

# **Η Βιολογική Σημασία της Έκφρασης και Αλληλεπίδρασης των Μορίων CD40/CD40L και Fas/FasL στην Κυτταρική Σειρά KG-1**

**Master Thesis**

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα**

**“Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία, Διαγνωστική  
και Θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου”**

**Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης**

**Ειρήνη Μαυρουδή**

Χημικός

Απόφοιτος Πανεπιστημίου Κρήτης

**Σεπτέμβριος, 2005 – Ηράκλειο**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	Σελ. 1
<b>ΤΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ .....</b>	Σελ. 5
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	Σελ. 7
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	Σελ. 14
<b>ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....</b>	Σελ. 34
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	Σελ. 36
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	Σελ. 41

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε υπό την επιστημονική επιμέλεια της καθηγήτριας κ. Ελένης Παπαδάκη την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω για αυτή τη δυνατότητα που μου παρείχε, όπως επίσης για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε και την πολύτιμη βοήθειά της. Η επίλυση των δυσκολιών ή αποριών που παρουσιαζόταν κατά τη διάρκεια του σχεδιασμού και της εκτέλεσης των πειραμάτων, υπήρξε σημαντικό βοήθημα για την πραγμάτωση της παρούσης εργασίας.

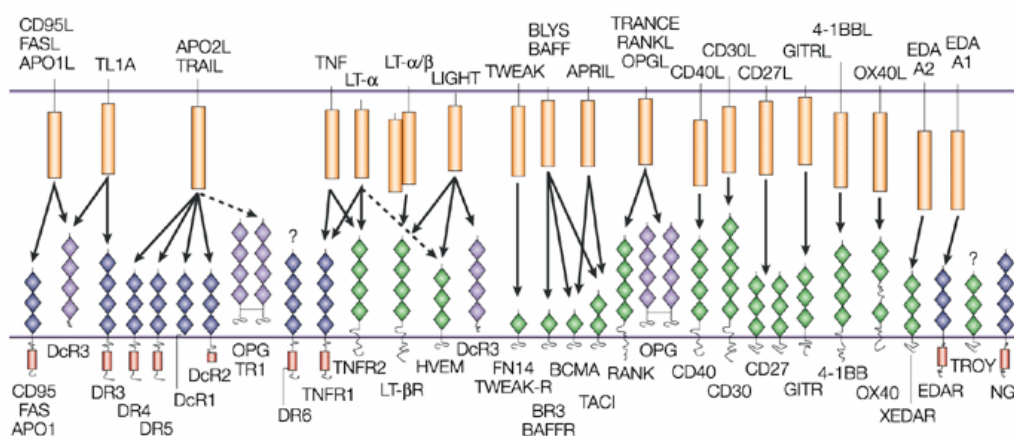
Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους καθηγητές κ Αριστείδη Ηλιόπουλο και κ. Γεώργιο Ηλιόπουλο για τη βοήθειά τους και για όλες τις επικοδομητικές συζητήσεις που αφορούσαν την εκτέλεση της παρούσης εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποίησα την παρούσα εργασία, κ. Κατερίνα Πυροβολάκη, για την πολύ καλή συνεργασία μας και την πάντα πρόθυμη παροχή βοήθειας εκ μέρους της καθώς επίσης και τις κ. Αθηνά Δαμιανάκη, κ. Κλαυδία Γεμετζή, και κ. Χριστίνα Καστρινάκη για την πολύ καλή συνεργασία τους, την παροχή βοήθειας όποτε ήταν αναγκαίο και την ενθάρρυνσή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ελένη Κουταλά για τη συνεργασία της.

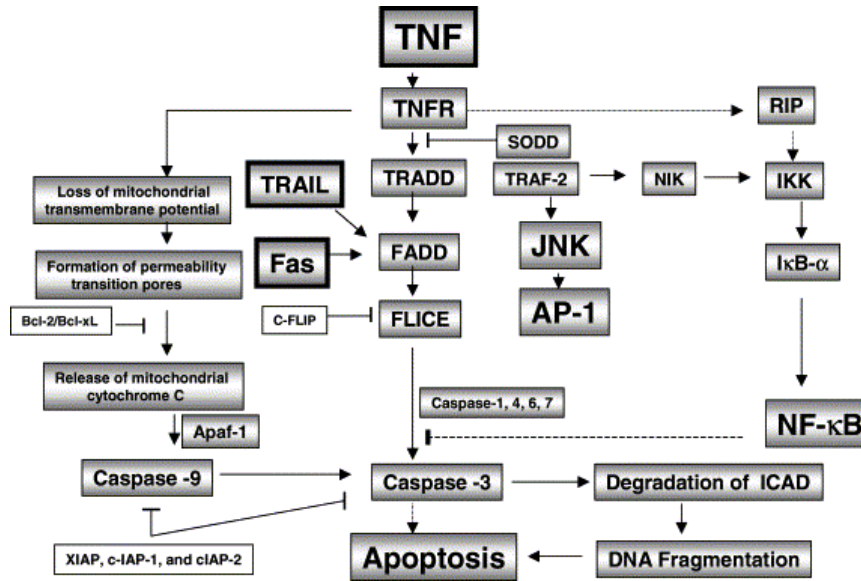
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένας σημαντικός μηχανισμός ελέγχου και διατήρησης της ομοιόστασης των ιστών, τόσο στο στάδιο της εμβρυογένεσης όσο και στον ώριμο οργανισμό. Ωστόσο, η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε μη φυσιολογικές καταστάσεις, όπως αιματολογικές κακοήθειες ή σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας. Για επαγωγή της απόπτωσης στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις, ενοχοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί αλλά και κυτταροκίνες όπως αυτές που ανήκουν στην οικογένεια του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) που δρουν μέσω υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων του TNF (TNF-Receptors, TNF-R) [Papadaki et al, 2003; Sawanobori et al 2003]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 20 μόρια της οικογένειας TNF, που ωστόσο δεν επάγουν όλα τον μηχανισμό απόπτωσης, και 30 διαφορετικά μέλη της οικογένειας των TNF-R (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Η οικογένεια των μορίων TNF/TNFR. [Ashkenazi, 2002]

Τα μέλη της οικογένειας TNF-R ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν περιέχουν ή όχι στο κυτταροπλασματικό τους άκρο «περιοχές επαγωγής θανάτου» (death domains, DD). Στην πρώτη κατηγορία TNF-R (με DD), ανήκουν τα μόρια TNF-R1 και Fas με ειδικά μόρια-διεγέρτες (Ligands, L) τον TNFα και FasL, αντίστοιχα. Στη δεύτερη κατηγορία TNF-R (χωρίς DD), ανήκουν τα μόρια TNF-R2 και CD40 με ειδικά μόρια-διεγέρτες τον TNFα και CD40L, αντίστοιχα. Οι DD περιοχές, είναι τα τμήματα του υποδοχέα που επιστρατεύουν άλλες πρωτεΐνες-σηματοδότες όπως, για παράδειγμα, στην περίπτωση του TNF-R1, το TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain), FADD (Fas Associated Death Domain), και FLICE (FADD-like Interleukin Convering Enzyme), με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 που οδηγεί στην απόπτωση [Gaur et al, 2003; Hsu et al, 1995; Tartalia et al, 1993]. Είναι, βέβαια, γνωστή η πολυπλοκότητα των δράσεων του TNF που οφείλεται, εν μέρει τουλάχιστον, στο γεγονός ότι ο TNF-R1 εμπλέκεται και στη μεταφορά αντι-αποπτωτικών σημάτων κυρίως μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nuclear Factor- κB (NF-κB) [Hsu et al, 1995; Tartalia et al, 1993]. Από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση του TNF-R2 έχει συνήθως αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα αφού, όπως προαναφέρθηκε, ο υποδοχέας στερείται DD. Συγκεκριμένα, ο TNF-R2 μετά την ενεργοποίησή του αλληλεπιδρά απευθείας με το μόριο-πλατφόρμα TRAF-2 (TNF associated factor 2) που στη συνέχεια ενεργοποιεί τον NF-κB αλλά και την κινάση Janus (Janus Kinase, JNK) [Cheng et al, 1995; Rothe et al, 1995; Rothe et al, 1994; Liu et al, 1996; Natoli et al, 1997] (Εικόνα 2).

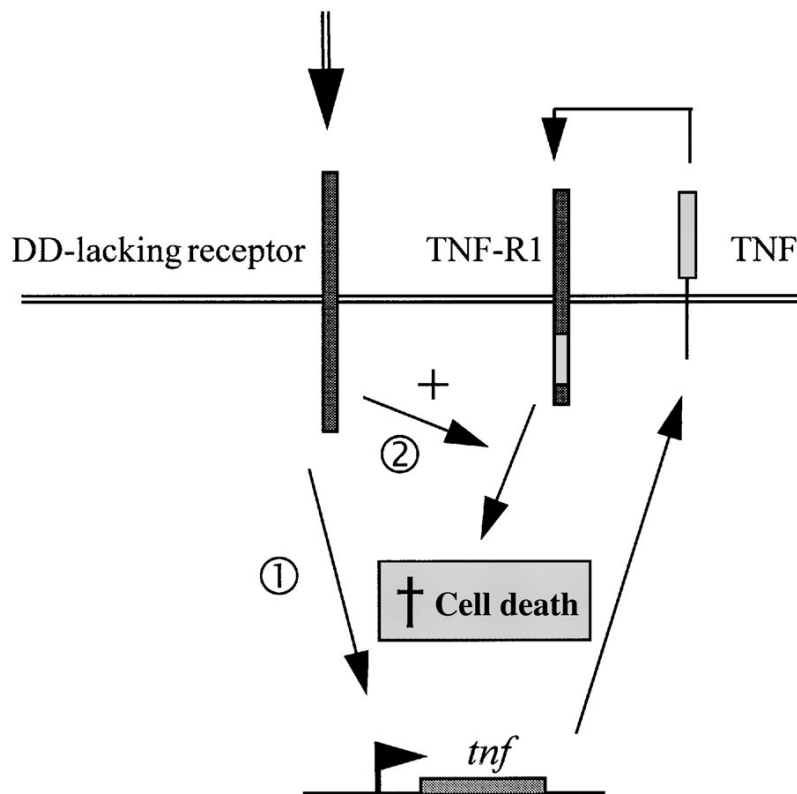


**Εικόνα 2:** Μετάδοση του σήματος του TNF [Gaur et al, 2003]

Το παραπάνω διπλό-μοντέλο-δράσης του TNF έχει επιβεβαιωθεί και από τις μελέτες των Micheau and Tschopp 2003. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές χρησιμοποιώντας την HT1080 κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος, απέδειξαν ότι η πρόσδεση του TNF $\alpha$  στον TNF-R1 επάγει δύο διαφορετικά ενδοκυττάρια συμπλέγματα. Το πρώτο προάγει την επιβίωση των κυττάρων μέσω του NF- $\kappa$ B, ενώ το δεύτερο σχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα σημαντικά αργότερα σε σχέση με την πρόσδεση του TNF $\alpha$  στον υποδοχέα του. Αυτό το δεύτερο σύμπλεγμα, προάγει την απόπτωση, αλλά μπορεί να παρεμποδιστεί από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που έχουν προηγουμένως παραχθεί μέσω του μονοπατιού του NF- $\kappa$ B. Αυτό το σύστημα καθορίζει τη μοίρα ενός συγκεκριμένου κυττάρου που λαμβάνει σήμα από τον TNF $\alpha$ .

Η δυναμικά διπλή λειτουργία του TNF $\alpha$  μέσω του TNF-R1 έχει αποδειχτεί και στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Συγκεκριμένα, έχει δείχτει ότι ο TNF $\alpha$  επηρεάζει θετικά ή αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών προβαθμίδων ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, το βαθμό ωριμότητας των κυττάρων στόχων και το είδος των αυξητικών παραγόντων στην καλλιέργεια ή στο μικροπεριβάλλον του μυελού. Έχει, λοιπόν, αποδειχτεί ότι ο TNF $\alpha$  κατά αποκλειστικότητα μέσω του TNF-R1, αναστέλλει τον σχηματισμό αποικιών *in vitro* από ώριμα προγονικά κύτταρα παρουσία αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) και τον πολλαπλασιασμό των άωρων προγονικών κυττάρων παρουσία αυξητικού παράγοντα των προγονικών κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF). Μέσω του ίδιου υποδοχέα, χαμηλή συγκέντρωση του TNF $\alpha$  φαίνεται να έχει επαγωγική δράση στα πρώιμα στάδια της μυελοποίησης δοθέντος ότι προάγει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των CD34<sup>+</sup> κυττάρων παρουσία ιντερλευκίνης-3 (interleukin-3, IL-3) και αυξητικού παράγοντα κοκκιοκυττάρων/μονοκυττάρων (Granulocyte/Macrophage-CSF, GM-CSF). Ωστόσο, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των πολύ πρώιμων προγονικών κυττάρων (high proliferative potential colony-forming cells, HPP-CFCs) παρουσία GM-CSF + IL-3 + G-CSF + SCF + IL-1 $\alpha$ . [Rusten et al, 1994a ; Caux et al, 1990 ; Rusten et al, 1994b].

Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση του TNF-R2 και του CD40 ασκεί κυρίως αντι-αποπτωτική δράση μέσω του NF- $\kappa$ B ή της JNK και, επομένως, προάγεται η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Αυτό έχει αποδειχτεί κατά την διαφοροποίηση των φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων και κατά την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Σε ορισμένες, ωστόσο, κυτταρικές σειρές (KYM-1, HeLa-CD40, murine A9-CD40), έχει αποδειχτεί το παράδοξο, η ενεργοποίηση των μορίων TNF-R2 και CD40, υποδοχέων δηλαδή χωρίς DD, να επάγουν την απόπτωση στα κύτταρα. Η παράδοξη αυτή δράση φαίνεται να είναι έμμεση, μέσω της επαγωγής της παραγωγής ενδογενούς TNF $\alpha$  και έκφρασης TNF-R1 [Grell et al,1999]. Ομοίως, η ενεργοποίηση του CD40 από το CD40L σε ηπατοκύτταρα *ex vivo* και σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*, μπορεί έμμεσα να οδηγήσει σε απόπτωση, με επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα Fas που έχει DD, και ενεργοποίησής του μέσω αυτοκρινικής ή παρακρινικής παραγωγής FasL [Eliopoulos et al, 2000; Afford et al, 1999]. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ακόμα και υποδοχείς που στερούνται DD μπορούν να μεταφέρουν αποπτωτικά σήματα μέσω επαγωγής της έκφρασης των υποδοχέων που φέρουν DD και παραγωγής των αντίστοιχων μορίων-συνδετών, τουλάχιστον σε ορισμένους τύπους κυττάρων [Eliopoulos et al,2000; Grell et al,1999]. Το μοντέλο αυτό επαγωγής της απόπτωσης μέσω υποδοχέων που στερούνται DDs παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Το εάν αντίστοιχος τρόπος επαγωγής της απόπτωσης ισχύει και για τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα δεν έχει ποτέ διερευνηθεί. .



Εικόνα 3:  
Μοντέλο

επαγωγής της απόπτωσης μέσω υποδοχέων στερούμενων DD. [Grell et al,1999]

## ΤΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε, η απόπτωση έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία αλλά και παθοφυσιολογία της αιμοποίησης. Μελέτες, μάλιστα, στο δικό μας αλλά και σε άλλα εργαστήρια έχουν δείξει ότι στην παθοφυσιολογία της μυελικής ανεπάρκειας σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα μόρια της οικογένειας TNF/TNFR που εκφράζονται στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα αλλά και στα κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος [Maciejewski et al, 1995; Gersuk et al, 1998; Papadaki et al, 2001,2002a,2002b,2003; Sato et al, 1997] Αυτό έχει κυρίως αποδειχτεί σε πάσχοντες από Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία, Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα και Απλαστική Αναιμία. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι ένας από τους κύριους παθογενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μυελική ανεπάρκεια είναι η επαγωγή της απόπτωσης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίηση του Fas. Υπό φυσιολογικές, ωστόσο, συνθήκες τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα δεν εκφράζουν Fas. Η έκφραση του Fas στα κύτταρα αυτά επάγεται από την παρουσία TNF $\alpha$  και/ή IFN $\gamma$  στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον [Maciejewski et al, 1995; Nagafuji et al, 1995]. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστός άλλος μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης του Fas. Έχει, επίσης, αποδειχτεί ότι η ενεργοποίηση του TNF-R1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, και του TNF-R2 επάγει τον πολλαπλασιασμό στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Ο μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης των υποδοχέων αυτών στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Σύμφωνα με το μοντέλο που περιγράφηκε παραπάνω που στηρίζεται σε δεδομένα από καρκινικές κυτταρικές σειρές και ηπατοκύτταρα, η επαγωγή και ενεργοποίηση του CD40 ενδέχεται να επάγει την έκφραση του Fas ή και άλλων μορίων της οικογένειας TNF/TNFR στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Η έκφραση, ωστόσο, του CD40 στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα είναι τελείως άγνωστη. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο TNF $\alpha$  και η IFN $\gamma$  έχει δείχθει ότι επάγουν την έκφραση του CD40 σε διάφορα κύτταρα όπως τα μακροφάγα των ιστών και κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης. [Schonbeck et al, 2001]. Σημειώνεται ότι οι κυτταροκίνες αυτές υπερεκφράζονται στον μυελό των οστών ασθενών με τα παραπάνω σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας.

Ο σκοπός της εργασίας είναι:

1. Η μελέτη της φυσιολογικής έκφρασης του μορίου CD40 στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και η διερεύνηση μηχανισμών επαγωγής του. Ιδιαίτερα θα μελετηθεί η επίδραση του TNF $\alpha$  που, όπως προαναφέρθηκε, υπερεκφράζεται στα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας.
2. Η διερεύνηση του πιθανού ρόλου του CD40 στην επαγωγή της απόπτωσης των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων μέσω επαγωγής της έκφρασης TNF/TNFR μορίων στα κύτταρα.

