

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήματα Βιολογίας και Ιατρικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
Μοριακής Βιολογίας - Βιοϊατρικής



UNIVERSITY OF CRETE
Medical School and Dept. of
Biology

Joint Graduate Program
on
Molecular Biology – Biomedicine

Αναφορά μεταπτυχιακής εργασίας
(εργαστήριο Ανοσολογίας Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας)

**Μελέτη των λειτουργικών αποκρίσεων των Τ λεμφοκυττάρων
σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ανοσολογικής ανοχής σε
ιστοειδικά εκφραζόμενο αντιγόνο στο ποντίκι.**

**Επιβλέπουσα Ερευνήτρια: Μαμαλάκη Κ.
Υπεύθυνος Καθηγητής: Παπαματθαϊάκης Ι.**

ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

Περίληψη

Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να πραγματοποιήσει μια απόκριση ενάντια σε κάποιο παθογόνο, αλλά παράλληλα να αποφύγει μια παθολογική απάντηση σε αντιγόνα του εαυτού, παραμένουν ένα θεμελιώδες ερώτημα για τους ανοσολόγους. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τη μελέτη των λειτουργικών αποκρίσεων των T λεμφοκυττάρων σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ανοσολογικής ανοχής σε ιστοειδικά εκφραζόμενο αντιγόνο στο ποντίκι. Η εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη. Στο πρώτο μέρος γίνεται η ανάλυση διαφόρων διαγονιδιακών ζώων σε ότι αφορά την έκφραση του αντιγόνου (NP) και του υποδοχέα που το αναγνωρίζει (F5) στις σειρές pNP31, pNP4.3L, pNP4.2 και F5/pNP31, F5/pNP4.3L. Στο δεύτερο μέρος εξετάζουμε το ρόλο του TNF στην ανάπτυξη ινσουλιτιδίας στο στέλεχος C57/BL10 και TNF^{-/-}, ύστερα από χορήγηση του φαρμάκου streptozotocin. Στο τρίτο μέρος ασχολούμαστε με τη δημιουργία γονιδιακών κατασκευών που περιέχουν το γονίδιο της DsRed πρωτεΐνης για την περαιτέρω δημιουργία διαγονιδιακών ζώων που θα μας επιτρέπουν να παρακολουθούμε τα T λεμφοκύτταρα και κατεπέκταση να μελετήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους αυτά λειτουργούν.

1. Εισαγωγή

Η επιβίωση ενός ατόμου, εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες, από τους οποίους ένας ιδιαίτερα σημαντικός, είναι η προστασία ενάντια σε παράσιτα και μολύνσεις. Στον οργανισμό, έχει αναπτυχθεί το ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο έχει αναλάβει αυτόν τον προστατευτικό ρόλο διακρίνοντας τα μόρια του εαυτού από εξωγενή μόρια, απομακρύνοντας επομένως καθετί ξένο.

Το ανοσοποιητικό σύστημα, προκειμένου να προσαρμόσει την ανοσολογική απόκριση σε κάθε «ξένο» εισβολέα, διαθέτει υψηλή ευελιξία και πολυπλοκότητα από όλες τις απόψεις. Συνεπώς, αποτελείται από αρκετούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και συστατικά στοιχεία, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με περίπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω διαλυτών μορίων (*επίκτητη ανοσία*) αλλά και μέσω κυτταρικής επαφής (*έμφυτη ανοσία*).

Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, διαφοροποιούνται από ένα κοινό αρχέγονο πρόδρομο, από τον οποίο προκύπτουν δύο κύριες εξελικτικές γραμμές: η **λεμφοειδής**, η οποία παράγει τα λεμφοκύτταρα και η **μυελοειδής** η οποία παράγει τα κοκκιοκύτταρα και τα μακροφάγα. Τα λευκοκύτταρα αποτελούν τη σημαντικότερη κυτταρική σειρά του ανοσοποιητικού συστήματος και διακρίνονται στα *λεμφοκύτταρα* που συμμετέχουν στην επίκτητη ανοσία και στα *μακροφάγα* τα οποία είναι υπεύθυνα για την έμφυτη ανοσία (Janeway C.2001).

Τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στο αίμα και σε ειδικά λεμφικά όργανα όπως ο θύμος, η σπλήνα και οι λεμφαδένες. Τα T κύτταρα που διαφοροποιούνται στο θύμο είναι υπεύθυνα για την κυτταρομεσολαβητική ανοσία, ενώ τα B κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται στο εμβρυϊκό σπλάχνι ή στο μυελό των οστών στα ώριμα άτομα, είναι αυτά που παράγουν αντισώματα. Τα T κύτταρα χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τους T βοηθούς (T helpers-TH) και τα T κυτταροτοξικά (T cytotoxic-Tc). Ο ρόλος των TH (CD4⁺CD8⁻) έγκειται στην ενεργοποίηση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ ο ρόλος των Tc (CD4⁻CD8⁺) έγκειται στη θανάτωση των κυττάρων στόχων (Janeway C.2001).

Η λειτουργία των κυττάρων αυτών, βασίζεται στην αναγνώριση αντιγόνων τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα με μεμβρανικούς υποδοχείς στην επιφάνεια ειδικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (**Antigen presenting cells-APC's**). Οι υποδοχείς αυτοί είναι τα λεγόμενα μόρια του κυρίου συμπλόκου ισοσυμβατότητας ή αλλιώς του μείζονος συμπλόκου ισοσυμβατότητας (ΜΣΙ), εκφράζονται στα κύτταρα όλων των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Πρωτοβρέθηκαν στα ποντίκια όπου ονομάστηκαν

H-2 αντιγόνα (histocompatibility-2 antigens). Τα αντίστοιχα ανθρώπινα μόρια ονομάζονται *HLA αντιγόνα (human-leucocyte-associated antigen)* (Alberts).

Υπάρχουν δύο κυρίαρχες τάξεις των μορίων ΜΣΙ

Οι πρωτεΐνες Τάξης I και Τάξης II του ΜΣΙ έχουν πολύ όμοιες γενικές δομές. Είναι και οι δύο διαμεμβρανικά ετεροδιμερή, των οποίων οι εξωκυτταρικές αμινοτελικές περιοχές προσδένουν το αντιγόνο για την παρουσίαση του στα Τ λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για επιφανειακά γλυκοπρωτεϊνικά μόρια των οποίων ο κύριος ρόλος έγκειται στην παρουσίαση ξένων προς τον οργανισμό πρωτεϊνών στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs-Antigen Presenting Cells). Τα μόρια αυτά συμμετέχουν τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρομεσολαβητική απόκριση ενός οργανισμού (Alberts).

Ανοχή. Μια χαρακτηριστική λειτουργική απόκριση των Τ κυττάρων.

Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να πραγματοποιήσει μια απόκριση ενάντια σε κάποιο παθογόνο, αλλά παράλληλα να αποφύγει μια παθολογική απάντηση σε αντιγόνα του εαυτού, παραμένουν ένα θεμελιώδες ερώτημα για τους ανοσολόγους.

Η **ανοχή** είναι μια φυσιολογική διαδικασία η οποία περιορίζει τα Τ και τα Β λεμφοκύτταρα και διακρίνεται σε κεντρική και περιφερική ανοχή. Οι μηχανισμοί της ανοχής έχουν σχεδιαστεί ώστε να εξαλείφονται τα αυτοδραστικά Β και Τ λεμφοκύτταρα, μια διαδικασία που για τα Τ λεμφοκύτταρα συμβαίνει στο θύμο (κεντρική ανοχή). Συγκεκριμένα, αντιγόνα του εαυτού παρουσιάζονται στα Τ λεμφοκύτταρα και εξαλείφονται οι κλώνοι εκείνοι που αναγνωρίζουν ισχυρά αντιγόνο του εαυτού. Ωστόσο, λόγω “αδυναμίας” παρουσίασης όλων των αντιγόνων εαυτού στο θύμο, κάποιοι κλώνοι λεμφοκυττάρων και εν δυνάμει αυτοδραστικοί, διαφεύγουν στην περιφέρεια. Οι κλώνοι αυτοί αποτελούν έναν “φυσιολογικό” πληθυσμό της περιφέρειας των λεμφοκυττάρων των οργανισμών και το ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί διάφορους μηχανισμούς ελέγχου και περιορισμού, προκειμένου να αποτραπούν φαινόμενα αυτοανοσίας (περιφερική ανοχή). Παρόμοιοι μηχανισμοί διαμορφώνονται και κατά την ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων.

Η ειδικότητα των αντιγονικών υποδοχέων των Β και των Τ λεμφοκυττάρων είναι το αποτέλεσμα τυχαίου ανασυνδυασμού πολλών γονιδίων μιας γενωμικής περιοχής (ανασυνδυασμός V,D,J). Θεωρητικά, μέσω της διαδικασίας αυτής μπορούν να

δημιουργηθούν 10^9 διαφορετικοί υποδοχείς των T κυττάρων (TCR's), συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αναγνωρίζουν πιθανά αυτοαντιγόνα (αυτοδραστικά T κύτταρα) (Janeway C.2001) .

Επομένως, η ανοχή (κεντρική και περιφερική) αποτελεί μια πολύ σημαντική διαδικασία που σε περιπτώσεις μειωμένης ενεργότητας μπορεί να οδηγήσει σε αυτοανοσία (Kamradt, 2001).

Κεντρική ανοχή:

Πιο αναλυτικά, ο κύριος μηχανισμός της κεντρικής ανοχής είναι η απαλοιφή των αυτοδραστικών T κυττάρων στο θύμο. Τα ανώριμα T κύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο θύμο, όπου έρχονται σε επαφή με διάφορα αντιγόνα. Τα T λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν υποδοχέα που αναγνωρίζει με χαμηλή συγγένεια το σύμπλοκο πεπτιδίου-ΚΣΙ (Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας), πεθαίνουν λόγω άγνοιας, ενώ τα κύτταρα τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια αυτοαντιγόνου-ΚΣΙ δέχονται σήμα για απόπτωση και πεθαίνουν. Τα κύτταρα εκείνα τα οποία έχουν ενδιάμεση συγγένεια πεπτιδίου-ΚΣΙ, δέχονται σήμα για θετική επιλογή, ωριμάζουν στο θύμο και στη συνέχεια μεταφέρονται στην περιφέρεια.

Περιφερική ανοχή:

Η περιφερική ανοχή λειτουργεί σύμφωνα με τους παρακάτω κύριους μηχανισμούς:

1) Άγνοια (Ignorance):

- Όταν το επίπεδο του αυτοαντιγόνου είναι κάτω από το κατώφλι ενεργοποίησης των T κυττάρων.
- Όταν υπάρχει φυσικός διαχωρισμός μεταξύ των αυτοαντιγόνων και των αυτοδραστικών T κυττάρων (πχ. αιματοεγκεφαλικός φραγμός).

2) Απαλοιφή (deletion) των T κυττάρων:

- Όταν γίνεται η αντιγονοπαρουσίαση παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αυτοαντιγόνου, με την κατάλληλη συμπληρωματική σηματοδότηση.

3) Ρύθμιση:

- Ανέργεια (Anergy): Όταν γίνεται η αντιγονοπαρουσίαση (υπάρχει αλληλεπίδραση TCR με πεπτιδίο-MHC), αλλά δεν υπάρχει σηματοδότηση από συνδιεγερτικά μόρια όπως πχ. το CD28.

- Αναστολή (Inhibition): ενεργοποιούνται κατασταλτικά μόρια τα οποία οδηγούν σε αναστολή της ενεργοποίησης των T κυττάρων όπως το CTLA-4.

- Καταστολή ή απόκλιση (Suppression or Deviation): ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs-T regulatory cells) μπορούν να αναστείλουν ή να καταστείλουν άλλα T κύτταρα μέσω της παραγωγής ανασταλτικών κυτοκινών όπως η IL-10 και ο TGF-β.

Οι βασικοί μηχανισμοί ανοχής που αναφέρθηκαν παραπάνω, εξαρτώνται σε πολλές περιπτώσεις και από το γενετικό υπόβαθρο του κάθε οργανισμού (Davidson, 2001).

Το ανοσοποιητικό σύστημα πολλές φορές δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά λόγω διαφόρων καταστάσεων που οφείλονται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έτσι λοιπόν προκύπτουν διάφορες παθολογικές καταστάσεις και αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (Type I Diabetes Mellitus)

Ο διαβήτης τύπου I είναι μια κλασική μορφή ινσουλινο-εξαρτώμενου διαβήτη. Αναπτύσσεται εξαιτίας μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και της γενετικής προδιάθεσης για την ασθένεια (Bach J.F. ,1995). Πολλές φορές θεωρείται ότι προκύπτει από μια αυτοάνοση καταστροφή των παγκρεατικών β νησιδίων, τα οποία αποτελούν τα κύτταρα παραγωγής ινσουλίνης. Με την καταστροφή τους δημιουργείται μια ανεπάρκεια τόσο στη σύνθεση όσο και στην παραγωγή της ινσουλίνης. Η αυτοάνοση καταστροφή των β νησιδίων μπορεί να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν τη διάγνωση της ασθένειας, αλλά η απώλεια των β κυττάρων πολλές φορές επιταχύνεται αρκετά γρήγορα. Η αυτοάνοση απόκριση μπορεί να οφείλεται σε πολλούς λόγους τους οποίους μπορούμε να διαχωρίσουμε περιληπτικά σε 5 κατηγορίες (Anderson, 2000):

A. Σε **μόλυνση** η οποία δεν έχει εντοπιστεί. Στην περίπτωση αυτή το ανοσοποιητικό σύστημα κατευθύνεται ενάντια σε ξένο παθογόνο, καταστρέφοντας παράλληλα το προσβεβλημένο όργανο.

B. **Μοριακός μιμητισμός**. Ορισμένα αντιγόνα στην επιφάνεια των β κυττάρων μπορούν να αναγνωριστούν από αντισώματα τα οποία δρουν ενάντια σε ξένα αντιγόνα (π.χ. αντισώματα ενάντια στον ιό Coxsackie B μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες των β κυττάρων όπως οι GAD).

Γ. Ανεξέλεγκτος **κυτταρικός θάνατος**. Μπορεί να προκληθεί από μη τοξικούς παράγοντες ή από μεταλλαγές σε ένα από τα πολλά γονίδια που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα.

Δ. **Ελαττωματική ρύθμιση** της ανοσολογικής απόκρισης, γεγονός που μπορεί να αλλάξει το κανονικό πρότυπο παραγωγής κυτοκινών και αντισωμάτων του ιστού.

Ε. Η **ανοσολογική απόκριση** μπορεί να είναι η συνέπεια και όχι η αιτία πρόκλησης κυτταρικής βλάβης. Παρόλο που μπορεί να υπάρχουν αυτοαντισώματα δεν παίζουν κανένα ρόλο στην παθογένεια της ασθένειας. Στην περίπτωση αυτή τα αυτοαντισώματα χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί μάρτυρες.

1.2 Κυτοκίνες

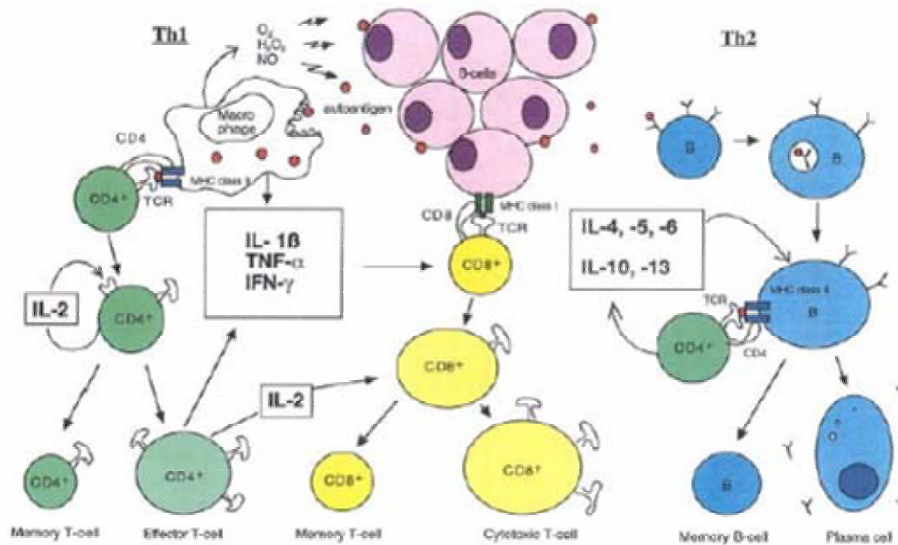
Τα διηθούμενα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παράγουν και απελευθερώνουν φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως για παράδειγμα κυτοκίνες που μπορεί να συνεισφέρουν στη δυσλειτουργία των β κυττάρων καθώς και το θάνατό τους. Οι περισσότερες κυτοκίνες δρουν τοπικά, αλλά υπάρχουν και άλλες όπως για παράδειγμα οι IL-1β, IL-6 και ο TNF-α, που έχουν γενικότερη δράση. Στα ζωικά μοντέλα του διαβήτη τύπου 1 εκφράζονται διάφορες κυτοκίνες και το πρότυπο λειτουργίας τους είναι αρκετά περίπλοκο. Μια συγκεκριμένη κυτοκίνη μπορεί είτε να ενισχύσει είτε να επηρεάσει τη δράση άλλων κυτοκινών (Thorvaldson, 2003). Επιπλέον, η δράση των κυτοκινών μπορεί να είναι εξαρτώμενη από το χρόνο και τη συγκέντρωσή τους (Christen,2001).

1.3 TH1 και TH2

Η καταστροφή των β κυττάρων στον τύπου I διαβήτη σχετίζεται με τις κυτοκίνες που παράγονται από τα T κύτταρα. Η ισορροπία μεταξύ των κυτοκινών που παράγονται από τα TH1 και TH2 λεμφοκύτταρα, θεωρείται ότι επηρεάζει την έκβαση της ασθένειας. Στον τύπου I διαβήτη μια TH1 απόκριση (παραγωγή κυτοκινών όπου κυριαρχούν οι TNF-α, IFN-γ, IL-2 και IL-12) θεωρείται ότι σχετίζεται με την ινσουλίτιδα που προκαλείται από την καταστροφή των β κυττάρων. Αντίθετα μια TH2 απόκριση σχετίζεται με μια μη καταστροφική ινσουλίτιδα και προστασία ενάντια στην καταστροφή των β κυττάρων που προκαλείται από την TH1 απόκριση (Thorvaldson, 2003) .

