφική μηχανή. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση κάποιου όγκου καθώς και την μελέτη της έκφρασης κάποιου γονιδίου. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έναντι των άλλων είναι το γεγονός ότι η αναλογία του σήματος που εκπέμπεται προς τον "θόρυβο" είναι πολύ υψηλή και επομένως παρέχει μεγαλύτερη εξειδίκευση και λιγότερες παρεμβολές από παράγοντες όπως ο αυτοφθορισμός που παίζει σημαντικό ρόλο στην φθορίζουσα απεικόνιση. Πρόκειται όμως για απεικόνιση της επιφάνειας του οργανισμού κάτι που δεν μπορεί να δώσει ούτε ποσοτικές πληροφορίες ούτε ποιοτικές σε ότι αφορά την ακριβή τοποθέτηση του απεικονιζόμενου γεγονότος (Ntziachristos et al., 2005).

Η επίπεδη (*planar*) φθορίζουσα απεικόνιση έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με την βιοφωταύγεια σε ότι αφορά τις αρχές της απεικόνισης ενός ζωντανού οργανισμού. Είναι δηλαδή πολύ δύσκολο να ποσοτικοποιηθεί γιατί πρόκειται για μια μέθοδο που απεικονίζει επιφανειακά γεγονότα χωρίς να λαμβάνει υπ' όψιν το βάθος του απεικονιζόμενου αντικειμένου. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται φθορίζουσες πρωτεΐνες οι οποίες είτε εισάγονται στον οργανισμό ως ανιχνευτές

είτε εκφράζονται από το ίδιο το διαγονιδιακό ζώο. Οι πρωτεΐνες αυτές διεγείρονται από μια δέσμη φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος και τα φωτόνια που εκπέμπουν δεσμεύονται από μια φωτογραφική μηχανή μεγάλης ευαισθησίας (Ntziachristos et al., 2005).

Στη Φθορίζουσα Μοριακή Τομογραφία χρησιμοποιούνται φθορίζουσες πρωτεΐνες οι οποίες εκτίθενται σε μια δέσμη φωτός από διαφορετικές θέσεις και τα φωτόνια που εκπέμπονται από αυτές τις διαφορετικές θέσεις φωτογραφίζονται από μια υψηλής ευαισθησίας φωτογραφική μηχανή. Η πληροφορία εκπομπής από τις διαφορετικές θέσεις επεξεργάζεται μαθηματικά και στη συνέχεια αναπαρίσταται ως μια εικόνα τριών διαστάσεων. Αυτή η τεχνική παρέχει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης της πληροφορίας. Επίσης είναι δυνατόν να καθοριστεί η θέση και το βάθος στο οποίο απεικονίζεται κάτι. Έχει μελετηθεί λοιπόν με την μέθοδο αυτή η απεικόνιση του θύμου ενός διαγονιδιακού ποντικού το οποίο εκφράζει την GFP πρωτεΐνη στα T λεμφοκύτταρα του. Στην παραπάνω μελέτη έχει ποσοτικοποιηθεί η ένταση της εκπομπής της GFP πρωτεΐνης και έχει συνδεθεί γραμμικά με τον αριθμό των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή (Garofalakis et al., 2007).

Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα στη μέθοδο της Φθορίζουσας Μοριακής Τομογραφίας είναι ο αυτοφθορισμός του ιστού δημιουργώντας ένα background σήμα, το οποίο περιορίζει το όριο εντοπισμού και την ευκρίνεια του σήματος. Μέχρι πρόσφατα χρησιμοποιούνταν ευρέως φθορίζουσες πρωτεΐνες οι οποίες εξέπεμπαν σε χαμηλά μήκη κύματος με αποτέλεσμα το σήμα τους να επικαλυπτόταν από τον αυτοφθορισμό των ιστών ειδικά σε μεγάλα βάθη. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι GFP και DsRed οι οποίες εκπέμπουν στα 510nm και 583nm αντίστοιχα (Weissleder et al., 2003). Για τον περιορισμό λοιπόν του αυτοφθορισμού έχουν κατασκευαστεί φθορίζουσες πρωτεΐνες που εκπέμπουν στο υπέρυθρο και το σήμα τους δεν επικαλύπτεται από τον αυτοφθορισμό των ιστών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δύναται να απεικονιστούν βιολογικές λειτουργίες σε μεγαλύτερα βάθη και το σήμα να είναι πιο εξειδικευμένο και πιο αξιόπιστο. Μια τέτοια φθορίζουσα πρωτεΐνη είναι η Katushka η οποία έχει μέγιστο απορρόφησης στα 588nm και μέγιστο εκπομπής στα 635nm (Hoffman, 2007).

Αντικείμενο μελέτης

Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου του PD-1 κατά την αλληλεπίδραση με τους προσδέτες του PD-L1/2 στην διατήρηση της περιφερικής ανοχής των CD8 T λεμφοκυττάρων. Στο δεύτερο μέρος σκοπός είναι η μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος με την τεχνική της μοριακής τομογραφίας φθορισμού καθώς επίσης και η εξέταση του βάθους που θα μπορούσε να ανιχνευτεί με την τεχνική αυτή ένας όγκος που εκφράζει την πρωτεΐνη Katushka.

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Διαγονιδιακά ποντίκια

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαγονιδιακά για τον F5 υποδοχέα (Mamalaki et al., 1992), Rag-1^{-/-} ποντίκια (Spanopoulou et al., 1994), PD-1^{-/-} (Nishimura et al., 1998), ποντίκια που εκφράζουν την NP 366-374 νουκλεοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης υπό τον *rdx-1* υποδοχέα, GFP ποντίκια (de Boer et al., 2003) και διασταυρώσεις αυτών. Όλα τα ζώα έχουν C57BL/10 γενετικό υπόβαθρο.

1.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Αφαιρούνται οι σπλήνες από τα ποντίκια, μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο 1XHBSS/ 5% FBS / 10 mM HEPES και διαχωρίζονται τα κύτταρα με κυτταρικούς διαχωριστές 40 μm. Για να απομακρυνθούν τα ερυθροκύτταρα ακολουθείται η μέθοδος της αιμόλυσης. Συγκεκριμένα τα κύτταρα κατακρημνίζονται για 10 λεπτά στις 1200 cfg και στη συνέχεια λύνονται με στιγμιαία προσθήκη 900μl H₂O την οποία ακολουθεί προσθήκη 10x HBSS και περίσσεια 1XHBSS / 5% FBS / 10 mM HEPES ανά σπλήνα.

Τα κύτταρα της σειράς HeLa-Katushka (Kai Schöning, αδημοσίευτα αποτελέσματα) καλλιεργήθηκαν σε 1xDMEM / 10% FBS / gentamycine στους 37°C.

1.3 Σήμανση των σπληνοκυττάρων με CFSE (carboxyfluorescein succinimidy ester)

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1x PBS σε συγκέντρωση 10⁸/ml και αναμιγνύονται με ίσο όγκο CFSE συγκέντρωσης 20μM διαλυμένο σε 1x PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη περίσσειας παγωμένου 1XHBSS / 5% FBS / 10 mM HEPES και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο. Τα κύτταρα ξεπλένονται δυο φορές με 1x HBSS.

1.4 Χρώση με αντισώματα

Χρησιμοποιούνται σπληνοκύτταρα από τα οποία έχουν αφαιρεθεί τα ερυθροκύτταρα με την διαδικασία της αιμόλυσης. Στη συνέχεια προστίθεται το μίγμα των αντισωμάτων σε 10⁶ σπληνοκύτταρα, επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά και αναλύονται με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αντί-CD8-PE, αντί-CD8-APC, αντί-CD8-Fitc, αντί-Vb11-PE, αντί-Vb11-biotin, αντί-biotin-perCP. Για την χρώση του αίματος τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται με την χρήση του FACS Lysing solution (BD Biosciences).

1.5 In vitro πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων

Ο πολλαπλασιασμός των CD8 T λεμφοκυττάρων μελετήθηκε με τις εξής δυο μεθόδους :

1. Παρακολούθηση των διαιρέσεων μέσω κυτταρομετρίας ροής: Συγκαλλιεργήθηκαν στους 37°C σε πιάτο 12 πηγαδιών (12 well plate) 6×10^5 σημασμένα με CFSE CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκύτταρα με 3×10^6 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους ανά πηγάδι, τα οποία έχουν επωαστεί με την NP πρωτεΐνη σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (1nM, 100nM, 1μM). Η καλλιέργεια διήρκησε είτε 2 είτε 3 ημέρες και το μέσο στο οποίο καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα ήταν RPMI / 10% FBS / 10 mM HEPES / 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη / 2 mM L-γλουταμίνη / 50 μM β-μερκαπτοαιθανόλη.
2. Μέθοδος ενσωμάτωσης ³H-dTTP : Συγκαλλιεργήθηκαν 8×10^4 κύτταρα τελεστές με 3×10^5 κύτταρα στόχους ανά πηγάδι σε πιάτο 96 πηγαδιών (well plate). Μετά από 3 ημέρες επώαστηκαν τα κύτταρα με 1μl ³H-dTTP ανά πηγάδι για 6 επιπλέον ώρες και μετρήθηκε η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας

1.6 Μεταφορά κυττάρων και in vivo πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων

Μεταφέρθηκαν 10^7 σημασμένα με CFSE F531 και F531PD-1/- CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα σε δέκτες που εκφράζουν την NP πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ο F5 υποδοχέας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από τους δέκτες τις ημέρες 1, 3 και 6 και μελετήθηκαν οι διαιρέσεις των CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων τις ημέρες αυτές με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Μεταφέρθηκαν $1,5 \times 10^7$ CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκύτταρα σημασμένα με CFSE σε δέκτες Rag^{-/-} και μια ημέρα μετά την μεταφορά χορηγήθηκε ενδοφλέβια στο κάθε ποντίκι 25 nmoles πεπτιδίου NP σε τελικό όγκο 100μl PBS. Η ημέρα αυτή ορίστηκε ως ημέρα 0. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία τις ημέρες 1, 3 και 6 από το κάθε ποντίκι και παρατηρήθηκαν οι διαιρέσεις των CD8⁺Vb11⁺ με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Μεταφέρθηκαν 5×10^6 και 10^7 HeLa-Katushka σε Rag^{-/-} ποντίκια. Τα κύτταρα είχαν πλυθεί 3 φορές με 1x HBSS και για την μεταφορά επαναδυσάλυθησαν σε 1x HBSS 300μl τελικό όγκο.

1.7 Ενδοκυττάρια ανίχνευση παραγωγής TNF-α

Συγκαλλιεργήθηκαν σε 12well plate 6×10^5 CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα με 3×10^6 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους ανά πηγάδι χωρίς NP πρωτεΐνη και με 100nM NP πρωτεΐνη για 12 ώρες. Στην καλλιέργεια είχαν προστεθεί εξ' αρχής 4μl Golgi plug σε κάθε πηγάδι με σκοπό να πραγματοποιηθεί ενδοκυττάρια χρώση του TNF-α και ανίχνευσή του με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. . Πραγματοποιήθηκε χρώση με αντί-CD8α και

αντί-Vb11 για την ανίχνευση παραγωγής TNF-α από τα CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα.

1.8 Προετοιμασία των ποντικών για απεικόνιση με την Φθορίζουσα Μοριακή Τομογραφία

Αφαιρέθηκε το τρίχωμα από το σημείο που επιθυμούσαμε να απεικονισθεί. Τα ζώα ήταν αναισθητα υπό την επίδραση του isofluorane κατά την διάρκεια του πειράματος.