Δοθέντος ότι ο αριθμός των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (CD34<sup>+</sup> κύτταρα) στον μυελό είναι πολύ μικρός (1-2% των εμπυρήνων κυττάρων του μυελού) απαιτείται μεγάλος αριθμός φυσιολογικών

ατόμων για την συλλογή και μελέτη των CD34<sup>+</sup> κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη θα διερευνηθούν τα παραπάνω ερωτήματα με χρήση της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς KG-1 που εκφράζει κατά 99% το CD34 μόριο. Σκοπός μας είναι η ανάπτυξη ενός μοντέλου για την περιγραφή ενός νέου μηχανισμού επαγωγής της απόπτωσης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ***KG1-Κυτταρική σειρά***

Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά KG-1 προήλθε από ασθενή με ερυθρολευχαιμία που εξελίχθηκε σε οξεία μυελογενή λευχαιμία [Koeffner et al, 1978]. Τα κύτταρα αυτά είναι αιωρούμενα και εκφράζουν το αντιγόνο επιφανείας CD34 που εκφράζεται και στα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

Η κυτταρική σειρά διατηρούνταν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation) εμπλουτισμένου με 10% απενεργοποιημένου με θερμότητα ορό εμβρύου βοός (heat inactivated fetal bovine serum, FBS; Gibco) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Penicillin/Streptomycin, P/S; Gibco). Η παραπάνω σύσταση του καλλιεργητικού υλικού, θα αναφέρεται στο εξής ως πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Τα κύτταρα αφήνονταν για επώαση σε υγρό επωαστικό κλίβανο με περιεκτικότητα 5%CO<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 37 °C. Σε κάθε καλλιεργητική φλάσκα η συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 0.3-0.4 x 10<sup>6</sup> cells/ml και κάθε 3-4 μέρες γινόταν ανακαλλιέργεια με ανανέωση του θρεπτικού υλικού.

## ***Καμπύλη ανάπτυξης KG-1 κυττάρων***

Για τον προσδιορισμό των τριών φάσεων ανάπτυξης (lag, log, plateau) των KG-1 κυττάρων δημιουργήθηκε η καμπύλη ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του MTT. Το MTT (diphenyltetrazoliumbromide) είναι μια κίτρινη χρωστική, άλας του τετραζολίου, το οποίο όταν αντιδράσει με το ένζυμο των μιτοχονδρίων ηλεκτρική αφυδρογονάση, μετατρέπεται σε ένα αδιάλυτο χρωματισμένο προϊόν (MTT-formazan). Το ποσοστό της απελευθερούμενης χρωστικής συσχετίζεται με την δραστικότητα των μιτοχονδρίων και επομένως με τη μεταβολική ικανότητα των κυττάρων, κατά συνέπεια δε και με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

Ειδικότερα, σε πλάκες 96-μικροβοθρίων στρογγυλού πυθμένα (96-well round bottom) καλλιεργούνταν τα KG-1 κύτταρα στις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω, σε πλήρες θρεπτικό RPMI 1640 σε συγκέντρωση 0,1- 0,75 x 10<sup>6</sup> cells/ml σε τελικό όγκο 200μl, εις τριπλούν. Κάθε μέρα, αφαιρούνταν το μισό θρεπτικό υλικό από κάθε βοθρίο μετά από φυγοκέντρηση οκτώ λεπτών στα 380g και στη συνέχεια προσθέτονταν 20μl MTT 10mg/ml. Μετά από επώαση 3 ωρών στους 37 °C, προσθέτονταν 100μl Lysis Buffer ( 20%SDS + 50%DMF σε dH<sub>2</sub>O, pH=4.7) για ολονύκτια (overnight) επώαση στους 37 °C . Την επόμενη μέρα, γινόταν μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 630nm και καταγραφόταν η απορρόφηση, η οποία αναγόταν σε αριθμό κυττάρων. Έτσι βρέθηκε ο ρυθμός διπλασιασμού των κυττάρων και η καμπύλη ανάπτυξης.

## ***Βραχύχρονες καλλιέργειες των KG-1 κυττάρων***

Για τον έλεγχο της έκφρασης των μορίων της οικογένειας TNF/TNFR και τη μελέτη της απόπτωσης στα κύτταρα KG-1, έγιναν βραχύχρονες καλλιέργειες των κυττάρων παρουσία κυτταροκινών.

Συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε πλάκες 96-μικροβοθρίων στρογγυλού πυθμένα σε θρεπτικό υλικό IMDM/10%FBS, σε συγκέντρωση  $0,1 \times 10^5$  κύτταρα/200μl. Σε κάθε μικροβοθρίο προσθέτονταν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (10ng/ml, 25ng/ml) ανθρώπινου ανασυνδυασμένου TNFα (recombinant human TNFα, rhTNFα; Bender MedSystems) με ή χωρίς 5μg/ml διαλυτού rhAPO-1/FasL (Bender MedSystems) και 1μg/ml rhCD40L (Bender MedSystems). Κύτταρα χωρίς προσθήκη κυτταροκινών χρησιμοποιούνταν ως control σε κάθε πείραμα.. Οι συνδυασμοί των κυτταροκινών αναγράφονται στον Πίνακα 1. Τα κύτταρα επωάζονταν στις προαναφερθείσες συνθήκες για 72 ώρες, ακολουθούσε πλύσιμο με PBS (Phosphate Buffer Saline)/1% FBS και έλεγχος με κυτταρομετρία ροής.

**Πίνακας 1:** Συνδυασμοί κυτταροκινών στις καλλιέργειες των κυττάρων KG-1

* KG-1 w/o	KG-1 + 10 ng/ml rhTNFα	KG-1 + 25 ng/ml rhTNFα
	KG-1 + 10 ng/ml rhTNFα + 5μg/ml rhAPO-1/FasL	KG-1 + 25 ng/ml rhTNFα + 5μg/ml rhAPO-1/FasL
	KG-1 + 10 ng/ml TNFα + 1μg/ml rhCD40L	KG-1 + 25 ng/ml TNFα + 1μg/ml rhCD40L
	KG-1 + 10 ng/ml TNFα + 5μg/ml rhAPO-1/FasL + 1μg/ml rhCD40L	KG-1 + 25 ng/ml TNFα + 5μg/ml rhAPO-1/FasL + 1μg/ml rhCD40L

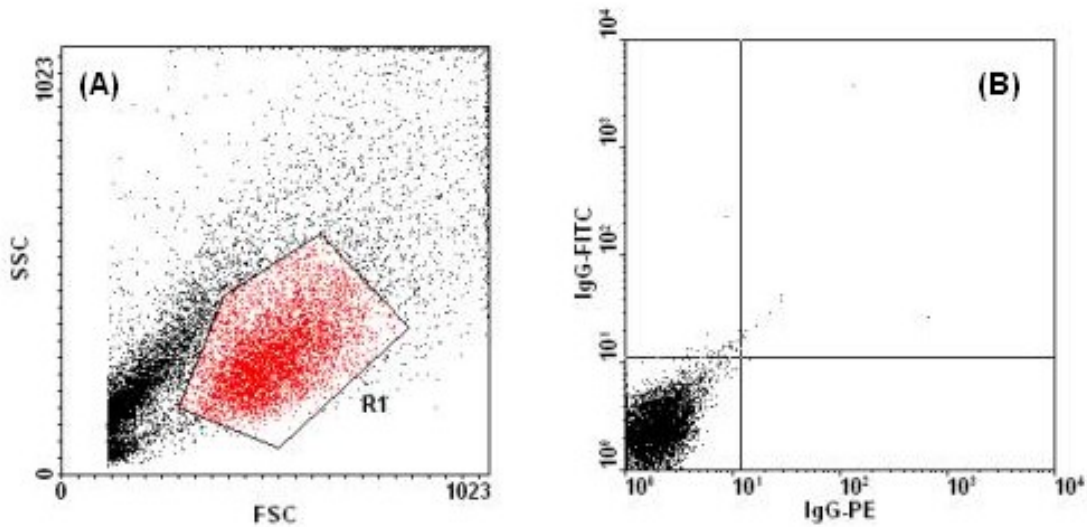
Επιλογή καλλιέργειας:  $2,5 \times 10^6$  κύτταρα σε πλάκες 24 βοθρίων σε θρεπτικό υλικό IMDM-10 \* KG-1 w/o: Κύτταρα χωρίς (without, w/o) προσθήκη κυτταροκινών. Πίνακα 1, 25ng/ml rhTNFα, 5μg/ml rhAPO-1/FasL και 1μg/ml rhCD40L. Τα κύτταρα επωάζονταν στις προαναφερθείσες συνθήκες για 3, 6, 9, 12, και 24 ώρες, ακολουθούσε πλύσιμο με PBS/1% FBS και συλλογή του ολικού RNA όπως περιγράφεται παρακάτω.

## Κυτταρομετρία Ροής

Για τον προσδιορισμό των αντιγόνων επιφανείας και την μελέτη της έκφρασης μορίων της οικογένειας TNF/TNFR στην επιφάνεια των κυττάρων KG-1, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής.

Σε συντομία,  $2 \times 10^5$  κύτταρα σε 100 μl PBS, επωάζονταν με 40μl γ-σφαιρίνης 2% (γ-HAG; Sigma) για 10 λεπτά στον πάγο για να μειωθεί η πιθανότητα μη-ειδικού φθορισμού και ακολούθως σημαίνονταν με το κατάλληλο αντι-ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού συνδεδεμένου με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein isothiocyanate, FITC) ή φυκοερυθρίνη (phycoerythrin, PE) ή το κατάλληλο ισοτυπικό control, για 30 λεπτά στους 4°C. Για την τυποποίηση των αντιγόνων επιφανείας της κυτταρικής σειράς χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μονοκλωνικά αντισώματα: αντι-CD7-FITC (8H8.1; Beckman Coulter), αντι-CD10-FITC (SJ5-1B4; Caltag), αντι-CD11b-FITC (Bear1; Beckman Coulter), αντι-CD13-FITC (SJ1D1; Beckman Coulter), αντι-CD14-FITC (RM052; Beckman Coulter), αντι-CD19-

PE (J4.119; Beckman Coulter), αντι-CD33-PE (D3HL60.251; Beckman Coulter), αντι-CD34-PE (QBEnd-10; Beckman Coulter), αντι-CD38-FITC (HIT2; Caltag), αντι-CD45-PE (J.33; Beckman Coulter), αντι-CD56-PE (N901; Beckman Coulter), αντι-CD16-PE (3G8; Beckman Coulter), anti-CD71-FITC (YDJ1.2.2; Beckman Coulter) και αντι-GlycophorinA-PE (11E4B-7-6; Beckman Coulter). Ακολουθούσε πλύσιμο των κυττάρων δύο φορές με PBS/1%FBS/0.05% αζίδιο του νατρίου (sodium azide,  $\text{NaN}_3$ ), μονιμοποίηση με 200μl διαλύματος παραφορμαλδεΐδης 2% (paraformaldehyde, PFA; Sigma) και πέρασμα (acquisition) σε κυτταρομετρητή ροής Epics Elite (Coulter, Miami, FL). Για την ανάλυση, επί 20.000 κυττάρων (events), χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης Elite. Αρχικά δημιουργούταν ένα διάγραμμα μεγέθους/κοκκίωσης (Forward Scatter/Side Scatter; FSC/SSC, αντίστοιχα) για την περιχαράκωση (gating) των κυττάρων και στη συνέχεια ένα δεύτερο διάγραμμα FITC/PE επί του πληθυσμού των κυττάρων προηγούμενου διαγράμματος (Εικόνα 4). Σε ορισμένες περιπτώσεις προσδιοριζόταν, επίσης, στα μονά ιστογράμματα η ένταση φθορισμού (mean channel fluorescence intensity) που αντιστοιχεί στον αριθμό υποδοχών ανά κύτταρο.



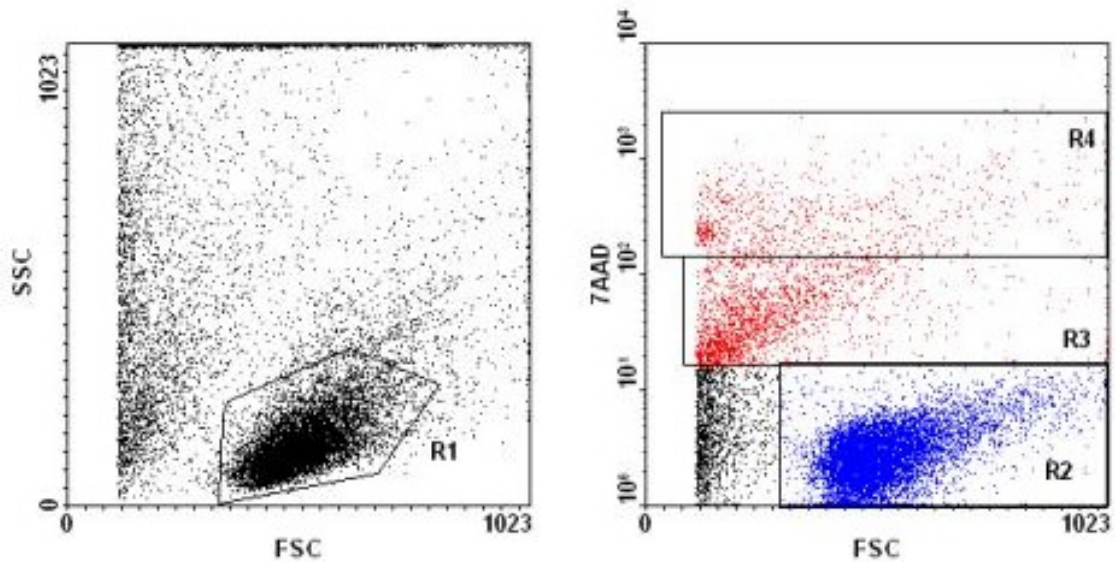
**Εικόνα 4: Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της έκφρασης αντιγόνων επιφανείας στα KG1 κύτταρα.** Το διάγραμμα A αφορά τη σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχαράκωση των κυττάρων (περιοχή R1). Το διάγραμμα B δείχνει την εικόνα που δίνουν τα ιστοτυπικά control.

Για τον έλεγχο της έκφρασης αντιγόνων της οικογένειας TNF/TNFR στην επιφάνεια των κυττάρων μετά από καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μονοκλωνικά αντισώματα: αντι-Fas-FITC (LOB 3/17; Serotech), αντι-FasL-FITC (Alf-2.1a; Ancell), αντι-CD40-FITC (5C3; BD Pharmingen), αντι-CD40L-FITC (TRAP1; BD Pharmingen), αντι-TNFR1-FITC (16803; R&D Systems) και αντι-TNFR2-PE (22235; R&D Systems). Η προετοιμασία των δειγμάτων με τα μονοκλωνικά αντισώματα ή τα αντίστοιχα ιστοτυπικά control και η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έγιναν όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### Μελέτη της απόπτωσης

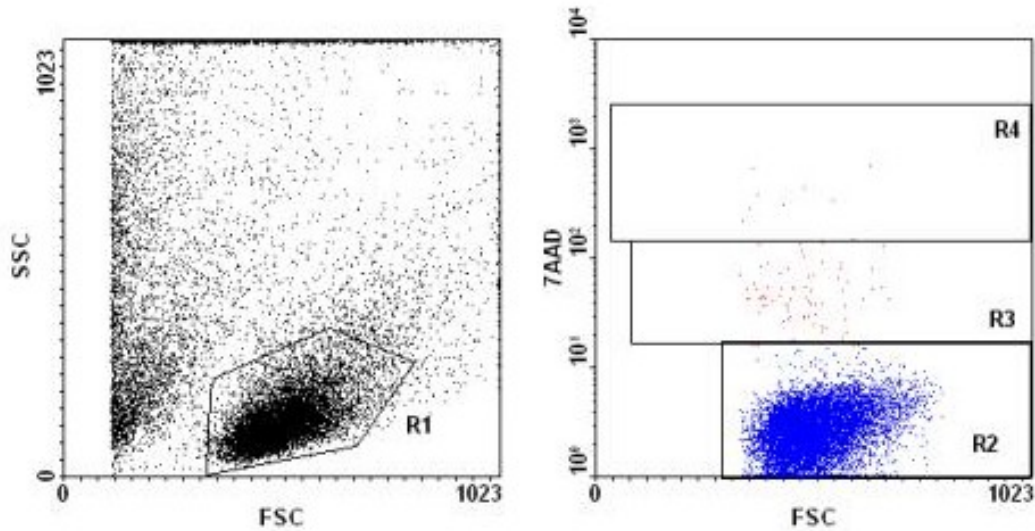
Για τη μελέτη της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής και η χρωστική 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-amino-actinomycin-D, 7-AAD). Το 7-AAD είναι μια φθορίζουσα ουσία (μήκος κύματος εκπομπής 660 nm) με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA παρεμβαλλόμενη μεταξύ των βάσεων κυτοσίνης-γουανίνης. Ο βαθμός πρόσδεσής της στο DNA εξαρτάται από το βαθμό βλάβης της

κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, τα ζωντανά κύτταρα τα οποία έχουν ακέραια την κυτταρική μεμβράνη δεν επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής, ενώ τα αποπτωτικά και νεκρά κύτταρα επιτρέπουν σε μέτριο και μεγάλο βαθμό, αντίστοιχα, την είσοδο της χρωστικής. Έτσι, με χρήση του 7-AAD ξεχωρίζονται τρεις κυτταρικοί πληθυσμοί: τα ζωντανά ( $7\text{-AAD}^{\text{neg}}$ ), αποπτωτικά ( $7\text{-AAD}^{\text{dim}}$ ) και νεκρά ( $7\text{-AAD}^{\text{bright}}$ ) κύτταρα [Philpott et al, 1996, Papadaki et al, 2003] (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5: Μελέτη της απόπτωσης με χρήση 7-αμινο-ακτινομυκίνης-D (7-AAD).** Το αριστερό διάγραμμα αφορά τη σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) προκειμένου να περιχαρακωθούν τα KG1 κύτταρα (R1 περιοχή). Το δεξιά διάγραμμα, FSC/7-AAD φθορισμού αναδεικνύει τα ζωντανά ( $7\text{-AAD}^{\text{neg}}$ , περιοχή R2 με μπλε χρώμα), τα αποπτωτικά ( $7\text{-AAD}^{\text{dim}}$ , περιοχή R3 με κόκκινο χρώμα) και τα προχωρημένα αποπτωτικά-νεκρά ( $7\text{-AAD}^{\text{bright}}$ , περιοχή R4 με κόκκινο χρώμα) κύτταρα. Η ανάλυση εν προκειμένω, έχει γίνει στο σύνολο του πληθυσμού αποκλείοντας τα κυτταρικά ράκη.

