

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ :
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΖΑΦΕΙΡΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος του ενδογενούς TNF σε *in vivo* αποκρίσεις περιφερικών CD8+ T λεμφοκυττάρων διαγονιδιακών για TCR υποδοχέα »

« Role of endogenous TNF in *in vivo* responses of peripheral transgenic-TCR CD8+T lymphocytes »

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ :ΜΑΜΑΛΑΚΗ Κ.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΟΥΜΠΑΣ Δ.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επαγωγή περιφερικής ανοχής στα T λεμφοκύτταρα, η οποία δρομολογείται μέσω μηχανισμών όπως η επαγωγή ανέργειας (anergy), η ανοσολογική παρέκκλιση (immunological deviation/ phenotype skewing), ο επαγόμενος μετά από ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος (AICD, activation induced cell death) και ο έλεγχος από T ρυθμιστικά κύτταρα, προστατεύουν τον οργανισμό τόσο από πιθανές επιζήμιες ανοσολογικές αποκρίσεις όσο και από την αυτοανοσία. Ο TNF είναι μία πολυδύναμη κυττοκίνη που έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον εξαιτίας τόσο των προφλεγμονώδων και των ανοσοκατασταλτικών αποκρίσεων που μπορεί να πυροδοτήσει, όσο και εξαιτίας της εμπλοκής του σε μηχανισμούς επαγωγής της ανοχής.

Στο σύστημα αυτοανοχής των ζώων F531 Rag^{-/-} και F531 TNF^{-/-}Rag^{-/-} που μελετήθηκε, τα οποία φέρουν CD8⁺ T λεμφοκύτταρα με διαγονιδιακό υποδοχέα TCR ικανό να αναγνωρίζει το πεπτίδιο NP της νουκλεοπροτεΐνης του ιού της γρίπης A/NT/60/68, ενώ ταυτόχρονα εκφράζουν το αντιγόνο NP, ως αντιγόνο εαυτού σε όλους τους ιστούς, καταγράφηκε μειωμένος αριθμός περιφερικών CD8⁺ T κυττάρων σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες (F5 Rag^{-/-} και F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} αντίστοιχα), γεγονός που υποδεικνύει την κλωνική απαλοιφή των F5 κυττάρων μετά την *in vivo* συνάντησή τους με το αντιγόνο. Στην απουσία του TNF, στα F531 TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα ο αριθμός των περιφερικών CD8⁺ T κυττάρων που καταγράφηκε ήταν ελαφρώς μειωμένος σε σχέση με τα ζώα F531 Rag^{-/-}, υποδηλώνοντας τον ρόλο του TNF στην περιφερική κλωνική απαλοιφή. Τα F5 κύτταρα και των δύο γονότυπων του συστήματος αυτοανοχής, ήταν θετικά για τους μάρτυρες ενεργοποίησης CD69 και CD44, γεγονός που υποδεικνύει την *in vivo* συνάντησή τους με το αντιγόνο, ενώ δεν παράγαν INF γ ούτε πολλαπλασιάστηκαν ως απάντηση στην *in vitro* δοκιμασία επαναδιέγερσης με το πεπτίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν περιέλθει σε κατάσταση ανέργειας, η οποία δεν φαίνεται να επηρεάζεται στο παρόν σύστημα από τον TNF.

Στα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} και F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} που μελετήσαμε, όπου τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα φέρουν έναν διαγονιδιακό υποδοχέα TCR ικανό να αναγνωρίζει το πεπτίδιο NP, παρατηρήθηκε ότι στην απουσία του ενδογενούς TNF καταγράφηκε μειωμένος αριθμός περιφερικών CD8⁺ T κυττάρων στα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} σε σχέση με τα F5 Rag^{-/-} ζώα, μια παρατήρηση που υποδεικνύει την πιθανή ανάμειξη του TNF στη μείωση των περιφερικών CD8⁺ T κυττάρων. Στο σύστημα αυτό καταγράφηκε επίσης στην απουσία του TNF, ένας χαρακτηριστικός διακριτός περιφερικός πληθυσμός CD8⁺ T κυττάρων με μειωμένο επίπεδο έκφρασης του υποδοχέα TCR, για την εμφάνιση του οποίου απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Επιπλέον, ένα ποσοστό των F5 κυττάρων στην απουσία του TNF, χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά θετικά για τον μάρτυρα ενεργοποίησης CD44, η έκφραση του οποίου απουσίαζε από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-}. Σε *in vitro* δοκιμασία διέγερσης με το πεπτίδιο, δεν καταγράφηκε διαφορά μεταξύ των δύο γονότυπων ως προς την παραγωγή INF γ , ενώ τα F5 κύτταρα από τα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα είχαν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-}, γεγονός που υποδεικνύει σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριο, ότι ο TNF μπορεί να επιδρά στο κατώφλι (threshold) ενεργοποίησης των CD8⁺ T κυττάρων, μειώνοντάς το. Τέλος στα ζώα αυτού του συστήματος καταγράφηκε στην απουσία του ενδογενούς TNF, *in vivo* κυτταροτοξικότητα ειδική για το πεπτίδιο NP, 19 ώρες μετά την παθητική μεταφορά κυττάρων στόχων φορτωμένων με το NP, η οποία δεν φαίνεται να μεσολαβείται από τη γκρανζύμη B και απουσιάζει από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου.

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι ο TNF φέρεται να εμπλέκεται στις αποκρίσεις των κυτταροτοξικών CD8⁺ T μειώνοντας το κατώφλι ενεργοποίησής τους, όπως και στην περιφερική κλωνική απαλοιφή τους στο σύστημα των F5 31Rag^{-/-} και F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων που μελετήθηκαν, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει την επαγωγή ανοχής σε αντιγόνα εαυτού *in vivo*.

SUMMARY

Tolerance induction of T cells in the periphery which is mediated through mechanisms that include anergy induction, immune deviation, activation induced cell death and dominant regulation by Tregs; protects host from adverse immune responses and autoimmunity. TNF is a multipotent cytokine which has drawn research attention due to both proinflammatory and immunosuppressive responses that is can mediate as well as its implication in mechanisms of peripheral tolerance.

In the system of self-tolerance of F531 Rag^{-/-} and F531 TNF^{-/-}Rag^{-/-} animals that we studied, which bear CD8⁺T cells with a transgenic TCR capable of recognizing the nucleoprotein NP peptide of A/NT/60/68 virus, while at the same time they express the NP antigen as self peptide in all tissues, reduced number of peripheral CD8⁺T cells was recorded as compared to the control animals (F5 Rag^{-/-} and F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} accordingly), which denotes the clonal deletion of F5 cells after the *in vivo* encounter with their cognate antigen. In the absence of TNF, in the F531 TNF^{-/-}Rag^{-/-} animals, the number of peripheral CD8⁺T cells was slightly reduced as compared to the F531 Rag^{-/-} animals, which implies a role of TNF in the peripheral clonal deletion. The F5 cells of both genotypes of the self-tolerance system, were positive for activation markers CD69 and CD44, which denotes their *in vivo* encounter with the antigen, while

they did not produce $\text{INF}\gamma$ nor did they proliferate in response to the *in vitro* rechallenge with the antigen, which denotes that these cells have been rendered anergic, a state that does not seem to be affected by TNF in this system.

In the control animals F5 Rag^{-/-} and F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} that we studied, where the CD8⁺T cells bear a transgenic TCR capable of recognizing the NP peptide, it was observed that in the absence of endogenous TNF a reduced number of peripheral CD8⁺T cells was recorded in the F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} animals as compared to the F5 Rag^{-/-} ones, an observation that implies the potential involvement of TNF in the reduction of peripheral CD8⁺T cells. In the same system, a distinctive separate peripheral population of CD8⁺T cells was recorded, which had a reduced expression level of the TCR receptor and this observation calls for more data regarding its generation. In addition, a percentage of the F5 cells were phenotypically characterized positive for the activation marker CD44 in the absence of TNF, the expression of which was absent from the control animals F5 Rag^{-/-}. In the *in vitro* NP challenge assay, no difference was observed between the two genotypes in regard to their $\text{INF}\gamma$ production, while the F5 cells of F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} animals had a reduced proliferative ability as compared to the F5 Rag^{-/-} ones, a fact that implies in accordance to previous results from the lab that TNF may affect the activation threshold of CD8⁺T cells, by means of lowering it. Finally, in the animals of this system, *in vivo* NP-antigen-specific cytotoxicity was recorded in the absence of TNF, 19 hours after the adoptive transfer of NP-loaded target cells, which does not seem to be mediated by granzyme B and is absent from control animals of F5 Rag^{-/-} genotype.

The above data show that TNF may be implicated in the responses of cytotoxic CD8⁺T cells by lowering their activation threshold, as well as in the peripheral clonal deletion in the system of F531 Rag^{-/-} and F531 TNF^{-/-}Rag^{-/-} animals that was studied, while it does not seem to affect the *in vivo* induction of tolerance against self peptides.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. Μέρος πρώτο: Βασικές πληροφορίες για τον TNF	5
1.2. Σηματοδότηση μέσω του TNF	6
1.3. Μέρος δεύτερο: Εκπαιδεύοντας τα T λεμφοκύτταρα στην ανοχή	7
1.4. Περιφερική ανοχή: TNF και ανέργεια	8
1.5. Περιφερική ανοχή: TNF και ανοσολογική παρέκκλιση	9
1.6. Περιφερική ανοχή: TNF και AICD	10
1.7. Περιφερική ανοχή: TNF και Tregs	11
1.8. Στόχος της μελέτης	13
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
Πειραματόζωα	14
Κυτταρική προετοιμασία	14
Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS)	14
<i>In vitro</i> διέγερση κυττάρων: δοκιμασία πολλαπλασιασμού και δοκιμασία παραγωγής INFγ	14
<i>In vivo</i> κυτταροτοξικότητα	15
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	16
3.1. Θύμος και κυτταρικοί υποπληθυσμοί	16
3.2. Περιφερικά λεμφικά όργανα: Σπλήνα	21
3.3.Περιφερικά λεμφικά όργανα: Λεμφαδένες πλωρικοί και μεσεντέριοι	28
3.4. <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός και παραγωγή INFγ σε απάντηση στο NP-αντιγόνο	34
3.5. <i>In vivo</i> κυτταροτοξικότητα	37
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μέρος πρώτο: Βασικές πληροφορίες για τον TNF

Ο TNF (Tumor Necrosis Factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων), είναι μία πολυδύναμη κυττοκίνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των TNF πρωτεϊνών και έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών ερευνών χάρη στις προφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές απαντήσεις που μπορεί να προκαλέσει.

Αυτή η κυττοκίνη περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975, ως ένας παράγοντας του ορού που παράγεται από τα μακροφάγα ως απάντηση στον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και οποίος μπορούσε να προκαλέσει την σμίκρυνση όγκων [1], ενώ ο αντίστοιχος ορθόλογος παράγοντας ανακαλύφθηκε ξεχωριστά στους επίμυες το 1985, ως ένα επαγόμενο από τον λιποπολυσακχαρίτη προϊόν των μακροφάγων, το οποίο ήταν υπεύθυνο για την καχεξία των ποντικών και ως εκ τούτου περιγράφηκε αρχικά ως καχεκτίνη (cachectin) [2].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο TNF αποτελείται από τέσσερα εξόνια και χαρτογραφήθηκε το 1985 μέσα στον γονιδιακό τόπο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC, major histocompatibility complex) στο χρωμόσωμα 6, στενά συνδεδεμένο με το γονίδιο που κωδικοποιεί την λυμφοτοξίνη άλφα (LTα) [3]. Ένα χρόνο αργότερα τα αντίστοιχα γονίδια του TNF και της λυμφοτοξίνης άλφα χαρτογραφήθηκαν στο χρωμόσωμα 17 των ποντικών [4]. Ο TNF είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, η οποία συντίθεται ως μία πρωτεΐνη 26kDa εκφραζόμενη στην πλασματική μεμβράνη, ενώ μπορεί επίσης να απελευθερωθεί ως διαλυτή πρωτεΐνη 17kDa μετά από την πρωτεολυτική δράση μιας μεταλλοπρωτεάσης (TACE, TNF converting enzyme) [5, 6]. Τόσο η διαλυτή μορφή (sTNF) όσο και η μεμβρανική μορφή (memTNF) του TNF είναι ενεργές στην ομοτρισμερισμένη μορφή τους και μπορούν να επάγουν την δράση τους συνδεδεμένες στους δύο ξεχωριστούς μεμβρανικούς υποδοχείς του TNF, τον υποδοχέα TNFR1 και τον υποδοχέα TNFR2 [7].

Τόσο ο μεμβρανικός υποδοχέας TNFR1(p60), ο οποίος εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα όπως και ο μεμβρανικός υποδοχέας TNFR2(p75), ο οποίος έχει μία περισσότερο περιορισμένη έκφραση στα ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα, είναι και οι δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I [7], που περιγράφηκαν το 1988 [8] και το 1990 [9] αντίστοιχα. Και οι δύο υποδοχείς μπορούν να συνδεθούν με τον TNF με υψηλή συγγένεια, ωστόσο τα δεδομένα παρουσιάζουν τον διαλυτό TNF να επάγει τη δράση του κυρίως μέσω του TNFR1 και τον μεμβρανικό TNF μέσω του TNFR2 [10]. Οι υποδοχείς μπορούν επίσης να συναντηθούν σε διαλυτή μορφή μετά από τη δράση της μεταλλοπρωτεάσης TACE [11] διατηρώντας την ικανότητά τους να δένουν τον TNF [12] και οι οποίοι μπορούν να δρουν σταθεροποιώντας ή ρυθμίζοντας τη δράση του TNF [7]. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα TNFR1, οι οποίες μειώνουν τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα και οδηγούν στο αυτοάνοσο σύνδρομο TRAPS, (TNF receptor associated periodic syndrome) υπογραμμίζουν τη σημασία των διαλυτών υποδοχέων στη ρύθμιση της δράσης του TNF [13].

Ο TNF παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα αλλά και από μία πλειάδα άλλων ενεργοποιημένων κυττάρων όπως τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα NK (Natural Killers) κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τους οστεοκλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ έχει επίσης βρεθεί να εκφράζεται στα αστροκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα [6, 14]. Στα ερεθίσματα που μπορούν να επάγουν την παραγωγή του TNF συγκαταλέγονται ο λιποπολυσακχαρίτης LPS, κυττοκίνες όπως η IL-1 και η IL-2, μιτογόνα καθώς και ο ίδιος ο TNF [15]. Δεδομένου του κυτταρικού μοτίβου έκφρασης του TNF όπως και των υποδοχέων του, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι TNF έχει ένα μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων επηρεάζοντας την αύξηση, διαφοροποίηση, ενεργοποίηση και επιβίωση πολλών κυττάρων, όπως και το γεγονός ότι ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις κυρίως κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης και της ανάκαμψης από βακτηριακές και ιικές λοιμώξεις [7, 16]. Επιπλέον, πέρα από τον καλά χαρακτηρισμένο ρόλο του στην κυτταροτοξικότητα μέσω των μακροφάγων, ο TNF μπορεί να επηρεάσει και άλλες διαδικασίες όπως την αναπαραγωγή και τον μεταβολισμό των λιπών και πρωτεϊνών [6, 17-19].

Επίσης ο TNF έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωριατική αρθρίτιδα, η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, η ψωρίαση και η ασθένεια του Crohn, ενώ τα ευεργετικά αποτελέσματα της αντί-TNF θεραπείας που έχουν καταγραφεί στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας έχουν πρωτοστατήσει για την δοκιμή της θεραπείας και σε άλλες ασθένειες [14, 20]. Ο TNF μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στο πλαίσιο αυτό και ως βιοδείκτης αφού σε υγιή άτομα τα επίπεδά του στον ορό δεν είναι ανιχνεύσιμα, ενώ τα αυξημένα ορολογικά επίπεδα του TNF σχετίζονται με την πρόοδο και τη σοβαρότητα ορισμένων ασθενειών [21-25].

Τέλος, ο TNF παρόλο το πολλά υποσχόμενο όνομά του (παράγοντας νέκρωσης όγκων) έχει περιορισμένη χρήση ως αντινεοπλαστικός παράγοντας λόγω της συστημικής τοξικότητας που προκαλεί [26] και για αυτό το λόγο θεραπείες με TNF σκευάσματα χαμηλής τοξικότητας είτε ειδικά στοχευμένες για διάθεση στα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται αυτή τη στιγμή σε εξέλιξη [27]. Παράλληλα αφού ο TNF έχει δείξει επίσης να διαθέτει προ-καρκινική δράση και μπορεί να συντελέσει στον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων [28], οι αντί-TNF παράγοντες θεωρούνται ως μία ελπιδοφόρα προσέγγιση θεραπείας και βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές [27].

1.2. Σηματοδότηση μέσω του TNF

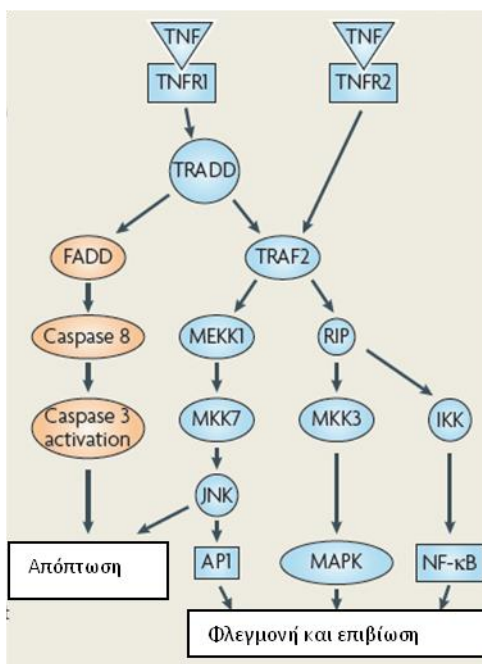
Η δυσκολία κατανόησης των πολλών λειτουργιών του TNF μπορεί επίσης να απεικονιστεί και στα περίπλοκα και αντικρουόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια που εκπορεύονται από αυτόν τον παράγοντα. Με βάση το κυτταρικό πλαίσιο, ο TNF μπορεί να σηματοδοτήσει μονοπάτια που οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση και την φλεγμονή μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB και ο AP-1, είτε στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών [27]. Ενώ και οι δύο υποδοχείς έχουν περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (cysteine-rich domains ,CRD) στις εξωκυτταρικές περιοχές τους, μόνο ο TNFR1 εμπεριέχει μία περιοχή θανάτου (death domain, DD) στην κυτταροπλασματική ουρά του [29] και για αυτό το λόγο θεωρείται υπεύθυνος για τη διαμεσολάβηση σημάτων κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου, ενώ ο υποδοχέας TNFR2 πιστεύεται ότι διαμεσολαβεί κυρίως σηματοδότηση επιβίωσης [30](εικόνα 1.1).

Καθόσον και οι δύο υποδοχείς του TNF στερούνται ενζυματικής δραστηριότητας στις ενδοκυτταρικές περιοχές τους, προκειμένου να διεκπεραιώσουν τη σηματοδότηση του TNF λειτουργούν ως περιοχές πρόσδεσης (docking sites) για έναν αριθμό πρωτεϊνών προσαρμοστών (adaptor proteins), μέσω χαρακτηριστικών μοτίβων των ενδοκυτταρικών ουρών τους [31]. Αυτές οι πρωτεΐνες προσαρμοστές περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες TRADD (TNF receptor associated death domain protein), TRAFs (TNF receptor associated factors), RIP (receptor interacting protein) και FADD (Fas associated death domain protein). Αν και μόνο ο TNFR1 υποδοχέας εμπεριέχει όπως αναφέρθηκε περιοχή θανάτου (DD) που του επιτρέπει να στρατολογεί πρωτεΐνες προσαρμοστές που έχουν επίσης περιοχή θανάτου (DD) όπως η TRADD και η FADD που οδηγούν σε σηματοδότηση απόπτωσης, ο TNFR2 μπορεί επίσης να οδηγήσει στο ίδιο αποτέλεσμα μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας (crosstalk) των σηματοδοτικών μονοπατιών [7, 32-34].

Η πρωτεΐνη TRADD είναι η κύρια πρωτεΐνη προσαρμοστής για τη σηματοδότηση του TNFR1, η οποία μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσει είτε στην απόπτωση είτε σε σηματοδότηση επιβίωσης και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Το μονοπάτι της απόπτωσης ξεκινά όταν ο TNF αφού προσδεθεί στον υποδοχέα TNFR1 δημιουργεί ένα σύμπλοκο TNF/TNFR1, το οποίο ενδοκυτταρώνεται σε κυστίδια όπου και συσχετίζεται με την πρωτεΐνη TRADD [35]. Η TRADD τότε μέσω της περιοχής θανάτου αλληλεπιδρά και στρατολογεί την FADD, η οποία με τη σειρά της μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης- πρωτεΐνης προσελκύει την προ-κασπάση 8, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα σύμπλοκο επαγωγής θανάτου (DISC, death inducing signal complex). Σε αυτό το σύμπλοκο η προ-κασπάση 8 ενεργοποιείται πρωτεολυτικά σε κασπάση 8, η οποία τότε αποχωρίζεται από το DISC και μεσολαβεί την ενεργοποίηση των υπολοίπων κασπασών του καταρράκτη, οδηγώντας έτσι στην απόπτωση [30, 36].

Στην περίπτωση σηματοδότησης του μονοπατιού επιβίωσης, η πρωτεΐνη TRADD προσελκύει την κινάση RIP και τη λιγάση TRAF-2, γεγονός το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και του AP-1 αντίστοιχα [31]. Αυτή η παρατήρηση προέρχεται από μελέτες απαλοιφής γονιδίων που αποκάλυψαν ότι η RIP είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κB και η TRAF-2 αντίστοιχα για την ενεργοποίηση του AP-1 [37, 38]. Αν και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι γνωστό ότι δρα ως αναστολέας της απόπτωσης [39], η ενεργοποίηση της MAPK μπορεί να οδηγήσει είτε να αποτρέψει τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο τα δεδομένα δείχνουν ότι ο TNF οδηγεί σε παροδική ενεργοποίηση της MAPK, η οποία ευνοεί την κυτταρική επιβίωση σε αντίθεση με την παρατεταμένη ενεργοποίησή της που ευνοεί τον κυτταρικό θάνατο [33]. Η πρωτεΐνη RIP επιτυγχάνει την ενεργοποίηση του NF-κB με το να ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK (inhibitor of κB kinase), το οποίο στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και οδηγεί στην αποδόμηση του IκB (inhibitor of κB) επιτρέποντας έτσι στον NF-κB να μετατοπιστεί στον πυρήνα [34] και να ξεκινήσει την μεταγραφή αντιαποπτωτικών γονιδίων όπως τα FLIP, cAP-1, cAP-2, TRAF-1, TRAF-2, Bcl-2, Bcl-XL και XIAP [33, 40]. Η μετατόπιση του TNFR1 σε λιπιδιακές σχεδίες (lipid rafts) μετά την πρόσδεση του TNF [35], όπως και η ενεργή σύνθεση πρωτεϊνών [31], πιστεύεται ότι είναι απαραίτητες για την πυροδότηση των σημάτων επιβίωσης μέσω του NF-κB.

Η σηματοδότηση του υποδοχέα TNFR2 έχει μελετηθεί σημαντικά λιγότερο σε σχέση με αυτή που εκπορεύεται από τον TNFR1 και ερευνητές έχουν προτείνει ένα παθητικό μοντέλο για την εξήγηση του ρόλου του TNFR2. Σε αυτό το μοντέλο, ο υποδοχέας TNFR2 λειτουργεί ως μία παγίδα υψηλής συγγένειας πρόσδεσης (high affinity trap) για τον TNF, η οποία εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού αποσυσχετισμού του συμπλόκου TNF/TNFR2, θεωρείται ότι παραδίδει τον TNF στον υποδοχέα TNFR1, ενισχύοντας είτε και ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο το αποπτωτικό μονοπάτι του TNFR1 [30, 36]. Ωστόσο άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο υποδοχέας TNFR2 είναι ικανός να σηματοδοτεί ανεξάρτητα από τον TNFR1, τόσο προσελκύνοντας την πρωτεΐνη TRAF-2 [36], όσο και ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη Etk (endothelial tyrosine kinase) η οποία παίρνει μέρος σε σηματοδότηση πολλαπλασιασμού και επιβίωσης [14].



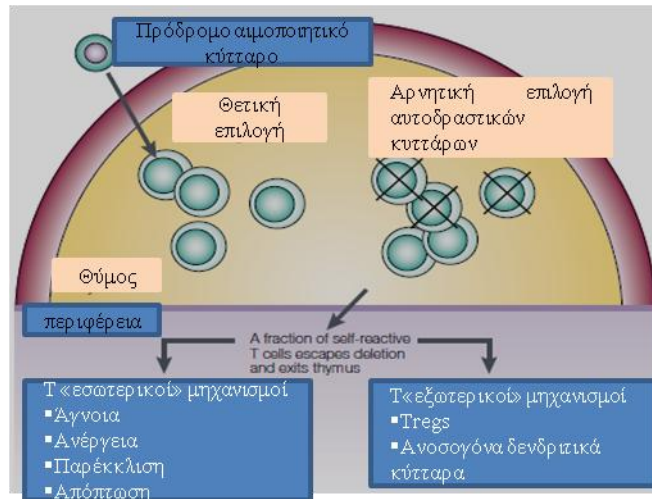
Εικόνα 1.1: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TNF. Ο TNF είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής της μοίρας του κυττάρου, ο οποίος με βάση το κυτταρικό πλαίσιο μπορεί να ξεκινήσει σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν είτε στην μεταγραφή φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και αντιαποπτωτικών γονιδίων, είτε στην μεσολαβούμενη από τις κασπάσες απόπτωση (η εικόνα έχει προσαρμοστεί από [27]).

1.3. Μέρος δεύτερο: Εκπαιδεύοντας τα T λεμφοκύτταρα στην ανοχή

Ένα από τα πλέον συναρπαστικά χαρακτηριστικά του ανοσολογικού συστήματος είναι η ικανότητά του να δημιουργεί ανοσολογικές προστατευτικές αποκρίσεις απαλείφοντας επιζήμια εισβάλλοντα παθογόνα, εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα τον οργανισμό από παράπλευρες βλάβες. Αφού ένας από τους κύριους συμμετέχοντες που διασφαλίζουν την προστασία του οργανισμού είναι τα T λεμφοκύτταρα, τα οποία δημιουργούνται φέροντας έναν υποδοχέα TCR (T cell receptor) ικανό να αναγνωρίζει πεπτίδια μόνο υπό το πλαίσιο εαυτού-MHC μορίων, είναι απαραίτητο για την ευημερία του οργανισμού να εκπαιδεύσει την ανοχή των T κυττάρων ως προς τα πεπτίδια του εαυτού. Αυτή η διαδικασία εκπαίδευσης των T κυττάρων λαμβάνει χώρα αρχικά στον θύμο, όπου ο μηχανισμός της κεντρικής ανοχής απαλείφει τη μεγαλύτερη πλειονότητα των αυτοδραστικών T κυττάρων και αργότερα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα μέσω των μηχανισμών της περιφερικής ανοχής. Η σημαντικότητα αυτής της εκπαίδευσης των T κυττάρων είναι εμφανής σε περιπτώσεις όπου αυτοί οι μηχανισμοί είναι ελαττωματικοί οδηγώντας σε κατάρρευση της ανοχής και δημιουργία αυτοανοσίας [41-44].

Στον θύμο όπου διαδραματίζεται το μεγαλύτερο μέρος της εκπαίδευσης των T κυττάρων, η κεντρική ανοχή λειτουργεί μέσω της θετικής θυμικής και αρνητικής θυμικής επιλογής βεβαιώνοντας αντίστοιχα ότι τα ώριμα T θυμοκύτταρα είναι ικανά να αναγνωρίζουν τα πεπτίδια στο πλαίσιο των εαυτού-MHC μορίων, ενώ δεν είναι ταυτόχρονα αυτοδραστικά [44]. Με αυτόν τον τρόπο απαλείφεται η πλειονότητα των αυτοδραστικών T, επειδή όμως μία πολύ αυστηρή αρνητική επιλογή θα μπορούσε να μειώσει επικίνδυνα το διαθέσιμο φάσμα TCR υποδοχέων για την αναγνώριση και καταπολέμηση των παθογόνων, ένα μικρό μέρος T κυττάρων που έχουν χαμηλή συγγένεια του TCR για πεπτίδια εαυτού παραμένει και υπόκειται στους περιφερικούς μηχανισμούς ανοχής, όπως μαρτυρά και η παρουσία εν δυνάμει αυτοδραστικών T κυττάρων στην περιφέρεια υγιών ατόμων [45, 46].

Η αποτροπή επιβλαβών ανοσολογικών αποκρίσεων εγχειρόμενη από εν δυνάμει αυτοδραστικά T κύτταρα που έχουν αποδράσει από τον μηχανισμό της θυμικής κεντρικής ανοχής, όπως και η αποφυγή τέτοιων αποκρίσεων σε αβλαβή διαιτητικά και περιβαλλοντικά αντιγόνα [47], μεσολαβείται από επιπρόσθετους μηχανισμούς που υπάρχουν στην περιφέρεια εκπαιδεύοντας περαιτέρω την ανοχή στα T κύτταρα. Οι μηχανισμοί αυτοί περιγράφονται από τον όρο περιφερική ανοχή και περιλαμβάνουν την άγνοια (ignorance) ως προς το πεπτίδιο, την ανέργεια (anergy), την ανοσολογική παρέκκλιση (immunological deviation/ phenotype skewing), την απόπτωση ή κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση (AICD), τη ρύθμιση από T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και από ανοσογόνα δενδριτικά κύτταρα (tolerogenic DCs). Σχηματικά οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν επίσης να υποδιαιρεθούν και σε μηχανισμούς «εσωτερικούς» (intrinsic) των T κυττάρων και μηχανισμούς «εξωτερικούς» (extrinsic) όταν η ρύθμιση των T κυττάρων μεσολαβείται από άλλους κυτταρικούς τύπους [45](εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2.: Μηχανισμοί ανοχής. Η κεντρική ανοχή λειτουργεί στον θύμο μέσω της θετικής και αρνητικής επιλογής διασφαλίζοντας την απαλοιφή του μεγαλύτερου μέρους των αυτοδραστικών T κυττάρων, ενώ επιπρόσθετοι μηχανισμοί «εσωτερικοί» των T κυττάρων είτε «εξωτερικοί» επιβαλλόμενοι στα T κύτταρα από άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, λειτουργούν στην περιφέρεια διασφαλίζοντας την εκπαίδευση των εν δυνάμει T αυτοδραστικών φυγάδων του θύμου. (Η εικόνα έχει προσαρμοστεί από [45])

Προτού περιγραφεί αναλυτικά ο ρόλος του TNF στους μηχανισμούς ανοχής της περιφέρειας, είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι ο TNF μπορεί να εμπλέκεται στη διαδικασία εκπαίδευσης των T κυττάρων ήδη από το στάδιο της κεντρικής ανοχής που συντελείται στον θύμο. Δεδομένα καταγράφουν την έκφραση του TNF στο θύμο τόσο στα ποντίκια[48] όσο και στον άνθρωπο[49] και μάλιστα το mRNA του TNF έχει βρεθεί σε περιοχή του θύμου (υποφλοιϊκή μυελική μοίρα του θύμου, subcortical medulla) [50], η οποία θεωρείται σημαντική στην επιλογή θυμοκυττάρων. Άλλα δεδομένα προτείνουν ότι ο TNF ρυθμίζει τη διαφοροποίηση και κυτταρική δέσμευση διαφοροποίησης (commitment) των θυμοκυττάρων με το να επάγει την έκφραση του CD25[51], όπως και τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των άωρων θυμοκυττάρων παρέχοντας τόσο θετικά όσο και αρνητικά σήματα [50, 51]. Επιπλέον, ο TNF έχει βρεθεί να ρυθμίζει την ομοιόσταση των θυμοκυττάρων σε ένα μοντέλο επαγόμενης από τον λιποπολυσακχαρίτη LPS-απόπτωσης των θυμοκυττάρων, η οποία αναστάληκε μετά από τη χορήγηση αντί- TNF [52].

