

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
Τμήματα Βιολογίας και Ιατρικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα  
Σπουδών  
Μοριακής Βιολογίας - Βιοιατρικής

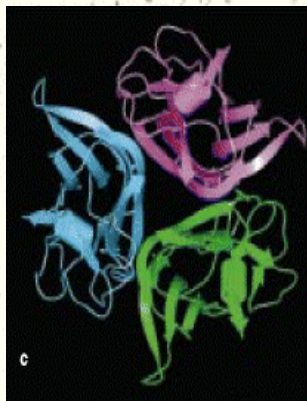


UNIVERSITY OF CRETE  
Medical School and Dept. of Biology

Joint Graduate Program  
on  
Molecular Biology - Biomedicine

αναφορά μεταπτυχιακής εργασίας

Μελέτη του Ανυπορρυθμιστικού Ρόλου του  
Μελέτη του Ανυπορρυθμιστικού Ρόλου του TNF  
στις Αποκρίσεις των T κυττάρων



Φουστέρη Γεωργία

Επιβλέπουσα Ερευνήτρια: Μαιμολάκη Κ.  
Υπεύθυνος Καθηγητής: Παπαματθαίου Ι.

Ηράκλειο 2002

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου στο εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Ηρακλείου Κρήτης. Με την ολοκλήρωσή της συμπληρώθηκε ένας πολύ σημαντικός κύκλος της ζωής μου, ενώ ταυτόχρονα ξεκίνησε μία νέα πορεία αναζήτησης. Οι εμπειρίες που αποκόμισα κατά την περίοδο αυτή ίσως αποδειχτούν οι πιο σημαντικές για την περαιτέρω εξέλιξή μου ως επιστήμονα και ανθρώπου. Για το λόγο αυτό, θα ήθελα πάρα πολύ να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα ερευνήτρια της εργασίας μου κ. Μαμαλάκη Κλειώ γιατί μου έδειξε εμπιστοσύνη και μου στάθηκε πολύτιμος σύμβουλος κατά τη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Δεν μπορώ να ξεχάσω επίσης την τρομερή συμπαράσταση και συνεργασία που είχα με τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Ντέπη, τη Σοφία και το Γιάννη. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους τον κ. Παπαματθαϊάκη Ι., τον κ. Ταλιανίδη Ι. και την κ. Κρετσόβαλη Ν. για τις συμβουλές που μου πρόσφεραν προκειμένου να με βοηθήσουν σε κάθε τροχοπέδη. Ακόμη στέλνω θερμές ευχαριστίες στα παιδιά του animal house, την Ελένη, τον Κώστα, την Χαρούλα, τη Νίκη και την Στέλλα για τη βοήθειά τους και τη συμπαράστασή τους. Τέλος δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους ανθρώπους που με υποστηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια στην προσπάθειά μου αυτή: την οικογένειά μου και τους φίλους μου, ιδιαίτερα το Γιώργο, που θα φύγει για σπουδές στο εξωτερικό και θα μου λείψει πολύ.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο TNF είναι μία κυτοκίνη που συμμετέχει στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και λαμβάνει ενεργά μέρος στις αποκρίσεις των Τ κυττάρων. Η σημασία του TNF αποκορυφώθηκε όταν ταυτοποιήθηκε ως μόριο με δισχιδή δράση: προφλεγμονώδη έναντι προ-ανοσοκατασταλτικής. Η ενοχοποίηση του συστήματος του TNF σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την ασθένεια του Crohn, τη σκλήρυνση κατά πλάκας και το διαβήτη (Douni E. 1995, Probert L. 1995, Kassiotis 2001a), η ευεργετική επίδραση της αντι-TNF θεραπείας σε κάποιες από αυτές σε αντιδιαστολή με την επιδείνωση που προκαλεί σε κάποιες άλλες καθώς και αποτελέσματα μελετών με knock-out ζώα προτείνουν ότι ο TNF εμπλέκεται στην ανοσορρύθμιση των Τ κυττάρων και πιο πρόσφατα των αυτοδραστικών (Kassiotis G. 2001β, Balkwill F. 2000). Οι συγκεκριμένοι ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί δράσης του TNF παραμένουν σε σημαντικό βαθμό αδιευκρίνιστοι μέχρι σήμερα.

Σε αυτήν την εργασία προσεγγίστηκαν πειραματικά δύο βασικοί στόχοι. Στον πρώτο πραγματοποιήθηκε μελέτη και σύγκριση της ικανότητας επιβίωσης των Τ κυττάρων που δεν εκφράζουν τον TNF in vivo. Στο δεύτερο, χρησιμοποιώντας in vitro κυτταρικές στρατηγικές, μελετήθηκε ο ρόλος του TNF σε δύο άλλες λειτουργίες των Τ κυττάρων, την ενεργοποίηση και την ανοχή. Η πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών μας οδήγησε σε σημαντικές πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης του TNF. Συγκεκριμένα, η επιβίωση των F5 CD8<sup>+</sup> θυμοκυττάρων βρέθηκε σε σημαντικό βαθμό μειωμένη απουσία TNF, ενώ η δραστηριότητα των F5TNF<sup>-/-</sup> και η ανέργεια των F5NPTNF<sup>-/-</sup> περιφερικών λεμφοκυττάρων σε σημαντικό βαθμό αλλοιωμένη. Τα αποτελέσματά μας αποκόμισαν νέες πληροφορίες για τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης από τον TNF, οδηγώντας μας σε νέα ερωτήματα και δραστηριοποιώντας το ενδιαφέρον μας για βαθύτερη σπουδή.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	σελ. 1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ. 2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	σελ. 3
<u>ΚΕΦ.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	<u>σελ.5</u>
<i>1. ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</i>	<i>σελ. 5</i>
<i>2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</i>	<i>σελ. 6</i>
<i>A. ΕΠΙΒΙΩΣΗ</i>	<i>σελ.6</i>
<i>B. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ</i>	<i>σελ. 8</i>
<i>Γ. ΑΝΟΧΗ</i>	<i>σελ. 9</i>
<i>3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ - TNF</i>	<i>σελ. 10</i>
<i>A. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TNF ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</i>	<i>σελ. 11</i>
<u>ΚΕΦ.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	<u>σελ.14</u>
Ποντίκια.	σελ. 14
Κυτταρική προετοιμασία και κυτταροκαλλιέργεια.	σελ. 14
Σήμανση με CFSE και κυτταρική μεταφορά.	σελ. 14
Διέγερση κυττάρων και ενδοκυττάρια σήμανση του προφίλ έκφρασης των κυττοκινών.	σελ. 15
Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός με κυτταρομετρία ροής.	σελ. 15

1. Μειωμένη ικανότητα επιβίωσης των F5 T θυμοκυττάρων μετά από μεταφορά τους στην περιφέρεια απουσία ενδογενούς TNF. σελ.16

2. Η απουσία της έκφρασης του ενδογενούς TNF δεν επιδρά στην επιβίωση των T θυμοκυττάρων στην περιφέρεια σε πολυκλωνικό σύστημα. σελ.18

3. Καθορισμένη χρονολογική σειρά έκφρασης των κυττοκινών TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  και IL-2 κατόπιν ενεργοποίησης περιφερικών F5 κυττάρων. σελ. 19

4. Χαμηλότερο προφίλ έκφρασης της IFN- $\gamma$  και της IL-2 των F5TNF<sup>-/-</sup> T κυττάρων μετά από αντιγονική διέγερση, μία ιδιότητα που πιθανόν οφείλεται σε ελάττωμα του T κυττάρου. σελ.21

5. Η ελαττωματική ανέργεια των διπλών διαγονιδιακών F5NP κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF συνοδεύεται από ικανότητα έκφρασης IFN- $\gamma$  αλλά όχι IL-2 κατόπιν διέγερσης. σελ.24

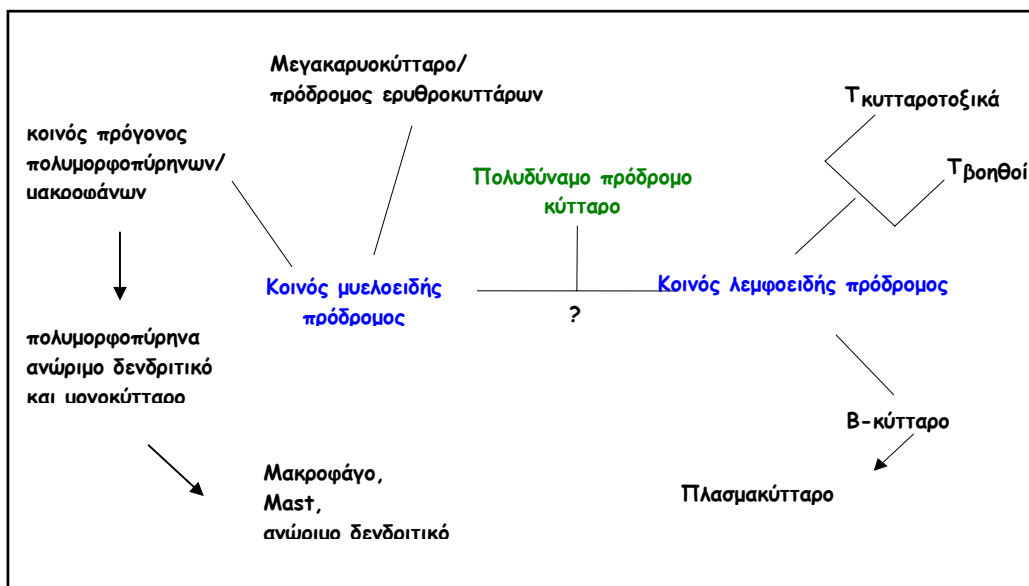
6. Η ανέργεια των F5NP κυττάρων μεταφράζεται και σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής TNF- $\alpha$  κατόπιν ενεργοποίησης. σελ.27

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ως απάντηση στους εσωτερικούς και εξωτερικούς κινδύνους το σώμα των ανώτερων οργανισμών έχει αναπτύξει δυναμικές άμυνες που συνθέτουν το **ανοσοποιητικό σύστημα**. Το ανοσοποιητικό σύστημα διαίρεται λειτουργικά σε δύο κατηγορίες: στην **έμφυτη -innate** και την **επίκτητη ή προσαρμόσιμη ανοσία –adaptive immunity**. Η έμφυτη ανοσία δρα στην πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους μολυσματικούς εισβολείς, ενώ η επίκτητη ενεργοποιείται όταν η πρώτη δεν είναι αρκετή για να προφυλάξει πλήρως τον οργανισμό ή /και παραβιάζεται. Η επίκτητη ανοσία αναπτύσσεται ειδικά ενάντια στο αντιγόνο και έχει την ικανότητα της *εξειδίκευσης, της προσαρμογής και της μνήμης* )(Janeway C.,2001).

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών αποτελείται από ένα αριθμό διαφόρων οργάνων και κυττάρων, τα οποία έχουν εξελιχθεί ώστε να αναγνωρίζουν και να καταπολεμούν ειδικά και με ακρίβεια κάθε ξένη ουσία, που καλείται **αντιγόνο ή Ag (antigen: antibody generator)**. Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, προκύπτουν από τη διαφοροποίηση πολυδύναμων αρχέγονων πρόδρομων -stem κυττάρων με δύο κύριες γραμμές εξέλιξης: τη **λεμφοειδή** που παράγει τα **λεμφοκύτταρα** και τη **μυελοειδή** που παράγει τα **κοκκιοκύτταρα** (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), και τα **μακροφάγα** (τύπος φαγοκυττάρων) (**εικόνα 1**). Τα πιο σημαντικά κύτταρα είναι τα **λευκοκύτταρα**, τα οποία κατατάσσονται σε δύο γενικές κατηγορίες: τα **φαγοκύτταρα** που συνθέτουν και την έμφυτη ανοσία και τα **λεμφοκύτταρα** που μεσολαβούν την επίκτητη ανοσία (Janeway C.,2001).



**Εικόνα1:** Οι κύριες γραμμές διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα **λεμφοκύτταρα** παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην παροχή ειδικής ανοσολογικής αναγνώρισης και ανταπόκρισης. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι λεμφοκυττάρων: τα **T**, τα **B** και τα **κυτταροτοξικά –natural killers -NK κύτταρα**. Τα T και τα B κύτταρα είναι και τα δύο εξοπλισμένα με επιφανειακούς υποδοχείς ειδικούς για το αντιγόνο, και συμμετέχουν στην *ειδική ανοσία*. Κάθε T ή B κύτταρο φέρει κατά κανόνα υποδοχείς μόνο μίας ειδικότητας εξειδικευμένους για μία συγκεκριμένη δομή πεπτιδίου. Τα T κύτταρα αναπτύσσονται στο θύμο, ενώ τα B διαφοροποιούνται στο εμβρυϊκό συκώτι και στον ώριμο μυελό των οστών -στα θηλαστικά. Τα **T κύτταρα** διαιρούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: σε αυτά που σκοτώνουν απευθείας τα ξένα κύτταρα –στόχους τους οπότε ονομάζονται και **κυτταροτοξικά** και σε αυτά που μπορούν να ενεργοποιούν άλλες κατηγορίες ανοσοποιητικών κυττάρων, (συμπεριλαμβανομένων και των B) και ονομάζονται **βοηθητικά**. Τα ώριμα T κύτταρα που κυκλοφορούν στην περιφέρεια είναι: **CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> - T βοηθοί-** και **CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> -T κυτταροτοξικά** (Janeway C.,2001).