Συγκεκριμένα,  $2 \times 10^5$  KG-1 κύτταρα σε 450  $\mu\text{l}$  PBS, επωάζονταν με 50  $\mu\text{l}$  7-AAD (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) για 15 λεπτά στον πάγο, προστατευμένα από το φως. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 380g για 5 λεπτά. και μονιμοποίηση με 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος PFA 2%. Κύτταρα κατεργασμένα όπως παραπάνω αλλά χωρίς προσθήκη 7-AAD χρησιμοποιούνταν ως αρνητικό control. Το πέρασμα (acquisition) των δειγμάτων στον κυτταρομετρητή γινόταν εντός 30 λεπτών δοθέντος ότι η μακρά επίδραση του 7-AAD είναι τοξική για τα κύτταρα και έτσι μπορεί να αυξήσει το ποσοστό των αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων. Για την ανάλυση, επί 20.000 κυττάρων, δημιουργούσαμε ένα διάγραμμα FSC/SSC για την περιχαρακωση των κυττάρων και ένα δεύτερο διάγραμμα συνδυασμού FSC/7-AAD φθορισμού (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6: Μελέτη της απόπτωσης στον πληθυσμό των KG1 κυττάρων.** Το αριστερό διάγραμμα αφορά τη σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) προκειμένου να περιχαρακωθούν τα KG1 κύτταρα (R1 περιοχή). Στο δεξιό διάγραμμα FSC/7-AAD φθορισμού η ανάλυση γίνεται στον πληθυσμό R1 και αναδεικνύει ότι η σημαντική πλειοψηφία των κυττάρων είναι ζωντανά (περιοχή R2 με μπλε χρώμα) ενώ τα αποπτωτικά (περιοχή R3 με κόκκινο χρώμα) και προχωρημένα αποπτωτικά-νεκρά (περιοχή R4 με κόκκινο χρώμα) κύτταρα είναι ελάχιστα.

### ***RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)***

Ολικό RNA απομονώθηκε από  $5-10 \times 10^6$  KG-1 κύτταρα χρησιμοποιώντας το Kit της Qiagen (RNeasy Mini-Kit) μετά από απομάκρυνση τυχόν προσμειξιών από DNA με κατεργασία με DNase, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Από 1μg ολικού RNA έγινε η σύνθεση του μονόκλωνου cDNA (first-strand synthesis) χρησιμοποιώντας το Superscript Preamplification System (Invitrogen), με υποκινητές (primers) oligoTs (oligo-deoxythymidines), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια ακολούθησε διπλό (duplex) RT-PCR με ειδικά ζεύγη υποκινητών (primers). Τα ζεύγη υποκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της έκφρασης των μορίων Fas, FasL, CD40, CD40L, TNFR1, TNFR2 καθώς και το μέγεθος του τελικού προϊόντος (bp), αναγράφονται στον Πίνακα 2. Ως εσωτερικό control (house keeping gene) της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH (glycerol aldehyde phosphate dehydrogenase).

**Πίνακας 2.** Μόρια ανίχνευσης με RT-PCR, υποκινητές και μέγεθος προϊόντων

Μόριο	Πρόσθιος υποκινητής, 5'→3' (Forward Primer)	Οπίσθιος υποκινητής, 5'→3' (Reverse Primer)	Μέγεθος (bp)
Fas	ACCTGGAGGACAGGGCTTAT'	TCAGTACGGAGTTGGGGAAG	249

FasL	TCTACCAGCCAGATGCACAC	CAAGATTGACCCCGGAAGTA	258
CD40	ATGGTTTCGTCTGCCTCTG	TCACTGTCTCTCCTGCACTGA	837
CD40L	AGATGATTGGGTCAGCACTTTT	CTTTTAACGGTCAGCTGTTTCC	390
TNFR1	GTACCGGCATTATTGGAGTGA	CACCGTTGGTAGCGATACATT	324
TNFR2	CCATGGTGTGAAAGTCAGATG	AATTCCTGAAAGGAGATGGT	277
GAPDH	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC	AGGGGTCTACATGGCAACTG	146

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού για κάθε μόριο ήταν: για το **Fas** 94°C για 30s , 58°C για 30s, και 72°C για 45s για 32 κύκλους, για το **FasL** 94°C για 30s, 61°C για 30s, και 72°C για 30s για 31 κύκλους, για το **CD40** 94°C για 30s, 61°C για 30s, και 72°C για 45s για 35 κύκλους, , για το **CD40L** 94°C για 30s, 60°C για 30s, και 72°C για 45s για 37 κύκλους, για το **TNFR1** 94°C για 30s, 52°C για 30s, και 72°C για 20s για 32 κύκλους, για το **TNFR2** 94°C για 30s, 60°C για 30s, και 72°C για 45s για 34 κύκλους. Τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορούσαν σε πηκτή (gel) αραρόζης 2% και εμφανίζονταν υπό UV (ultra violet) ακτινοβολία με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Η σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων έγινε με βάση την έκφραση του GAPDH στο πρόγραμμα ανάλυσης ImageJ.

### Στατιστική Ανάλυση

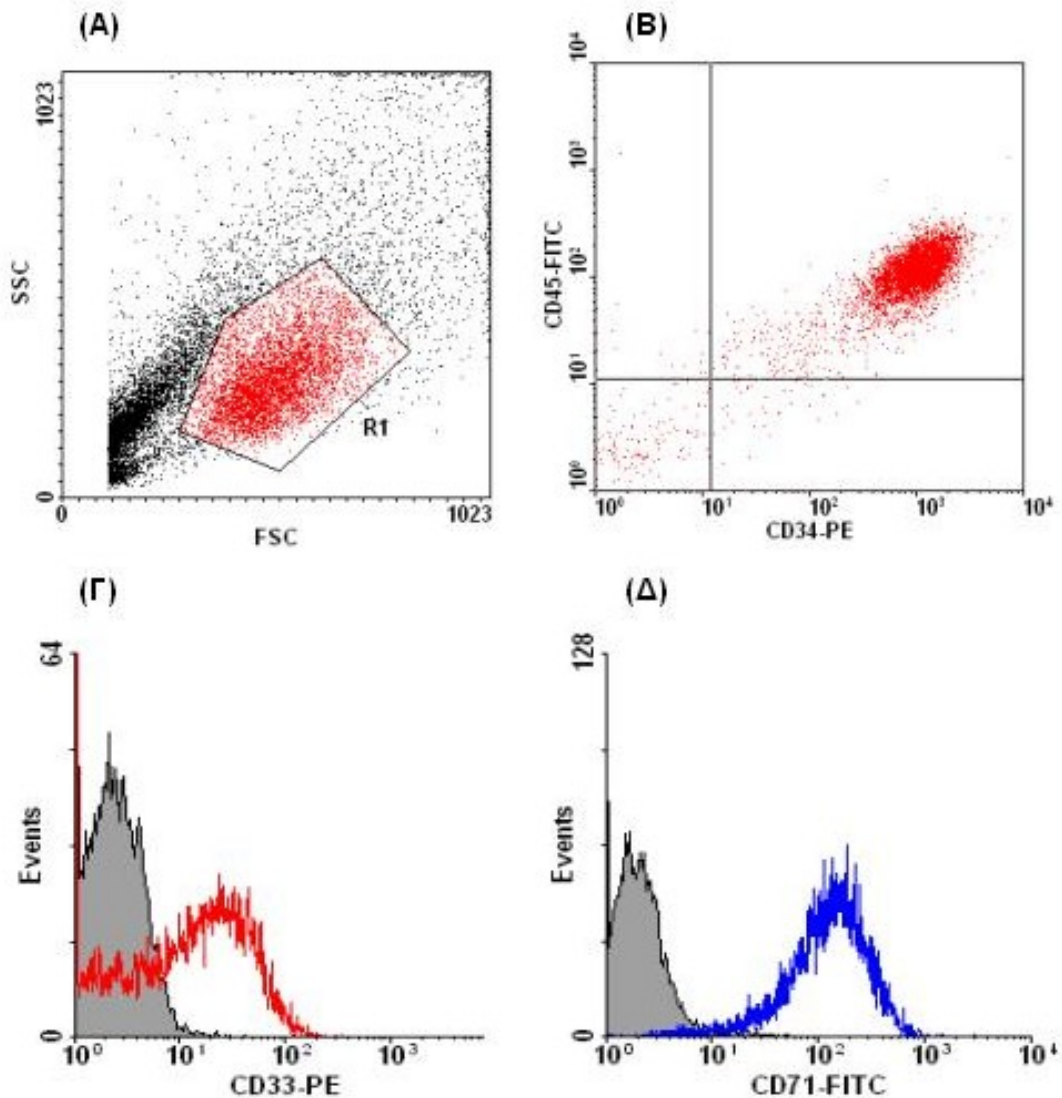
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPAD Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέση τιμή (mean) ± σταθερή απόκλιση (standard deviation, SD). Για τη σύγκριση δύο μέσων τιμών μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική δοκιμασία Man-Whitney. Για σύγκριση μέσων τιμών με ή χωρίς προσθήκη κυτταροκινών χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test για ζεύγη (paired t-test). Για τη σύγκριση πολλών μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας μιας κατευθύνσεως (one-way analysis of variance, ANOVA).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των KG-1 κυττάρων*

Τα αποτελέσματα από την μελέτη της έκφρασης αντιγόνων επιφανείας στα KG-1 κύτταρα με κυτταρομετρία ροής, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Το CD34, αντιγόνο επιφανείας των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, ανιχνεύθηκε στο  $99 \pm 0,8$  % των KG1 κυττάρων (Εικόνα 7B).



**Εικόνα 7: Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της έκφρασης αντιγόνων επιφανείας στα KG1 κύτταρα.** Το διάγραμμα A αφορά τη σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχαρακωση των κυττάρων (περιοχή R1). Το διάγραμμα B δείχνει την έντονη θετικότητα των κυττάρων για τα CD34 και CD45 αντιγόνα επιφανείας. Τα ιστογράμματα Γ και Δ δείχνουν την έντονη θετικότητα των κυττάρων για το CD33 και CD71 αντιγόνα, αντίστοιχα. Η ανάλυση στα διαγράμματα B, Γ και Δ έγιναν στον πληθυσμό R1.

Ο TNF-R1 ανιχνεύθηκε στο  $18,3\% \pm 17,5\%$ , ο TNF-R2 στο  $1,4 \pm 0,2$  %, το CD40 στο  $1,6 \pm 1$  % και το Fas στο  $5,2 \pm 3$  % των KG-1 κυττάρων. Επιπλέον τα KG-1 κύτταρα εξέφραζαν το CD45 αντιγόνο επιφανείας, υποδηλωτικό της αιμοποιητικής προέλευσης των κυττάρων (Εικόνα 7B), το αντιγόνο CD38 χαρακτηριστικό των άωρων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων καθώς και τα αντιγόνα CD71,

Glycophorin A χαρακτηριστικά της ερυθράς σειράς και τα CD13, CD11b, CD33, χαρακτηριστικά της μυελικής σειράς (Εικόνα 7Γ και 7Δ).. Τα κύτταρα εξέφραζαν, επίσης, το αντιγόνο T-λεμφικής προέλευσης CD7 (aberrant expression) ενώ δεν εξέφραζαν δείκτες B-λεμφικής προέλευσης (CD10, CD19) και NK-προέλευσης (CD56, CD16). Ο παραπάνω ανοσοφαινότυπος είναι συμβατός με τη γνώση από την βιβλιογραφία προέλευση της κυτταρικής σειράς, δηλαδή από ασθενή με ερυθρολευχαιμία που εξελίχθηκε σε οξεία μυελογενή λευχαιμία [Koeffner et al, 1978].

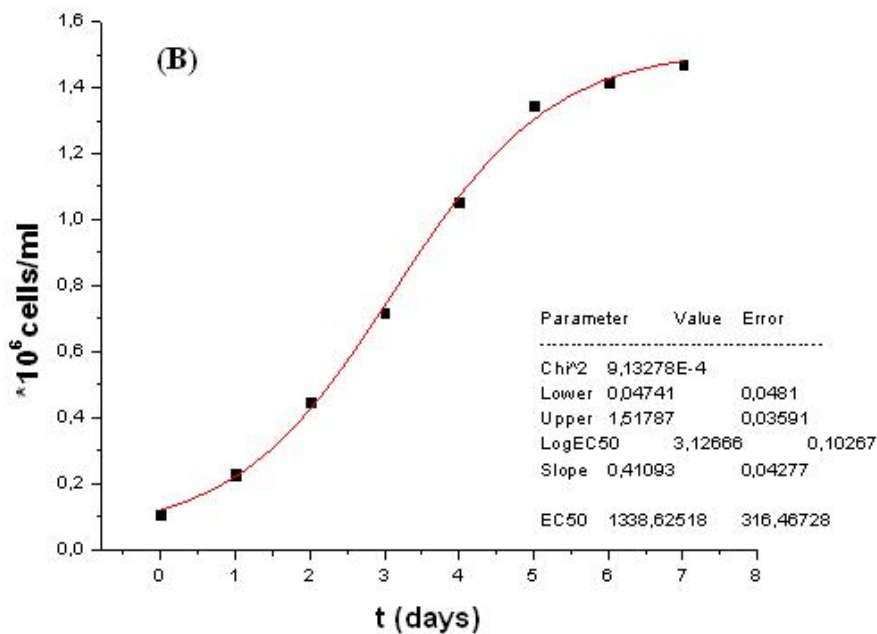
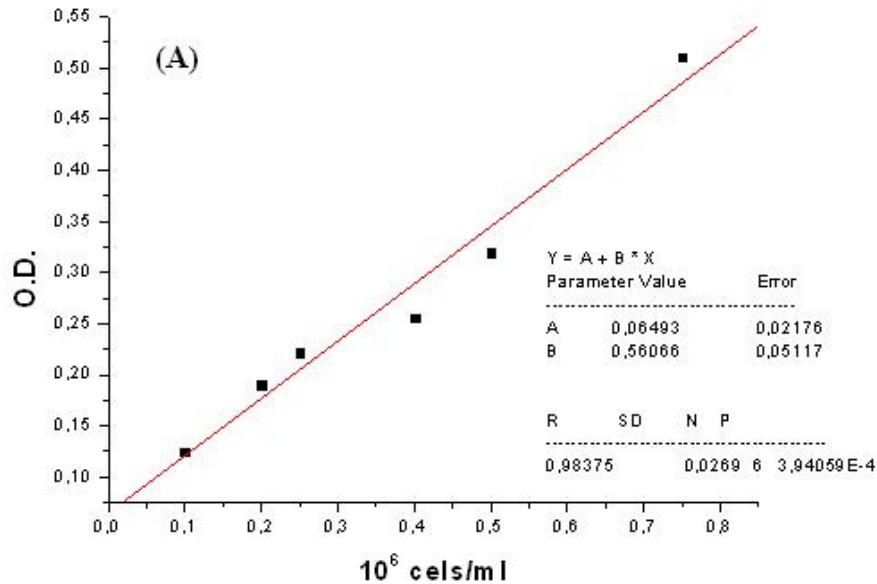
**Πίνακας 3.** Έκφραση αντιγόνων επιφανείας στα KG-1 κύτταρα

<b>CD34</b>	99±0,8 %	<b>CD7</b>	78,9±5,8 %	<b>CD38</b>	98,5±0,6 %
<b>CD40</b>	1,6±1 %	<b>CD10</b>	0 %	<b>CD45</b>	97,6±0,8 %
<b>CD40L</b>	0 %	<b>CD11b</b>	44,8±9,8 %	<b>CD56</b>	12,1±1,4 %
<b>Fas</b>	5,2±3 %	<b>GlycoA</b>	79,9±4,9 %	<b>CD16</b>	0 %
<b>FasL</b>	0,7±0,2 %	<b>CD13</b>	79,1±19,3 %	<b>CD71</b>	97,6±1,4 %
<b>TNF-R1</b>	18,3±17,5%	<b>CD14</b>	0 %	<b>CD33</b>	22,1±2,9 %
<b>TNF-R2</b>	1,4±0,2 %	<b>CD19</b>	0 %		

### ***Καμπύλη ανάπτυξης των KG-1 κυττάρων***



Για την δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του MTT. Αρχικά μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων KG-1 σε καθορισμένες συγκεντρώσεις 0,1- 0,75 x 10<sup>6</sup> κυττάρων/ml σε τελικό όγκο 200μl, εις τριπλούν, ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεως κυττάρων-οπτικής πυκνότητας όπως φαίνεται στην Εικόνα 8Α. Στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν κύτταρα KG-1 σε συγκέντρωση 0,1x 10<sup>6</sup> /ml σε τελικό όγκο 200μl, εις τριπλούν για επτά



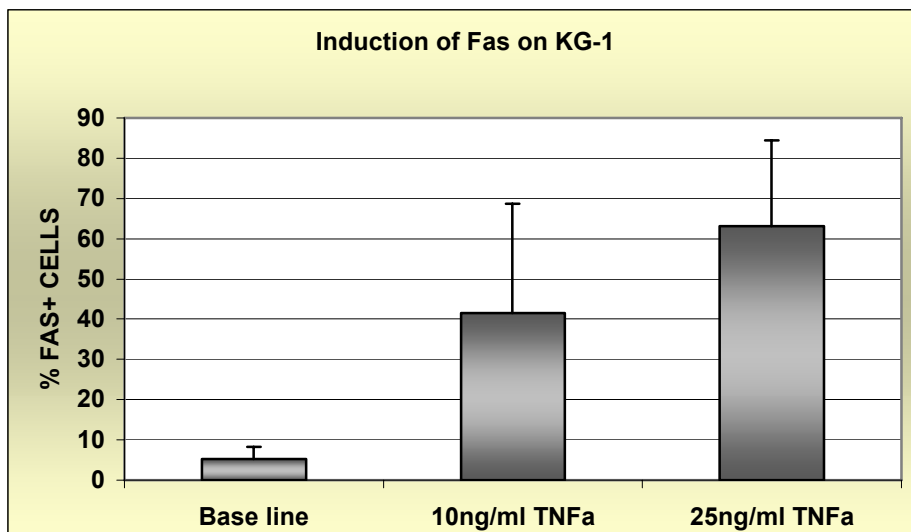
ημέρες, ενώ κάθε μέρα μετρίοταν η οπτική πυκνότητα μετά από κατεργασία των κυττάρων με MTT όπως αναλυτικά περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τελικά, με αντιστοίχιση της οπτικής πυκνότητας σε συγκέντρωση κυττάρων, κατασκευάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης των KG-1 κυττάρων (Εικόνα 8B).

