

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ Τ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ
ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΤΑΝΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

UNIVERSITY OF CRETE
BIOLOGY DEPARTMENT
JOINT GRADUATE PROGRAM ON
“PROTEIN BIOTECHNOLOGY”

MASTER THESIS

**BROAD DETECTION OF SOLUBLE T CELL
RECEPTOR AND IMMUNE SYSTEM REGULATION**

ANTONOPOULOU TANIA

HERAKLION 2020

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογίας, στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΕΙΡΗΝΗ ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

ΕΙΡΗΝΗ ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΓΙΩΡΓΗΣ ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΜΙΧΑΗΛΗΣ ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου Ειρήνη Αθανασάκη για την υποστήριξή της από την πρώτη κιόλας στιγμή της γνωριμίας μας. Την ευχαριστώ για όλες τις συμβουλές της και τις ατελείωτες ώρες που πρόθυμα και υπομονετικά αφιέρωσε για να με διδάξει και να με καθοδηγήσει σε όσες ευκαιρίες και προκλήσεις μου εμφανίστηκαν ως τώρα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους καθηγητές της τριμελούς μου επιτροπής, τον κ. Χαλεπάκη και τον κ. Κοκκινίδη για την συνεργασία τους και τον χρόνο τους.

Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη που βρίσκονταν στο εργαστήριο Ανοσολογίας το διάστημα που ήμουν κι εγώ εκεί. Ο καθένας με τον τρόπο του συνέβαλλε στη δημιουργία ενός ξεχωριστού κλίματος στο εργαστηριακό περιβάλλον και με βοήθησε να γίνω καλύτερη. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Βασιλεία Πατεράκη για την αφοσίωσή της στο έργο του εργαστηρίου και για το θετικό της πνεύμα που στάθηκε δίπλα μου σε όλες τις δύσκολες στιγμές. Της είμαι ευγνώμων για την συναδελφικότητα και την φιλία μας, είναι ένας εκπληκτικός άνθρωπος και είμαι πραγματικά ευτυχής που υπάρχει στη ζωή μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες και φίλες μου Στέλλα Χατζηιωαννίδου, Μυρτώ Κουτάντου και Μάρθα Τσελικά για την αλληλοκατανόηση και την αλληλοϋποστήριξη που αναπτύξαμε μες στα δύο χρόνια των μεταπτυχιακών μας σπουδών. Είστε υπέροχες και νιώθω πολύ τυχερή που σας γνώρισα.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη τους σε κάθε μου επιλογή. Είστε το στήριγμά μου όλα αυτά τα χρόνια και ό, τι κι αν πω θα είναι λίγο. Σας αγαπώ πολύ κι ας είστε μακριά.

Until we meet again!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Τα κύρια συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος	8
1.2 Χυμική και κυτταρομεσολαβητική ανοσία	9
1.3 Η δομή του TCR και τα επικουρικά μεμβρανικά μόρια των T κυττάρων	11
1.4 Οργάνωση και αναδιάταξη των γονιδίων του TCR.....	13
1.5 Οι διακριτές λειτουργίες των TCRαβ και TCRγδ	14
1.6 Ωρίμανση και θυμική επιλογή του ρεπερτορίου των T κυττάρων.....	14
1.7 Ανοσολογική ανοχή.....	16
1.8 Ένας ακόμη υποπληθυσμός T κυττάρων, τα T ρυθμιστικά κύτταρα.....	16
1.9 Τα T _s του παρελθόντος και τα T _{reg} του παρόντος	17
1.10 Τα διαλυτά μόρια MHC και TCR.....	19
1.11 Σκοπός της εργασίας.....	21
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1 Πειραματική προσέγγιση	22
2.2 Πειραματόζωα.....	22
2.3 Ανίχνευση του sTCR σε σωματικά υγρά	22
2.3.1 Συλλογή κοιλιακού υγρού	22
2.3.2 Συλλογή σπερματικού πλάσματος.....	23
2.3.3 Συλλογή εντερικού υγρού	23
2.3.4 Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Δοκιμή – ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)	23
2.4 Ανίχνευση του sTCR σε υπερκείμενο καλλιέργειας εντερικού ιστού	24
2.5 Απομόνωση sTCRγδ από σπερματικό πλάσμα	25
2.6 Ανάλυση του sTCRγδ με βάση το μοριακό βάρος	26
2.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	26
2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining).....	28
2.7 Πρωτόκολλα ανοχοποίησης.....	28
2.8 Ανίχνευση επιφανειακών παραγόντων σε κύτταρα σπλήνα	29

2.9 Πρωτόκολλο δημιουργίας T υβριδωμάτων	30
2.9.1 Ανάπτυξη των κυττάρων BW5147α-β-.....	30
2.9.2 Απομόνωση καθαρού πληθυσμού T λεμφοκυττάρων σπλήνα	30
2.9.3 Σύντηξη κυττάρων BW5147α-β- με T λεμφοκύτταρα.....	30
2.10 Δοκιμασίες ανταγωνισμού (competition assays)	32
2.11 Στατιστική ανάλυση	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1 Η ανίχνευση του sTCR στα σωματικά υγρά	33
3.1.1 Ανίχνευση του sTCR σε κοιλιακό υγρό	33
3.1.2 Ανίχνευση του sTCR στο σπέρμα.....	34
3.1.2 Ανίχνευση του sTCR στον εντερικό ιστό.....	34
3.2 Απομόνωση sTCRγδ από το σπέρμα.....	35
3.3 Ανίχνευση του sTCR σε σύστημα in vitro και in vivo ανοχοποίησης.....	36
3.3.1 Ανίχνευση του sTCR σε σύστημα in vitro ανοχοποίησης.....	36
3.3.1 Ανίχνευση του sTCR σε σύστημα in vivo ανοχοποίησης.....	38
3.4 Ανίχνευση του sTCR που παράγεται από T υβριδώματα	39
3.6 Ανίχνευση αλληλεπίδρασης του sTCR με το MHC.....	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι διαλυτές μορφές των μορίων του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), τάξης I και τάξης II, καθώς και των υποδοχέων T λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCR), έχουν περιγραφεί με το πέρασμα των χρόνων και ανιχνεύονται σε όλα σχεδόν τα υγρά του σώματος. Με στόχο να βρεθεί μια κατάλληλη πηγή έκφρασης του διαλυτού TCR (soluble TCR, sTCR), που θα επιτρέπει την απομόνωση και περαιτέρω μελέτη του, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες ανίχνευσής του σε κολπικό υγρό, σπέρμα και εντερικό υγρό, αλλά τα ποσοστά έκφρασης του sTCR ήταν αποθαρρυντικά. Πειράματα που έγιναν στη συνέχεια σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα ανοχής, ήρθαν να επιβεβαιώσουν την θεωρία των ανοσολόγων του παρελθόντος ότι η καταστολή μεσολαβείται από τους διαλυτούς παράγοντες TsF1 και TsF2, οι οποίοι θεωρήθηκε ότι αντιστοιχούν στο sMHC και sTCR αντίστοιχα. Με βάση το λειτουργικό σύστημα ανοχής, δημιουργήθηκαν T υβριδώματα από κύτταρα σπλήνας *in vivo* ανοχοποιημένου ποντικίου, προκειμένου να ξεκινήσει μια διαδικασία παραγωγής κλώνων που θα εκκρίνουν τον επιθυμητό sTCR σε μεγάλες ποσότητες. Υπερκείμενα καλλιέργειας από τους πρώτους κλώνους που ξεχώρισαν, εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά ανίχνευσης sTCRab και sTCRgd. Πειραματικές δοκιμασίες με τα υπερκείμενα αυτά, οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο sTCR σχηματίζει σύμπλοκο με το sMHC του υπερκειμένου. Η ύπαρξη των μορίων sTCR είναι αναμφισβήτητη και προφανώς έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση, γι' αυτό και η μελέτη τους θα συμβάλλει σημαντικά στο μέλλον της ανοσοθεραπείας.

ABSTRACT

The soluble forms of the major histocompatibility complex (MHC), class I or class II, as well as T cell receptor (TCR), have already been described and detected in almost all body fluids. In order to find an appropriate source of soluble TCR (sTCR) expression, which will allow its isolation and further study, attempts were made to detect it in vaginal fluid, sperm and intestine fluids, but the results were disappointing. Following experiments in in vivo and in vitro tolerance systems, confirmed the theory of older immunologists that suppression is mediated by the soluble factors TsF1 and TsF2, which are considered to represent sMHC and sTCR respectively. Under the same functional tolerance system, T hybridomas were created for the beginning of a clone selection process in favor of those who will excrete the desirable sTCR amounts. Culture supernatants, from the first clones that were selected, showed increased amounts of sTCRab and sTCRgd. Experiments on these supernatants, lead to the hypothesis that sTCR forms a complex with the sMHC molecule of the supernatant. The existence of sTCR molecules is undeniable and apparently they have the ability to regulate immune response, this is why their study will contribute to the future of immunotherapy.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα κύρια συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα εξελίχθηκε για να μας προστατεύει από παθογόνους παράγοντες και η υψηλή του διακριτική ικανότητα είναι η βάση της επιβίωσης. Τα θηλαστικά ως θερμοαίμα ζώα με μακρύ χρόνο ζωής διαθέτουν πολυδιάστατους διαπλεκόμενους αμυντικούς μηχανισμούς ανοσίας στους οποίους συμμετέχει μια τεράστια ποικιλία κυττάρων και διαλυτών μορίων ικανών για την ειδική αναγνώριση ξένων εισβολέων.

Τα λευκοκύτταρα διαδραματίζουν τον κύριο ρόλο σε όλες τις ανοσολογικές αποκρίσεις και διακρίνονται σε μονοκύτταρα - μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα), σιτευτικά κύτταρα, φυσικοί φονιάδες και λεμφοκύτταρα (εικόνα 1.1).

- Τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα τα οποία αποτελούν την σημαντικότερη ομάδα φαγοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα μυελικά αρχέγονα προγονικά κύτταρα και η λειτουργία τους συνίσταται στο να εγκολπώνουν σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων των μολυσματικών παραγόντων, να τα εισάγουν στο εσωτερικό τους και να τα καταστρέφουν.

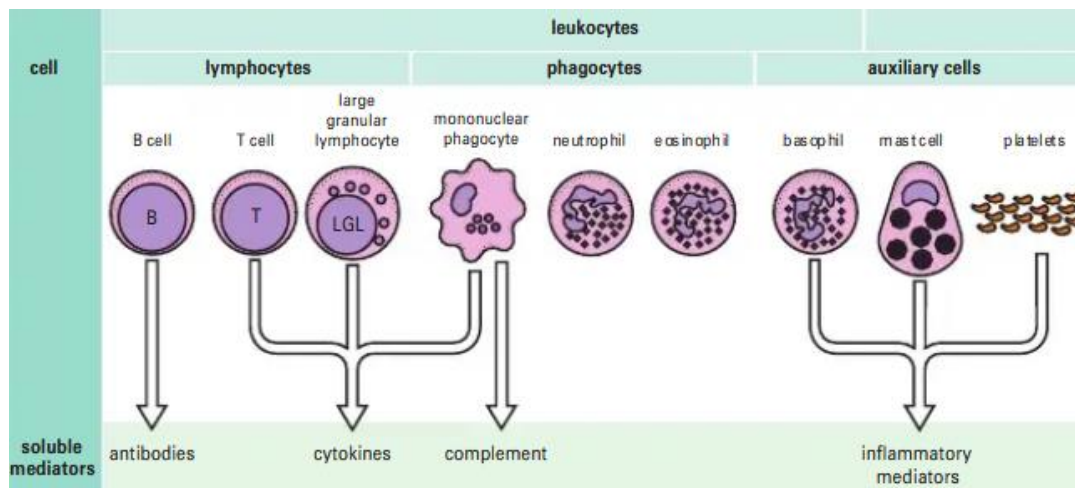
- Τα ουδετερόφιλα είναι μία άλλη σημαντική ομάδα φαγοκυττάρων.

- Τα ηωσινόφιλα αποτελούν μια εξειδικευμένη ομάδα λευκοκυττάρων που έχουν την ικανότητα να βλάπτουν μεγάλα εξωκυτταρικά παράσιτα.

- Τα βασεόφιλα μαζί με τα σιτευτικά κύτταρα διαθέτουν κοκκία τα οποία εμπεριέχουν διαμεσολαβητές που προκαλούν φλεγμονή.

- Τα μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα, γνωστά και ως φυσικοί φονιάδες, ειδικεύονται στο να αναγνωρίζουν τις μεταβολές που συμβαίνουν στην επιφάνεια διάφορων νεοπλασματικών κυττάρων και κυττάρων μολυσμένων από ιούς.

- Τα Β λεμφοκύτταρα και Τ λεμφοκύτταρα είναι εξ ολοκλήρου υπεύθυνα για την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων. Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 20%-40% των λευκοκυττάρων του οργανισμού και το 99% των κυττάρων της λέμφου. Κυκλοφορούν συνεχώς ανάμεσα στο αίμα και στη λέμφο και μπορούν να μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς και τα λεμφικά όργανα, καθιστώντας το ανοσοποιητικό σύστημα σε υψηλό βαθμό ένα ενιαίο σύνολο. Όλα τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από τα μυελικά αρχέγονα προγονικά κύτταρα, αλλά στη συνέχεια τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στον μυελό των οστών, ενώ τα Τ λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στον θύμο αδένα. Κάθε Β λεμφοκύτταρο είναι γενετικά προγραμματισμένο να εκφράσει έναν επιφανειακό υποδοχέα, ειδικό για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτός ο υποδοχέας αντιγόνων καλείται αντίσωμα. Όταν ένα Β λεμφοκύτταρο ενεργοποιείται παράγει και εκκρίνει μεγάλες ποσότητες του υποδοχέα σε διαλυτή μορφή. Από την άλλη, τα Τ λεμφοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα στην επιφάνεια άλλων κυττάρων και επιφέρουν τα αποτελέσματά τους είτε απελευθερώνοντας διαλυτές πρωτεΐνες που ονομάζονται κυτταροκίνες και οι οποίες λειτουργούν ως μηνύματα σε άλλα κύτταρα, είτε με άμεσες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις^[1].

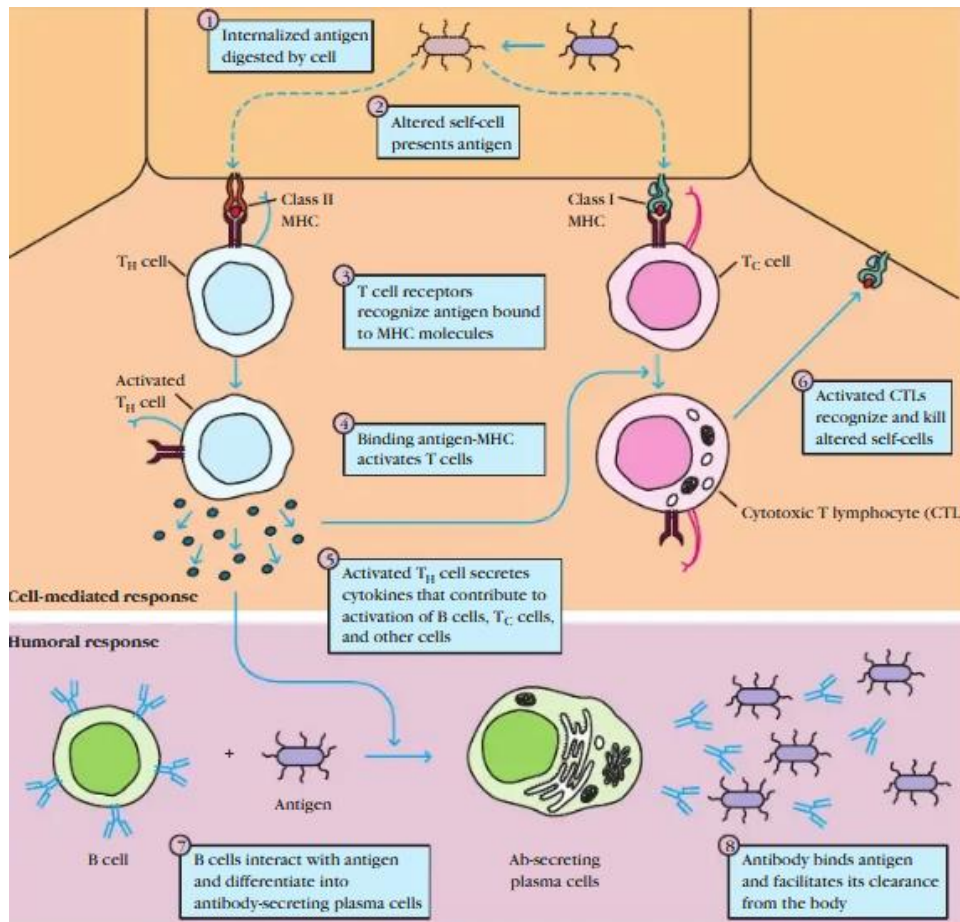


Εικόνα 1.1 Παρουσιάζονται τα σημαντικότερα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος και τα κύτταρα που συνθέτουν τους διαλυτούς διαμεσολαβητές (Male *et al.*, 2006)

1.2 Χυμική και κυτταρομεσολαβητική ανοσία

Οι ανοσολογικές αποκρίσεις μπορούν να διακριθούν σε χυμικές και κυτταρομεσολαβητικές (εικόνα 1.2). Ο όρος χυμική ανοσία οφείλεται στο ότι τα παραγόμενα προϊόντα αυτού του μηχανισμού ανοσίας, δηλαδή τα αντισώματα, μπορούν να κυκλοφορούν στα υγρά του σώματος (χυμοί), όπως είναι το αίμα, το εξωκυττάριο υγρό και διάφορες εκκρίσεις οργάνων. Η χυμική ανοσία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των Β λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα τα οποία εκκρίνουν αντισώματα. Το αντίσωμα λειτουργεί ως το δραστικό συστατικό της χυμικής απόκρισης, με δέσμευσή του στο αντιγόνο και την επακόλουθη εξουδετέρωση ή τον περιορισμό του. Όταν ένα αντιγόνο καλύπτεται με αντίσωμα, μπορεί να περιοριστεί με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, το αντίσωμα μπορεί να διασταυρωθεί με διάφορα αντιγόνα, σχηματίζοντας συμπλέγματα που μπορούν να φαγοκυτταρωθούν πιο εύκολα. Επίσης η δέσμευση του αντισώματος σε ένα αντιγόνο μικροοργανισμού μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος με αποτέλεσμα τη λύση του ξένου οργανισμού. Το αντίσωμα μπορεί ακόμη να εξουδετερώνει τοξίνες ή ιικά σωματίδια καλύπτοντάς τα, εμποδίζοντας έτσι τη σύνδεσή τους σε κύτταρα του ξενιστή.

Η προστασία που προσφέρουν τα αντισώματα ισχύει στον χώρο εκτός των κυττάρων. Ο βασικός ρόλος της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας συνίσταται στην αναγνώριση και καταστροφή κυττάρων που είτε περιέχουν ενδοκυττάρια παθογόνα, είτε εκφράζουν αντιγόνα που δεν χαρακτηρίζουν τα φυσιολογικά κύτταρα, λόγω υφιστάμενης γενετικής τροποποίησης, όπως για παράδειγμα τα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο κατηγορίες κυττάρων που συμμετέχουν στον μηχανισμό της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Στην κατηγορία των μη ειδικών κυττάρων συμπεριλαμβάνονται οι φυσικοί φονιάδες καθώς και μη λεμφοειδή κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα. Στην κατηγορία των ειδικών κυττάρων ανήκουν τα Τ λεμφοκύτταρα με τους υποπληθυσμούς τους. Στο στάδιο της ωρίμανσης, κάθε Τ κύτταρο αρχίζει να εκφράζει στην μεμβράνη του



Εικόνα 1.2
Επισκόπηση
χυμικής και
κυτταρικής
ανοσίας
(Goldsby *et al.*, 2003).

