

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννης Γ. Χατζηδάκης

*Ομοιοστατικοί μηχανισμοί κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων
σε μοντέλα διαγονιδιακών και ελλειματικών ποντικών*



ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2002

Η εργασία αυτή έγινε υπό την καθοδήγηση της Δρ. Κλ. Μαμαλάκη

Η επταμελής επιτροπή αξιολόγησης ήταν:

1. Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ, Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Ανάγνου Νικόλαος, Καθηγητής
3. Μπούμπας Δημήτριος, Καθηγητής
4. Σαββάκης Χαράλαμπος, Καθηγητής
5. Δελιδάκης Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής
6. Καραγωγέως Δόμνα, Αναπληρωτής Καθηγητής
7. Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Περιεχόμενα

| | |
|---|-----------|
| Εισαγωγή | 8 |
| 1. Το ανοσοποιητικό σύστημα | 8 |
| 2. Ανάπτυξη και επιβίωση T κυττάρων | 13 |
| 3. Ενεργοποίηση T κυττάρων | 19 |
| 4. Κύτταρα τελεστές | 24 |
| 5. Ανοχή T κυττάρων | 25 |
| 5.1 Κεντρική Ανοχή | 26 |
| 5.2 Περιφερική ανοχή T κυττάρων | 27 |
| 5.2.1 Μηχανισμοί και μοντέλα περιφερικής ανοχής | 27 |
| 5.2.2 Το μοριακό υπόβαθρο της περιφερικής ανοχής | 29 |
| 6. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) | 31 |
| 6.1 Σηματοδότηση μέσω των TNFRs | 32 |
| 6.2 Ο ρόλος του TNF στα T κύτταρα | 35 |
| 6.2.1 Ο ρόλος του TNF στον AICD | 36 |
| 6.2.2 TNF και αυτοάνοσες ασθένειες που μεσολαμβάνονται από T κύτταρα | 37 |
| 7. Fas και T κύτταρα | 38 |
| | |
| <u>Αποτελέσματα</u> | 41 |
| 1. Μελέτες πάνω στην ανοχή CD8 T κυττάρων σε μοντέλο διπλά διαγονιδιακών ποντικών | 41 |
| 1.0 Ερωτήματα-Προσεγγίσεις | 41 |
| 1.1 Η ανοχή στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια οφείλεται σε κλωνική απαλοιφή και ανάπτυξη ανέργειας στην περιφέρεια | 42 |
| 1.2 Το υπεραντιγόνο SEA προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των ανέργων F5/NP CD8 T κυττάρων in vitro και in vivo | 47 |
| 1.3 Προσπάθειες εύρεσης γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή ή/και την διατήρηση του ανέργου φαινοτύπου | 52 |
| 1.3.1 Σύγκριση μεταγραφικού προτύπου παρθένων και ανέργων CD8 T κυττάρων | 52 |
| 1.3.2 Το προϊόν T.52.76 εκφράζεται διαφορετικά σε άνεργα F5/NP CD8 T κύτταρα | 56 |
| 1.3.3 Σύγκριση μεταγραφικού προτύπου μεταξύ ανέργων CD8 T κυττάρων και κυττάρων με αναστροφή του ανέργου φαινοτύπου | 60 |

| | |
|---|------------|
| 2. Διαμόρφωση αποκρίσεων των CD8 T κυττάρων από τον ενδογενή TNF | 62 |
| 2.0 Ερωτήματα-Προσεγγίσεις | 62 |
| 2.1 Μειωμένοι αριθμοί περιφερικών F5 T κυττάρων και ελαττωματικοί μηχανισμοί ομοιόστασης απουσία ενδογενούς TNF | 63 |
| 2.2 Η απουσία του ενδογενούς TNF δε μεταβάλλει τη θετική επιλογή των F5 θυμοκυττάρων, επηρεάζει όμως μερικώς την απόκρισή τους στο πεπτίδιο-αγωνιστή | 67 |
| 2.3 Χαμηλότερες αποκρίσεις των F5/TNF ^{-/-} T κυττάρων μετά από αντιγονική διέγερση | 70 |
| 2.4 Το φαινόμενο της μικρότερης ενεργοποίησης των TNF ^{-/-} T κυττάρων είναι πολυκλωνικό | 75 |
| 2.5 Ελαττωμένη ενεργοποίηση των NF-κB και NF-ATp στα F5/TNF ^{-/-} T κύτταρα | 75 |
| 2.6 Η εγγύς σηματοδότηση μέσω T υποδοχέα δεν επηρεάζεται ποιοτικά στα F5/TNF ^{-/-} T κύτταρα | 81 |
| 2.7 Η περιφερική ανοχή απουσία ενδογενούς TNF είναι ελαττωματική στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια | 82 |
| 2.8 Η αφύσικα μικρή απαλοιφή των F5/TNF ^{-/-} T κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση σε αντιγόνο είναι χαρακτηριστικό που εξαρτάται μόνο από τα T κύτταρα | 82 |
| 2.9 Ελαττωματική επαγωγή ανέργειας στα F5 T κύτταρα μετά από χρόνια έκθεση σε αντιγόνο εν απουσία του TNF | 86 |
| 3. Ο ρόλος του ενδογενούς Fas σε αποκρίσεις των CD8 T κυττάρων | 88 |
| 3.1 Η <i>lpr</i> μεταλλαγή υποβαθμίζει την ικανότητα επιβίωσης των F5 T κυττάρων σε νέα ποντίκια | 88 |
| 3.2 Φυσιολογική περιφερική ανοχή απουσία λειτουργικού ενδογενούς Fas στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια | 88 |
| 3.3 Η σύγχρονη ανενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εκπορεύονται από Fas και TNFRs δεν είναι αρκετή για την εξάλειψη του AICD των F5 CD8 T κυττάρων in vivo. | 91 |
| | |
| <u>Συζήτηση</u> | 93 |
| <u>Υλικά-Μέθοδοι</u> | 106 |
| <u>Βιβλιογραφία</u> | 119 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει αναπτύξει μηχανισμούς για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών. Παράλληλα με αυτούς αναπτύχθηκαν και ομοιοστατικοί μηχανισμοί που επαναφέρουν το σύστημα κοντά στην αρχική του κατάσταση και επιπλέον μηχανισμοί αποτρέπουν την ανοσοαπάντηση εναντίον συστατικών του εαυτού. Η δεύτερη αυτή ομάδα μηχανισμών ονομάζεται συνολικά ανοσολογική ανοχή. Η ανοχή των T λεμφοκυττάρων μπορεί να εγκαθιδρυθεί είτε στο θύμο (κεντρική ανοχή) ή/και στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα (περιφερική ανοχή).

Για να μελετήσουμε την περιφερική ανοχή των CD8 T λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήσαμε ποντίκια διαγονιδιακά για την πρωτεΐνη NP του ιού της γρίπης. Επίσης χρησιμοποιήσαμε ποντίκια διαγονιδιακά για έναν συγκεκριμένο T υποδοχέα, τον F5, που αναγνωρίζει έναν επίτοπο της πρωτεΐνης NP παρουσιάζόμενο από το τάξης I MHC μόριο D^b. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν διπλά διαγονιδιακά ποντίκια F5/NP. Στα F5/NP ποντίκια δεν παρατηρείται αυξημένη αρνητική επιλογή των F5 θυμοκυττάρων (κεντρική ανοχή). Αντίθετα υπάρχει έκδηλη κλωνική απαλοιφή των F5 CD8 T κυττάρων στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα των F5/NP ποντικίων. Επιπλέον τα εναπομείναντα CD8 T κύτταρα είναι άνεργα μιας και δεν πολλαπλασιάζονται σε δεύτερη διέγερση στο NP αντιγόνο *in vitro*. Η υποδραστικότητα των F5/NP CD8 T λεμφοκυττάρων οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην ανικανότητά τους να αυξήσουν τα επίπεδα του υποδοχέα της IL-2 ώστε να μη μπορούν να αξιοποιήσουν επαρκώς την IL-2, κάτι που πιθανώς εξηγεί την μερική μόνο αναστροφή του άνεργου φαινοτύπου μετά την προσθήκη εξωγενούς IL-2. Επιβεβαιωτικό του ότι η ανέργεια των F5 T λεμφοκυττάρων επάγεται πράγματι στην περιφέρεια είναι πως περιφερικά παρθένα F5 κύτταρα που μεταφέρονται σε NP αποδέκτες καθίστανται άνεργα μετά από κάποια χρονική περίοδο. Στα παραπάνω μοντέλα δείξαμε ότι πριν την επαγωγή ανέργειας έχει προηγηθεί ενεργοποίηση των F5 CD8 T κυττάρων όπως υποδηλώνουν οι αυξημένοι μάρτυρες ενεργοποίησης αλλά και η κλωνική επέκταση των F5 T κυττάρων στα πειράματα μεταφοράς. Έτσι, η επαγωγή ανέργειας στα παραπάνω μοντέλα προέρχεται κυρίως από παρατεταμένη έκθεση στο αντιγόνο που παρουσιάζεται από κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές (APCs) και όχι από έλλειψη συνδιέγερσης.

Προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε νέα γονίδια που να εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση ή/και στην επαγωγή της ανέργειας στα F5/NP CD8 T κύτταρα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία του mRNA Differential Display σε RNAs από παρθένα F5 CD8 T κύτταρα και άνεργα F5/NP CD8 T κύτταρα. Μετά από μια σχετικά εκτεταμένη

αναζήτηση βρήκαμε ότι ένα μετάγραφο που αντιστοιχεί στο γονίδιο SLP-65 εκφράζεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό στα άνεργα F5/NP CD8 T κύτταρα σε σχέση με τα παρθένα F5.

Περαιτέρω, θελήσαμε να μελετήσουμε το ρόλο των πρωτεϊνών TNF και Fas της TNF/TNFR υπεροικογένειας στο προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα στα CD8 T κύτταρα. Έτσι χρησιμοποιώντας τα παραπάνω συστήματα διαγονιδιακών ποντικών σε συνδυασμό με ποντίκια με ανενεργό το *tnf* ή *fas* γονίδιο μελετήσαμε την επίδραση του TNF και του Fas στις κλωνοτυπικές αποκρίσεις των CD8 T κυττάρων σε αντιγόνα αλλά και τη συνεισφορά τους στην επιβίωση και εν γένει στην ομοίωση των CD8 T κυττάρων.

Συγκεκριμένα, δείξαμε ότι η ανυπαρξία ενδογενούς TNF έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένους αριθμούς περιφερικών F5 κυττάρων καθώς και ελαττωμένη ικανότητα τους για ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό μετά από μεταφορά τους σε λεμφοπενικούς αποδέκτες. Μάλιστα αυτή η ικανότητα επηρεάζεται από την ικανότητα έκφρασης TNF από τα T λεμφοκύτταρα και όχι από τον αποδέκτη.

Επιπλέον, δείξαμε ότι τα F5/TNF^{-/-} CD8 T κύτταρα αποκρίνονται σε μικρότερο βαθμό στο αντιγόνο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε σχέση με F5, δηλαδή διαιρούνται με μικρότερο ρυθμό και εκφράζουν σε χαμηλότερο βαθμό χαρακτηριστικούς επιφανειακούς μάρτυρες ενεργοποίησης. Αυτή η μειωμένη ενεργοποίηση των F5/TNF^{-/-} T κυττάρων συνοδεύεται και από μειωμένο αποπτωτικό θάνατο που επάγεται από την ενεργοποίηση τους (AICD). Η επίδραση της TNF μεταλλαγής δεν περιορίζεται στον F5 κλώνο καθώς και TNF^{-/-} T κύτταρα έχουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και αποπτωτικού θανάτου όταν διεγερθούν πολυκλωνικά με α -CD3. Οι ελαττωματικές αποκρίσεις των TNF^{-/-} T κυττάρων μετά από διέγερση του TCR συνδέονται με τη μειωμένη ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B και NF-ATp που ανιχνεύσαμε σε F5/TNF^{-/-} κύτταρα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο TNF έχει έναν σημαντικό ρόλο στην περιφερική ανοχή των CD8 T λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα, παρουσιάζεται μειωμένη κλωνική απαλοιφή των *en* δυνάμει αυτοδραστικών F5/NP T κυττάρων στο TNF^{-/-} υπόβαθρο. Επιπλέον τα F5/NP/TNF^{-/-} CD8⁺ T κύτταρα έχουν σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα σε επαναδιέγερσή τους με αντιγόνο *in vitro* σε σχέση με τα ομόλογά τους από F5/NP ζώα. Επιβεβαιωτικά, σε πειράματα μεταφοράς παρθένων F5 κυττάρων σε NP αποδέκτες παρουσία ή απουσία TNF, η επαγωγή ανέργειας ήταν λιγότερο αποτελεσματική στη δεύτερη περίπτωση.

Συνολικά λοιπόν τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι ο ενδογενής TNF μπορεί να διαμορφώνει μια πλειάδα λειτουργιών των CD8 T κυττάρων και αυτό οφείλεται στο ότι

ενισχύει την TCR σηματοδότηση τόσο για συνδέτες χαμηλής όσο και για συνδέτες υψηλής συγγένειας.

Τα πειράματά μας με Ipr ποντίκια (μεταλλαγή που καθιστά ανενεργό το γονίδιο *fas*) έδειξαν ότι ο Fas έχει έναν ρόλο, αν και μικρό, στην συντήρηση του φυσιολογικού αριθμού περιφερικών F5 CD8 T κυττάρων σε νεαρά ποντίκια και μάλιστα η σύγχρονη έλλειψη TNF και Fas δρα προσθετικά στην μείωση των περιφερικών F5 CD8 T λεμφοκυττάρων.

Η έλλειψη του Fas, δεν επηρεάζει τον αποπτωτικό θάνατο που επάγεται από ενεργοποίηση στα F5 T κύτταρα *in vivo* όπως έδειξαν πειράματα μεταφοράς λεμφοκυττάρων σε NP αποδέκτες. Μάλιστα δεν γίνεται ορατός κάποιος ρόλος του Fas στον θάνατο αυτό ακόμα και όταν ελλείπει συγχρόνως και ο TNF. Επίσης, ο ενδογενής Fas δεν έχει κάποιο εμφανή ρόλο στην κλωνική απαλοιφή των F5/NP CD8 T κυττάρων αλλά ούτε και στον άνεργο φαινότυπο των εναπομείναντων κυττάρων.

SUMMARY

Vertebrates have developed complex immune systems comprised of cells, molecules and mechanisms capable to cope with invading microorganisms. It is equally important that mechanisms assuring immune system homeostasis and protection of self-tissues from immune reactivity are developed too. The latter group of mechanisms is collectively called immunological tolerance. T cell tolerance can be established either in the thymus (central tolerance) or/and in the peripheral lymphoid organs (peripheral tolerance).

To study the peripheral CD8 T cell tolerance we used transgenic mice expressing the NP nucleoprotein of an influenza virus. We also used TCR transgenic mice expressing the F5 T cell receptor, which is able to recognize an NP epitope in the context of the D^b MHC I molecule, and double transgenic F5/NP mice. There is no negative selection (central tolerance) observed in F5/NP thymocytes. However, there is a marked clonal deletion of F5 CD8 T cells in the periphery of F5/NP mice. Moreover, F5 cells that escaped clonal deletion have become severely hyporeactive to a second challenge with antigen *in vitro*, a state that is termed T cell anergy. F5/NP CD8 T cells hyporeactivity is at least partly due to low IL-2 receptor expression following stimulation and that probably explains the partial reversion of the anergic phenotype after addition of exogenous IL-2, since anergic F5/NP T cells can not properly utilize this cytokine. More evidence that tolerance induction in F5/NP mice takes place in the periphery is the fact that naïve F5 T cells transferred to NP expressing recipients are soon rendered anergic in host's tissues. Using the models described above, we showed that anergy induction of F5 T cells is preceded by activation as judged by high expression of surface activation markers and clonal expansion of F5 T cells in transfer experiments. This indicates that in our models anergy is induced by chronic exposure to antigen presented by APCs and not by lack of costimulation.

We tried to identify novel genes that are involved in the induction and/or the persistence of anergy in F5/NP CD8 T cells. To do so we used the mRNA Differential Display technology on RNA populations from purified naïve F5 and anergic F5/NP CD8 T cells. After an extensive pursuit we ended up with one differentially expressed transcript corresponding to the SLP-65 gene, which is upregulated in the anergic F5/NP T cells compared to the naïve F5.

In this study, we also tried to assess the role of TNF and Fas, two members of the TNF/TNFR superfamily, on the adaptive immune system and specifically on CD8 T cells.

In particular, we showed that lack of endogenous TNF results to lower numbers of peripheral F5 cells as well as to reduced homeostatic proliferation after adoptive transfer to lymphopenic hosts. It is of interest that T cell derived rather than host derived TNF has the major contribution to homeostatic expansion of transferred F5 T cells.

Furthermore we showed that F5/TNF^{-/-} CD8 T cells respond to the antigen, in vitro and in vivo, in a lesser extent compared to F5 ones. Namely, they exhibit a lower division rate and express lower levels of surface activation markers after encountering the antigen. The lower degree of activation is accompanied and can be correlated with lower activation induced cell death (AICD). This influence of TNF mutation is not restricted to the F5 T cell clone but is rather polyclonal since α -CD3 activation of TNF^{-/-} T cells results to less activation and AICD compared to TNF^{+/+} T cells. These defective TNF^{-/-} T cell responses can be well attributed, at least partly, to defective NF- κ B and NF-ATp activation that we have identified in F5/TNF^{-/-} T cells.

Our results showed that TNF plays a non-compensatory role in CD8 T lymphocyte tolerance. Potentially autoreactive F5/NP T cells undergo decreased clonal deletion in a TNF^{-/-} background. In addition F5/NP/TNF^{-/-} cells that escaped clonal deletion are considerably reactive after rechallenge with NP antigen in vitro compared to F5/NP. On top of that, anergy induction is compromised when transferring naïve F5 CD8 T cells in NP recipients the absence of TNF.

Overall our results point out to a pivotal role of TNF on modulating CD8 T cell functions by enhancing TCR signaling for both low and high affinity ligands.

Our results with *lpr* mice (a mutation that renders *fas* gene inactive) showed that Fas has a minor role in the maintenance of normal populations of peripheral naïve F5/CD8 T cells in young mice. Moreover, there is an additive effect of the Fas mutation to the TNF mutation as far as it concerns numbers of peripheral F5 CD8 T cells.

There is no obvious participation of Fas to activation induced apoptosis of F5 T cells in vivo as judged by transfer experiments in NP expressing mice. In addition, there was no discernible role of Fas in this type of experiments even if F5 T cells were unable to produce both TNF and Fas.

There is also not an apparent role of endogenous Fas either to F5/NP CD8 T cells clonal deletion or to the establishment of their anergic phenotype.

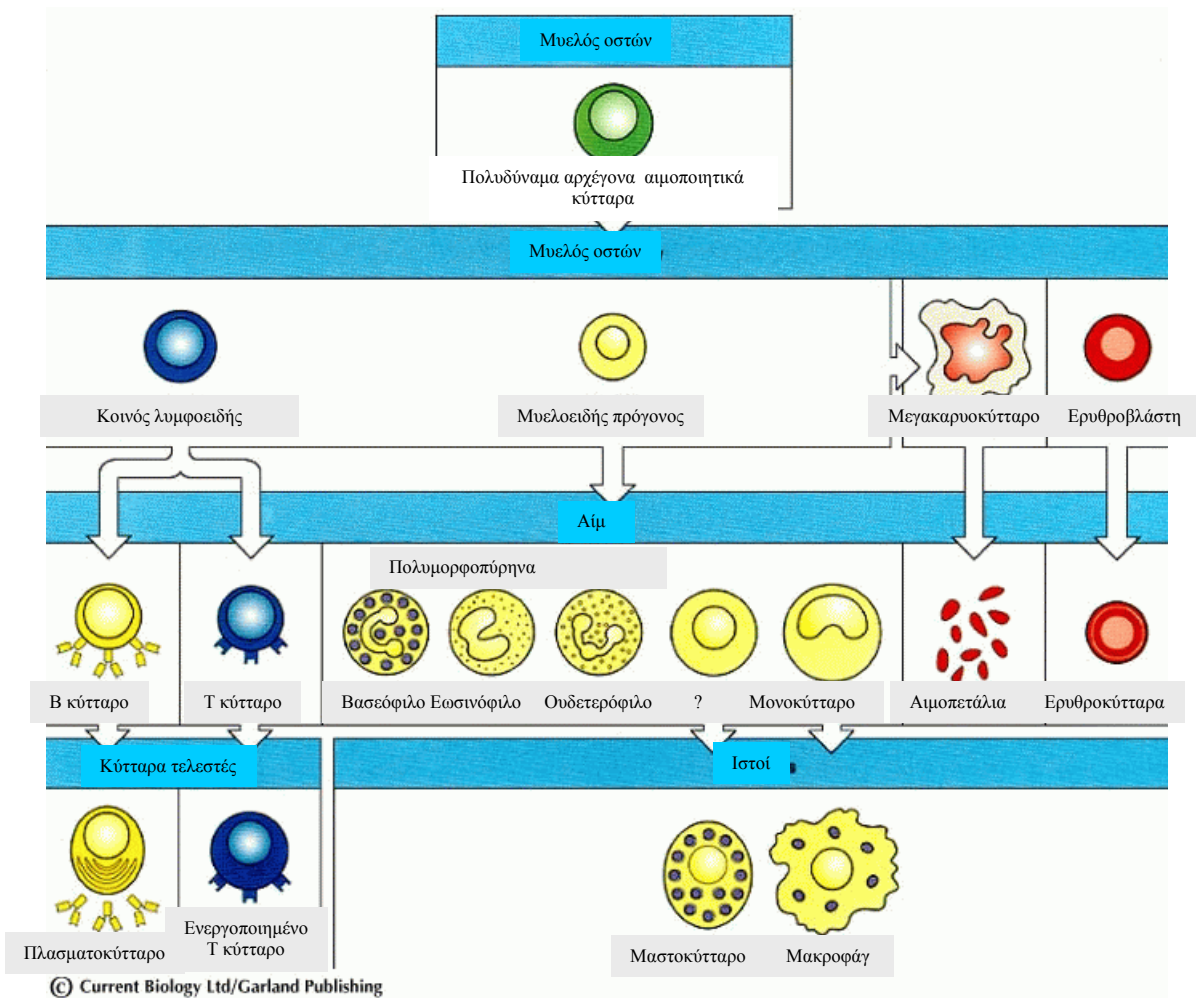
Εισαγωγή

1. Το ανοσοποιητικό σύστημα

Οι ανοσοαπαντήσεις απαρτίζονται από συνδυασμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του οργανισμού και των προστατευτικών μορίων που παράγουν μετά από την συνάντησή τους με παθογόνους μικροοργανισμούς ή αντιγόνα. Ο σκοπός τους είναι να αποτρέψουν τις επικίνδυνες για την ακεραιότητα του οργανισμού εισβολές και κατόπιν να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση. Το ανοσοποιητικό σύστημα δεν έχει να αντιμετωπίσει μόνο τις εξωτερικής προέλευσης εισβολές που προέρχονται κυρίως από μικροοργανισμούς, αλλά και τις πιθανές εκ των έσω επιθέσεις από καρκινικά κύτταρα ή τις επιθέσεις από ίδιες αμυντικές δυνάμεις δηλαδή περιπτώσεις κατά τις οποίες το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται εναντίον κυττάρων ή ιστών του εαυτού (αυτοανοσία).

Υπάρχει μεγάλη πολυπλοκότητα σε αυτές τις ανοσοαπαντήσεις και κατά επέκταση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η πολυπλοκότητά του προέκυψε από τη ανάπτυξη προσαρμοστικών μηχανισμών στους ιούς, βακτήρια, και άλλα παράσιτα για να παρακάμψουν την ανοσοαπάντηση του ξενιστή. Συνεπακόλουθα, κατάλληλοι μηχανισμοί εξελίχθηκαν και στους ξενιστές για να παραμείνουν ικανοί στην αντιμετώπιση των εισβολέων.

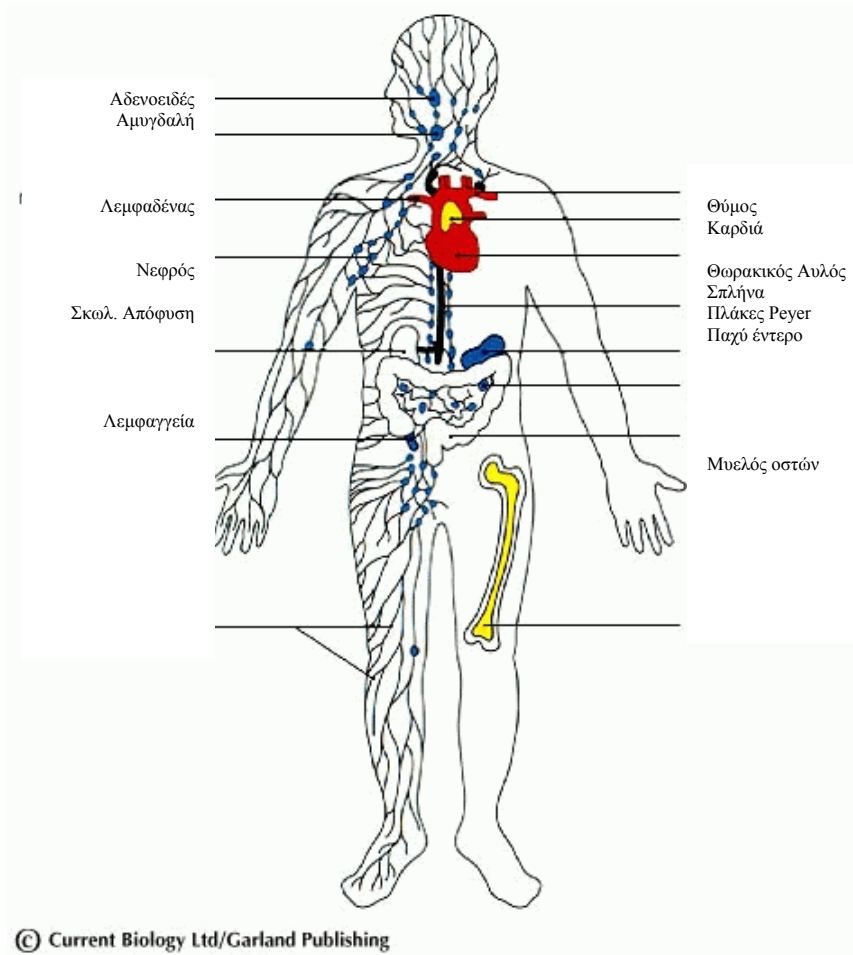
Σε μία ολοκληρωμένη ανοσοαπάντηση συμμετέχουν δύο επιμέρους συστήματα: Το σύστημα της πρωταρχικής (innate) και μη ειδικής ανοσίας και το σύστημα της προσαρμόσιμης (adaptive) και ειδικής ανοσίας. Το σύστημα της πρωταρχικής ανοσίας παρέχει μια γενική, πάντα διαθέσιμη και άμεση απόκριση απέναντι σε εισβολείς. Οι καταβολές της πρωταρχικής ανοσίας βρίσκονται στα ασπόνδυλα και περιλαμβάνει μηχανισμούς φαγοκύττωσης, χημειοτακτισμού, κυτταρικής κίνησης και συντονισμένης δράσης. Στο σύστημα πρωταρχικής ανοσίας των θηλαστικών περιλαμβάνονται και προστατευτικές πρωτεΐνες του πλάσματος, ειδικά φαγοκύτταρα (κοκκιώδη ή κοκκιοκύτταρα) και φυσικοί φραγμοί όπως το δέρμα και οι βλεννογόνοι. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ανοσοαπάντησης είναι ο τρόπος με τον οποίο το πρωταρχικό και το προσαρμόσιμο σύστημα αλληλεπιδρούν. Στην αλληλεπίδραση αυτή παίζουν μείζονα ρόλο δύο τύποι κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα (DC), και οι φυσικοί φονείς (Natural Killers, NK). Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τοποθετημένα σε στρατηγικά σημεία στο σώμα των



Εικόνα Α. Κυτταρικά συστατικά του αίματος. Απεικονίζονται οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι του αίματος καθώς και τα στάδια διαφοροποίησής τους σε αδρές γραμμές

θηλαστικών όπως στο δέρμα (όπου ονομάζονται κύτταρα Langerhans), τους πνεύμονες το ήπαρ και τους νεφρούς όπου δεσμεύουν και «πέπτουν» τους εισβολείς. Η είσοδος ενός μολυσματικού παράγοντα επάγει μια φλεγμονώδη απόκριση, που μεσολαβείται από άλλα κύτταρα της πρωταρχικής ανοσίας, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Τότε, τα DC που έχουν προσλάβει το αντιγόνο το μεταφέρουν στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα όπου και το παρουσιάζουν σε ειδικά B και T λεμφοκύτταρα για να ξεκινήσει η ειδική, προσαρμόσιμη ανοσοαπάντηση. Τα NK κύτταρα μεσολαβούν και αυτά την σύνδεση του πρωταρχικού με το προσαρμόσιμο σύστημα, παράγουν κυττοκίνες που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα διάφορων κυτταρικών τύπων και επιπλέον μπορούν να σκοτώσουν καρκινικά ή κύτταρα μολυσμένα με ιό.

Όλα τα κυτταρικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος είναι μυελογενούς προέλευσης. Δύο είναι οι πρόγονοι κυτταρικοί τύποι που μπορούν να ανασυστήσουν ένα πλήρες ανοσοποιητικό σύστημα., ο μυελοειδής πρόγονος και ο κοινός λεμφοειδής πρόγονος. Ο μυελοειδής πρόγονος είναι ο πρόδρομος των κοκκιοκυττάρων (ή πολυμορφοπύρηνα) και των μακροφάγων (τύπος φαγοκυττάρων κατανεμημένα σε όλο το σώμα). Υπάρχουν τρεις τύποι κοκκιοκυττάρων: Τα ουδετερόφιλα, που είναι και αυτά φαγοκύτταρα, και αποτελούν το πιο πολυάριθμο και σημαντικό κυτταρικό συστατικό της πρωταρχικής ανοσίας. Τα εωσινόφιλα που είναι σημαντικά κυρίως στην άμυνα εναντίον παρασίτων. Τα βασεόφιλα που συμμετέχουν στην προστασία των βλεννωδών επιφανειών του σώματος και απελευθερώνουν ισταμίνη κατά τις αλλεργικές αντιδράσεις, κάτι που κάνουν και τα μαστοκύτταρα. (Εικόνα Α). Ο κοινός λεμφοειδής πρόγονος είναι ο πρόδρομος των λεμφοκυττάρων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι λεμφοκυττάρων τα B κύτταρα και τα T κύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την εξειδίκευση της ανοσοαπάντησης και περίπου 2×10^{12} από αυτά απαρτίζουν το ώριμο λεμφοειδές σύστημα στον άνθρωπο. Αν και, τόσο τα B όσο και τα T κύτταρα έχουν καταβολές στο μυελό των οστών μόνο τα B κύτταρα ωριμάζουν εκεί, ενώ τα πρόδρομα T κύτταρα μεταναστεύουν στο θύμο για την ωρίμανσή τους. Μετά την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων στα κεντρικά λεμφοειδή όργανα (μυελό των οστών και θύμο) φεύγουν από αυτά και είναι πλέον ικανά για να αποκριθούν στα αντιγόνα που μπορούν να αναγνωρίσουν. Αν και τα παθογόνα μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό από πολλές πύλες, τα αντιγόνα και τα λεμφοκύτταρα θα συναντηθούν κυρίως στα δευτερεύοντα ή περιφερικά λεμφοειδή όργανα (σπλήνα, λεμφαδένες, πλάκες του Peyer, αμυγδαλές, σκωληκοειδής απόφυση). Οι λεμφαδένες είναι στρατηγικά τοποθετημένα σημεία σύγκλισης ενός εκτεταμένου συστήματος λεμφαγγείων



Εικόνα Β. Κατανομή των λεμφοειδών οργάνων στο ανθρώπινο σώμα.

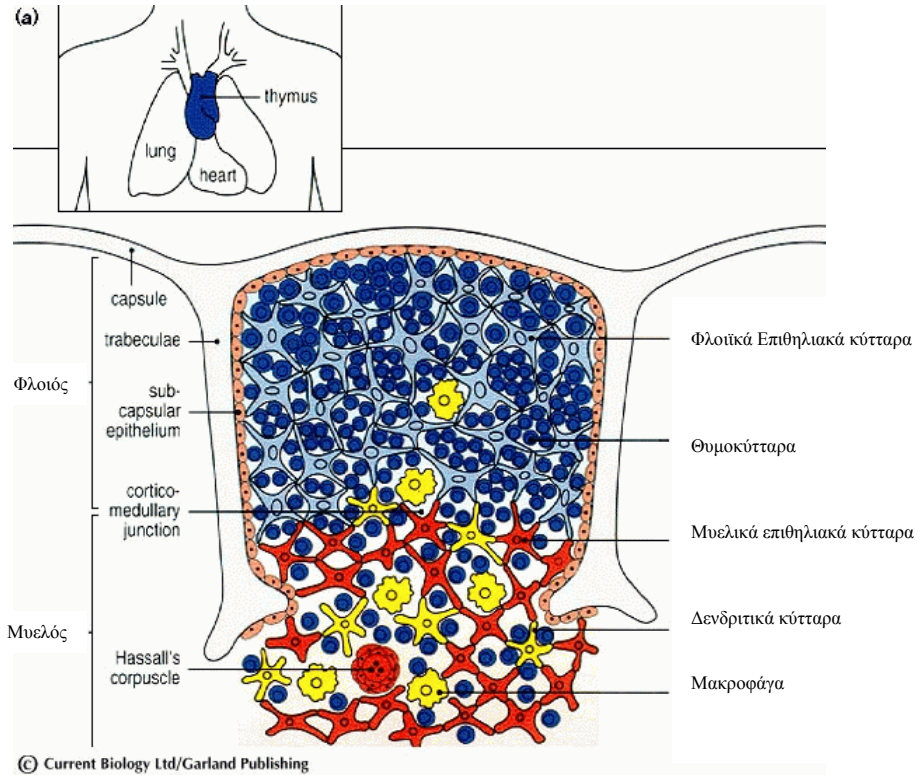
(Εικόνα Β) που συλλέγουν και μεταφέρουν εξωκυττάριο υγρό από τους ιστούς και το επιστρέφουν στο αίμα. Έτσι τα λεμφοαγγεία μπορούν να μεταφέρουν αντιγόνα από το σημείο της μόλυνσης στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα, ή να μεταφέρουν κύτταρα που έχουν μολυνθεί από παθογόνα ή τα έχουν ενδοκυττώσει (όπως στην περίπτωση των DC, ουδετερόφιλων και μακροφάγων). Αυτό μαζί με το γεγονός ότι και τα λεμφοκύτταρα μπορούν να κυκλοφορούν μεταξύ λέμφου και αίματος αυξάνει την πιθανότητα συνάντησης «αντιγόνου»-λεμφοκυττάρου. Η εξειδίκευση που παρουσιάζουν τα Β και Τ κύτταρα για το αντιγόνο οφείλονται στους αντιγονικούς υποδοχείς που φέρουν στην επιφάνειά τους (Β υποδοχέας BCR: B Cell Receptor, Τ υποδοχέας TCR: T Cell Receptor). Κάθε Τ ή Β κύτταρο φέρει κατά κανόνα υποδοχείς μόνο μίας ειδικότητας που έχουν μεγάλη εξειδίκευση για ένα δεδομένο δομικό μοτίβο, και ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν δημιουργηθεί κατά τα στάδια ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων μέσω μιας μοναδικής διαδικασίας ανασυνδυασμού των γενετικών τόπων των δύο αλυσίδων τους γνωστής σαν V(D)J ανασυνδυασμός. Μετά τη συνάντηση του ώριμων Β ή Τ κυττάρων με το αντιγόνο και υπό κατάλληλες συνθήκες, αυτά διεγείρονται και αρχίζει η προσαρμόσιμη ανοσοαπάντηση. Στα τελικά στάδια της διέγερσης τους τα Β κύτταρα μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν μεγάλες ποσότητες διαλυτών αντισωμάτων IgG που μπορούν να αδρανοποιήσουν πρωτεΐνες των παθογόνων μικροοργανισμών, ή να προάγουν τη λύση και τη φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή κυττάρων του ξενιστή μολυσμένων με ιό με τη συμμετοχή φαγοκυττάρων και μορίων του συμπληρώματος (ομάδα πρωτεϊνών του πλάσματος). Σε αντίθεση με τα Β, τα Τ κύτταρα δεν μπορούν να αναγνωρίσουν «γυμνά» αντιγόνα, αλλά μόνο μικρά πεπτίδια τα οποία τους παρουσιάζονται στην επιφάνεια κυττάρων-αντιγονοπαρουσιαστών (Antigen Presenting Cells:APC) συνδεδεμένα με μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex:MHC). Τα τάξης II MHC μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των «επαγγελματιών» κυττάρων-αντιγονοπαρουσιαστών (Β κύτταρα, δενδριτικά, μακροφάγα), παρουσιάζουν τα αντιγονικά πεπτίδια μέσα σε μία κοιλότητά τους στα Τ βοηθητικά κύτταρα (T_H ή CD4). Τα T_H κύτταρα χαρακτηρίζονται από τον CD4 συνυποδοχέα ο οποίος έρχεται σε επαφή με μία μη μεταβλητή περιοχή του τάξης II μορίου του APC. Τα τάξης I MHC μόρια υπάρχουν σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και δεσμεύουν πεπτίδια από πρωτεΐνες-εαυτού ή από ενδοκυττάρια παθογόνα όπως ιούς και μερικά βακτήρια. Τα πεπτίδια αυτά παρουσιάζονται στα Τ κυτταροτοξικά κύτταρα (T_C, ή CTL ή CD8). Αυτά χαρακτηρίζονται από τον CD8 συνυποδοχέα που έρχεται σε επαφή με μία μη μεταβλητή περιοχή του τάξης I μορίου (1, 2).

Τα ώριμα T κύτταρα αποκρίνονται στη διέγερση του αντιγονικού τους υποδοχέα TCR οδηγούμενα σε πολλαπλασιασμό (κλωνική επέκταση: clonal expansion), διαφοροποίηση και έκκριση κυττοκινών. Τα CD4 κύτταρα χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με το πρότυπο έκκρισης κυττοκινών. Τα Th1 (T helper 1), που εκκρίνουν κυρίως ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και ιντερφερόνη γ (IFN γ), και τα Th2 (T helper 2) που εκκρίνουν κυρίως IL-4, IL-5, IL-6 και IL-10. Οι κυττοκίνες τύπου I βοηθούν στον έλεγχο ιικών μολύνσεων ενεργοποιώντας τα NK και τα CD8 κύτταρα, ενώ οι κυττοκίνες τύπου II, και κύρια οι IL-4, IL-5, σχετίζονται με ανοσοαπαντήσεις σε εξωκυτταρικά παράσιτα και με την εκδήλωση αλλεργιών, καθώς επάγουν την παραγωγή IgE αντισωμάτων από τα B κύτταρα και ενισχύουν την ανάπτυξη των μαστοκυττάρων (1).

2. Ανάπτυξη και επιβίωση T κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε η ανάπτυξη των T κυττάρων γίνεται στο θύμο τα οποία ενόσω βρίσκονται στο όργανο αυτό ονομάζονται θυμοκύτταρα . Ο θύμος αποτελείται από πολυάριθμα λοβίδια που το καθένα αποτελείται από δύο διακριτές μοίρες. Τη φλοιική (cortex) και τη μυελική (medulla). Ο θύμος ενός νεαρού ζώου περιέχει πολλούς πρόδρομους T κυττάρων που κείτονται σε ένα επιθηλιακό δίκτυο, το στρώμα του θύμου. Αυτό περιέχει και μεγάλο αριθμό κυττάρων μυελογενούς προέλευσης. Ο φλοιός περιέχει άωρα θυμοκύτταρα, διάσπαρτα μακροφάγα και φλοιϊκά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ο μυελός περιέχει πιο ώριμα θυμοκύτταρα μαζί με δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα (Εικόνα Γ). Ο ρυθμός παραγωγής T κυττάρων από το θύμο μικραίνει σημαντικά μετά την εφηβεία και αυτό συνοδεύεται από συρρίκνωση του θύμου (3).

Τα πρόδρομα κύτταρα όταν φθάνουν στο θύμο από το μυελό των οστών δεν φέρουν τα περισσότερα από τα μόρια επιφανείας που χαρακτηρίζουν τα ώριμα T κύτταρα, ανάμεσα σε αυτά και τον TCR. Σε αυτό το στάδιο μπορούν να δώσουν είτε δενδριτικά κύτταρα του θύμου ή αβ ή γδ θυμοκύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις τους με το στρώμα του θύμου επάγουν διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και την έκφραση των πρώτων μορίων ειδικών για T κύτταρα, όπως το CD2. Στο τέλος αυτής της φάσης φέρουν, μάρτυρες χαρακτηριστικούς της T σειράς (lineage), αλλά δεν εκφράζουν καμία αλυσίδα του T υποδοχέα, ούτε κανέναν από τους συνυποδοχείς CD4, CD8. Λόγω της έλλειψης και των δύο συνυποδοχέων, τα θυμοκύτταρα στο στάδιο αυτό ονομάζονται διπλά αρνητικά. Τα διπλά αρνητικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν το 5% των συνολικών θυμοκυττάρων και είναι αρκετά ετερογενή. Το

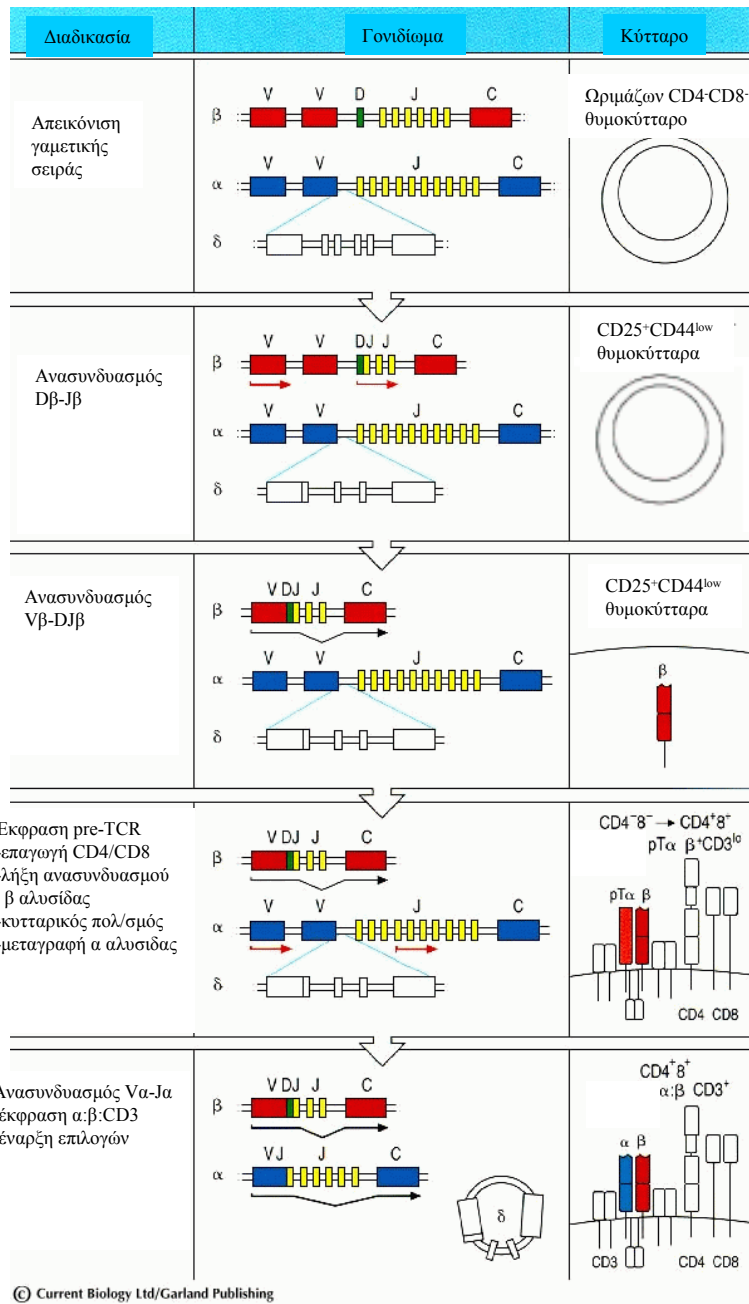


Εικόνα Γ. Η κυτταρική οργάνωση του θύμου. Ο θύμος βρίσκεται πάνω από την καρδιά και αποτελείται από πολυάριθμα λοβίδια που το καθένα περιέχει διακριτές φλοιϊκές και μυελικές περιοχές.

20% των είναι κύτταρα που έχουν ανασυνδυάσει και εκφράσει στην επιφάνειά τους τις αλυσίδες του γδ T υποδοχέα και ένα άλλο 20% φέρει αβ T υποδοχείς μικρής ποικιλότητας. Το υπόλοιπο 60% που είναι και τα «κλασσικά» διπλά αρνητικά κύτταρα δίνουν τελικά ώριμα γδ και κυρίως αβ T κύτταρα (1, 2).

Ένα από τα πρώιμα γεγονότα στην ωρίμανση των διπλά αρνητικών θυμοκυττάρων είναι ο ανασυνδυασμός της β-αλυσίδας του T υποδοχέα. Στην Εικόνα Δ φαίνονται τα στάδια ανασυνδυασμού και έκφρασης των α και β αλυσίδων του T υποδοχέα και δίπλα τα αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια των θυμοκυττάρων. Τα Dβ γονιδιακά τμήματα ανασυνδυάζονται με τα Jβ και κατόπιν τα Vβ με τα DJβ. Ο ανασυνδυασμός των τμημάτων της β αλυσίδας αλλά και της α και των γ, δ, και των βαριών και ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών μεσολαβείται κυρίως από τις λεμφοειδικές πρωτεΐνες Rag-1 και Rag-2. Αν δεν μπορέσει να συντεθεί λειτουργική β αλυσίδα από κανένα από τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα του κυττάρου τότε αυτό θα πεθάνει εκτός και αν ανασυνδυάσει επιτυχώς τις γ και δ αλυσίδες του.

Αν έχει δημιουργηθεί λειτουργική β αλυσίδα, αυτή συνεκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου με τη μη μεταβλητή αλυσίδα pTα (pre-T-cell receptor α chain) σχηματίζοντας έτσι τον πρώιμο TCR (pre-TCR). Η κυτταρική σηματοδότηση που εκπορεύεται από τον pre-TCR καθορίζει εν μέρει την διαφοροποίηση προς την α:β T σειρά (σε σχέση με γ:δ), σταματά τον ανασυνδυασμό της β αλυσίδας στο άλλο αλληλόμορφο (αλληλικός αποκλεισμός) και προάγει την επιβίωση των θυμοκυττάρων. Αυτά γίνονται μέσω κινητοποίησης Ca^{2+} και ενεργοποίησης των παραγόντων NF-κB και NF-AT (4, 5). Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι έντονος στο στάδιο αυτό και οδηγεί στην παραγωγή των πρώιμων $CD4^+CD8^+$ θυμοκυττάρων (διπλά θετικά θυμοκύτταρα, DP: Double Positive). Ακολουθεί ο Vα-Jα ανασυνδυασμός στον γενετικό τόπο της α αλυσίδας και αν δημιουργηθεί λειτουργική α αλυσίδα τα κύτταρα θα εκφράσουν τον τυπικό αβ υποδοχέα στην επιφάνεια τους, σε χαμηλό όμως επίπεδο ($CD4^+CD8^+$ αβ TCR^{low}). Τα κύτταρα αυτά θα μπορέσουν να επιβιώσουν για λίγο μόνο χρόνο, εκτός αν επιλεχθούν θετικά.. Η θετική επιλογή των θυμοκυττάρων διασφαλίζει ότι ο οργανισμός θα διαθέτει «χρήσιμα» ώριμα T κύτταρα με ικανότητα αναγνώρισης πεπτιδίων παρουσιαζομένων από MHC μόρια. Τα $CD4^+CD8^+$ αβ TCR^{low} θυμοκύτταρα που θα αναγνωρίσουν σύμπλοκα MHC/πεπτίδιο πάνω σε φλοιϊκά επιθηλιακά κύτταρα και θα δεχθούν σήμα «μέτριου επιπέδου» θα επιβιώσουν και είναι υποψήφια για να διαφοροποιηθούν σε ώριμα μονά θετικά (SP: Single Positive), $CD4$ ή $CD8$, θυμοκύτταρα. Η σηματοδότηση τούτη μεσολαβείται από τον TCR και



Εικόνα Δ . Τα στάδια ανασυνδυασμού και έκφρασης των α, β αλυσίδων του T υποδοχέα (TCR). Δείχνεται η αλληλουχία ανασυνδυαστικών γεγονότων, τα αναπτυξιακά στάδια που γίνονται αυτά καθώς και τα επιφανειακά μόρια που χαρακτηρίζουν κάθε στάδιο.

υποβοηθείται από τους συνυποδοχείς CD4 ή CD8 που δεσμεύουν μη πολυμορφικές περιοχές των τάξης II και I MHC μορίων αντίστοιχα. Τα θυμοκύτταρα που ο TCR τους αναγνωρίζει πεπτίδια πάνω σε τάξης II MHC μόρια θα διαφοροποιηθούν προς CD4⁺ T κύτταρα ενώ αυτά που ο TCR τους αναγνωρίζει πεπτίδια πάνω σε τάξης I MHC μόρια θα διαφοροποιηθούν προς CD8⁺. Τα πεπτίδια που είναι κατάλληλα για να παρέχουν το «μέτριου επιπέδου» σήμα για τη θετική επιλογή είναι κυρίως πεπτίδια-ανταγωνιστές και όχι αγωνιστές οι οποίοι παρέχουν ισχυρότερο σήμα. Η θετική επιλογή των ανώριμων CD4⁺CD8⁺ θυμοκυττάρων μέσω χαμηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεων MHC/πεπτίδια, και με βάση πειραματικά δεδομένα ότι τέτοιες αλληλεπιδράσεις δεν διεγείρουν τα ώριμα T κύτταρα, υπονοεί ότι τα DP θυμοκύτταρα είναι πιο ευαίσθητα σε συνδέτες (ligands) χαμηλής συγγένειας σε σχέση με τους ώριμους απογόνους τους (αν και κάτω από ορισμένες συνθήκες και τα ώριμα T κύτταρα αποκρίνονται σε χαμηλής συγγένειας συνδέτες π.χ. ομοιστατικός πολλαπλασιασμός) (6). Σημαντικό είναι ότι περίπου το 95% των CD4⁺CD8⁺ θυμοκυττάρων δεν έχουν αρκετή συνάφεια (avidity) για σύμπλοκα MHC/πεπτιδίου, και πεθαίνουν από αμέλεια (neglect) μέσω αποπτωτικού θανάτου (1-3).

Η αρνητική επιλογή είναι σχεδιασμένη για να αφαιρεί από το ρεπερτόριο των T κυττάρων, εκείνους τους κλώνους με υψηλή δραστικότητα για συστατικά του εαυτού. Τούτο είναι αναγκαίο για την επαγωγή ανοχής (κεντρική ανοχή) και την αποτροπή αυτοάνοσων ασθενειών. Έτσι, κατά την αρνητική επιλογή απαλείφονται, επίσης με απόπτωση, τα κύτταρα που δέχονται ισχυρή σηματοδότηση μέσω του TCR, κάτι που σημαίνει ότι προκαλείται κυρίως από πεπτίδια-αγωνιστές και όχι μερικώς αγωνιστές ή ανταγωνιστές. Η περιοχή του θύμου στην οποία επιτελείται η αρνητική επιλογή δεν είναι ξεκαθαρισμένη αλλά μάλλον γίνεται κύρια στη μυελική αλλά και στη φλοιϊκή μοίρα. Τα ώριμα πλέον θυμοκύτταρα παραμένουν στο μυελό του θύμου για κάποιο επιπλέον διάστημα (για αδιευκρίνιστους λόγους) και κατόπιν ελευθερώνονται στο εξωθυμικό περιβάλλον (1, 2).

Μετά την επιλογή και ωρίμανση των T κυττάρων στο θύμο τα κύτταρα που εισέρχονται στην περιφέρεια ονομάζονται παρθένα (naïve) (επειδή δεν έχουν συναντήσει το πεπτίδιο-αγωνιστή) και κυκλοφορούν μεταξύ των δευτερευόντων λεμφοειδών οργάνων μέχρι να συναντήσουν το αντιγόνο. Η οργάνωση των πολλών κυτταρικών τύπων που απαρτίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα απαιτεί πολύπλοκους ομοιοστατικούς μηχανισμούς για να διασφαλιστεί η παρουσία του κάθε κυτταρικού τύπου σε κατάλληλους αριθμούς ώστε να διατηρείται η φυσιολογική λειτουργία του συστήματος. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να ελέγχουν την παραγωγή λεμφοκυττάρων, την δραστικότητα και διαίρεση των ώριμων

λεμφοκυττάρων και τέλος των θανάτο τους. Οι πληθυσμοί των B και T λεμφοκυττάρων φαίνεται να ρυθμίζονται ανεξάρτητα (7). Τα πειράματα που γίνονται για την εξαγωγή τέτοιων συμπερασμάτων περιλαμβάνουν μεταφορά B ή T κυττάρων ή και των δύο τύπων σε αποδέκτες που δεν έχουν B ή T ή καθόλου λεμφοκύτταρα (λεμφοπενικοί), σε διαφορετικούς συνδυασμούς (adoptive transfer experiments). Η δεξαμενή των περιφερικών T κυττάρων αποτελείται κυρίως από παρθένα T κύτταρα και κύτταρα-μνήμης τα οποία έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο στο παρελθόν. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι υποδεξαμενές των παρθένων και των κυττάρων μνήμης υπόκεινται σε ξεχωριστή ρύθμιση. Έτσι, μετά από μεταφορά κυττάρων μνήμης σε ποντίκια-αποδέκτες ελλειμματικά για T κύτταρα, τα κύτταρα μνήμης αυξάνουν σε αριθμό (ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός) μέχρι να γίνουν ίσα με αυτά ενός φυσιολογικού ποντικίου. Επιπλέον, δεν είναι δυνατόν να αυξηθεί τεχνητά η υποδεξαμενή των T κυττάρων μνήμης με μεταφορά μεγάλου αριθμού κυττάρων μνήμης. Η ντετερμινιστική εξήγηση για τις δύο ανεξάρτητες υποδεξαμενές είναι ότι από τη μια δεν πρέπει να εκτοπίζονται τα παρθένα κύτταρα ώστε να εξασφαλίζεται η ποικιλομορφία του ρεπερτορίου των T κυττάρων, και από την άλλη πρέπει να υπάρχει ένας επαρκής αριθμός T κυττάρων μνήμης ώστε να εξασφαλίζονται αποτελεσματικές ανοσοαποκρίσεις.(8).

Αν και τα CD4 και CD8 κύτταρα αναγνωρίζουν διαφορετικά MHC μόρια και επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, φαίνεται να υπάρχει επικάλυψη στη ρύθμιση των περιφερικών υποδεξαμενών τους. Έτσι, οι αριθμοί των ολικών T κυττάρων είναι σχετικά φυσιολογικοί σε ποντίκια ελλειμματικά σε τάξης I ή τάξης II MHC ή στους συνυποδοχείς CD4, CD8. Επιπλέον, η μεταφορά μικρού αριθμού T κυττάρων σε αποδέκτες χωρίς T κύτταρα, οδηγεί σε επέκτασή τους (expansion), η οποία καταστέλλεται από συν-μεταφορά μεγάλου αριθμού CD4 ή CD8 T κυττάρων (9, 10) Επίσης σε ποντίκια διαγονιδιακά για TCR που η μεγάλη πλειοψηφία των T κυττάρων τους είναι CD4 ή CD8 (ανάλογα με τον TCR, εξαιτίας του αλληλικού αποκλεισμού) ο ολικός τους αριθμός είναι σχεδόν φυσιολογικός. Όμως σίγουρα υπάρχει κάποια διάκριση μεταξύ των CD4 και CD8 υποδεξαμενών αφού η αναλογία CD4:CD8 είναι αυστηρά ρυθμισμένη στα φυσιολογικά ποντίκια και μετά από μεταφορά μεγάλου αριθμού CD4 ή CD8 λεμφοκυττάρων επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα (11).