Από την άλλη τα δεδομένα σχετικά με τον ρόλο του TNF στην αρνητική θυμική επιλογή είναι αντιφατικά μέχρι στιγμής αφού αναφέρουν ότι ο TNF μπορεί να είναι επουσιώδης στην αρνητική επιλογή όπως καταγράφηκε σε δύο μοντέλα in vivo αντιγονοεπαγόμενης αρνητικής επιλογής [53, 54], είτε να την προάγει όπως αναφέρεται σε μία in vitro μελέτη καλλιέργειας θυμοκυττάρων στην οποία παρατηρήθηκε σημαντικά περισσότερος κυτταρικός θάνατος μετά τη χορήγηση TNF [55], όπως και σε μία μελέτη TNFRKO ζώων στα οποία παρατηρήθηκε ελαττωματική αρνητική θυμική επιλογή [56]. Επιπλέον, ο TNF είναι πιθανόν να συμμετέχει στη ρύθμιση των T ρυθμιστικών (Tregs) κυττάρων του θύμου όπως αποκαλύπτουν δεδομένα από NOD ζώα στα οποία καταγράφηκαν μειωμένοι αριθμοί CD4+CD25+κυττάρων στο θύμο και στη σπλήνα, οι οποίοι αυξήθηκαν μετά από ένεση με αντί- TNF [47, 57]. Τα παραπάνω δεδομένα στο σύνολό τους συνηγορούν για έναν σημαντικό ρόλο του TNF στη διαμόρφωση της κεντρικής ανοχής στον θύμο.

1.4. Περιφερική ανοχή: TNF και ανέργεια

Καθώς τα εν δυνάμει αυτοδραστικά T κύτταρα εγκαταλείπουν τον θύμο και μεταναστεύουν στην περιφέρεια, ενδέχεται να συναντήσουν εκεί πεπτιδία εαυτού. Το αποτέλεσμα ωστόσο αυτής της συνάντησης (εάν τα T κύτταρα θα ενεργοποιηθούν, θα απαλειφτούν, είτε θα γίνουν άνεργα) εξαρτάται από το σύνολο των σημάτων που δέχονται. Σύμφωνα με τη θεωρία των δύο σημάτων (η οποία έχει προταθεί για να εξηγήσει κυρίως τον τρόπο ενεργοποίησης των κυττάρων) τα κύτταρα «επαγγελματίες» αντιγονοπαρουσιαστές APCs μπορούν να ενεργοποιήσουν τα T κύτταρα παρέχοντας σε αυτά δύο σήματα :1) ένα αντιγονο-ειδικό σήμα μέσω της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου αντιγόνο-MHC μορίων με τον υποδοχέα TCR και 2) συνδιεγερτικά σήματα μέσω της αλληλεπίδρασης επιφανειακών μορίων. Στην απουσία συνδιέγερσης ένα εν δυνάμει αυτοδραστικό T κύτταρο το οποίο δεν έχει απαλειφθεί στον θύμο, θα γίνει άνεργο [47, 58].

Ο όρος της ανέργειας είναι μια λειτουργική ιδιότητα των T κυττάρων, η οποία είναι μια ενεργός διαδικασία και εξαρτάται από την συνεχή παρουσία του αντιγόνου στην περιφέρεια [47]. Σε αυτήν την υποδραστική κατάσταση της ανέργειας, τα T κύτταρα είναι ανίκανα να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν κυττοκίνες όπως η IL-2 ως απάντηση σε συναντήσεις τους με το αντιγόνο [59]. Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μετά την ανακάλυψη και άλλων συνδιεγερτικών μορίων πάνω στα T κύτταρα όπως το CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4) και το PD-1(programmed death-1), είναι εμφανές ότι η πρόκληση της ανέργειας δεν

βασίζεται αποκλειστικά στην αλληλεπίδραση των APCs με τα T κύτταρα καθώς και ότι πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχουν στην πρόκλησή της [58, 60].

Τα μοναδικά μέχρι στιγμής δεδομένα για την εμπλοκή του TNF στην επαγωγή ανέργειας των T κυττάρων προέρχονται από την μελέτη των Chatzidakis *et al.*[61], οι οποίοι κατέγραψαν ότι στο μοντέλο τους τα T κύτταρα στην απουσία ενδογενούς TNF έφεραν έναν ελαττωματικό άνεργο φαινότυπο μετά από την *in vivo* αλληλεπίδρασή τους με το αντιγόνο. Πιο συγκεκριμένα αδαή F5TNF^{-/-}T κύτταρα (T κύτταρα με TCR που αναγνωρίζει το αντιγόνο NP) μεταφέρθηκαν παθητικά σε αποδέκτες (NP47/TNF^{-/-}) που εκφράζουν το αντιγόνο NP ως πεπτιδίο εαυτού στην περιφέρεια και 26 μέρες μετά την μεταφορά τα F5TNF^{-/-}T κύτταρα απομονώθηκαν από τη σπλήνα των αποδεκτών και μελετήθηκε η απάντησή τους σε *in vitro* επαναδιέγερση με το αντιγόνο NP. Ένα μέρος των απομονωμένων από NP47/TNF^{-/-} αποδέκτες F5TNF^{-/-}T κυττάρων διατήρησε την ικανότητα πολλαπλασιασμού σε απάντηση επαναδιέγερσης με το αντιγόνο NP, μια ικανότητα που έλειπε από τα κύτταρα των ζώων μάρτυρες τα οποία είχαν καταστεί άνεργα μετά την *in vivo* έκθεσή τους στο αντιγόνο. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι στο συγκεκριμένο μοντέλο ο TNF μπορεί να εμπλέκεται στην επαγωγή ανέργειας των T κυττάρων.

1.5. Περιφερική ανοχή: TNF και ανοσολογική παρέκκλιση

Τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα είναι επίσης γνωστά και ως κύτταρα «βοηθοί» χάρη στην ικανότητά τους να ενισχύουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις παρέχοντας βοήθεια σε άλλους κυτταρικούς τύπους όπως τα B λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια ενεργοποίησης από τα APCs, τα άωρα CD4⁺ κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικές υποκατηγορίες με βάση τα σήματα που δέχονται από το περιβάλλον τους. Κυτταροκίνες, χυμοκίνες και άλλοι παράγοντες μπορούν να συμβάλλουν στη σηματοδότηση των CD4⁺ T κυττάρων και στο αποτέλεσμα της δέσμευσής τους. Με αυτόν τον τρόπο η IL-12 και η INF γ οδηγούν στη δημιουργία της TH1 υποκατηγορίας CD4⁺ T κυττάρων, ενώ η IL-4 και η IL-6 στη δημιουργία της TH2 υποκατηγορίας (ανασκοπήσεις [62-65]).

Αυτές οι υποκατηγορίες των CD4⁺T κυττάρων εκφράζουν διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες και παράγουν διαφορετικές κυττοκίνες, οι οποίες ενισχύουν διαφορετικές ανοσολογικές αποκρίσεις και δρουν ταυτόχρονα ως παράγοντες ανάπτυξης της υποκατηγορίας που τις παράγει και ως παράγοντες αναστολής για την άλλη υποκατηγορία, ελέγχοντας έτσι η μία την δραστηριότητα της άλλης [64]. Η TH1 υποκατηγορία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή IL-2 και INF γ , οι οποίες βοηθούν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και των κυτταροτοξικών CD8⁺ T κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε μία ανοσολογική απάντηση κυτταρικού τύπου που συμβάλει στην απαλοιφή ιών και ενδοκυττάρων βακτηρίων. Από την άλλη πλευρά, η TH2 υποκατηγορία παράγει τις ιντερλευκίνες IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 και IL-13, οι οποίες προάγουν την διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων οδηγώντας σε μία ανοσολογική απάντηση μεσολαβούμενη από αντισώματα, βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία ενάντια σε εξοκυττάρια παθογόνα [63, 65]. Για τους παραπάνω λόγους η διασταυρούμενη ρύθμιση της μίας υποκατηγορίας από την άλλη είναι πολύ σημαντική αφού μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές ανοσολογικές απαντήσεις και επιζήμια αποτελέσματα όταν δεν είναι ισορροπημένη.

Σε αυτό το πλαίσιο η ανοσολογική παρέκκλιση αναφέρεται στην ικανότητα των παραγόμενων κυττοκινών να μπορούν να ελέγξουν και να αλλάξουν την ανοσολογική απάντηση από μία απάντηση TH1 κυτταρικού τύπου σε TH2 τύπου μεσολαβούμενη από αντισώματα ή και το αντίθετο προκειμένου να αποφευχθούν επιζήμια αποτελέσματα για τον οργανισμό. Έτσι η INF γ μπορεί να αναστείλει την πόλωση της διαφοροποίησης των CD4⁺T κυττάρων προς την TH2 υποκατηγορία, ενώ οι ιντερλευκίνες IL-4, IL-6 και IL-10 μπορούν να εμποδίσουν την διαφοροποίηση της TH1 υποκατηγορίας [63]. Αυτή η στρατηγική αποτελεί ακόμα έναν μηχανισμό ανοχής, όπως έχει περιγραφεί στην περίπτωση της από του στόματος επαγόμενης ανοχής κατά την οποία παράγονται IL-4 και IL-10 ευνοώντας μία ανοσολογική απάντηση TH2 τύπου [66]. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι το μοντέλο της TH1/ TH2 παρέκκλισης είναι απλουστευτικό, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις οι ανοσολογικές απαντήσεις δεν είναι αυστηρά είτε TH1 είτε TH2 τύπου αλλά ένας συνδυασμός και των δύο, ενώ υπάρχουν επίσης και άλλες υποκατηγορίες CD4⁺ T κυττάρων, όπως τα TH17, T_h(follicular help) και τα επαγόμενα T ρυθμιστικά (induced Tregs), οι οποίες μπορούν να προκύψουν από το ίδιο πρόδρομο αδιαφοροποίητο CD4⁺ T κύτταρο και λειτουργούν ελέγχοντας τη δράση των άλλων υποκατηγοριών, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα σύνθετο σύστημα ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης [64, 65].

Καθώς ο TNF παράγεται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους [14], είναι λογικό να αναμένει κανείς ότι μπορεί να επηρεάσει τον περιβάλλοντα χώρο των κυττάρων και να μεταβάλλει την TH1/ TH2 πόλωση. Μελέτες *in vitro* σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν δείξει ότι η συνδιέγερση των TCR/CD28/TNFR2 ανέστειλε την παραγωγή IL-2 και IL-10, αφήνοντας την παραγωγή του TNF και της INF γ άθικτη. Στην ίδια μελέτη δείχτηκε ότι η συνδιέγερση των TCR/TNFR2 μπορεί να ρυθμίσει την παραγωγή κυττοκινών από τα T κύτταρα διαφορετικά από την συνδιέγερση των TCR/CD28, με την πυροδότηση του TNFR2 να οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή IL-13 και αναστολή παραγωγής των IL-2 και IL-10 σε σχέση με την διέγερση μόνο μέσω του CD28. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι ο TNF προάγει την πόλωση προς την TH1 υποκατηγορία κυττοκινών, αφού δύο κυττοκίνες που οδηγούν στην TH2 ήταν μειωμένες (IL -13) είτε είχαν ανασταλεί (IL-10) [67].

Επιπλέον τα αποτελέσματα της δράσης του TNF πάνω στην TH1/TH2 πόλωση μπορεί να διαφέρουν με βάση τη διάρκεια της έκθεσης στον TNF. Μελέτες *in vitro* σε ανθρώπινα αντιγόνο-ειδικά T κύτταρα που είχαν προ-επεξεργαστεί για 14 έως 16 ημέρες με TNF, έδειξαν μειωμένα επίπεδα IL-2, INF γ και TNF μετά από διέγερσή τους με το αντιγόνο, ενώ η παραγωγή της IL-10 δεν ήταν ανιχνεύσιμη, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η παρατεταμένη έκθεση στον TNF μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία των κυττοκινών τόσο της TH1 όσο και της TH2 υποκατηγορίας [68]. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε αργότερα σε μοντέλα ζώων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα ποντίκια που έλαβαν ενέσεις TNF για μια περίοδο 3 εβδομάδων, είχαν 50% μείωση στα επίπεδα των IL-2, INF γ , IL-4 και IL-10 που παράγονται τα T λεμφοκύτταρά τους μετά από αντιγονική διέγερση σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Επιπλέον επεξεργασία 12 ημερών T κυττάρων με TNF, προερχόμενων από ποντίκια BALB/c τα οποία έχουν TH2 τύπου προφίλ κυττοκινών και προερχόμενα από B10.D2 ποντίκια που έχουν TH1 προφίλ, οδήγησε στη σημαντική μείωση παραγωγής τόσο των TH1 όσο και των TH2 τύπου κυττοκινών μετά από αντιγονική πρόκληση των T κυττάρων, ενώ η χορήγηση αντί-TNF ανέστρεψε αυτό το αποτέλεσμα, υποδηλώνοντας ότι η παρατεταμένη έκθεση στον TNF μπορεί να καταστείλει την παραγωγή κυττοκινών και από τις δύο υποκατηγορίες CD4+T κυττάρων [69].

Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν σε έναν σημαντικό ρόλο του TNF στη ρύθμιση της TH1/TH2 ισορροπίας των CD4+ T κυττάρων «βοηθών», υποδεικνύοντας ότι μπορεί να κατευθύνει την πόλωση της ανοσολογικής απάντησης στον TH1 τύπο, είτε να καταστείλει και τις δύο υποκατηγορίες με βάση τη διάρκεια της έκθεσης των T κυττάρων στον TNF, εμπλέκοντας τον παράγοντα αυτόν σε μία πιθανή συμμετοχή στην πρόκληση ανοχής μέσω ανοσολογικής παρέκκλισης.

1.6. Περιφερική ανοχή: TNF και AICD

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό μηχανισμό για διαφορετικά γεγονότα της βιολογίας των T κυττάρων όπως η ανάπτυξή τους, η σμίλευση του φάσματος του T υποδοχέα και η ομοιοστάση. Όταν τα αδαή T κύτταρα που κυκλοφορούν στην περιφέρεια συναντούν το ειδικό για τον υποδοχέα τους αντιγόνο παρουσιαζόμενο από ενεργοποιημένα APCs, τότε ενεργοποιούνται και εισέρχονται σε μία κατάσταση πολλαπλασιασμού, προτού διαφοροποιηθούν σε κύτταρα τελεστές ή δράστες. Τα CD8+T κύτταρα δράστες, όπως και τα κύτταρα «φυσικοί φονιάδες» NK της έμφυτης ανοσίας που δεν χρειάζονται ενεργοποίηση, μπορούν στη συνέχεια να προκαλέσουν το θάνατο σε κύτταρα στόχους είτε παράγοντας κυττοκίνες όπως η INF γ και ο TNF, είτε σηματοδοτώντας μέσω υποδοχέων θανάτου όπως οι αλληλεπιδράσεις των Fas/FasL και TNF/TNFRs, είτε τέλος μέσω περφορίνης (perforin) και γκρανζύμων(granzymes). Η φάση πολλαπλασιασμού που ακολουθεί την ενεργοποίηση των T κυττάρων διασφαλίζει ότι δημιουργείται ικανός αριθμός αντιγόνο-ειδικών T κυττάρων για την καταπολέμηση των παθογόνων. Μετά την απαλοιφή του αντιγόνου, τα T κύτταρα υπόκεινται σε μία φάση μείωσης του αριθμού τους κατά τη διάρκεια της οποίας ευαισθητοποιούνται στην απόπτωση και ο μεγαλύτερος αριθμός των κλωνικά επεκταμένων T κυττάρων δραστών απαλείφεται, ενώ ένα μικρό ποσοστό αντιγόνο-ειδικών T κυττάρων επιβιώνει και διαφοροποιείται περαιτέρω σε κύτταρα μνήμης, ικανά να απαντήσουν άμεσα σε επόμενη συνάντησή τους με το ίδιο αντιγόνο. Η απόπτωση κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής είναι σημαντική για τη διατήρηση της ομοιοστάσης των T κυττάρων, αφού μειώνει τον αριθμό τους σε κανονικά επίπεδα και αποτρέπει τη δημιουργία αυτοανοσίας (ανασκοπήσεις [70-73]).

Ο επαγόμενος μετά από ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος (AICD, activation induced cell death) από την άλλη πλευρά, περιγράφει την διαδικασία κατά την οποία επάγεται θάνατος όταν ένα ήδη ενεργοποιημένο T κύτταρο δέχεται σηματοδότηση μέσω του TCR χωρίς την παρουσία συνδιέγερσης και η διαδικασία αυτή της απόπτωσης περιλαμβάνει τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά (μιτοχόνδρια και Bcl-2, λυσοσωμικές καθεψίνες) μονοπάτια επαγωγής θανάτου [71]. Όσον αφορά το εξωτερικό μονοπάτι, η δέσμευση του συνδέτη σε υποδοχείς θανάτου όπως ο Fas, οι TNFRs και ο TRAILR (ο οποίος εμπλέκεται κυρίως στην απόπτωση των «αβοήθητων» CD8+ T κυττάρων[74]), οδηγεί σε απόπτωση μέσω κασπασών των κυττάρων που φέρουν τους υποδοχείς αυτούς [71, 72]. Σε αυτό το πλαίσιο είναι ενδιαφέρον να διευκρινιστεί πως η σηματοδότηση μέσω του TCR μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση των T κυττάρων, ενώ μία δεύτερη σηματοδότηση μέσω του TCR μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο. Αυτή η απόφαση μπορεί να υπόκειται στην αναλογία προ- και αντι-αποπτωτικών μορίων που επάγονται κατά την TCR σηματοδότηση, μία αναλογία η οποία εξαρτάται τόσο από την ένταση της διέγερσης μέσω του TCR και των συνδιεγερτικών σημάτων που παρέχονται στα T κύτταρα, όσο και στη διάθεση πρωτεϊνών προσαρμοστών στη συνέχεια των σηματοδοτικών αυτών μονοπατιών[71].

Όσον αφορά το θάνατο ενεργοποιημένων T κυττάρων *in vitro* δεδομένα καταδεικνύουν ότι ο επαγόμενος μετά από ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος μεσολαβείται στην περίπτωση αυτή κυρίως μέσω της Fas/FasL σηματοδότησης [73, 75]. Η έκφραση του FasL επάγεται στα ενεργοποιημένα T κύτταρα μετά από επαναδιέγερση του TCR και οδηγεί στην απόπτωση των T κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα θανάτου Fas [72], ενώ η σημασία αυτού του μονοπατιού στη διατήρηση της ομοιοστάσης των T κυττάρων διαφαίνεται σαφώς σε περιπτώσεις μεταλλαγών του Fas γονιδίου που οδηγούν στην εμφάνιση αυτοάνοσου λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου τόσο στον άνθρωπο (ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome) όπως και σε παρόμοιο σύνδρομο στα ποντίκια [45].

Από την άλλη πλευρά τα δεδομένα που αφορούν στη συμμετοχή του TNF και των υποδοχέων του στον AICD είναι αντιφατικά, αντανακλώντας όχι μόνο τις διαφορές στις πειραματικές προσεγγίσεις αλλά και τη συμμετοχή στον κυτταρικό θάνατο διαφορετικών

σηματοδοτικών μονοπατιών. Αρχικά *in vitro* πειράματα κατέδειξαν ότι ο TNF μεσολαβεί τον AICD ώριμων ανθρώπινων και ποντικίστων T λεμφοβλαστών χωρίς τη συμμετοχή του Fas μονοπατιού[76]. Επιπλέον σε ένα μοντέλο όπου τα ζώα είχαν δεχτεί αντί-TNF τρεις μέρες αφού είχαν δεχτεί παθητικά TCR-διαγονιδιακά T κύτταρα και ένεση πεπτιδίου, ο TNF θεωρήθηκε υπεύθυνος από τους ερευνητές για την ενδοπαθιακή απόπτωση των T κυττάρων[77]. Σε αντίθεση ο TNF θεωρήθηκε επουσιώδης για την απόπτωση CD8+T κυττάρων σε TNFKO ποντίκια που είχαν μολυνθεί με τον ιό LCMV(lymphocytic choriomeningitis virus)[78], όπως και στην περίπτωση ανθρώπινων κυττάρων μετά από διέγερση μέσω α-CD3, όπου η *in vitro* ουδετεροποίηση του TNF καθώς και η χορήγηση TNF δεν είχαν κάποια επίδραση στον AICD αυτών των κυττάρων [79]. Επιπροσθέτως η παρεμπόδιση του TNF ανέστειλε την απόπτωση σε TCR-διαγονιδιακά ποντίκια ανεπαρκή για το Fas μονοπάτι (TCR *tg-lpr/lpr*) αλλά όχι σε TCR-διαγονιδιακά ποντίκια χωρίς έλλειψη του Fas, δείχνοντας ότι τόσο ο TNF όπως και ο Fas συμμετέχουν στον AICD των περιφερικών T κυττάρων[80].

Ο υποδοχέας TNFR1 καταδείχτηκε ότι μπορεί να μεσολαβήσει την απόπτωση κυτταροτοξικών T κυττάρων (CTL, cytotoxic T lymphocytes) *in vivo* σε ένα μοντέλο LCMV διαμόλυνσης TCR διαγονιδιακών ποντικών [81], ενώ σε δύο παρόμοια LCMV μοντέλα ποντικών τόσο ο TNFR1, όσο και ο Fas καταγράφηκαν ως επουσιώδεις για την απόπτωση των CD8+T κυττάρων *in vivo*[78, 82]. Σε αντίθεση οι *Nguyen et al.* κατέληξαν ότι ο TNFR1 και ο Fas συμμετέχουν στην αντιγονο-επαγόμενη απαλοιφή των T κυττάρων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως κατέγραψαν σε TNFR1-/- και *lpr/lpr* ποντίκια [82]. Στο ίδιο θέμα, τα δεδομένα από τους *Miller et al.* συνηγορούν ότι ο TNFR2 και όχι ο TNFR1 είναι απαραίτητος για την απόπτωση των CTL μετά από υπερδιεγερτική ενεργοποίηση (supra-optimal) [83]. Επιπλέον μία άλλη έρευνα που χρησιμοποίησε *in vitro* καλλιέργειες ποντικίστων T κυττάρων αναφέρει ότι ο TNFR2 χρειάζεται και τη σηματοδότηση Fas/FasL για την επαγωγή θανάτου σε ενεργοποιημένα CD8+T κύτταρα, ενώ επίσης λειτουργεί αυξάνοντας την απόπτωση των ενεργοποιημένων CD4+ και CD8+ T κυττάρων που μεσολαβείται μέσω του TNFR1 σε υψηλές συγκεντρώσεις του TNF [84]. Σε αντίθεση οι *Kim et al.* έδειξαν σε ένα μοντέλο παθητικής μεταφοράς TNFR2-/- TCR διαγονιδιακών CD8+T κυττάρων σε ποντίκια που εκκρίνουν το ειδικό για τον TCR αντιγόνο, ότι τα TNFR2-/-T κύτταρα υπέκυψαν σε σημαντικά περισσότερη απόπτωση [85].

Τα παραπάνω δεδομένα που περιγράφουν το ρόλο του TNF και των υποδοχέων του στον AICD των ενεργοποιημένων T κυττάρων δεν παρέχουν μία ξεκάθαρη απάντηση, δίνουν όμως τη βάση για την επιχειρηματολογία ότι ο TNF και οι δύο υποδοχείς του εμπλέκονται ως ένα βαθμό σε αυτόν τον μηχανισμό της περιφερικής ανοχής με το να επάγουν πιθανόν σε συνεργασία με άλλα μονοπάτια, όπως αυτό του Fas, την απόπτωση σε ενεργοποιημένα T κύτταρα.

1.7. Περιφερική ανοχή: TNF και Tregs

Η περιφερική ανοχή που διασφαλίζει ότι κύτταρα του εαυτού δεν θα επιτεθούν στον ίδιο τον οργανισμό περιλαμβάνει εκτός από «εσωτερικούς» και «εξωτερικούς» μηχανισμούς, όπως ειδικούς υποπληθυσμούς κυττάρων των οποίων η δράση διασφαλίζει τη διατήρηση της περιφερικής ανοχής και την αποφυγή δημιουργίας αυτοάνοσων ασθενειών. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα Tregs, διαχωρίζονται φαινοτυπικά με βάση τους επιφανειακούς μάρτυρες ως CD4+CD25+ κύτταρα τα οποία πιστοποίησαν τον ρυθμιστικό ρόλο τους στην περιφερική ανοχή μέσω πειραματικών μοντέλων ζώων στα οποία η εμφάνιση διάφορων αυτοάνοσων ανοσολογικών διαταραχών όταν τα CD4+CD25+ κύτταρα απαλείφονταν, αποτρεπόταν με την αποκατάσταση αυτού του κυτταρικού υποπληθυσμού [86]. Αργότερα η σημασία των Tregs στον άνθρωπο έγινε εμφανής σε ασθενείς με το σύνδρομο IPEX (immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked), οι οποίοι αναπτύσσουν οργανοειδική αυτοανοσία και άλλες ανοσοπαθολογίες λόγω μεταλλάξεων στον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 (Forkhead box P3) [87, 88], ενώ τον ίδιο καιρό στο στέλεχος ποντικών scurfy, το οποίο φέρει μια υποτελή X-συνδεδεμένη μεταλλαγή που οδηγεί στον θάνατο των ημίζυγων αρσενικών ζώων και εμφανίζουν υπερενεργοποίηση των CD4+T κυττάρων, ο FoxP3 αναγνωρίστηκε ως ο καθοριστικός παράγοντας που κυβερνά τη διαφοροποίηση των CD4+ T κυττάρων σε Tregs [89, 90].

Εκτός από τα «φυσικά» εμφανιζόμενα Tregs (nTregs, natural Tregs) τα οποία παράγονται στον θύμο μετά από θετική επιλογή κυττάρων με υψηλή συγγένεια του TCR για μόρια πεπτιδία-εαυτού-MHC-II [91], καταγράφηκε το 2003 ότι η έκφραση του FoxP3 και η ρυθμιστική δράση μπορούσε να επαχθεί σε περιφερικά αδαή CD4+CD25- T κύτταρα μετά από TCR και TGFβ σηματοδότηση [86]. Τα δεδομένα μέχρι στιγμής αναδεικνύουν τα επαγόμενα Tregs (iTregs, induced Tregs) υπεύθυνα για τον έλεγχο της χρόνιας αλλεργικής φλεγμονής και για τη διατήρηση της ανοχής σε διαιτητικά και περιβαλλοντικά αντιγόνα, μειώνοντας την ίδια στιγμή με τη δράση τους την απαλοιφή παρασίτων και καρκινικών κυττάρων, ενώ τα «φυσικά» εμφανιζόμενα nTregs θεωρούνται υπεύθυνα για την αποφυγή της αυτοανοσίας [92]. Ωστόσο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν τα «φυσικά» εμφανιζόμενα nTregs και τα επαγόμενα iTregs έχουν διακριτές ή επικαλυπτόμενες λειτουργίες όπως και εάν συνεργάζονται ή όχι μεταξύ τους για τη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων.

Η λειτουργία των Tregs κομίζεται με την καταστολή της ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και παραγωγής κυττοκινών των CD4+ και CD8+ T κυττάρων όπως και πιθανόν άλλων κυτταρικών τύπων [91], με μηχανισμούς οι οποίοι δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και μπορεί να περιλαμβάνουν την καταστολή μέσω ανασταλτικών κυττοκινών όπως η IL-10, IL-35 και ο TGFβ, την καταστολή μέσω κυτταρόλυσης μεσολαβούμενης από την περφορίνη και τις γκρανζύμες, την καταστολή μέσω της ρύθμισης των δένδριτικών κυττάρων

και την καταστολή μέσω μεταβολικών μονοπατιών όπως η στέρηση IL-2[93]. Αυτή η κατασταλτική δράση των Tregs θεωρείται ελπιδοφόρα για θεραπευτικές παρεμβάσεις σε αυτοάνοσα νοσήματα και την αποφυγή απόρριψης αλλομοσχευμάτων, ενώ η αναστολή της δράσης τους θα μπορούσε να ωφελήσει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ενάντια σε καρκινικούς όγκους και χρόνιους παθογόνους παράγοντες [65, 94].

Η δράση του TNF πάνω στα Tregs έχει μελετηθεί στο πλαίσιο πειραματικών μοντέλων ζώων, όπως και σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στα NOD (non obese diabetic) ποντίκια δείχτηκε ότι η δράση του TNF στη ρύθμιση των Tregs εξαρτάται από την ηλικία, με την χορήγηση TNF σε νεογνά ποντίκια να οδηγεί σε μειωμένους αριθμούς και ελαττωματική δράση των Tregs, ενώ η χορήγησή του σε νεαρά και ενήλικα ζώα να οδηγεί σε αύξηση των Tregs. Επιπλέον, η απευθείας χορήγηση T ρυθμιστικών κυττάρων σε νεογνά ζώα, όπως και η χορήγηση αντι-TNF σε ζώα της ίδιας ηλικίας, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της έναρξης της ασθένειας, υποδεικνύοντας ότι ο TNF με το να ρυθμίζει τον αριθμό και τη δράση των Tregs μπορεί να ελέγχει την αυτοανοσία σε αυτό το μοντέλο ποντικών με διαβήτη [57].

Σε ένα άλλο μοντέλο ποντικών ο TNF κρίθηκε υπεύθυνος για την κατανίκηση της ανέργειας των Tregs μετά από TCR πυροδότηση, όπως και για την αύξηση του αριθμού τους και της κατασταλτικής τους δράσης μέσω του TNFR2, ο οποίος βρέθηκε να εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα Tregs σε σχέση με τα CD4+ CD25- κύτταρα δραστές (Teffs, T effectors). *In vitro*, τα κύτταρα Teffs πολλαπλασιαζόταν σε συν-καλλιέργεια με τα Tregs μετά από σύντομη έκθεση στον TNF (48 ώρες), ενώ μεγαλύτερη έκθεση στον TNF (72 ώρες) οδηγούσε σε καταστολή του πολλαπλασιασμού των Teffs μεσολαβούμενη από τα Tregs, κατευθύνοντας τους ερευνητές να προτείνουν ότι ο TNF μπορεί παροδικά να αναστείλει την κατασταλτική δράση των Tregs, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στα Teffs να δημιουργήσουν μια ανοσολογική απάντηση, ενώ σε παρατεταμένη έκθεση ο TNF οδηγεί στην επαναφορά της δράσης των Tregs, επιτρέποντας τον έλεγχο της φλεγμονής. Στην ίδια εργασία, ο ρόλος του TNF μελετήθηκε σε ένα μοντέλο ποντικών επαγωγής σήψης, όπου βρέθηκε ότι στα TNFR2-/- ποντίκια δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των Tregs μετά την επαγωγή σήψης, ενώ η απαλοιφή των Tregs από τα ζώα μάρτυρες είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη θνησιμότητα μετά την επαγωγή σήψης, γεγονός που καταλογίστηκε στη δράση του TNF μέσω του TNFR2, ο οποίος μπορεί πιθανόν να αυξήσει τα Tregs και να επάγει ανοσοκαταστολή κατά την επαγωγή σήψης συνοδευόμενη από απουσία απαλοιφής των βακτηρίων και θνησιμότητα [95].

Σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA) τα Tregs είναι άνεργα μετά από TCR διέγερση αλλά παρουσιάζουν μία ελαττωματική δράση ως προς την καταστολή του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κυττοκινών από τα CD4+ κύτταρα δραστές *in vitro*. Δεδομένα από τους Valencia *et al.* δείχνουν ότι ο TNF μπορεί να καταστείλει τη δράση των φυσικά εμφανιζόμενων Tregs και των TGFβ-επαγόμενων Tregs, μέσω σηματοδότησης από τον TNFR2, η έκφραση του οποίου αυξάνεται ως απάντηση στον TNF. Αυτή η καταστολή των Tregs που επιβάλλεται από τον TNF *in vitro* συνοδεύεται επίσης από μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του FoxP3, μια παρατήρηση που συμφωνεί με τα μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του FoxP3 που καταγράφηκε σε απομονωμένα κύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [96]. Οι Ehrenstein *et al.* έδειξαν επιπλέον ότι η ελαττωματική δράση των Tregs δεν οφείλεται στην αντίσταση των κυττάρων δραστών έναντι της μεσολαβούμενης από τα Tregs καταστολής[97]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η αντί-TNF θεραπεία επανέφερε την κατασταλτική λειτουργία των Tregs, όπως αυτή καταγράφηκε με την αναστολή του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κυττοκινών από τα κύτταρα CD4+CD25- T δραστές [96, 97], ενώ επίσης αύξησε τον αριθμό των Tregs του περιφερικού αίματος [97] και τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του FoxP3[98], μειώνοντας ταυτόχρονα την έκφραση του TNFR2 στα Tregs[96]. Μια επόμενη μελέτη των Ehrenstein *et al.* αποκάλυψε ότι η αντί-TNF θεραπεία οδηγεί στη διαφοροποίηση των CD4+CD25-T κυττάρων μέσω του TGFβ σε έναν νέο πληθυσμό (CD4+CD25+FoxP3+CD62L-) Tregs, ο οποίος απουσιάζει από τους υγιείς και τους ασθενείς με PA και μπορεί να μεσολαβεί την κατασταλτική του δράση μέσω των TGFβ και της IL-10. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα φυσικά εμφανιζόμενα Tregs (CD4+CD25+FoxP3+CD62L+) των ασθενών που είχαν λάβει αντί-TNF θεραπεία παρέμειναν ελαττωματικά ως προς την κατασταλτική τους δράση έναντι των CD4+T κυττάρων δραστών, υποδεικνύοντας ότι η καταστολή των CD4+T κυττάρων δραστών μετά την αντί-TNF θεραπεία μεσολαβείται από αυτόν τον νέο διαφοροποιηθέντα CD4+CD25+FoxP3+CD62L- Tregs πληθυσμό [99]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν καθαρά ότι ο TNF μπορεί να μεταβάλλει τον αριθμό και τη δράση των T ρυθμιστικών κυττάρων, αν και με διαφορετικό τρόπο μέχρι στιγμής στον άνθρωπο και τα ποντίκια. Η περαιτέρω διευκρίνηση των αποτελεσμάτων του TNF πάνω στα Tregs θα αυξήσει τα οφέλη της αντί-TNF θεραπείας στις αυτοάνοσες παθήσεις όπως και στις θεραπευτικές εφαρμογές των Tregs.