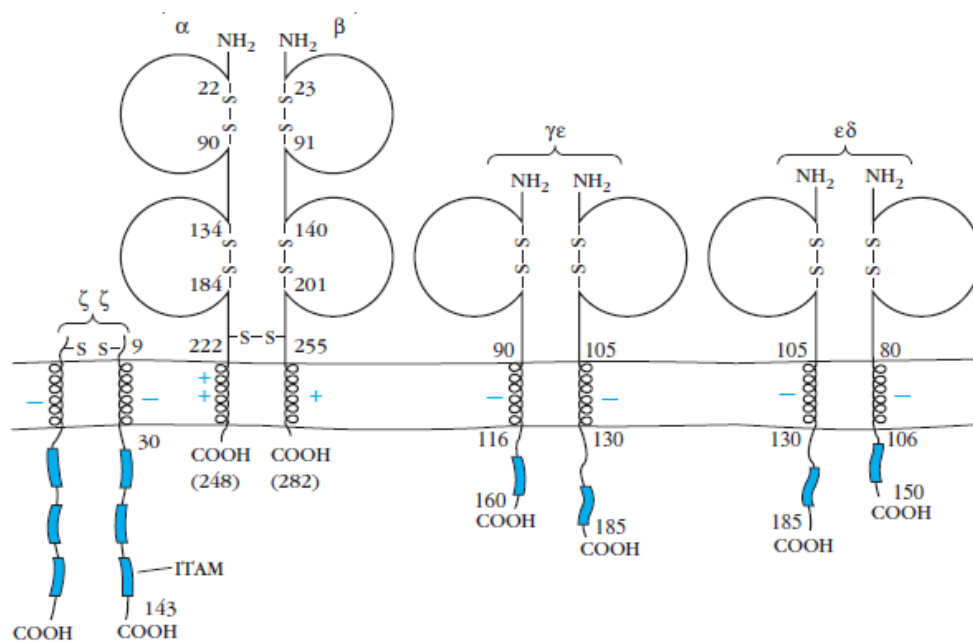
ένα μοναδικό αντιγено-συνδεόμενο μόριο που ονομάζεται υποδοχέας Τ λεμφοκυττάρων (T Cell Receptor, TCR). Ο TCR αναγνωρίζει αντιγόνο συνδεδεμένο σε μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι μορίων MHC: τα MHC τάξης I που εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα των σπονδυλωτών και συνίστανται από μια βαριά αλυσίδα συνδεδεμένη με β_2 -μικροσφαιρίνη, και τα MHC τάξης II που αποτελούνται από μια α και μια β γλυκοπρωτεϊνική αλυσίδα και εκφράζονται στα αντιγеноπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα κλασικά MHC τάξης I κωδικοποιούνται από τα B, C, A γονίδια στο HLA σύμπλεγμα στον άνθρωπο και από τα K, D γονίδια στο σύμπλεγμα H-2 στο ποντίκι. Τα κλασικά MHC τάξης II κωδικοποιούνται από τα DP, DQ, DR γονίδια στο HLA στον άνθρωπο και από τα IA, IE γονίδια στο H-2 στο ποντίκι.

Υπάρχουν δύο καθιερωμένοι υποπληθυσμοί Τ κυττάρων: τα Τ βοηθητικά (T helper, T_H) και τα Τ κυτταροτοξικά (T cytotoxic, T_C). Γενικά, τα Τ κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο CD4 λειτουργούν ως T_H και αναγνωρίζουν αντιγόνα συνδεδεμένα με μόρια MHC τάξης II. Ενώ τα Τ κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο CD8 λειτουργούν ως T_C και αναγνωρίζουν αντιγόνα συνδεδεμένα με μόρια MHC τάξης I. Όταν ένα T_H κύτταρο αναγνωρίσει και αλληλεπιδράσει με ένα σύμπλοκο αντιγόνου-MHC τάξης II, ενεργοποιείται και εκκρίνει κυτταροκίνες. Οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Β κυττάρων, των T_C και των μακροφάγων. Κάτω από την

επίδραση των κυτταροκινών, ένα T_C που αναγνωρίζει σύμπλοκο αντιγόνου-MHC τάξης I, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε δραστικό κύτταρο που λέγεται κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο (cytotoxic T lymphocyte, CTL). Σε αντίθεση με το T_H κύτταρο, το CTL γενικά δεν εκκρίνει πολλές κυτταροκίνες^[2].

1.3 Η δομή του TCR και τα επικουρικά μεμβρανικά μόρια των T κυττάρων

Ο TCR είναι ένα ετεροδιμερές γλυκοπρωτεϊνικό μόριο. Ο TCRαβ αποτελείται από μια α αλυσίδα (49kDa) συνδεδεμένη μέσω δισουλφιδικού δεσμού με μια β αλυσίδα (43kDa), ενώ ο TCRγδ αποτελείται από μια γ αλυσίδα (40-55kDa) συνδεδεμένη μέσω δισουλφιδικού δεσμού με μια δ αλυσίδα (45kDa). Δομές TCRαδ ή TCRγβ δεν έχουν βρεθεί στη φύση. Η δομή του υποδοχέα είναι εντυπωσιακά όμοια με την αντίστοιχη των ανοσοσφαιρινών, γι' αυτό ανήκει στην υπεροικογένειά τους. Η κάθε αλυσίδα ενός TCR μορίου διαθέτει δύο επικράτειες, μία αμινοτελική που ονομάζεται μεταβλητή (V) και παρουσιάζει αξιοσημείωτη ποικιλία ως προς την ακολουθία της, και μια σταθερή (C) η οποία χαρακτηρίζεται από συντηρητικότητα. Κάθε επικράτεια εμπεριέχει έναν δια-αλυσιδικό δισουλφιδικό δεσμό ο οποίος εκτείνεται σε μήκος 65-70 αμινοξέων (εικόνα 13). Οι μεταβλητές επικράτειες έχουν 3 περιοχές που καθορίζουν την συμπληρωματικότητα (Complementary Determining Regions, CDR): CDR1, CDR2 CDR3. Οι CDRs συναθροίζονται προκειμένου να σχηματίσουν την περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου. Υπάρχει μία πρόσθετη περιοχή υπερμεταβλητότητας (Hypervariable 4, HV4) στις β και γ αλυσίδες, η οποία φυσιολογικά δεν έρχεται σε επαφή με το αντιγόνο κι έτσι δε θεωρείται CDR.



Εικόνα 1.3 Σχηματικό διάγραμμα του συμπλέγματος TCRαβ-CD3 (Goldsby *et al.*, 2003).

Εκτός από τη σταθερή επικράτεια, κάθε αλυσίδα του TCR περιέχει μια μικρού μήκους ακολουθία σύνδεσης στην οποία ένα κατάλοιπο κυστεΐνης σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την άλλη αλυσίδα του ετεροδιμερούς. Μετά την ακολουθία σύνδεσης υπάρχει το διαμεμβρανικό κομμάτι μήκους 21-22 αμινοξέων το οποίο αγκυροβολεί την κάθε αλυσίδα στην πλασματική μεμβράνη. Οι διαμεμβρανικές επικράτειες και των δύο αλυσίδων παρουσιάζουν το ασυνήθιστο χαρακτηριστικό να περιέχουν θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα. Αυτά τα κατάλοιπα καθιστούν ικανές τις αλυσίδες του TCR να αλληλεπιδρούν με τις αλυσίδες του συμπλέγματος μεταγωγής μηνυμάτων CD3.

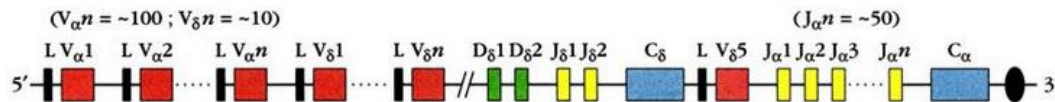
Τα αβ ή γδ ετεροδιμερή πρέπει να συνδεθούν μη ομοιοπολικά με ένα σύνολο πολυπεπτιδικών αλυσίδων οι οποίες συνολικά ονομάζονται σύμπλεγμα CD3, ώστε να σχηματιστεί ένας πλήρης λειτουργικός υποδοχέας με ικανότητα μεταγωγής σήματος μετά την πρόσδεση του αντιγόνου. Το CD3 είναι ένα σύμπλεγμα πέντε αμετάβλητων πολυπεπτιδικών αλυσίδων (γ, δ, ε, ζ, η) που συνδέονται ώστε να σχηματίσουν τρία διμερή. Γενικά, το σύμπλεγμα CD3 που συγκεντρώνεται γύρω από τον TCRαβ στον άνθρωπο ή στο ποντίκι αποτελείται από ένα CD3δε ετεροδιμερές, ένα ετεροδιμερές CD3γε κι ένα ομοδιμερές CD3ζζ. Σε κάποιες περιπτώσεις ένα ετεροδιμερές CD3ζη αντικαθιστά το ομοδιμερές CD3ζζ. Το σύμπλεγμα CD3 στον TCRγδ του ανθρώπου αποτελείται από ένα ετεροδιμερές CD3δε, ένα ετεροδιμερές CD3γε κι ένα ομοδιμερές CD3ζζ, ενώ του ποντικιού αποτελείται από δύο ετεροδιμερή CD3γε κι ένα ομοδιμερές CD3ζζ. Οι κυτταροπλασματικές ουρές των αλυσίδων του μορίου CD3 εμπεριέχουν μία ακολουθία γνωστή ως πρότυπο ενεργοποίησης ανασοϋποδοχέα βασιζόμενο στην τυροσίνη (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM). Οι ακολουθίες ITAM αλληλεπιδρούν με κινάσες τυροσίνης που είναι συνδεδεμένες με τις κυτταροπλασματικές ουρές των συνυποδοχέων CD4/CD8, και παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση. Στο μόριο CD3 καθεμία από τις αλυσίδες γ, δ και ε περιέχει ένα αντίγραφο ITAM, ενώ η ζ και η περιέχουν 3 αντίγραφα^{[2][3]}.

Παρόλο που η αναγνώριση του συμπλόκου αντιγόνου-MHC μεσολαβείται από το σύμπλεγμα TCR-CD3, υπάρχουν και διάφορα άλλα μεμβρανικά μόρια στα T κύτταρα με σημαντικό επικουρικό ρόλο στην αναγνώριση του αντιγόνου και στην ενεργοποίησή τους. Οι συνυποδοχείς CD4 και CD8 συνδέουν το εξωκυτταρικό τους τμήμα με τις συντηρημένες περιοχές των μορίων MHCII και MHCI αντίστοιχα συμβάλλοντας στην μεταγωγή σήματος. Η βέλτιστη κατάσταση για την ενεργοποίηση ενός T-λεμφοκυττάρου απαιτεί επιπλέον σήματα από συνδιεγερτικά μόρια, όπως το CD45 (που λειτουργεί ως φωσφατάση τυροσίνης πρωτεϊνών), το CD28 και το CTLA-4 (CD152). Τα δύο τελευταία μόρια μπορούν να προσδένονται στους B7-1 ή B7-2 (CD80 ή CD86) υποδοχείς των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και παρόλο που αποτελούν γλυκοπρωτεΐνες με παρόμοια χημική δομή, η δράση τους είναι ανταγωνιστική, με το μεν CD28 να διεγείρει των πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των T κυττάρων και το δε CTLA4 να την καταστέλλει. Το CD28 εκφράζεται στα T κύτταρα τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και σε κατάσταση διέγερσης, ενώ το CTLA-4 δεν ανιχνεύεται καθόλου σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία^[4].

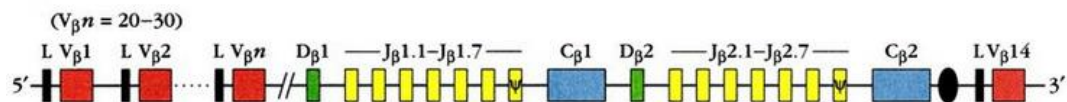
1.4 Οργάνωση και αναδιάταξη των γονιδίων του TCR

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες του TCR συντίθενται από V και C εξώνια, όπου τα V εξώνια αποτελούνται από V(D)J (Variable-Diversity-Joining) τμήματα. Τα λειτουργικά TCR γονίδια παράγονται από την αναδιάταξη V και J τμημάτων για τις αλυσίδες α και γ, και από την αναδιάταξη V, D και J τμημάτων για τις αλυσίδες β και δ. Στο ποντίκι τα γονίδια των α, β και γ αλυσίδων εδράζονται στα χρωμοσώματα 14, 6 και 13 αντίστοιχα (εικόνα 1.4). Τα γονίδια της δ αλυσίδας εδράζονται στο χρωμόσωμα 14 μεταξύ των τμημάτων Va και Ja. Η θέση των γονιδίων της δ αλυσίδας είναι σημαντική: αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων της α αλυσίδας διαγράφει την έκφραση του τμήματος Cδ έτσι ώστε σε ένα δεδομένο T κύτταρο να μην επιτρέπεται η ταυτόχρονη έκφραση του TCR αβ και γδ.

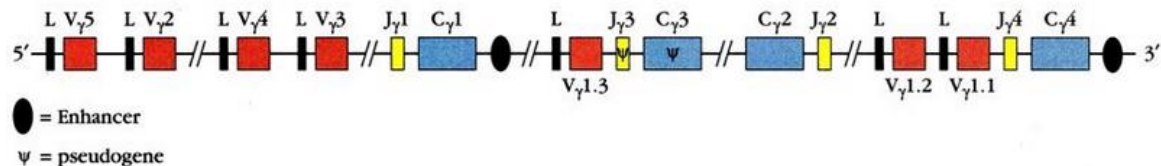
Mouse TCR α-chain and δ-chain DNA (chromosome 14)



Mouse TCR β-chain DNA (chromosome 6)



Mouse TCR γ-chain DNA (chromosome 13)



Εικόνα 1.4 Οργάνωση των γονιδιακών τμημάτων των TCR αλυσίδων σε κύτταρα σπερματικής σειράς στο ποντίκι (Goldsby *et al.*, 2003).

Στον μηχανισμό VDJ αναδιάταξης του TCR παίζουν σημαντικό ρόλο κάποιες συντηρητικές 7μερείς ή 9μερείς αλληλουχίες σηματοδότησης ανασυνδυασμού (Recombinant Signal Sequences, RSS) οι οποίες περιέχουν διαχωριστικές (spacer) αλληλουχίες μήκους 12 ζευγών βάσεων (1 στροφή) ή 23 ζευγών βάσεων (2 στροφές). Οι RSS βρίσκονται πλευρικά καθενός από τα V, D, J γονιδιακά τμήματα και ισχύει ο κανόνας συνδυασμού μίας στροφής/δύο στροφών δηλαδή RSS που έχουν 1 στροφή συνδυάζονται μόνο με RSS που έχουν 2 στροφές. Το ένζυμο ρεκομπινάση RAG-1/2 (Recombinant Activating Genes) αναγνωρίζει τις προαναφερθείσες 7μερείς ή 9μερείς αλληλουχίες και καταλύει τη σύνδεση των V-J και V-D-J τμημάτων. Πιο συγκεκριμένα η RAG-1/2 εισάγει μία θραύση ανάμεσα στην αλληλουχία κωδικοποίησης και την RSS. Στη συνέχεια καταλύει μια αντίδραση μεταεστεροποίησης που καταλήγει στον σχηματισμό φουρκέτας στην αλληλουχία κωδικοποίησης και τη θραύση της διπλής έλικας με έντονα φωσφορυλιωμένο 5' άκρο στην RSS. Σε θυμοκύτταρα έχουν βρεθεί προϊόντα κυκλικής εκτομής που

προέρχονται από διαδικασίες δημιουργίας και αποκοπής θηλιών και τελικά εξάλειψης κατά τις αναδιατάξεις του TCR γονιδίου^[5, 6].

1.5 Οι διακριτές λειτουργίες των TCRαβ και TCRγδ

Οι δύο τύποι TCR τείνουν να βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε κάποιους ιστούς και θεωρείται ότι επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Ο TCRαβ είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας των T κυττάρων στον άνθρωπο και στο ποντίκι. Ο υποδοχέας αυτός αλληλεπιδρά με πεπτιδικά αντιγόνα τα οποία επεξεργάζονται και έπειτα παρουσιάζονται μέσω των μορίων MHC I ή MHC II στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Ο TCRγδ συναντάται στην μειονότητα των T κυττάρων του περιφερικού αίματος (2-10% των CD3⁺ T κυττάρων), αλλά υπερτερεί στα T κύτταρα των επιθηλιακών επιφανειών του δέρματος, της αναπαραγωγικής οδού, του πνεύμονα και του εντέρου^[7]. Σε αντίθεση με τους TCRαβ, πέρα από το συμβατικό σύμπλοκο αντιγονικού πεπτιδίου-MHC, οι TCRγδ μπορούν επιπλέον να προσδέσουν αντιγόνα διαφορετικής φύσεως όπως λιπίδια ή φωσφοαντιγόνα προερχόμενα από μικρόβια. Ακόμα δεν έχει διατυπωθεί μία ενιαία θεωρία για την ακριβή φύση των αντιγόνων που αναγνωρίζουν τα γδ T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο η ικανότητα των γδ T λεμφοκυττάρων να σπάνε τον κανόνα και να μην απαιτούν την MHC αντιγονοπαρουσίαση για να αλληλεπιδράσουν, πιθανότατα να οφείλεται στην εξέλιξη μίας ελαφρώς διαφορετικής γωνίας άρθρωσης, της γωνίας δηλαδή που σχηματίζεται μεταξύ του επιμήκους άξονα των V και C περιοχών του TCRγδ. Όπως υποδεικνύουν οι κρυσταλλογραφικές αναλύσεις, στην περίπτωση του TCRγδ η γωνία άρθρωσης είναι 111° ενώ του TCRαβ είναι 149° με αποτέλεσμα τα δύο μόρια να έχουν διαφορετικά σχήματα. Πέραν αυτών των λειτουργικών διαφορών μεταξύ TCRαβ και TCRγδ, η βασική τους βιοχημεία παραμένει σχετικά ίδια^[8,9].

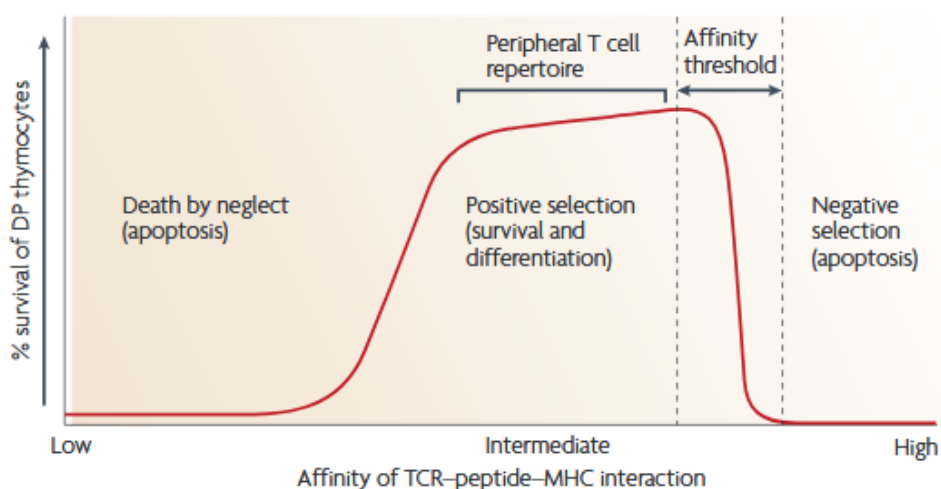
Η μοναδική ικανότητα των γδ T λεμφοκυττάρων από τη μία να αναγνωρίζουν την ύπαρξη φλεγμονής και από την άλλη να αναγνωρίζουν αντιγόνα χωρίς τους περιορισμούς της επεξεργασίας του αντιγόνου από MHC, μπορεί να τους επιτρέπει να συμμετέχουν στην ανοσορρύθμιση. Ειδικότερα, τα γδ T κύτταρα μπορεί να καταστέλλουν δυνητικά καταστροφικές φλεγμονώδεις διεργασίες παρέχοντας ανοσολογική προστασία, είτε όταν η λειτουργία των MHC μορίων έχει κατασταλεί (όπως σε περίπτωση ιικών λοιμώξεων οι οποίες μειώνουν την έκφραση MHC), είτε σε μικρή ηλικία όταν η λειτουργία των αβ T κυττάρων είναι ανώριμη και η διαδικασία επεξεργασίας και επιλογής των αντιγόνων δεν είναι ακόμα ώριμη.