Όμως ποιοι είναι οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την επιβίωση και την ικανότητα ανανέωσης των παρθένων T κυττάρων στην περιφέρεια; Πολλές ερευνητικές ομάδες έδειξαν ότι τα MHC μόρια είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της περιφερικής δεξαμενής των παρθένων T κυττάρων αλλά όχι και των T κυττάρων μνήμης (12). Σε διάφορα πειραματικά συστήματα, τα παρθένα CD4 T κύτταρα απαιτούν την παρουσία των τάξης II MHC μορίων για τη μακροχρόνια επιβίωσή τους (13-15). Σε μία από αυτές τις αναφορές

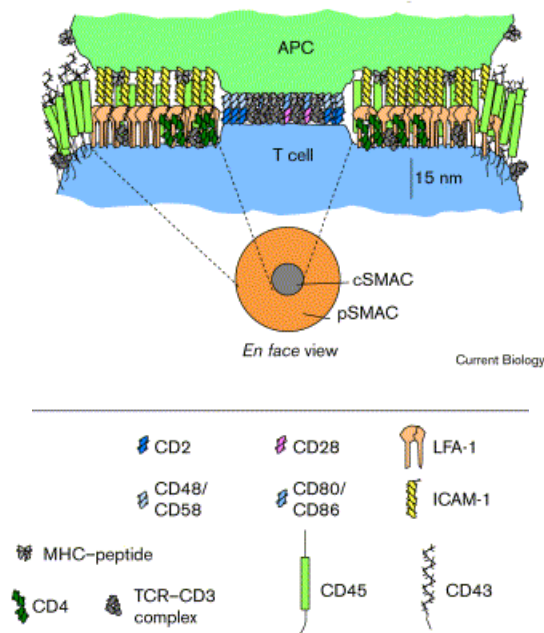
δείχθηκε ότι για τούτο αρκεί ή έκφραση του τάξης II MHC μορίου μόνο σε δενδριτικά κύτταρα (15). Αντιστοίχως και τα περιφερικά παρθένα CD8 T κύτταρα απαιτούν την παρουσία τάξης I MHC μορίων για τη μακροχρόνια επιβίωσή τους. Έτσι, σε πειράματα μεταφοράς παρθένων CD8 T κυττάρων, διαγονιδιακών για TCR, σε αποδέκτες ελλειμματικούς για MHC I μόρια, τα κύτταρα αυτά γρήγορα απέκλιναν σε αριθμό (16, 17). Μάλιστα η επιβίωσή τους φαίνεται να εξαρτάται αυστηρά από το συγκεκριμένο MHC I αλληλόμορφο που μεσολάβησε τη θετική επιλογή στο θύμο (17). Πρόσφατα όμως υπήρξε μια αναφορά ότι η επιβίωση παρθένων CD4 T κυττάρων δεν συνδέεται άμεσα με την αλληλεπίδραση του TCR τους με MHC μόρια (18) κάτι που αλλάζει την αντίληψη για την επιβίωση των παρθένων T κυττάρων και δημιουργήσε μία επιστημονική διχογνωμία. (19). Τελευταία δείχθηκε ότι και κυττοκίνες, όπως η IL-7, εμπλέκονται τόσο στην επιβίωση όσο και στον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό παρθένων CD8 T κυττάρων (20). Τα μοριακά μονοπάτια που διέπουν την επιβίωση των παρθένων T κυττάρων φαίνεται να είναι εν μέρει διαφορετικά από αυτά που διέπουν τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό, καθώς η έλλειψη λειτουργικής Lck (βλ.επόμενη παράγραφο) επηρεάζει μόνο τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό αλλά όχι και την επιβίωση των παρθένων T κυττάρων (21).

Οι παραπάνω απαιτήσεις των CD8 κυττάρων για MHC I μόρια δεν είναι αναγκαίες για την επιβίωση των CD8 T κυττάρων μνήμης. Για παράδειγμα, CD8+ T κύτταρα μνήμης μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται ομοιοστατικά σε λεμφοπενικούς αποδέκτες ακόμα και χωρίς την έκφραση MHC I μορίων (16, 17), γεγονός που υπονοεί ότι η επιβίωσή τους δεν απαιτεί σηματοδότηση μέσω TCR. Τουλάχιστο για τα CD8 T κύτταρα μνήμης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ομοιόστασή τους (επιβίωση και πολλαπλασιασμός απουσία αντιγόνου) ρυθμίζεται θετικά από την IL-15 (22, 23), μια κυττοκίνη που παράγεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους αλλά όχι από T κύτταρα.(24). Επιπλέον για τη δημιουργία και την επιβίωση CD8 T κυττάρων μνήμης σημαντικό ρόλο παίζει η IL-7 (20).

3. Ενεργοποίηση T κυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε η ενεργοποίηση του T κυττάρου από το αντιγόνο γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασης των T υποδοχέων με συνδέτες αποτελούμενους από πεπτιδικά αντιγόνα (πεπτίδια-αγωνιστές) και μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας. Για να διασφαλιστεί όμως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των T κυττάρων, πρέπει μια ποικιλία βοηθητικών μορίων και μορίων προσκόλλησης των T κυττάρων να αλληλεπιδράσει με τους αντίστοιχους υποδοχείς στα APC. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες

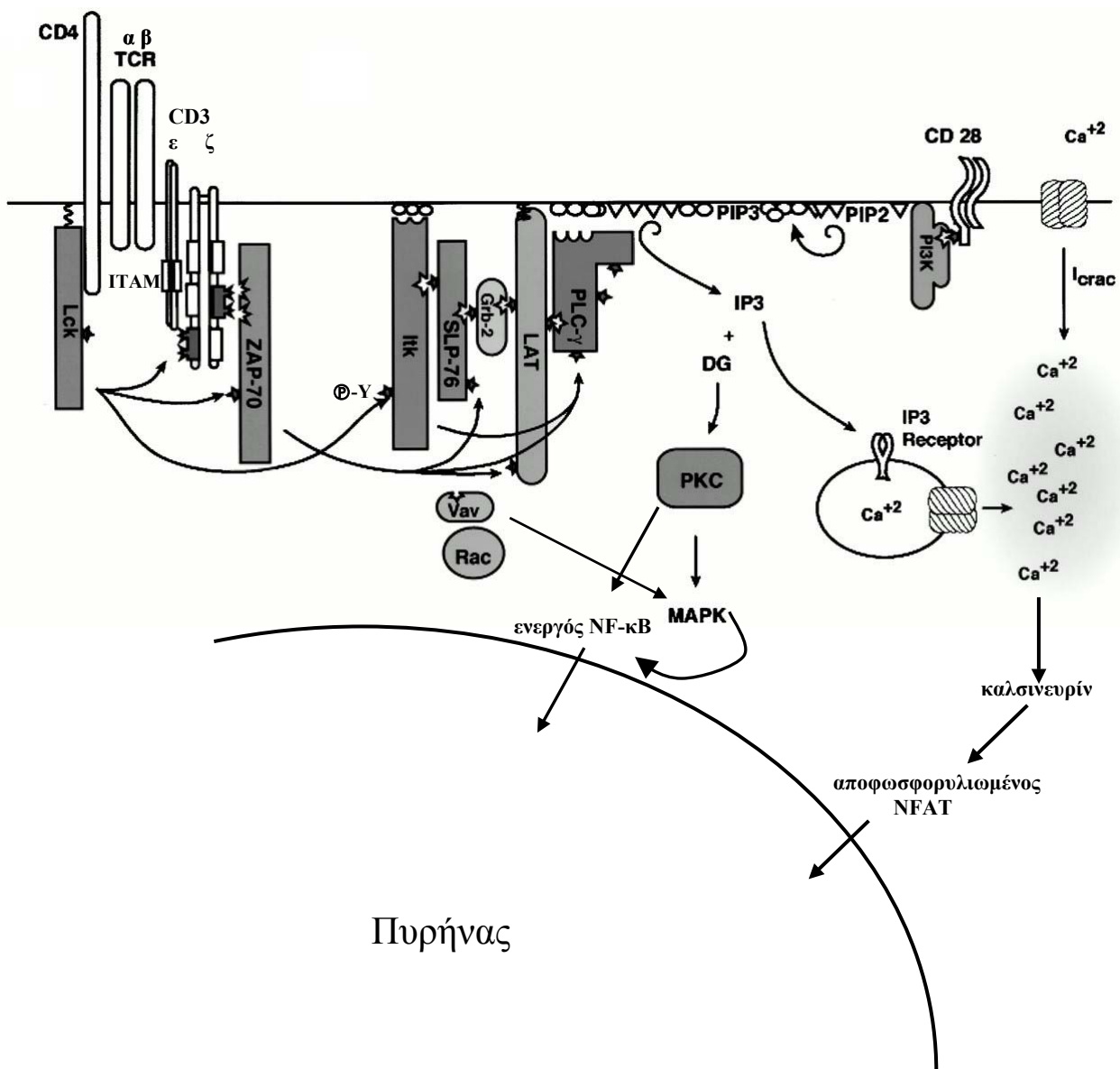
οργανώνονται, με υψηλό βαθμό οργάνωσης, σε ένα σχηματισμό στη ζώνη επαφής των δύο κυττάρων που ονομάζεται ανοσολογική σύναψη (25). Η ανοσολογική σύναψη χαρακτηρίζεται από την μεγάλη συσσώρευση επιφανειακών μορίων σε ομόκεντρες ζώνες



Εικόνα Ε. Η ανοσολογική σύναψη. Παρουσιάζεται αναλυτικά η πλευρική όψη καθώς και σχηματικά η κάτοψη της σύναψης που σχηματίζεται μεταξύ ενός T κυττάρου και ενός κυττάρου-αντιγόνοπαρουσιαστή (APC). Διακρίνονται οι ομόκεντρες ζώνες που σχηματίζονται από τις επιφανειακές πρωτεΐνες που παρουσιάζονται στο υπόμνημα.

σχηματίζοντας μια μορφή σαν «μάτι», διαμέτρου αρκετών μm (26) (Εικόνα 5).

Για τη δημιουργία της απαιτείται η σύνδεση TCR με MHC-πεπτίδιο και η επακόλουθη σηματοδότηση μέσω TCR. Η δημιουργία της λοιπόν, δεν φαίνεται να είναι προϋπόθεση για την TCR-σηματοδότηση αλλά μάλλον σταθεροποιεί τη σηματοδότηση αυτή για το παρατεταμένο διάστημα που απαιτείται για την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (25). Στα T κύτταρα πολλοί κυτταροπλασματικοί και μεμβρανικοί μεσολαβητές σήματος (όπως Lck, Fyn, LAT, CD4) αλλά όχι και το σύμπλοκο TCR/CD3, βρίσκονται κυρίως σε domains της κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζονται λιπιδιακές σχεδίες (lipid rafts). Μετά την ενεργοποίηση των T κυττάρων, και άλλα μόρια συσσωρεύονται στις σχεδίες οι οποίες φαίνεται να μεσολαβούν μεταξύ της TCR-σηματοδότησης και της αναδιοργάνωσης του κυττοσκελετού ακτίνης. Έτσι, τα κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων προσανατολίζονται προς το σημείο επαφής του T κυττάρου με το APC φτιάχνοντας την «υποδομή» για τη δημιουργία της ανοσολογικής σύναψης (27) και πολώνουν (polarize) το κύτταρο έτσι ώστε να εστιάζεται η απελευθέρωση δραστικών μορίων προς το κύτταρο-στόχο, όπως στην περίπτωση των CD8 T κυττάρων.



Εικόνα ΣΤ. Σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με ενεργοποίηση των T κυττάρων. Παρατίθενται τα κυριότερα μονοπάτια της μεταγωγής σήματος που εκπορεύεται από διέγερση του TCR. Διακρίνεται η αλληλουχία των φωσφορυλιώσεων σε τυροσίνες που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και την είσοδό τους στον πυρήνα.

Ο αβTCR δε μπορεί αφ' εαυτού να μετάγει σήμα στο εσωτερικό του T κυττάρου μετά τη δέσμευση του σε MHC-πεπτιδίο συνδέτη. Σε γειτνία με αυτόν βρίσκεται το σύμπλοκο των CD3 αλυσίδων που αποτελείται από τις αλυσίδες CD3γ, CD3δ, CD3ε και CD3ζ. Οι αλυσίδες αυτές είναι μέλη της οικογένειας των υπομονάδων μεταγωγής σήματος από ανοσοϋποδοχείς και περιέχουν ένα σημαντικό μοτίβο σηματοδότησης γνωστό σαν ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Η συντηρημένη αλληλουχία σε κάθε ITAM είναι YXXL(X)₆₋₈YXXL. Οι CD3-γ, -δ και -ε αλυσίδες περιέχουν από ένα ITAM ενώ η CD3ζ περιέχει τρία. Οι CD3 αλυσίδες οργανώνονται σαν διμερή γ/ε, δ/ε και ζ/ζ. Οι δύο τυροσίνες καθενός ITAM της CD3ζ αλυσίδας φωσφορυλιώνονται από κινάσες της Src οικογένειας (την Lck και/ή την Fyn) δίνοντας τις φωσφορυλιωμένες μορφές p23 και p21 που παρατηρούνται κυρίως σε ενεργοποιημένα και μη, T κύτταρα αντίστοιχα (28). Τα θυμοκύτταρα ποντικών ελλειματικών σε CD3ε είναι καθηλωμένα στο διπλά αρνητικό στάδιο και δεν υπάρχουν ώριμα αβ T κύτταρα στην περιφέρεια (29), και το ίδιο περίπου συμβαίνει και σε ποντίκια ελλειματικά για τη CD3γ αλυσίδα (30) επειδή οι αλυσίδες αυτές είναι απαραίτητα συστατικά του pre-TCR συμπλόκου. Στα ποντίκια που είναι ελλειματικά για την CD3δ αλυσίδα τα θυμοκύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν πέρα από το διπλά αρνητικό στάδιο (30), ενώ η έλλειψη της ζ αλυσίδας επηρεάζει την ωρίμανση και την επιλογή των θυμοκυττάρων (31) αλλά όχι στον ίδιο βαθμό καθώς βρίσκεται και μικρός αριθμός ώριμων T κυττάρων στην περιφέρεια των ζώων. Παρά τις μεγάλες διαταραχές που προκαλούνται στην ανάπτυξη των T κυττάρων από την έλλειψη των CD3 αλυσίδων δεν συμβαίνει το ίδιο όταν έχουν επιλεκτικά «καταστραφεί» τα ITAMs της κάθε υπομονάδος. Έτσι σε ποντίκια με «κατεστραμμένα» όλα τα ITAMs της CD3ζ αλυσίδας γίνεται φυσιολογική ανάπτυξη λειτουργικών T κυττάρων αλλά πιθανώς επηρεάζεται το ρεπερτόριο τους και οι αποκρίσεις τους σε χαμηλές δόσεις πεπτιδίου (32, 33). Ομοίως, σε ποντίκια με μη λειτουργικό το ITAM της CD3ε δείχθηκε ότι η μεταγωγή σήματος από αυτό δεν απαιτείται για την ωρίμανση των T κυττάρων αλλά συνεισφέρει ποσοτικά στην ενεργοποίησή τους, και επιδρά εκλεκτικά στην επιβίωση στην περιφέρεια ορισμένων T κλώνων επηρεάζοντας έτσι το ρεπερτόριο τους (34). Ενώ η μη λειτουργικότητα ανεξάρτητων ITAMs δεν είναι καταστροφική για τις αποκρίσεις των T κυττάρων, φαίνεται να υπάρχει κάποιο κατώφλι, κάτω από το οποίο δεν μπορεί να μειωθεί ο αριθμός των λειτουργικών ITAMs, χωρίς να βλαφτεί σημαντικά η σηματοδότηση (32) κάτι που συνηγορεί υπέρ ενός ποσοτικού μοντέλου σχέσης σηματοδότησης-βιολογικού αποτελέσματος.

Μετά τη φωσφορυλίωση των ITAMs, η ZAP-70, μία κινάση τυροσίνης πρωτεϊνών, στρατολογείται στη κυτταροπλασματική ουρά της CD3ζ, όπου και φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες Lck ή Fyn (35). Μετά την ενεργοποίησή της η ZAP-70 κινάση φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες LAT (Linker of Activation in T cells) και SLP-76. Η φωσφορυλιωμένη σε τυροσίνες LAT στρατολογεί κρίσιμα σηματοδοτικά μόρια στη μεμβράνη όπως την PLCγ, την κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3, τη Grb2 και τις Sos, Cbl, SLP-76, Vav που αλληλεπιδρούν με την Grb2. Η LAT είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των NFAT, AP1 (Nuclear Factor of Activated T cells, Activating-Protein 1) και για την σύζευξη του TCR με τα μονοπάτια σηματοδότησης των PLCγ-Ca²⁺ και Ras. Η SLP-76 συνεισφέρει, και αυτή, στη βέλτιστη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών Ca²⁺ και Ras (28) (Εικόνα ΣΤ). Οι ενεργοποιημένοι, από τα παραπάνω μονοπάτια, μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB, NF-AT, AP1, Egr και άλλοι, εισέρχονται στον πυρήνα όπου και συμμετέχουν στην μεταγραφή πλήθους πρωτεϊνών (περίπου 70, με σημαντικότερη την IL-2) που σχετίζονται με κυτταρική διαίρεση, έκκριση κυττοκινών και διαφοροποίηση των T κυττάρων προς κύτταρα-τελεστές.

Αν και η δέσμευση του συμπλόκου MHC/αντιγόνου στον TCR είναι αναγκαία, δεν είναι και επαρκής για τη βέλτιστη ενεργοποίηση των T κυττάρων. Για αυτήν χρειάζονται και αρκετά βοηθητικά μόρια στην επιφάνεια του T κυττάρου. Έγινε ήδη αναφορά στον επικουρικό ρόλο των συνυποδοχέων CD8 και CD4 στην αναγνώριση του συνδέτη. Αυτά, μαζί και με τον βοηθητικό υποδοχέα CD45 συμμετέχουν και σε άμεση σηματοδότηση. Υπάρχουν και άλλα επιφανειακά μόρια που ενισχύουν την προσκόλληση του T κυττάρου στο APC αλλά έχουν και συνδιεγερτικό (costimulatory) ρόλο στις αποκρίσεις των T κυττάρων στο αντιγόνο. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων μπορεί να περιγραφεί σύμφωνα με το μοντέλο των δύο σημάτων, όπου το σήμα 1 περιγράφει τα σήματα που εκπορεύονται μόνο από τον TCR ενώ το σήμα 2 αναφέρεται στα σήματα που προέρχονται από συνδιεγερτικά μόρια. Έτσι, σαν συνδιεγερτικά ορίζονται από πολλούς τα μόρια που ενισχύουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων χωρίς να αλλάζουν το σήμα 1 αν και η διάκριση δεν είναι πάντα ξεκάθαρη.

Το LFA-1 (Leucocyte Function-associated Antigen-1), πάνω στα T κύτταρα, δεσμεύεται με τα ICAM-1, -2, -3 (InterCellular Adhesion Molecules) στα APC, ενώ το CD2 μόριο των T κυττάρων δεσμεύεται στα LFA-3/CD58 ή CD48 των APC (1). Οι αλληλεπιδράσεις LFA-1-ICAM-1 και CD2-CD48 ενισχύουν την ενεργοποίηση T κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου με παρόμοιους μηχανισμούς, και μάλιστα με προσθετικό τρόπο. Ο ρόλος τους είναι κυρίως ενισχυτικός της προσκόλλησης και κατά

δεύτερο λόγο συνδιεγερτικός (36). Το CD28 επιφανειακό μόριο κυττάρων είναι το πιο αποτελεσματικό και καλά μελετημένο συνδιεγερτικό μόριο των T κυττάρων. Οι συνδέτες του πάνω στους «επαγγελματίες» APCs είναι τα μόρια CD80/B7.1 και CD86/B7.2. Η σηματοδότηση από το CD28 γίνεται μέσω της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης-3 και οδηγεί στην επαγωγή IL-2 και άλλων κυττοκινών, καθώς και της Bcl-x_L που είναι αντιαποπτωτική πρωτεΐνη (37). Επίσης, η σύνδεση του CD28 με τα B7 επιμηκύνει τις αποκρίσεις των T κυττάρων και ενισχύει την διακυτταρική προσκόλληση (38). Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκαν δύο νέα συνδιεγερτικά μόρια. Το ICOS, που ο συνδέτης του είναι το B7h, και η διέγερση του έχει παρόμοια αποτελέσματα με αυτή του CD28, με εξαίρεση την επαγωγή της IL-2 (39). Το 4-1BB/CD137, με συνδέτη το 4-1BBL, είναι ένα μέλος της TNFR υπεροικογένειας και βρέθηκε να έχει συνδιεγερτικό ρόλο στα CD4 και στα CD8 κύτταρα επάγοντας μεταξύ άλλων πολλαπλασιασμό, έκκριση IL-2 και IFN γ (40, 41). Ο κατάλογος των συνδιεγερτικών μορίων στην ενεργοποίηση των T κυττάρων βαίνει αυξανόμενος κάτι που δικαιολογεί και τον πλεονασμό (redundancy) στη λειτουργία τους.

4. Κύτταρα τελεστές

Ο συνδυασμός αντιγόνου και συνδιεγερτικών μορίων κινητοποιεί, όπως περιγράφηκε, πλήθος σηματοδοτικών μηχανισμών στο παρθένο, έως τότε, T κύτταρο. Κάποιοι από αυτούς οδηγούν στην έκφραση της IL-2 και του υποδοχέα της, IL-2R. Η IL-2 επάγει την κλωνική επέκταση του T κυττάρου και τη διαφοροποίηση των απογόνων του. Μετά από 4-5 ημέρες έντονου πολλαπλασιασμού τα T κύτταρα διαφοροποιούνται προς κύτταρα τελεστές που συνθέτουν όλες τις απαιτούμενες πρωτεΐνες για την εξειδικευμένη λειτουργία τους σαν βοηθητικά ή κυτταροτοξικά.

Ένα CD4 T κύτταρο που πολλαπλασιάζεται μπορεί να διαφοροποιηθεί σε Th1 ή Th2. Σημαντικό ρόλο σε αυτήν την αναπτυξιακή απόφαση παίζουν οι κυττοκίνες IL-4 και IL-12, που παράγονται από κύτταρα που συμμετέχουν στη πρωταρχική ανοσία. Η IL-4 ευνοεί τη διαφοροποίηση προς Th2, ενώ η IL-12 και η IFN γ τη διαφοροποίηση προς Th1. Οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι εκκρίνουν, όπως περιγράφηκε παραπάνω, διαφορετικές κυττοκίνες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η παραγωγή κυρίως Th1 κυττάρων να οδηγεί σε επικράτηση της κυτταρικής ανοσίας ενώ τα Th2 να οδηγούν σε επικράτηση της χυμικής ανοσίας (1). Τα δραστικά μόρια που παράγονται από CD8 κύτταρα τελεστές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: Τις κυττοκίνες και διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η IFN γ , IL-2, IL-2R, CD44, CD69, CD2, LFA-1 (42), και τις κυττοτοξίνες.

Οι κυττοτοξίνες περιλαμβάνουν την περφορίνη, τις γκρανζύμες (granzymes) (πρωτεάσες σερίνης), τον TNF και τον FasL. Η περφορίνη και οι γκρανζύμες, που μεσολαβούν τους κύριους κυτταροτοξικούς μηχανισμούς των CD8 T κυττάρων, βρίσκονται προαποθηκευμένες σε λυτικά κοκκία. Τα κοκκία αυτά απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους, με Ca^{2+} -εξαρτώμενο τρόπο μετά την αναγνώριση του αντιγόνου στο κύτταρο στόχο. Η απελευθέρωση γίνεται αυστηρά μόνο στο σημείο επαφής των δύο κυττάρων αποτρέποντας έτσι την θανάτωση γειτονικών κυττάρων από τα δραστικά μόρια που απελευθερώνονται. Η περφορίνη μπορεί μέσω πολυμερισμού, να σχηματίσει διαμεμβρανικούς πόρους στη κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου που επιτρέπουν σε γκρανζύμες, νερό και άλατα να διέλθουν στο εσωτερικό του με αποτέλεσμα τη γρήγορη θανάτωσή του. Οι γκρανζύμες, και ειδικά η γκρανζύμη B, δρουν μέσω ενεργοποίησης ανενεργών μορφών των κασπασών. Τελικά, ενεργοποιείται η CAD (CAD:Caspase-Activated Deoxyribonuclease) νουκλεάση που οδηγεί στην αποικοδόμηση του DNA του κυττάρου-στόχου (χαρακτηριστικό γεγονός της απόπτωσης). Σε απόπτωση, μέσω παρόμοιου μονοπατιού ενεργοποίησης κασπασών, μπορούν να οδηγήσουν και οι πρωτεΐνες TNF (Tumor Necrosis Factor) και FasL που εκκρίνονται από τους κυτταροτοξικούς τελεστές και δεσμεύονται σε αντίστοιχους υποδοχείς στα κύτταρα-στόχους. Τα CD8 κύτταρα-τελεστές δεν απαιτούν συν-διέγερση για να δράσουν και η ταχύτητα δράσης τους είναι εντυπωσιακά μεγάλη- 5min είναι αρκετά για να «προγραμματίσουν» τον θάνατο του κυττάρου-στόχου(1, 43).

5. Ανοχή T κυττάρων

Είδαμε πόσο αποτελεσματικές και γρήγορες είναι οι απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος σε είσοδο ξένων αντιγόνων, για παράδειγμα μετά από μία μόλυνση, και αυτό είναι πολύ σημαντικό για την εξασφάλιση της ομοιόστασης και ακεραιότητάς του οργανισμού. Οι ανοσοαπαντήσεις μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν και θεαματική επέκταση συγκεκριμένων κλώνων (clonal expansion) T και B κυττάρων που αποκτούν και δράση τελεστών.

Εξίσου σημαντικά είναι α) η επαναφορά του ανοσολογικού συστήματος στην αρχική του κατάσταση (με εξαίρεση τα νέα κύτταρα-μνήμης) διότι η ύπαρξη μεγάλου αριθμού συγκεκριμένων κλώνων συναγωνίζεται τις άλλες ειδικότητες και θα μείωνε την ικανότητα απάντησης του ανοσοποιητικού σε έναν νέο εισβολέα και επιπλέον τα κύτταρα-τελεστές μπορούν να διεγείρουν παράπλευρα (by-stander) άλλες ειδικότητες με ανεπιθύμητες συνέπειες β) η εξάλειψη ή η ανενεργοποίηση κλώνων που μπορούν λόγω της ειδικότητας

του υποδοχέα τους να «επιτεθούν» εναντίον κυττάρων ή ιστών του εαυτού, που εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τους αντίστοιχους υποδοχείς.

5.1 Κεντρική Ανοχή

Η ανοχή εαυτού (self-tolerance) είναι μια φυσιολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του οργανισμού για ανοσοαπάντηση έναντι ιδίων συστατικών και επιτυγχάνεται με πολλούς διαφορετικούς «κεντρικούς» και «περιφερικούς» μηχανισμούς που αλληλοσυμπληρώνονται. Ο όρος κεντρική ανοχή αναφέρεται σε μία κατάσταση που εγκαθιδρύεται μέσω μηχανισμών που λειτουργούν κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων στα κεντρικά λεμφοειδή όργανα και αποτρέπουν τα άωρα λεμφοκύτταρα που φέρουν αντιγονικούς υποδοχείς με μεγάλη συγγένεια για αντιγόνα-εαυτού να γίνουν ώριμα (εν δυνάμει αυτοδραστικά) περιφερικά λεμφοκύτταρα.

Όσο αφορά τα T λεμφοκύτταρα η μηχανισμοί που οδηγούν στην κεντρική ανοχή λαμβάνουν χώρα, όπως αναφέρθηκε, στο θύμο και μάλιστα κυρίως κατά την αρνητική επιλογή. Στη κεντρική ανοχή των T κυττάρων παίζουν ρόλο το αναπτυξιακό στάδιο των θυμοκυττάρων, το είδος των αντιγονοπαρουσιαστών, η συγκέντρωση και ο τρόπος παρουσίασης του αντιγόνου. Όσο αφορά το αναπτυξιακό στάδιο, φαίνεται ότι τα θυμοκύτταρα μπορούν να επιλεγούν αρνητικά σε όλα τα στάδια από την έκφραση του TCR έως την ωρίμανσή τους σε SP T κύτταρα (44-47). Τα κύτταρα που μεσολαβούν την αρνητική επιλογή φαίνεται να είναι κυρίως επαγγελματίες APCs, αλλά έχουν αναφερθεί και φλοϊκά και μυελικά επιθηλιακά κύτταρα του θύμου και ακόμα και τα ίδια τα θυμοκύτταρα αν και υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (48-51). Η συγκέντρωση του αντιγόνου και η πρόσβαση του στο θύμο είναι μια σημαντική παράμετρος για την αποτελεσματικότητα της αρνητικής επιλογής. Σε αρκετά συστήματα με διαφορετικά αντιγόνα έχει δειχθεί ότι μικρές συγκεντρώσεις αντιγόνου στο θύμο δεν είναι αρκετές για την επαγωγή πλήρους κεντρικής ανοχής. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί πολλά αντιγόνα δεν εκφράζονται ή δεν έχουν πρόσβαση στο θύμο ή ανιχνεύονται εκεί σε μικρές μόνο ποσότητες και έτσι ειδικότητες T κυττάρων με μεγάλη συγγένεια προς αυτά μπορούν να παρακάμψουν την αρνητική επιλογή και να εξέλθουν ως ώριμα στην περιφέρεια του ζώου.

Η σηματοδότηση μόνο μέσω TCR δεν είναι αρκετή για την απαλοιφή των θυμοκυττάρων και άρα κάποιου είδους συνδιέγερση πρέπει να απαιτείται κατά την αρνητική επιλογή τους. Αν και αρχικές μελέτες έδειξαν ότι για την συνδιέγερση είναι αναγκαία η αλληλεπίδραση CD28-B7, τα CD28^{-/-} ποντίκια παρουσίαζαν ελαφρά μόνο ελαττωμένη αρνητική επιλογή. Δύο άλλα μόρια με συνδιεγερτικές ιδιότητες στα ώριμα T κύτταρα, τα

CD2 και LFA-1, δεν φαίνεται να ενισχύουν την αρνητική επιλογή (52). Οι επιφανειακές πρωτεΐνες CD5, CD43 έχουν κάποια συνδιεγερτική ικανότητα στην αρνητική επιλογή μετά από ένεση μικρών δόσεων υπεραντιγόνων σε CD5^{-/-} και CD43^{-/-} ποντίκια. Να σημειωθεί ότι τα τελευταία αποτελέσματα αφορούν την απαλοιφή ημιώριμων (semimature) μυελικών HSA^{hi}CD4⁺CD8⁻ (HSA:Heat Stable Antigen) θυμοκυττάρων, ενώ για την απαλοιφή των CD4⁺CD8⁺ κυττάρων τα μόρια CD5 και CD43 δεν παίζουν κανένα ρόλο (46) ενώ αντίθετα το CD40L έχει κάποιο συνδιεγερτικό ρόλο (53). Τα παραπάνω υπονοούν ότι η αρνητική επιλογή απαιτεί συνδυασμένη δράση συνδιεγερτικών μορίων, κάτι που περιγράφηκε παραπάνω και για τη ενεργοποίηση των ώριμων παρθένων T κυττάρων.

Ασαφή αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τα μόρια που μεσολαβούν τον αποπτωτικό θάνατο των αρνητικά επιλεγμένων θυμοκυττάρων όσο αφορά το Fas (47, 54, 55) και τους υποδοχείς του TNF (TNFRs) (56). Είναι ακόμα πιθανό ο θάνατος των CD4⁺CD8⁺ κυττάρων που παρουσιάζεται μετά από ένεση του πεπτιδίου-αγωνιστή σε ποντίκια διαγονιδιακά για TCR, να οφείλεται εν πολλοίς σε παράπλευρο αποτέλεσμα από τις κυττοκίνες που εκκρίνονται από τη διέγερση των περιφερικών T κυττάρων ή από κορτικοστεροειδή που είναι τοξικά για τα CD4⁺CD8⁺ κύτταρα (57).

5.2 Περιφερική Ανοχή T κυττάρων

5.2.1 Μηχανισμοί και Μοντέλα Περιφερικής Ανοχής

Τα αυτοδραστικά, λοιπόν, T κύτταρα μπορεί να απαλοφούν στο θύμο, με τις προϋποθέσεις που αναφέρθηκαν, αλλά υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που διασφαλίζουν ανοχή απέναντι στα αντιγόνα που εκφράζονται εκτός θύμου.

Μερικά από αυτά τα αντιγόνα μπορεί να μην παρουσιάζονται σε κατάλληλη μορφή και να αγνοούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η αιτία της κλωνικής άγνοιας (clonal ignorance) μπορεί να είναι ότι δεν διεγείρεται το πρωταρχικό ανοσοποιητικό σύστημα ή/και δεν υπάρχει έκφραση του σήματος 2, ή το αντιγόνο είναι ανατομικά απομονωμένο από τα T λεμφοκύτταρα (58).

Ένας δεύτερος μηχανισμός ανοχής αυτοδραστικών T κυττάρων είναι η κλωνική απαλοιφή (59, 60). Η απαλοιφή αυτή μπορεί να παρουσιαστεί και σε έλλειψη του σήματος 2. Έτσι αν T κύτταρα εκτεθούν σε αντιγόνο είτε παρουσία ανταγωνιστών του B7 είτε αν προέρχονται από CD28^{-/-} ποντίκια πεθαίνουν με απόπτωση (58).

Η περιφερική κλωνική απαλοιφή δεν είναι σχεδόν ποτέ πλήρης. Συχνά όμως εναπομείναντα αυτοδραστικά T κύτταρα έχουν υποστεί αρκετές αλλαγές που τα έχουν οδηγήσει σε μια υποδραστική λειτουργική κατάσταση. Παρόμοιας λειτουργικής κατάστασης

Τ κύτταρα μπορούν να προκύψουν με πολλούς τρόπους (βλ. παρακάτω) και κατηγοριοποιούνται όλα υπό τον όρο «άνεργα Τ κύτταρα» (κλωνική ανέργεια). Η επαγωγή της ανέργειας σε ώριμα Τ κύτταρα έχει γίνει αντικείμενο έρευνας για αρκετά χρόνια και πολλά πειραματικά πρωτόκολλα έχουν δοκιμαστεί λόγω των αναμενόμενων εφαρμογών σε αυτοάνοσα νοσήματα και σε μεταμοσχεύσεις. Έτσι, επαγωγή περιφερικής ανοχής Τ κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί κάνοντας επαναλαμβανόμενες ενέσεις σε ποντίκια με μεγάλες ή μικρές δόσεις διαλυτού αντιγόνου ενδοφλέβια ή ενδοπεριτοναϊκά, ενώ οι εφάπαξ δόσεις συνήθως δεν είναι αποτελεσματικές (61, 62). Αντίθετα οι υποδερμικές ενέσεις προάγουν την ανοσία και όχι την ανοχή (63) και μάλλον αυτό οφείλεται στην πρόσληψη του αντιγόνου από τα κύτταρα Langerhans που είναι πολύ αποτελεσματικοί αντιγονοπαρουσιαστές, ενώ στην περίπτωση της ενδοφλέβιας εισόδου του αντιγόνου η παρουσίαση γίνεται κυρίως από τα παρθένα Β κύτταρα της σπλήνας που είναι ανίκανα για συνδιέγερση. Σημαντικό σε αυτά τα πρωτόκολλα είναι να γίνεται η ένεση απουσία ενισχυτικού (adjuvant) (64), ενώ η επαγωγή ανέργειας μπορεί να υποβοηθηθεί από συν-ένεση αντι-CD4⁺ αντισωμάτων (60). Σε ένα άλλο πειραματικό σύστημα ποντικών με διαγονιδιακό TCR, η ενδοθυμική ένεση αντιγόνου είχε σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή των θυμοκυττάρων και την επαγωγή μακροχρόνιας ανέργειας στα περιφερικά CD4⁺ Τ κύτταρα (65). Σε άλλα πρωτόκολλα επαγωγής ανοχής, η ανέργεια των Τ κυττάρων επιτυγχάνονταν ταΐζοντας τα ζώα με αντιγόνο, και για αυτό ονομάστηκε ανοχή από του στόματος (oral tolerance) (66). Επιπλέον, ανέργεια Τ κυττάρων μπορεί να επαχθεί και με ενέσεις βακτηριακών υπεραντιγόνων σε ποντίκια (67).

Άλλα μοντέλα μελέτης περιφερικής ανοχής Τ κυττάρων περιλαμβάνουν ποντίκια διαγονιδιακά για έναν TCR και συγχρόνως διαγονιδιακά για το αντιγόνο που αναγνωρίζει αυτός ο υποδοχέας. Σε τέτοια μοντέλα μπορεί να υπάρχει εμφανής ή όχι αρνητική επιλογή στο θύμο (κεντρική ανοχή), όμως εμφανίζεται και ένας μικρός κατά κανόνα αριθμός περιφερικών Τ κυττάρων που φέρουν τον «αυτοδραστικό» TCR λόγω μη πλήρους κλωνικής απαλοιφής στην περιφέρεια. Τα κύτταρα αυτά δεν πολλαπλασιάζονται σε απόκριση στο αντιγόνο, *in vitro* και *in vivo*, και έχουν μειωμένες λειτουργίες κυττάρων-τελεστών (κυτταροτοξικότητα και έκκριση κυττοκινών), είναι δηλαδή άνεργα (60, 68, 69). Παρόμοια μορφής ανέργεια παρατηρείται και σε πειράματα μεταφοράς, διαγονιδιακών για TCR, CD4 ή CD8 κυττάρων σε ποντίκια που εκφράζουν το αντίστοιχο αντιγόνο (59, 60). Στα παραπάνω μοντέλα, με εξαίρεση ίσως αυτό των διπλά διαγονιδιακών ποντικών, προηγείται πολλαπλασιασμός των Τ κυττάρων, μετά την είσοδο του αντιγόνου ή τη μεταφορά των λεμφοκυττάρων και ακολουθεί η εμφάνιση της ανέργειας.

5.2.2 Το Μοριακό Υπόβαθρο της Περιφερικής Ανοχής

Τα αίτια της επαγωγής της ανέργειας δεν είναι τελείως σαφή και οριοθετημένα. Υπάρχει πάντως η γενική αντίληψη ότι η διέγερση του TCR από το αντιγόνο (σήμα 1) απουσία συνδιέγερσης (σήμα 2) *in vivo* και *in vitro* οδηγεί στην εμφάνιση ανέργειας που χαρακτηρίζεται και από ανικανότητα παραγωγής IL-2 (70, 71). Υπάρχουν όμως και αναφορές επαγωγής ανέργειας σε CD8 T κύτταρα *in vitro* (72) και *in vivo* [Tanchot, 1998 #137] παρουσία και των δύο σημάτων και τότε η ανέργεια εξηγείται σαν ένα είδος απευαισθητοποίησης των T κυττάρων λόγω της διαρκούς παρουσίας του αντιγόνου (χαρακτηρίζεται σαν «antigen persistence» ή σαν «chronic exposure to antigen»). Η ανέργεια κατάσταση μπορεί να αναστραφεί μερικώς, αν κατά την επαναδιέγερση των κυττάρων προστεθεί εξωγενής IL-2 (που αποκαθιστά το σήμα 2) (60, 61) αν και υπάρχουν συστήματα που δεν παίζει κανένα ρόλο (73). Το γεγονός ότι η IL-2 συχνά δεν αναστρέφει τον άνεργο φαινότυπο μπορεί να συσχετιστεί με την αδυναμία έκφρασης του υποδοχέα με υψηλή συγγένεια για IL-2 (δηλαδή του υποδοχέα IL-2R που φέρει και την α αλυσίδα (CD25) μετά την αντιγονική ενεργοποίηση των κυττάρων (73, 74).

Είναι πλέον καλά χαρακτηρισμένο ότι η ανικανότητα παραγωγής IL-2 οφείλεται σε ελάττωμα στο επίπεδο της μεταγραφής. Η μοριακή βάση του ελαττώματος τούτου είναι η ελαττωμένη ενεργοποίηση κάποιων MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) μετά από διέγερση ανέργων T κυττάρων. Τόσο η ERK-1 όσο και JNK-1, -2 κινάσες επηρεάζονται όχι ως προς την ποσότητά τους αλλά ως προς την ενεργότητά τους (75-77) και μάλλον αυτό οφείλεται σε αναστολή της ενεργοποίησης του Ras (77). Η μειωμένη ERK ενεργότητα έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταγραφή των c-Fos, FosB και JunB και συνεπακόλουθα μειωμένα σύμπλοκα AP-1 (Fos-Jun) που μεσολαβούν την μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 (78). Σε άλλα *in vitro* συστήματα τα άνεργα CD4 T κύτταρα είχαν αυξημένη φωσφορυλιωμένη PLCγ1 και ελαττωμένο ενδοκυτταρικό Ca²⁺ μετά από διέγερση (79). Σε *in vivo* μοντέλα ανέργειας CD8 T κυττάρων έχει επίσης βρεθεί ελαττωμένη κινητοποίηση Ca²⁺ μετά από ενεργοποίησή τους, αν και τα αποτελέσματα ήταν αντίθετα ως προς τα ενδοκυτταρικά του επίπεδα προ της ενεργοποίησης (61, 73). Πάντως φαίνεται ότι το πρότυπο, της επαγόμενης από TCR, εγγύς φωσφορυλίωσης σε τυροσίνες (δηλαδή στα CD3ε, CD3ζ, ZAP-70) δεν σχετίζεται με την επαγωγή ανέργειας από πεπτιδία-αγωνιστές ή μερικά αγωνιστές (80).

Σε άλλα πειραματικά μοντέλα ανέργειας είναι μειωμένο το επίπεδο έκφρασης του TCR (59, 69, 81) ή και του συνυποδοχέα (59) και ο φαινότυπος της μικρής ικανότητας απόκρισης των T κυττάρων είχε αποδοθεί κυρίως σε αυτό.

Πρόσφατα καταδείχθηκε ότι σημαντικό ρόλο στην επαγωγή άνεργου φαινοτύπου σε T κύτταρα μετά από ενεργοποίησή τους, παίζουν επαγόμενα επιφανειακά μόρια των T κυττάρων, όπως η CTLA-4 και η PD-1, που αλληλεπιδρούν με μέλη της B7 οικογένειας. Τα CTLA-4^{-/-} ποντίκια αναπτύσσουν μια θανατηφόρο λεμφοϋπερπλαστική ασθένεια με πολυοργανική λεμφοκυτταρική διήθηση δείχνοντας το ρόλο της CTLA-4 στη διατήρηση της ομοιόστασης των T κυττάρων (82). Η συγγένεια των B7.1 και B7.2 με την CTLA-4 είναι 20-50 φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη με το CD28 (83). Η CTLA-4 εκφράζεται στην επιφάνεια T κυττάρων μετά την ενεργοποίησή τους, με μέγιστο στις 48 ώρες (84), ενώ η έκφραση και ο ρόλος της στα παρθένα T κύτταρα είναι αμφιλεγόμενα. Η CTLA-4 έχει ένα αναγκαίο ρόλο στην επαγωγή ανέργειας *in vivo*, καθώς CTLA-4^{-/-} CD4 T κύτταρα με διαγονιδιακό TCR δεν μπορούν να καταστούν άνεργα όταν τους δοθεί κατάλληλο ερέθισμα που ανεργοποιεί τα αντίστοιχα CTLA-4^{+/+}. Επιπλέον, η αντίσταση των CTLA-4^{-/-} T κυττάρων στην ανάπτυξη ανοχής δεν συσχετίζεται με ελάττωμα τους για αποπτωτικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση (AICD:Activation Induced Cell Death) (85). Η δέσμευση της CTLA-4 στους συνδέτες της μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των T κυττάρων μετά από επαναδιέγερση και την παραγωγή IL-2, IL-4 και IFN γ από αυτά. Τα παραπάνω φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από τη CTLA-4 (μπλοκάρει την μετάβαση από G1 σε S φάση επηρεάζοντας την έκφραση και δραστηριότητα cdk κινασών και τη φωσφορυλίωση της Rb) καθώς και της εξασθένησης της δραστηριότητας των AP-1, NF-AT και NF- κ B μεταγραφικών παραγόντων στα ενεργοποιημένα T κύτταρα μετά τη σύνδεση της CTLA-4 (85, 86).

Η PD-1 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη με δομικές ομοιότητες με τη CTLA-4, που η έκφρασή της επάγεται μεταγραφικά σε ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα. Τα PD-1^{-/-} ποντίκια αναπτύσσουν συμπτώματα παρόμοια με του λύκου (lupus), όπως αρθρίτιδα και σπειραματονεφρίτιδα. Επιπρόσθετα, σε PD-1^{-/-} ποντίκια διαγονιδιακά για έναν TCR με ειδικότητα ενάντια στο H-2L^d αναπτυσσόταν χρόνια και συστηματική ασθένεια τύπου αντίδρασης μοσχεύματος κατά ξενιστή (graft-versus-host disease) όταν αυτά βρισκόταν στο H-2^{b/d} γενετικό υπόβαθρο. Παρόλο που η αρνητική επιλογή στο θύμο ήταν εμφανής, περιφερικά CD8 T κύτταρα από τα ποντίκια αυτά εμφάνιζαν φαινότυπο κυττάρων-μνήμης και διηθούσαν αρκετούς ιστούς (87). Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε ο συνδέτης του PD-1, ο PD-L1, που ανήκει στην B7 οικογένεια αλλά έχει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης από τα B7.1 και B7.2, και δείχθηκε ότι η σύνδεσή PD-1 με PD-L1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό T κυττάρων και την έκκριση κυττοκινών από αυτά (88).

Ένας άλλος μηχανισμός επαγωγής και διατήρησης της περιφερικής ανοχής είναι η ανοσοκαταστολή μέσω ρυθμιστικών (κατασταλτικών) T κυττάρων. Καλά χαρακτηρισμένα τέτοια κύτταρα είναι ένας θυμικής προέλευσης $CD4^+CD25^+$ πληθυσμός που εμφανίζεται τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο και χαρακτηρίζεται σαν άνεργος μιας και «αποκρίνεται» λίγο σε διέγερση όπως με αντι-CD3 και αντι-CD28. Τα κύτταρα αυτά μπορούν και παράγουν IL-10 και TGF- β , που θεωρούνται κυττοκίνες κατασταλτικές για T κύτταρα, αν και είναι αβέβαιο αν αυτές μεσολαβούν τις κατασταλτικές τους ιδιότητες. Τα $CD4^+CD25^+$ T κύτταρα άπαξ και διεγερθούν μέσω TCR μπορούν να καταστείλουν την ενεργοποίηση άλλων T κυττάρων και αυτό έχει μελετηθεί κυρίως σε μικτές αντιδράσεις λευκοκυττάρων (MLR: Mixed Leukocyte Reaction) και σε μοντέλα επαγωγής αυτοάνοσων καταστάσεων μετά από πειράματα μεταφοράς T λεμφοκυττάρων (89). Κατασταλτική δράση άνεργων $CD4^+$ T έχει αναφερθεί και σε άλλο σύστημα όπου τα άνεργα, ρυθμιστικά $CD4^+$ T δημιουργήθηκαν μετά από συνεχείς αντιγονικές διεγέρσεις και μπορούσαν να καταστείλουν τις ανοσοαποκρίσεις παρθένων T κυττάρων (90).

6. Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (TNF)

Ο ανθρώπινος TNF είναι μια κυττοκίνη που αποτελείται από 157 αμινοξέα. Υπάρχει σε διαλυτή μορφή ή σε μορφή δεσμευμένη σε μεμβράνη που περιέχει 76 επιπλέον αμινοξέα η οποία μπορεί να υδρολυθεί από μεταλλοπρωτεϊνάσες. Στη βιολογικά ενεργή του μορφή ο TNF είναι ομοτριμερής και στην τρισδιάστατη απεικόνισή του έχει μορφή τριγωνικής πυραμίδας.

Ο TNF παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα και ενεργοποιημένα μακροφάγα. Άλλες πηγές του είναι τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα κερατινοκύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα κύτταρα μικρογλοίας, τα κύτταρα λείων μυϊκών ινών, κάποια εντερικά κύτταρα και καρκινικά κύτταρα. Ο TNF μπορεί να δράσει σε ιστούς μακριά από το σημείο παραγωγής του («ορμονική» δράση) ή τοπικά, σε γειτονικά κύτταρα (παρακρινής δράση) (91). Πολλά είναι τα ερεθίσματα που επάγουν την παραγωγή του TNF, και συμπεριλαμβάνουν τον λιποπολυσακχαρίτη LPS (που είναι και το ισχυρότερο ερέθισμα), τους εστέρες φορβόλης, τα μιτογόνα, και τις κυττοκίνες IL-1, IL-2, CSF-1, GM-CSF και τον ίδιο τον TNF (92). Οι πολλαπλές δράσεις του TNF μεσολαβούνται από δύο διαφορετικούς, υψηλής συγγένειας, υποδοχείς, τον TNFR55/TNFR1/p55/CD120a και τον TNFR75/TNFR2/p75/CD120b με τον δεύτερο να είναι υψηλότερης συγγένειας στο ποντίκι (91), και επιπλέον να είναι ο κύριος υποδοχέας για τον μεμβρανικό TNF (93). Ο TNF και οι υποδοχείς του ανήκουν στην υπεροικογένεια TNF/TNFR και χαρακτηρίζονται από αυτή τη

συμμετρία 3^{ης} τάξης που καθορίζει και τη στοιχειομετρία τους. Οι συνδέτες στην οικογένεια αυτή είναι πρωτεΐνες τύπου 2, που βρίσκονται τόσο σε πρόδρομη μεμβρανική μορφή όσο και σε ώριμη διαλυτή μορφή. Και οι δύο μορφές είναι βιολογικά ενεργές όταν ομοτριμεριστούν (94). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι άλλο ένα μέλος των συνδετών αυτής της οικογένειας, η LTα (Lymphotoxin α), μπορεί να δεσμευθεί στους TNFR1 και TNFR2 με παρόμοιο τρόπο με τον TNF (σαν ομοτριμερές) αλλά και στον υποδοχέα HVEM (Herpes simplex Virus Entry Mediator) ή στον υποδοχέα LTαβR σαν ετεροτριμερές με την LTβ (95).

Ο TNF θεωρείται σαν μια ισχυρή προφλεγμονώδης (proinflammatory) κυττοκίνη που εμπλέκεται στην παθογένεση χρόνιων τοπικών ή συστημικών φλεγμονών. Έτσι μεταξύ άλλων, προάγει την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των μακροφάγων, την συσσώρευση μονοπύρηνων σε αγγεία, την εμφάνιση πυρετού (μέσω απελευθέρωσης προσταγλανδινών στον υποθάλαμο), και την παραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης (acute phase proteins) (92).

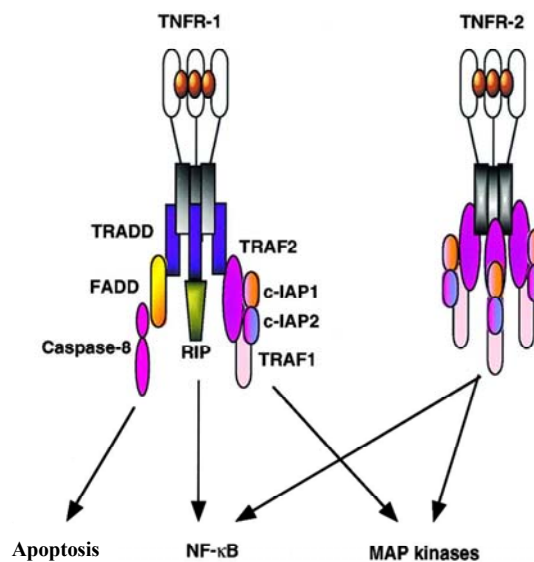
Ο TNF παίζει σημαντικό ρόλο και στο σηπτικό σοκ που επάγεται από βακτήρια (που περιέχουν μεγάλες ποσότητες LPS), στο οποίο υπάρχει σημαντική έκκριση TNF από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα στο συκώτι, σπλήνα και αλλού. Η συστηματική απελευθέρωση TNF προκαλεί απώλεια πλάσματος λόγω αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, και ανώμαλη ενδοαγγειακή πήξη του αίματος που οδηγεί σε θρομβώσεις μικρών αγγείων σε ζωτικά όργανα, κάτι που συνήθως είναι θανατηφόρο (1).

6.1 Σηματοδότηση μέσω των TNFRs

Ο TNF έχει και κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι μεγάλης ποικιλίας ανθρώπινων και ποντικίστιων κυττάρων και σειρών που ενισχύονται από αναστολείς της μεταγραφής ή της μετάφρασης, κάτι που είναι ένδειξη για την ύπαρξη προστατευτικών παραγόντων. Ο ρόλος των υποδοχέων του TNF στην κυτταροτοξικότητα του TNF είναι αμφιλεγόμενος και έτσι είναι αβέβαιο ποιος υποδοχέας είναι ο κύριος μεσολαβητής της. Το μεγάλο εύρος των δράσεων του TNF εξηγείται εν μέρει από την έκφραση των TNFRs σε σχεδόν όλα τα εμπύρηννα κύτταρα. Αν και τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν TNFR1 και TNFR2, η έκφραση των γονιδίων αυτών ρυθμίζεται διαφορετικά σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Το γονίδιο TNFR1 φαίνεται να ελέγχεται από ένα μη επαγόμενο υποκινητή που μόνο ελαφρά ενεργοποιείται από ερεθίσματα όπως ο TNF, η IL-1, και οι εστέρες φορβόλης. Αντίθετα ο TNFR2 εκφράζεται σε πολύ διαφορετικά επίπεδα (έως 100 φορές διαφορά) ανάμεσα σε κυτταρικούς τύπους και σειρές. Έτσι η έκφραση του TNFR2 αυξάνει στα B και T

λεμφοκύτταρα από μιτογόνα, στα μακροφάγα από LPS και στα NK από IL-2, ενώ δεν επηρεάζεται από αυτά η έκφραση του TNFRI (96). Ο TNFRI υποδοχέας (όπως και άλλοι της TNF/TNFR υπεροικογένειας) φέρει ένα μοτίβο στην κυτταροπλασματική του ουρά που ονομάζεται «επικράτεια θανάτου» (DD:Death Domain). Αρχικά επικρατούσε η αντίληψη ότι οι υποδοχείς της οικογένειας τριμερίζονταν κατόπιν της δέσμευσης του συνδέτη και ο τριμερισμός ήταν το έναυσμα για τη σηματοδότηση μέσω αυτών. Όμως πρόσφατες ενδείξεις οδηγούν στην αντίληψη ότι τα τριμερή TNFRI σύμπλοκα είναι σχηματισμένα πριν τη δέσμευση του συνδέτη, και ότι η δέσμευσή του επάγει μια αλλαγή στον προσανατολισμό των αλυσίδων του υποδοχέα στο τριμερές σύμπλοκο, που διευκολύνει τη μεταγωγή σήματος (97). Το προσχηματισμένο σύμπλοκο των υποδοχέων TNFRI δεν μπορεί να σηματοδοτήσει επειδή είναι δεσμευμένη σε αυτό η πρωτεΐνη SODD (Silencer Of Death Domains), που απελευθερώνεται μόνο μετά από την σύνδεση με TNF (98).