Η κυτοκίνη TNF-α επάγει την παραγωγή ορισμένων άλλων κυτοκινών όπως η IL1-β και η IL-6. Η έλλειψη της p55 μορφής του υποδοχέα του TNF-α, έχει δείξει ότι λειτουργεί προστατευτικά στην περίπτωση του διαβήτη στα NOD ποντίκια, αλλάζοντας την ικανότητα των T κυττάρων που αλληλεπιδρούν με τα νησίδια να επάγουν

ινσουλίτιδα και να προκαλέσουν την καταστροφή αυτών (Pakala,1999). Αναστολή του TNF-α έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη της υπεργλυκαιμίας και της ινσουλίτιδας σε ορισμένα μοντέλα διαβητικών ποντικών (Holstad 2001, Rothe 1990), ωστόσο σε κάποια άλλα έχει αναφερθεί αύξηση της παραγωγής του.



εικόνα 1 Ισορροπία TH1-TH2

Οι αυτοάνοσες διαδικασίες που σχετίζονται με το διαβήτη τύπου I και με άλλες ασθένειες, έχουν σαν αρχικό ερέθισμα ένα φλεγμονώδες γεγονός. Σε αυτή την αρχική φάση πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν διαμεσολαβητικά μόρια όπως ο TNF-α και συνήθως επάγουν παρά αναστέλλουν την έκβαση της ασθένειας. Συγκεκριμένα ο TNF-α έχει δείξει σε διάφορες περιπτώσεις ότι λειτουργεί ως ανοσορρυθμιστικό μόριο αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών καθώς και αποτρέποντας την ανάπτυξη αυτοαντιδραστικών T κυττάρων. Επομένως πρέπει να σημειώσουμε πως οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες υπάρχουν σε μια ευαίσθητη ισορροπία μέσα στον οργανισμό (Christen,2001) (εικόνα1).

1.4. TNF παράγοντας νέκρωσης όγκων

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor –TNF) είναι μία κυτοκίνη που έχει χαρακτηριστεί από το 1975 (Carswell, 1975). Ο TNF υπάρχει τόσο σε διαλυτή όσο και σε μεμβρανική μορφή και είναι βιολογικά ενεργή όταν ομοτριμερίζεται

(Jones,1989). Οι δραστηριότητες του TNF μεσολαβούνται από δύο κύριους υποδοχείς **TNFR1 (p55)** και **TNFR2 (p75)**, οι οποίοι διαφέρουν όσον αφορά την κατανομή τους στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, καθώς και στη συγγένεια τους για τον TNF (Heller, 1994). Ο TNF είναι μία πλειοτροπική κυτοκίνη με πληθώρα λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων της κυτταροτοξικότητας, της ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματος, της προστασίας από τις μολύνσεις, της ανοσορρύθμισης και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Barbara,1996/ Baxter,1996). Η ανακάλυψη όσον αφορά τον TNF, ότι δεν επάγει μόνο φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά φέρει και σημαντική ανοσοκατασταλτική δράση, άλλαξε δραστικά τα δεδομένα σε ότι αφορούσε την καθιερωμένη αντίληψη ότι οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες προάγουν τα αυτοάνοσα νοσήματα ενώ οι ρυθμιστικές τα καταστέλλουν (O Shea,2001). Μάλιστα, πιο πρόσφατες λεπτομερείς μελέτες υποδεικνύουν ότι τόσο η στιγμή όσο και η διάρκεια έκφρασης του παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του παθογενετικού έναντι του προστατευτικού ρόλου του TNF (Green,2000/Cope,1997).

Στόχος του εργαστηρίου είναι να αναπτύξει ένα ζωικό μοντέλο για τον ανθρώπινο διαβήτη, προκειμένου να μπορέσουμε, ύστερα από τις κατάλληλες πειραματικές διαδικασίες, να βρούμε στοιχεία για να αντιμετωπίσουμε αυτή την ασθένεια. Για το λόγο αυτό έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακές σειρές ζώων που εκφράζουν ένα συγκεκριμένο πεπτιδίο (NP) και ένα συγκεκριμένο TCR υποδοχέα που αναγνωρίζει το πεπτιδίο αυτό. Το NP πεπτιδίο που βλέπουν οι υποδοχείς αυτοί είναι ιστοειδικά εκφραζόμενο στο πάγκρεας. Μπορούμε έτσι και μελετάμε την ανοσολογική απόκριση των ζωικών μοντέλων που διαθέτουμε (ενθέςεις του NP γονιδίου διαφορετικές σε αριθμό στις διάφορες σειρές ποντικών), ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό, τη σύστασή τους (CD8⁺ CD4⁺), καθώς και την ιστοειδική τους έκφραση (θύμος, λεμφαδένες, πάγκρεας) και το βαθμό έκφρασης στους ιστούς αυτούς.

Για την παρακολούθηση των T λεμφοκυττάρων προχωρήσαμε στη δημιουργία μιας γονιδιακής κατασκευής (construct), η οποία θα περιέχει το γονίδιο μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη DsRed, φθορίζει στην περιοχή του κόκκινου στο φάσμα του φωτός και θα μας επιτρέψει να παρακολουθούμε τα T λεμφοκύτταρα στην κυτταρομετρία ροής, χωρίς να τα βάψουμε με ειδικά αντισώματα που φέρουν άλλες χρωστικές, γιατί θα εκφράζουν ενδογενώς αυτή που εμείς θα τους προσθέσουμε.

DsRed:

Η πρωτεΐνη DsRed express, είναι μια παραλλαγή της πρωτεΐνης των *Discosoma* sp. και φθορίζει στο κόκκινο. Περιέχει 9 αμινοξικές αλλαγές, οι οποίες μειώνουν

δραστικά το χρόνο από την επιμόλυνση μέχρι τον εντοπισμό του κόκκινου φθορισμού και μειώνουν επίσης την εκπομπή πράσινου φθορισμού (Gross et al,2000) (Baird,2000).

Όταν η DsRed express εκφράζεται σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών, τα κύτταρα που εκπέμπουν κόκκινο φως μπορούν να εντοπιστούν μέσα σε 8-12 ώρες με μικροσκόπιο φθορισμού είτε με FACS. Ο μέγιστος φθορισμός συνήθως αποκτάται μέσα σε 24-30 ώρες.

➤ **Εφαρμογές:**

Λόγω της ιδιότητας της αυτής, να φθορίζει αρκετά γρήγορα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μάρτυρας προκειμένου να εκτιμήσουμε την αποδοτικότητα των επιμολύνσεων που κάνουμε, καθώς επίσης και σαν μάρτυρας για να εντοπίσουμε την ενεργοποίηση της δραστηριότητας των υποκινητών. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την EGFP ή την HcRed, για να παρακολουθήσουμε την γονιδιακή έκφραση από διαφορετικούς υποκινητές.

χαρακτηριστικά	DsRed-Express
Μέγιστο διέγερσης(nm)	557
Μέγιστο εκπομπής (nm)	579
Ένταση	17100
Χρόνος εντοπισμού	8-12ώρες
Τριτοταγής δομή	Τετραμερές
Εφαρμογές μαζί με άλλες χρωστικές :	
Μικροσκοπία φθορισμού	++
Κυτταρομετρία ροής	++
	(μπορεί να διεγερθεί με laser στα 488nm)

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες γενικότερα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την GFP, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για in vivo απεικόνιση (imaging). Ένα μειονέκτημα της GFP είναι ότι το μήκος εκπομπής της είναι αρκετά χαμηλό, ώστε να επικαλύπτεται με τον κυτταρικό αυτοφθορισμό. Αυτός είναι ένας λόγος για τον οποίο αναζητήθηκαν νέες πρωτεΐνες με παρόμοιες ιδιότητες, όπως η DsRed που χρησιμοποιούμε εμείς. Οι

φθορίζουσες πρωτεΐνες δεν χρειάζονται συμπράγοντες, ούτε άλλες χημικές τροποποιήσεις πριν την απεικόνιση. Έτσι λοιπόν μπορούμε να παρακολουθήσουμε την αύξηση ενός όγκου, τη δημιουργία μετάστασης, καθώς επίσης και έκφραση διαφόρων γονιδίων με τη χρήση των πρωτεϊνών αυτών (Ntziachristos,2002).

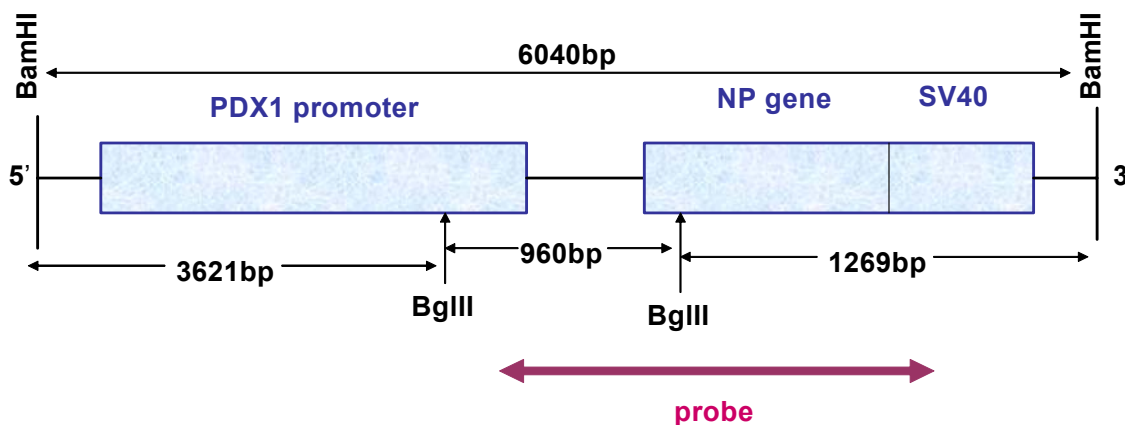
Αντικείμενο μελέτης

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τη μελέτη των λειτουργικών αποκρίσεων των Τ λεμφοκυττάρων σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ανοσολογικής ανοχής σε ιστοειδικά εκφραζόμενο αντιγόνο στο ποντίκι. Η εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη. Στο πρώτο μέρος γίνεται η ανάλυση διαφόρων διαγονιδιακών ζώων σε ότι αφορά την έκφραση του αντιγόνου (NP) και του υποδοχέα που το αναγνωρίζει (F5) στις σειρές pNP31, pNP4.3L, pNP4.2 και F5/pNP31, F5/pNP4.3L. Στο δεύτερο μέρος εξετάζουμε το ρόλο του TNF στην ανάπτυξη ινσουλιτίδας στο στέλεχος C57/BL10 και TNF^{-/-}, ύστερα από χορήγηση του φαρμάκου streptozotocin. Στο τρίτο μέρος ασχολούμαστε με τη δημιουργία γονιδιακών κατασκευών που περιέχουν το γονίδιο της DsRed για την περαιτέρω δημιουργία διαγονιδιακών ζώων που θα μας επιτρέπουν να παρακολουθούμε τα Τ λεμφοκύτταρα και κατεπέκταση να μελετήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους αυτά λειτουργούν.

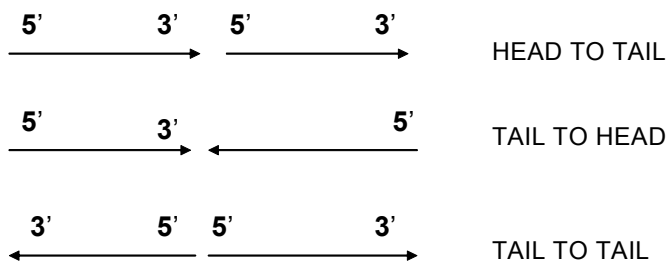
2. Υλικά και μέθοδοι

Ποντίκια : Τα ποντίκια που διαθέτουμε είναι Α) αυτά που εκφράζουν τον TCR υποδοχέα από έναν κυτταροτοξικό κλώνο (F5), ο οποίος αναγνωρίζει ένα πεπτιδίο από μια νουκλεοπρωτεΐνη A/NT/60/68 NP του ιού της γρίπης (NP→ 366-374). Ο υποδοχέας F5 χρησιμοποιεί τις Va4 και Vβ11 μεταβλητές περιοχές των α και β αλυσίδων. Η πλειονότητα των CD8⁺ T κυττάρων από τα διαγονιδιακά ζώα, εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό και αναγνωρίζουν το αντιγόνο μαζί με το αντίστοιχο μόριο ιστοσυμβατότητας I. Είναι λοιπόν MHC I περιορισμένα (Mamalaki, 1992). Β) διαγονιδιακά για τον NP επίτοπο, Γ) Knockout για τον TNF (Pasparakis G. 1995), Δ) knockout για την ρεκομπινάση 1 (Rag1) ώστε να μη φέρουν καθόλου λεμφοκύτταρα (Spanoroulou E.1994) και οι διασταυρώσεις αυτών (Αν διασταυρωθούν με F5 ποντίκια (F5/Rag1-/-) έχουν μόνο CD8 T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν όλα τον F5 υποδοχέα) και Ε) C57BL/10 ζώα αγρίου τύπου (H-2^b).

Τα ζώα που είναι διαγονιδιακά για τον επίτοπο NP έχουν δημιουργηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουμε ιστοειδική έκφραση του πεπτιδίου στο πάγκρεας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε τον υποκινητή του γονιδίου **pdx-1**, ο οποίος κατευθύνει την έκφραση διαγονιδίων στα β παγκρεατικά κύτταρα.



Τρόπος ένθεσης



εικόνα 2: construct σύμφωνα με το οποίο κατασκευάστηκαν τα NP διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την NP πρωτεΐνη στο πάγκρεας. Το μέγεθος όλου του ευθέματος είναι 6040bp και έχει την ικανότητα να μπει στο γονιδίωμα σε πολλαπλά αντίγραφα και με οποιοδήποτε τρόπο .

Κυτταροκαλλιέργειες : Οι σπλήνες, οι θύμοι και οι λεμφαδένες που αφαιρούνται από τα ποντίκια, τοποθετούνται σε 1X HBSS -5% FBS, 10 mM HEPES (Gibco BRL), 2 mM L-γλουταμίνη, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco BRL) και διαχωρίζονται με κυτταρικούς διαχωριστές διαμέτρου 40 μm (Falcon). Προκειμένου να απομακρυνθούν τα ερυθροκύτταρα από τη σπλήνα ακολουθείται η διαδικασία της αιμόλυσης. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα σπληνοκύτταρα κατακρημνίζονται (cfg 1200 rpm 10min) και λύνονται με στιγμιαίο υποτονικό σοκ, προσθέτοντας 900 μl H₂O ακολουθούμενο από 100 μl 10X HBSS και 10ml 1X HBSS -5% FBS, 10 mM HEPES ανά σπλήνα.

Σήμανση με CFSE και μεταφορά κυττάρων (adoptive transfer): Για τη σήμανση με CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester), τα κύτταρα επαναϊωρούνται σε πυκνότητα 100×10^6 /ml σε 1X PBS-HEPES, και αναμιγνύονται με ίσο όγκο 1X PBS-HEPES συγκέντρωσης 20 μM σε CFSE (Molecular Probes). Τα κύτταρα επωάζονται για ~12 min στους 37° C και η αντίδραση σήμανσης σταματά με προσθήκη παγωμένου HBSS 5% FBS και επώαση για 5 min σε πάγο. Ακολούθως τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1200rpm για 10 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Ο παραπάνω κύκλος πλυσίματος επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές με HBSS χωρίς ορρό. Πριν τη μεταφορά τα κύτταρα μετρούνται και τελικά επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο HBSS-HEPES.

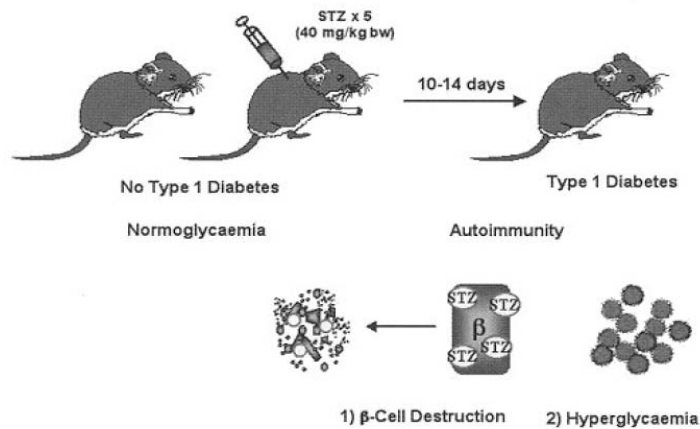
Κυτταρομετρία ροής (FACS): Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα, anti-CD8-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD3-βιοτίνη (BD Pharmigen) και anti-Vβ11-βιοτίνη (Serotec) με streptavidin-Red (Gibco BRL). Για την ανάλυση έκφρασης επιφανειακών μαρτύρων, 10^6 κύτταρα επωάζονται με τα κατάλληλα αντισώματα σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσεων (1X PBS, 1% BSA, 0.02% NaN₃) για 30 min στους 4°C τα anti-CD8-PE, anti-CD4-FITC και 40 min τα anti-CD3-βιοτίνη και anti-Vβ11- βιοτίνη, πλένονται μία φορά με 1X PBS, 0.02% NaN₃. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στο FACSCalibur και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό CellQuest.

Proliferation: Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί της σπλήνας των εξεταζόμενων ζώων. Στη συνέχεια μπαίνουν σε καλλιέργεια με διάλυμα RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FCS, 10 mM HEPES, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη και 50 μ M β -μερκαπτοαιθανόλη. Τα κύτταρα αυτά επώάζονται παρουσία ή απουσία IL-2, καθώς και με διάφορες συγκεντρώσεις πεπτιδίου NP. Στη συνέχεια εξετάζεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών με τη χρήση ραδιενεργής θυμιδίνης και μέτρηση αυτής σε ειδικό μετρητή (B-Counter-BD). Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να διαπιστώσουμε το βαθμό ενεργοποίησης καθώς και τη δυνατότητα επαν-ενεργοποίηση των αυτοδραστικών F5T λεμφοκυττάρων *in vitro* +/-IL2.

Southern: Για την ταυτοποίηση κάθε πειραματόζωου που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε διαδικασία, ακολουθήθηκε η μέθοδος αυτή, σύμφωνα με την οποία ένας ραδιενεργός ικνηθέτης (probe) επώζεται με το γενετικό υλικό του κάθε ζώου. Ο ικνηθέτης αυτός αντιστοιχεί σε γονίδια του ενδιαφέροντός μας όπως το γονίδιο NP, το γονίδιο της ρεκομπινάσης και το γονίδιο του TNF. Από το αποτέλεσμα της διαδικασίας μπορούσαμε να διαχωρίσουμε τα διαγονιδιακά ζώα από τα μη διαγονιδιακά και να ελέγξουμε το γονότυπο κάθε πειραματόζωου.