Είναι εμφανές από το σύνολο των πληροφοριών αυτών ότι ο TNF είναι μία κυττοκίνη που εμπλέκεται με διάφορους τρόπους στους μηχανισμούς της περιφερικής ανοχής των T λεμφοκυττάρων, όπως η επαγωγή ανέργειας, η ανοσολογική παρέκκλιση, ο επαγόμενος μετά από ενεργοποίηση θάνατος και τα T ρυθμιστικά κύτταρα. Η ρύθμιση αυτών των μηχανισμών περιφερικής ανοχής από τον TNF δημιουργεί μία πρόκληση στην εκπαιδευτική διαδικασία των T λεμφοκυττάρων προς την απόκτηση ανοχής στον εαυτό και κατηγοριοποιεί την κυττοκίνη αυτή στη λίστα με τα μόρια που θέτουν τον οργανισμό σε κίνδυνο αυτοάνοσων και φλεγμονώδων επιζήμιων ανοσοαποκρίσεων. Η διασαφήνιση των δράσεων και των απαντήσεων που πυροδοτούνται από τον TNF θα αποτελέσει ένα

πολύτιμο εργαλείο στην αποτελεσματική χειραγώγηση των προφλεγμονώδων και ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων του TNF στο πλαίσιο ωφέλιμων θεραπειών.

1.8. Στόχος της μελέτης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της απουσίας του ενδογενούς TNF στην δημιουργία και διατήρηση της περιφερικής ανοχής των CD8+T λεμφοκυττάρων σε αυτοαντιγόνο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα με τους ακόλουθους γονότυπους : F5 Rag1^{-/-} και F5 TNF^{-/-}Rag1^{-/-}, όπως και F5 31 Rag1^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-}. Στα μοντέλα αυτά ποντικών, το διαμέρισμα των T λεμφοκυττάρων τους αποτελείται από CD8⁺ κυτταροτοξικά T κύτταρα (F5), τα οποία φέρουν έναν διαγονιδιακό υποδοχέα TCR αποτελούμενο από τα Vβ11 και Va4 γονίδια για την β και α αλυσίδα αντίστοιχα, ικανό να αναγνωρίζει το εννιαμερές πεπτίδιο (NP 366-374) του ιού της γρίπης (A/NT/60/68). Στο σύστημα των ζώων με F5 31 Rag1^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} γονότυπο, το αντιγόνο NP εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του pdx-1 υποκινητή, ως αντιγόνο εαυτού σε πολλούς ιστούς των ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού, αποτελώντας έτσι ένα σύστημα μελέτης της ανοχής των CD8+ T λεμφοκυττάρων έναντι αντιγόνου εαυτού.

Σε προηγούμενη μελέτη (Διδακτορικό Φουστέρη Γ.2006[100]) στο σύστημα αυτό της αυτοανοχής (F5 31 Rag1^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-}) καταγράφηκε η εμφάνιση αυτοάνοσου διαβήτη τύπου I, με διήθηση του παγκρεατικού ιστού (ινσουλίτιδα), σε ένα σημαντικό ποσοστό (40%) των ζώων στα οποία απουσίαζε ενδογενώς ο TNF. Η εμφάνιση αυτοανοσίας συνοδεύτηκε από απώλεια ανοχής των F5 κυττάρων στα F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} διαβητικά ζώα, τα οποία είχαν αυξημένο αριθμό CD8+T κυττάρων στη σπλήνα σε αντίθεση με τα υγιή, τα οποία είχαν μικρότερο αριθμό CD8+T κυττάρων λόγω περιφερικής κλωνικής απαλοίφης. Επιπλέον, στα F5 κύτταρα των F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} διαβητικών ζώων παρατηρήθηκε και αναστροφή της ανέργειας, όπως αυτή καταγράφηκε *in vitro* με την αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και παραγωγής INFγ μετά από επαναδιέγερση των F5 σπληνοκυττάρων με το αντιγόνο NP. Η μειωμένη διεισδυτικότητα της νόσου στα F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} ποντίκια και η πιθανότητα να οφείλεται σε διαφορές του γενετικού υπόβαθρου των ζώων, οδήγησε τους ερευνητές στην πραγματοποίηση διασταυρώσεων F5 31 TNF^{+/+}Rag1^{-/-} ζώων με F5 TNF^{+/+}Rag1^{-/-} και στην ανάλυση της παρουσίας της νόσου στους απογόνους. Παρατηρήθηκε ότι οι F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} απόγονοι παρουσίασαν διαβήτη σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (10%) σε σχέση με τα αρχικά F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} ζώα (40%), ενώ τα ετερόζυγα ως προς τον TNF ζώα είχαν επίσης το ίδιο χαμηλό ποσοστό εμφάνισης της νόσου, η οποία δεν παρατηρήθηκε στα F5 31 Rag1^{-/-} ζώα. Τα παραπάνω δεδομένα ενίσχυσαν την άποψη ότι μικρές διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο των ζώων μπορεί να επηρεάζουν το αποτέλεσμα της εμφάνισης του αυτοάνοσου διαβήτη τύπου I στα F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} ζώα, γεγονός που οδήγησε στην πραγματοποίηση 10 και περισσότερων ανάδρομων διασταυρώσεων (back-crosses) στη σειρά αυτή των ζώων ώστε να προκύψουν ζώα με ομοιογενές γενετικό υπόβαθρο ως προς αυτό των C57BL/10 ζώων, μετά το πέρας των οποίων δεν εμφανίστηκε διαβητικός φαινότυπος σε κανένα από τα εν λόγω ζώα. Στο πλαίσιο αυτών των παρατηρήσεων, ήταν αναγκαίο να προσδιοριστεί εκ νέου η κατάσταση των CD8+ T λεμφοκυττάρων ως προς την ανοχή και την ανέργειά τους στο μοντέλο της αυτοανοχής των ζώων F5 31 Rag1^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-}Rag1^{-/-}. Ενώ ταυτόχρονα, μελετήθηκαν οι αποκρίσεις των CD8+ T κυττάρων στα ζώα F5 Rag1^{-/-} και F5 TNF^{-/-}Rag1^{-/-} γονότυπου.

2.ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα.

Τα πειραματικά ζώα που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή ήταν αρσενικά και θηλυκά ποντίκια, ηλικίας 2 έως 7 μηνών, με υγιή φαινότυπο, εκτός από τις περιπτώσεις που σημειώνονται διαφορετικά στο κείμενο. Οι γονότυποι των ζώων αυτών ήταν οι ακόλουθοι: F5 Rag1^{-/-}, F5 TNF^{-/-} Rag1^{-/-}, F5 31 Rag1^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag1^{-/-} σε C57BL/10 γενετικό υπόβαθρο, οι οποίοι προέκυψαν από τις κατάλληλες διασταυρώσεις των παρακάτω ζώων: α) F5 ζώα, διαγονιδιακά για τον TCR υποδοχέα F5 που αναγνωρίζει το εννιαμερές πεπτιδίο NP (366-374) της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού της γρίπης A/NT/60/68, στο πλαίσιο MHC μορίων τάξης I[101]. β) διαγονιδιακά ζώα για τον επίτοπο NP, τα οποία εκφράζουν το αντιγόνο NP[102], που αναγνωρίζεται από τον F5 TCR υποδοχέα, ως αντιγόνο εαυτού σε όλους τους ιστούς κάτω από τον έλεγχο του pdx-1 υποκινητή. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η σειρά ζώων NP 31[100]. γ) Knockout ζώα για το γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF [103], δ) Knockout ζώα για το γονίδιο της ρεκομπινάσης 1 (Rag1^{-/-}), τα οποία δεν φέρουν λεμφοκύτταρα [104] και ε) ζώα άγριου τύπου C57BL/10. Όλα τα ζώα γεννήθηκαν και διατηρήθηκαν στις εγκαταστάσεις ζώων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) Κρήτης. Όλοι οι χειρισμοί των ζώων έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο οδηγιών του ιδρύματος.

Κυτταρική προετοιμασία.

Οι ιστοί που αφαιρέθηκαν από τα ζώα (θύμος, σπλήνα, μεσεντέριοι και πυλωρικοί λεμφαδένες) τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο 1X HBSS -5% FBS, 10 mM HEPES (Gibco BRL), και κατόπιν διαχωρίστηκαν με με κυτταρικούς διαχωριστές διαμέτρου 40 μm (Falcon). Η αφαίρεση των ερυθροκυττάρων της σπλήνας έγινε με αιμόλυση σύμφωνα με τη διαδικασία του στιγμιαίου υποτονικού στρες, κατά την οποία τα κύτταρα κατακρημνίζονται (cfg 1200 rpm 10min) και ακολουθεί η προσθήκη 900 μl H₂O, ακολουθούμενης από προσθήκη 100 μl 10X HBSS και 9ml 1X HBSS -5% FBS, 10 mM HEPES ανά σπλήνα.

Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: anti-CD8-APC, anti-CD8-FITC, anti-CD4-FITC, anti-Vβ11-PE, anti-Vβ11-PERCP, anti-Vβ11 bio με streptavidin PERCP, anti-CD69-FITC, anti-CD44-PE, anti-CD44-PERCP, anti-CD44-FITC, anti-CD62L-PE, anti-INFγ-PE, (BD Pharmingen), anti-GrzB-PE (eBIOSCIENCE) με isotype IgG2k (BD Pharmingen). Για την ανάλυση έκφρασης επιφανειακών μαρτύρων, 10⁶ κύτταρα επώαστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσεων (1X PBS, 1% BSA, 0.02% NaN₃) για τουλάχιστον 30 λεπτά, σε θερμοκρασία 4⁰C. Κατόπιν τα κύτταρα πλύθηκαν μία φορά με διάλυμα 1X PBS, 0.02% NaN₃. Στην περίπτωση ενδοκυττάριας χρώσης (anti-INFγ, anti-GrzB, isotype IgG2k) αυτή πραγματοποιήθηκε μετά από τη χρώση για τους επιφανειακούς μάρτυρες, η οποία ακολουθήθηκε από τη μονιμοποίηση των κυττάρων και τη δημιουργία σπών στην εξωτερική μεμβράνη σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτόκολλου της εταιρείας (anti-GrzB, isotype IgG2k: eBIOSCIENCE FoxP3 staining set και anti-INFγ: Cytofix/Cytoperm™ Kit- Pharmingen). Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στο FACSCalibur και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό CellQuest.

In vitro διέγερση κυττάρων: δοκιμασία πολλαπλασιασμού και δοκιμασία παραγωγής INFγ.

Τα κύτταρα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία της σπλήνας όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω, αναλύονται με κυτταρομετρία ροής ως προς το ποσοστό των CD8⁺T κυττάρων και προσαρμόζεται η πυκνότητά τους σε 1x10⁶ CD8⁺ κυττάρων /ml σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FCS, 10 mM HEPES, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 2 mM L-γλουταμίνη. Κατόπιν τα κύτταρα συγκαλλιεργούνται σε πλάκες παρουσία ακτινοβολημένων C57BL/10 σπληνοκυττάρων είτε μη ακτινοβολημένων Rag1^{-/-}, τα οποία έχουν προεπιαστεί με κατάλληλες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου για τουλάχιστον μία ώρα. Οι συνθήκες της καλλιέργειας είναι 5% CO₂ και θερμοκρασία 37⁰C. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής που είναι όμοια και για τις δύο δοκιμασίες, ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα για κάθε διαδικασία.

Για τη δοκιμασία του πολλαπλασιασμού, μετά από 40 ώρες συγκαλλιέργειας προστίθεται σε κάθε οπή 1μCi [methyl-³H] θυμιδίνης για 6 ώρες. Ακολουθεί λύση των κυττάρων, συλλογή του περιεχομένου τους σε ειδικό φίλτρο με κατάλληλη συσκευή (INSEL CELL HARVESTER MODEL CH3 H/W) και μέτρηση της ενσωματωμένης ραδιενέργειας με μετρητή ακτινοβολίας β μέσα σε σπινθηριστικό υγρό (τολουόλιο, 0.5% PPO, 0.005% POPOP).

Για τη δοκιμασία παραγωγής INFγ, μετά από 16 ώρες καλλιέργειας προστίθεται 1μl /ml καλλιέργειας GolgiPlug (Pharmingen) και αφήνεται για 5 ώρες. Κατόπιν τα κύτταρα πλένονται, βάφονται για επιλεγμένους εξωτερικούς μάρτυρες, φιάζονται, διαπερατοποιείται η

κυτταρική τους μεμβράνη και βάφονται με αντισώματα anti-IFN γ σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου της εταιρείας (Cytotfix/Cytoperm™ Kit- Pharmingen), προτού αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής.

***In vivo* κυτταροτοξικότητα**

Για τη δοκιμασία της *in vivo* κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε η παθητική μεταφορά κυττάρων στόχων σημασμένων με διαφορετική ένταση χρώσης CFSE (CFSE Hi και CFSE Low) σε αποδέκτες, όπως έχει περιγραφεί αλλού [61]. Συνοπτικά, ακτινοβολημένα σπληνοκύτταρα από C57BL/10 ποντίκια σε 1X PBS επώαστηκαν με 1 μ M πεπτιδίου NP68 για 90 λεπτά στους 37°C, πλύθηκαν και κατόπιν σημάνθηκαν με CFSE συγκέντρωσης 10 μ M σε 1X PBS(CFSE Hi). Τα μη-φορτωμένα με πεπτίδιο αντίστοιχα σπληνοκύτταρα σημάνθηκαν με CFSE συγκέντρωσης 1 μ M σε 1X PBS (CFSE Low). Η αντίδραση σήμανσης σταμάτησε με την προσθήκη 5 μ g των παγωμένου HBSS 5% FCS και επώαση για 5 λεπτά σε πάγο. Ακολούθως, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1200rpm για 10 λεπτά και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου ο παραπάνω κύκλος πλυσίματος επαναλήφθηκε για άλλες δύο φορές με HBSS χωρίς ορό. Κατόπιν, 5 εκατομμύρια από κάθε πληθυσμό σπληνοκυττάρων (CFSE Hi και CFSE Low) ενέθηκαν ενδοφλεβίως στις ουρές των αποδεκτών.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε με ίδιο τρόπο και στην περίπτωση της δημιουργίας δύο ξεχωριστών μειγμάτων κυττάρων στόχων, όπου στο πρώτο μείγμα μισά από τα κύτταρα ήταν φορτωμένα με το πεπτίδιο και σημασμένα με CFSE Hi, ενώ τα υπόλοιπα μισά δεν ήταν φορτωμένα με το πεπτίδιο και σημάνθηκαν με CFSE Low(μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο), όπως και στο δεύτερο μείγμα όπου τα κύτταρα δεν ήταν φορτωμένα με το πεπτίδιο και μισά από αυτά σημάνθηκαν με CFSE Low και μισά με CFSE Low(μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο).

Η ειδική κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκε με την ανάλυση των σπληνοκυττάρων στους αποδέκτες 19 ώρες μετά την παθητική μεταφορά των κυττάρων στόχων. Τα σημασμένα με διαφορετική ένταση χρώσης CFSE κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Για τον προσδιορισμό της ειδικής κυτταροτοξικότητας υπολογίστηκε η αναλογία των CFSE Hi και CFSE Low κυττάρων στόχων στους αποδέκτες και χρησιμοποιήθηκε ο τύπος (*%ειδική κυτταροτοξικότητα = 1 -*

$$\frac{\% \text{κυττ } \acute{\alpha}\rho\omega\text{n CFSE HI} \times \frac{\% \text{κυττ } \acute{\alpha}\rho\omega\text{n CFSE LOW B10}}{\% \text{κυττ } \acute{\alpha}\rho\omega\text{n CFSE HI B10}}}{\% \text{κυττ } \acute{\alpha}\rho\omega\text{n CFSE LOW}} \times 100$$

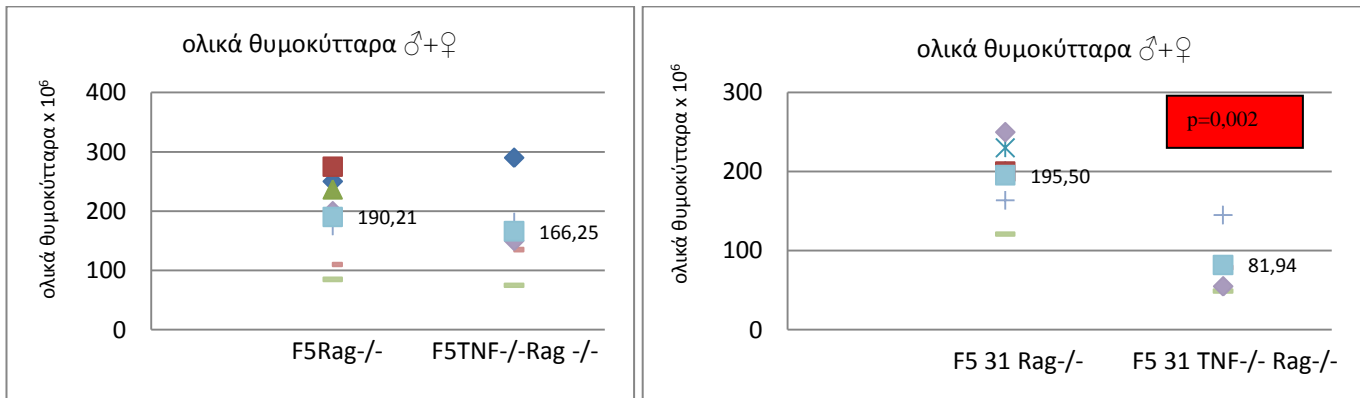
).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Θύμος και κυτταρικοί υποπληθυσμοί

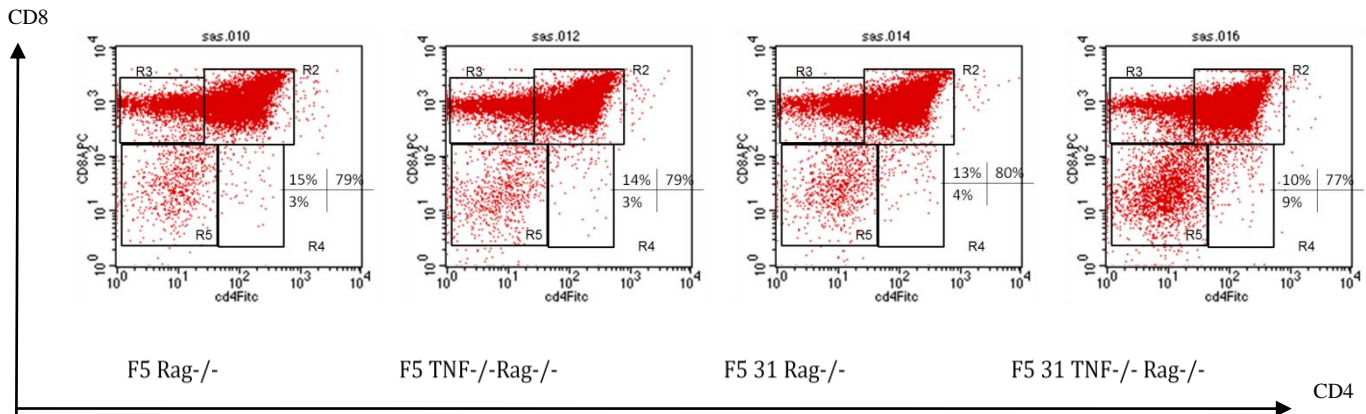
Στη μελέτη αυτή συμπεριελήφθησαν τα εξής ζώα από κάθε γονότυπο :7(4♂+3♀) F5 Rag^{-/-}, 5 (4♂+1♀) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, 7 (4♂+3♀) F5 31 Rag^{-/-} και 4 (♂) F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, ηλικίας 3-4 μηνών, με υγιή φαινότυπο. Ο θύμος αδένας που αφαιρέθηκε και επεξεργάστηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι, είχε φυσιολογική εξωτερική όψη, μορφολογία και μέγεθος σε κάθε περίπτωση. Πριν την επεξεργασία με συζευγμένα αντισώματα για τον προσδιορισμό των κυτταρικών υποπληθυσμών με κυτταρομετρία ροής, προσδιορίστηκε ο ολικός αριθμός θυμοκυττάρων όπως αυτός προέκυψε από μικροσκοπία σε πλάκες αιματοκυτταρόμετρου τύπου Neubauer.

Τα ζώα F5 Rag^{-/-} γονότυπου είχαν μέσο όρο ολικών θυμοκυττάρων 190,2 εκατομμυρίων και τα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} αντίστοιχα 166,2 εκατομμύρια, χωρίς να παρουσιάζουν κάποια στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Εικόνα 3.1.α). Ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά τιμής $p=0,002$ παρατηρήθηκε μεταξύ των ζώων F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου, όπου ο μέσος όρος ολικών θυμοκυττάρων ήταν 195,5 και 81,9 εκατομμύρια αντίστοιχα (Εικόνα 3.1.β).



Εικόνα 3.1: αριθμός ολικών θυμοκυττάρων. α) η σύγκριση μεταξύ των ζώων F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου δεν παρουσιάζει καμία στατιστική σημαντική διαφορά, ενώ β) η σύγκριση μεταξύ των ζώων F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου κατέδειξε μία στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0,002$) των ολικών θυμοκυττάρων στα ζώα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου σε σχέση με τα F5 31 Rag^{-/-}. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις τιμές των μέσων όρων σε εκατομμύρια.

Ο προσδιορισμός των κυτταρικών υποπληθυσμών του θύμου με κυτταρομετρία ροής που έγινε μετά από χρώση με αντι-CD8, αντι-CD4 και αντι-Vβ11 αντισωμάτων, δεν κατέδειξε κάποια διαφορά στην ποσόστωση των διπλά θετικών CD8⁺CD4⁺, μονά θετικών CD8⁺ και διπλά αρνητικών CD8⁻CD4⁻ T θυμοκυττάρων μεταξύ των F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, ενώ μεταξύ των F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων παρατηρήθηκε διαφορά μόνο στην ποσόστωση των διπλά αρνητικών CD8⁻CD4⁻ T θυμοκυττάρων όπου η μέση τιμή του ποσοστού είναι 2,69% στα F5 Rag^{-/-} και 3,94% στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώα με στατιστική τιμή $p=0,01$ (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: κυτταρικοί υποπληθυσμοί του θύμου με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αντι-CD4 και αντι-CD8. Η σύγκριση μεταξύ των F5 31 Rag-/- και F5 31 TNF-/- Rag-/- ζώων δεν κατέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά των διπλά θετικών CD8+CD4+(R2), μονά θετικών CD8+(R3) και διπλά αρνητικών CD8-CD4-(R5) T θυμοκυττάρων, ενώ μεταξύ των F5 Rag-/- και F5 TNF-/- Rag-/- ζώων παρατηρήθηκε διαφορά μόνο στην ποσοστιαία των διπλά αρνητικών CD8-CD4- T θυμοκυττάρων όπου η μέση τιμή του ποσοστού είναι 2,69% στα F5 Rag-/- και 3,94% στα F5 TNF-/- Rag-/- ζώα με στατιστική τιμή $p=0,01$. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των υποπληθυσμών όπως αυτά προέκυψαν κατά την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζονται ζώα(♂)αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο. Τα κύτταρα έχουν επιλεγεί επί των ζωντανών κυττάρων της λογικής πύλης R1 (περιχαρακωμένος πληθυσμός ζωντανών κυττάρων).

Με βάση τα ποσοστά των υποπληθυσμών και του ολικού αριθμού θυμοκυττάρων υπολογίστηκαν αντίστοιχα και οι ολικοί αριθμοί των διπλά θετικών CD8+CD4+, μονά θετικών CD8+ και διπλά αρνητικών CD8-CD4- T θυμοκυττάρων, οι οποίοι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των F5 Rag-/- και F5 TNF-/- Rag-/- ζώων, ενώ στα ζώα F5 31 Rag-/- και F5 31 TNF-/- Rag-/- γονότυπου παρόλο που τα ποσοστά των υποπληθυσμών δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, η αρχική διαφορά στον ολικό αριθμό θυμοκυττάρων συμπαρασύρει τις αντίστοιχες τιμές των ολικών αριθμών των διπλά θετικών CD8+CD4+ και μονά θετικών CD8+ T υποπληθυσμών με αποτέλεσμα να υπολογίζονται μειωμένοι με οριακά σημαντική στατιστική διαφορά στα ζώα F5 31 TNF-/- Rag-/-, όπως φαίνεται στον συγκεντρωτικό πίνακα 3.1. Επιπλέον στα F5 31 Rag-/- σε σχέση με τα F5 Rag-/- ζώα ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των ολικών θυμοκυττάρων, καταγράφηκε ελαφρώς αυξημένος αριθμός διπλά αρνητικών T κυττάρων (όπως και στο αντίστοιχο ποσοστό). Αντίστοιχα στα F5 31 TNF-/- Rag-/- ζώα σε σχέση με τα F5 TNF-/- Rag-/-, καταγράφηκε μειωμένος ολικός αριθμός των μονά θετικών T κυττάρων (χωρίς αντιστοιχία στο ποσοστό), όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1.

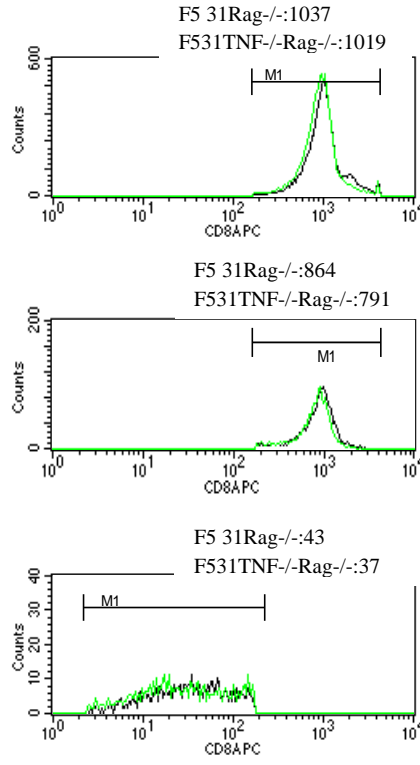
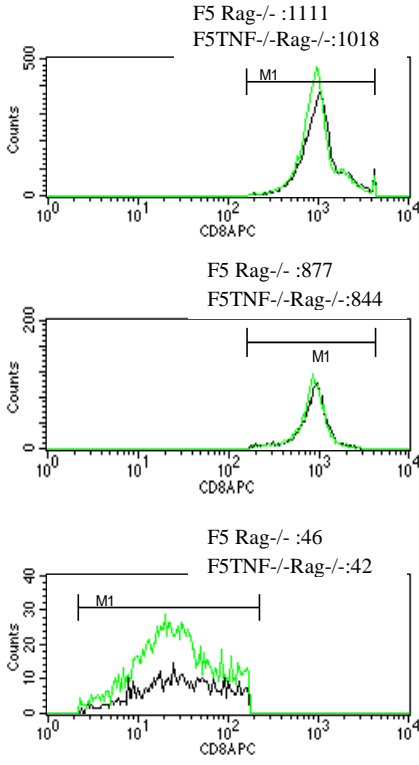
Πίνακας 3.1. Ολικοί αριθμοί και ποσοστά υποπληθυσμών των θυμοκυττάρων. Οι ολικοί αριθμοί αντιστοιχούν σε εκατομμύρια. Όπου DN: διπλά αρνητικά CD8-CD4-T, DP: διπλά θετικά CD8+CD4+T. Η τιμή p προέκυψε μετά από student t-test.

Γονότυπος	Ολικά θυμοκύτταρα X 10 ⁶	% DN	DN X 10 ⁶	% DP	DP X 10 ⁶	% CD8+	CD8+ X 10 ⁶
F5 Rag-/- (♀)	250	2,47%	6,18	76,68%	191,70	19,79%	49,48
(♀)	275	2,21%	6,08	75,31%	207,10	21,15%	58,16
(♀)	236,5	2,52%	5,96	75,94%	179,60	20,50%	48,48
(♂)	175	3,26%	5,71	84,12%	147,21	11,80%	20,65
(♂)	110	3,12%	3,43	84,41%	92,85	11,86%	13,05
(♂)	85	1,96%	1,67	62,40%	53,04	32,56%	27,68
(♂)	200	3,31%	6,62	79,00%	158,00	15,78%	31,56
Μέσος όρος	190,21	2,69%	5,09	76,84%	147,07	19,06%	35,58
F5 TNF-/-Rag-/- (♀)	290	4,93%	14,30	82,32%	238,73	11,38%	33,00
(♂)	181,25	2,44%	4,42	87,11%	157,89	9,89%	17,93
(♂)	135	4,02%	5,43	81,63%	110,20	13,45%	18,16
(♂)	75	4,76%	3,57	80,47%	60,35	12,26%	9,20
(♂)	150	3,53%	5,30	79,59%	119,39	14,71%	22,07
Μέσος όρος	166,25	3,94%	6,60	82,22%	137,31	12,34%	20,07
p value F5Rag-/- vs F5TNF-/-Rag-/-	0,595	0,019	0,425	0,156	0,787	0,069	0,088
F5 31 Rag-/- (♀)	200	3,73%	7,46	81,54%	163,08	13,76%	27,52
(♀)	200	2,15%	4,30	82,69%	165,38	14,44%	28,88
(♀)	230	7,98%	18,35	59,77%	137,47	30,11%	69,25
(♂)	163,75	5,10%	8,35	86,90%	142,30	7,59%	12,43
(♂)	203,75	5,95%	12,12	85,82%	174,86	7,52%	15,32
(♂)	121	3,96%	4,79	76,02%	91,98	18,32%	22,17
(♂)	250	4,04%	10,10	80,89%	202,23	13,43%	33,58
Μέσος όρος	195,5	4,70%	9,35	79,09%	153,90	15,02%	29,88
p value F5Rag-/- vs F5 31Rag-/-	0,869	0,018	0,05	0,623	0,79	0,328	0,56
F5 31 TNF-/-Rag-/- (♂)	145	3,05%	4,42	89,83%	130,25	6,54%	9,48
(♂)	78,75	6,01%	4,73	84,99%	66,93	8,71%	6,86
(♂)	49	6,59%	3,23	73,28%	35,91	17,20%	8,43
(♂)	55	9,59%	5,27	77,54%	42,65	10,81%	5,95
Μέσος όρος	81,93	6,31%	4,41	81,41%	68,93	10,82%	7,68
p value F5 31Rag-/- vs F531TNF-/-Rag-/-	0,002	0,267	0,078	0,679	0,005	0,350	0,047
p value F5 TNF-/- Rag-/- vs F531 TNF-/- Rag-/-	0,1	0,106	0,362	0,826	0,12	0,516	0,026

Τέλος η επιφανειακή έκφραση των μορίων CD8 και Vβ11 μελετήθηκε σε όλους τους υποπληθυσμούς του θύμου με βάση τα ιστογράμματα έκφρασης όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Η σύγκριση των επιπέδων του CD8 τόσο μεταξύ των ζώων F5 Rag-/- και F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου, όσο και μεταξύ των F5 31 Rag-/- και F5 31 TNF-/- Rag-/- δεν κατέδειξε κάποια σημαντική διαφορά στη μέση ένταση φθορισμού (MFI) και στην κατανομή του φθορισμού σε όλους τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς (Εικόνα 3.3). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά την αντιπαραβολή των επιπέδων του Vβ11, τα οποία δεν παρουσίασαν αξιόλογη μεταβολή μεταξύ των συγκριθέντων γονοτύπων σε κανέναν από τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς (Εικόνα 3.4).