1.9 Μετρήσεις με την μέθοδο της Φθορίζουσας Μοριακής Τομογραφίας

Οι μετρήσεις των διαγονιδιακών GFP ποντικών πραγματοποιήθηκαν με φίλτρα μήκους κύματος 488nm για την διέγερση και 510nm για την απορρόφηση του GFP. Για την μέτρηση των όγκων από HeLa - Katushka χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα μήκους κύματος 600nm για την διέγερση και 700nm για την απορρόφηση. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Labview.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΡΟΣ Α

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου του PD-1 υποδοχέα στην ανάπτυξη και διατήρηση της περιφερικής ανοχής των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Για την μελέτη της αυτοανοχής χρησιμοποιήθηκε ένα διπλά διαγονιδιακό μοντέλο, το F531, στο οποίο εκφράζεται συγκεκριμένης ειδικότητας διαγονιδιακός TCR υποδοχέας και συγχρόνως η πρωτεΐνη της οποίας τον επίτοπο αναγνωρίζει αυτός ο υποδοχέας. Πρόκειται για έναν κυτταροτοξικό κλώνο λεμφοκυττάρων στα οποία ο TCR υποδοχέας τους (F5) αναγνωρίζει το εννιαμερές πεπτίδιο από την νουκλεοπρωτεΐνη (NP 366-374) του ιού της γρίπης (A/NT/60/68). Ο υποδοχέας αυτός εκφράζει τα Vb11 και Va4 γονίδια για την β και α αλυσίδα αντίστοιχα. Ταυτόχρονα στο ίδιο ποντίκι εκφράζεται η NP πρωτεΐνη, που αναγνωρίζει ο συγκεκριμένος υποδοχέας υπό την ρύθμιση του rdx-1 υποκινητή. Η NP πρωτεΐνη εκφράζεται σε διάφορους ιστούς μεταξύ των οποίων είναι το πάγκρεας. Στο μοντέλο αυτό τα περιφερικά F5 λεμφοκύτταρα υπόκεινται είτε σε κλωνική απαλοιφή και θανατώνονται είτε βρίσκονται σε κατάσταση ανέργειας, κατά την οποία δεν αποκρίνονται στο αντιγόνο και έχουν μειωμένες λειτουργίες κυττάρων – τελεστών.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του PD-1 υποδοχέα στην δημιουργία και διατήρηση της περιφερικής ανοχής διασταυρώθηκαν τα παραπάνω ποντίκια με PD-1^{-/-} ποντίκια. Με τα F531 και F531PD-1^{-/-} διαγονιδιακά μοντέλα είναι δυνατόν να μελετηθούν οι αποκρίσεις των CD8 λεμφοκυττάρων σε ενδογενή αντιγόνα καθώς και οι μηχανισμοί ανάπτυξης και διατήρησης της περιφερικής ανοχής παρουσία και απουσία του PD-1^{-/-} υποδοχέα.

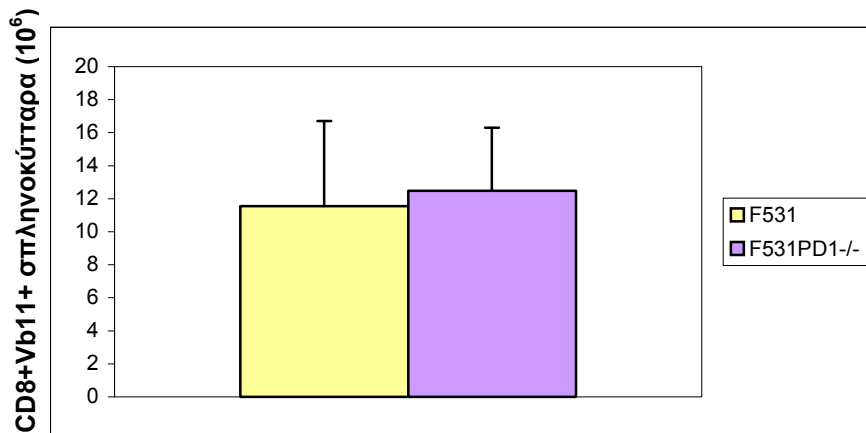
1.1 Ο ρόλος του PD-1 στην κλωνική απαλοιφή των F531 CD8 T λεμφοκυττάρων

Για την μελέτη του ρόλου του PD-1 υποδοχέα στην κλωνική απαλοιφή των περιφερειακών F5 λεμφοκυττάρων συγκρίναμε τους αριθμούς των CD8⁺Vb11⁺ T λεμφοκυττάρων της σπλήνας ανάμεσα στα F531 και F531PD-1^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια. Συγκεκριμένα αναλύθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής ο αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων σπλήνας από ζώα F531 και F531PD-1^{-/-} και ηλικίας 12 - 17 εβδομάδων και παρατηρήθηκε ότι ο συνολικός αριθμός τους δεν εμφανίζει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δυο γονότυπους (εικόνα1). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 15 ποντίκια από τον κάθε γονότυπο. Επίσης αναλύθηκε ο αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων από ζώα ηλικίας 31 – 38 εβδομάδων. Θυσιάστηκαν 3 ζώα από κάθε γονότυπο και παρατηρήθηκε ότι το ένα από τα τρία ζώα να αποκλίνει κατά πολύ στον αριθμό των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων στα F531PD-1^{-/-} ποντίκια (εικόνα 2). Σε αντίθεση με τα F531 ζώα η τυπική απόκλιση των CD8⁺Vb11⁺

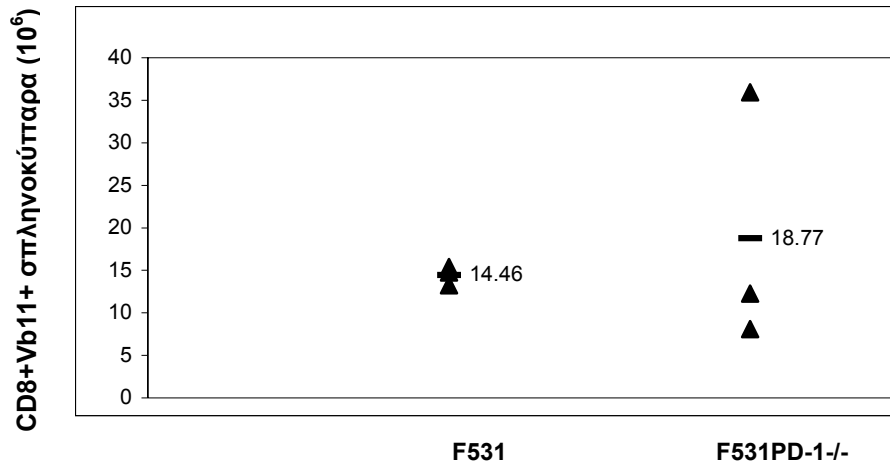
σπληνοκυττάρων στα F531PD-1^{-/-} είναι πολύ μεγάλη και ο πληθυσμός φαίνεται να είναι ανομοιογενής (πίνακας 1, εικόνα 2). Το ίδιο ισχύει και για τον συνολικό αριθμό των σπληνοκυττάρων στα F531PD-1^{-/-} ποντίκια. Από περαιτέρω πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο φαίνεται σε ένα ποσοστό περίπου 30% των F531PD-1^{-/-} ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ να αποκλίνει από το μέσο όρο και να είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από εκείνο των F531 ποντικών

	Συνολικά σπληνοκύτταρα (x10 ⁶)	CD8 ⁺ Vb11 ⁺ σπληνοκύτταρα (x10 ⁶)
F531 12-17 εβδ. (12♂ 3♀)	87.17 ± 37.88	11.56 ± 5.15
F531PD-1 ^{-/-} 12-17 εβδ. (12♂ 3♀)	88.28 ± 25.37	12.49 ± 3.8
F531 31-38 εβδ. (3♂)	168 ± 53.02	14.46 ± 1.09
F531PD-1 ^{-/-} 31-38 εβδ. (3♂)	181.33 ± 104.51	18.77 ± 15.01

Πίνακας 1: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του συνολικού αριθμού σπληνοκυττάρων και των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων .



Εικόνα 1 : Απεικονίζεται ο μέσος όρος του απόλυτου αριθμού των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων σε F531 και F531PD-1^{-/-} ποντίκια . Θυσιάστηκαν 15 F531 και 15 F531PD-1^{-/-} ζώα και αναλύθηκαν με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής τα ποσοστά των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ στα F531 και F531PD-1^{-/-} ποντίκια. Τα ζώα είναι ηλικίας 12 – 17 εβδομάδων και τα 12 είναι αρσενικά και τα 3 θηλυκά.



Εικόνα 2: Απεικονίζεται ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων σε F531 και F531PD-1-/- ποντίκια. Θυσιάστηκαν 3 F531 και 3 F531PD-1-/- ποντίκια και αναλύθηκαν με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής τα ποσοστά των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ στα F531 και F531PD-1-/- . Τα ζώα είναι ηλικίας 31 – 38 εβδομάδων και φύλου αρσενικού. Το αριθμημένο σύμβολο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων.

1.2 Ο ρόλος του PD-1-/- στην διατήρηση της ανέργειας και της περιφερικής ανοχής των CD8⁺ λεμφοκυττάρων.

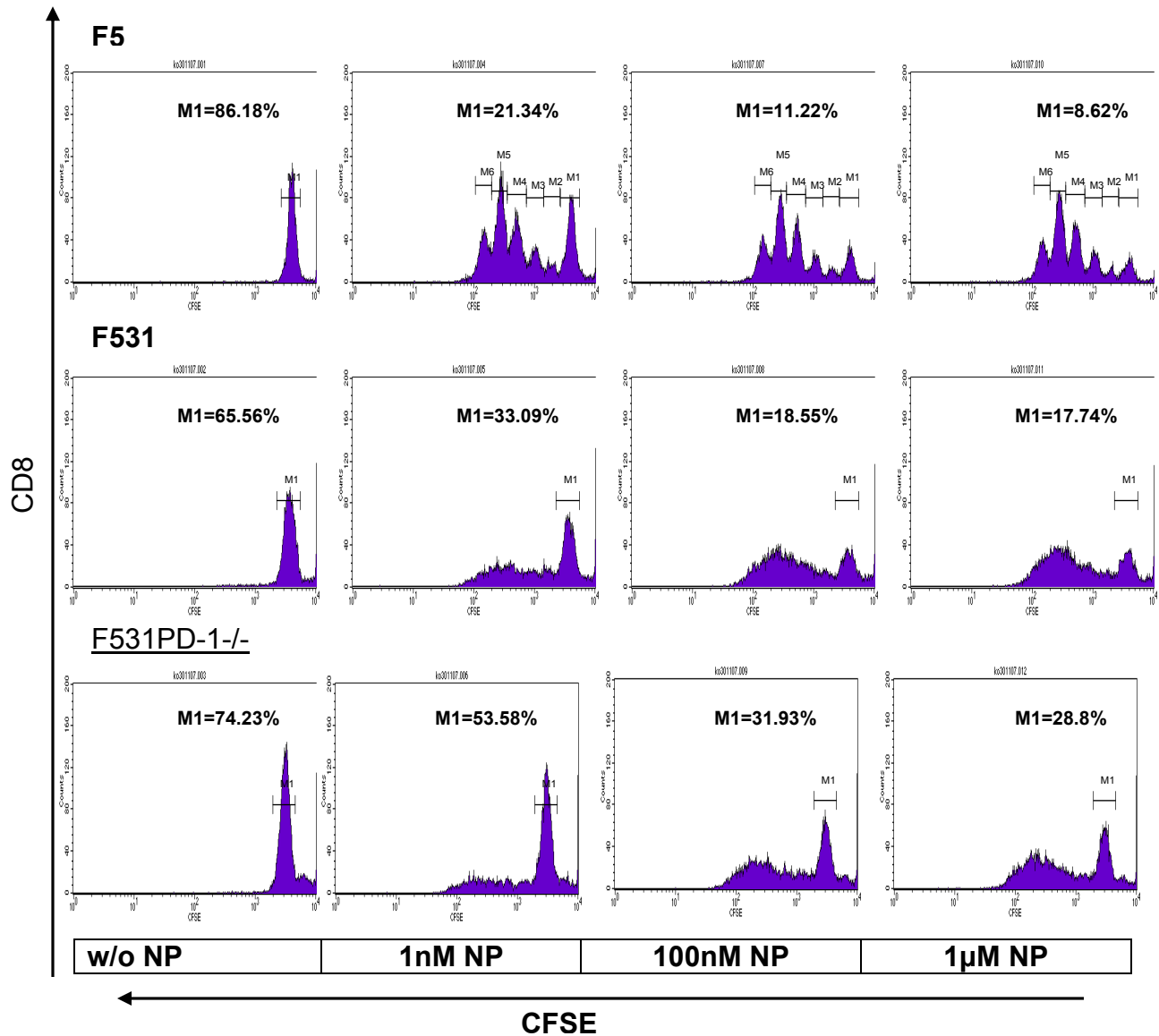
Ο PD-1 υποδοχέας θεωρείται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της αυτοανοχής και η απουσία του θα μπορούσε να οδηγήσει στη διακοπή της. Σύμφωνα με *in vivo* πειράματα μεταφοράς PD-1-/- OT-1 διαγονιδιακών κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων σε OVA δέκτες τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται εντονότερα σε σύγκριση με του αγρίου τύπου και επίσης έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν στον δέκτη αυτοάνοσο σακχαρώδη διαβήτη (Keir et al., *Jl*, 2007). Επίσης έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση του PD-1 υποδοχέα με τον PD-L1 προσδέτη του είναι απαραίτητη για την επίτευξη της ανέργειας των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων και η διακοπή αυτής της αλληλεπίδρασης μπορεί να την αντιστρέψει (Tsushima et al., *Blood*, 2007).

