

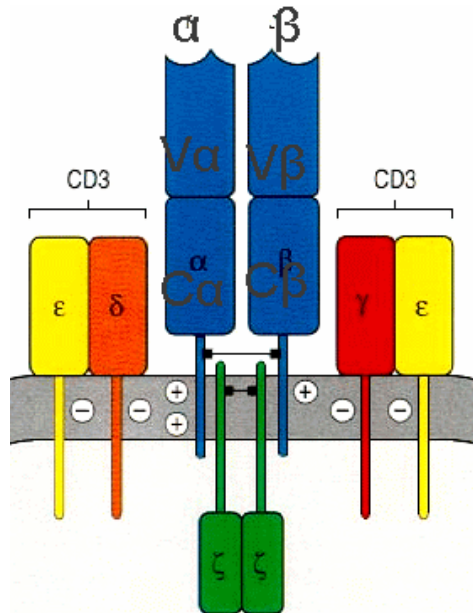
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Διαφοροποίηση και Ανάπτυξη T λεμφοκυττάρων

Τα T λεμφοκύτταρα κυριαρχούν στην κυτταρική ανοσοαπάντηση ενός θηλαστικού. Αυτή η απάντηση καθορίζεται από την αναγνώριση του αντιγονικού πεπτιδίου, όταν αυτό είναι συμπλεγμένο με μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC I και MHC II, από τον αντιγονικό υποδοχέα του T κυττάρου.

Ο T υποδοχέας στα ώριμα λεμφοκύτταρα συνδέεται με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα CD3 που μεταδίδει σήματα από τον υποδοχέα στο εσωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 1). Επίσης ο T υποδοχέας συνεργάζεται με τον συνυποδοχέα CD8 ή CD4, στην αναγνώριση του συμπλόκου MHC-αντιγόνο.

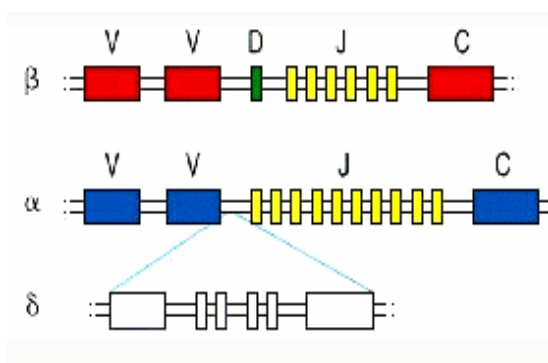
Ωριμα T κύτταρα που ο υποδοχέας τους αναγνωρίζει πεπτίδιο με τάξης I MHC μόρια ονομάζονται T-κυτταροτοξικά και εκφράζουν CD8 συνυποδοχέα, ενώ T κύτταρα που ο υποδοχέας τους αναγνωρίζει πεπτίδιο με τάξης II MHC μόρια ονομάζονται T-βοηθοί και εκφράζουν CD4 συνυποδοχέα.



Εικόνα 1. Δομή του T υποδοχέα μη ομοιοπολικά συμπλεγμένου με το μόριο CD3. Διακρίνονται οι δύο αλυσίδες α και β, οι μεταβλητές και σταθερές περιοχές των καθώς και οι υπομονάδες του CD3

Ο αβ T υποδοχέας αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, που ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών, την α και τη β. Η α αλυσίδα αποτελείται από τα τμήματα Vα, Jα και Cα, ενώ η β από τα τμήματα

V β , D β , J β και C β . Τα τμήματα αυτά δεν είναι συνεχή στο επίπεδο του γενωμικού DNA αλλά απέχουν μερικές χιλιάδες βάσεις. Το ίδιο ισχύει και για την βαριά και ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών, αλλά και για τις γ , δ , αλυσίδες ενός άλλου υποδοχέα που φέρει μια μειοψηφία T κυττάρων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Απλουστευμένη απεικόνιση γαμετικής σειράς των γενετικών τόπων των α και β αλυσίδων. Υπάρχουν ~50 V β τμήματα, 2 D β , 14 J β , και 2 C β , ενώ για την α αλυσίδα, 35 V α , 50 J α και 2 C α τμήματα. Ο γενετικός τόπος της δ αλυσίδας του $\gamma\delta$ T υποδοχέα βρίσκεται μέσα στο γενετικό τόπο της α .

Η διάταξη αυτή ονομάζεται απεικόνιση γαμετικής σειράς (germline configuration). Για τη δημιουργία λειτουργικού T υποδοχέα είναι απαραίτητο τα τμήματα αυτά να έρθουν σε γειννία. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται V(D)J ανασυνδυασμός και ρυθμίζεται με χρονικό και κυτταροειδικό τρόπο. Αυτό σημαίνει ότι στα T κύτταρα ανασυνδυάζονται μόνο ο α και ο β γενετικός τόπος (και όχι οι τόποι των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών), και ότι αυστηρά ανασυνδυάζεται πρώτα η β και μετά η α αλυσίδα. Οι ανασυνδυασμοί αυτών των γενετικών τόπων έχουν συνδεθεί με σύγχρονη μεταγραφική δραστηριότητα που επάγεται από μεταγραφικούς υποκινητές ή ενισχυτές (enhancers) (Villey et al., 1996), η οποία ανοίγει τις δομές χρωματίνης και κάνει τον τόπο προσβάσιμο στους παράγοντες του ανασυνδυασμού (Yancopoulos et al., 1986).

Τα T λεμφοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα στελέχη, του μυελού των οστών. Αυτά μεταναστεύουν στο θύμο αδένι όπου προχωράει η ανάπτυξη και διαφοροποίησή τους.

Τα άωρα τούτα θυμοκύτταρα δεν εκφράζουν στην επιφάνειά τους CD4 ή CD8 και ονομάζονται διπλά αρνητικά (double negative) κύτταρα. Επίσης δεν εκφράζουν T υποδοχέα και CD3. Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τους αρχίζει ο ανασυνδυασμός της β αλυσίδας. Αρχικά έρχονται σε γειννία τα τμήματα D β -J β , και κατόπιν ενώνεται με αυτά το τμήμα V β . Το ενεργό εξόνιο

V-D-J που έχει σχηματιστεί, ματίζεται (splices) με τη σταθερή περιοχή Cβ Αν ο ανασυνδυασμός είναι παραγωγικός, δηλ. παραχθεί β αλυσίδα, αυτή εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μία «αναπληρώτρια» α αλυσίδα (pTα). Αυτός ο προ-υποδοχέας που σχηματίζεται δίδει τα απαραίτητα σινιάλα για να σώσει το κύτταρο από προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Groettrup et al., 1993). Η έκφραση του προ-υποδοχέα επάγει εκτεταμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έκφραση του μορίου CD3 σε χαμηλά επίπεδα, των CD4 και CD8 στο ίδιο κύτταρο (στάδιο διπλά θετικών κυττάρων), αλλά, και την απαρχή του ανασυνδυασμού του γενετικού τόπου της α αλυσίδας, ο οποίος περιλαμβάνει μόνο ένα γεγονός ανασυνδυασμού (Vα-Jα ανασυνδυασμός και μάτισμα του ενεργού εξονίου με τη Cα). Βλέπουμε τη σημασία του ανασυνδυασμού της β αλυσίδας στην ανάπτυξη των T κυττάρων, αν και υπάρχουν μελέτες που αποσυνδέουν τις δύο αυτές διεργασίες (Tourigny et al., 1997, Guidos et al., 1995). Αν υπάρχει παραγωγικός ανασυνδυασμός της α αλυσίδας, τότε έχουμε έκφραση του T υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου σε χαμηλά επίπεδα και σε αυτό το στάδιο αυξάνει η έκφραση των μορίων CD4, CD8. Αυτά τα κύτταρα αποτελούν ~80 % των θυμοκυττάρων αλλά τα περισσότερα από αυτά θα πεθάνουν. Θα ζήσουν μόνο όσα μπορούν να αναγνωρίσουν μόρια ιστοσυμβατότητας MHC του εαυτού συμπλεγμένα με πεπτίδιο (θετική επιλογή). Όσα κύτταρα επιβιώσουν ωριμάζουν αυξάνοντας τα επίπεδα του T υποδοχέα και του CD3, και σταματώντας την έκφραση ενός από τα CD4, CD8 αναλόγως αν ο T υποδοχέας αναγνωρίζει τάξης I ή II MHC μόρια αντίστοιχα. Τα T κύτταρα επίσης υφίστανται και την αρνητική επιλογή όπου απαλείφονται κύτταρα δραστικά για πεπτίδια του εαυτού. Όσα T κύτταρα επιβιώσουν από τις δύο αυτές επιλογές, εισέρχονται στη λεμφική κυκλοφορία και μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα (σπλήνα, λεμφαδένες, αμυγδαλές κλπ) (Janeway Travers, 1996).

Ανάπτυξη ανοσολογικής ανοχής στα T κύτταρα

Το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών πρέπει με ειδικό τρόπο να αναγνωρίζει και να εξολοθρεύει τους εισβολείς αλλά συγχρόνως πρέπει να

αποτρέπει την καταστροφή του ξενιστή (εαυτού). Η παραγωγή μεγάλου αριθμού διαφορετικών αντιγονικών ειδικοτήτων το βοηθάει να αντιμετωπίζει την ποικιλότητα των αντιγόνων των ιών και των μικροβίων. Επειδή όμως η πληθώρα των αντιγονικών υποδοχέων δημιουργείται από τυχαίους μηχανισμούς, όπως ο V(D)J ανασυνδυασμός, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει εξελιχθεί έτσι ώστε να διασφαλίζεται από τη δράση λεμφοκυττάρων που κατά τύχη εκφράζουν ένα αυτοδραστικό υποδοχέα.

Ο θύμος, όπως είδαμε παραπάνω, είναι το πρωτογενές λεμφικό όργανο στο οποίο άωρα πρώιμα κύτταρα αναπτύσσονται σε ώριμα T κύτταρα. Είναι επίσης το μέρος που άωρα T κύτταρα που εκφράζουν αυτοδραστικό T υποδοχέα, εξολοθρεύονται. Ένα διπλά θετικό θυμοκύτταρο που εκφράζει ένα υποδοχέα με συγγένεια για σύμπλοκο πεπτιδίου εαυτού-MHC μόριο θα επιλεγεί θετικά, και θα συνεχίσει τη διαδρομή του από το φλοιό στο μυελό του θύμου. Οι πληθυσμοί των θετικά επιλεγμένων T λεμφοκυττάρων περιλαμβάνουν και κύτταρα που έχουν μεγάλη απληστία (avidity) για σύμπλοκα πεπτιδίου εαυτού-MHC μόρια τα οποία εκφράζονται από τα αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα στο θύμο. Αυτά τα T κύτταρα είναι αυτοδραστικά και απαλείφονται μέσω αποπτωτικών διαδικασιών (αρνητική επιλογή). Πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν μόνο ένα είδος T υποδοχέα στα κύτταρά τους και συγχρόνως εκφράζουν ενδογενώς το αντιγόνο που αυτός αναγνωρίζει έδειξαν ότι αυτή η κλωνική απαλοιφή (clonal deletion) μπορεί να γίνει σε ένα πρώιμο διπλά θετικό στάδιο στο φλοιό του θύμου ή σε ένα μεταγενέστερο στο μυελό. Το πού θα γίνει η απαλοιφή των αυτοδραστικών κυττάρων εξαρτάται από τι είδος κύτταρα παρουσιάζουν το αντιγόνο. Έτσι αν το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC παρουσιάζεται από επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού, η απαλοιφή θα γίνει στο φλοιό, ενώ αν παρουσιάζεται από δενδριτικά κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει από το μυελό των οστών στο θύμο, η απαλοιφή θα γίνει στο μυελό του θύμου.