Και οι δύο κατηγορίες T κυττάρων μπορούν να αναγνωρίζουν αντιγόνα που βρίσκονται συνδεδεμένα σε μεμβρανικούς υποδοχείς στη επιφάνεια ειδικών κυττάρων που ονομάζονται **αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ή antigen presenting cells -APC** ( B κύτταρα, δένδριτικά και μακροφάγα). Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται **κύριο σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας ή major histocompatibility complex –MHC** και είναι δύο τύπων: **τύπου I** και **τύπου II**. Τα CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικά κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα συνδεδεμένα σε μόρια τάξης I του MHC, ενώ οι T βοηθοί αναγνωρίζουν αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα σε τάξης II μόρια του MHC. Οι υποδοχείς που χρησιμοποιούν τα T κύτταρα για να αναγνωρίσουν το σύμπλοκο: “*μόριο MHC : αντιγόνο*” ονομάζονται **υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων ή T cell receptor –TCR**. Ο TCR ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Janeway C.,2001).

## 2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΤΩΝ T ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τρεις είναι οι καλά χαρακτηρισμένες λειτουργικές αποκρίσεις των T κυττάρων: η **επιβίωση**, η **ενεργοποίηση** και η **ανέργεια**.

### A. ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Τα λεμφοκύτταρα που δεν έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο **-παρθένα –naïve-** όταν βρίσκονται στην περιφέρεια του οργανισμού κυκλοφορούν μεταξύ των δευτερευόντων λεμφοειδών οργάνων (σπλήνα, λεμφαδένες) μέχρι να συναντήσουν κάποιο αντιγόνο. Η διατήρηση του μεγέθους της περιφερικής δεξαμενής των λεμφοκυττάρων είναι ουσιώδης

σημασίας για το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα. Και αυτό γιατί από την μία πλευρά υπάρχει ο περιορισμός του χώρου, από την άλλη υπάρχει η αναγκαιότητα της ποικιλότητας. Η δεξαμενή θα πρέπει να είναι συγκεκριμένου μεγέθους και αρκετά ποικίλης, ώστε να μπορεί να αναγνωρίζει και να καταστρέφει ένα μεγάλο εύρος εν δυνάμει παθογόνων. Μέρος από την επίλυση που έχει δώσει το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών στο ζήτημα αυτό είναι ο γρήγορος πολλαπλασιασμός και η μείωση των αντιγονο-ειδικών πληθυσμών κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης μέσω θανάτου που επάγεται από ενεργοποίηση – **activation induced cell death- AICD**. Η διατήρηση της ομοιόστασης της περιφερικής λεμφοκυτταρικής δεξαμενής είναι πολύ σημαντική και δύο επιπλέον ομοιοστατικοί μηχανισμοί έχουν περιγραφεί: η **επιβίωση** και **ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός**. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ομοιοστατικά σε λεμφογενικά περιβάλλοντα ενώ επιβιώνουν σε πλήρη (Janeway C.,2001).

Η διατήρηση της λεμφοκυτταρικής δεξαμενής ενός οργανισμού φαίνεται ότι υποδιαιρείται σε διαφορετικές ρυθμίσεις ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί των B και T λεμφοκυττάρων μάλλον ρυθμίζονται ανεξάρτητα (Tanchot, 1997). Όσον αφορά τα T κύτταρα, πιστεύεται ότι τα παρθένα T κύτταρα τα CD4<sup>+</sup> όσο και τα CD8<sup>+</sup> κύτταρα απαιτούν χαμηλή αλληλεπίδραση με αντιγόνα εαυτού πάνω στα μόρια MHC που αναγνωρίζουν προκειμένου να επιβιώσουν στην περιφέρεια (Takeda S, 1996, Tanchot, 1997). Πρόσφατα, υποστηρίχθηκε ότι για την επιβίωση των παρθένων CD4 T κυττάρων δεν απαιτείται η αλληλεπίδραση του TCR υποδοχέα τους με τα μόρια του MHC (Dorfman, 2000).

Οι υποδεξαμενές των CD4<sup>+</sup> και των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων αλληλοεπικαλύπτονται στην περιφέρεια (Tanchot, 1995). Επειδή όμως η αναλογία CD4<sup>+</sup> προς CD8<sup>+</sup> είναι σταθερή στα φυσιολογικά ζώα πρέπει με κάποιο τρόπο να ρυθμίζονται και ανεξάρτητα αυτές οι δύο υποδεξαμενές. Όσον αφορά τις υποδεξαμενές των παρθένων και των κυττάρων μνήμης, φαίνεται ότι υπόκεινται σε ξεχωριστή ρύθμιση, γεγονός που εξασφαλίζει την ποικιλία του TCR στη δεξαμενή των παρθένων κυττάρων, ενώ υπάρχει ένας επαρκής αριθμός T κυττάρων μνήμης που εξασφαλίζει γρήγορες και αποτελεσματικές ανοσοαποκρίσεις (Tanchot, 2000 , Goldrath, 2002). Η αναγκαιότητα των μορίων του MHC, δε φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της περιφερικής δεξαμενής των **T κυττάρων μνήμης** ούτε για τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό (Freitas, 1999, Tanchot 1997, Murali-Krishna, 1999).

Σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των T κυττάρων παίζουν και άλλοι παράγοντες, όπως κυττοκίνες και ενδοκυτταριοί παράγοντες μεταγωγής σήματος εκατέρωθεν του υποδοχέα TCR. Η IL-7 για παράδειγμα είναι απαραίτητη τόσο για την επιβίωση όσο και για τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό των παρθένων CD8<sup>+</sup> T κυττάρων (Schluns, 2000), ενώ η IL-15 ρυθμίζει θετικά την επιβίωση και τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων μνήμης (Zhang, 1998; Ku, 2000). Η IL-7 παίζει σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία



CD8<sup>+</sup> T κυττάρων μνήμης (Schluns, 2000). Οι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα και επιδρούν στην επιβίωση των παρθένων T κυττάρων αφορούν την Ick, ένα μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του μηνύματος που ξεκινά από τον TCR. Βρέθηκε, ότι η επιβίωση των τα κυττάρων ήταν ανεξάρτητη της Ick, ενώ η έκφραση της Ick ήταν βασική προϋπόθεση για να διαιρεθούν τα κύτταρα σε λεμφοπενικούς αποδέκτες. Τα δεδομένα αυτά πρότειναν ότι η επιβίωση και ο ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός εξαρτώνται από διαφορετικά μηνύματα και ότι πρόκειται για δύο εντελώς διαφορετικούς μηχανισμούς διατήρησης των αριθμών των λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια (Seddon, 2000).

## B. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ

Τα ώριμα T κύτταρα που εντοπίζονται στην περιφέρεια επιβιώνουν και αντιδρούν οδηγούμενα σε *κλωνικό πολλαπλασιασμό -clonal expansion* όταν διεγείρονται από αντιγονικό ερέθισμα. Κατά την ενεργοποίησή τους διαφοροποιούνται σε *δραστικά κύτταρα -effectors* – αποκτώντας ιδιότητες παραγωγής και έκκρισης κυττοκινών. Τα CD4<sup>+</sup> κύτταρα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση το πρότυπο έκκρισης κυττοκινών: τα βοηθητικά τύπου 1 -T helper 1- Th1, που εκκρίνουν κυρίως *ιντερλευκίνη 2 -IL-2* και *ιντερφερόνη -γ -IFN-γ*, και τα βοηθητικά τύπου 2 -T helper 2 -Th2 που εκκρίνουν κυρίως *IL-4, IL-5, IL-6* και *IL-10*. Τα ενεργοποιημένα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα παράγουν δύο είδη προϊόντων: κυττοκίνες (*IFNγ, IL-2* και *TNF-α*), και κυτταροτοξίνες (*περφορίνη, γκρανζύμες, και FasL*) (Janeway C.,2001).

Η αντιγονοπαρουσίαση μέσω MHC στον υποδοχέα TCR των T λεμφοκυττάρων είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Ωστόσο η βέλτιστη ενεργοποίηση των αντιγονο-ειδικών λεμφοκυττάρων απαιτεί επιπρόσθετα μηνύματα φέροντα από *συνδιεγερτικά -costimulatory* μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων (*μοντέλο των δύο σημάτων*). Το μονοπάτι συνδιέγερσης των *B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4* είναι το καλύτερα μελετημένο με ζωτικής σημασίας ιδιότητες ρύθμισης της κυτταρικής ενεργοποίησης και ανοχής. Συγκεκριμένα, η σηματοδότηση μέσω CD28 ρυθμίζει το σκαλοπάτι -threshold- ενεργοποίησης των T κυττάρων μειώνοντας σημαντικά τον αριθμό των συζεύξεων του TCR που χρειάζονται για πλήρη ενεργοποίηση. Άλλα πρόσφατα χαρακτηρισμένα συνδιεγερτικά μόρια είναι τα *ICOS-ICOSL* και *PD-1-PD-L* (Sharpe A, 2002). Μετά την ανοσοποίηση, ένα επιλεγμένο ποσοστό των λεμφοκυττάρων παραμένει ως ομάδα ειδικών για το αντιγόνο *κυττάρων μνήμης*, που απαντούν ανοσολογικά σχετικά γρήγορα και με μεγαλύτερη ένταση και μήκος, μετά από επανέκθεση του οργανισμού στο ίδιο αντιγόνο (Janeway C.,2001, Veiga-Fernandes H, 2000).

Ο μηχανισμός σηματοδότησης που μεσολαβείται από τον υποδοχέα των T κυττάρων –TCR είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος με γεγονότα να λαμβάνουν χώρα κοντά στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Συνοπτικά, η ενεργοποίηση του TCR οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών που ανήκουν στην οικογένεια src (Lck, Fyn) οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις υπομονάδες του CD3 συμπλόκου όπως και τις αλληλουχίες ITAM. Οι φωσφορυλιωμένες ITAM χρησιμεύουν ως θέσεις κατεύθυνσης της ZAP70 στον ενεργοποιημένο TCR (Clements JL, 1999, Koretzky GA, 2001). Η ZAP70 με την άφιξή της, φωσφορυλιώνεται από τις Lck και Fyn και ενεργοποιημένη οδηγεί στην έναρξη διαφόρων καταρρακτών σηματοδότησης (Ras, calcineurin, NF-AT). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf/MAPK οδηγεί στην επαγωγή της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 ενώ ενεργοποίηση της PLC-γ οδηγεί μέσω άλλου μονοπατιού στην αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου, γεγονός που οδηγεί με αλληπάλληλη ενεργοποίηση της καλσινευρίνης στην ενεργοποίηση του NF-AT. Ο τελευταίος στην συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα και συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων όπως της IL-2 (Cantrell DA., 2001).

## Γ. ANOXH

Όπως γνωρίζουμε, κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των T λεμφοκυττάρων στο θύμο πραγματοποιείται η εκπαίδευσή τους στο να αναγνωρίζουν αντιγόνα εαυτού από μη-εαυτό. Η ανοχή εαυτού είναι μία φυσιολογική κατάσταση των λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα απάντησης/ ενεργοποίησης σε αντιγόνα εαυτού και από αδυναμία παραγωγής IL-2 (Dubois PM, 1998). Όταν η ανοχή εγκαθιδρύεται κατά την εκπαίδευση των λεμφοκυττάρων στο θύμο ονομάζεται **κεντρική ανοχή**, ενώ όταν εγκαθιδρύεται στην περιφέρεια **περιφερική**. Ο μηχανισμός εγκαθίδρυσης της ανοχής στο στάδιο του θύμου είναι μέσω απαλοιφής των άωρων λεμφοκυττάρων που φέρουν αντιγονικούς υποδοχείς με μεγάλη συγγένεια για αντιγόνα-εαυτού πριν να γίνουν ώριμα (εν δυνάμει αυτοδραστικά) και μεταπηδήσουν στην περιφέρεια (Janeway C.,2001).