Όπως έχει ήδη περιγραφεί τα F5 κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα της περιφέρειας στο διαγονιδιακό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε βρίσκονται σε κατάσταση ανέργειας. Έχουν δηλαδή μειωμένες δυνατότητες κυττάρων τελεστών και δεν ανταποκρίνονται στο αντιγόνο. Προκειμένου να εξεταστεί η δυνατότητα του PD-1 να διακόψει την περιφερική ανοχή των ανέργων F5 κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων του μοντέλου είναι απαραίτητο να μελετηθούν οι λειτουργίες των F531 CD8⁺Vb11⁺ περιφερικών λεμφοκυττάρων κατά την απουσία αυτού του υποδοχέα.

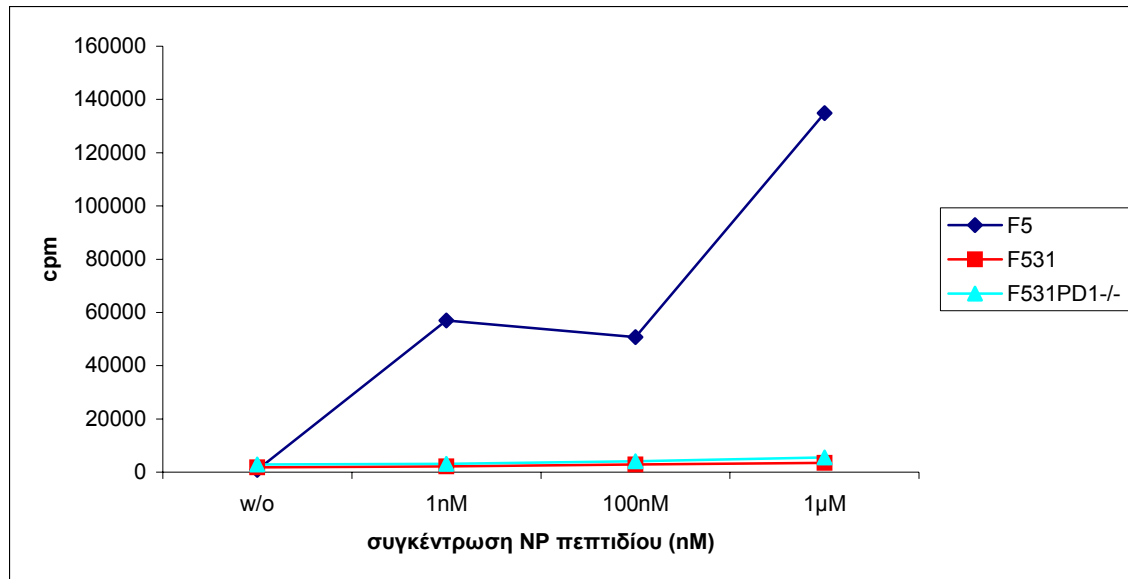
Αρχικά λοιπόν μελετήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού των F531PD1-/- κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων κατά την επαφή τους με το αντιγόνο *in vitro* και *in vivo*. Για την *in vitro* μελέτη της ικανότητας πολλαπλασιασμού των F531PD-1-/-

CD8 T λεμφοκυττάρων διεγέρθηκαν με αύξουσες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης NP σημασμένα με CFSE CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκύτταρα από F531 και F531PD-1^{-/-} ποντικούς ηλικίας 12-17 εβδομάδων. Τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν 3 φορές και συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 9 ζώα από τον κάθε γονότυπο. Στη συνέχεια μελετήθηκε με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής η ικανότητα πολλαπλασιασμού των CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων (εικόνα 3). Επίσης ο *in vitro* πολλαπλασιασμός των F531PD-1^{-/-} T λεμφοκυττάρων μελετήθηκε και με την μέθοδο ενσωμάτωσης ³H-dTTP. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ποντίκια ηλικίας 12-20 εβδομάδων και φύλου αρσενικού.

Και με τις δυο προσεγγίσεις του ίδιου πειράματος παρατηρήθηκε ότι οι διαιρέσεις των F531 και F531PD-1^{-/-} CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά. Στην περίπτωση των σημασμένων με CFSE CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων επειδή οι διαιρέσεις στα F531 και F531PD-1^{-/-} δεν είναι διακριτές υπολογίζουμε τον ρυθμό μείωσης των αδιαίρετων CD8⁺Vb11⁺ δηλαδή M1(χωρίς πεπτίδιο) / M1(κάποιας συγκέντρωσης). Έτσι λοιπόν στα F531 στη συγκέντρωση του 1 nM ο λόγος αυτός είναι 1,9, των 100nM είναι 3,5 και του 1μM είναι 3,6. Στα F531PD-1^{-/-} ο λόγος αυτός για συγκέντρωση 1nM είναι 1,3, για 100nM είναι 2,3 και για 1μM είναι 2,5. Με την μέθοδο ενσωμάτωσης ³H-dTTP τα F531 και F531PD-1^{-/-} φαίνεται να μην μπορούν να αποκριθούν στο αντιγόνο εξ' ίσου. Φαίνεται λοιπόν ότι η απουσία του PD-1 υποδοχέα δεν καθιστά τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα του F531PD-1^{-/-} διαγονιδιακού μοντέλου ικανά να διεγερθούν και να αποκριθούν στο αντιγόνο. Δηλαδή τα F531PD-1^{-/-} CD8 λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται με τον ίδιο περίπου ρυθμό με τα F531 αποκρινόμενα στο αντιγόνο. Επομένως δεν φαίνεται να διακόπτεται η ανέργεια των F531 CD8 λεμφοκυττάρων όταν απουσιάζει ο PD-1 υποδοχέας σε αυτό το διαγονιδιακό μοντέλο.



Εικόνα 3: In vitro πολλαπλασιασμός των F531 και F531PD-1-/- CD8 T λεμφοκυττάρων. Στο πείραμα αυτό επωάστηκαν για 3 μέρες 6×10^5 σηματομενόμενα με CFSE CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα από F5 (control), F531 και F531PD-1-/- ποντίκια με 3×10^5 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους τα οποία έχουν επωαστεί με το NP πεπτιδίον στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις. Το πείραμα που απεικονίζεται είναι αντιπροσωπευτικό, έχει επαναληφθεί δυο φορές και συνολικά έχουν εξεταστεί 9 ποντίκια από κάθε γονότυπο. Το M1 αντιπροσωπεύει το ποσοστό των αδιάρετων CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων. Επειδή οι διαιρέσεις δεν είναι διακριτές για τα F531 και F531PD-1-/- υπολογίζουμε τον ρυθμό μείωσης των αδιάρετων κυττάρων.

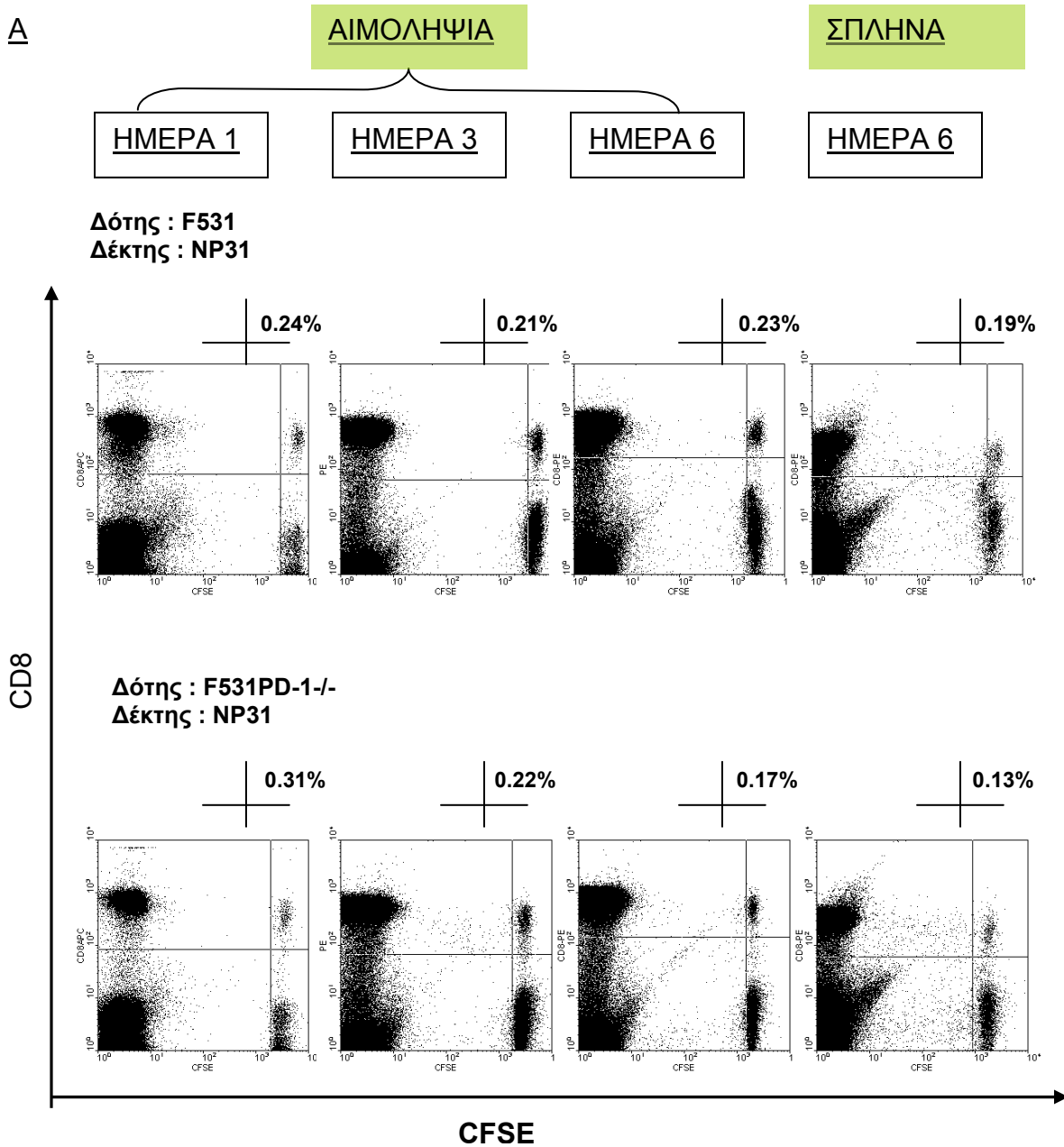


Εικόνα 4: In vitro πολλαπλασιασμός των F531 και F531PD-1-/- CD8 T λεμφοκυττάρων. Καλλιεργήθηκαν 8×10^4 $CD8^+Vb11^+$ σπληνοκύτταρα από ομογενοποιημένες σπλήνες ποντικών F531 και F531PD-1-/- με 3×10^5 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους τα οποία έχουν επωαστεί με το NP πεπτίδιο στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις. Μετά από 3 ημέρες συγκαλλιέργειας επώαστηκαν για 6 επιπλέον ώρες με 3H -dTTP και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια. Δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην ικανότητα πολλαπλασιασμού των F531 και F531PD-1-/- λεμφοκυττάρων.