Όσα κύτταρα επιβιώσουν από την αρνητική επιλογή, αποικίζουν τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Όμως επειδή δε εκφράζονται ή δεν έχουν πρόσβαση όλα τα αντιγόνα εαυτού στο θύμο, θα υπάρχουν στα περιφερικά όργανα και αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα. Το ανοσοποιητικό σύστημα θα πρέπει να καταστείλει ή να απαλείψει τη δραστηριότητά τους ενώ συγχρόνως

να επιτρέπει στους υπόλοιπους κλώνους T κυττάρων να αποκρίνονται θετικά όταν έρχονται σε επαφή με ξένα αντιγόνα (Mondino et al., 1996).

Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια για την αδρανοποίηση/εξουδετέρωση των αυτοδραστικών κλώνων στα περιφερικά όργανα. Το ένα μονοπάτι οδηγεί σε απαλοιφή, μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, κυττάρων που συνάντησαν το αντιγόνο, και το άλλο μονοπάτι φέρει τα κύτταρα σε κατάσταση που δεν αποκρίνονται στο αντιγόνο (δηλ. δεν ενεργοποιούνται), και που ονομάζεται ανεργία (anergy). Τα άνεργα κύτταρα, όπως έχει δειχθεί κυρίως σε διαγονιδιακά μοντέλα, μπορεί είτε να έχουν φυσιολογικό φαινότυπο είτε να έχουν χαμηλή έκφραση T υποδοχέα, CD8 ή και των δύο (Rocha and von Boehmer, 1991).

Αν ένα T κύτταρο που πέρασε το φράγμα της αρνητικής επιλογής συναντήσει έναν επίτοπο στον οποίο μπορεί να αντιδράσει, αυτό δε σημαίνει και την άμεση ενεργοποίησή του, αλλά χρειάζονται και άλλα, συν-διεγερτικά, σήματα πέρα από τη δέσμευση του υποδοχέα στο σύμπλεγμα πεπτιδίου-MHC μόριο. Τέτοια σήματα είναι η αλληλεπίδραση του CD4 ή CD8 με τα τάξης II ή τάξης I μόρια αντίστοιχα, και η δέσμευση επιφανειακών μορίων του T κυττάρου με επιφανειακά μόρια αντιγονοπαρουσιάζοντων κυττάρων. Τα αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα έχουν συν-διεγερτικές ιδιότητες για T κύτταρα, που δεν έχουν άλλα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης και της έκκρισης κυτοκινών (οι τελευταίες εκκρίνονται και από T κύτταρα). Ένα σημαντικό μονοπάτι για τη συν-ενεργοποίηση του T κυττάρου, μετά τη δέσμευση του αντιγόνου, ξεκινάει από τη δέσμευση του B7.1 ή B7.2 μορίου των αντιγονοπαρουσιάζοντων κυττάρων με το CD28 μόριο του T υποδοχέα.

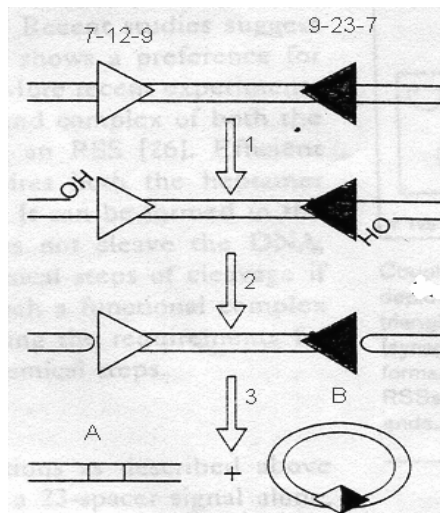
Διέγερση του T κυττάρου μέσω της αναγνώρισης T υποδοχέα-αντιγόνου, χωρίς να παρέχονται τα συν-διεγερτικά σήματα, οδηγεί το κύτταρο σε ανεργία. Επιπλέον πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι συν-διεγέρτες, όπως τα B7 μόρια, μπορούν να μεταδώσουν στο T κύτταρο τόσο ενεργοποιητικά όσο και κατασταλτικά σήματα. Το B7 μπορεί να δεσμευθεί και από το CTLA-4 μόριο των T κυττάρων, ένα ομόλογο του CD28, που συνδέεται όμως με το B7 με μεγαλύτερη συγγένεια. Το CTLA-4 λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής των ανοσοαπαντήσεων, και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη εγκαθίδρυση της ανοσολογικής ανοχής απέναντι σε αντιγόνα εαυτού στα περιφερικά όργανα, όσο και στη ρύθμιση των φυσιολογικών

ανοσοαπαντήσεων των T κυττάρων (Bluestone, 1997, Perez et al,1997). Μένουν όμως να διευκυνθούν τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης που ξεκινούν από το CTLA-4, αλλά πιθανώς και τελείως καινούρια μονοπάτια (Quill, 1996) που οδηγούν και διασφαλίζουν την περιφερική ανοσολογική ανοχή και συγκεκριμένα την ανεργία.

Μηχανισμός και ενζυμολογία του V(D)J ανασυνδυασμού

Οι μηχανισμοί και η ενζυμολογία του ανασυνδυασμού δεν έχουν πλήρως αποσαφηνισθεί. Σημαντικό ρόλο στην ειδικότητα (specificity) του ανασυνδυασμού παίζουν αλληλουχίες που περιστοιχίζουν τα τμήματα V, D, J και ονομάζονται αλληλουχίες σινιάλα του ανασυνδυασμού (RSS:Recombination Signal Sequences). Αυτές αποτελούνται από ένα πολύ συντηρημένο επταμερές, ένα λιγότερο συντηρημένο εννιαμερές και μια ενδιάμεση αλληλουχία 12 ή 23 βάσεων. Ανασυνδυασμός είναι δυνατός μόνο μεταξύ τμημάτων που φέρουν το μεν ένα 12μερή, το δε άλλο 23μερή ενδιάμεση αλληλουχία, κάτι που είναι γνωστό σαν ο κανόνας 12/23. Έτσι οι πιθανότητες ανασυνδυασμού περιορίζονται μόνο σε παραγωγικούς ανασυνδυασμούς δηλ. δεν είναι δυνατοί οι ανασυνδυασμοί V-V, J-J κλπ. που θα έδιναν ανώμαλα προϊόντα (Lewis, 1994).

Στα αρχικά στάδια του ανασυνδυασμού εισάγονται εγκοπές στα 5' άκρα των επταμερών αφήνοντας ένα 3'-OH στη κωδικοποιούσα πλευρά και μία 5'-P ομάδα στην πλευρά του σινιάλου. Στο επόμενο βήμα το 3'-OH προσβάλλει μία φωσφορική ομάδα στην απέναντι έλικα δημιουργώντας μια φουρκέτα (hairpin) στην κωδικοποιούσα άκρη, και ένα λείο σπάσιμο DNA (blunt double strand break), στο άκρο της αλληλουχίας σινιάλου (Ramsden et al.,1997, Eastman et al., 1996, Εικόνα 3). Αυτός ο μηχανισμός παρουσιάζει ομοιότητες



Εικόνα 3. Τα στάδια του V(D)J ανασυνδυασμού σε αδρές γραμμές. Στο στάδιο 1 έχουμε εγκοπή του DNA, στο επταμερές, στο στάδιο 2 γίνεται ο σχηματισμός φουρκετών και λείων άκρων και στο στάδιο 3 πραγματοποιείται η επιδιόρθωση του DNA. Τα τρίγωνα ενδεικνύουν τις αλληλουχίες σινιάλα του ανασυνδυασμού.

με τη μετάθεση DNA (transposition) ορισμένων βακτηριοφάγων και ρετροϊών (Craig, 1996). Για παράδειγμα στη μετάθεση του βακτηριοφάγου Mu (Mizzuchi et al., 1991) και στην ενσωμάτωση του HIV (Engelman et al., 1991) στο γένωμα γίνεται παρόμοια αντίδραση μετεστεροποίησης, με το 3'-OH άκρο του μεταθετού στοιχείου να προσβάλλει το DNA-στόχο, δίνοντας πολύ συχνά ενδιάμεσες δομές φουρκέτας. Επιπλέον μεταθετά στοιχεία όπως το Tc1 και Tc3 από τον *C.elegans* και το Uhu από τη *D.melanogaster* έχουν τελικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομοιότητες με το επταμερές και συχνά και το εννιαμερές των RSS. (Vink et al., 1991)

Μετά το σχηματισμό φουρκετών τα περαιτέρω στάδια ανασυνδυασμού περιλαμβάνουν το άνοιγμα της φουρκέτας από δραστικότητα ενδονουκλεάσης, προσθήκη τυχαίων (non template) δεοξυνουκλεοτιδίων, που ονομάζονται N νουκλεοτίδια, από την τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT), και τέλος επιδιόρθωση του DNA (Στάδιο 3 στην Εικόνα 3). Αυτά τα τελευταία στάδια ανασυνδυασμού μεσολαβούνται από μία σειρά πρωτεϊνών που εκφράζονται σε όλους τα κυτταρικούς τύπους, και περιλαμβάνουν συστατικά της μηχανής επιδιόρθωσης σπασιμάτων διπλής έλικας (Double Strand Break:DSB) (Taccioli et al., 1995). Σε αυτά κυρίαρχο ρόλο παίζει το πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξαρτώμενης από DNA πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-dependent protein kinase). Αποτελείται από την καταλυτική της υπομονάδα, DNA-PKcs, το ετεροδιμερές Ku, και το προϊόν του γονιδίου *XRCC4*. Το ετεροδιμερές Ku αποτελείται από τις Ku70 και Ku86 υπομονάδες που δεσμεύονται σε αλλαγμένες δομές DNA, όπως εγκοπές, φουρκέτες, δίκλινα

σπασίματα κλπ (Taccioli et al., 1994). Επιπλέον το Ku φαίνεται να παίζει ρόλο στην προσθήκη των N νουκλεοτιδίων από τη TdT, ίσως με το να διευκολύνει την αλληλεπίδραση της TdT με τα ενδιάμεσα προϊόντα του ανασυνδυασμού (Bogue et al., 1997). Η πρωτεΐνη XRCC4 αλληλεπιδρά με τη DNA λιγάση IV, και μόνο αυτό το σύμπλοκο μπορεί να συνδέσει τα άκρα του DNA στο τελικό στάδιο του ανασυνδυασμού (Grawunder et al., 1997). Η DNA-PKcs είναι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη στη βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια στο ποντίκι (Severe Combined Immune Deficiency), που χαρακτηρίζεται από γενική ανικανότητα επιδιόρθωσης σπασισμάτων δίκλωνου DNA και φυσικά από ατελή V(D)J ανασυνδυασμό (Blunt et al., 1995).

Τα τελικά προϊόντα του V(D)J ανασυνδυασμού είναι, αφενός ενωμένες κωδικές περιοχές με μη ακριβείς συνδέσεις-λόγω των N νουκλεοτιδίων-και αφετέρου κυκλικά μόρια που περιέχουν την ενδιάμεση περιοχή που εκτέμνεται κατά τον ανασυνδυασμό, και συνδέονται στα άκρα των περιοχών σινιάλου με ακριβείς συνδέσεις (Εικόνα 3). Εκτός αυτών έχουν ανιχνευθεί -ειδικά για την α αλυσίδα- άφθονα παραπροϊόντα του ανασυνδυασμού σε θυμοκύτταρα και ώριμα T κύτταρα (Livak et al., 1996).