Μετά την ενεργοποίηση του TNFRI, η DD προσελκύει την πρωτεΐνη-προσαρμοστή TRADD, και οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μέσω των DD τους (Εικόνα Z). Όμοια, μέσω DD-DD επαφών, αλληλεπιδρά η TRADD με τη FADD. Τελικά η στρατολόγηση της κασπάσης-8 ή -10 μέσω της FADD αποτελεί το έναυσμα της σειράς ενζυμικών αντιδράσεων που οδηγούν στην απόπτωση. Σε αυτό συνηγορούν και αποτελέσματα με FADD^{-/-} και κασπάση-8^{-/-} κύτταρα που είναι ανθεκτικά σε θανάτωση με TNF (99). Στο σύμπλοκο σηματοδότησης του TNFRI, η ενεργοποίηση του υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει στη στρατολόγηση των RIP και TRAF2 μέσω του TRADD. Η RIP είναι μια κινάση που περιέχει DD και είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση του NF-κB (μέσω αλληλεπίδρασης με IKK γ (100)) ενώ η TRAF2 ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPK που οδηγεί και σε ενεργοποίηση του AP-1 (101). Η έλλειψη της RIP ή της TRAF2 οδηγεί σε υπερευαισθησία στην



Εικόνα Z. Η σηματοδότηση που εκπορεύεται από τους TNFR υποδοχείς.

κυτταροτοξικότητα επαγόμενη από TNF (99). Έτσι ο TNFR1 υποδοχέας μπορεί να οδηγήσει σε αποκρίσεις επιβίωσης/ενεργοποίησης/φλεγμονής ή σε απόπτωση μέσω διαφορετικών πρωτεϊνών-προσαρμοστών (Εικόνα Z).

Ο υποδοχέας TNFR2, δεν έχει κυτταροπλασματική DD αλλά περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο που επιτρέπει τη δέσμευση των TRAF πρωτεϊνών. Η διέγερση του TNFR2 από τον συνδέτη του οδηγεί στην στρατολόγηση των TRAF1, TRAF2 και των cIAP1, cIAP2 (IAP:Inhibitors of Apoptosis Proteins). Το σύμπλοκο TRAF1-TRAF2-cIAP1-cIAP2 μπορεί να στρατολογηθεί και στο σύμπλοκο σηματοδότησης του TNFR1 προσδίδοντας αντιαποπτωτικές λειτουργίες αφού καταστέλλει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (102) (Εικόνα Z).

Αν και, όπως αναφέρθηκε, το μονοπάτι σηματοδότησης που εκπορεύεται από τον TNFR2 δεν καταλήγει άμεσα σε απόπτωση, εν τούτοις η σύνδεσή του μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για αποπτωτικό θάνατο (103, 104). Μια υπόθεση ήταν ότι ο TNFR2 μπορεί να ενισχύει το θάνατο που επάγεται από TNFR1 με το να δεσμεύει πρώτος τον TNF (λόγω μεγαλύτερης συγγένειας) και κατόπιν να τον «περνάει» στον TNFR1 (“ligand-passing” model) (105). Όμως υπάρχουν περιπτώσεις θανάτωσης κυττάρων με αντισώματα ειδικά για TNFR2 ή με μεταλλαγμένο TNF που μπορεί να δεσμευτεί μόνο στον TNFR2 και έτσι το μοντέλο «μεταβίβασης του συνδέτη» δεν μπορεί να είναι καθολικό (104). Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα ότι η σηματοδότηση μέσω TNFR2 οδηγεί σε αποικοδόμηση του TRAF2, κάτι που μετατοπίζει τη σηματοδότηση του TNFR1 από την ενεργοποίηση των MAPK στο θάνατο, παρά την αύξηση του ενεργού NF-κB. Επιπλέον, η στρατολόγηση TRAF2 στον TNFR2 στερεί τον TNFR1 από TRAF2 συνεισφέροντας περαιτέρω στο παραπάνω αποτέλεσμα (106).

Και για τους δύο υποδοχείς έχει δειχθεί ότι μπορούν να εκκρίνονται τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (διάχυση υποδοχέων: receptor shedding) και συνεπώς υπάρχουν στον οργανισμό σε δύο μορφές, τη διαλυτή και τη μεμβρανική. Η διάχυση του TNFR2 είναι πιο συχνή από του TNFR1. Ανάμεσα στους παράγοντες που επάγουν τη διάχυση αυτών των δύο υποδοχέων είναι οι εστέρες φορβόλης, ο TNF, οι θειόλες και τα ρετινοειδή. Αν και η πρωτεάση που ευθύνεται για τη διάχυσή τους δεν έχει ταυτοποιηθεί, φαίνεται να είναι μια μεταλλοπρωτεάση (107). Είναι αυτονόητο ότι η ρύθμιση της διάχυσης των TNF υποδοχέων έχει μεγάλη σημασία για το αποτέλεσμα της δράσης του TNF καθώς υπάρχει συναγωνισμός για τον συνδέτη μεταξύ της μεμβρανικής και της διαλυτής μορφής των υποδοχέων. Τούτο καταδεικνύεται σε κάποιες αυτοφλεγμονώδεις ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλαγές στο *TNFR1* γονίδιο, και στις οποίες υπάρχει ελλατωματική διάχυση και κατά συνέπεια χαμηλότερα επίπεδα διαλυτού

TNFR1 υποδοχέα αλλά αντίθετα αυξημένα επίπεδα μεμβρανικού (108). Οι αριθμός των διαφορετικών, πιθανών εκβάσεων της αλληλεπίδρασης TNF-TNFRs γίνεται ακόμα μεγαλύτερος αν λάβουμε υπόψη πρόσφατα δεδομένα που συνηγορούν στο ότι ο μεμβρανικός TNF μπορεί και αυτός να μετάγει σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Έτσι, σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα η σηματοδότηση μέσω του μεμβρανικού TNF αναστέλλει την παραγωγή IL-1, IL-6, IL-10 και TNF που παράγονται μετά από επαγωγή με LPS (109). Η κυτταροπλασματική επικράτεια του μεμβρανικού TNF έχει ένα μοτίβο για φωσφορυλίωση από τύπου I κινάση καζεΐνης. Τούτο το μοτίβο φωσφορυλιώνεται μετά από κατεργασία με LPS ενώ αποφωσφορυλιώνεται από διαλυτό TNFR1 με σύγχρονη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (110).

6.2 Ο ρόλος του TNF στα T κύτταρα

Εκτός από τις καλά χαρακτηρισμένες ιδιότητες του TNF ως προφλεγμονώδη κυττοκίνη, σχετικά πρόσφατα έχουν συσσωρευτεί ενδείξεις, ότι παίζει άμεσο ρόλο στη ρύθμιση του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, και ειδικά των T κυττάρων. Πολλές εργασίες δείχνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις TNF/TNFRs εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στις λειτουργίες και στον αποπτωτικό θάνατο των T κυττάρων που επάγεται από ενεργοποίηση (AICD) αν και πολλά αποτελέσματα είναι, τουλάχιστον φαινομενικώς, αντιφατικά. Αρχικά λοιπόν, δείχθηκε ότι διαλυτός TNF μπορεί να ενισχύσει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων CD4 και CD8 T κυττάρων όταν διεγείρονται με χαμηλές δόσεις αντι-CD3 *in vitro* και τον πολλαπλασιασμό των CD4 T κυττάρων σε υποβέλτιστες συνθήκες παρουσίας αντιγόνου (111). Παρομοίως, προσθήκη διαλυτού TNF (ή λεμφοτοξίνης α (LT α), που ανήκει στην TNF οικογένεια) σε ανθρώπινη MLR αντίδραση ενίσχυε τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (112). Αργότερα, δείχθηκε ότι εξωγενής TNF ή αντισώματα εναντίον του TNFR2 μπορούν να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων θυμοκυττάρων ή περιφερικών T κυττάρων όταν διεγείρονται με κονκαβαλίνη A (ConA), κάτι που δεν επιτυγχάνεται με αντι-TNFR1 αντισώματα. Μάλιστα σε αυτή την εργασία δείχθηκε ότι και η LT α μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό θυμοκυττάρων μέσω δέσμευσης στον TNFR2 (113). Από άλλες ερευνητικές ομάδες δείχθηκε επίσης η ενισχυτική δράση του εξωγενούς TNF σε ανθρώπινα T κύτταρα όταν διεγερθούν από αντι-CD3 ή PMA (εστέρας φορβόλης) και επιπλέον αντι-TNF αντισώματα που εξουδετέρωναν τον ενδογενή TNF, μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων καθώς και την έκφραση της IL-2R α αλυσίδας και την ενεργοποίηση του NF- κ B των (114). Ο *in vivo* ρόλος του TNFR1 σε αποκρίσεις

αλλοδραστικότητας (alloreactivity) T κυττάρων δείχθηκε σε πειράματα με ποντίκια ελλειμματικά για αυτή την πρωτεΐνη. Έτσι, TNFR1^{-/-} T κύτταρα μεταφερόμενα σε αποδέκτες κατάλληλου MHC απλοτύπου δεν μπορούσαν να επάγουν ασθένεια μοσχεύματος-κατά-δότη τόσο αποτελεσματικά όσο τα αντίστοιχα προερχόμενα από αγρίου τύπου ή TNFR2^{-/-} ποντίκια και επιπλέον εμφάνιζαν μειωμένη παραγωγή IFN γ και TNF. Τα TNFR1^{-/-} T κύτταρα σε MLR αντίδραση *in vitro*, πολλαπλασιάζονταν λιγότερο έντονα, παρουσίαζαν μικρή κυτταροτοξικότητα και παρήγαγαν λιγότερη IL-2 και IFN γ , ενώ παραδόξως σε διέγερσή τους με αντι-CD3 και αντι-CD28 δεν παρουσίαζαν ελαττωματικό πολλαπλασιασμό (το ίδιο ίσχυε και για διέγερση με Con A) ή παραγωγή IL-2 και επιπλέον παρήγαγαν πολύ μεγαλύτερη του φυσιολογικού ποσότητα IFN γ (115).

Πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η ουδετεροποίηση του TNF *in vivo* σε μοντέλο ασθένειας μοσχεύματος-κατά-δότη σε ποντίκια, εμποδίζει την επαγωγή κυτταροτοξικότητας CD8 T κυττάρων επειδή μειώνεται η παραγωγή IFN γ από αυτά και συνεπακόλουθα η επαγωγή Fas από τα B λεμφοκύτταρα στόχους (116). Επίσης, *in vitro* πειράματα με TNFR2^{-/-} T κύτταρα έδειξαν ότι τόσο τα CD8 όσο και τα CD4 κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε μικρότερο βαθμό όταν διεγερθούν με αντι-CD3 σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Ο μικρότερος πολλαπλασιασμός των TNFR2^{-/-} CD8 T κυττάρων συνοδευόταν από χαμηλότερη έκφραση των μαρτύρων ενεργοποίησης CD69 και CD25 και μικρότερη παραγωγή IFN γ και IL-2. Η μειωμένη ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό σε σχέση με τα αγρίου τύπου ανακτώταν μερικώς, αν η διέγερση με αντι-CD3 συνοδεύονταν από συνδιέγερση με αντι-CD28 (117).

6.2.1 Ο ρόλος του TNF στον AICD

Η προσθήκη εξωγενούς TNF σε ποντικίσιους ή ανθρώπινους βλάστες T κυττάρων προάγει την απόπτωσή τους κάτι που συμβαίνει και με την προσθήκη LT τουλάχιστο όσο αφορά τους ανθρώπινους βλάστες. Στο ίδιο σύστημα, αντισώματα εναντίον ταυτόχρονα και των δύο TNFRs είχαν παρόμοιο αποτέλεσμα (118). Σε πειράματα με T κύτταρα από TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-}, ή TNFR1^{-/-}TNFR2^{-/-} ποντίκια δείχθηκε ότι ο TNF συνεισφέρει στον AICD κύρια των CD8 T κυττάρων μέσω του TNFR2, ενώ ο FasL μεσολαβεί τον AICD των CD4 μετά από διέγερση με αντι-CD3 *in vitro* (119). Σε πειράματα με ποντίκια διαγονιδιακά για TCR και ελλειμματικά για Fas, (*lpr/lpr*), η ένεση του πεπτιδίου αγωνιστή προκαλεί μειωμένο αποπτωτικό θάνατο στα CD4 T κύτταρα σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου, μόνο αν στο ποντίκι ενεθεί εξουδετερωτικό αντίσωμα για TNF, το οποίο όμως παρουσία λειτουργικού Fas δεν έχει καμμία επίδραση (120). Μελέτες των αποκρίσεων CD8 T κυττάρων έγιναν σε

διαγονιδιακά για TCR, TNFRI^{-/-} ποντίκια. Μετά από ενέσεις χαμηλών δόσεων πεπτιδίου τα TNFRI^{-/-} CD8 T κύτταρα αποπίπτουν με αργότερους ρυθμούς από τα αντίστοιχα TNFRI^{+/+} (στις υψηλές συγκεντρώσεις δεν υπάρχουν διαφορές), παρόλο που δεν φαίνονται διαφορές στη φάση της ενεργοποίησης τους. Διαφορές δεν διαπιστώθηκαν ούτε και στην επαγωγή ανέργειας που εκδηλώνεται μερικές μέρες μετά τη φάση ενεργοποίησης (121). Σε άλλο πειραματικό σύστημα, με υπερδιέγερση CD8 T κυτταρικών σειρών δείχθηκε ότι ο AICD τους μεσολαβείται από σηματοδότηση μέσω TNFRII που οδηγεί και σε μείωση της Bcl-2 (122).

Ενώ η καθεστηκία άποψη ήταν ότι ο AICD των T κυττάρων μεσολαβείται κυρίως από Fas ή/και TNFRs υπάρχουν διάφορα πειραματικά δεδομένα που εξασθενίζουν αυτή την αντίληψη. Τέτοια προέκυψαν από την μελέτη του AICD των T κυττάρων σε Ipr/Ipr, TNFRI^{-/-} και TNFRII^{-/-} ποντίκια μετά από ένεση υπεραντιγόνων όπου δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στον AICD ανάμεσα στους διάφορους γονοτύπους (123). Επιπρόσθετα, η απαλοιφή TCR-διαγονιδιακών CD8 T κυττάρων ειδικών για LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) μετά από διαμόλυνση των ποντικών με τον ιό δεν εξαρτάται από TNF και Fas (σε πειράματα με TNF^{-/-}, TNFRI^{-/-} ή/και Ipr/Ipr ποντίκια) και το ίδιο συμβαίνει και μετά από ενέσεις αντιγόνου ενώ αν ενεθούν μικρές ποσότητες αντιγόνου εμφάνίζεται ελαφρώς ελαττωματικός AICD στα Ipr/Ipr ζώα (124). Πολύ παρόμοια πειράματα έδειξαν επίσης ότι ούτε ο TNFRI ούτε ο Fas απαιτούνται για την απαλοιφή CD8 T κυττάρων μετά από μόλυνση με ιό ή ένεση μεγάλης δόσης αντιγόνου, αλλά η συνδυασμένη απουσία τους ή η απουσία μόνο του TNFRI από τα T κύτταρα είναι υπεύθυνη για την μειωμένη επαγωγή ανοχής σε αυτά μετά από ενέσεις αντιγονικού πεπτιδίου (125).

6.2.2 TNF και αυτοάνοσες ασθένειες που μεσολαβούνται από T κύτταρα

Τα τελευταία χρόνια έχουν συσσωρευθεί πολλές ενδείξεις ότι ο TNF εμπλέκεται στην παθογένεση αρκετών αυτοάνοσων ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (IDDM:Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Ο ρόλος του δεν είναι ξεκάθαρος μιας και η απορύθμιση της παραγωγής του μπορεί να είναι προστατευτική ή παθογόνος για την πρόοδο της ασθένειας. Οι αντιτιθέμενες δράσεις του TNF έχουν δειχθεί σε αρκετά πειραματικά μοντέλα ασθενειών σε ζώα (126), και σε αυτοάνοσες ανθρώπινες ασθένειες (92). Έτσι, η διαγονιδιακή έκφραση του TNF και συνδιεγερτικών μορίων στα β κύτταρα των νησίδων του Langerhans οδηγεί σε αυτοάνοσο IDDM σε στελέχη ποντικών που δεν έχουν γενετική προδιάθεση (127, 128). Έχει

επίσης περιγραφεί ότι η διαγονιδιακή έκφραση του TNF στο πάγκρεας οδηγεί σε μειωμένες αποκρίσεις ειδικών CD4 T κυττάρων και επαγωγή ανοχής σε παγκρεατικό αντιγόνο (129). Παραδόξως, σε μη-παχύσαρκα-διαβητικά-ποντίκια (NOD:Non Obese Diabetic), που έχουν γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση IDDM, η έκφραση του TNF στις νησίδες του Langerhans αποτρέπει την ανάπτυξη της νόσου (αν και εκδηλώνεται ινσουλίτιδα) στα ενήλικα ποντίκια (130), ενώ επιταχύνει την εξέλιξη προς διαβήτη στα νεογνά (131). Επιπλέον, επαναλαμβανόμενες ενέσεις TNF σε ενήλικα NOD ποντίκια καταστέλλουν την εμφάνιση IDDM (132), ενώ η ίδια διαδικασία σε νεογνά NOD ενισχύει τις αποκρίσεις B και T κυττάρων και αυξάνει την εμφάνιση και τη σοβαρότητα της ασθένειας (133). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η διάρκεια της έκφρασης του TNF στη φλεγμονή και όχι η κατάσταση ωριμότητας του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι σημαντική για την έκβαση της ασθένειας αυτής σε ένα σύστημα επαγόμενης έκφρασης διαγονιδιακού TNF στις νησίδες του Langerhans που συνέκφραζαν B7.1 (134). Αντικρουόμενα είναι και τα αποτελέσματα θεραπείας αυτοάνοσων ασθενειών σε ανθρώπους και μοντέλα ποντικίων. Οι ενέσεις εξουδετερωτικών αντι-TNF είναι ωφέλιμες σε ασθενείς με RA ή χρόνια φλεγμονώδη ασθένεια των εντέρων (bowel disease) (126). Αν και ο ρόλος του TNF στην εξέλιξη της MS είναι επιβλαβής (135), η θεραπεία με εξουδετερωτικά αντι-TNF οδηγεί σε ανοσοδιέγερση και αύξηση βλαβών στους ασθενείς (136). Οι ενδείξεις από διάφορα μοντέλα ζώων για MS είναι ότι ο TNF έχει ένα παθογόνο ρόλο στην ασθένεια (126), ενώ πρόσφατα αποκαλύφθηκε μια ανοσοκατασταλτική δράση του ενδογενούς TNF στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE: Experimental Acute Encephalomyelitis). Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα των ειδικών για μυελίνη T κυττάρων υποχωρούσε με αφύσικα αργούς ρυθμούς σε TNF-/- ποντίκια οδηγώντας σε επιδείνωση της ασθένειας (137).

7. Fas και T κύτταρα

Ο υποδοχέας Fas/CD95/Apo-1 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I που ανήκει στην υπεροικογένεια TNFR και αποτελείται από 319 αμινοξέα. Μια περιοχή 80 αμινοξέων της ενδοκυτταρικής του επικράτειας αποτελεί την επικράτεια θανάτου και είναι σημαντική (όπως είδαμε και για τον TNFRI) για την κυτταρική σηματοδότηση που οδηγεί σε απόπτωση. Ο συνδέτης του υποδοχέα Fas ονομάζεται FasL και είναι μια τριμερής μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που ομοιάζει με τον TNF, και μπορεί και αυτή να υπάρξει σε διαλυτή μορφή μετά τη δράση μεταλλοπρωτεϊνών (138). Η πρωτεΐνη Fas εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα T κύτταρα, στο θύμο, στο ήπαρ, στις ωοθήκες, στους πνεύμονες και στην καρδιά (139).

Η *in vivo* λειτουργία του Fas ορίστηκε αρχικά από την φυσική υπολειπόμενη μεταλλαγή *lpr* που προκαλεί συστηματική αυτοανοσία και λεμφοϋπερπλασία σε ποντίκια. Η μεταλλαγή αυτή οφείλεται στην ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου που αδρανοποιεί την μεταγραφή του *Fas*. Παρόμοιο αυτοάνοσο σύνδρομο παρατηρείται σε ποντίκια και από τη φυσική υπολειπόμενη μεταλλαγή *gld* του *FasL* γονιδίου (140).

Ο φαινότυπος των *Ipr/Ipr* ποντικών εξαρτάται κατά πολύ από το γενετικό υπόβαθρο της σειράς των ποντικών. Έτσι τα MRL ποντίκια που είναι ομόζυγα για την *lpr* μεταλλαγή (MRL-*Ipr/Ipr*) παράγουν διάφορα αυτοαντισώματα συμπεριλαμβανομένων των αντι-ds DNA και αντι-IgG τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ανοσοσυμπλόκων που προκαλούν νεφρίτιδα και τα ζώα οδηγούνται σε θάνατο σε ηλικία περίπου 6 μηνών. Επίσης αναπτύσσουν συστηματική φλεγμονή των αγγείων και αρθρίτιδα. Επιπλέον, μετά την 6^η περίπου εβδομάδα τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν λεμφαδενοπάθεια (λεμφοϋπερπλασία) λόγω συσσώρευσης ενός ασυνήθιστου πληθυσμού $CD4^+CD8^-TCR\alpha\beta^+CD3^+$ T κύτταρα που εκφράζουν επίσης και την πρωτεΐνη B220, που φυσιολογικά είναι μάρτυρας των B κυττάρων (139). Αντίθετα στο «φυσιολογικό» υπόβαθρο των C57bl/6 ποντικών η ασθένεια είναι πολύ πιο ήπια, με μικρότερου βαθμού λεμφοϋπερπλασία, καθυστερημένη παραγωγή αυτοαντισωμάτων και καθόλου ή ελάχιστες ιστοπαθολογικές εκδηλώσεις (141).

Τα $CD4^+CD8^-TCR\alpha\beta^+CD3^+$ T κύτταρα που συσσωρεύονται στα *Ipr/Ipr* ποντίκια δεν πολλαπλασιάζονται ενεργά και μάλιστα δεν διεγείρονται προς πολλαπλασιασμό *in vitro* με αντι-CD3 και IL-2 (139).

Ο Fas έχει αρκετά διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο του ανοσοποιητικού συστήματος. Ενώ κάποια αποτελέσματα έδειξαν ότι αντι-Fas αντισώματα μπορούν να επάγουν την απόπτωση διπλά θετικών θυμοκυττάρων *in vitro* (142), αρκετές ομάδες έδειξαν *in vivo* ότι ποντίκια ελλειμματικά σε Fas ή FasL φέρουν φυσιολογικά σε πέρας την αρνητική επιλογή των θυμοκυττάρων τους (55, 120), αν και μια άλλη ομάδα χρησιμοποιώντας μια ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης αποπτωτικών θυμοκυττάρων αποφάνθηκε ότι ο Fas προάγει την αρνητική επιλογή (54).

Ο ρόλος του Fas στον AICD των T κυττάρων δεν είναι τελείως ξεκάθαρος. Φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στην απόπτωση ενεργοποιημένων CD4 T κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (55, 58, 119), αλλά κατά άλλους αυτό αμφισβητείται (120). Όσο αφορά τα CD8 T κύτταρα, ο Fas δεν παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην απαλοιφή τους μετά από ενεργοποίηση (119, 124, 125), ενώ έχει ρόλο στην απαλοιφή αυτοδραστικών CD8 T κυττάρων που επάγεται από διασταυρούμενη παρουσίαση (cross-presentation) αυτοαντιγόνων (143).

Από παλιά ήταν γνωστό ότι αντισώματα για Fas μπορούσαν να παρέχουν συνδιεγερτικά σήματα για ανθρώπινα T κύτταρα in vitro. Πιο πρόσφατα δείχθηκε ότι η αδρανοποίηση του Fas in vitro αναστέλλει τη διέγερση T κυττάρων ενώ ο FasL προάγει τον πολλαπλασιασμό T κυττάρων και την έκκριση IL-2 σε απόκριση σε υποβέλτιστες συγκεντρώσεις αντι-CD3. Άλλες ενδείξεις που συνδέουν τον Fas με τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων προέρχονται από FADD^{-/-} T κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν σοβαρά ελαττωμένο πολλαπλασιασμό μετά από διέγερση του TCR τους (138).

Αποτελέσματα

1. Μελέτες πάνω στην ανοχή CD8⁺ T κυττάρων σε μοντέλο διπλών διαγονιδιακών ποντικών

1.0 Ερωτήματα-Προσεγγίσεις

Περιγράφηκαν στην Εισαγωγή οι μηχανισμοί ανοχής T λεμφοκυττάρων. Η σημασία της κατανόησης τους είναι απαραίτητη όχι μόνο για την κατανόηση της βιολογίας των T λεμφοκυττάρων αλλά και για το σχεδιασμό παρεμβάσεων σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα και στην ανοχή μοσχευμάτων.

Ένα από τα κύρια ερωτήματα της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ανοχής αυτοδραστικών κυτταροτοξικών T κυττάρων, δηλαδή η προσπάθεια αποσαφήνισης λειτουργιών και μηχανισμών που σχετίζονται με την μη «επίθεση» κυτταροτοξικών T κύτταρων ενάντια σε αντιγόνα εαυτού, παρά την ικανότητα αναγνώρισης τους.

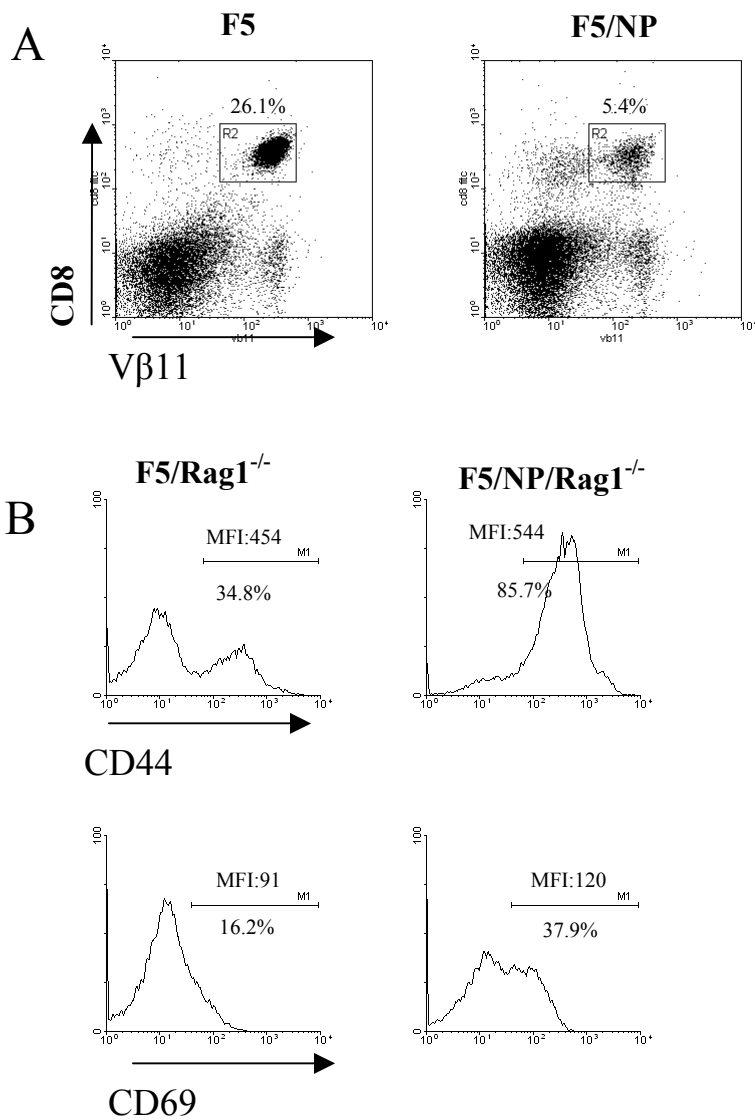
Για τη μελέτη της ανοχής σε αντιγόνα εαυτού χρησιμοποιήσαμε ένα μοντέλο διπλά διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν έναν TCR ορισμένης ειδικότητας, και συγχρόνως την πρωτεΐνη της οποίας ένας επίτοπος αναγνωρίζεται από αυτόν τον TCR. Ο TCR προέρχεται από έναν κυτταροτοξικό κλώνο, τον F5, και αναγνωρίζει ένα εννιαμερές πεπτίδιο (αα 366-374) από τη νουκλεοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης A/NT/60/68 παρουσιαζόμενο από το D^b MHC I μόριο. Ο F5 TCR φέρει τα Vα4 και Vβ11 μέλη των γονιδιακών οικογενειών των μεταβλητών περιοχών των α και β αλυσίδων αντίστοιχα. Τα cDNAs και των δύο αλυσίδων βρίσκονταν στην ίδια κατασκευή υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ανθρώπινου CD2 γονιδίου. Η πλειοψηφία των CD8 T κυττάρων των διαγονιδιακών ποντικών εκφράζει τον διαγονιδιακό TCR και αποκρίνονται στο αντιγόνο *in vivo* και *in vitro* (144). Επίσης, στα ποντίκια αυτά παρατηρείται πολύ μεγάλο ποσοστό CD8 T κυττάρων στη περιφέρεια αλλά και CD8 SP κυττάρων στο θύμο (skewing) (144) κάτι που έχει περιγραφεί και σε άλλα ποντίκια διαγονιδιακά για TCR που εκφράζεται σε CD8 κύτταρα. Όλα τα πειράματα έγιναν με ποντίκια που ήταν ομόζυγα για την ένθεση των γονιδίων των α και β αλυσίδων του F5 TCR (F5 ποντίκια), εκτός ενός πειράματος που χρησιμοποιήθηκαν και ετερόζυγα ποντίκια (F5 het).

Τα NP διαγονιδιακά ποντίκια εκφραζουν την νουκλεοπρωτεΐνη της γρίπης υπό τον έλεγχο του τάξης MHC I H-2K^b υποκινητή και το mRNA ανιχνεύεται τουλάχιστον στη σπλήνα και στο θύμο με RT-PCR (Steve Pascolo, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Συνεπώς στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια μπορούν να υπάρξουν εν δυνάμει αυτοδραστικοί κλώνοι κυτταροτοξικών T κυττάρων και έτσι τα ποντίκια αυτά αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για να μελετήσουμε τις ομοιοστατικές διαδικασίες που συγκροτούν την ανοχή των T κυττάρων, δηλαδή την κλωνική απαλοιφή και την κλωνική ανέργεια. Επίσης, χρησιμοποιώντας το παραπάνω μοντέλο ποντικών προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε γονίδια που σχετίζονται με τον άνεργο φαινότυπο T λεμφοκυττάρων, επειδή ελάχιστα ήταν γνωστά για τις διαφορές άνεργων και παρθένων T κυττάρων σε μεταγραφικό επίπεδο.

1.1 Η ανοχή στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια οφείλεται σε κλωνική απαλοιφή και ανάπτυξη ανέργειας στην περιφέρεια

Εξετάζοντας τα περιφερικά λεμφικά τους όργανα βρίσκουμε ότι τα F5/NP ποντίκια περιέχουν σημαντικά μικρότερο ποσοστό και αριθμό CD8⁺Vβ11⁺ T κυττάρων (δηλαδή F5 T κυττάρων) σε σχέση με τα F5 ποντίκια. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των F5 T κυττάρων στη σπλήνα των F5 ζώων είναι κατά μέσο όρο 22.3×10^6 και το ποσοστό τους επί των σπληνοκυττάρων 28.5%, ενώ στα F5/NP ζώα οι αντίστοιχοι αριθμοί είναι 4.5×10^6 και 7.2% (Εικόνα 1A). Παρόμοιες διαφορές βρίσκονται και μεταξύ των F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ζώων όπου το σύνολο των T κυττάρων φέρουν τον F5 TCR επειδή δεν μπορούν να ανασυνδυαστούν οι ενδογενείς α και β αλυσίδες. Τα περιφερικά F5/NP T κύτταρα έχουν μειωμένη επιφανειακή έκφραση του F5 TCR ενώ η επιφανειακή έκφραση του συνυποδοχέα CD8 δεν φαίνεται να έχει επηρεαστεί ((69) και προσωπικές παρατηρήσεις). Τα F5/NP T κύτταρα εκφράζουν στη μεγάλη πλειοψηφία τους τον μάρτυρα ενεργοποίησης CD44/rgp1 που αποτελεί ένδειξη ότι έχουν αναγνωρίσει και αποκριθεί στο αντιγόνο-εαυτού NP, κάτι που σημαίνει ότι η νουκλεοπρωτεΐνη παράγεται, επεξεργάζεται (processed) κανονικά και το 9μερές πεπτίδιο παρουσιάζεται από το D^b MHC I μόριο. Υπάρχει επίσης μεγαλύτερος πληθυσμός F5/NP T κυττάρων που εκφράζει τον πρώιμο μάρτυρα ενεργοποίησης CD69. Τα CD69⁺ F5/NP T κύτταρα είναι πολύ λιγότερα από τα αντίστοιχα CD44⁺ F5/NP και αυτό πιθανά οφείλεται στο ότι ο CD69 μάρτυρας αυξάνει παροδικά μετά τη συνάντηση με το αντιγόνο και κατόπιν επιστρέφει στα αρχικά του επίπεδα (Εικόνα 1B).



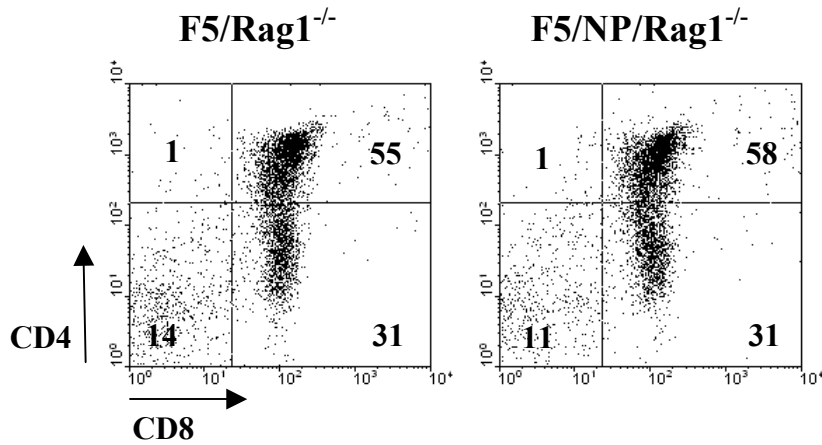
Εικόνα 1. Μειωμένη συχνότητα *F5* *T* κυττάρων στα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια *F5/NP*. Α. Σπληνοκύτταρα από *F5* και *F5/NP* ποντίκια ηλικίας 6-10 εβδομάδων αναλύονται με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των *CD8* και *Vβ11*. Τα ποσοστά αναφέρονται στη συχνότητα των $CD8^+Vβ11^+$ κυττάρων στη σπλήνα του κάθε ζώου. Β. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της επιφανειακής έκφρασης των μαρτύρων ενεργοποίησης *CD44* και *CD69* στα $CD8^+Vβ11^+$ κύτταρα από *F5/Rag1^{-/-}* και *F5/NP/Rag1^{-/-}* ποντίκια. Τα ποσοστά δηλώνουν τη συχνότητα των *F5* κυττάρων που εκφράζουν αυτούς τους μαρτυρες και το MFI την μέση ένταση φθορισμού των θετικών κυττάρων.

Τα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια F5/NP ποντίκια δεν εμφανίζουν αυξημένη αρνητική επιλογή στο θύμο όσο αυτό κρίνεται από τα ποσοστά και τους απόλυτους αριθμούς των DP και SP υποπληθυσμών τους σε σχέση με τα F5 (Εικόνα 2A). Συνεπώς δεν υπάρχει έκδηλη κεντρική ανοχή στα F5/NP ποντίκια και ώριμα εν δυνάμει αυτοδραστικά CD8 T εξέρχονται στην περιφέρεια των ζώων. Όμως τα F5/NP CD8 SP θυμοκύτταρα εκφράζουν μάρτυρες ενεργοποίησης σε υψηλότερο βαθμό από τα αντίστοιχα F5 (Εικόνα 2B).

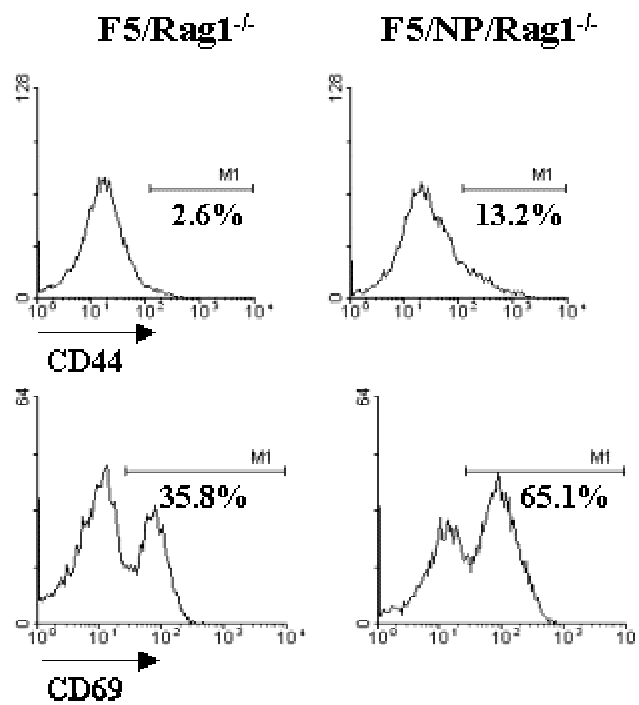
Τα F5/NP CD8 T κύτταρα που έχουν επιβιώσει της κλωνικής απαλοιφής στη περιφέρεια δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό μετά από διέγερσή τους με NP68 πεπτίδιο *in vitro*. Στην Εικόνα 3A φαίνεται μια τυπική τέτοια δοκιμασία που δείχνει ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις NP68 που χρησιμοποιήθηκαν, τα F5/NP CD8 T λεμφοκύτταρα είναι ανίκανα για πολλαπλασιασμό μετά από αντιγονική διέγερση κάτι που είναι χαρακτηριστικό της κλωνικής ανέργειας. Η ανέργεια αυτή μόνο μερικώς μπορεί να αναστραφεί μετά από προσθήκη εξωγενούς IL-2 (Εικόνα 3B) κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο άνεργος φαινότυπος δεν μπορεί να οφείλεται μόνο σε ελαττωματική παραγωγή IL-2. Χαρακτηριστικά τα άνεργα F5/NP CD8 T κύτταρα δεν επάγουν σε μεγάλο βαθμό την αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 μετά από διέγερσή τους με NP68 *in vitro* σε σύγκριση με τα παρθένα F5 κάτι που πιθανώς σημαίνει ότι δεν μπορούν να αξιοποιήσουν επαρκώς την IL-2 (Εικόνα 3Γ).

Η υποδραστικότητα των F5/NP CD8⁺ T κυττάρων δεν παρατηρείται ήδη από το θύμο καθώς τα F5/NP/Rag1^{-/-} θυμοκύτταρα ενσωματώνουν συγκρίσιμες ποσότητες θυμιδίνης με τα F5/Rag1^{-/-} σε *in vitro* δοκιμασία πολλαπλασιασμού μετά από διέγερση με NP68 (Εικόνα 4).

A

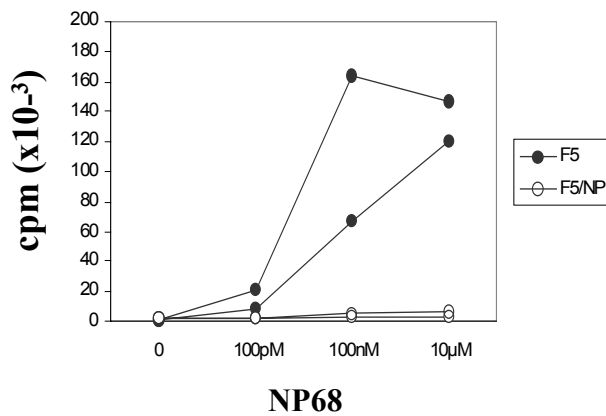


B

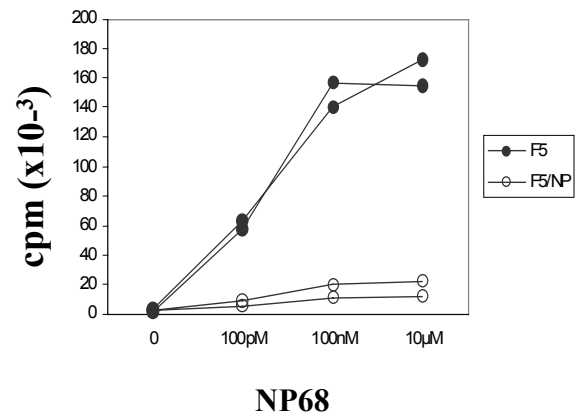


Εικόνα 2. Αυξημένα επίπεδα μαρτύρων ενεργοποίησης στα CD8 SP θυμοκύτταρα των F5/NP ποντικών, χωρίς να συνοδεύονται από αυξημένη αρνητική επιλογή. Α. Με αριθμούς απεικονίζονται τα ποσοστά των DN (κάτω αριστερά), DP (πάνω δεξιά), CD4 SP (πάνω αριστερά) και CD8 SP (κάτω δεξιά) θυμοκυττάρων από F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ποντίκια. Β. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της επιφανειακής έκφρασης των μαρτύρων ενεργοποίησης CD44 και CD69 στα CD8⁺ SP θυμοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ποντίκια. Τα ποσοστά δηλώνουν τη συχνότητα των CD8⁺ SP θυμοκυττάρων που εκφράζουν αυτούς τους μαρτυρες .

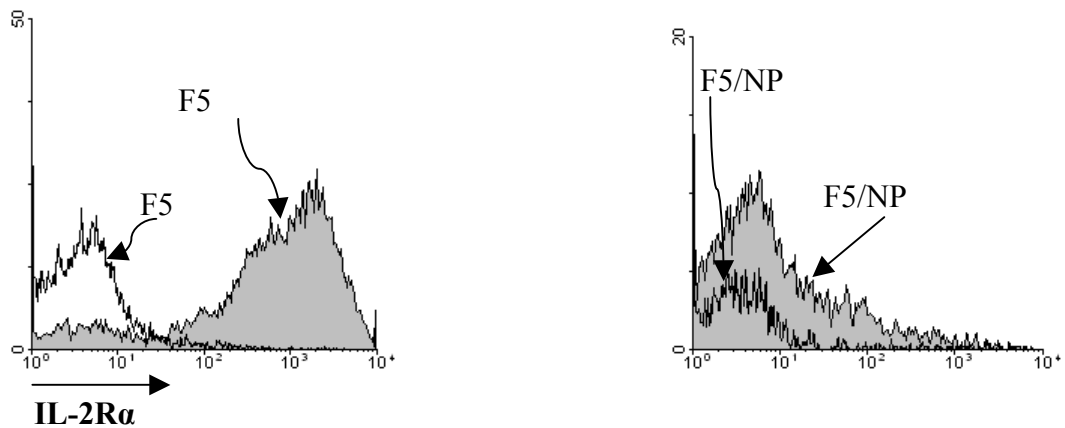
A



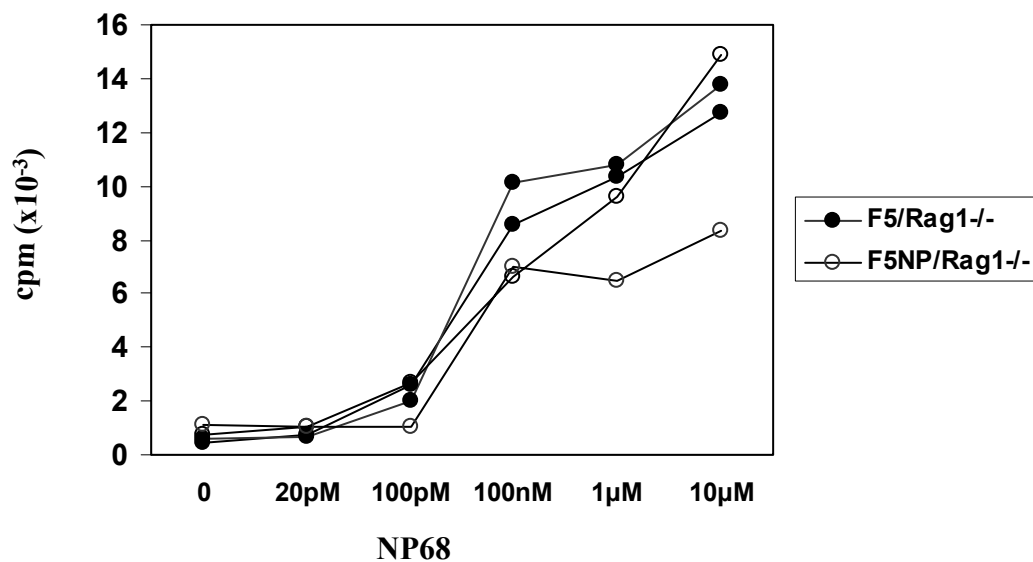
B



Γ



Εικόνα 3. Τα F5/NP CD8 T κύτταρα αποκρίνονται σε αντιγονική διέγερση πολύ λιγότερο από τα F5. Α. Σπληνοκύτταρα από F5 και F5/NP ζώα που περιέχουν ίσο αριθμό CD8 T κυττάρων διεγείρονται με ακτινοβολημένα σπληνοκύτταρα C57bl/10 που έχουν προεπαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις πεπτιδίου NP68. Μετά από 2 ημέρες καλλιέργειας επωάστηκαν για 6 επιπλέον ώρες με ³H-dTTP και μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια Β. Τα κύτταρα του προηγούμενου πειράματος καλλιεργήθηκαν σε μέσο εμπλουτισμένο (5%) με υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων που παράγουν IL-2. Γ. Σε F5 και F5/NP CD8 T κύτταρα που διεγέρθηκαν με τον τρόπο της εικόνας Α (1µM NP68), έγινε FACS ανάλυση στην έκφραση του IL-2Rα μορίου (CD25).



Εικόνα 4. Τα F5/NP θυμοκύτταρα πολλαπλασιάζονται στον ίδιο βαθμό με τα F5 σε απόκριση στο NP68 *in vitro*. Ίσοι αριθμοί θυμοκυττάρων από F5/Rag1^{-/-} και F5NP/Rag1^{-/-} ποντίκια διεγείρονται με ακτινοβολημένα C57bl/10 σπληνοκύτταρα που έχουν προεπωαστεί με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις NP68. Μετά από 40 h συγκαλλιέργειας επώαστηκαν για 6 επιπλέον ώρες με ³H-dTTP και μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια.

1.2 Το υπεραντιγόνο SEA προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των άνεργων F5/NP CD8 T κυττάρων *in vitro* και *in vivo*.

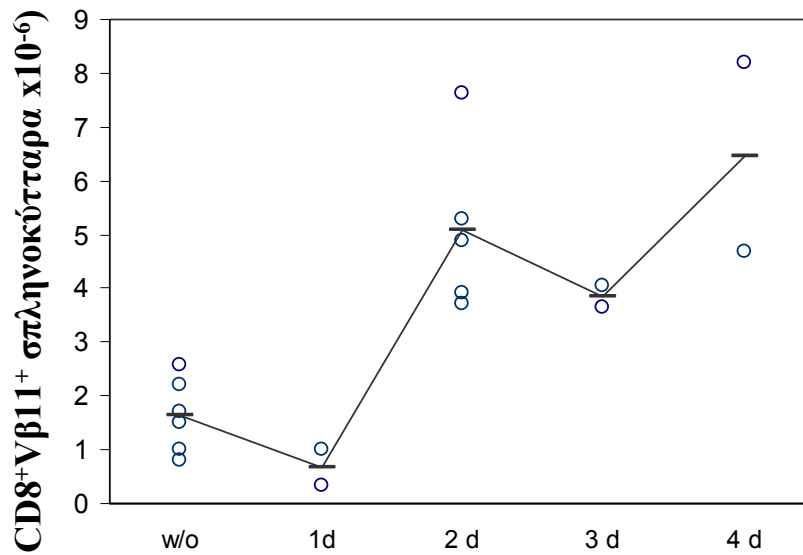
Τα υπεραντιγόνα είναι μικροβιακές τοξίνες που προκαλούν μαζική ενεργοποίηση των T κυττάρων, απελευθέρωση κυττοκινών και συστηματικό σοκ στον οργανισμό. Πολύ μικρές ποσότητες (της τάξης των fg) υπεραντιγόνου είναι ικανές να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό T κυττάρων *in vitro*. Η βακτηριακή τοξίνη SEA εκκρίνεται από τα Gram-θετικά βακτήρια *Staphylococcus aureus* και μπορεί να διεγείρει τα ποντίκια T κύτταρα που φέρουν τις Vβ11 και Vβ3 μεταβλητές περιοχές της β αλυσίδας του TCR με ταυτόχρονη δέσμευσή της σε αυτές τις μεταβλητές περιοχές και στα τάξης II MHC μόρια (145).

Όπως αναφέρθηκε τα F5/NP CD8 T κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται σε απόκριση στο πεπτίδιο NP68 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεσή του σε ποντίκια (69). Αντίθετα ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις SEA σε F5NP/Rag1^{-/-} ποντίκια οδηγούν στην ενεργοποίηση των F5/NP CD8 T κυττάρων που γίνεται αντιληπτή με τη βλαστοποίηση

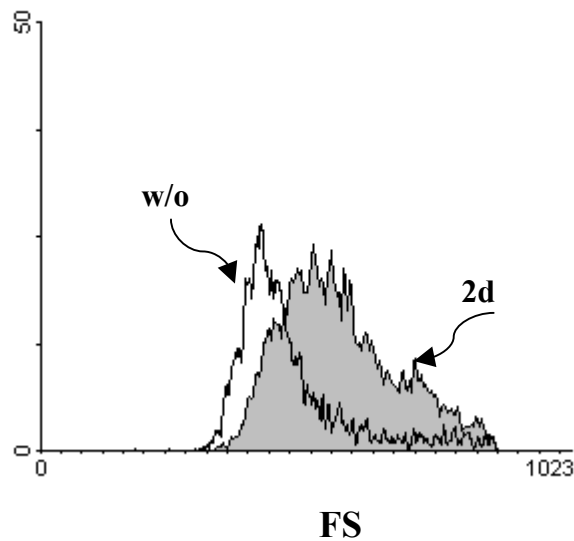
και τον πολλαπλασιασμό τους. Έτσι στην Εικόνα 5A βλέπουμε ότι μετά την ελάττωση των αποκρινόμενων F5 κυττάρων την μέρα 1 (φαινόμενο σύνηθες μετά από ενέσεις αντιγόνων ή υπεραντιγόνων) ακολουθεί αύξηση του αριθμού τους στη σπλήνα του ζώου τουλάχιστον μέχρι την μέρα 4 που συνοδεύεται και με αύξηση του μεγέθους τους (σχηματισμός βλαστών) (Εικόνα 5B). Στα ποντίκια που ενίονται με SEA απαλείφεται σχεδόν η ολότητα των DP θυμοκυττάρων τους και η πλειοψηφία των CD8 SP (Εικόνα 6A, B). Τα F5 T κύτταρα που ανακτώνται από σπλήνες F5/NP ποντικών ενεμένων με SEA μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε απόκριση στο πεπτίδιο NP68 in vitro (Steve Pascolo, αδημοσίευτα δεδομένα) κάτι που είναι χαρακτηριστικό αναστροφής του άνεργου χαρακτήρα τους.

Η SEA μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλασιασμό τα F5/NP κύτταρα και in vitro όπως φαίνεται στην Εικόνα 7 (αν και σε μικρότερο βαθμό από ότι τα παρθένα F5), κάτι που δεν συμβαίνει όταν τα κύτταρα αυτά διεγερθούν με το NP68.

A

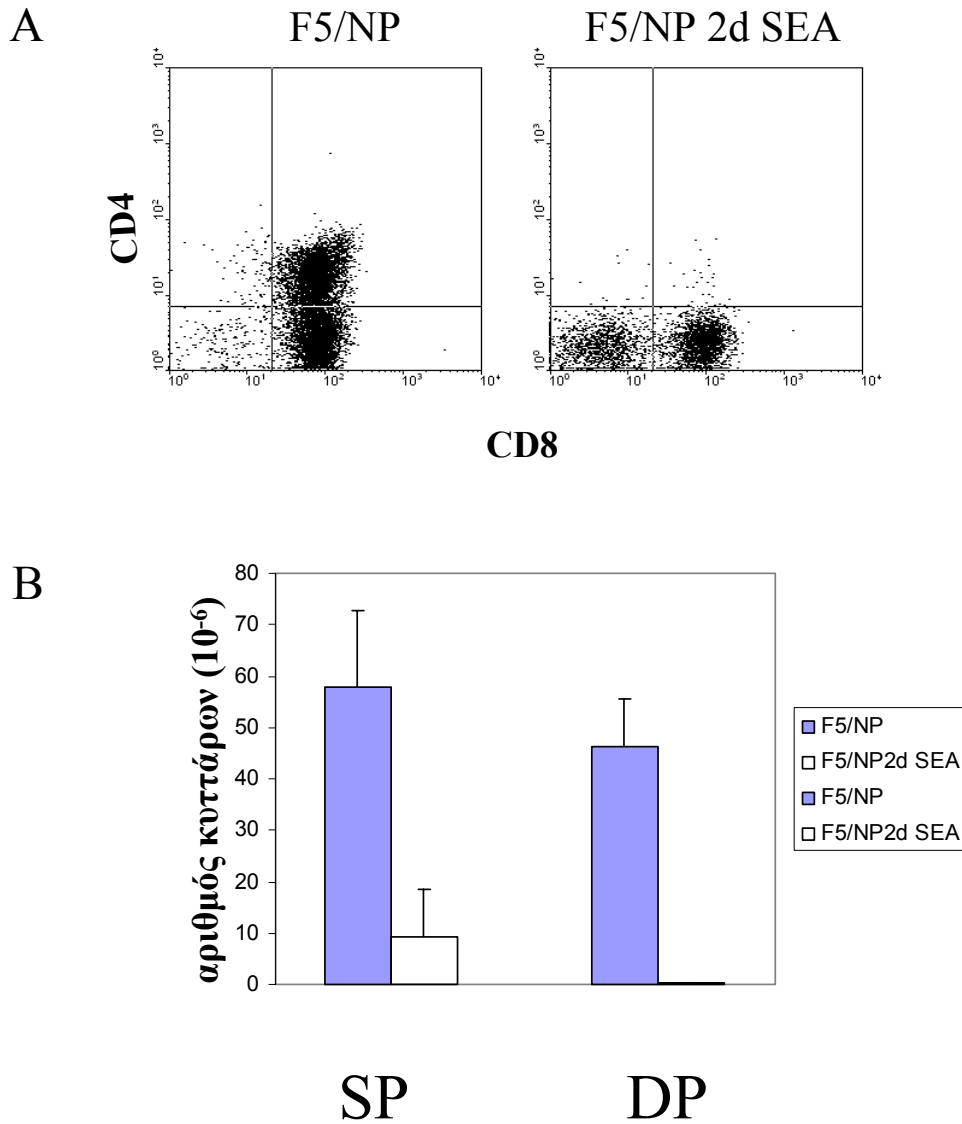


B

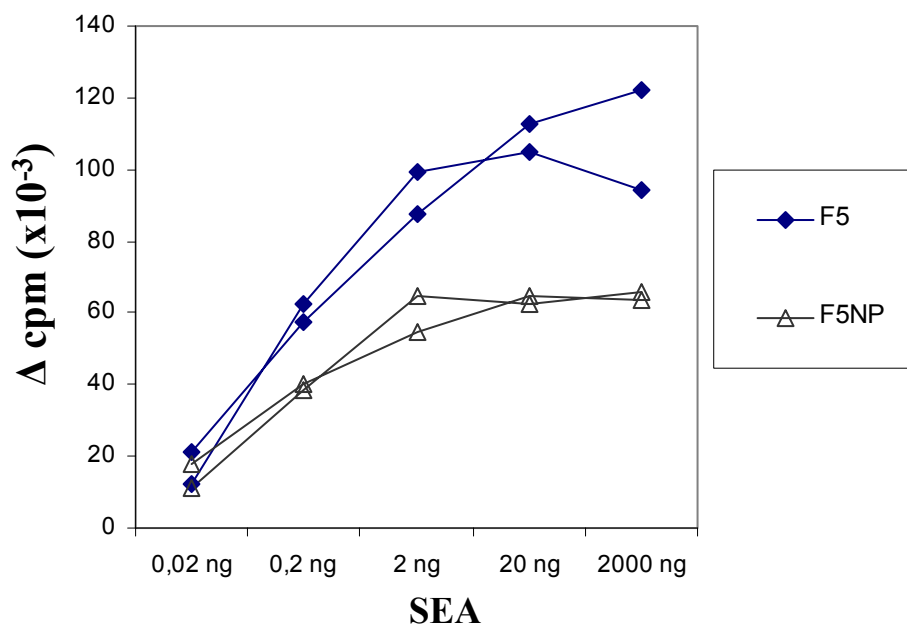


Εικόνα 5. Ένεση SEA σε F5/NP ποντίκια προκαλεί την βλαστοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των F5 κυττάρων. Α. F5/NP/Rag1^{-/-} ποντίκια που δεν ενέθηκαν (w/o) ή ενέθηκαν με 90 μg SEA επί 1, 2, 3, ή 4 ημέρες θυσιάστηκαν και τα σπληνοκύτταρα τους μετρήθηκαν σε μικροσκόπιο και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής με αντισώματα για CD8 και Vβ11. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι απόλυτοι αριθμοί F5 T κυττάρων σε συνάρτηση με το πρωτόκολλο ενέσεων. Κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι και τα ευθύγραμμα τμήματα αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές. Β. Απεικονίζεται η μεταβολή στο μέγεθος (FS: Forward Scatter) των F5 T κυττάρων μετά τις ενέσεις με SEA επί 2 ημέρες.