1.6 Ωρίμανση και θυμική επιλογή του ρεπερτορίου των T κυττάρων

Όταν τα προγονικά T κύτταρα της λεμφοειδούς σειράς φτάνουν από τον μυελό των οστών στον θύμο, δεν εκφράζουν κανέναν από τους επιφανειακούς δείκτες όπως ο TCR, το σύμπλεγμα CD3 ή οι συνυποδοχείς CD4, CD8. Τα T κύτταρα γίνονται CD4⁺CD8⁺ (διπλά θετικά, Double Positive, DP), CD3⁺ και πραγματοποιείται η επιτυχής αναδιάταξη και έκφραση των γονιδίων του TCRαβ μετά την 17^η ημέρα της κύησης στο ποντίκι. Σε ένα μικρό ποσοστό (λιγότερο από 5%) θυμοκυττάρων, γίνεται επιτυχής αναδιάταξη των γονιδίων της γ και δ αλυσίδας του TCR σε CD4⁻CD8⁻

(διπλά αρνητικά) CD3⁺ γδ κυττάρων. Αυτός ο υποπληθυσμός στο ποντίκι είναι ανιχνεύσιμος από την 14^η μέρα της κύησης, φτάνει στο μέγιστο κατά την 18^η μέρα και στη συνέχεια μειώνεται ως την γέννηση^[2].

Τα αναπτυσσόμενα Τ κύτταρα στον θύμο πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται μέσω διαδικασιών επιλογής ώστε να παραχθούν οι λειτουργικά διαφορετικοί υποπληθυσμοί ώριμων Τ κυττάρων. Η μία επιλεκτική διαδικασία είναι η θετική επιλογή η οποία επιτρέπει την επιβίωση των θυμοκυττάρων που φέρουν υποδοχείς με ικανότητα σύνδεσης σε εαυτά μόρια ΜHC. Είναι συνεπώς υπεύθυνη για τη δημιουργία ενός ρεπερτορίου Τ κυττάρων με περιορισμό ΜHC. Τα θυμοκύτταρα που δεν επιλέγονται κατά τη διαδικασία αυτή, πεθαίνουν μες στον θύμο με απόπτωση. Ο πληθυσμός των θυμοκυττάρων που καταφέρνουν να επιβιώσουν από τη θετική επιλογή περιλαμβάνει ορισμένα κύτταρα με TCR που έχουν χαμηλή συγγένεια προς εαυτά μόρια ΜHC σε συνδυασμό με TCR χαμηλής συγγένειας προς αυτά. Η άλλη επιλεκτική διαδικασία είναι η αρνητική επιλογή κατά την οποία καταστρέφονται τα θυμοκύτταρα που έχουν υψηλή συγγένεια για σύνδεση με εαυτά μόρια ΜHC χωρίς αντιγόνο ή με εαυτά αντιγόνα που παρουσιάζονται με εαυτά μόρια ΜHC (εικόνα 1.5). Είναι σημαντική για την παραγωγή Τ κυττάρων με αυτοανοχή η οποία προστατεύει τον οργανισμό από το να εξαπολύσει μια ανοσολογική επίθεση έναντι των δικών του αντιγόνων^[10]. Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την αρνητική επιλογή έχουν περιγραφεί, όπως η έκφραση των γονιδίων ορμονικών υποδοχέων Nurr77, Nor1, Nurr1, RORγ καθώς και των γονιδίων ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου cdK2 and Bcl2^[11].



Εικόνα 1.5 Το μοντέλο συνάφειας της θυμικής επιλογής (Klein *et al.*, 2009).

Το κόστος της ωρίμανσης των Τ κυττάρων είναι υψηλό για τον ξενιστή. Υπολογίζεται ότι το 98% των του συνόλου των θυμοκυττάρων δεν ωριμάζουν, αλλά πεθαίνουν με απόπτωση μες στον θύμο, είτε διότι δεν επιτεύχθηκε σε αυτά παραγωγική αναδιάταξη των γονιδίων του TCR, είτε διότι δεν κατόρθωσαν να περάσουν επιτυχώς από τη διαδικασία της επιλογής. Τα CD4⁺CD8⁺ θυμοκύτταρα που εκφράζουν το σύμπλεγμα TCR-CD3 και κατορθώνουν να επιβιώσουν,

εξελίσσονται προς μονά θετικά CD4⁺ ή μονά θετικά CD8⁺ κύτταρα που περνούν στην κυκλοφορία.

1.7 Ανοσολογική ανοχή

Η ανοσολογική ανοχή αποτελεί μια ενεργή κατάσταση μη απόκρισης σε συγκεκριμένο αντιγόνο. Η ισορροπία μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης έναντι παθογόνων και της ανοχής σε στοιχεία του εαυτού είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Η ανοχή διαχωρίζεται σε κεντρική και περιφερική. Η κεντρική ανοχή λαμβάνει χώρα κατά την ωρίμανση στον μυελό των οστών για τα Β κύτταρα και στον θύμο για τα Τ κύτταρα. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της κεντρικής ανοχής που αφορά στα Τ κύτταρα περιλαμβάνει τη διαγραφή των κλώνων μέσω απόπτωσης. Πρόκειται για την αρνητική επιλογή, όπως αναφέρεται και στην ενότητα 1.7, κατά την οποία διαγράφονται οι κλώνοι που έχουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα με υψηλή συνάφεια. Παρά την επιλογή στο θύμο, κάποια αυτοαντιδρώντα Τ κύτταρα δε διαγράφονται και συναντώνται στην περιφέρεια. Δύο είναι οι παράγοντες οι οποίοι συνεισφέρουν σε αυτό, είτε δεν εκφράζονται όλα τα εαυτά αντιγόνα στον θύμο όπου συμβαίνει η αρνητική επιλογή, είτε κάποιοι ασθενώς αυτοαντιδρώντες κλώνοι βρίσκονται οριακά στο κατώφλι της υψηλής συγγένειας με το αντιγόνο-MHC κατά την επιλογή και επιβιώνουν^[12]. Η περιφερική ανοχή που αφορά στα Τ κύτταρα, λαμβάνει χώρα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και περιλαμβάνει τους εξής μηχανισμούς: καταστροφή των Τ κυττάρων με απόπτωση, ανέργεια (μη απόκριση) των Τ κυττάρων και δράση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων.

1.8 Ένας ακόμη υποπληθυσμός Τ κυττάρων, τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα

Σήμερα οι ανοσολόγοι ξεχωρίζουν κι έναν επιπλέον υποπληθυσμό Τ κυττάρων, τα λεγόμενα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory, T_{reg}). Αυτά δρουν σε δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς και σε σημεία φλεγμονής, και μέσω αλληλεπιδράσεων του TCR αναγνωρίζουν συγκριμένα αντιγόνα του εαυτού ή ξένα αντιγόνα. Τα T_{reg} μπορούν να παραχθούν είτε φυσικά στον θύμο (natural T_{reg}, nT_{reg}) ως μια εναλλακτική στην τύχη των αυτοαντιδρώντων Τ κυττάρων, είτε στην περιφέρεια από συμβατικά ώριμα Τ κύτταρα που εκτίθενται σε κυτταροκίνες μετά την επαγωγή από αντιγόνο (induced T_{reg}, iT_{reg}). Μερικοί επιστήμονες διαχωρίζουν τον ρόλο τους, εκτιμώντας από τη μία πως τα nT_{reg} ρυθμίζουν την απόκριση σε αυτοαντιγόνα για να περιορίσουν αυτοάνοσες ασθένειες, κι από την άλλη πως τα iT_{reg} ελέγχουν αντιδράσεις κατά των αβλαβών ξένων αντιγόνων σε βλενογόνους ιστούς όπου το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε συνεχή επαφή με τον έξω κόσμο.

Από το 1995 ξεκινούν οι αναφορές στην ανακάλυψη των T_{reg} η οποία θεωρείται σημαντικότερη για την ανοσορρύθμιση. Ένας CD4⁺ Τ κυτταρικός πληθυσμός που βρέθηκε στον άνθρωπο και στο ποντίκι αποδείχθηκε να διαφέρει στο επιφανειακό του προφίλ και στο προφίλ παραγωγής κυτταροκινών από τα T_H και είχε την ικανότητα να καταστέλλει in vivo τις λειτουργίες των CD4⁺ T_H και να

μπλοκάρει την αυτοανοσία^[13-17]. Μεταξύ των διαφόρων επιφανειακών μορίων που βρίσκονται στα CD4⁺ T_{reg}, όπως το CTLA-4, Foxp3 (forkhead winged-helix transcription factor box P3), CD5, CD45RB, CD25, CD62L και CD38, η έκφραση του CD25 είναι η πιο βασική για την προστασία από αυτοανοσίες^[18]. Τα CD4⁺CD25⁺ T_{reg} μπορούν να προέρχονται από καλλιέργεια CD4⁺ T κυττάρων με ειδικό αντιγόνο, με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και με IL-10. Υπό αυτές τις συνθήκες τα T_{reg} παράγουν IL-10, IL-4, TGF-β και χαμηλά επίπεδα IFN-γ^[17, 19, 20]. Η κατασταλτική δράση των CD4⁺CD25⁺ T κυττάρων είναι αντιγονο-ειδική και μεσολαβείται από την αποτροπή της μεταγραφής της IL-2 στα CD4⁺CD25⁻ T κύτταρα. Η καταστολή απαιτεί κυτταρική επαφή μεταξύ των δύο πληθυσμών, ενεργοποίηση μέσω του TCR και μπορεί να ξεπεραστεί με επίδραση από IL-2 ή αντί-CD28. Άρα τα CD4⁺CD25⁺ T_{reg} χρειάζονται IL-2 και CD28 συνδιέγερση για την ανάπτυξή τους, και λειτουργούν με συνδιέγερση από το CTLA-4 για να παράγουν IL-10 και TGF-β^[21-23]. Επιπρόσθετες έρευνες περιγράφουν την ύπαρξη κατασταλτικών CD8⁺CD28⁻ T_{reg}, καθώς και CD8⁻ κυττάρων με MHC I περιορισμό ικανά να καταστείλουν τα CD8⁻CD28⁻ CTL^[24].

1.9 Τα T_s του παρελθόντος και τα T_{reg} του παρόντος

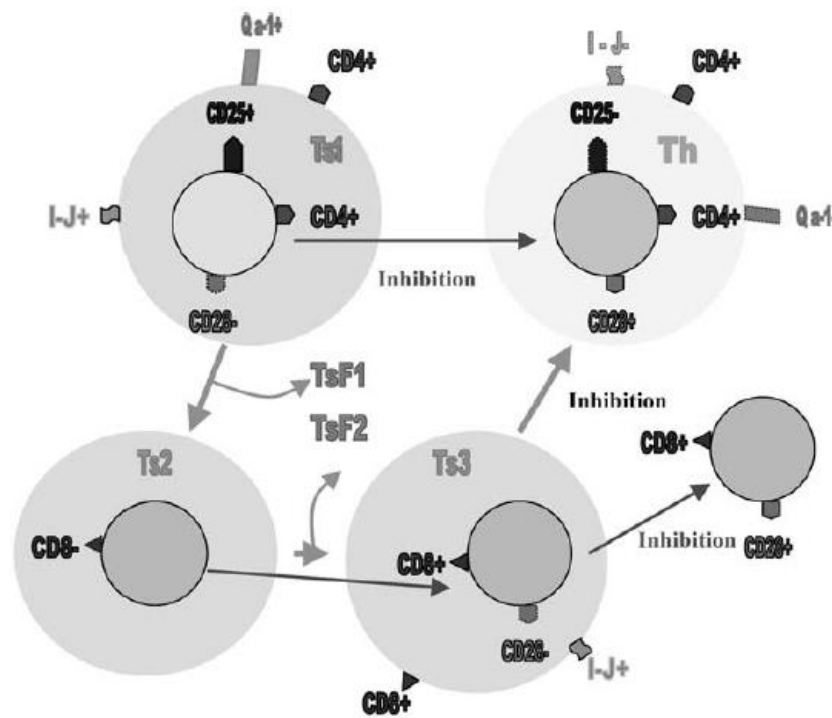
Η ανασοκαταστολή, όντας υπεύθυνη για τη διατήρηση υγείας και την πρόκληση ασθένειας, είναι πιθανότατα το σημαντικότερο κομμάτι του ανοσοποιητικού συστήματος. Διατηρώντας την ανοχή, η ανασοκαταστολή διατηρεί τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, ενώ η ανάπτυξή της κατά τη διάρκεια σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος ή η σήψη, χειροτερεύει την ασθένεια και οδηγεί τον οργανισμό στην κατάρρευση. Οι γνώσεις μας για την ανασοκαταστολή είναι ακόμη περιορισμένες, με τις σημερινές μελέτες να επικεντρώνονται στα Treg. Παλαιότερες μελέτες της δεκαετίας του '70 και '80, οι οποίες αναφέρονται στα T κατασταλτικά κύτταρα (T suppressor, Ts), αποδείχτηκαν πολύ περίπλοκες και αποθάρρυναν τους επιστήμονες να συνεχίσουν την έρευνά τους. Ωστόσο οι γνώσεις που είχαν αποκτηθεί τότε, σε συνδυασμό με τις πιο πρόσφατες ανακαλύψεις, μπορούν να προσφέρουν σημαντικές απαντήσεις για την αντιγονο-ειδική ανασοκαταστολή.

Οι περισσότερες από τις μελέτες του παρελθόντος διακρίνουν τρεις πληθυσμούς T_s: Ts1 (ή Ts inducer, Tsi), Ts2 (ή Ts transducer, Tst) και Ts3 (ή Ts effector, Tse). Οι Ts1 και Ts2 έχουν συζητηθεί το περισσότερο. Ο Ts1 πληθυσμός περιείχε CD4⁺, I-J⁺ (σήμερα MHC τάξης II), Qa-1⁺ (MHC τάξης I), ιδιοτυπικά κύτταρα με ικανότητα πρόσδεσης σε αντιγόνο και παραγωγή του διαλυτού παράγοντα TsF1 (Ts Factor 1). Ο παράγοντας αυτός αποτελούνταν από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες με δισουλφιδικό δεσμό^[25, 26]. Η μία αλυσίδα παρουσίαζε MHCII περιορισμό, ενώ η άλλη αλυσίδα ήταν αντιγονο-ειδική αφού προσδένονταν στο αντιγόνο. Παρόλο που ο TsF1 δεν ήταν αντίσωμα, είχε παρόμοιους ιδιοτυπικούς καθοριστές με εκείνους που εκφράζονταν στα αντισώματα τα οποία παράγονταν εναντίον των συγκεκριμένων αντιγόνων. Επιπλέον, ο παράγοντας αυτός είχε την ικανότητα να επάγει την διαφοροποίηση των Ts2 κυττάρων^[27, 28]. Τα Ts2 κύτταρα είχαν αντι-ιδιοτυπικούς αντιγονο-ειδικούς καθοριστές και παρήγαγαν τον διαλυτό παράγοντα TsF2 (Ts Factor 2)^[29, 30]. Ο TsF2 ήταν κι αυτός ένα ετεροδιμερές του οποίου η μία αλυσίδα είχε MHC καθοριστές (χωρίς απόδειξη ότι είναι ο I-J

καθοριστής), αλλά σε αντίθεση με τον TsF1 δεν προσδένονταν σε αντιγόνο ούτε είχε αντιγονικούς καθοριστές. Το ενδιαφέρον είναι πως ο TsF2 μπορούσε να προσδέσει ιδιοτυπικούς καθοριστές και έτσι χαρακτηρίστηκε ως αντι-ιδιοτυπικός παράγοντας που του λείπουν ωστόσο καθοριστές της C περιοχής της ανοσοσφαιρίνης οι οποίοι περιγράφονται στον TsF1^[31]. Τέλος, τα Ts3 κύτταρα ήταν CD8⁺, I-J⁺ και φάνηκαν να είναι τα δραστικά (effector) κύτταρα της καταστολής. Το κύτταρο στόχος αυτού του μονοπατιού ήταν το CD4⁺, I-J⁻, Qa-1⁻ T_H, το οποίο όταν καταστέλλονταν μπορούσε να μπλοκάρει την περεταίρω ενεργοποίηση της χυμικής ή κυτταρικής απόκρισης^[32, 33].

Συνδυάζοντας τις πιο πρόσφατες γνώσεις με αυτές του παρελθόντος, τα CD4⁺CD25⁺ κύτταρα μπορεί να αντιστοιχούν στα Ts1 κύτταρα, τα CD8⁻ με περιορισμό MHC I στα Ts2 κύτταρα και τα CD8⁺CD28⁻ T_{reg} στα Ts3. Με βάση αυτόν τον παραλληλισμό, τα T_{reg} αποτελούν αντιγονο-ειδικά T_s, τα οποία κατά την ειδική αναγνώριση του αντιγόνου δρουν μέσω του συνδεδεγμένου CTLA-4 για να καταστείλουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Η δράση τους στα CD8⁻ κύτταρα πιθανόν να επάγει την διαφοροποίηση και παραγωγή CD8⁺CD28⁻ κυττάρων που μπορούν να καταστέλλουν τα CD8⁺CD28⁺ κύτταρα (εικόνα 1.6).

Σύμφωνα με το παλιό μοντέλο, η παρουσία του CD4⁺ Ts είναι προαπαιτούμενη για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του CD8⁺ Ts. Τα ευρήματα



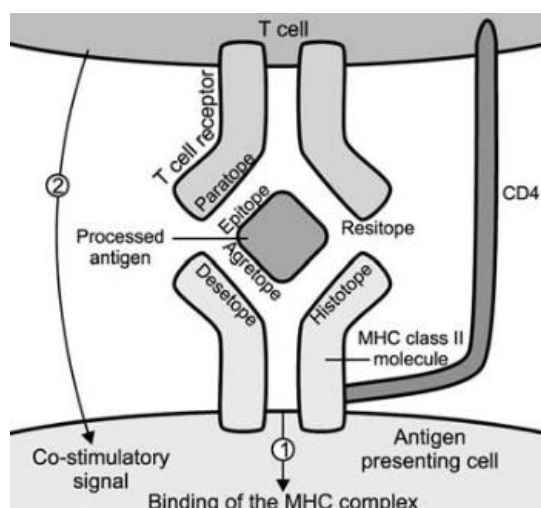
Εικόνα 1.6 Συνδυαστική γνώση των δεκαετιών '70 και '90 για το κύκλωμα κατασταλτικών και ρυθμιστικών T κυττάρων. Οι μεγάλοι κύκλοι δείχνουν τα Ts υποσύνολα του '70, όπου το Ts1 (CD4⁺, I-J⁺, Qa-1⁺) παράγει τον TsF1 και διεγείρει τον Ts2 πληθυσμό να εκκρίνει τον TsF2, να διαφοροποιηθεί σε Ts3 (CD8⁺, I-J⁺) και να καταστείλει τα T_H (CD4⁺, I-J⁻, Qa-1⁻). Οι μικροί κύκλοι δείχνουν τα T_{reg} του '90, όπου τα CD4⁺CD25⁺CD28⁻ κύτταρα καταστέλλουν τα CD4⁺CD25⁺CD28⁺ κύτταρα, ενώ τα CD8⁻ κύτταρα πιθανόν να επάγει τα CD8⁺CD28⁻ κύτταρα να καταστέλλουν τα CD8⁺CD28⁺ κύτταρα (Athanassakis *et al.*, 2002).

του σήμερα δεν επιτρέπουν ακόμα την σύνδεση μεταξύ των $CD4^+CD25^+CD28^-$ και $CD8^+CD28^-$ κυττάρων. Με βάση τις βασικές γνώσεις ανοσολογίας, η διαφοροποίηση του προ- T_C σε T_C χρειάζεται ειδικά $CD4^+ T_H$. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι παράγοντες των $CD4^+CD25^+$ κυττάρων επιτρέπουν την ωρίμανση των $CD8^- T_S$ σε $CD8^+CD28^- T_S$. Τα $CD8^+CD28^+$ κύτταρα δεν εμφανίζονται ως στόχος του παλιού κυκλώματος των T_S . Εφόσον όμως η καταστολή του $CD4^+ T_H$ στόχου αποτρέπει όχι μόνο την χυμική απόκριση (B κύτταρα) αλλά και την κυτταρική απόκριση (T_C), οι ερευνητές της εποχής δεν επιχείρησαν να αναγνωρίσουν κανέναν $CD8^+$ κυτταρικό στόχο. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, τα $CD4^+CD25^+$ κύτταρα απαιτούν κυτταρική επαφή για να ασκήσουν την κατασταλτική τους δράση. Παρόμοια κυτταρική επαφή θα μπορούσε να υπάρξει και στα T_S του παρελθόντος μέσω των ιδιοτυπικών/αντι-ιδιοτυπικών αλληλεπιδράσεων^[34].