Συμμετοχή των RAG-1 και RAG-2 στο V(D)J ανασυνδυασμό

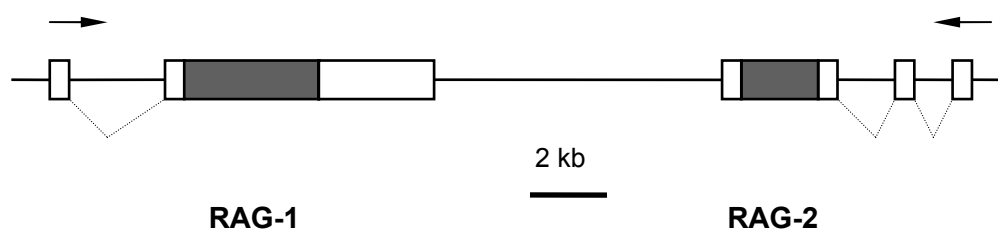
Οι προηγούμενοι παράγοντες -εκτός της TdT- εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα, και όμως V(D)J ανασυνδυασμός γίνεται μόνο σε λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκυτταρο-ειδικά συστατικά της V(D)J ρεκομπινάσης, είναι δύο πρωτεΐνες, η RAG-1 και η RAG-2 που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια, τα οποία είναι γειτονικά στο γένωμα-απέχουν ~8 χιλιάδες βάσεις.

Ο RAG γενετικός τόπος βρέθηκε με διαμολύνσεις ινοβλαστών με γενωμικούς κλώνους και έλεγχο για δραστικότητα ρεκομπινάσης. Οι ινοβλάστες, που φυσιολογικά δεν κάνουν V(D)J ανασυνδυασμό, είχαν διαμολυνθεί και με πλασμίδιο υπόστρωμα του ανασυνδυασμού (Schatz et al., 1988, 1989). Από πληθώρα και άλλων πειραματικών παρατηρήσεων βρέθηκε ότι τα RAG-1 και RAG-2 είναι απαραίτητα και επαρκή για τα αρχικά στάδια ανασυνδυασμού, δηλαδή τη δημιουργία εγκοπών και το σχηματισμό φουρκετών. Τέτοια πειράματα περιλάμβαναν δοκιμασίες συμπληρωματικότητας για ανασυνδυασμό σε διάφορες κυτταρικές σειρές

όπως εμβρυικά ηπατώματα, CHO (chinese hamster ovary) κύτταρα, L κύτταρα κ.ά.. Επιπλέον τα αρχικά στάδια του ανασυνδυασμού έχουν αναπαραχθεί *in vitro* με χρήση καθαρών RAG-1 και RAG-2 πρωτεϊνών (van Gent et al., 1995, 1996). και πρόσφατα ο πλήρης V(D)J ανασυνδυασμός έχει ανασυσταθεί σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων (Ramsden et al., 1997).

Πειράματα με καθαρές πρωτεΐνες έδειξαν ότι η RAG-1 και η RAG-2 σε κατάλληλα υποστρώματα ανασυνδυασμό και παρουσία Mg^{2+} επιβεβαιώνουν τον κανόνα 12/23 (van Gent et al., 1996b). Η ειδικότητα καθαρών πρωτεϊνών RAG-1 και RAG-2 μπορεί να αυξηθεί αν συνυπάρχουν ολόκληρα κυτταρικά εκχυλίσματα. Επιπλέον πρωτεΐνες που κάμπτουν το DNA όπως οι HMG1, HMG2 και η προκαρυωτική HU, όταν προστεθούν στις RAG-1-RAG-2 ενισχύουν την αποτελεσματικότητα δημιουργίας εγκοπών και το σχηματισμό φουρκετών σύμφωνα με τον κανόνα 12/23 (Sawchuck et al., 1997). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η HU παίζει ρόλο στη μετάθεση του φάγου Mu, ένα ακόμα στοιχείο που συνδέει τη μετάθεση αυτή με το V(D)J ανασυνδυασμό.

Το RAG-1 γονίδιο αποτελείται από δύο εξόνια και ένα ιντρόνιο. Το cDNA του έχει μήκος 6.6 χιλιάδες βάσεις, και το πρώτο εξόνιο περιέχει μόνο μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες (Oettinger et al., 1990) (Εικ.4). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει μήκος 1043 αμινοξέα στον άνθρωπο και 1040 αμινοξέα στο ποντίκι, ενώ έχει κλωνοποιηθεί και στο κοτόπουλο, στο *Xenopus*, στο *Zebrafish* και αλλού. Η συντήρησή της σε αυτά τα απομακρυσμένα είδη είναι 70%-90% σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Να σημειωθεί ότι μεταξύ των γονιδίων RAG-1 και RAG-2 δεν υπάρχει ομολογία, κάτι που υποδηλώνει τη διαφορετική βιοχημική τους δραστηριότητα.

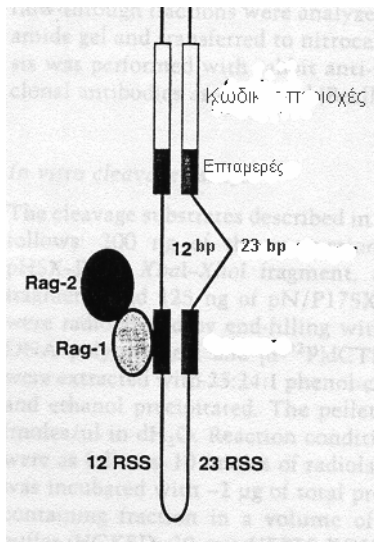


Εικόνα 5. Ο γενωμικός τόπος των RAG-1 και RAG-2 γονιδίων. Τα παραλληλόγραμμα είναι εξόνια, από τα οποία τα σκιασμένα είναι κωδικές περιοχές. Το RAG-1 γονίδιο έχει 2 εξόνια, ενώ το RAG-2 έχει αρκετά μη μεταφραζόμενα εξόνια στο 5' άκρο του από τα οποία δείχνονται μόνο 2. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής για κάθε γονίδιο.

Οι πρωτεΐνες RAG-1 και RAG-2 εκφράζονται σε αναπτυσσόμενα T και B κύτταρα στο θύμο και στο μυελό των οστών αντίστοιχα. Για το θύμο έχει βρεθεί ότι σε όλα τα θυμοκύτταρα του φλοιού του θύμου εκφράζεται mRNA των πρωτεϊνών αυτών. Στο μυελό όμως του θύμου, ανιχνεύεται RAG έκφραση μόνο στον υποπληθυσμό των διπλά θετικών κυττάρων και όχι σε αυτό των απλά θετικών. Ο τερματισμός της έκφρασης των RAG-1, RAG-2 φαίνεται ότι γίνεται κατά την θετική και αρνητική επιλογή, και μεσολαβείται από τις αλληλεπιδράσεις του T υποδοχέα με το σύμπλεγμα MHC-αντιγόνο που μεταγουν σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω του CD3. (Turka et al., 1991)

Παραπάνω φάνηκε αναγκαιότητα των RAG-1, RAG-2 στα αρχικά στάδια του ανασυνδυασμού. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι δύο αυτές πρωτεΐνες ασκούν τη δράση τους πάνω στα υποστρώματα ανασυνδυασμού μόλις πρόσφατα άρχισαν να αποσαφηνίζονται.

Το σύμπλοκο RAG-1—RAG-2 κόβει αποτελεσματικά το DNA μόνο παρουσία ακέραιου επταμερούς και εννιαμερούς της αλληλουχίας σινιάλου, κάτι που υπονοεί ότι το σύμπλοκο αυτό έχει δραστικότητα δέσμευσης DNA. Με σύστημα ενός υβριδίου που ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης αλλά και με surface plasmon resonance βρέθηκε ότι η RAG-1 πρωτεΐνη, χωρίς την παρουσία της RAG-2, μπορεί να δεσμευθεί σε αλληλουχίες σινιάλα του ανασυνδυασμού, και μάλιστα η αναγνώριση γίνεται μέσω του εννιαμερούς, ενώ το επταμερές ενισχύει αυτή τη δέσμευση. Η RAG-2 στρατολογείται στην αλληλουχία σινιάλο μόνο παρουσία της RAG-1, και η στρατολόγηση αυτή είναι πολύ πιο αποτελεσματική με 12μερή ενδιάμεση αλληλουχία από ότι με 23μερή (Εικόνα 5). Με συν-ανοσοκατακρήμνιση έχειδειχθεί ότι στα σύμπλοκα RAG-1—RAG-2 υπάρχουν 3-5 μόρια RAG-2 για κάθε μόριο RAG-1.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των αρχικών σταδίων του ανασυνδυασμού. Η RAG-1 δεσμεύεται στο εννιαμερές της αλληλουχίας σινιάλου και στρατολογεί τη RAG-2. Το επόμενο βήμα είναι η εγκοπή του DNA στα όρια του επταμερούς με την κωδική περιοχή

Η ειδική αναγνώριση του πλούσιου σε A/T εννιαμερούς γίνεται από μια επικράτεια της RAG-1 που έχει μεγάλη ομοιότητα με την τύπου ελικαστροφής-έλικας ομοιωτική δομή. Οι ομοιοεπικράτειες (homeodomains) είναι γνωστό ότι αναγνωρίζουν περιοχές DNA πλούσιες σε A/T, και αποτελούν τις DNA-δεσμεύουσες επικράτειες πρωτεϊνών που θεωρούνται σα ρυθμιστές κυτταρικής διαφοροποίησης και ανάπτυξης. Η συγκεκριμένη επικράτεια της RAG-1 είναι πολύ συντηρημένη εξελικτικά. Περιλαμβάνει τα αμινοξέα 384-477 και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την ομοιοεπικράτεια της Hin ιμβερτάσης (είναι μια ρεκομπινάση) της *S.typhimurium*, που αναγνωρίζει κι αυτή αλληλουχίες παρόμοιες με το εννιαμερές, και με την Tc1 τρανποζάση του *C.elegans*. Μάλιστα η ομοιοεπικράτεια της Hin μπορεί μερικώς να αντικαταστήσει λειτουργικά σε V(D)J ανασυνδυασμό, την αντίστοιχη της RAG-1. Βλέπουμε δηλαδή έναν ακόμα συνδετικό κρίκο μεταξύ του ανασυνδυασμού στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και του V(D)J ανασυνδυασμού.

Ελλείψεις της RAG-1 έδειξαν ότι μπορεί να αφαιρεθεί ένα μεγάλο μέρος της RAG-1 πρωτεΐνης από το αμινοτελικό της άκρο (~380 αμινοξέα), χωρίς αυτή να χάνει την ικανότητα της να φέρει σε πέρας τον ανασυνδυασμό. Αυτή η πρωτεΐνη είναι αρκετά πιο διαλυτή από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και πιο ανθεκτική στην αποικοδόμηση (Spanopoulou et al 1996, Difilippantonio et al 1996). Μάλιστα αυτή η ελλειμματική πρωτεΐνη μπορεί, σε μια ειδική κυτταρική σειρά (Abelson) να φέρει σε πέρας και ανασυνδυασμό των ανοσοσφαιρινών στο χρωμόσωμα (Roman et al., 1997). Μελέτες με αυτή την κυτταρική σειρά

έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα για ανασυνδυασμό εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης (αγρίου τύπου και ελλειμματική) ειδικά για μικρές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις φάνηκε ότι η ελλειμματική πρωτεΐνη έχει σημαντικά μικρότερη δραστικότητα ανασυνδυασμού από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (Roman et al., 1997).