**Εικόνα 8:** Πρότυπη καμπύλη σχέσεως συγκεντρώσεως κυττάρων/οπτικής πυκνότητας **(Α)** και καμπύλη ανάπτυξης των KG-1 κυττάρων **(Β)**.

### ***Επαγωγή της έκφρασης του αντιγόνου Fas στα KG-1 κύτταρα***

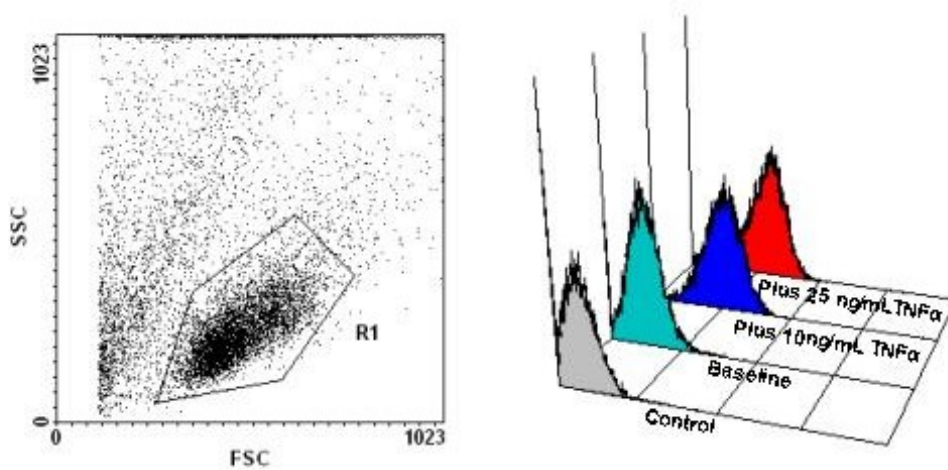
Η επαγωγή της έκφρασης του Fas σε προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μέσω φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF $\alpha$  και η IFN- $\gamma$  έχει δειχτεί στο παρελθόν από άλλες ερευνητικές ομάδες. [Maciejewski et al, 1995; Nagafuji et al ,1995].

Για να διερευνηθεί η επίδραση της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF $\alpha$  στην έκφραση του Fas στα KG-1 κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε αρχικά κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο Fas μετά από καλλιέργεια 72 ωρών παρουσία rhTNF $\alpha$  σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (10ng/ml και 25ng/ml). Από μία σειρά 5 πειραμάτων βρέθηκε ότι παρουσία 10ng/ml TNF $\alpha$  αυξήθηκε η έκφραση του Fas κατά 8 φορές (41,5%  $\pm$  27,2%), σε σχέση με την έκφραση του Fas χωρίς παρουσία rhTNF $\alpha$  (control) (5,2%  $\pm$  3%), ενώ παρουσία 25ng/ml η αύξηση της έκφρασης ήταν ακόμα μεγαλύτερη, κατά 12,5 φορές περίπου (63,1%  $\pm$  21,4%). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική (One-way ANOVA, P < 0.05) (Εικόνα 9).



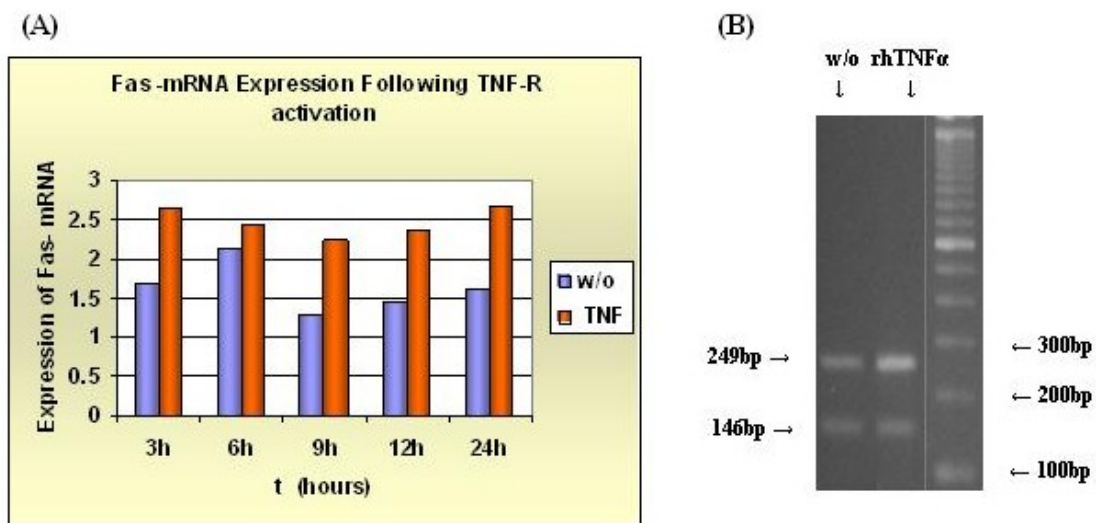
**Εικόνα 9:** Δοσοεξαρτώμενη επαγωγή του αντιγόνου Fas με επίδραση rhTNF $\alpha$ .  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς 10ng/ml και 25ng/ml rhTNF $\alpha$  για 72 ώρες και με κυτταρομετρία ροής μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν Fas. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD (n= 5) (P<0.05).

Ένα παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής της επαγωγή του Fas με rhTNF $\alpha$ , φαίνεται στην Εικόνα 10.



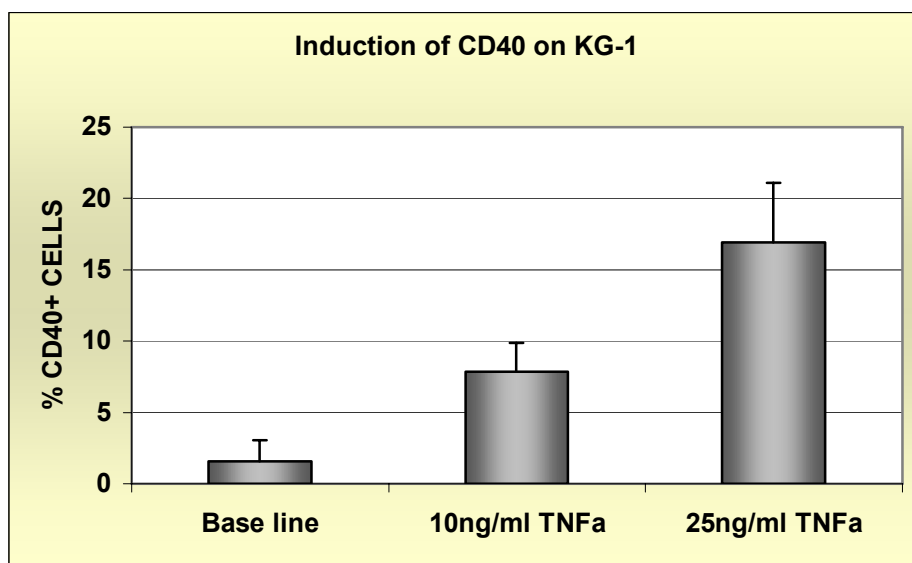
**Εικόνα 10: Παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής της έκφρασης του αντιγόνου Fas με επίδραση rhTNF $\alpha$ .** Το διάγραμμα A παριστάνει σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχάρακωση των κυττάρων (περιοχή R1). Το διάγραμμα B δείχνει την έκφραση του Fas χωρίς rhTNF $\alpha$ , και μετά από επίδραση 10ng/ml και 25ng/ml rhTNF $\alpha$  για 72 ώρες. Με γκρι χρώμα παριστάνεται το αρνητικό control.

Για περαιτέρω επιβεβαίωση της αύξησης της έκφρασης του Fas στα KG-1 κύτταρα παρουσία TNF $\alpha$ , πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική RT-PCR από RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες καλλιέργειας KG-1 κυττάρων με ή χωρίς 25ng/ml TNF $\alpha$ . Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση την έκφραση του GAPDH, φαίνονται στην Εικόνα 11. Η διαφορά στην έκφραση του Fas ανάμεσα στις σειρές μετρήσεων με και χωρίς rhTNF $\alpha$  (time-course) ήταν στατιστικά σημαντική ( $P < 0.05$ , paired t-test).



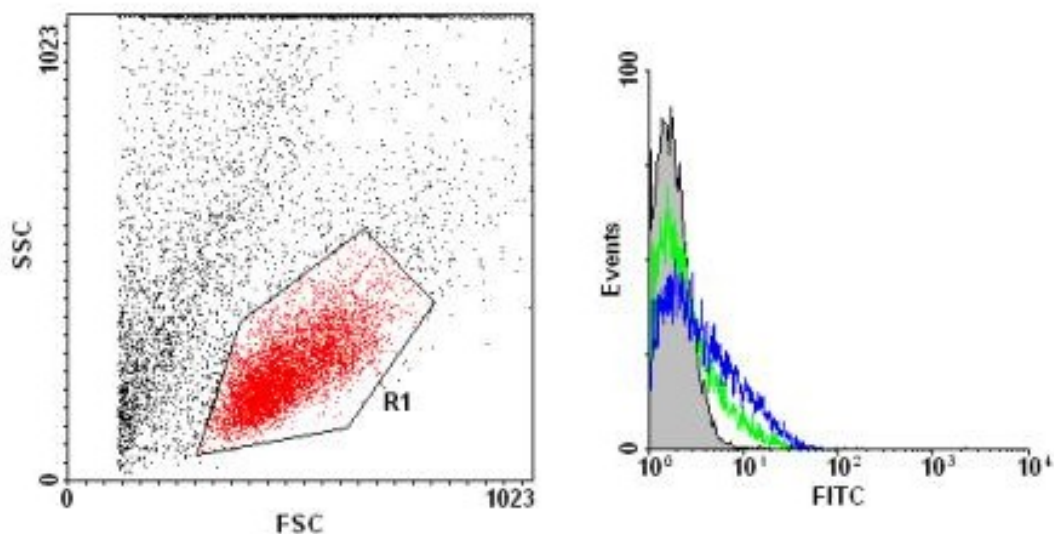
**Εικόνα 11. Α** Έκφραση του Fas mRNA μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα του TNF $\alpha$  σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα ( $P < 0.05$ ) **Β**. Έκφραση του Fas και GAPDH mRNA μετά από 3 ώρες καλλιέργειας με και χωρίς rhTNF $\alpha$ .

αρχικά με κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο CD40 μετά από καλλιέργεια 72 ωρών παρουσία rhTNFα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (10ng/ml και 25ng/ml). Βρέθηκε ότι παρουσία 10ng/ml αυξήθηκε η έκφραση του CD40 κατά 5 φορές ( $7,8\% \pm 2\%$ ), σε σχέση με την έκφραση του CD40 χωρίς παρουσία rhTNFα (control) ( $1,6\% \pm 1,5\%$ ), ενώ παρουσία 25ng/ml η αύξηση της έκφρασης ήταν ακόμα μεγαλύτερη, κατά 10,5 φορές περίπου ( $16,9\% \pm 4,2\%$ ). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA) (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12. Δοσοεξαρτώμενη επαγωγή του αντιγόνου CD40 με επίδραση rhTNFα.**  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κύτταρα καλλιιεργήθηκαν με ή χωρίς 10ng/ml και 25ng/ml rhTNFα για 72 ώρες και με κυτταρομετρία ροής μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν CD40. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD (n= 5) ( $P < 0.05$ ).

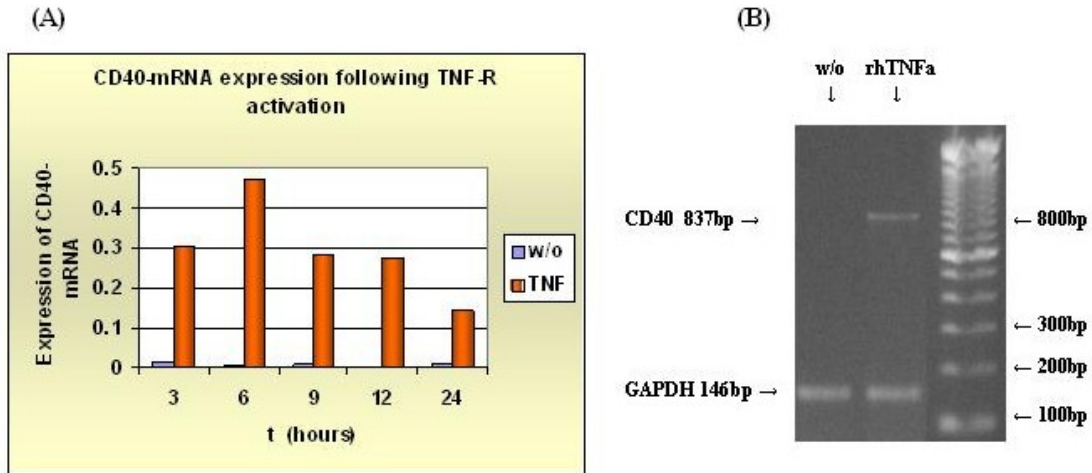
Ένα παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής της επαγωγής του CD40 με rhTNFα, παρουσιάζεται στην Εικόνα 13.



**Εικόνα 13: Τυπικό παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής της έκφρασης του αντιγόνου CD40 με επίδραση rhTNFα.** Το αριστερό διάγραμμα παριστάνει σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχαρακωση των κυττάρων (περιοχή R1) ενώ το ιστόγραμμα δεξιά την έκφραση του CD40 χωρίς rhTNFα (γκρι) και μετά από επίδραση 10ng/ml (πράσινο) και 25ng/ml (μπλε) rhTNFα για 72 ώρες.

Για περαιτέρω επιβεβαίωση της αύξησης της έκφρασης του CD40 στα KG-1 παρουσία TNFα, πραγματοποιήθηκε ημιοσοτική RT-PCR από RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες καλλιέργειας KG-1 κυττάρων με ή χωρίς 25ng/ml TNFα. Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση την έκφραση του GAPDH φαίνονται στην Εικόνα 14A, ενώ στην Εικόνα 14B φαίνεται η επαγωγή του CD40 mRNA μετά από 6 ώρες καλλιέργειας. Επιβεβαιώνεται η απουσία ή ελάχιστη έκφραση του CD40 στα κύτταρα απουσία διεγέρτη και η στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του παρουσία rhTNFα ( $P < 0.01$ , paired t-test).

Από τα παραπάνω δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής και του RT-PCR αποδεικνύεται ότι στα KG-1 κύτταρα το μόριο CD40 δεν εκφράζεται σε απλές συνθήκες καλλιέργειας, ωστόσο, το μόριο επάγεται υπό την επίδραση του TNFα και μάλιστα κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

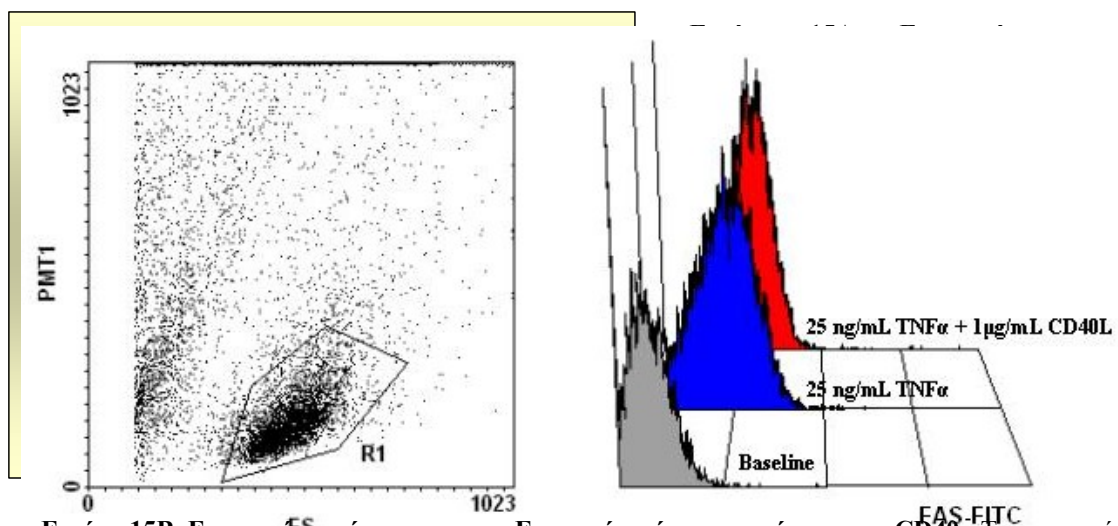


**Εικόνα 14.** (A) Έκφραση του CD40 mRNA στα KG-1 κύτταρα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, μετά από επώαση των κυττάρων με 25ng/ml rhTNF $\alpha$  ( $P < 0.01$ ). B. Έκφραση του CD40 και GAPDH mRNA μετά από 3 ώρες καλλιέργειας με και χωρίς rhTNF $\alpha$ .