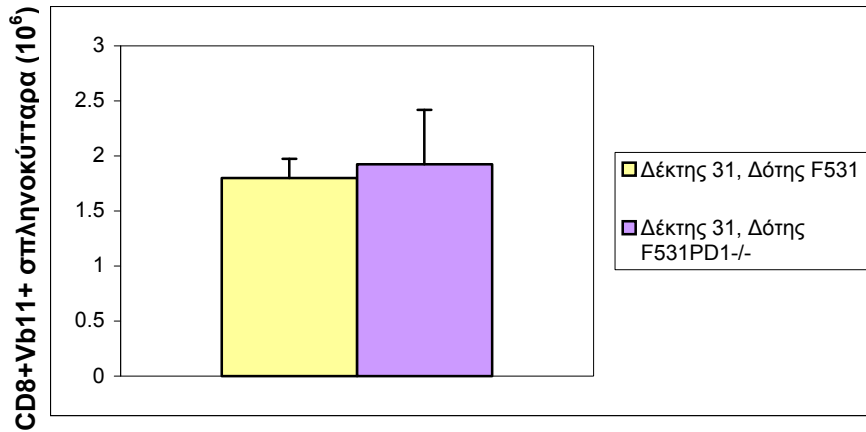
Επίσης μελετήθηκε in vivo ο ρόλος του PD-1 υποδοχέα στη διατήρηση της ανέργειας και της περιφερικής ανοχής των $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα μεταφέρθηκαν σημασμένα με CFSE F531 και F531PD-1-/- $CD8^+Vb11^+$ λεμφοκύτταρα σε δέκτες που εκφράζουν την NP πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ο F5 υποδοχέας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από τους δέκτες τις ημέρες 1, 3 και 6 και μελετήθηκαν οι διαιρέσεις των $CD8^+Vb11^+$ λεμφοκυττάρων τις ημέρες αυτές με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (εικόνα 5A). Την έκτη μέρα θυσιάστηκαν τα ζώα και μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός των F5 κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων στην σπλήνα (εικόνα 5A). Επίσης υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός των $CD8^+Vb11^+$ κυττάρων στις σπλήνες (εικόνα 5B). Υπήρχαν από τρία πειραματικά ζώα για τον κάθε γονότυπο και ως control χρησιμοποιήθηκαν C57bl/10 ζώα ενεμένα με F531 και F531PD-1-/- $CD8^+Vb11^+$ λεμφοκύτταρα. Επειδή και σε αυτή την περίπτωση οι διαιρέσεις των F531 και F531PD-1-/- λεμφοκυττάρων δεν είναι διακριτές επικεντρωθήκαμε στα ποσοστά των αδιαίρετων κυττάρων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα ποσοστά των αδιαίρετων $CD8$ λεμφοκυττάρων παρατηρούμε τα F531PD-1-/- κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα να διαιρούνται εξ' ίσου με τα F531 (εικόνα 5A). Σε ότι αφορά τον απόλυτο αριθμό των $CD8^+Vb11^+$ κυττάρων επίσης δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στα F531 και F531PD-1-/- ποντίκια. Φαίνεται λοιπόν ότι η απουσία του PD-1, στο in vivo μοντέλο μελέτης της ανέργειας των $CD8^+$

λεμφοκυττάρων, δεν παίζει κάποιο ρόλο στην διακοπή της περιφερικής ανοχής των F531 κυττάρων. Τα F531PD-1^{-/-} CD8 λεμφοκύτταρα στο πείραμα αυτό παραμένουν άνεργα και δεν αποκρίνονται στο ενδογενές αντιγόνο.

A



B

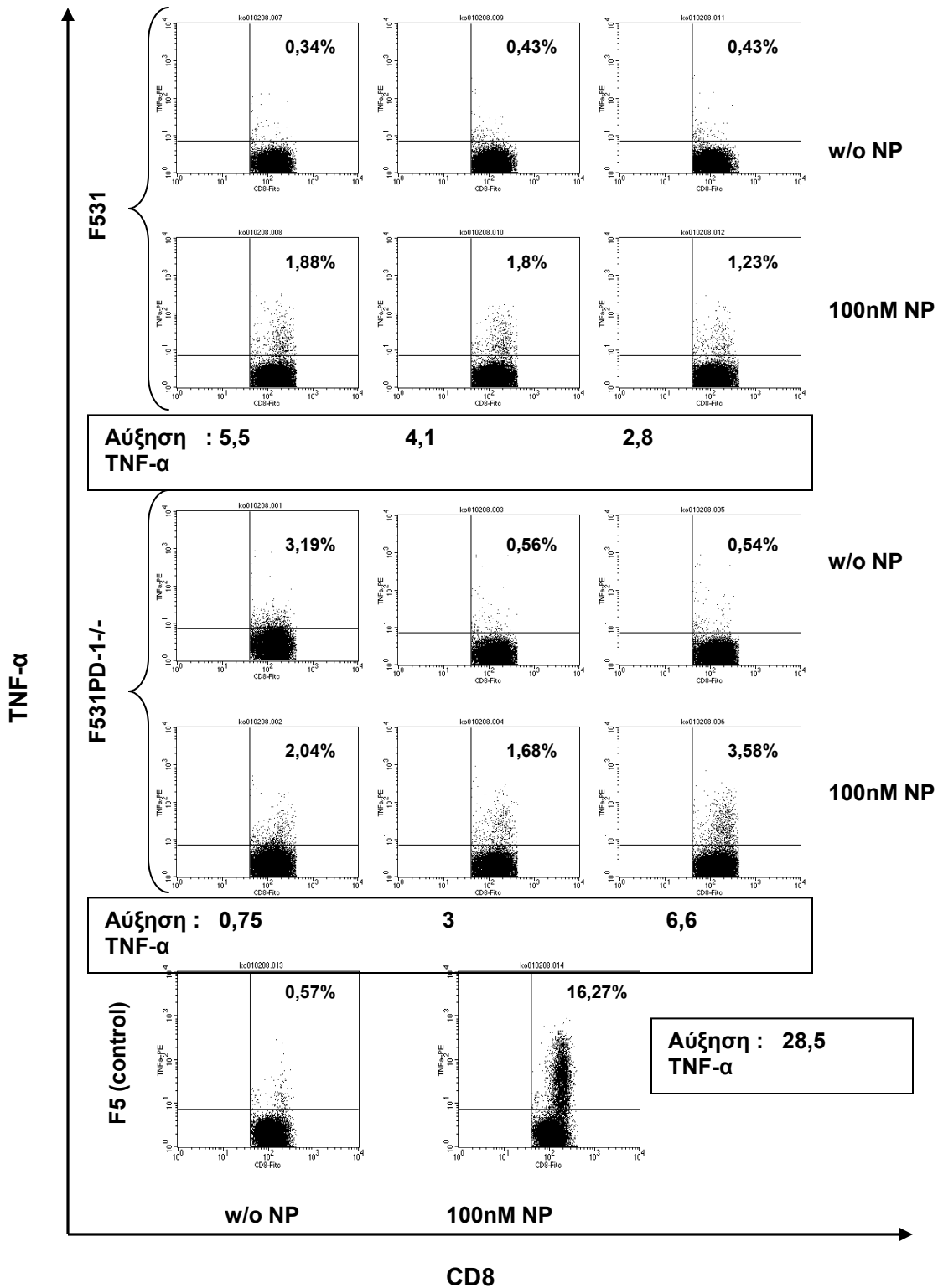


Εικόνα 5: In vivo πολλαπλασιασμός των F531 και F531PD-1-/- CD8 T λεμφοκυττάρων. **A)** Μεταφέρθηκε 10^7 σημασμένων με CFSE $CD8^+Vb11^+$ σπληνοκυττάρων από F531 και F531PD-1-/- σε ποντίκια δέκτες που εκφράζουν την NP πρωτεΐνη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από κάθε δέκτη 1, 3 και 6 ημέρες μετά την μεταφορά των κυττάρων και μελετήθηκαν οι διαιρέσεις των $CD8^+Vb11^+$ σπληνοκυττάρων των δοτών με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Την έκτη μέρα θυσιάστηκαν τα ζώα και μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής οι διαιρέσεις και των $CD8^+Vb11^+$ λεμφοκυττάρων στην σπλήνα. **B)** Την ημέρα 6 που θυσιάστηκαν τα ζώα αναλύθηκαν τα σπληνοκύτταρα τους με κυτταρομετρία ροής και υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός των $CD8^+Vb11^+$ λεμφοκυττάρων. Στην εικόνα απεικονίζεται ο μέσος όρος από 3 δέκτες F531 και F531PD-1-/- κυττάρων αντίστοιχα.

1.3 Ο ρόλος του PD-1 στην παραγωγή κυτοκινών από τα F531PD-1/- κύτταρα

Επίσης σύμφωνα με μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι κατά την διακοπή της αλληλεπίδρασης του PD-1 με τους προσδέτες του αυξάνεται *in vitro* η παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι η IFN- γ και η IL-2 (Tsushima et al., Blood, 2007). Έτσι μελετήθηκε ο ρόλος του PD-1 στην διακοπή της περιφερικής ανοχής των άνεργων CD8 λεμφοκυττάρων σε ότι αφορά την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων και συγκεκριμένα του TNF- α από τα κυτταροτοξικά F531 και F531PD-1/- λεμφοκύτταρα. Για τον σκοπό αυτό διεγέρθηκαν F531 και F531PD-1/- CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα με την NP πρωτεΐνη και ανιχνεύθηκε με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής η ενδοκυττάρια παραγωγή TNF- α . Προκειμένου να συγκρίνουμε την παραγωγή TNF- α ανάμεσα στα F531 και στα F531PD-1/- λαμβάνουμε υπ' όψιν μας τον λόγο των ποσοστών παραγωγής TNF- α από τα CD8⁺Vb11⁺ κύτταρα κατά την διέγερσή τους από το NP πεπτιδίο προς τα ποσοστά παραγωγής των μη διεγερμένων κυττάρων. Παρατηρούμε λοιπόν στα F531 η παραγωγή TNF- α να κυμαίνεται από 2,8 ως 5,5 φορές σε σχέση με το βασικό επίπεδο παραγωγής ενώ στα F531PD-1/- από 0,75 ως 6,6 (εικόνα 6). Στα F531PD-1/- εμφανίζεται μεγάλη ανομοιογένεια και θα μπορούσαμε να πούμε ότι δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην παραγωγή TNF- α συγκριτικά με τα F531 στο συγκεκριμένο πείραμα. Στα πειράματα αυτά όμως παρατηρήθηκε μια τάση τα F531PD-1/- κυτταροτοξικά να παράγουν υψηλότερη ποσότητα TNF- α απουσία πεπτιδίου.

Βέβαια για να καταλήξουμε σε κάποιο σίγουρο συμπέρασμα σε ότι αφορά το ρόλο του PD-1 υποδοχέα στην διακοπή της ανοχής των άνεργων CD8⁺ λεμφοκυττάρων και στην ικανότητα τους να παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες θα πρέπει το πείραμα αυτό να επαναληφθεί και να εξεταστεί η παραγωγή και άλλων κυτοκινών από τα κύτταρα αυτά όπως είναι η IFN- γ και η IL-2.



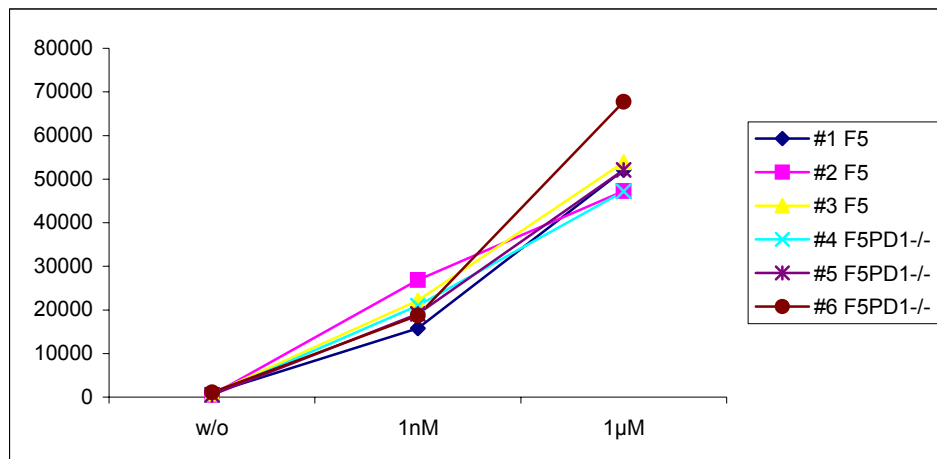
Εικόνα 6: Παραγωγή TNF-α από F531 και F531PD-1-/- CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Συγκαλλιεργήθηκαν για 12 ώρες 6×10^5 CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα από F5 (control), F531 και F531PD-1-/- ποντίκια με 3×10^6 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους τα οποία έχουν επωαστεί με το NP πεπτιδίο στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις. Πραγματοποιήθηκε ενδοκυττάρια χρώση του TNF-α. Με την μέθοδο κυτταρομετρίας ροής υπολογίστηκε το ποσοστό παραγωγής TNF-α από τα CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα.