Θύμος



Εικόνα 6. Ένεση SEA σε F5/NP ποντίκια οδηγεί σε απαλοιφή των απλά θετικών (SP) και διπλά θετικών (DP) θυμοκυττάρων. Α. 6-10 εβδομάδων F5/NP/Rag1^{-/-} ποντίκια ενίονταν ενδοπεριτοναϊκά με 90 μg SEA επί 2 ημέρες, και κατόπιν κυτταρικά εναιωρήματα θύμων αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τα επιφανειακά μόρια CD4 και CD8. Β. Με συνδυασμό μικροσκοπικής καταμέτρησης κυττάρων και κυτταρομετρίας ροής υπολογίστηκαν οι απόλυτοι αριθμοί των διαφορετικών υποπληθυσμών στο θύμο. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια ίδιου γονοτύπου και ηλικίας που δεν ενέθηκαν με SEA. Οι στήλες απικονίζουν τις μέσες τιμές ενώ οι μπάρες είναι ίσες με μία τυπική απόκλιση. Το πείραμα είναι ένα τυπικό από αρκετά παρόμοια και περιλαμβάνει 4 ζώα από κάθε είδος.



Εικόνα 7. Το υπεραντιγόνο SEA μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των F5/NP T κυττάρων *in vitro*. 6-10 εβδομάδων F5 και F5/NP ποντίκια θυσιάστηκαν και σπληνοκύτταρά τους που περιείχαν ίσο αριθμό CD8 T κυττάρων καλλιεργήθηκαν παρουσία των παραπάνω ποσοτήτων SEA. Μετά από 2 ημέρες επώαστηκαν για 6 επιπλέον ώρες με ³H-dTTP και μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια

1.3 Προσπάθειες εύρεσης γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή ή/και τη διατήρηση του άνεργου φαινοτύπου.

1.3.1 Σύγκριση μεταγραφικού προτύπου παρθένων και άνεργων CD8 T κυττάρων

Θέλαμε περαιτέρω να συγκρίνουμε το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των παρθένων F5 CD8 T κυττάρων και των άνεργων F5/NP CD8 T κυττάρων. Ο βασικός σκοπός ήταν η ανίχνευση νέων, αχαρακτήριστων γονιδίων που να εμπλέκονται στην επαγωγή ή/και διατήρηση του άνεργου φαινοτύπου CD8 T κυττάρων.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν μία βελτιωμένη εκδοχή της μεθόδου του mRNA Differential Display που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας (146). Για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι απαραίτητος ο καθαρισμός F5 T κυττάρων από σπλήνες ποντικών και η απομόνωσή τους επειδή το RNA από άλλους κυτταρικούς τύπους θα αλλοίωνε τα αποτελέσματά μας. Για τούτο το λόγο απομονώθηκαν CD8⁺ T κύτταρα είτε επιλέγοντας τα θετικά με αντίσωμα που αναγνωρίζει το CD8 μόριο είτε αρνητικά χρησιμοποιώντας μίγμα αντισωμάτων που αναγνωρίζει όλα τα μη-T κύτταρα μιας σπλήνας (βλέπε Υλικά-Μέθοδοι). Στις μελέτες μας χρησιμοποιήθηκαν κυρίως ποντίκια στο Rag-1^{-/-} γενετικό υπόβαθρο ώστε όλα τα CD8 T κύτταρα να εκφράζουν τον F5 TCR (τα F5/NP ζώα στο Rag-1^{+/+} υπόβαθρο εκτός από άνεργα F5 CD8 κύτταρα έχουν και παρθένα CD8 κύτταρα άλλων ειδικοτήτων). Με τις παραπάνω μεθόδους λαμβάνονταν κυτταρικοί πληθυσμοί καθαρότητας 80%-98% σε CD8 T κύτταρα.

Από αυτούς τους CD8⁺ πληθυσμούς των δύο ζώων γίνεται παρασκευή ολικού RNA, κατεργασία του με Dnάση για απομάκρυνση του γενωμικού DNA, και ακολούθως ανάστροφη μεταγραφή με χρήση ενός πλήρως εκφυλισμένου (degenerate) εξανουκλεοτιδίου σαν εκκινητή. Στο cDNA που προκύπτει γίνεται PCR με αυθαίρετους, αλλά όχι εκφυλισμένους δεκαμερείς εκκινητές και χρησιμοποιώντας [α -³⁵S]-dATP. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και μετά από αυτοραδιογραφία αναλύεται το πρότυπο ζώνωσης που προέκυψε από τους πληθυσμούς των παρθένων και άνεργων CD8 T κυττάρων (Εικόνα 8A). Ζώνες που εμφανίζονται διαφορεικά αποκόπτονται από την πηκτή, εκλούνται σε νερό και μετά από νέα PCR με τους αρχικούς εκκινητές και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, κλωνοποιούνται σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης

προϊόντων PCR και αναλύεται μια σειρά βακτηριακών κλώνων με τρόπο που εξηγείται παρακάτω. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με βάση τους παρακάτω περιορισμούς: ο εκκινητής να είναι δεκαμερής, να έχει περιεκτικότητα σε GC 60%-70% να μην περιέχει αν είναι δυνατόν κωδικόνια λήξης, να μην έχει κωδικόνια που αντιστοιχούν σε γλυκίνη (για να μην πολλαπλασιάζονται τα ευρέως απαντώμενα mRNA των κολλαγόνων), και λαμβάνοντας υπόψη τη χρήση των κωδικονίων (codon usage) στο ποντίκι (147).

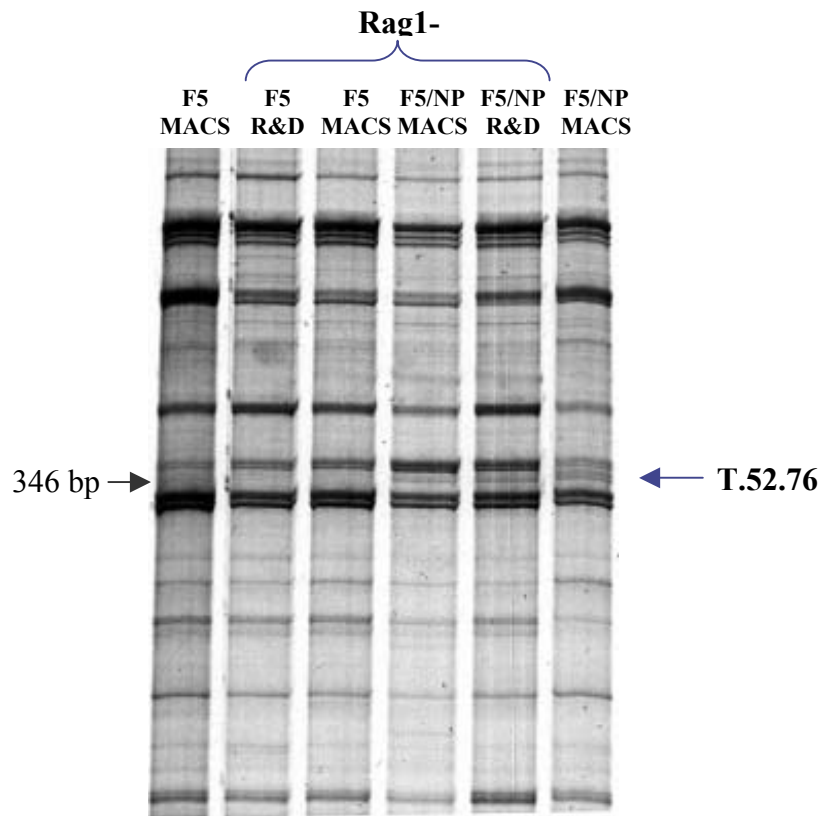
Τα πρότυπα ζώνωσης αυτών των RT-PCR αντιδράσεων δεν είναι απολύτως αναπαραγώγιμα και το πρότυπο διαφέρει εν μέρει ανάλογα με την παρασκευή του υποστρώματος (matrix), το μηχάνημα θερμικών κύκλων κ.ά., πέραν του γεγονότος ότι τόσο ευαίσθητες μέθοδοι είναι επιδεκτικές σε μολύνσεις. Επίσης αρκετά συχνό είναι μία ζώνη να αντιπροσωπεύει πάνω από ένα προϊόν. Για το λόγο αυτό διαφορετικοί κλώνοι προερχόμενοι από την ίδια ζώνη μεταφέρονται κατά Southern εις διπλούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υβριδοποιούνται με τα ολικά προϊόντα της αρχικής PCR. Μετά την αυτοραδιογραφία απορρίπτονται εκείνοι οι κλώνοι που υβριδοποιούνται και με τους δύο ιχνηθέτες (Εικόνα 8B).

Αναλύθηκαν τα πρότυπα ζώνωσης που προέκυψαν από 60 διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών και αποκόπηκαν, κλωνοποιήθηκαν και βρέθηκε η αλληλουχία 20 διαφορετικών ζωνών. Η πιστοποίηση της διαφορικής έκφρασης των αλληλουχιών αυτών έγινε με διάφορες κατά περίπτωση τεχνικές όπως ανάλυση Northern, ημιποσοτική PCR, και δοκιμασίες προστασίας από Rnάση. Τα περισσότερα προϊόντα που ελέγχθηκαν και φαίνονταν να εκφράζονται διαφορεικά στο πήκτωμα αγαρόζης αποδείχθηκε ότι ήταν ψευδώς θετικά (ή απλώς δεν αποδείχθηκε ότι ήταν αληθώς θετικά).

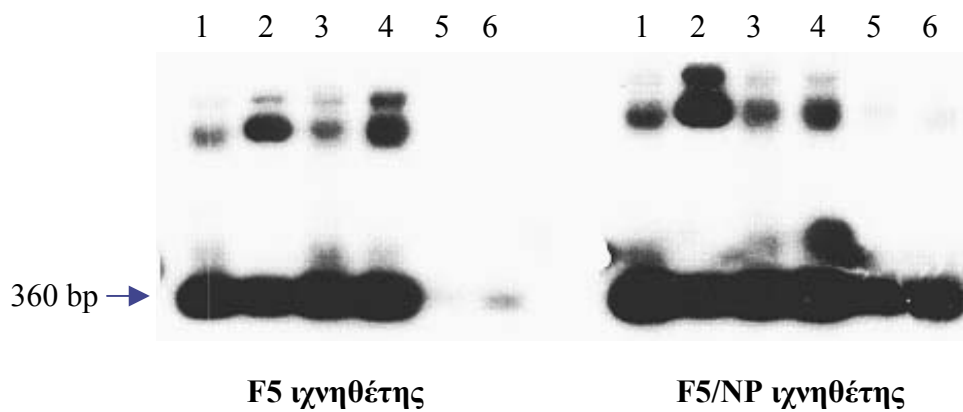
Από το πρότυπο που προέκυψε από τον συνδυασμό εκκινητών BS52 και BS76 παρατηρείται μία αδύναμη ζώνη μήκους 344 bp (που ονομάστηκε T.52.76) στα προϊόντα PCR που προέρχονται από CD8 T κύτταρα F5/NP/Rag1^{-/-} ποντικών απομονωμένα με θετικό (MACS) ή αρνητικό (R&D) τρόπο ενώ δεν παρατηρείται στα cDNA από CD8 T κύτταρα F5/Rag1^{-/-} ποντικών. Επίσης ανιχνεύεται σε υπόστρωμα από F5/NP ποντίκια και λιγότερο σε υπόστρωμα από F5 ποντίκια. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCR 2.1 (Invitrogen) (Εικόνα 9) και βρέθηκε η αλληλουχία του που είναι η παρακάτω

```
1 CTGGTCACAC TCCATCATGA ACAAAGTCAG GATCGGAACT CAAGGTCATG GAGGCATGTT
61 ACTACGTA CTGGCTTGCTCC TCAGGCAAGC TTAGCCTGCT CTCTTATAGC AGCCAGGATC
121 ACCCTCATCA ATTATCAATC AAGAAAACAC CCCCAGGCTT TGCCACGGG GCCAATGTGG
181 TGGTGACATT TTTCTCAGTT GAGGTTCCCT CTCCCCGAT GACTCTATCG GGTTTCATGA
241 AGCCCTTCAG CACACTAGGC AAGGGTTCTA CTATTGAGTT ACATTACAG ACACAGAAAT
301 TGTCTGTTCA ATGATGGGTA TGGAACCAGC ATGTACCTCG CTTG
```

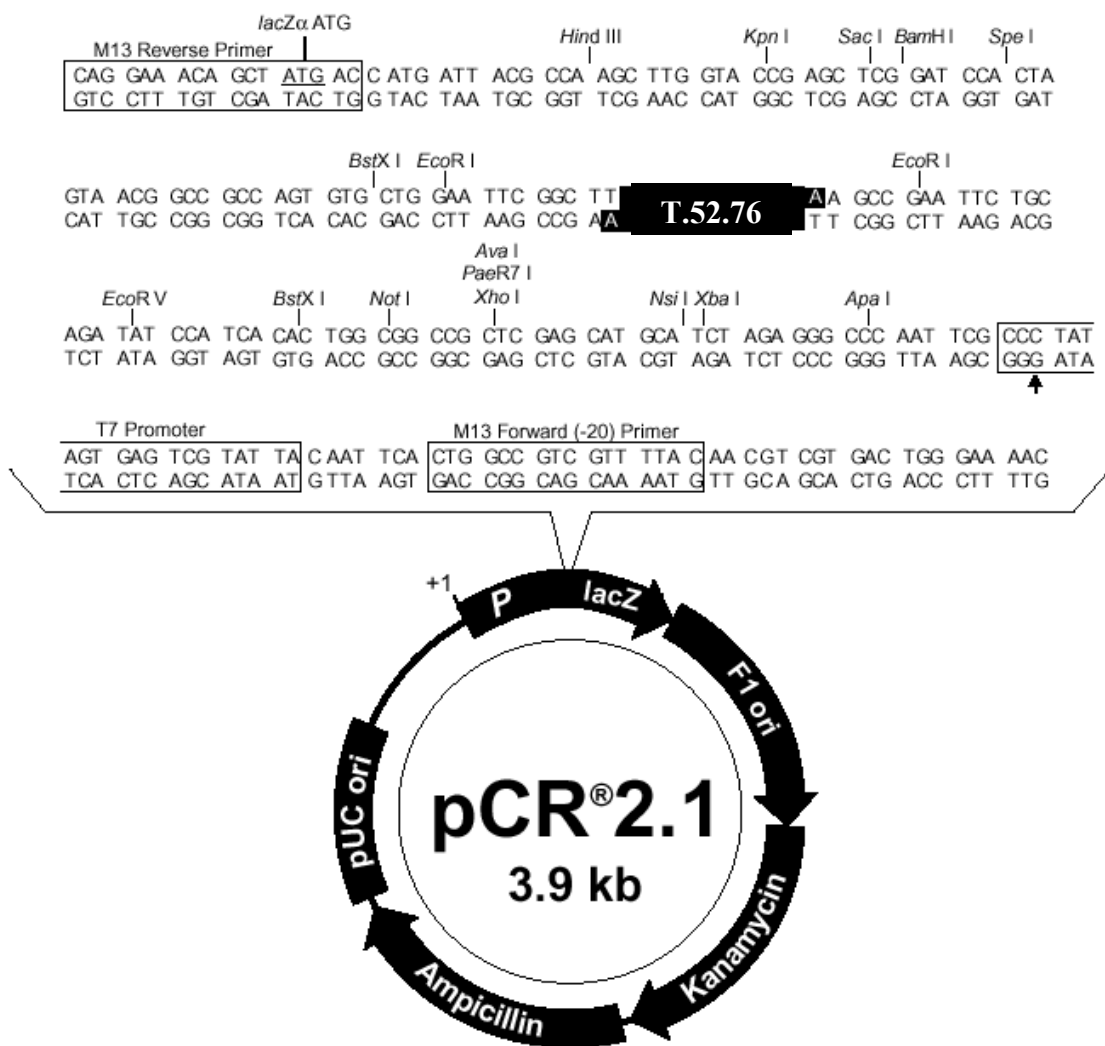
A



B



Εικόνα 8. Απομόνωση του προϊόντος T52.76. Α. Αυτοραδιογραφία, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης, προϊόντων RT-PCR σε υποστρώματα από F5 και F5/NP CD8⁺ κύτταρα ποντικών Rag1^{-/-} ή Rag1^{+/+} απομονωμένα με θετικό (MACS) ή αρνητικό τρόπο (R&D). Με βέλος επισημαίνεται η ζώνη που παραλήφθηκε και αποκόπηκε μετά την PCR με εκκινητές BS52 και BS76. Β. Μετά την κοπή της ζώνης και κλωνοποίηση των προϊόντων της σε φορέα pCR2.1, τα ενθέματα απελευθερώθηκαν με EcoRI και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη. Τα παραπάνω έγιναν εις διπλούν και οι δύο πηκτές στύπώθηκαν κατά Southern. Η μία μεμβράνη υβριδοποιήθηκε με ιχνηθέτη τα ολικά προϊόντα της RT-PCR με τους προαναφερθέντες εκκινητές και υπόστρωμα από F5/Rag1^{-/-} cDNA(αντιστοιχεί στην 3η σειρά της εικόνας Α), ενώ η άλλη με υπόστρωμα από F5/NP/Rag1^{-/-} cDNA(αντιστοιχεί στην 4η σειρά της εικόνας Α). Παρουσιάζονται 6 κλώνοι από τους οποίους οι 5 και 6 εμφανίζουν μεγάλη διαφορά στην ένταση σήματος μεταξύ των δύο υποστρωμάτων και αποδείχθηκε ότι έχουν την ίδια αλληλουχία (T52.76)



Εικόνα 9. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR2.1 με το ένθεμα T.52.76

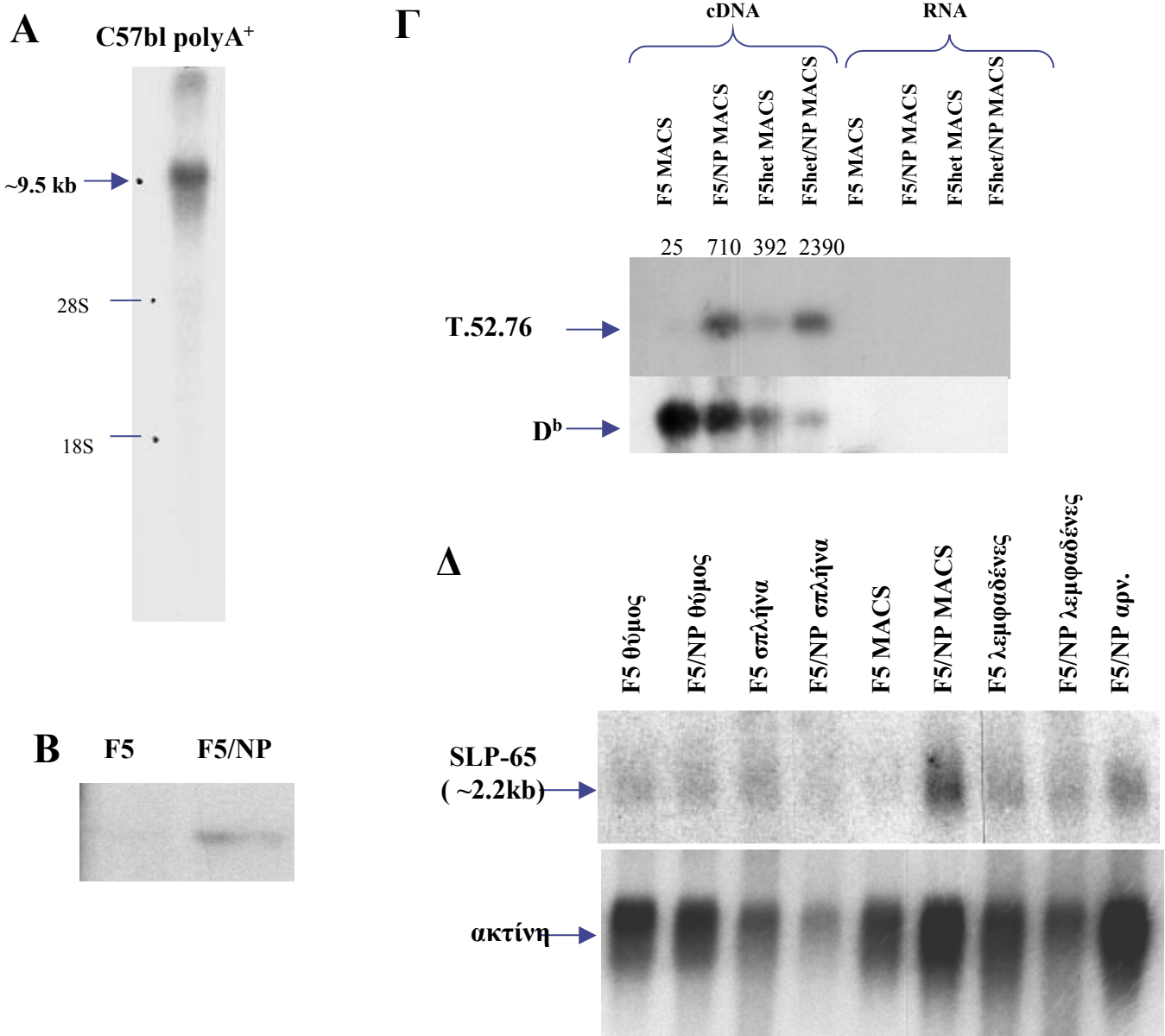
και στην οποία κανένα από τα 6 πλαίσια ανάγνωσης δεν είναι ανοιχτό. Σύγκριση της αλληλουχίας του με τις καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιώντας τα προγράμματα FASTA και BLAST, δεν έδειξε ταυτότητα ή σημαντική ομοιότητα με κάποια άλλη αλληλουχία.

1.3.2 Το προϊόν T52.76 εκφράζεται διαφορετικά σε άνεργα F5/NP CD8 T κύτταρα

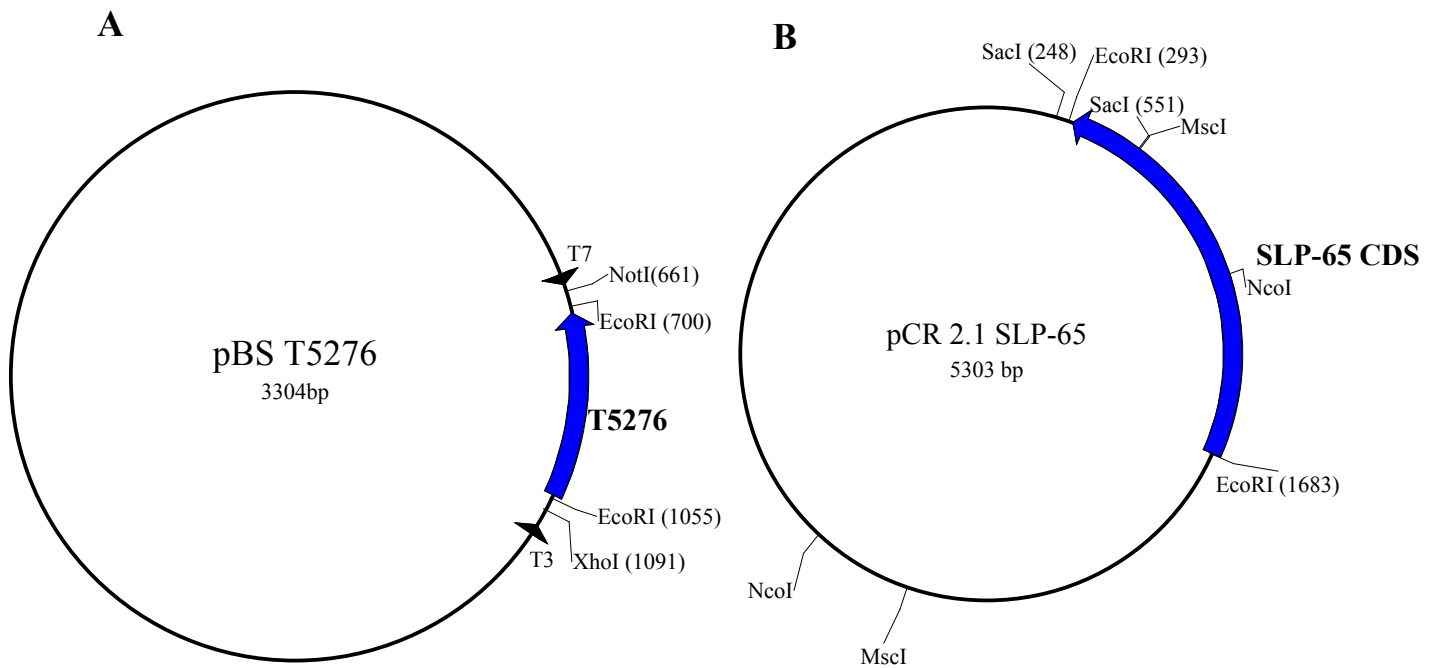
Για να εξεταστεί αν πράγματι το γονίδιο που αντιστοιχεί στην αλληλουχία T.52.76 εκφράζεται διαφορετικά, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ολικό RNA από σπλήνες F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ποντικών σε ανάλυση Northern χωρίς όμως να ανιχνευθεί οποιοδήποτε σήμα. Παρόμοιο ήταν το αποτέλεσμα και όταν χρησιμοποιήθηκε poly(A⁺)RNA από σπληνοκύτταρα των παραπάνω ποντικών. Χρησιμοποιώντας poly(A⁺)RNA από σπλήνα C57bl/10 ποντικών ανιχνεύθηκε μια ζώνη που αντιστοιχεί σε RNA μεγαλύτερο από 10 kb (Εικόνα 10A).

Επειδή δεν ανιχνεύονταν κάποια ζώνη στη σύγκριση F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} με ανάλυση Northern, εφαρμόστηκε η δοκιμασία προστασίας από Rnάση που είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος. Έτσι, το T52.76 υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα Bluescript KS+ στη θέση EcoRI (Εικόνα 11A). Επειδή η φορά μεταγραφής του γονιδίου που αντιστοιχεί στο T.52.76 ήταν άγνωστη η κατασκευή αυτή πέφθηκε είτε με XhoI είτε με NotI ώστε να προκύψουν δύο διαφορετικά ευθύγραμμα μόρια. Χρησιμοποιώντας μεγάλες ποσότητες ολικού RNA από σπλήνες F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ποντικών σε υβριδοποίηση με το σημασμένο RNA που μεταγραφόταν από τον T7 υποκινητή (δηλαδή από την κατασκευή που είχε πεφθεί με XhoI) ανιχνεύθηκε μια αχνή ζώνη στο RNA από σπλήνες F5/NP/Rag1^{-/-} ποντικών και που ήταν σημαντικά ασθενέστερη στο RNA από σπλήνες F5/Rag1^{-/-} ζώων (Εικόνα 10B). Αντίθετα, στα δείγματα που υβριδοποιήθηκαν με το σημασμένο RNA από τον T3 υποκινητή δεν ανιχνεύθηκε καμία ζώνη (δεν δείχνεται).

Όμως επειδή στο πείραμα προστασίας από Rnάση χρησιμοποιήθηκε RNA από ολόκληρη σπλήνα μπορεί και άλλοι κυτταρικοί τύποι πέραν των T κυττάρων να συνεισέφεραν στη διαφορεική αυτή ένταση ζώνωσης, και συνεπώς ήταν αναγκαίο να πιστοποιήσουμε ότι το προϊόν T.52.76 εκφράζεται στα άνεργα CD8⁺ T κύτταρα πολύ περισσότερο από ότι στα αντίστοιχα παρθένα. Για το λόγο αυτό έγινε ημιποσοτική PCR σε cDNA από απομονωμένα παρθένα και άνεργα CD8⁺ T κύτταρα. Σαν γονίδιο εσωτερικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το D^b που εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους της σπλήνας, και οι κύκλοι στους



Εικόνα 10. Το προϊόν T.52.76 που αντιστοιχεί στο SLP-65 γονίδιο εκφράζεται διαφορεικά στα άνεργα F5/NP CD8⁺ T κύτταρα. Α. Ανάλυση Northern σε 20 γ polyA⁺ RNA από σπλήνες C57bl/10 ποντικών. Β. Δοκιμασία προστασίας από Rnάση χρησιμοποιώντας 150 γ ολικού RNA από σπλήνες F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ποντικών και ιχνηθέτη T52.76 antisense RNA. Γ. Ημιποσοτική PCR σε cDNAs και RNAs από διάφορους τύπους απομονωμένων CD8⁺ κυττάρων με εκκινητές ειδικούς για το T.52.76 και το D^b. Οι αριθμοί είναι μονάδες έντασης σήματος της T52.76 ζώνης κανονικοποιημένες ως προς την ένταση σήματος της D^b ζώνης. Δ. Ανάλυση Northern σε ιστούς και απομονωμένα CD8⁺ T κύτταρα από F5/Rag1^{-/-} και F5/NP/Rag1^{-/-} ποντίκια με ιχνηθέτη το cDNA του γονιδίου SLP-65 ή τμήμα του cDNA της β-ακτίνης.



Εικόνα 11. Πλασμιδιακοί χάρτες. **A.** Η αλληλουχία T.52.76 κλωνοποιημένη στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II KS+. Η αρχή του μπλε βέλους είναι το νουκλεοτίδιο +1 της αλληλουχίας T52.76. Τα μαύρα βέλη αντιπροσωπεύουν τους T3 και T7 υποκινητές. **B.** Παρουσιάζεται η κωδική περιοχή του SLP-65 κλωνοποιημένη στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pCR2.1. Το βέλος ενδεικνύει το πλαίσιο ανάγνωσης του SLP-65.

οποίους έγινε η αντίδραση επιλέχθηκαν σε πιλοτικά πειράματα ώστε η ποσότητα και των δύο προϊόντων να συναρτάται εκθετικά από τον αριθμό των κύκλων. Παρατηρούμε ότι τόσο σε ποντίκια ετερόζυγα για TCR (F5het) όσο και σε ομόζυγα (F5), τα άνεργα F5/NP CD8⁺ T κύτταρα εκφράζουν πολύ περισσότερο T52.76 προϊόν από ότι τα παρθένα F5 CD8⁺ T κύτταρα (Εικόνα 10Γ) αν τα παραπάνω αποτελέσματα ποσοτικοποιηθούν σε phosphoimager και κανονικοποιηθούν ως προς την έκφραση του D^b. Οι ζώνες αυτές προέρχονται από cDNA και όχι από γενωμικό DNA, καθώς ίση ποσότητα δειγμάτων στα οποία δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή δεν έδινε κάποιο προϊόν (Εικόνα 10Γ).

Περαιτέρω, και θέλοντας να αντλήσουμε περισσότερες πληροφορίες για την αλληλουχία του διαφορικά εκφραζόμενου μεταγράφου, προσπαθήσαμε να λάβουμε ένα μεγαλύτερο τμήμα του με πειράματα RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Έγινε πειράματα 5' RACE και 3' RACE. Εν συντομία, για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε Marathon-Ready cDNA από σπλήνες αρσενικών ποντικών Balb/c (Clontech) που είναι συνδεδεμένο στα άκρα του με κατάλληλους προσαρμοστές (adaptors). Χρησιμοποιώντας εκκινητές πάνω στο T.52.76 και εκκινητές πάνω στους προσαρμοστές μπορούν να πολλαπλασιαστούν εκλεκτικά τμήματα του cDNA που μας ενδιαφέρει πολύ μεγαλύτερα από το αρχικό. Κάνοντας 3' RACE στο T.52.76 και ακολούθως re-PCR με εσωτερικούς εκκινητές καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε ένα προϊόν μήκους 1112 bp που βρέθηκε η αλληλουχία του. Αυτή σε συνδυασμό με την T.52.76 δίνει ένα contig μήκους 1270 βάσεων που ονομάστηκε T4 και η αλληλουχία του είναι η παρακάτω:

```

1  GCCGCCCGGG CAGGTGAAAA AAGAAAAAGA ACATAAAACA TACATAGACA GGGAGACACA
61  CACAATTGCA CATCATAAAT CCCATAAAAC ACAAAGTCAG AAACCCATAA TACATCAGCA
121 AAAGACCTAT AAGGGTACAA AAGTCCTCAG ACAAAGCATG ATGAGACAAA AAATCTCCCA
181 AAATATCATT GAGTTCGCTT TGTGTTGGCC ATCTACTGTT GGGCATGAGG TCCGTCCTTA
241 AGTGTGGATA ATTAGTTTGA TAGTACAAAT AAGTTCCTGA TATTCTAGGG AAAGGGAAAT
301 TTTGTTTCTC CCCATAGTGA AATGATAACT GTTTAAGGAG ACTCTAGCAT TTGGCCTAAT
361 GTGAACCCTA TACGATGTAT ACATACATGT ATTAAATGCA ACATGGACCC CATACATATG
421 TTCAACCTTA TCGTCAGTT GAAATGAAAA TGCATTATAT TTATTTTAA TAGACTCAAA
481 TATTGAACAT ATTTCTGGGG CAGCACCTGT ATACACACAT CTATTAGGTA GAAGATGCAA
541 GGCCAAGATG GCTGCAATTG TATAAATTAG ATGATTCTCT GTGCATCAGC CTCCAACGT
601 TGGGCAGTTG TTAAAGGAA TGTTATTAGT GAAGACTGGA ATTAAGACAA GCATTTTTTA
661 GTACTGTTTC CATAATACCT TCCATGGGTA CTACAGTACA GTCACGTGTA CTACATGGGT
721 CTACTATTAC AGGACCTTGT CGCTGTTTCT TTCTCACTGT AGCCTTCCG ACCTCAAGC
781 CTACAGATGC CATTGCTCTT TTACTTCTC TGTAGCTTC CCTTCTCCAC AGTGTCCGGT
841 AACTGTTGG AGTCAGATAG TACATAAACT TTTTAAATGA GCTTTTCTTT TTCTCTTGGC
901 ATATATTTTA ATGTAACATA GTCATTGGTC AACTCCATC ATGAAGAAAG TGCCATCGGA
961 ACTCAAGGTC ATGGAGGCAT GTTACATACG TAACTGGCTT GTCCTCAAT GGCAAGCTTA
1021 GCCTGCTCTC TTATAGCAGC CAGGATCACC CGCATCAATT ATCAATCAAG AAAACACCCC

```

1081 CAGGCTTCCG CACGGGGCCA ATGTGGTGGT GACATTTTTC TCAGTTGAGG TTCCTCTTC
1141 CCCGATGACT CTATCGGGTT TCATGAAGCC CTTCAGCACA CTAGGCAAGG GTTCTACTAT
1201 TGAGTTACAT TCACAGACAC AGAAATTGTC TGTTCAATGA TGGGTATGGA ACCAGCATGT
1261 ACCTCGCTTG

Με μπλέ γράμματα απεικονίζεται η περιοχή που αντιστοιχεί στο αρχικά κλωνοποιημένο T.52.76 προϊόν ενώ με το βέλος απεικονίζεται η περιοχή του T4 στην οποία σχεδιάστηκε ο εσωτερικός εκκινητής της re-PCR. Το παραπάνω μόριο επίσης δεν βρέθηκε αρχικά να έχει σημαντική ομολογία με κάποιο καταχωρημένο στις βάσεις δεδομένων, την περίοδο που βρέθηκε η αλληλουχία του. Πρόσφατα, σύγκριση με μεταγενέστερες καταχωρήσεις έδειξε ότι η αλληλουχία T4 αντιστοιχεί στο γονίδιο SPL-65 του ποντικού (97% ταυτότητα). Το SPL-65 έχει χαρακτηριστεί σαν μία πρωτεΐνη προσαρμοστής που εκφράζεται κύρια σε Β λεμφοκύτταρα, και λιγότερο στο θύμο, και συμμετέχει στην σηματοδότηση που εκπορεύεται από τον BCR (B Cell Receptor) (148). Όμως η περιοχή που το προϊόν T4 συμπίπτει με το SPL-65 είναι οι βάσεις 23489 έως 24729 του γονιδίου SPL-65 που περιέχονται εξ' ολοκλήρου στο 1^ο ιντρόνιο του.

Για να πιστοποιήσουμε ότι πράγματι το γονίδιο SPL-65 εκφράζεται διαφορετικά στα άνεργα F5/NP CD8 T κύτταρα πολλαπλασιάσαμε με PCR την κωδική περιοχή του SPL-65 με εκκινητές που σχεδιάστηκαν στα άκρα της. Το μόριο που παραλήφθηκε είχε το προβλεπόμενο μέγεθος (1374 bp), κλωνοποιήθηκε σε φορέα pCRII (Εικόνα 11B) και έγινε διαγνωστική πέψη με SacI που έδωσε αναμενόμενο μέγεθος (δεν δείχνεται). Το κλωνοποιημένο SPL-65 χρησιμοποιήθηκε σαν ιχνηθέτης σε ανάλυση Northern. Για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης στην ίδια ανάλυση (Εικόνα 10Δ). Μετά από την ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών και την κανονικοποίηση ως προς την ένταση του σήματος της ακτίνης βρέθηκε ότι το mRNA του SPL-65 είναι ~5.1 φορές περισσότερο στα απομονωμένα άνεργα F5/NP CD8⁺ T κύτταρα από ότι στα αντίστοιχα παρθένα F5.

1.3.3 Σύγκριση μεταγραφικού προτύπου μεταξύ άνεργων CD8⁺ T κυττάρων και κυττάρων με αναστροφή του άνεργου φαινοτύπου

Οι ενέσεις SEA στα F5/NP ποντίκια είναι ένα καλό εργαλείο για την μελέτη της κατάρρευσης του άνεργου φαινοτύπου T λεμφοκυττάρων. Για αυτό προχωρήσαμε σε προσπάθειες ταυτοποίησης γονιδίων που να συσχετίζονται με την αναστροφή της ανέργειας CD8 T λεμφοκυττάρων. Έτσι, εφαρμόσαμε την προαναφερθείσα μέθοδο του mRNA Differential Display συγκρίνοντας cDNAs από F5/NP/Rag1^{-/-} σπληνοκύτταρα και από

σπληνοκύτταρα ζώων του ίδιου γονοτύπου που είχαν ενεθεί με SEA επί 2 ημέρες. Κάθε ζεύγος εκκινητών δοκιμάζονταν ταυτόχρονα σε τρία διαφορετικά cDNAs από το κάθε είδος ζώου ώστε να αποφευχθεί η άσκοπη ενασχόλησή μας με ψευδώς θετικές ζώνες. Έγιναν αντιδράσεις PCR με περίπου 80 διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών χωρίς να υπάρξει τουλάχιστον μία ζώνη που να αντιστοιχεί σε διαφορεικά εκφραζόμενο RNA.

2. Διαμόρφωση αποκρίσεων των $CD8^+$ T κυττάρων από τον ενδογενή TNF.

2.0 Ερωτήματα-Προσεγγίσεις

Τα περισσότερα ερωτήματα που τίγονται στη διατριβή αυτή μπορούν να μπουν κάτω από τον γενικότερο υπέρτιτλο «ομοιόσταση κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων». Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς με τους οποίους επιτυγχάνεται η ομοιόσταση των CD8 T κυττάρων (και αυτό ισχύει γενικά για τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος) είναι ο κυτταρικός θάνατος και αυτός μπορεί να συμβαίνει είτε στην κεντρική ανοχή είτε στην περιφερική ανοχή είτε μετά την ενεργοποίηση μετά από επαφή με αντιγόνα.

Η κυττοκίνη TNF περιγράφηκε στην Εισαγωγή σαν ένας παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει απόπτωση T κυττάρων και έτσι τέθηκαν ερωτήματα κατά πόσο μπορεί να συνεισφέρει στους διάφορους αποπτωτικούς (και όχι μόνο) ομοιοστατικούς μηχανισμούς των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Στην Ενότητα 6 της εισαγωγής αναφέρθηκαν κάποια δεδομένα για το ρόλο του TNF στις λειτουργίες των T κυττάρων. Κάποια από αυτά τα δεδομένα είναι αντιφατικά ενώ αρκετές ενδείξεις έχουν προκύψει από *in vitro* πειράματα και μάλιστα συχνά με προσθήκη εξωγενούς διαλυτού TNF σε ποσότητες μάλλον διαφορετικές από τις φυσιολογικές. Επίσης με αυτό τον τρόπο δεν μπορεί να ελεγχθεί ο ρόλος του μεμβρανικού TNF. Επιπλέον τα περισσότερα πειράματα έγιναν με ποντίκια ελλειμματικά για έναν από τους TNFRs κάθε φορά, κάτι που μπορεί να δημιουργήσει τεχνητή υπερστρατολόγηση κάποιων πρωτεϊνών στον εναπομείναντα λειτουργικό υποδοχέα, και τέλος αποσαφηνίζοντας τη δράση ενός υποδοχέα δε γνωρίζουμε σε ποιο ποσοστό συνεισφέρει σε αυτήν η δράση της LTα, που μπορεί επίσης να δεσμευθεί και στους δύο TNFR υποδοχείς.

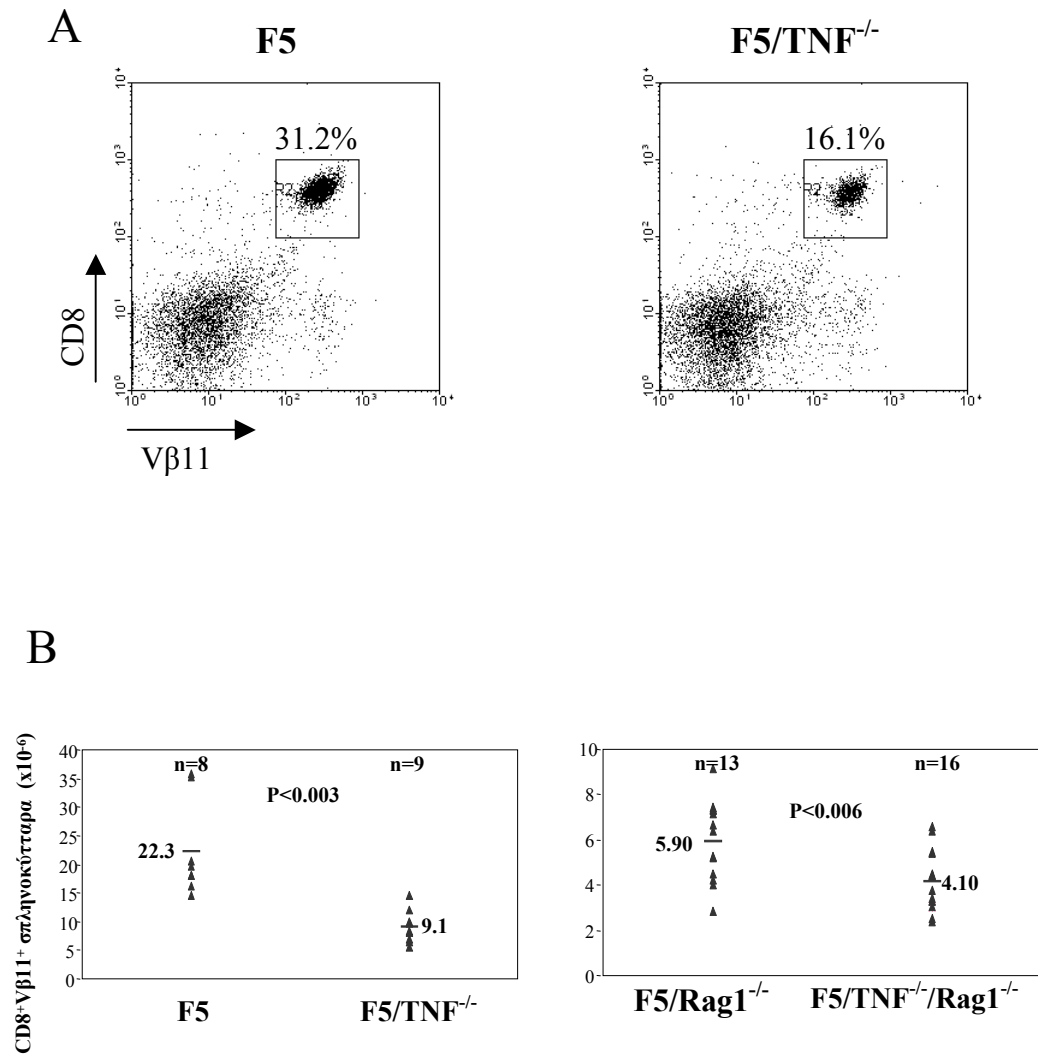
Έτσι λοιπόν κρίθηκε σκόπιμο να μελετήσουμε το ρόλο του ενδογενούς TNF σε διάφορες λειτουργίες των T κυττάρων, και για να το πράξουμε χρησιμοποιήσαμε TNF^{-/-} ποντίκια (149). Για να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε τις κλωνοτυπικές αποκρίσεις TNF^{-/-} T κυττάρων χρησιμοποιήσαμε το F5 μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών. Έτσι εστιαστήκαμε κύρια στα CD8 T κύτταρα κάτι που ήταν επιθυμητό και λόγω του συσχετισμού του TNF με τον αποπτωτικό θάνατο μετά από ενεργοποίηση (AICD) των CD8 και όχι των CD4 T κυττάρων (119-122). Επιπλέον το μοντέλο των διπλά διαγονιδιακών ποντικών, F5/NP, που είχε αρκετά καλά χαρακτηριστεί (βλ. Αποτελέσματα) χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τα TNF^{-/-} ποντίκια για την αποσαφήνιση του ρόλου του ενδογενούς TNF στην περιφερική ανοχή των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων

2.1 Μειωμένοι αριθμοί περιφερικών F5 T κυττάρων και ελαττωματικοί μηχανισμοί ομοιοστάσης σε κατάσταση λεμφοπενίας απουσία ενδογενούς TNF.

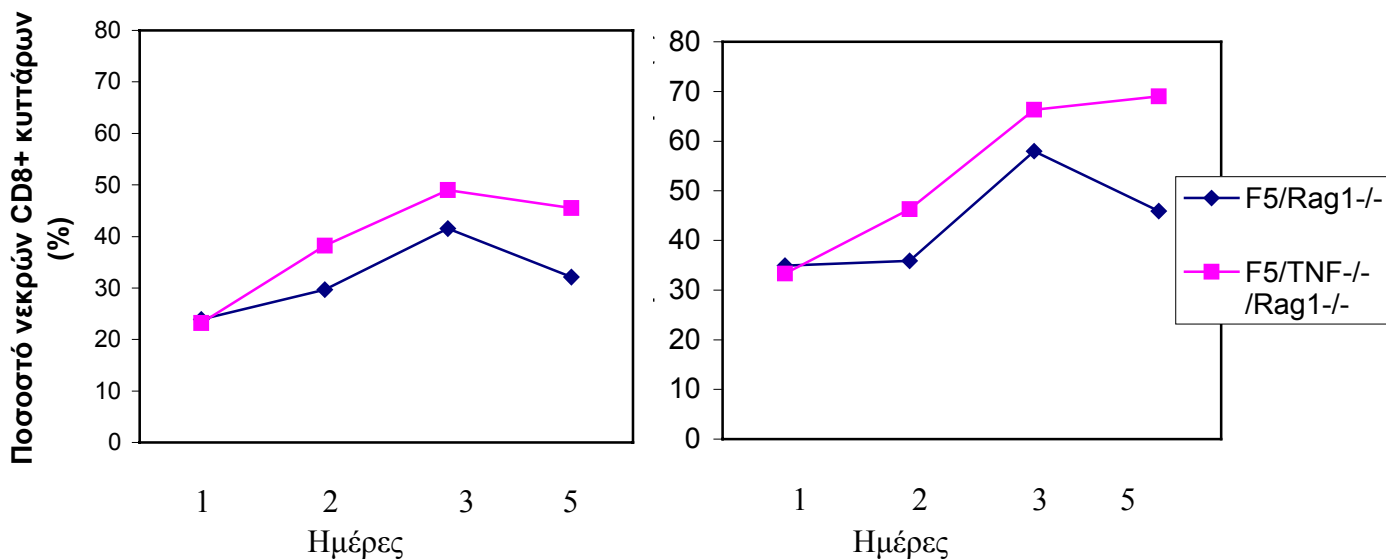
Για να μελετηθούν οι κλωνοτυπικές αποκρίσεις CD8⁺ T κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF, διασταυρώθηκαν F5 ποντίκια με TNF^{-/-}. Η πρώτη ένδειξη για τον φυσιολογικό ρόλο του TNF στη διατήρηση της περιφερικής δεξαμενής κυτταροτοξικών T κυττάρων, προήρθε από την φαινοτυπική ανάλυση F5/TNF^{-/-} ποντικών. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (ανάλυση FACS) σπληνοκυττάρων από F5/TNF^{-/-} ποντίκια έδειξε μείωση του αριθμού των περιφερικών CD8⁺Vβ11⁺ T κυττάρων μεγαλύτερη από 50% σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό στα F5 ποντίκια. Μείωση των F5 T κυττάρων απουσία του TNF παρατηρήθηκε και στο γενετικό υπόβαθρο Rag1^{-/-} αν και σε μικρότερο βαθμό (Εικόνα 12).

Για να διαπιστωθεί αν οι μειωμένοι αριθμοί F5 T κυττάρων στην περιφέρεια των F5/TNF^{-/-} ποντικών οφείλονται σε μειωμένη ικανότητα επιβίωσής τους, σπληνοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-} και F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια μεταφέρθηκαν σε καλλιέργεια και παρακολούθηθηκε η βιωσιμότητά των F5 T κυττάρων με τη χρήση ιωδιούχου προπιδίου (PI) με την πάροδο του χρόνου. Παρατηρήθηκε (Εικόνα 13) ότι συστηματικά στα F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} σπληνοκύτταρα υπάρχουν υψηλότερα ποσοστά PI⁺ CD8⁺ κυττάρων που δηλώνει την μικρότερη ικανότητα επιβίωσης των F5 T κυττάρων in vitro απουσία ενδογενούς TNF.

Όπως αναφέρθηκε, στα T κύτταρα έχουν αναπτυχθεί ομοιοστατικοί μηχανισμοί που διασφαλίζουν την διατήρηση του αριθμού τους στην περιφερική δεξαμενή του ζώου. Ένας από αυτούς είναι ο ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός των T κυττάρων που ενεργοποιείται μετά από καταστροφή τους π.χ. από ιϊκές λοιμώξεις, κυτταροτοξικά φάρμακα από ακτινοβολίες, ή, προσομοιάζοντας αυτό, μετά από μεταφορά τους σε λεμφοπενικούς αποδέκτες (150). Για να μελετηθεί ο φυσιολογικός ρόλος του TNF στον ομοιοστατική κλωνική επέκταση των F5 T κυττάρων, συγκρίθηκε η ανάκτηση μεταφερθέντων F5 T κυττάρων σε λεμφοπενικούς αποδέκτες σε συνθήκες επάρκειας ή πλήρους ανεπάρκειας σε TNF. Βρέθηκε ότι 26 ημέρες μετά τη μεταφορά, λιγότερο από το 50% των F5 T κυττάρων ανακτώνται όταν τόσο οι δότες όσο και οι αποδέκτες δεν μπορούν να παράγουν TNF σε σχέση με όταν και οι δύο μπορούν (P<0.001) (Εικόνα 14A, στήλες A και B). Για να διαπιστωθεί αν αυτή η διαφορά οφείλεται στον αποδέκτη που δεν μπορεί να παράγει TNF ή στα κύτταρα του δότη, συμπεριλήφθηκε στο προηγούμενο πειραματικό σχήμα η σύγκριση της ανάκτησης F5 και F5/TNF^{-/-} T κυττάρων κατόπιν μεταφοράς τους σε TNF^{-/-} και TNF^{+/+} λεμφοπενικούς αποδέκτες αντίστοιχα (Εικόνα 14A, στήλες Γ και Δ). Βρέθηκε ότι η

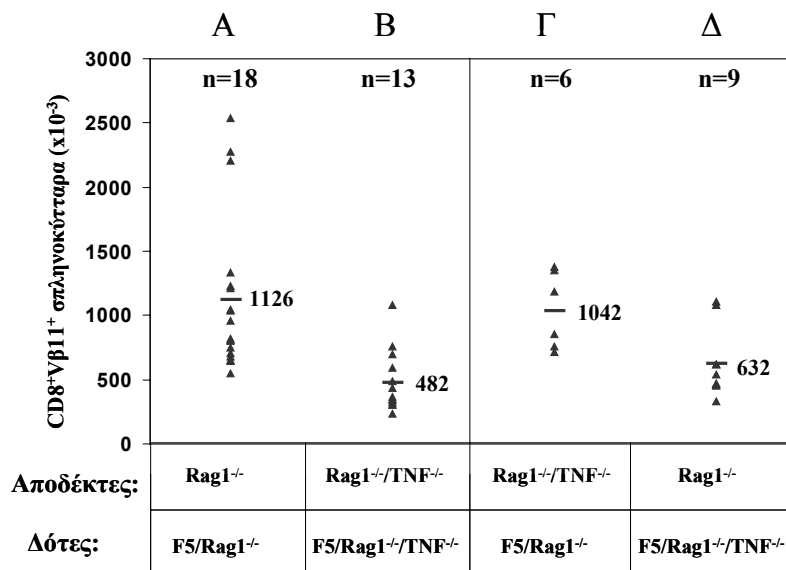


Εικόνα 12. Μειωμένη συχνότητα και απόλυτοι αριθμοί F5 σπληνοκυττάρων στην απουσία ενδογενούς TNF. Α. Σπληνοκύτταρα από F5 ή F5/TNF^{-/-} ποντίκια επώαστηκαν με α-CD8 και α-Vβ11 αντισώματα και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζονται τα ποσοστά CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων. Β. Με συνδυασμό μικροσκοπικής απαρίθμησης και ανάλυσης FACS υπολογίστηκαν οι απόλυτοι αριθμοί των CD8⁺Vβ11⁺ σπληνοκυττάρων στα F5 και F5/TNF^{-/-} ποντίκια τόσο στο Rag1^{+/+} όσο και στο Rag1^{-/-} γενετικό υπόβαθρο. Κάθε τρίγωνο αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι και οι παύλες σε μέσους όρους. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν μια συλλογή από 3 τουλάχιστο διαφορετικά πειράματα.