1.10 Τα διαλυτά μόρια MHC και TCR

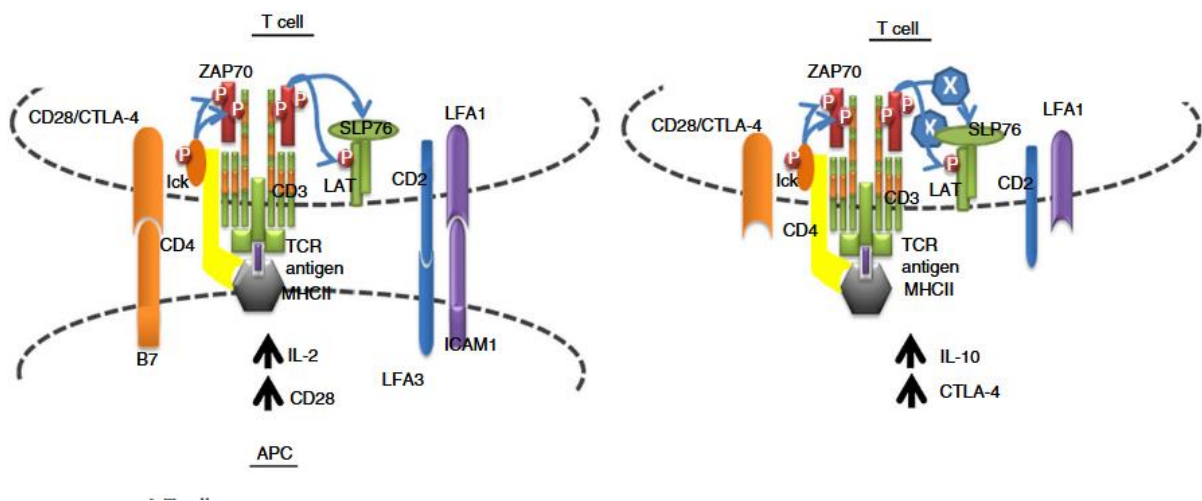
Η διατήρηση του MHC πολυμορφισμού στα είδη είναι μία θεμελιώδης φυσική διαδικασία που εξασφαλίζει την επιβίωση και την εξέλιξη των οργανισμών^[35, 36]. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι τα μόρια MHC τάξης I και τάξης II, καθώς και οι υποδοχείς τους, TCR $\alpha\beta$ και TCR $\gamma\delta$, αποτελούν διαμεμβρανικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Ωστόσο τα μόρια αυτά έχουν βρεθεί και σε διαλυτή μορφή στα υγρά του σώματος, χωρίς όμως ο ρόλος και η προέλευσή τους να έχουν ξεκαθαριστεί. Υπάρχουν έντονες ενδείξεις για την έκφραση των διαλυτών MHC ή TCR (soluble MHC/TCR, sMCH/sTCR) στους αναπαραγωγικούς ιστούς και τα περιβάλλοντα υγρά^[37], καθώς και στον ορό του αίματος^[38-41].

Η πρόσδεση του MHC μορίου στον TCR επιτυγχάνεται από δύο διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης (εικόνα 1.7): η πρώτη περιλαμβάνει την κατάλληλη αλληλεπίδραση εαυτού MHC/TCR, αναφέρεται ως histotope-resitope αναγνώριση



Εικόνα 1.7 MCH-TCR αλληλεπίδραση. Ο TCR αλληλεπιδρά με το MHC μέσω της resitope περιοχής του, και με το αντιγόνο μέσω της paratope περιοχής του. Αντίστοιχα το MHC αναγνωρίζει το resitope μέσω της histotope περιοχής του, και το αντιγόνο μέσω της desetope περιοχής του. Τέλος, το αντιγόνο αλληλεπιδρά με τον TCR μέσω της epitope περιοχής του, και με το MHC μέσω της agreptope περιοχής του (Lewis *et al.*, 2003).

και είναι ανεξάρτητη από το αντιγονικό πεπτίδιο, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση αντιγονικού επιτόπου/TCR, αναφέρεται ως *epitope-paratope* αναγνώριση και εξαρτάται από το αντιγονικό πεπτίδιο που φορτώνει το MHC. Επομένως, στο πλαίσιο του MHC περιορισμού, η αλληλεπίδραση *histotore-resitope* συμβαίνει ανεξάρτητα από το αντιγονικό πεπτίδιο. Μπορούμε επομένως να υποθέσουμε ότι ανεξαρτήτως του πεπτιδίου που φορτώνεται στο sMHC, το δεύτερο θα μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον TCR με χαμηλή συνάφεια^[42, 43]. Δεδομένα δείχνουν ότι τα sMHCIII μόρια ασκούν κατασταλτική δράση σε CD4⁺ T_H, όπου όταν συνδεθούν στον μεμβρανικό TCRαβ διεγείρουν κατασταλτικά μονοπάτια στα κύτταρα (εικόνα 1.8)^[44]. Με παρόμοιο σκεπτικό, οι sTCRαβ and sTCRγδ θα μπορούσαν να ρυθμίζουν την παθοφυσιολογία του οργανισμού αλληλεπιδρώντας και καλύπτοντας μεμβρανοσύνδετα ή διαλυτά μόρια MHC.



Εικόνα 1.8 Διαφορετικά σηματοδοτικά γεγονότα συμβαίνουν σε CD4⁺ κύτταρα από τη δράση του μεμβρανικού μορίου MHCII συγκριτικά με του sMHCII μορίου: Παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, η αλληλεπίδραση του μεμβρανικού μορίου MHCII με το CD4⁺ κύτταρο ενισχύεται από τις αλληλεπιδράσεις των CD4, CD28/CTLA-4/B7, CD2/LFA3 or LFA1/ICAM1 και οδηγεί στην αυξημένη έκφραση του CD28 και IL-2. Απουσία αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και συνεπώς απουσία ανοσολογικής απόκρισης, το sMHCII αλληλεπιδρά με τα CD4⁺ κύτταρα και οδηγεί σε έκφραση του CTLA-4 και της IL-10 (Bakela *et al.*, 2015).

Αν αποδειχθεί ότι τα T_s αποτελούν πράγματι τα σημερινά T_{reg}, η πιο σημαντική ίσως συνεισφορά των παλαιότερων πειραμάτων είναι η περιγραφή ειδικών διαλυτών κατασταλτικών παραγόντων^[38]. Αυτό διότι ο TsF1 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει τον sTCR, ενώ ο TsF2 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει το sMHCII. Πράγματι ο TCR αβ ή γδ είναι ένα ετεροδιμερές με ιδιοτυπικούς καθοριστές και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHCII όπως ακριβώς περιγράφηκε για τον TsF1. Ακόμη, οι sMHCII πρωτεΐνες φορτώνονται ισχυρά με τον αντιγονικό επίτοπο κατά την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης, αποτρέποντας έτσι την οποιαδήποτε άλλη πρόσδεση ελεύθερου αντιγόνου, ενώ ταυτόχρονα αναγνωρίζονται από τον TCR, όπως ακριβώς περιγράφηκε για τον TsF2.

Στην προσπάθειά τους να κατανοήσουν τον ρόλο του TCR, πολλά εργαστήρια έχουν κατασκευάσει διαλυτές μορφές του υποδοχέα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν κυρίως στην θεραπεία κατά του καρκίνου^[45]. Ωστόσο έχει δειχθεί ότι sTCR μόρια μπορούν να παραχθούν φυσιολογικά στον οργανισμό και προφανώς έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση. Επομένως είναι απαραίτητο να καταλάβουμε τους μηχανισμούς δράσης του φυσικού sTCR, προτού να είμαστε σε θέση να εφαρμόσουμε με θεραπευτικό σκοπό τον sTCR που κατασκευάζεται τεχνητά μέσω γενετικής τροποποίησης.

1.11 Σκοπός της εργασίας

Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCR) με το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), τάξης I και τάξης II, και το αντιγόνο που αυτό φορτώνει, καταλαμβάνει κεντρική θέση στην ανοσολογική απόκριση, ρυθμίζοντας την κατάσταση υγείας και ασθένειας. Οι διαλυτές (soluble) μορφές αυτών των μορίων, sTCRαβ, sTCRγδ, sMHC I και sMHC II, έχουν περιγραφεί με το πέρασμα των χρόνων και ανιχνεύονται σε όλα σχεδόν τα υγρά του σώματος. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην αναζήτηση των sTCRαβ και sTCRγδ τόσο in vivo προέλευσης σε σωματικά υγρά, όσο και in vitro προέλευσης από λεμφικά κύτταρα, καθώς και στον ρόλο που οι υποδοχείς διαδραματίζουν στην ανοσολογική ρύθμιση. Βασικός στόχος είναι να βρεθεί μια κατάλληλη πηγή, όπου ο sTCR ανιχνεύεται σε επίπεδα τέτοια που να επιτρέπουν την απομόνωσή του σε επαρκείς και αξιοποιήσιμες ποσότητες. Η διαθεσιμότητα του φυσικής προέλευσης sTCR σε μία τέτοια κλίμακα, δίνει τη δυνατότητα μελλοντικά να μελετηθεί σε βάθος η δομή του και η λειτουργική του δράση στις διάφορες καταστάσεις που το ανοσοποιητικό σύστημα κρίνεται να αντιμετωπίσει.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματική προσέγγιση

Αρχικά, συλλέχθηκε κοιλιακό υγρό ανθρώπινης προέλευσης (όλα τα επόμενα αφορούν το ποντίκι) και σπερματικό πλάσμα προς αναζήτηση του sTCR. Απομονώθηκε επίσης λεπτό έντερο από το οποίο ελέγχθηκε το υγρό και το υπερκείμενο της *in vitro* καλλιέργειας του ιστού για την ύπαρξη sTCR.

Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα ανοχοποίησης με χορήγηση hsa (human serum albumin) τόσο *in vitro* σε κύτταρα σπλήνας όσο και *in vivo* ενδοπεριτοναϊκά προς αναζήτηση του sTCR στο υπερκείμενο και στον ορό αντίστοιχα.

Τέλος, πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε υπερκείμενα από την *in vitro* καλλιέργεια T λεμφοκυττάρων σπλήνα, τα οποία προέρχονταν από *in vivo* ανοχοποιημένα ποντίκια, μετά από σύντηξή τους με κύτταρα της λεμφικής σειράς BW5147α^β.

Ακολουθεί λεπτομερής ανάλυση όλων των χειρισμών και των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2 Πειραματοζώα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια BALB/c (*Mus musculus*), ηλικίας 8-12 εβδομάδων, του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας, η εκτροφή των οποίων έγινε στο ζωοτροφείο του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα ποντίκια εκτρέφονται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (18-24°C) και υγρασίας (-50%) και 12ωρη φωτοπερίοδο (07:00 έως 19:00) με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Ο χειρισμός των πειραματοζώων έγινε σύμφωνα με τις ισχύουσες νομικές διατάξεις και τους διεθνείς κανονισμούς βιοηθικής.

2.3 Ανίχνευση του sTCR σε σωματικά υγρά

2.3.1 Συλλογή κοιλιακού υγρού

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από κοιλιακές πλύσεις γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας (με έμμηνο ρύση) στη φάση της ωορρηξίας. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε από γυναικολόγο και η κάθε πλύση έγινε με 5mL φυσιολογικό ορό. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (1200 rpm, 6 min) στο εργαστήριο και τα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν φυλάχθηκαν στους -20°C.

2.3.2 Συλλογή σπερματικού πλάσματος

Για τη συλλογή του σπέρματος χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια που είχαν ελεγχθεί πρόσφατα για την γονιμοποιητική τους ικανότητα. Μετά από ευθανασία του ζώου αφαιρέθηκε προσεκτικά η κάθε επιδιδυμίδα από τους όρχεις. Στη συνέχεια με τη βοήθεια στερεοσκοπίου, απομακρύνθηκε προσεκτικά ο λιπώδης ιστός και τα αιμοφόρα αγγεία. Το σπερματικό υγρό εξέρχεται πιέζοντας με ήπιες κινήσεις κατά μήκος της επιδιδυμίδας με την χρήση λυγισμένης βελόνας, μέσα σε τρυβλίο σε 1 mL PBS (Phosphate Buffered Saline). Το υγρό φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm, 6 min) και το υπερκείμενο που συλλέχθηκε φυλάχθηκε στους -20°C.

2.3.3 Συλλογή εντερικού υγρού

Για τη συλλογή του εντερικού υγρού, μετά από ευθανασία του ζώου, έγινε απομόνωση τμημάτων του λεπτού εντέρου που ήταν ελεύθερα από προϊόντα του στομάχου. Στα τμήματα αυτά πραγματοποιήθηκαν πλύσεις στο εσωτερικό με τη χρήση σύριγγας η οποία επιτρέπει την είσοδο 500 μL PBS με πίεση. Το υγρό των πλύσεων φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm, 6 min) και το υπερκείμενο που συλλέχθηκε φυλάχθηκε στους -20°C.

2.3.4 Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Δοκιμή – ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)

Η ανίχνευση του sTCR στα παραπάνω υγρά του σώματος έγινε με την τεχνική της ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). Η ELISA είναι μια ενζυμική μέθοδος ανίχνευσης μορίων, με τη χρήση αντισωμάτων, ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνων υποστρωμάτων, κατά την οποία η συγκέντρωση του εξεταζόμενου μορίου προσδιορίζεται από την απορρόφηση του φωτός που επηρεάζεται από την ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος παραγόμενο από την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η έμμεση ELISA κατά την οποία τα δείγματα επιστρώνονται σε στερεή επιφάνεια με σκοπό την πρόσδεση και ακινητοποίηση των αντιγόνων και στη συνέχεια επωάζονται με ένα πρώτο αντίσωμα ειδικό ως προς το αντιγόνο, κι ένα δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση ειδικό ως προς το πρώτο αντίσωμα. Μετά από την προσθήκη του υποστρώματος η ένταση του χρώματος που αναπτύσσεται είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα.

Διαδικασία:

Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου και τα πλυσίματα έγιναν με 200μL PBS-Tween 20 (Tween 20, synthesis grade, Scharlau Chemie, Tw0020).

- Ξεπάγωμα των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου και αραίωσή τους σε coating buffer (0.05M NaHCO₃, 0.05 Na₂CO₃, pH 9.6). Επίστρωση 100 μL κάθε δείγματος σε 96-well flat bottom plate και επώαση για 18 h στους 4°C.
- Αφαίρεση της περίσσειας δείγματος από τα πηγάδια και τριπλή πλύση.

- Επώαση με 150 μL /πηγάδι PBS-BSA 2% για 2 h, με σκοπό τον αποκλεισμό της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων που θα ακολουθήσουν, και τριπλή πλύση.
- Επώαση με 100 μL /πηγάδι με το πρώτο αντίσωμα για 1h και 30 min και τριπλή πλύση.
- Επώαση με 100 μL /πηγάδι με το δεύτερο αντίσωμα για 1 h και τριπλή πλύση.
- Επώαση με 100 μL /πηγάδι με το χρωμογόνο υπόστρωμα (Pierce TMB substrate kit, Thermo Scientiic) για 15 min.
- Προσθήκη 50 μL /πηγάδι H_2SO_4 1M για την λήξη της αντίδρασης.
- Η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε σε 450nm σε χρονικό εύρος 5 λεπτών από την προσθήκη του H_2SO_4 .

Η αραίωση των δειγμάτων σε coating buffer ήταν 1:2 για το κοιλικό υγρό, 1:50 για το σπερματικό πλάσμα και 1:2 για το εντερικό υγρό.

Τα αντισώματα αραιώθηκαν 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε PBS-BSA 0,1%. Για το ανθρώπινο δείγμα ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα Purified anti-human TCR α/β Antibody, Biolegend και Purified anti-human TCR γ/δ Antibody, Biolegend και ως δεύτερο το Anti-mouse IgG HRP. Για τα δείγματα από ποντίκι ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα Purified anti-mouse TCR α/β Antibody, Biolegend και Purified anti-mouse TCR γ/δ Antibody, Biolegend και ως δεύτερο το Anti-hamster IgG HRP.

2.4 Ανίχνευση του sTCR σε υπερκείμενο καλλιέργειας εντερικού ιστού

Ο καθαρός ιστός που απομονώθηκε και έμεινε από την διαδικασία των πλύσεων του λεπτού εντέρου χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια. Οι παρακάτω χειρισμοί έγιναν σε στείρες συνθήκες. Αρχικά τα εντερικά τμήματα από κάθε ποντίκι κομματιάστηκαν σε ακόμη μικρότερα και στη συνέχεια επώαστηκαν για 5 min σε διάλυμα θρυψίνης (Trypsin-EDTA 1X, Biosera) 1 mL στους 37°C . Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο με ικανότητα να διασπά τις πρωτεϊνικές διασυνδέσεις μεταξύ των κυττάρων του ιστού. Η απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης έγινε με αραίωσή της σε 3 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, high glucose, Biosera) με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera). Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος (1200 rpm, 6 min) και αφαίρεση του υπερκειμένου. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS στους 37°C και σε 5 % CO_2 . Μετά από 48 h, η καλλιέργεια συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε (1200 rpm, 6 min) και τα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν φυλάχθηκαν στους -20°C .

Στη συνέχεια η ανίχνευση των sTCR $\alpha\beta$ και sTCR $\gamma\delta$ στα αντίστοιχα υπερκείμενα έγινε με την τεχνική της ELISA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4. Η αραίωση των δειγμάτων σε coating buffer ήταν 1:2. Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα Purified anti-mouse TCR α/β Antibody, Biolegend και Purified anti-mouse TCR γ/δ Antibody, Biolegend και ως δεύτερο το Anti-hamster IgG HRP.

2.5 Απομόνωση sTCRγδ από σπερματικό πλάσμα

Το απομονωμένο υπερκείμενο σπέρματος χρησιμοποιήθηκε για την επιλεκτική απομόνωση του sTCRγδ από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Αυτό πραγματοποιήθηκε με ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης με σφαιρίδια.

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία απλή, γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για απομόνωση πρωτεϊνών από ορούς, υπερκείμενα ή εκχυλίσματα. Ειδικότερα, η πειραματική αυτή τεχνική βασίζεται στην ικανότητα των αντισωμάτων να προσδένονται σε συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια με μεγάλη ακρίβεια και εξειδίκευση. Παραμαγνητικά σφαιρίδια (beads) που έχουν στην επιφάνειά τους προσκολλημένα δεύτερα αντισώματα, αν συνδυαστούν με πρώτα αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, είναι ιδανικά για την θετική επιλογή της τελευταίας από ένα σύνολο διαφορετικών πρωτεϊνών. Τα πρώτα αντισώματα σχηματίζουν, μέσω του Fc τμήματος τους, ομοιοπολική σύνδεση με τα δεύτερα αντισώματα, το σύμπλοκο πρώτο αντίσωμα – πρωτεΐνη κατακρατείται κι έτσι γίνεται εφικτή η απομόνωση της πρωτεΐνης, ύστερα από αποκόλλησή της από τα πρώτα αντισώματα.

Διαδικασία

1) Αρχικά απαιτείται η ακινητοποίηση του πρώτου αντισώματος στα σφαιρίδια (κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει αφαίρεση του tube από τον μαγνήτη και επαναδιάλυση των beads σε 2 mL PBS, τοποθέτηση του tube ξανά στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads):

- Προσθήκη $4 \cdot 10^7$ beads σε 1 mL PBS σε tube (χωρητικότητας 5 mL), τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, απομάκρυνση του PBS αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads, και διπλή πλύση.
- Επώαση των beads με 1 mL πρώτο αντίσωμα/PBS για 1 h υπό ανάδευση στους 4°C .
- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads, και διπλή πλύση.
- Επαναδιάλυση των beads σε 1 mL triethanolamine (0,2M σε dH₂O , pH 8,2) , τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads.
- Επώαση των beads με 1 mL 00.1 gr dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP, Pierce)/Triethanolamine για 30 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DMP είναι αυτό που εξασφαλίζει το cross linking μεταξύ των δύο αντισωμάτων.
- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads και επώαση των beads με 1 mL Tris buffer (50mM σε dH₂O , pH 7,5) για 5 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads, και διπλή πλύση.
- Επαναδιάλυση των beads σε 1 mL PBS και διατήρηση στους 4°C .

Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Dynabeads anti-Rat IgG, M-450, Invitrogen και το πρώτο αντίσωμα (3 μg στα $4 \cdot 10^7$ beads) το Purified hamster anti-mouse TCR γ/δ Antibody, Biolegend εφόσον υπάρχει cross reactivity μεταξύ rat και hamster.

2) Αφού τα σφαιρίδια έχουν συνδεθεί με το επιθυμητό, και ειδικό για την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος αντίσωμα, ακολουθεί η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης (κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει αφαίρεση του tube από τον μαγνήτη και επαναδιάλυση των beads σε 2 mL PBS, τοποθέτηση του tube ξανά στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads):

- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, απομάκρυνση του PBS αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads, και διπλή πλύση.
- Επώαση των beads με 500 mL του αραιωμένου δείγματος που περιέχει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος για 2 h υπό ανάδευση στους 4°C .
- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, απομάκρυνση του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads, και διπλή πλύση.
- Επώαση του συμπλόκου beads-πρωτεΐνη με 500 mL NaCl 1M για 20 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό εξασφαλίζει την έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης.
- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη, συλλογή του υγρού το οποίο περιέχει την επιθυμητή πρωτεΐνη και φύλαξή του στους 4°C .
- Διπλή πλύση των beads, επαναδιάλυση σε 1 mL PBS και διατήρηση στους 4°C ώσπου να ξαναχρησιμοποιηθούν (ως 5 φορές το πολύ).

Το υπερκείμενο του σπέρματος ξεπάγωσε σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε αραιώση 1:2 με PBS πριν την επώαση στα beads. Το δείγμα αυτό επώαστηκε συνολικά 3 φορές με τα beads οπότε το τελικό διάλυμα καθαρής πρωτεΐνης ήταν 1.5 mL. Για τον λόγο αυτό τα 1.5 mL συμπυκνώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση (3000 rpm, 5 min, στους 4°C) με τη χρήση φίλτρου (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Nominal Molecular Weight Limit-NMWL 10,000, Millipore) στα 500 μL.

2.6 Ανάλυση του sTCR $\gamma\delta$ με βάση το μοριακό βάρος

Μετά τη διαδικασία απομόνωσης του sTCR $\gamma\delta$ από το σπερματικό πλάσμα, ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος του διαλυτού υποδοχέα ο οποίος βασίστηκε στον διαχωρισμό με βάση το μοριακό του βάρος.

2.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η πολυακρυλαμίδα είναι ένα πολυμερές το οποίο αναλόγως τη συγκέντρωσή του σχηματίζει πόρους ποικίλου μεγέθους κατά τον πολυμερισμό του. Οι πρωτεΐνες του δείγματος που υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθος τους. Η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους γίνεται με οδηγό (marker) μετά την εμφάνιση τους χρησιμοποιώντας μία μέθοδο χρώσης. Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν σε αποδιατακτικές συνθήκες, για να μην διατηρούνται τυχών σύμπλοκα, και σε πήκτωμα

πολυακρυλαμίδης που αποτελείται από ένα Stacking gel, πυκνότητας 4% σε ακρυλαμίδα και pH 6,8 το οποίο βοηθά στο πακετάρισμα των δειγμάτων, πάνω από ένα, μεγαλύτερου μεγέθους, Running gel 12% σε ακρυλαμίδα και pH 6,8, μέσα στο οποίο διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες.

Υλικά

- Για τα πηκτώματα:

Αντιδραστήριο	Running Gel 12% (10ml)	Stacking Gel 4% (5ml)
ddH ₂ O	3,35ml	1,6
Acrylamide	4ml	2ml
SDS 10%	100λ	50λ
Tris – HCl	2,5ml	1,25ml
Temed	50λ	30λ
APS 10%	100λ	50λ

Η προσθήκη του APS και του TEMED γίνεται στο τελευταίο βήμα προκειμένου να ξεκινήσει ο πολυμερισμός.

- Για το δείγμα:

5X loading buffer: 0,0625M Tris, 5% β-mercaptethanol, 2% SDS, 20% Glycerol, 0,1% Bromophenol blue

- Για την ηλεκτροφόρηση:

1X Running buffer: 0,025M Tris, 0,192M Glycine, 0,1%w/v SDS

Διαδικασία

- Τοποθέτηση στην συσκευή του gel ανάλυσης (running gel) και κάλυψη με αιθανόλη για να προκύψει ενιαίο το gel.
- Προσθήκη του gel πακεταρίσματος (stacking gel) και από πάνω το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις για τα δείγματα.
- Προετοιμασία των δειγμάτων στον επιθυμητό όγκο και προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας 5X loading buffer (ώστε να αποτελεί το 1/5 του συνολικού όγκου). Βρασμός τους στους 95°C για 5 min ώστε να αναδιαταχτούν οι πρωτεΐνες.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις μαζί με κατάλληλο οδηγό (marker) και πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης σε τάση 120-150 V.
- Μετά το τέλος της διαδικασίας ακολουθεί η χρώση του running gel για οπτικοποίηση των ζωνών. Κάθε ζώνη συγκρίνεται με τις ζώνες του marker γνωστού μοριακού βάρους, ώστε να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της καθεμίας.

2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη στον εντοπισμό μικρών πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων (2–5 ng/band). Συγκεκριμένα, είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την χρώση με coomassie blue. Η μοριακή βάση της χρώσης είναι η εξής: τα ιόντα αργύρου δεσμεύονται στις αρνητικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών, η περίσσεια ιόντων αργύρου ξεπλένεται με νερό και στο τελικό στάδιο τα ιόντα αργύρου ανάγονται σε στοιχειακό άργυρο με προσθήκη αλκαλικής φορμαλδεΐδης. Αυτό κηλιδώνει τις θέσεις όπου υπάρχουν πρωτεΐνες, με χρώμα καφέ ως μαύρο. Η ένταση της χρώσης εξαρτάται από την πρωταρχική δομή της πρωτεΐνης.

Διαδικασία

- Μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στο gel σε 50% methanol, 5% CH₃COOH για τουλάχιστον 20 min υπό ανάδευση.
- Πλύση με 50% methanol για 10 min υπό ανάδευση.
- Ενυδάτωση με ddH₂O για 10 min υπό ανάδευση.
- Ευαισθητοποίηση του gel σε Sodium Triosulfate (Na₂S₂O₃•5H₂O) 0,02% για 1 min υπό ανάδευση.
- Πλύση με ddH₂O για 1 min υπό ανάδευση.
- Χρώση με AgNO₃ 0,1% (pre-chilled) για 20 min στους 4° C υπό ανάδευση.
- Πλύση με ddH₂O για 1 min υπό ανάδευση.
- Εμφάνιση με το διάλυμα εμφάνισης εμφάνισης (Na₂CO₃ 2%, 0,04% φορμαλδεΐδη) υπό ανακίνηση και τερματισμός της αντίδρασης με 5% CH₃COOH.
- Διατήρηση σε 1% CH₃COOH.

2.7 Πρωτόκολλα ανοχοποίησης

Για την *in vitro* ανοχοποίηση έγινε απομόνωση των κυττάρων της σπλήνας τα οποία στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν με συγκέντρωση 10⁶ κύτταρα/mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, high glucose, Biosera) με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera) παρουσία hsa (human serum albumin) συγκέντρωσης 10 µg/mL. Μετά από 3 μέρες και 6 μέρες, κάθε καλλιέργεια συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε (1200 rpm, 6 min) και τα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν φυλάχθηκαν στους -20°C για την μετέπειτα ανίχνευση των sTCRαβ, sTCRγδ, sMHCI και sMHCIΙ με την τεχνική της ELISA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4. Παράλληλα τα κύτταρα κάθε καλλιέργειας επεξεργάστηκαν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιφανειακών παραγόντων CD28, CTLA-4, TCRαβ και TCRγδ.

Για την *in vivo* ανοχοποίηση έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση hsa 100 µg ανά ποντίκι και τα ζώα ευθανατώνονταν μετά από 6 μέρες και μετά από 12 μέρες (με μία ενδιάμεση επαναχορήγηση 100 µg hsa την 6η μέρα). Πριν την ευθανασία το αίμα συλλέχθηκε με καρδιακή παρακέντηση υπό αναισθησία. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και ο ορός συλλέχθηκε και φυλάχθηκε στους -20°C για την μετέπειτα ανίχνευση των sTCRαβ, sTCRγδ, sMHCI και

sMHCII με την τεχνική της ELISA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4. Μετά την ευθανασία έγινε απομόνωση της σπλήνας, τα κύτταρα της οποίας επεξεργάστηκαν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιφανειακών παραγόντων CDA, CD25, CTLA-4, TCRαβ και TCRγδ.

2.8 Ανίχνευση επιφανειακών παραγόντων σε κύτταρα σπλήνα

Η απομόνωση των σπλενοκυττάρων έγινε με μηχανικό τρόπο, με ελαφριά πίεση από λυγισμένη βελόνα ισονουλίνης και την διέλευσή τους από μία μικρή οπή που δημιουργήθηκε στην άκρη του σπλήνα, για την απελευθέρωσή τους σε διάλυμα HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco). Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε (1200 rpm, 6 min), απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και συλλέχθηκαν τα κύτταρα. Αν τα κύτταρα αυτά προορίζονταν για καλλιέργεια όλοι οι χειρισμοί γίνονταν στείρες συνθήκες. Επιπλέον, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν πρώτα σε τρυβλίο petri για 18 h, σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS στους 37°C και σε 5 % CO₂, προκειμένου να προσκολληθούν και να απομακρυνθούν τα μακροφάγα. Αν τα κύτταρα δεν προορίζονταν για καλλιέργεια, οι στείρες συνθήκες δε χρειάστηκαν, ούτε η απομάκρυνση των μακροφάγων.

Η ανίχνευση των επιφανειακών παραγόντων έγινε με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Ο ανοσοφθορισμός είναι μια διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνων ή άλλων αντισωμάτων σε ιστούς και κύτταρα. Μετά την χρώση ακολούθησε κυτταρομετρία ροής (FACScan, Becton Dickinson) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα FCS Express V3 Software (De Novo Software).

Διαδικασία

Για να αποφευχθεί η δημιουργία συμπλόκων όλοι οι χειρισμοί που ακολούθησαν έγιναν στον πάγο. Τα αντισώματα αραιώθηκαν 1 μg/mL σε PBS-BSA 1% και ήταν είτε PE-conjugated είτε FITC-conjugated.

- Τριπλή πλύση των κυττάρων με PBS (φυγοκέντρηση 1200 rpm, 6 min και απόρριψη υπερκείμενου) και προσθήκη 1 mL lysing RC Lysing RC (Ammonium chloride 0,83g, Sodium hydrogen Carbonate 0,1g, EDTA 0,032g, ddH₂O 100ml, pH 7,4) για την διάρρηξη των ερυθροκυττάρων.
- Τριπλή πλύση των κυττάρων με PBS (φυγοκέντρηση 1200 rpm, 6 min και απόρριψη υπερκείμενου) και επώασή τους με 1 mL PFA 4% για 20 min για μονιμοποίηση.
- Τριπλή πλύση των κυττάρων με PBS (φυγοκέντρηση 1200 rpm, 6 min και απόρριψη υπερκείμενου) και επώασή τους με 1 mL PBS-BSA 3% για 20 min με σκοπό τον αποκλεισμό της μη ειδική πρόσδεσης των αντισωμάτων που θα ακολουθήσουν.
- Τριπλή πλύση των κυττάρων με PBS (φυγοκέντρηση 1200 rpm, 6 min και απόρριψη υπερκείμενου) και επώασή τους με τα αντισώματα 100 μL/πηγάδι σε 96-well V bottom plate για 30 min.
- Τριπλή πλύση των κυττάρων με PBS (φυγοκέντρηση 1300 rpm, 8 min και απόρριψη υπερκείμενου) και κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση του σήματος.

2.9 Πρωτόκολλο δημιουργίας T υβριδωμάτων

2.9.1 Ανάπτυξη των κυττάρων BW5147α-β-

Η κυτταρική σειρά BW5147α-β- προέρχεται από θύμωμα και το όνομά της υποδηλώνει ότι τα κύτταρα δεν εκφράζουν τον TCRαβ.

Διαδικασία

- Ξεπάγωμα του 1 mL διαλύματος BW5147α-β- κυττάρων από τους -80°C στους 37°C.
- Στάγδην προσθήκη 9 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, high glucose, Biosera) με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera).
- Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min) και απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 5 mL DMEM 20% FBS και μεταφορά σε φλάσκα στους 37°C και σε 5 % CO₂.
- Σταδιακή μετάβαση των κυττάρων σε DMEM 10% FBS και μοίρασμα των κυττάρων της μίας φλάσκας σε δύο μόλις ο πληθυσμός αρχίζει να καταλαμβάνει τον μέγιστο δυνατό χώρο ανάπτυξης μες στην φλάσκα.

2.9.2 Απομόνωση καθαρού πληθυσμού T λεμφοκυττάρων σπλήνα

Η απομόνωση των σπλενοκυττάρων έγινε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.7, και ο σπλήνας προήλθε από in vivo ανοχοποιημένα ποντίκια όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.6. Μετά την προσκόλληση των μακροφάγων, το κυτταρικό ελαιώρημα φυγοκεντρήθηκε (1200 rpm, 6 min), απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε αρνητική επιλογή των B λεμφοκυττάρων από το σύνολο των κυττάρων με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων.

Διαδικασία

- Επώαση των κυττάρων με 2 mL anti-mouse CD45R (ImmunoTools) PBS-BSA 0.1% για 40 min στους 4°C.
- Προσθήκη 2 mL PBS, φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min) και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL PBS, μεταφορά σε tube (χωρητικότητας 5 mL) και επώαση με 30 μL Dynabeads anti-mouse IgG, M-280, Invitrogen για 30 min στους 4°C υπό ανάδευση.
- Τοποθέτηση του tube στον μαγνήτη και συλλογή του υγρού αφότου μαγνητιστούν όλα τα beads. Τα B λεμφοκύτταρα συνδέονται στα beads και έτσι στο υγρό μένουν μόνο τα T λεμφοκύτταρα.
- Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min) και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση των T κυττάρων σε DMEM 10% FBS και μεταφορά σε petri στους 37°C και σε 5 % CO₂ για 16 h.

2.9.3 Σύντηξη κυττάρων BW5147α-β- με T λεμφοκύτταρα

Η σύντηξη των T λεμφοκυττάρων με κύτταρα BW5147α-β- δημιούργησε υβριδώματα. Το καρκινικό κύτταρο BW5147α-β- προσδίδει στο υβρίδωμα την ικανότητα της άπειρης διαίρεσης, ενώ το T λεμφοκύτταρο δίνει την ικανότητα της

έκφρασης TCR $\alpha\beta$ και TCR $\gamma\delta$ ειδικού για το σύστημα ανοχοποίησης απ' το οποίο προήλθε. Επομένως, το υβρίδωμα μπορεί να διατηρηθεί επ' αόριστο σε καλλιέργεια, παράγοντας συνεχώς μεγάλο αριθμό TCR με την ίδια πάντοτε ειδικότητα.

Διαδικασία

Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες και όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα.

- Συλλογή των καλλιιεργειών των κυττάρων BW5147 α - β - και των T λεμφοκυττάρων, φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min) και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε τελικό όγκο 20 mL DMEM μετά από ένωση τους σε αναλογία 1 BW5147 α - β - : 4 T κύτταρα.
- Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min) και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Απαλό χτύπημα για ήπια ανάδευση της κυτταρικής πελλέτας και προσθήκη, με ήπιο τρόπο, 2 mL διαλύματος PEG (Polyethylene Glycol 1000, Serva) 40% σε DMEM, με ταυτόχρονη ανάδευση για 2 min. Η PEG δρα ως παράγοντας αφυδάτωσης και οδηγεί σε σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών με τυχαίο τόπο.
- Στάγδην προσθήκη 20 mL DMEM. Η διαδικασία διήρκησε τουλάχιστον 5 min.
- Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min) και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Απαλό χτύπημα για ήπια ανάδευση της κυτταρικής πελλέτας και προσθήκη 25 mL DMEM 20% FBS.
- Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε τρυβλίο και επώαση για 1-3 h στους 37°C και σε 5 % CO₂.
- Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 6 min), απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των υβριδωμάτων σε διάλυμα HAT (50x Hyroxanthine, Aminopterin, Thymidine, Sigma) 1x DMEM 10% FBS.
- Μοίρασμα σε 24-well flat bottom plate με συγκέντρωση 10⁶ κύτταρα/mL.

Η αμινοπτερίνη μπλοκάρει την de novo σύνθεση του DNA η οποία είναι απολύτως απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση. Ωστόσο, η υποξανθίνη και η θυμιδίνη παρέχουν τη δυνατότητα στο κύτταρο να αποφύγει αυτό το μπλοκάρισμα, προϋποθέτοντας όμως ότι το κύτταρο διαθέτει το κατάλληλο ένζυμο Hyroxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). Εφόσον τα T κύτταρα έχουν το ένζυμο αυτό και συντήκονται με κύτταρα BW5147 α - β -, έχουν μεταβιβάσει αυτό το χαρακτηριστικό στα υβριδοποιημένα κύτταρα. Άρα σε μέσο καλλιέργειας HAT τα υβριδοποιημένα κύτταρα επιβιώνουν, τα T λεμφοκύτταρα που δε συντήχθηκαν με κύτταρα BW5147 α - β - πεθαίνουν έτσι κι αλλιώς λόγω της φύσης τους (δηλαδή του περιορισμένου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων τους) και τέλος, τα κύτταρα BW5147 α - β - που δε συντήχθηκαν με T κύτταρα πεθαίνουν λόγω της ευαισθησίας τους στο HAT

Μετά από 2 εβδομάδες το μέσο καλλιέργειας άλλαξε σε HT 1x DMEM 10% FBS και από την 5^η εβδομάδα κι έπειτα σε σκέτο DMEM 10% FBS. Στη συνέχεια γίνεται σταδιακή επιλογή των επιθυμητών κλώνων που επιβιώνουν και αυξάνονται, και αυτοί υποκλωνοποιούνται.

Τα υπερκείμενα από κάθε πηγάδι καλλιέργειας T υβριδωμάτων συλλέγονταν ανά διαστήματα προκειμένου να ελεγχθεί η έκκριση sTCRαβ και sTCRγδ και να γίνει η επιλογή των κλώνων με την μεγαλύτερη έκφραση του υποδοχέα στο υπερκείμενό τους. Η ανίχνευση έγινε με την τεχνική της ELISA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4. Η αραιώση των δειγμάτων σε coating buffer ήταν 1:2. Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα Purified anti-mouse TCR α/β Antibody, Biolegend και Purified anti-mouse TCR γ/δ Antibody, Biolegend και ως δεύτερο το Anti-hamster IgG HRP.

2.10 Δοκιμασίες ανταγωνισμού (competition assays)

Τα υπερκείμενα από τις καλλιέργειες των T υβριδωμάτων όπου ανιχνεύονταν οι sTCRαβ και sTCRγδ, χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασής τους με τα μόρια MHC. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε αν οι sTCR του υπερκειμένου ανταγωνίζονται τα anti-MHC αντισώματα για τις θέσεις πρόσδεσης είτε σε διαλυτό μόριο MHC είτε σε διαμεμβρανικό μόριο MHC σπλενοκυττάρου. Για τις δοκιμασίες αυτές έγινε συμπύκνωση 14 mL υπερκειμένου μετά από φυγοκέντρηση (3000 rpm, 5 min, στους 4°C) με τη χρήση φίλτρου (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Nominal Molecular Weight Limit-NMWL 10,000, Millipore) στο 1 μL.

Η δοκιμασία ανταγωνισμού sTCR-αντισώματος για τις θέσεις πρόσδεσης σε sMHC μοιάζει με την τεχνική της ELISA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4, με την διαφορά ότι το δείγμα που επιστρώθηκε αυτή τη φορά ήταν τα sMHCI και sMHCIΙ σε ποσότητα 1 μg ανά 100 mL coating buffer. Επίσης, προστέθηκε ένα επιπλέον βήμα επώασης με 100 μL υπερκείμενο καλλιέργειας υβριδωμάτων αραιωμένο 1:2 σε PBS-BSA 0,1% για 1 h, πριν την επώαση με τα αντισώματα. Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα anti-mouse N22 Antibody και anti-mouse HB159 Antibody και ως δεύτερο το anti-mouse IgG HRP.