1.4 Ο ρόλος του PD-1 στον πολλαπλασιασμό των αδών F5 λεμφοκυττάρων

Επειδή κατά την απουσία του PD-1 υποδοχέα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην λειτουργία των ανεργών F5 κυττάρων που αναγνωρίζουν το NP αντιγόνο ως ενδογενές πεπτιδίο μελετήθηκε *in vitro* και *in vivo* ο ρόλος του PD-1 στον πολλαπλασιασμό των F5 κυττάρων που δεν έχουν έρθει ποτέ σε επαφή με την NP πρωτεΐνη. Για τα *in vitro* πειράματα διεγέρθηκαν με αύξουσες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης NP σημασμένα με CFSE $CD8^+Vb11^+$ σπληνοκύτταρα από 3 F5 και 3 F5PD-1/- ποντίκια φύλου αρσενικού και ηλικίας 11 – 13 εβδομάδων και στη συνέχεια με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκαν οι διαιρέσεις των $CD8^+Vb11^+$ λεμφοκυττάρων σε κάθε συγκέντρωση της πρωτεΐνης (εικόνα 7B). Επιπλέον μετρήθηκε και υπολογίστηκε ο αριθμός των κυττάρων καθώς και τα ποσοστά και ο απόλυτος αριθμός των $CD8^+Vb11^+$ που υπήρχε σε κάθε πηγάδι. Ο αριθμός των διαιρέσεων των F5 και των F5PD-1/- κυττάρων είναι όμοιος όπως επίσης και τα ποσοστά των διαιρεμένων $CD8^+Vb11^+$ κυττάρων (εικόνα 7B). Παρατηρήθηκε όμως μια τάση τα διεγερμένα F5PD-1/- να έχουν μεγαλύτερο απόλυτο αριθμό $CD8^+Vb11^+$ και μάλιστα στην συγκέντρωση του 1 nM αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική (εικόνα 7Γ). Στη συγκέντρωση του 1 μ M λόγω μεγαλύτερης διασποράς η διαφορά που παρατηρείται στον αριθμό των $CD8^+Vb11^+$ δεν είναι στατιστικά σημαντική και για αυτό είναι απαραίτητο να επαναληφθεί το πείραμα και να ληφθεί υπ' όψιν μεγαλύτερος αριθμός ζώων. Στην περίπτωση που επαληθευτεί το παραπάνω πείραμα και τα F5PD-1/- εμφανίσουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων κατά την διέγερσή τους με το αντιγόνο θα μπορούσε αυτή η διαφορά να αποδοθεί σε μειωμένο κυτταρικό θάνατο των $CD8^+$ λεμφοκυττάρων των F5PD-1/-. Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε και με την μέθοδο ενσωμάτωσης ραδιενεργής 3H -dTTP όπου παρατηρήθηκαν επίσης τα F5 και F5PD-1/- λεμφοκύτταρα να διαιρούνται με τον ίδιο ρυθμό (εικόνα 7A).

A

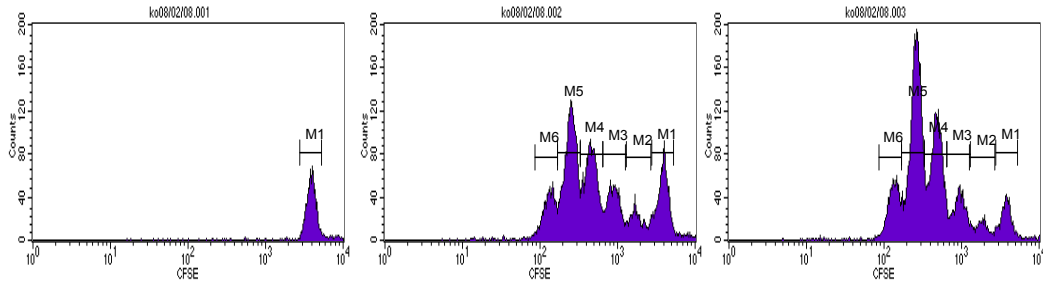
HΜΕΡΑ 2



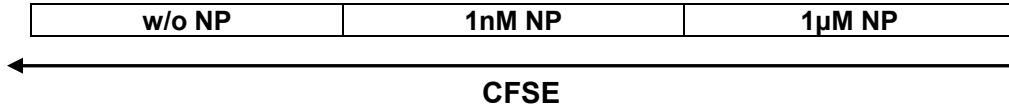
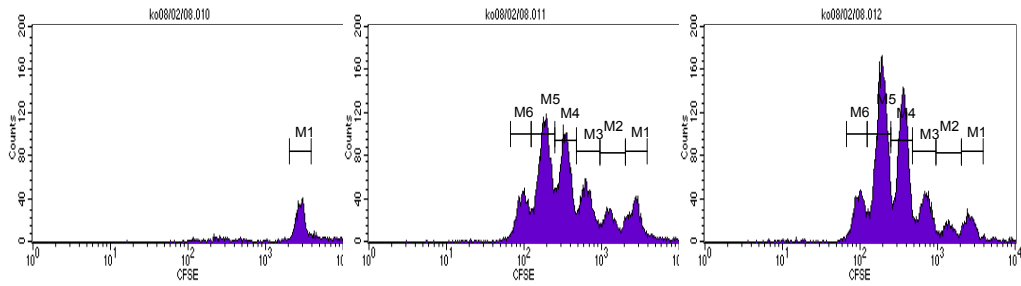
B

HMEPA 3

F5

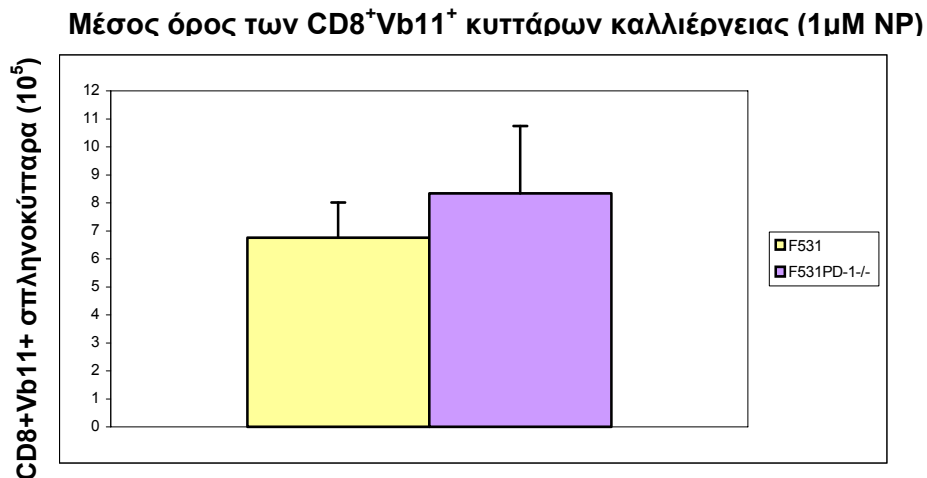
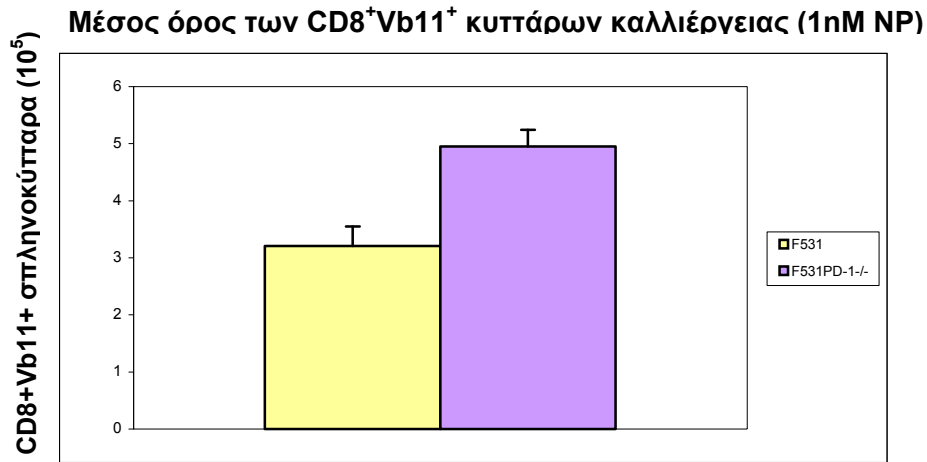


F5PD1-/-



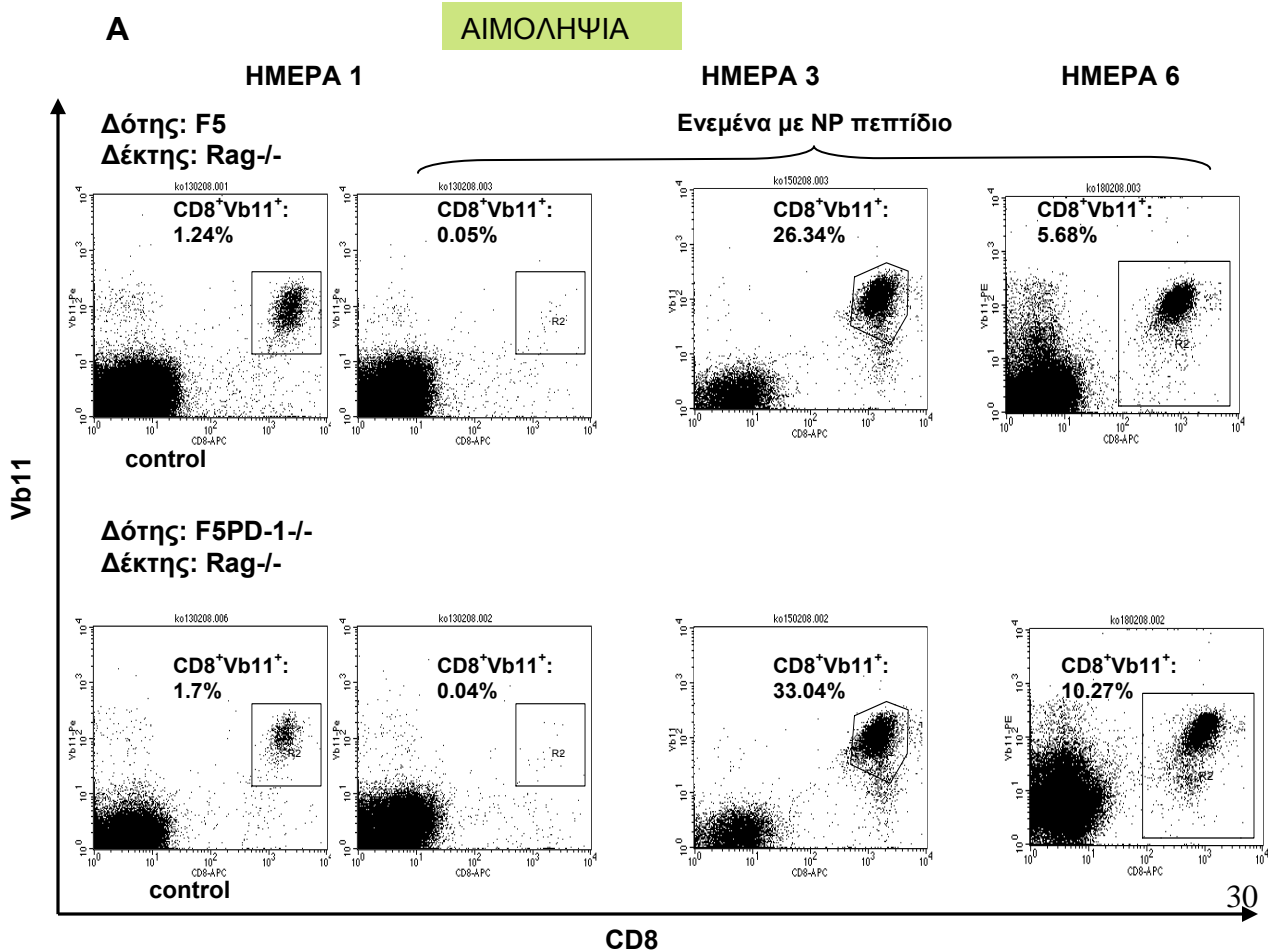
	F5			F5PD-1-/-		
(%)	w/o NP	1nM	1µM	w/o NP	1nM	1µM
M1	93.51	14.98	6.74	76.07	8.65	4.78
M2		7.14	4		8.79	4.03
M3		13.16	10.84		14.12	11.02
M4		20.78	24.86		24.14	29.24
M5		31.79	40.89		31.69	39.66
M6		11.11	12.35		11.58	10.85

Γ



Εικόνα 7 : In vitro πολλαπλασιασμός των F531 και F531PD-1-/- CD8 T λεμφοκυττάρων. **A)** Καλλιεργήθηκαν 8×10^4 CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκύτταρα από F5 και F5PD-1-/- ποντίκια με 3×10^5 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους τα οποία έχουν επωαστεί με το NP πεπτιδίιο στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις. Μετά από 2 ημέρες συγκαλλιέργειας μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια. **B)** Στο πείραμα συγκαλλιεργήθηκαν για 3 μέρες 6×10^5 σημασμένα με CFSE CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκύτταρα από F5 και F5PD-1-/- ποντίκια με 3×10^6 ακτινοβολημένα C57bl/10 κύτταρα στόχους τα οποία έχουν επωαστεί με το NP πεπτιδίιο στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις. Με κυτταρομετρία ροής μελετήσαμε τις διαιρέσεις των CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων. **Γ)** Μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που υπήρχαν στο κάθε πηγάδι και υπολογίστηκαν τα ποσοστά και οι απόλυτοι αριθμοί των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων.