Ωστόσο, επειδή δεν εκφράζονται όλα τα αντιγόνα εαυτού στο θύμο και σε υψηλά επίπεδα για να προκαλέσουν απαλοιφή των αυτοδραστικών κλώνων, ο οργανισμός έχει αναπτύξει άλλους μηχανισμούς εγκαθίδρυσης ανοχής στην περιφέρεια. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να διαιρεθούν σε αυτούς που δρουν απευθείας στο T κύτταρο (*T-cell intrinsic*) και σε αυτούς που επιδρούν σε άλλα κύτταρα όπως τα δενδριτικά και τα ρυθμιστικά T κύτταρα (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) (*T-cell extrinsic*). Το απλούστερο σενάριο περιφερικής ανοχής είναι η **άγνοια –ignorance-** των αντιγόνων εαυτού είτε λόγω χαμηλής έκφρασης είτε λόγω έκφρασης σε μη προσβάσιμες περιοχές /ιστούς για το T κύτταρο. Ένας άλλος μηχανισμός περιφερικής ανοχής είναι η **ανέργεια –anergy-**, μία διαδικασία κατά την οποία το T κύτταρο οδηγείται σε

λειτουργική απενεργοποίηση όταν αναγνωρίσει αντιγόνα εαυτού. Ένα μοντέλο πρόκλησης ανέργειας είναι η ενεργοποίηση του T κυττάρου απουσία του δεύτερου συνδιεγερτικού σήματος (B7-1,-2/ CD28,CTLA-4), που είναι απαραίτητο για πλήρη ενεργοποίηση (Walker Lucy, 2002).

Ένας τρίτος μηχανισμός περιφερικής ανοχής των αυτοδραστικών T κυττάρων είναι η **κλωνική απαλοιφή** (Rocha, 1991). Η καταστροφή του κλώνου με ειδικότητα για αντιγόνο εαυτού από το ρεπερτόριο των T κυττάρων μέσω θανάτου που επάγεται από ενεργοποίηση – **activation induced cell death- AICD** είναι ίσως ο πιο δραστικός τρόπος ανοχής. Αλλά ακόμα και όταν τα κύτταρα ενεργοποιηθούν πλήρως για αντιγόνο εαυτού, η ανοχή μπορεί να διατηρηθεί αν η φύση της απόκρισης είναι τέτοια ώστε οι παθογενετικές συνέπειες να αποφεύγονται. Η μεταβολή για παράδειγμα της κυκλοφορίας των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων μπορεί να επηρεάσει την ανοσολογική απόκριση καθορίζοντας ποια βοηθητικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με αυτά. Συγκεκριμένα, σε απάντηση σε αντιγόνο που προκαλεί ανοχή, τα T κύτταρα πολλαπλασιάζονται, αλλά η μετανάστευσή τους στις περιοχές των B κυττάρων των δευτερογενών λεμφοειδών ιστών μπορεί να είναι ελαττωματική (Kearney E, 1994). Ο μηχανισμός αυτός περιφερικής ανοχής που ονομάζεται **phenotype skewing** ουσιαστικά ρυθμίζει το πού πηγαίνουν τα αυτοδραστικά κύτταρα και με ποια βοηθητικά κύτταρα έρχονται σε επαφή.

Όσον αφορά τους μηχανισμούς εγκαθίδρυσης περιφερικής ανοχής με τη μεσολάβηση των δενδριτικών και των ρυθμιστικών T κυττάρων τα δεδομένα που έχουμε μιλούμε για τον τρόπο αντιγονοπαρουσίασης από τα πρώτα και την προστασία από επίθεση των αυτοδραστικών κυττάρων από τα δεύτερα. Το πώς τα δενδριτικά κύτταρα καθορίζουν την ενεργοποίηση ή την ανοχή των T κυττάρων είναι ακόμα σε πολύ πρώιμο στάδιο διερεύνησης, ενώ τα ρυθμιστικά T κύτταρα φαίνεται ότι μεσολαβούν τη δραστηριότητά τους τόσο μέσω επαφής, όσο και μέσω εκκρινόμενων παραγόντων (Walker L, 2002).

### **3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ –TNF**

Ο **παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor –TNF)** είναι μία κυτοκίνη που έχει χαρακτηριστεί από το 1975 (Carswell WA. 1975). Ο TNF υπάρχει τόσο σε διαλυτή όσο και σε μεμβρανική μορφή και είναι βιολογικά ενεργή όταν ομοτριμερίζεται (Jones EY. 1989) (εικόνα εξώφυλλο). Οι δραστηριότητες του TNF μεσολαβούνται από δύο κύριους καλά χαρακτηρισμένους υποδοχείς **TNFR I (p55)** και **TNFR II (p75)**, οι οποίοι διαφέρουν όσον αφορά την κατανομή τους στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, καθώς και στη συγγένεια για τον TNF άρα και τη δραστηριότητα (Heller R. 1994 review). Ο TNF είναι μία πλειοτροπική κυτοκίνη με πληθώρα λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων της κυτταροτοξικότητας, της ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματος, της προστασίας από

τις μολύνσεις, της ανοσορρύθμισης και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Barbara LA, 1996, Baxter GT, 1999). Η εκπληκτική ανακάλυψη όσον αφορά τον TNF, ότι δεν επάγει μόνο φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά φέρει σημαντική ανοσοκατασταλτική δράση, έφερε ρήξη στην καθιερωμένη αντίληψη ότι οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες προάγουν τα αυτοάνοσα νοσήματα ενώ οι ρυθμιστικές τα καταστέλλουν (O Shea J. 2001). Μάλιστα, πιο πρόσφατες λεπτομερείς μελέτες υποδεικνύουν ότι τόσο η στιγμή όσο και η διάρκεια έκφρασης του παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του παθογενετικού έναντι του προστατευτικού ρόλου του TNF (Green EA. 2000, Core AP, 1997).

Μελέτες με αντισώματα αγωνιστές έχουν δείξει ότι οι δύο υποδοχείς του TNF σηματοδοτούν κοινές και διαφορετικές λειτουργίες αλλά δεν έχει βρεθεί ο βαθμός αλληλοεπικάλυψης (Ashkenazi A. 1998, Chan KF. 2000, Screaton G. 2000). Ενώ ο p55 έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνος για την κυτταροτοξική σηματοδότηση και την επαγωγή διαφόρων γονιδίων, ο p75 έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνος για τη σηματοδότηση πολλαπλασιασμού. Μετά τη δέσμευση του TNF στους υποδοχείς προκαλείται ενεργοποίηση διαφόρων κινασών –PKCα, PKA, CAPK, PKCζ και κινάση β-καζεΐνης- και ξεκινά ένας καταρράκτης σηματοδότησης μέσω αλληλάλληλων φωσφορυλιώσεων. Μία άλλη οικογένεια κινασών που ενεργοποιείται είναι οι υποοικογένειες της MAPK: JNK, p38 MAPK, p42/44 MAPK, οι οποίες συμβάλλουν στην μεταγραφή γονιδίων με το να ενεργοποιούν τον NF-kB (Heller RA, 1994, Boone EV. 1998). Ο p55 υποδοχέας φέρει περιοχή θανάτου (death domain –DD), που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 αλλά και μέσω άλλου δρόμου στην ενεργοποίηση του NF-kB (μέσω ενεργοποίησης IKKα/β). Μέλη της Bcl-2 οικογένειας παίρνουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόφασης του κυττάρου για επιβίωση ή θάνατο (Alexander-Miller M. 1998, DiRenzo M. 2001) Επίσης, οι δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες TRAF1 TRAF2 που συνδέονται και με τους δύο υποδοχείς συνδέονται με τους αναστολείς της απόπτωσης (Inhibitors of apoptosis –IAPs) μετατρέποντας το μηχανισμό ρύθμισης του δυναμικού ενός κυττάρου από τον TNF ακόμα πιο περίπλοκο (Chu Z. 1997).

## ***A. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TNF ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ***

Η βιολογική σημασία και ο ρόλος του TNF στις λειτουργικές αποκρίσεις του προσαρμόσιμου ανοσοποιητικού συστήματος έχουν πρόσφατα αρχίσει να ταυτοποιούνται. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τόσο ο TNF όσο και υποδοχείς του εντοπίζονται σε μεμβρανική και εκκρινόμενη μορφή. Η ρύθμιση της διάχυσης του TNF και των υποδοχέων του έχει μεγάλη σημασία για το αποτέλεσμα της δράσης του TNF καθώς υπάρχει

συναγωνισμός για τον συνδέτη μεταξύ της μεμβρανικής και της διαλυτής μορφής των υποδοχέων. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει στο επίπεδο της δράσης του TNF στις λειτουργικές αποκρίσεις των T κυττάρων έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια που δεν εκφράζουν ή υπερεκφράζουν ένα ή και περισσότερα από τα συστατικά του συστήματος αυτού. Ένα από τα μοντέλα είναι τα F5, το οποίο εκφράζει κύτταρα που φέρουν έναν συγκεκριμένο υποδοχέα TCR –τον F5- και αναγνωρίζουν έναν κυρίως αντιγονικό επίτοπο του ιού της ινφλουένζας –τον NP68.

Τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων σε άλλα όπως και στο F5 μοντέλο είναι σε αρκετές περιπτώσεις αντιφατικά. Όσον αφορά την επιβίωση των T λεμφοκυττάρων τα *in vitro* πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι τα TNF ελλειμματικά ζώα έχουν χαμηλότερη ικανότητα επιβίωσης. Το γεγονός αυτό πρωτοδιαπιστώθηκε όταν μελετήθηκε ο συνολικός αριθμός T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια F5 ζώων ελλειμματικών για τον TNF. Φαινοτυπική ανάλυση F5TNF<sup>-/-</sup> ποντικών έδειξε μεγάλη μείωση του αριθμού των περιφερικών F5 T κυττάρων σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό των F5 ποντικών. Μείωση των F5 T κυττάρων απουσία του TNF παρατηρήθηκε και στο γενετικό υπόβαθρο Rag1<sup>-/-</sup> αλλά σε μικρότερο βαθμό. Για να μελετηθεί ο φυσιολογικός ρόλος του TNF στον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό των F5 T κυττάρων, μελετήθηκαν οι διαιρέσεις και η ανάκτηση μεταφερθέντων F5 και F5TNF<sup>-/-</sup> T κυττάρων σε λεμφοπενικούς αποδέκτες με πλήρες ή ανεπαρκές γενετικό υπόβαθρο για τον TNF. Βρέθηκε ότι ο πολλαπλασιασμός των μεταφερθέντων CD8<sup>+</sup> F5TNF<sup>-/-</sup> T κυττάρων ήταν σημαντικά καθυστερημένος, γεγονός που αποδόθηκε στην ελαττωματική ικανότητά τους για ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό (Διδακτορικό Χατζιδάκη I.,2002).

Η ελαττωματική επιβίωση των παρθένων F5TNF<sup>-/-</sup> T κυττάρων συνοδεύτηκε και από, χαμηλότερη ικανότητα για ενεργοποίηση. F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> T κύτταρα μελετήθηκαν σε *in vitro* πειράματα ενεργοποίησης με διάφορους τρόπους (διαιρέσεις, πολλαπλασιασμό και μάρτυρες ενεργοποίησης). Βρέθηκε ότι απουσία ενδογενούς TNF, τα F5 T κύτταρα αποκρίνονται λιγότερο. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν κατά την πραγματοποίηση *in vitro* ενεργοποίησης με ακινητοποιημένο α-CD3ε αντίσωμα. Η ελαττωμένη ενεργοποίηση των F5 TNF<sup>-/-</sup> σε σχέση με τα F5 μελετήθηκε και σε βιοχημικό επίπεδο και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σηματοδότηση που εκπορεύεται από τον TCR υποδοχέα δεν επηρεάζεται στα F5TNF<sup>-/-</sup> T κύτταρα, αλλά η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και NF-ATp είναι ελαττωμένη (Διδακτορικό Χατζιδάκη I.,2002).

Τέλος, όπως αναφέραμε, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που συσχετίζουν τον TNF με μειωμένη περιφερική ανοχή. Πειράματα που έγιναν για τη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής του ενδογενούς TNF στην περιφερική ανοχή των F5 T κυττάρων σε διπλά διαγονιδιακά F5NP ποντίκια έδειξαν ότι η περιφερική κλωνική απαλοιφή των F5 T κυττάρων

εξαιτίας έκθεσής τους σε αυτοαντιγόνο ήταν σε σαφώς μικρότερο βαθμό στα  $TNF^{-/-}$  ποντίκια. Με περαιτέρω πειράματα διαπιστώθηκε ότι η μειωμένη απαλοιφή των F5 T κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση στο ενδογενές αντιγόνο οφειλόταν πιθανότατα σε ελάττωμα του ελλειμματικού για τον TNF T κυττάρου παρά σε ελάττωμα των  $TNF^{-/-}$  αντιγονοπαρουσιαστών –APC (Διδακτορικό Χατζιδάκη Ι.,2002).