### **Επίδραση του συστήματος CD40/CD40L στην έκφραση του αντιγόνου Fas**

Έχειδειχτεί από άλλες ερευνητικές ομάδες ότι η ενεργοποίηση του συστήματος CD40/CD40L επάγει την έκφραση του Fas σε ορισμένες κυτταρικές σειρές [Eliopoulos et al, 2000; Afford et al, 1999]. Για να διερευνηθεί κατά πόσο αυτό το φαινόμενο παρουσιάζεται στην κυτταρική σειρά KG-1, καλλιεργήθηκαν κύτταρα παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  (προκειμένου να γίνει επαγωγή του CD40 όπως αποδείχθηκε παραπάνω) με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L για 72 ώρες. Με κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε ότι παρουσία rhCD40L αυξήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν το Fas (56,9%  $\pm$  16,9 %, μέση τιμή από 3 πειράματα) σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο rhTNF $\alpha$  (43,9%  $\pm$  13,5 %;  $P < 0.05$ , one-way ANOVA) (Εικόνα 15A).

Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρίας ροής στο οποίο είναι εμφανής η επαγωγή του Fas μετά από ενεργοποίηση του CD40, παρουσιάζεται στην Εικόνα 15B.

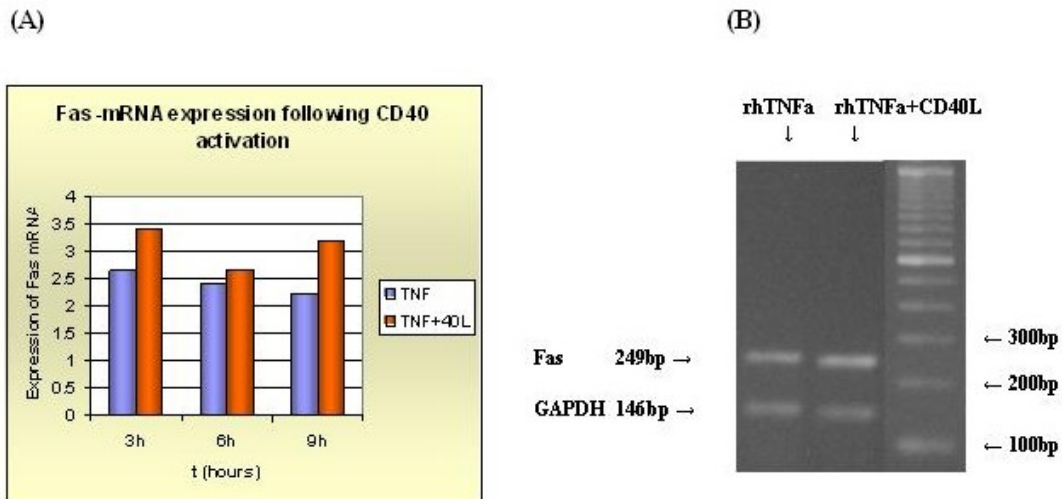


**Εικόνα 15B.** Επαγωγή της έκφρασης του Fas μετά από ενεργοποίησης του CD40. Το αριστερό διάγραμμα παριστάνει σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχαράκωση των κυττάρων (περιοχή R1) ενώ το ιστόγραμμα δεξιά την έκφραση του Fas χωρίς rhTNF $\alpha$  (γκρι) και μετά από επίδραση 25ng/ml rhTNF $\alpha$  (μπλε) ή 25ng/ml rhTNF $\alpha$  και 1 $\mu$ g/ml rhCD40L (κόκκινο), για 72 ώρες. Η ανάλυση στο ιστόγραμμα έχει γίνει τον πληθυσμό R1.



Η επαγωγή της έκφρασης του Fas στα KG-1 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση του CD40 με το CD40L, μελετήθηκε επίσης με ημιποσοτική RT-PCR από RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 3, 6, και 9 ώρες καλλιέργειας KG-1 κυττάρων με παρουσία 25ng/ml TNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L. Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση την έκφραση του GAPDH, φαίνονται στην Εικόνα 16. Η διαφορά μεταξύ των μετρήσεων με και χωρίς την προσθήκη rhCD40L είναι στατιστικά σημαντική ( $P < 0.05$ , paired t-test), εύρημα που επιβεβαιώνει τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής.

Από τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύεται ότι η ενεργοποίηση του μορίου CD40 στα KG-1 κύτταρα επάγει την έκφραση του αντιγόνου Fas στην επιφάνεια των κυττάρων.



**Εικόνα 16. (A)** Επαγωγή της έκφρασης του Fas mRNA μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα CD40 σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. ( $P < 0.05$ ). **(B)** Επαγωγή της έκφρασης του Fas mRNA μετά από 6 ώρες καλλιέργειας.

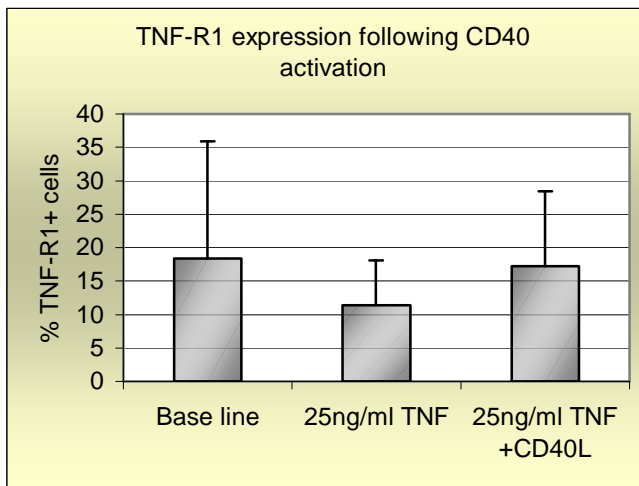
### Επίδραση του συστήματος CD40/CD40L στην έκφραση των TNF-Rs

Από τα παραπάνω πειράματα δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση του συστήματος CD40/CD40L επάγει την έκφραση του Fas στα KG-1 κύτταρα. Ωστόσο, δεν έχει ερευνηθεί η επίδραση της ενεργοποίησης αυτού του συστήματος στην έκφραση των υποδοχέων TNF-R1 και TNF-R2. Για το λόγο αυτό, καλλιεργήθηκαν KG-1 κύτταρα παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L για 72 ώρες. Με κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε ότι παρουσία rhCD40L αυξήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν TNF-R1 (17,2%  $\pm$  11,2 %) σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο rhTNF $\alpha$  (11,4%  $\pm$  6,7%), η διαφορά ωστόσο

**Εικόνα 17. Αύξηση του ποσοστού των TNF-R1(+) κυττάρων με ενεργοποίηση του CD40.** Μετά από σύγχρονη καλλιέργεια  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κυττάρων παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L, για 72 ώρες, μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν TNF-R1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD, (n= 3).

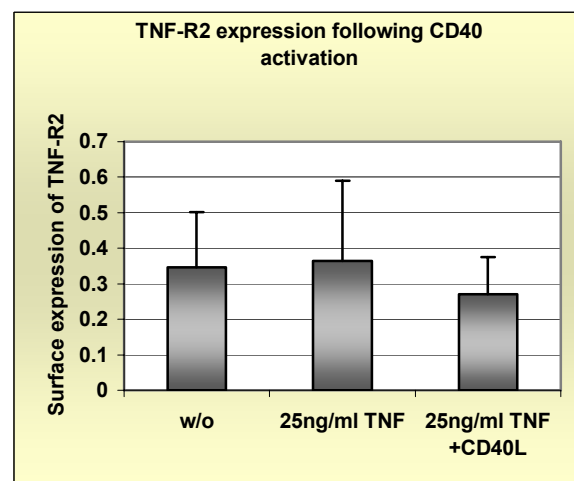
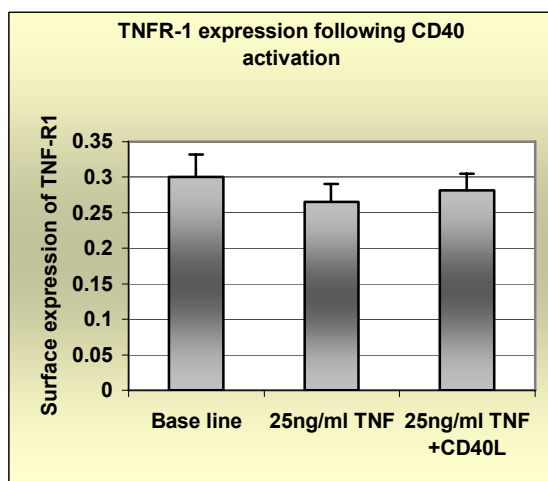


δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα. 17).



Επιπλέον, αυξήθηκε η ένταση φθορισμού (mean channel fluorescence

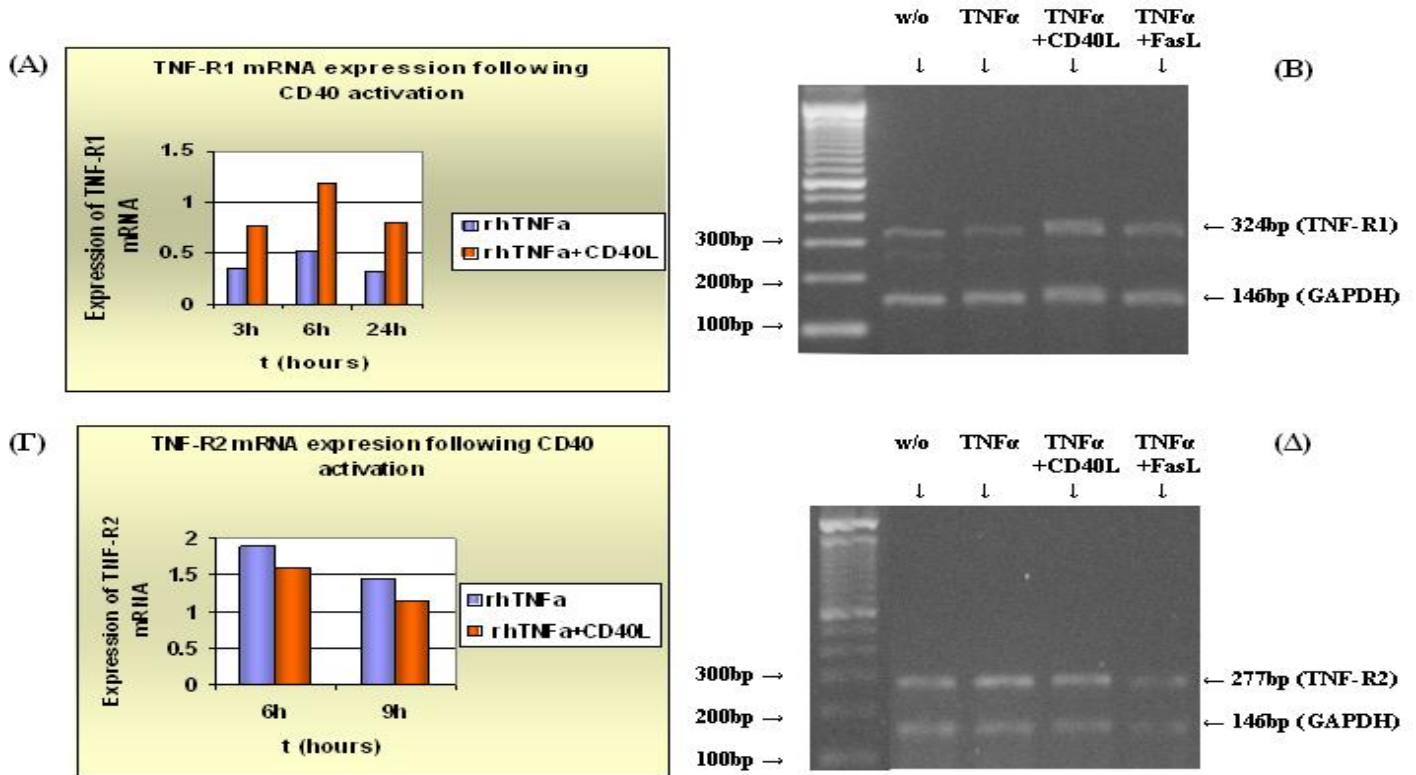
intensity) της έκφρασης TNF-R1, εύρημα που υποδηλώνει ότι το CD40 αυξάνει και το αριθμό των υποδοχέων TNF-R1 στην επιφάνεια των KG-1 κυττάρων, η διαφορά ωστόσο και πάλι δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 18). Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα, η ενεργοποίηση του CD40 δε φάνηκε να έχει καμία επίδραση στο ποσοστό των TNF-R2(+)-κυττάρων, ωστόσο φάνηκε πως υπήρχε η τάση να μειώνει την επιφανειακή έκφραση αυτού του υποδοχέα ανά κύτταρο (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18. Επίδραση του CD40 στην ένταση φθορισμού της έκφραση των υποδοχέων του TNF.** Μετά από σύγχρονη καλλιέργεια  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κυττάρων παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L, για 72 ώρες, μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής η ένταση του φθορισμού στα TNF-R1<sup>+</sup> (αριστερά) και TNF-R2<sup>+</sup> κύτταρα (δεξιά). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD (n= 2).

Για επιβεβαίωση της αύξησης της έκφρασης του TNF-R1 και της μείωσης της έκφρασης του TNF-R2 στα KG-1 μετά από ενεργοποίηση του CD40 με το CD40L, πραγματοποιήθηκε RT-PCR από RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 3, 6, 9 και 24 ώρες καλλιέργειας KG-1 κυττάρων παρουσία 25ng/ml TNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L. Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση

την έκφραση του GAPDH, φαίνονται στην Εικόνα 19 και επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της κυτταρομετρίας, δηλαδή την επαγωγή της έκφρασης του TNF-R1 και την μείωση της έκφρασης του TNF-R2 στα KG-1 μετά από ενεργοποίηση του CD40 με το CD40L.

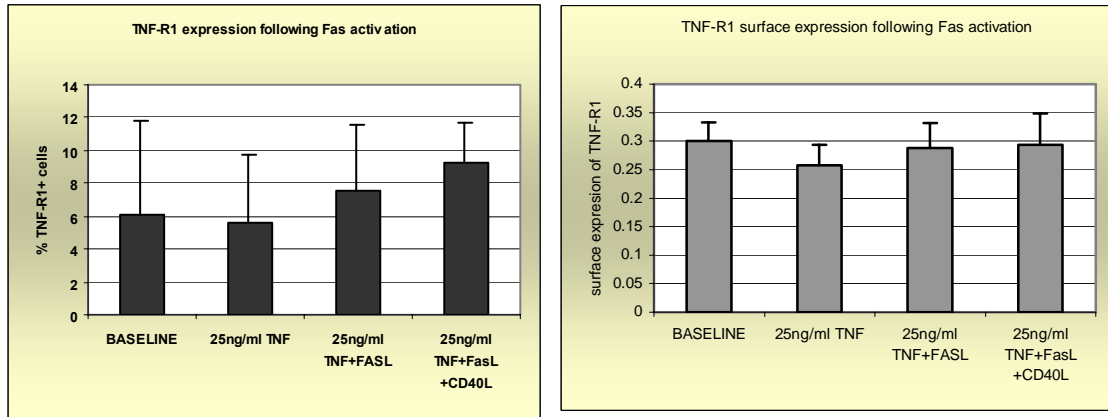


**Εικόνα 19. Επίδραση του CD40L στην έκφραση των TNF-Rs mRNAs.** Αύξηση της έκφρασης του TNF-R1 mRNA (A, B) και μείωση της έκφρασης του TNF-R2 mRNA (Γ, Δ) μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα CD40. Η εικόνα B ελήφθη μετά από 24 ώρες καλλιέργειας και η εικόνα Δ μετά από 6 ώρες καλλιέργειας.

### Επίδραση του συστήματος Fas/FasL στην έκφραση των TNF-Rs

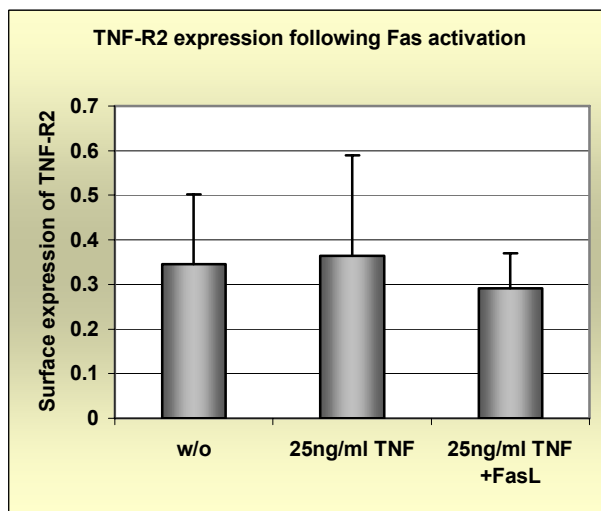
Όπως δείχθηκε από τα παραπάνω πειράματα, η ενεργοποίηση του συστήματος CD40/CD40L επάγει την έκφραση του TNF-R1 ενώ φαίνεται ότι μειώνει την έκφραση του TNF-R2 στα KG-1. Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως η επίδραση της ενεργοποίησης του συστήματος Fas/FasL στην έκφραση αυτών των υποδοχέων. Για το λόγο αυτό, καλλιιεργήθηκαν KG-1 κύτταρα παρουσία 25ng/ml rhTNFα με ή χωρίς 5μg/ml διαλυτού rhAPO-1/FasL για 72 ώρες. Με κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε ότι παρουσία rhFasL αυξήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν τον TNF-R1 ( $7,6\% \pm 3,9\%$ ) σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο του rhTNFα ( $5,6\% \pm 4\%$ ), ενώ με συνδυασμό και των δύο παραγόντων (rhCD40L, rhFasL) η αύξηση αυτή ήταν πιο εμφανής ( $9,3 \pm 2,4\%$ ). Επιπλέον η αύξηση στην ένταση φθορισμού που παρατηρήθηκε, υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του Fas αύξησε και το ποσοστό έκφρασης του υποδοχέα TNF-R1 στην επιφάνεια των KG-1 κυττάρων. Οι διαφορές, ωστόσο, τόσο στο ποσοστό όσο και στην

ένταση φθορισμού του TNF-R1 παρουσία των παραπάνω κυτταροκινών, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 20).