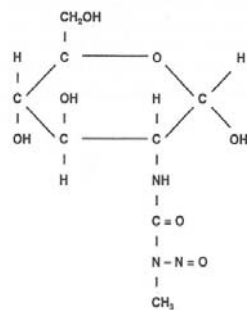
GTT (glucose tolerance test - τεστ ανοχής στη γλυκόζη): Τα πειραματόζωα έμειναν νηστικά για 12-15 ώρες. Στη συνέχεια ενέθηκε σε αυτά υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 5% σε γλυκόζη. Τα επίπεδα της γλυκόζης μετρήθηκαν σε δείγματα αίματος από την ουρά των ζώων με τη βοήθεια ενός μετρητή γλυκόζης (Ascensia ELITE-Bayer Health care) πριν την ένεση της γλυκόζης καθώς και 15, 30, 60, 120 λεπτά μετά. Ως παθολογικές τιμές στην καμπύλη αυτή θεωρούμε τιμή άνω των 300mg/dL στα 15 λεπτά και τιμή άνω των 200mg/dL να παραμένει στα 120 λεπτά. Γενικά, ως παθολογικές τιμές ορίζουμε τιμές άνω των 200mg/dL.

Streptozotocin: Σύμφωνα με τις αναφορές των Like και Rossini το 1976, πολλαπλές καθημερινές δόσεις του φαρμάκου αυτού, με ενδοπεριτοναϊκή ή ενδοφλέβια χορήγηση, προκαλούν παγκρεατική ινσουλιτίδα με καταστροφή των β κυττάρων και εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη (εικόνα 3).



εικόνα 3 σχεδιαγραμματικά τρόπος χορήγησης streptozotocin

Μία μόνο δόση του φαρμάκου σε υψηλή συγκέντρωση ($\geq 180\text{mg/kg}$) προκαλεί νέκρωση των β κυττάρων μέσα σε 4 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου και η υπεργλυκαιμία αναπτύσσεται γρήγορα. Στην αντίθετη περίπτωση όπου οι δόσεις είναι χαμηλότερης συγκέντρωσης (50mg/kg), προκαλούν μια σταδιακή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης σε διάφορες σειρές ποντικών. Το μοντέλο αυτό φαίνεται να εξαρτάται τόσο από την άμεση τοξικότητα της STZ στα β παγκρεατικά κύτταρα όσο και από αυτοάνοσα συνιστώσα μέρη.



εικόνα4 δομή streptozotocin

Το μόριο της streptozotocin διαθέτει εκτός των υπολοίπων ομάδων κι ένα κατάλοιπο γλυκόζης, το οποίο ενδέχεται να διευκολύνει την μεταφορά του από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα των β κυττάρων, μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων. Έχει μικρό χρόνο ημιζωής *in vivo* 5-15 λεπτά.

DsRed: Οι πειραματικές διαδικασίες στις οποίες προχωρήσαμε για να πραγματοποιήσουμε τη γονιδιακή κατασκευή (construct), είναι βασισμένες στα πρωτόκολλα της:

- Nucleobond High-copy Plasmid purification (pg.19-22, 03/2002) για maxipreps, και της
- QIAGEN, Quick gel extraction (pg23-24), για την απομόνωση των DNA τμημάτων από τα gel αγαρόζης.
- Οι διαδικασίες της συγκόλλησης, του μετασχηματισμού και των minipreps είναι βασισμένες στα συνήθη πρωτόκολλα.
- Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρείας Minotech.

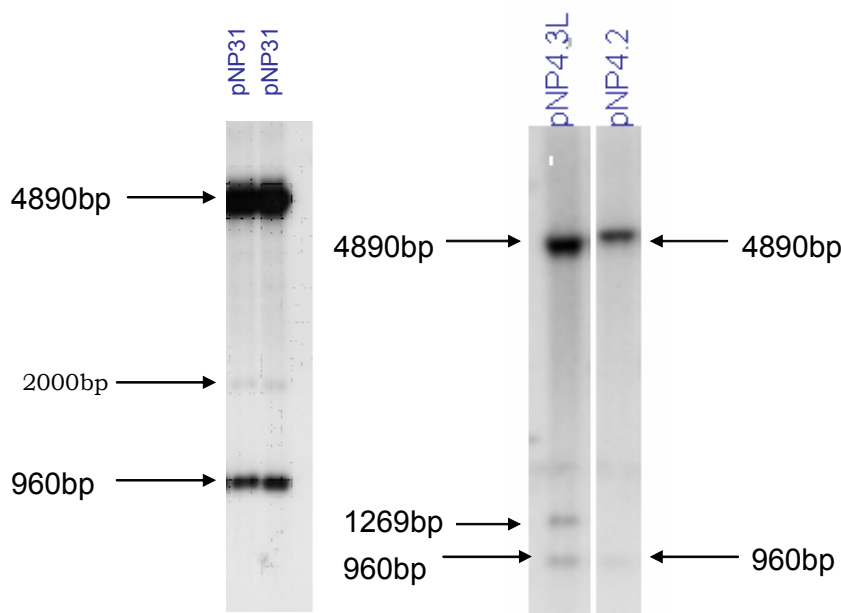
Ιστοχημεία: Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παγκρεατικών ιστών των πειραματοζώων και τη μελέτη των χαρακτηριστικών τους. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται μια σταδιακή αφυδάτωση του ιστού ώστε να φτάσει σε ένα τελικό στάδιο όπου εμβαπτίζεται σε παραφίνη. Ακολουθούν τομές του ιστού και στη συνέχεια γίνεται χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. Η αιματοξυλίνη βάφει τους πυρήνες των κυττάρων ενώ η ηωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα.

3.Αποτελέσματα

Μέρος Α

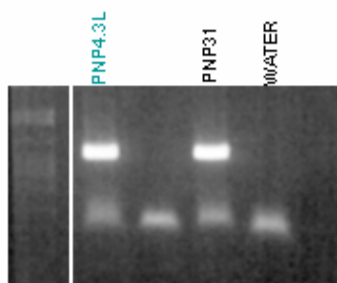
Στο πρώτο μέρος της εργασίας ασχοληθήκαμε με την ταυτοποίηση και φαινοτυπική ανάλυση των κυτταρικών υποπληθυσμών στον θύμο αδένα και τα περιφερικά λεμφικά όργανα στις διαγονιδιακές σειρές pNP31, pNP4.3L, pNP4.2 και F5/pNP31, F5/pNP4.3L και τη σύγκριση μεταξύ τους.

Οι σειρές που διαθέτουμε ταυτοποιούνται με τη μέθοδο Southern. Ενδεικτικά παρουσιάζεται το πρότυπο εμφάνισης 3 διαγονιδιακών σειρών ποντικών που έχουν το γονίδιο NP στο γονιδίωμά τους, καθώς και η έκφρασή του στο πάγκρεας (ο εντοπισμός αυτός έχει γίνει με τη μέθοδο RT-PCR με ειδικούς primer για το NP γονίδιο).

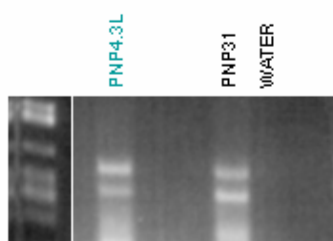


Εικόνα 5 μεγέθη μπαντών με τη μέθοδο southern στις σειρές pNP31, pNP4.3L και pNP4.2.

RT – PCR FOR INSULIN



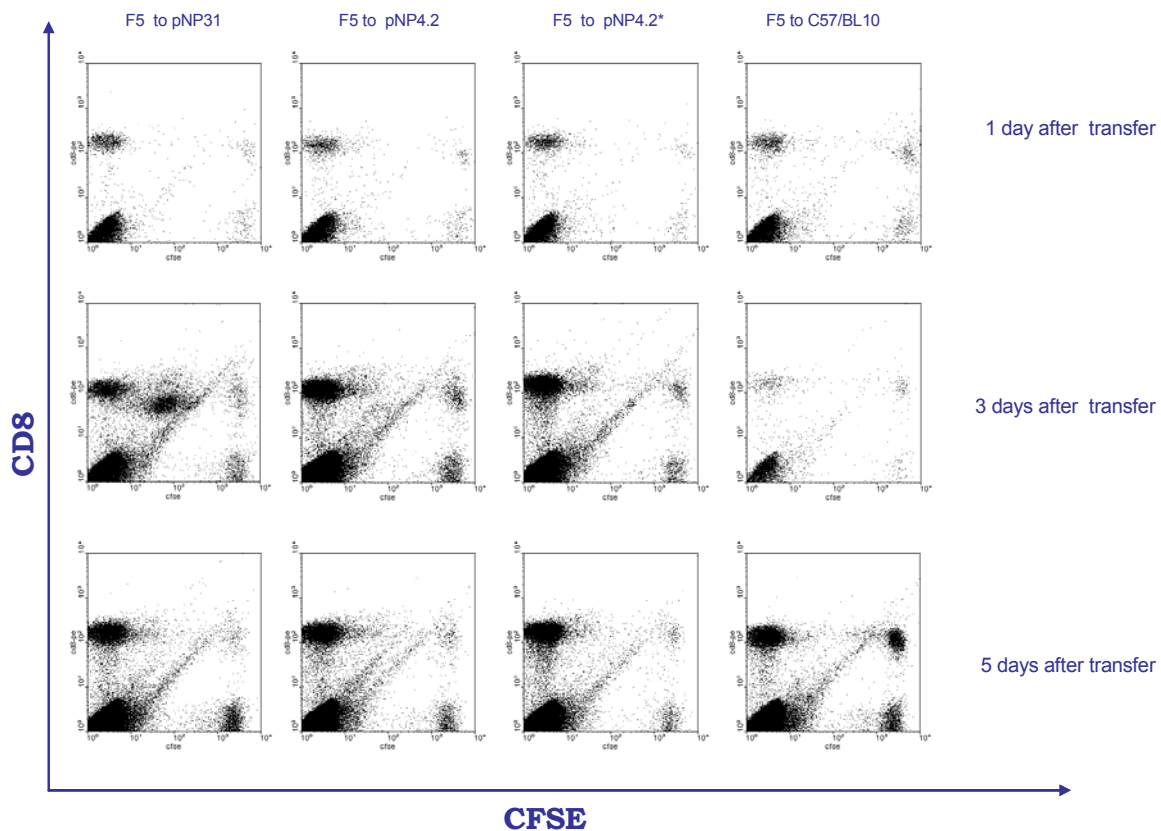
RT – PCR FOR NP



Εικόνα 6 RT-PCR για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου NP στο πάγκρεας (πραγματοποιήθηκε από τη διδακτορικό Φουστέρη Γεωργία).

➤ Για να διαπιστώσουμε κατά πόσο τα F5 κύτταρα όταν μεταφερθούν σε δέκτες που εκφράζουν το αντιγόνο, μπορούν να το δουν και να ανταποκριθούν σε αυτό, πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων παθητικής μεταφοράς.

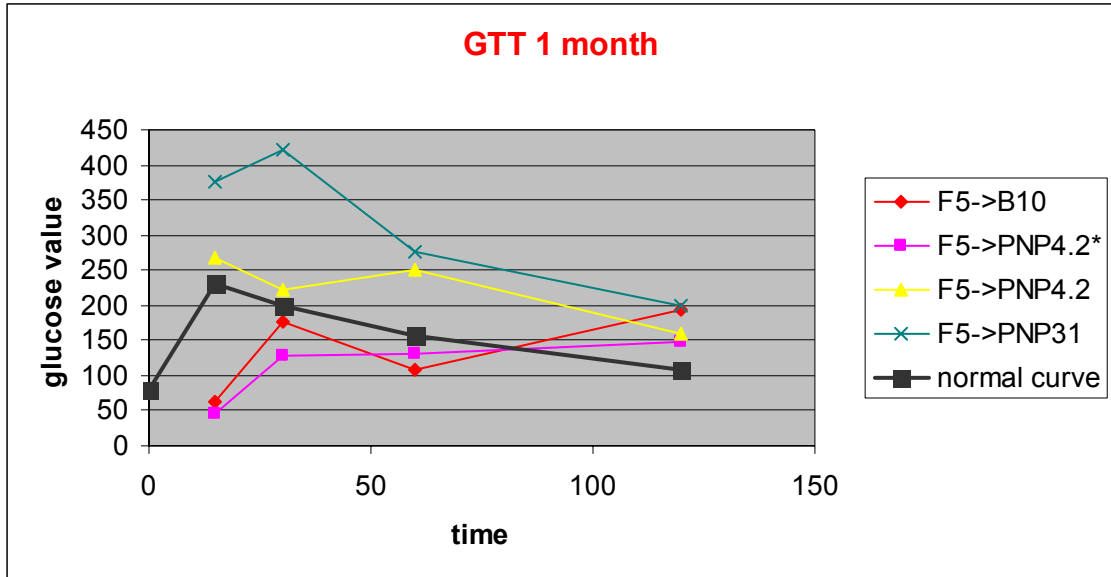
Αρχικά ξεκινήσαμε με ένα πείραμα παθητικής μεταφοράς μη ενεργοποιημένων (παίνε) κυττάρων από αρσενικούς F5 δότες τα οποία σημάνθηκαν με CFSE, σε διάφορους αρσενικούς δέκτες. Οι δέκτες αυτοί ήταν ένα C57BL/10 ζώο το οποίο δεν εκφράζει το αντιγόνο NP πουθενά, ένα ζώο της σειράς pNP31 και 2 της σειράς pNP4.2 τα οποία εκφράζουν το αντιγόνο. Από το πείραμα αυτό περιμένουμε να δούμε κατά πόσον τα F5 κύτταρα μπορούν να εντοπίσουν το αντιγόνο στους δέκτες και αν αντιδρούν σε αυτό. Αυτό το παρακολουθούμε με την τεχνολογία FACS εντοπίζοντας την φθορίζουσα χρωστική CFSE. Πράγματι παρατηρούνται κυτταρικές διαιρέσεις γεγονός που σημαίνει ότι τα F5 κύτταρα μπορούν να εντοπίσουν το αντιγόνο, να αντιδράσουν σε αυτό και να διαιρεθούν (εικόνα 7). Κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρούνται και στην περίπτωση όπου οι αποδέκτες είναι ζώα της σειράς pNP4.3L, πείραμα που έχει πραγματοποιηθεί από τη διδακτορικό Φουστέρη Γεωργία.



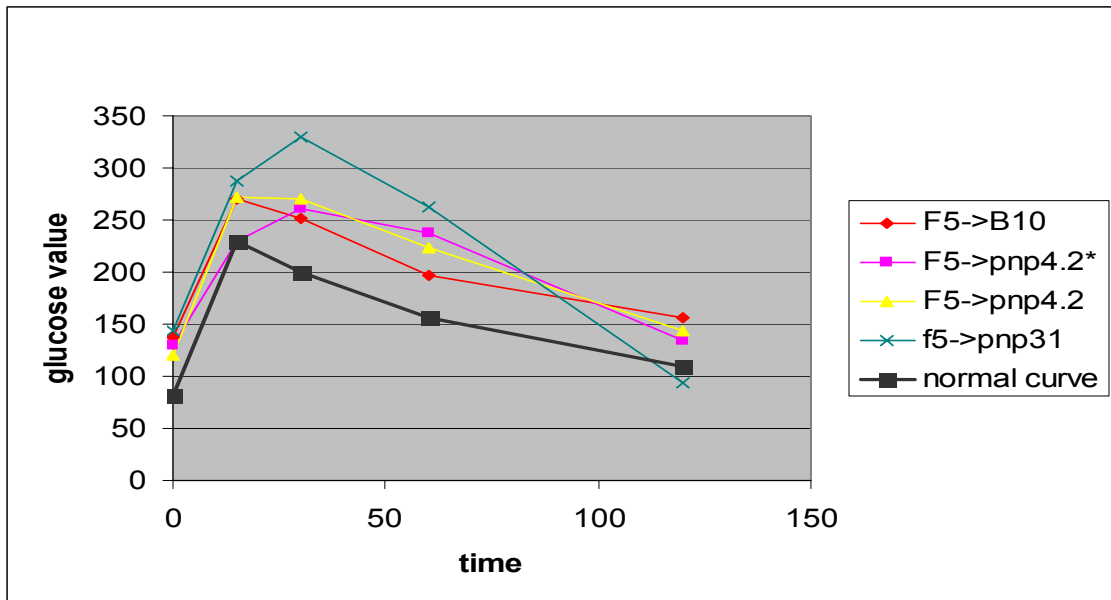
Εικόνα 7: κυτταρικές διαιρέσεις παύσε F5 κυττάρων σημασμένων με CFSE ύστερα από αιμοληψίες 1,3 και 5 ημερών.

Από την παραπάνω εικόνα διαπιστώνουμε ότι την πρώτη ημέρα μετά τη μεταφορά δεν έχει διαιρεθεί κανένας κυτταρικός πληθυσμός. Τα F5 κύτταρα που έχουν μεταφερθεί στο B10 παραμένουν αδιαίρετα ακόμα και μετά από 5 μέρες ενώ όλα τα υπόλοιπα διαιρούνται. Τα F5 που μετεφέρθηκαν στο pNP31 διαιρούνται περισσότερο από όλα και στις 5 ημέρες έχουν διαιρεθεί σχεδόν όλα.

Συνεχίζουμε να παρακολουθούμε τα ζώα αυτά σε βάθος χρόνου, με τη χρήση της τεχνικής GTT. Εφόσον τα F5 κύτταρα μπορούν να δουν το αντιγόνο, όταν αυτό εκφράζεται στο πάγκρεας, θα πραγματοποιήσουν την κυτταροτοξική τους δράση με ενδεχόμενες βλαβερές συνέπειες για τον παγκρεατικό ιστό. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται τα αποτελέσματα που πήραμε ύστερα από 1 και 2,5 μήνες μετά την παθητική κυτταρική μεταφορά.



Διάγραμμα 1: στο διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται το GTT που πραγματοποιήθηκε 1 μήνα μετά την παθητική μεταφορά κυττάρων. Με μαύρο εμφανίζεται η φυσιολογική καμπύλη του στελέχους C57/BL10 η οποία έχει προκύψει από στατιστική επεξεργασία.