F5 Rag^{-/-} με F5 TNF^{-/-}Rag^{-/-}

F531Rag^{-/-} με F531TNF^{-/-}Rag^{-/-}



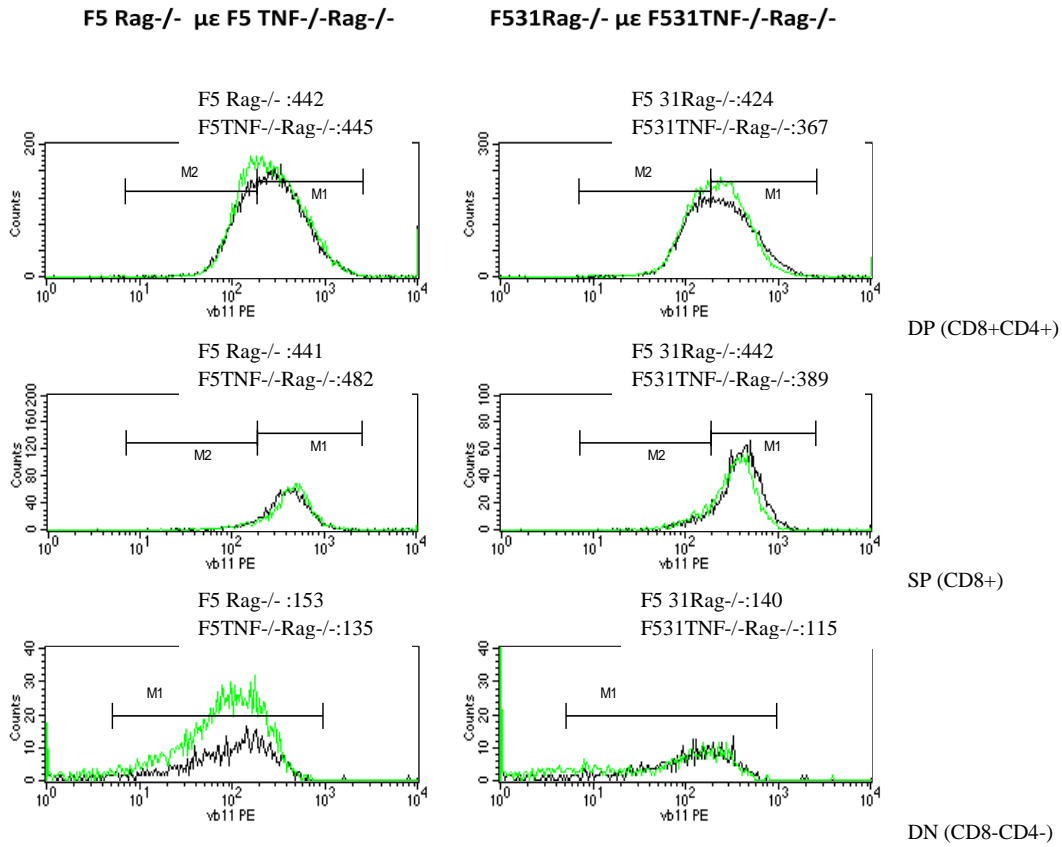
DP (CD8+CD4+)

SP (CD8+)

DN (CD8-CD4-)

CD8

Εικόνα 3.3. Ιστόγραμμα έκφρασης του CD8 στους υποπληθυσμούς του θύμου. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των ζώων F5 Rag^{-/-} με F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) και F5 31 Rag^{-/-} με F5 31 TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Όπου DP: διπλά θετικά CD8+CD4+T, SP: μονά θετικά CD8+T, DN: διπλά αρνητικά CD8-CD4-T. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI) του M1. Τα ζώα από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.2.

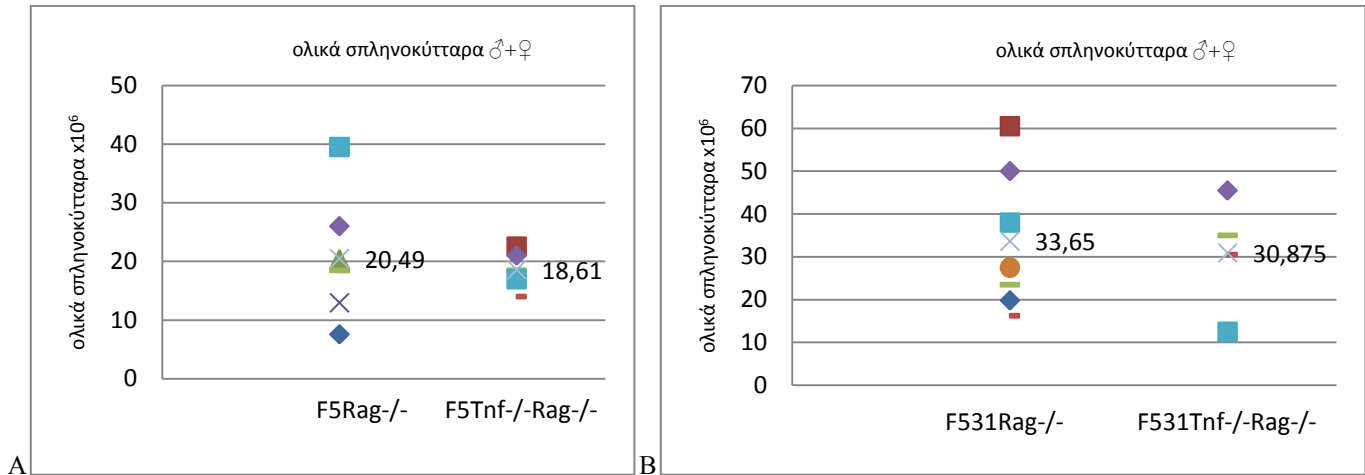


Vβ11

Εικόνα 3.4: Ιστογράμματα έκφρασης του Vβ11 στους υποπληθυσμούς του θύμου. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των ζώων F5 Rag^{-/-} με F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) και F5 31 Rag^{-/-} με F5 31 TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Όπου DP: διπλά θετικά CD8+CD4+T, SP: μονά θετικά CD8+T, DN: διπλά αρνητικά CD8-CD4-T. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI) του M1. Τα ζώα από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.2.

3.2. Περιφερικά λεμφικά όργανα: Σπλήνα

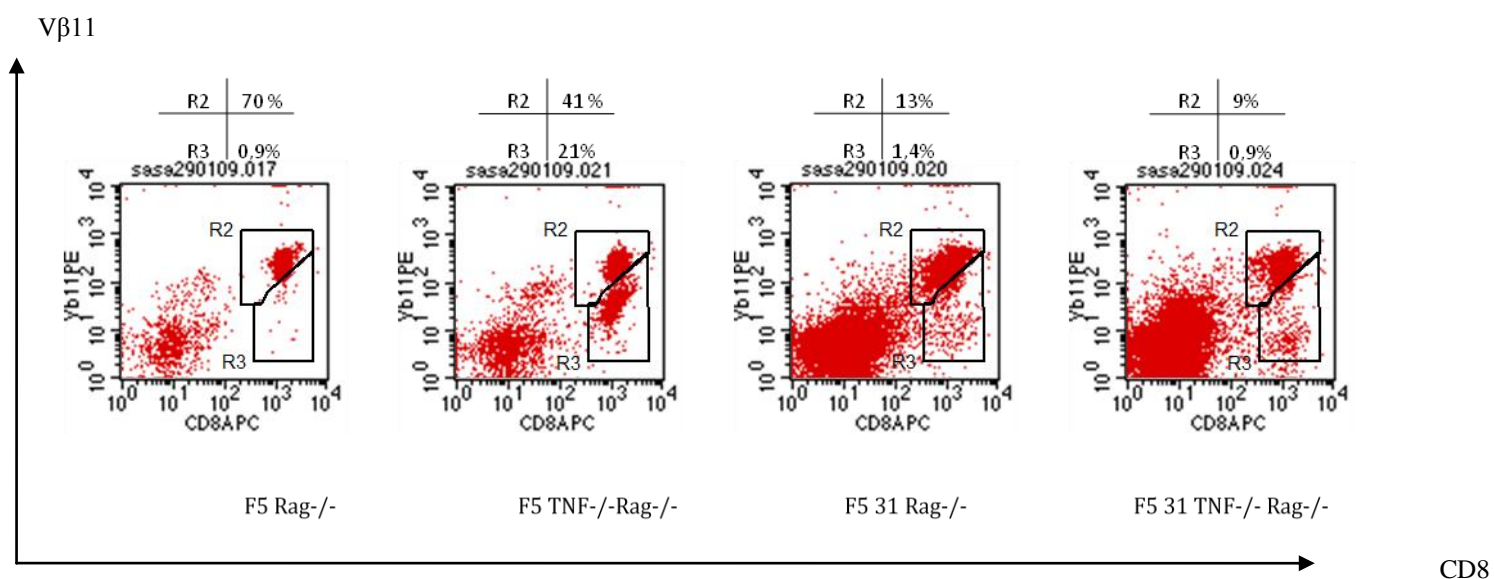
Στη μελέτη αυτή συμπεριελήφθησαν τα εξής ζώα από κάθε γονότυπο :7(4♂+3♀) F5 Rag^{-/-}, 5 (4♂+1♀) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, 7 (4♂+3♀) F5 31 Rag^{-/-} και 4 (♂) F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} , ηλικίας 3-4 μηνών, με υγιή φαινότυπο. Η σπλήνα που αφαιρέθηκε είχε φυσιολογική εξωτερική όψη, μορφολογία και μέγεθος σε κάθε περίπτωση. Ο ολικός αριθμός σπληνοκυττάρων όπως αυτός προσδιορίστηκε με μικροσκοπία είχε μέση τιμή 20,4 εκατομμύρια στα ζώα F5 Rag^{-/-} γονότυπου και 18,6 εκατομμύρια στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (Εικόνα 3.5 α) χωρίς να υπολογίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεταξύ τους σύγκριση. Αντίστοιχα στα ζώα F5 31 Rag^{-/-} γονότυπου η μέση τιμή των ολικών σπληνοκυττάρων είναι 33,6 εκατομμύρια και 30,8 εκατομμύρια στα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (Εικόνα 3.5 β). Επίσης δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τη σύγκριση μεταξύ των F5 Rag^{-/-} και F5 31 Rag^{-/-}, όπως και μεταξύ των F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων ως προς τους ολικούς αριθμούς σπληνοκυττάρων τους.



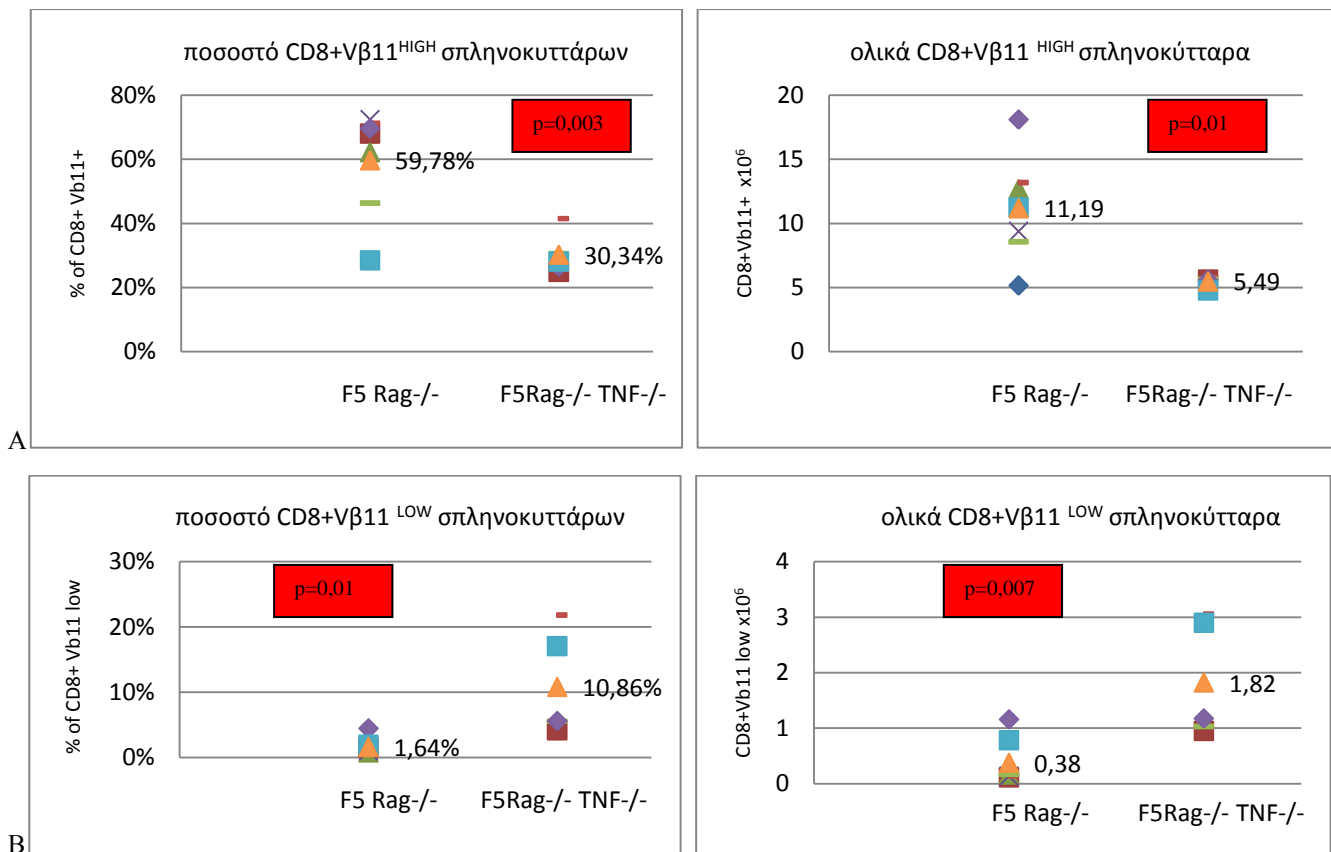
Εικόνα 3.5: αριθμός ολικών σπληνοκυττάρων. α) η σύγκριση μεταξύ των ζώων F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου δεν παρουσιάζει κάποια στατιστική σημαντική διαφορά, όπως και β) η σύγκριση μεταξύ των ζώων F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου. Στατιστική διαφορά δεν καταγράφηκε επίσης κατά τη σύγκριση μεταξύ των F5 Rag^{-/-} και F5 31 Rag^{-/-} , όπως και μεταξύ των F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} .Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις τιμές των μέσων όρων σε εκατομμύρια.

Στην εικόνα 3.6 παρουσιάζεται η κατανομή των σπληνοκυττάρων (για ζώα αντιπροσωπευτικά κάθε γονότυπου) μετά από χρώση τους με αντι-CD8 και αντι-Vβ11 αντισώματα, όπως αυτή προέκυψε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Χαρακτηριστικό των F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων είναι η εμφάνιση ενός CD8+ Vβ11^{LOW} (χαμηλού) πληθυσμού σπληνοκυττάρων με διακύμανση στην ποσοστώςή του (4% έως 21%) και μέση τιμή 10,8%, ο οποίος δεν εμφανίζεται στα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου (μέση τιμή 1,6%). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική με τιμή p=0,01 για τα ποσοστά του CD8+ Vβ11^{LOW} (χαμηλού) πληθυσμού, όσο και για τους αριθμούς των συνολικών CD8+ Vβ11^{LOW} σπληνοκυττάρων με στατιστικά σημαντική τιμή p=0,007, οι οποίοι έχουν μέση τιμή 0,38 εκατομμύρια στα ζώα F5 Rag^{-/-} γονότυπου και 1,82 εκατομμύρια στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (Εικόνα 3.7β). Επιπλέον τα ζώα F5 Rag^{-/-} γονότυπου έχουν μέση τιμή ολικών CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων 11,1 εκατομμύρια ενώ η αντίστοιχη τιμή στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώα είναι 5,4 εκατομμύρια, μια στατιστικά σημαντική διαφορά (p= 0,01) η οποία αντανακλάται και στα αντίστοιχα ποσοστά των CD8+ Vβ11^{HIGH} κυττάρων (μέση τιμή ποσοστού CD8+ Vβ11^{HIGH} 59,7% στα F5 Rag^{-/-} και 30,3% στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και τιμή p= 0,003)(Εικόνα 3.7α).

Σε αντιπαράθεση η σύγκριση των F5 31 Rag^{-/-} ζώων και των F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στα ποσοστά και τον αριθμό των CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων όπως και στα ποσοστά και τον αριθμό των CD8+ Vβ11^{LOW} σπληνοκυττάρων. Τα ποσοστά και οι αντίστοιχοι ολικοί αριθμοί σπληνοκυττάρων για τα ζώα κάθε γονότυπου παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3.2, όπου επίσης φαίνεται ότι τα ζώα F5 31 Rag^{-/-} παρουσιάζουν μειωμένο ποσοστό CD8+ Vβ11^{HIGH} κυττάρων σε σχέση με τα F5 Rag^{-/-}, όπως και τα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώα έχουν μειωμένο ποσοστό και ολικό αριθμό CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων σε σχέση με τα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώα. Το ποσοστό της μείωσης των CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων μεταξύ των F5 Rag^{-/-} και F5 31 Rag^{-/-} (36%) σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό στα ζώα χωρίς ενδογενή TNF, F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (40%) δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά.



Εικόνα 3.6. Σπλήνα: ανάλυση κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αντι-CD8 και αντι-Vβ11 αντισώματα. Χαρακτηριστικό των ζώων F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου είναι η ύπαρξη ενός CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμού (με διακύμανση από 4% έως 21% και μέση τιμή 11,19%) ο οποίος δεν εμφανίζεται στα ζώα F5 Rag^{-/-}, ενώ τα ποσοστά των CD8⁺ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων εμφανίζονται μειωμένα στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου. Η σύγκριση των F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα εν λόγω σπληνοκύτταρα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8⁺ Vβ11^{HIGH} (R2) και των CD8⁺ Vβ11^{LOW} (R3) Τ σπληνοκυττάρων επί των ζωντανών επιλεγμένων κυττάρων της λογικής πύλης R1. Απεικονίζονται ζώα (♂) αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο.



Εικόνα 3.7. ποσοστά και συνολικοί αριθμοί των CD8+ Vβ11^{HIGH} και CD8+ Vβ11^{LOW} σπληνοκυττάρων στα ζώα F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου. α) το ποσοστό των CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων και ο αντίστοιχος ολικός αριθμός των CD8+ Vβ11^{HIGH} T σπληνοκυττάρων υπολογίζεται μειωμένος στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} με στατιστικά σημαντική τιμή $p=0,003$ και $p= 0,01$ αντίστοιχα β) το ποσοστό και ο ολικός αριθμός των CD8+Vβ11^{LOW} σπληνοκυττάρων υπολογίζεται αυξημένο στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου με στατιστικά σημαντική τιμή $p=0,01$ και $p= 0,007$ αντίστοιχα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση τιμή σε εκατομμύρια και τα ποσοστά καταδεικνύουν τη μέση τιμή των ποσοστών.

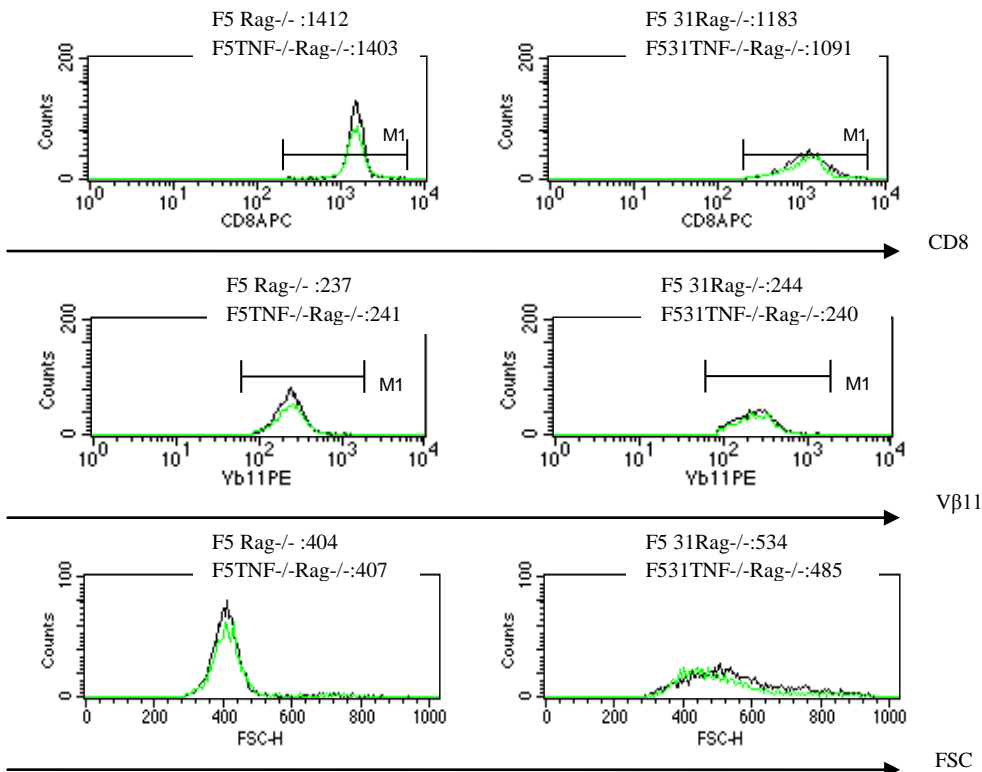
Πίνακας 3.2.: ολικοί αριθμοί και ποσοστά σπληνοκυττάρων μετά από χρώση με αντι- CD8 και αντι- Vβ11. Οι ολικοί αριθμοί αντιστοιχούν σε εκατομμύρια. Η τιμή p προέκυψε μετά από student t-test.

Γονότυπος	Ολικά σπληνοκύτταρα X 10 ⁶	% CD8+Vb11 ^{HIGH}	CD8+Vb11 ^{HIGH} IGH X 10 ⁶	%CD8+Vb11 ^L ow	CD8+Vb11 ^L ow X 10 ⁶
F5 Rag-/- (♀)	7,59	68,07%	5,17	1,51%	0,11
(♀)	20,4	62,24%	12,70	0,82%	0,17
(♀)	12,96	72,40%	9,38	1,06%	0,14
(♂)	18,5	70%	12,95	0,9%	0,17
(♂)	18,5	46,34%	8,57	0,91%	0,17
(♂)	26	69,61%	18,10	4,46%	1,16
(♂)	39,5	28,47%	11,25	1,98%	0,78
Μέσος όρος	20,49	59,78%	11,19	1,64%	0,38
F5 TNF-/-Rag-/- (♀)	22,55	24,94%	5,62	4,21%	0,95
(♂)	14	41,51%	5,81	21,90%	3,07
(♂)	18,5	30,60%	5,66	5,28%	0,98
(♂)	21	26,56%	5,58	5,60%	1,18
(♂)	17	28,08%	4,77	17,06%	2,90
Μέσος όρος	18,61	30,34%	5,49	10,86%	1,82
P value F5Rag-/- vs F5TNF-/-Rag-/-	0,702	0,003	0,011	0,012	0,007
F5 31 Rag-/- (♀)	19,8	31,31%	6,20	3,07%	0,61
(♀)	60,5	16,07%	9,72	1,04%	0,63
(♀)	27,5	40,93%	11,26	0,92%	0,25
(♂)	16,25	13,24%	2,15	1,50%	0,24
(♂)	23,5	13%	3,53	1,40%	0,33
(♂)	50	33,22%	16,61	6,97%	3,49
(♂)	38	11,65%	4,43	2,22%	0,84
Μέσος όρος	33,65	20,89%	7,66	2,91%	1,01
p value F5Rag-/- vs F5 31Rag-/-	0,098	0,0004	0,180	0,19	0,19
F5 31 TNF-/-Rag-/- (♂)	30,5	12,70%	3,87	2,10%	0,64
(♂)	35	9,70%	3,40	0,90%	0,32
(♂)	45,5	9,49%	4,32	4,03%	1,83
(♂)	12,5	16,39%	2,05	5,16%	0,65
Μέσος όρος	30,875	12,07%	3,41	3,05%	0,86
p value F5 31Rag-/- vs F531TNF-/-Rag-/-	0,783	0,102	0,132	0,351	0,796
p value F5 TNF-/-Rag-/- vs F531 TNF-/-Rag-/-	0,091	0,001	0,0001	0,138	0,297

Ο πληθυσμός CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά ως προς το επίπεδο έκφρασης των μορίων CD8 και Vβ11, όπως αυτό μελετήθηκε με βάση τα ιστογράμματα επιφανειακής έκφρασης, τόσο κατά τη σύγκριση μεταξύ των ζώων F5 Rag-/- και F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου, όσο και μεταξύ των F5 31 Rag-/- και F5 31 TNF-/- Rag-/- (Εικόνα 3.8). Στην ίδια εικόνα παρουσιάζεται το ιστόγραμμα της πρόσθιας σκέδασης (FSC), το οποίο δεν καταδεικνύει κάποια διαφορά μεταξύ των συγκριθέντων γονοτύπων. Ενώ στην επόμενη εικόνα (Εικόνα 3.9) παρουσιάζονται τα ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC των CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων σε αντιπαράθεση με τα αντίστοιχα ιστογράμματα των CD8+ Vβ11^{LOW} σε δύο αντιπροσωπευτικά ζώα F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου.

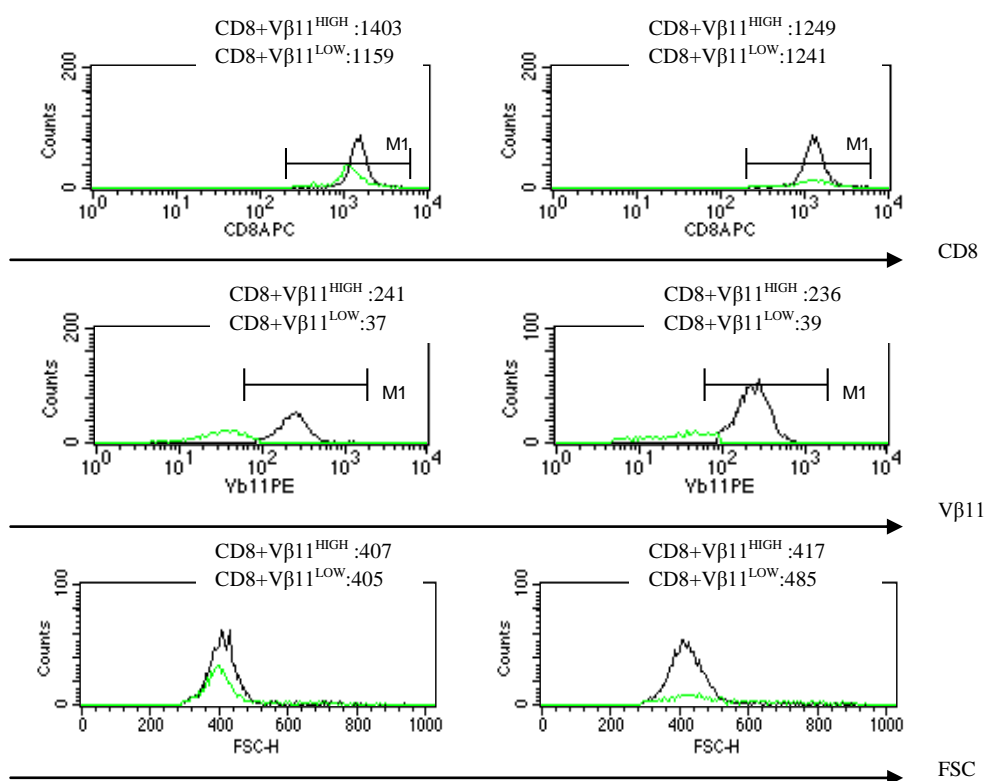
F5 Rag^{-/-} με F5 TNF^{-/-}Rag^{-/-}

F531Rag^{-/-} με F531TNF^{-/-}Rag^{-/-}



Εικόνα 3.8: Ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC στον CD8⁺ Vβ11^{HIGH} πληθυσμό σπληνοκυττάρων. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των ζώων F5 Rag^{-/-} με F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) και F5 31 Rag^{-/-} με F5 31 TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI). Τα ζώα από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.6.

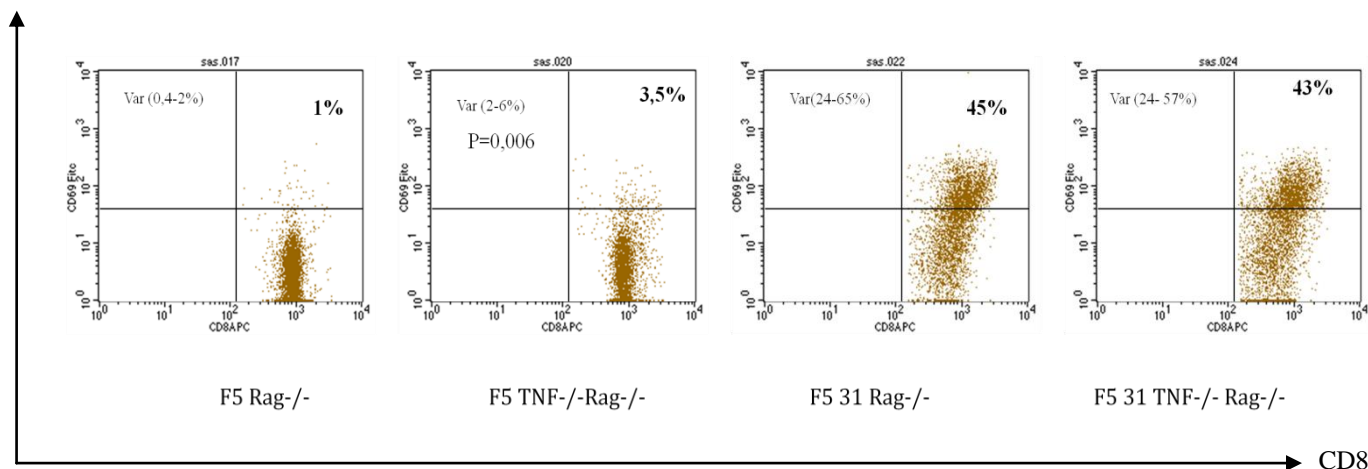
F5 TNF^{-/-}Rag^{-/-} :
 CD8+Vβ11^{HIGH} με CD8Vβ11^{LOW}



Εικόνα 3.9. σπλήνα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-}:- ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των CD8+ Vβ11^{LOW} (πράσινη γραμμή) και CD8+ Vβ11^{HIGH} (μαύρη γραμμή) όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI).