Η δοκιμασία ανταγωνισμού sTCR-αντισώματος για τις θέσεις πρόσδεσης σε διαμεμβρανικό MHCI και MHCIΙ κυττάρων σπλήνας μοιάζει με την τεχνική του ανοσοφθορισμού όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.7 με την προσθήκη ενός επιπλέον βήματος επώασης με 100 μL υπερκείμενο καλλιέργειας υβριδωμάτων αραιωμένο 1:2 σε PBS-BSA 0,1% για 1 h, πριν την επώαση με τα αντισώματα.

2.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.01. Για την αξιολόγηση της σύγκρισης μεταξύ διαφορετικών χειρισμών χρησιμοποιήθηκε το two-tailed Unpaired Student's T-test. Τιμές P value<0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

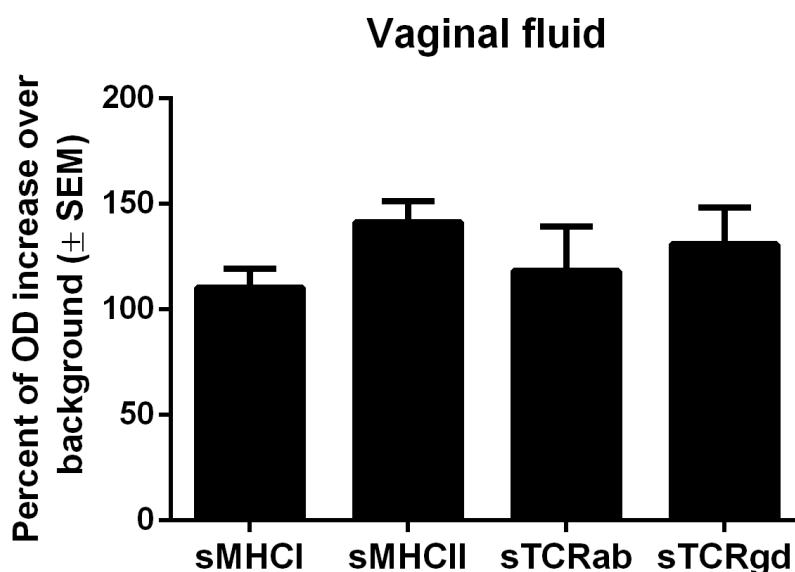
3.1 Η ανίχνευση του sTCR στα σωματικά υγρά

Με σκοπό να εντοπιστεί μία κατάλληλη πηγή που θα επιτρέψει την απομόνωση του sTCR, αρχικά έγιναν προσπάθειες ανίχνευσης του υποδοχέα στα εξής σωματικά υγρά: κολπικό υγρό, πλάσμα σπέρματος και εντερικό υγρό, με μία επιπλέον προσπάθεια ανίχνευσης στο υπερκείμενο της εντερικής καλλιέργειας.

3.1.1 Ανίχνευση του sTCR σε κολπικό υγρό

Μελέτη του παρελθόντος που αφορούσε κολπικό υγρό ποντικών τα οποία βρίσκονταν σε οίστρο, έδειξε αυξημένη έκφραση κυρίως sTCRγδ, με παράλληλη μειωμένη έκφραση των sMHC^[37]. Με βάση τη μελέτη αυτή, έγινε στροφή στην ανίχνευση των διαλυτών αυτών μορίων σε ανθρώπινα κολπικά υγρά. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κολπικά δείγματα από γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία (με έμμηνο ρύση) στη φάση της ωορρηξίας.

Τα ποσοστά των διαλυτών μορίων που βρέθηκαν με την τεχνική της ELISA στα κολπικά υγρά ήταν χαμηλά. Βέβαια, τα sMHC I και ο sTCRγδ ανιχνεύονται σε μεγαλύτερα ποσοστά (εικόνα 3.1).

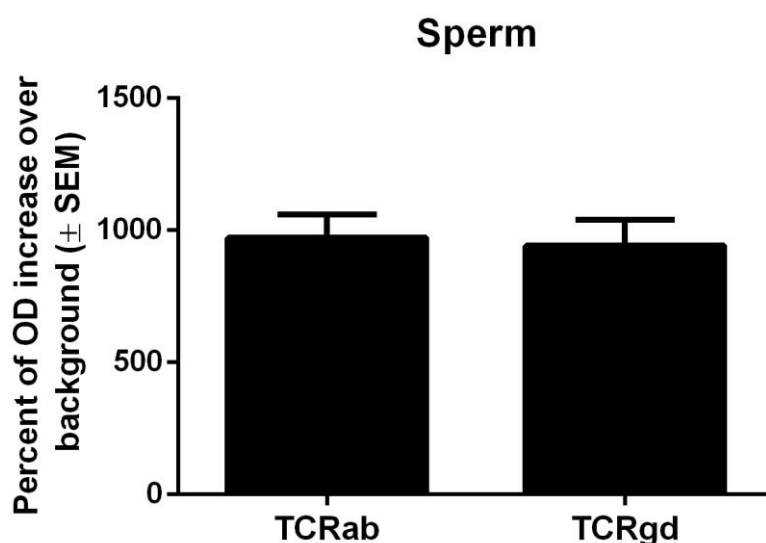


Εικόνα 3.1 Ποσοστά ανίχνευσης των sMHC I, sMHC II, sTCRab και sTCRgd σε κολπικό υγρό από γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία (με έμμηνο ρύση) στη φάση της ωορρηξίας με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 5 άτομα και εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer.

3.1.2 Ανίχνευση του sTCR στο σπέρμα

Με βάση την παλαιότερη έρευνα που προαναφέρθηκε κατά την οποία φάνηκε η ύπαρξη του sTCR και στο πλάσμα του ποντικίσκου σπέρματος^[37], ένα επόμενο βήμα αποτέλεσε την απομόνωση σπέρματος από αρσενικά ποντίκια που είχαν ελεγχθεί πρόσφατα για την γονιμοποιητική τους ικανότητα.

Στην προσπάθεια ανίχνευσης του sTCR στο σπέρμα με την τεχνική της ELISA, προέκυψε sTCRαβ ελάχιστα πιο αυξημένος από τον sTCRγδ (εικόνα 3.2).

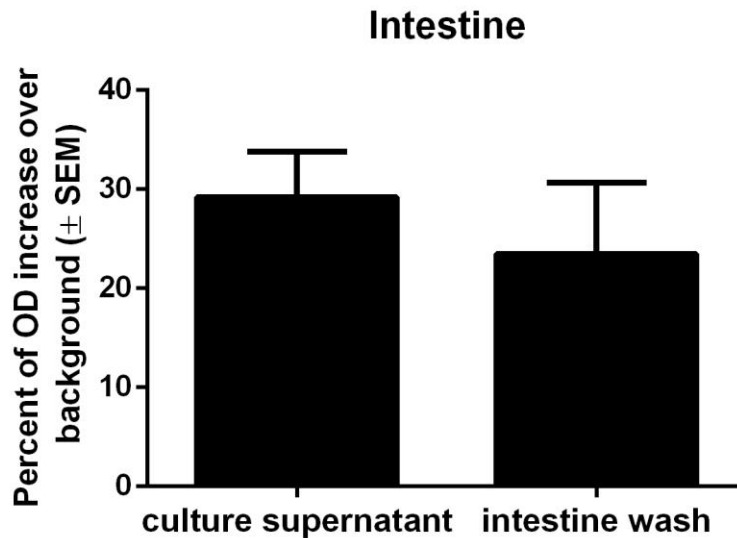


Εικόνα 3.2 Ποσοστά ανίχνευσης των sTCRab και sTCRgd με την τεχνική της ELISA, σε σπέρμα από αρσενικά ποντίκια που είχαν ελεγχθεί πρόσφατα για την γονιμοποιητική τους ικανότητα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 4 ποντίκια και εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer.

3.1.2 Ανίχνευση του sTCR στον εντερικό ιστό

Καθώς το έντερο βρίσκεται κατά έναν μεγάλο βαθμό εκτεθειμένο σε πιθανά παθογόνα, τα Τ λεμφοκύτταρα στο επιθήλιό του παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία από μολύνσεις^[46]. Λόγω του ότι πάνω από το 50% των Τ κυττάρων του εντέρου εκφράζουν τον γδ υποδοχέα^[47], έγιναν προσπάθειες ανίχνευσης της διαλυτής του μορφής στο υγρό που προέρχεται από πλύσεις λεπτού εντέρου. Επίσης, ο εντερικός ιστός διασπάστηκε σε μοναδιαία κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν για 48 h και το υπερκείμενο της καλλιέργειάς τους ελέγχθηκε για την ύπαρξη sTCRγδ.

Τα ποσοστά των διαλυτών μορίων που βρέθηκαν με την τεχνική της ELISA τόσο στο εντερικό υγρό όσο και στο υπερκείμενο από την καλλιέργεια του ιστού φαίνονται στην εικόνα 3.3. Πιο συγκεκριμένα, ο sTCRγδ ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο εντερικό υγρό απ' ότι στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

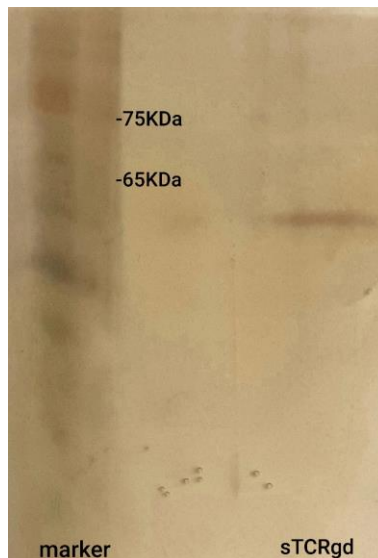


Εικόνα 3.3 Ποσοστά ανίχνευσης των sTCRgd σε υπερκείμενο καλλιέργειας λεπτού εντέρου και σε εντερικό υγρό με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 3 ποντίκια και εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer.

3.2 Απομόνωση sTCRγδ από το σπέρμα

Από τα παραπάνω σωματικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του sTCR, το σπέρμα εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές του διαλυτού υποδοχέα. Για τον λόγο αυτό έγινε εστίαση σε αυτό, και αρχικά ακολούθησαν διαδικασίες απομόνωσης του sTCRγδ από το σπέρμα με τη βοήθεια παραμαγνητικών σφαιριδίων. Στην συνέχεια η ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου sTCRγδ σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και η μετέπειτα χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο έκαναν εμφανή μία πρωτεϊνική μπάνα λίγο χαμηλότερη από 65 kDa (εικόνα 3.4). Έτσι προέκυψε το συμπέρασμα ότι ο sTCR παρέμεινε ετεροδιμερές μόριο παρόλες τις αποδιατακτικές συνθήκες που προηγήθηκαν. Είναι γνωστό ότι στον διαμεμβρανικό υποδοχέα η αλυσίδα γ έχει μοριακό βάρος 40-55kDa και η αλυσίδα δ 45kDa, οπότε αναμένονταν το ετεροδιμερές μόριο του sTCR να εμφανίσει ένα μοριακό βάρος περίπου 95kDa. Η μικρότερη τιμή του μοριακού βάρους sTCR που παρατηρήθηκε, πιθανόν να οφείλεται στην απουσία των αμινοξέων του διαμεμβρανικού και ενδοκυττάριου τμήματος, τα οποία κατά πάσα πιθανότητα δεν είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του υποδοχέα σε διαλυτή μορφή.

Το γεγονός ότι η ποσότητα του σπέρματος συνδέεται κάθε φορά με την ποιότητά του, αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα από το να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για την παραγωγή του sTCR σε σταθερά και ικανοποιητικά επίπεδα. Επομένως δεν έγιναν περαιτέρω προσπάθειες να απομονωθεί επιπλέον και ο sTCRαβ από σπέρμα.



Εικόνα 3.4 Απεικόνιση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. Αριστερά φαίνονται οι πρωτεϊνικές μπάντες του marker. Δεξιά είναι εμφανής μία μπάντα κοντά στα 65 kDa η οποία αντιστοιχεί στον απομονωμένο sTCRgd από το σπέρμα. Το δείγμα προέρχεται από ένα ποντίκι.

3.3 Ανίχνευση του sTCR σε σύστημα in vitro και in vivo ανοχοποίησης

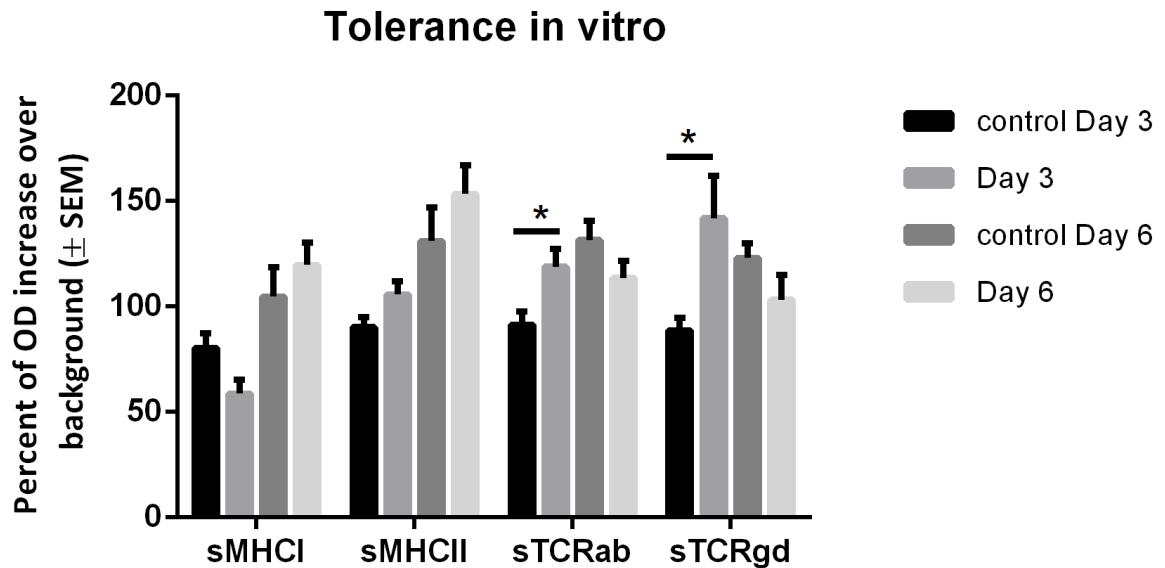
Η ανοσολογική ανοχή στον οργανισμό συντηρείται μέσω της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος. Με την υπόθεση ότι η καταστολή μπορεί να μεσολαβείται από τον sTCR, προκλήθηκε in vitro και in vivo ανοχή στο ποντίκι με αντιγόνο την hsa (human serum albumin) βάσει αποδεδειγμένου πρωτοκόλλου ανοχοποίησης^[48], για την ανίχνευση του sTCR από αυτά τα συστήματα.

3.3.1 Ανίχνευση του sTCR σε σύστημα in vitro ανοχοποίησης

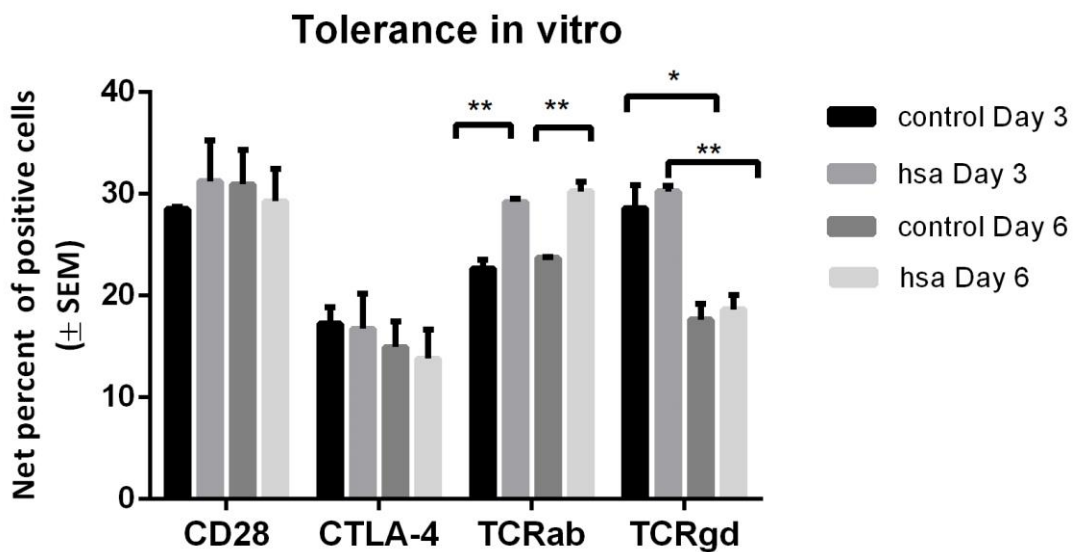
Το σύστημα της in vitro ανοχοποίησης περιελάμβανε την καλλιέργεια κυττάρων σπλήνα παρουσία hsa 10 µg/mL για ένα διάστημα 3 ημερών και 6 ημερών. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των sMHC I, sMHC II, sTCRab και sTCRgd με την τεχνική της ELISA. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (εικόνα 3.5) φαίνεται να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 27,4 ($p=0,0419$) στο sTCRab των 3 ημερών ανοχής σε σχέση με το control. Επίσης, υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 53,2 ($p=0,0251$) στο sTCRgd των 3 ημερών ανοχής σε σχέση με το control.

Τα κύτταρα από τις καλλιέργειες των 3 και 6 ημερών ανοχοποίησης απομονώθηκαν, ακολούθησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού και η μέτρησή της έντασης του με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιφανειακών παραγόντων CD28, CTLA-4, TCRab, TCRgd. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (εικόνα 3.6) φαίνεται να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 6,5 ($p=0,021$) στον TCRab των 3 ημερών ανοχής σε σχέση με το control και κατά 6,5 ($p=0,0031$) στον TCRab των 6 ημερών ανοχής σε σχέση με το control. Επίσης, παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική διαφορά 11 ($p=0,0158$) στο TCRgd μεταξύ

των control 3 ημερών και 6 ημερών. Στατιστικά σημαντική διαφορά 11,6 ($p=0,0017$) φαίνεται να υπάρχει στο TCRgd και μεταξύ των 3 και 6 ημερών ανοχής.



Εικόνα 3.5 In vitro ανοχοποίηση κυττάρων σπλήνα με hsa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για ένα διάστημα 3 ημερών και 6 ημερών. Απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης των sMHC I, sMHC II, sTCRab και sTCRgd στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 3 πειραματικές επαναλήψεις και εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer.

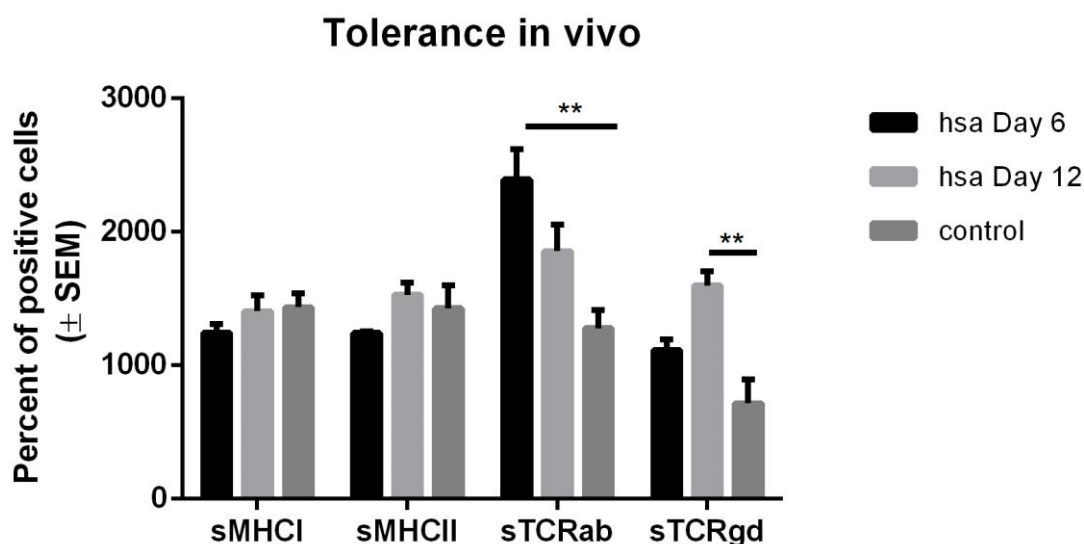


Εικόνα 3.6 In vitro ανοχοποίηση κυττάρων σπλήνα με hsa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για ένα διάστημα 3 ημερών και 6 ημερών. Μετά την απομόνωση των κυττάρων από την καλλιέργεια,

πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός και αξιολόγηση με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζονται τα ποσοστά φθορισμού των επιφανειακών παραγόντων CD28, CTLA-4, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ στα σπλενοκύτταρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 3 πειραματικές επαναλήψεις.