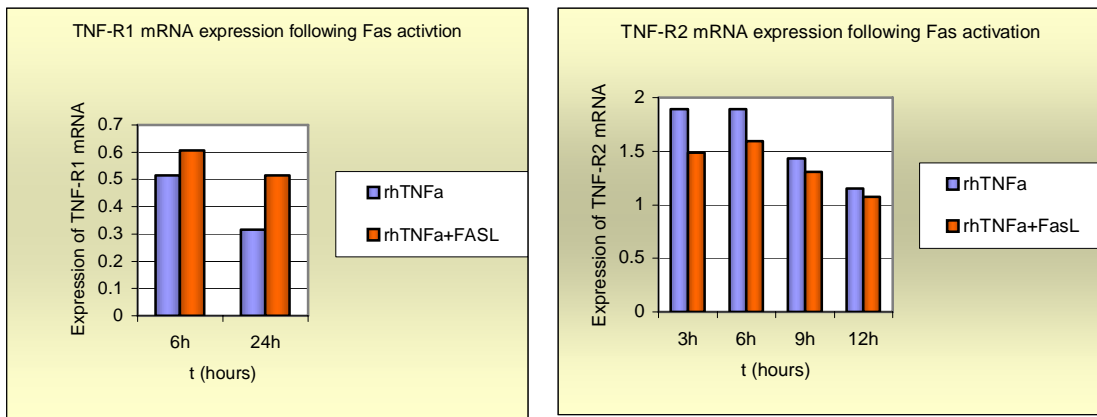
**Εικόνα 20. Επίδραση της ενεργοποίησης του Fas στην έκφραση του TNF-R1.** Μετά από καλλιέργεια KG-1 κυττάρων παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  με ή χωρίς 5 $\mu$ g/ml rhFasL ή και 1 $\mu$ g/ml rhCD40L, για 72 ώρες, μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής το ποσοστό των TNF-R1(+) κυττάρων (αριστερά) και η ένταση του φθορισμού του TNF-R1 στα κύτταρα (δεξιά). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD (n= 2).

Σε αντίθεση με τον TNF-R1, η ενεργοποίηση του Fas δε φάνηκε να έχει καμία επίδραση στο ποσοστό των TNF-R2(+)-κυττάρων, ωστόσο φάνηκε πως υπήρχε η τάση να μειώνει την επιφανειακή έκφραση αυτού του υποδοχέα ανά κύτταρο, όπως αυτό φάνηκε με προσδιορισμό του mean channel fluorescence intensity (Εικόνα 21).



**Εικόνα 21. Μείωση της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα TNF-R2 μετά από ενεργοποίηση του Fas.** 0,1\*10<sup>6</sup> KG-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  με ή χωρίς 5 $\mu$ g/ml rhFasL για 72 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ένταση φθορισμού του TNF-R2 στα κύτταρα, με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD ( n= 2).

Για επιβεβαίωση της αύξησης της έκφρασης του TNF-R1 και της μείωσης της έκφρασης του TNF-R2 στα KG-1 μετά από ενεργοποίηση του Fas με FasL, πραγματοποιήθηκε RT-PCR από RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 3, 6, 9 και 24 ώρες καλλιέργειας KG-1 κυττάρων με 25ng/ml TNF $\alpha$  παρουσία ή μη 5 $\mu$ g/ml rhFasL. Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση την έκφραση του GAPDH, φαίνονται στην Εικόνα 22 και επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της κυτταρομετρίας.

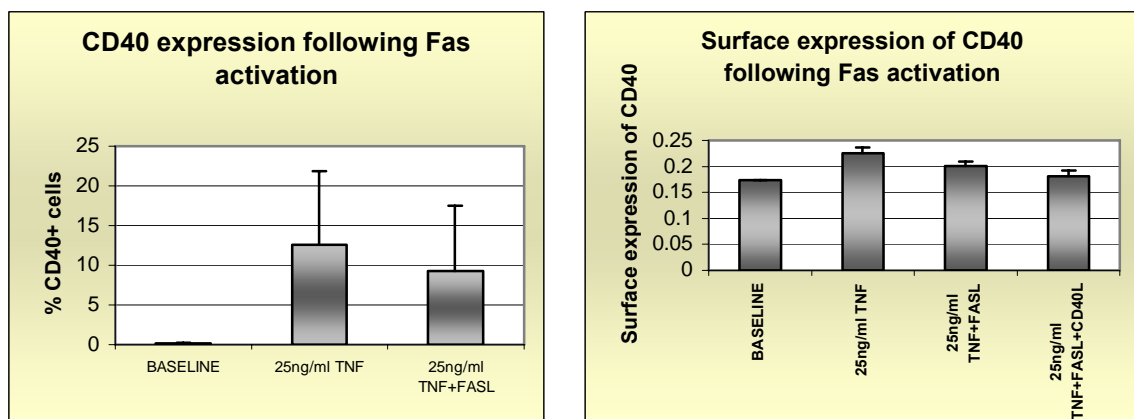


**Εικόνα 22. Επίδραση του FasL στην έκφραση των TNF-Rs mRNAs.** Αύξηση της έκφρασης του TNF-R1 mRNA (αριστερά) και μείωση της έκφρασης του TNF-R2 mRNA (δεξιά) μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

### Επίδραση του συστήματος Fas/FasL στην έκφραση του CD40

Το CD40 όπως δείχθηκε σε αυτή τη μελέτη, επάγει την έκφραση του Fas στα KG-1 κύτταρα όπως έχει αποδειχτεί και για άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς. [Eliopoulos et al, 2000; Afford et al, 1999]. Ωστόσο, δε έχει μελετηθεί η επίδραση της ενεργοποίησης του Fas στην έκφραση του CD40 στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, για να μελετηθεί δηλαδή η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο συστημάτων CD40/CD40L και Fas/FasL, καλλιεργήθηκαν KG-1 κύτταρα παρουσία 25ng/ml rhTNFα με ή χωρίς 5μg/ml διαλυτού rhAPO-1/FasL για 72 ώρες.

Με κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε ότι παρουσία rhFasL μειώθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν το CD40 (9,3% ±8,2%) σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο του rhTNFα (12,6% ±9,2%), οι



παραπάνω διαφορές ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Ωστόσο, η ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas μείωσε το ποσοστό έκφρασης του CD40 στην επιφάνεια των κυττάρων (0,20 ±0,01) σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο του TNFα (0,23 ±0,01) ενώ η παρουσία και των δύο παραγόντων (rhFasL, rhCD40L) μείωσε περισσότερο το ποσοστό αυτό (0,18 ±0,01) (Εικόνα 23). Οι παραπάνω διαφορές είναι σημαντικά στατιστικές ( $P < 0.05$ , One-way ANOVA).

Η μείωση της έκφρασης του CD40 στα KG-1 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση του Fas με το διαλυτό rhFasL επιβεβαιώθηκε με RT-PCR με RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 6 και 24 ώρες καλλιέργειας με 25ng/ml TNFα παρουσία ή μη 5μg/ml rhFasL. Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση την έκφραση του GAPDH, φαίνονται στην Εικόνα 24. Παρατηρείται ελάττωση στην έκφραση του CD40 ( $P < 0.05$ ).

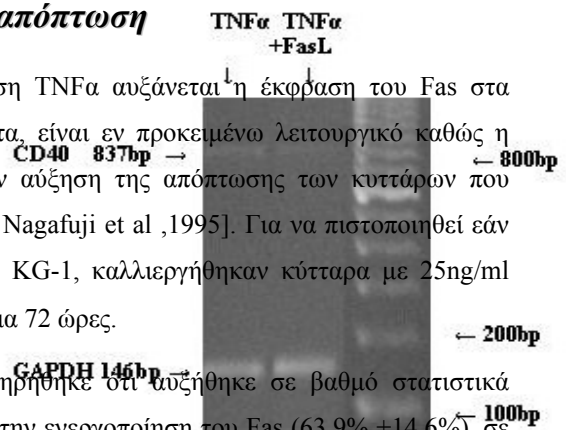
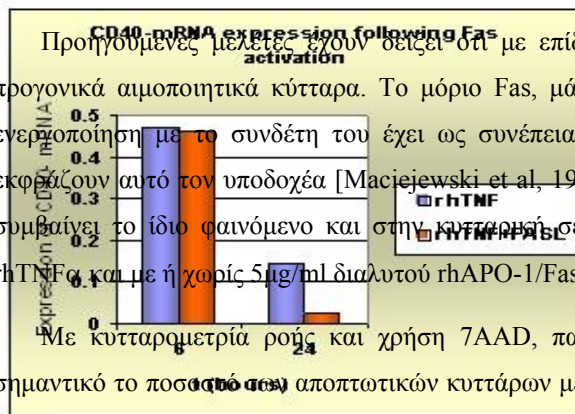
**Εικόνα 23. Μείωση της έκφρασης του CD40 μετά από ενεργοποίηση του Fas.**  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κύτταρα επωάστηκαν παρουσία 25ng/ml rhTNFα με ή χωρίς 5μg/ml rhFasL, για 72 ώρες. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν CD40 (αριστερά) και η ένταση φθορισμού του CD40 (δεξιά) στα κύτταρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ;  $P > 0,05$  και  $P < 0,05$ , αντίστοιχα).

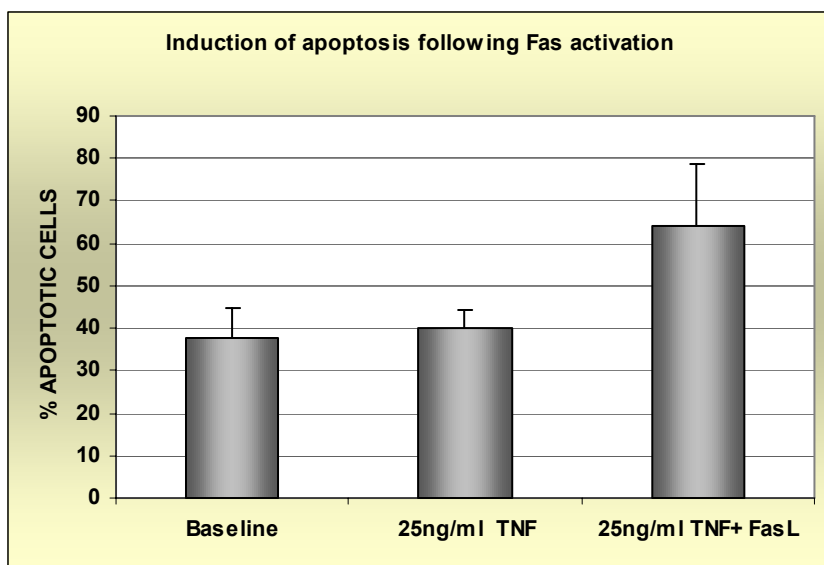
**Εικόνα 24. Μείωση της έκφρασης του CD40 mRNA στα KG-1 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas.** (Α) Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 6 και 24 ώρες με 25ng/ml TNFα παρουσία ή μη 5μg/ml rhFasL (B) Έκφραση CD40 mRNA (B) GAPDH μετά από 24 ώρες.

### Επίδραση του συστήματος Fas/FasL στην απόπτωση

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι με επίδραση TNFα αυξάνεται η έκφραση του Fas στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Το μόριο Fas, μάλιστα, είναι εν προκειμένω λειτουργικό καθώς η ενεργοποίησή του με το συνδέτη του έχει ως συνέπεια την αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων που εκφράζουν αυτό τον υποδοχέα [Maciejewski et al, 1995; Nagafuji et al, 1995]. Για να πιστοποιηθεί εάν συμβαίνει το ίδιο φαινόμενο και στην κυτταροκίνητα KG-1, καλλιεργήθηκαν κύτταρα με 25ng/ml rhTNFα και με ή χωρίς 5μg/ml διαλυτού rhFasL για 72 ώρες.

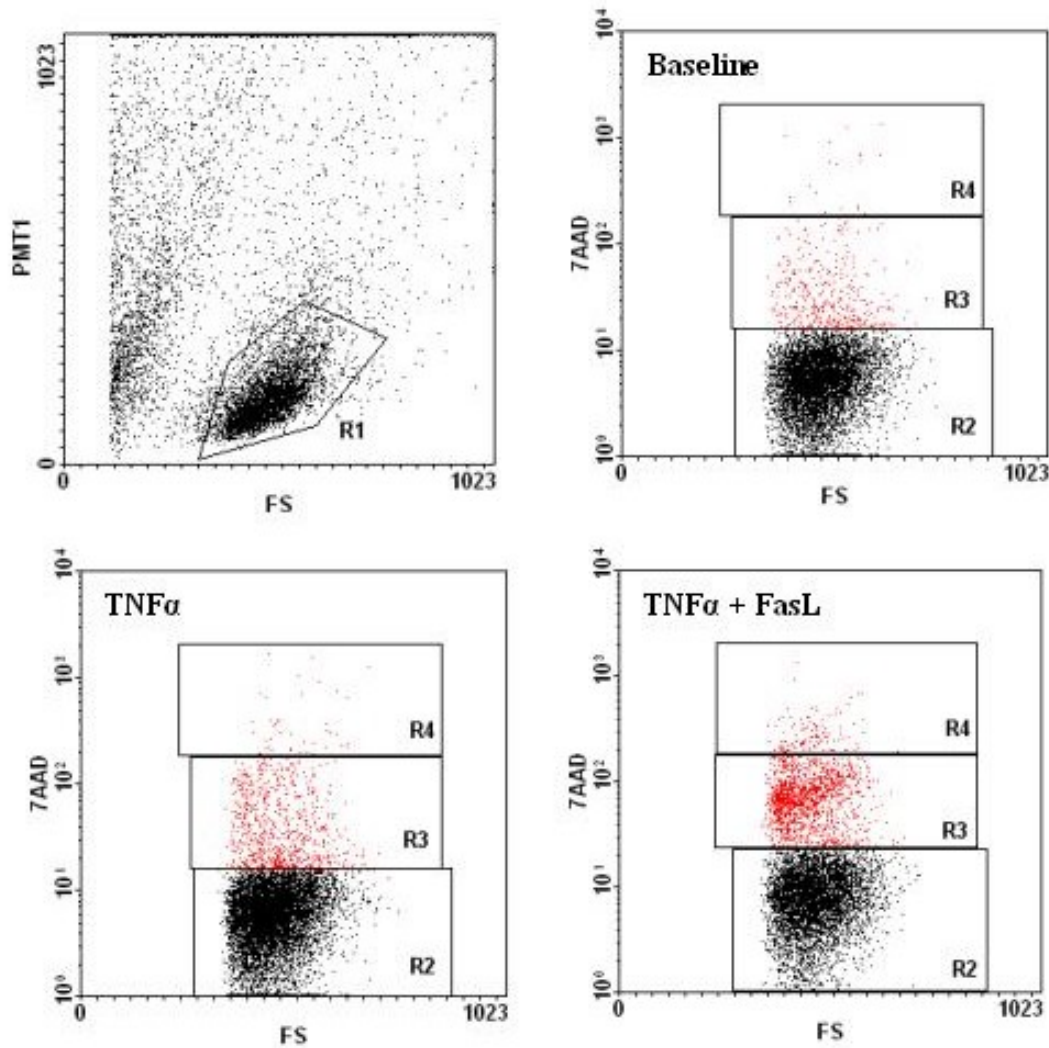
Με κυτταρομετρία ροής και χρήση 7AAD, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μετά την ενεργοποίηση του Fas ( $63,9\% \pm 14,6\%$ ), σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό παρουσία μόνο TNFα ( $39,9\% \pm 4,6\%$ ) ή χωρίς την επίδραση κυτταροκινών TNFα ( $37,7\% \pm 7,2\%$ ) ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA) (Εικόνα 25A). Επιβεβαιώνεται, λοιπόν ότι η ενεργοποίηση του Fas στα KG-1 κύτταρα έχει αποτέλεσμα ανάλογο με αυτό στα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα, δηλαδή επαγωγή της απόπτωσης.





**Εικόνα 25Α. Επαγωγή της απόπτωσης στα KG-1 κύτταρα με ενεργοποίηση του Fas.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  με και χωρίς 5 $\mu$ g/ml rhFasL, για 72 ώρες. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής και χρήση 7-AAD, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD, ( n= 3, P<0,05 ).

Ένα τυπικό παράδειγμα επαγωγής της απόπτωσης μετά από ενεργοποίηση του Fas στα KG-1 κύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 25B.



**Εικόνα 25B. Επαγωγή της απόπτωσης στα KG-1 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση του Fas.** Το άνω αριστερό διάγραμμα παριστάνει σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχαράκωση των κυττάρων (περιοχή R1). Τα υπόλοιπα διαγράμματα δείχνουν το ποσοστό των ζώντων (περιοχή R2), αποπτωτικών (περιοχή R3) και νεκρών (περιοχή R4) κυττάρων χωρίς rhTNF $\alpha$  (baseline), μετά από επίδραση 25ng/ml rhTNF $\alpha$  (για να γίνει επαγωγή του Fas) και μετά από επίδραση 25ng/ml rhTNF $\alpha$  και 5 $\mu$ g/ml FasL, για 72 ώρες. Για έμφαση, το ποσοστό των αποπτωτικών-νεκρών κυττάρων παριστάνονται με κόκκινο. Η ανάλυση έχει γίνει τον πληθυσμό R1.