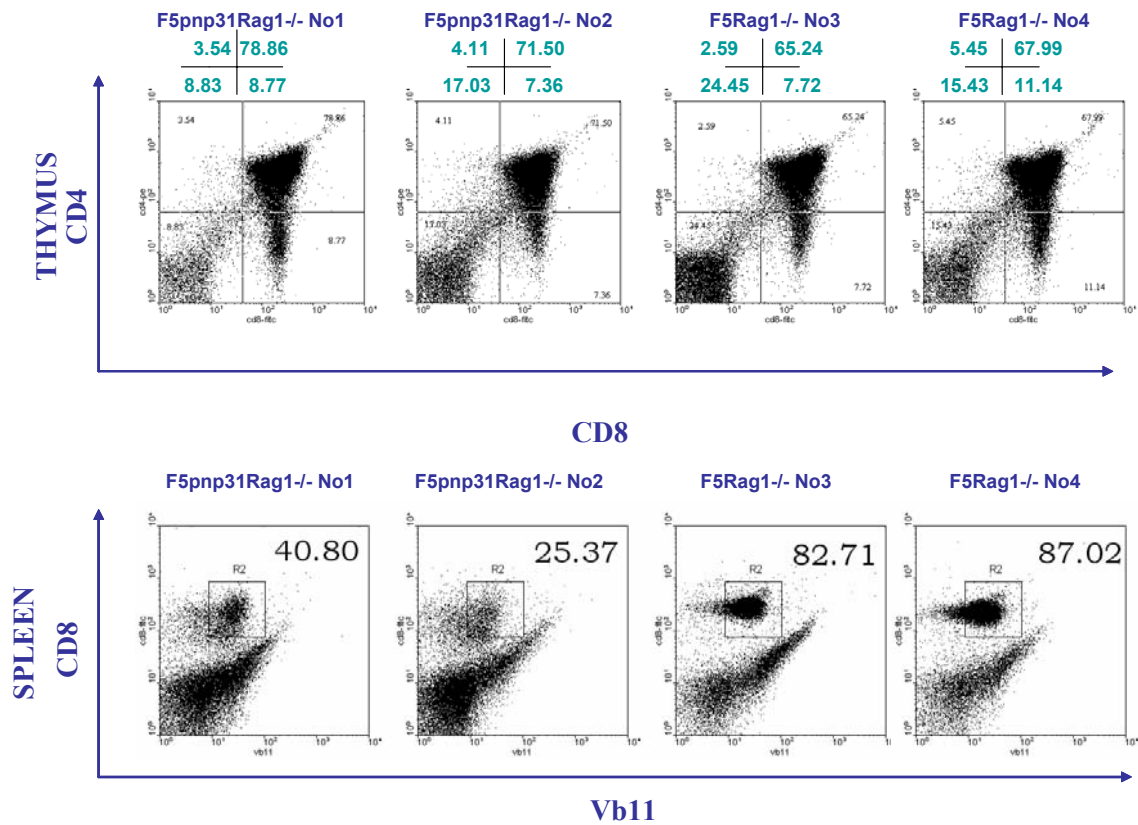
Διάγραμμα 2: στο διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται το GTT που πραγματοποιήθηκε 2,5 μήνες μετά την παθητική μεταφορά κυττάρων. Με μαύρο εμφανίζεται η φυσιολογική καμπύλη του στελέχους C57/BL10 η οποία έχει προκύψει από στατιστική επεξεργασία.

Από τα διαγράμματα 1 και 2 διαπιστώνουμε πως το pNP31 ζώο εμφανίζει παθολογική καμπύλη γλυκόζης, τόσο σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές (normal curve) όσο και σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα. Αυτό σημαίνει ότι κύτταρα τα οποία δεν είχαν έρθει ποτέ σε επαφή με το αντιγόνο, όταν το εντόπισαν ενεργοποιήθηκαν και αποκρίθηκαν σε αυτό. Μετά τους 2,5 μήνες όμως η καμπύλη του ζώου αυτού πλησίασε την φυσιολογική, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι αναπτύσσεται κάποιος μηχανισμός ανοχής. Χρειάζονται βέβαια και περαιτέρω μετρήσεις και τεστ ανοχής στη γλυκόζη στους 3 και 4 μήνες.

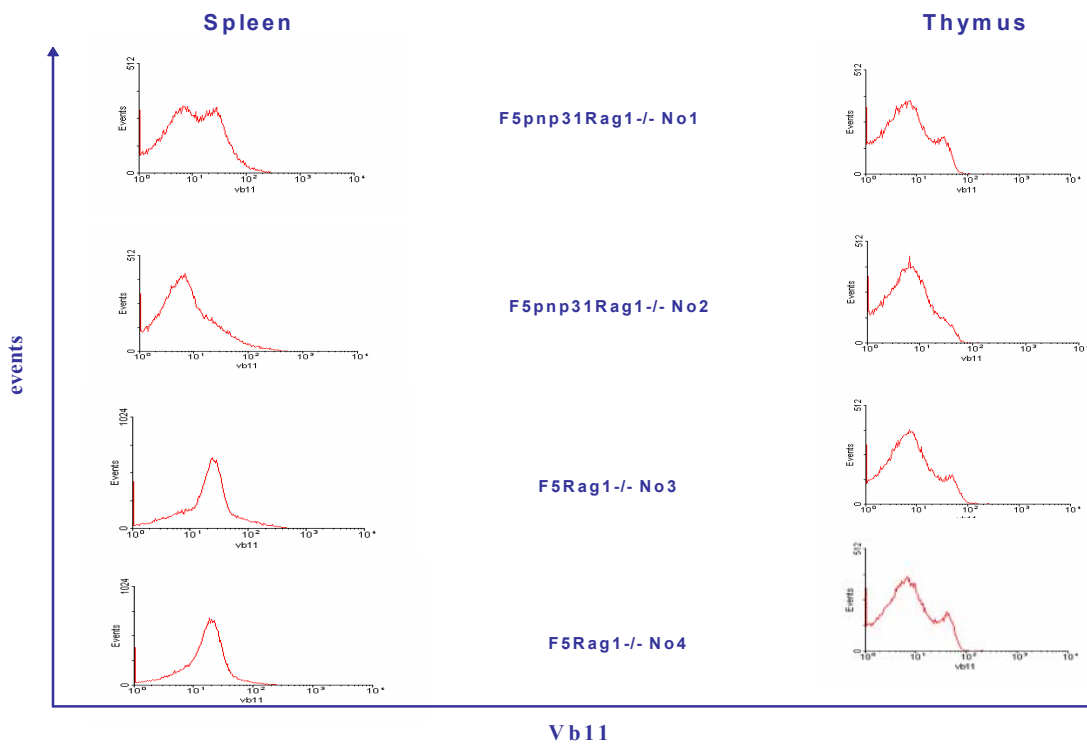
Ύστερα από RT-PCR που έγινε στα ζώα της σειράς pNP4.2, βρέθηκε ότι δεν εκφράζουν το NP γονίδιο στο πάγκρεας. Έτσι λοιπόν η σειρά αυτή των ζώων θανατώθηκε και δεν γίνονται άλλες μελέτες που να αφορούν τη σειρά αυτή.

➤ Προκειμένου να μελετήσουμε τους μηχανισμούς λειτουργίας των Τ λεμφοκυττάρων και τον τρόπο ανάπτυξης της ανοσολογικής ανοχής, προχωρήσαμε στη συγκριτική μελέτη των κυττάρων στο σπλήνα και το θύμο στα F5 και στα διπλά διαγονιδιακά ζώα (F5pnp31-εκφράζουν ταυτόχρονα και τον υποδοχέα F5 και το αντιγόνο που αυτός αναγνωρίζει NP) τα οποία βρίσκονται όλα σε Rag1-/- γενετικό υπόβαθρο. Στο Rag1-/- γενετικό υπόβαθρο δεν υπάρχουν καθόλου λεμφοκύτταρα και τα μόνα κύτταρα που υπάρχουν είναι τα F5 που εμείς εκφράζουμε διαγονιδιακά. Με τον τρόπο αυτό εξειδικεύουμε περισσότερο την αναγνώριση υποδοχέα/αντιγόνο, και αποφεύγουμε τυχόν σφάλματα στα αποτελέσματά μας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνοπτικά τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα.

No	gender	genotype	age	σπλήνας		θύμος	
				total (M)	total CD8VB11 (M)	total (M)	total CD8 (M)
1	female	F5pnp31Rag1-/-	3,5mo	39,6	*40,80% = 16	256,25	*8,77% = 22,5
2	male	F5pnp31Rag1-/-	3,5mo	21,5	*25,37% = 5,5	107,5	*7,36% = 8
3	male	F5Rag1-/-	3,5mo	29	*82,71% = 24	210,65	*7,72% = 16,3
4	male	F5Rag1-/-	3,5mo	30	*87,02% = 26	139,5	*11,14% = 15,5



εικόνα 8: φαινοτυπική ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών θυμικών και σπληνικών κυττάρων στα *F5pnp31Rag1-/-* και *F5Rag1-/-* διαγονιδιακά ζώα.

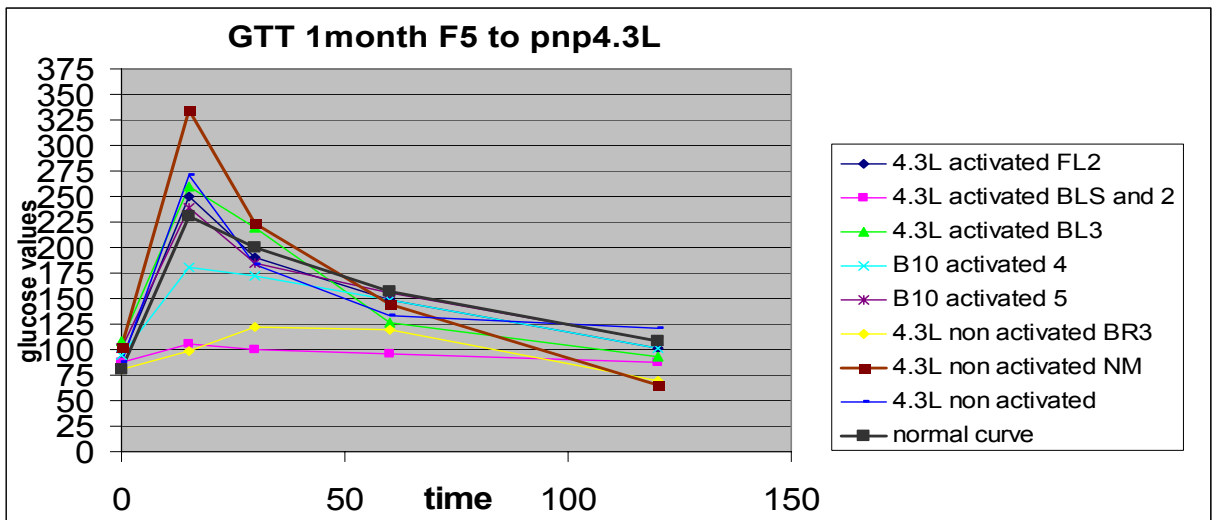


Εικόνα 9: σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων του Vb11 υποδοχέα στους κυτταρικούς πληθυσμούς της σπλήνας και του θύμου στα F5rnp31Rag1^{-/-} και F5Rag1^{-/-} διαγονιδιακά ζώα.

Συγκρίνοντας τα F5rnp31Rag1^{-/-} με τα F5Rag1^{-/-} παρατηρούμε πως στο θύμο υπάρχει κάποια μικρή απαλοιφή (deletion) σε ότι αφορά το συνολικό πληθυσμό των κυττάρων στο ζώο No2. Το ίδιο παρατηρούμε και στον πληθυσμό των CD8 κυττάρων. Σε ότι αφορά τη σπλήνα υπάρχει απαλοιφή των CD8 κυττάρων στα F5rnp31Rag1^{-/-} η οποία είναι εμφανής και από τα αποτελέσματα του FACS, καθώς επίσης και μείωση του επιπέδου του CD8 όπως και του επιπέδου του Vβ11. Το γεγονός αυτό, συμφωνεί με τα δεδομένα που είναι ως τώρα γνωστά και συγκαταλέγουν τη μείωση των επιπέδων των υποδοχέων αυτών, ως ένα μηχανισμό ανοχής (tolerance).

➤ Στο κομμάτι αυτό ασχολούμαστε με την ανάλυση της σειράς pNP4.3L. Για να διαπιστώσουμε τους μηχανισμούς λειτουργίας των T κυττάρων στη σειρά αυτή, πραγματοποιήσαμε πειράματα παθητικής μεταφοράς κυττάρων από F5 δότες σε pNP4.3L αποδέκτες. Όταν τα κύτταρα των δοτών είναι βαμμένα με CFSE υπάρχει η δυνατότητα παρακολούθησής τους στο FACS. Τα κύτταρα αυτά φαίνεται να βλέπουν το αντιγόνο και να αντιδρούν σε αυτό, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε μεταφορά F5 κυττάρων (35M CD8) ενεργοποιημένων 36 ώρες in vivo (με ενδοπεριτοναϊκή ένεση του πεπτιδίου) και μη ενεργοποιημένων. Μετά από 1 μήνα μετά τη μεταφορά των κυττάρων κάναμε ένα τεστ ανοχής στη γλυκόζη του οποίου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

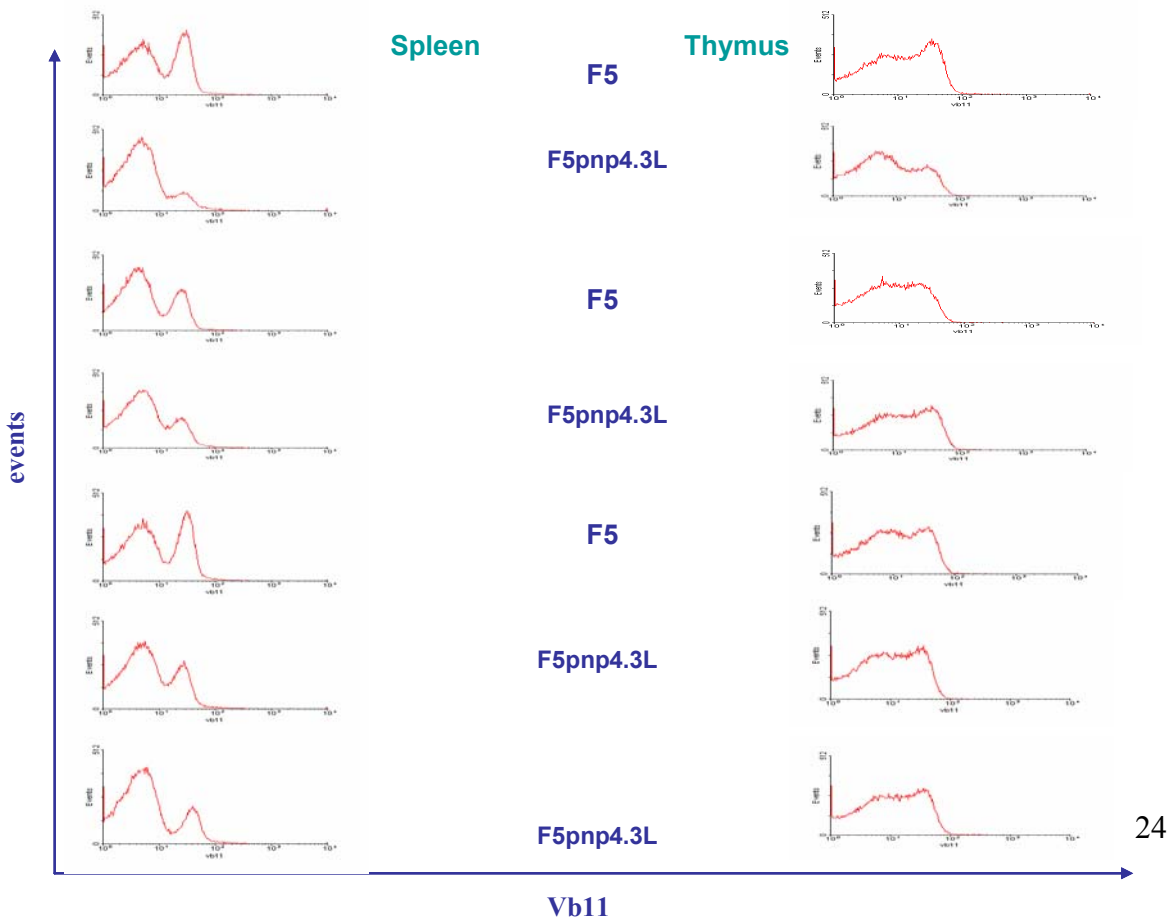


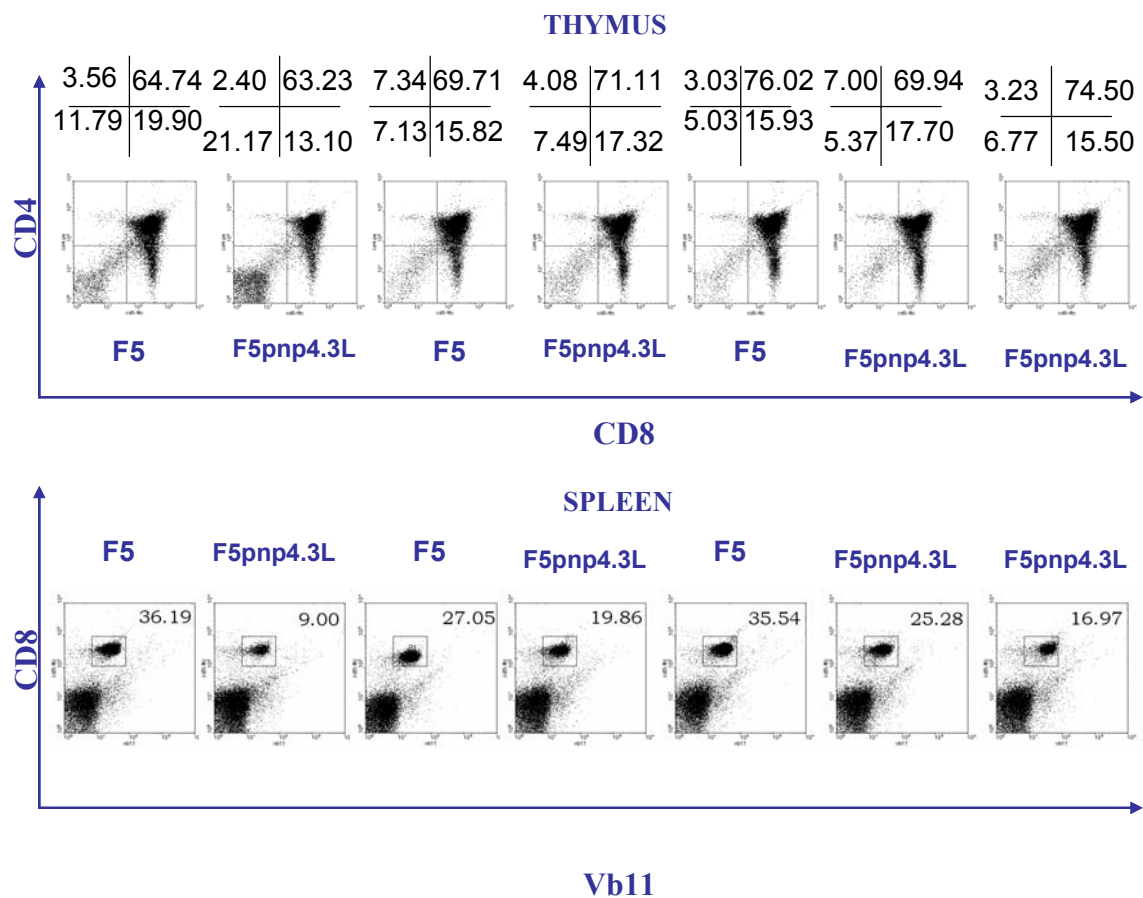
διάγραμμα 3: τεστ ανοχής στη γλυκόζη 1 μήνα μετά την παθητική μεταφορά F5 κυττάρων ενεργοποιημένων και μη σε pNP4.3L αποδέκτες. Με μαύρο εμφανίζεται η φυσιολογική καμπύλη του στελέχους C57/BL10 η οποία έχει προκύψει από στατιστική επεξεργασία.