3.3.1 Ανίχνευση του sTCR σε σύστημα in vivo ανοχοποίησης

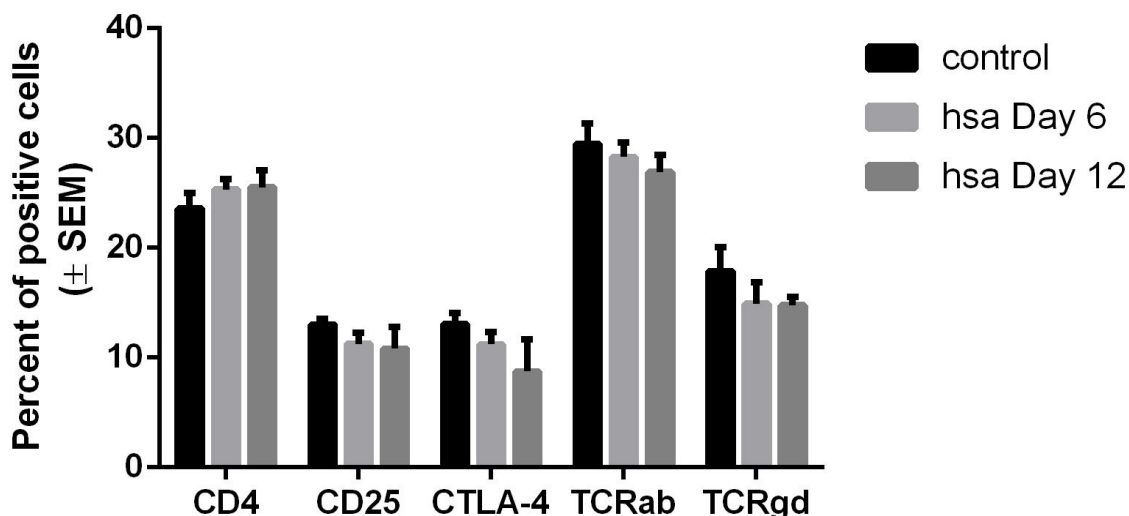
Το σύστημα της in vivo ανοχοποίησης περιελάμβανε την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση hsa 100 μg ανά ποντίκι και την ευθανασία του ζώου μετά από 6 μέρες και μετά από 12 μέρες (με μία ενδιάμεση επαναχορήγηση 100 μg hsa την 6η μέρα στη διάρκεια των 12 ημερών). Πραγματοποιήθηκε συλλογή του ορού αίματος για την ανίχνευση των sTCR $\alpha\beta$, sTCR $\gamma\delta$, sMHC I και sMHC II με την τεχνική της ELISA. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (εικόνα 3.7) φαίνεται να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 1116 ($p=0,0058$) στο sTCR $\alpha\beta$ των 6 ημερών ανοχής σε σχέση με το control, καθώς και στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 884,8 ($p=0,0027$) στο sTCR $\gamma\delta$ των 12 ημερών ανοχής σε σχέση με το control.



Εικόνα 3.7 In vivo ανοχοποίηση με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση hsa 100 μg ανά ποντίκι για ένα διάστημα 6 ημερών και 12 ημερών. Απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης των sMHC I, sMHC II, sTCR $\alpha\beta$ και sTCR $\gamma\delta$ στον ορό του αίματος με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 3 πειραματικές επαναλήψεις και εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer.

Επίσης, απομονώθηκε ο σπλήνας τα κύτταρα του οποίου επεξεργάστηκαν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιφανειακών παραγόντων CDA, CD25, CTLA-4, TCR $\alpha\beta$ και TCR $\gamma\delta$. Από τα ποσοστά που προκύπτουν (εικόνα 3.8) φαίνεται ότι οι επιφανειακοί παράγοντες των κυττάρων που προέρχονται από ανοχοποιημένα ποντίκια δεν έχουν κάποια στατιστική σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα που προέρχονται από control ποντίκια.

Tolerance in vivo



Εικόνα 3.8 In vivo ανοχοποίηση με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση hsa 100 µg ανά ποντίκι για ένα διάστημα 6 ημερών και 12 ημερών. Μετά την απομόνωση των κυττάρων του σπλήνα, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός και αξιολόγηση με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζονται τα ποσοστά φθορισμού των επιφανειακών παραγόντων CD4, CD25, CTLA-4, TCRab, TCRgd στα σπλενοκύτταρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από συνολικά 3 πειραματικές επαναλήψεις.

Τελικά, οι ποσότητες των sTCRαβ και sTCRγδ που προκύπτουν τόσο από το in vitro όσο και από το in vivo σύστημα ανοχοποίησης στο ποντίκι είναι μεν ανιχνεύσιμες, αλλά δεν είναι αρκετές γι' αυτό το οποίο επιζητείται.

3.4 Ανίχνευση του sTCR που παράγεται από T υβριδώματα

Στην προσπάθεια να βρεθεί ένας τρόπος παραγωγής του sTCR σε επιθυμητά επίπεδα, δημιουργήθηκαν υβριδώματα μέσω της σύντηξης κυττάρων της λεμφικής σειράς BW5147a-b- με T λεμφοκύτταρα από σπλήνα in vivo ανοχοποιημένου ποντικού μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση hsa 100 µg για ένα διάστημα 6 ημερών και 12 ημερών. Γνωρίζοντας ότι τα κύτταρα που προέρχονται από in vivo ανοχοποίηση εκκρίνουν ανιχνεύσιμα ποσοστά sTCR, η σύντηξή τους με καρκινικά κύτταρα προσδίδει στα πρώτα την ιδιότητα των απεριόριστων κυτταρικών διαιρέσεων. Έτσι, η καλλιέργεια υβριδωμάτων δίνει την δυνατότητα να αναπτυχθεί απεριόριστος αριθμός κυττάρων ικανών να εκκρίνουν τον sTCR στο υπερκείμενο.

Τα υβριδώματα που δημιουργήθηκαν με τον παραπάνω τρόπο, καλλιεργήθηκαν με σκοπό την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό των κλώνων εκείνων που εκκρίνουν τον sTCR σε μεγαλύτερο βαθμό. Στην εικόνα 3.9 απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης sTCRab και sTCRgd στο υπερκείμενο της καλλιέργειας υβριδωμάτων (hsa 6 ημέρες) ανά τετράδα πηγαδιών με το πέρασμα των εβδομάδων. Ως αρχή της πρώτης εβδομάδας θεωρείται η ημέρα που

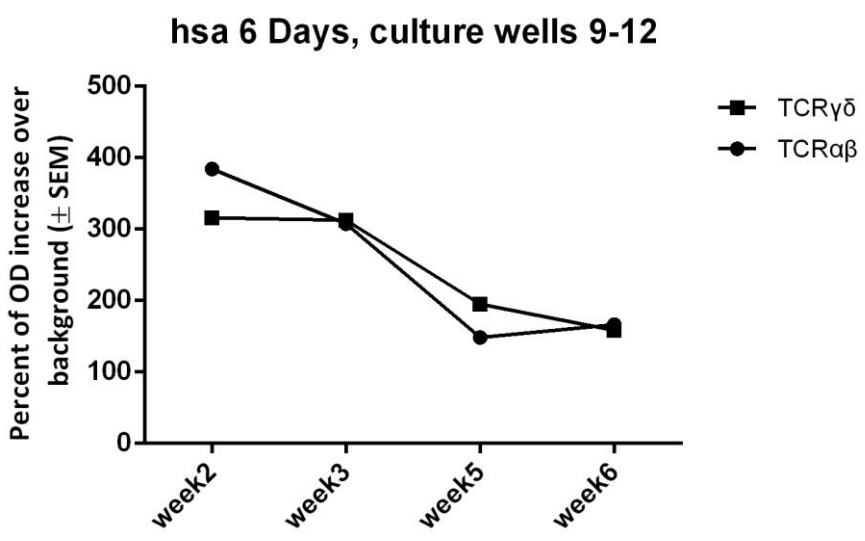
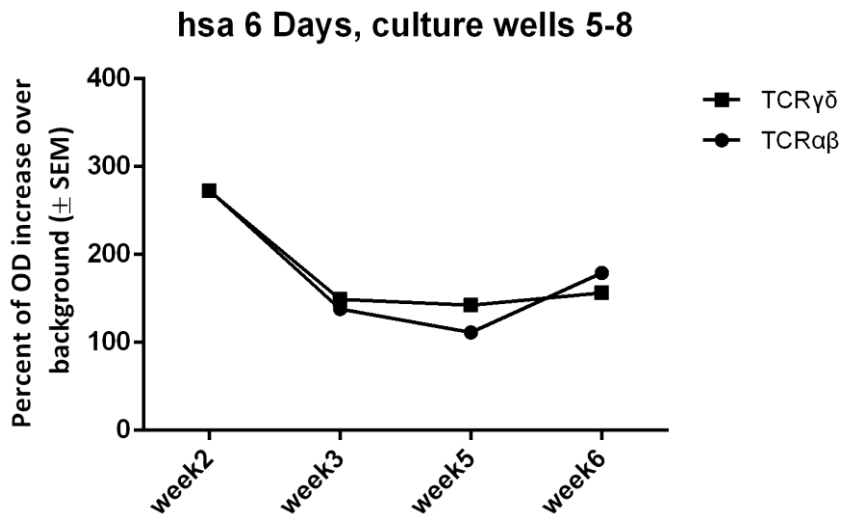
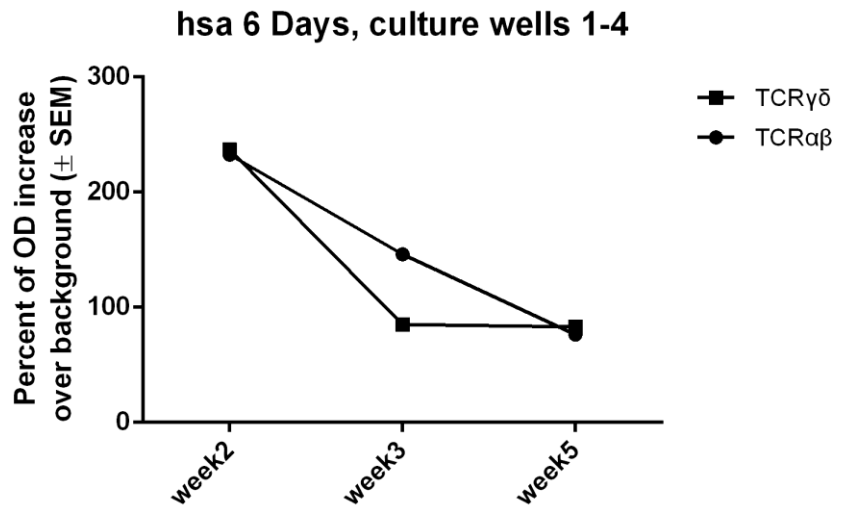
πραγματοποιήθηκε η σύντηξη. Η ανίχνευση έγινε με την τεχνική της ELISA και τα ποσοστά εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer. Στα πηγάδια 1-4 παρατηρείται αρχικά μείωση των sTCRab και sTCRgd, με τον sTCRgd να σταθεροποιείται σε ένα χαμηλό ποσοστό στις 3-5 εβδομάδες και τον sTCRab να παρουσιάζει συνεχόμενη μείωση από την 1^η ως την 5^η εβδομάδα. Στα πηγάδια 5-8 παρατηρείται μείωση των sTCRab και sTCRgd τις πρώτες εβδομάδες, η οποία σταθεροποιείται για τον sTCRgd στις 3-5 εβδομάδες και στην συνέχεια παρουσιάζει αύξηση και για τα δύο μόρια ως την 6^η εβδομάδα. Στα πηγάδια 9-12 παρατηρείται αρχικά μείωση των sTCRab και sTCRgd, με τον sTCRgd να σταθεροποιείται στις 5-6 εβδομάδες και τον sTCRab να παρουσιάζει αύξηση στις 5-6 εβδομάδες.

Στην εικόνα 3.10 απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης sTCRab και sTCRgd στο υπερκείμενο της καλλιέργειας υβριδωμάτων (hsa 12 ημέρες) ανά τετράδα πηγαιδίων με το πέρασμα των εβδομάδων. Στα πηγάδια 1-4 παρατηρείται αρχικά αύξηση των sTCRab και sTCRgd ως την 5^η εβδομάδα, όμως το ποσοστό μειώνεται ως την 6^η εβδομάδα. Την ίδια ακριβώς πορεία ακολουθούν και οι κλώνοι στα πηγάδια 5-8 όπου υπάρχει και πάλι αύξηση των sTCRab και sTCRgd ως την 5^η εβδομάδα, με το ποσοστό μειώνεται ως την 6^η εβδομάδα. Στα πηγάδια 9-12 ο sTCRgd ανιχνεύεται με μια συνεχώς αυξανόμενη πορεία καθόλη την διάρκεια των 6 εβδομάδων. Ενώ ο sTCab ανιχνεύεται σχετικά σταθερός τις 3 πρώτες εβδομάδες, συνεχίζει με αυξητική πορεία ως την 5^η εβδομάδα η οποία τείνει να σταθεροποιείται ως την 6^η εβδομάδα.

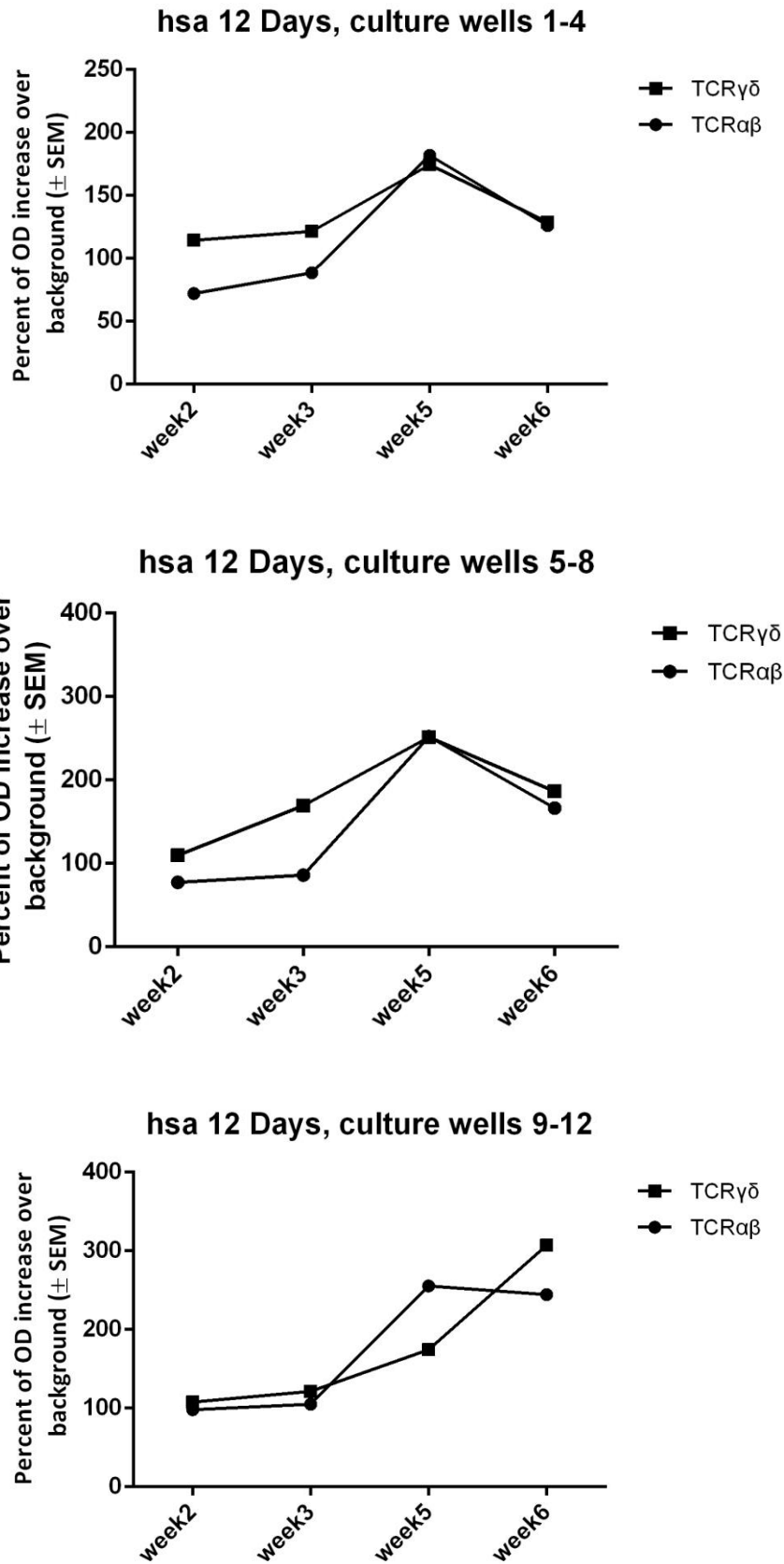
Γίνεται λοιπόν αντιληπτή μία αυξομείωση στα ποσοστά ανίχνευσης των sTCRab και sTCRgd στο υπερκείμενο της καλλιέργειας υβριδωμάτων. Είναι λογικό και αναμενόμενο στην αρχή της ανάπτυξης να πεθαίνουν τα κύτταρα και τα οποία δεν έχουν υβριδοποιηθεί και επομένως να εμφανίζεται μείωση και του προϊόντος τους, δηλαδή του sTCR. Στην συνέχεια οι κλώνοι που καταφέρνουν να επιβιώσουν, μαζί και ο sTCR που εκκρίνουν, αυξάνονται ως έναν μέγιστο βαθμό και τελικά η ανάπτυξη σταθεροποιείται σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Σε επόμενο βήμα γίνεται διαλογή κατά την οποία από τους κλώνους αυτούς επιλέγονται όσοι εκφράζουν τον επιθυμητό sTCR σε μεγαλύτερο ποσοστό. Οι κλώνοι που εξαρχής εμφανίζουν πτωτική τάση στην ανάπτυξη ή μειωμένα επίπεδα έκκρισης sTCR απορρίπτονται.

3.6 Ανίχνευση αλληλεπίδρασης του sTCR με το MHC

Η επιλογή των κλώνων που εκφράζουν το επιθυμητό προϊόν από τις καλλιέργειες των υβριδωμάτων είναι μια χρονοβόρα διαδικασία. Ωστόσο, μετά από μία πρώτη προσπάθεια επιλογής των πηγαιδίων που φάνηκαν να σταθεροποιούνται οι κλώνοι τους, συλλέχθηκε υπερκείμενο της καλλιέργειας στην οποία βρίσκονταν και συμπυκνώθηκε. Το συμπυκνωμένο αυτό υπερκείμενο, το οποίο περιέχει sTCRab και sTCRgd, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασής τους με τα μόρια MHC. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανταγωνισμού (competition assays), όπου θεωρήθηκε ότι τα μόρια sTCR θα μπορούσαν να ανταγωνίζονται τα anti-MHC αντισώματα για τις θέσεις πρόσδεσης είτε σε διαλυτό μόριο MHC είτε σε διαμεμβρανικό μόριο MHC σπλενοκυττάρου, ώστε τελικά να μειώνεται το σήμα ανίχνευσης του anti-MHC αντισώματος στην εκάστοτε δοκιμασία.



Εικόνα 3.9 Απεικόνιση των ποσοστών ανίχνευσης sTCRab και sTCRgd στο υπερκείμενο της καλλιέργειας υβριδωμάτων (hsa 6 ημέρες) ανά 4 πηγάδια με το πέρασμα των εβδομάδων.