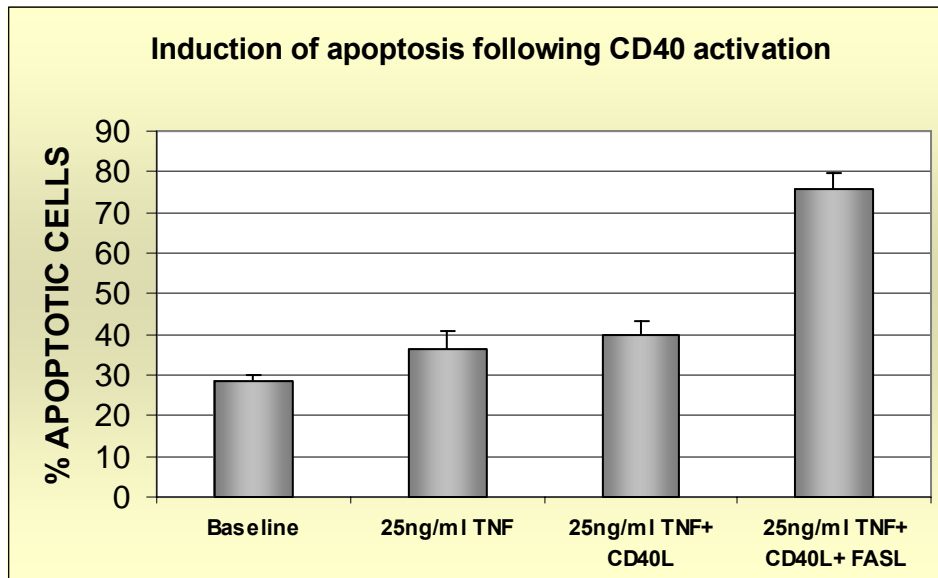
### **Επίδραση του CD40/CD40L στην απόπτωση**

Αναφέρθηκε στην Εισαγωγή ότι το μόριο CD40 ανήκει στην οικογένεια του TNF-R αλλά στερείται “death domains” (DD) στο ενδοπλασματικό του τμήμα και ως εκ τούτου αναμένεται ότι η ενεργοποίησή του δεν θα επάγει την απόπτωση. Για να διερευνηθεί η υπόθεση αυτή, καλλιεργήθηκαν KG-1 κύτταρα παρουσία 25ng/ml rhTNF $\alpha$  (προκειμένου να γίνει επαγωγή των μορίων CD40 και Fas) με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml διαλυτού rhCD40L ή 5 $\mu$ g/ml rhFasL για 72 ώρες.

Με κυτταρομετρία ροής και χρήση 7AAD, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του CD40 με



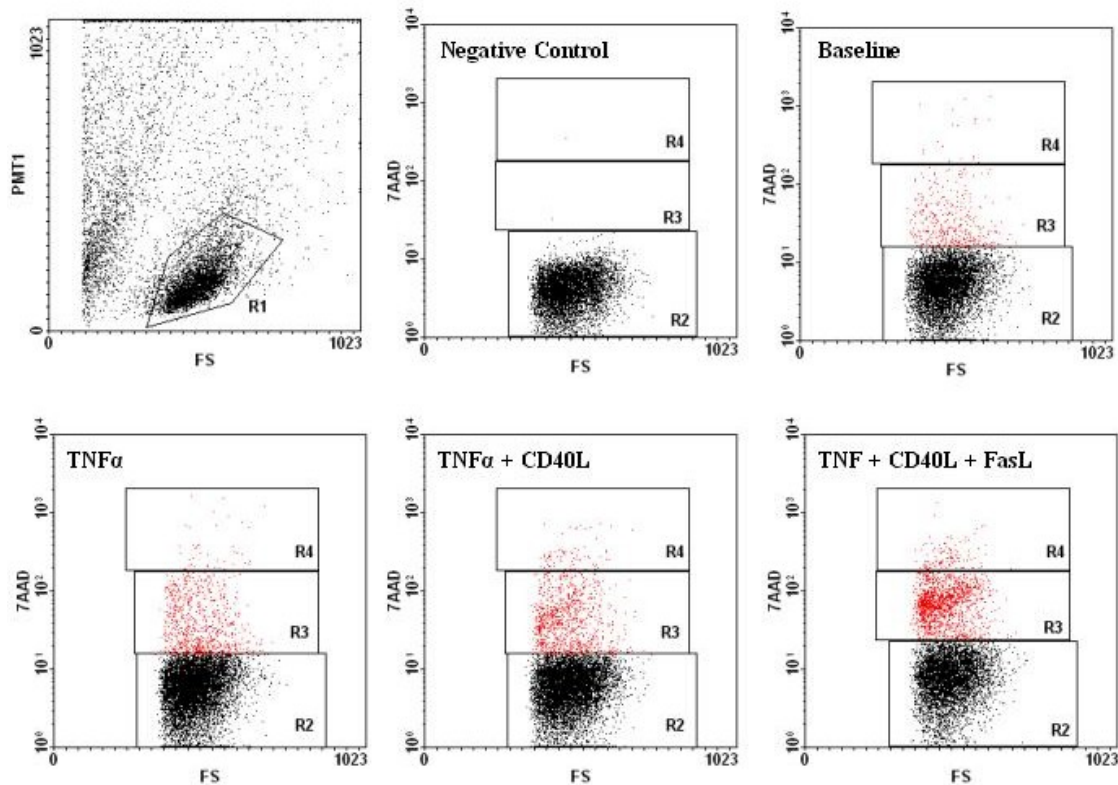
rhCD40L έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων ( $39,9\% \pm 3,3\%$ ) σε σχέση με το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων που λαμβάνονται παρουσία μόνο του TNFα ( $36,4\% \pm 4,2\%$ ). Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνει ακόμα περισσότερο παρουσία και των δύο παραγόντων (rhFasL, rhCD40L) ( $75,6\% \pm 4,2\%$ ), ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων που λαμβάνονται παρουσία του TNFα και rhFasL για τον ίδιο αριθμό πειραμάτων είναι ( $72\% \pm 5,6\%$ ). (Εικόνα 26A). Οι παραπάνω τιμές διαφέρουν μεταξύ τους σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ( $P < 0.01$ , one-way ANOVA)



**Εικόνα 26A. Επαγωγή της απόπτωσης με ενεργοποίηση του CD40.** KG-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 25ng/ml rhTNFα με ή χωρίς 1μg/ml rhCD40L ή 5μg/ml rhFasL, για 72 ώρες. Η μελέτη της απόπτωσης έγινε με κυτταρομετρία ροής και χρήση 7AAD. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SD, ( n= 3,  $P < 0,01$  ).

Ένα τυπικό παράδειγμα επαγωγής της απόπτωσης μετά από ενεργοποίηση του CD40 στα KG-1 κύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 26B. Στην Εικόνα είναι, επίσης, εμφανής η αύξηση της απόπτωσης παρουσία και των τριών κυτταροκινών (rhTNFα, rhFasL, rhCD40L).





**Εικόνα 26B. Επαγωγή της απόπτωσης στα KG-1 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση του CD40.** Το άνω αριστερό διάγραμμα παριστάνει σχέση μεγέθους (FSC)/κοκκίωσης (SSC) για την περιχαράκωση των κυττάρων (περιοχή R1). Τα υπόλοιπα διαγράμματα δείχνουν το ποσοστό των ζώντων (περιοχή R2), αποπτωτικών (περιοχή R3) και νεκρών (περιοχή R4) κυττάρων χωρίς rhTNF $\alpha$  (baseline), μετά από επίδραση 25ng/ml rhTNF $\alpha$  (για να γίνει επαγωγή των μορίων Fas και CD40), μετά από επίδραση 25ng/ml rhTNF $\alpha$  και 1 $\mu$ g/ml rhCD40L, και μετά από επίδραση 25ng/ml rhTNF $\alpha$ , 1 $\mu$ g/ml rhCD40L και 5 $\mu$ g/ml rhFasL, για 72 ώρες. Για έμφαση, το ποσοστό των αποπτωτικών-νεκρών κυττάρων παριστάνονται με κόκκινο. Η ανάλυση έχει γίνει τον πληθυσμό R1. Είναι εμφανής η επαγωγή της απόπτωσης από το CD40L η οποία επάγεται περαιτέρω παρουσία rhFasL. Το ποσοστό της απόπτωσης παρουσία και των τριών κυτταροκινών (rhTNF $\alpha$ , rhFasL, rhCD40L), υπερβαίνει το ποσοστό της απόπτωσης παρουσία μιας εκάστης εξ' αυτών.

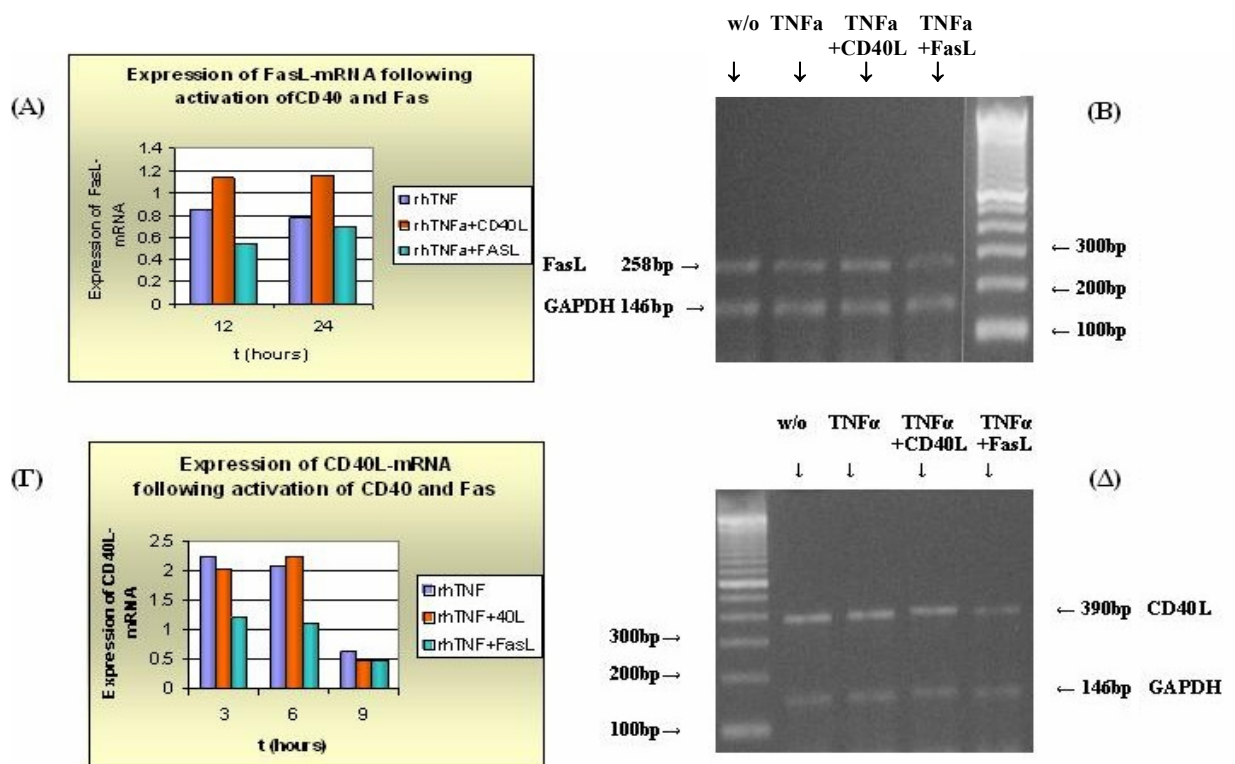
### ***Επαγόμενη έκφραση των μορίων FASL και CD40L στα KG-1 κύτταρα***

Όπως δείχθηκε στην πρώτη ενότητα, η έκφραση των μορίων FasL, CD40L και CD40 στα KG-1 κύτταρα είναι σχεδόν μηδενική, η έκφραση δε του Fas είναι πολύ χαμηλή. Δείξαμε, ωστόσο, ότι με την επίδραση του TNF $\alpha$  η έκφραση του CD40 και του Fas αυξάνεται. Για να μελετηθεί κατά πόσο η παρουσία του TNF $\alpha$  επηρεάζει την έκφραση των συνδετών των παραπάνω υποδοχέων, καλλιεργήθηκαν  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κύτταρα παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων rhTNF $\alpha$  (10ng/ml και 25ng/ml). Δεν παρατηρήθηκε κυτταρομετρικά καμία αλλαγή στην έκφραση των παραπάνω μορίων.

Επειδή σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχτεί ότι η ενεργοποίηση του CD40 επάγει σε κάποιους κυτταρικούς πληθυσμούς την έκφραση όχι μόνο του Fas αλλά και του FasL ερευνήθηκε κατά πόσο ισχύει αυτό και στα KG-1. Για το λόγο αυτό καλλιεργήθηκαν  $0,1 \times 10^6$  KG-1 κύτταρα παρουσία 25ng/ml

rhTNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml διαλυτού rhCD40L ή 5 $\mu$ g/ml rhFasL για 72 ώρες. Ακόμα και με αυτές τις συνθήκες δεν παρατηρήθηκε κυτταρομετρικά καμία αξιολογήσιμη αλλαγή στην έκφραση των μορίων CD40L και FasL.

Επειδή με την κυτταρομετρία ροής δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν μικρές αλλαγές στην έκφραση κάποιων μορίων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ημιποσοτικού RT-PCR με RNA που είχε συλλεχθεί μετά από 3, 6, 9, 12, και 24 ώρες καλλιέργειας παρουσία 25ng/ml TNF $\alpha$  με ή χωρίς 1 $\mu$ g/ml rhCD40L ή 5 $\mu$ g/ml rhFasL. Τα αποτελέσματα μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων με βάση την έκφραση του GAPDH, φαίνονται στην Εικόνα 27. Διαπιστώθηκε ότι μετά από 12 και 24 ώρες παρουσία rhCD40L αυξήθηκε η έκφραση του FasL-mRNA, ενώ παρουσία rhFasL ελαττώθηκε η έκφραση του FasL-mRNA. Επιπλέον, μετά από 3, 6 ή 9 ώρες καλλιέργειας με rhCD40L, η έκφραση του CD40L-mRNA δεν παρουσίασε καμία σημαντική διαφορά, ενώ παρουσία rhFasL, αυτή η έκφραση μειώθηκε.



**Εικόνα 27. Διερεύνηση της επαγόμενης έκφραση FasL-mRNA και CD40L-mRNA.** Μετά από καλλιέργεια KG-1 κυττάρων με 25ng/ml rhTNF $\alpha$  παρουσία ή όχι 1 $\mu$ g/ml rhCD40L ή 5 $\mu$ g/ml rhFasL, συλλέχθηκε ολικό RNA μετά από 3, 6, 9, 12, και 24 ώρες, και πραγματοποιήθηκε RT-PCR. Παρατηρείται η επαγωγή της έκφρασης FasL-mRNA μετά από ενεργοποίηση του CD40 (A, B) και η μείωση της έκφρασης CD40L-mRNA μετά από ενεργοποίηση του Fas (Γ, Δ).

## ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα που περιγράφησαν παραπάνω συνοψίζονται ως εξής:

1. Τα KG-1 κύτταρα εκφράζουν σχεδόν 100% το αντιγόνα CD34 και CD45 και ως εκ τούτου μπορούν να θεωρηθούν λευχαιμικό ισοδύναμο των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.
2. Τα KG-1 κύτταρα παρουσιάζουν σε υγρή καλλιέργεια εκθετικό τρόπο ανάπτυξης.
3. Το αντιγόνο Fas εκφράζεται σε χαμηλό ποσοστό στα KG-1 κύτταρα, η έκφρασή του ωστόσο επάγεται από τον TNFα και μάλιστα κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο.
4. Το αντιγόνο CD40 εκφράζεται σε χαμηλό ποσοστό στα KG-1 κύτταρα, η έκφρασή του ωστόσο επάγεται από τον TNFα και μάλιστα κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο.
5. Η επαγωγή του CD40 με TNFα και η ενεργοποίησή του με CD40L έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του μορίου Fas στα KG-1 κύτταρα. Δηλαδή η ενεργοποίηση ενός TNFR (CD40) που στερείται DDs (Death Domains) επάγει την έκφραση ενός TNFR με DD (Fas).
6. Η επαγωγή του CD40 με TNFα και η ενεργοποίησή του με CD40L έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του TNF-R1 (που έχει DDs) και μείωση της έκφρασης του TNF-R2 (που στερείται DDs) στα KG-1 κύτταρα.
7. Η επαγωγή του Fas με TNFα και η ενεργοποίησή του με FasL έχει επίσης ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του TNF-R1 και μικρή μείωση της έκφρασης του TNF-R2 στα KG-1 κύτταρα. Ο συνδυασμός, μάλιστα, της ενεργοποίησης των μορίων CD40 και Fas αυξάνει ακόμα περισσότερο την έκφραση του TNF-R1.
8. Η επαγωγή του Fas με TNFα και η ενεργοποίησή του με FasL έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης του CD40 στα KG-1 κύτταρα.
9. Η επαγωγή του Fas με TNFα και η ενεργοποίησή του με FasL έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης στα KG-1 κύτταρα.
10. Η επαγωγή του CD40 με TNFα και η ενεργοποίησή του με CD40L έχει ως αποτέλεσμα μικρή επαγωγή της απόπτωσης στα KG-1 κύτταρα. Η απόπτωση αυξάνει περισσότερο παρουσία και FasL.
11. Η επαγωγή της απόπτωσης στα KG-1 κύτταρα παρουσία του συνδυασμού TNFα, CD40L και FasL είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την απόπτωση παρουσία μιας εκάστης των κυτταροκινών.
12. Η επαγωγή του CD40 με TNFα και η ενεργοποίησή του με CD40L έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή όχι μόνο του Fas αλλά και του FasL mRNA στα KG-1 κύτταρα ενώ η επαγωγή του Fas με

TNF $\alpha$  και η ενεργοποίησή του με FasL έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης όχι μόνο του CD40 αλλά και του CD40L mRNA στα KG-1 κύτταρα.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas επάγει την απόπτωση στις προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες [Maciejewski et al, 1995; Nagafuji et al, 1995] και ότι η επαγωγή και ενεργοποίηση του μορίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη παθοφυσιολογία της μυελικής ανεπάρκειας [Gersuk et al, 1998; Young, 2000; Papadaki et al, 2003]. Στην επαγωγή της έκφρασης του μορίου στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα αλλά και στην ενεργοποίηση της απόπτωσης έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν και άλλα μόρια της οικογένειας του TNF και των υποδοχέων του (TNF-Rs). Έχει, για παράδειγμα, αποδειχθεί ότι ο TNFα επάγει την έκφραση λειτουργικού Fas στα CD34<sup>+</sup> προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και παρουσία του συνδέτη του FasL στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων επάγεται σε αυτά η απόπτωση. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί τον πλέον γνωστό στη παθοφυσιολογία της μυελικής ανεπάρκειας που σχετίζεται με τον TNFα. Άλλοι μηχανισμοί, ωστόσο, επαγωγής της απόπτωσης στα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί.