Ο πληθυσμός των CD8+ Vβ11^{HIGH} σπληνοκυττάρων ελέγχθηκε επίσης μετά από χρώση με αντι-CD69 αντίσωμα στα ζώα όλων των γονοτύπων και βρέθηκε ότι το ποσοστό και ο ολικός αριθμός των CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ κυττάρων παρουσιάζει μία μικρή αύξηση στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου (μέση τιμή 4,12%, 0,79 εκατομμύρια) σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} (μέση τιμή 1,19%, 0,29 εκατομμύρια), μία διαφορά που εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντική με τιμή p=0,006 ως προς τα ποσοστά των CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ σπληνοκυττάρων (Εικόνα 3.10) και p= 0,05 για τους αντίστοιχους ολικούς αριθμούς. Τα ζώα των F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονοτύπων δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστική διαφορά τόσο ως προς τα ποσοστά (Εικόνα 3.10) όσο και ως προς τον ολικό αριθμό των CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ κυττάρων (μέση τιμή 15,7 εκατομμύρια CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ για τα F5 31 Rag^{-/-} και 11,58 εκατομμύρια για τα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}). Στον CD8+ Vβ11^{LOW} πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο ποσοστό των CD69+ σπληνοκυττάρων σε σχέση με το αντίστοιχο του CD8+ Vβ11^{HIGH} πληθυσμού, στα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

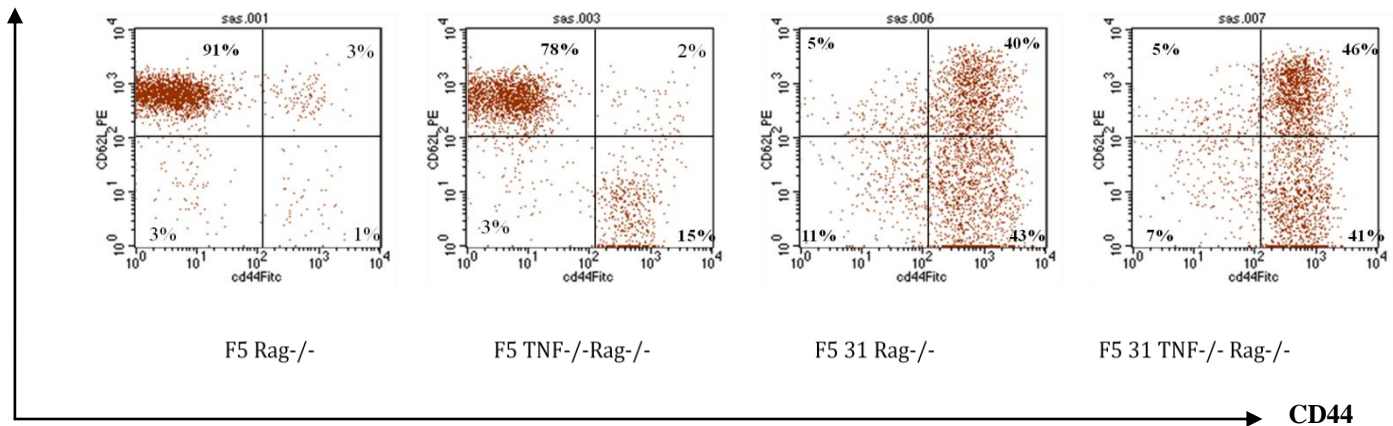
CD69



Εικόνα 3.10. Ποσοστά των CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ σπληνοκυττάρων όπως αυτά προέκυψαν μετά από χρώση με αντι- CD69 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου παρουσιάζουν μία μικρή αύξηση με σημαντική στατιστικά τιμή $p=0,006$ στο ποσοστό των CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ κυττάρων σε σχέση με τα ζώα F5 Rag^{-/-}, ενώ τα ζώα F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ζώα(♂) από κάθε γονότυπο. Οι αριθμοί στο πάνω δεξιό τεταρτημόριο αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8+ Vβ11^{HIGH} CD69+ σπληνοκυττάρων, ενώ οι αριθμοί στο πάνω αριστερό τεταρτημόριο δείχνουν τη διακύμανση των ποσοστών για κάθε γονότυπο. Η εικόνα παρουσιάζει τα επιλεγμένα κύτταρα της λογικής πύλης R1+R2 (CD8+ Vβ11^{HIGH}) επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης R1.

Τα CD8+T σπληνοκύτταρα 2 (♂) ζώων από κάθε γονότυπο (F5 Rag^{-/-} , F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}) ελέγχθησαν επίσης μετά από χρώση με αντι-CD62L και αντι-CD44 αντισώματα για τον προσδιορισμό των υποπληθυσμών T_{EM} κύτταρα μνήμης τελεστής(T effector memory CD62L- CD44+), T_{CM} κύτταρα κεντρικής μνήμης (T central memory CD62L+ CD44+) και T παρθένα/αδαή (T naïve CD62L+ CD44-). Όπως ήταν αναμενόμενο στα ζώα F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου τα οποία εκφράζουν το αντιγόνο NP στην περιφέρεια ένα αμελητέα μικρό ποσοστό των T σπληνοκυττάρων παρέμεινε ως T παρθένα/αδαή, ενώ το μεγαλύτερο μέρος των T κυττάρων κατανέμεται ισοσκελώς στους υποπληθυσμούς των T_{EM} και T_{CM}. Στα ζώα F5 Rag^{-/-} γονότυπου σχεδόν το σύνολο των T σπληνοκυττάρων κατηγοριοποιείται ως T παρθένα/αδαή, ενώ στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου πέρα από τον αναμενόμενο πληθυσμό των T παρθένων/αδαών κυττάρων, εμφανίζεται σε σημαντικό ποσοστό (διακύμανση 15%-35%) ένας πληθυσμός T_{EM} κυττάρων (Εικόνα 3.11).

CD62L

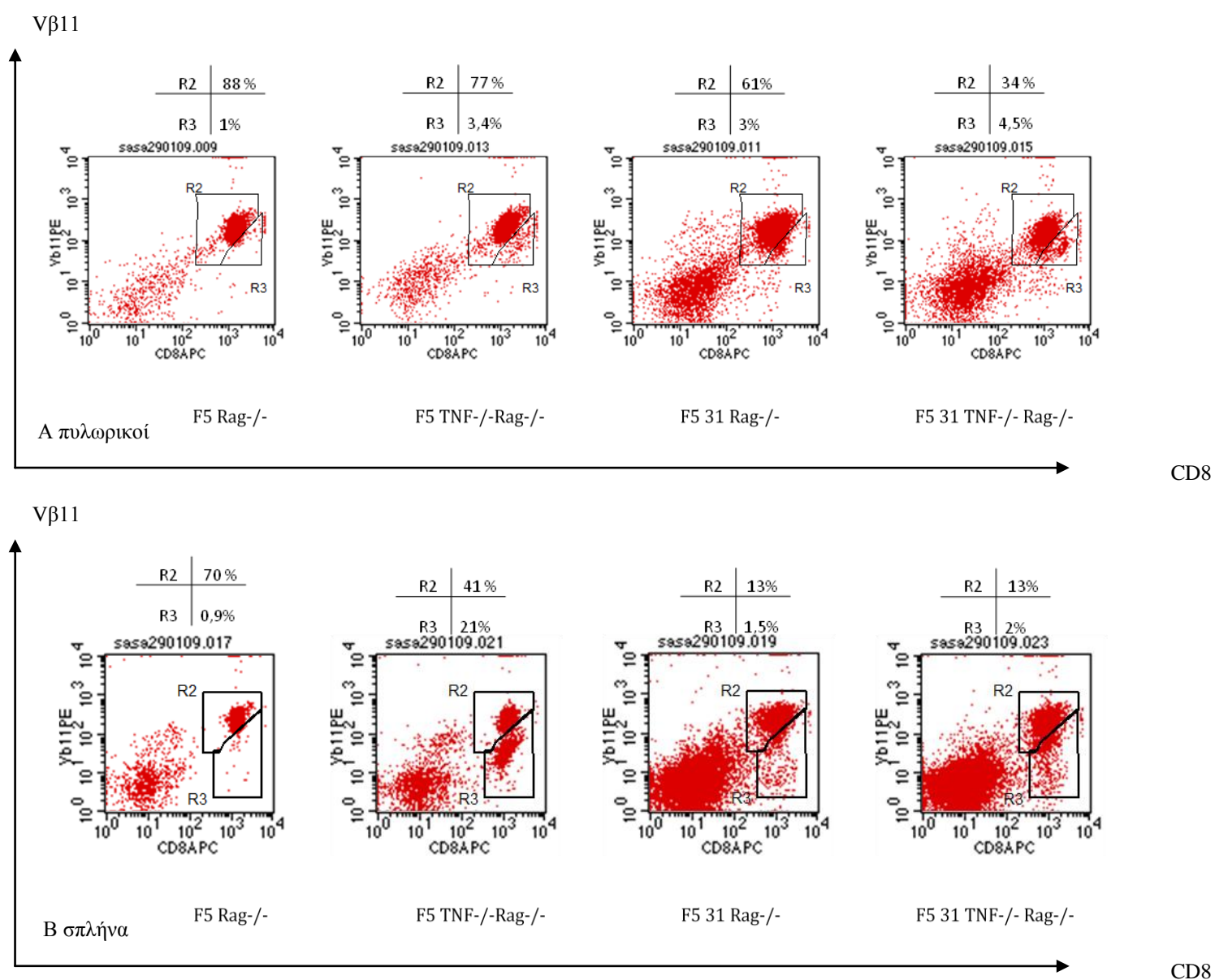


Εικόνα 3.11. Υποπληθυσμοί των T_{EM} , T_{CM} και T παρθένων/αφελών $CD8+$ σπληνοκυττάρων όπως αυτοί προέκυψαν με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αντι- $CD62L$ και αντι- $CD44$ αντισώματα. Παρουσιάζονται ζώα (♂) αντιπροσωπευτικά κάθε γονότυπου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό κάθε υποπληθυσμού T_{EM} κύτταρα μνήμης τελεστές (T effector memory $CD62L- CD44+$), T_{CM} κύτταρα κεντρικής μνήμης (T central memory $CD62L+ CD44+$) και T παρθένα/αδαή (T naive $CD62L+ CD44-$). Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν στη λογική πύλη $R1+R2$ ($CD8+$) επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης $R1$.

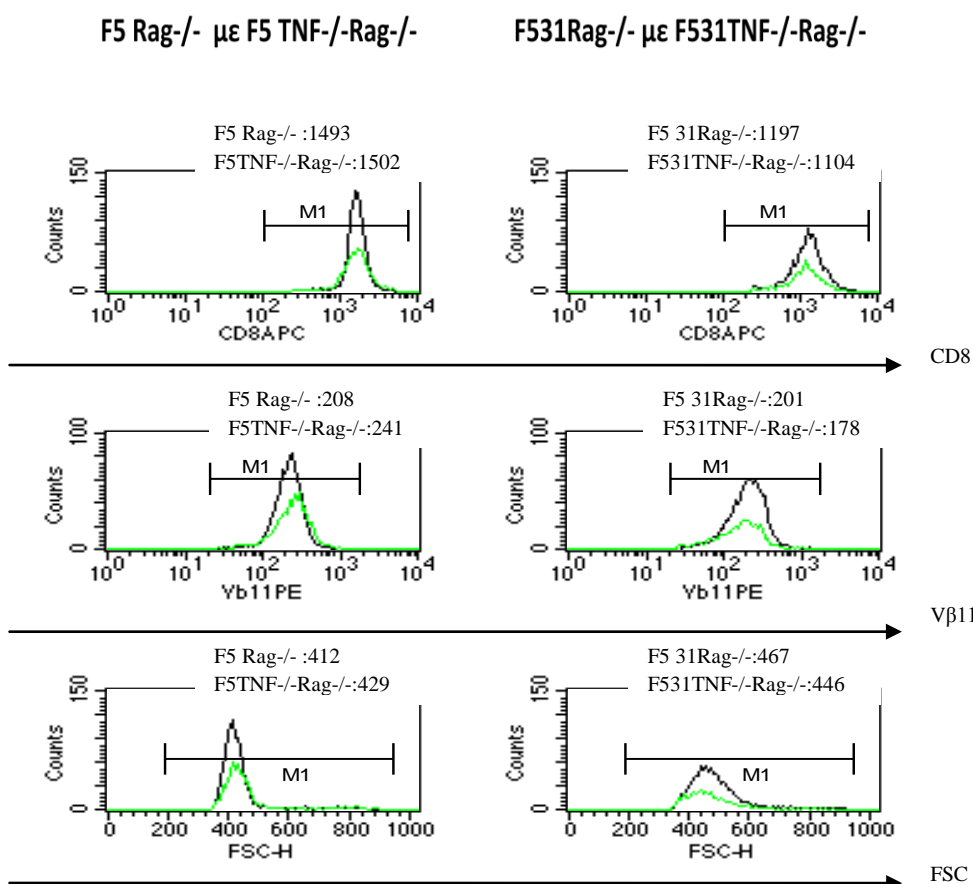
3.3. Περιφερικά λεμφικά όργανα: Λεμφαδένες πλωρικοί και μεσεντέριοι

Οι πλωρικοί λεμφαδένες μελετήθηκαν συνολικά στα εξής ζώα κάθε γονότυπου: 3(2♂+1♀) F5 Rag^{-/-}, 3(2♂+1♀) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, 3(2♂+1♀) F5 31 Rag^{-/-} και 2(♂) F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, ηλικίας 3-4 μηνών, με υγιή φαινότυπο. Ο ιστός που αφαιρέθηκε είχε φυσιολογική εξωτερική όψη, μορφολογία και μέγεθος σε κάθε περίπτωση. Στην εικόνα 3.12A παρουσιάζεται η κατανομή των T λεμφοκυττάρων (για ζώα αντιπροσωπευτικά κάθε γονότυπου) μετά από χρώση τους με αντι- $CD8$ και αντι- $V\beta 11$ αντισώματα, όπως αυτή προέκυψε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, ενώ στη δεύτερη σειρά (εικόνα 3.12B) απεικονίζεται η αντίστοιχη εικόνα τους στον ιστό της σπλήνας. Ο πληθυσμός $CD8+ V\beta 11^{LOW}$ στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου που εμφανίζεται στη σπλήνα, καταγράφεται επίσης και στους πλωρικούς λεμφαδένες (και στα τρία ζώα που μελετήθηκαν), ενώ δεν εμφανίζεται στα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου. Ταυτόχρονα ένας διακριτός $CD8+ V\beta 11^{LOW}$ πληθυσμός εμφανίζεται στους πλωρικούς και στα 2 ζώα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου που μελετήθηκαν, ενώ δεν αντικατοπτρίζεται στην εικόνα του ιστού της σπλήνας τους.

Η μέση ένταση φθορισμού (MFI) της επιφανειακής έκφρασης των μορίων $CD8$ και $V\beta 11$, όπως και της πρόσθιας σκέδασης (FSC) του περιχαρακωμένου πληθυσμού $R2: CD8+ V\beta 11^{HIGH}$ (εικόνα 3.12.A) όπως αυτή μελετήθηκε μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, δεν παρουσίασε κάποια διαφορά κατά τη σύγκριση τόσο των F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων όσο και μεταξύ των F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων (εικόνα 3.13). Η αντίστοιχη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των $CD8$ και $V\beta 11$, όπως και της πρόσθιας σκέδασης (FSC) του περιχαρακωμένου πληθυσμού $R3: CD8+ V\beta 11^{LOW}$ (εικόνα 3.13.A) σε σχέση με τις τιμές του $R2 CD8+ V\beta 11^{HIGH}$ πληθυσμού, κατέδειξε παρόμοια τιμή πρόσθιας σκέδασης στους δύο πληθυσμούς και αυξημένη μέση ένταση φθορισμού του $CD8$ στον $CD8+ V\beta 11^{LOW}$ πληθυσμό. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των $R2$ και $R3$ πληθυσμών στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου, όπως και αντίστοιχα στα ζώα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

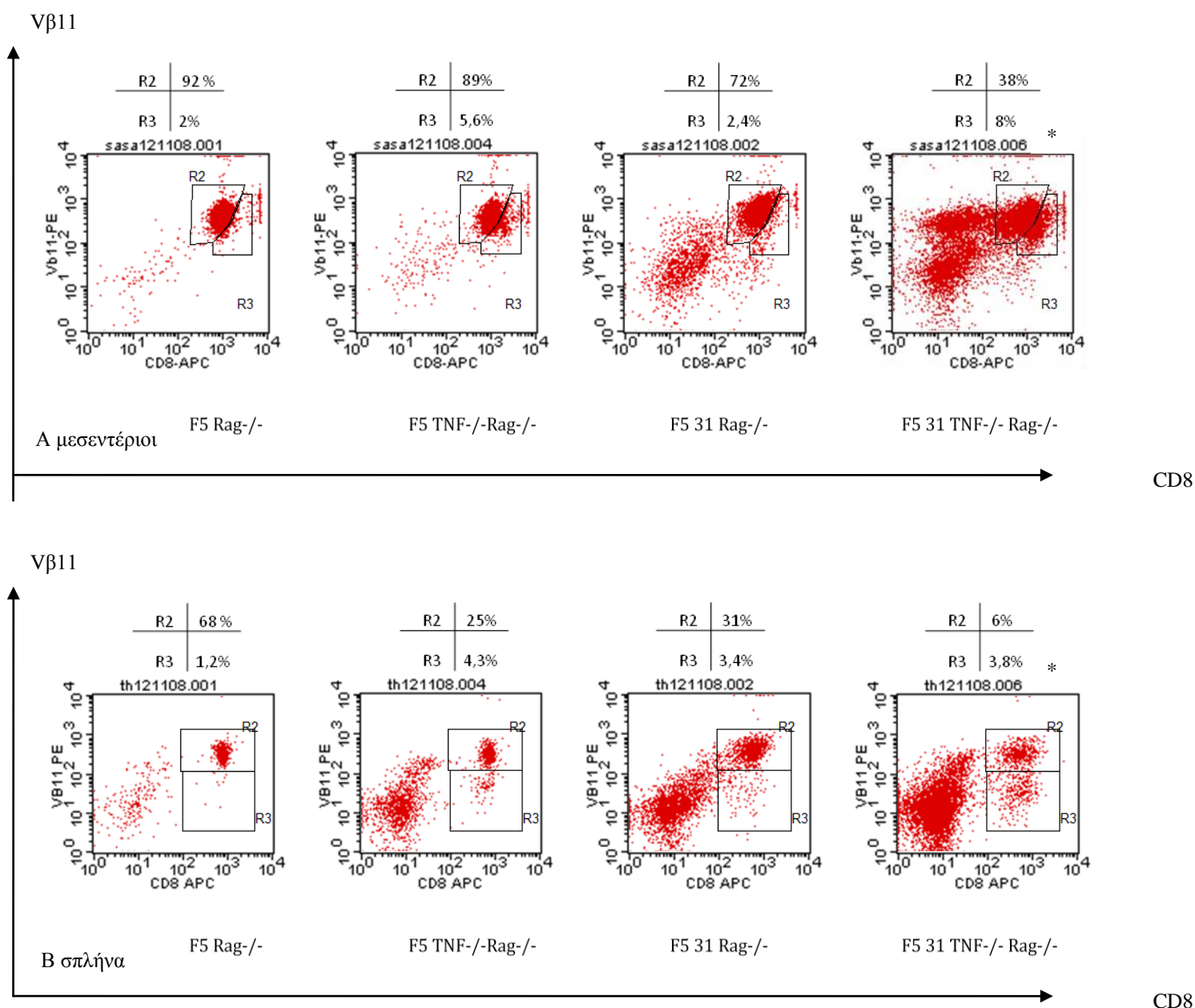


Εικόνα 3.12. α) Πυλωρικοί λεμφαδένες και β)σπλήνα: ανάλυση κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αντι-CD8 και αντι-Vβ11 αντισώματα. Α)Στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου εμφανίζεται ένας διακριτός CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμός, ο οποίος καταγράφεται και στην εικόνα του ιστού της σπλήνας τους (B),ενώ δεν εμφανίζεται στα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου. Ένας αντίστοιχος CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμός εμφανίζεται επίσης στα ζώα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8⁺ Vβ11^{HIGH} (R2) και των CD8⁺ Vβ11^{LOW} (R3) T λεμφοκυττάρων επί των ζωντανών επιλεγμένων κυττάρων της λογικής πύλης R1. Απεικονίζονται ζώα(♂) αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο.



Εικόνα 3.13. Πυλωρικοί λεμφαδένες: Ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC στον CD8+ Vβ11^{HIGH} πληθυσμό λεμφοκυττάρων. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των ζώων F5 Rag^{-/-} με F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) και F5 31 Rag^{-/-} με F5 31 TNF^{-/-}Rag^{-/-} (πράσινη γραμμή) όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των αντίστοιχων ζώων. Τα ζώα από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.12.

Οι μεσεντέριοι λεμφαδένες μελετήθηκαν συνολικά στα εξής ζώα κάθε γονότυπου: 3(♀) F5 Rag^{-/-}, 3(1+2*) (♀) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, 2(♀) F5 31 Rag^{-/-} και 2* (♀) F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, ηλικίας 3-4 μηνών, με υγιή φαινότυπο εκτός από τα ζώα που σημειώνονται με αστερίσκο (*). Τα ζώα χωρίς υγιή φαινότυπο αναλύθηκαν ξεχωριστά και δεν συμπεριλαμβάνονται στα αποτελέσματα που αφορούν τον ιστό του θύμου, σπλήνας και πυλωρικών λεμφαδένων. Ο ιστός που αφαιρέθηκε είχε φυσιολογική εξωτερική όψη, μορφολογία και μέγεθος σε κάθε περίπτωση, εκτός από τα ζώα χωρίς υγιή φαινότυπο(*) τα οποία ήταν καχεκτικά και είχαν διογκωμένους μεσεντέριους λεμφαδένες. Στην εικόνα 3.14A παρουσιάζεται η κατανομή των T λεμφοκυττάρων μετά από χρώση τους με αντι-CD8 και αντι-Vβ11 αντισώματα, όπως αυτή προέκυψε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, ενώ στη δεύτερη σειρά (εικόνα 3.14B) απεικονίζεται η αντίστοιχη εικόνα τους στον ιστό της σπλήνας. Ο πληθυσμός CD8+ Vβ11^{LOW} στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου που εμφανίζεται στη σπλήνα και τους πυλωρικούς λεμφαδένες καταγράφεται επίσης και στους μεσεντέριους (σε δύο από τα τρία ζώα που μελετήθηκαν), ενώ δεν εμφανίζεται στα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου. Επίσης, ένας διακριτός CD8+ Vβ11^{LOW} πληθυσμός εμφανίζεται στους μεσεντέριους λεμφαδένες των 2 F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων που παρουσίαζαν μη-υγιή φαινότυπο. Επιπρόσθετα ο πληθυσμός αυτός καταγράφηκε σε ένα από τα δύο ζώα και στον ιστό της σπλήνας (εικόνα 3.14.B), όπως και στους πυλωρικούς λεμφαδένες (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



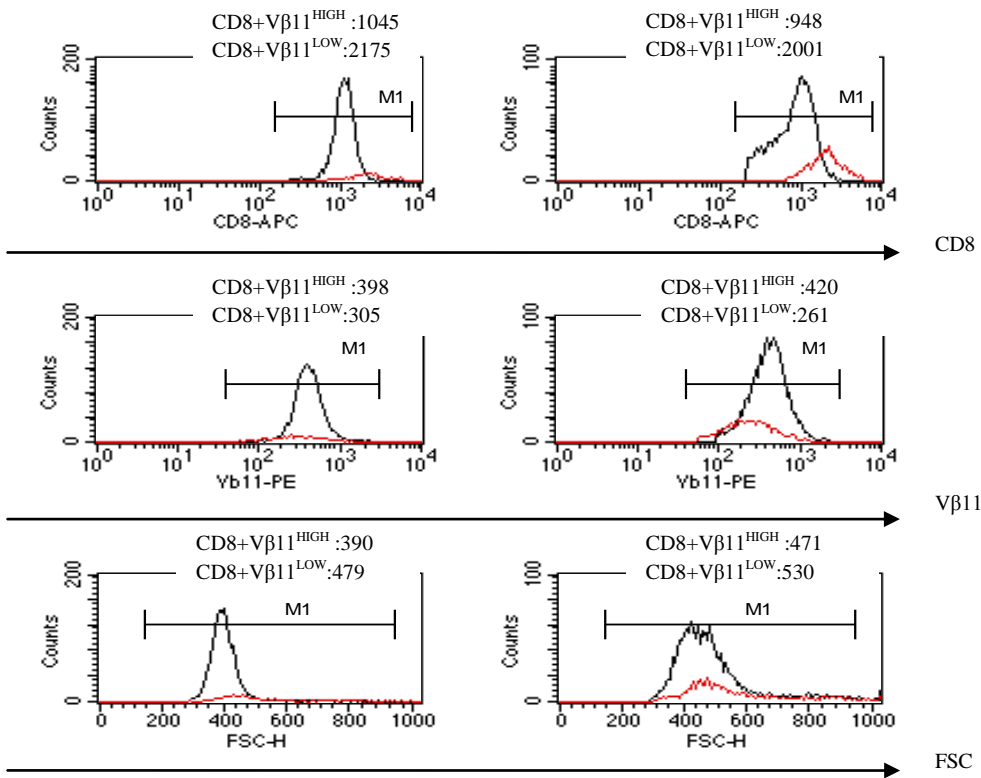
Εικόνα 3.14. α) Μεσεντέριοι λεμφαδένες και β)σπλήνα: ανάλυση κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αντι-CD8 και αντι-Vβ11 αντισώματα. Α)Στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου εμφανίζεται ένας διακριτός CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμός, ο οποίος καταγράφεται και στην εικόνα του ιστού της σπλήνας τους (B),ενώ δεν εμφανίζεται στα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου. Ένας αντίστοιχος CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμός εμφανίζεται επίσης στα ζώα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου, τα οποία είχαν μη-υγιή φαινότυπο(*). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8⁺ Vβ11^{HIGH} (R2) και των CD8⁺ Vβ11^{LOW} (R3) T λεμφοκυττάρων επί των ζωντανών επιλεγμένων κυττάρων της λογικής πύλης R1. Απεικονίζονται ζώα(♀) αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο.

Ο περιχαρακωμένος πληθυσμός R2: CD8⁺ Vβ11^{HIGH} (εικόνα 3.14A) κατά την σύγκριση μεταξύ των F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων όσο και μεταξύ των F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, δεν παρουσίασε κάποια διαφορά στο επίπεδο έκφρασης των CD8 και Vβ11, ούτε στην πρόσθια σκέδαση, όπως αυτά μελετήθηκαν με βάση την μέση ένταση φθορισμού των αντίστοιχων ιστογραμμάτων (δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η αντίστοιχη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των CD8 και Vβ11, όπως και της πρόσθιας σκέδασης (FSC) του περιχαρακωμένου πληθυσμού R3:CD8⁺ Vβ11^{LOW} (εικόνα 3.14.A) σε σχέση με τις τιμές του R2 CD8⁺ Vβ11^{HIGH} πληθυσμού, τόσο στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, όπως και στα F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} κατέδειξε ότι ο πληθυσμός R3:CD8⁺ Vβ11^{LOW} είχε αυξημένη μέση ένταση φθορισμού του CD8 όπως και αυξημένη πρόσθια σκέδαση (εικόνα 3.15).

CD8+ Vβ11^{HIGH}
 με CD8+ Vβ11^{LOW}

F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}

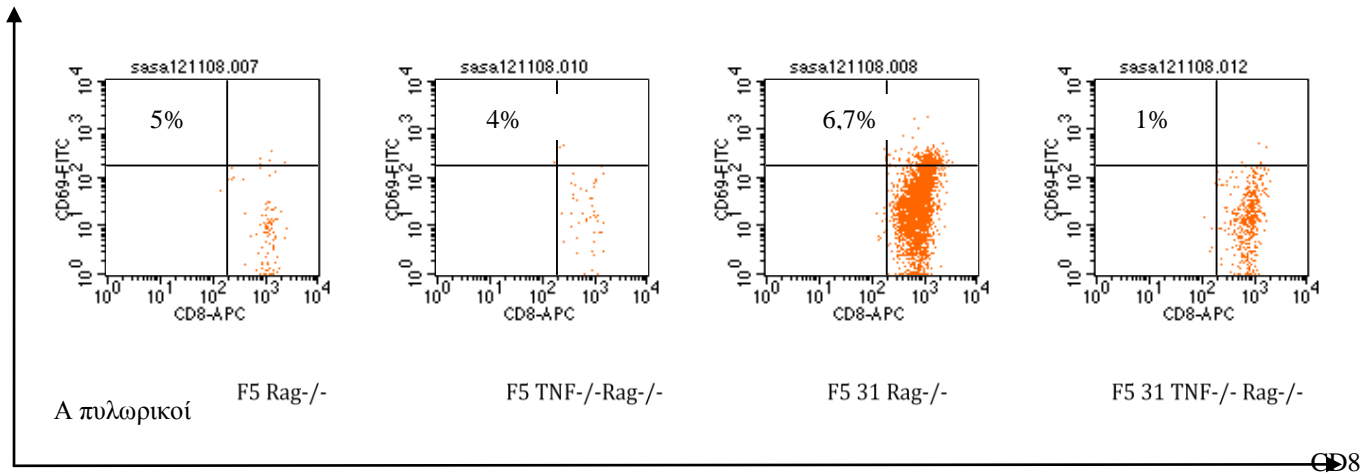
F5 31TNF^{-/-} Rag^{-/-}



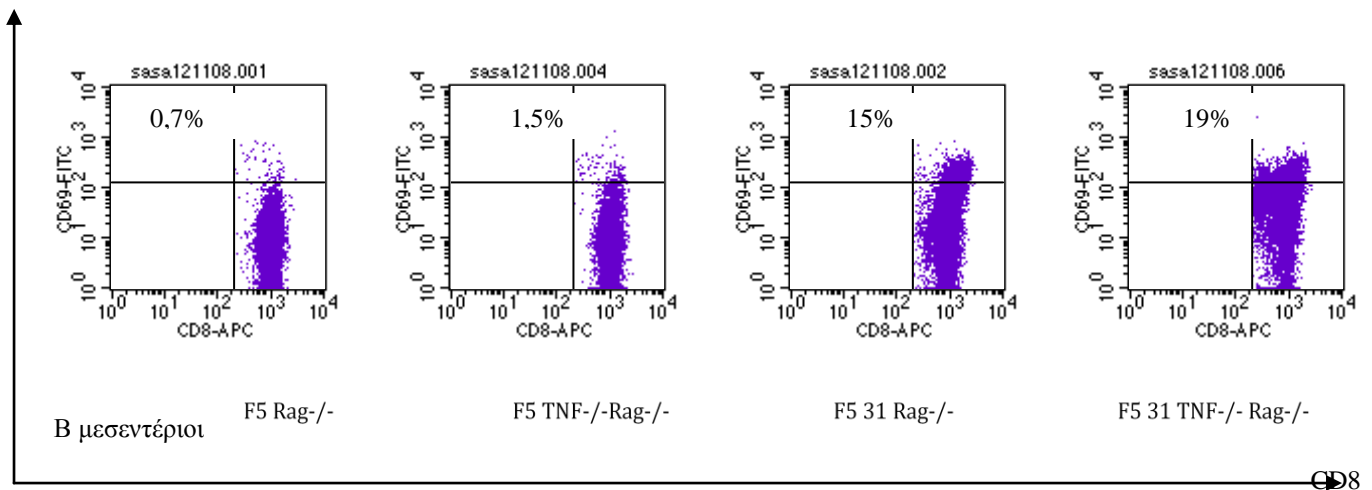
Εικόνα 3.15. Μεσεντέριοι λεμφαδένες F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 31TNF^{-/-} Rag^{-/-}: Ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των πληθυσμών CD8+ Vβ11^{HIGH} (μαύρη γραμμή) και CD8+ Vβ11^{LOW} (κόκκινη γραμμή) όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των αντιστοιχων ζώων. Τα ζώα από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.14.

Στα παραπάνω θηλυκά ζώα μελετήθηκε επίσης τόσο στην περίπτωση των πλωρικών όσο και των μεσεντέριων λεμφαδένων η έκφραση του μάρτυρα ενεργοποίησης CD69 μετά από χρώση με αντι-CD69. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ένα αμελητέα μικρό ποσοστό των CD8+ Vβ11^{HIGH} κυττάρων ως θετικό στους πλωρικούς λεμφαδένες των ζώων όλων των γονοτύπων (εικόνα 3.16A), ενώ στους μεσεντέριους ένα μικρό ποσοστό των CD69+ κυττάρων του CD8+ Vβ11^{HIGH} πληθυσμού ήταν διακριτό στα ζώα F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου (εικόνα 3.15B). Αντίστοιχα στον CD8+ Vβ11^{LOW} πληθυσμό και συγκεκριμένα στους πλωρικούς λεμφαδένες το ποσοστό των CD69+ κυττάρων ήταν αμελητέο στα ζώα όλων των γονοτύπων (δεδομένα δεν παρουσιάζονται), ενώ στους μεσεντέριους υπήρχε ένα διακριτό ποσοστό στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}, F5 31 Rag^{-/-} και F5 31 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (εικόνα 3.17).

CD69

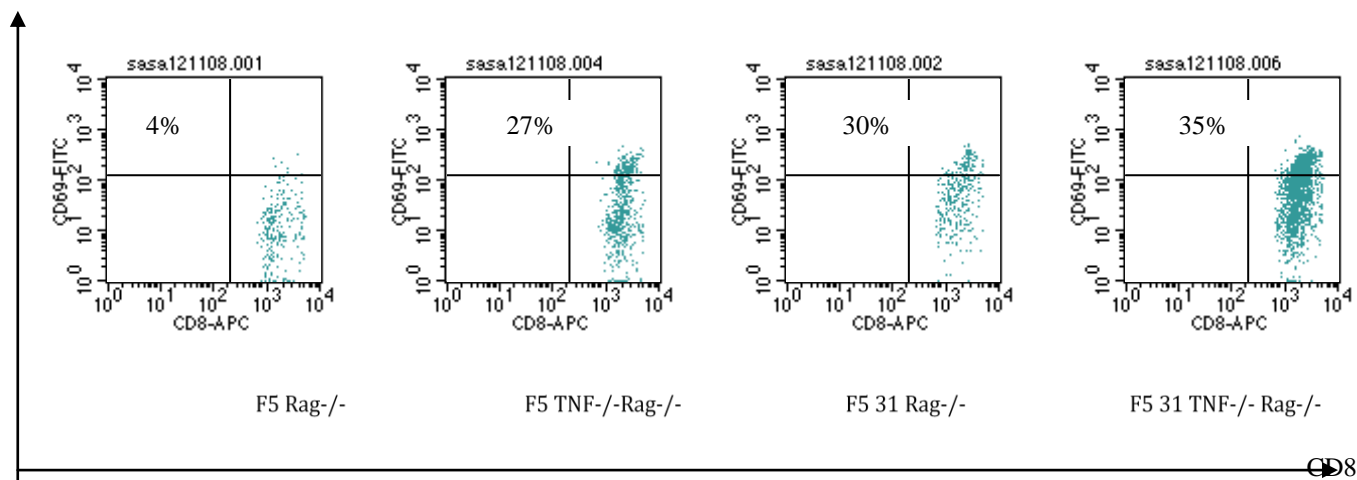


CD69



Εικόνα 3.16. Α) πλωρικοί και Β) μεσεντέριοι λεμφαδένες : χρήση με αντι- CD69 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής στα κύτταρα του CD8+ Vβ11^{HIGH} πληθυσμού. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD69+ CD8+ Vβ11^{HIGH} κυττάρων. Τα ζώα που παρουσιάζονται (♀) είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.14. Τα κύτταρα αντιστοιχούν στη λογική πύλη R1+R2 επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης R1.