### Αντικείμενο μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι κλωνοτυπικές αποκρίσεις των F5  $CD8^{+}$  T κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF. Η εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο, διερευνήθηκε η επίδραση της έλλειψης του TNF στην ικανότητα των F5 κυττάρων για επιβίωση. Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης κυτοκινών (IFN- $\gamma$ , IL-2 και TNF- $\alpha$  ) μετά από ενεργοποίηση κυττάρων παρθένων και άνεργων, στα οποία απουσίαζε ο TNF.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Ποντίκια.** Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά μοντέλα ζώων και διασταυρώσεις αυτών: α) F5 ζώα διαγονιδιακά για τον TCR. Τα F5 ζώα έχουν στην πλειονότητά τους T κύτταρα που αναγνωρίζουν την νουκλεοπρωτεΐνη -NP του ιού της ινφλουένζας όταν εκφράζεται σε μόρια του Κύριου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας I –είναι MHC I περιορισμένα και άρα CD8<sup>+</sup> (Mamalaki C. 1992). β) διαγονιδιακά για τον NP επίτοπο (Mamalaki C. 1993), γ) Knockout για τον TNF (Pasparakis G. 1996), (δ) knockout για την ρεκομπινάση 1 (Rag1) ώστε να μη φέρουν καθόλου λεμφοκύτταρα (Spanoroulou E.1994) και οι διασταυρώσεις αυτών και δ) C57BL/10 ζώα αγρίου τύπου.

**Κυτταρική προετοιμασία και κυτταροκαλλιέργεια.** Οι σπλήνες ή οι θύμοι αφαιρούνται από τα ποντίκια, τοποθετούνται σε 1X HBSS -5% FCS, 10 mM HEPES (Gibco BRL), 2 mM L-γλουταμίνη, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco BRL) και διαχωρίζονται με κυτταρικούς διαχωριστές -cell strainers διαμέτρου 40 μm (Falcon). Προκειμένου να απομακρυνθούν τα ερυθροκύτταρα από τη σπλήνα ακολουθούνται δύο διαδικασίες: της αιμόλυσης και την κάθετης βαθμίδωσης με φικόλλη (Lympholyte-M). Η πρώτη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την προετοιμασία των κυττάρων για ενδοφλέβια μεταφορά όπως και των αντιγονοπαρουσιαστών στα πειράματα διέγερσης. Η δεύτερη, χρησιμοποιήθηκε στην προετοιμασία των κυττάρων για τη μελέτη της έκφρασης των κυττοκινών.

Κατά τη διαδικασία της αιμόλυσης, τα σπληνοκύτταρα κατακρημνίζονται και λύνονται με στιγμιαίο υποτονικό σοκ, προσθέτοντας 900 μl H<sub>2</sub>O ακολουθούμενη από 100 μl 10X HBSS και 10ml 1X HBSS -5% FCS, 10 mM HEPES ανά σπλήνα. Κατά τη διαδικασία της φικόλλης τα κύτταρα αιωρούνται σε συγκέντρωση 15 x 10<sup>6</sup>/ml πάνω από ίσο όγκο Lympholyte-M και φυγοκεντρώνονται στις 2400rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρεται η μεσόφαση που περιέχει τα λεμφοκύτταρα σε falcon και ακολουθεί διπλή πλύση με 1X HBSS -10 mM HEPES μία φορά στις 1800rpm και άλλη μία στις 1200rpm. Τελικά τα κύτταρα επαναφέρονται σε διάλυμα RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FCS, 10 mM HEPES, 100u/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη και 50 μM β-μερκαπτοαιθανόλη.

**Σήμανση με CFSE και κυτταρική μεταφορά.** Για τη σήμανση με CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester), τα κύτταρα επαναιωρούνται σε πυκνότητα 100\*10<sup>6</sup>/ml σε 1X PBS-HEPES, και αναμιγνύονται με ίσο όγκο 1X PBS-HEPES συγκέντρωσης 20 μM σε CFSE (Molecular Probes). Τα κύτταρα επωάζονται για ~12 min στους 37° C και η αντίδραση σήμανσης σταματά με προσθήκη παγωμένου HBSS 5% FCS και επώαση για 5 min σε πάγο. Ακολούθως τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1200rpm για 10 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο, και ο παραπάνω κύκλος πλυσίματος

επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές με HBSS χωρίς ορρό. Πριν τη μεταφορά τα κύτταρα μετρούνται και τελικά επαναδιαλύονται σε όγκο κατάλληλο HBSS-HEPES που να αντιστοιχεί σε  $10^8$  κύτταρα/ζώο.

**Διέγερση κυττάρων και ενδοκυττάρια σήμανση του προφίλ έκφρασης των κυττοκινών.** Μετά την αφαίρεση των σπληνών από τα ζώα, παρασκευάζονται κυτταρικά εναιωρήματα με τις μεθόδους που αναφέραμε και αναλύονται ως προς το ποσοστό των  $CD8^+$  κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Η πυκνότητα των κυττάρων προσαρμόζεται σε ίσους αριθμούς  $CD8^+$  κυττάρων  $1 \times 10^6$ . Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλήρες RPMI 1640 σε πλάκες παρουσία είτε ακτινοβολημένων C57BL/10 σπληνοκυττάρων είτε μη ακτινοβολημένων  $Rag1^{-/-}$  ή  $TNF^{-/-}Rag1^{-/-}$ , που έχουν φορτωθεί με το NP πεπτίδιο σε κατάλληλες συγκεντρώσεις για τουλάχιστον μία ώρα. Η αναλογία των APCs προς τα δραστικά κύτταρα ήταν κυρίως  $10^6 CD8^+ : 3 \times 10^6 APCs$  και οι συνθήκες καλλιέργειας είναι σε 5%  $CO_2$ , στους  $37^\circ C$ . Μετά από επιλεγμένο χρόνο καλλιέργειας προστίθεται 1μl /ml καλλιέργειας GolgiPlug και αφήνεται για 5 ώρες (Pharmingen).

Στη συνέχεια τα κύτταρα, προκειμένου να μελετηθεί το ενδοκυττάριο προφίλ έκφρασης των κυττοκινών τους συλλέγονται και βάφονται σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Cytofix/Cytoperm™ Kit- Pharmingen). Συνοπτικά, τα κύτταρα πλένονται, βάφονται για επιλεγμένους εξωτερικούς μάρτυρες, φιξάρονται, βάφονται με αντισώματα ενάντια σε επιλεγμένες κυττοκίνες και τελικά αναλύονται σε κυτταρομετρητή ροής.

**Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός με κυτταρομετρία ροής.** Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti-CD8-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD8-APC, anti-CD4-PE, anti-CD4-PE, anti-IFN $\gamma$ -PE, anti-TNF $\alpha$ -PE, anti-IL-2-PE (BD Pharmingen), anti-pan $\alpha/\beta$ -FITC (Serotec) και anti-V $\beta$ 11-βιοτίνη (Serotec) με streptavidin-Red (Gibco BRL). Για την ανάλυση έκφρασης επιφανειακών μαρτύρων,  $10^6$  κύτταρα επωάζονται με τα κατάλληλα αντισώματα σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσεων (1X PBS, 1% BSA, 0.02%  $NaN_3$ ) για 30 min στους  $4^\circ C$ , πλένονται μία φορά με 1X PBS, 0.02%  $NaN_3$ . Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στο FACSCalibur και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό CellQuest.

Για την ανάλυση αίματος από τα πειράματα μεταφοράς, 200-250 μl αίμα συλλέγονταν από φλέβες της ουράς σε Eppendorfs που περιείχαν 80 μl ηπαρίνης (90u/ml, Leo). Το αίμα πλένεται δύο φορές και ακολουθεί χρώση όπως προηγούμενα. Πριν την κυτταρομετρία, στα ερυθροκύτταρα προκαλείται λύση με επώαση 22 min σε 1X FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson) σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθούμενη από δύο πλυσίματα με 1X PBS, 0.02%  $NaN_3$ .



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

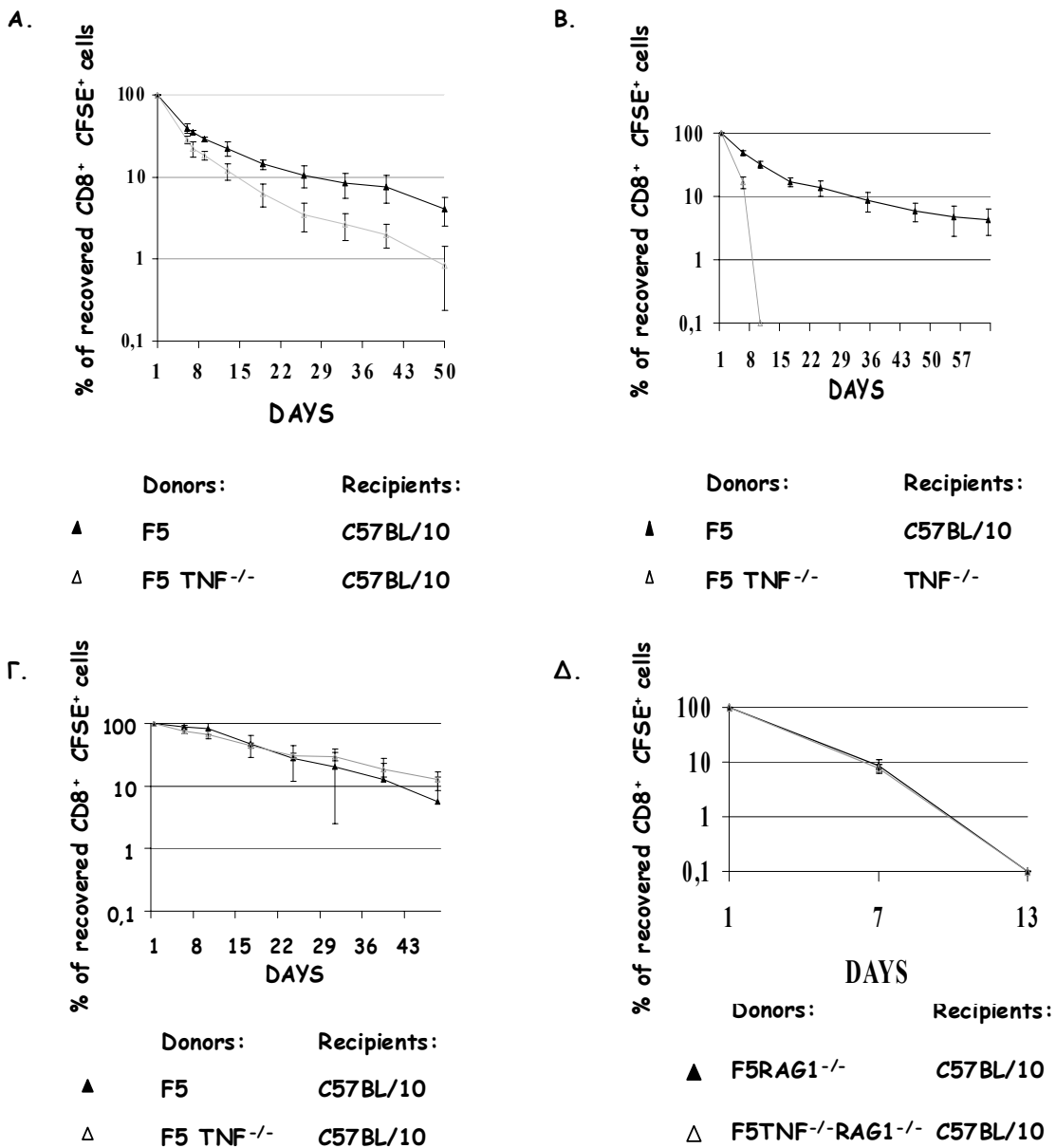
*1. Μειωμένη ικανότητα επιβίωσης των F5 T θυμοκυττάρων μετά από μεταφορά τους στην περιφέρεια απουσία ενδογενούς TNF.*

Οι πρώτες ενδείξεις για τον φυσιολογικό ρόλο του TNF στη διατήρηση της περιφερικής δεξαμενής των T κυττάρων, προήρθε από την φαινοτυπική ανάλυση F5TNF<sup>-/-</sup> ποντικών. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής σπληνοκυττάρων από F5TNF<sup>-/-</sup> ποντίκια έδειξε μεγάλη μείωση του αριθμού των περιφερικών CD8<sup>+</sup> T κυττάρων σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό στα F5 ποντίκια (Διδακτορικό Χατζιδάκη Ι.). Για να διαπιστωθεί ότι οι μειωμένοι αριθμοί F5 T κυττάρων στην περιφέρεια των F5TNF<sup>-/-</sup> ποντικών οφείλονται σε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης, θυμοκύτταρα από F5 και F5TNF<sup>-/-</sup> ποντίκια μετά από χρώση τους με CFSE μεταφέρθηκαν σε ποντίκια C57BL/10 (αγρίου τύπου) και παρακολούθηθηκε η βιωσιμότητά τους in vivo με την πάροδο του χρόνου. Παρατηρήθηκε (εικόνα 1.A) ότι μέχρι τη μέρα 8 υπήρξε μείωση του αριθμού των CD8<sup>+</sup> κυττάρων περισσότερο από 50% στα F5. Ωστόσο, η μείωση των F5TNF<sup>-/-</sup> ήταν πολύ μεγαλύτερη τη στιγμή εκείνη (>70%), η οποία διατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Το γεγονός αυτό δηλώνει την μικρότερη ικανότητα επιβίωσης των F5 T κυττάρων in vivo απουσία ενδογενούς TNF.