Η ανθρώπινη λευχαιμική σειρά KG-1 που χρησιμοποιήσαμε για τα πειράματά μας, εκφράζει σταθερά το αντιγόνο CD34 που χαρακτηρίζει τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Σε αντιστοιχία, μάλιστα, με τα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα που εκφράζουν το Fas σε πολύ χαμηλό ποσοστό και συγκεκριμένα κάτω του 10%, τα KG-1 κύτταρα εξέφραζαν επίσης σε πολύ χαμηλό ποσοστό τον υποδοχέα Fas. Καλλιέργεια, ωστόσο, των KG-1 κυττάρων παρουσία TNFα, βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση το Fas τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης στην επιφάνεια των κυττάρων, και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως αποδείχτηκε με RT-PCR και κυτταρομετρία ροής, αντίστοιχα. Το μόριο, μάλιστα, είναι λειτουργικό και στα KG-1 κύτταρα, δοθέντος ότι η ενεργοποίησή του με FasL δείξαμε ότι αυξάνει σημαντικά την απόπτωση στα κύτταρα. Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει παρόμοια ανοσοφαινοτυπικά αλλά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με τα ανθρώπινα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και, επομένως, μπορούμε να τη χρησιμοποιήσουμε για να εξάγουμε έμμεσα συμπεράσματα για τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος.

Το σύστημα των TNF/TNF-Rs που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, τα μόρια Fas/FasL και CD40/CD40L, έχει μελετηθεί ευρέως σε διάφορα κυτταρικά συστήματα. Ωστόσο, δεν είναι σχεδόν τίποτα γνωστό για την έκφραση και την λειτουργικότητα των μορίων CD40/CD40L στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα δεν εκφράζουν φυσιολογικά τα μόρια CD40/CD40L [Biancone L, 1999; Schonbeck & Libby, 2001]. Σε συμφωνία με τα δεδομένα αυτά, δεν βρήκαμε έκφραση των παραπάνω μορίων στα KG-1 κύτταρα.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το μόριο CD40 επάγεται σε διάφορα κύτταρα, όπως σε μακροφάγα των ιστών και σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, υπό την επίδραση φλεγμονώδων κυτταροκινών όπως ο TNFα [Biancone L, 1999; Schonbeck & Libby, 2001]. Με δεδομένο ότι στο μικροπεριβάλλον του μυελού ασθενών με μυελική ανεπάρκεια υπερεκφράζεται ο TNFα, διερευνήσαμε αν η κυτταροκίνη αυτή επάγει την έκφραση του CD40 στα KG-1 κύτταρα. Βρήκαμε ότι ο TNFα επάγει

την έκφραση όχι μόνο του Fas, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά και του CD40 στην επιφάνεια των KG-1 κυττάρων και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Με δεδομένο, λοιπόν, ότι ο TNF $\alpha$  επάγει την επιφανειακή έκφραση του CD40 στα KG-1 κύτταρα, θελήσαμε να ελέγξουμε την λειτουργικότητα του μορίου στο μηχανισμό της απόπτωσης. Στηριχτήκαμε σε προηγούμενες μελέτες που αναφέρονται σε διάφορους τύπους κυττάρων και δείχνουν ότι το CD40, ένας υποδοχέας-μέλος της οικογένειας του TNF-R που στερείται DDs στο ενδοπλασματικό του τμήμα, μπορεί δυναμικά να επάγει αποπτωτικά σήματα είτε με την ενδογενή παραγωγή TNF $\alpha$  και επακόλουθη ενεργοποίηση του TNF-R1, είτε με επαγωγή της έκφρασης του Fas και ενεργοποίησή του μέσω ενδογενούς παραγωγής FasL [Eliopoulos et al, 2000; Afford et al, 1999; Grell et al, 1999]. Κάτι τέτοιο δεν έχει μελετηθεί ποτέ στα CD34<sup>+</sup> προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Χρησιμοποιώντας λοιπόν τα KG-1 κύτταρα, βρήκαμε ότι μετά από καλλιέργεια 72 ωρών με TNF $\alpha$  (προκειμένου να γίνει, όπως αποδείξαμε, επαγωγή του CD40) και παρουσία του συνδέτη του CD40L, αυξήθηκε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων όπως δείχθηκε από την ένταση του φθορισμού της ουσίας 7-AAD, σε σχέση με το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων που λαμβάνονταν μόνο παρουσία TNF $\alpha$ . Σύμφωνα λοιπόν με τα δεδομένα αυτά, το CD40 έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει αποπτωτικά μηνύματα στα CD34<sup>+</sup> KG-1 κύτταρα.

Όπως προαναφέρθηκε, η επαγωγή της απόπτωσης με ενεργοποίηση του CD40 θεωρείται «παράδοξο γεγονός» δοθέντος ότι το μόριο στερείται DDs. Για περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού επαγωγής της απόπτωσης από την ενεργοποίηση του CD40, ελέγξαμε εάν η ενεργοποίηση του μορίου CD40 έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης μορίων της οικογένειας του TNF με DDs. Αρχικά διερευνήσαμε την επαγωγή της παραγωγής του Fas στα KG-1 κύτταρα. Πραγματικά, βρήκαμε ότι μετά από καλλιέργεια 72 ωρών με TNF $\alpha$  προκειμένου να γίνει επαγωγή του CD40 και παρουσία του συνδέτη του CD40L, αυξήθηκε το ποσοστό των Fas<sup>+</sup> κυττάρων σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο TNF $\alpha$ . Παρουσία, μάλιστα, rhFasL οπότε ενεργοποιείται και ο υποδοχέας Fas, αυξήθηκε περαιτέρω το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, σε σχέση με αυτό παρουσία μόνο TNF $\alpha$ , εύρημα που δείχνει ότι το μόριο Fas που επάγεται μέσω ενεργοποίησης του CD40 είναι λειτουργικό. Θελήσαμε, στην συνέχεια να διερευνήσουμε εάν η ενεργοποίηση του CD40 επάγει την έκφραση όχι μόνο του Fas αλλά και του FasL, το οποίο δεν εκφράζεται στα KG-1 κύτταρα ούτε σε φυσιολογικές συνθήκες ούτε μετά από επίδραση του TNF $\alpha$ . Σε μια τέτοια περίπτωση, η αυξημένη απόπτωση μετά την ενεργοποίηση του CD40, θα μπορούσε να οφείλεται στην ενεργοποίηση του Fas από τον ενδογενώς παραγόμενο FasL. Με κυτταρομετρία ροής δε βρέθηκε αύξηση στην έκφραση του FasL στα KG-1 κύτταρα στις παραπάνω συνθήκες καλλιέργειας. Με RT-PCR, ωστόσο, διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης του FasL mRNA μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα CD40, στις 12 και 24 ώρες. Το γεγονός ότι δε φάνηκε κάποια αξιόλογη αλλαγή στην επιφανειακή έκφραση του FasL ίσως οφείλεται σε κάποιο μετα-μεταγραφικό ρυθμιστικό μηχανισμό. Θα μπορούσε, ωστόσο, να υπάρχει παραγωγή FasL τόσο μικρή που να μην ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής. Τέλος, θα μπορούσε το μόριο FasL να αποπίπτει ταχύτατα από την επιφάνεια των κυττάρων ώστε να μην ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής. Ο μηχανισμός αυτός της αποκοπής (cleavage) του μορίου FasL από την επιφάνεια των κυττάρων με τη δράση μεταλλοπρωτεάσης είναι ευρύτατα γνωστός [Brunner et al, 2003; Li-Weber & Krammer, 2003]. Όλοι οι παραπάνω πιθανοί μηχανισμοί χρήζουν περαιτέρω

διερεύνησης.

Στη συνέχεια ελέγξαμε εάν η ενεργοποίηση του CD40 επάγει την έκφραση του TNF-R1 στα KG-1 κύτταρα, ενός υποδοχέα με DDs η ενεργοποίηση του οποίου επάγει την απόπτωση στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα [Sato et al, 1997]. Βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του CD40 αυξάνει την έκφραση TNF-R1, αφενός σε επίπεδο mRNA αφετέρου σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως αποδείχτηκε από την αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν TNF-R1 αλλά και την επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα ανά κύτταρο στην ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Με βάση τα δεδομένα αυτά αποδεικνύεται ότι το CD40 επηρεάζει το σηματοδοτικό μονοπάτι του TNF-R1, αυξάνοντας την έκφρασή του και ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση του. Η παραγωγή ενδογενούς TNF $\alpha$  μέσω του CD40 δεν ελέγχθηκε εν προκειμένω, αλλά αποτελεί ένα ενδιαφέρον θέμα για περαιτέρω διερεύνηση.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του TNF-R2, που στερείται DDs, στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα επάγει αντι-αποπτωτικά σήματα. [Sato et al, 1997]. Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι στα KG-1 κύτταρα, η ενεργοποίηση του CD40 μείωσε το ποσοστό έκφρασης TNF-R2 αφενός σε επίπεδο mRNA αφετέρου σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως αποδείχτηκε με RT-PCR και κυτταρομετρία ροής, αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, είναι εύλογο να υποθέσει κανείς ότι η ενεργοποίηση του CD40 στα KG-1 κύτταρα επάγει το μηχανισμό της απόπτωσης, τουλάχιστον εν μέρει, επάγοντας την έκφραση του TNF-R1 που έχει αποπτωτική δράση και μειώνοντας την έκφραση του TNF-R2 που έχει αντι-αποπτωτική δράση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ανάλογα αποτελέσματα αναφορικά με την έκφραση των μορίων TNF-R1 και TNF-R2 είχε και η ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas στα KG-1 κύτταρα. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του Fas προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του TNF-R1, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA, και ελάττωση της έκφρασης του TNF-R2. Αυτό το φαινόμενο, ωστόσο, είναι αναμενόμενο δοθέντος ότι το Fas είναι μέλος της οικογένειας του TNF-R που περιέχει DDs και φαίνεται λογικό να ενισχύει την αποπτωτική του δράση αυξάνοντας την έκφραση του TNF-R1 (που έχει αποπτωτική δράση) και μειώνοντας την έκφραση του TNF-R2 (που έχει αντι-αποπτωτική δράση).

Η ενεργοποίηση του Fas στα KG-1 κύτταρα είχε, επίσης, ως αποτέλεσμα μια τάση μείωσης της έκφρασης του CD40 στα κύτταρα, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το εύρημα της ελάττωσης της έκφρασης του TNF-R2 στα κύτταρα μετά την ενεργοποίηση του Fas, και μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός ρύθμισης μεταξύ υποδοχέων με και χωρίς DDs.

Από όλα τα παραπάνω ευρήματα γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει ένα είδος ενδοκυττάριας επικοινωνίας μεταξύ των μορίων TNF/TNF-Rs στα KG-1 κύτταρα. Είναι, επομένως, προφανές ότι η επαγωγή της απόπτωσης μέσω CD40 στα κύτταρα διενεργείται κυρίως έμμεσα., με επαγωγή της έκφρασης άλλων μορίων της οικογένειας TNF/TNF-Rs με αποπτωτική δράση όπως το Fas, FasL, TNF-R1, και παράλληλη μείωση της έκφρασης μορίων με αντι-αποπτωτική δράση όπως ο TNF-R2. Η παρουσία TNF $\alpha$  στην καλλιέργεια ενισχύει τον μηχανισμό της απόπτωσης σε συνδυασμό με την επαγωγή του TNF-R1. Το γεγονός ότι δεν υπήρξε επαγωγή του CD40L σε καμία περίπτωση και

συγκεκριμένα μετά από καλλιέργεια παρουσία TNF $\alpha$  με και χωρίς rhCD40L, όπως αποδείχτηκε με κυτταρομετρία ροής και με RT-PCR, ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπόθεση της έμμεσης δράσης του CD40 στα KG-1.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι το σύστημα CD40/CD40L παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των CD34<sup>+</sup> KG-1 κυττάρων, με έμμεσο κυρίως τρόπο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων CD40/CD40L και άλλων μορίων της οικογένειας TNF/TNF-Rs διερευνήθηκαν για πρώτη φορά σε CD34<sup>+</sup> μυελικά κύτταρα και ανοίγουν ένα νέο πεδίο μελέτης της απόπτωσης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η μελέτη του συστήματος θα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας στα οποία ο TNF $\alpha$  έχει κύριο παθογενετικό ρόλο. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει η μελέτη της έκφρασης του CD40 στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα ασθενών με αυξημένες συγκεντρώσεις TNF $\alpha$  στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον. Με βάση τα δεδομένα της μελέτης μας αναμένεται ότι τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα των ασθενών αυτών θα εκφράζουν CD40, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά άτομα. Σε αυτή την περίπτωση, η απόπτωση που αποδεδειγμένα παρατηρείται στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών ενδέχεται να ενισχύεται από αλληλεπιδράσεις των συστημάτων CD40/CD40L, Fas/FasL, TNF $\alpha$ /TNF-R1. Ενδιαφέρονσα, επίσης, θα είναι η μελέτη της έκφρασης του CD40L στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με μυελική ανεπάρκεια, με την έννοια της αναζήτησης μεμβρανικής και διαλυτής μορφής του μορίου και κυτταρικών πληθυσμών που το εκφράζουν. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων CD40/CD40L, Fas/FasL, TNF $\alpha$ /TNF-R1 στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και τα κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος θα βοηθήσει στην πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την φυσιολογία και παθοφυσιολογία της αιμοποίησης.



## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos AG, Hubscher SG, Young LS, Adams DH. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface Fas Ligand expression and amplifies Fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *J. Exp. Med.* 1999;189:441-446
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002;2:420-430
- Biancone L, Cantaluppi V, Camussi G. CD40-CD154 interaction in experimental and human disease. *Int J Mol Med* 1999; 3:343-353.
- Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jacob S, Cprazza N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 2003;15:167-176.
- Caux C, Saeland S, Favre C, Duvert V, Mannoni P, Banchereau J. Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of Human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990;75:2292-2298
- Cheng G, Cleary AM, Ye Z, Hong DI, Lederman S, Baltimore D. Involvement of CRAF-1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science.* 1995;267:1494-1498
- Eliopoulos AG, Davies C, Knox PG, Gallagher NJ, Afford SC, Adams DH, Young LS. CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Molecular and Cellular Biology.* 2000;5503-5515
- Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology.* 2003;66:1403-1408
- Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrad A, Troutt AB, Ledbetter JA, Deeg HJ. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 1998;103:176-188
- Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen C, Grunwald U, Huang DCS, Wu Lee Y, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *The EMBO Journal.* 1999;18:3034-3043

- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF-receptor-1 associated protein TRADD signal cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*. 1995;81:495-504
- Koeffler PH, Golde DW. Acute Myelogenous Leukemia: A human derived cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 1978;200: 1153-1154
- Li-Weber M, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* 2003;15:145-57.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- $\kappa$ B activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565-576
- Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34<sup>+</sup> human marrow cells is induced by interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995;85:3183-3190
- Misceau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes. *Cell* 2003;114:181-190
- Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, Mizuno S, Takenaka K, Miyamoto T, Okamura T, Gondo H, Niho Y. Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995;86:883-889
- Natoli G, Costanzo A, Lami A, Templeton DJ, Woodgett JR, Balsano C. Activation of SAPK/JNK by the TNF receptor 1 through a non-cytotoxic TREF-2 dependent pathway. *Science* 1997;275:200-203
- Papadaki HA, Boumpas DT, Gibson FM, Jayne DR, Axford JS, Gordon-Smith EC, Marsh JC, Eliopoulos GD. Increased apoptosis of bone marrow CD34<sup>+</sup> cells and impaired function of bone marrow stromal cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol*. 2001;115:167-174
- Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetzi C, Koutala H, Marsh JC, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. *Blood* 2002;99:1610-1619
- Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* 2002;100:474-482

- Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas K, Gemetzi C, Damianaki A, Koutala H, Bux J, Eliopoulos GD. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood*. 2003; 101: 2591-2600
- Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dalgleish AG, Gibson FM. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*. 1996;87: 2244-2251.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994;78:681-692
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF-2 mediated activation of NF- $\kappa$ B by the TNF receptor 2 nd CD40. *Science* 1995;269:1424-1427
- Rusten LS, Jacobsen FW, Lesslauer W, Loetscher H, Smeland EB. Bifunctional effects of tumor necrosis factor a (TNFa) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* 1994a;83:3152-3159
- Rusten LS, Smeland EB, Jacobsen FW, Lien E, Lesslauer W, Loetscher H, Dubois CM, Jacobsen SEW. Tumor necrosis factor-a inhibits stem cell factor-induced proliferation of human bone marrow progenitor cells in vitro. *J Clin Invest*. 1994b;94:165-171
- Sato T, Selleri C, Anderson S, Young NS, Maciejewski JP. Expression and modulation of cellular receptors for interferon- $\gamma$ , tumour necrosis factor, and Fas on human bone marrow CD34<sup>+</sup> cells. *British Journal of Haematology* 1997;97:356-365
- Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, Inoue M, Susuki K, Kamiyama R, Hirokawa K, Kitagawa M. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2003;27:583-591
- Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:4-43
- Tartalia LA, Ayers TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kDa receptor signals cell death. *Cell*. 1993;74:845-853
- Young N.S. Bone marrow failure syndromes. Bone marrow failure syndromes. Philadelphia: W.B. Saunders Company (2000).