CD69

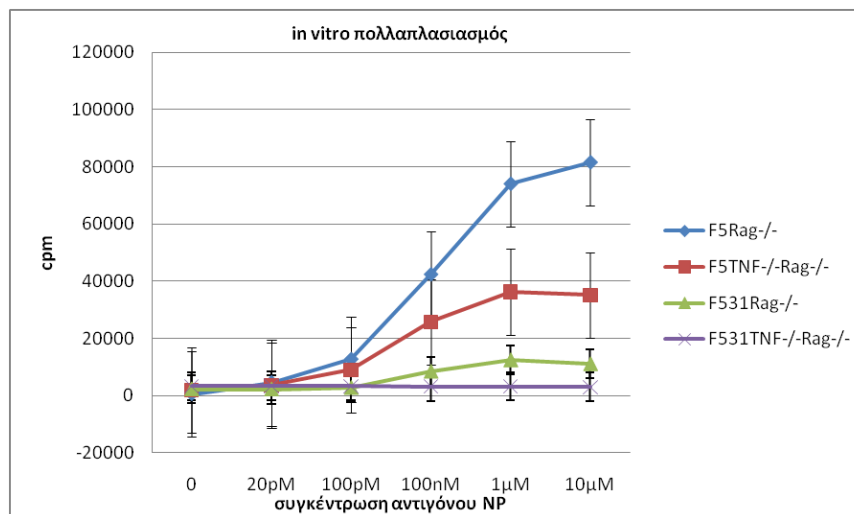


Εικόνα 3.16 Μεσευτέριοι λεμφαδένες : χρώση με αντι- CD69 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής στα κύτταρα του CD8+ Vβ11^{low} πληθυσμού. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD69+ CD8+ Vβ11^{low} κυττάρων. Τα ζώα που παρουσιάζονται (♀) είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.14. Τα κύτταρα αντιστοιχούν στη λογική πύλη R1+R2 επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης R1.

3.4. *In vitro* πολλαπλασιασμός και παραγωγή INFγ σε απάντηση στο NP-αντιγόνο.

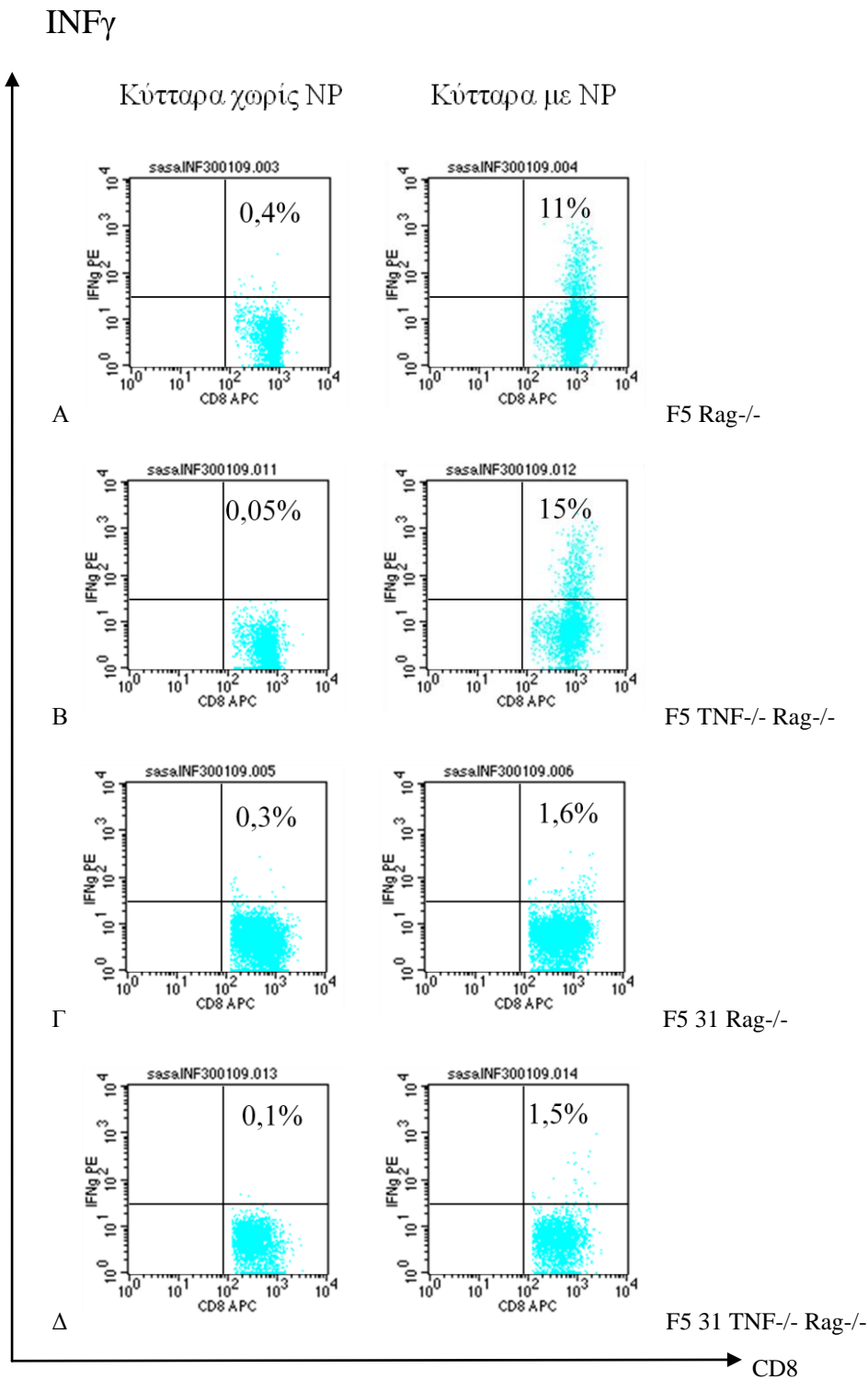
Στη μελέτη αυτή περιελήφθησαν συνολικά τα εξής ζώα από κάθε γονότυπο: 5(2♂+3♀) F5 Rag-/-, 5 (2♂+3[2*]♀) F5 TNF-/- Rag-/-, 5(2♂+3♀) F5 31 Rag-/- και 4 (2♂+2*♀) F5 31 TNF-/- Rag-/-, ηλικίας 3-4 μηνών, με υγιή φαινότυπο, εκτός από την περίπτωση των ζώων που σημειώνονται με αστερίσκο(*). Σημειώνεται ότι τα δεδομένα από τα ζώα χωρίς υγιή φαινότυπο δεν παρέκκλιναν από αυτά των υγιών.

Η δοκιμασία πολλαπλασιασμού έγινε σε απομονωμένα CD8+T σπληνοκύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν *in vitro* με διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντιγόνου NP, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.17. Στα ζώα F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου καταγράφηκε μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες F5 Rag-/- γονότυπου, ενώ τα ζώα F5 31 Rag-/- και F5 TNF-/- Rag-/-γονότυπου εμφάνισαν πολύ μικρή ικανότητα πολλαπλασιασμού ως απάντηση στο αντιγόνο NP, με τα F5 31 Rag-/- να υπερτερούν ελαφρώς επί των F5 31 TNF-/- Rag-/-.



Εικόνα 3.17.: *In vitro* δοκιμασία πολλαπλασιασμού CD8+T σπληνοκυττάρων ως απάντηση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντιγόνου NP. Απεικονίζονται τα δεδομένα ενός πειράματος από τα τέσσερα που πραγματοποιήθηκαν με όμοια αποτελέσματα. Εμφανίζονται οι γραμμές πλέγματος του τυπικού σφάλματος.

Ακολούθως παρουσιάζονται τα δεδομένα που αφορούν στην παραγωγή ιντερφερόνης γάμμα (INFγ) από απομονωμένα CD8+T σπληνοκύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν *in vitro* με ακτινοβολημένα C57BL/10 είτε μη ακτινοβολημένα Rag1-/- σπληνοκύτταρα φορτωμένα (loaded) ή όχι με το αντιγόνο NP. Η ανίχνευση της παραγωγής ιντερφερόνης έγινε μετά από ενδοκυττάρια χρώση με αντι-INFγ και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Σε απάντηση σε κύτταρα μη φορτωμένα με το αντιγόνο NP, κανένα από τα ζώα που εξετάστηκαν από όλους τους γονότυπους δεν παρήγαγε INFγ, ενώ σε απάντηση σε φορτωμένα κύτταρα με το πεπτιδίο NP τα ζώα F5 Rag-/- και F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου απάντησαν με παραγωγή INFγ, ενώ αυτή η ιδιότητα απουσίαζε από τα ζώα των F5 31 Rag-/- και F5 31 TNF-/- Rag-/- γονότυπων (εικόνα 3.18). Όλα τα πειράματα που αναφέρονται στην ενότητα αυτή έγιναν με την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία της Κα. Ντέλυ Τσουκάτου.

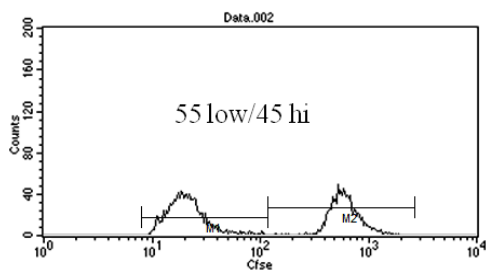


Εικόνα 3.18.: Παραγωγή INF γ CD8 $^{+}$ T σπληνοκυττάρων ως απάντηση σε *in vitro* καλλιέργεια με ακτινοβολημένα C57BL/10 είτε μη ακτινοβολημένα Rag1 $^{-/-}$ σπληνοκύτταρα φορτωμένα (loaded) ή όχι με το αντιγόνο NP. Όπου α) ζώα F5 Rag $^{-/-}$, β) F5 TNF $^{-/-}$ Rag $^{-/-}$ γ) F5 31 Rag $^{-/-}$, δ) F5 31 TNF $^{-/-}$ Rag $^{-/-}$. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στην καλλιέργεια CD8 $^{+}$ T σπληνοκυττάρων με σπληνοκύτταρα χωρίς αντιγόνο NP (unloaded), ενώ η δεύτερη στην καλλιέργεια CD8 $^{+}$ T σπληνοκυττάρων με σπληνοκύτταρα φορτωμένα με αντιγόνο NP (loaded). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8 $^{+}$ INF γ $^{+}$ T κυττάρων κάθε ζώου. Παρουσιάζονται τα δεδομένα ενός πειράματος από τα τέσσερα που πραγματοποιήθηκαν συνολικά με όμοια αποτελέσματα. Τα κύτταρα που απεικονίζονται προέρχονται από την λογική πύλη R2 (CD8 $^{+}$) επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης R1.

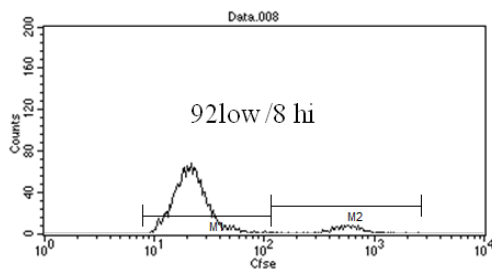
3.5. *In vivo* κυτταροτοξικότητα

Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν τα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου έχουν την ικανότητα να σκοτώνουν *in vivo* σπληνοκύτταρα φορτωμένα με το πεπτίδιο NP (όπως έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο) πραγματοποιήθηκε η παθητική μεταφορά μείγματος CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο, σε αποδέκτες F5 Rag^{-/-} και F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου και ακολούθησε ανάλυση των αποδεκτών 19 ώρες μετά την μεταφορά των κυττάρων στόχων. Στο πείραμα αυτό περιελήφθησαν 3(♂) ζώα F5 Rag^{-/-} και 2(♂) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ηλικίας 3 μηνών με υγιή φαινότυπο. Ως θετικοί μάρτυρες (παρουσία *in vivo* κυτταροτοξικότητας) χρησιμοποιήθηκαν ένα ζώο(♂) F5 31 Rag^{-/-} (*in vivo* κυτταροτοξικότητα σε προηγούμενα πειράματα) όπως και ένα ζώο (♂) F5 Rag^{-/-} το οποίο είχε ενεθεί (24 ώρες πριν την έναρξη της διαδικασίας παθητικής μεταφοράς κυττάρων στους αποδέκτες) με το πεπτίδιο NP, ηλικίας και τα δύο ηλικίας 5 μηνών με υγιή φαινότυπο, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας (απουσία *in vivo* κυτταροτοξικότητας) χρησιμοποιήθηκε ένα ζώο B10 ηλικίας 6 μηνών με υγιή φαινότυπο (εικόνα 3.19).

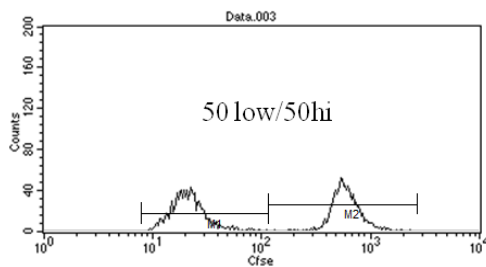
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.20 που συνοψίζει τα δεδομένα αυτού του πειράματος, τα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου παρουσιάζουν *in vivo* κυτταροτοξικότητα ειδική για το αντιγόνο απαλείφοντας τα κύτταρα στόχους που έχουν φορτωθεί με το πεπτίδιο NP και όχι τα κύτταρα στόχους που δεν είναι φορτωμένα με το πεπτίδιο. Αυτή η ιδιότητα απουσιάζει από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} γονότυπου τα οποία δεν σκοτώνουν τα κύτταρα στόχους είτε αυτά είναι φορτωμένα με το πεπτίδιο είτε όχι. Ταυτόχρονα η ικανότητα *in vivo* κυτταροτοξικότητας των F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώων εμφανίζεται κατά πολύ αυξημένη σε σχέση με το ζώο F5 Rag^{-/-} γονότυπου το οποίο είχε δεχτεί ένεση με το πεπτίδιο NP (primed), όπως και σημαντικά υψηλότερη από την εικόνα της *in vivo* κυτταροτοξικότητας που παρουσιάζει το ζώο F5 31 Rag^{-/-}.



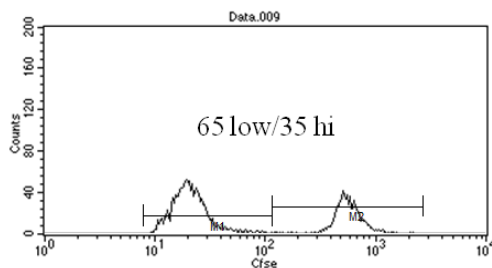
B10 μάρτυρας



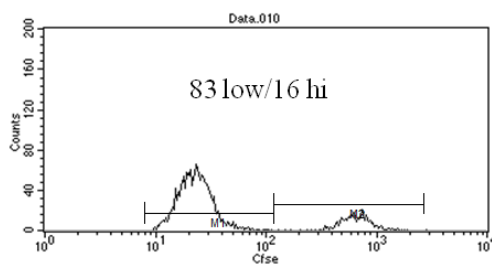
F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-}



F5 Rag^{-/-}



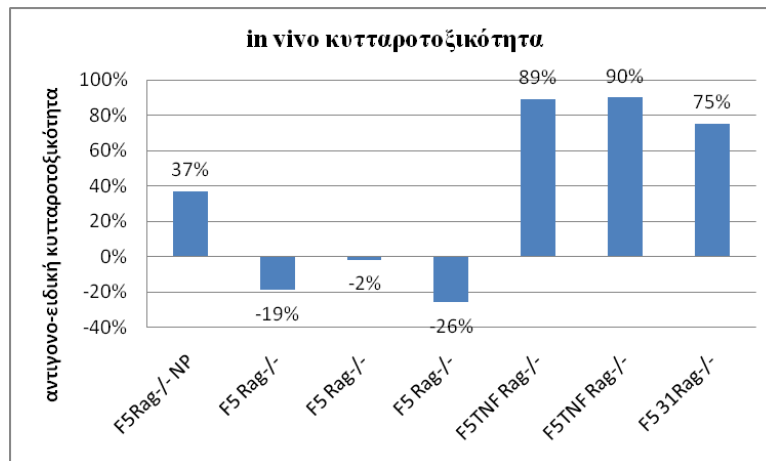
F5 Rag^{-/-} που δέχτηκε ένεση NP



F5 31 Rag^{-/-}

→CFSE

Εικόνα 3.19. In vivo αντιγено-ειδική κυτταροτοξικότητα αποδεκτών μετά από παθητική μεταφορά μείγματος CFSE (high με πεπτίδιο /low) σημασμένων κυττάρων στόχων και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα ζώα αποδέκτες αναλύθηκαν 19 ώρες αφού είχε μεταφερθεί σε αυτά μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα ζώα B10 (αρνητικός μάρτυρας), ένα F5 Rag^{-/-} που είχε ενεθεί με το πεπτίδιο 24 ώρες πριν την στιγμή μηδέν (αρχή παθητικής μεταφοράς), όπως και ένα F5 31 Rag^{-/-} (θετικοί μάρτυρες). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των κυττάρων που καταγράφηκαν μέσα στο πλαίσιο των ορίων M1 (CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο) και M2 (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένα με το πεπτίδιο). Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν στη λογική πύλη R2 (CFSE+FL2-) επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης R1.

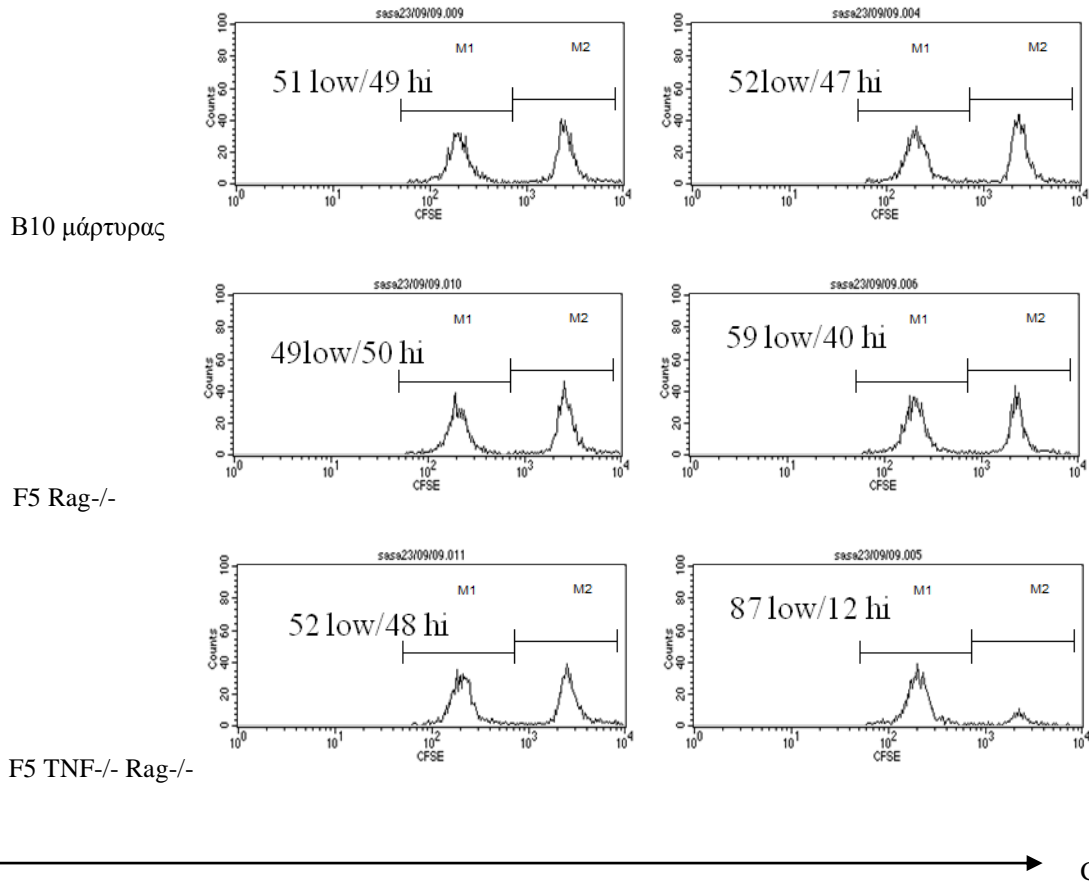


Εικόνα 3.20. Ποσοστό *in vivo* αντιγено-ειδικής κυτταροτοξικότητας αποδεκτών μετά από παθητική μεταφορά μείγματος CFSE (high με πεπτίδιο /low) σημασμένων κυττάρων στόχων. Όπου F5 Rag-/- NP :το ζώο που ενέθηκε με το αντιγόνο 24 ώρες πριν την έναρξη της παθητικής μεταφοράς των κυττάρων στόχων. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει μετά από κανικοποίηση των δεδομένων με βάση τα δεδομένα του μάρτυρα B10 ($\% \text{κυτταροτοξικότητα} = 1 - \frac{\% \text{κυττ άρων CFSE HI} \times \frac{\% \text{κυττ άρων CFSE LOW B10}}{\% \text{κυττ άρων CFSE HI B10}}}{\% \text{κυττ άρων CFSE LOW}} \times 100$).

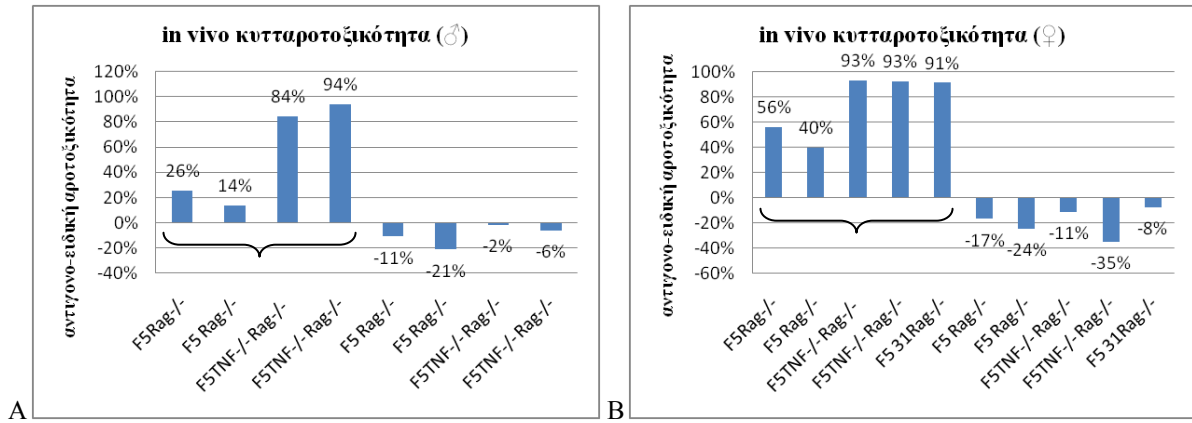
Στη συνέχεια προκειμένου να εξακριβώσουμε εάν η *in vivo* κυτταροτοξικότητα που παρατηρήθηκε σε απάντηση στα CFSE-high-σημασμένα φορτωμένα με το πεπτίδιο σπληνοκύτταρα μπορεί να οφείλεται στη χρώση CFSE-high των κυττάρων κάνοντάς τα πιο επιρρεπή στην κυτταρόλυση σε σχέση με τα CFSE-low-σημασμένα σπληνοκύτταρα, ακολουθήσαμε την εξής τροποποίηση στην προσέγγισή μας: οι μισοί αποδέκτες ενέθηκαν με μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο(πρώτο μείγμα), όπως και προηγούμενα, ενώ οι υπόλοιποι μισοί αποδέκτες ενέθηκαν με μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο (δεύτερο μείγμα) και ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής 19 ώρες μετά την παθητική μεταφορά των κυττάρων στόχων. Οι αποδέκτες ήταν 4(♂) ζώα F5 Rag-/- και 4(♂) ζώα F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου, ηλικίας 2-3 μηνών με υγιή φαινότυπο, οι μισοί εκ των οποίων δέχτηκαν το πρώτο μείγμα κυττάρων(CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο) και οι υπόλοιποι μισοί το δεύτερο μείγμα όπως περιγράφεται παραπάνω. Ως μάρτυρες (ένα ζώο για κάθε συνθήκη) χρησιμοποιήθηκαν 2 ζώα B10 ηλικίας 2 μηνών με υγιή φαινότυπο(εικόνα 3.21). Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε επίσης με αποδέκτες 4(♀) ζώα F5 Rag-/- και 4(♀) ζώα F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου, ηλικίας 4-7 μηνών με υγιή φαινότυπο (μάρτυρες 2 ζώα B10 ηλικίας 7 μηνών με υγιή φαινότυπο, όπως και 2 ζώα F5 31 Rag-/- ηλικίας 6-7 μηνών με υγιή φαινότυπο), δίνοντας την ίδια εικόνα αποτελεσμάτων.

Συγκεκριμένα τα ζώα F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου επιδεικνύουν *in vivo* κυτταροτοξικότητα στοχευμένη στα κύτταρα που είναι φορτωμένα με το αντιγόνο NP χωρίς αυτή να επηρεάζεται από την χρώση CFSE high των κυττάρων, αφού τα κύτταρα CFSE high που δεν είναι φορτωμένα με το πεπτίδιο δεν αποτελούν στόχους της *in vivo* κυτταροτοξικότητας των αποδεκτών. Η παρατηρηθείσα *in vivo* αντιγено-ειδική κυτταροτοξικότητα των F5 TNF-/- Rag-/- ζώων είναι κατά πολύ μεγαλύτερη των ζώων F5 Rag-/- ενώ είναι ίση με αυτή που εμφανίζεται στα F5 31 Rag-/- ζώα (εικόνα 3.22).

Στόχοι CFSE-Hi χωρίς NP/CFSE-Low χωρίς NP Στόχοι CFSE-Hi με NP/CFSE-Low χωρίς NP

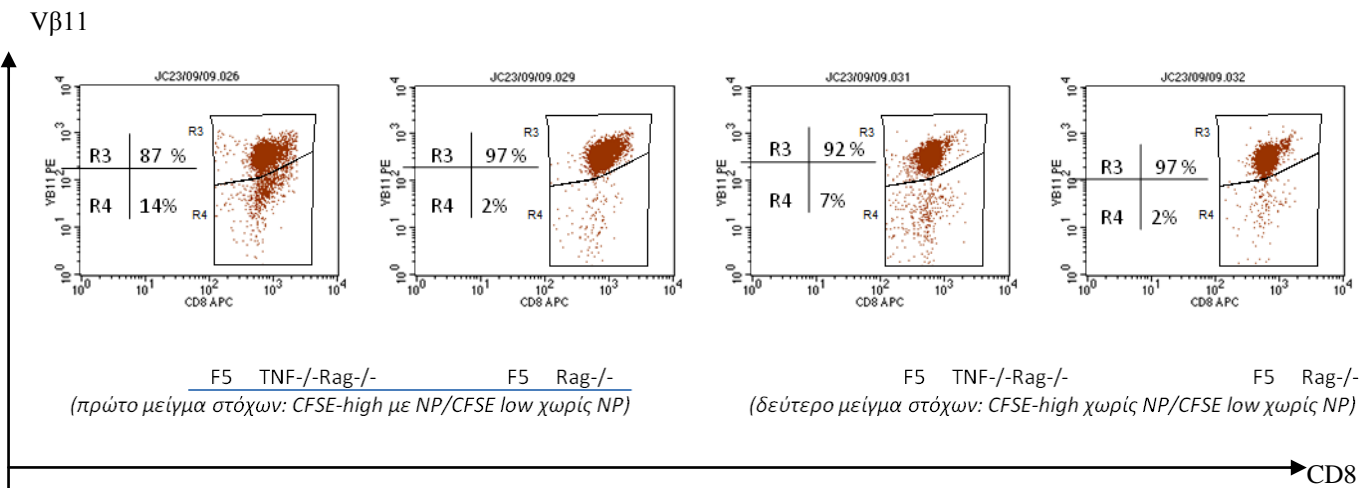


Εικόνα 3.21. Η *in vivo* κυτταροτοξικότητα αποδεκτών μετά από παθητική μεταφορά μείγματος CFSE σημασμένων κυττάρων στόχων είναι αντιγονο-ειδική και δεν επηρεάζεται από τη χρώση CFSE. Τα ζώα αποδέκτες αναλύθηκαν 19 ώρες αφού είχε μεταφερθεί σε αυτά μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο είτε μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν B10 ζώα. Τα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου σκοτώνουν ειδικά τα φορτωμένα με πεπτίδιο CFSE-high-σημασμένα κύτταρα στόχους και όχι τα αντίστοιχα CFSE-high-σημασμένα κύτταρα χωρίς το πεπτίδιο. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των κυττάρων που καταγράφηκαν μέσα στο πλαίσιο των ορίων M1(CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο) και M2 (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένα με το πεπτίδιο). Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν στη λογική πύλη R2 (CFSE+) επί των ζωντανών κυττάρων της πύλης R1.



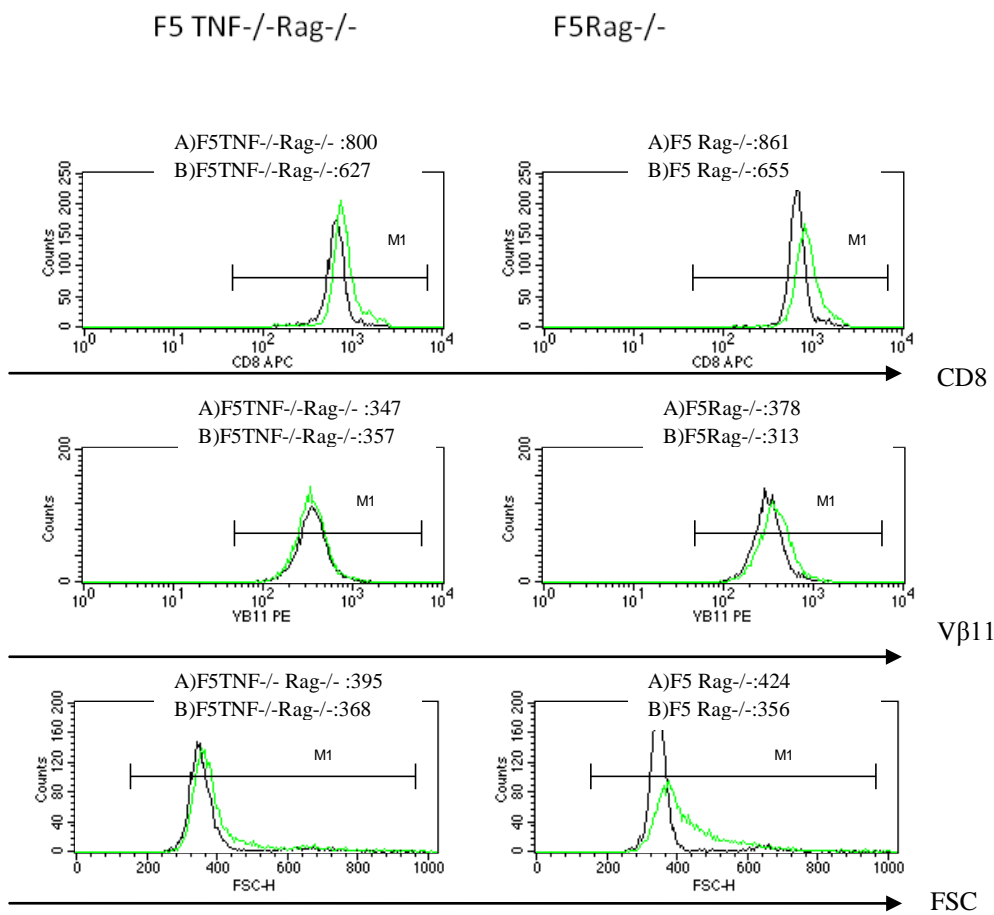
Εικόνα 3.22. Ποσοστό in vivo αντιγено-ειδικής κυτταροτοξικότητας αποδεκτών μετά από παθητική μεταφορά μείγματος CFSE σημασμένων κυττάρων στόχων. Α) ♂ τα πρώτα τέσσερα ζώα (σημειώνονται με αγκύλη) έλαβαν μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτιδίιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο και τα υπόλοιπα τέσσερα έλαβαν μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων χωρίς το πεπτιδίιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο. Β) ♀ Αντίστοιχα τα πρώτα πέντε ζώα έλαβαν (σημειώνονται με αγκύλη) μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων φορτωμένων με το πεπτιδίιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο και τα υπόλοιπα πέντε έλαβαν μείγμα CFSE-high-σημασμένων B10 σπληνοκυττάρων χωρίς το πεπτιδίιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει μετά από κανικοποίηση των δεδομένων με βάση τα δεδομένα του μάρτυρα B10 (%κυτταροτοξικότητα = $1 - \frac{\% \text{κυττάρων CFSE HI} \times \frac{\% \text{κυττάρων CFSE LOW B10}}{\% \text{κυττάρων CFSE HI B10}}}{\% \text{κυττάρων CFSE LOW}} \times 100$).