Για την *in vivo* μελέτη του ρόλου του PD-1 υποδοχέα στον πολλαπλασιασμό των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων μεταφέρθηκαν σημασμένα με CFSE CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκύτταρα σε δέκτες Rag^{-/-} και μια ημέρα μετά την μεταφορά το κάθε ποντίκι ενέθηκε με την πρωτεΐνη NP συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Η ημέρα αυτή ορίστηκε ως ημέρα 0. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία τις ημέρες 1, 3 και 6 από το κάθε ποντίκι και με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκε ο πολλαπλασιασμός των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων. Ως control χρησιμοποιήθηκαν ζώα τα οποία δεν ενέθηκαν με το NP πεπτιδίο. Την ημέρα 1 μετά την ένεση του πεπτιδίου τα F5 κύτταρα δεν ανιχνεύονται στο αίμα. Την ημέρα 3 το ποσοστό των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων στο F5PD-1^{-/-} είναι υψηλότερο σε σχέση με το F5 (εικόνα 8A) καθώς επίσης στα CD8⁺Vb11⁺ κύτταρα του F5PD-1^{-/-} παρατηρείται μια επιπλέον διαίρεση συγκριτικά με τα F5 (εικόνα 8B). Την ημέρα 6 η μείωση των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων των F5PD-1^{-/-} είναι εντονότερη συγκριτικά με τα F5 (εικόνα 8A). Την ημέρα 6 συγκρίνοντας τα ποσοστά των διαιρεμένων κυττάρων φαίνεται οι διαιρέσεις να είναι πιο προχωρημένες στα F5PD-1^{-/-} κύτταρα (εικόνα 8B). Τα ζώα θυσιάστηκαν την ημέρα 8 και με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής υπολογίστηκε το ποσοστό και ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων. Ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ των F5PD-1^{-/-} είναι κατά $1,3 \times 10^6$ μεγαλύτερος από των F5 (εικόνα 8Δ) και παρατηρείται μια επιπλέον διαίρεση στα CD8⁺Vb11⁺ κύτταρα του F5PD-1^{-/-} (εικόνα 8Γ). Βέβαια αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί στατιστικά σημαντικό διότι εξετάστηκαν 2 ζώα από κάθε γονότυπο.



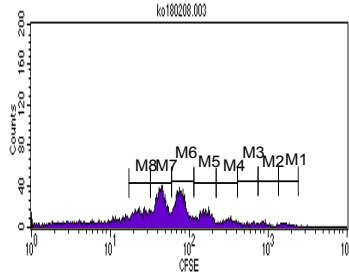
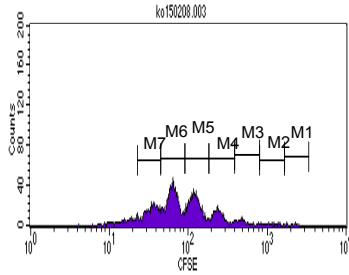
B

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ

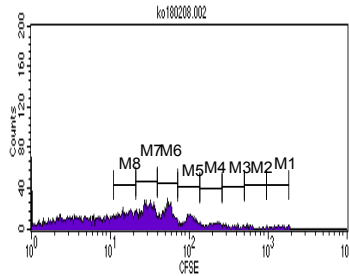
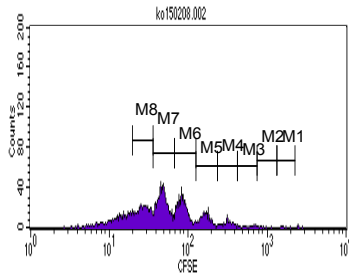
ΗΜΕΡΑ 3

ΗΜΕΡΑ 6

**Δότης: F5
Δέκτης: Rag-/-**



**Δότης: F5PD-1-/-
Δέκτης: Rag-/-**



← **CFSE**

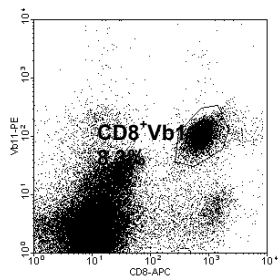
	ΗΜΕΡΑ 3		ΗΜΕΡΑ 6	
	F5	F5PD-1-/-	F5	F5PD-1-/-
M1	0.32	0.13	0.94	0.84
M2	0.73	0.15	1.04	0.49
M3	2.57	0.44	1.49	0.89
M4	11	3.34	4.91	3.09
M5	28.04	8.87	11.74	8.15
M6	30.54	21.67	24.98	16.03
M7	20.1	29.4	26.7	21.71
M8		19.1	13.91	17.14

Γ

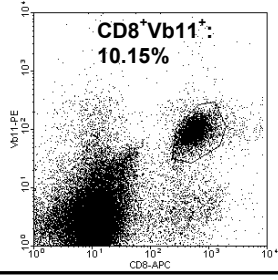
ΣΠΛΗΝΑ

ΗΜΕΡΑ 6

Δότης: F5
Δέκτης: Rag^{-/-}



Δότης: F5PD-1^{-/-}
Δέκτης: Rag^{-/-}

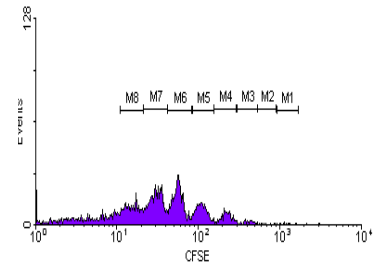
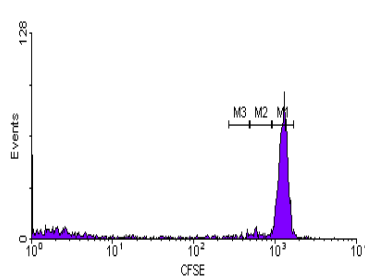
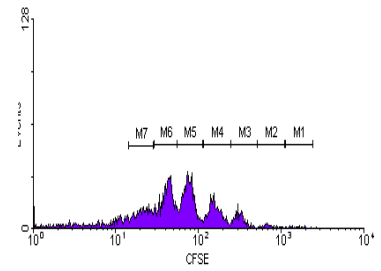
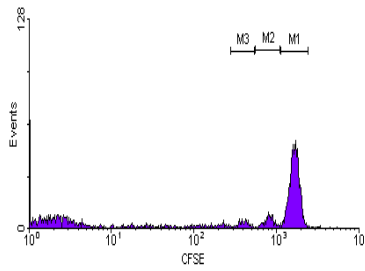


Vb11

CD8

ΗΜΕΡΑ 6

Δότης: F5
Δέκτης: Rag^{-/-}
control

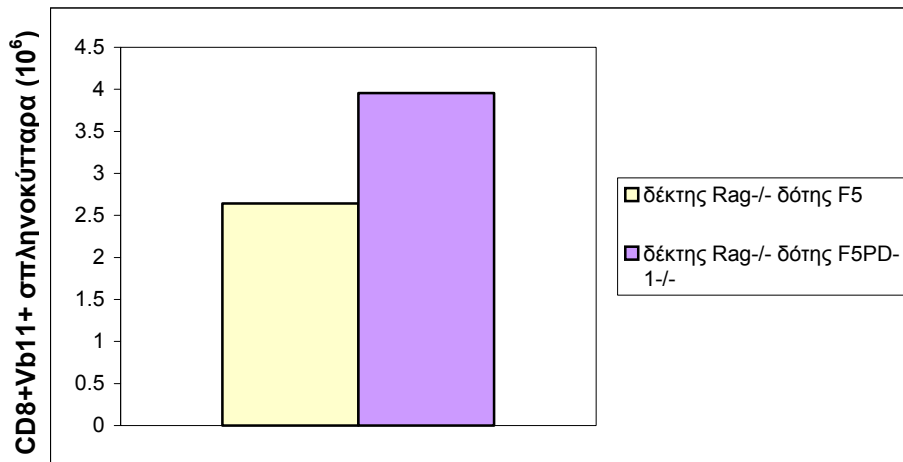


←

CFSE

	F5	F5PD-1 ^{-/-}
M1	0.48	0.45
M2	1.44	0.43
M3	6.22	1.71
M4	14.42	5.19
M5	25.54	11.64
M6	23.99	20.75
M7	12.82	24.65
M8		16.58

Δ



Εικόνα 8 : In vivo πολλαπλασιασμός των F5 και F5PD-1-/- λεμφοκυττάρων. Μεταφέρθηκε ίσος αριθμός CD8⁺Vb11⁺ από F5 και F5PD-1-/- κύτταρα σε Rag-/- δέκτες. Μια ημέρα μετά την μεταφορά των κυττάρων τα ποντίκια δέκτες ενέθηκαν με το πεπτίδιο NP (ημέρα 0). Ως control θεωρούνται τα Rag-/- ποντίκια, τα οποία έχουν δεχτεί F5 και F5PD-1-/- κύτταρα αλλά δεν έχουν ενεθεί με την πρωτεΐνη NP και τα κύτταρά τους δεν διεγείρονται προς πολλαπλασιασμό. Τις ημέρες 1, 3 και 6 πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και την ημέρα 8 τα ζώα θυσιάστηκαν. Παρακολουθήθηκαν οι διαιρέσεις των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. **A)** Απεικονίζεται ο πληθυσμός των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων τις ημέρες 1, 3 και 6. **B)** Απεικονίζονται οι διαιρέσεις των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων τις ημέρες 3 και 6. Ημέρα 1 δεν απεικονίζεται γιατί τα κύτταρα έχουν εξαφανιστεί από την περιφέρεια. **Γ)** Απεικονίζονται στη στήλη δεξιά οι πληθυσμοί των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων και στα αριστερά οι διαιρέσεις των κυττάρων της σπλήνας. **Δ)** Ο μέσος όρος των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων

Το πείραμα επαναλήφθηκε, οι αιμοληψίες έγιναν επιπλέον τις ημέρες 8 και 15 μετά την ένεση με το πεπτίδιο. Στο πείραμα αυτό επαληθεύεται το γεγονός ότι οι διαιρέσεις των CD8⁺Vb11⁺ των F5PD-1-/- ποντικών είναι πιο προχωρημένες σε σύγκριση με των F5. Τα ζώα θυσιάστηκαν την ημέρα 21 και με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής υπολογίστηκε το ποσοστό και ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ σπληνοκυττάρων. Επειδή είχε περάσει μεγάλο χρονικό διάστημα από την μεταφορά των κυττάρων στους δέκτες ο αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων ήταν μικρός και δεν εμφάνιζε κάποια διαφορά ανάμεσα στους δυο γονοτύπους.

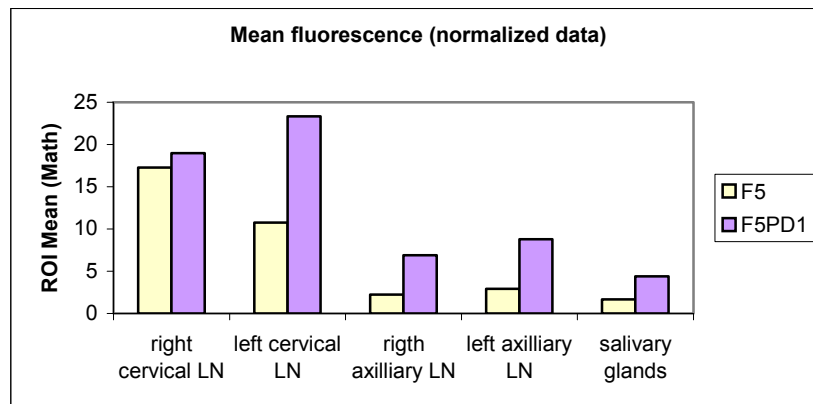
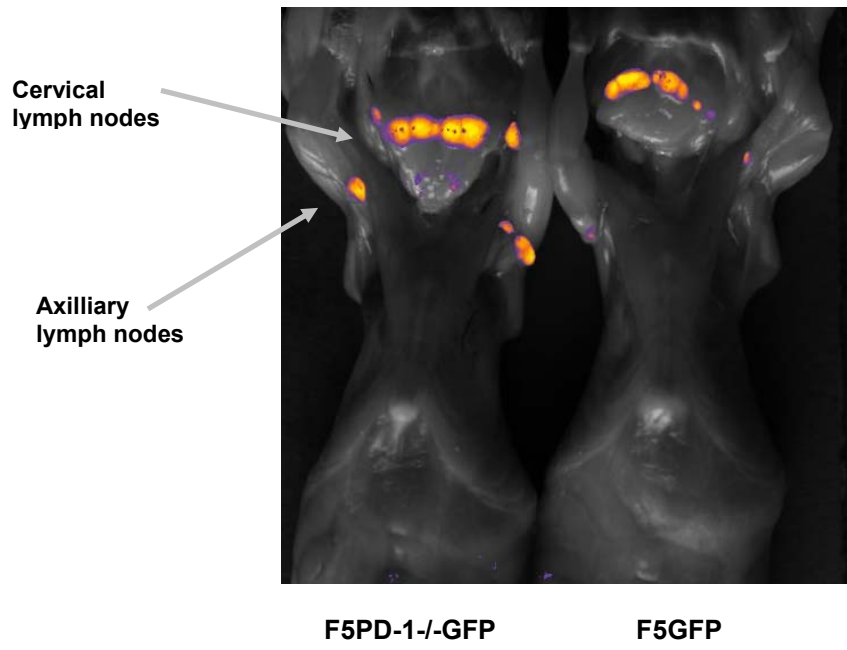
2. ΜΕΡΟΣ Β