Το αμινοτελικό άκρο της RAG-1 περιέχει αηλουχίες που έχουν χαρακτηριστεί σα σινιάλα για εντοπισμό της στον πυρήνα (NLS:Nuclear Localization Signals) και στον πυρηνίσκο του κυττάρου. Όμως μεταλλαγές στα σινιάλα δεν επηρέασαν σημαντικά την δραστικότητα της πρωτεΐνης στον ανασυνδυασμό πλασμιδιακών υποστρωμάτων σε κυτταρικές σειρές, ούτε υπήρξε σαφής συσχετισμός μεταξύ της δραστικότητας αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και της εντόπισής τους στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, στα 330 αμινοτελικά αμινοξέα υπάρχουν 3 μοτίβα βασικών αμινοξέων (αμινοξέα 141-146, 222-225, 243-249) τα οποία βοηθούν την αλληλεπίδραση της RAG-1 με την πρωτεΐνη SRP1. Η τελευταία μεσολαβεί στη μετάβαση πρωτεϊνών που φέρουν NLSs, στο κυτταρικό πυρήνα. Επιπλέον στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχουν άλλα 2 παρόμοια μοτίβα (αμινοξέα 826-840, 969-973), που δεν αλληλεπιδρούν με την SRP1 αλλά με την πρωτεΐνη Rch που κι αυτή είναι «συνοδός» πρωτεϊνών στο πυρήνα. Απαλοιφή των 330 πρώτων αμινοξέων της RAG-1 δεν επηρεάζει τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης αλλά επηρεάζει τον εντοπισμό της στο πυρηνίσκο. Ενδιαφέρον είναι ότι απαλοιφή του μοτίβου 826-840 εντοπίζει, σε μερικά μόνο είδη κυττάρων, την RAG-1 αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (Spanopoulou et al., 1995).

Στα πρώτα 384 αμινοτελικά αμινοξέα υπάρχουν επίσης και συντηρημένα στοιχεία κυστεΐνης-ιστιδίνης τα οποία έχουν ομολογία με δακτύλιους ψευδαργύρου, είναι απόλυτα συντηρημένα στις RAG-1 πρωτεΐνες από διαφορετικούς οργανισμούς, και η απαλοιφή μερικών από αυτά μειώνει σε μεγάλο βαθμό τη δραστικότητα της πρωτεΐνης (Roman et al., 1997).

Ο ρόλος των πρωτεϊνών RAG-1 και RAG-2 έχει μελετηθεί και σε ποντίκια που έχουν μεταλλαχθεί τα γονίδια αυτά με ομόλογο ανασυνδυασμό (knock-out). RAG-1 $-/-$ ή RAG-2 $-/-$ (ομόζυγα μεταλλαγμένα) ποντίκια, χαρακτηρίζονται από πλήρη απουσία λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια. Στο θύμο η ανάπτυξη των T κυττάρων σταματάει στο διπλά αρνητικό στάδιο, πριν

δηλαδή τον ανασυνδυασμό των γενετικών τόπων του T υποδοχέα. Όταν τέτοια μεταλλαγμένα ποντίκια φέρουν και διαγονίδια ανασυνδυασμένης β αλυσίδας τα T κύτταρα τους προχωράνε σε επόμενο αναπτυξιακό στάδιο στο θύμο (διπλά θετικά κύτταρα). Τέλος αν RAG-1 $-/-$ ή RAG-2 $-/-$ ποντίκια φέρουν διαγονιδιακή α και β αλυσίδα φτιάχνουν ένα λειτουργικό T υποδοχέα και κάνουν πλήρη ανασύσταση του φαινοτύπου των T κυττάρων τους τόσο στο θύμο όσο και στα περιφερικά λεμφικά όργανα (Mombaerts et al., 1992, Shinkai et al., 1993). Τα ποντίκια με μεταλλαγμένο ένα από τα RAG γονίδια δεν έχουν ούτε B λεμφοκύτταρα στα περιφερικά τους όργανα, ενώ στο μυελό των οστών είναι καθηλωμένα στο στάδιο των προ-B (pro-B). Αν αυτά τα ποντίκια φέρουν διαγονιδιακή ανασυνδυασμένη βαριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών (μ), τότε οι πρόδρομοι των B κυττάρων στο νωτιαίο μυελό μπορούν να περάσουν στο στάδιο των των προ-B (pre-B). Και για τα B κύτταρα ισχύει ότι η εισαγωγή συγχρόνως διαγονιδίου μ και κ ή λ αλυσίδας ανασυσταίνει πλήρως την ανάπτυξη και διαφοροποίησή τους (Spanopoulou et al., 1994).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανασυνδυασμός της α αλυσίδας του αβ υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων σε RAG-1 $-/-$ που φέρουν διαγονίδιο β αλυσίδας

Στο εργαστήριό μας είναι διαθέσιμα ποντίκια (από την κ. Ε. Σπανοπούλου που τα δημιούργησε) στα οποία το RAG-1 γονίδιο έχει καταστεί ανενεργό με ειδική (site-specific) μεταλλαγή. Σε αυτήν, μία κατασκευή εισήχθη με ομόλογο ανασυνδυασμό στο RAG-1 γονίδιο στο νουκλεοτίδιο 1084 του RAG-1 cDNA (που αντιστοιχεί στο αμινοξύ 330 της πρωτεΐνης). Η κατασκευή έφερε την κωδική περιοχή του γονιδίου ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη κάτω από τον υποκινητή της πολυγαλακτουρονάσης, σινιάλο πολυαδενυλίωσης και τερματισμού της μεταγραφής. Η ένθεση στη κωδική περιοχή του RAG-1 εισάγει και μία μεταλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσής του.

Τα ποντίκια αυτά όταν είναι ομοζυγώτες για τη μεταλλαγή (RAG-1 $-/-$) (Spanorouliou et al., 1994) δεν ανασυνδυάζουν τους γενετικούς τόπους της α και β αλυσίδας του T υποδοχέα, με αποτέλεσμα να μην έχουν ώριμα T λεμφοκύτταρα στα περιφερικά όργανα, ενώ στο θύμο τα T κύτταρα είναι καθηλωμένα στο διπλά αρνητικό στάδιο.

Επίσης είναι διαθέσιμα ποντίκια που φέρουν διαγονίδιο μίας ανασυνδυασμένης β αλυσίδας που φέρει τη μεταβλητή περιοχή Vβ11 (Mamalaki et al., 1993). Αυτά, ομόζυγα ή ετερόζυγα για το διαγονίδιο, εκφράζουν στη πλειοψηφία των T κυττάρων τους τη διαγονιδιακή β αλυσίδα, και έχουν φυσιολογικούς πληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων.

Ξεκινώντας από β διαγονιδιακό ποντίκι και RAG-1 $-/-$ ποντίκι, με κατάλληλη σειρά διασταυρώσεων και έλεγχο των γονοτύπων των απογόνων, λήφθηκαν ποντίκια που φέρουν ταυτόχρονα ομόζυγη μεταλλαγή στο RAG-1 γονίδιο και β διαγονίδιο στο ένα τους χρωμόσωμα (ποντίκια β RAG-1 $-/-$).

Όπως είδαμε, προηγούμενες πειραματικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι ποντίκια με ομόζυγες μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια RAG δεν έχουν Τ λεμφοκύτταρα στα περιφερικά λεμφικά όργανα, ακόμα και αν φέρουν ανασυνδυασμένη διαγονιδιακή β αλυσίδα (Mombaerts et al., 1992, Shinkai et al., 1993)

Όμως στο εργαστήριό μας παρατηρήθηκαν σε β RAG-1 *-/-* ποντίκια ενδείξεις για ύπαρξη Τ λεμφοκυττάρων σε περιφερικά όργανα. Για να μελετηθεί το φαινόμενο έγιναν πειράματα για εξακρίβωση του φαινοτύπου αυτών των κυττάρων, πειράματα για τη διαπίστωση ανασυνδυασμού της α αλυσίδας των κυττάρων και πειράματα για να βρεθεί το μεταγραφικό πρότυπο της RAG-1 στα θυμοκύτταρα β RAG-1 *-/-* ποντικίων.

Βρέθηκε η ύπαρξη Τ κυττάρων στο θύμο και στα περιφερικά όργανα β RAG-1 *-/-* ποντικίων, τα οποία έφεραν ανασυνδυασμένες α αλυσίδες Τ υποδοχέα. Επίσης βρέθηκαν μετάγραφα που εν δυνάμει κωδικοποιούν για μία ελλειμματική RAG-1 πρωτεΐνη, που είναι δυνατό να εξηγήσει τον ανασυνδυασμό αυτό.

Σπληνοκύτταρα β RAG-1 *-/-* ποντικίων φέρουν δείκτες Τ κυττάρων

Σπληνοκύτταρα από RAG-1 *-/-*, β RAG-1 *-/-* και β RAG-1 *+/+* ποντίκια χρώστηκαν με αντισώματα αντι-CD4 και αντι-CD8 για τους αντίστοιχους δείκτες. Επίσης χρώστηκαν και με αντίσωμα αντι-Vβ11 που αναγνωρίζει τη μεταβλητή περιοχή της διαγονιδιακής β αλυσίδας. Σε κυτταρομετρική ανάλυση τριπλού φθορισμού, συνεχούς ροής, (FACS), τα ποντίκια RAG-1 *-/-* δεν είχαν καθόλου CD4+, CD8+ ή Vβ11+ σπληνοκύτταρα, ενώ τα β RAG-1 *+/+* είχαν απλά θετικά κύτταρα σε φυσιολογικούς αριθμούς τα οποία σε μεγάλο ποσοστό ήταν Vβ11+. Αντίθετα με το προβλεπόμενο, σπληνοκύτταρα από β RAG-1 *-/-* ποντίκια έφεραν αυτούς τους χαρακτηριστικούς για Τ κύτταρα δείκτες (βλ.εικόνα 6 ή πίνακα1).

Πείραμα	Ποντίκια	% CD4	% CD8	CD4/CD8
1	RAG-1 <i>-/-</i>	0.4	0.2	2

2 *	β RAG-1 -/-	1.7	0.7	2.4
	β RAG-1	30.4	24.6	12.4
	+/+			
	C57bl	18.9	10.2	1.9
	RAG-1 -/-	2.4	1.4	1.7
	β RAG-1 -/-	14.5	2.3	6.3
	β RAG-1	29.5	22.2	1.3
3	+/+			
	C57bl	21.2	12.8	1.7
	β RAG-1 -/-	1.4	0.9	1.6
	β RAG-1 -/-	2.7	0.7	3.9
	β RAG-1 -/-	3.1	2.4	1.3
	β RAG-1 -/-	1.9	2.1	0.9
	β RAG-1	18.6	10.1	1.8
4	+/+			
	C57bl	16.1	5.8	2.8
	RAG-1 -/-	0.3	0.6	0.5
	β RAG-1 -/-	3.1	1.6	1.9
	β RAG-1 -/-	2.6	0.7	3.7
	β RAG-1	11.1	9.1	1.2
	+/+			
C57bl	17.4	9.8	1.8	

Πίνακας1: Ποσοστά CD4+, CD8+ και ο λόγος τους σε σπληνοκύτταρα από RAG-1 -/-, β RAG-1 -/-, β RAG-1 +/+ και C57bl (αγρίου τύπου) ποντίκια, όπως αυτά προκύπτουν σε ανάλυση κατά FACS, σε πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Τα απλά θετικά κύτταρα που βρίσκονται στα RAG-1 -/- ποντίκια δεν είναι Vβ11+ και το πιθανότερο είναι ότι δεν αντιπροσωπεύουν T κύτταρα.