Στη σπλήνα των ζώων που μελετήθηκαν (♂+♀) καταγράφηκε ο CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμός κυττάρων σε όλα τα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} γονότυπου (τόσο σε αυτά που δέχτηκαν το πρώτο όσο και σε αυτά που δέχτηκαν το δεύτερο μείγμα κυττάρων στόχων) ενώ απουσίαζε από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-} (εικόνα 3.23).



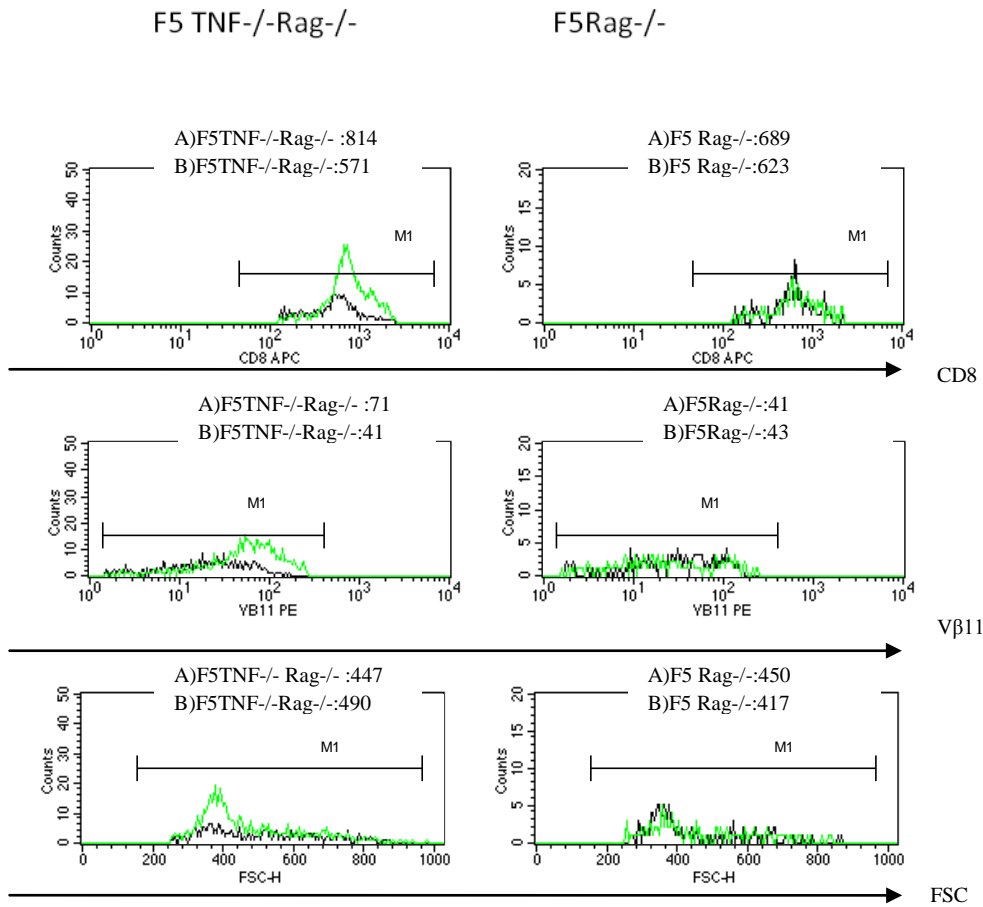
Εικόνα 3.23: Σπλήνα, ανάλυση με κυτταρομετρίας ροής μετά από χρήση με αντι-CD8 και αντι-Vβ11 αντισώματα των αποδεκτών της παθητικής μεταφοράς κυττάρων στόχων. Τα δύο πρώτα ζώα από αριστερά έλαβαν το πρώτο μείγμα κυττάρων στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένων με το πεπτιδίιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο), ενώ τα επόμενα δύο έλαβαν το δεύτερο μείγμα (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτιδίιο). Στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} εμφανίζεται ένας διακριτός CD8⁺ Vβ11^{LOW} (R4) πληθυσμός, ο οποίος απουσιάζει από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag^{-/-}. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8⁺ Vβ11^{HIGH} (R3) και CD8⁺ Vβ11^{LOW} (R4) πληθυσμών. Παρουσιάζονται (♂)ζώα αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο. Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν στη λογική πύλη R1+R2 (CD8+Vβ11+) επί των ζωντανών της πύλης R1.

Στον CD8+ Vβ11^{HIGH} πληθυσμό τα επίπεδα έκφρασης των CD8 και Vβ11, καθώς και η πρόσθια σκέδαση FSC, όπως αναλύθηκε με βάση τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των αντίστοιχων ιστογραμμάτων, δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά μεταξύ των ζώων F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 Rag^{-/-} που δέχτηκαν το πρώτο μείγμα στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο), όπως και μεταξύ των ζώων F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 Rag^{-/-} που δέχτηκαν το δεύτερο μείγμα στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο). Ωστόσο στη σύγκριση μεταξύ των ζώων (F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 Rag^{-/-}) που δέχτηκαν το πρώτο μείγμα στόχων με τα αντίστοιχα που δέχτηκαν το δεύτερο μείγμα (χωρίς πεπτίδιο) παρατηρήθηκε στα ζώα και των δύο γονότυπων αύξηση στο επίπεδο του CD8 (εικόνα 3.24). Επιπλέον στα ζώα F5 Rag^{-/-} που έλαβαν το πρώτο μείγμα στόχων σε σχέση με τα αντίστοιχα F5 Rag^{-/-} που έλαβαν το δεύτερο μείγμα καταγράφηκε και αύξηση στην πρόσθια σκέδαση. (εικόνα 3.24), η οποία υποδηλώνει την ενεργοποίηση των F5 κυττάρων μετά τη συνάντηση με τα κύτταρα στόχους που φέρουν το πεπτίδιο και δεν παρατηρείται στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώα μαρτυρώντας την ήδη ενεργοποιημένη κατάστασή τους.



Εικόνα 3.24. Ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC στον CD8+ Vβ11^{HIGH} πληθυσμό σπληνοκυττάρων των αποδεκτών κυττάρων στόχων. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των ζώων στην αριστερή στήλη: A) (πράσινη γραμμή) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (έλαβε το πρώτο μείγμα CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο) με B) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} το οποίο έλαβε το δεύτερο μείγμα στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο). Στη δεξιά στήλη αντίστοιχα παρουσιάζονται τα A) (πράσινη γραμμή) F5 Rag^{-/-} (έλαβε το πρώτο μείγμα) με B) F5 Rag^{-/-} (έλαβε το δεύτερο μείγμα). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI). Τα ζώα (♂) από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.23.

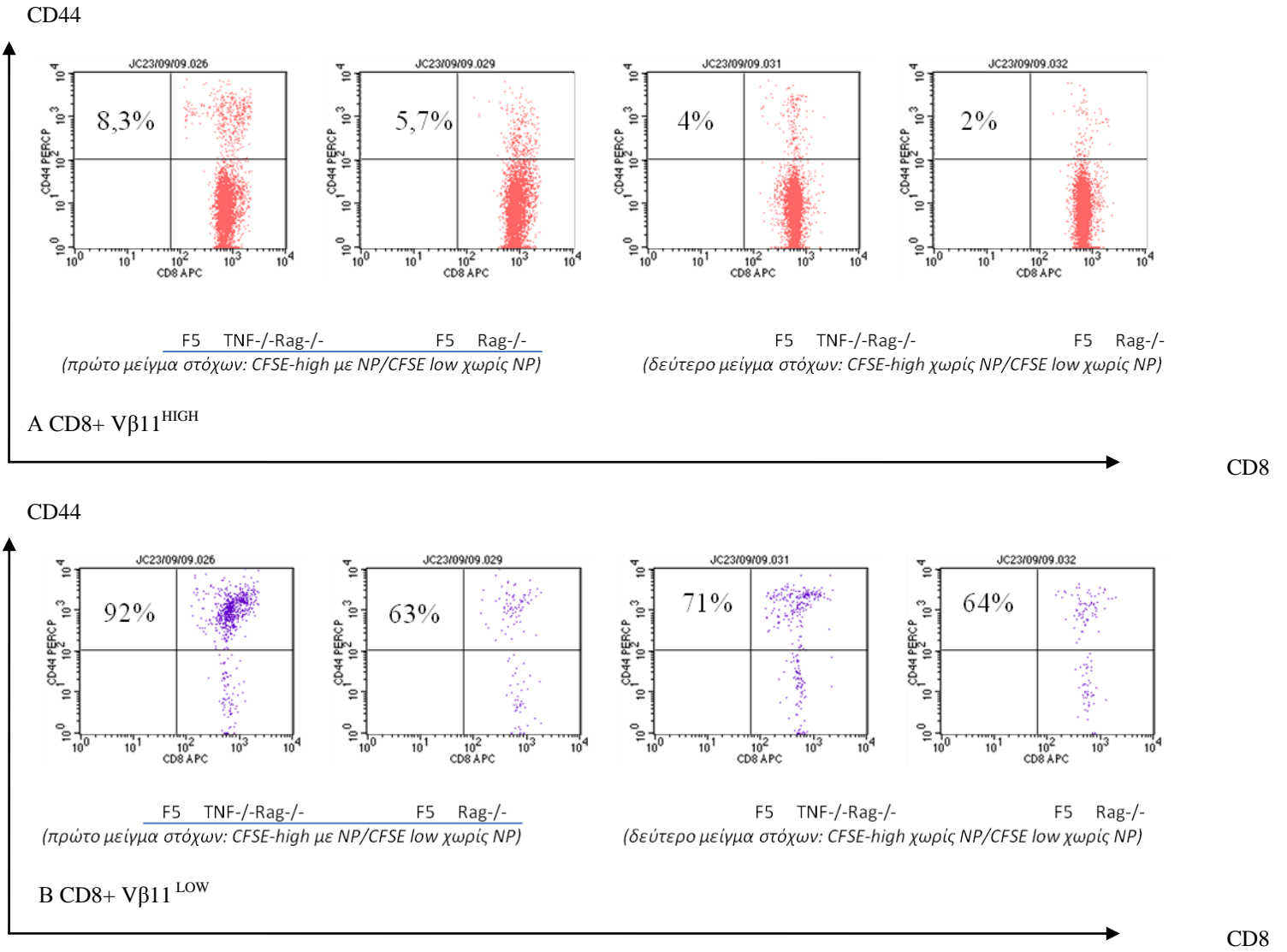
Αντίστοιχα στον CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμό, καταγράφηκε αύξηση στο επίπεδο του CD8 στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} ζώα που έλαβαν το πρώτο μείγμα σε σχέση με τα αντίστοιχα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} που έλαβαν το δεύτερο μείγμα, η οποία ήταν πιο διακριτή σε σχέση με την αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού που καταγράφηκε στα F5 Rag^{-/-} ζώα που έλαβαν το πρώτο μείγμα στόχων (εικόνα 3.24). Τα επίπεδα του Vβ11 όπως και η πρόσθια σκέδαση FSC δεν παρουσίασαν διαφορές (εικόνα 3.24).



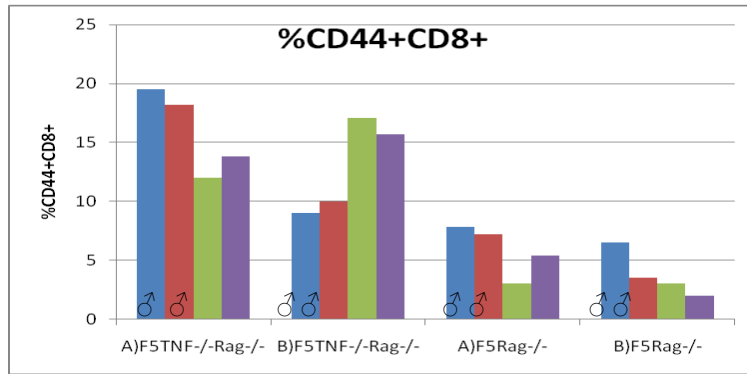
Εικόνα 3.25. Ιστογράμματα των CD8, Vβ11 και FSC στον CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμό σπληνοκυττάρων των αποδεκτών κυττάρων στόχων. Παρουσιάζονται με αλληλοεπικάλυψη τα ιστογράμματα των ζώων στην αριστερή στήλη: A) (πράσινη γραμμή) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (έλαβε το πρώτο μείγμα CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο) με B) F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} το οποίο έλαβε το δεύτερο μείγμα στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο) σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο). Στη δεξιά στήλη αντίστοιχα παρουσιάζονται τα A) (πράσινη γραμμή) F5 Rag^{-/-} (έλαβε το πρώτο μείγμα) με B) F5 Rag^{-/-} (έλαβε το δεύτερο μείγμα). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη μέση ένταση φθορισμού (MFI). Τα ζώα (♂) από κάθε γονότυπο είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.23.

Στα ζώα αυτά (♂+♀) μελετήθηκε επίσης η έκφραση του επιφανειακού μάρτυρα CD44 μετά από χρώση με αντι-CD44 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Στην εικόνα 3.26 παρουσιάζονται τα ποσοστά των CD44⁺CD8⁺ που καταγράφηκαν στον CD8⁺ Vβ11^{HIGH} και στον CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμό σπληνοκυττάρων. Φαίνεται ότι ένα μικρό ποσοστό του CD8⁺ Vβ11^{HIGH} πληθυσμού είναι CD44⁺, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό του CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμού είναι CD44⁺, τόσο στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} όσο και στα F5 Rag^{-/-} ζώα που έλαβαν το πρώτο και το δεύτερο μείγμα στόχων. Τα CD44⁺ κύτταρα και των δύο πληθυσμών (CD8⁺ Vβ11^{HIGH} και CD8⁺ Vβ11^{LOW}) είχαν υψηλή μέση ένταση φθορισμού του CD44 και του CD8, καθώς και υψηλό FSC (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Στο σύνολο των CD44⁺CD8⁺ κυττάρων (λογική πύλη R1+R2: CD8⁺) παρατηρήθηκε ότι τα ζώα Rag^{-/-} που έλαβαν το πρώτο μείγμα στόχων είχαν μια πολύ μικρή αύξηση στο ποσοστό των CD44⁺CD8⁺ κυττάρων σε σχέση με τα F5 Rag^{-/-} που έλαβαν το δεύτερο μείγμα (χωρίς το πεπτίδιο). Στα ζώα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} (♂+♀), τόσο σε αυτά που έλαβαν το πρώτο μείγμα όσο και σε αυτά που έλαβαν το δεύτερο μείγμα, καταγράφηκε μεγαλύτερο ποσοστό CD44⁺CD8⁺ σπληνοκυττάρων σε σχέση με τα αντίστοιχα F5 Rag^{-/-} ζώα. Ωστόσο στην περίπτωση των αρσενικών ζώων το ποσοστό αυτό παρουσιάζεται αυξημένο στα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} που έλαβαν το πρώτο μείγμα σε σχέση με τα αντίστοιχα F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} που έλαβαν το δεύτερο μείγμα, ενώ στα θηλυκά F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} καταγράφηκε η αντίθετη τάση (εικόνα 3.27). Περαιτέρω δεδομένα απαιτούνται για την αποσαφήνιση της επικρατούσας εικόνας.

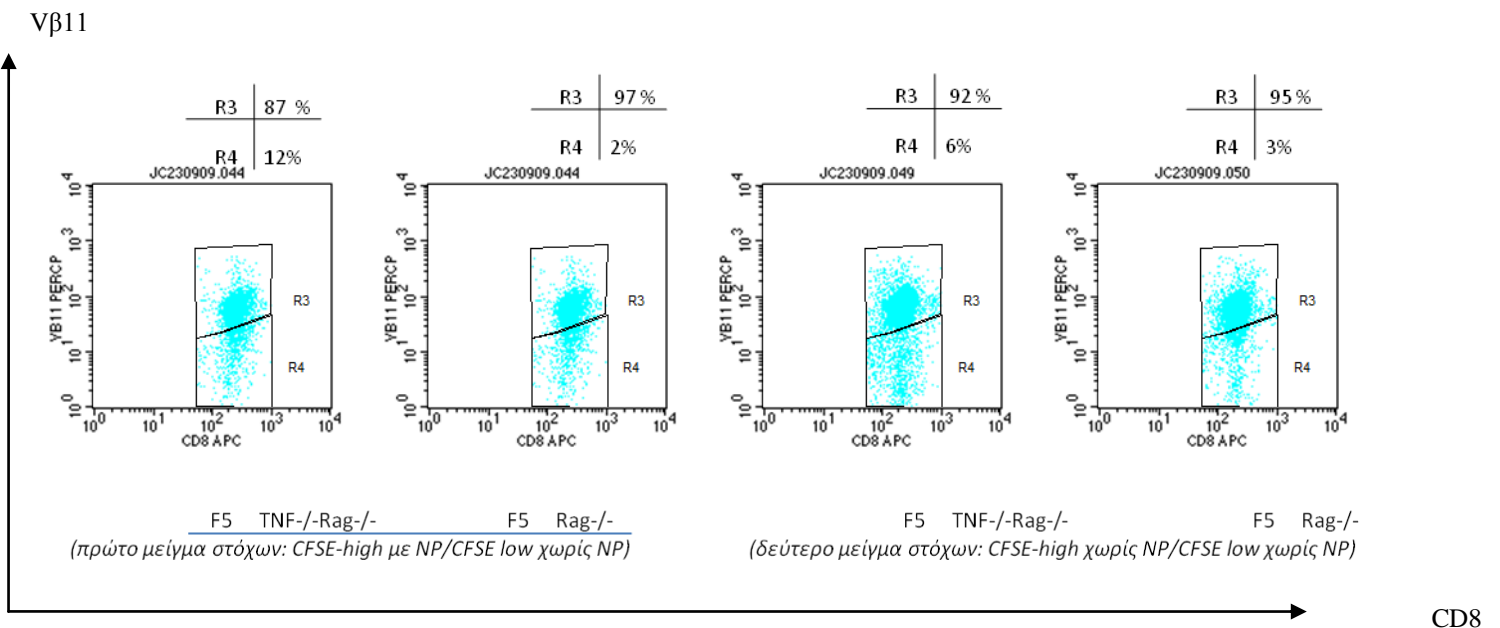


Εικόνα 3.26. Ποσοστό CD44+CD8+ σπληνοκυττάρων στους πληθυσμούς A) CD8+ Vβ11^{HIGH} και B) CD8+ Vβ11^{LOW} των αποδεκτών κυττάρων στόχων. Τα ζώα και οι συνθήκες είναι αντίστοιχα με αυτά της εικόνας 3.23.



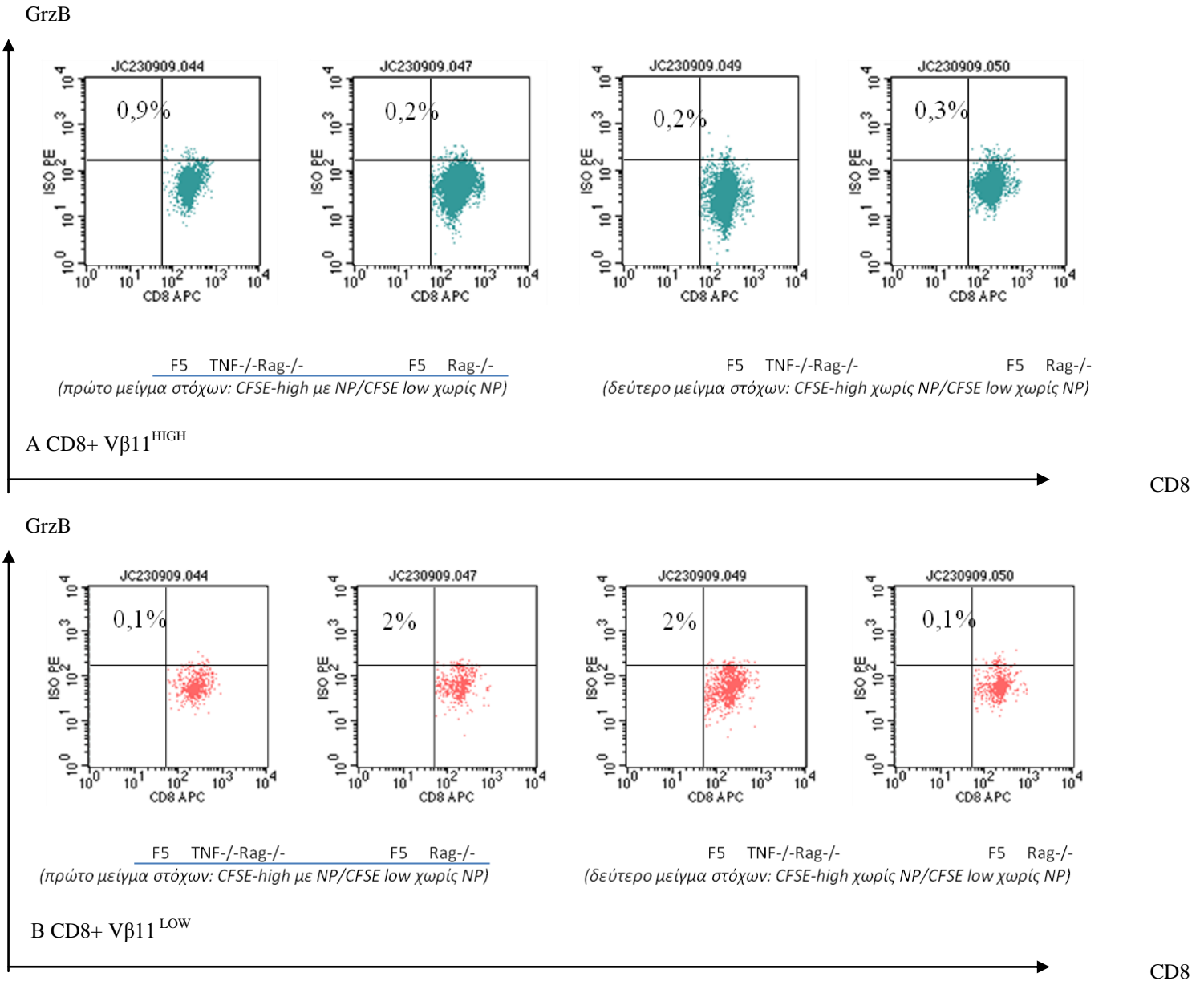
Εικόνα 3.27. Ποσοστό των CD44+CD8+ σπληνοκυττάρων στα ζώα αποδέκτες κυττάρων στόχων. Όπου A) μείγμα CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο και B) δεύτερο μείγμα στόχων(CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο). Τα δύο πρώτα από αριστερά ζώα κάθε γονότυπου είναι αρσενικά, ενώ τα επόμενα δύο είναι θηλυκά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στη λογική πύλη R1+R2 (CD44+CD8+) επί των ζωντανών κυττάρων της λογικής πύλης R1.

Στα αρσενικά ζώα τέλος μελετήθηκε ενδοκυττάρια η έκφραση της γκρανζύμης B(Granzyme B, GrzB) μετά από χρώση με αντι- GrzB. Μετά την επεξεργασία για την ενδοκυττάρια χρώση των σπληνοκυττάρων των ζώων αποδεκτών, τόσο αυτών που έλαβαν το πρώτο όσο και το δεύτερο μείγμα κυττάρων στόχων, καταγράφηκε και πάλι ο CD8+ Vβ11^{LOW} πληθυσμός στα ζώα F5 TNF-/- Rag-/- γονότυπου ενώ απουσίαζε από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag-/- (εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.28: Σπλήνα, ανάλυση με κυτταρομετρίας ροής μετά από επεξεργασία για ενδοκυττάρια χρώση των αποδεκτών της παθητικής μεταφοράς κυττάρων στόχων. Τα δύο πρώτα ζώα από αριστερά έλαβαν το πρώτο μείγμα κυττάρων στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένων με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο), ενώ τα επόμενα δύο έλαβαν το δεύτερο μείγμα (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο). Στα ζώα F5 TNF-/- Rag-/- εμφανίζεται ένας διακριτός CD8+ Vβ11^{LOW} (R4) πληθυσμός, ο οποίος απουσιάζει από τα ζώα μάρτυρες F5 Rag-/- . Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8+ Vβ11^{HIGH} (R3) και CD8+ Vβ11^{LOW} (R4) πληθυσμών. Παρουσιάζονται (♂)ζώα αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο. Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν στη λογική πύλη R1+R2 (CD8+Vβ11+) επί των ζωντανών της πύλης R1.

Η ενδοκυττάρια χρώση για την γκρανζίνη Β δεν κατέδειξε κάποια διαφορά τόσο μεταξύ των συγκριθέντων γονότυπων F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 Rag^{-/-}, όσο και μεταξύ των ζώων που έλαβαν το πρώτο μείγμα κυττάρων στόχων σε σχέση με εκείνα που έλαβαν το δεύτερο μείγμα. Επιπλέον δεν καταγράφηκε διαφορά στο ποσοστό των GrzB⁺ CD8⁺ κυττάρων μεταξύ του CD8⁺ Vβ11^{HIGH} και CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμού στα ζώα που συγκρίθηκαν (εικόνα 3.29). Στα GrzB⁺ CD8⁺ κύτταρα δεν καταγράφηκε κάποια διαφορά στη μέση ένταση φθορισμού των CD8, GrzB και Vβ11 όπως και στη μέση ένταση φθορισμού της πρόσθιας σκέδασης FSC (δεδομένα δεν παρουσιάζονται) τόσο μεταξύ των συγκριθέντων γονότυπων F5 TNF^{-/-} Rag^{-/-} και F5 Rag^{-/-}, όσο και μεταξύ των ζώων που έλαβαν το πρώτο μείγμα κυττάρων στόχων σε σχέση με εκείνα που έλαβαν το δεύτερο μείγμα.



Εικόνα 3.29.: Σπλήνα (♂) ανάλυση με κυτταρομετρία ροής μετά από ενδοκυττάρια χρώση με αντι-GrzB και αντι-CD8 των αποδεκτών της παθητικής μεταφοράς κυττάρων στόχων . Όπου A) CD8⁺ Vβ11^{HIGH} και B) CD8⁺ Vβ11^{LOW} πληθυσμός σπληνοκυττάρων. Τα δύο πρώτα ζώα από αριστερά έλαβαν το πρώτο μείγμα κυττάρων στόχων (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα φορτωμένον με το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο), ενώ τα επόμενα δύο έλαβαν το δεύτερο μείγμα (CFSE-high-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο σε ίση αναλογία με CFSE-low-σημασμένα B10 σπληνοκύτταρα χωρίς το πεπτίδιο). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο ποσοστό των CD8⁺ GrzB⁺ κυττάρων. Παρουσιάζονται (♂)ζώα αντιπροσωπευτικά από κάθε γονότυπο. Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν στη λογική πύλη A) R1+R3 (CD8⁺ Vβ11^{HIGH}) και B) R1+R4 (CD8⁺ Vβ11^{LOW}) επί των ζωντανών της πύλης R1.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επαγωγή της ανοχής στα T λεμφοκύτταρα η οποία διαδραματίζεται στον θύμο μέσω των μηχανισμών της κεντρικής ανοχής όσο και από ανάλογους μηχανισμούς στην περιφέρεια που δρουν επί των εν δυνάμει αυτοδραστικών T κυττάρων που έχουν ξεφύγει από την κεντρική απαλοιφή του θύμου, είναι ουσιαστικής σημασίας για την ευημερία του οργανισμού καθώς συντελεί στην αποφυγή επιζήμιων ανοσολογικών αποκρίσεων καθώς και στην αποφυγή της αυτοανοσίας. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF είναι μία κυττοκίνη ικανή να επάγει τόσο προφλεγμονώδεις όσο και ανοσοκατασταλτικές αποκρίσεις, με εμφανή εμπλοκή σε αρκετές αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις παθήσεις στον άνθρωπο, ενώ δεδομένα μαρτυρούν τη συμβολή του στη ρύθμιση των μηχανισμών επαγωγής της ανοχής.

Για τους λόγους αυτούς στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος του TNF στη δημιουργία και τη διατήρηση της περιφερικής ανοχής των κυτταροτοξικών CD8+ T κυττάρων στο σύστημα των F5 31Rag-/- και F531TNF-/-Rag-/- ζώων, τα οποία έχουν CD8+ T κύτταρα που φέρουν έναν διαγονιδιακό TCR υποδοχέα (F5 κύτταρα) ικανό να αναγνωρίζει το εννιαμερές πεπτίδιο (366-374) NP της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού της γρίπης A/NT/60/68, στο πλαίσιο MHC μορίων τάξης I, ενώ ταυτοχρόνως εκφράζουν το πεπτίδιο NP ως αντιγόνο εαυτού σε όλους τους ιστούς. Παράλληλα μελετήθηκαν και αποκρίσεις των CD8+ T κυττάρων στο σύστημα των F5Rag-/- και F5TNF-/-Rag-/- ζώων, τα οποία ήταν οι μάρτυρες του πειράματος.

Ξεκινώντας από τον θύμο αδένα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον μηχανισμό της κεντρικής ανοχής των θυμοκυττάρων απουσία του TNF, με εξαίρεση το ελαφρώς αυξημένο ποσοστό των διπλά αρνητικών θυμοκυττάρων (CD8-CD4-) στα F5TNF-/-Rag-/- σε σχέση με F5 Rag-/- ζώα (πίνακας 3.1), όπως και με τον μειωμένο αριθμό ολικών διπλά θετικών (CD8+CD4+) και μονά θετικών (CD8+CD4-)T κυττάρων στα F531TNF-/-Rag-/- ζώα σε σχέση με τα F531 Rag-/- (πίνακας 3.1). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μείωση του ολικού αριθμού και του ποσοστού των διπλά αρνητικών (CD8-CD4-)T κυττάρων στα F531 Rag-/- σε σχέση με τα F5 Rag-/- ζώα, ενώ στα F531TNF-/-Rag-/- ζώα σε σχέση με τα F5TNF-/-Rag-/- παρατηρήθηκε μειωμένος ολικός αριθμός των μονά θετικών (CD8+CD4-)T κυττάρων. Προηγούμενα δεδομένα σε σχέση με τον ρόλο του TNF στους μηχανισμούς της θετικής και αρνητικής επιλογής στον θύμο είναι αντικρουόμενα [53-56] και τα δεδομένα που συλλέξαμε στην παρούσα εργασία δεν επαρκούν για να διευκρινιστεί εάν ο TNF συμμετέχει ή όχι σε αυτήν τη διαδικασία. Ωστόσο, είναι πιθανό κάποιες από τις παρατηρήσεις αυτές να οφείλονται στη διακύμανση των ολικών θυμοκυττάρων, που καταγράφηκαν στα F531TNF-/-Rag-/- ζώα συμπαρασύροντας έτσι και τους ολικούς αριθμούς των αντίστοιχων μονά και διπλά θετικών θυμοκυττάρων, ενώ η επιμέρους ποσοστίαση των υποπληθυσμών όπως προέκυψε από την κυτταρομετρία ροής δεν εμφάνισε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκριθέντων γονότυπων. Για τον λόγο αυτό, απαιτούνται περισσότερα δεδομένα σε αυτήν την κατεύθυνση προτού εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για τη συμβολή του TNF στον μηχανισμό της κεντρικής ανοχής στον θύμο.