Η καμπύλη γλυκόζης δεν φαίνεται να είναι γενικά παθολογική, παρά μόνο για ένα ζώο στο οποίο έχει γίνει μεταφορά μη ενεργοποιημένων κυττάρων (naïve) και η τιμή γλυκόζης στα 15 λεπτά έχει φτάσει τα 335 mg/dL. Ένας μήνας όμως δεν είναι αρκετός για να βγάλουμε οριστικά αποτελέσματα. Χρειάζονται και άλλα τέτοια τεστ τους επόμενους μήνες καθώς και επανάληψη του πειράματος με μεγαλύτερο αριθμό ζώων.

Σαν επόμενη προσέγγιση προχωρήσαμε στην ανάλυση διπλά διαγονιδιακών ζώων για τον F5 υποδοχέα και για την πρωτεΐνη. Συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται τα ζώα που αναλύθηκαν με FACS και τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

No	gender	Genotype	age	thymus		spleen		LN	
				total M	total CD8(M)	total M	total CD8/Vb11	total M	total CD8/Vb11
1	male	F5	8 wk	105,6	*19,90%=21	127	*36,19%=46	43,6	*47,5%=20,7
2	male	F5 pnp4.3L	8 wk	124,2	*13,10%=16,3	89,5	*9%=8	31,6	*20,68%=6,5
3	female	F5	8 wk	286	*15,82%=45	142	*27,05%=38,5	35,6	*48,22%=17
4	female	F5 pnp4.3L	8 wk	225	*17,32%=39	141,5	*19,86%=28	31,6	*37,78%=12
5	female	F5	8 wk	137	*15,93%=22	170,5	*35,54%=60	42,8	*61,23%=26
6	female	F5 pnp4.3L	8 wk	265,5	*17,7%=47	135,5	*25,28%=34	26,4	*49,27%=13
7	female	F5 pnp4.3L	8 wk	212, 25	*15,50%=33	132,5	*16,97%=22,5	34,8	*25,59%=9

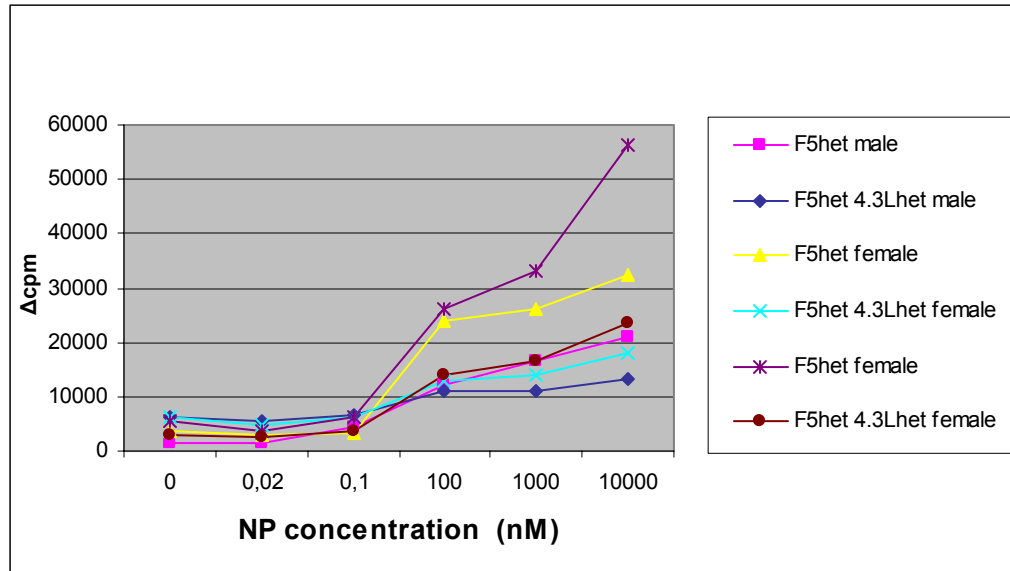




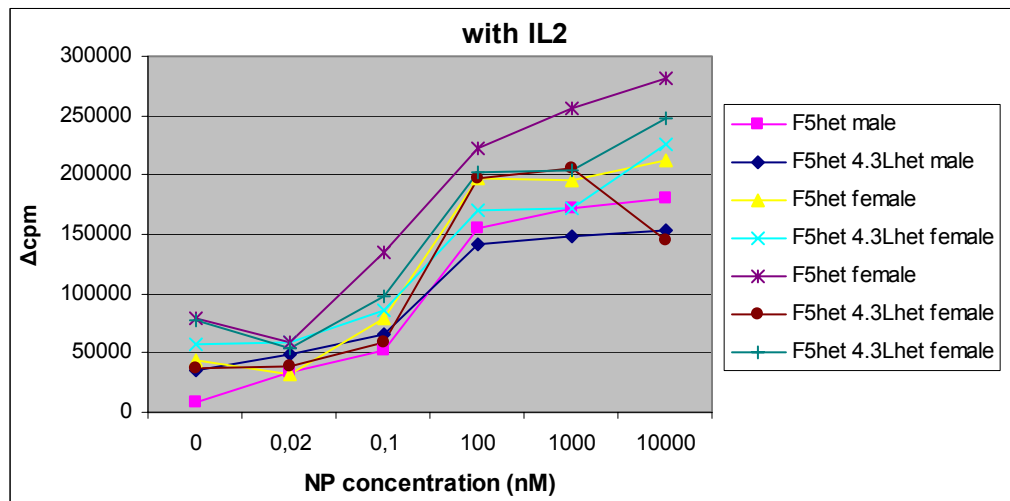
Εικόνα 10: Α) σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων του Vb11 υποδοχέα στους κυτταρικούς πληθυσμούς της σπλήνας και του θύμου στα F5 και F5rnp4.3l διαγονιδιακά ζώα. Β) φαινοτυπική ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών θυμικών και σπληνικών κυττάρων στα F5 και F5rnp4.3l διαγονιδιακά ζώα.

Από την ανάλυση των ζώων αυτών ως γενική παρατήρηση μπορούμε να πούμε πως υπάρχει μερική κυτταρική απαλοιφή η οποία είναι πιο έντονη στο αρσενικό σε ότι αφορά τον κυτταρικό πληθυσμό της σπλήνας (8 εκατομμύρια κύτταρα CD8/Vb11). Επίσης, από την εικόνα 10B παρατηρούμε πως τα ποσοστά των CD8 κυττάρων στον πληθυσμό της σπλήνας είναι αρκετά μειωμένα Αυτό ενδεχομένως να μαρτυρά κάποια μεταβλητότητα μέσα στον πληθυσμό, γεγονός που χρίζει περαιτέρω μελέτης για εξακρίβωση. Στο θύμο δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή. Σε ότι αφορά τα επίπεδα του υποδοχέα Vb11 φαίνεται πως είναι μικρότερα στα F5rnp4.3L σε σχέση με τα F5 στη σπλήνα ενώ στο θύμο δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή (εικόνα10Α).

Τα κύτταρα από τις σπλήνες των ζώων αυτών χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο του proliferation (πραγματοποιήθηκε από τη διδακτορικό Φουσιέρη Γεωργία) για να μελετήσουμε το βαθμό ενεργοποίησης καθώς και τη δυνατότητα επαν-ενεργοποίησης των αυτοδραστικών F5T λεμφοκυττάρων in vitro +/-IL2 και με διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στα παρακάτω διαγράμματα.



διάγραμμα 4: ικανότητα απάντησης των σπλενικών κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτιδίου απουσία IL2.



διάγραμμα 5: ικανότητα απάντησης των σπλενικών κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτιδίου παρουσία IL2.

Από τα παραπάνω διαγράμματα 4 και 5 μπορούμε να δούμε πως όλα τα κύτταρα απαντούν στο πεπτιδίο και πιο συγκεκριμένα στις ψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού. Η απάντηση στο πεπτιδίο είναι εντονότερη παρουσία IL-2.

Μέρος Β (streptozotocin)

Η streptozotocin είναι μια χημική ουσία που χρησιμοποιείται συχνά σε ζωικά μοντέλα για τη μελέτη του διαβήτη, αρχικά όμως χρησιμοποιούνταν ως αντιβιοτικό. Η ουσία αυτή απομονώθηκε από τον οργανισμό *Streptomyces achromogenes* τη δεκαετία του 1960. Αποτελεί ένα αντιβιοτικό φάρμακο ευρέως φάσματος καθώς επίσης κι ότι διαθέτει ιδιότητες ενάντια σε όγκους, ιδιότητες πρόκλησης διαβήτη και ογκογονικές ιδιότητες (Like Rossini, 1976).

Στην παρούσα εργασία θέλουμε να διαπιστώσουμε αν το φάρμακο αυτό αφενός προκαλεί διαβήτη στο στέλεχος C57/BL10 και αφετέρου αν ο TNF έχει κάποιο ρόλο στη διαδικασία αυτή. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να αποκτήσουμε ένα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη του μηχανισμού της ανάπτυξης του αυτοάνοσου διαβήτη με τη χρήση της streptozotocin και να καθορίσουμε αν το φαινόμενο αυτό σχετίζεται άμεσα με μηχανισμούς λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων.

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ότι το φάρμακο αυτό προκαλεί την καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων (Like, Rossini 1976). Ο ρόλος του θανάτου των β κυττάρων στην ανάπτυξη του αυτοάνοσου διαβήτη δεν είναι γνωστός. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι με το θάνατο των β κυττάρων αυξάνεται η αντιγονοπαρουσίαση των αυτοαντιγόνων των β κυττάρων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Υπάρχει επίσης και η πιθανότητα παρουσίασης νεο-αντιγόνων (Zhang, 2002). Η μελέτη αυτού του συστήματος θα μας επιτρέψει να διαπιστώσουμε τη συμμετοχή των T λεμφοκυττάρων στη διαδικασία αυτή. Αυτό μπορούμε να το κάνουμε σε Rag1^{-/-} υπόβαθρο. Αν λοιπόν χορηγήσουμε το φάρμακο σε rnp31Rag1^{-/-} ή rnp4.3LRag1^{-/-} για παράδειγμα και στη συνέχεια μεταφέρουμε F5 κύτταρα στα ζώα αυτά και παρακολουθήσουμε το φαινόμενο, μπορούμε να βγάλουμε χρήσιμα συμπεράσματα για το ρόλο των T κυττάρων στη διαδικασία αυτή.

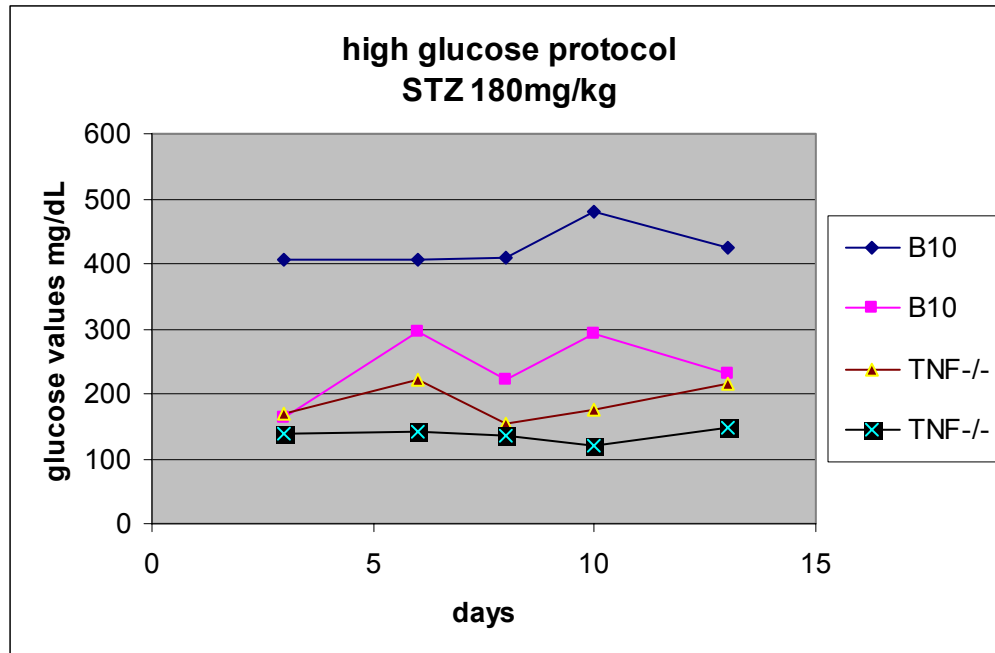
➤ Πρωτόκολλο υψηλής δόσης streptozotocin

Για να ελέγξουμε αν διαθέτει ή όχι την ικανότητα το φάρμακο αυτό να προκαλέσει διαβήτη στα ζώα που διαθέτουμε (C57BL/10, TNF^{-/-}), προχωρήσαμε αρχικά στη

χορήγηση υψηλής δόσης του φαρμάκου (180mg/kg σε διάλυμα 1xSSC pH 4.2) σε 2 αρσενικά C57BL/10 και 2 αρσενικά TNF-/-, αφού πρώτα έμειναν νηστικά για 4 ώρες. Στη συνέχεια τα ζώα αυτά ελέγχθηκαν για τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους. Οι μετρήσεις έγιναν σε διάφορα χρονικά διαστήματα και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα :

high dose protocol stz 180mg/kg			
2 male TNF-/-			
2 male C57/BL10			
afte		after 10 days	
B10	TNF-/-		TNF-/-
406	170		175
	138	292	121
after 6 days		after 13 days	
	TNF-/-		TNF-/-
4	2	4	2
294	141	232	148
after 8 days			
B10	TNF-/-	Οι τιμ	γλυκόζης
410		αντιστοιχούν	σε mg/dL
	135		

Από τις τιμές αυτές της γλυκόζης παρατηρούμε πως το ένα από τα δύο B10 ζώα εμφανίζει υψηλή τιμή η οποία διατηρείται πάνω από τα 400 mg/dL. Το δεύτερο B10 ζώο ανεβάζει και αυτό τα επίπεδα της γλυκόζης του αλλά σταδιακά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η ένεση με το φάρμακο σε αυτό έγινε πιο μετά γιατί οι ενέσεις πραγματοποιούνται διαδοχικά. Ο παράγοντας χρόνος είναι πάρα πολύ σημαντικός σε αυτή την πειραματική μέθοδο. Λόγω της αστάθειας του φαρμάκου το οποίο όπως έχει αναφερθεί έχει χρόνο ημιζωής 5-15 λεπτά και είναι και φωτοευαίσθητο. Σε αντίθεση με τα B10, τα TNF-/- ζώα δεν εμφανίζουν παθολογικές τιμές (>200 mg/dL) σε καμία από τις μετρήσεις. Παρακάτω φαίνεται η πορεία των ζώων αυτών στο χρόνο σε ότι αφορά τα επίπεδα γλυκόζης τους.

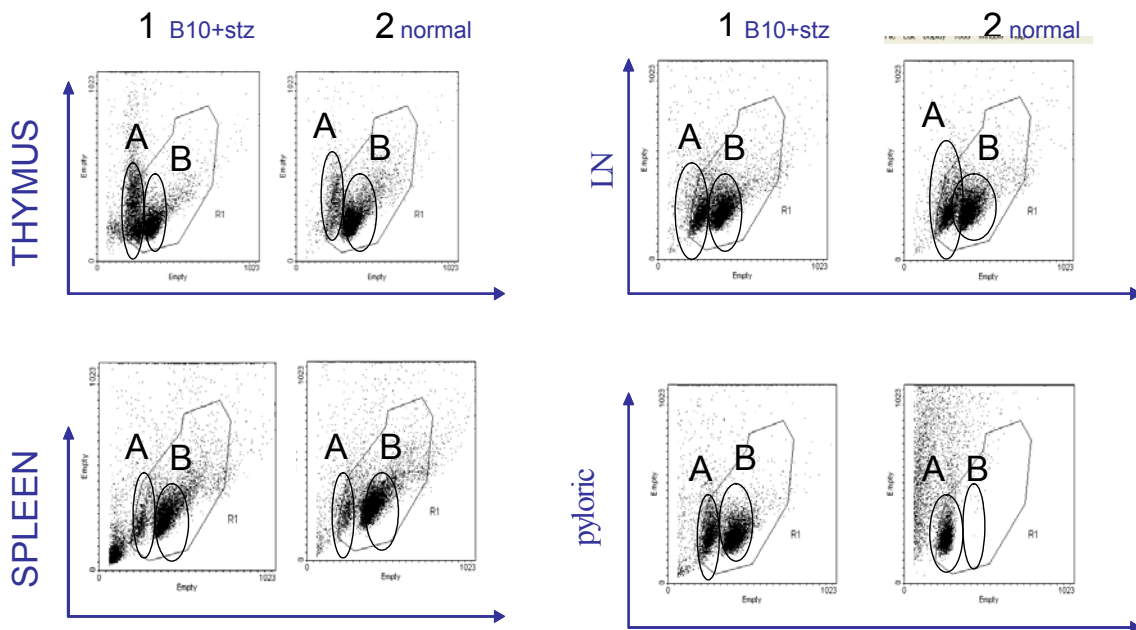


διάγραμμα 6: επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ζώων στα οποία έχει γίνει χορήγηση *streptozotocin* 180mg/dL. Οι φυσιολογικές τιμές γλυκόζης κυμαίνονται κάτω από τα 200mg/dL.