Επειδή η διαφορά που διαπιστώθηκε φάνηκε ότι δεν οφείλεται στον αποδέκτη (εφόσον ήταν αγρίου τύπου) ο οποίος παράγει TNF πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα, όπου δοκιμάστηκε η μεταφορά F5TNF<sup>-/-</sup> θυμοκυττάρων σε TNF<sup>-/-</sup> αποδέκτες. Βρέθηκε ότι η ανεπάρκεια TNF στον αποδέκτη και τα κύτταρα του δότη οδήγησε σε πλήρη αφανισμό των μεταφερθέντων F5TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων του δότη, από την όγδοη μέρα μετά τη μεταφορά τους (Εικόνα 1.B). Τα F5 κύτταρα που μεταφέρθηκαν σε C57BL/10 ζώα έδειξαν το ίδιο προφίλ επιβίωσης όπως στο προηγούμενο πείραμα (Εικόνα 1.B).

Επειδή τα πειράματα που προηγήθηκαν για τη μελέτη της επιβίωσης των F5 κυττάρων έγιναν με μεταφορά ολικών θυμοκυττάρων, θέλαμε να μελετήσουμε αν το φαινόμενο της μειωμένης ικανότητας για επιβίωση θα επαναλαμβανόταν μελετώντας τα περιφερικά. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.Γ, η διαφορά στην επιβίωση των F5 κυττάρων απουσία του ενδογενούς TNF ως προς τα F5TNF<sup>-/-</sup> δεν υπήρχε. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι τρία από τα πέντε ζώα στα οποία είχε γίνει η μεταφορά F5 κυττάρων παρουσίαζαν μεγάλο ποσοστό διαιρέσεων σε σχέση με τα υπόλοιπα. Υπογραμμίζουμε ότι στο γράφημα απεικονίζεται το ποσοστό των αδιαίρετων κυττάρων γιατί δεν υπήρχε τρόπος να μελετήσουμε τον πληθυσμό των κυττάρων που διαιρούταν. Η χρώση με τη CFSE μειώνεται με κάθε νέα διαίρεση στο μισό της προηγούμενης. Επομένως, εξαιτίας των διαιρέσεων, η χρώση μειωνόταν σε μεγάλο

βαθμό και δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμη. Συνεπώς, δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ότι η επιβίωση των περιφερικών F5TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων είναι όμοια με των F5 ούτε ότι τα F5 έχουν μεγαλύτερη ικανότητα για επιβίωση επειδή διαιρούνται.

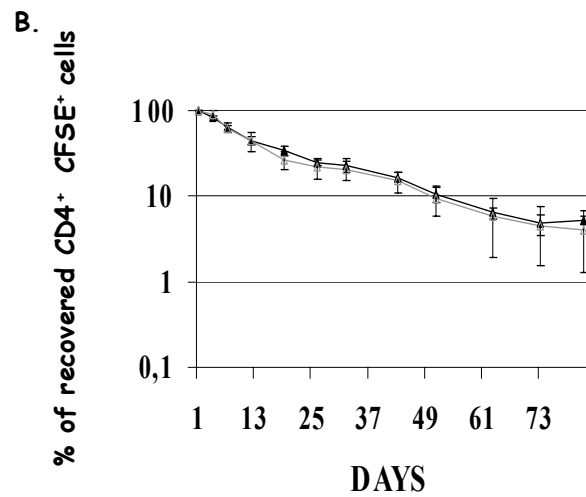
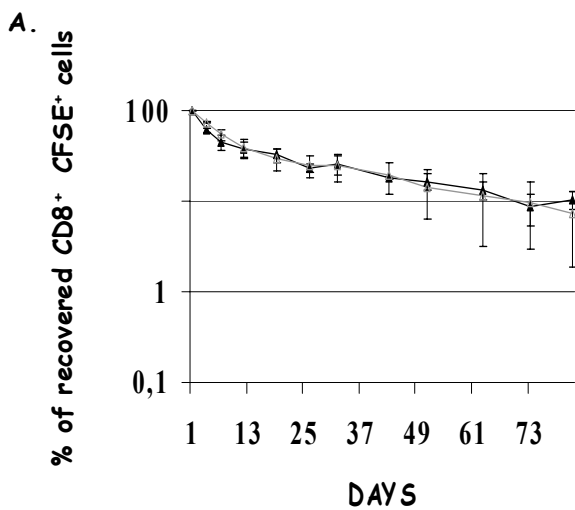


**Εικόνα 1.** Η απουσία του ενδογενούς TNF μειώνει την ικανότητα επιβίωσης των F5 κυττάρων. (A) Τα F5 θυμοκύτταρα όταν μεταφέρονται ενδοφλέβια στην περιφέρεια ζώων αγρίου τύπου επιβιώνουν καλύτερα από τα F5TNF<sup>-/-</sup>. (B) Τα F5TNF<sup>-/-</sup> θυμοκύτταρα χάνονται μέσα σε 10 μέρες μετά την μεταφορά τους στην περιφέρεια TNF<sup>-/-</sup> ζώων. (Γ) Τα F5 περιφερικά κύτταρα μετά από μεταφορά τους στην περιφέρεια ζώων αγρίου τύπου δε φαίνεται να επιβιώνουν καλύτερα από τα F5TNF<sup>-/-</sup>. (Δ) F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> θυμοκύτταρα χάνονται μέσα σε 13 μέρες μετά την μεταφορά τους στην περιφέρεια ζώων αγρίου τύπου. Απεικονίζεται το ποσοστό των αδιαίρετων CD8<sup>+</sup> κυττάρων.

Τέλος, επειδή η μείωση των F5 T κυττάρων απουσία του TNF παρατηρήθηκε και στο γενετικό υπόβαθρο Rag1<sup>-/-</sup> αν και σε μικρότερο βαθμό, μελετήσαμε την επιβίωση F5Rag1<sup>-/-</sup> F5Rag1<sup>-/-</sup> TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων όταν μεταφέρθηκαν σε αποδέκτες C57BL/10. Και στις δύο περιπτώσεις, τα κύτταρα των δοτών χάθηκαν μέσα στις 13 μέρες μετά τη μεταφορά (εικόνα 1.Δ). Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία, ότι τα Rag1<sup>-/-</sup> κύτταρα έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι επιβίωσης και έντονες διαφορές στην ικανότητα για επιβίωση από κύτταρα που αναπτύσσονται σε Rag1<sup>+/+</sup> γενετικό υπόβαθρο. Δεν μπορούμε να πούμε ξεκάθαρα πού οφείλεται η εξαφάνιση των κυττάρων τόσο πρώιμα, αν οφείλεται δηλαδή σε ελάττωμα του Rag1<sup>-/-</sup> γενετικού υπόβαθρου ή όχι. Το φαινόμενο αυτό, όπως και το φαινόμενο της κατακόρυφης μείωσης των κυττάρων που μεταφέρονται τις πρώτες 10 μέρες μετά τη μεταφορά χρειάζονται περισσότερη μελέτη.

## *2. Η απουσία της έκφρασης του ενδογενούς TNF δεν επιδρά στην επιβίωση των T θυμοκυττάρων στην περιφέρεια σε πολυκλωνικό σύστημα.*

Οι μειωμένοι αριθμοί των περιφερικών F5TNF<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T κυττάρων και η ελαττωμένη ικανότητά τους για επιβίωση σε πειράματα μεταμόσχευσης κυττάρων, μας οδήγησαν στο ερώτημα για το αν το φαινόμενο της μειωμένης ικανότητας για επιβίωση ισχύει και σε πολυκλωνικό σύστημα. Για να εξεταστεί αυτή η πιθανότητα, λήφθηκαν θύμοι από C57BL/10 και TNF<sup>-/-</sup> ποντίκια και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε C57BL/10 και TNF<sup>-/-</sup> αποδέκτες αντίστοιχα. Τα μεταφερμένα θυμοκύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τα ποσοστά των αδιαίρετων CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> υποπληθυσμών που επιβίωσαν. Όπως φαίνεται και στις εικόνες 2.A και 2.B, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά στο ποσοστό των θυμοκυττάρων που επιβίωσαν μεταξύ C57BL/10 και TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι στο γενετικό υπόβαθρο TNF<sup>-/-</sup> έχουν προεπιλεγεί οι κλώνοι των κυττάρων με μεγαλύτερη ικανότητα για επιβίωση. Αξίζει να προσθέσουμε ότι επειδή παρακολούθησαμε την πορεία των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρατηρήσαμε μικρό ποσοστό κυττάρων να έχουν κάνει τουλάχιστον μία διαίρεση σε όλες τις περιπτώσεις μετά την τρίτη εβδομάδα, γεγονός που ίσως αντικατοπτρίζει το **basal cycling** των παρθένων κυττάρων στην περιφέρεια των ζώων που έχει περιγραφεί (Jameson S, 2002).



	Donors:	Recipients:
▲	C57BL/10	C57BL/10
△	TNF <sup>-/-</sup>	TNF <sup>-/-</sup>

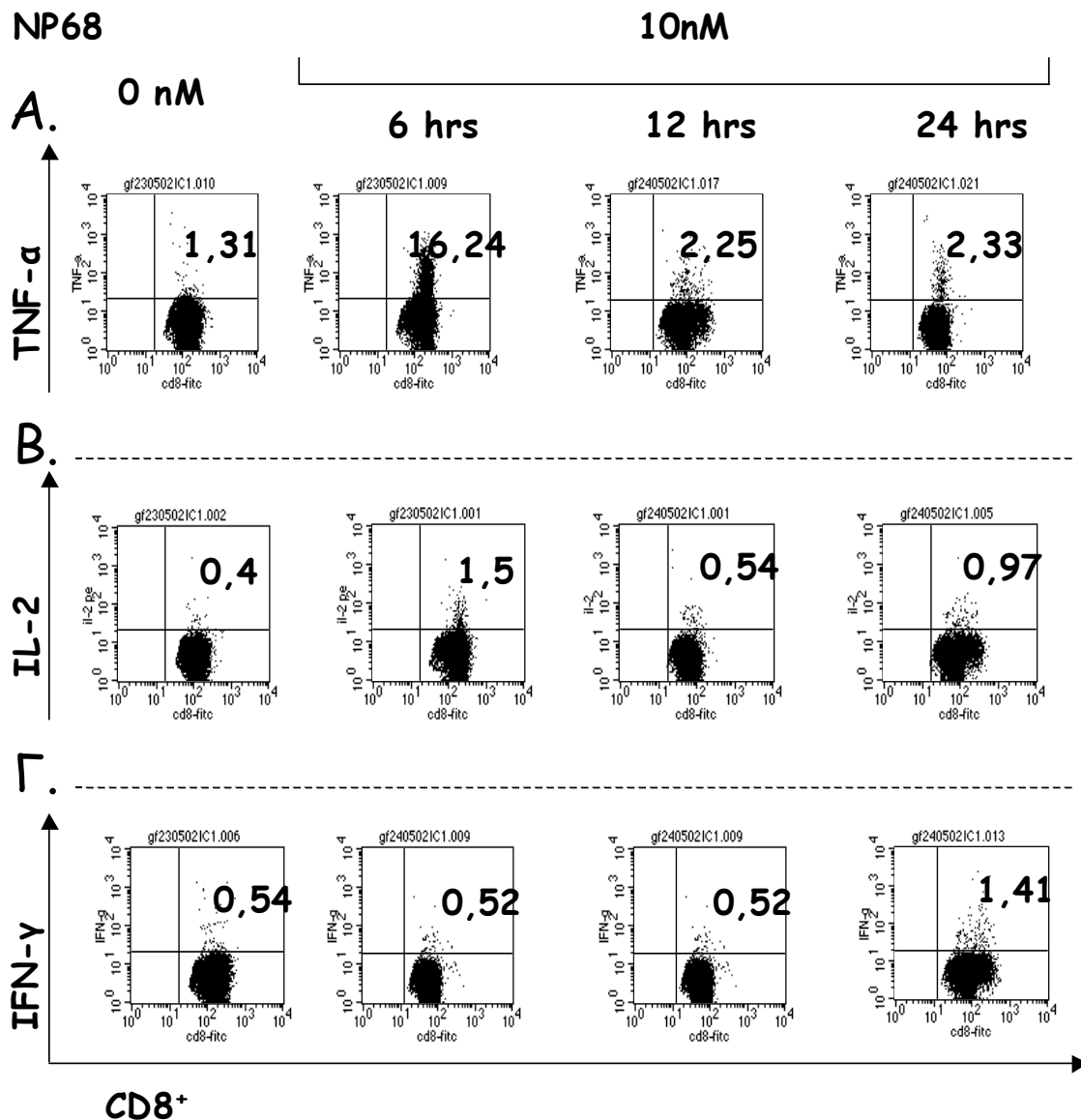
	Donors:	Recipients:
▲	C57BL/10	C57BL/10
△	TNF <sup>-/-</sup>	TNF <sup>-/-</sup>

**Εικόνα 2.** Η απουσία του ενδογενούς TNF δεν επιδρά στην ικανότητα επιβίωσης των T κυττάρων σε πολυκλωνικό σύστημα. Θυμοκύτταρα από ζώα αγρίου τύπου ή ελλειμματικά για τον TNF όταν μεταφέρονται ενδοφλέβια στην περιφέρεια ζώων αγρίου ή TNF<sup>-/-</sup> αντίστοιχα, δεν παρουσιάζουν διαφορές στην επιβίωση ούτε ως προς τα CD8<sup>+</sup> (A) ούτε ως προς τα CD4<sup>+</sup> (B). Απεικονίζεται το ποσοστό των αδιαίρετων κυττάρων.