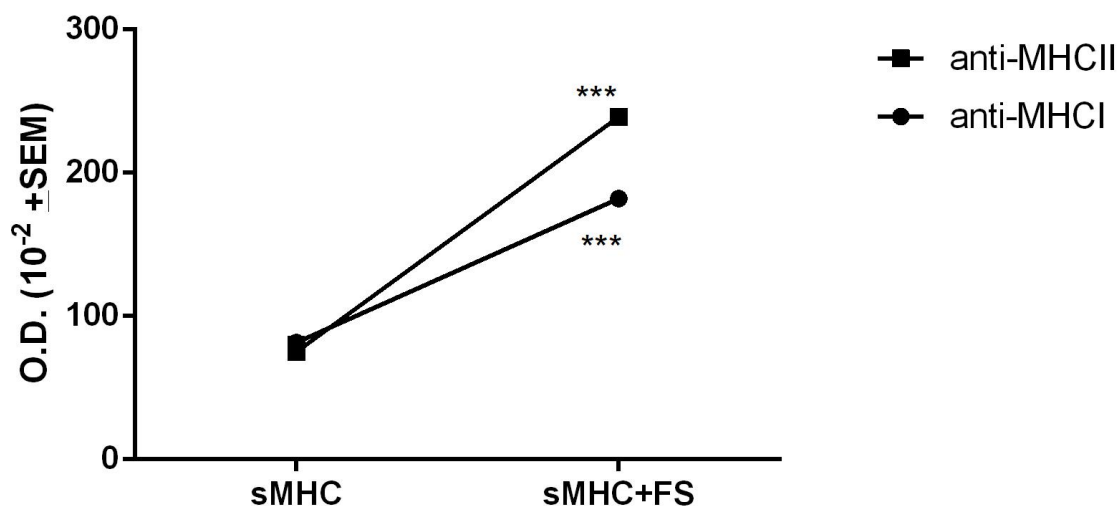


Εικόνα 3.10 Απεικόνιση των ποσοστών ανίχνευσης sTCR $\alpha\beta$ και sTCR $\gamma\delta$ στο υπερκείμενο της καλλιέργειας υβριδωμάτων (hsa 12 ημέρες) ανά 4 πηγάδια με το πέρασμα των εβδομάδων.

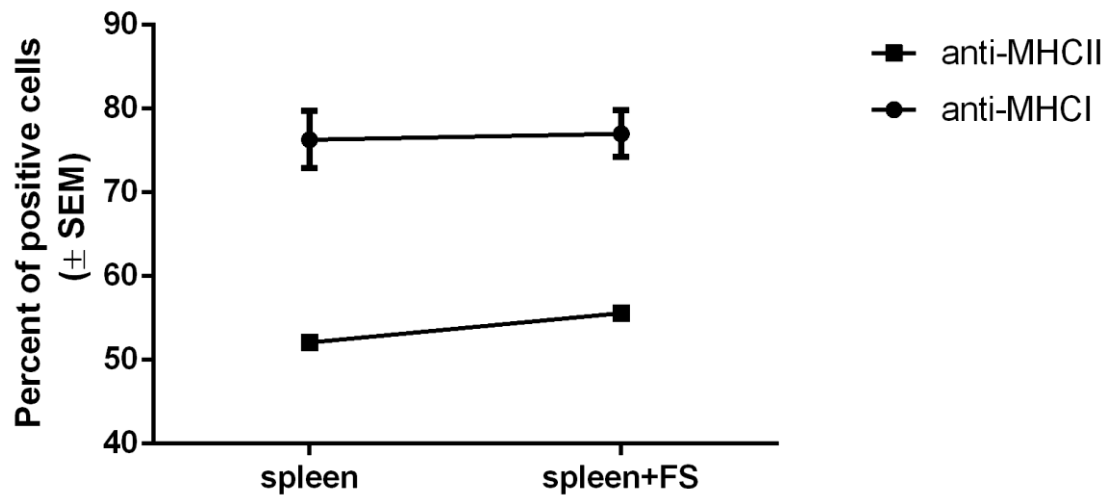
Τα αποτελέσματα της δοκιμής του ανταγωνισμού που έγιναν με sMHC I και sMHC II, δείχνουν αύξηση, και όχι την αναμενόμενη μείωση, στην ανίχνευση των anti-MHC αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα τα sMHC I όπου έγινε προσθήκη υπερκειμένου με sTCR, δείχνουν στατιστικά σημαντική αύξηση ($p=0,0006$) συγκριτικά με τα sMHC I χωρίς υπερκείμενο. Παρομοίως, τα sMHC II όπου έγινε προσθήκη υπερκειμένου με sTCR, δείχνουν στατιστικά σημαντική αύξηση ($p=0,0003$) συγκριτικά με τα sMHC II χωρίς υπερκείμενο (εικόνα 3.11).

Τα αποτελέσματα της δοκιμής του ανταγωνισμού που έγιναν με σπλενοκύτταρα τα οποία επιφανειακά εκφράζουν MHC I και MHC II, δείχνουν για ακόμη μία φορά αύξηση, και όχι την αναμενόμενη μείωση, στην ανίχνευση των anti-MHC αντισωμάτων. (εικόνα 3.12). Η αύξηση αυτή γίνεται περισσότερο αντιληπτή στα σπλενοκύτταρα τα οποία εκφράζουν MHC II σε σχέση με αυτά που εκφράζουν MHC I στην επιφάνειά τους.

Η αύξηση των anti-MHC αντισωμάτων που προκύπτει σε αντίθεση με την μείωση που αναμένονταν, πιθανόν να οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των sTCR και των sMHC μορίων που πιθανόν υπάρχουν στο υπερκείμενο της καλλιέργειας των υβριδωμάτων.



Εικόνα 3.11 Απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης των anti-MHC I και anti-MHC II αντισωμάτων κατά την δοκιμή ανταγωνισμού που έγινε με sMHC I και sMHC II. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το coating buffer.



Εικόνα 3.12 Απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης των anti-MHCI και anti-MHCII αντισωμάτων κατά την δοκιμή ανταγωνισμού που έγινε με σπλενοκύτταρα που εκφράζουν επιφανειακά MHCI και MHCII.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα από τα κυρίαρχα συστατικά της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα Τ λεμφοκύτταρα. Ο ρόλος τους περιλαμβάνει την άμεση θανάτωση των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από κάποιο παθογόνο, την ενεργοποίηση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, την παραγωγή κυτταροτοκινών και την ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Μέσω του υποδοχέα τους, τα Τ κύτταρα αλληλεπιδρούν με το MHC, τάξης I και τάξης II, και το αντιγόνο που αυτό φορτώνει, ρυθμίζοντας καταστάσεις υγείας και ασθένειας. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι τα μόρια MHC τάξης I και τάξης II, καθώς και οι υποδοχείς τους, TCRαβ και TCRγδ, αποτελούν διαμεμβρανικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Ωστόσο μια σειρά από έρευνες αποδεικνύει πλέον την ύπαρξη των μορίων αυτών και σε διαλυτή μορφή στα υγρά του σώματος.

Οι ανοσολόγοι του παρελθόντος είχαν περιγράψει ότι τα Τ κατασταλτικά κύτταρα της εποχής ήταν υπεύθυνα για την διατήρηση της ανοχής. Μεταξύ των 3T κατασταλτικών πληθυσμών, ανέφεραν ότι ο πληθυσμός Ts1 που είναι CD4⁺ εκκρίνει τον παράγοντα TsF1 ο οποίος δρα σε έναν δεύτερο πληθυσμό Ts2. Με τη σειρά του, ο Ts2 παράγει σε επόμενο χρονικό στάδιο τον παράγοντα TsF2 ο οποίος ενεργοποιεί τον πληθυσμό Ts3 που τελικά είναι αυτός που δρα κατασταλτικά. Συνδυάζοντας τις γνώσεις του τότε με τις σημερινές, δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι ο TsF1 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει τον sTCR, ενώ ο TsF2 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει το sMHC.

Το μεγάλο ενδιαφέρον που προκύπτει από την ανακάλυψη της ύπαρξης των sTCR μορίων στον οργανισμό, αποτέλεσε κινητήριο δύναμη για την εύρεση μιας κατάλληλης πηγής, όπου ο sTCR θα ανιχνεύεται σε επίπεδα τέτοια που να επιτρέπουν την απομόνωσή του σε επαρκείς και αξιοποιήσιμες ποσότητες. Για τον σκοπό αυτό έγιναν προσπάθειες ανίχνευσης στο κοιλιακό υγρό, στο σπέρμα και στο εντερικό υγρό. Παρόλο που οι sTCRab και sTCRgd ανιχνεύτηκαν σε αυτά τα σωματικά υγρά, οι ποσότητές τους δεν ήταν αρκετά υψηλές άρα δε θα μπορούσαν να αποτελέσουν καλή πηγή. Ενδιαφέρον βέβαια προκαλεί η ανάλυση του μοριακού βάρους του sTCR που απομονώθηκε από το σπέρμα. Στο πηκτωμα πολυακρυλαμίδης με αποδιατακτικές συνθήκες φαίνεται πως ο sTCR διατηρείται σε ετεροδιμερή μορφή και μάλιστα έχει μοριακό βάρος μικρότερο της αντίστοιχης διαμεμβρανικής του μορφής. Η πληροφορία αυτή δίνει στοιχεία για την δομή του sTCR από την οποία πιθανόν να απουσιάζουν το διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα.

Στο πλαίσιο της δεύτερης προσπάθειας που έγινε για την εύρεση πηγής sTCR, χρησιμοποιήθηκε ένα λειτουργικό σύστημα ανοχής κατά το οποίο εμφανίζεται καταστολή σε 2 χρονικές στιγμές. Από την *in vivo* ανοχοποίηση συμπεραίνεται ότι στην αρχή της καταστολής (ημέρα 6) αυξάνεται σημαντικά ο sTCRab, ενώ σε επόμενο χρόνο (ημέρα 12) αυξάνεται σημαντικά ο sTCRgd. Το επίπεδο κυττάρων όμως δεν άλλαξε σημαντικά από την ανοχοποίηση, πράγμα που σημαίνει ότι δεν είναι ουσιαστικά τα κύτταρα αυτά που δρουν στην καταστολή, αλλά τα προϊόντα τους όπως ακριβώς περιγράφηκε από τους ανοσολόγους του παρελθόντος. Από την *in vitro* ανοχοποίηση παρατηρείται σημαντικά αυξημένος πληθυσμός TCRab και στις δύο χρονικές στιγμές της ανοχής που με την ίδια λογική δεν σχετίζεται με στην καταστολή. Την καταστολή επιφέρουν, όπως προειπώθηκε, τα προϊόντα sTCRab και sTCRgd τα οποία ανιχνεύονται σε σημαντικά ποσοστά.

Το παραπάνω σύστημα ανοχής επιβεβαίωσε φυσικά την ύπαρξη του sTCR και έδωσε κάποιες λειτουργικές πληροφορίες, αλλά τα επίπεδα ανίχνευσης του υποδοχέα είναι χαμηλά και δεν επιτρέπουν την απομόνωση και περεταίρω μελέτη του. Η τρίτη προσπάθεια, κατά την οποία δημιουργήθηκαν T υβριδώματα από αρχικά T κύτταρα σπλήνας ανοχοποιημένου ζώου, φαίνεται πως θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή πηγή έκφρασης sTCR μορίων. Όμως η διαδικασία επιλογής των σταθερών κλώνων με δυνατότητα επιβίωσης και έκκρισης του επιθυμητού προϊόντος απαιτεί πολύ χρόνο και είναι ένα αρκετά δύσκολο εγχείρημα. Ωστόσο σε ένα πρωταρχικό βήμα που έγινε, προέκυψαν κάποια λειτουργικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, από τις δοκιμασίες ανταγωνισμού παρατηρείται ένα επαναλαμβανόμενο αποτέλεσμα αύξησης των anti-MHC αντισωμάτων. Ενώ η αρχική υπόθεση υποστήριζε ότι τα μόρια sTCR ανταγωνίζονταν τα anti-MHC αντισώματα για τις θέσεις πρόσδεσης είτε σε διαλυτό μόριο MHC είτε σε διαμεμβρανικό μόριο MHC σπλενοκυττάρου, και επομένως θα αναμένονταν μείωση των anti-MHC αντισωμάτων. Έτσι προκύπτει το συμπέρασμα ότι σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ των sTCR και των sMHC μορίων που πιθανόν υπάρχουν στο υπερκείμενο της καλλιέργειας των υβριδωμάτων. Αν ο sTCR βρίσκεται ήδη σε σύμπλοκο με το sMHC, δε μπορεί να μπει καν στη διαδικασία να ανταγωνιστεί το anti-MHC αντίσωμα. Ως σύμπλοκο όμως, μπορεί να προσδώσει επιπλέον μόρια MHC τα οποία και ανιχνεύονται. Έτσι δικαιολογείται η αύξηση των anti-MHC αντισωμάτων στο πρωτεϊνικό επίπεδο δοκιμασίας ανταγωνισμού. Επίσης, λόγω του ότι ο sTCR είναι σε θέση να αντιδράσει παράπλευρα με το CD4 ή CD8, μπορεί να προσδένεται στα κύτταρα που φέρουν αυτούς του παράγοντες και να τους προσφέρει επιπλέον μόρια MHC. Έτσι δικαιολογείται η αύξηση των anti-MHC αντισωμάτων στο κυτταρικό επίπεδο δοκιμασίας ανταγωνισμού. Μία ακόμη παρατήρηση είναι ότι το πιθανό σύμπλοκο sTCR-sMHC δε συνδέεται ισχυρά, αφού η μοναδική πρωτεϊνική μπάντα που εμφανίστηκε στην ανάλυση του sTCR απομονωμένου από το σπέρμα, δεν ξεπερνά τα 65 kDa. Αν υπήρχαν και τα δύο μόρια του συμπλόκου μες στο πήκτωμα θα είχαν εμφανιστεί διαφορετικά μοριακά βάρη. Πιθανή εξήγηση σε περίπτωση που υπάρχει το σύμπλοκο πριν την απομόνωση με σφαιρίδια, είναι ότι λόγω των ασθενών ιοντικών δυνάμεων μεταξύ των δύο, μορίων το sMHC αποσπάται κατά την έκλυση του sTCR από τα σφαιρίδια.

Η ανίχνευση του TCR σε διαλυτή μορφή ανοίγει έναν νέο δρόμο για την έρευνα που αφορά στην ανοσορρύθμιση σε ασθένειες και θεραπείες. Διαθέτοντας τις κατάλληλες ποσότητες των sTCRab και sTCRgd, θα μπορέσουμε να ερευνήσουμε τον ρόλο τους και να οδηγήσουμε την ανοσοθεραπεία προς επιλεγμένα μονοπάτια ενεργοποίησης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Edition, I. S. Immunology 7th Ed.-D. Male, J. Brostoff, D. Roth, I. Roitt (elsevier, 2006).
2. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2003). Immunology 5th edition. W. H.
3. Mak, T. W., Saunders, M. E., & Je, B. D. (2014). Primer to the Immune Response. Second Edition. AP Cell.
4. Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, 229(1), 12-26
5. Krangel, M. S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology*, 21(2), 133-139.
6. Schatz, D. G., & Swanson, P. C. (2011). V (D) J recombination: mechanisms of initiation. *Annual review of genetics*, 45, 167-202.
7. Born, W. K., Reardon, C. L., & O'Brien, R. L. (2006). The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Current opinion in immunology*, 18(1), 31-38.
8. Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y. L., & Tu, W. (2013). $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cellular & molecular immunology*, 10(1), 50-57.
9. Allison, T. J., Winter, C. C., Fournié, J. J., Bonneville, M., & Garboczi, D. N. (2001). Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature*, 411(6839), 820-824.
10. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., & Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature Reviews Immunology*, 9(12), 833-844.
11. O. Williams, H.G.M. Brady, *Trends Immunol.* 22 (2001) 107-111.
12. Sprent, J., & Kishimoto, H. (2001). The thymus and central tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1409), 609-616.
13. B. Seddon, D. Mason, *Immunol. Today* 21 (2000) 95_ 99.
14. E. Suri-Payer, A.Z. Amar, A.M. Thornton, E.M. Shevach, *J. Immunol.* 160 (1998) 1212_ 1218.
15. L.A. Stephens, D. Mason, *J. Immunol.* 165 (2000) 3105_ 3110.
16. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, *J. Immunol.* 155 (1995) 1151_ 1164.
17. H. Groux, A. O'Garra, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. De Vries, M.G. Roncarolo, *Nature* 389 (1997) 737_ 742.
18. Y. Kuniyasu, T. Takahashi, M. Itoh, J. Shimizu, G. Toda, S.Sakaguchi, *Int. Immunol.* 12 (2000) 1145_ 1155.
19. L.A. Stephens, C. Mottet, D. Mason, F. Powrie, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 1247_ 1254.
20. D. Dieckmann, H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 1303_ 1310.
21. A.M. Thornton, E.M. Shevach, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 287_ 296.
22. M. Papiernik, M.L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, C. Penit, *Int. Immunol.* 10 (1998) 5317_ 5321.
23. S. Read, V. Malmstrom, F. Powrie, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 295_ 302.

24. Z.X. Zhang, L. Yang, K.J. Young, B. DuTemple, L. Zhang, *Nat Med.* 6 (2000) 782_ 789.
25. G.L. Asherson, V. Colizzi, M. Zembala, *Annu. Rev. Immunol.* 4 (1986) 37_ 68.
26. M. Taniguchi, I. Takei, T. Tada, *Nature* 283 (1980) 227_ 228.
27. J.W. Murphy, R.L. Mosley, *J. Immunol.* 134 (1985) 577_ 584 M.-S. Sy, M.H. Dietz, R.N. Germain, B. Benacerraf, M.I.
28. Greene, J. *Exp. Med.* 151 (1980) 1183_ 1195.
29. S. Jayaraman, C.J. Bellone, *Cell. Immunol.* 101 (1986) 72_ 81.
30. M.S. Sy, A. Nisonoff, R.N. Germain, B. Benacerraf, M.I. Green, *J. Exp. Med.* 153 (1981) 1415_ 1425.
31. G.L. Asherson, V. Colizzi, M. Zembala, *Annu. Rev. Immunol.* 4 (1986) 37_ 68.
32. M.E. Sunday, B. Benacerraf, M.E. Dorf, *J. Exp. Med.* 153 (1981) 811_ 822.
33. K. Okuda, M. Minami, S.T. Ju, M.E. Dorf, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 78 (1981) 4557_ 4561.
34. Athanassakis, I., & Vassiliadis, S. (2002). T-regulatory cells: are we re-discovering T suppressors?. *Immunology letters*, 84(3), 179-183.
35. Sommer S. 2005 The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* 2005, 2: 16. doi: 10.1186/1742-9994-2-16
36. Piertney SB, Oliver MK. 2006 The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 2006, 96: 7–21.
37. Mytilinaiou I, Sarganaki K, Sachouli E, Tsagdi S, Vardaki K, Vassiliadis A, Athanassakis I. Immune molecules in the female reproductive path and sperm: relevance to mate choice. *Reproduction* 2019, 158: 159-167. doi: 10.1530/REP-19-0084
38. R. Sumimoto, N. Kamada, *Transplantation* 50 (1990) 678_ 682.
39. C.M. Weyand, M. Jendro, J.J. Goronzy, *Autoimmunity* 8 (1991) 281_ 287.
40. M. Jendro, J.J. Goronzy, C.M. Weyand, *Autoimmunity* 8 (1991) 289_ 296.
41. M. Ott, C. Seidl, U. Westhoff, K. Stecker, E. Seifried, P.A. Fischer, H. Grosse-Wilde, *Tissue Antigens* 51 (1998) 301_ 304.
42. Lewis, R. E., & Robert, E. (2003). *Atlas of immunology*. Taylor & Francis.
43. Bakela, K., & Athanassakis, I. (2018). Soluble major histocompatibility complex molecules in immune regulation: highlighting class II antigens. *Immunology*, 153(3), 315-324.
44. Bakela K, Kountourakis N, Aivaliotis M., Athanassakis I. Soluble MHC-II proteins promote suppressive activity in CD4+ T-cells. *Immunology*, 2015, 144: 158-69.
45. Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ Jr. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer.
46. Ma, H., Tao, W., & Zhu, S. (2019). T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cellular & molecular immunology*, 16(3), 216-224.
47. Carding, S. R., & Egan, P. J. (2002). $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews immunology*, 2(5), 336-345.
48. Vevis, K., Matheakakis, A., Kyvelidou, C., Bakela, K., & Athanassakis, I. (2012). Characterization of antigen-binding and MHC class II-bearing T cells with suppressive activity in response to tolerogenic stimulus. *Immunobiology*, 217(1), 100-110.