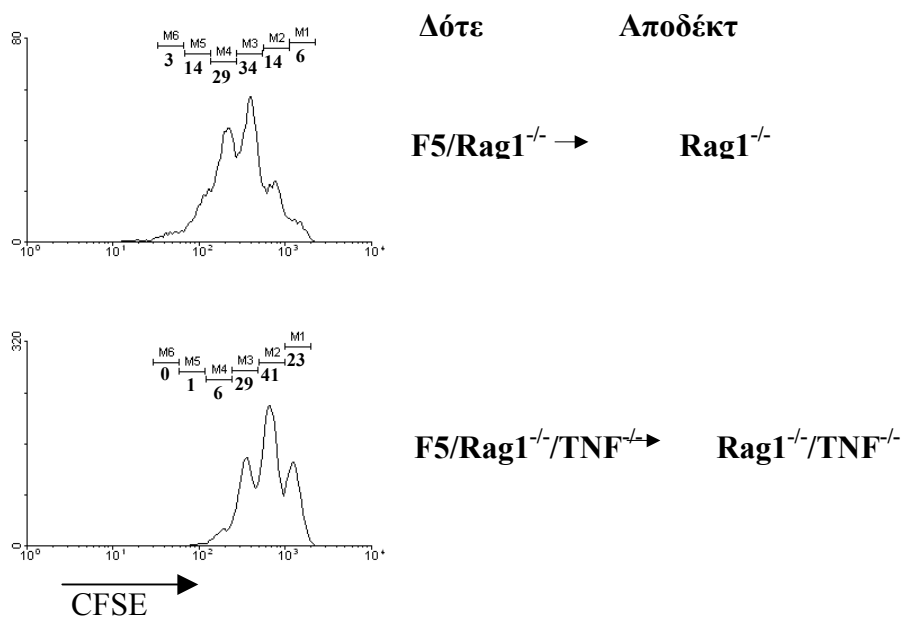


Εικόνα 13. Μειωμένη *in vitro* επιβίωση F5 T κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF. F5/Rag1^{-/-} ή F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} σπληνοκύτταρα μεταφέρονται σε καλλιέργεια. Το ποσοστό των νεκρών CD8⁺ λεμφοκυττάρων με τη πάροδο του χρόνου ελέγχεται με τη χρώση PI που βάφει μόνο νεκρά κύτταρα. Δείχνονται δύο ανεξάρτητα πειράματα.

A



B



Εικόνα 14. Ελαττωματική ομοιοστατική επέκταση F5/TNF^{-/-} CD8⁺ T κυττάρων. Σπληνοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-} και F5/TNF^{-/-}/Rag1^{-/-} ποντίκια, που περιείχαν 3x10⁶ CD8⁺ κύτταρα, μεταφέρθηκαν σε TNF^{+/+} ή TNF^{-/-} λεμφοπενικούς αποδέκτες όπως δείχνεται παραπάνω. Α. Οι αποδέκτες θυσιάστηκαν την 26η ημέρα και υπολογίστηκαν οι αριθμοί των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων με μικροσκοπική απαρίθμηση και κυτταρομετρία ροής. Κάθε τρίγωνο αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι και οι παύλες δηλώνουν μέσες τιμές. Β. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των σημασμένων με CFSE CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων την 7η ημέρα μετά τη μεταφορά τους στους λεμφοπενικούς αποδέκτες. Οι αριθμοί κάτω από τις μπάρες δηλώνουν τα ποσοστά των CD8⁺Vβ11⁺ T κυττάρων που βρίσκονται στις υποκείμενες κορυφές και έχουν διαιρεθεί αντίστοιχες φορές.

ανεπάρκεια TNF μόνο στα κύτταρα των δοτών είναι αρκετή για να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ανάκτησής τους από τους ξενιστές ($P < 0.023$) και η επιπλέον απουσία TNF από τους ξενιστές δεν οδηγεί σε περαιτέρω μείωση ($P > 0.1$).

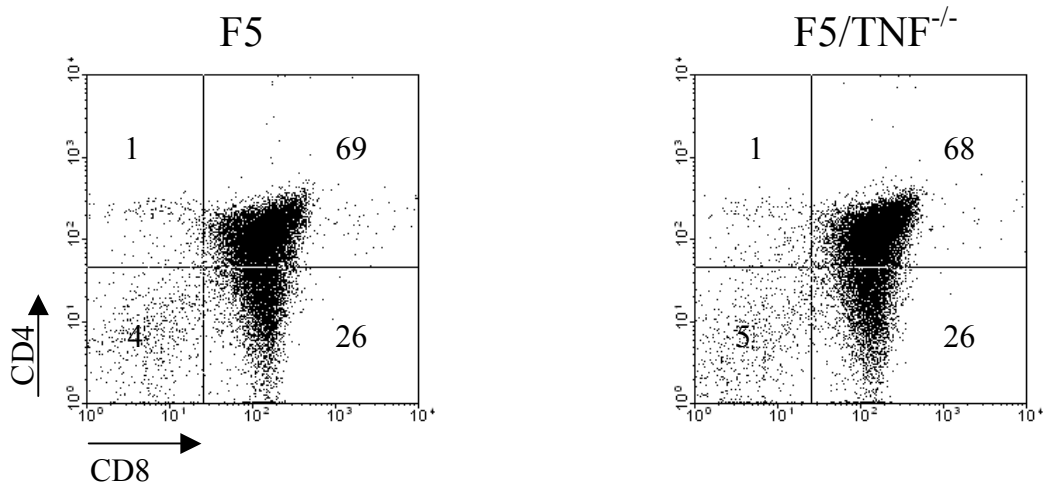
Για να εξεταστεί άμεσα αν η ανάκτηση λιγότερων F5/TNF^{-/-} T κυττάρων οφείλεται σε ελαττωματική ικανότητά τους για ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό, προσδιορίστηκε το πρότυπο πολλαπλασιασμού F5 T κυττάρων σημασμένων με CFSE μετά από μεταφορά τους σε κατάλληλους αποδέκτες. Έτσι στην Εικόνα 14B φαίνεται ότι στα δείγματα ελέγχου, όπου τόσο τα ποντίκια-δότες όσο και τα ποντίκια-αποδέκτες είναι TNF^{+/+}, ανιχνεύονται τέσσερις τουλάχιστο διαιρέσεις στα ανακτώμενα CD8⁺ T κύτταρα με πολύ λίγα να είναι αδιαίρετα. Από την άλλη όταν ο TNF απουσιάζει από τους δότες και τους αποδέκτες ο πολλαπλασιασμός των μεταφερθέντων CD8⁺ T κυττάρων είναι σημαντικά καθυστερημένος, όπου ελάχιστα κύτταρα έχουν ολοκληρώσει την τρίτη τους διαίρεση και ένα σημαντικό ποσοστό έχουν παραμείνει αδιαίρετα.

2.2 Η απουσία του ενδογενούς TNF δεν μεταβάλλει την θετική επιλογή των F5 θυμοκυττάρων , επηρεάζει όμως μερικώς την απόκριση τους στο πεπτιδίο-αγωνιστή

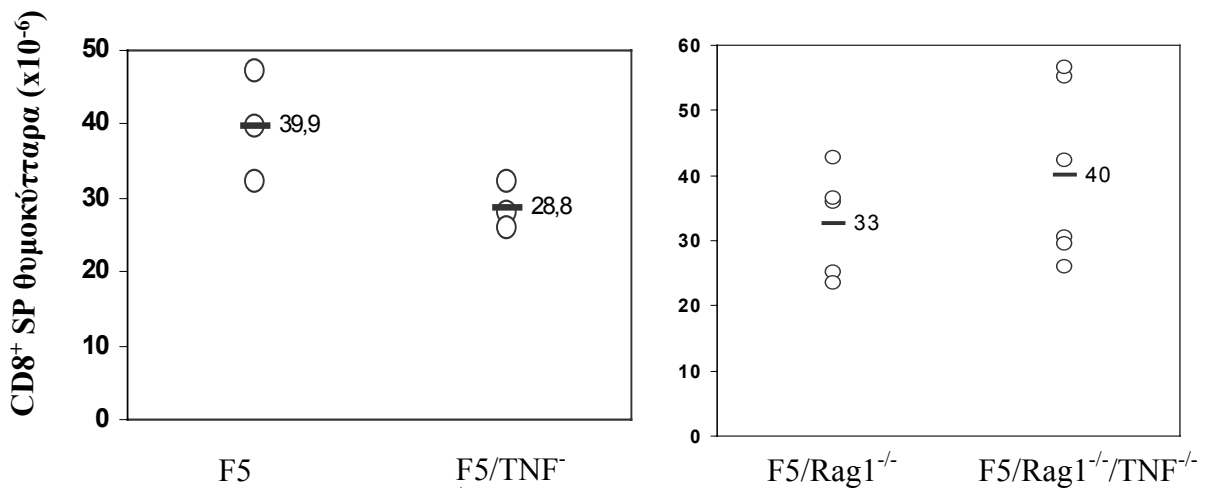
Οι μειωμένοι αριθμοί περιφερικών F5/TNF^{-/-} CD8 T κυττάρων μπορεί να οφείλονται είτε σε ελαττωματική ομοιόστασή τους στην περιφέρεια του ζώου ή/και σε ελαττωματική θετική επιλογή στο θύμο. Για να εξεταστεί η δεύτερη πιθανότητα, λήφθηκαν θύμοι από F5 και F5/TNF^{-/-} ποντίκια σε Rag1^{-/-} ή Rag1^{+/+} γενετικό υπόβαθρο και τα θυμοκύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τα ποσοστά και τους απόλυτους αριθμούς των DP και SP υποπληθυσμών. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό ή στην αναλογία DP και SP θυμοκυττάρων μεταξύ F5 και F5/TNF^{-/-} ποντικίων (Εικόνα 15A, B). Αυτό αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι η μείωση στον αριθμό των περιφερικών F5 T κυττάρων απουσία του TNF δεν οφείλεται κύρια σε διαφορετική θετική επιλογή στο θύμο.

Για να δούμε αν η έλλειψη έκφρασης TNF στο θύμο μπορεί να επηρεάσει την αρνητική επιλογή των διπλά θετικών θυμοκυττάρων in vitro, F5/Rag1^{-/-} και F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} θυμοκύτταρα επώαστηκαν σε καλλιέργεια παρουσία διαλυτού NP68 πεπετιδίου και η τύχη τους παρακολούθηθηκε με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρείται ότι μετά από 16 ώρες

A

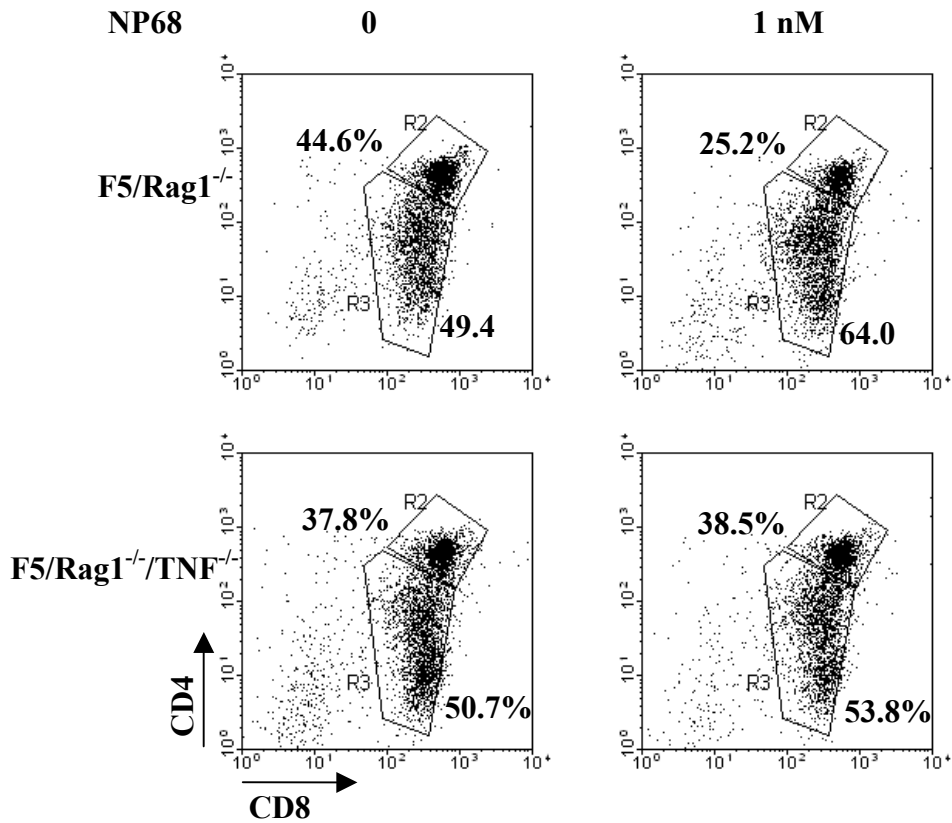


B

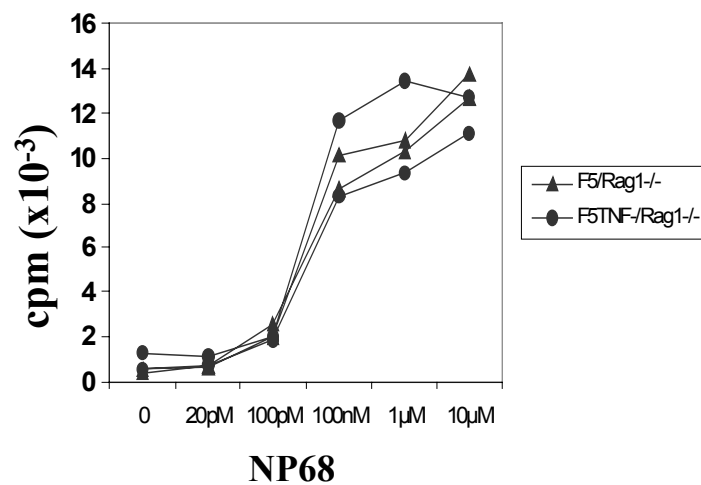


Εικόνα 15. Η *TNF* μεταλλαγή δεν επηρεάζει τα ποσοστά και τους απόλυτους αριθμούς των *CD8* SP θυμοκυττάρων στα *F5* ποντίκια. Α. Με αριθμούς απεικονίζονται τα ποσοστά των DN (κάτω αριστερά), DP (πάνω δεξιά), *CD4* SP (πάνω αριστερά) και *CD8* SP (κάτω δεξιά) θυμοκυττάρων από *F5* και *F5/TNF^{-/-}* ποντίκια. Β. Παρουσιάζονται οι ολικοί αριθμοί *CD8* SP θυμοκυττάρων όπως προέκυψαν από μικροσκοπική απαρίθμηση και κυτταρομετρία ροής σε θύμους *F5* και *F5/TNF^{-/-}* ζώων σε γενετικό υπόβαθρο *Rag1^{+/+}* (αριστερά) και *Rag1^{-/-}* (δεξιά). Κάθε κύκλος αντιπροσωπεύει ένα ζώο και οι παύλες τους μέσους όρους. Παρουσιάζεται ένα πείραμα από τρία για κάθε τύπο ζώων.

A



B



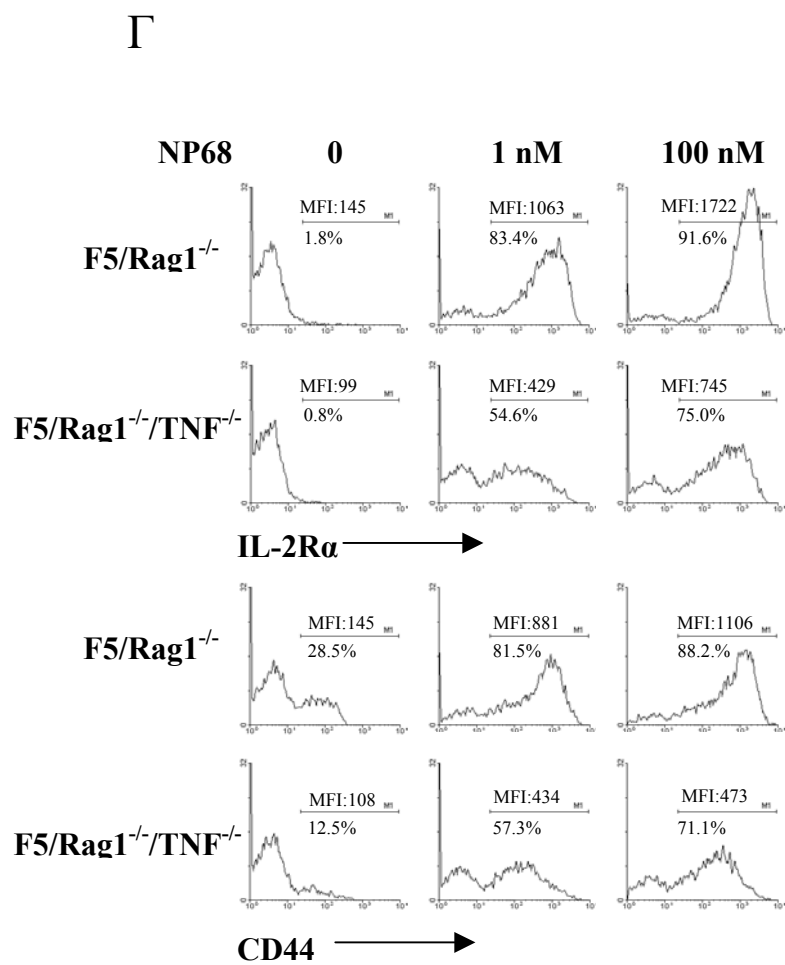
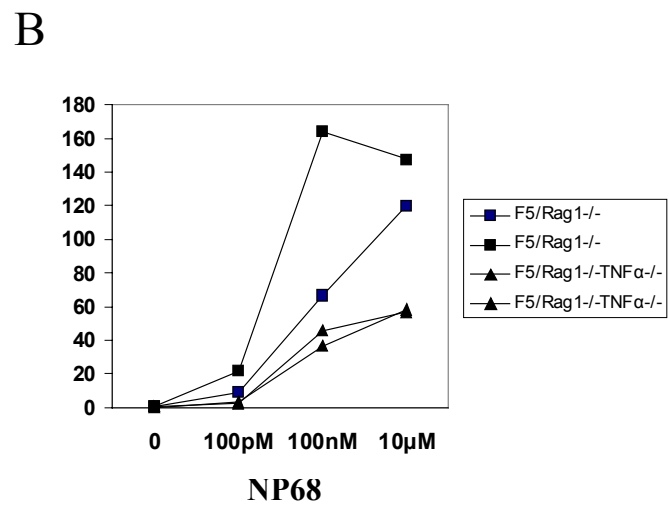
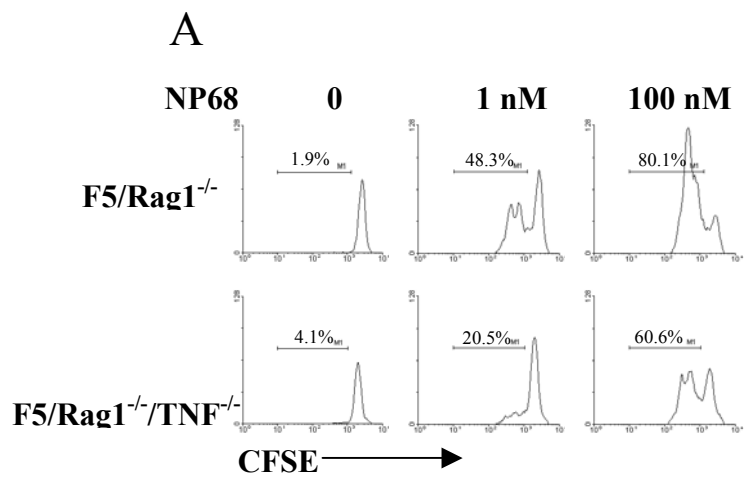
Εικόνα 16. Μειωμένη *in vitro* “αρνητική επιλογή” αλλά φυσιολογικός πολλαπλασιασμός των $F5/TNF^{-/-}$ θυμοκυττάρων σε απόκριση στο πεπτιδίο-αγωνιστή. Α. Θυμοκύτταρα από $F5/Rag1^{-/-}$ και $F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}$ ποντίκια επωάζονται παρουσία ή απουσία διαλυτού NP68 και 16 h αργότερα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των συνυποδοχέων CD4 και CD8. Τα ποσοστά στο πάνω και κάτω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται στο ποσοστό των DP και CD8 SP θυμοκυττάρων αντίστοιχα. Β. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού σε $F5$ και $F5/TNF^{-/-}$ θυμοκύτταρα που διεγείρονται με ακτινοβολημένα σπληνοκύτταρα C57bl/10 που έχουν προεπαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις πεπτιδίου NP68.

καλλιέργειας παρουσία ή απουσία 1 nM διαλυτού NP68, το ποσοστό των διπλά θετικών F5/TNF^{-/-} θυμοκυττάρων παραμένει ίδιο. Αντίθετα στα δείγματα ελέγχου, F5 θυμοκύτταρα, το ποσοστό των διπλά θετικών θυμοκυττάρων μειώθηκε κατά περίπου 45% όταν αυτά επωάστηκαν παρουσία του πεπτιδίου (Εικόνα 16Α).

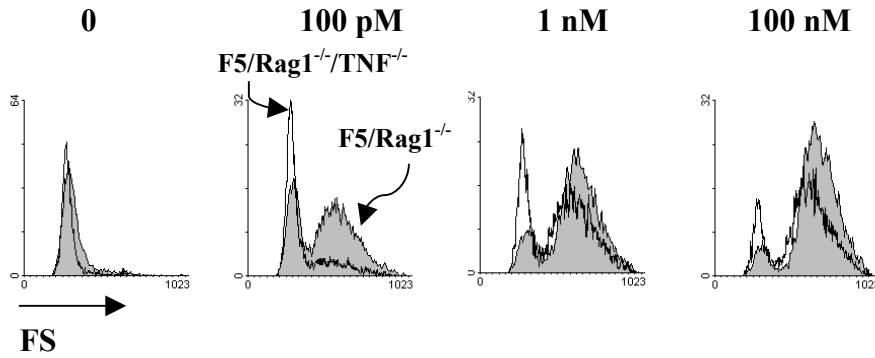
Επιπλέον θελήσαμε να δούμε την ικανότητα πολλαπλασιασμού των F5/TNF^{-/-} θυμοκυττάρων σε απόκριση σε NP68 που παρουσιάζεται από ακτινοβολημένα C57bl/10 σπληνοκύτταρα. Το σκεπτικό είναι ότι με αυτό τον τρόπο θα πολλαπλασιαστούν κυρίως τα ώριμα SP F5 θυμοκύτταρα ενώ τα υπόλοιπα θα πεθάνουν. Αυτό συμβαίνει γιατί τα θυμοκύτταρα που δεν έχουν ολοκληρώσει τα στάδια επιλογών τους στο θύμο έχουν χαμηλότερη ουδό στις αποκρίσεις μετά από TCR-σηματοδότηση, και πεθαίνουν όταν διεγερθούν με το πεπτίδιο-αγωνιστή. Στην Εικόνα 16B παρατηρούμε ότι η ενσωμάτωση θυμιδίνης από τα F5/Rag1^{-/-}TNF^{-/-} θυμοκύτταρα γίνεται στον ίδιο βαθμό με τα ποντίκια μάρτυρες F5/Rag1^{-/-}.

2.3 Χαμηλότερες αποκρίσεις των F5/TNF^{-/-} T κυττάρων μετά από αντιγονική διέγερση.

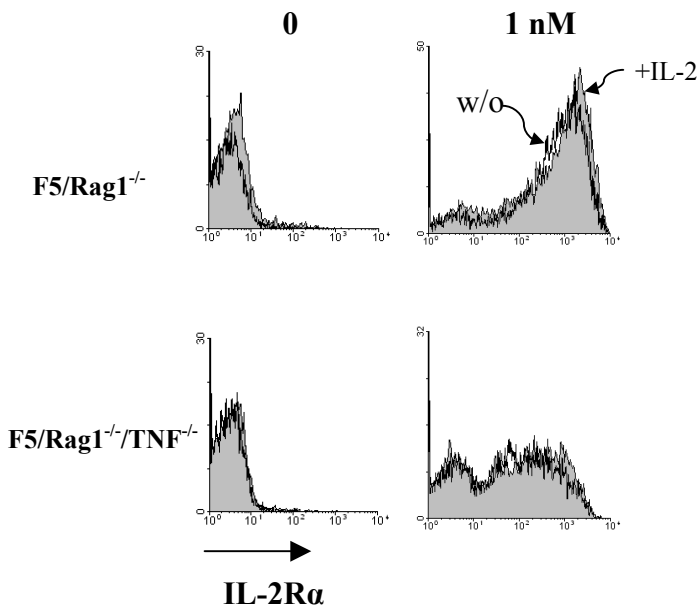
Για να εξεταστεί κατά πόσο η ελαττωματική επιβίωση των παρθένων F5/TNF^{-/-} T κυττάρων συνοδεύεται και από άλλες λειτουργικές δυσλειτουργίες μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους μετά από ενεργοποίηση. Για αυτό F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} και F5/Rag1^{-/-} T κύτταρα σημάνθηκαν με CFSE και διεγέρθηκαν *in vitro* με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου NP68. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17Α, απουσία ενδογενούς TNF τα F5 T κύτταρα πολλαπλασιάζονται σαφώς λιγότερο έντονα. Επιβεβαιωτικά, σε πειράματα μέτρησης ενσωμάτωσης ³H-θυμιδίνης (δοκιμασίες πολλαπλασιασμού) αυτή ενσωματώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα αγρίου τύπου F5 T κύτταρα (Εικόνα 17B). Επιπλέον, οι μάρτυρες ενεργοποίησης CD44, CD69 καθώς και η IL-2Rα αλυσίδα επάγονται λιγότερο στα ενεργοποιημένα F5/TNF^{-/-} κύτταρα, καθώς τόσο το ποσοστό των θετικών για αυτά κυττάρων όσο και το επίπεδο έκφρασης επηρεάζεται σημαντικά από την TNF μεταλλαγή (Εικόνα 17Γ). Επίσης, τα F5/TNF^{-/-} T κύτταρα έχουν μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βλαστών μετά από την αντιγονική διέγερση (Εικόνα 17Δ). Παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται και με υψηλότερες δόσεις πεπτιδίου αλλά και την τρίτη μέρα καλλιέργειας (δεν δείχνεται). Η προσθήκη εξωγενούς IL-2 δεν αποκατέστησε την ενεργοποίηση όσο



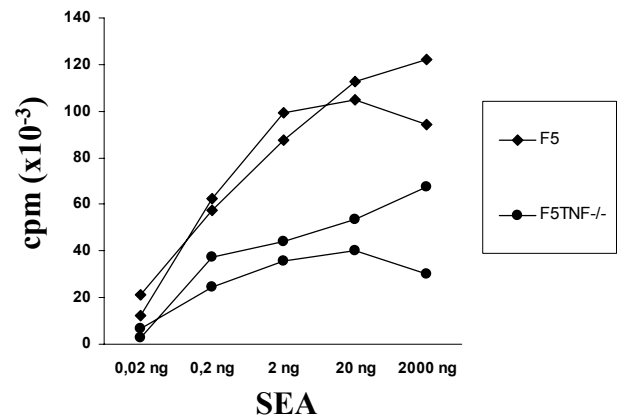
Δ



E



ΣΤ



Εικόνα 17. Μειωμένη ενεργοποίηση και αποπτωτικός θάνατος των $F5/TNF^{-/-}$ $CD8^+$ T κυττάρων *in vitro*. Σπληνοκύτταρα από τα ποντίκια που αναφέρονται παρακάτω συγκαλλιεργούνται με ακτινοβολημένα C57bl/10 σπληνοκύτταρα που είχαν προεπαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου NP68 και οι καλλιέργειες αναλύονται την 2η ημέρα. Α. Παρουσιάζεται το προφίλ της CFSE στα $CD8^+$ T κύτταρα από $F5/Rag1^{-/-}$ και $F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}$ ποντίκια. Τα ποσοστά δηλώνουν το κλάσμα των $CD8^+$ T κυττάρων που έχουν διαιρεθεί τουλάχιστο μία φορά. Β. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού σε $F5/Rag1^{-/-}$ και $F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}$ σπληνοκύτταρα που περιέχουν ίσους αριθμούς $CD8^+$ κυττάρων παρουσία ακτινοβολημένων C57bl/10 σπληνοκυττάρων προεπασμένων με διάφορες συγκεντρώσεις NP68. Γ. Τα παραπάνω $CD8^+$ T κύτταρα αναλύθηκαν για την έκφραση των επιφανειακών μορίων CD44 και IL-2Ra. Το MFI τη μέση ένταση φθορισμού των κυττάρων που είναι θετικά για το υπό εξέταση μόριο. Δ. Σύγκριση του μεγέθους (FS) των $F5/Rag1^{-/-}$ (σκιασμένα ιστογράμματα) και $F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}$ (ασκίαστα) T κυττάρων μετά από διέγερση. Ε. Επίδραση εξωγενούς IL-2 στην έκφραση του IL-2Ra πάνω στα ενεργοποιημένα $CD8^+$ κύτταρα από τα εν λόγω ποντίκια. Τα σκιασμένα ιστογράμματα αντιστοιχούν στις καλλιέργειες που προστέθηκε IL-2. ΣΤ. 6-10 εβδομάδων F5 και $F5/TNF^{-/-}$ ποντίκια θυσιάστηκαν και σπληνοκύτταρά τους που περιείχαν ίσο αριθμό $CD8^+$ T κυττάρων καλλιεργήθηκαν παρουσία των παραπάνω ποσοτήτων SEA. Μετά από 2 ημέρες επώαστηκαν για 6 επιπλέον ώρες με ^3H-dTTP και μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια.

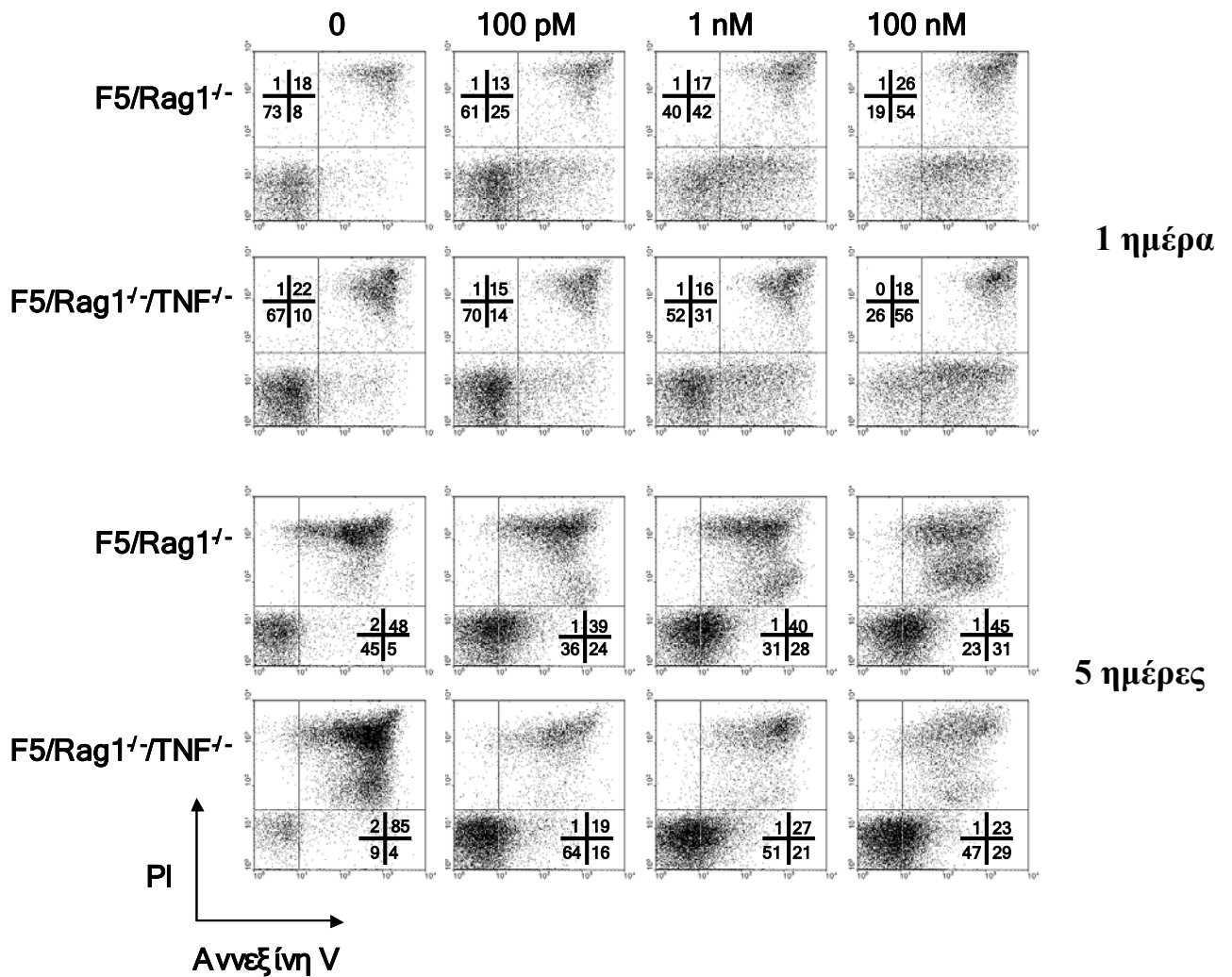
αφορά τους αντιστοιχούς μάρτυρες (δείχνεται μόνο ο IL-2Rα), κάτι που σημαίνει ότι ο μειωμένος πολλαπλασιασμός δεν οφείλεται αποκλειστικά σε ελαττωματική παραγωγή IL-2 (Εικόνα 17Ε). Καθώς σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν C57bl/10 (TNF^{+/+}) σπληνοκύτταρα σαν αντιγονοπαρουσιαστές, φαίνεται ότι ο TNF που προέρχεται από τα T κύτταρα (διαλυτός ή μεμβρανικός) είναι αυτός που απαιτείται για τη βέλτιστη ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T κυττάρων.

Επιπλέον, και όταν η διέγερση των F5 T κυττάρων γίνει με το βακτηριακό υπεραντιγόνο SEA, οι διαφορές στον πολλαπλασιασμό F5 και F5/TNF^{-/-} T κυττάρων είναι παρόμοια μεγάλες (Εικόνα 17ΣΤ). Αν και με την SEA διεγείρονται όλα τα Vβ11⁺ και Vβ3⁺ T κύτταρα εν τούτοις σε ποντίκια διαγονιδιακά για F5 TCR η συντριπτική πλειοψηφία των T κυττάρων που αποκρίνονται στην SEA έχει την F5 ειδικότητα.

Για να μελετηθεί ο φυσιολογικός ρόλος του TNF στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από ενεργοποίηση (AICD), παρακολουθήθηκε ο αποπτωτικός θάνατος ενεργοποιημένων *in vitro* F5/Rag1^{-/-} και F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} T κυττάρων από αυξανόμενες συγκεντρώσεις πεπτιδίου NP68. Για τούτο, έγινε κυτταρομετρία ροής με αννεξίνη V και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Η αννεξίνη V μπορεί να δεσμεύει φωσφατιδυλοσερίνη, ένα φωσφολιπίδιο που εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης σαν πρώιμο γεγονός στον αποπτωτικό θάνατο. Το PI μπορεί να δεσμευθεί στο DNA του κυττάρου και η είσοδός του στον πυρήνα γίνεται μόνο σε νεκρωτικά κύτταρα. Στην Εικόνα 18 φαίνονται τα αποτελέσματα από ένα τέτοιο πείραμα, μετά από διέγερση 1 και 5 ημερών. Παρατηρείται ότι στα F5 και στα F5/TNF^{-/-} T κύτταρα η αναλογία των πρώιμα αποπτωτικών T κυττάρων (αννεξίνη V⁺ PI) αυξάνει κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο με επακόλουθη μείωση των ζωντανών κυττάρων (αννεξίνη V⁻ PI). Όμως, σε όλες τις συγκεντρώσεις του NP68 που ελέγχθηκαν, το ποσοστό των ζωντανών CD8⁺ T κυττάρων ήταν υψηλότερο απουσία του.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι εμφανίζεται μειωμένος θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση (AICD) στα T κύτταρα που ελλείπουν TNF. Όμως, επειδή η ενεργοποίηση των F5/TNF^{-/-} T κυττάρων είναι επίσης μειωμένη, δεν είναι ξεκάθαρο αν ο μειωμένος AICD οφείλεται καθαρά στην ελαττωματική ενεργοποίηση ή αν σε αυτόν συνεισφέρει και η σηματοδότηση που εκπορεύεται από τους TNFRs και οδηγεί σε θάνατο με άμεσο τρόπο.

NP68



Εικόνα 18. Μειωμένος αποπτωτικός θάνατος των F5/TNF^{-/-} CD8 T κυττάρων μετά από διέγερσή τους *in vitro*. Σπηνοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-} και F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια καλλιεργούνται παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων NP68 πεπτιδίου. Στις μέρες 1 και 5, τα ολικά CD8⁺ T κύτταρα αναλύθηκαν για δέσμευση αννεξίνης V και χρώση με PI. Οι αριθμοί στους σταυρούς δηλώνουν ποσοστά στις ανάλογες περιοχές.

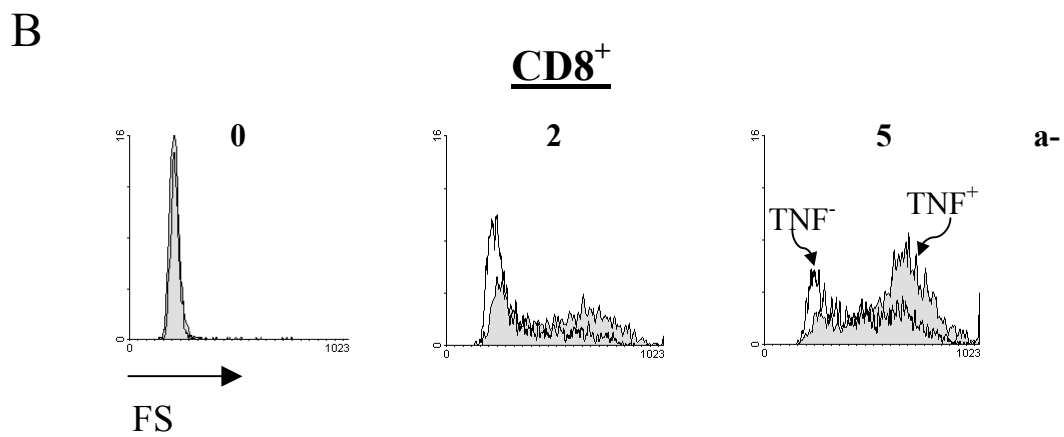
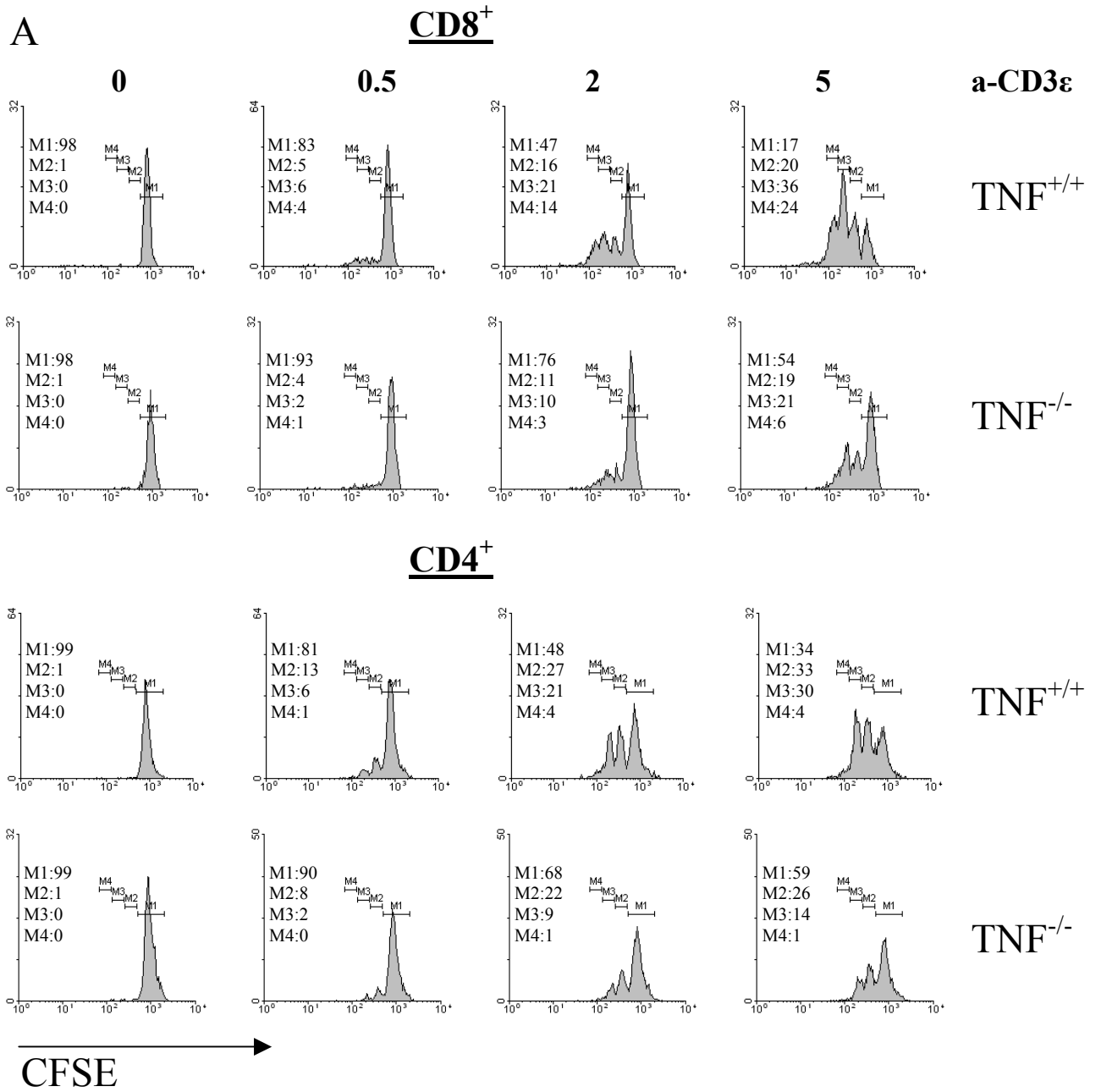
2.4 Το φαινόμενο της μικρότερης ενεργοποίησης των $TNF^{-/-}$ T κυττάρων είναι πολυκλωνικό

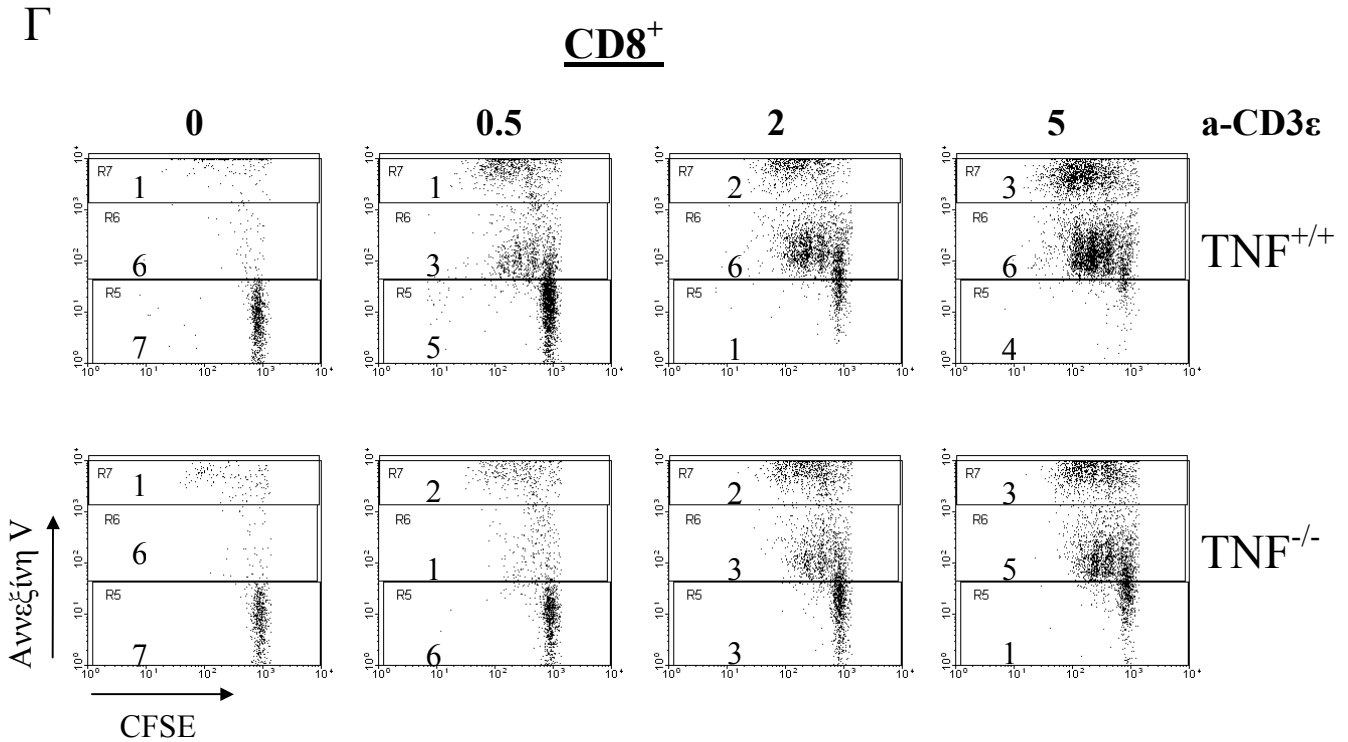
Για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ελαττωματικές αποκρίσεις των F5/ $TNF^{-/-}$ CD8 T κυττάρων σε αντιγόνο είναι ίδιον της F5 ειδικότητας ή και άλλες ή όλες οι ειδικότητες των T κυττάρων επηρεάζονται από την TNF-μεταλλαγή ήταν σκόπιμη η πολυκλωνική διέγερση T κυττάρων προερχόμενων από C57bl/10 ($TNF^{+/+}$) και $TNF^{-/-}$ ποντίκια. Για το λόγο αυτό προσδέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις a-CD3ε αντισώματος σε τρυβλία καλλιέργειας στα οποία κατόπιν καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα για 2 ή 3 ημέρες. Στην Εικόνα 19Α παρατηρούμε ότι για όλες τις συγκεντρώσεις a-CD3, τόσο τα CD8 όσο και τα CD4 T κύτταρα που προέρχονται από σπλήνες $TNF^{-/-}$ ποντικίων πολλαπλασιάζονται σε μικρότερο βαθμό από τα αντίστοιχα των $TNF^{+/+}$. Η λιγότερο έντονη κυτταρική διαίρεση των CD8 $TNF^{-/-}$ κυττάρων συνοδεύεται και από μικρότερη βλαστοποίηση τους (Εικόνα 19B).

Θέλοντας και εδώ να συγκρίνουμε την απόπτωση των $TNF^{+/+}$ και $TNF^{-/-}$ CD8 T κυττάρων μετά από την ενεργοποίηση με a-CD3ε, έγινε χρώση τους με αννεξίνη V. Στην Εικόνα 19Γ παρατηρούμε ότι και στα δύο είδη ζώων, τα ζωντανά CD8 κύτταρα που δεσμεύουν αννεξίνη V είναι κυρίως αυτά που έχουν διαιρεθεί. Αυτό προκύπτει αν συγκρίνουμε τις περιοχές R5 και R6 του κάθε γραφήματος, (βλ. λεζάντα) ενώ η περιοχή R7 περιέχει αποκλειστικά νεκρωτικά κύτταρα όπως προκύπτει από ανεξάρτητη χρώση με PI (δεν δείχνεται). Σημαντικό είναι ότι για όλες τις συγκεντρώσεις του a-CD3 το ποσοστό των ζωντανών, μη αποπτωτικών CD8 T κυττάρων είναι μεγαλύτερο όταν αυτά προέρχονται από $TNF^{-/-}$ ποντίκια (ορθογώνια R5) Συμπερασματικά, η ανικανότητα για βέλτιστη αντιγονική διέγερση και επακόλουθο προγραμματισμένο θάνατο σε απουσία ενδογενούς TNF δεν περιορίζεται μόνο στον F5 κλώνο αλλά επεκτείνεται και στα υπόλοιπα CD8 (και CD4) T κύτταρα.

2.5 Ελαττωμένη ενεργοποίηση των $NF-\kappa B$ και $NF-ATp$ στα F5/ $TNF^{-/-}$ T κύτταρα

Ακολούθως θελήσαμε να μελετήσουμε τους βιοχημικούς μηχανισμούς που διέπουν τις παρατηρούμενες επιδράσεις της έλλειψης του ενδογενούς TNF στις αποκρίσεις των T κυττάρων. Ο $NF-\kappa B$ μεταγραφικός παράγοντας παίζει ένα θετικό ρόλο στην ανάπτυξη και

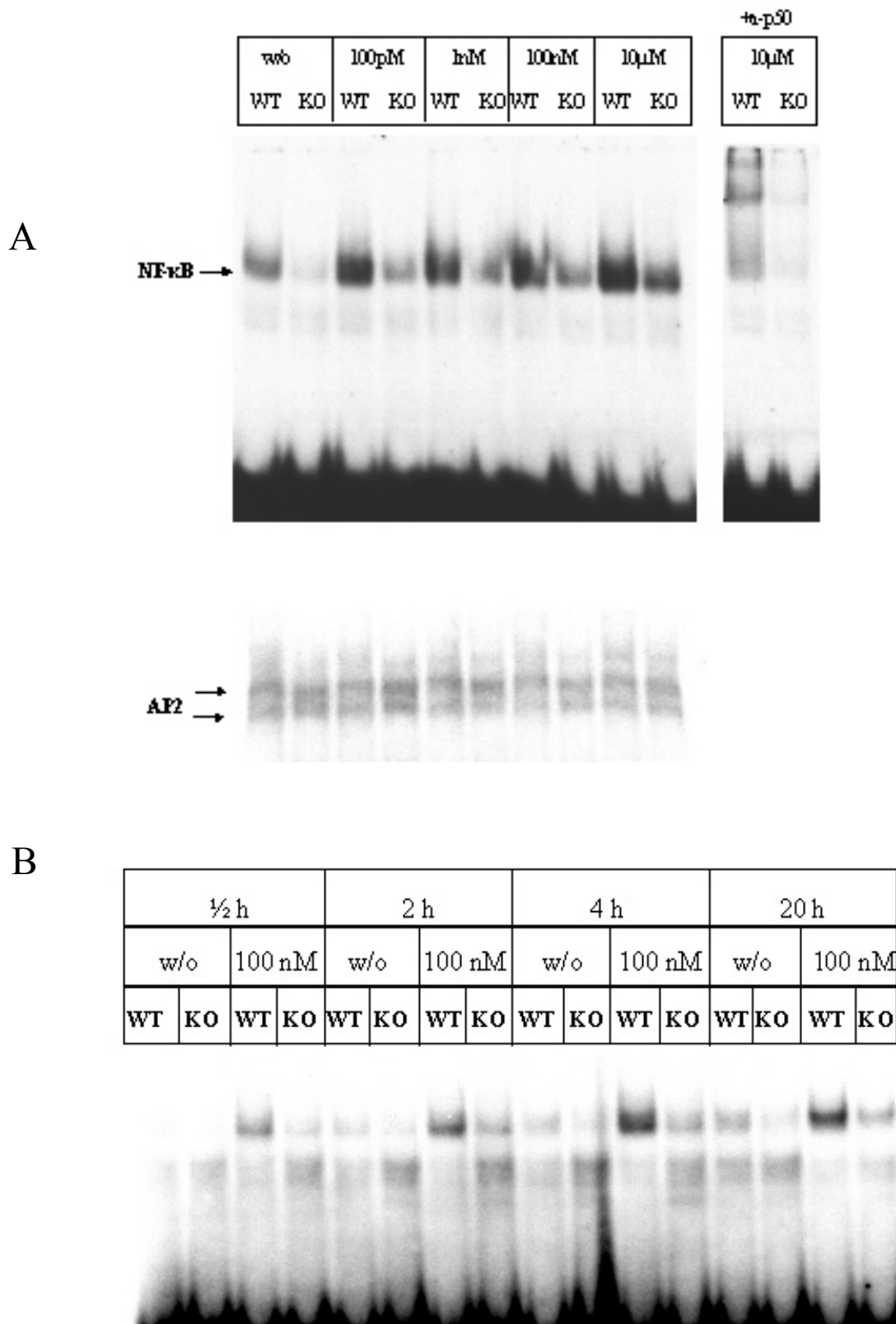




Εικόνα 19. Μειωμένη ενεργοποίηση και AICD σε $TNF^{-/-}$ T κύτταρα μετά από πολυκλωνική διέγερση με α -CD3ε. Σπληνοκύτταρα απομονώνονται από $TNF^{+/+}$ ή $TNF^{-/-}$ ποντίκια, σημαίνονται με CFSE και τα T τους κύτταρα διεγείρονται επί 2 ημέρες με τις αναφερόμενες ποσότητες α -CD3ε (μg/ml) προσδεμένου στα τρυβλία καλλιέργειας. Α.Ανάλυση FACS του προτύπου CFSE στα $CD8^{+}$ ή στα $CD4^{+}$ σπληνοκύτταρα των $TNF^{+/+}$ και $TNF^{-/-}$. Οι αριθμοί δίπλα από τα M1, M2, M3 και M4 αναφέρονται στα ποσοστά των ζωντανών κυττάρων που έχουν διαιρεθεί 0, 1, 2 ή 3 φορές αντίστοιχα. Β.Απεικόνιση του σχηματισμού βλαστών στα $CD8^{+}$ κύτταρα μετά από διέγερση με τις αναφερόμενες ποσότητες α -CD3ε. Τα σκιασμένα γραφήματα απεικονίζουν τα $TNF^{+/+}$ $CD8^{+}$ T κύτταρα, ενώ τα μη σκιασμένα τα $TNF^{-/-}$. Γ. Απεικόνιση της συσχέτισης πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στα $TNF^{+/+}$ και $TNF^{-/-}$ $CD8^{+}$ T κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με α -CD3ε. Το ορθογώνιο R5 περιέχει μόνο ζωντανά, μη αποπτωτικά $CD8^{+}$ T κύτταρα, το ορθογώνιο R7 περιέχει νεκρωτικά κύτταρα (PI+), ενώ το ορθογώνιο R6 περιέχει κυρίως πρώιμα αποπτωτικά $CD8^{+}$ T κύτταρα. Οι αριθμοί μέσα στα ορθογώνια αναφέρονται στα ποσοστά των $CD8^{+}$ T κυττάρων στο κάθε ένα από αυτά.