Το B10 ζώο που εμφάνιζε σταθερές τιμές πάνω από 400 mg/dL, θανατώθηκε καθώς επίσης και ένα B10 ζώο αντίστοιχης ηλικίας το οποίο δεν είχε δεχθεί καμία φαρμακευτική αγωγή ως control. Οι ιστοί των ζώων αυτών (θύμος, σπλήνα, λεμφαδένες, πυλωρικοί λεμφαδένες) αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, και το πάγκρεας διατηρήθηκε για να ακολουθήσει τη διαδικασία χρώσης με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. Συνεχίσαμε να παρακολουθούμε τα TNF-/- ζώα, τα οποία εμφάνισαν υψηλή τιμή γλυκόζης στα 385 mg/dL, η οποία έπεσε όμως στα 238 και μετά από 2 μήνες στα 193 mg/dL.

Στην κυτταρομετρία ροής τα κύτταρα που απομονώθηκαν αναλύθηκαν με τη χρήση των αντισωμάτων anti-CD8-FITC, anti-CD4-PE και anti-CD3-βιοτινή. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνοπτικά ο συνολικός κυτταρικός πληθυσμός για κάθε ιστό.

No	genotype	age	thymus		spleen		LN		pyloric	
			total M	total CD8(M)	total M	total CD8/CD3(M)	total M	total CD8/CD3(M)	total M	total CD8/CD3(M)
1	<i>B10+stz</i> ♂	8wk	56	*3,19%=2	51	*12,06%=6	22	*17,25%=4	3	*25,19%=0,75
2	<i>B10</i> ♂	8wk	134,5	*4,27%=6	87,5	*13,81%=12	16,4	*24,52%=4	1,45	*23,8%=0,34
No	genotype	age	total M	total CD4(M)	total M	total CD4/CD3(M)	total M	total CD4/CD3(M)	total M	total CD4/CD3(M)
1	<i>B10+stz</i> ♂	8wk	56	*10,54%=5,9	51	*19,16%=9,8	22	*24,45%=5,34	3	*37,58%=1,13
2	<i>B10</i> ♂	8wk	134,5	*7,72%=10,4	87,5	*22,49%=19,7	16,4	*29,64%=4,9	1,45	*31,28%=0,45
No	genotype	age	total M	total CD4/CD8(M)						
1	<i>B10+stz</i> ♂	8wk	56	*69,45%=38,9						
2	<i>B10</i> ♂	8wk	134,5	*83,07%=111,7						

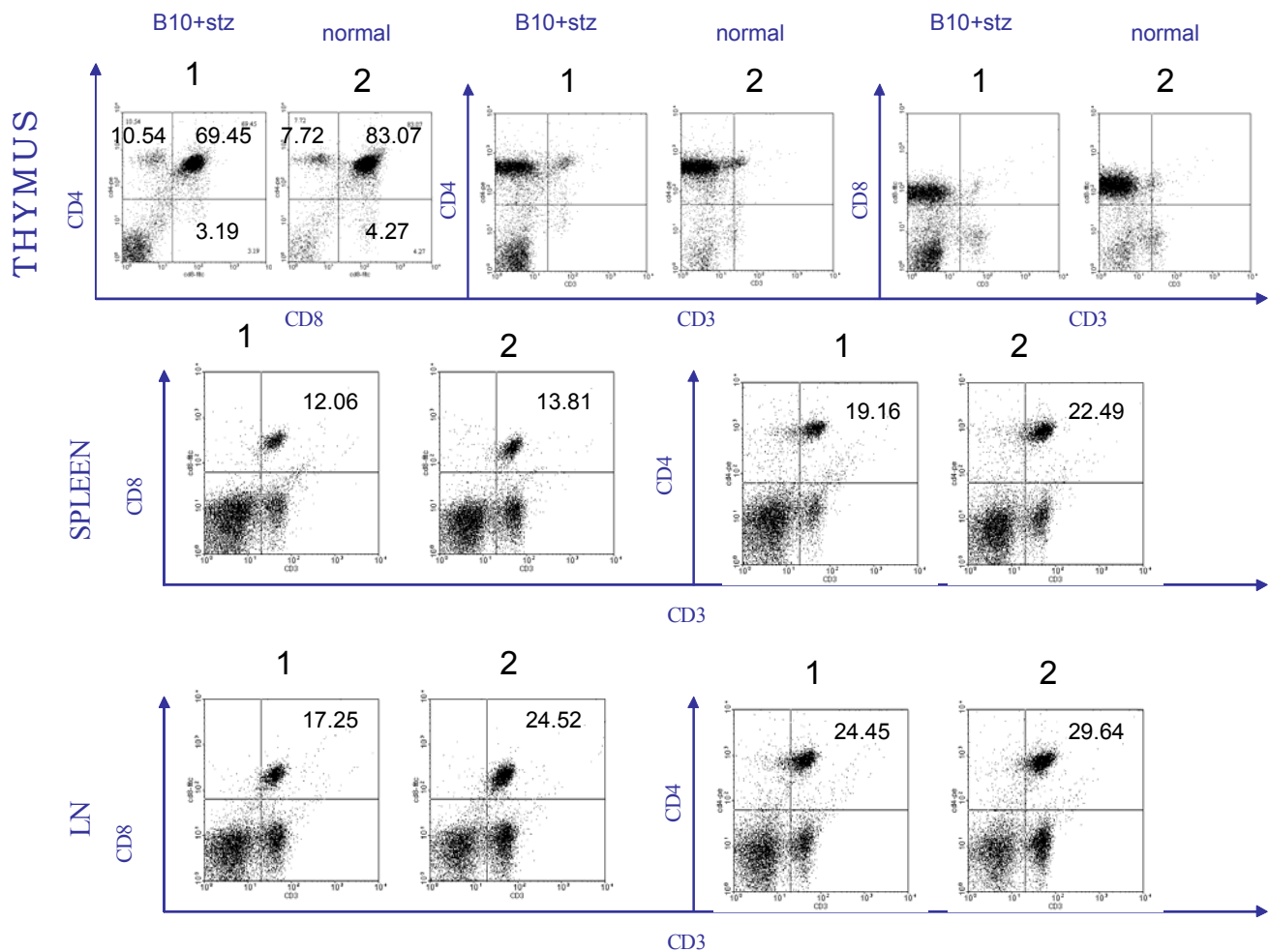


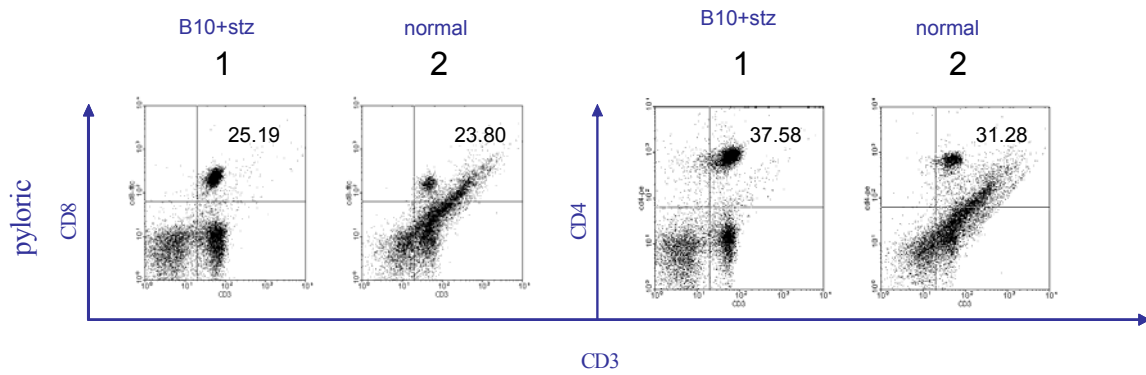
εικόνα 11: πληθυσμοί κυττάρων από τους ιστούς της σπλήνας, του θύμου των λεμφαδένων και των πυλωρικών λεμφαδένων. Διακρίνουμε δύο πληθυσμούς A και B. Το No1 είναι το ζώο με τις παθολογικές τιμές γλυκόζης και το No2 είναι το φυσιολογικό που δεν έχει streptozotocin.

Η βασική διαφορά που παρατηρούμε και είναι ιδιαίτερα εμφανής είναι ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στους ιστούς και πιο συγκεκριμένα στο θύμο. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα στο ζώο με τις παθολογικές τιμές γλυκόζης (No1) είναι 3 φορές λιγότερα απ' ότι στο φυσιολογικό (No2). Το γεγονός αυτό εξηγείται και από τα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία αναφέρεται τοξικότητα του φαρμάκου με αποτέλεσμα ατροφία στο θύμο και σε άλλους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς (Joslin's

13th edition) . Επίσης ο αριθμός των DP κυττάρων στο θύμο είναι σχετικά μειωμένος στο ζώο που έχει εμφανίσει υπεργλυκαιμία σε σχέση με το φυσιολογικό. Ο αριθμός των κυττάρων επηρεάζει κατ' επέκταση και τις υπόλοιπες μετρήσεις, ωστόσο σε ότι αφορά τα ποσοστά των κυττάρων για τους πληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺ είναι περίπου τα ίδια.

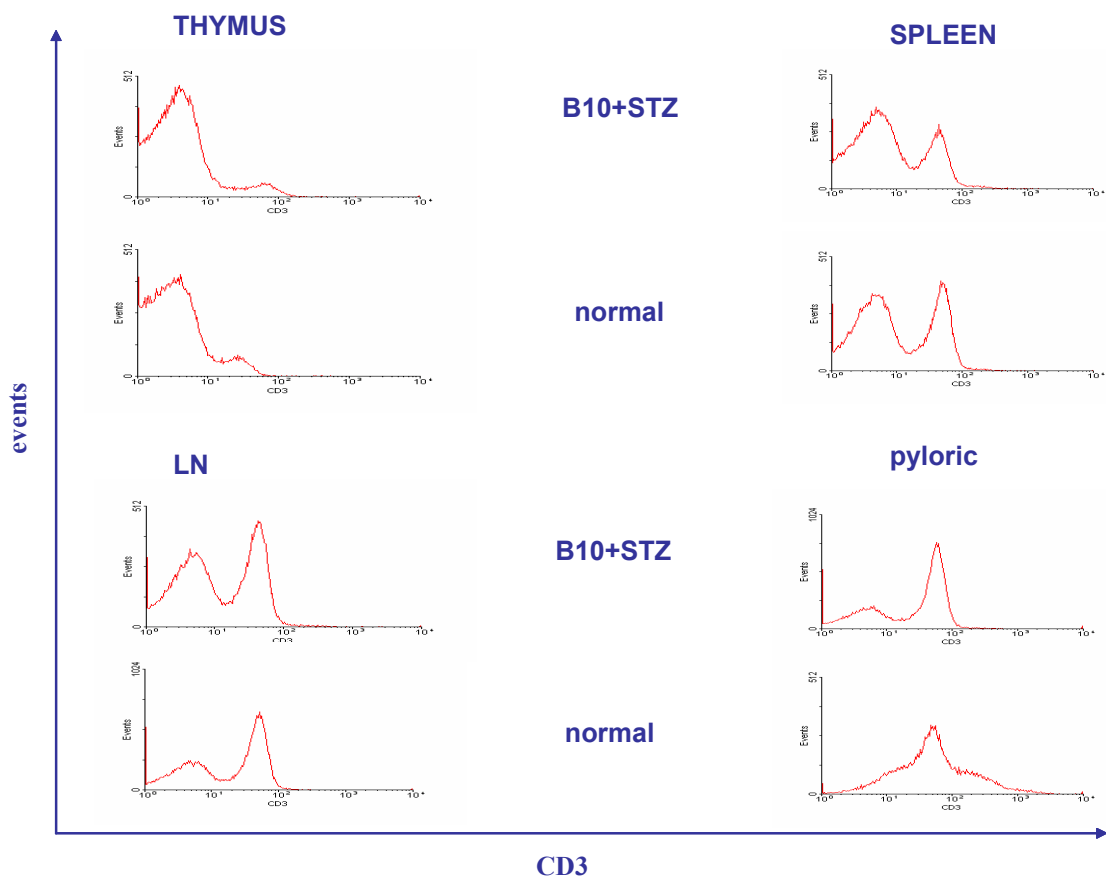
Σε ότι αφορά τα επίπεδα του CD3 στο θύμο μέσα στον πληθυσμό των CD8⁺ κυττάρων είναι σχεδόν διπλάσιος στο No1 απ'ότι στο No2. Το ίδιο ισχύει και για τον πληθυσμό των CD4⁺ κυττάρων ενώ για τα DP κύτταρα η κατανομή του CD3 είναι περίπου ίδια. Τα επίπεδα του CD3 στον κυτταρικό πληθυσμό της σπλήνας είναι λίγο λιγότερα τόσο στον πληθυσμό των CD4⁺ όσο και στον πληθυσμό των CD8⁺ κυττάρων. Το ίδιο συμβαίνει και στον κυτταρικό πληθυσμό των λεμφοδένων, ενώ στον πληθυσμό των πυλωρικών λεμφοδένων συμβαίνει το αντίθετο.





εικόνα 12: φαινοτυπική ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών της σπλήνας, του θύμου, των λεμφαδένων και των πυλωρικών λεμφαδένων.

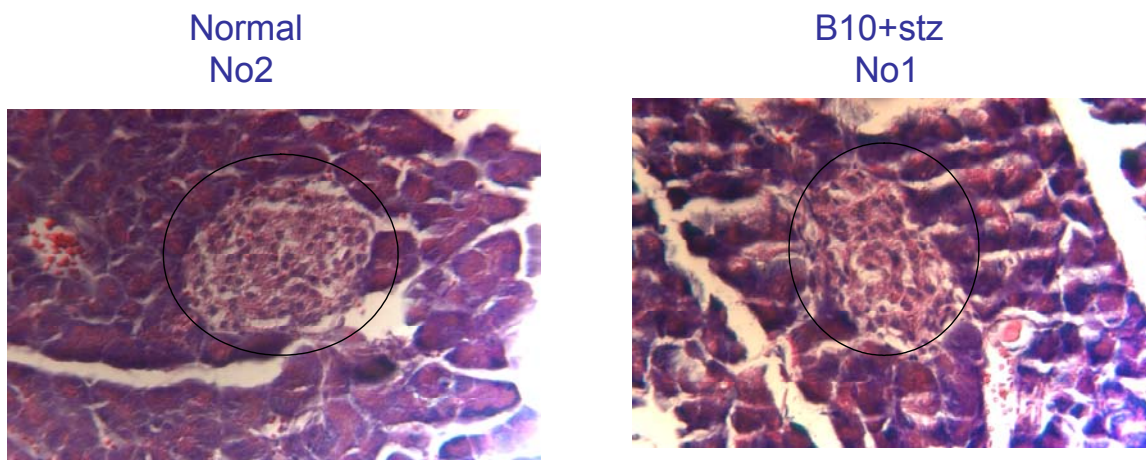
Από την εικόνα της κυτταρομετρίας ροής (εικόνα 10) φαίνεται πως υπάρχουν 2 πληθυσμοί κυττάρων οι οποίοι όμως δεν επηρεάζουν το συνολικό χαρακτηρισμό του ιστού. Οι διαφορές που υπάρχουν μεταξύ τους αφορούν χαμηλότερα ποσοστά CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων στον πληθυσμό A απ' ότι στον πληθυσμό B. Ωστόσο στην περίπτωση των πυλωρικών λεμφαδένων ο πληθυσμός B υπάρχει μόνο στο ζώο No1 ενώ στο No2 δεν εμφανίζεται καθόλου. Μεταξύ των 2 αυτών πληθυσμών στο ζώο με την υπεργλυκαιμία (No1) εμφανίζεται διπλάσιος αριθμός CD8⁺ και CD4⁺ κυττάρων στον πληθυσμό B απ' ότι στον A. Η ύπαρξη αυτών των δύο πληθυσμών μπορεί να οφείλεται στο ότι τα κύτταρα του πληθυσμού A βρίσκονται σε απόπτωση γεγονός που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για τον εντοπισμό των επιπέδων αννεξίνης.



εικόνα 13: σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων του CD3 υποδοχέα στους κυτταρικούς πληθυσμούς της σπλήνας, του θύμου, των λεμφαδένων και των πυλωρικών λεμφαδένων.

Τα επίπεδα του CD3 όπως προκύπτουν από την εικόνα 13 φαίνεται να είναι λίγο πιο ψηλά στο θύμο του B10+STZ, ενώ σε όλους τους άλλους ιστούς παραμένουν υψηλότερα στο φυσιολογικό ζώο. Αυτό συντείνει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναφέρουν τοξικότητα του φαρμάκου streptozotocin στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς.

Ιστολογικά δεδομένα: από την ιστολογική ανάλυση του παγκρέατος των δύο ζώων, παρατηρήσαμε πολύ λιγότερα παγκρεατικά νησίδια στο παθολογικό ζώο σε σχέση με το φυσιολογικό, καθώς επίσης και αυτά τα λίγα που υπήρχαν ήταν αισθητά συρρικνωμένα σε σχέση με τα φυσιολογικά (εικόνα 14). Το γεγονός αυτό εξηγείται και από τα βιβλιογραφικά δεδομένα αφού το φάρμακο streptozotocin οδηγεί τα β κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο (Like Rossini, 1976).



εικόνα 14: Χρώση με αιματοξυλίνη ηωσίνη του παγκρεατικού ιστού του ζώου με τις παθολογικές τιμές γλυκόζης (No1) και ενός φυσιολογικού ζώου ίδιας ηλικίας και στελέχους (No2) που δεν έχει δεχθεί το φάρμακο. Τα παγκρεατικά νησίδια στο No2 όπου υπάρχουν, έχουν χάσει τη μορφολογία τους και έχουν συρρικνωθεί σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.