Τα ποσοστά των απλά θετικών κυττάρων στα β RAG-1 -/- ποντίκια είναι σαφώς μικρότερα, για τα περισσότερα ζώα, από τα αντίστοιχα στα β RAG-1 +/+ και C57bl ποντίκια. Επιπλέον ο συνολικός αριθμός Τ κυττάρων είναι μεγαλύτερος στα β RAG-1 +/+ και C57bl ποντίκια (περίπου 30 εκατομμύρια ανά σπλήνα), από ότι στα β RAG-1-/- (2-15 εκατομμύρια).

Ανάλυση κατά FACS έγινε και στους θύμους των ίδιων ζώων (Εικόνα). Βλέπουμε, όπως αναμενόταν, ότι όλα τα RAG-1 -/- θυμοκύτταρα είναι καθηλωμένα στο διπλά αρνητικό στάδιο, ενώ η φυσιολογική εικόνα των αναπτυξιακών σταδίων των θυμοκυττάρων είναι αυτή για τα β RAG-1 +/+ και C57bl. Για τα β RAG-1 -/- θυμοκύτταρα η πρόβλεψη είναι ότι τα κύτταρα θα είναι καθηλωμένα στο διπλά θετικό στάδιο. Όμως υπάρχουν πληθυσμοί απλά θετικών κυττάρων, άλλοτε περισσότερο και άλλοτε λιγότερο ευδιάκριτοι (1.5 %-6 % των θυμοκυττάρων σε σχέση με περίπου 20 % στα β RAG-1 +/+ και C57bl).

Κύτταρα σπλήνας β RAG -1-/- ποντικίων εκφράζουν ανασυνδυσασμένες α-αλυσίδες

Αν τα κύτταρα αυτά ήταν Τ λεμφοκύτταρα θα έπρεπε να είχαν λειτουργικό Τ υποδοχέα, διότι αλλιώς θα πέθαιναν με απόπτωση στο θύμο. Αυτό όμως προϋποθέτει τον ανασυνδυασμό της α αλυσίδας του υποδοχέα.

Για να εξακριβώσουμε αν γίνεται μεταγραφή της α αλυσίδας, κάτι που γίνεται μόνο μετά από ανασυνδυασμό του γενετικού της τόπου, κάναμε σε συνεργασία με το κ. Steve Pascolo, RT-PCR σε ολικό RNA σπληνοκυττάρων από ποντίκια RAG-1 -/-, β RAG-1 -/-, β RAG-1 +/+ και C57bl.

Σε κάθε ζεύγος εκκινητών ο ένας αναγνώριζε ειδικά μία από τις μεταβλητές περιοχές της α αλυσίδας (Va) και ο άλλος ειδικά τη μοναδική σταθερή περιοχή της (Ca). Γίνανε PCR με διαφορετικούς εκκινητές για είκοσι Va και τα προϊόντά τους ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Για τα περισσότερα ζεύγη εκκινητών τα οποία έδωσαν προϊόν στα C57bl ή/και β RAG-1 +/+ ποντίκια, πήραμε προϊόν και για τα β RAG-1 -/- ποντίκια (Πίνακας)

Συγκεκριμένα από τα 16 ζεύγη εκκινητών που έδωσαν, με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, ορατό προϊόν αντίδρασης με cDNA από αγρίου τύπου

ποντίκι, 9 έδωσαν ορατό προϊόν και με cDNA από β RAG-1 $-/-$. Οι ζώνες αυτές ήταν κατά κανόνα μικρότερης έντασης από τις αντίστοιχες των θετικών δειγμάτων ελέγχου (positive control) (Εικ. 7) και αυτό είναι σε συμφωνία με τη μικρότερη συχνότητα T κυττάρων στα β RAG-1 $-/-$ ποντίκια. Επίσης, ένα ζεύγος εκκινητών (το Va4+Ca) έδωσε ορατό προϊόν και με υπόστρωμα RAG-1 $-/-$ cDNA.

	RAG-1 $-/-$	β RAG-1 $-/-$	β RAG-1 $+/+$ ή C57bl
Va1+Ca	-	-	+
Va2+Ca	-	+	+
Va3+Ca	-	-	-
Va4+Ca	αχνή	+	+
Va5+Ca	-	+	+
Va6+Ca	-	+	+
Va7+Ca	-	-	-
Va8+Ca	-	-	+
Va9+Ca	-	-	-
Va10+Ca	-	+	+
Va11+Ca	-	αχνή	+
Va12+Ca	-	-	-
Va13+Ca	-	αχνή	+
Va34S281+Ca	-	-	+
VaA10+Ca	-	-	+
VaBWB+Ca	-	-	+
VaBMA+Ca	-	-	+
VaBMB+Ca	-	αχνή	+
Va5T+Ca	-	+	+

Πίνακας 2: Αποτελέσματα PCR με εκκινητές διάφορους Va και τον Ca με

υπόστρωμα cDNA σπληνοκυττάρων από RAG-1 ^{-/-}, β RAG-1 ^{-/-} κα β RAG-1 ^{+/+} ή C57bl ποντίκια. Το (+) ή (-) αναφέρεται στην ύπαρξη ή μη ζώνης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Εκκινητές	Ποντίκι	#κλώνων που βρέθηκε η αλληλουχία τους	#κλώνων με διαφορετική αλληλουχία	Ja
Vα2+Cα	βRAG-1-/-#5	11	7	Ja35,Ja47,Ja65
	βRAG-1-/-#6	11	3	JaTA31,Ja18,Ja
	βRAG-1-/-#9	8	5	36
	βRAG-1-/-#13	5	1	Ja48,Ja49
	βRAG-1+/+#2	8	7	Ja49
				JaTA28,Ja80,Ja new11 Ja65,Ja32,Ja18, Ja36
Vα4+Cα	βRAG-1-/-#6	6	5	Ja35,Ja44,Ja48, Ja49,Ja65
	βRAG-1-/-#2	3	3	JaTA20,JaTA28, Ja12
				Ja12,Ja112-

Va5+Ca	βRAG-1-/-#6	9	9	2,Ja27, JaTA61,Janew.0 4 Janew.06,Janew .07
Va6+Ca	βRAG-1-/-#6 βRAG-1+/+#2	11 10	1 10	Ja18 Ja32,Ja34,Ja44, Ja47,Ja48

Πίνακας 3: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εύρεσης αλληλουχίας σε προϊόντα PCR, που προέκυψαν από cDNA σπληνοκυττάρων β RAG-1 -/- και β RAG-1 +/+ ποντικών. Η πρώτη στήλη αναφέρεται στο συνδυασμό των εκκινητών που έδωσαν το προϊόν, η δεύτερη στα ανεξάρτητα ποντίκια από τα οποία λήφθηκαν σπληνοκύτταρα, η τρίτη στον αριθμό των κλώνων, από κάθε ποντίκι, που βρέθηκε η αλληλουχία τους και η τέταρτη στον αριθμό κλώνων με διαφορετική αλληλουχία ανά ποντίκι. Τέλος η δεξιά στήλη δείχνει ποια Ja τμήματα χρησιμοποιούσαν οι αλυσίδες που βρέθηκε η αλληλουχία τους.

Για να διαπιστωθεί αν τα προϊόντα αυτά ήταν πράγματι αλυσίδες έγινε κλωνοποίησή τους σε κατάλληλο φορέα, και εύρεση των αλληλουχιών τους πάλι σε συνεργασία με τον κ.Pascolo. Αυτές συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στις τράπεζες αλληλουχιών και βρέθηκε ότι ήταν αλυσίδες του T υποδοχέα, και μάλιστα με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Το προϊόν της αντίδρασης με υπόστρωμα RAG-1 cDNA δεν αντιστοιχούσε σε αλυσίδα και ούτε κάτι σχετικό, και ήταν μάλλον αποτέλεσμα μη ειδικής υβριδοποίησης των υποκινητών. Συγχρόνως κλωνοποιήθηκαν και τα προϊόντα των θετικών δειγμάτων ελέγχου και έγιναν και για αυτά οι παραπάνω διαδικασίες.

Για κάθε ζεύγος Va+Ca λαμβάνονται κατά κανόνα πάνω από μία διαφορετικές αλληλουχίες, στις οποίες συνήθως το Ja τμήμα διαφέρει αλλά και όταν είναι ίδιο υπάρχει διαφορά στα N νουκλεοτίδια. Αυτό

δείχνει ότι τα T κύτταρα των β RAG-1 *-/-* ποντικών είναι πολυκλωνικά (βλ. Πίνακα3). Από το πίνακα επίσης φαίνεται ότι στα β RAG-1 *+/+* ποντίκια υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλότητα αλληλουχιών α αλυσίδων, και συγκεκριμένα από τις 21 αλληλουχίες που βρέθηκαν 19 ήταν διαφορετικές μεταξύ τους, ενώ αντιστοίχα στα β RAG-1 *-/-* ποντίκια από τις 61 αλληλουχίες μόνο 38 ήταν διαφορετικές. Αυτό μάλλον οφείλεται στο μικρότερο ποσοστό T κυττάρων που υπάρχουν στη σπλήνα των β RAG-1 *-/-* ποντικών (βλ. αποτελέσματα FACS ανάλυσης).

Για να διαπιστωθεί αν σε RAG-1 *-/-* ποντίκια υπάρχουν ανασυνδυασμένες β αλυσίδες, έγινε RT-PCR σε RNA σπληνοκυττάρων με εκκινητές τον Vβ4 που αναγνωρίζει ειδικά τη Vβ4 μεταβλητή περιοχή, που είναι μια συχνή V περιοχή β αλυσίδων, και τον Cβa που αναγνωρίζει ειδικά τη μία από τις δύο σταθερές περιοχές Cβ. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης και επειδή δεν υπήρχε ορατό προϊόν, υβριδοποιήθηκαν με κατάλληλο ιχνηθέτη για τη Cβ, αλλά και πάλι δεν λήφθηκε σήμα κατά την αυτοραδιογραφία. Σα θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε β RAG-1*+/+* RNA σπληνοκυττάρων έδωσε την αναμενόμενη ζώνη, η οποία κλωνοποιήθηκε και εξακριβώθηκε η αλληλουχία της.

α αλυσίδες εκφράζονται και σε θυμοκύτταρα β RAG-1 *-/-* ποντικών

Για να ελεγχθεί αν το ίδιο φαινόμενο παρουσιάζεται στο θύμο, κάτι που είναι προβλεπόμενο, έγιναν RT-PCR σε RNA θυμοκυττάρων από RAG-1 *-/-*, β RAG-1 *-/-* και RAG-1 *+/+* ποντίκια με όλους τους εκκινητές που είχαν δώσει προϊόν στις PCR στα σπληνοκύτταρα των θετικών δειγμάτων ελέγχου και τα προϊόντα τους ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης. (βλ. Πίνακα 4 και εικόνα 7).

Vα εκκινητής	RAG-1 <i>-/-</i>	β RAG-1 <i>-/-</i>				βRAG-1 <i>+/+</i>
	#1	#1	#2	#3	#4	#1
VαBMA	-	-	-	-	-	+

Vα1	-	-	-	-	-	+
Vα2	-	+	αχνή	αχνή	αχνή	+
Vα4	-	ΔΠ	+	ΔΠ	ΔΠ	+
Vα5	-	-	αχνή	-	-	+
Vα5T	-	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	+
Vα6	-	+	+	-	αχνή	+
Vα8	-	+	+	+	+	+
Vα10	αχνή	ΔΠ	+	ΔΠ	ΔΠ	+
Vα10Á	-	-	-	-	-	+
VαBWB	-	-	-	-	-	+
Vα34S281	-	-	-	-	-	+

Πίνακας4: Αποτελέσματα αντιδράσεων PCR με υποστρώματα cDNA θυμοκυττάρων από RAG-1 $-/-$, διάφορα β RAG-1 $-/-$, και β RAG-1 $+/+$ ποντίκια, με διάφορα ζεύγη εκκινητών Vα+Ca που πολλαπλασιάζουν την α αλυσίδα του T υποδοχέα. Το (+) ή (-) δείχνει την ύπαρξη ή όχι ζώνης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. (ΔΠ:Δεν Προσδιορίστηκε).