2.1 Χρήση της Μοριακής Τομογραφίας Φθορισμού για την μελέτη οργάνων του ανοσοποιητικού

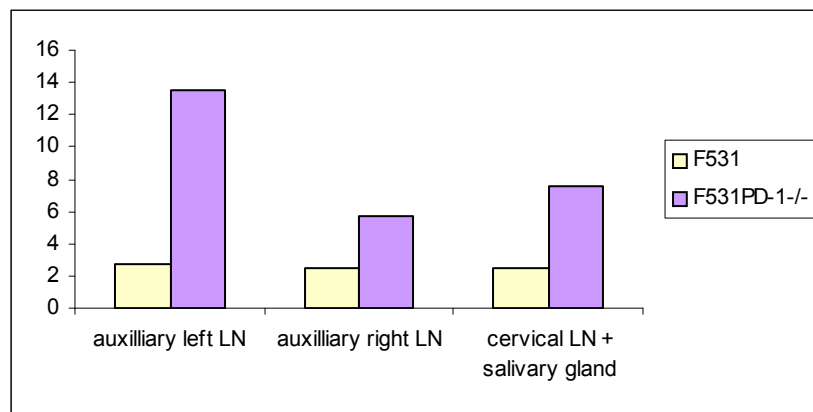
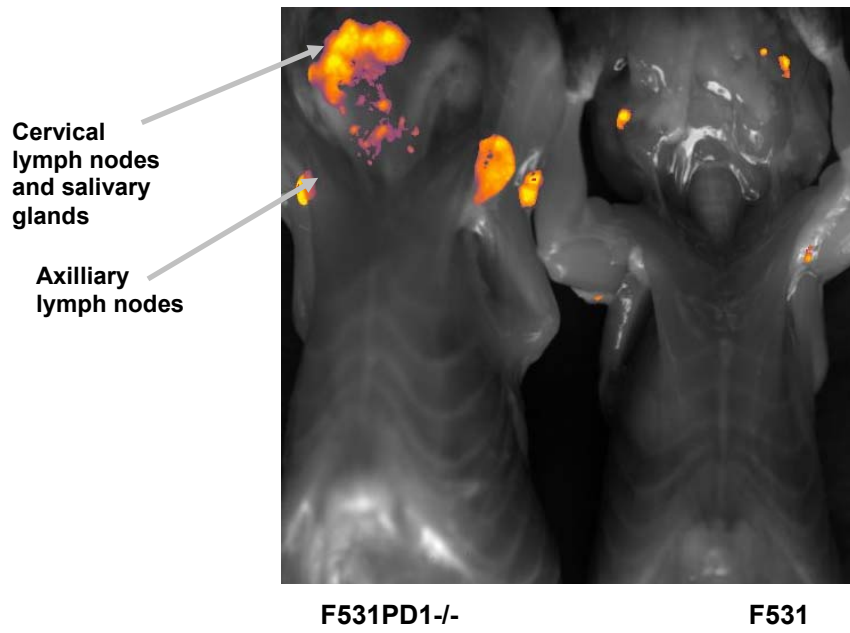
Σκοπός των παρακάτω πειραμάτων είναι η μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος με την μέθοδο της μοριακής τομογραφίας φθορισμού (FMT). Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαγονιδιακά ποντίκια F531, F531PD-1-/-, F5, F5PD-1-/- τα οποία εκφράζουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP υπό τον CD2 υποκινητή στα λεμφοκύτταρα.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης της έντασης του φθορισμού των υπογνάθιων και των μασχαλιαίων λεμφαδένων σε F5GFP, F5PD-1-/-GFP, F531GFP και F531PD-1-/-GFP ποντίκια τα οποία εκφράζουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στα F5 λεμφοκύτταρα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της φθορίζουσας μοριακής τομογραφίας και τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα multiview (labview). Με την μέθοδο αυτή δύναται να ποσοτικοποιηθεί ο φθορισμός της GFP πρωτεΐνης. Έτσι η ένταση της φθορίζουσας πρωτεΐνης είναι ανάλογη με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων που την εκφράζουν. Δηλαδή όσο μεγαλύτερη η ένταση τόσο μεγαλύτερος και ο αριθμός των λεμφοκυττάρων που την εκφράζουν. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι στα F5PD-1-/- ποντίκια η ένταση της GFP πρωτεΐνης άρα και ο αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι μεγαλύτερος και στους υπογνάθιους και στους μασχαλιαίους λεμφαδένες σε σύγκριση με τα F5. Το ίδιο παρατηρείται για τα F531 σε σχέση με τα F531PD-1-/. Επιπλέον στα F531PD-1-/- παρατηρείται διείσδυση των λεμφοκυττάρων στους σιελογόνους αδένες του ποντικού όπου εκφράζεται η NP πρωτεΐνη

A



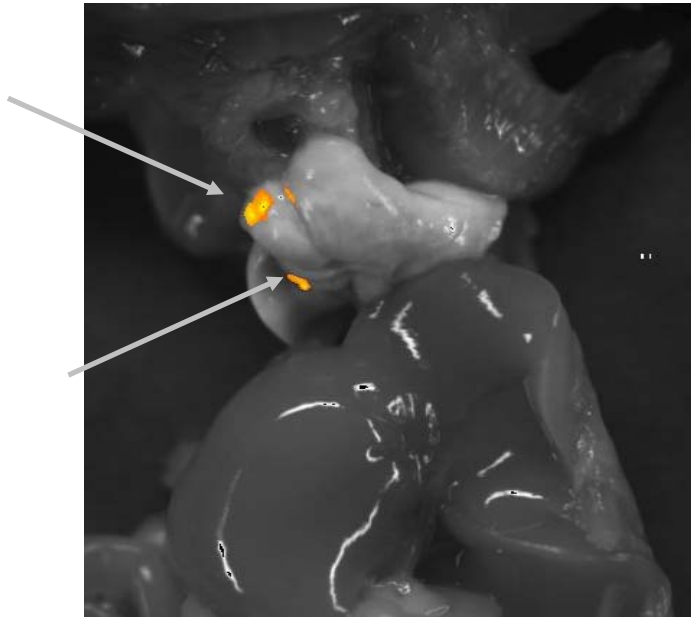
B



Εικόνα 9 : Μέτρηση της έντασης του φθορισμού της GFP πρωτεΐνης **A)** σε F5 GFP και F5PD-1/-GFP ποντίκια. **B)** σε F531GFP και F531PD-1/-GFP ποντίκια. Στα διαγράμματα απεικονίζεται ο φθορισμός των αναφερόμενων οργάνων μετά από κανονικοποίηση.

2.2 Μελέτη της δυνατότητας απεικόνισης σε μεγάλο βάθος με την μέθοδο Μοριακής Τομογραφίας Φθορισμού.

Η απεικόνιση ενός ζωντανού οργανισμού είναι πιο αποτελεσματική όταν η φθορίζουσα πρωτεΐνη που διεγείρεται εκπέμπει σε υψηλά μήκη κύματος, τα οποία σκεδάζονται λιγότερο μέσα στους ιστούς και απορροφώνται επίσης λιγότερο από αυτούς. Αυτό μας παρέχει την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε σε μεγαλύτερο βάθος και με λιγότερο “θόρυβο” τα κύτταρα ή τους ιστούς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές. Μια τέτοια φθορίζουσα πρωτεΐνη είναι και η *Katushka*, η οποία απορροφά στα 588nm και εκπέμπει στα 635nm (Hoffman, 2007). Σύμφωνα με πειράματα που έχουν γίνει κατά την ενδοφλέβια μεταφορά 5×10^6 κυττάρων HeLa που εκφράζουν την Ds-Red φθορίζουσα πρωτεΐνη τα ζώα αποκτούν καρκίνο του πνεύμονα και στις 35 περίπου ημέρες πεθαίνουν από αυτό (Lu et al., 2002). Προκειμένου να μελετηθεί το βάθος στο οποίο είναι δυνατόν να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη *Katushka* μεταφέρθηκαν ενδοφλέβια σε Rag-/- ποντίκια καρκινικά κύτταρα HeLa τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη *Katushka* επαγόμενα σε ένα σύστημα τετρακυκλίνης. Στα ποντίκια αυτά χορηγήθηκε το αντιβιοτικό doxycyclin μέσω του νερού τους με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης της *Katushka*. Στη συνέχεια τα ποντίκια αυτά εξετάστηκαν με το FMT τις ημέρες 26, 35, 43 και 44 μετά την μεταφορά των κυττάρων. Τα ζώα στη συνέχεια θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε απεικόνιση των πνευμόνων τους με την μοριακή τομογραφία φθορισμού. Εξωτερικά σε κανένα από τα τέσσερα ζώα που ενέθηκαν με τα HeLa δεν ήταν εφικτό να παρατηρηθεί πιθανός όγκος στον πνεύμονα. Μετά τον θάνατό τους και το imaging στους πνεύμονες μόνο σε ένα από τα τέσσερα ποντίκια φαίνεται να έχει αναπτυχθεί κάποιος όγκος (εικόνα 10).



Εικόνα 10 : Απεικονίζεται ο όγκος από κύτταρα HeLa-Katushka στον πνεύμονα νεκρού ποντικού. Για το πείραμα 4 Rag^{-/-} ποντίκια δέχτηκαν 5×10^6 κύτταρα HeLa-Katushka και εξετάστηκαν με FMT για εμφάνιση καρκίνου. Τα ζώα θυσιάστηκαν μετά το πείραμα και εξετάστηκαν εκτεθειμένοι οι πνεύμονες τους με FMT για την ύπαρξη κάποιου όγκου που να εκφράζει την πρωτεΐνη Katushka. Σε ένα από τα τέσσερα ποντίκια μόνο εκπέμπεται σήμα την ημέρα 44 μετά την μεταφορά των κυττάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΜΕΡΟΣ Α

Σύμφωνα με μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι ο PD-1 υποδοχέας είναι πολύ σημαντικός για την επίτευξη και διατήρηση της περιφερικής ανοχής και συγκεκριμένα της ανέργειας. Μάλιστα κατά την διακοπή της αλληλεπίδρασής του με τους προσδέτες του παρατηρήθηκε διακοπή της ήδη υπάρχουσας ανέργειας (Tsushima et al., 2007). Επίσης κατά την μεταφορά PD-1^{-/-} OT-1 CD8 T λεμφοκυττάρων σε δέκτες που εκφράζουν το OVA πεπτιδίδιο που αναγνωρίζεται από τον παραπάνω διαγονιδιακό TCR υποδοχέα τα ποντίκια εμφανίζουν αυτοάνοσο σακχαρώδη διαβήτη (Keir et al., 2007). Απουσία δηλαδή του PD-1 υποδοχέα δεν αποκτάται περιφερική ανοχή με αποτέλεσμα τα CD8 T λεμφοκύτταρα να γίνονται κύτταρα τελεστές και να επιτίθενται στους ιστούς του ίδιου του οργανισμού.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό μοντέλο F531 όπου ο F5 υποδοχέας των CD8 T λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει ειδικά την NP 366-374 νουκλεοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα ποντίκια υπό τον *rdx-1* υποκινητή στο πάγκρεας αλλά και σε άλλους ιστούς. Τα F5 κυτταροτοξικά κύτταρα έχουν αναπτύξει περιφερική ανοχή μέσω της κλωνικής απαλοιφής και της ανέργειας λόγω αναγνώρισης της NP πρωτεΐνης κατά την ανάπτυξη του ζώου ως αντιγόνο εαυτού. Το μοντέλο αυτό λοιπόν θα μπορούσαμε να πούμε ότι απεικονίζει καλύτερα την περιφερική ανοχή αφού τα ζώα κατά την ανάπτυξη τους έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο και το αναγνωρίζουν ως αντιγόνο εαυτού. Πρόκειται λοιπόν για ένα μοντέλο στο οποίο είναι δυνατόν να μελετηθούν οι αποκρίσεις των CD8 T λεμφοκυττάρων στο αντιγόνο του εαυτού παρουσία και απουσία του PD-1 υποδοχέα.