➤ Πρωτόκολλο χαμηλής δόσης streptozotocin

Για να δημιουργήσουμε ένα μοντέλο σακχαρώδη διαβήτη στα στελέχη C57/BL10 και TNF^{-/-} προχωρήσαμε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου χορήγησης χαμηλής δόσης

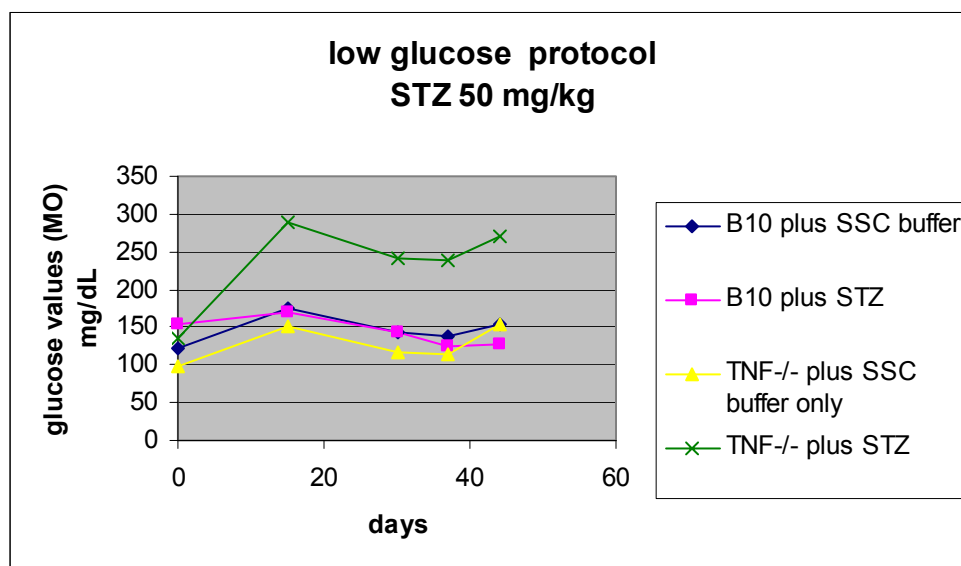
του φαρμάκου. Με βάση το πρωτόκολλο αυτό, προχωρήσαμε στη χορήγηση χαμηλής δόσης streptozotocin (50 mg/kg σε διάλυμα 1x SSC pH 4.2) σε 3 αρσενικά C57BL/10 και 3 αρσενικά TNF-/-, αφού πρώτα έμειναν νηστικά για 4 ώρες. Είχαμε επίσης ως control 3 αρσενικά C57BL/10 και 3 αρσενικά TNF-/- στα οποία έγινε ένεση μόνο με το διάλυμα 1x SSC pH 4.2. Στη συνέχεια τα ζώα αυτά ελέγχθηκαν για τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους. Οι μετρήσεις έγιναν σε διάφορα χρονικά διαστήματα και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αρχικά ξεκινήσαμε με τις τιμές της γλυκόζης στο αίμα πριν την έναρξη οποιασδήποτε διαδικασίας ώστε να αποκλείσουμε την περίπτωση κάποιο ζώο να βρίσκεται ήδη σε κάποια παθολογική κατάσταση για οποιοδήποτε λόγο.

low dose stz protocol		
50mg/kg		
B10 before ssc buffer		TNF-/- before ssc buffer
59		105
167		134
137		55
B10 before STZ		TNF-/- before STZ
144		137
154		146
163		127
15 days		
B10 + SSC buffer		TNF-/- + SSC buffer
170		167
181		137
174		151
B10 + STZ		TNF-/- + STZ
210		253
147		286
150		328
30 days		
B10 + SSC buffer		TNF-/- + SSC buffer
132		124
144		113
150		112
B10 + STZ		TNF-/- + STZ
166		219
136		229
129		275

37 days		
B10 + SSC buffer		TNF ^{-/-} + SSC buffer
107		107
142		115
164		124
B10 + STZ		TNF ^{-/-} + STZ
145		155
115		211
117		351
44 days		
B10 + SSC buffer		TNF ^{-/-} + SSC buffer
137		135
147		152
180		132
B10 + STZ		TNF ^{-/-} + STZ
148		233
122		256
113		325

Παρακάτω φαίνεται διαγραμματικά η πορεία των ζώων αυτών στο χρόνο σε ότι αφορά τα επίπεδα γλυκόζης τους.



Διάγραμμα: στον άξονα X εμφανίζονται οι μέρες κατά τις οποίες έγιναν οι μετρήσεις της γλυκόζης και στον άξονα Y εμφανίζονται οι μέσοι όροι των τιμών γλυκόζης για κάθε συνθήκη.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι τα TNF^{-/-} ζώα στα οποία χορηγήθηκε το φάρμακο εμφάνισαν υπεργλυκαιμία ενώ από τα υπόλοιπα ζώα δεν εμφάνισαν κάποια τέτοια ένδειξη.

Μέρος Γ (κατασκευή DsRed construct)

Στην μελέτη της απόκρισης των T λεμφοκυττάρων και των μηχανισμών λειτουργίας τους, εστιάζεται το τρίτο μέρος της εργασίας αυτής, του οποίου ένα μέρος πραγματοποιήθηκε κατά την εκπόνηση της πρακτικής άσκησης (rotation). Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η δημιουργία κατάλληλης κατασκευής (construct), η οποία θα περιέχει το γονίδιο μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης καθώς και όλες τις απαραίτητες ρυθμιστικές περιοχές που απαιτούνται για την έκφραση αυτής στα T λεμφοκύτταρα. Η πρωτεΐνη αυτή, DsRed, φθορίζει στην περιοχή του κόκκινου στο φάσμα του φωτός. Μέσω της πρωτεΐνης αυτής θα έχουμε τη δυνατότητα να παρακολουθούμε τα T λεμφοκύτταρα στην κυτταρομετρία ροής, χωρίς να τα βάψουμε με ειδικά αντισώματα που φέρουν άλλες φθορίζουσες ομάδες, γιατί θα εκφράζουν ενδογενώς αυτή που εμείς θα τους προσθέσουμε (Marchant.2001).

Τέτοιου είδους διαγονιδιακά ζώα έχουν πολλές προοπτικές για το μέλλον. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές in vivo απεικόνισης (imaging) (Ntziahristos,2002), όπου θα μπορούμε να παρακολουθούμε τα κύτταρα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές π.χ GFP, DsRED κλπ. οπουδήποτε και αν βρίσκονται μέσα στον οργανισμό in vivo (Cahalan,2003), πως αυτά αποκρίνονται σε ένα ερέθισμα καθώς και πως συμπεριφέρονται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ήδη έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακά ζώα για την πρωτεΐνη GFP που μελετώνται με τη μέθοδο αυτή και έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Τα ζώα που χρησιμοποιούμε είναι C57BL/10. Η πλασμιδιακή κατασκευή που θέλουμε να δημιουργήσουμε βασίζεται στην ανθρώπινη CD2-minigene κασσέττα η οποία διαθέτει όλα τα απαραίτητα στοιχεία και ρυθμιστικές περιοχές ώστε να έχουμε έκφραση των γονιδίων στα T λεμφοκύτταρα και μόνο.

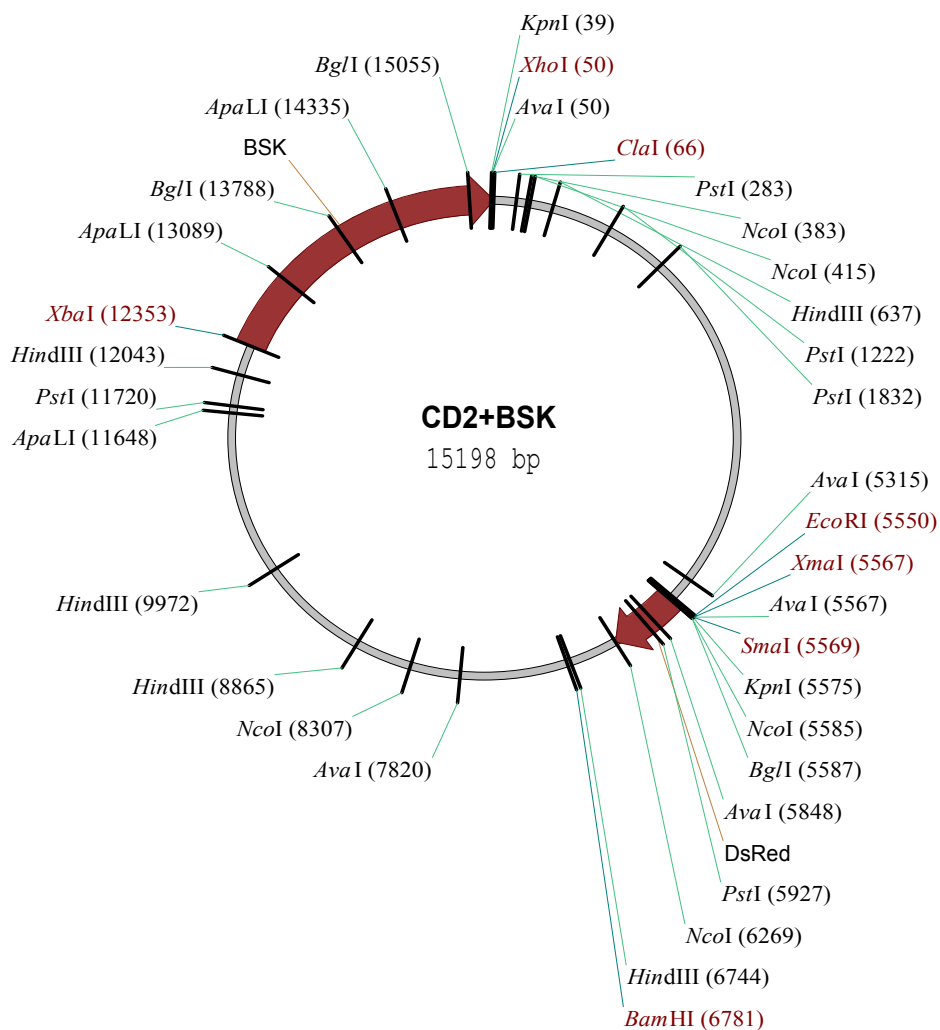
Η ανθρώπινη CD2-minigene κασσέττα έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για την έκφραση διαφόρων γονιδίων αναφοράς στα T λεμφοκύτταρα σε διαγονιδιακά ζώα. Μια τροποποιημένη μορφή αυτής, χρησιμοποιούμε στην προσπάθειά μας να δημιουργήσουμε διαγονιδιακά ζώα τα οποία θα περιέχουν το γονίδιο του ενδιαφέροντός μας (DsRed) και θα το εκφράζουν αποκλειστικά και μόνο στα T λεμφοκύτταρα.

Η τροποποιημένη μορφή της κασσέττας περιέχει 5kb 5' και 5.5kb 3' πλευρικές αλληλουχίες, οι οποίες περιέχουν αντίστοιχα τον υποκινητή και την locus control region (LCR) του ανθρώπινου CD2 γονιδίου. Η LCR περιοχή προσφέρει έκφραση, η οποία

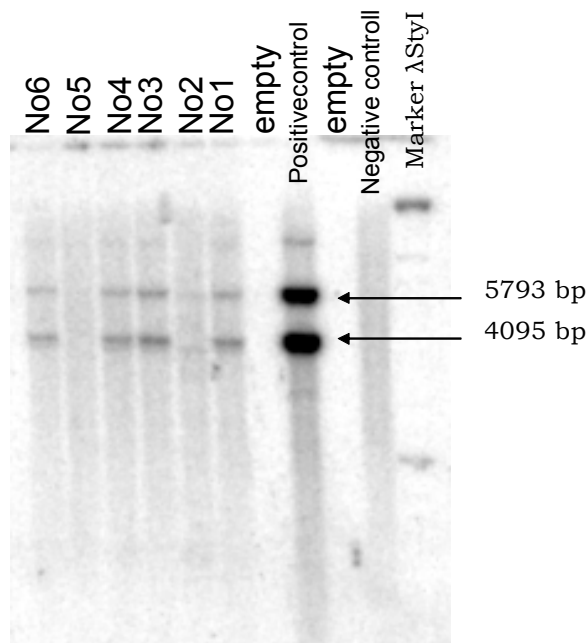
εξαρτάται από τον αριθμό των γονιδίων που έχουν εισαχθεί, αλλά είναι ανεξάρτητη της θέσης εισαγωγής των γονιδίων. Η κασέττα περιέχει μια θέση έναρξης της μεταγραφής, το πρώτο ιντρόνιο του ανθρώπινου CD2 γονιδίου, καθώς και 2 σήματα πολυαδενυλίωσης στην 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του CD2 γονιδίου (Zhumabekov et al,1995).

Για τη δημιουργία του επιθυμητού construct, αποφασίσαμε να κόψουμε με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και NotI το πλασμιδίο pDsRed-Express (3,3Kb) και με SmaI τον hCD2-minigene vector. Έπειτα ακολούθησαν προσπάθειες σύνδεσης αυτών των τμημάτων μεταξύ τους και μετασχηματισμός αυτών σε βακτηριακά κύτταρα E.coli. Απομονώσαμε τις θετικές αποικίες και στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε δοκιμαστικές πέψεις, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν το ένθεμα έχει μπει σωστά στον φορέα (vector).

Προχωρούμε σε καλλιέργειά τους και απομόνωση DNA, με βάση τη διαδικασία απομόνωσης της εταιρείας Nucleobond. Ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις σε αυτά τα maxi prep ώστε να ταυτοποιήσουμε την ποιότητά τους. Το θετικό δείγμα στη συνέχεια δόθηκε για αλληλούχιση (sequencing). Χαρακτηριστικά μπορούμε να δούμε το χάρτη αυτής της πλασμιδιακής κατασκευής.



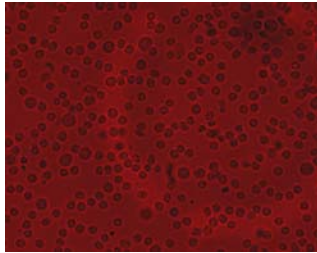
Το πλασμίδιο αυτό στη συνέχεια κόπηκε με τα ένζυμα Xba-XhoI και ενέθηκε σε πειραματόζωα του στελέχους C57/BL10. Τα ζώα αυτά καθώς και οι απόγονοί τους εξετάστηκαν με τη μέθοδο Southern για το αν διαθέτουν το διαγονίδιο ή όχι. Για το λόγο αυτό κατασκευάσαμε ένα ραδιενεργό ικνηθέτη ο οποίος είναι το ίδιο το γονίδιο της DsRed πρωτεΐνης το οποίο το απομονώνουμε από το πλασμίδιο pDsRed express ύστερα από πέψη με τα ένζυμα BamH1-Not1. Το γενωμικό DNA των πειραματοζώων ελέγχεται με τη μέθοδο Southern αφού πρώτα κοπεί με το ένζυμο Pst1. Όταν ο ραδιενεργός ικνηθέτης υβριδοποιηθεί με το γονίδιο της DsRed πρωτεΐνης μέσα στο γονιδίωμα, τότε θα έχουμε θετικό σήμα στην αυτοραδιογραφία στα αναμενόμενα μεγέθη (5793bp και 4095 bp). Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας φαίνεται παρακάτω:



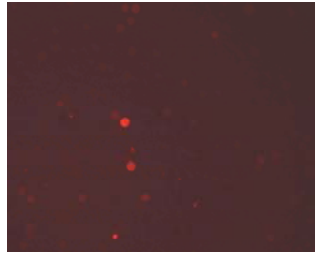
DsRED Southern: στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται ενδεικτικά το αποτέλεσμα της εφαρμογής της μεθόδου Southern με τη χρήση ραδιενεργού ανιχνευτή για το γονίδιο DsRED σε 6 (No1-6) δείγματα. Ως θετικό control έχουμε μια ποσότητα από το DNA που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ζώων και ως αρνητικό control ένα C57/BL10. Τα No5 και 2 είναι αρνητικά ενώ τα No1,3,4 και 6 είναι θετικά .

Προχωρώντας περαιτέρω στην ανάλυση των ζώων αυτών, θελήσαμε να δούμε κατά πόσον εκφράζουν την πρωτεΐνη DsRED με την τεχνική FACS καθώς και αν μπορούμε να εντοπίσουμε τα κύτταρα αυτά με χρήση της μικροσκοπίας Confocal.

thymus

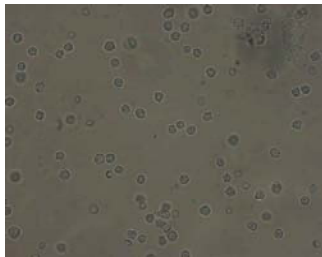


Οπτικό πεδίο



Κύτταρα που φθορίζουν στο ίδιο οπτικό πεδίο

LN



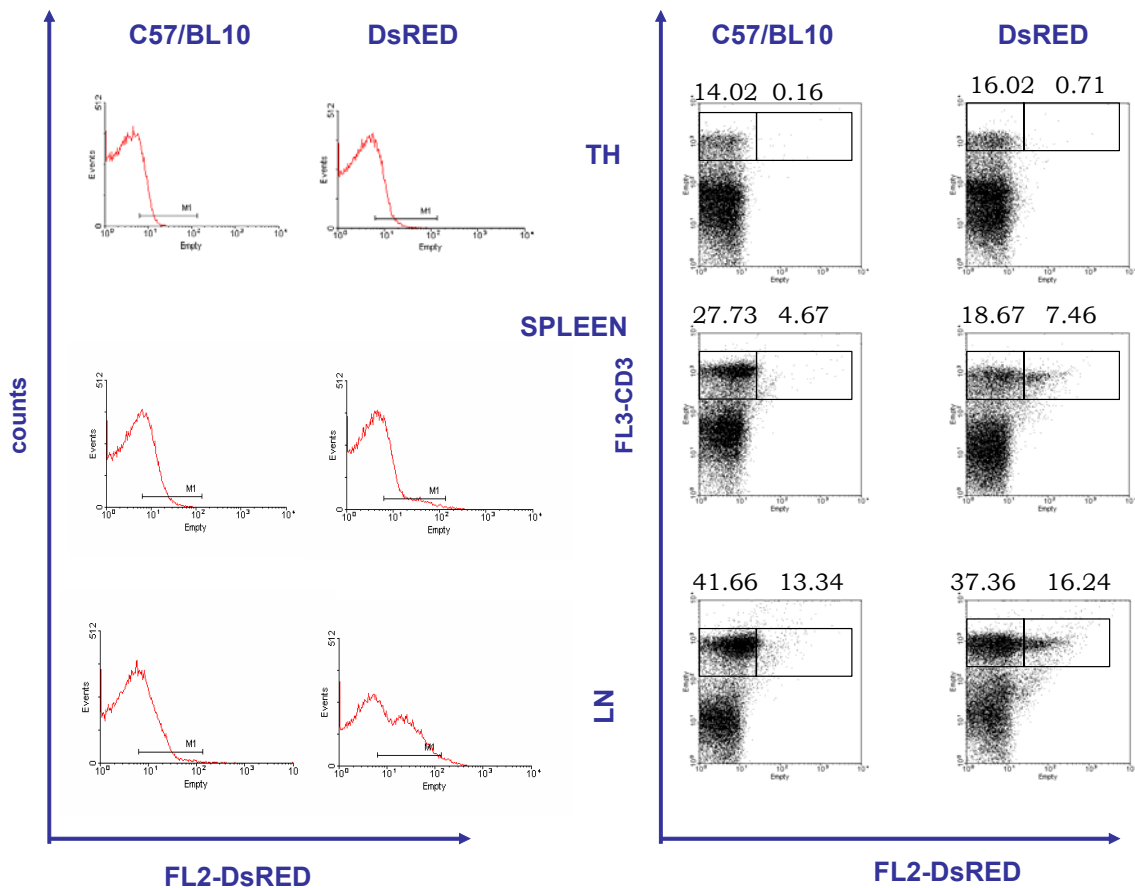
Οπτικό πεδίο



Κύτταρα που φθορίζουν στο ίδιο οπτικό πεδίο

εικόνα 15 confocal: *Τ λεμφοκύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη DsRED στον ιστό του θύμου και των λεμφαδένων. Στο οπτικό πεδίο βρίσκεται κυτταρικό διάλυμα από τον ιστό του θύμου και των λεμφαδένων από ένα διαγονιδιακό για την DsRED πρωτεΐνη ζώο.*

Από την εικόνα 15 παρατηρούμε πως υπάρχει φθορισμός τόσο στα κύτταρα του θύμου όσο και στα κύτταρα των λεμφαδένων, ωστόσο ο φθορισμός δεν αντιστοιχεί σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό.