Μετά από συγκριτική παρατήρηση των πινάκων 3 και 4 φαίνεται ότι κάποιοι συνδυασμοί εκκινητών που δίνουν προϊόν με υπόστρωμα από σπληνοκύτταρα β RAG-1 $-/-$ ποντικίων δεν δίνουν με υπόστρωμα από θυμοκύτταρα του ίδιου τύπου ποντικίων. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην αρκετά μικρότερη συχνότητα κυττάρων με ανασυνδυασμένη α αλυσίδα στο θύμο, ενώ στη σπλήνα λόγω της συνεχούς συσσώρευσης T κυττάρων από το θύμο και της κλωνικής επέκτασης (clonal expansion), κύτταρα με την ίδια αλυσίδα έχουν μεγαλύτερη αντιπροσώπευση στο συνολικό αριθμό σπληνοκυττάρων.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων σε υπόστρωμα cDNA από θυμοκύτταρα β RAG-1 *-/-* ποντικών με εκκινητές Va2+Ca και Va6+Ca κλωνοποιήθηκαν και βρέθηκε η αλληλουχία τους. Οι αλληλουχίες (εκτός μίας που ήταν τελομερική αλληλουχία του *P.falciparum*) αντιπροσώπευαν α αλυσίδες και ήταν πολυκλωνικές (βλ. Πίνακα 5). Το ίδιο έγινε και για τα προϊόντα της αντίδρασης με Va8+Ca εκκινητές, αλλά η αλληλουχία τους αντιπροσώπευε μετάγραφα από υποκινητές της Ja γενωμικής περιοχής η οποία είναι γνωστό ότι είναι μεταγραφικά ενεργή κατά τα στάδια του V(D)J ανασυνδυασμού.

Εκκινητές	Ποντίκι	Συνολ.κλώνοι	Διαφ.κλώνοι
Ja			
Va2+Ca	β RAG-1 <i>-/-</i> #1	6	5
Ja47,Ja49			Ja65
Va6+Ca	β RAG-1 <i>-/-</i> #1	3	2
Ja36			

Πίνακας 5: Αποτελέσματα εύρεσης αλληλουχιών των προϊόντων PCR σε cDNA θυμοκυττάρων σε ποντίκια β RAG-1 *-/-*. Η τρίτη στήλη παρουσιάζει τον αριθμό των κλώνων που βρέθηκε η αλληλουχία τους, τέταρτη τον αριθμό των διαφορετικών μεταξύ τους κλώνων και η τελευταία τα Ja τμήματα που υπήρχαν σε αυτές τις α αλυσίδες.

Το γονίδιο RAG στα μεταλλαγμένα ποντίκια εκφράζει ποικιλία μεταγράφων

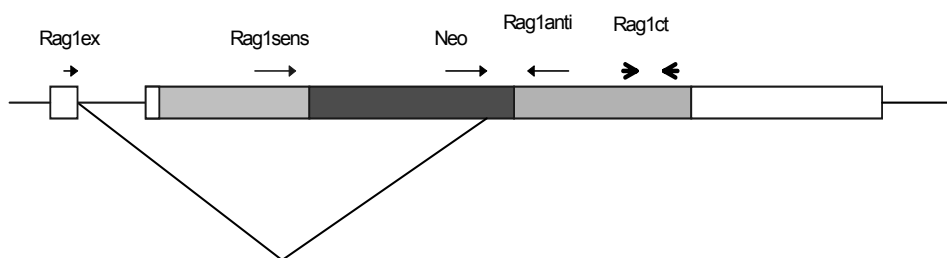
Το γεγονός ότι υπάρχουν μετάγραφα α αλυσίδας σε θυμοκύτταρα και σπληνοκύτταρα β RAG-1 *-/-* ποντικών σημαίνει ότι σε αυτά

ανασυνδυάζεται ο γενετικός τόπος της α αλυσίδας. Αυτό υπονοεί ή ότι υπάρχει μονοπάτι ανασυνδυασμού που δεν συμμετέχει η RAG-1 πρωτεΐνη, ή ότι η δραστικότητα της RAG-1 μπορεί να αναπληρωθεί εν μέρει από τις άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον V(D)J ανασυνδυασμό ή τέλος, ότι υπάρχει έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης (ελλειμματικής ή χιμαιρικής) που έχει μερική δραστικότητα.

Για να εξακριβωθεί το μεταγραφικό πρότυπο του γονιδίου RAG-1 στα RAG-1 $-/-$ έγινε μία σειρά RT-PCR με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών ειδικά για αλληλουχίες του RAG-1 και της κασέτας ένθεσης. Σε αυτά τα ποντίκια αναμένεται η μεταγραφή να λήγει μετά το πολύ(A) σινιάλο της κασέτας ένθεσης, και δεν πρέπει να υπάρχουν μετάγραφα του RAG-1 με αλληλουχίες πέρα της βάσης 1084 του RAG-1 cDNA.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Rag1ct που πολλαπλασιάζουν το τμήμα 2476-3010 του RAG-1 cDNA, και το τμήμα αυτό δεν μεταγράφεται θεωρητικά σε RAG-1 $-/-$ και β RAG-1 $-/-$ ποντίκια. Όμως σε τέσσερα διαφορετικά β RAG-1 $-/-$ ποντίκια, και σε ένα RAG-1 $-/-$ εμφανίστηκε μία ζώνη μεγέθους περίπου 550 βάσεων (Εικόνα 10). Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε, βρέθηκε η αλληλουχία του, και πράγματι αντιπροσώπευε το τμήμα 2476-3010 του RAG-1 cDNA.

Για να διαπιστωθεί αν το μετάγραφο αυτό ήταν τμήμα ενός χιμαιρικού neo^r-RAG-1 μετάγραφου, έγινε RT-PCR με τους εκκινητές Rag1sens και Rag1anti, (βλ. Σχήμα) η οποία δεν έδωσε καμία ξεκάθαρη ζώνη, ίσως λόγω του μεγάλου τμήματος που έπρεπε να πολλαπλασιαστεί (περίπου 1.8 κιλοβάσεις).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου RAG-1 και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για ανίχνευση RAG-1 μεταγράφων σε RAG-1 ^{-/-} ποντίκια. Οι ευθείες γραμμές απεικονίζουν περιοχές του RAG-1 που δεν βρίσκονται στο mRNA του αγρίου τύπου γονιδίου, ενώ τα λευκά παραλληλόγραμμα μη μεταφραζόμενες περιοχές. Τα γκριζα παραλληλόγραμμα είναι οι κωδικές περιοχές του RAG-1 και τα μαύρα αντιπροσωπεύουν την κασέτα ένθεσης. Η τεθλασμένη γραμμή δείχνει το μάτισμα που μπορεί να δώσει λειτουργική πρωτεΐνη

Επιπλέον έγιναν RT-PCR με τους εκκινητές Neo και Rag1anti, οι οποίες έδωσαν δύο προϊόντα (βλ.εικόνα 11). Και τα δύο κλωνοποιήθηκαν και βρέθηκε η αλληλουχία τους. Η ζώνη του μεγάλου μοριακού βάρους ήταν cDNA που αντιπροσώπευε όλη την μεταγραφόμενη αλληλουχία από τον ένα εκκινητή στον άλλο (βλ. Σχήμα). Το μετάγραφο αυτό δεν μπορεί να δώσει πρωτεΐνη που να περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο της RAG-1, λόγω της πλαισιοτροποποιητικής μεταλλαγής της κασέτας ένθεσης που εισάγει κωδικόνιο τερματισμού. Η ζώνη μικρού μοριακού βάρους προερχόταν από μάτισμα του προηγούμενου μετάγραφου, που του αφαιρούσε ένα κομμάτι 340 βάσεων από την κωδική περιοχή του neo και του πολύ(A). Όμως, ούτε το μετάγραφο αυτό μπορεί να δώσει τέτοια πρωτεΐνη, για τον ίδιο με πρίν λόγο (στο πλαίσιο ανάγνωσης του RAG-1 ακολουθούν κωδικόνια τερματισμού της μετάφρασης).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο καταλυτικός πυρήνας της πρωτεΐνης (core protein) φαίνεται να είναι τα περίπου 650 καρβοξυτελικά αμινοξέα της.

Η μόνη περίπτωση να υπάρχει τέτοια πρωτεΐνη στα θυμοκύτταρα β RAG-1 ^{-/-} ποντικίων, είναι αν κάποιο «ανώμαλο» μάτισμα αφαιρεί όλη την περιοχή PGK υποκ.-neo^r-πολύ(A). Για να εξετασθεί αυτό έγινε PCR σε cDNA θυμοκυττάρων με τον εκκινητή Rag1ex που βρίσκεται στο πρώτο εξόνιο του RAG-1 γονιδίου και με τον εκκινητή Rag1anti (Εικόνα 8).

Από cDNA θύμου β RAG-1 ^{-/-} ποντικίου λήφθηκε μια ασθενής ζώνη μήκους 212 βάσεων (Εικόνα 12) και προσδιορίστηκε η αλληλουχία της. Αυτή προερχόταν από μάτισμα ενός χιμαιρικού RNA που περιλάμβανε όλες τις μεταγραφόμενες περιοχές του RAG-1 μαζί με την κασέτα ένθεσης.

Και τα δύο αυτά μετάγραφα μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιήσουν σαν κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης την ATG τριπλέτα που βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 1147 του RAG-1 cDNA και είναι στο πλαίσιο ανάγνωσης του RAG-1 mRNA, και συνεπώς δεν υπάρχει κωδικόνιο τερματισμού άλλο εκτός αυτού που υπάρχει φυσιολογικά στο RAG-1. Το κωδικόνιο έναρξης αυτό περιστοιχίζεται από ακολουθία με μεγάλη ομολογία με τη συντήρηση της Kozak αλληλουχίας και είναι ένας καλός υποψήφιος για την έναρξη της μετάφρασης. Αυτό το ATG δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα μετάγραφα που πολλαπλασίασαν οι εκκινητές Neo+Rag1anti γιατί αυτά χρησιμοποιούν το κωδικόνιο έναρξης του RAG-1 ή του neo^r.

Η δυνητική πρωτεΐνη αποτελείται από τα 689 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της RAG-1, δηλαδή της λείπουν τα πρώτα 351 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου.