3. Καθορισμένη χρονολογική σειρά έκφρασης των κυττοκινών TNF-α, IFN-γ και IL-2 κατόπιν ενεργοποίησης περιφερικών F5 κυττάρων.

Για να εξεταστεί κατά πόσο η ελαττωματική επιβίωση των παρθένων F5TNF<sup>-/-</sup> T κυττάρων συνοδεύεται και από μειωμένη ικανότητα για ενεργοποίηση και έκφραση κυττοκινών, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες μελέτες. Επειδή όμως δεν έχει μελετηθεί ξανά, δεν αναφέρεται τουλάχιστον στη βιβλιογραφία η χρονολογική σειρά της έκφρασης των κυττοκινών TNF-α, IFN-γ και IL-2 στο μοντέλο που θέλαμε να μελετήσουμε, σε πρώτη φάση ερευνήσαμε τη χρονολογική σειρά έκφρασης των κυττοκινών αυτών. Βρέθηκε ότι, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.A, η πρώτη κυτοκίνη που εκφράζεται μετά την ενεργοποίηση των

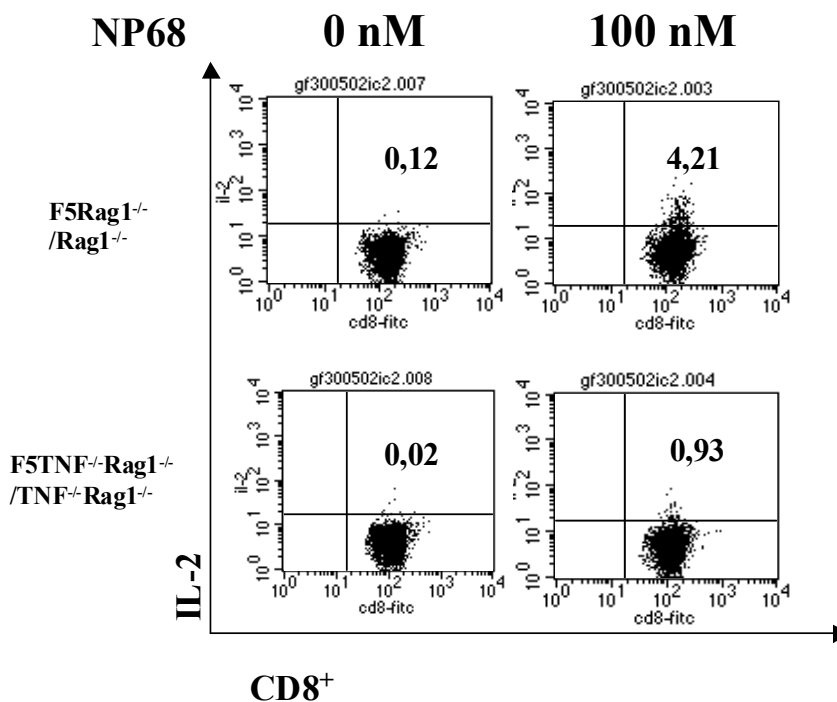
F5 είναι ο TNF- $\alpha$ , ο οποίος εκφράζεται σε ψηλά επίπεδα ήδη από τις 6 ώρες. Τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  είναι εμφανή σε πολύ χαμηλότερο βαθμό στις 12 και τις 24 ώρες γεγονός που υποδηλώνει ότι βρίσκεται στη φθίνουσα φάση. Η δεύτερη κυτοκίνη που εκφράζεται είναι η IL-2, με μέγιστη αλλά συνολικά χαμηλή έκφραση στις 12 ώρες, η οποία διατηρείται σχεδόν στα ίδια επίπεδα μέχρι τις 24 ώρες (εικόνα 3.B). Τέλος, η IFN- $\gamma$  αρχίζει να εκφράζεται από τις 12 ώρες για να φτάσει σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις 24 ώρες (εικόνα 3.Γ).



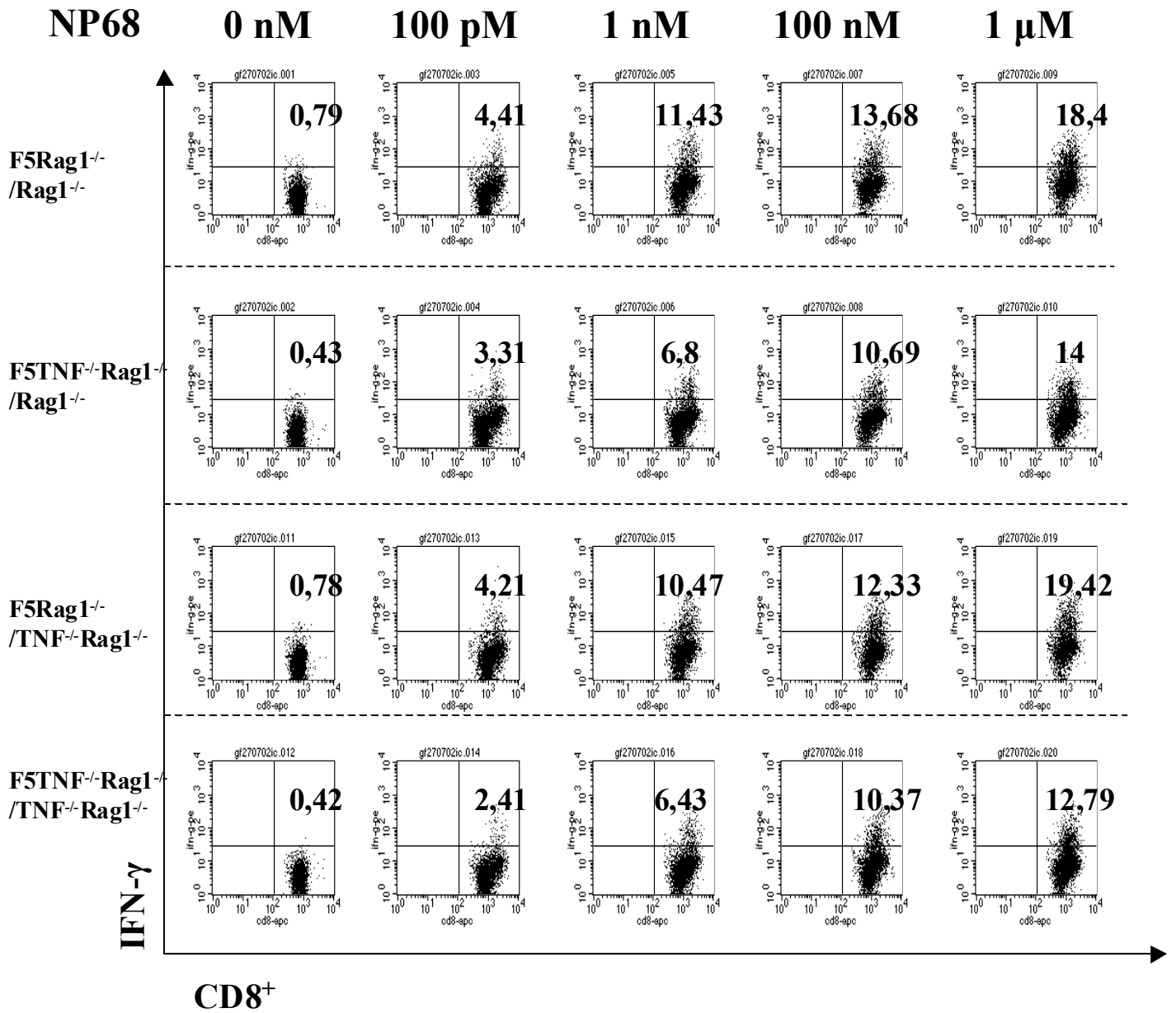
**Εικόνα 3.** Καθορισμένη σειρά έκφρασης των κυτοκινών TNF- $\alpha$ , IL-2 και IFN- $\gamma$  από τα F5 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση.  $10^6$  F5 σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτίδιο NP68 φορτωμένο σε  $3 \times 10^6$  ακτινοβολημένους C57BL/10 αντιγονοπαρουσιαστές. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για τις ώρες που αναγράφονται και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης των κυτοκινών στα CD8<sup>+</sup> κύτταρα.

4. Χαμηλότερο προφίλ έκφρασης της IFN- $\gamma$  και της IL-2 των F5TNF<sup>-/-</sup> T κυττάρων μετά από αντιγονική διέγερση, μία ιδιότητα που πιθανόν οφείλεται σε ελάττωμα του T κυττάρου.

Μετά την ταυτοποίηση της σειράς έκφρασης των κυτοκινών, όπως αναφέραμε, θέλαμε να συγκρίνουμε την ικανότητα παραγωγής κυτοκινών των F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5Rag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων κατόπιν ενεργοποίησης. Επιλέξαμε τη χρονική στιγμή που είχαμε την περισσότερη έκφραση της κάθε κυτοκίνης για τη συγκριτική μελέτη. Για αυτό F5Rag1<sup>-/-</sup> κ' F5Rag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup> T κύτταρα διεγέρθηκαν in vitro με το πεπτίδιο NP. Όπως φαίνεται στις εικόνες 4.1 και 4.3, απουσία ενδογενούς TNF τα F5Rag1<sup>-/-</sup> T κύτταρα εκφράζουν σαφώς χαμηλότερη IFN- $\gamma$  στις 24 ώρες και IL-2 στις 12 ώρες. Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης των κυτοκινών ανά κύτταρο μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων δεν είναι διαφορετικά. Ήδη γνωρίζουμε από πειράματα μέτρησης της ικανότητας πολλαπλασιασμού, των διαιρέσεων και των επιφανειακών μαρτύρων ενεργοποίησης όπως CD44, CD69 μετά από ενεργοποίηση, ότι επάγονται λιγότερο στα ενεργοποιημένα F5TNF<sup>-/-</sup> κύτταρα απ' ότι στα F5 T κύτταρα. Το γεγονός της μειωμένης έκφρασης IFN- $\gamma$  και IL-2 προσθέτει πληροφορίες για το μηχανισμό μείωσης του δραστικού φαινοτύπου των F5TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων.