εικόνα 16 : *χρήση της τεχνικής FACS για τον εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη DsRED στους ιστούς του θύμου, των λεμφαδένων και της σπλήνας. Με την τεχνική αυτή φαίνεται να εντοπίζονται καλύτερα τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη στον ιστό των λεμφαδένων.*

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι πράγματι τα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη DsRED, φαινόμενο όμως που είναι περισσότερο ευδιάκριτο στον ιστό των λεμφαδένων (εικόνα 16). Παρατηρούμε επίσης από τα αποτελέσματα του FACS (εικόνα 16) όπου φαίνονται τα λεμφοκύτταρα βαμμένα με το αντίσωμα anti-CD3 παράλληλα με τη DsRED, πως αφενός η DsRED εκφράζεται εξειδικευμένα στα T λεμφοκύτταρα αφετέρου δεν εκφράζεται από όλα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε μη καλή χρώση με το αντίσωμα anti-CD3, είτε σε κάποιο άλλο παράγοντα που έχει σχέση με τη δυνατότητα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής από τα T λεμφοκύτταρα. Είναι απαραίτητο λοιπόν να γίνουν περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθούν οι ακριβείς συνθήκες έκφρασης της DsRED πρωτεΐνης.

4. Συζήτηση

Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος δεν έχουν μελετηθεί πλήρως και εξακολουθούν να παραμένουν βασικό ερώτημα για τους ανοσολόγους. Η μελέτη των μηχανισμών αυτών είναι αναγκαία για την κατανόηση της λειτουργίας τους και της διατήρησης της φυσιολογικής κατάστασης του οργανισμού.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιούμε ένα μοντέλο ανοσολογικής ανοχής το οποίο βασίζεται σε έναν F5 TCR υποδοχέα (MHCI restricted) και σε ένα αντιγόνο NP που αυτός αναγνωρίζει. Στο πρώτο μέρος της εργασίας ασχοληθήκαμε με την ταυτοποίηση και φαινοτυπική ανάλυση των κυτταρικών υποπληθυσμών στον θύμο αδένα και τα περιφερικά λεμφικά όργανα στις διαγονιδιακές σειρές pNP31, pNP4.3L, pNP4.2 και F5/pNP31, F5/pNP4.3L και τη σύγκριση μεταξύ τους. Με τη μελέτη αυτή επιδιώκουμε να πάρουμε πληροφορίες για τον τρόπο λειτουργίας του μηχανισμού κυτταροτοξικότητας.

Αρχικά θελήσαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο τα F5 κύτταρα όταν μεταφερθούν σε δέκτες που εκφράζουν το αντιγόνο, μπορούν να το δουν και να ανταποκριθούν σε αυτό. Με πειράματα παθητικής μεταφοράς κυττάρων, δείξαμε ότι ο F5 υποδοχέας είναι ικανός να δει το NP αντιγόνο σε όποια από τις παραπάνω σειρές ελέγξαμε και να αποκριθεί σε αυτό.

Στη συνέχεια για να διαπιστώσουμε αν η κυτταροτοξική δράση των F5 κυττάρων προκαλεί κάποια βλάβη στον παγκρεατικό ιστό, όπου εκφράζεται το αντιγόνο, πραγματοποιήσαμε τεστ ανοχής στη γλυκόζη. Τα τεστ αυτά έδειξαν ότι σε κάποια ζώα (pNP31, pNP4.3L) είχαμε παθολογική καμπύλη γλυκόζης η οποία σε ότι αφορά το pNP31 παρουσίασε κάμψη μετά τους 2,5 μήνες. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι έχει ενεργοποιηθεί κάποιος μηχανισμός ανοχής στον οργανισμό, γεγονός που για να διαπιστωθεί χρειάζεται περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό ζώων και τεστ ανοχής στη γλυκόζη ακόμα περισσότερους μήνες μετά την παθητική μεταφορά κυττάρων.

Προκειμένου να μελετήσουμε τους μηχανισμούς λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων και τον τρόπο ανάπτυξης της ανοσολογικής ανοχής, προχωρήσαμε στη συγκριτική μελέτη των κυττάρων στο σπλήνα και το θύμο στα F5 και στα διπλά διαγονιδιακά ζώα (F5/pnp31-εκφράζουν ταυτόχρονα και τον υποδοχέα F5 και το αντιγόνο που αυτός αναγνωρίζει NP) τα οποία βρίσκονται όλα σε Rag1^{-/-} γενετικό υπόβαθρο. Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων αυτών, προέκυψε μείωση του επιπέδου του CD8 υποδοχέα όπως και του επιπέδου του Vβ11 στον ιστό της σπλήνας. Το γεγονός αυτό, συμφωνεί με τα

δεδομένα που είναι ως τώρα γνωστά και συγκαταλέγουν τη μείωση των επιπέδων των υποδοχέων αυτών, ως ένα μηχανισμό ανοχής (tolerance).

Εκτενέστερα ασχοληθήκαμε με την ανάλυση της σειράς pNP4.3L. Για να διαπιστώσουμε τους μηχανισμούς λειτουργίας των T κυττάρων στη σειρά αυτή, πραγματοποιήσαμε πειράματα παθητικής μεταφοράς κυττάρων από F5 δότες σε pNP4.3L αποδέκτες. Από το τεστ ανοχής στη γλυκόζη που πραγματοποιήσαμε 1 μήνα μετά, ένα μόνο ζώο εμφάνισε παθολογική καμπύλη η οποία όμως μετά τα 120 λεπτά, επανήλθε στο φυσιολογικό. Για να μπορέσουμε να βγάλουμε πιο σαφή συμπεράσματα χρειάζεται να επαναλάβουμε το τεστ 2,3,4 μήνες μετά, αλλά και να πραγματοποιήσουμε νέα πειράματα με μεγαλύτερο αριθμό ζώων.

Σαν επόμενη προσέγγιση προχωρήσαμε στην ανάλυση διπλά διαγονιδιακών ζώων για τον F5 υποδοχέα και για την πρωτεΐνη (F5 και F5/pNP4.3L). Σε ότι αφορά τη φαινοτυπική ανάλυση των ζώων αυτών, ως γενική παρατήρηση μπορούμε να πούμε πως υπάρχει μερική κυτταρική απαλοιφή η οποία είναι πιο έντονη στο αρσενικό σε ότι αφορά τον κυτταρικό πληθυσμό της σπλήνας. Το γεγονός αυτό, μαρτυρά κάποια ενδεχόμενη μεταβλητότητα μέσα στον πληθυσμό, μεταξύ αρσενικών και θυληκών ατόμων παρατήρηση που πρέπει να εξεταστεί εκτενέστερα με περισσότερα πειράματα.

Για να μελετήσουμε το βαθμό ενεργοποίησης καθώς και τη δυνατότητα επαν-ενεργοποίησης των αυτοδραστικών F5T λεμφοκυττάρων *in vitro* +/-IL2 και με διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου, εφαρμόσαμε τη μέθοδο του proliferation. Όλα τα κύτταρα απαντούν στο πεπτίδιο και πιο συγκεκριμένα στις ψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού. Η απάντηση στο πεπτίδιο είναι εντονότερη παρουσία IL-2. Επομένως, όλα τα κύτταρα παρουσιάζουν ικανότητα επαν-ενεργοποίησης, γεγονός που μαρτυρά ότι δεν βρίσκονται σε άνεργη κατάσταση.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν το φάρμακο streptozotocin αφενός προκαλεί διαβήτη στο στέλεχος C57/BL10 και αφετέρου αν ο TNF έχει κάποιο ρόλο στη διαδικασία αυτή. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να αποκτήσουμε ένα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη του μηχανισμού της ανάπτυξης του αυτοάνοσου διαβήτη με τη χρήση της streptozotocin και να καθορίσουμε αν το φαινόμενο αυτό σχετίζεται άμεσα με μηχανισμούς λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων. Πράγματι το φάρμακο αυτό είναι λειτουργικό στα στελέχη C57/BL10 και TNF-/-, στο πρώτο όταν χορηγείται σε υψηλή δόση και στο δεύτερο όταν χορηγείται σε χαμηλή δόση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι ενέσεις πραγματοποιούνται διαδοχικά στα ζώα. Ο παράγοντας χρόνος είναι πάρα πολύ σημαντικός σε αυτή την πειραματική μέθοδο, λόγω της αστάθειας του φαρμάκου το οποίο

όπως έχει αναφερθεί έχει χρόνο ημιζωής 5-15 λεπτά και είναι και αρκετά φωτοευαίσθητο. Για να διαπιστωθεί επομένως αν όντως ισχύει κάτι τέτοιο, το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί με μεγαλύτερο αριθμό ζώων και η σειρά των ενέσεων να εναλλάσσεται μεταξύ ενός C57/BL10 και ενός TNF-/-.

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη φαινοτυπική ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών της σπλήνας, του θύμου, των λεμφαδένων και των πυλωρικών λεμφαδένων, του ζώου που έχει εμφανίσει υπεργλυκαιμία σε σύγκριση με ένα φυσιολογικό που δεν έχει δεχθεί το φάρμακο, συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας στα οποία αναφέρεται η τοξική δράση της streptozotocin στον κυτταρικό πληθυσμό του θύμου και περιφερικών λεμφικών οργάνων (Joslin's diabetes mellitus 13th edition).

Η μελέτη αυτού του συστήματος θα μας επιτρέψει να διαπιστώσουμε τη συμμετοχή των T λεμφοκυττάρων στη διαδικασία ανάπτυξης του σακχαρώδη διαβήτη και να εφαρμόσουμε το μοντέλο αυτό στη μελέτη του μηχανισμού της κυτταροτοξικότητας στο μοντέλο του υποδοχέα F5TCR και του αντιγόνου NP.

Στην μελέτη της απόκρισης των T λεμφοκυττάρων και των μηχανισμών λειτουργίας τους, εστιάστηκε το τρίτο μέρος της εργασίας αυτής, του οποίου ένα μέρος πραγματοποιήθηκε κατά την εκπόνηση της πρακτικής άσκησης (rotation). Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η δημιουργία κατάλληλης κατασκευής (construct), η οποία θα περιέχει το γονίδιο μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης (DsRED) καθώς και όλες τις απαραίτητες ρυθμιστικές περιοχές που απαιτούνται για την έκφραση αυτής στα T λεμφοκύτταρα. Τα διαγονιδιακά ζώα που προέκυψαν και είχαν την κατασκευή αυτή αναλύθηκαν με τη μέθοδο FACS και τη μικροσκοπία confocal για να διαπιστωθεί η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής και σε ποια κύτταρα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας ήταν θετικό. Τα T λεμφοκύτταρα φαίνεται να εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή ωστόσο δεν φαίνεται να την εκφράζουν όλα. Από την κυτταρομετρία ροής και τη μικροσκοπία confocal, πιο ευδιάκριτα είναι τα κύτταρα των λεμφαδένων, σε ότι αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης DsRED.

Τα διαγονιδιακά αυτά ζώα που εκφράζουν την πρωτεΐνη DsRED στα T λεμφοκύτταρα, αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των μηχανισμών λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων. Τέτοιου είδους διαγονιδιακά ζώα έχουν πολλές προοπτικές για το μέλλον. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές in vivo απεικόνισης, όπου μπορούμε να παρακολουθούμε τα T λεμφοκύτταρα οπουδήποτε και αν βρίσκονται μέσα στον οργανισμό in vivo, πως αυτά αποκρίνονται σε ένα ερέθισμα καθώς και πως συμπεριφέρονται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

5. Βιβλιογραφία

- 1) **Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Watson James D.**, *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*, 3rd edition, 1229-1246.
- 2) **Anderson C.C. and P. Matzinger**, 2000, Danger: the view from the bottom to the cliff. *Semin Immunol* 12:231-238.
- 3) **Bach J.F.**, 1995, Insulin-dependent diabetes mellitus as a beta-cell targeted disease of immunoregulation. *J Autoimmunity* 8:439-463.
- 4) **Baird Geoffrey S., Zacharias David A. and Tsien Roger Y.**, 2000, Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral, *PNAS*, Vol 97, pg 11984-11989.
- 5) **Barbara, J.A., X. Van ostade, and A. Lopez.** 1996. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol* 74, no. 5:434.
- 6) **Baxter, G.T., R.C. Kuo, O.J. Jupp, P. Vandenabeele, and D.J. MacEwan.** 1999. Tumor necrosis factor-alpha mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem* 274, no. 14:9539.
- 7) **Cahalan, M. D., I. Parker, et al.** (2003). "Real-time imaging of lymphocytes in vivo." *Curr Opin Immunol* 15(4): 372-7.
- 8) **Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson.** 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, no. 9:3666.
- 9) **Christen Urs, Richard Flavell et al**, 2001, A dual role for TNFa in type 1 diabetes: islet specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *Journal of Immunology*, 7023-7032.
- 10) **Cope, A.P., R.S. Liblau, X.D. Yang, M. Congia, C. Laudanna, R.D. Schreiber, L. Probert, G. Kollias, and H.O. McDevitt.** 1997. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med* 185, no. 9:1573.
- 11) **Douni, E., K. Akassoglou, L. Alexopoulou, S. Georgopoulos, S. Haralambous, S. Hill, G. Kassiotis, D. Kontoyiannis, M. Pasparakis, D. Plows, L. Probert, and G. Kollias.** 1995. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 47, no. 1-2:27.

- 12) **Davidson, A. and B. Diamond** (2001). "Autoimmune diseases." *N Engl J Med* **345**(5): 340-50.
- 13) **Green EA, Flavell RA.** 2000. The temporal importance of TNFalpha expression in the development of diabetes. *Immunity*. 12(5):459-69.
- 14) **Gross Larry A., Baird Geoffrey S. et al, 2000,** The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral, *PNAS*, Vol 97, pg 11990-11995.
- 15) **Heller, R.A., and M. Kronke.** 1994. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 126, no. 1:5.
- 16) **Holstad Maria and Stellan Sandler,** 2001, A transcriptional inhibitor of TNFa prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice, *Journal of Autoimmunity*, 16:441-447.
- 17) **Janeway C. et al.** 2001 *Immunobiology*. Garland Publishing.
- 18) **Jones, E.Y, D.I. Stuart, and N.P. Walker.** 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, no. 6212:225.
- 19) **Kahn C. Ronald and Weir C. Gordon,** *Joslin's Diabetes Mellitus*, 13th edition.
- 20) **Kamradt, T. and N. A. Mitchison** (2001). "Tolerance and autoimmunity." *N Engl J Med* **344**(9): 655-64.
- 21) **Like A. Arthur and Rossini A. Aldo** (1976). "Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus." *Science* : 415-417.
- 22) **Mamalaki C, T. Norton, et al.** (1992). "Thymic depletion and peripheral activation of class I major histocompatibility complex-restricted T cells by soluble peptide in T-cell receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11342-6.
- 23) **Marchant Jonathan S, Stutzmann Grace E. et al,** 2001, Multiphoton-evoked color change of DsRed as an optical highlighter for cellular and subcellular labelling, *Nature Biotechnology*, Vol 19, pg 645-649.
- 24) **Ntziahristos Vasilis et al,** 2002, In vivo Tomographic Imaging of Near-Infrared fluorescent probes, Vol 1, pg 82-88.
- 25) **O'Shea, JJ, Ma, A, Lipsky, P.** 2001. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, no. 2:37.
- 26) **Pakala SV, Chivetta M, Kelly CB, Katz JD.** 1999, In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 189:1053-1062.
- 27) **Rothe H, Fehsel K, Kolb H,** 1990, Tumour necrosis factor alpha production is upregulated in diabetes prone BB rats, *Diabetologia*, 33:573-575.

- 28) Spanopoulou, E., C.A. Roman, L.M. Corcoran, M.S. Schlissel, D.P. Silver, D. Nemazee, M.C. Nussenzweig, S.A. Shinton, R.R. Hardy, and D. Baltimore.** 1994. Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice. *Genes Dev* 8, no. 9:1030.
- 29) Thorvaldson Lina, Holstad Maria, Sandler Stellan.** 2003, Cytokine release by murine spleen cells following multiple low dose streptozotocin-induced diabetes and treatment with a TNF α transcriptional inhibitor, *International Immunopharmacology* 3: 1609-1617.
- 30) Zhang Yiqun, Bronwyn O'Brien, Jacqueline Trudeau, Rusung Tan, Pere Santamaria, Jan P. Dutz,** 2002, In situ β cell death promotes priming of diabetogenic CD8 T lymphocytes, *Journal of Immunology*, 1466-1472.
- 31) Zhumabekov Talgat et al,** 1995, Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice, *Journal of Immunological Methods*, vol 185, pg 133-140.