Διερεύνηση μεταγραφικών προτύπων από άνεργα και μη
T λεμφοκύτταρα
με τη χρήση της τεχνολογίας mRNA Differential Display

Στο εργαστήριό μας υπάρχουν διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν διαγονίδιο μιας ανασυνδυασμένης α και β αλυσίδας T υποδοχέα. Έτσι, σε τούτα τα ποντίκια, ο διαγονιδιακός υποδοχέας εκφράζεται στη πλειονότητα των T κυττάρων τους. Ο υποδοχέας αυτός, που ονομάζεται F5 εκφράζεται ιστοειδικά στα θυμοκύτταρα και περιφερικά T λεμφοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικιών. Ο F5 χρησιμοποιεί τις μεταβλητές περιοχές Vα4 και Vβ11 των α και β αλυσίδων αντίστοιχα. Ο F5 υποδοχέας αναγνωρίζει ένα εννιαπεπτίδιο (αμινοξέα 366-374) της νουκλεοπρωτεΐνης (NP) του ιού της ινφλουέντσας, όταν αυτό παρουσιάζεται από το τάξης I MHC μόριο D^b. Έτσι, τα περισσότερα περιφερικά κύτταρα του ποντικιού F5 είναι κυτταροτοξικά κύτταρα. Με ανάλυση FACS βρέθηκε ότι το 80 % των T κυττάρων των διαγονιδιακών ποντικιών φέρει την Vβ11 αλυσίδα, ενώ στα αγρίου

τύπου μόνο ένα 1-4%. Έτσι ποντίκια με F5 διαγονιδιακό υποδοχέα έχουν 70-75% CD8+ κύτταρα στα περιφερικά λεμφικά όργανα, τα οποία αποκρίνονται στο αντιγονικό πεπτίδιο in vivo και in vitro (Mamalaki et al., 1992, 1993).

Επίσης δημιουργήθηκαν διάφορες σειρές διαγονιδιακών ζώων (NP ποντίκια) που εκφράζουν την ιική πρωτεΐνη κάτω από τον υποκινητή του H-2K^b MHC I μορίου, που εκφράζεται σε μεγάλο εύρος ιστών. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η NP47 σειρά ποντικίων.

Όταν διασταυρωθούν F5 ποντίκια με ποντίκια NP47, λαμβάνονται τα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια F5NP47, που εκφράζουν ενδογενώς τη πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ο T υποδοχέας της πλειονότητας των T κυττάρων τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα στο θύμο να έχουν μειωμένο αριθμό CD4+CD8+TCR^{hi} θυμοκυττάρων λόγω της κλωνικής απαλοιφής των αυτοδραστικών T κυττάρων κατά την αρνητική επιλογή. Παρά ταύτα στα περιφερικά λεμφικά όργανα εμφανίζεται ένας σημαντικός αριθμός CD8+Vβ11+ T κυττάρων. Όμως αυτά τα κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα T υποδοχέα και δεν αποκρίνονται στο αντιγονικό πεπτίδιο ούτε in vivo ούτε in vitro. Η μη απόκριση σε αντιγόνο τα κάνει εξ' ορισμού άνεργα (anergized) κύτταρα.

Αν F5 και F5NP47 ποντίκια διασταυρωθούν με RAG-1 ^{-/-} ποντίκια δίνουν F5RAG-1^{-/-} και F5NP47RAG-1^{-/-} ποντίκια αντίστοιχα. Τα δύο τελευταία, στα περιφερικά τους όργανα και στο θύμο έχουν στη μεγάλη πλειοψηφία τους T κύτταρα με F5 υποδοχέα (Mamalaki et al., 1996).

Το σύστημα των ποντικίων αυτών είναι ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη μηχανισμών που διέπουν την περιφερική ανοχή (peripheral tolerance) και συγκεκριμένα την ανεργία.

Για την ταυτοποίηση αγνώστων γονιδίων που εμπλέκονται με την έκφραση ή καταστολή τους εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ανεργίας, έγινε σύγκριση του μεταγραφικού προτύπου των σπληνοκυττάρων από F5RAG-1 ^{-/-} και F5NP47 RAG-1 ^{-/-} ποντίκια, με τη χρήση της τεχνολογίας του mRNA Differential Display.

RT-PCR σε RNA διαφορετικών ιστών ποντικίων αποκαλύπτει ανομοιότητες στα μεταγραφικά τους πρότυπα

Η συγκεκριμένη εκδοχή της τεχνολογίας του Differential Display που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριό μας αναπτύχθηκε από το Steve Pascolo, που την εφάρμοσε αρχικά για να δείξει διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ θύμων εμβρύου και θύμων ενήλικου ποντικίου.

Στην εφαρμογή της τεχνικής αυτής για τη μελέτη της ανεργίας ήταν επιθυμητός ο καθαρισμός και η απομόνωση των T κυττάρων που φέρουν τον F5 T υποδοχέα τόσο από F5 RAG-1 $-/-$ όσο και από F5 NP47 RAG-1 $-/-$ σπληνοκύτταρα. Επειδή τα κύτταρα αυτά είναι CD8⁺ χρησιμοποιήθηκαν, από τον Steve Pascolo, αντι-CD8 αντισώματα συζευγμένα με μαγνητικά σφαιρίδια τα οποία κατόπιν διέρχονται από κολώνα που βρίσκεται μέσα σε μαγνητικό πεδίο. Έτσι επιτυγχάνεται εμπλουτισμός των κυττάρων σε CD8⁺ κύτταρα της τάξης περίπου του 90%.

Από αυτούς τους CD8⁺ πληθυσμούς των δύο ζώων γίνεται παρασκευή ολικού RNA, κατεργασία του με DNάση για αποφυγή «μολύνσεων» από γενωμικό DNA, και ακολούθως ανάστροφη μεταγραφή με χρήση ενός πλήρως εκφυλισμένου (degenerate) εξανουκλεοτιδίου σαν εκκινήτη.

Στο cDNA που προκύπτει γίνεται PCR με αυθαίρετους, αλλά όχι εκφυλισμένους δεκαμερείς εκκινήτες, με σημασμένο ένα από τα δεοξυνουκλεοτίδια της αντίδρασης. Τα προϊόντα της (βλ. Υλικά-Μέθοδοι) ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και μετά από αυτοραδιογραφία αναλύεται το πρότυπο ζώνωσης που προέκυψε από τους δύο πληθυσμούς CD8⁺ σπληνοκυττάρων, F5 RAG-1 $-/-$ και F5NP47 RAG-1 $-/-$ αντίστοιχα (βλ. Εικόνα 13).

Ζώνες που εκφράζονται διαφορετικά αποκόπτονται, εκκλούνται σε νερό και μετά από νέα PCR με τους αρχικούς εκκινήτες, κλωνοποιούνται και αναλύεται μια σειρά κλώνων.

Μία ζώνη αντιστοιχεί σε πάνω από ένα προϊόντα

Όταν αναλύαμε τα κλωνοποιημένα προϊόντα διαπιστώσαμε ότι από μία ζώνη, συνήθως λαμβάνονταν αρκετές διαφορετικές αλληλουχίες. Επειδή το ενδιαφέρον εστιάζεται στα προϊόντα που είναι πραγματικώς διαφορετικά εκφρασμένα, ακολουθήθηκε η παρακάτω στρατηγική για απόρριψη κάποιων προϊόντων που δεν εκφράζονταν διαφορετικά.

Μετά από παρασκευή πλασμιδιακού DNA από τα κλωνοποιημένα προϊόντα, γίνεται πέψη του με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο ώστε να απελευθερωθεί το ένθεμα, και ακολούθως υβριδοποίησή τους κατά Southern, με ιχνηθέτες (probes) τα ολικά μίγματα των δύο PCR αντιδράσεων - F5 RAG-1-/- και F5NP47 RAG-1 -/- (βλ. Εικόνα 14 και επεξηγηματική λεζάντα). Μετά την αυτοραδιογραφία, απορρίπτονται εκείνοι οι κλώνοι που υβριδοποιούνται και με τους δύο ιχνηθέτες.

Άλλες δοκιμασίες για να διαπιστωθεί αν ένα προϊόν αποτελεί υποψήφιο cDNA που εμπλέκεται στην ανεργία

Για τα προϊόντα που πέρασαν τη παραπάνω δοκιμασία, βρίσκεται η αλληλουχία τους, και ερευνάται αν έχει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και, με σύγκριση με τις τράπεζες αλληλουχιών, αν είναι γνωστή αλληλουχία, αν έχει ομολογία με μόρια που σχετίζονται με ανοσολογικές αποκρίσεις κλπ.

Τα πρότυπα ζώνωσης αυτών των RT-PCR αντιδράσεων δεν είναι απολύτως αναπαραγώγιμα. Φαίνεται ότι το πρότυπο ζώνωσης εξαρτάται από τη παρασκευή του υποστρώματος (matrix), το μηχάνημα θερμικών κύκλων κ.ά, πέρα του γεγονότος ότι τόσο ευαίσθητες μέθοδοι είναι επιδεκτικές μολύνσεων (contaminations). Επιπλέον, επιθυμητή είναι και η γνώση της έκφρασης ενός προϊόντος σε κάποια δείγματα ελέγχου, όπως και σε άλλους ιστούς από τα F5 RAG-1-/- και F5NP47 RAG-1 -/- ζώα.

Για τους παραπάνω λόγους γίνονται νέες RT-PCR (Differential Display PCR) με τους ίδιους εκκινητές, στα αρχικά και σε νέα υποστρώματα, και τα προϊόντα τους ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης και υβριδοποιούνται κατά Southern, με ιχνηθέτη ένα προϊόν που έχει περάσει τη δοκιμασία της προηγούμενης παραγράφου. Ένα τέτοιο παράδειγμα φαίνεται στην Εικόνα 15.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υποθέσεις για τον ανασυνδυασμό στο γενετικό τόπο της α αλυσίδας σε βRAG-1 -/- ποντίκια

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν είναι φανερό ότι σε περιφερικά λεμφικά όργανα β RAG-1 -/- ποντικών υπάρχουν ώριμα T λεμφοκύτταρα. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά φαίνεται να προέρχονται από το θύμο όπως προβλέπεται από τη θεωρία της ανάπτυξης των T λεμφοκυττάρων.

Αν και στα ποντίκια τούτα το RAG-1 γονίδιο έχει μεταλλαχθεί, εν τούτοις βρίσκονται μετάγραφα α αλυσίδων, με ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τόσο στα σληνοκύτταρα όσο και στα θυμοκύτταρα. Αυτές οι αλυσίδες έχουν προέρθει από ανασυνδυασμό του α γενετικού τόπου στα κύτταρα του θύμου.

Από τις αναλύσεις των αποτελεσμάτων του FACS όσο και των ακολουθιών των α αλυσίδων για τα β RAG-1 -/- ποντίκια και συγκρίσεις τους με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στα β RAG-1 +/+, δείχνει ότι ο ανασυνδυασμός μιας α αλυσίδας στο θύμο του β RAG-1 -/- ποντικίου είναι ένα σπάνιο γεγονός. Αυτό φαίνεται από τους μικρούς πληθυσμούς απλά θετικών κυττάρων στη σπλήνα και στο θύμο των β RAG-1 -/- ζώων και από το μεγάλο ποσοστό ίδιων α αλυσίδων στις αλληλουχίες που κλωνοποιήθηκαν.

Η ύπαρξη ενεργότητας ρεκομπινάσης στα θυμοκύτταρα των β RAG -/- ποντικών υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μονοπατιού (διαφορετικού ή του ίδιου) που δε συμμετέχει η RAG-1 και το οποίο φέρει σε πέρας V(D)J ανασυνδυασμό στον α γενετικό τόπο λιγότερο αποτελεσματικά, ή την ύπαρξη χιμαιρικής ή ελλειμματικής RAG-1 πρωτεΐνης που έχει μέρος της δραστηριότητας της αγρίου τύπου πρωτεΐνης.