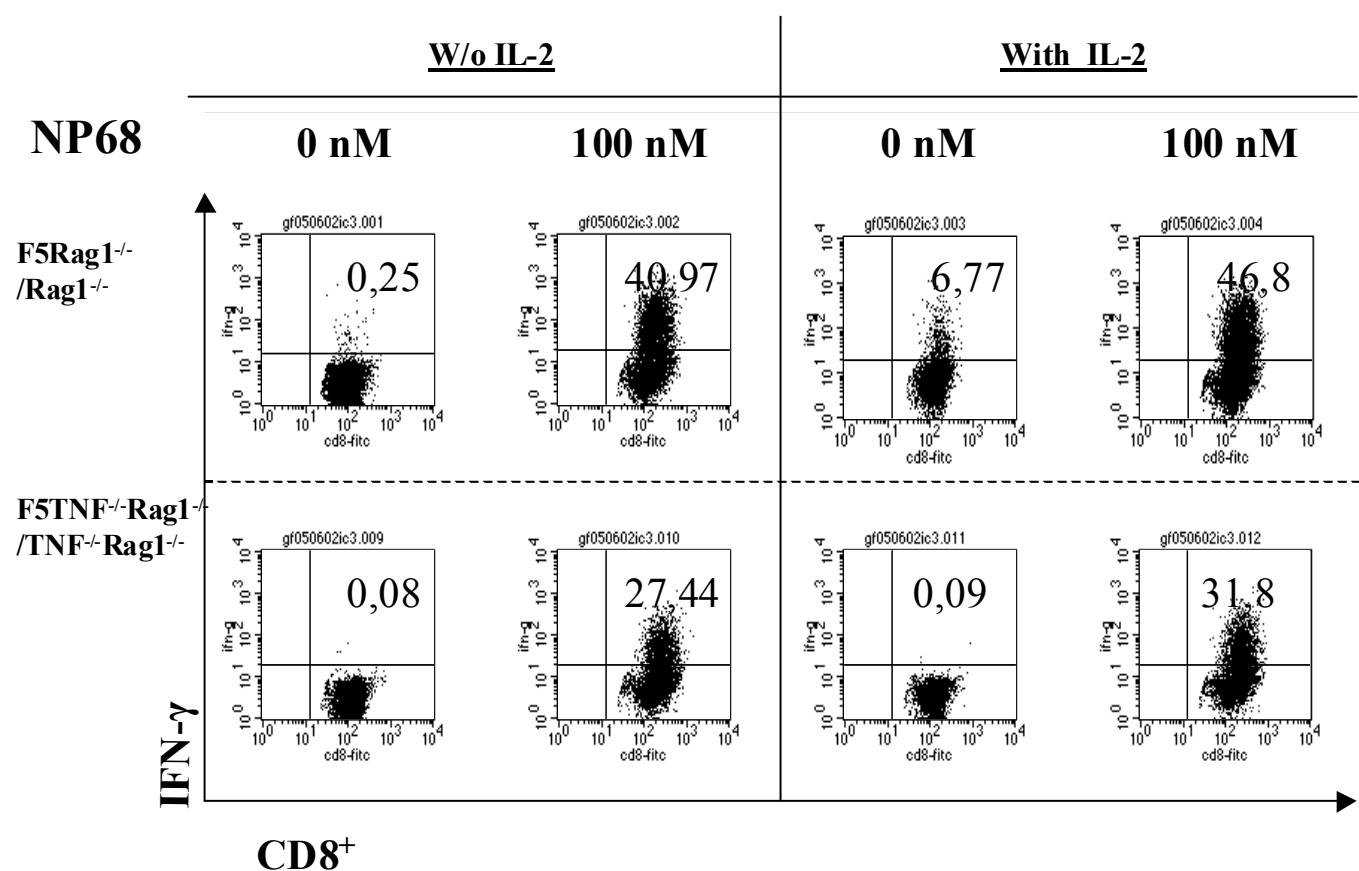


**Εικόνα 4.3.** Η απουσία του ενδογενούς TNF μειώνει την ικανότητα των F5 κυττάρων να παράγουν IL-2 μετά από ενεργοποίηση. F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτίδιο NP68 φορτωμένο σε Rag1<sup>-/-</sup> ή TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> αντιγονοπαρουσιαστές. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης της IL-2 στα CD8<sup>+</sup> κύτταρα.



**Εικόνα 4.1.** Η απουσία του ενδογενούς TNF μειώνει την ικανότητα των F5 κυττάρων να παράγουν IFN-γ μετά από ενεργοποίηση. F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτίδιο NP68 φορτωμένο σε Rag1<sup>-/-</sup> ή TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> αντιγονοπαρουσιαστές. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης της IFN-γ στα CD8<sup>+</sup> κύτταρα.

Μάλιστα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2, η προσθήκη εξωγενούς IL-2 δεν αποκατέστησε την παραγωγή ούτε της IFN- $\gamma$ , γεγονός που σημαίνει ότι το συνολικό φαινόμενο που έχει περιγραφεί της μειωμένης ενεργοποίησης των F5TNF $^{-/-}$  κυττάρων δεν οφείλεται σε ελαττωματική παραγωγή IL-2. Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια είτε όταν χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγονοπαρουσιαστές Rag1 $^{-/-}$  είτε Rag1 $^{-/-}$  TNF $^{-/-}$  κύτταρα (εικόνα 4.1). Φαίνεται λοιπόν, ότι ο TNF που προέρχεται από τα T κύτταρα (διαλυτός ή μεμβρανικός) είναι αυτός που απαιτείται για την καλύτερη ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T κυττάρων.



**Εικόνα 4.2.** Η μείωση της ικανότητας των F5 κυττάρων να παράγουν IFN- $\gamma$  μετά από ενεργοποίηση απουσία ενδογενούς TNF δεν μπορεί να αντιστραφεί με την προσθήκη IL-2. F5Rag1 $^{-/-}$  και F5TNF $^{-/-}$ -Rag1 $^{-/-}$  σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτίδιο NP68 φορτωμένο σε Rag1 $^{-/-}$  και TNF $^{-/-}$ -Rag1 $^{-/-}$  αντιγονοπαρουσιαστές αντίστοιχα παρουσία ή απουσία IL-2. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης της IFN- $\gamma$  στα CD8 $^{+}$  κύτταρα.



5. Η ελαττωματική ανέργεια των διπλών διαγονιδιακών F5NP κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF συνοδεύεται από ικανότητα έκφρασης IFN- $\gamma$  αλλά όχι IL-2 κατόπιν διέγερσης.

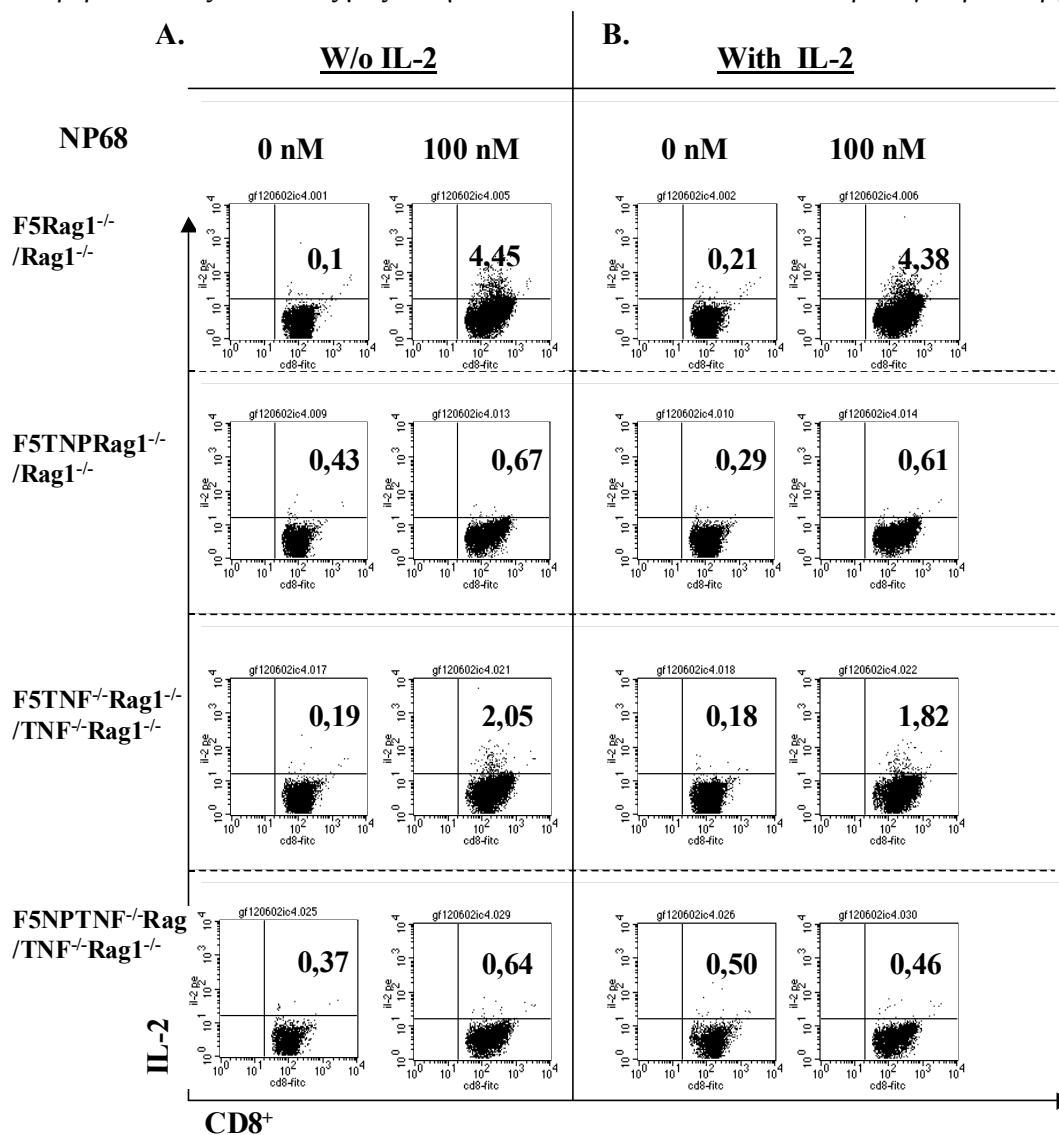
Τα αποτελέσματά μας μέχρι τώρα αποκάλυψαν ελαττώματα στην επιβίωση και τη λειτουργική παραγωγή των κυτοκινών IFN- $\gamma$  και IL-2 κατόπιν διέγερσης στα F5TNF<sup>-/-</sup> T κύτταρα. Όπως αναφέρουμε και στην εισαγωγή, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα όπως και πειράματα στο δικό μας σύστημα (Διδακτορικό Χατζιδάκη Ι.) που εμπλέκουν τον TNF με μειωμένη περιφερική ανοχή. Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στη διερεύνηση του μηχανισμού της εμπλοκής του ενδογενούς TNF στην περιφερική ανοχή των F5 T κυττάρων. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν κύτταρα από διπλά διαγονιδιακά F5NPRag1<sup>-/-</sup> ποντίκια -που αποτελούν μοντέλο περιφερικής ανοχής-, σε γενετικό υπόβαθρο TNF<sup>-/-</sup> ως προς την έκφραση των κυτοκινών IFN- $\gamma$  και IL-2 κατόπιν ενεργοποίησης.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.2, η παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα F5NPRag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup> T κύτταρα είναι σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι στα F5NPRag1<sup>-/-</sup>. Μετά λοιπόν από *in vitro* διέγερση με το NP πεπτίδιο τα F5 κύτταρα που προέρχονται από F5NPRag1<sup>-/-</sup> TNF<sup>-/-</sup> ζώα, μπορούν να παράγουν σε σημαντικό βαθμό IFN- $\gamma$ , ενώ αυτά που προέρχονται από τα F5NPRag1<sup>-/-</sup> παράγουν πολύ λίγο. Μάλιστα, συγκρίνοντας την έκφραση της IFN- $\gamma$  από τα F5NPRag1<sup>-/-</sup> TNF<sup>-/-</sup> κύτταρα μοιάζει σε σημαντικό βαθμό με τα F5Rag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup>. Επίσης, αξίζει να σημειώσουμε ότι υπάρχει πλήρης αναστροφή του άνεργου φαινοτύπου στα F5NPRag1<sup>-/-</sup> TNF<sup>-/-</sup> κύτταρα, αν κατά την ενεργοποίησή τους προστεθεί εξωγενώς ανασυνδυασμένη IL-2. Αντίθετα, η αναστροφή του άνεργου φαινοτύπου στα F5NPRag1<sup>-/-</sup> κύτταρα δε φτάνει σε αυτό το βαθμό με την προσθήκη IL-2. Αξίζει να σημειώσουμε, ότι οι διαφορές παρέμειναν -σε μικρότερο βαθμό- και όταν χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγονοπαρουσιαστές είτε Rag1<sup>-/-</sup> είτε TNF<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>, γεγονός που επιβεβαιώνει εν μέρει ότι η απουσία του TNF από το T κύτταρο οφείλεται για τις φαινοτυπικές διαφορές.