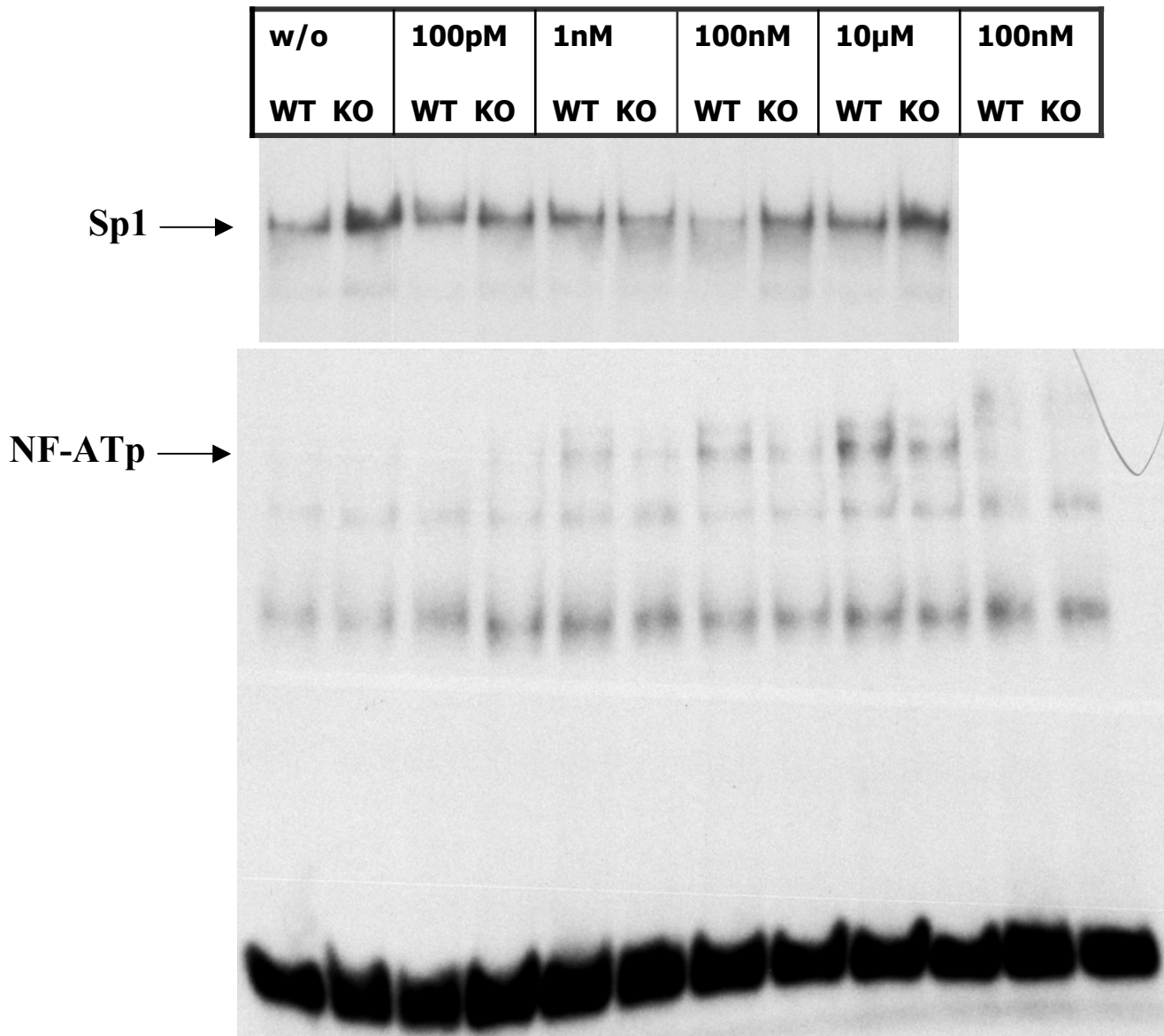
στις λειτουργίες των T κυττάρων (151, 152), αλλά και προστατευτικό ρόλο απέναντι στην απόπτωση που επάγεται από TNF (153, 154). Ο NF-κB κατακρατείται στο κυτταρόπλασμα των μη διεγερμένων T κυττάρων και μεταναστεύει στον πυρήνα τους μετά από διάφορα ερεθίσματα που περιλαμβάνουν τον TNF και τη διέγερση του TCR (152, 155, 156). Για να προσδιοριστεί αν η απουσία του TNF επηρεάζει την ενεργοποίηση του NF-κB μετά από αντιγονική διέγερση, χρησιμοποιήσαμε δοκιμασίες υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πηκτή (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay), συγκρίνοντας την ικανότητα πρόσδεσης NF-κB σε κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο, από πυρηνικά εκχυλίσματα F5/Rag1^{-/-} και F5/Rag1^{-/-}TNF^{-/-} σπληνοκυττάρων που εκτέθηκαν σε πεπτίδιο in vitro. Στην Εικόνα 20A και 20B φαίνεται ότι η πρόσδεση του NF-κB είναι συστηματικά λιγότερη στα πυρηνικά εκχυλίσματα από ενεργοποιημένα F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} T κύτταρα σε όλες τις συγκεντρώσεις NP68 πεπτιδίου και σε όλα τα χρονικά σημεία που ελέγχθηκαν.

Οι NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) είναι μια άλλη οικογένεια επαγόμενων μεταγραφικών παραγόντων, που παίζουν έναν κεντρικό ρόλο στη μεταγραφή γονιδίων μετά από επίδραση μιτογόνων ερεθισμάτων σε T κύτταρα, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις για ενεργοποίησή του από τον TNF. Ο NF-ATp/NF-AT1/NF-ATc2 μετά από διέγερση μέσω TCR ή από ιονοφόρα ασβεστίου αποφωσφορυλιώνεται πολύ γρήγορα και εισέρχεται στον πυρήνα του T κυττάρου (157). Η επίδραση της έλλειψης TNF στην ενεργοποίηση του NF-ATp προσδιορίστηκε με πειράματα EMSA σε θυμοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια μετά από διέγερση με πεπτίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν θυμοκύτταρα αντί για σπληνοκύτταρα επειδή στα δεύτερα ανιχνεύονταν δύσκολα η πρόσδεση του NF-ATp. Παρατηρείται ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις πεπτιδίου που δοκιμάστηκαν (Εικόνα 21) η ειδική δέσμευση του πυρηνικού NF-ATp, στο κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο, ήταν συστηματικά λιγότερο ανιχνεύσιμη στα εκχυλίσματα από F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} θυμοκύτταρα σε σχέση με τα F5/Rag1^{-/-}. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι ο ενδογενής TNF έχει την ικανότητα να ρυθμίζει μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μετά από διέγερση του TCR.



Εικόνα 20. Μειωμένη ποσότητα ενεργοποιημένου NF-κB σε *F5/TNF^{-/-}* T κύτταρα. Α. 3×10^7 σπληνοκύτταρα από *F5/Rag1^{-/-}* (WT) και *F5/Rag1^{-/-}TNF^{-/-}* (KO) ποντίκια διεγείρονται από διάφορες συγκεντρώσεις διαλυτού πεπτιδίου NP68 για 4h in vitro. Από τα κύτταρα αυτά φτιάχτηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα EMSA με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που προσδέονται NFκB ή AP2 η οποία βρίσκεται συστατικά στη σπλήνα. Για την ταυτοποίηση του NFκB χρησιμοποιήθηκαν α-p50 και α-p65(δεν δείχνεται) αντισώματα δείχνοντας ότι στο σύμπλοκο που ανιχνεύουμε υπάρχει p50 αλλά όχι p65. Β. Σύγκριση ενεργοποιημένου πυρηνικού NF-κB στα παραπάνω κύτταρα μετά από διέγερση με 100nM NP68 για διάφορα χρονικά διαστήματα.

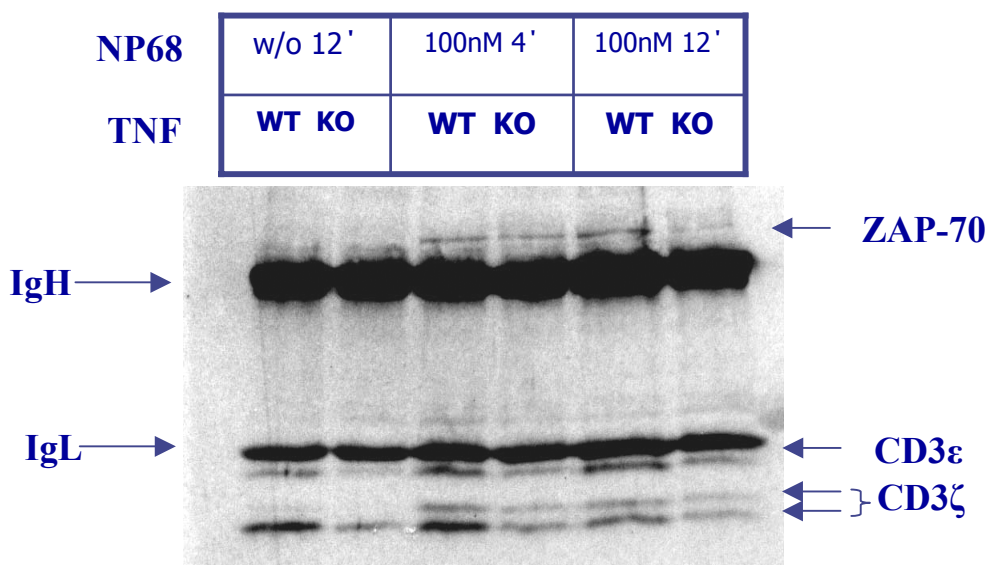
+a-NF-ATp



Εικόνα 21. Μειωμένη ποσότητα ενεργοποιημένου *NF-ATp* σε *F5/TNF^{-/-}* θυμοκύτταρα. 4×10^7 θυμοκύτταρα απομονώθηκαν από *F5/Rag1^{-/-}* (WT) ή *F5/Rag1^{-/-}TNF^{-/-}* (KO) ποντίκια και καλλιεργήθηκαν για 30 min απουσία ή παρουσία των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων NP68. Ίση ποσότητα πρωτεΐνης, από τα πυρηνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν, επωάστηκε με τη θέση δέσμευσης *NF-AT* του υποκινητή της *IL-4*. Αντίσωμα εναντίον του *NF-ATp* επιβεβαίωσε ότι αυτός είναι ένα από τα συστατικά του επαγόμενου συμπλόκου. Η δέσμευση του *Sp1* σε κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Δείχνεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από τρία.

2.6 Η εγγύς σηματοδότηση μέσω T υποδοχέα δεν επηρεάζεται ποιοτικά στα F5/TNF^{-/-} T κύτταρα

Αφού βρέθηκε ότι υπάρχουν οι παραπάνω διαφορές στην TCR-σηματοδότηση απουσία του TNF, θεωρήθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί αν οι καταβολές των διαφορών αυτών βρίσκονται στην εγγύς TCR-σηματοδότηση. Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, από τα πρώτα γεγονότα στη μετάδοση του σήματος που εκπορεύεται από τον TCR είναι οι φωσφορυλιώσεις, σε τυροσίνες, των αλυσίδων CD3ε, CD3ζ και της πρωτεΐνης ZAP-70 από κινάσες της Src οικογένειας. Για να δούμε αν η απουσία του ενδογενούς TNF επηρεάζει μεταξύ άλλων και αυτή τη σηματοδότηση, ελέγξαμε το πρότυπο φωσφορυλίωσης σε τυροσίνες των παραπάνω μορίων σε F5 και F5/TNF^{-/-} κύτταρα μετά από ενεργοποίησή τους. Παρατηρείται στην Εικόνα 22 ότι τόσο στα διεγερμένα περιφερικά T λεμφοκύτταρα ανιχνεύουμε φωσφορυλιωμένη CD3ε, ZAP-70 και υπερφωσφορυλιωμένη CD3ζ, ανεξαρτήτως αν τα κύτταρα προέρχονται από F5 ή F5/TNF^{-/-} ζώα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν είναι ποσοτικά γιατί ενώ τα δείγματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς ολική πρωτεΐνη, εν τούτοις έχουν διαφορετικά ποσοστά F5 και T κυττάρων. Σε άλλα πειράματα με πρωτεΐνη από ίσους αριθμούς F5 T κυττάρων (δεν δείχνονται) δεν υπήρχαν συστηματικές διαφορές στην ένταση ζωνών των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και ως εκ τούτου δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στην εγγύς TCR-σηματοδότηση μεταξύ διεγερμένων F5 και F5/TNF^{-/-} T κυττάρων.



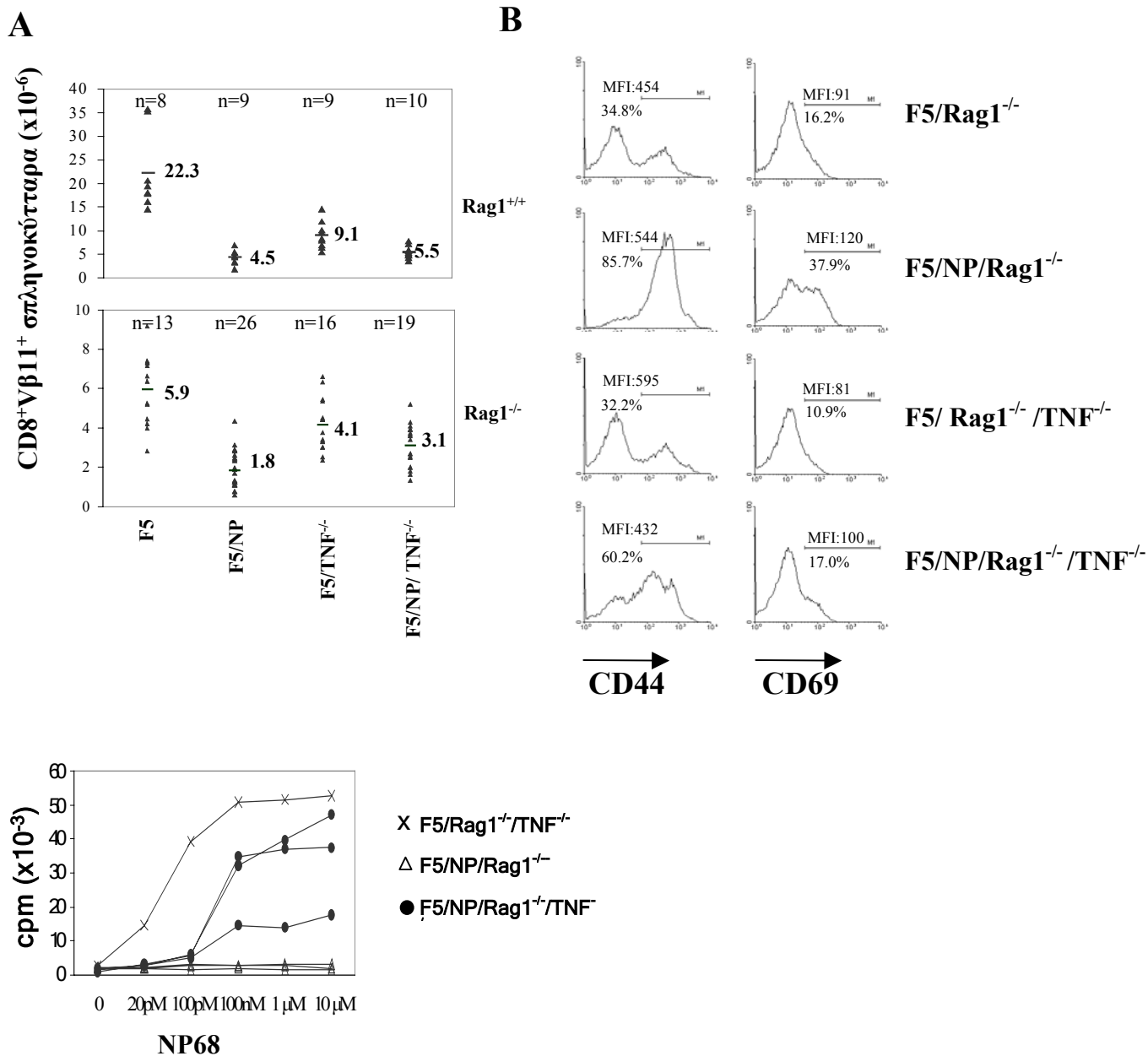
Εικόνα 22. Παρόμοια πρότυπα φωσφορυλίωσης στις τυροσίνες των πρωτεϊνών που γειτνιάζουν με TCR μεταξύ F5 και F5/TNF^{-/-} T κυττάρων. Α. 6.5×10^7 σπληνοκύτταρα από F5 ή F5/TNF^{-/-} ποντίκια καλλιεργούνται παρουσία ή απουσία NP για τους ενδεικνυόμενους χρόνους. Παρασκευάστηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που ανοσοκατακρημνίστηκαν με α-CD3ε αντίσωμα. Δείγματα που αντιστοιχούν σε ίσες ποσότητες πρωτεΐνης διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη που υβριδοποιήθηκε με αντίσωμα εναντίον φωσφοτυροσίνης.

2.7 Η περιφερική ανοχή απουσία ενδογενούς TNF είναι ελαττωματική στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια

Το γεγονός ότι τα αποτελέσματά μας αποκάλυψαν ελαττώματα σε διάφορες αποκρίσεις των F5/TNF^{-/-} T κυττάρων, και επειδή όπως αναφέρθηκε υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που συσχετίζουν τον TNF με περιφερική ανοχή μας οδήγησαν στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής του ενδογενούς TNF στην περιφερική ανοχή των F5 T κυττάρων. Για το λόγο αυτό αναλύθηκαν τα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια, που αποτελούν μοντέλο περιφερικής ανοχής, σε γενετικό υπόβαθρο TNF^{-/-}. Στην Εικόνα 23Α φαίνεται ότι η περιφερική κλωνική απαλοιφή των F5 T κυττάρων εξαιτίας του αυτοαντιγόνου συμβαίνει σε σαφώς μικρότερο βαθμό στα TNF^{-/-} ποντίκια. Έτσι, στο γενετικό υπόβαθρο Rag1^{-/-} παρατηρείται μείωση 70% στα F5 σπληνοκύτταρα μεταξύ F5 και F5/NP ποντικίων ενώ αντίστοιχη μείωση μεταξύ F5/TNF^{-/-} και F5/NP/TNF^{-/-} ποντικίων είναι μόλις 24%. Η έκφραση των επιφανειακών μαρτύρων ενεργοποίησης CD44 και CD69 είναι λιγότερο έντονη στα περιφερικά T κύτταρα από τα F5/NP/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια σε σχέση με αυτά από τα F5/NP/Rag1^{-/-} (Εικόνα 23B), κάτι που σημαίνει ότι αποκρίθηκαν με διαφορετικό τρόπο στη συνάντησή τους με το αυτοαντιγόνο στους ιστούς του ζώου. Αυτό έγινε πιο έκδηλο όταν εξετάστηκε η επίδραση της TNF μεταλλαγής στην ανάπτυξη του άνεργου φαινότυπου των F5/NP CD8 T κυττάρων. Μετά, λοιπόν, από διέγερση με NP68 πεπτίδιο *in vitro* τα F5 κύτταρα που προέρχονται από F5/NP/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ζώα, μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε σημαντικό βαθμό ενώ αυτά που προέρχονται από τα F5/NP/Rag1^{-/-} δεν πολλαπλασιάζονται σχεδόν καθόλου (Εικόνα 23Γ). Πάντως τα F5/NP/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} T κύτταρα παραμένουν υπο-δραστικά αν συγκριθούν με τα F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}.

2.8 Η αφύσικα μικρή απαλοιφή των F5/TNF^{-/-} κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση σε αντιγόνο είναι χαρακτηριστικό που εξαρτάται μόνο από τα T κύτταρα.

Για να αναλυθεί περαιτέρω η επίδραση του TNF στην κλωνική απαλοιφή, ένα απαραίτητο συστατικό ανοχής, χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα μεταφοράς F5/Rag1^{-/-} ή F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} T κυττάρων σε ποντίκια-αποδέκτες που εκφράζουν ενδογενώς το NP. Με αυτό τον τρόπο ήταν εφικτό να παρακολουθήσουμε την αρχική φάση, της κλωνικής επέκτασης, και κατόπιν την φθίση της ανοσοαπάντησης, την κλωνική απαλοιφή. Στην



Εικόνα 23. Η κλωνική απαλοιφή και η ανέργεια των αυτοδραστικών T κυττάρων είναι ελαττωματικές στα $F5/NP/TNF^{-/-}$ ποντίκια. Α. Οι απόλυτοι αριθμοί $CD8^+V\beta 11^+$ σπληνοκυττάρων υπολογίστηκαν με μικροσκοπική καταμέτρηση και κυταρομετρία ροής σε $F5$, $F5/NP$, $F5/TNF^{-/-}$ και $F5/NP/TNF^{-/-}$ ποντίκια σε $Rag1^{-/-}$ και $Rag1^{+/+}$ γενετικά υπόβαθρα. Κάθε τρίγωνο αντιπροσωπεύει ένα ποντίκι και οι παύλες δηλώνουν μέσες τιμές. Β. Δείχεται η έκφραση των μαρτύρων ενεργοποίησης $CD44$ και $CD69$ πάνω στα $CD8^+$ κύτταρα. Η τιμή MFI δηλώνει τη μέση ένταση φθορισμού των θετικών κυττάρων και τα ποσοστά αναφέρονται στα $CD44^+$ και $CD69^+$ κύτταρα του $CD8^+$ πληθυσμού. Γ. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού σε σπληνοκύτταρα από ποντίκια $F5/NP/Rag1^{-/-}$, $F5/NP/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}$ και από ποντίκια «ελέγχου» $F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-}$ παρουσία ακτινοβολημένων $C57bl/10$ σπληνοκυττάρων προεπωασμένων με διάφορες συγκεντρώσεις NP68. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν για ίσους αριθμούς $CD8^+$ κυττάρων. Το πείραμα έγινε τουλάχιστον τρεις φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

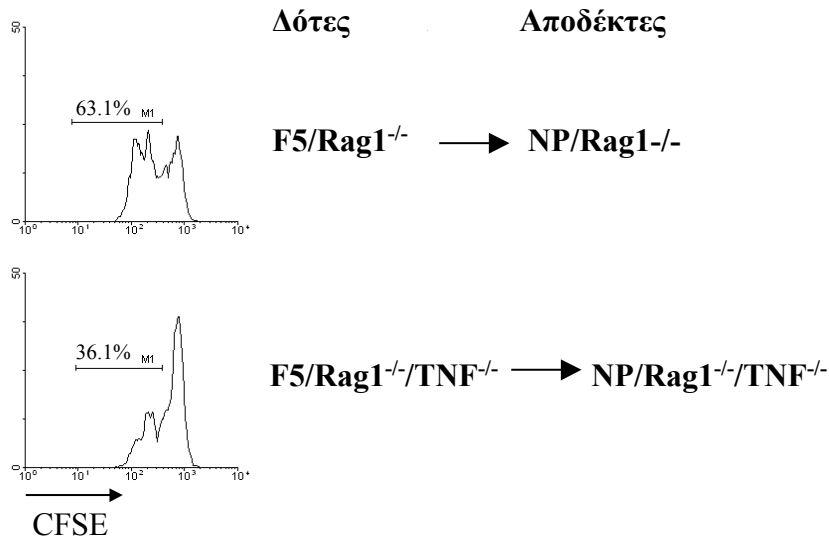
Εικόνα 24A δείχνεται ο *in vivo* πολλαπλασιασμός T κυττάρων σημασμένων με CFSE, στους αποδέκτες που εκφράζουν το NP, 40 ώρες μετά τη μεταφορά τους. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η απουσία του TNF από τους δότες και από τους δέκτες οδηγεί σε σημαντική καθυστέρηση του πολλαπλασιασμού των F5 T κυττάρων, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας σε διέγερση των F5/TNF^{-/-} T κυττάρων *in vitro*.

Για να προσδιοριστεί ο ρόλος του TNF στην περιφερική κλωνική απαλοιφή των F5 T κυττάρων, μετρήθηκαν τα F5 T κύτταρα που ανακτήθηκαν 26 ημέρες μετά τη μεταφορά τους στους NP-αποδέκτες. Στατιστικώς σημαντικά περισσότερα F5 κύτταρα ανακτώνται απουσία του TNF μετά από την παραπάνω περίοδο (Εικόνα 24B στήλες Β,Δ, P<0.013). Φαίνεται λοιπόν πως η απαλοιφή που έπεται της χρόνιας έκθεσης στο ενδογενές αντιγόνο είναι ελαττωματική στην απουσία του TNF, κάτι που επιβεβαιώνει ότι ο αυξημένος αριθμός CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων στις F5/NP/TNF^{-/-} σπλήνες αποδίδεται κύρια σε αναποτελεσματική περιφερική απαλοιφή, και όχι σε συμμετοχή του θύμου.

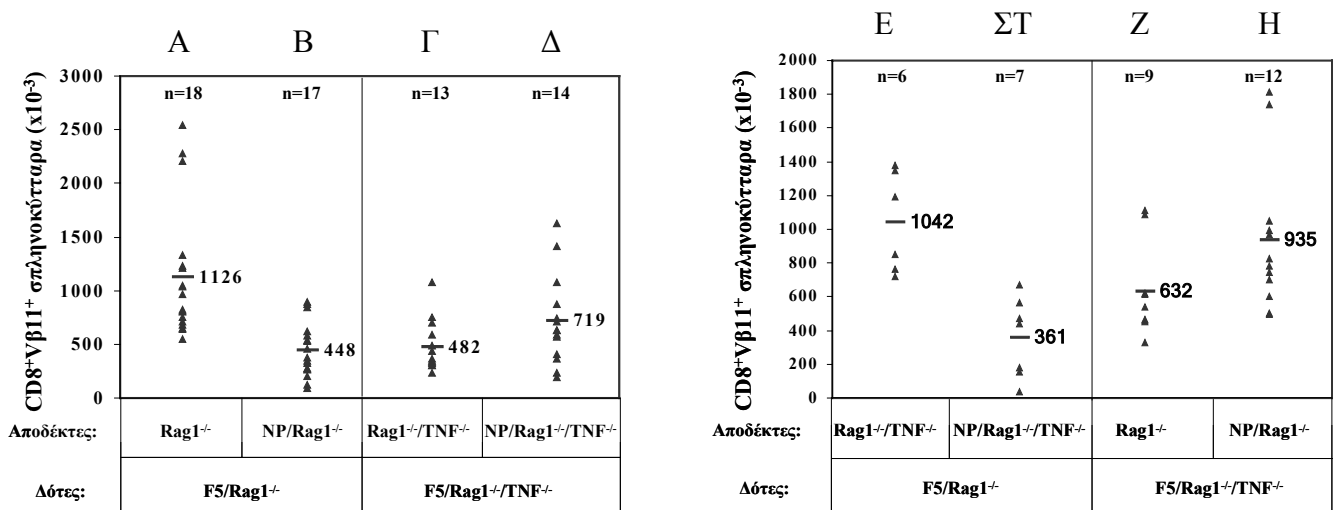
Περαιτέρω θελήσαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο οι παρατηρούμενες διαφορές στην παραπάνω απαλοιφή εξαρτώνται από τον γονότυπο των T κυττάρων ή του αποδέκτη ή και των δύο. Για τούτο, μεταφέρθηκαν F5 σπληνοκύτταρα σε αποδέκτες αντίθετου γονοτύπου ως προς TNF, δηλαδή F5/Rag1^{-/-} κύτταρα μεταφέρθηκαν σε NP/Rag1^{-/-}TNF^{-/-} αποδέκτες και F5/Rag1^{-/-}TNF^{-/-} κύτταρα, μεταφέρθηκαν σε NP/Rag1^{-/-} αποδέκτες. Στην Εικόνα 24B φαίνεται ότι ο μέγιστος AICD συμβαίνει όταν τα F5 T κύτταρα είναι ικανά να παράγουν TNF. Έτσι, η μείωση του αριθμού των F5 κυττάρων, αγρίου τύπου ως προς TNF, είναι παρόμοια ανεξάρτητα από το αν οι αποδέκτες ήταν TNF^{+/+} ή TNF^{-/-} (Εικόνα 22B στήλες Α,Β σε αντιπαραβολή με τις Ε, ΣΤ). Αντίστροφα, ο ελαττωματικός AICD των F5/Rag1^{-/-} TNF^{-/-} T κυττάρων σε απόκριση στο ενδογενές αντιγόνο συμβαίνει στον ίδιο βαθμό ανεξάρτητα της παρουσίας λειτουργικού TNF στον αποδέκτη (Εικόνα 24B στήλες Γ, Δ σε αντιπαραβολή με τις Ζ, Η).

Συμπερασματικά τα παραπάνω δείχνουν ότι η μειωμένη απαλοιφή των F5 T κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση στο ενδογενές αντιγόνο οφείλεται μάλλον σε ελάττωμα του TNF^{-/-} T κυττάρου παρά σε ελάττωμα των TNF^{-/-} APC. Το ελάττωμα είναι πιθανώς είτε η ανικανότητα των διεγερμένων F5/TNF^{-/-} T κυττάρων να παράγουν TNF (ενεργοποιημένα T κύτταρα παράγουν σημαντικές ποσότητες μεμβρανικού και διαλυτού TNF) ή είναι οι αλλαγές στις αποκρίσεις τους σε αντιγόνα που θεμελιώθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και παραμονής τους στα TNF^{-/-} ποντίκια.

A



B

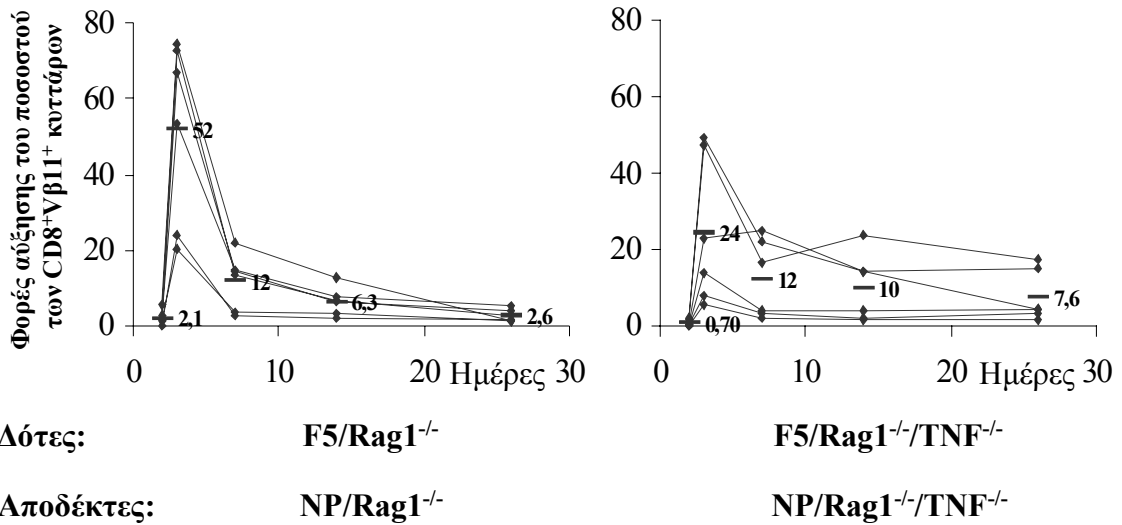
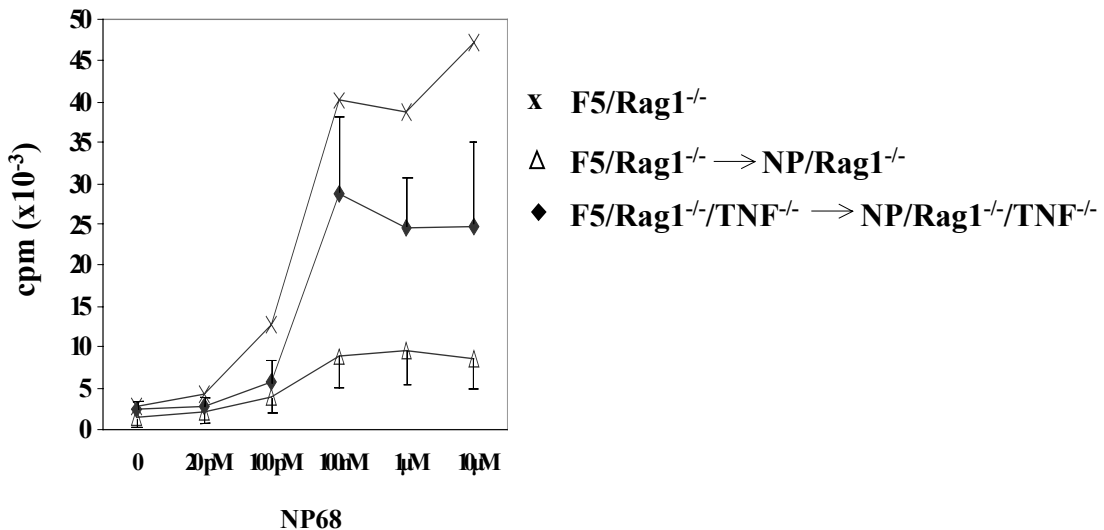


Εικόνα 24. Ελαττωματικός πολλαπλασιασμός και επακόλουθη μειωμένη απαλοιφή των F5 T κυττάρων απουσία του TNF μετά από χρόνια έκθεση σε ενδογενές αντιγόνο. Σπληνοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-} ή F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια-δότες, που περιέχουν 3x10⁶ CD8⁺ κύτταρα μεταφέρθηκαν σε λεμφοπενικούς αποδέκτες που εξέφραζαν ενδογενώς το NP σε TNF^{+/+} και TNF^{-/-} γενετικό υπόβαθρο. Α. Ανάλυση FACS στα CD8⁺ σπληνοκύτταρα που είχαν σημανθεί με CFSE και ανακτήθηκαν από τους αποδέκτες την ημέρα 2 μετά τη μεταφορά. Τα ποσοστά δείχνουν το μέρος των ανακτημένων CD8⁺ που είχαν διαιρεθεί τουλάχιστον μία φορά. Β. Οι αποδέκτες αναλύθηκαν για αριθμό CD8⁺Vβ11⁺ σπληνοκυττάρων 26 ημέρες μετά τη μεταφορά. Σαν ποντίκια ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αποδέκτες που δεν εξέφραζαν το αντιγόνο. Κάθε τρίγωνο δηλώνει ένα ποντίκι και οι παύλες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν μια συλλογή από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα.

2.9 Ελαττωματική επαγωγή ανέργειας στα F5 T κύτταρα από χρόνια έκθεση στο αντιγόνο εν απουσία του TNF.

Για να εξετάσουμε το ρόλο του TNF κατά την εγκαθίδρυση του άνεργου φαινοτύπου στα T κύτταρα, μετά από χρόνια έκθεση στο αντιγόνο, ίσοι αριθμοί F5 T κυττάρων από F5/Rag1^{-/-} και F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} σπληνοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε NP/Rag1^{-/-} και NP/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια-αποδέκτες αντίστοιχα. Η τύχη των μεταφερμένων F5 T κυττάρων στους αποδέκτες, παρακολούθηθηκε μετρώντας το ποσοστό των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων στο αίμα των αποδεκτών με την πάροδο του χρόνου, και ο βαθμός απόκρισης των ανακτηθέντων κυττάρων στο πεπτιδίο δοκιμάστηκε *in vitro* 26 ημέρες μετά την μεταφορά τους. Στην Εικόνα 25A δείχνεται η μεταβολή των ποσοστών των μεταφερμένων F5 T κυττάρων στο αίμα σε διάφορα χρονικά σημεία σε σχέση με την ημέρα 1. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα πειράματα η κλωνική επέκταση των F5 T κυττάρων στα αρχικά στάδια της ανοσοαπάντησης είναι σημαντικά ελαττωμένη στο TNF^{-/-} γενετικό υπόβαθρο. Η επίδραση της TNF μεταλλαγής είναι πιο έκδηλη στο ρυθμό φθίσης της ανοσοαπάντησης, που καθυστερεί αφύσικα στα F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} CD8 T κύτταρα σε σχέση με τα F5/Rag1^{-/-}, δηλαδή στα πρώτα η κλωνική απαλοιφή είναι λιγότερο έντονη. Τα F5 T κύτταρα που επιβίωσαν της κλωνικής απαλοιφής μετά τη χρόνια έκθεση στο αντιγόνο, δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό μετά από δεύτερη «συνάντηση» με το αντιγόνο *in vitro*. Όπως ήταν αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία (59, 60), η χρόνια έκθεση στο αντιγόνο είχε οδηγήσει τα F5 T κύτταρα σε μια κατάσταση που έμοιαζε με άνεργη, δηλαδή είναι υπο-δραστικά αν συγκριθούν με ίσο αριθμό παρθένων F5 T κυττάρων (Εικόνα 25B). Μάλιστα η κατάσταση αυτή έχει ήδη αρχίσει να εγκαθιδρύεται τουλάχιστον από την όγδοη μέρα μετά τη μεταφορά (δε δείχνεται).

Τα ανακτημένα F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} T κύτταρα ήταν (σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας) περισσότερα από τα αντίστοιχα F5/Rag1^{-/-} και επιπλέον η ικανότητα τους, ανά κύτταρο, για πολλαπλασιασμό ήταν αξιοσημείωτα μεγαλύτερη αν και παρέμεναν λιγότερο δραστικά από τα παρθένα F5 T κύτταρα (Εικόνα 25B).

A**B**

Εικόνα 25. Η κλωνική επέκταση, η κλωνική απαλοιφή και η ανέργεια που επάγονται από ενδογενές αντιγόνο είναι ελαττωματικές στην απουσία του *TNF*. Α. Σπληνοκύτταρα από F5/Rag1^{-/-} ή F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια-δότες, που περιέχουν 6x10⁶ CD8⁺ κύτταρα, μεταφέρονται αντίστοιχα σε NP/Rag1^{-/-} ή NP/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} ποντίκια-αποδέκτες. Τις ημέρες 1, 2, 3, 7, 14 και 26, λήφθηκε αίμα από τους αποδέκτες και αναλύθηκε ως προς το ποσοστό των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως «φορές αύξησης του ποσοστού των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων»=(%-%1ης ημέρας)/%1ης ημέρας. Δείχνονται έξι ποντίκια από κάθε είδος, ενός από δύο τέτοια πειράματα. Οι παύλες δηλώνουν μέσες τιμές. Β.Την 26η ημέρα μετά τη μεταφορά, τα ποντίκια θυσιάζονται και σπληνοκύτταρα από τα δύο είδη αποδεκτών που περιέχουν ίσους αριθμούς CD8⁺ κυττάρων υποβάλλονται σε δοκιμασία πολλαπλασιασμού σε απόκριση στο NP68 in vitro. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή από πέντε ζώα και οι ράβδοι την τυπική απόκλιση. Ίσος αριθμός CD8⁺ κυττάρων από μία F5/Rag1^{-/-} σπλήνα χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα ελέγχου.

3. Ο ρόλος του ενδογενούς Fas σε αποκρίσεις των CD8⁺ T κυττάρων

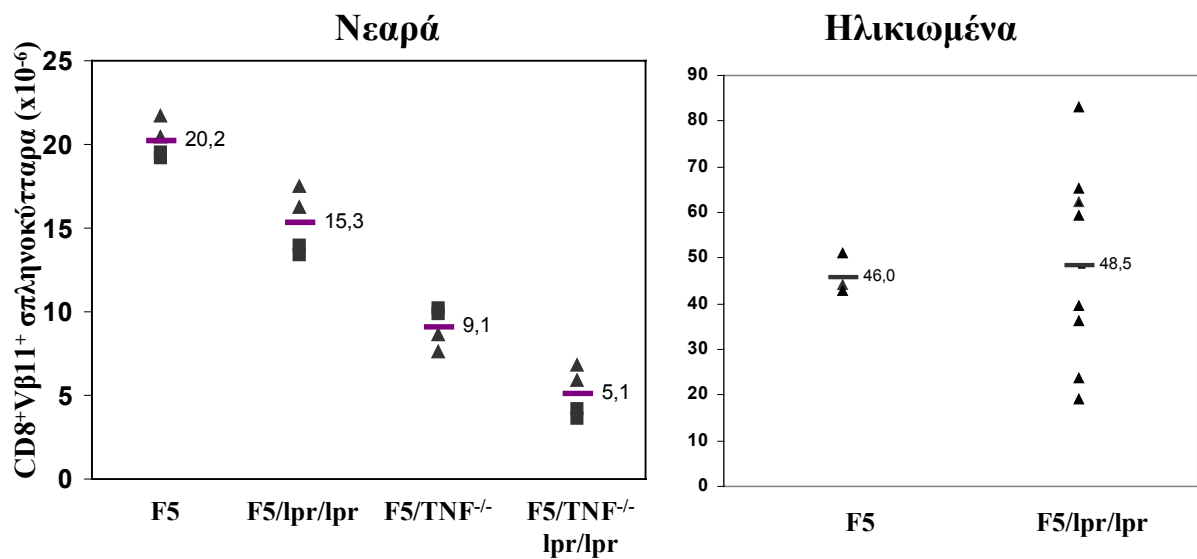
3.1 Η *Ipr* μεταλλαγή υποβαθμίζει την ικανότητα επιβίωσης των F5 T κυττάρων σε νέα ποντίκια

Αρχικά, διασταυρώθηκαν ποντίκια *Ipr/Ipr* με F5 και συγκρίθηκαν οι αριθμοί των CD8⁺Vβ11⁺ σπληνοκυττάρων τους ως μέτρο των περιφερικών F5 T κυττάρων. Καθότι, όπως αναφέρθηκε, η κατάργηση της σηματοδότησης του TNF έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένους αριθμούς F5 κυττάρων ήταν λογικό να εξετάσουμε αν η έλλειψη σηματοδότησης μέσω ενός άλλου μέλους της ίδιας οικογένειας έχει παρόμοια αποτελέσματα. Στην Εικόνα 26 βλέπουμε ότι η έλλειψη λειτουργικού Fas οδηγεί σε μια ήπια μείωση των F5 T κυττάρων σε νεαρά F5/*Ipr/Ipr* ποντίκια μικρότερου βαθμού από ότι προκαλεί η έλλειψη του TNF. Επιπροσθέτως, η σύγχρονη έλλειψη ενδογενούς TNF και Fas έχει σαν αποτέλεσμα την δραματικότερη μείωση F5 T κυττάρων (περίπου στο 20% αυτών του αγρίου τύπου). Στα ηλικιωμένα F5 ζώα (Εικόνα 26) παρατηρείται αύξηση του αριθμού των CD8⁺Vβ11⁺ σπληνοκυττάρων (~2.3 φορές) σε σχέση με τα νέα, ενώ στα F5/*Ipr/Ipr* η αύξηση είναι μεγαλύτερη (~3.2 φορές) ώστε τελικά οι διαφορές στους αριθμούς των F5 T κυττάρων που παρατηρούνταν στα νέα ποντίκια λόγω της *Ipr/Ipr* μεταλλαγής να έχουν εξαλειφτεί στα ηλικιωμένα.

3.2 Φυσιολογική περιφερική ανοχή απουσία λειτουργικού ενδογενούς Fas στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια.

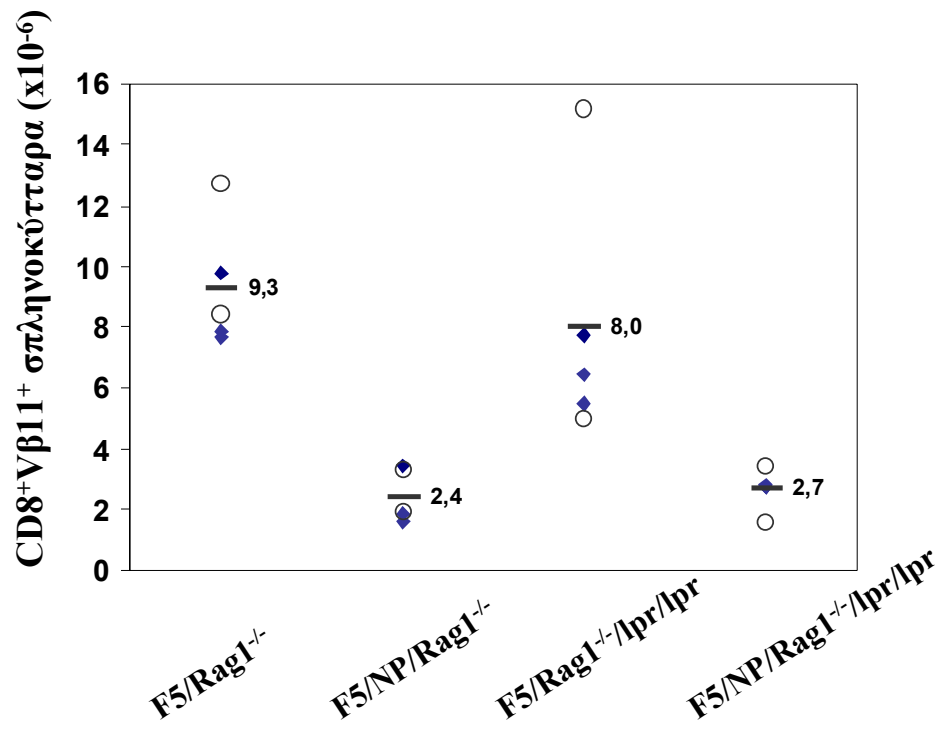
Καθώς ο Fas έχει εμπλακεί σε θανάτωση T κυττάρων μετά από διέγερσή τους με αντιγόνο θελήσαμε να ελέγξουμε την πιθανή συμμετοχή του στην κλωνική απαλοιφή που είναι έκδηλη στα περιφερικά F5 κύτταρα των F5/NP ποντικών. Για τούτο διασταυρώθηκαν F5/NP ποντίκια με *Ipr/Ipr* και συγκρίθηκε ο αριθμός των CD8⁺Vβ11⁺ σπληνοκυττάρων από F5/NP/*Ipr/Ipr* με αυτόν από F5/*Ipr/Ipr* ποντίκια. Στην Εικόνα 27Α φαίνεται ότι η απαλοιφή των F5 T κυττάρων απουσία Fas σηματοδότησης είναι εξίσου αποτελεσματική με αυτήν στα αγρίου τύπου ως προς Fas ποντίκια κάτι που σημαίνει ότι στο συγκεκριμένο μοντέλο περιφερικής ανοχής η πρωτεΐνη Fas δεν έχει κάποιο εμφανή ρόλο στην κλωνική απαλοιφή των εν δυνάμει αυτοδραστικών κυττάρων.

Τα ειδικά για NP, T κύτταρα που επιβιώνουν από την κλωνική απαλοιφή στην περιφέρεια των F5/NP/*Ipr/Ipr* ποντικών ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να

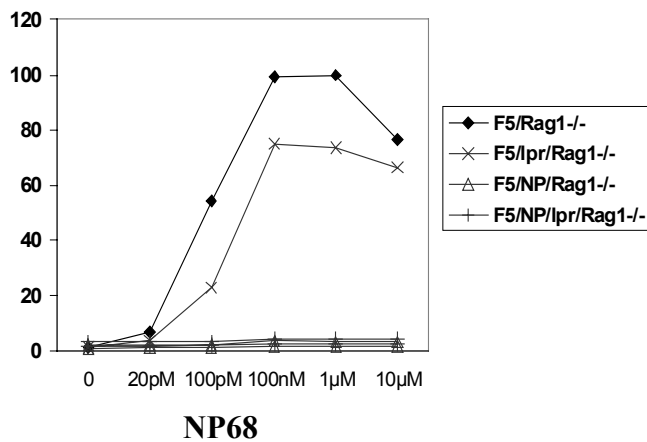


Εικόνα 26. Μειωμένοι αριθμοί F5 T σπληνοκυττάρων σε νεαρά F5/lpr/lpr και F5/TNF^{-/-}lpr/lpr ποντίκια. 6-12 εβδομάδων ποντίκια (νεαρά) ή 20-24 εβδομάδων (ηλικιωμένα) θυσιάζονται και τα σπληνοκύτταρα τους απαριθμούνται στο μικροσκόπιο και αναλύονται με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των επιφανειακών μορίων CD8, CD4 και Vβ11. Κάθε τρίγωνο ή τετράγωνο αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι και οι παύλες αναπαριστούν τις μέσες τιμές. Τα τρίγωνα συμβολίζουν διαφορετικό πείραμα από τα τετράγωνα.

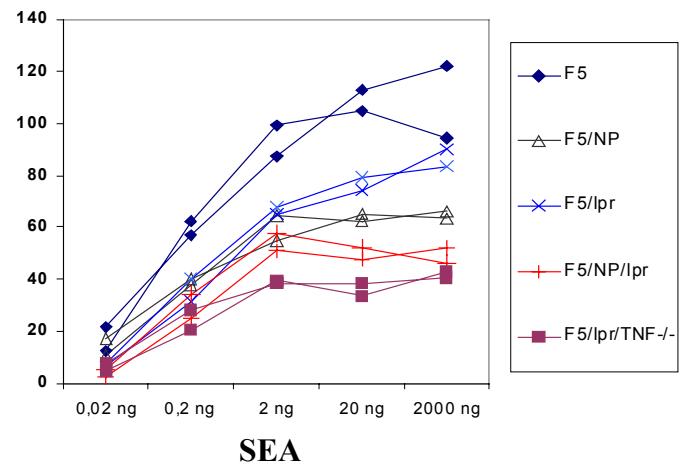
A



B



Γ



Εικόνα 27. Η περιφερική ανοχή των F5/NP T κυττάρων δεν επηρεάζεται από την Ipr μεταλλαγή. Α. Ποντίκια 9-11 εβδομάδων θυσιάζονται και τα σπληνοκύτταρά τους αναλύονται με μικροσκοπική απαρίθμηση και κυτταρομετρία ροής για τον υπολογισμό του αριθμού των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων τους. Παρουσιάζεται συλλογή αποτελεσμάτων από δύο ανεξάρτητα πειράματα, με δύο ζώα (κύκλοι) και τρία ζώα (ρόμβοι). Οι παύλες και οι αριθμοί δηλώνουν μέσους όρους. Β. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού σε σπληνοκύτταρα των παραπάνω ζώων που περιέχουν ίσους αριθμούς CD8⁺ T κυττάρων, παρουσία ακτινοβολημένων C57bl/10 σπληνοκυττάρων προεπωασμένων με διάφορες συγκεντρώσεις NP68. Γ. Σπληνοκύτταρα από F5, F5/NP, F5/Ipr/Ipr, F5/NP/Ipr/Ipr και F5/Ipr/Ipr/TNF^{-/-} ποντίκια που περιείχαν ίσο αριθμό CD8 T κυττάρων καλλιεργήθηκαν παρουσία των παραπάνω ποσοτήτων SEA. Μετά από 2 ημέρες επώαστηκαν για 6 επιπλέον ώρες με ³H-dTTP και μετρήθηκε η ενσωματωμένη στα κύτταρα ραδιενέργεια

αποκρίνονται στο πεπτίδιο NP68 *in vitro*. Στην Εικόνα 27B παρατηρούμε ότι τα F5/NP/Ipr/Ipr σπληνοκύτταρα συμπεριφέρονται όπως ακριβώς τα αγρίου τύπου ως προς Fas, F5/NP, δηλαδή δεν πολλαπλασιάζονται πρακτικά καθόλου όπως αυτό κρίνεται από τις χαμηλές τιμές ενσωματωμένης θυμιδίνης.

Επιπλέον ελέγχθηκε η απόκριση των F5/NP/Ipr/Ipr T κυττάρων στο υπεραντιγόνο SEA που όπως αναφέρθηκε μπορεί να αναστρέψει, αλλά όχι πλήρως, τον άνεργο φαινότυπο των F5/NP T κυττάρων *in vitro*. Παρατηρείται στην Εικόνα 27Γ ότι η διέγερση των F5/NP/Ipr/Ipr T κυττάρων από το υπεραντιγόνο SEA τα οδηγεί σε παρόμοιο βαθμό πολλαπλασιασμού με τα F5/NP (Εικόνα 27 Γ).

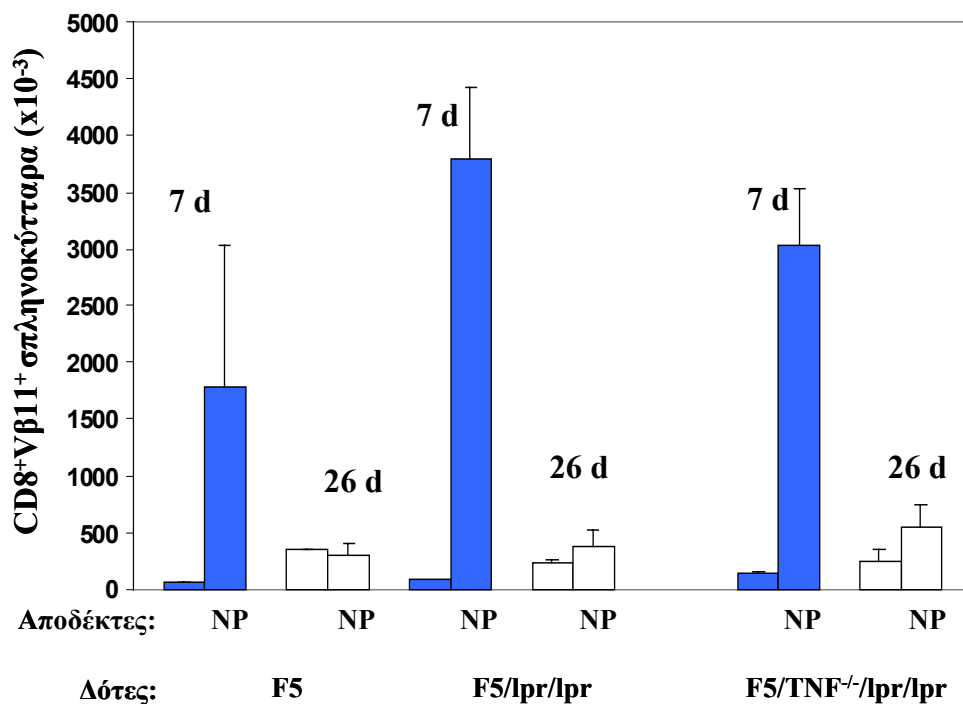
Συμπερασματικά η Ipr μεταλλαγή δεν επηρεάζει ούτε την κλωνική απαλοιφή ούτε τον άνεργο φαινότυπο των F5/NP CD8 T κυττάρων. Συνεπώς σε αυτό το μοντέλο ποντικών ο Fas δεν έχει κανένα εμφανή ρόλο στην περιφερική ανοχή αυτοδραστικών T κυττάρων στο αυτοαντιγόνο.

*3.3 Η σύγχρονη ανενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εκπορεύονται από Fas και TNFRs δεν είναι αρκετή για την εξάλειψη του AICD των F5 CD8 T κυττάρων *in vivo*.*

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, υπάρχουν ενδείξεις ότι τόσο ο Fas όσο και ο TNF εμπλέκονται στον θάνατο των T κυττάρων που επάγεται από ενεργοποίηση. Έτσι, μελετήσαμε το φαινόμενο του AICD των F5 κυττάρων *in vivo* όταν αυτά δεν μπορούν να παράγουν Fas και TNF πρωτεΐνες.

Για το λόγο αυτό μεταφέραμε F5, F5/Ipr/Ipr, και F5/TNF^{-/-}/Ipr/Ipr σπληνοκύτταρα που περιείχαν ίσους αριθμούς CD8⁺ T κυττάρων σε ποντίκια-αποδέκτες NP/Rag1^{-/-}, και προσδιορίσαμε τους ολικούς αριθμούς F5 T κυττάρων στις σπλήνες των αποδεκτών την 7^η και την 26^η ημέρα μετά την μεταφορά. Βρέθηκε ότι ο βαθμός απαλοιφής των διεγερμένων και πολλαπλασιασμένων T κυττάρων μεταξύ της 7^{ης} και της 26^{ης} ημέρας είναι παραπλήσιος για κάθε γονότυπο T κυττάρων από τους παραπάνω (Εικόνα 28). Παρατηρούμε βέβαια ότι η απόκλιση των ανακτηθέντων F5 κυττάρων από NP ζώα την 7^η ημέρα είναι μεγάλη και επιπλέον εκ των υστέρων διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των F5 κυττάρων είναι μέγιστος την

3^η ή 4^η ημέρα και όχι την 7^η (βλέπε εικόνα 25A), και συνεπώς η 7^η ημέρα δεν είναι καλό σημείο αναφοράς για να ποσοτικοποιηθεί ο AICD. Πάντως μπορούμε σίγουρα να συμπεράνουμε ότι ο AICD των F5 κυττάρων *in vivo* δεν εξαρτάται μόνο από τους Fas και TNF καθώς ο αριθμός των F5/TNF^{-/-}/lpr/lpr CD8⁺ T κυττάρων που ανιχνεύονται την 26^η ημέρα είναι μόλις το 20% του αντίστοιχου αριθμού της 7^{ης} ημέρας.