Εν συνεχεία στο κεντρικό δευτερογενές λεμφικό όργανο της σπλήνας, παρατηρήθηκε σχετική κλωνική απαλοιφή των F5 κυττάρων όταν αυτά μελετήθηκαν στο σύστημα των F531 Rag-/- ζώων, που εκφράζουν το αντιγόνο NP σε πολλούς ιστούς τους, σε σχέση με τα F5 Rag-/- ζώα. Η κλωνική αυτή απαλοιφή δεν ήταν αυξημένη στην απουσία του TNF, όπως μαρτυρούν οι αριθμοί των CD8+ T κυττάρων στα F5TNF-/-Rag-/- ζώα σε σχέση με τα F531TNF-/-Rag-/-ζώα που βλέπουν το αντιγόνο *in vivo* (πίνακας 3.2), ωστόσο παρατηρήθηκε ότι ο ολικός αριθμός των CD8+ T κυττάρων ήταν ελαφρώς μειωμένος στα F531TNF-/-Rag-/- ζώα σε σχέση με τα F531 Rag-/-, υποδηλώνοντας μία πιθανή εμπλοκή του TNF στην περιφερική κλωνική απαλοιφή των κυτταροτοξικών CD8+ T κυττάρων. Ταυτόχρονα στα F5TNF-/-Rag-/- ζώα καταγράφηκε μειωμένος αριθμός CD8+ T κυττάρων σε σχέση με αυτόν των F5 Rag-/- ζώων, ο οποίος σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη [61] φαίνεται να οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα επιβίωσης των περιφερικών CD8+ T κυττάρων στην απουσία του TNF.

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CD8+ T σπληνοκυττάρων με χρώση επιφανειακών μαρτύρων ενεργοποίησης, έδειξε ότι στα F5 Rag-/- ζώα, το σύνολο των CD8+ T κυττάρων τους είναι αρνητικά για την έκφραση των CD69 και CD44 μαρτύρων ενεργοποίησης, γεγονός που τα εντάσσει στην κατηγορία των αδαών T λεμφοκυττάρων (T naive) που δεν έχουν ενεργοποιηθεί, ενώ στα F5TNF-/-Rag-/- ζώα παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό CD69+ CD8+ T κυττάρων καθώς και ένα σημαντικό ποσοστό CD44+ CD8+ T κυττάρων, υποδηλώνοντας την ενεργοποίησή τους (εικόνες 3.10 και 3.11). Χαρακτηριστικό είναι ότι στο συνδυασμό χρώσης με CD62L και CD44, ο οποίος χρησιμοποιείται για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CD8+ T κυττάρων κεντρικής μνήμης (T_{CM}) και CD8+ T κυττάρων δραστών μνήμης (T_{EM}) [105], το σύνολο των F5 κυττάρων στα F5 Rag-/- ζώα ήταν CD62L+ CD44- δηλαδή αδαή, ενώ στα F5TNF-/-Rag-/- ζώα ένα σημαντικό ποσοστό χαρακτηρίστηκε ως CD62L- CD44+ όπως μπορούν να προσδιοριστούν με βάση αυτούς τους επιφανειακούς μάρτυρες τα CD8+ T κύτταρα μνήμης δραστές (T_{EM}). Είναι ίσως πιθανόν ένα μέρος των ενεργοποιημένων CD8+ T κυττάρων που καταγράφηκαν στα ζώα F5TNF-/-Rag-/-, να έχει διαφοροποιηθεί σε T κύτταρα μνήμης δραστές(T_{EM}), αν και απαιτείται η χρήση και άλλων επιφανειακών μαρτύρων ενεργοποίησης(όπως για παράδειγμα η συνδυαστική χρώση με CCR7,CD44,CD62L και IL7R [106] είτε η συνδυαστική χρώση με CD62L, IL7R, IL2, CD43 και CD27 [107]) προκειμένου να είμαστε σίγουροι για την ύπαρξη αυτού του πληθυσμού CD8+ T κυττάρων.

Από την άλλη στο σύστημα των ζώων που εκφράζουν το αντιγόνο NP, είναι εμφανής η ενεργοποίηση των περιφερικών CD8+ T κυττάρων με μεγάλο ποσοστό να είναι θετικά για τον μάρτυρα CD69 (εικόνα 3.10) και το σύνολό τους να είναι CD44+ (εικόνα 3.11). Πιο συγκεκριμένα, στην ανάλυση μετά από τη διπλή χρώση με CD62L και CD44, τόσο στα F531 Rag-/- όσο και στα F531TNF-/-Rag-/- ζώα, ο πληθυσμός των CD8+ T κυττάρων τους κατανεμήθηκε ισοσκελώς σε CD62L- CD44+ και CD62L+ CD44+, υποδηλώνοντας την παρουσία ενεργοποιημένων κυττάρων και πιθανώς διαφοροποιημένων σε CD8+ T κύτταρα μνήμης δραστές(T_{EM}), και CD8+ T κύτταρα κεντρικής μνήμης (T_{CM}) αντίστοιχα. Η ενεργοποίηση των F5 κυττάρων, όπως αυτή μελετήθηκε με βάση την έκφραση του μάρτυρα

CD69 στο σύστημα της αυτοανοχής καταγράφηκε επίσης και στους πυλωρικούς και μεσεντέριους λεμφαδένες, όπου και ήταν περισσότερο εμφανής στη δεύτερη περίπτωση (εικόνα 3.16), ενώ ανάλογα τα F5 κύτταρα των F5 Rag^{-/-} και F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων ήταν στο σύνολό τους αρνητικά για τον CD69 σε αυτούς τους λεμφαδένες (εικόνα 3.16).

Χαρακτηριστικό των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων είναι η εμφάνιση ενός διακριτού πληθυσμού περιφερικών CD8⁺ T λεμφοκυττάρων με μειωμένο επίπεδο έκφρασης του υποδοχέα TCR. Ο πληθυσμός αυτός των CD8⁺ Vβ11^{LOW} T κυττάρων καταγράφηκε στο σύνολο των ιστών της σπλήνας των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-}ζώων που μελετήθηκαν (εικόνα 3.6), ενώ ήταν εμφανής και σχεδόν στο σύνολο των ιστών των πυλωρικών και μεσεντέριων λεμφαδένων(εικόνα 3.12 και 3.14). Ο λόγος εμφάνισης αυτού του πληθυσμού στην απουσία αντιγόνου δεν είναι γνωστός και απαιτεί περισσότερες μελέτες στο σύστημα των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων, προκειμένου να διασαφηνιστεί ο ρόλος του TNF στη δημιουργία αυτού του πληθυσμού. Ένα πρώτο βήμα θα μπορούσε να είναι η μέτρηση της απόπτωσης μετά από χρώση με αννεξίνη προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν αυτά τα κύτταρα που φέρουν χαμηλό επίπεδο T υποδοχέα είναι ταυτόχρονα και αποπτωτικά ή όχι, καθώς επίσης και να προσδιοριστεί η ικανότητα επιβίωσής τους μετά από απομόνωση αυτού του πληθυσμού (FACS sorter) και παθητική μεταφορά του σε λεμφοπενικούς αποδέκτες στους οποίους λείπει (Rag^{-/-} TNF^{-/-}) είτε είναι παρόν ο ενδογενής TNF (Rag^{-/-}).

Ταυτόχρονα ένας παρόμοιος πληθυσμός CD8⁺ Vβ11^{LOW} T κυττάρων καταγράφηκε και στους μεσεντέριους λεμφαδένες δύο F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων μη υγιούς φαινότυπου (εικόνα 3.14), χωρίς όμως να εμφανίζεται ταυτόχρονα στον ιστό της σπλήνας τους. Είναι πιθανόν στην περίπτωση αυτή του συστήματος της αυτοανοχής, η παρουσία τοπικής φλεγμονής στους μεσεντέριους λεμφαδένες να οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο μετά από ενεργοποίηση (AICD) και ένα μέρος των ενεργοποιημένων κυττάρων να κατέφυγαν στη μείωση του υποδοχέα τους προκειμένου να επιβιώσουν. Αυτός ο μηχανισμός έχει αναφερθεί σε μοντέλο ζώων αυτοάνοσου διαβήτη, που φέρουν CD4⁺ T κύτταρα με διαγονιδιακό TCR ικανό να αναγνωρίζει ένα πεπτίδιο εαυτού σχετιζόμενο με την εμφάνιση της νόσου. Στην περίπτωση αυτή τα CD4⁺T κύτταρα καταγράφηκαν να έχουν μειωμένο επίπεδο του TCR υποδοχέα τους στην περιφέρεια, υποδηλώνοντας πιθανόν μία στρατηγική για να μειώσουν τη συγγένεια του υποδοχέα T με το αντιγόνο εαυτού και να αποφύγουν τον επαγόμενο μετά από ενεργοποίηση θάνατο [108].

Οι *in vitro* δοκιμασίες διέγερσης των F5 κυττάρων, κατέδειξαν ότι τόσο τα F5 Rag^{-/-} όσο και τα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα απαντούν με παραγωγή INF γ μετά από συνάντησή τους με το αντιγόνο, ενώ η *in vitro* επαναδιέγερση των F5 κυττάρων των F531 Rag^{-/-} και F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων δεν οδηγεί σε παραγωγή INF γ (εικόνα 3.18), γεγονός που καταδεικνύει ότι έχουν περιέλθει σε κατάσταση ανέργειας μετά την *in vivo* συνάντησή τους με το αντιγόνο NP. Ταυτόχρονα η κατάσταση ανέργειάς τους είναι έκδηλη και στην απουσία πολλαπλασιασμού μετά από επανέκθεσή τους στο αντιγόνο, η οποία είναι όμοια στα ζώα και των δύο γονότυπων F531 Rag^{-/-} και F531TNF^{-/-}Rag^{-/-}, ενώ στα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα παρατηρήθηκε μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού ως απάντηση στην *in vitro* διέγερσή τους με το αντιγόνο, σε σχέση με τα F5 Rag^{-/-} ζώα (εικόνα 3.17), γεγονός που εμπλέκει τον TNF σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες στην μείωση της ουδού (threshold) ενεργοποίησης των CD8⁺ T κυττάρων.

Τέλος μελετήσαμε την *in vivo* κυτταροτοξικότητα που εμφανίζεται σε μεγάλο βαθμό στα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ενώ απουσιάζει από τα ζώα μάρτυρες, όταν συναντούν κύτταρα στόχους φορτωμένα με το πεπτίδιο NP. Συγκεκριμένα δείξαμε ότι η *in vivo* κυτταροτοξικότητα που παρουσιάζουν τα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα είναι ειδική για το αντιγόνο NP και δεν σχετίζεται με την διαφορετική ικανότητα λύσης των κυττάρων λόγω της χρώσης CFSE hi που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία του πειράματος (εικόνα 3.19 και 3.21). Επιπλέον η ικανότητα της *in vivo* κυτταροτοξικότητας απαντάται σε μικρό χρονικό διάστημα (19 ώρες) μετά την παθητική μεταφορά των κυττάρων στόχων στους αποδέκτες, γεγονός που αποκλείει την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών κυττάρων μέσα σε αυτό το σύντομο χρονικό διάστημα και καταδεικνύει ότι τα F5 κύτταρα των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων είναι ήδη ενεργοποιημένα. Στην κατεύθυνση αυτή, η χρώση με τον μάρτυρα ενεργοποίησης CD44, κατέδειξε ότι το ποσοστό των CD44⁺ CD8⁺ T κυττάρων είναι αυξημένο στα ζώα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} σε σχέση με τα F5 Rag^{-/-} (εικόνα 3.27), αλλά τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν είναι ξεκάθαρα ως προς την περαιτέρω αύξηση ή όχι των επιπέδων αυτού του μάρτυρα ενεργοποίησης στα F5 κύτταρα των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων που παρουσιάζουν την *in vivo* κυτταροτοξικότητα και για τον λόγο αυτό απαιτούνται περισσότερα πειραματικά στοιχεία.

Καθώς τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T κύτταρα δράστες μπορούν να σκοτώσουν τα κύτταρα στόχους με διαφορετικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την παραγωγή κυττοκινών όπως η INF γ και ο TNF, τη σηματοδότηση μέσω υποδοχέων θανάτου όπως ο Fas και την μεσολαβούμενη μέσω γκρανζύμων και περφορίνης κυτταροτοξικότητα, θελήσαμε να διερευνήσουμε τον μηχανισμό με τον οποίο μεσολαβείται η *in vivo* κυτταροτοξικότητα των F5 κυττάρων στο σύστημά μας. Για τον λόγο αυτό μελετήσαμε την ενδοκυττάρια έκφραση της γκρανζύμης B (granzyme B, GrzB), η οποία θεωρείται ως ένα σημαντικό αποπτωτικό μόριο στη μεσολαβούμενη από γκρανζύμες κυτταροτοξικότητα των CD8⁺ T κυττάρων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι δεν σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση της γκρανζύμης B στα F5 κύτταρα των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων που δέχτηκαν τα φορτωμένα με πεπτίδιο κύτταρα στόχους και τα οποία επέδειξαν κυτταροτοξικότητα *in vivo*. Με άλλα λόγια η *in vivo* κυτταροτοξικότητα των F5 κυττάρων που παρατηρείται στην απουσία του ενδογενούς TNF στα ζώα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-}, δεν φαίνεται να μεσολαβείται από την γκρανζύμη B στο σύστημα αυτό που μελετήσαμε.

Αυτά τα δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Regner *et al.* οι οποίοι κατέδειξαν ότι διπλά knock-out ποντίκια για τις γκρανζύμες A και B (GrzA^{-/-}, GrzB^{-/-}) είχαν την ίδια *in vivo* κυτταροτοξικότητα απέναντι σε κύτταρα στόχους σε σχέση με τα ζώα άγριου τύπου, η οποία μάλιστα καταγράφηκε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (λεπτά) μετά την παθητική μεταφορά των κυττάρων στόχων, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η άμεση *in vivo* κυτταροτοξικότητα των CD8⁺ T κυττάρων δεν μεσολαβείται από τις γκρανζύμες A και B [109]. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται προκειμένου να αναδειχτεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα F5 κύτταρα επιφέρουν *in vivo* τον θάνατο των κυττάρων στόχων στο σύστημά μας, με υποψήφιους στόχους για μελέτη την ενδοκυττάρια έκφραση

της περφορίνης όπως και την έκφραση του συνδέτη FasL στα CD8+ T κύτταρα, καθώς μελέτες δείχνουν ότι η κυτταροτοξικότητα των CD8+ T κυττάρων μεσολαβείται κυρίως μέσω αυτών των πρωτεϊνών.

Επιπλέον σημαντικό είναι να προσδιοριστεί η αιτία που οδηγεί στην ικανότητα της *in vivo* κυτταροτοξικότητας των F5 κυττάρων στα ζώα με F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} γονότυπο καθώς και εάν αυτή είναι αποτέλεσμα της απουσίας του TNF. Είναι πιθανόν η ενεργοποίηση των F5 κυττάρων να οφείλεται σε κάποιο περιβαλλοντικό ή διαιτητικό αντιγόνο είτε ακόμα σε τοπική φλεγμονή. Πέρα από αυτές τις πιθανότητες θα μπορούσε επίσης να διευκρινιστεί εάν η έλλειψη του ενδογενούς TNF μεταβάλλει τα επίπεδα συγκεκριμένων ιντερλευκινών στα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα, με αποτέλεσμα να οδηγεί στην ενεργοποίηση των F5 κυττάρων τους. Συγκεκριμένα μελέτες αναφέρουν ότι η IL-12 μπορεί να αντικαταστήσει τα CD4+T κύτταρα καθώς και τις CD40/ CD40L αλληλεπιδράσεις μεταξύ των CD4+T και δενδριτικών κυττάρων, που απαιτούνται για την πλήρη ενεργοποίηση των CD8+ T κυττάρων, παρέχοντάς τους ένα «τρίτο σήμα» ενεργοποίησης [110]. Στο ίδιο πλαίσιο ιντερλευκίνες όπως οι IL-2, IL-6, IL-7, IL-15 και IL-21 έχουν δείξει τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια να αυξάνουν ή να επάγουν την μη-ειδική για αντιγόνο ενεργοποίηση των CD8+ T κυττάρων στην απουσία TCR διέγερσης [111]. Τέλος, εάν η *in vivo* κυτταροτοξικότητα επαχθεί μετά από αντι- TNF θεραπεία στα F5 Rag^{-/-} ζώα, όπως και εάν αυτή ανασταλεί μετά από χορήγηση TNF στα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-}ζώα, θα μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι η ικανότητα αυτή των F5 κυττάρων σχετίζεται η όχι με τον TNF.

Όσον αφορά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων τα οποία προέκυψαν μετά από 10 και περισσότερες ανάδρομες διασταυρώσεις αυτής της σειράς ζώων (back-crosses) έτσι ώστε αυτά να φέρουν ομοιογενές γενετικό υπόβαθρο ως προς τα C57/BL ζώα, σε σχέση με προηγούμενα F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα στα οποία είχε καταγραφεί σε σημαντικό ποσοστό (40%) αυτοάνοσος διαβήτης τύπου I, συνοδευόμενος από απώλεια ανοχής και αναστροφή της ανέργειας των F5 κυττάρων, όπως αυτές οι ιδιότητες καταγράφηκαν με τον αυξημένο αριθμό περιφερικών CD8+ T σπληνοκυττάρων και την *in vitro* αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και παραγωγής INF γ μετά από επαναδιέγερση των F5 σπληνοκυττάρων με το αντιγόνο NP [100], τα τωρινά δεδομένα εμφανώς καταδεικνύουν την πλήρη αναστροφή αυτής της κατάστασης. Πιο συγκεκριμένα, στα ζώα F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} δεν εμφανίζεται πλέον αυτοανοσία, οι αριθμοί των περιφερικών CD8+ T κυττάρων στη σπλήνα είναι μειωμένοι σε σχέση τόσο με τα F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα όσο και με τα F531 Rag^{-/-}, υποδηλώνοντας την εμπλοκή του TNF στην κλωνική απαλοιφή των περιφερικών CD8+ T κυττάρων, ενώ επιπλέον τα F5 κύτταρα των ζώων αυτών έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού και παραγωγής INF γ μετά από *in vitro* επανέκθεσή τους στο αντιγόνο, που χαρακτήριζε τα προηγούμενα διαβητικά F531TNF^{-/-}Rag^{-/-}ζώα, υποδεικνύοντας ότι τώρα βρίσκονται σε κατάσταση ανέργειας. Τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν σαφώς τη μεταβολή του φαινότυπου των ζώων, η οποία μπορεί να προκύψει από πολύ μικρές αλλαγές στο γενετικό τους υπόβαθρο, τονίζοντας τη συμβολή της επίδρασης του γενετικού υπόβαθρου (the “flanking gene” problem) κατά τη διάρκεια διασταυρώσεων, η οποία μπορεί να δώσει εσφαλμένες ερμηνείες σε ανοσολογικούς φαινότυπους [112].

Το σύνολο των δεδομένων που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή καταδεικνύουν την εμπλοκή του TNF στην επαγωγή και διατήρηση της ανοχής των περιφερικών CD8+ T κυττάρων στο μοντέλο ποντικών που αναλύσαμε. Συγκεκριμένα στο σύστημα των F5 Rag^{-/-} και F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων που μελετήθηκαν, τα οποία έχουν CD8+ T κύτταρα που φέρουν τον διαγονιδιακό υποδοχέα TCR που αναγνωρίζει το πεπτίδιο NP, η απουσία του TNF φαίνεται να συμβάλει στην αύξηση της ουδού (threshold) ενεργοποίησης των F5 κυττάρων. Ταυτόχρονα τα F5 κύτταρα στην απουσία του TNF και στο σύστημα των F5TNF^{-/-}Rag^{-/-}ζώων, εμφανίζουν αυξημένη *in vivo* κυτταροτοξικότητα ειδική για το αντιγόνο, 19 μόλις ώρες μετά την παθητική μεταφορά κυττάρων στόχων φορτωμένων με το πεπτίδιο, γεγονός που δηλώνει την πιθανή ανάμειξη του TNF στις κυτταροτοξικές απαντήσεις CD8+ T κυττάρων, ενώ από την άλλη ο TNF δεν φάνηκε να εμπλέκεται στην επαγωγή ανοχής σε αντιγόνα εαυτού *in vivo* όπως καταγράφηκε στο σύστημα των F531 Rag^{-/-} και F531TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώων.

Τα παραπάνω δεδομένα χρήζουν περισσότερης μελέτης, καθώς η ενδεχόμενη ενεργοποίηση και κυτταροτοξικότητα εν δυνάμει αυτοδραστικών CD8+ T κυττάρων στην απουσία του ενδογενούς TNF, μπορεί να έχει επιζήμιες ανοσολογικές επιπτώσεις. Ένα βήμα προς τη διευκρίνιση αυτού του θέματος θα μπορούσε να είναι η παθητική μεταφορά F5 κυττάρων από F5TNF^{-/-}Rag^{-/-} ζώα, τα οποία έχουν επιδείξει *in vivo* κυτταροτοξικότητα, σε λεμφοπενικούς (31 Rag^{-/-}) είτε λεμφοεπαρκείς (31 Rag^{+/+}) αποδέκτες που εκφράζουν το αντιγόνο *in vivo*, έτσι ώστε να προσδιοριστεί εάν τα F5 κύτταρα είναι ικανά να δημιουργήσουν αυτοανοσία στους αποδέκτες. Αν και στο σύστημα των ζώων που μελετήσαμε η έλλειψη του TNF συνοδεύτηκε από αυξημένη *in vivo* κυτταροτοξικότητα των CD8+ T κυττάρων, δεν γνωρίζουμε μέχρι στιγμής εάν αυτή η ικανότητά τους μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοση παθολογία, μία πιθανότητα που θα μπορούσε να δημιουργήσει ανησυχία στην εφαρμογή της αντι-TNF θεραπείας στον άνθρωπο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από την χρήση αντι-TNF παραγόντων στο πλαίσιο φλεγμονωδών και αυτοάνοσων παθήσεων στον άνθρωπο δεν έχουν αναφέρει μέχρι στιγμής καμία τέτοια επιζήμια απόκριση των CD8+ T κυττάρων [113-116].

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
2. Beutler, B., et al., *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin*. Nature, 1985. **316**(6028): p. 552-4.
3. Nedwin, G.E., et al., *Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(17): p. 6361-73.
4. Nedospasov, S.A., et al., *The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(19): p. 7713-25.
5. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
6. Goetz, F.W., J.V. Planas, and S. MacKenzie, *Tumor necrosis factors*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 487-97.
7. Herbein, G. and W.A. O'Brien, *Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis*. Proc Soc Exp Biol Med, 2000. **223**(3): p. 241-57.
8. Stauber, G.B., R.A. Aiyer, and B.B. Aggarwal, *Human tumor necrosis factor-alpha receptor. Purification by immunoaffinity chromatography and initial characterization*. J Biol Chem, 1988. **263**(35): p. 19098-104.
9. Schall, T.J., et al., *Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 361-70.
10. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
11. Reddy, P., et al., *Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14608-14.
12. Wang, J., et al., *Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21751-60.
13. Lobito, A.A., et al., *Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS)*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1320-7.
14. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149-60.
15. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 411-52.
16. Kollias, G. and D. Kontoyiannis, *Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 315-21.
17. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, *Altered lipid metabolism in brain injury and disorders*. Subcell Biochem, 2008. **49**: p. 241-68.
18. Pajak, B., et al., *Crossroads of cytokine signaling--the chase to stop muscle cachexia*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59 Suppl 9**: p. 251-64.
19. Haider, S. and M. Knofler, *Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium*. Placenta, 2009. **30**(2): p. 111-23.
20. Feldmann, M., *Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3533-6.
21. Aukrust, P., et al., *Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection--correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters*. J Infect Dis, 1994. **169**(2): p. 420-4.
22. Helbok, R., et al., *The use of the multi-organ-dysfunction score to discriminate different levels of severity in severe and complicated Plasmodium falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(2): p. 150-4.
23. Evereklioglu, C., et al., *Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behcet's disease*. Mediators Inflamm, 2002. **11**(2): p. 87-93.
24. Andrade Junior, D.R., et al., *Correlation between serum tumor necrosis factor alpha levels and clinical severity of tuberculosis*. Braz J Infect Dis, 2008. **12**(3): p. 226-33.
25. Roman, J., et al., *Serum TNF levels in neonatal sepsis and septic shock*. Acta Paediatr, 1993. **82**(4): p. 352-4.
26. Feinberg, B., et al., *A phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients*. J Clin Oncol, 1988. **6**(8): p. 1328-34.
27. Balkwill, F., *Tumour necrosis factor and cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 361-71.
28. Moore, R.J., et al., *Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis*. Nat Med, 1999. **5**(7): p. 828-31.
29. Tartaglia, L.A., et al., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 845-53.
30. Gupta, S. and S. Gollapudi, *Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 1034-42.
31. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
32. Clark, J., et al., *What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term?* Ann Rheum Dis, 2005. **64 Suppl 4**: p. iv70-6.
33. Nakano, H., et al., *Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 730-7.
34. Varfolomeev, E.E. and A. Ashkenazi, *Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?* Cell, 2004. **116**(4): p. 491-7.
35. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
36. Gupta, S., *A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling*. J Clin Immunol, 2002. **22**(4): p. 185-94.
37. Tada, K., et al., *Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36530-4.
38. Yeh, W.C., et al., *Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 715-25.
39. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
40. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
41. Maniati, E., et al., *Control of apoptosis in autoimmunity*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 190-8.
42. Anderton, S.M. and D.C. Wraith, *Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 487-98.
43. Palmer, E., *Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 383-91.
44. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
45. Walker, L.S. and A.K. Abbas, *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 11-9.
46. Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso, *Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 829-40.
47. Redmond, W.L. and L.A. Sherman, *Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 275-84.
48. Deman, J., et al., *Analysis by in situ hybridization of cells expressing mRNA for tumor-necrosis factor in the developing thymus of mice*. Dev Immunol, 1992. **2**(2): p. 103-9.
49. Krangel, M.S., et al., *A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 847-59.

50. Baseta, J.G. and O. Stutman, *TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5621-30.
51. Zuniga-Pflucker, J.C., J. Di, and M.J. Lenardo, *Requirement for TNF-alpha and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation*. Science, 1995. **268**(5219): p. 1906-9.
52. Kato, Y., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha and glucocorticoid on lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis of thymocytes*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995. **12**(3-4): p. 195-204.
53. Jondal, M., S. Okret, and D. McConkey, *Killing of immature CD4+ CD8+ thymocytes in vivo by anti-CD3 or 5'-(N-ethyl)-carboxamide adenosine is blocked by glucocorticoid receptor antagonist RU-486*. Eur J Immunol, 1993. **23**(6): p. 1246-50.
54. Martin, S. and M.J. Bevan, *Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection*. Eur J Immunol, 1997. **27**(10): p. 2726-36.
55. Page, D.M., *Cutting edge: thymic selection and autoreactivity are regulated by multiple coreceptors involved in T cell activation*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3577-81.
56. Page, D.M., et al., *TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 120-33.
57. Wu, A.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12287-92.
58. Saibil, S.D., E.K. Deenick, and P.S. Ohashi, *The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 658-64.
59. Li, L. and V.A. Boussiotis, *Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications*. J Mol Med, 2006. **84**(11): p. 887-99.
60. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 166-82.
61. Chatzidakis, I., et al., *An essential role for TNF in modulating thresholds for survival, activation, and tolerance of CD8+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6735-45.
62. Del Prete, G., *The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets*. Parasitologia, 2008. **50**(1-2): p. 9-16.
63. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
64. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
65. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
66. Faria, A.M. and H.L. Weiner, *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 232-59.
67. Aspalter, R.M., M.M. Eibl, and H.M. Wolf, *Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 572-82.
68. Cope, A.P., et al., *Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1994. **94**(2): p. 749-60.
69. Cope, A.P., et al., *Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling*. J Exp Med, 1997. **185**(9): p. 1573-84.
70. Arnold, R., et al., *How T lymphocytes switch between life and death*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1654-8.
71. Brenner, D., P.H. Krammer, and R. Arnold, *Concepts of activated T cell death*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **66**(1): p. 52-64.
72. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 532-42.
73. Zhang, N., et al., *The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes*. Cell Res, 2005. **15**(10): p. 749-69.
74. Janssen, E.M., et al., *CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 88-93.
75. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 180-92.
76. Sarin, A., M. Conan-Cibotti, and P.A. Henkart, *Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3716-8.
77. Murray, D.A. and I.N. Crispe, *TNF-alpha controls intrahepatic T cell apoptosis and peripheral T cell numbers*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2402-9.
78. Reich, A., et al., *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, 2000. **30**(2): p. 678-82.
79. Gorak-Stolinska, P., et al., *Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(5): p. 756-66.
80. Sytwu, H.K., R.S. Liblau, and H.O. McDevitt, *The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice*. Immunity, 1996. **5**(1): p. 17-30.
81. Speiser, D.E., et al., *Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo*. Eur J Immunol, 1996. **26**(12): p. 3055-60.
82. Nguyen, L.T., et al., *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, 2000. **30**(2): p. 683-8.
83. Alexander-Miller, M.A., et al., *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, 1998. **188**(8): p. 1391-9.
84. Teh, H.S., A. Seebaran, and S.J. Teh, *TNF receptor 2-deficient CD8 T cells are resistant to Fas/Fas ligand-induced cell death*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4814-21.
85. Kim, E.Y., et al., *TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 1026-35.
86. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
87. Chatila, T.A., et al., *JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. R75-81.
88. Bennett, C.L. and H.D. Ochs, *IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena*. Curr Opin Pediatr, 2001. **13**(6): p. 533-8.
89. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
90. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
91. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
92. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
93. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
94. Riley, J.L., C.H. June, and B.R. Blazar, *Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 656-65.

95. Chen, X., et al., *Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells.* J Immunol, 2007. **179**(1): p. 154-61.
96. Valencia, X., et al., *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells.* Blood, 2006. **108**(1): p. 253-61.
97. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy.* J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.
98. Sun, Y., et al., *Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances.* Transl Res, 2007. **150**(4): p. 197-214.
99. Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein, *Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta.* J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 33-9.
100. Fousteri G., *Μελέτη μηχανισμών περιφερικής ανοσολογικής ανοχής των CD8 T λεμφοκυττάρων σε νέο διαγονιδιακό μοντέλο TCR/αντιγόνο στο ποντίκι.* 2006, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
101. Mamalaki, C., et al., *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, 1992. **89**(23): p. 11342-6.
102. Mamalaki, C., et al., *Positive and negative selection in transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for influenza nucleoprotein and endogenous superantigen.* Dev Immunol, 1993. **3**(3): p. 159-74.
103. Pasparakis, M., et al., *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, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
104. Spanopoulou, E., et al., *Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice.* Genes Dev, 1994. **8**(9): p. 1030-42.
105. Joshi, N.S. and S.M. Kaech, *Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation.* J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1309-15.
106. Laouar, A., et al., *Concurrent generation of effector and central memory CD8 T cells during vaccinia virus infection.* PLoS One, 2008. **3**(12): p. e4089.
107. Teixeira, E., et al., *Different T cell receptor signals determine CD8+ memory versus effector development.* Science, 2009. **323**(5913): p. 502-5.
108. Gebe, J.A., et al., *Restricted autoantigen recognition associated with deletional and adaptive regulatory mechanisms.* J Immunol, 2009. **183**(1): p. 59-65.
109. Regner, M., et al., *Cutting edge: rapid and efficient in vivo cytotoxicity by cytotoxic T cells is independent of granzymes A and B.* J Immunol, 2009. **183**(1): p. 37-40.
110. Srinivasan, M. and K.A. Frauwirth, *Peripheral tolerance in CD8+ T cells.* Cytokine, 2009. **46**(2): p. 147-59.
111. Ramanathan, S., J. Gagnon, and S. Ilangumaran, *Antigen-nonspecific activation of CD8+ T lymphocytes by cytokines: relevance to immunity, autoimmunity, and cancer.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008. **56**(5): p. 311-23.
112. Ridgway, W.M., et al., *New tools for defining the 'genetic background' of inbred mouse strains.* Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 669-73.
113. Pang, L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha blockade leads to decreased peripheral T cell reactivity and increased dendritic cell number in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis.* J Rheumatol, 2008. **35**(11): p. 2220-8.
114. Leombruno, J.P., T.R. Einarson, and E.C. Keystone, *The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events.* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(7): p. 1136-45.
115. Harrison, M.J., et al., *Rates of new-onset psoriasis in patients with rheumatoid arthritis receiving anti-tumour necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register.* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(2): p. 209-15.
116. Strangfeld, A., et al., *Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents.* JAMA, 2009. **301**(7): p. 737-44.