Προκειμένου να μελετήσουμε την δράση του PD-1 υποδοχέα στην κλωνική απαλοιφή μετρήθηκε και συγκρίθηκε ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων σε F531 και F531PD-1^{-/-} ποντίκια ηλικίας 12 - 17 εβδομάδων. Από τα πειράματα αυτά δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των CD8⁺Vb11⁺. Σε ότι λοιπόν αφορά την κλωνική απαλοιφή δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον PD-1 στα ποντίκια αυτής της ηλικίας. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε F531PD-1^{-/-} ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας (31-38 εβδομάδες) παρατηρήθηκε μια ανομοιογένεια στον πληθυσμό των CD8⁺Vb11⁺ στα F531PD-1^{-/-} και ένα από τα τρία ζώα εμφάνιζε πολύ μεγάλη απόκλιση στον απόλυτο αριθμό των CD8⁺Vb11⁺ κυττάρων του. Ταυτόχρονα το ποντίκι αυτό εμφανίζει και αντιστοίχως μεγάλο αριθμό συνολικών σπληνοκυττάρων. Από περαιτέρω πειράματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριο παρατηρήθηκε ότι το 30% περίπου των F531PD-1^{-/-} ποντικών εμφανίζουν αυτή την απόκλιση στον αριθμό των CD8⁺Vb11⁺.

Για να μελετήσουμε *in vivo* τον ρόλο του PD-1 υποδοχέα στην διατήρηση της ανέργειας πραγματοποιήσαμε πειράματα παθητικής μεταφοράς F531 και F531PD-1^{-/-} λεμφοκυττάρων σε ποντίκια που εκφράζουν ενδογενώς την NP πρωτεΐνη και παρατηρήσαμε ότι οι διαιρέσεις των F531PD-1^{-/-} είναι παρόμοιες με των F531. Δεν φαίνεται δηλαδή απουσία του PD-1 υποδοχέα να ανατρέπεται η ήδη υπάρχουσα ανέργεια, τα κύτταρα δεν αποκτούν ρόλο τελεστή και δεν πολλαπλασιάζονται. Επίσης κατά την *in vitro* διέγερση των F531 και F531PD-1^{-/-} CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων οι διαιρέσεις τους είναι μη διακριτές και όμοιες.

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι απουσία του PD-1 υποδοχέα τα CD8 λεμφοκύτταρα παράγουν υψηλά ποσά φλεγμονωδών κυτοκινών και συγκεκριμένα IFN- γ (Tsushima et al., 2007). Μετά από *in vitro* διέγερση των F531 και F531PD-1^{-/-} CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων η παραγωγή του TNF- α δεν φαίνεται να διαφέρει. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι ότι τα επίπεδα παραγωγής TNF- α απουσία διέγερσης φαίνεται να είναι πιο υψηλά στα F531PD-1^{-/-} κύτταρα. Βέβαια αυτό το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί και να ελεγχθεί και η παραγωγή και άλλων κυτοκινών προκειμένου να καταλήξουμε σε συμπεράσματα για τον ρόλο του PD-1 στην παραγωγή αυτών.

Συνολικά όμως θα μπορούσαμε να πούμε ότι από τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια μικρής ηλικίας δεν φαίνεται η απουσία του PD-1 να είναι ικανή να αναστρέψει την ήδη υπάρχουσα ανέργεια των F5

κυττάρων σε ότι αφορά τον πολλαπλασιασμό τους. Γι αυτό στραφήκαμε στην μελέτη του ρόλου του μορίου αυτού σε αδαή κύτταρα τα οποία δεν έχουν έρθει ποτέ σε επαφή με το αντιγόνο και είναι ικανά να αποκριθούν σε αυτό. Από τα *in vitro* πειράματα πολλαπλασιασμού των F5 και F5PD-1 CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων παρατηρείται μια τάση ο αριθμός των F5PD-1-/- κυττάρων να είναι μεγαλύτερος από των F5 παρόλο που οι διαιρέσεις τους είναι παρόμοιες. Το πείραμα αυτό θα πρέπει να επαναληφθεί για να δούμε αν αυτή η τάση είναι τελικά στατιστικά σημαντική. Στην περίπτωση που ισχύει θα μπορούσε αυτό να αποδοθεί σε μειωμένο θάνατο των F5PD-1-/- κυττάρων. Από τα *in vivo* πειράματα πολλαπλασιασμού των F5 και F5PD-1-/- CD8⁺Vb11⁺ λεμφοκυττάρων φαίνεται οι διαιρέσεις των F5PD-1-/- κυττάρων να είναι πιο προχωρημένες και κατά την αιμοληψία και μετά την θυσία των ζώων στην σπλήνα.

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της Μοριακής τομογραφίας φθορισμού σε F531GFP, F531PD-1-/-GFP, F5GFP και F5PD-1-/-GFP ποντίκια μεγάλης ηλικίας παρατηρήθηκε ότι στους υπογνάθιους και στους μασχालιαίους λεμφαδένες η ένταση της φθορίζουσας πρωτεΐνης στα F531PD-1-/-GFP και F5PD-1-/-GFP είναι μεγαλύτερη από τα F531GFP και F5GFP αντίστοιχα. Επειδή η ένταση της φθορίζουσας πρωτεΐνης είναι ανάλογη με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων στα όργανα αυτά μπορούμε να πούμε ότι και ο αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι μεγαλύτερος στα F531PD-1-/-GFP και F5PD-1-/-GFP συγκριτικά με τα F531GFP και F5GFP αντίστοιχα. Επίσης στα F531PD-1-/-GFP παρατηρείται διείσδυση των λεμφοκυττάρων στους σιελογόνους αδένες όπου εκφράζεται η NP πρωτεΐνη.

ΜΕΡΟΣ Β

Για την *in vivo* απεικόνιση κυτταρικών λειτουργιών σε μεγάλο βάθος μέσα στον οργανισμό είναι απαραίτητο να αποφύγουμε τον αυτοφθορισμό των ιστών. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν φθορίζουσες πρωτεΐνες, οι οποίες θα εκπέμπουν σε υψηλά μήκη κύματος που δεν απορροφούνται τόσο από τους ιστούς. Μια τέτοια φθορίζουσα πρωτεΐνη που κατασκευάστηκε πρόσφατα είναι και η Katushka, η οποία είναι μια φωτεινή, κόκκινη πρωτεΐνη που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 588nm και μέγιστο εκπομπής στα 635nm (Hoffman, 2007).

Προκειμένου να μελετήσουμε την δυνατότητα απεικόνισης της φθορίζουσας αυτής πρωτεΐνης σε μεγάλο βάθος χρησιμοποιήσαμε ένα μοντέλο δημιουργίας καρκίνου του πνεύμονα στο οποίο τα κύτταρα του όγκου εκφράζουν την πρωτεΐνη Katushka. Ακολουθήθηκε η διαδικασία που έχει περιγραφεί στα αποτελέσματα και τα ζώα απεικονίσθηκαν με την μέθοδο Μοριακής τομογραφίας φθορισμού.. Δεν παρατηρήθηκε κατά την *in vivo* απεικόνιση του ζώου και την επεξεργασία των δεδομένων ο όγκος. Μετά την θυσία του και την απεικόνιση του σε έναν από τους δύο πνεύμονες φαίνεται να έχει αναπτυχθεί όγκος σε δυο

σημεία. Οι λόγοι που πιθανά αυτό δεν ήταν εφικτό να παρατηρηθεί κατά την in vivo απεικόνιση του ζώου είναι ποικίλοι. Λόγω του πρωτοκόλλου δημιουργίας του καρκίνου η θέση στην οποία αναπτύσσεται ο όγκος δεν είναι ελεγχόμενη με αποτέλεσμα να είναι πιθανό να βρίσκεται σε κάποιο σημείο το οποίο δεν είναι καλά εκτεθειμένο για την απεικόνισή του. Επίσης είναι πιθανό το μέγεθος του να είναι πολύ μικρό και αυτό σε συνδυασμό με το βάθος και το σημείο όπου έχει αναπτυχθεί να το καθιστά δύσκολο προς απεικόνιση.

Βιβλιογραφία

1. Ansari M.J.I, Salama A.D., Chitnis T., Smith R.N., Yagita H., Akiba H., Tomohide Y., Azuma M., Iwai H., Khoury S., Auchincloss H., Sayegh M.H., (2003) The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) mice. *J.Exp.Med.*, 198, 63-69.
2. Butte M.J., Keir M.E., Phamduy T.B., Sharpe A.H., Freeman G.J., (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27, 111-122.
3. Charles A.J., Travers P., Walport M., Shlomchik M., (2004) *Immunobiology*.
4. de Boer, J., A. Williams, G. Skavdis, N. Harker, M. Coles, M. Tolaini, T. Norton, K. Williams, K. Roderick, A. J. Potocnik, and D. Kioussis. (2003) Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur. J. Immunol.* 33, 314–325.
5. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L.J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M., Horton H.F., Carreno B.M., Collins M., Wood C.R., Honjo T., (2000) Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.*, 192, 1027-1034.
6. Garofalakis A., Zacharakis G., Meyer H., Economou E.N., Mamalaki C., Papamatthaiakis J., Kioussis D., Ntziachristos V., Ripoll J., (2007) Three-dimensional in vivo imaging of green fluorescent protein-expressing T cells in mice with noncontact molecular tomography. *Mol. Imaging*, 6, 96 – 107.
7. Goldberg M.V., Maris C.H., Hipkiss E.L., Flies A.S., Zhen L., Tuder R.M., Grosso J.F., Harris T.J., Getnet D., Whartenby K.A., Brockstedt D.G., Dubensky T.W., Chen L., Pardoll D.M., Drake C.G., (2007) Role of PD-1 and its ligand B7-1 in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood* 110, 186-192.
8. Hoffman R.M., (2007) A better fluorescent protein for whole body imaging. *Trends in Biotechnol.*, 26, 1 - 4.

9. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H., (2007) PD-1 and its ligands in Tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.*, 26, 677-704.
10. Keir M.E., Freeman G.J., Sharpe A.H., (2007) PD-1 regulates self-reactive CD8⁺ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J. Immunol.* 179, 5064-5070.
11. Liang S.C., Latchman Y.E., Buhlmann J.E., Tomczak M.F., Horwitz B.H., et al. (2003). Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 2706–2716.
12. Lu J., Chen H., Chu R.Y., Lin T.E., Hsu P., Huang M., Tseng C., Hsiao M., (2002) Establishment of red fluorescent protein-tagged HeLa tumor metastasis models : Determination of DsRed2 insertion effects and comparison of metastatic patterns after subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous injection. *Clinical and experimental metastasis*, 20, 121-133.
13. Mamalaki, C., T. Norton, Y. Tanaka, A. R. Townsend, P. Chandler, E. Simpson, and D. Kioussis. (1992) Thymic depletion and peripheral activation of class II major histocompatibility complex-restricted T cells by soluble peptide in T-cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11342–11346.
14. Nishimura H., Minato N., Nakano T., Honjo T., (1998) Immunological studies on PD-1 deficient mice : implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International Immunology*, 10, 1563-1572.
15. Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N., Honjo T., (1999) Development of Lupus-like autoimmune diseases by disruption of the *PD-1* gene encoding an ITIM Motif-carrying immunoreceptor., *Immunity*, 11, 141-151.
16. Nishimura H., Okazaki T., Tanaka Y., Nakatani K., Hara M., Matsumori A., Sasayama S., Mizoguchi A., Hiai H., Minato N., Honjo T., (2001) Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291, 319-322.
17. Ntziachristos V., Ripoll J., Wang L.V., Weissleder R., (2005) Looking and listening to light : the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat. Biotechnol.*, 23, 313 – 320.
18. Redmond W.L., Linda A. Sherman L.A., (2005) Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes., *Immunity*, 22, 275–284.
19. Salama A.D., Chitnis T., Imitola J., Ansari M.J., Akiba H., Tushima F., Azuma M., Yagita H., Sayegh M.H., Khoury S.J., (2003). Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 198, 71–78
20. Spanopoulou, E., C. A. Roman, L. M. Corcoran, M. S. Schlissel, D. P. Silver, D. Nemazee, M. C. Nussenzweig, S. A. Shinton, R. R. Hardy, and D. Baltimore. (1994) Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice. *Genes Dev.* 8, 1030–1042.
21. Tushima F., Yao S., Shin T., Flies A., Flies S., Xu H., Tamada K., Pardoll D.M., Chen L., (2007) Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood*, 110, 180-185.
22. Walker L.S.K., Abbas A.K., (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 11-19.

23. Wang J., Yoshida T., Nakaki F., Hiai H., Okazaki T., Honjo T., (2005) Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *PNAS*, 102, 11823-11828.
24. Weissleder R., Ntziachristos V., (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.*, 9, 123 – 128.
25. Zhu B, Guleria I, Khosroshahi A, Chitnis T, Imitola J, Azuma M., Yagita H., Sayegh M.H., Khoury S.J., (2006). Differential role of programmed death-ligand 1 and programmed death-ligand 2 in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 176, 3480–3489