Εικόνα 28. Η σύγχρονη έλλειψη των Fas και TNF δεν καταργεί τον θάνατο που επάγεται στα F5 T κύτταρα μετά από ενεργοποίηση (AICD) *in vivo*. Σπληνοκύτταρα από F5, F5/lpr/lpr, και F5/TNF^{-/-}/lpr/lpr ποντίκια που περιείχαν 3x10⁶ CD8⁺ κύτταρα ενέθηκαν ενδοφλέβια σε λεμφοπενικούς αποδέκτες Rag1^{-/-} που εξέφραζαν ή όχι την πρωτεΐνη NP. Οι αποδέκτες θυσιάστηκαν την 7η και την 26η ημέρα μετά την ένεση, και προσδιορίστηκε ο αριθμός των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων στη σπλήνα τους. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ενώ οι μπάρες είναι ίσες με μία τυπική απόκλιση. Για κάθε είδος NP/Rag1^{-/-} ζώου που αναλύθηκε χρησιμοποιήθηκαν τρία ποντίκια ανά χρονικό σημείο ενώ για τα Rag1^{-/-} ζώα χρησιμοποιήθηκαν δύο από αυτά.

Συζήτηση

Η περιφερική ανοχή των T κυττάρων είναι ένα σύνολο μηχανισμών που διασφαλίζουν ότι τα επιλεγμένα στο θύμο, ώριμα, εν δυνάμει αυτοδραστικά T κύτταρα δεν θα προκαλέσουν ανοσοαπάντηση σε ίδια συστατικά του οργανισμού (αυτοαντιγόνα). Η μελέτη και κατανόηση αυτών των μηχανισμών είναι αναγκαία για την ερμηνεία ανάπτυξης και εξέλιξης αυτοάνοσων ασθενειών και για θεραπευτική παρέμβαση σε αυτές.

Θέλοντας να διελευκάνουμε διαδικασίες που μεσολαβούν την επαγωγή και εγκαθίδρυση της περιφερικής ανοχής κυτταροτοξικών CD8 T κυττάρων απέναντι σε αυτοαντιγόνο χρησιμοποιήσαμε μοντέλα ποντικών που έχουν κύρια ή μόνο μια ειδικότητα CD8 T κυττάρων εξαιτίας της διαγονιδιακής έκφρασης του F5 TCR. Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την πρωτεΐνη NP του ιού της γρίπης, της οποίας έναν επίτοπο αναγνωρίζει ο F5 TCR, καθώς και ποντίκια F5/NP που εκφράζουν και τα δύο.

Δείξαμε ότι στα διπλά διαγονιδιακά F5/NP ποντίκια ο αριθμός των εν δυνάμει αυτοδραστικών T κυττάρων στα περιφερικά λεμφοειδή όργανά τους έχει μειωθεί σημαντικά, μια διαδικασία που ονομάζεται κλωνική απαλοιφή (Εικόνα 1). Η μείωση αυτή λαμβάνει χώρα μετά την ανάπτυξη των κυττάρων στο θύμο αφού δεν υπάρχει έκδηλη φαινομενολογία αρνητικής επιλογής. Συνεπώς, η κλωνική απαλοιφή των F5/NP CD8 T κυττάρων συμβαίνει είτε σε δευτερεύοντα λεμφοειδή όργανα, είτε σε ιστούς που εκφράζεται το αντιγόνο, είτε σε κάποια σημεία της λεμφικής κυκλοφορίας.

Ο θάνατος ώριμων T κυττάρων μετά από συνάντηση με αυτοαντιγόνο μπορεί να οφείλεται σε παρουσίασή του με έλλειψη συνδιέγερσης από κύτταρα που δεν είναι αντιγονοπαρουσιαστές (58). Όμως μπορεί να οφείλεται στην παρουσίασή του από επαγγελματίες-αντιγονοπαρουσιαστές (APCs) που το προσέλαβαν από άλλα κύτταρα, να το επεξεργάστηκαν και να το παρουσίασαν, που σημαίνει ότι υπό ορισμένες συνθήκες η παρουσίαση αντιγόνου από APCs (κυρίως δένδριτικά κύτταρα) μπορεί να είναι ανοχογόνος (tolerogenic) (158). Αν και στη περίπτωση αυτή τα T κύτταρα ενεργοποιούνται και οδηγούνται σε πολλαπλασιασμό, η συνάντησή τους με το αντιγόνο οδηγεί σε ανοχή και όχι σε αυτοανοσία (159, 160).

Στην περίπτωση των F5/NP T κυττάρων δεν είναι ξεκαθαρισμένο αν το αντιγόνο παρουσιάζεται από APCs, άλλα κύτταρα ή και από τα δύο. Φαίνεται όμως η παρουσίαση από APCs να παίζει κάποιο ρόλο. Αυτό γιατί τα F5/NP CD8⁺ T κύτταρα εκφράζουν το μάρτυρα ενεργοποίησης CD44, και αρκετά από αυτά τον μάρτυρα ενεργοποίησης CD69

(Εικόνα 2 Β). Επίσης είδαμε ότι αν μεταφερθούν παρθένα F5 T κύτταρα σε NP-αποδέκτες αυτά διαιρούνται έντονα και ο αριθμός τους αυξάνει δραματικά κάτι που συνηγορεί υπέρ μιας αντιγονοπαρουσίασης από APCs (Εικόνες 24Α και 25Α). Επιπλέον σε αυτά τα πειράματα μεταφοράς ο μάρτυρας ενεργοποίησης CD44 εκφράζεται σε υψηλό βαθμό από τα περισσότερα κύτταρα ενώ ο CD69 ανεβαίνει παροδικά και την 3^η ημέρα από την μεταφορά έχει επανέλθει στα αρχικά του επίπεδα (δεν δείχνεται). Τα παραπάνω συνηγορούν υπέρ του ότι η επαγωγή ανοχής στα F5/NP T κύτταρα μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, από την παρουσίαση του NP αντιγόνου από APCs.

Στο θύμο των F5/NP ζώων εκφράζεται η πρωτεΐνη NP. Όμως δεν είναι εμφανής η αρνητική επιλογή πιθανώς λόγω της μικρής του έκφρασης (ανιχνεύεται μόνο με RT-PCR) (Steve Pascolo, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Παρόλα αυτά υπάρχει ένα μικρό ποσοστό F5/NP CD8 SP θυμοκυττάρων που εκφράζουν τον μάρτυρα ενεργοποίησης CD44, ο οποίος δεν εκφράζεται στα F5 CD8 SP. Παρόμοια, το ποσοστό των CD69⁺ CD8 SP θυμοκυττάρων είναι σημαντικά μεγαλύτερο στα F5/NP ποντίκια σε σχέση με τα F5. Αυτά σημαίνουν ότι τουλάχιστο κάποια από τα CD8 SP θυμοκύτταρα που εξέρχονται ως ώριμα στην περιφέρεια των F5/NP ποντικών έχουν ήδη «αποκριθεί» στο αντιγόνο στο θύμο κάτι που όμως δεν φαίνεται να τα εμποδίζει να πολλαπλασιαστούν όταν ξανασυναντήσουν το αντιγόνο in vitro (Εικόνα 4).

Τα F5 κύτταρα που δεν απαλείφονται και ανακτώνται από την περιφέρεια των F5/NP ζώων δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε δευτερογενή διέγερσή τους από το αντιγόνο in vitro. Αυτό δηλώνει ότι τα κύτταρα έχουν περιέλθει σε άνεργη κατάσταση. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις άνεργων T κυττάρων η προσθήκη IL-2 αναστρέφει την υποδραστικότητά τους (60, 61), στην περίπτωση των F5/NP αυτό συμβαίνει μόνο σε πολύ μικρό βαθμό. Χαρακτηριστικό των άνεργων F5/NP T κυττάρων είναι η ανικανότητά τους, μετά την συνάντησή τους με αντιγόνο, να αυξήσουν τα επίπεδα της IL-2Ra αλυσίδας (Εικόνα 3) που είναι καθοριστική για το σχηματισμό του υποδοχέα υψηλής συγγένειας για IL-2. Τούτα συνηγορούν στο ότι τα F5/NP T κύτταρα έχουν υποστεί τέτοιες τροποποιήσεις ώστε να μην μπορούν να χρησιμοποιήσουν επαρκώς την IL-2 και σε αυτό μερικώς να οφείλεται ο άνεργος φαινότυπός τους (73, 74).

Αν στα παραπάνω προσθέσουμε ότι σε πειράματα μεταφοράς F5/NP θυμοκυττάρων κυττάρων σε NP-αποδέκτες αυτά διαιρούνται σε μεγάλο βαθμό (Σ. Αλεξάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα) τότε η εικόνα που αναδύεται για τον τρόπο επαγωγής της ανέργειας των T κυττάρων στο F5/NP μοντέλο είναι η παρακάτω: Από το θύμο εξέρχονται ώριμα F5/NP T κύτταρα ικανά για απάντηση στο NP68, αυτό τους παρουσιάζεται στα περιφερικά λεμφικά

όργανα από APCs, και εξαιτίας αυτού τα T κύτταρα πολλαπλασιάζονται και απαλείφονται. Τα εναπομείναντα F5/NP CD8⁺ T κύτταρα είναι άνεργα γιατί η προηγούμενη «επαφή» τους με το αντιγόνο αύξησε την ουδό επανεργοποίησής τους προκαλώντας τους ένα είδος απευαισθητοποίησης. Δεν γνωρίζουμε ποια μονοπάτια ενεργοποίησης των F5/NP T κυττάρων έχουν τροποποιηθεί αλλά υποψήφιο είναι το μονοπάτι που οδηγεί στην έκφραση της IL2-Ra αλυσίδας, και που πιθανά εμπλέκει την ενεργοποίηση του NF-ATp (161).

Θελήσαμε να ταυτοποιήσουμε γονίδια που να εκφράζονται διαφορεικά μεταξύ παρθένων και άνεργων T κυττάρων με σκοπό να μελετήσουμε το ρόλο τους στην επαγωγή ή/και διατήρηση του άνεργου φαινοτύπου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε μια βελτιωμένη εκδοχή της τεχνολογίας του mRNA Differential Display που είχε αποδειχτεί γρήγορη, φτηνή και αξιόπιστη (146). Χρησιμοποιήθηκαν 60 διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών που για τον καθένα λαμβάνονται 20-30 διακριτές ζώνες, ώστε συνολικά να πολλαπλασιάστηκαν, κατ' εκτίμηση, 1000-1600 διαφορετικά cDNAs (δεν μπορούμε να υπολογίσουμε τον ακριβή βαθμό αλληλεπικάλυψης των προϊόντων μεταξύ διαφορετικών ζευγών εκκινητών). Από τα προϊόντα αποκόπηκαν και αναλύθηκαν 20 περίπου ζώνες, που όμως για τις οποίες οι διαφορές μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων δεν ήταν του τύπου «όλα-ή-τίποτα». Όλες, πλην μιας, αποδείχθηκαν ψευδώς θετικές. Τα αίτια της μερικής αυτής αποτυχίας είναι τα εξής: 1) Συγκρίνονται δύο πολύ παρόμοιοι πληθυσμοί κυττάρων, είναι δηλαδή και οι δύο ποντικίσια CD8⁺ T κύτταρα. Ο άνεργος φαινότυπος μπορεί κάλλιστα να διαφοροποιείται από τον παρθένο λόγω της διαφορετικής έκφρασης μόλις 5-10 γονιδίων και χωρίς κατά ανάγκη οι διαφορές στην έκφρασή τους να είναι πολύ μεγάλες. Επιβεβαιωτικό αυτής της υπόθεσης είναι τα αποτελέσματα από πειράματα με μικροσυστοιχίες με cDNAs από παρθένα CD4⁺ TCR-HA T κύτταρα και άνεργα T κύτταρα από TCR-HA/IgHA διπλά διαγονιδιακά ποντίκια, ένα μοντέλο παρόμοιο με το F5/NP. Συγκρίθηκε η έκφραση 1157 γονιδίων και μόνο σε 8 βρέθηκαν να υπάρχουν διαφορές στην έκφραση πάνω από 5 φορές. Μάλιστα και τα 8 υπερεκφράζονταν στα άνεργα TCR-HA/IgHA κύτταρα. Ανάμεσα σε αυτά τα γονίδια ήταν τα PD-1 και CTLA-4 που έχουν ανοσοκατασταλτικό ρόλο και επάγονται μετά από ενεργοποίηση, όπως περιγράφηκε στην Εισαγωγή. Επίσης σε αυτά συγκαταλέγονται το SOCS-1 (Silencer Of Cytokine Signaling-1) και η IL-10 που και αυτά μετέχουν στην αρνητική ανάδραση της ανοσοαπάντησης (162).

2) Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται έπρεπε να καθαρίζονται από τα άλλα σπληνοκύτταρα. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούσαμε ήταν καθαρότητας 80%-98% σε CD8⁺, με τα F5/NP να είναι λιγότερο καθαρά διότι το αρχικό ποσοστό τους στη σπλήνα είναι περίπου 5 φορές μικρότερο από αυτό των F5. Έτσι, αν μετά

τον καθαρισμό έχουμε F5 κύτταρα καθαρότητας π. χ. 97% και F5/NP κύτταρα καθαρότητας 85%, ένα γονίδιο που δεν εκφράζεται καθόλου σε T κύτταρα αλλά εκφράζεται σε άλλα σπληνοκύτταρα θα εμφανίζει ψευδώς 5 φορές ισχυρότερη ζώνωση στο F5/NP cDNA σε σχέση με το F5. Παρόμοιοι συλλογισμοί μπορούν να οδηγήσουν στο ότι κάποια αληθώς διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια δεν ανιχνεύθηκαν για τον ίδιο λόγο.

Μια ζώνη που προέκυψε από τον συνδυασμό εκκινητών BS52, BS76 αποδείχθηκε να είναι υπερεκφραζόμενη στα F5/NP CD8⁺ T κύτταρα και αντιστοιχούσε στο γονίδιο SLP-65. Το αξιοπερίεργο είναι ότι με τη μέθοδο του Differential Display ανιχνεύθηκε τμήμα του RNA που περιέχεται εξ' ολοκλήρου σε ιντρόνιο του SLP-65 κάτι που εξηγεί τη δυσκολία που αντιμετωπίσαμε στην διερεύνηση των προτύπων έκφρασής του, πριν κλωνοποιήσουμε το cDNA. Αν και δεν είναι σύνηθες να ανιχνεύονται hnRNA εν τούτοις αν χρησιμοποιηθούν αρκετά ευαίσθητες μέθοδοι ή/και μεγάλες ποσότητες RNA τούτο δεν είναι απίθανο. Στην περίπτωση του T4 μετάγραφου αυτό ανιχνεύθηκε με ραδιενεργή RT-PCR, με 20 μg poly(A⁺)RNA και 150 μg RNA στη δοκιμασία προστασίας από Rnάση.

Η πρωτεΐνη SLP-65 χαρακτηρίστηκε πρόσφατα σαν πρωτεΐνη-προσαρμοστής του σύμπλοκου σηματοδότησης των B κυττάρων που εκπορεύεται από τον BCR (B Cell Receptor) και μάλιστα γίνεται ενεργή μόνο σε κύτταρα που εκφράζουν BCR (148). Η SLP-65 παρουσιάζει δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με την SLP-76 πρωτεΐνη (148, 163) που είναι μέρος του αντίστοιχου σηματοδοτικού συμπλόκου στα T κύτταρα και μάλιστα αλληλεπιδρούν με τις ίδιες πρωτεΐνες όπως PLCγ, Btk, Vav και Nck (95). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται κύρια στα B και όχι σε T κύτταρα, εκφράζεται όμως λίγο στο θύμο (148). Πώς θα μπορούσε άραγε η αύξηση της SLP-65 να συνεισφέρει στην εγκαθίδρυση του άνεργου φαινότυπου; Ένα πιθανό σενάριο είναι ότι η αυξημένη ποσότητα SLP-65 συναγωνίζεται και εκτοπίζει την SLP-76 από το προαναφερόμενο σύμπλοκο στα άνεργα T κύτταρα καθιστώντας το ανίκανο για σηματοδότηση, και κατ' επέκταση ανίκανα τα T κύτταρα για πολλαπλασιασμό μετά από διέγερση του TCR. Πιθανώς η έκτοπη υπερέκφραση του SLP-65 στα T κύτταρα F5 ποντικών και η επακόλουθη διέγερσή τους θα αποσαφήνιζε το λειτουργικό του ρόλο στον άνεργο φαινότυπο.

Χρησιμοποιώντας τα διαγονιδιακά για TCR, F5 ποντίκια σε συνδυασμό με τα TNF^{-/-} ποντίκια δείξαμε ότι ο ενδογενής TNF ρυθμίζει την ουδό αποκρίσεων των T κυττάρων σε συνδέτες (ligands) είτε είναι πλήρως αγωνιστές είτε όχι. Ειδικότερα παρατέθηκαν στοιχεία για ένα καινοφανή ρόλο του TNF στη περιφερική ομοιοστάση των παρθένων

κυτταροτοξικών T κυττάρων, στις αντιγονικές τους αποκρίσεις, αλλά και στην επαγωγή περιφερικής ανοχής σε αυτά.

Δείχθηκε ότι η TNF μεταλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένους αριθμούς περιφερικών F5 T κυττάρων. Η επιβίωση των παρθένων T κυττάρων εξαρτάται σημαντικά από την σηματοδότηση μέσω TCR μετά από αλληλεπίδρασή του με MHC μόρια που φέρουν πεπτίδια μερικώς-αγωνιστές ή ανταγωνιστές (12). Η εξάρτηση της επιβίωσης των T κυττάρων από TCR-σηματοδότηση είναι πιο έντονη για τα CD8⁺ T κύτταρα όπως έδειξαν πειράματα επαγόμενης κατάργησης του TCR (164). Έτσι είναι λογικό ότι αλλαγμένη ή «μειωμένη» σηματοδότηση που εκπορεύεται από τον TCR θα οδηγήσει σε μειωμένο χρόνο ζωής παρθένων CD8⁺ T κυττάρων, και, αντίστροφα, μειωμένη ικανότητα επιβίωσης CD8⁺ T κυττάρων είναι πολύ πιθανό να έχει τα αίτιά της σε ανεπαρκή TCR σηματοδότηση. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα TNF^{-/-} ποντίκια που δεν είναι διαγονιδιακά για F5 δεν παρατηρούνται μειωμένοι αριθμοί περιφερικών CD8 T κυττάρων (δικές μας παρατηρήσεις και (165)). Έτσι, η επιβίωση των παρθένων F5 T κυττάρων μπορεί να εξαρτάται από την παρουσία του TNF στην περιφέρεια ή/και κατά την ανάπτυξη τους, ενώ η επιβίωση άλλων κλώνων όχι. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με την παραδοχή ότι κάποιοι κλώνοι δεσμεύονται με μεγαλύτερη συγγένεια μέσω του TCR με συνδέτες-εαυτού (self-ligands) από ότι άλλοι (34) και έτσι είναι λιγότερο ευάλωτοι σε σηματοδοτικές δυσλειτουργίες που μπορεί να επιφέρει η έλλειψη ενός παράγοντα όπως ο TNF. Συνέπεια αυτού είναι ότι το ρεπερτόριο των παρθένων περιφερικών T κυττάρων θα είναι διαφορετικό μεταξύ των TNF^{-/-} και TNF^{+/+} ποντικών λόγω διαφορετικής περιφερικής επιλογής (peripheral selection). Η υπόθεση αυτή μπορεί να ελεγχθεί πειραματικά με ανάλυση των ανασυνδυασμένων γονιδίων της α και β αλυσίδας του TCR και σύγκριση των συχνοτήτων κάθε α και κάθε β αλυσίδας των TCRs των T κύτταρων μεταξύ TNF^{-/-} και TNF^{+/+} ποντικών.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ώριμα παρθένα T κύτταρα διαιρούνται και συσσωρεύονται μετά την μεταφορά τους σε αποδέκτες που δεν έχουν T κύτταρα («ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός») αναδεικνύοντας έτσι έναν ομοιοστατικό μηχανισμό για τη διατήρηση του αριθμού των περιφερικών παρθένων T κυττάρων. Ο ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός επίσης απαιτεί σηματοδότηση μέσω TCR που επάγεται από δέσμευση σε αυτόν MHC μορίων με συνδέτες-εαυτού (6, 10, 166, 167). Δείξαμε ότι η μέγιστη συσσώρευση F5 T κυττάρων σε λεμφοπενικούς αποδέκτες απαιτεί ενδογενή TNF και επιπλέον η παρουσία TNF στους αποδέκτες δεν είναι επαρκής για την μέγιστη ανάκτηση F5/Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} T κυττάρων (Εικόνα 14A). Όμως δεν είναι ξεκάθαρο αν στα παραπάνω εμπλέκεται η διαλυτή, η μεμβρανική ή και οι δύο μορφές του TNF. Επιπλέον, δείχθηκε ότι

η μειωμένη συσσώρευση των F5/TNF^{-/-} T κυττάρων οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, σε μειωμένους ρυθμούς διαίρεσης όπως φάνηκε από πειράματα με κύτταρα σημασμένα με CFSE (Εικόνα 14 B).

Αν και τα μοριακά μονοπάτια που διέπουν τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των περιφερικών T κυττάρων διαφοροποιούνται ήδη από πρώιμα σηματοδοτικά στάδια (21) τα παραπάνω ευρήματά μας σε συνδυασμό με τη μειωμένη συχνότητα και τους απόλυτους αριθμούς των F5 T κυττάρων που απαντώνται στην περιφέρεια των F5/TNF^{-/-} ζώων δείχνουν ότι ο ενδογενής TNF εμπλέκεται και στους δύο αυτούς διακριτούς μηχανισμούς που συντηρούν το περιφερικό ρεπερτόριο των παρθένων T κυττάρων.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα F5 T κύτταρα από TNF^{-/-} ποντίκια έχουν ελαττωματική απόκριση στο αντιγόνο (πεπτιδίο-αγωνιστής). Έτσι, απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιγόνου για να έχουν παρόμοια απόκριση με τα αγρίου τύπου F5 T κύτταρα, δηλαδή η απώλεια του ενδογενούς TNF ανεβάζει την ουδό απόκρισης των F5 T κυττάρων σε αντιγόνο. Στις *in vitro* μελέτες μας χρησιμοποιήθηκαν TNF^{+/+} (C57bl/10) αντιγονοπαρουσιαστές, κάτι που συνηγορεί για έναν σημαντικό ρόλο της έλειψης του TNF κυρίως από τα T κύτταρα για τη ελαττωματική αντιγονική τους διέγερση. Έτσι το φαινόμενο που παρατηρούμε δεν οφείλεται αποκλειστικά στην γνωστή επίδραση του TNF στα τάξης I MHC μόρια ή σε άλλα μόρια των APCs (168, 169) αν και αυτή σίγουρα συνεισφέρει καθώς η αντιγονοπαρουσίαση από TNF^{-/-}/Rag1^{-/-} σπληνοκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα μικρότερου βαθμού πολλαπλασιασμό F5 κυττάρων *in vivo* (δε δείχνεται) αλλά και *in vitro* (Σ. Αλεξάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα), αν και δεν γνωρίζουμε αν αυτό οφείλεται σε ελαττωματική αντιγονοπαρουσίαση *per se* ή σε διαφορετικές συχνότητες κυτταρικών τύπων στις Rag1^{-/-} και Rag1^{-/-}/TNF^{-/-} σπλήνες. Παρόλα αυτά η ανυπαρξία λειτουργικού TNF στα T κύτταρα είναι κρίσιμη καθώς όταν τα TNF^{-/-} T κύτταρα όταν διεγερθούν από αντι-CD3 αντίσωμα (δηλαδή απουσία αντιγονοπαρουσιαστών κυττάρων) πολλαπλασιάζονται σε μικρότερο βαθμό από τα αντίστοιχα TNF^{+/+} (Εικόνα 16A). Δείχθηκε επίσης ότι η μειωμένη ενεργοποίηση των TNF^{-/-} T κυττάρων συνοδεύεται από μειωμένο αποπτωτικό θάνατο που επάγεται από την ενεργοποίησή τους (AICD). Αυτό ισχύει όχι μόνο για τα F5/TNF^{-/-} T κύτταρα όταν διεγείρονται με NP68 αλλά και για τα CD8⁺ TNF^{-/-} T κύτταρα σαν σύνολο όταν διεγερθούν με διάφορες συγκεντρώσεις αντι-CD3. Ο μικρότερου βαθμού AICD των TNF^{-/-} T κυττάρων μπορεί να είναι παρεπόμενο της μικρότερης ικανότητας ενεργοποίησης τους καθώς απαιτείται η υπέρβαση μιας ουδού ενεργοποίησης για να εκδηλωθεί ο AICD.

Περιγράψαμε ότι ο ενδογενής TNF είναι αναγκαίος για την μέγιστη NF-κB ενεργότητα στα F5 CD8 T κύτταρα όταν αυτά διεγερθούν μέσω του TCR τους. Ο φαινότυπος των F5/TNF^{-/-} ποντικών είναι παρόμοιος με φαινότυπο ποντικών που έχει ανασταλεί μερικώς η ενεργότητα του NF-κB, έχουν δηλαδή φυσιολογική ανάπτυξη στο θύμο αλλά μειωμένη CD8/CD4 αναλογία στην περιφέρεια αυξημένη αυθόρμητη απόπτωση σε καλλιέργεια και μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των T κυττάρων μετά από αντιγονική διέγερση. Όμως στα ποντίκια αυτά βρέθηκαν φυσιολογικά επίπεδα IL-R2α, και αυξημένος AICD (151) σε αντίθεση με τα ευρήματά μας στα F5/TNF^{-/-} CD8⁺ T κύτταρα. Μια πιθανή εξήγηση για αυτές τις διαφορές είναι ότι ενώ ο ενεργός NF-κB είναι σημαντικός για την επιβίωση, τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των CD8⁺ T κυττάρων ο ρόλος του στον AICD καθίσταται ασαφής όταν απουσιάζει ένας συνδέτης που επάγει θάνατο, όπως ο TNF.

Η σύνδεση μεταξύ της ενεργοποίησης των T κυττάρων και της απόπτωσής τους έχει συσχετιστεί με διάφορα μόρια και μονοπάτια. Η υπερέκφραση ενός τέτοιου μορίου, του CD44, είναι μειωμένη στα ενεργοποιημένα F5/TNF^{-/-} T κύτταρα. Το CD44, που περιγράφηκε στα Αποτελέσματα σαν μάρτυρας ενεργοποίησης, συνεισφέρει το ίδιο στην ενεργοποίηση των T κυττάρων (170). Έτσι, συνδέεται συστατικά με τα μόρια Ick και fyn και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό όπως και την απόπτωση των ενεργοποιημένων T κυττάρων κυρίως με το να ενισχύει την μεταγωγή σήματος μέσω του TCR (171).

Ένας άλλος κοινός κρίκος μεταξύ της ενεργοποίησης των T κυττάρων και του αποπτωτικού τους θανάτου είναι το καλά χαρακτηρισμένο μονοπάτι σηματοδότησης IL-2/IL-2R. Τόσο η IL-2 όσο και η IL-2Rα επάγονται στα T κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους. Η σηματοδότηση μέσω IL-2/IL-2Rα μπορεί να διευκολύνει την κλωνική επέκταση των T κυττάρων που επάγεται από αντιγόνο, αλλά επίσης παίζει σπουδαίο ρόλο στον τερματισμό αυτής της απάντησης με κλωνική απαλοιφή με ένα μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης (155). Σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα (114), δείξαμε ότι ο ενδογενής TNF ρυθμίζει την επιφανειακή έκφραση του υψηλής συγγένειας υποδοχέα IL-2R στα ενεργοποιημένα T κύτταρα ποντικών, κάτι που μπορεί να αιτιολογήσει τουλάχιστον μερικώς τον δυαδικό ρόλο του TNF στην ενεργοποίηση και στον θάνατο των F5 T κυττάρων (155). Η έλλειψη του ενδογενούς TNF επηρεάζει την ενεργοποίηση του NF-ATp μετά την αντιγονική διέγερση θυμοκυττάρων. Είναι καλά χαρακτηρισμένο ότι ο NF-ATp ρυθμίζει με θετικό τρόπο την έκφραση της IL-2Rα αλυσίδας (161), κάτι που μπορεί να εξηγήσει τη μειωμένη της έκφραση στα F5/TNF^{-/-} CD8⁺ T κύτταρα. Έτσι λοιπόν ο TNF μπορεί να «συνομιλεί» με μονοπάτια

διαφορετικά από εκείνα που έχουν περιγραφεί για τη σηματοδότηση μέσω TNFRs. Χρειάζονται και άλλες μελέτες για να καθορισθεί η ιεραρχία των γεγονότων που μεσολαβούν τη δράση του TNF στις αποκρίσεις των CD8⁺ T κυττάρων, καθώς και τα μόρια ή μονοπάτια που αποτελούν συνδετικούς κρίκους μεταξύ της σηματοδότησης από TNFRs και από TCR.

Τα παρατιθέμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι η έλλειψη του TNF στα F5/NP ποντίκια οδηγεί σε ελαττωματική περιφερική ανοχή των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Έτσι, τα αποτελέσματα μας έδειξαν μια μείωση της κλωνικής απαλοιφής των εν δυνάμει αυτοδραστικών F5/NP T κυττάρων της τάξης του 65% στο TNF^{-/-} γενετικό υπόβαθρο. Επιπλέον, τα F5/NP/TNF^{-/-} περιφερικά CD8 T κύτταρα αποκρίνονται σε επαναδιέγερσή τους με το αντιγόνο in vitro κάτι που δεν συμβαίνει καθόλου με τα F5/NP/TNF^{+/+} T κύτταρα, αν και τα πρώτα παραμένουν λιγότερο δραστικά από τα παρθένα F5/TNF^{-/-} που δεν έχουν συναντήσει προηγουμένως το αντιγόνο στους ιστούς του ζώου. Συνεπώς δύο βασικά «συστατικά» της περιφερικής ανοχής των T κυττάρων είναι αλλοιωμένα απουσία του ενδογενούς TNF: Η περιφερική κλωνική απαλοιφή και η ανέργεια. Αν σε αυτά συνυπολογίσουμε και τον μειωμένο AICD in vitro και in vivo (Εικόνες 18-19Γ και 25 αντίστοιχα) γίνεται αντιληπτό ότι ο ενδογενής TNF έχει έναν σφαιρικό ρόλο στην περιφερική ανοχή των CD8 T λεμφοκυττάρων. Στη βιβλιογραφία έχει περιγραφεί ότι η περιφερική απαλοιφή CD8 T κυττάρων μετά από ενέσεις του πεπτιδίου-αγωνιστή ήταν μειωμένη σε διαγονιδιακά για TCR TNFR1^{-/-} ποντίκια (121). Όμως σε πρόσφατες μελέτες, με μεγαλύτερες δόσεις του ίδιου πεπτιδίου ή με ιική διαμόλυνση ή με μεταφορά κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο δεν βρέθηκε να εμπλέκεται ο TNF στην περιφερική απαλοιφή των CD8⁺ T κυττάρων (124, 125). Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν προηγούμενες αναφορές για τον φυσιολογικό ρόλο των TNF/TNFRs σε κυτταροτοξικά κύτταρα που έχουν αναπτύξει ανοχή σε ενδογενώς εκφραζόμενο αντιγόνο. Έτσι για πρώτη φορά προτείνεται ότι ο ενδογενής TNF μπορεί να ρυθμίσει την ενεργότητα εν δυνάμει αυτοδραστικών T κυττάρων. Επιπλέον δείχθηκε σε πειράματα μεταφοράς ότι η φυσιολογική απαλοιφή των F5 T κυττάρων εξαρτάται μόνο από τον γονότυπο των T κυττάρων (TNF^{+/+} ή TNF^{-/-}) και όχι από των αποδεκτών (Εικόνα 22). Με τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορεί να προσδιορισθεί αν τούτο το φαινόμενο συνδέεται άμεσα με την ανικανότητα των T κυττάρων να εκφράζουν TNF ή αν η απουσία του TNF κατά την ανάπτυξη των T κυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα τους για απόκριση σε αντιγόνα.

Περιγράφηκε ότι τα F5/TNF^{-/-} T κύτταρα είναι ελαττωματικά όσο αφορά την αρχική κλωνική τους επέκταση και τον επακόλουθο AICD μετά από τη συνάντησή τους με το

ενδογενές αντιγόνο σε πειράματα μεταφοράς (Εικόνα 25A). Όμως η απουσία του TNF οδηγεί τα εναπομείναντα F5 T κύτταρα σε σημαντικά μεγαλύτερη δραστικότητα απέναντι στο αντιγόνο σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Εικόνα 25B). Είναι λοιπόν αξιοσημείωτο ότι ο TNF έχει έναν θετικό ρόλο στις αρχικές αποκρίσεις των CD8⁺ T κυττάρων απέναντι στο ενδογενές αντιγόνο ενώ σε μεταγενέστερα στάδια, μετά από παρατεταμένη έκθεση στο αντιγόνο, αποκτά έναν ανοσοκατασταλτικό ρόλο που εκδηλώνεται στα TNF^{-/-} F5 T κύτταρα τόσο με υπερδραστικότητα όσο και με μειωμένη κλωνική απαλοιφή. Παρόμοιοι διακριτοί ρόλοι του TNF έχουν περιγραφεί κατά την εξέλιξη αυτοανοσίας σε ένα TNF^{-/-} EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα) μοντέλο όπου ο ενδογενής TNF εμφανίζεται να συνεισφέρει στην καταστροφή της μυελίνης στην οξεία φάση της ασθένειας με το να ενισχύει τις αποκρίσεις των T κυττάρων ενάντια στην MBP (Myelin Basic Protein: Βασική Πρωτεΐνη της Μυελίνης), και επίσης ο TNF απαιτείται για την υποχώρηση αυτής της δραστικότητας και την ελάττωση των αποκρίσεων των T κυττάρων ενάντια στην MBP στα όψιμα στάδια της ασθένειας (137).

Συνολικά μπορούμε να πούμε ότι ο ενδογενής TNF μπορεί να ρυθμίσει ένα εύρος αποκρίσεων των CD8 T κυττάρων κυρίως με το να ενισχύει την ένταση του σήματος που εκπορεύεται από τον TCR. Ο συνδέτης σε όλες τις περιπτώσεις είναι MHC I μόριο που φέρει κάποιο πεπτίδιο το οποίο μπορεί να είναι αγωνιστής, ανταγωνιστής ή μερικώς αγωνιστής. Αναφέρθηκε ότι τόσο η επιβίωση όσο και η ενεργοποίηση των CD8 T κυττάρων εξαρτάται από την ένταση της σηματοδότησης που προέρχεται από το σύμπλοκο TCR-συνδέτη. Επιπλέον, η ένταση αυτή καθορίζει και το βαθμό στον οποίο τα ενεργοποιημένα CD8 T κύτταρα θα πεθάνουν ή θα καταστούν άνεργα.

Στην Εικόνα 29 βλέπουμε ένα μοντέλο που συσχετίζει την συνολική ένταση σηματοδότησης με την συνάφεια του συνδέτη. Σαν συνάφεια συνδέτη (avidity) ονομάζουμε τη «συνολική σύνδεση» TCR-συνδέτη που είναι ανάλογη της συγγένειας σύνδεσης TCR-συνδέτη, της συγκέντρωσης του συνδέτη και του αριθμού των TCRs ανά κύτταρο. Επίσης στο συγκεκριμένο μοντέλο αντιστοιχίζεται άμεσα η συνολική ένταση σηματοδότησης με την βιολογική της έκβαση στα CD8 T κύτταρα. Έτσι, για μια συγκεκριμένη συνάφεια συνδέτη (σχετικά χαμηλή), τα παρθένα TNF^{+/+} CD8⁺ T κύτταρα σηματοδοτούν με μια συγκεκριμένη ένταση που έχει σαν αποτέλεσμα την φυσιολογική επιβίωσή τους (επίπεδο Π).

Για την ίδια συνάφεια συνδέτη τα TNF^{-/-} CD8⁺ T κύτταρα σηματοδοτούν με μικρότερη 40ένταση (πιο αχνό χρώμα στην ταινία «συνολική ένταση σηματοδότησης») κάτι που

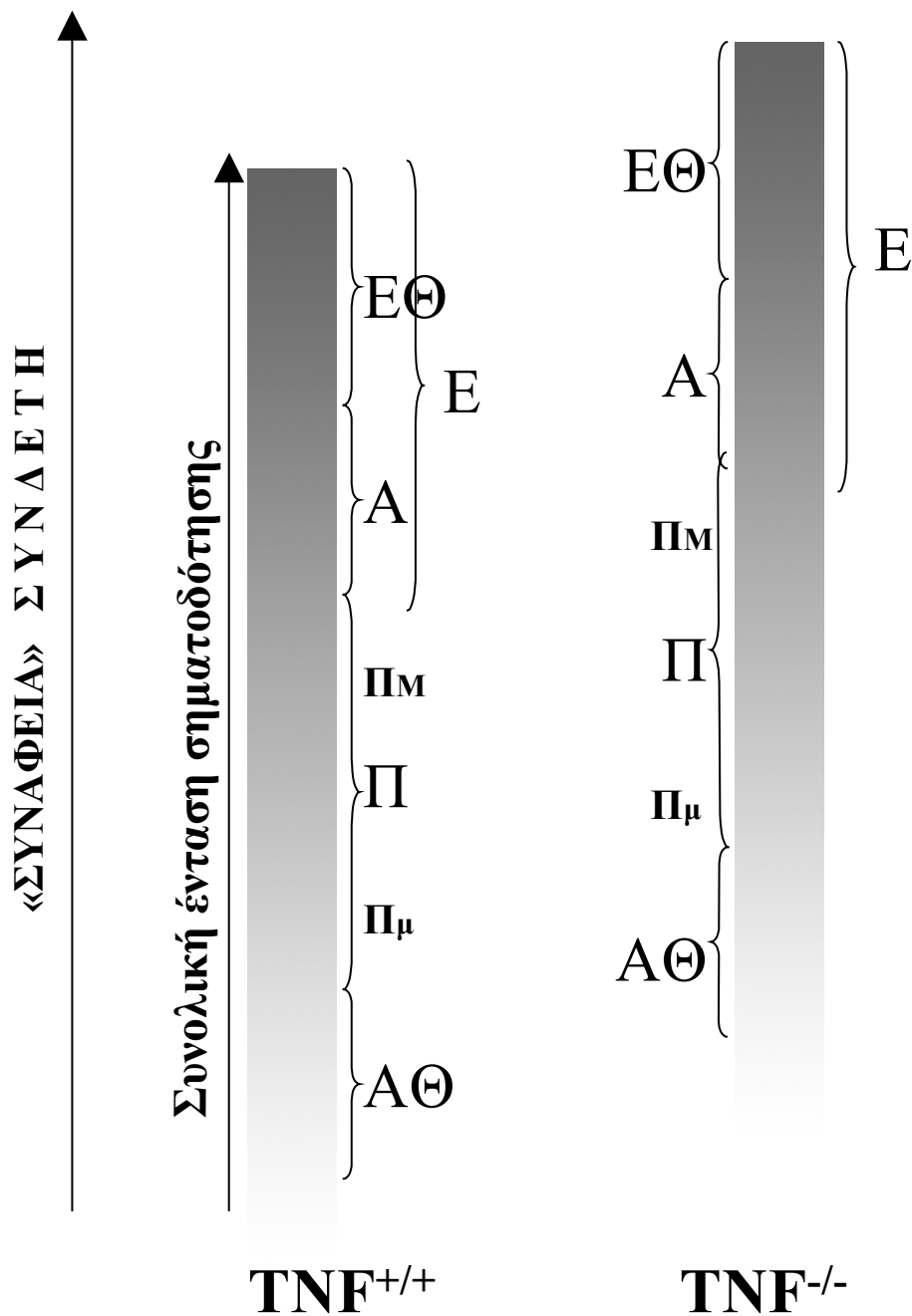
οδηγεί σε μικρή ικανότητα επιβίωσης (επίπεδο Πμ). T κλώνοι που φέρουν TCR με μικρή συνάφεια για συνδέτες-εαυτού οδηγούνται σε θάνατο από αμέλεια (επίπεδο ΑΘ) όταν βρίσκονται στο TNF^{-/-} γενετικό υπόβαθρο.

Με παρόμοια συλλογιστική, ίση συνάφεια συνδέτη θα οδηγήσει σε μικρότερη ενεργοποίηση (δηλ. χαμηλότερα στο επίπεδο E) τα TNF^{-/-} CD8⁺ T κύτταρα σε σχέση με τα TNF^{+/+}, λόγω μικρότερης έντασης σηματοδότησης κάτι που οδηγεί τελικά και σε μικρότερου βαθμού AICD. Για τον ίδιο λόγο έχουμε αυξημένους αριθμούς άνεργων F5 CD8 T κυττάρων απουσία TNF μετά από διέγερσή τους, και επιπλέον αυτά είναι πιο δραστικά από τα αντίστοιχα TNF^{+/+}, γιατί η ένταση σηματοδότησης των πρώτων είναι σχετικά χαμηλά στο επίπεδο A (μικρότερος βαθμός ανέργειας). Πράγματι, αν και θα μπορούσε να υποστηριχτεί ότι η εγκαθίδρυση του άνεργου φαινοτύπου βασίζεται περισσότερο σε ποιοτικές παρά σε ποσοτικές διαφοροποιήσεις εν τούτοις μόρια που ευθύνονται άμεσα για την επαγωγή ανέργειας, όπως η CTLA-4, συσσωρεύονται στα T κύτταρα σε βαθμό ανάλογο της έντασης της TCR-σηματοδότησης (172).

Το μοντέλο τούτο της ποσοτικής αντιστοίχισης σήματος-βιολογικού αποτελέσματος είναι σύμφωνο με όλα τα πειραματικά δεδομένα που παρατέθηκαν και αφορούν τον φαινότυπο των TNF^{-/-} CD8 T κυττάρων και καταδεικνύει (μαζί με τα αποτελέσματα των βιοχημικών πειραμάτων) ότι η συνολική σηματοδότηση των CD8 T κυττάρων, που έχει αφόρμηση την αλληλεπίδραση TCR/MHC, είναι μειωμένη απουσία ενδογενούς TNF, και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεαστεί η επιβίωση, η ικανότητα ενεργοποίησης και η ανοχή των περιφερικών CD8 T λεμφοκυττάρων.

Θελήσαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο η σύγχρονη κατάργηση δύο μονοπατιών που είχαν σχετιστεί με θάνατο T κυττάρων επαγόμενο από ενεργοποίηση (AICD) έχει μεγάλη επίπτωση στην ομοιόσταση των CD8 T κυττάρων μετά από αντιγονική διέγερση.

Οι πρώτες όμως παρατηρήσεις μας αφορούσαν τους αριθμούς των F5 CD8⁺ T κυττάρων



EΘ: Ενεργοποίηση και θάνατος T κυττάρων (AICD)

A: Ενεργοποίηση και ανέργεια T κυττάρων

E: Ενεργοποίηση

ΠΜ: Παρθένα T κύτταρα με μεγάλη ικανότητα επιβίωσης

Π: Παρθένα T κύτταρα

Πμ: Παρθένα T κύτταρα με μικρή ικανότητα επιβίωσης

AΘ: Θάνατος από αμέλεια (neglect)

Εικόνα 29. Μοντέλο απεικόνισης της επίδρασης του ενδογενούς TNF στις αποκρίσεις T κυττάρων μέσω μείωσης της ουδού σηματοδότησης.

που ανακτούσαμε από τις σπλίνες των F5/Ipr/Ipr ζώων. Από τις σπλίνες των νεαρών F5/Ipr/Ipr ποντικίων ανακτούσαμε περίπου 25% λιγότερα F5 CD8⁺ T κύτταρα σε σχέση με F5 που είχαν ακέραιο το γονίδιο *Fas*. Παρόμοια, η *Ipr* μεταλλαγή επιτείνει το φαινότυπο της TNF^{-/-} μεταλλαγής καθώς από τα νεαρά F5/TNF^{-/-}/Ipr/Ipr ποντίκια ανακτώνται 40% λιγότερα F5 CD8⁺ T σπληνοκύτταρα σε σχέση με τα F5/TNF^{-/-} (Εικόνα 26). Έτσι φαίνεται ότι η έλλειψη των πρωτεϊνών Fas και TNF δρα προσθετικά στην μείωση των περιφερικών F5 CD8⁺ T λεμφοκυττάρων (τουλάχιστον στο Rag1^{+/+} γενετικό υπόβαθρο). Αν και στην βιβλιογραφία (και προσωπικές παρατηρήσεις) δεν έχουν περιγραφεί μειωμένοι αριθμοί CD8⁺ T κυττάρων στα B6-Ipr/Ipr ποντίκια είναι όμως πιθανό να επηρεάζεται εκλεκτικά η επιβίωση μερικών κλώνων με χαμηλή συγγένεια για αντιγόνο όταν οι συνθήκες είναι υποβέλτιστες. Εναλλακτικά, δεν μπορεί να αγνοηθεί η πιθανότητα οι μειωμένοι αριθμοί περιφερικών F5/Ipr/Ipr CD8⁺ T κυττάρων να οφείλονται σε ελλείψα θυμικής προέλευσης που έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένους ρυθμούς εκροής F5 T κυττάρων στην περιφέρεια. Σε αυτό συνηγορεί και η εξάλειψη της παρατηρούμενης διαφοράς σε ηλικιωμένα ζώα όταν πλέον ο θύμος υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν συνεισφέρει σημαντικά στη διατήρηση της περιφερικής δεξαμενής των T λεμφοκυττάρων.

Από την επόμενη σειρά πειραμάτων μας φαίνεται ότι στο F5/NP μοντέλο περιφερικής ανοχής, δεν υπάρχει κάποιος εμφανής ρόλος για τον υποδοχέα Fas. Πράγματι, τόσο η κλωνική απαλοιφή των περιφερικών F5/NP/Ipr/Ipr CD8⁺ T κυττάρων όσο και η ικανότητά τους για επαναπόκριση *in vitro* στο αντιγόνο είναι συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες των F5/NP CD8⁺ T κυττάρων (Εικόνα 27). Αξίζει να παρατηρηθεί ότι στα πειράματα αυτά η έλλειψη του Fas σχετιζόταν συστηματικά με μικρότερες αποκρίσεις των παρθένων CD8⁺ T κυττάρων στα αντιγόνα κάτι που συνάδει με τον ρόλο του Fas ως συνδιεγερτικό μόριο (138).

Τέλος δείξαμε ότι η σύγχρονη ανενεργοποίηση δύο μονοπατιών που οδηγούν σε θάνατο ενεργοποιημένα T κύτταρα δεν είναι αρκετή για να μειώσει δραματικά αυτό το φαινόμενο της κλωνικής απαλοιφής. Έτσι, όταν μεταφερθούν σπληνοκύτταρα από F5/TNF^{-/-}/Ipr/Ipr ποντίκια σε NP-αποδέκτες ο θάνατος των CD8⁺Vβ11⁺ κυττάρων τους που έπεται της κλωνικής τους επέκτασης συμβαίνει σε αρκετά παρόμοιο βαθμό με αυτόν των F5 (Εικόνα 28).

Αν και ο Fas είχε συνδεθεί με τον AICD κύρια των CD4 T κυττάρων (119, 120) υπήρχαν αναφορές και για την ύπαρξη ρόλου του στα CD8 T κύτταρα (143). Όμως σχετικά πρόσφατες εργασίες, σύγχρονες με τις παρατηρήσεις μας, έδειξαν την ύπαρξη μόνο ενός δευτερεύοντα ρόλου για τον Fas στον AICD και την περιφερική ανοχή των CD8 T

κυττάρων (124, 125). Όμως, ποια μονοπάτια εκτός αυτών των δύο μονοπατιών «θανάτου» μπορεί να συμμετέχουν στον AICD των T κυττάρων; Σε ένα πειραματικό σύστημα έχειδειχθεί ότι ο AICD των T λεμφοκυττάρων μπορεί να προκληθεί από δραστικά οξυγονούχα μόρια (Reactive Oxygen Species:ROS) όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει κασπάσες και απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων (123). Επίσης, η περφορίνη φαίνεται να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην ομοιοστατική επαναφορά των CD8 T κυττάρων στους αρχικούς αριθμούς μετά από αντιγονική διέγερση με διαφορους τρόπους (173, 174) καθώς και η IFN γ (174). Είναι φανερό ότι δεν υπάρχει μόνο ένα μονοπάτι από το οποίο να εκπορεύεται ο επαγόμενος από ενεργοποίηση αποπτωτικός θάνατος των CD8 T κυττάρων αλλά υπάρχει μεγάλος πλεονασμός (redundancy) μορίων και μονοπατιών. Είναι πολύ πιθανό όλα τα παραπάνω μόρια να έχουν κάποια συνεισφορά στο θάνατο αυτό, και ανάλογα με το πειραματικό σύστημα (in vivo, in vitro, είδος αντιγόνου, τρόπος εισόδου του κλπ) κάποιο (ή κάποια) από τα μονοπάτια να συνεισφέρει περισσότερο από τα άλλα και να γίνεται το κυρίαρχο, άρα και το παρατηρήσιμο.

Υλικά-Μέθοδοι

Παρασκευή RNA

Το RNA παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης από ιστούς ή από κύτταρα που βρίσκονταν σε Solution D (θειοκυανικό γουανίνιο 4M, κιτρικό νάτριο 25 mM pH=7, 0,5% σαρκοσύλιο). Σε αυτό προστίθεται πριν από τη χρήση του 0,72% (v/v) μερκαπτοαιθανόλη 11,1M.

Οι ιστοί ή τα κύτταρα ομογενοποιούνται με σύριγγα και βελόνη, και προστίθενται κατά σειρά 1/10 όγκοι οξικού αμμωνίου 2M, 1 όγκος φαινόλης με pH=4 και 0,2 όγκοι Sevaq (χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1). Ακολουθεί επώαση 15 min σε πάγο και φυγοκέντριση σε 10.000 g για 20 min σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο εκχυλίζεται με ίσο όγκο φαινόλης pH=7,5. Στο νέο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και τοποθετείται στους -20°C για περισσότερη από μία ώρα. Κατόπιν φυγοκεντρείται για ~20 min σε ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο στις 14.000 rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και η πελλέτα εκπλένεται με 700λ αιθανόλης 75%. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η πελλέτα στεγνώνεται από τα ίχνη αλκοόλης και επαναδιαλύεται σε 30-200λ dd H₂O που περιέχει Rnasin (40u/λ, Promega) που είναι αναστολέας της RNάσης A.

Μετά την πλήρη επαναιώρησή του το RNA ποσοτικοποιείται με φωτομέτρηση στα 260 nm και η ποιότητά του ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση 0,5γ-1,0γ σε μη αποδιατακτική πηκτική αγαρόζης 2%.

Κατεργασία με DNάση και ανάστροφη μεταγραφή

2-10γ RNA επωάζονται με 1λ DNάση (10u/λ, απηλλαγμένη από RNάση), 5X ρυθμιστικό DNάσης και 0,5λ Rnasin (40u/λ, Promega) σε τελικό όγκο 130λ, στους 37⁰C για μία ώρα. (όπου 5X ρυθμιστικό DNάσης: 200 mM Tris·Cl, pH=8, 50 mM NaCl, 30 mM MgCl₂)

Μετά την επώαση γίνεται εκχύλιση με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (25/24/1). Στο υπερκείμενο προστίθονται 3,5 όγκοι μίγματος απόλυτης αιθανόλης/οξικού αμμωνίου 7,5 M (6/1), επωάζεται στους -80°C για 20 min και φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο για 20 min στις 14.000 rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η πελλέτα εκπλένεται με 700λ αιθανόλης 75%. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου και το στέγνωμα, η πελλέτα επαναιωρείται σε 20λ ddH₂O που περιέχει Rnasin.

Για την ανάστροφη μεταγραφή χρησιμοποιούνται 2γ RNA κατεργασμένου με DNAση. Σε αυτά προστίθενται 2λ τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (Pd(6), 100pm/λ, Pharmigen), και ddH₂O σε τελικό όγκο 27,5λ και επωάζονται στους 65°C για χρόνο >5 min. Στο μίγμα προστίθενται 8λ ρυθμιστικό διάλυμα 5X MMLV RT (Promega), 2λ MMLV Reverse Transcriptase Rnase H⁻ (200u/λ, Promega), 0,5λ Rnasin και 2 λ μίγματος των τεσσάρων dNTPs συγκέντρωσης 10 mM για το καθένα, και ακολουθεί επώαση στους 37°C για δύο ώρες. Προστίθονται ξανά 2λ MMLV Reverse Transcriptase Rnase H⁻, και ακολουθεί νέα επώαση στους 37°C για δύο ώρες. Κατόπιν προστίθεται 1λ Rnase H και επωάζεται στους 37°C για 30 min.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για Differential Display

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20λ και περιέχει 2λ 10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 1λ MgCl₂ 25 mM, 0,2λ από μίγμα των τεσσάρων dNTPs 200 μM το καθένα (Promega), 0,5λ [α -³⁵S]-dATP, 1λ από κάθε εκκινητή 6,7 pM, 12,3λ ddH₂O και 1λ από το κατάλληλο cDNA (~50 ng). Τα σωληνάκια της αντίδρασης σκεπάζονται με δύο σταγόνες παραφινέλαιο για να μην εξατμίζεται το περιεχόμενο κατά τη διάρκεια των θερμικών κύκλων. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται 1λ από μίγμα *Taq pol* (5u/λ, Amplitaq)/ddH₂O, όταν πλέον η θερμοκρασία στη μηχανή θερμικών κύκλων έχει φτάσει τους 94°C (hot start). Κάθε κύκλος απαρτίζεται από τα εξής τμήματα: 45 sec αποδιάταξη στους 94°C , 2 min υβριδοποίηση στους 40°C , και 45 sec στάδιο αντιγραφής στους 72°C . Ο αριθμός των κύκλων είναι 40.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

| | |
|------------------------|------------------------|
| BS52: 5'-CAAGCGAGGT-3' | BS59: 5'-GAGCTATGGC-3' |
| BS54: 5'-AACGCGCAAC-3' | BS70: 5'-GAGCTATGGC-3' |
| BS55: 5'-GTGGAAGCGT-3' | BS73: 5'-AGCCTGTGTC-3' |
| BS57: 5'-GGAAGCAGCT-3' | BS76: 5'-CTGGTCACAC-3' |
| BS58: 5'-CAGTGAGCGT-3' | BS78: 5'-CACAGTGAGC-3' |

BS80: 5'-CATGCGATGG-3' BS81: 5'-CAAGCGCAAG-3'
BS82: 5'-AGACTGCGTG-3' BS83: 5'-CTCGATTGCC-3'
BS84: 5'-AGCAGCAGTG-3' BS85: 5'-CTACATGCGC-3'

Υπόλοιπες PCRs

SLP65 sens: 5'-ATGGACAAGCTGAATAAGATAACTG-3'
SLP-65 anti: 5'-TTATGAAACCTTCACAGCATATTTTC-3'
TNF α 148S: 5'-AACCAGGCAGGTTCTGTCCC-3'
TNF α 149A: 5'-CTCTTGCTTATCCCCCTCTTCC-3'
FAS12FX: 5'-ACAGCATAGATTCCATTTGCTGCT-3'
FAS12REV: 5'-TGAGTAATGGGCTCAGTGCAGCA-3'
FASZ8XTR: 5'-CAAATTTTATTGTTGCGACACCA-3'

Κλωνοποίηση προϊόντων PCR αντιδράσεων

Όλα τα προϊόντα PCR κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pCR 2.1 (Invitrogen), το οποίο είναι ένα ανοικτό πλασμίδιο 3,9 κιλοβάσεων που έχει δύο εξέχοντα 3'-T άκρα. Τα PCR προϊόντα που έχουν δημιουργηθεί με *Taq* πολυμεράση, φέρουν εκατέρωθεν 3'-A εξέχοντα άκρα και έτσι μπορούν να κλωνοποιηθούν στον παραπάνω φορέα. Η αντίδραση σύνδεσης γίνεται σε όγκο 10 μ l και περιέχει 1 μ l PCR προϊόν, κατευθείαν από την αντίδραση, 2 μ l pCR 2.1 φορέα (25 ng/ μ l), 1 μ l 10X ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (60 mM Tris-HCl, pH=8,3 σε 42 $^{\circ}$ C, 60 mM MgCl $_2$, 50 mM NaCl, 1mg/ml αλβουμίνη βόειου ορού, 70 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM ATP, 20 mM διθειοτριϊτόλη, 10 mM σπερμιδίνη), 1 μ l T4 DNA λιγάση (4u/ μ l) και 5 μ l ddH $_2$ O. Το όλο μίγμα επωάζεται στους 14 $^{\circ}$ C για τουλάχιστον τεσσερις ώρες. Με το μίγμα της αντίδρασης μετασχηματίζονται επιδεκτικά (competent) βακτήρια *E. coli* DH5 με θερμικό σοκ 45 sec στους 42 $^{\circ}$ C, και απλώνονται σε τρυβλία LB με αμικικιλίνη (1/10.000 w/v), στα οποία προστίθεται X-Gal (5,βρωμο-4,χλωρο-3,ινδοϋλο- β -D-γαλακτοζίτης). Τα πιάτα επωάζονται στους 37 $^{\circ}$ C για 18 περίπου ώρες.