Η δεύτερη εκδοχή φαίνεται πιθανή αφού σε θυμοκύτταρα βρέθηκαν δύο διαφορετικά μετάγραφα που εν δυνάμει κωδικοποιούν για 689 καρβοξυτελικά αμινοξέα της RAG-1. Τα μετάγραφα αυτά μπορούν να χρησιμοποιήσουν σα κωδικόνιο έναρξης της αντιγραφής το AUG που βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 1147 του RAG-1 cDNA, και περιτοιχίζεται από αλληλουχία με ομολογία με Kozak ακολουθία. Η ελλειματική πρωτεΐνη δεν περιέχει τα πρώτα 351 αμινοξέα της RAG-1 ($\Delta 351$), αλλά περιέχει τον πυρήνα (core protein) της RAG-1, που έχει δειχθεί ότι είναι αρκετός μαζί με RAG-2 πρωτεΐνη να φέρει σε πέρας ανασυνδυασμό επισωμικών υποστρωμάτων σε ινοβλάστες, και *in vitro*, πάλι μαζί με RAG-2, να κόψει αλληλουχίες σινιάλα του ανασυνδυασμού σύμφωνα με τον κανόνα 12/23. (Sadofsky et al.,(1993), Cortes et al.(1996)). Επιπλέον σε μετασχηματισμένες με *v-abl* (Abelson) σειρές B κυττάρων από RAG-1 *-/-* ποντίκια έχει δειχθεί ότι προσθήκη εξωγενούς πρωτεΐνης-πυρήνα μπορεί να φέρει σε πέρας D-J_H ανασυνδυασμό στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Οι Abelson κυτταρικές σειρές από αγρίου τύπου ποντίκια εκφράζουν RAG-1 και RAG-2 και μπορούν σε καλλιέργεια να κάνουν V(D)J ανασυνδυασμό στους τόπους της ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας. Οι Roman et al χρησιμοποίησαν Abelson σειρά που προήλθε από νωτιαίο μυελό RAG-1 *-/-*ποντικίων που προήλθαν από το ίδιο αρχικό μεταλλαγμένο ποντίκι με τα δικά μας ((Spanoroulou et al., Gen. & Devel. (1994). Οι Roman et al στα αρνητικά δείγματα ελέγχου τους (control) στα οποία δεν προστέθηκε εξωγενής RAG-1 πρωτεΐνη δεν μπορούσαν να ανιχνεύσουν D-J_H ανασυνδυασμό. Αν τα «ανωμαλα» μετάγραφα που ανιχνεύονται στα θυμοκύτταρα βρίσκονται και στην Abelson σειρά (κάτι πολύ πιθανό αφού τα μετάγραφα αυτά προέρχονται από τον RAG-1 υποκινητή) θα έπρεπε στη σειρά αυτή να ανιχνεύεται D-J_H ανασυνδυασμός. Επίσης με RT-PCR σε RNA θυμοκυττάρων από RAG-1 *-/-* ποντίκια, με ένα εκκινητή ειδικό για την V β 4 περιοχή και τον Ca εκκινητή, δεν ανιχνεύθηκε ανασυνδυασμένη β αλυσίδα, ακόμη και μετά από υβριδοποίηση κατά Southern με κατάλληλο ιχνηθέτη. Τα παραπάνω γεγονότα, μαζί με το γεγονός ότι RAG-1 πρωτεΐνη δεν ανιχνεύεται σε θυμοκύτταρα RAG-1 *-/-* και β RAG-1 *-/-* μετά από ανάλυση τύπου Western με μονοκλωνικό αντίσωμα (πειράματα στο εργαστήριό μας από τη κ. Μαμαλάκη και τη κ. Τσουκάτου, αλλά και Spanoroulou et al., (1995)) δίνουν δύο πιθανές ερμηνείες για τα αποτελέσματά μας.

Στη πρώτη ερμηνεία, παράγεται ελλειμματική (Δ1-351) πρωτεΐνη αλλά σε τόσο μικρή ποσότητα που δεν μπορεί να ανιχνευθεί και επιπλέον τόσο μικρή που δεν μπορεί να φέρει σε πέρας τον ανασυνδυασμό της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στα προ-B κύτταρα (σε μεγαλύτερη ποσότητα μπορεί γιατί οι Roman et al χρησιμοποιούν πρωτεΐνη με έλλειψη των αμινοξέων 1-384). Επίσης πιθανό είναι ότι δεν μπορεί να φέρει σε πέρας και ανασυνδυασμό β αλυσίδας T υποδοχέα, σε RAG-1 ^{-/-} ποντίκι, αν και δοκιμάστηκε μόνο ένας εκκινητής ειδικός για Vβ περιοχές. Όμως ποσότητα αυτή είναι ικανή να προάγει τον ανασυνδυασμό του γενετικού τόπου της α αλυσίδας σε θυμοκύτταρα που έχουν ήδη εκφράσει τη β αλυσίδα του T υποδοχέα. Αυτό ίσως σχετίζεται με τις διαφορετικές/μικρότερες απαιτήσεις του α γενετικού τόπου για ανασυνδυασμό. Πράγματι ο α γενετικός τόπος χαρακτηρίζεται από μία «ευκολία» στον ανασυνδυασμό με την έννοια, ότι ουσιαστικά δεν ισχύει για αυτόν ο αλληλικός αποκλεισμός (allelic exclusion). Ένας τρόπος να εξετασουμε την ερμηνεία αυτή είναι να γίνει RT-PCR σε μυελό RAG-1 ^{-/-} ποντικών με τους εκκινητές Rag1ex και Ragant1 (βλ.Αποτελέσματα) για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι του μεταγράφου που μπορεί να δώσει την ελλειμματική πρωτεΐνη.

Στη δεύτερη ερμηνεία, το εν λόγω μετάγραφο δεν δίνει πρωτεΐνη. Ο ανασυνδυασμός της α αλυσίδας μπορεί τότε να εξηγηθεί ή με την ύπαρξη ενός διαφορετικού μηχανισμού στον οποίο δε μετέχει RAG-1 πρωτεΐνη (τέτοιος μηχανισμός δεν είναι γνωστός), ή οι άλλες πρωτεΐνες του συμπλόκου της ρεκομπινάσης μπορούν εν μέρει να φέρουν σε πέρας Vα-Jα ανασυνδυασμό αλλά όχι π.χ. D-J_H (όμως δεν υπάρχει άλλη υποψήφια πρωτεΐνη για δέσμευση στην αλληλουχία σινιάλο του ανασυνδυασμού). Για την εξέταση της ερμηνείας αυτής πρέπει να εξετασθεί η ύπαρξη ανασυνδυασμού ή όχι α αλυσίδας σε β RAG-1 ^{-/-} ποντίκια που έχουν προέρθει από άλλη σειρά RAG-1 ^{-/-} ποντικών (Mombaerts et al., 1992).

Επιπλέον, ενδιαφέρον έχει να μελετηθεί και ο λόγος που το γεγονός του ανασυνδυασμού είναι αφενός σπάνιο, και αφετέρου τυχαίο (δηλαδή γιατί σε κάποια ποντίκια είναι πιο έντονο το φαινόμενο, όσον αφορά τις αναλύσεις FACS και τα αποτελέσματα των PCR, βλ. αποτελέσματα). Είναι κάποιοι πληθυσμοί θυμοκυττάρων με τέτοιες ιδιαιτερότητες που επιτρέπουν αυτόν τον ανορθόδοξο «ανασυνδυασμό», ενώ κάποιοι άλλοι όχι; Ή απλώς κάποια

κύτταρα δεν «προλαβαίνουν» ανασυνδυάσουν παραγωγική α αλυσίδα, (γιατί οι πρώτοι ανασυνδυασμοί ήταν εκτός πλαισίου ανάγνωσης), και πεθαίνουν με απόπτωση; Η μελέτη αυτών των μηχανισμών μπορεί να αποκαλύψει νέους υποπληθυσμούς και νέα, στενά καθορισμένα, στάδια στην ανάπτυξη των T κυττάρων. Για τέτοιες μελέτες, απαραίτητο εργαλείο είναι η ανάπτυξη κυτταρικών σειρών από θύμους RAG-1 $-/-$ και β RAG-1 $-/-$ ποντικών, μετασχηματισμένα με κάποιο ογκογονίδιο π.χ. το c-myc.

Συζήτηση

ή

Πρακτικές δυσκολίες στη προσπάθεια για ανεύρεση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη/σπάσιμο της ανεργίας

Οι δύο τύποι κυττάρων που μελετάμε είναι σίγουρο ότι έχουν πολύ περισσότερες ομοιότητες παρά διαφορές στη γονιδιακή τους έκφραση.

Τα F5 RAG-1 $-/-$ και F5NP47 RAG-1 $-/-$ T κύτταρα ανήκουν και τα δύο στη λυμφοειδή σειρά (lineage), είναι και τα δύο ώριμα T λεμφοκύτταρα, και μάλιστα ανήκουν και τα δύο στον κυτταροτοξικό υποπληθυσμό. Επιπλέον αναγνωρίζουν και τα δύο το ίδιο αντιγόνο. Η διαφορά τους εστιάζεται στον τρόπο με τον οποίο αποκρίνονται στο αντιγόνο αυτό. Η τεχνολογία του mRNA έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία σε περιπτώσεις που τα υποστρώματα (cDNAs) προέρχονται είτε από διαφορετικούς ιστούς είτε από διακριτά αναπτυξιακά στάδια του ίδιου ιστού, στα οποία οι διαφορές στη γονιδιακή έκφραση είναι πολλές και ξεκάθαρες. Στο παρόν μοντέλο δεν είναι σίγουρο αν έχουμε καθόλου διαφορές στη γονιδιακή έκφραση του τύπου όλα/τίποτα, ή αν απλώς κάποια γονίδια αλλάζουν μερικώς την έκφρασή τους και το αθροισμα αυτών των αλλαγών σχετίζεται με την ανάπτυξη ή όχι

της ανεργίας. Εναλλακτικά, μπορεί η ανεργία να ρυθμίζεται και σε κάποιο μετα-μεταγραφικό ή μετα-μεταφραστικό στάδιο και όχι μόνο στο επίπεδο της μεταγραφής.

Κάθε ζώνη που αναλύεται είδαμε ότι χρειάζεται ένα προσεκτικό και πολύ-σταδιακό έλεγχο, για να αποτελέσει ένα καλό υποψήφιο. Ο τελικός έλεγχος γίνεται με ανάλυση τύπου Northern. Μέχρι στιγμής κανένα προϊόν δεν αποδείχθηκε να εκφράζεται διαφορετικά σε τέτοια ανάλυση, και μάλιστα τα περισσότερα προϊόντα δεν έδιναν καθόλου σήμα στην αυτοραδιογραφία, ίσως γιατί χρησιμοποιούταν ολικό (και όχι πολύ(A)) RNA ή/και γιατί το μήκος των ιχνηθετών ήταν συχνά αρκετά μικρό (120-250 βάσεις).

Για να εξεταστεί όλο το μεταγραφικό πρότυπο των F5 RAG-1^{-/-} και F5NP47 RAG-1^{-/-} CD8⁺ σπληνοκυττάρων χρειάζονται θεωρητικά 150 διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών ενώ μέχρι στιγμής έχουν γίνει 45. Πέρα από την εκτέλεση νέων PCR αντιδράσεων θα εξεταστούν και ήδη κλωνοποιημένα προϊόντα σε ανάλυση Northern με (πολύ-A) RNA. Μετά την ταυτοποίηση ενός διαφορεικά εκφρασμένου γονιδίου, και την επακόλουθη κλωνοποίησή του απο cDNA και γενωμική βιβλιοθήκη θα γίνουν λειτουργικές δοκιμασίες, για να εξετασθεί η συμμετοχή ή όχι του στην ανάπτυξη ή το «σπάσιμο» της ανεργίας, και η αλληλεπίδραση του με γνωστά ή μη μόρια, ώστε να διαπιστωθεί ποιός είναι ακριβώς ο ρόλος του στην ανάπτυξη ή καταστολή της περιφερικής ανοχής.