Προσδιορισμός αλληλουχίας (sequencing) πλασμιδιακού DNA

5 γ πλασμιδιακού DNA αποδιατάσσονται σε διάλυμα 0,2 M NaOH, με επώαση 5 min στους 85⁰C. Προστίθενται 1/10 όγκοι CH₃COONH₄ 2 M με pH=4, και 2,5 όγκοι απόλυτης αλκοόλης, και ακολουθεί επώαση στους -80⁰C για 15 λεπτά, κατακρήμνιση με φυγοκέντρηση και έκπλυση με 75% αλκοόλη. Στη πελλέτα του DNA προστίθεται εκκινητής σε τελική περιεκτικότητα 1ng/λ και σε διάλυμα 40mM Tris-HCl με pH=7,5, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl (5X Sequenase buffer). Το όλον επωάζεται για 15 λεπτά στους 37⁰C, και για άλλα 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν τω μεταξύ σε πιάτο 96 πηγαδιών μοιράζονται από 2,5λ κάθε μίγματος ddNTP (80 μM σε καθένα από τα dNTPs, και 8 μM από το ddNTP). Στο μίγμα με το DNA προστίθενται σε τελικές συγκεντρώσεις 0,018 M DTT (διθειοτριτόλη), 3 μM dCTP, 3 μM dGTP, 3 μM dTTP, 0,5λ [α³⁵S]-dATT, και 6,5 u Sequenase (τροποποιημένη T7 DNA πολυμεράση, Amersham). Το ¼ του τελευταίου μίγματος προστίθεται σε κάθε πηγάδι με μίγμα ddNTP, και επωάζονται στους 37⁰C για 5-15 λεπτά. Η αντίδραση σταματάει με προσθήκη διαλύματος φορμαμιδίου 95%, 0,05% κυανού της βρωμοθυμόλης, 0,05% κυανόλης του ξυλενίου και 20 mM EDTA. Οι αντιδράσεις ηλεκτροφορούνται, αφού πρώτα αποδιαταχτούν για 5 λεπτά στους 100⁰C, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 55, με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TBE (10X TBE: 1M Tris, 1M βορικό οξύ, 25 mM EDTA). Η πηκτή στεγνώνεται υπό κενό και εκτίθεται με φιλμ αυτοραδιογραφίας KODAK-XOMAT.

Παρασκευή ιχνηθέτη (probe)

Ο ιχνηθέτης παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation). Η αντίδραση γίνεται με 100 ng DNA σε 10 mM Tris-HCl, pH=7,5 σε 42⁰C, 5 mM MgCl₂, 7,5 mM διθειοτριτόλη, 100 μM από dGTP, dTTP, [α³²P]-dATP, [α³²P]-dCTP, 10 u DNA pol I (E.coli), και 1/430.000 από διάλυμα DNάσης 10 mg/ml. Το μίγμα επωάζεται στους 16⁰C για μια ώρα και διηθείται από στήλη Sephadex-G50.

Μεταφορά δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων κατά Southern και υβριδοποίησή τους

Το πλασμιδιακό DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης υπό κλίση τάσης 6V/cm. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή κατεργάζεται υπό ανάδευση, αρχικά με 0,125 N HCl 20 min, για να μπορούν να μεταφερθούν τα μεγάλα μόρια DNA, κατόπιν το DNA αποδιατάσσεται με συνεργασία της πηκτής με διάλυμα 0,5 N NaOH-1,5 M NaCl, και τελικά ουδετεροποιείται σε διάλυμα 0,5 M Tris-Cl pH=7,4, 1,5 M NaCl. Η πηκτή τοποθετείται

πάνω σε γέφυρα χαρτιού 3MM Whatmann που τα άκρα της ακουμπούν σε διάλυμα 20X SSC (3M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο). Πάνω στην πηκτή τοποθετούνται διαδοχικά, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran Nitrocellulose, Schleicher & Schuell) που είχε εμβαπτισθεί σε 2X SSC για τουλάχιστον 20min, 2 χαρτιά 3MM Whatmann, αρκετές χειροπετσέτες και τέλος βάρος 1kg. Το DNA αφήνεται να μεταφερθεί από την πηκτή στη μεμβράνη 12-18 ώρες. Μετά, σημειώνονται οι θέσεις των πηγαδιών πάνω στη μεμβράνη, ξεπλένεται σε διάλυμα 6X SSC και ψήνεται τουλάχιστον δύο ώρες σε φούρνο 80°C, για μονιμοποίηση του DNA.

Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2X SSC και επωάζεται υπό ανακίνηση στους 65°C σε διάλυμα υβριδοποίησης (3X SSC, 0,1% SDS, 0,2% Ficoll, 0,2% πολυβινυλοπυρολλιδόνη, 10% w/vθειϊκή δεξτράνη, 120 μg/ml αποδιαταγμένου DNA σπέρματος σολωμού) για τουλάχιστον δύο ώρες (προϋβριδοποίηση). Μετά προστίθεται ο αποδιαταγμένος ιχνηθέτης και αφήνεται για υβριδοποίηση 12-18 ώρες.

Η μεμβράνη ξεπλένεται στους 65°C διαδοχικά με διαλύματα 3X SSC-0,1% SDS, 0,3X SSC-0,1% SDS, 0,1X SSC-0,1% SDS (για κάθε διάλυμα γίνονται δύο ξεπλύματα από μισή ώρα) και εκτίθεται με φιλμ αυτοραδιογραφίας KODAK-XOMAT.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Από καλλιέργεια 2 ml που αναπτύχθηκε περίπου 18 ώρες σε LB με 100 μg/ml αμπικιλίνη λαμβάνονται 1,2 ml τα οποία φυγοκεντρούνται 2 min σε 14000 rpm. Η πελλέτα επαναιωρείται, σε αυτήν προστίθενται 300 μl STET (Σακχαρόζη 8%, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) 50 mM, Triton-X 0.5%) και 25 μl λυσοζύμη (10 mg/ml), και επωάζεται στον πάγο για 5 min. Κατόπιν βράζεται στους 100 °C για 2 min, αφήνεται για λίγο στον πάγο και φυγοκεντρείται για 30 min στις 14000 rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης/οξικού αμμωνίου 7.5 M (σε αναλογία 6:1), αφήνεται για 20 min στους -80°C σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Η πελλέτα πλύνεται με αιθανόλη 75% και στεγνώνεται υπό κενό και επαναδιαλύεται σε 30-50 μl TE.

Μεταφορά, τύπου Northern, RNA σε μεμβράνη και υβριδοποίηση

10 μg ολικού RNA ηλεκτροφορούνται υπό κλίση δυναμικού 6 V/cm για 3 περίπου ώρες, σε πηκτή αγαρόζης 1.2 % όγκου 150 ml (15 ml 10XMOPS, 22.5 ml HCHO 37%, 112.5 ml

dH₂O). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτική κατεργάζεται διαδοχικά με διαλύματα 50 mM NaOH-0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 7.6, 2X SSC, επί 20 min για το καθένα. Τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρονται (όπως στο Southern) σε μεμβράνη Genescreen (DuPont). Κατόπιν η μεμβράνη ξεπλύνεται σε 2X SSC, και το RNA μονιμοποιείται στη μεμβράνη με έκθεση σε UV 254nm επί 2 λεπτά και ψήσιμο για 2 ώρες στους 80 °C. Ακολουθούν δύο ώρες προϋβριδοποίηση σε διάλυμα 50 % φορμαμίδιο, 5X SSC, 1X Denhards (100X Denhards: 2% Ficoll, 2% βόειος αλβουμίνη ορού, 2% πολυβινυλοπυρολιδόνη), 20 mM από ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6.8, 0.4% SDS, και 10 % (w/v) θειϊκή δεξτράνη και αφού προστεθούν διάλυμα αποδιαταγμένου DNA σπέρματος σολωμού σε τελική συγκέντρωση 120 µg/ml. Κατόπιν προστίθεται ο αποδιαταγμένος ιχνηθέτης και αφήνεται για υβριδοποίηση 14-18 ώρες. Η μεμβράνη ξεπλένεται στους 52°C διαδοχικά με διαλύματα 3X SSC-0.1 % SDS, 0.3X SSC-0.1 % SDS, 0.1X SSC-0.1 % SDS και εκτίθεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Σήμανση με CFSE και κυτταρομετρία ροής.

Για σήμανση με CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester), τα σπληνοκύτταρα επαναιωρούνται σε πυκνότητα 10⁸/ml σε 1xPBS, και αναμιγνύονται με ίσο όγκο 1xPBS που συγκέντρωσης 20 µM σε CFSE (Molecular Probes). Τα κύτταρα επωάζονται για 10 min στους 37°C και η αντίδραση σήμανσης σταματά με προσθήκη 5 όγκων παγωμένου RPMI που περιέχει 10% FCS (Fetal Calf Serum:Εμβρυϊκός Ορός Μοσχαριού) και επώαση για 5 min σε πάγο. Ακολούθως τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε 400 g για 10 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο, και ο παραπάνω κύκλος πλυσίματος επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti-CD8-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD8-APC, anti-CD4-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD44-PE, anti-CD25-PE (BD Pharmingen) και anti-Vβ11-βιοτίνη (Serotec) σε συνδυασμό με streptavidin-Red670 (Gibco BRL). Για την ανάλυση έκφρασης επιφανειακών μορίων, 10⁶ κύτταρα επωάζονται με τα κατάλληλα αντισώματα σε 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσεων (1xPBS, 1% BSA, 0.02% NaN₃) για 30 min, πλένονται μία φορά με 1xPBS, 0.02% NaN₃. Η κυτταρομετρία

ροής έγινε είτε σε Coulter Epics Elite ή σε FACSCalibur και η ανάλυση των δεδομένων με τα πακέτα λογισμικού WinMDI και CellQuest αναλύοντας τουλάχιστον 15000 ζωντανά κύτταρα όπως κρίνονταν από το μέγεθος και το κοκκιώδες τους.

Για την ανάλυση αίματος σε πειράματα μεταφοράς, τουλάχιστο 50 μl αίμα συλλέγονταν από φλέβες της ουράς σε Eppendorfs που περιείχαν 80 μl ηπαρίνης (90u/ml, Leo). Το αίμα εκπλένεται δύο φορές και ακολουθούσε χρώση όπως προηγούμενα. Πριν την κυτταρομετρία, τα ερυθροκύτταρα λύνονται με επώαση 20 min σε 1xFACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson) σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθούμενη από δύο εκπλύσεις με 1xPBS, 0.02% NaN₃.

Η δέσμευση της αννεξίνης V σε συνδυασμό με την χρώση με PI έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Immunotech). Εν συντομία, στα κύτταρα γίνεται αρχικά χρώση για επιφανειακά μόρια και κατόπιν επώαστηκαν με αννεξίνη V-FITC και PI σε 1xΡυθμιστικό-διάλυμα-δέσμευσης για 10 min και αμέσως ακολούθησε κυτταρομετρία ροής.

Διεγερση των F5 κυττάρων και κυτταροκαλλιέργεια.

Οι σπλήνες αφαιρούνται από τα ποντίκια, τοποθετούνται σε 1xHBSS (Gibco BRL), 5% FCS, 10 mM HEPES (Gibco BRL), 2 mM L-γλουταμίνη, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco BRL) και ξαίνονται πάνω σε ηθμούς πόρου 40 μm (Falcon).

Τα σπληνοκύτταρα που προορίζονταν για μεταφορά σε ποντίκια, κατακρημνίζονταν και τα ερυθροκύτταρα λύνονταν με στιγμιαία προσθήκη 900 μl H₂O για κάθε σπλήνα ακολουθούμενη από 100 μl 10xHBSS και περίσσεια 1xHBSS, 5% FCS, 10 mM HEPES. Τα κύτταρα αναλύονταν ως προς ποσοστό CD8⁺ κυττάρων, επαναιωρούνταν σε πυκνότητα 15x10⁶ CD8⁺/ml, και από αυτά ενίονταν 200 μl σε κάθε ποντίκι ενδοφλεβίως από την ουρά.

Για την *in vitro* καλλιέργεια τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονταν με τη βοήθεια διαλύματος διαχωρισμού (Lympholyte-M) με βάση την πυκνότητα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, τα κύτταρα αιωρούνται σε πυκνότητα 1-2x10⁷/ml εμπύρηνα κύτταρα πάνω από ίσο όγκο Lympholyte-M και φυγοκεντρώνονται στα 1000g για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται η μεσόφαση των λεμφοκυττάρων με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε νεό δοχείο όπου εκπλένεται με 1xHBSS, 10 mM HEPES μία φορά στα 800 g και άλλες δύο στα 400 g. Τελικά τα κύτταρα επαναιωρούνται σε RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FCS, 10 mM HEPES, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη και 50 μM 2-ME, σε πυκνότητα 1x10⁶/ml και συγκαλλιεργούνται σε 5% CO₂, στους 37°C με 3x10⁶/ml ακτινοβολημένα (2000 rad) σπληνοκύτταρα από C57bl/10 ποντίκια

που είχαν προεπωαστεί με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις NP68 για τουλάχιστον μία ώρα και εκπλυθεί τρεις φορές.

Δοκιμασία πολλαπλασιασμού

Μετά την αφαίρεση των σπληνών από τα ζώα, παρασκευάζονταν κυτταρικά εναιωρήματα όπως προηγουμένως και αναλύονταν για το ποσοστό CD8⁺ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Οι πυκνότητα των σπληνοκυττάρων προσαρμόζονταν έτσι ώστε να περιέχουν ίσους αριθμούς CD8⁺ κυττάρων (150×10^3). Τα σπληνοκύτταρα συγκαλλιεργούνται στο προαναφερθέν μέσο σε πλάκες 96 οπών με ακτινοβολημένα C57bl/10 σπληνοκύτταρα, που είχαν προεπωαστεί με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις NP68 για τουλάχιστον μία ώρα και εκπλυθεί τρεις φορές, και σε αναλογία C57bl/10:CD8⁺ ~20. Μετά από 40 h καλλιέργειας προστίθεται σε κάθε οπή 1μCi [methyl-³H] θυμιδίνης για 6 h. Κατόπιν τα κύτταρα λύνονται, το περιεχόμενό τους συλλέγεται σε κατάλληλη συσκευή (INSEL CELL HARVESTER MODEL CH3 H/W), και η ενσωματωμένη ραδιενέργεια μετράται σε μετρητή ακτινοβολίας β μέσα σε σπυθιριστικό υγρό (τολουόλιο, 0.5% PPO, 0.005% POPOP).

Καθαρισμός CD8⁺ κυττάρων με μαγνήτη και κολώνες MACS και R&D.

Σπλήνες που περιέχουν περίπου 2×10^8 σπληνοκυτταρα αφαιρούνται από τα ποντίκια, τοποθετούνται σε 1xHBSS (Gibco BRL), 5% FCS, 10 mM HEPES (Gibco BRL), 2 mM L-γλουταμίνη, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco BRL) και ζαίνονται πάνω σε ηθμούς πόρου 40 μm (Falcon). Τα σπληνοκύτταρα φυγοκεντρούνται στα 400g και επαναδιαλύονται σε 1.5 ml διαλύματος 1xPBS, 2 mM EDTA, 0.5% BSA που έχει εξαερωθεί σε θερμοκρασία δωματίου (διάλυμα κολώνας). Ακολουθούν δύο ακόμα πλυσίματα για 2 min σε 2000 rpm σε επιτραπέζια Eppendorf. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 900 μl διάλυμα κολώνας, απομακρύνοντας τυχόν συσσωματώματα κυτταρων και κυτταρικών υπολειμμάτων. Προστίθενται 100 μl anti-CD8 Magnetic MicroBeads (MACS), και ακολουθεί επώαση 10 min υπό ανάδευση στους 4°C. Μετά την επώαση τα κύτταρα αραιώνονται σε τελικό όγκο 6 ml με διάλυμα κολώνας, και διέρχονται μέσα από LS+ κολώνα διαχωρισμού MACS που έχει τοποθετηθεί σε κατάλληλο μαγνήτη (MidiMACS) και έχει πλυθεί με 3 ml διάλυμα κολώνας. Ακολουθεί έκπλυση της κολώνας τρεις φορές με 3 ml διάλυμα κολώνας, η κολώνα απομακρύνεται από το μαγνήτη προστίθενται σε αυτήν 5 ml διάλυμα

κολώνας και τα οποία διέρχονται βίαια από την κολώνα με τη χρήση εμβόλου σύριγγας. Στο έκλουσμα βρίσκονται τα καθαρισμένα CD8⁺ κύτταρα και ο εμπλουτισμός του δείγματος σε σχέση με το αρχικό πιστοποιείται με ανάλυση FACS.

Για τον καθαρισμό CD8⁺ κυττάρων με κολώνες R&D έγινε αιμόλυση σε δείγμα περίπου 2×10^8 σπληνοκυττάρων (με διαδοχική προσθήκη 9 όγκων νερού, 1 όγκου 10xHBSS και συμπλήρωση με 1xHBSS) και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1xδιάλυμα κολώνας (R&D). Προστίθεται 1 ml κοκταίηλ αντισωμάτων (R&D) που περιέχει αντισώματα για B κύτταρα, μονοκύτταρα και CD4 T κύτταρα και ακολουθεί επώαση για 15 min. Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 10 ml 1xδιάλυμα κολώνας με φυγοκέντρηση στα 300 g επί 10min κάθε φορά και τελικά τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 2 ml 1xδιαλύματος κολώνας. Κατόπιν τα κύτταρα αφήνονται να διέλθουν από την κολώνα (R&D) που είχε προηγουμένως πλυθεί με 10 ml 1xδιάλυμα κολώνας. Ο όγκος των κυττάρων εκτοπίζει τον προηγούμενο όγκο της έκπλυσης και έτσι τα κύτταρα επωάζονται μέσα στην κολώνα για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν άλλα 10 ml 1x διαλύματος κολώνας αφήνονται να διέλθουν από αυτήν εκλούοντας έτσι τα CD8⁺ κύτταρα. Και εδώ ο βαθμός καθαρότητας του εκλούσματος προσδιορίζεται με ανάλυση FACS.

Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων και δοκιμασία υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πηκτή (Electrophoretic Mobility Shift Assay:EMSA).

$2-6 \times 10^7$ σπληνοκύτταρα ή θυμοκύτταρα κατακρημνίστηκαν και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων που περιέχει 0.32 M σουκρόζη, 3 mM CaCl₂, 2 mM οξικό μαγνήσιο, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM διθειοτριτόλη, 0.5 mM φθοριούχο φαινυλμεθυλσουλφονύλιο, 10 μg/ml απρωτινίνη 0.5% (v/v) Nonidet P-40, και επώαστηκαν 3 min σε πάγο. Κατόπιν οι πυρήνες φυγοκεντρούνται στα 500 g για 5 min και εκπλένονται μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που δεν περιέχει NP40. Τελικά οι πυρήνες επαναιωρούνται σε 20% γλυκερόλη, 25 mM HEPES pH 7.9, 115 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.1% (v/v) Nonidet-P40, 1 mM διθειοτριτόλη, 0.5 mM φθοριούχο φαινυλμεθυλσουλφονύλιο, 10 mM NaF και ταμπλέτα με μίγμα αναστολέων προτεασών (complete mini EDTA-free, Roche). Τα πυρηνικά εκχυλίσματα παγώνουν σε λουτρό ξηρού πάγου/αιθανόλης και τήκονται στους 37°C επί τρεις φορές, φυγοκεντρούνται στις 12000 g για 15 min και το υπερκείμενο μοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Για την παρασκευή του ιχνηθέτη, 100 ng δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου σημάνθηκε σε αντίδραση συμπλήρωσης (fill-in) χρησιμοποιώντας [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP, [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (USB Amersham) και 13 u Sequenase (USB Amersham) σε 1 x Sequenase Buffer, 10 nM DTT, 200 nM dGTP, 200 nM dTTP σε όγκο αντίδρασης 20 μl . Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37°C επί 30 min ακολουθούμενα από προσθήκη 2 nmoles από κάθε dNTP και επιπλέον επώαση για 15 min. Τα μη ενσωματωμένα δεοξυνουκλεοτίδια κατακρατούνται χρησιμοποιώντας δύο φορές στήλες G-50, και τελικά $\sim 4 \times 10^4$ cpm ιχνηθέτη ($3\text{-}5 \times 10^5$ cpm/ng) χρησιμοποιούνται σε κάθε αντίδραση σύνδεσης.

Για την NF- κB EMSA, το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε με το ραδιοσημασμένο DNA για 40 min σε πάγο σε αντίδραση όγκου 15 μl που περιέχει 1 x ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης (10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 4 mM σπερμιδίνη, 100 ng/ml BSA, 20 nM οξικό ψευδάργυρο, 0.05% Nonidet-P40, 400 $\mu\text{g/ml}$ poly dI-dC). Τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-DNA διαχωρίζονται από τον ελεύθερο ιχνηθέτη σε 5% μη-αποδιατακτική πηκτή σε 0.5 x TBE ρυθμιστικό διάλυμα. Το ποσό της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση προέρχεται από ίσους αριθμούς CD8+ κυττάρων όπως προέκυψε από κυτταρομετρία ροής. Σε αντιδράσεις αυξημένης υστέρησης (supershifts), 0.5 μg από anti-p50 ή anti-p65 πολυκλωνικά αντισώματα (Santa Cruz) επωάζονται με τα εκχυλίσματα στον πάγο για 30 min πριν την προσθήκη του ιχνηθέτη. Για την AP-2 EMSA οι αντιδράσεις έγιναν σε 100 $\mu\text{g/ml}$ poly dI-dC χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα (με την περίπτωση του NF- κB) ολικής πυρηνικής πρωτεΐνης.

Για την NFAT EMSA τα πυρηνικά εκχυλίσματα του θύμου επωάζονται με το ραδιοσημασμένο DNA σε 67 $\mu\text{g/ml}$ poly dI-dC, για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και για επιπλέον 30 min σε πάγο. Για τις αντιδράσεις αυξημένης υστέρησης, προστέθηκε 0.5 μg από μονοκλωνικό NF-ATp αντίσωμα πριν την επώαση στον πάγο. Για την Sp1 EMSA τα πυρηνικά εκχυλίσματα του θύμου επώαστηκαν με το ραδιοσημασμένο DNA σε 50 $\mu\text{g/ml}$ poly dI-dC, για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι: μια αλληλουχία από τον I μ κ ενισχυτή (5'-GATCCAGAGGGGACTTTCCGAGAGGCCAT-3') που περιέχει μια θέση δέσμευσης για NF- κB , ένα δίκλωνο DNA (5'-GGATCGAACTGACCGCCCGCGGC-3') που περιέχει μια θέση δέσμευσης για AP2, μια αλληλουχία από τον IL-4 υποκινητή (5'-TGGATTTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3') που περιέχει μια θέση δέσμευσης για NFAT και ένα δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει μια θέση δέσμευσης για Sp1.

Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, ανοσοκατακρήμνιση και μεταφορά πρωτεϊνών τύπου Western.

Σπληνοκύτταρα απαλλαγμένα ερυθροκυττάρων με Lympholyte-M διεγείρονται με κατάλληλες συγκεντρώσεις NP68 για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα. Η διέγερση διακόπτεται με προσθήκη τουλάχιστον δύο όγκων παγωμένου 1xPBS. Τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με παγωμένο 1xPBS. Στα κατακρημνισμένα κύτταρα προστίθενται τουλάχιστον 4 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος X (Lysis Buffer) (25 mM HEPES pH 7.9, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 10% γλυκερόλη, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 μg/ml απρωτινίνη, 1 mM ορθοβαναδικό νάτριο) και ακολουθεί καλή ανάμιξη. Τα κύτταρα παγώνουν σε λουτρό ξηρού πάγου/αιθανόλης και τήκονται στους 37°C επί τρεις φορές, φυγοκεντρώνται στις 12000 g για 15 min και το υπερκείμενο αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα.

Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε μίγμα ίσων ποσοτήτων από Protein A Sepharose και Protein G Sepharose και τα δείγματα περιστρέφονται στους 4°C επί 1h, φυγοκεντρώνται στους 4°C, σε 5000 rpm επί 3 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες (σε αυτό το στάδιο το δείγμα «καθαρίζεται» από τις πρωτεΐνες που δεσμεύονται μη ειδικά στις Protein A/G).

Στο υπερκείμενο προστίθενται 10 μg α-CD3ε αντισώματος (κλώνος 2C11, Pharmingen) ανά 600-1000 μg πρωτεΐνης, και τα δείγματα περιστρέφονται στους 4°C επί τουλάχιστον 1 h. Το δείγμα μεταφέρεται πάλι σε μίγμα ίσων ποσοτήτων από Protein A Sepharose και Protein G Sepharose και τα δείγματα περιστρέφονται στους 4°C επί τουλάχιστον 7 h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η Protein A/G Sepharose εκπλένεται 4-5 φορές με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (25 mM HEPES pH 7.9, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP40, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 μg/ml απρωτινίνη, 1 mM ορθοβαναδικό νάτριο). Μετά την τελευταία έκπλυση προστίθεται ίσος όγκος 2x SDS-ρυθμιστικού διαλύματος για ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πηκτή (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM διθειοτριτόλη, 4% SDS, 0.2% κυανό της βρωμοφαινόλης, 20% γλυκερόλη). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης διπλής σύστασης. Αρχικά το δείγμα πεκετάρεται καθώς διέρχεται από το αραιότερο stacking gel 5% υπό τάση 60 V, και κατόπιν οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μετά τη διέλευσή τους από τη πηκτή περιεκτικότητας 12% υπό τάση 120 V. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες της πηκτής μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.45 μm). Η μεταφορά γίνεται σε ειδική συσκευή της Biorad (Mini Trans-Blot Cell) με την μεμβράνη εγκλωβισμένη σε Whatmann τα οποία με τη

σειρά τους περιέχονται σε δύο σφουγγαράκια. Το όλον είναι εμβαπτισμένο σε διάλυμα μεταφοράς (20% μεθανόλη, 24 mM Tris, 194 mM γλυκίνη) στους 4°C με ροή ρεύματος 350 mA.

Στη συνέχεια η μεμβράνη διαβρέχεται σε διάλυμα TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20) και επώάζεται για τουλάχιστον 12 h, στους 4°C σε TBST που περιέχει 5% σκόνη άπαχου γάλακτος. Η μεμβράνη μεταφέρεται σε TBST-5% σκόνη άπαχου γάλακτος που περιέχει την κατάλληλη αραίωση του αντισώματος για φωσφοτυροσίνες συζευγμένο με υπεροξειδάση του ραπανιού, και ακολουθεί επώαση για τουλάχιστον 1h υπό ανάδευση. Κατόπιν ξεπλυνουμε την μεμβράνη με TBST τέσσερις φορές επί 15 min και άλλες τέσσερις επί 5 min. Η δέσμευση του αντισώματος στις πρωτεΐνες πιστοποιείται με τη χρήση της ενζυμικής αντίδρασης της υπεροξειδάσης πάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα (μέθοδος χημειοφωταύγειας) (ECL, AmershamPharmacia).

Δοκιμασία προστασίας από Rnάση.

Η αρχή της μεθόδου είναι η παρασκευή ενός ριβοιχνηθέτη του οποίου μία αλληλουχία θα υβριδοποιηθεί με το υπό εξέταση RNA ώστε το σχηματιζόμενο δίκλωνο RNA-RNA να προστατεύεται από πέψη με Rnάση A. Για να συμβεί αυτό ο ιχνηθέτης πρέπει να είναι το antisense RNA. Ο ριβοιχνηθέτης μεταγράφεται από ένα cDNA που έχει κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα όπως ο Bluescript KS+ που φέρει τους υποκινητές για την T3 και την T7 πολυμεράση. Απαιτείται προσοχή ώστε να μεταγραφεί η σωστή αλυσίδα και να παραχθεί το antisense RNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο γίνεται ευθύγραμμο με πέψη με κατάλληλο ένζυμο που αφήνει 5'προεξέχοντα άκρα. Αν το ένζυμο αφήνει 3'προεξέχοντα άκρα η μεταγραφή προχωράει και πέρα από την περιοριστική θέση.

Για την παρασκευή του ριβοιχνηθέτη χρησιμοποιούνται το πολύ 500 ng DNA. Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20 μl 1X T3 ή T7 ρυθμιστικό διάλυμα (4 mM Tris-HCl pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 0.2 mM σπερμιδίνη), 500 μM για καθένα από τα ATP, CTP, GTP, 5 μM UTP, [³²P] UTP 50 μCi, 20 u Rnasin, 20 u T3 ή T7 πολυμεράση και επώάζεται στους 37°C για 1 h.

Κατόπιν προστίθονται 1 unit RQ Dnase (Promega) και η επώαση συνεχίζεται για 15 επιπλέον λεπτά. Για τον προσδιορισμό της ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας λαμβάνονται 0.5 μl της αντίδρασης και στα οποία προστίθενται 20 μg tRNA. Η αντίδραση «σποτάρεται» σε δύο χαρτιά GFC-Whatman που το ένα έχει κατεργαστεί με 10% TCA, και η ραδιενέργεια μετρίεται και στα δύο χαρτιά. Μετά την πέψη του DNA, προστίθονται στην

αντίδραση 200 μl ddH₂O και ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Το RNA κατακρημνίζεται με ίσο όγκο ισοπροπανόλης και σε 1 N CH₃COONH₄, μετά από ολονύχτια παραμονή στους -20°C και ακολούθως φυγοκέντρηση, ενώ εκπλένεται με 70% αιθανόλη. Ο ιχνηθέτης αραιώνεται στα 10⁵ cpm/ μl .

Για την υβριδοποίηση 30-50 μg ολικού RNA (στην περίπτωση του T.52.76 χρησιμοποιήθηκαν 150 μg) αναμιγνύονται με 10⁵ cpm ιχνηθέτη και συγκατακρημνίζονται. Μετά από έκπλυση του ιζήματος και στέγνωμα επί 5 min στους 65°C, αυτό επαναδιαλύεται σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης (75% φορμαμίδιο (Gibco BRL), 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA). Το όλον επωάζεται στους 75°C για 15 min και ακολούθως στους 45°C για όλη τη νύκτα.

Την επόμενη μέρα προστίθενται 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος Rνάσης (300 mM NaCl, 5 mM EDTA) και 10 μl Rνάση A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) και η αντίδραση επωάζεται στους 20°C για 20-30 min. Μετά την παραπάνω επώαση προστίθενται 10 μl , πρωτεΐνάση K (10 mg/ml), 1.5 μl SDS και ακολουθεί επώαση στους 37°C επί 20-30 min. Τελικά, γίνεται 2 φορές εκχύλιση με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και κατακρήμνιση με αιθανόλη και οξικό νάτριο ως συνήθως.

Κάθε ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 μl ddH₂O και 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (95% φορμαμίδιο, 20 mM EDTA, 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0.05% κυανό του ξυλενίου). Πριν την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης, τα δείγματα θερμαίνονται στους 80°C για 5 min.

Βιβλιογραφία

1. Janeway, C.A., Jr., Travers, P., Walport, M. 1999. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 4th ed, ed. C.A. Janeway, Jr. Garland Publ.
2. Delves, P.J., Roitt, I. M. 1998. Encyclopedia of Immunology. 2nd ed. 1-4 vols. Academic Pr.
3. Res, P., and H. Spits. 1999. Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol* 11, no. 1:39.
4. Aifantis, I., F. Gounari, L. Scorrano, C. Borowski, and H. von Boehmer. 2001. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat Immunol* 2, no. 5:403.
5. von Boehmer, H., I. Aifantis, J. Feinberg, O. Lechner, C. Saint-Ruf, U. Walter, J. Buer, and O. Azogui. 1999. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 11, no. 2:135.
6. Goldrath, A.W., and M.J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, no. 6759:255.
7. Tanchot, C., M.M. Rosado, F. Agenes, A.A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* 9, no. 6:331.
8. Tanchot, C., H.V. Fernandes, and B. Rocha. 2000. The organization of mature T-cell pools. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, no. 1395:323.
9. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cell pools. *Eur J Immunol* 25, no. 8:2127.
10. Ernst, B., D.S. Lee, J.M. Chang, J. Sprent, and C.D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11, no. 2:173.
11. Rocha, B., N. Dautigny, and P. Pereira. 1989. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol* 19, no. 5:905.
12. Freitas, A.A., and B. Rocha. 1999. Peripheral T cell survival. *Curr Opin Immunol* 11, no. 2:152.
13. Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 186, no. 8:1269.
14. Takeda, S., H.R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, no. 3:217.
15. Brocker, T. 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186, no. 8:1223.
16. Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, no. 5443:1377.

17. Tanchot, C., F.A. Lemonnier, B. Perarnau, A.A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, no. 5321:2057.
18. Dorfman, J.R., I. Stefanova, K. Yasutomo, and R.N. Germain. 2000. CD4+ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat Immunol* 1, no. 4:329.
19. Kirberg, J., H. von Boehmer, T. Brocker, H.R. Rodewald, and S. Takeda. 2001. Class II essential for CD4 survival. *Nat Immunol* 2, no. 2:136.
20. Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, no. 5:426.
21. Seddon, B., G. Legname, P. Tomlinson, and R. Zamoyska. 2000. Long-term survival but impaired homeostatic proliferation of Naive T cells in the absence of p56lck. *Science* 290, no. 5489:127.
22. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, no. 5:591.
23. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, no. 5466:675.
24. Waldmann, T.A., and Y. Tagaya. 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 17:19.
25. Delon, J., and R.N. Germain. 2000. Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* 10, no. 24:R923.
26. Anton van der Merwe, P., S.J. Davis, A.S. Shaw, and M.L. Dustin. 2000. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 12, no. 1:5.
27. Xavier, R., and B. Seed. 1999. Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol* 11, no. 3:265.
28. van Leeuwen, J.E., and L.E. Samelson. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 11, no. 3:242.
29. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3- epsilon gene. *Embo J* 14, no. 19:4641.
30. Haks, M.C., P. Krimpenfort, J. Borst, and A.M. Kruisbeek. 1998. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgamma lineages. *Embo J* 17, no. 7:1871.
31. Shores, E.W., K. Huang, T. Tran, E. Lee, A. Grinberg, and P.E. Love. 1994. Role of TCR zeta chain in T cell development and selection. *Science* 266, no. 5187:1047.
32. Ardouin, L., C. Boyer, A. Gillet, J. Trucy, A.M. Bernard, J. Nunes, J. Delon, A. Trautmann, H.T. He, B. Malissen, and M. Malissen. 1999. Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity* 10, no. 4:409.
33. Shores, E.W., T. Tran, A. Grinberg, C.L. Sommers, H. Shen, and P.E. Love. 1997. Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med* 185, no. 5:893.
34. Sommers, C.L., J.B. Dejarnette, K. Huang, J. Lee, D. El-Khoury, E.W. Shores, and P.E. Love. 2000. Function of CD3 epsilon-mediated signals in T cell development. *J Exp Med* 192, no. 6:913.
35. Kersh, E.N., A.S. Shaw, and P.M. Allen. 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 281, no. 5376:572.

36. Bachmann, M.F., M. Barner, and M. Kopf. 1999. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *J Exp Med* 190, no. 10:1383.
37. Rudd, C.E. 1996. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4, no. 6:527.
38. Chambers, C.A. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22, no. 4:217.
39. Hutloff, A., A.M. Dittrich, K.C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R.A. Kroczeck. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, no. 6716:263.
40. Gramaglia, I., D. Cooper, K.T. Miner, B.S. Kwon, and M. Croft. 2000. Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 30, no. 2:392.
41. Shuford, W.W., K. Klussman, D.D. Tritchler, D.T. Loo, J. Chalupny, A.W. Siadak, T.J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C.P. Larsen, T.C. Pearson, J.A. Ledbetter, A. Aruffo, and R.S. Mittler. 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 186, no. 1:47.
42. Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1, no. 1:47.
43. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18:275.
44. Sprent, J., D. Lo, E.K. Gao, and Y. Ron. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 101:173.
45. MacDonald, H.R., and R.K. Lees. 1990. Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature* 343, no. 6259:642.
46. Kishimoto, H., and J. Sprent. 1997. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185, no. 2:263.
47. Dautigny, N., A. Le Campion, and B. Lucas. 1999. Timing and casting for actors of thymic negative selection. *J Immunol* 162, no. 3:1294.
48. Matzinger, P., and S. Guerder. 1989. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 338, no. 6210:74.
49. Swat, W., L. Ignatowicz, H. von Boehmer, and P. Kisielow. 1991. Clonal deletion of immature CD4+8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 351, no. 6322:150.
50. Von Boehmer, H., and K. Schubiger. 1984. Thymocytes appear to ignore class I major histocompatibility complex antigens expressed on thymus epithelial cells. *Eur J Immunol* 14, no. 11:1048.
51. Jameson, S.C., and M.J. Bevan. 1998. T-cell selection. *Curr Opin Immunol* 10, no. 2:214.
52. Kishimoto, H., and J. Sprent. 2000. The thymus and central tolerance. *Clin Immunol* 95, no. 1 Pt 2:S3.
53. Foy, T.M., D.M. Page, T.J. Waldschmidt, A. Schoneveld, J.D. Laman, S.R. Masters, L. Tygrett, J.A. Ledbetter, A. Aruffo, E. Claassen, and et al. 1995. An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med* 182, no. 5:1377.
54. Castro, J.E., J.A. Listman, B.A. Jacobson, Y. Wang, P.A. Lopez, S. Ju, P.W. Finn, and D.L. Perkins. 1996. Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 5, no. 6:617.
55. Singer, G.G., and A.K. Abbas. 1994. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, no. 5:365.

56. Page, D.M., E.M. Roberts, J.J. Peschon, and S.M. Hedrick. 1998. TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection. *J Immunol* 160, no. 1:120.
57. Martin, S., and M.J. Bevan. 1997. Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection. *Eur J Immunol* 27, no. 10:2726.
58. Van Parijs, L., and A.K. Abbas. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, no. 5361:243.
59. Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251, no. 4998:1225.
60. Lanoue, A., C. Bona, H. von Boehmer, and A. Sarukhan. 1997. Conditions that induce tolerance in mature CD4+ T cells. *J Exp Med* 185, no. 3:405.
61. Dubois, P.M., M. Pihlgren, M. Tomkowiak, M. Van Mechelen, and J. Marvel. 1998. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 161, no. 10:5260.
62. Mondino, A., A. Khoruts, and M.K. Jenkins. 1996. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, no. 6:2245.
63. Ptak, W., D. Rozycka, P.W. Askenase, and R.K. Gershon. 1980. Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 151, no. 2:362.
64. Pape, K.A., R. Merica, A. Mondino, A. Khoruts, and M.K. Jenkins. 1998. Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance. *J Immunol* 160, no. 10:4719.
65. Chen, W., M.H. Sayegh, and S.J. Khoury. 1998. Mechanisms of acquired thymic tolerance in vivo: intrathymic injection of antigen induces apoptosis of thymocytes and peripheral T cell anergy. *J Immunol* 160, no. 3:1504.
66. Weiner, H.L., A. Friedman, A. Miller, S.J. Khoury, A. al-Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R.B. Nussenblatt, D.E. Trentham, and D.A. Hafler. 1994. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 12:809.
67. Miller, C., J.A. Ragheb, and R.H. Schwartz. 1999. Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen- induced tolerance mechanisms in vivo. *J Exp Med* 190, no. 1:53.
68. Kisielow, P., H. Bluthmann, U.D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, no. 6175:742.
69. Mamalaki, C., M. Murdjeva, M. Tolaini, T. Norton, P. Chandler, A. Townsend, E. Simpson, and D. Kioussis. 1996. Tolerance in TCR/cognate antigen double-transgenic mice mediated by incomplete thymic deletion and peripheral receptor downregulation. *Dev Immunol* 4, no. 4:299.
70. Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991.
71. Schwartz, R.H. 1997. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9, no. 3:351.
72. Deeths, M.J., R.M. Kedl, and M.F. Mescher. 1999. CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *J Immunol* 163, no. 1:102.
73. Tanchot, C., S. Guillaume, J. Delon, C. Bourgeois, A. Franzke, A. Sarukhan, A. Trautmann, and B. Rocha. 1998. Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8, no. 5:581.

74. Groux, H., M. Bigler, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 184, no. 1:19.
75. Li, W., C.D. Whaley, A. Mondino, and D.L. Mueller. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 271, no. 5253:1272.
76. DeSilva, D.R., W.S. Feeser, E.J. Tancula, and P.A. Scherle. 1996. Anergic T cells are defective in both jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Exp Med* 183, no. 5:2017.
77. Fields, P.E., T.F. Gajewski, and F.W. Fitch. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 271, no. 5253:1276.
78. Mondino, A., C.D. Whaley, D.R. DeSilva, W. Li, M.K. Jenkins, and D.L. Mueller. 1996. Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells. *J Immunol* 157, no. 5:2048.
79. Gajewski, T.F., D. Qian, P. Fields, and F.W. Fitch. 1994. Anergic T-lymphocyte clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, no. 1:38.
80. Madrenas, J., R.H. Schwartz, and R.N. Germain. 1996. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, no. 18:9736.
81. Girgis, L., M.M. Davis, and B.F. de St Groth. 1999. The avidity spectrum of T cell receptor interactions accounts for T cell anergy in a double transgenic model. *J Exp Med* 189, no. 2:265.
82. Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, no. 5:541.
83. Linsley, P.S., J. Ledbetter, R. Peach, and J. Bajorath. 1995. CD28/CTLA-4 receptor structure, binding stoichiometry and aggregation during T-cell activation. *Res Immunol* 146, no. 3:130.
84. Alegre, M.L., P.J. Noel, B.J. Eisfelder, E. Chuang, M.R. Clark, S.L. Reiner, and C.B. Thompson. 1996. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol* 157, no. 11:4762.
85. Greenwald, R.J., V.A. Boussiotis, R.B. Lorsch, A.K. Abbas, and A.H. Sharpe. 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14, no. 2:145.
86. Fraser, J.H., M. Rincon, K.D. McCoy, and G. Le Gros. 1999. CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur J Immunol* 29, no. 3:838.
87. Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, no. 2:141.
88. Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, no. 7:1027.
89. Shevach, E.M. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193, no. 11:F41.
90. Jooss, K., B. Gjata, O. Danos, H. von Boehmer, and A. Sarukhan. 2001. Regulatory function of in vivo anergized CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 3:3.

91. Barbara, J.A., X. Van ostade, and A. Lopez. 1996. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol* 74, no. 5:434.
92. Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411.
93. Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and et al. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, no. 5:793.
94. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, no. 4:487.
95. Fu, C., C.W. Turck, T. Kurosaki, and A.C. Chan. 1998. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, no. 1:93.
96. Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert, and W. Fiers. 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in Cell Biology* 5:392.
97. Chan, F.K., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui, and M.J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, no. 5475:2351.
98. Jiang, Y., J.D. Woronicz, W. Liu, and D.V. Goeddel. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, no. 5401:543.
99. Chan, K.F., M.R. Siegel, and J.M. Lenardo. 2000. Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity* 13, no. 4:419.
100. Zhang, S.Q., A. Kovalenko, G. Cantarella, and D. Wallach. 2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, no. 3:301.
101. Ashkenazi, A., and V.M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, no. 5381:1305.
102. Wang, C.Y., M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, and A.S. Baldwin, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, no. 5383:1680.
103. Declercq, W., G. Denecker, W. Fiers, and P. Vandenabeele. 1998. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 161, no. 1:390.
104. Haridas, V., B.G. Darnay, K. Natarajan, R. Heller, and B.B. Aggarwal. 1998. Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, and c-Jun kinase activation. *J Immunol* 160, no. 7:3152.
105. Tartaglia, L.A., D. Pennica, and D.V. Goeddel. 1993. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268, no. 25:18542.
106. Chan, F.K., and M.J. Lenardo. 2000. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30, no. 2:652.
107. Aggarwal, B.B., and K. Natarajan. 1996. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7, no. 2:93.
108. McDermott, M.F., I. Aksentijevich, J. Galon, E.M. McDermott, B.W. Ogunkolade, M. Centola, E. Mansfield, M. Gadina, L. Karenko, T. Pettersson, J. McCarthy, D.M. Frucht, M. Aringer, Y. Torosyan, A.M. Teppo, M. Wilson, H.M. Karaarslan, Y. Wan, I. Todd, G. Wood, R. Schlimgen, T.R. Kumarajeewa, S.M. Cooper, J.P. Vella, D.L. Kastner, and et al. 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97, no. 1:133.

109. Eissner, G., S. Kirchner, H. Lindner, W. Kolch, P. Janosch, M. Grell, P. Scheurich, R. Andreesen, and E. Holler. 2000. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 164, no. 12:6193.
110. Watts, A.D., N.H. Hunt, Y. Wanigasekara, G. Bloomfield, D. Wallach, B.D. Roufogalis, and G. Chaudhri. 1999. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *Embo J* 18, no. 8:2119.
111. Yokota, S., T.D. Geppert, and P.E. Lipsky. 1988. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 140, no. 2:531.
112. Shalaby, M.R., T. Espevik, G.C. Rice, A.J. Ammann, I.S. Figari, G.E. Ranges, and M.A. Palladino, Jr. 1988. The involvement of human tumor necrosis factors-alpha and -beta in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 141, no. 2:499.
113. Tartaglia, L.A., D.V. Goeddel, C. Reynolds, I.S. Figari, R.F. Weber, B.M. Fendly, and M.A. Palladino, Jr. 1993. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* 151, no. 9:4637.
114. Pimentel-Muinos, F.X., M.A. Munoz-Fernandez, and M. Fresno. 1994. Control of T lymphocyte activation and IL-2 receptor expression by endogenously secreted lymphokines. *J Immunol* 152, no. 12:5714.
115. Hill, G.R., T. Teshima, V.I. Rebel, O.I. Krijanovski, K.R. Cooke, Y.S. Brinson, and J.L. Ferrara. 2000. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* 164, no. 2:656.
116. Via, C.S., A. Shustov, V. Rus, T. Lang, P. Nguyen, and F.D. Finkelman. 2001. In vivo neutralization of TNF-alpha promotes humoral autoimmunity by preventing the induction of CTL. *J Immunol* 167, no. 12:6821.
117. Kim, E.Y., and H.S. Teh. 2001. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol* 167, no. 12:6812.
118. Sarin, A., M. Conan-Cibotti, and P.A. Henkart. 1995. Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J Immunol* 155, no. 8:3716.
119. Zheng, L., G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch, and M.J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, no. 6547:348.
120. Sytwu, H.K., R.S. Liblau, and H.O. McDevitt. 1996. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 5, no. 1:17.
121. Speiser, D.E., E. Sebzda, T. Ohteki, M.F. Bachmann, K. Pfeffer, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 1996. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol* 26, no. 12:3055.
122. Alexander-Miller, M.A., M.A. Derby, A. Sarin, P.A. Henkart, and J.A. Berzofsky. 1998. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II- mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, no. 8:1391.
123. Hildeman, D.A., T. Mitchell, T.K. Teague, P. Henson, B.J. Day, J. Kappler, and P.C. Marrack. 1999. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10, no. 6:735.
124. Reich, A., H. Korner, J.D. Sedgwick, and H. Pircher. 2000. Immune down-regulation and peripheral deletion of CD8 T cells does not require TNF receptor-ligand interactions nor CD95 (Fas, APO-1). *Eur J Immunol* 30, no. 2:678.
125. Nguyen, L.T., K. McKall-Faienza, A. Zakarian, D.E. Speiser, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 2000. TNF receptor 1 (TNFR1) and CD95 are not required for T cell

- deletion after virus infection but contribute to peptide-induced deletion under limited conditions. *Eur J Immunol* 30, no. 2:683.
126. Kollias, G., E. Douni, G. Kassiotis, and D. Kontoyiannis. 1999. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 169:175.
 127. Guerder, S., D.E. Picarella, P.S. Linsley, and R.A. Flavell. 1994. Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, no. 11:5138.
 128. Herrera, P.L., D.M. Harlan, L. Fossati, S. Izui, J. Huarte, L. Orchi, J.D. Vassalli, and P. Vassalli. 1994. A CD8+ T-lymphocyte-mediated and CD4+ T-lymphocyte-independent autoimmune diabetes of early onset in transgenic mice. *Diabetologia* 37, no. 12:1277.
 129. McSorley, S.J., S. Soldera, L. Malherbe, C. Carnaud, R.M. Locksley, R.A. Flavell, and N. Glaichenhaus. 1997. Immunological tolerance to a pancreatic antigen as a result of local expression of TNFalpha by islet beta cells. *Immunity* 7, no. 3:401.
 130. Grewal, I.S., K.D. Grewal, F.S. Wong, D.E. Picarella, C.A. Janeway, Jr., and R.A. Flavell. 1996. Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med* 184, no. 5:1963.
 131. Green, E.A., E.E. Eynon, and R.A. Flavell. 1998. Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity* 9, no. 5:733.
 132. Jacob, C.O., S. Aiso, S.A. Michie, H.O. McDevitt, and H. Acha-Orbea. 1990. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, no. 3:968.
 133. Yang, X.D., R. Tisch, S.M. Singer, Z.A. Cao, R.S. Liblau, R.D. Schreiber, and H.O. McDevitt. 1994. Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med* 180, no. 3:995.
 134. Green, E.A., and R.A. Flavell. 2000. The temporal importance of TNFalpha expression in the development of diabetes. *Immunity* 12, no. 5:459.
 135. Sharief, M.K., and R. Hentges. 1991. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325, no. 7:467.
 136. van Oosten, B.W., F. Barkhof, L. Truyen, J.B. Boringa, F.W. Bertelsmann, B.M. von Blomberg, J.N. Woody, H.P. Hartung, and C.H. Polman. 1996. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47, no. 6:1531.
 137. Kassiotis, G., and G. Kollias. 2001. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193, no. 4:427.
 138. Siegel, R.M., F.K. Chan, H.J. Chun, and M.J. Lenardo. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1, no. 6:469.
 139. Singer, G.G., A.C. Carrera, A. Marshak-Rothstein, C. Martinez, and A.K. Abbas. 1994. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* 6, no. 6:913.

140. Chu, J.L., J. Drappa, A. Parnassa, and K.B. Elkon. 1993. The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J Exp Med* 178, no. 2:723.
141. Vidal, S., D.H. Kono, and A.N. Theofilopoulos. 1998. Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Faslpr mice. *J Clin Invest* 101, no. 3:696.
142. Ogasawara, J., T. Suda, and S. Nagata. 1995. Selective apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes by the anti-Fas antibody. *J Exp Med* 181, no. 2:485.
143. Kurts, C., W.R. Heath, H. Kosaka, J.F. Miller, and F.R. Carbone. 1998. The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross- presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo- 1). *J Exp Med* 188, no. 2:415.
144. Mamalaki, C., T. Norton, Y. Tanaka, A.R. Townsend, P. Chandler, E. Simpson, and D. Kioussis. 1992. Thymic depletion and peripheral activation of class I major histocompatibility complex-restricted T cells by soluble peptide in T- cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, no. 23:11342.
145. Fraser, J., V. Arcus, P. Kong, E. Baker, and T. Proft. 2000. Superantigens - powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today* 6, no. 3:125.
146. Pascolo, S., D. Tsoukatou, and C. Mamalaki. 1999. Identification of thymus specific and developmentally regulated genes by an improved version of the mRNA differential display technique. *Dev Immunol* 7, no. 1:1.
147. Sokolov, B.P., and D.J. Prockop. 1994. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 22, no. 19:4009.
148. Wienands, J., J. Schweikert, B. Wollscheid, H. Jumaa, P.J. Nielsen, and M. Reth. 1998. SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* 188, no. 4:791.
149. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. 1996. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184, no. 4:1397.
150. Theofilopoulos, A.N., W. Dummer, and D.H. Kono. 2001. T cell homeostasis and systemic autoimmunity. *J Clin Invest* 108, no. 3:335.
151. Ferreira, V., N. Sidenius, N. Tarantino, P. Hubert, L. Chatenoud, F. Blasi, and M. Korner. 1999. In vivo inhibition of NF-kappa B in T-lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *J Immunol* 162, no. 11:6442.
152. Kuo, C.T., and J.M. Leiden. 1999. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 17:149.
153. Beg, A.A., and D. Baltimore. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, no. 5288:782.
154. Van Antwerp, D.J., S.J. Martin, T. Kafri, D.R. Green, and I.M. Verma. 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, no. 5288:787.
155. Lenardo, M., K.M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, and L. Zheng. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17:221.

156. Wallach, D., E.E. Varfolomeev, N.L. Malinin, Y.V. Goltsev, A.V. Kovalenko, and M.P. Boldin. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17:331.
157. Loh, C., J.A. Carew, J. Kim, P.G. Hogan, and A. Rao. 1996. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol* 16, no. 7:3945.
158. Kurts, C., H. Kosaka, F.R. Carbone, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186, no. 2:239.
159. Hernandez, J., S. Aung, W.L. Redmond, and L.A. Sherman. 2001. Phenotypic and functional analysis of cd8(+) t cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 194, no. 6:707.
160. Morgan, D.J., C. Kurts, H.T. Kruwel, K.L. Holst, W.R. Heath, and L.A. Sherman. 1999. Ontogeny of T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, no. 7:3854.
161. Schuh, K., T. Twardzik, B. Kneitz, J. Heyer, A. Schimpl, and E. Serfling. 1998. The interleukin 2 receptor alpha chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med* 188, no. 7:1369.
162. Lechner, O., J. Lauber, A. Franzke, A. Sarukhan, H. von Boehmer, and J. Buer. 2001. Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 11, no. 8:587.
163. Jumaa, H., B. Wollscheid, M. Mitterer, J. Wienands, M. Reth, and P.J. Nielsen. 1999. Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* 11, no. 5:547.
164. Polic, B., D. Kunkel, A. Scheffold, and K. Rajewsky. 2001. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 15:8744.
165. Marino, M.W., A. Dunn, D. Grail, M. Inglese, Y. Noguchi, E. Richards, A. Jungbluth, H. Wada, M. Moore, B. Williamson, S. Basu, and L.J. Old. 1997. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, no. 15:8093.
166. Bender, J., T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 1999. CD4+ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J Exp Med* 190, no. 3:367.
167. Garcia, S., J. DiSanto, and B. Stockinger. 1999. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 11, no. 2:163.
168. Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, no. 6673:245.
169. Collins, T., L.A. Lapierre, W. Fiers, J.L. Strominger, and J.S. Pober. 1986. Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, no. 2:446.
170. Huet, S., H. Groux, B. Caillou, H. Valentin, A.M. Prieur, and A. Bernard. 1989. CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol* 143, no. 3:798.
171. Foger, N., R. Marhaba, and M. Zoller. 2000. CD44 supports T cell proliferation and apoptosis by apposition of protein kinases. *Eur J Immunol* 30, no. 10:2888.
172. Egen, J.G., and J.P. Allison. 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16, no. 1:23.
173. Kagi, D., B. Odermatt, and T.W. Mak. 1999. Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin. *Eur J Immunol* 29, no. 10:3262.

174. Badovinac, V.P., A.R. Tvinnereim, and J.T. Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290, no. 5495:1354.