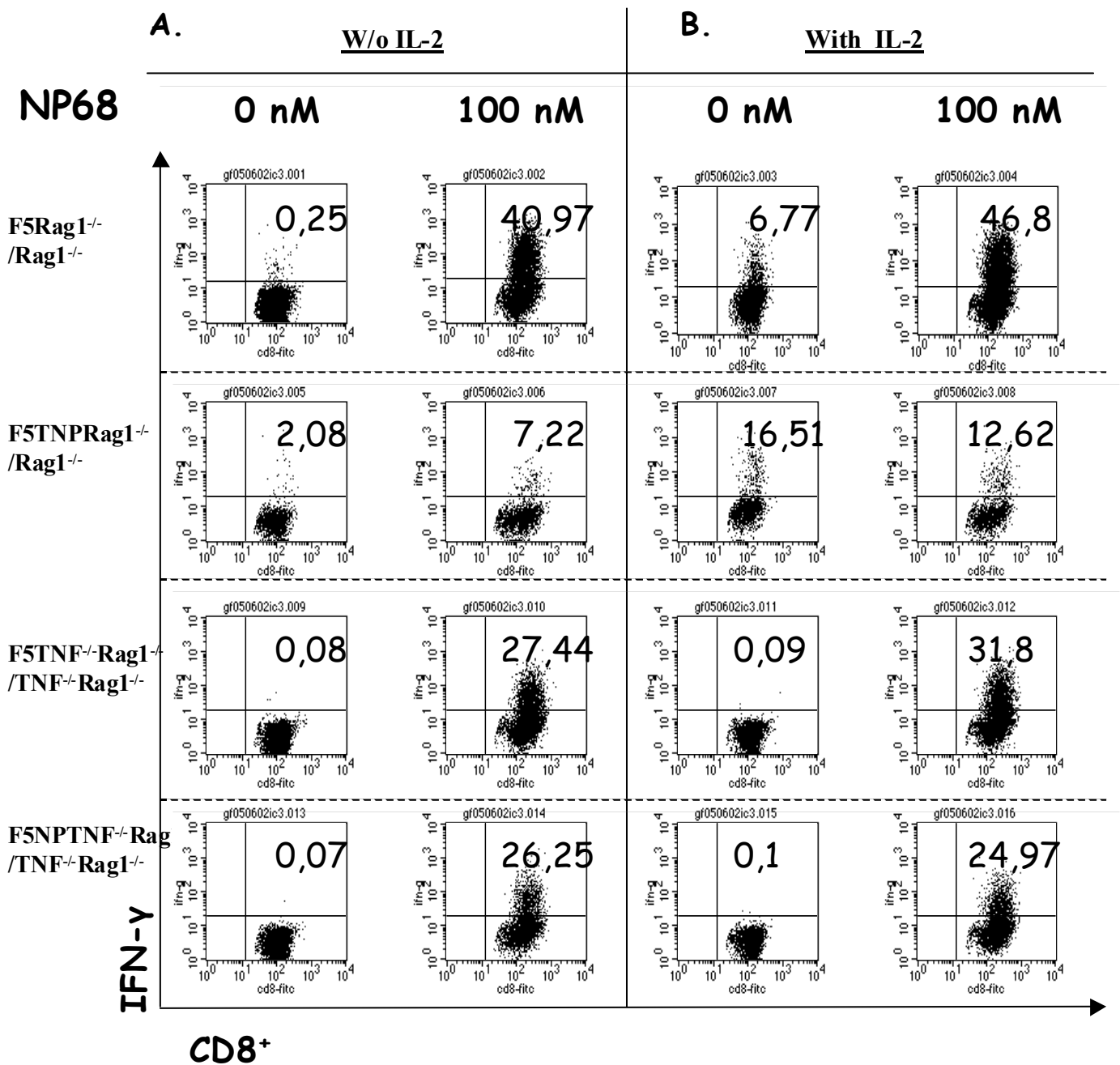
Ωστόσο, όσον αφορά την έκφραση της IL-2, ούτε στα F5NPRag1<sup>-/-</sup> κύτταρα ούτε στα F5NPRag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup> παρατηρήθηκε ουσιαστική αύξηση και κατά συνέπεια διαφορά στο επίπεδο έκφρασης. Μάλιστα, είτε παρουσία είτε απουσία εξωγενούς IL-2 και στους δύο γονοτύπους δεν εκφράστηκε καθόλου IL-2, κατόπιν *in vitro* διέγερσης (εικόνα 5.1). Το γεγονός αυτό πιθανόν σημαίνει ότι η αναστροφή του άνεργου φαινοτύπου στα F5NPRag1<sup>-/-</sup> TNF<sup>-/-</sup> κύτταρα έχει να κάνει μέσω άλλου μηχανισμού και όχι μέσω παραγωγής IL-2. Το τελευταίο χρήζει περαιτέρω επιβεβαίωσης.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως απουσία διέγερσης, τα F5NPRag1<sup>-/-</sup> και όχι άλλα κύτταρα εξέφραζαν χαμηλά επίπεδα IFN- $\gamma$  (εικόνα 5.2). Τα επίπεδα αυτά μάλιστα

αυξάνονταν με την προσθήκη εξωγενούς IL-2. Μία εξήγηση του φαινομένου αυτού θα ήταν η απόδοση της έκφρασης της IFN- $\gamma$  από νέα κύτταρα που μόλις έχουν μεταναστεύσει από το θύμο στην περιφέρεια και έχουν έρθει πρόσφατα σε επαφή με το ενδογενές αντιγόνο NP. Ωστόσο, in vitro πειράματα μέτρησης της εισαγωγής τριτωμένης θυμιδίνης σε F5NPRag1<sup>-/-</sup> κύτταρα κατόπιν ενεργοποίησης παρουσία ή απουσία IL-2 δεν έχουν δείξει την ύπαρξη δραστηριότητας από κάποια κύτταρα που πιθανόν έχουν μεταναστεύσει πρόσφατα στην περιφέρεια από το θύμο. Επομένως, η χαμηλή έκφραση της IFN- $\gamma$  από τα κύτταρα αυτά είναι μάλλον ένδειξη του άνεργου φαινοτύπου τους. Σημειώνουμε ότι η εικόνα της έκφρασης IFN- $\gamma$  από κύτταρα χωρίς πεπτιδίο στα F5NPRag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup> δεν είναι εμφανής, γεγονός που επιβεβαιώνει τις υποθέσεις μας ότι η απουσία του TNF κάνει τα κύτταρα λιγότερο άνεργα.



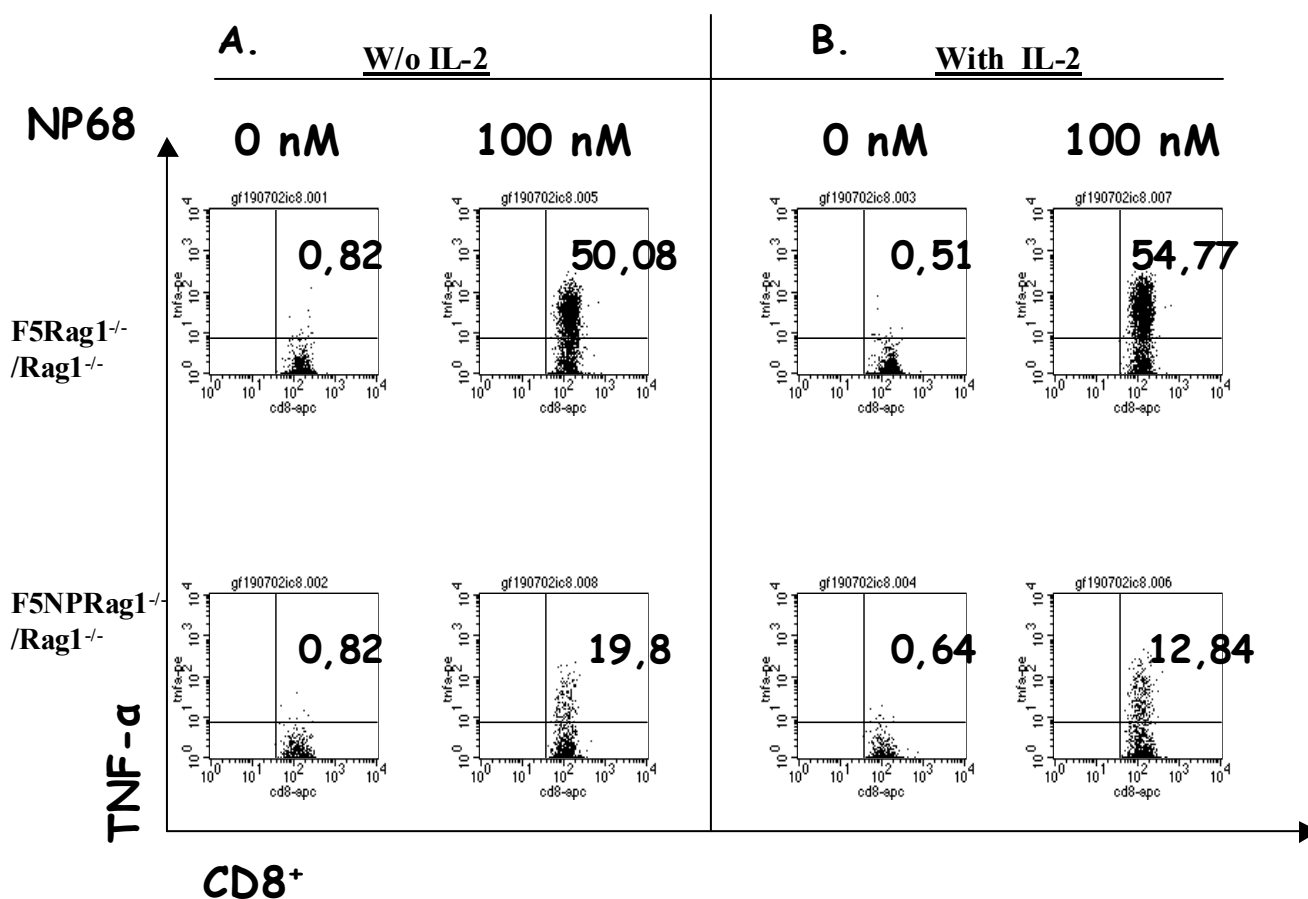
**Εικόνα 5.1.** Η ελαττωματική ανέργεια των διπλών διαγονιδιακών F5NP κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF δε συνοδεύεται από ικανότητα παραγωγής IL-2. F5Rag1<sup>-/-</sup>, F5NPRag1<sup>-/-</sup>, F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> και F5NPTNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτιδίο NP68 φορτωμένο σε Rag1<sup>-/-</sup> ή TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> αντιγονοπαρουσιαστές. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 12 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης της IFN- $\gamma$  στα CD8<sup>+</sup> κύτταρα.



**Εικόνα 5.2.** Η ελαττωματική ανέργεια των διπλών διαγονιδιακών F5NP κυττάρων απουσία ενδογενούς TNF συνοδεύεται από ικανότητα παραγωγής IFN- $\gamma$ . F5Rag1<sup>-/-</sup>, F5NPRag1<sup>-/-</sup>, F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> και F5NPTNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτίδιο NP68 φορτωμένο σε Rag1<sup>-/-</sup> ή TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> αντιγονοπαρουσιαστές. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης της IFN- $\gamma$  στα CD8<sup>+</sup> κύτταρα.

6. Η ανέργεια των F5NP κυττάρων μεταφράζεται και σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής TNF- $\alpha$  κατόπιν ενεργοποίησης.

Επιπλέον της μελέτης της εμπλοκής του TNF στην εγκαθίδρυση της περιφερικής ανοχής, θέλαμε να μελετήσουμε το μηχανισμό της ανοχής αποκλειστικά στο επίπεδο έκφρασης της κυτοκίνης TNF- $\alpha$ . Για το λόγο αυτό προκαλέσαμε in vitro διέγερση σε κύτταρα προερχόμενα από F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5NPRag1<sup>-/-</sup> και μετρήσαμε την έκφραση του TNF με ενδοκυττάρια σήμανση. Βρήκαμε ότι η έκφρασή του ήταν σε σημαντικά βαθμό μειωμένη και ότι η κατάσταση αυτή δεν μπόρεσε στα δύο τουλάχιστον πειράματα που πραγματοποιήσαμε να αναστραφεί παρουσία εξωγενούς IL-2 (εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Τα άνεργα F5 κύτταρα δεν παράγουν TNF- $\alpha$  μετά από ενεργοποίηση.

F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5NPRag1<sup>-/-</sup> σπληνοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν in vitro με πεπτίδιο NP68 φορτωμένο σε Rag1<sup>-/-</sup> αντιγονοπαρουσιαστές. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 4 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης της IL-2 στα CD8<sup>+</sup> κύτταρα.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιβίωση των T κυττάρων είναι ένα σύνολο μηχανισμών που διασφαλίζουν ότι οι ώριμοι επιλεγμένοι κλώνοι από το θύμο, θα παραμείνουν στην περιφέρεια του ζώου, έτοιμοι να προσφέρουν αποτελεσματική άμυνα σε πρόκληση του οργανισμού από ξένα αντιγόνα. Από την άλλη, η ενεργοποίηση των T κυττάρων ως απάντηση σε αντιγόνο είναι μία διαδικασία η οποία πρέπει να γίνει σύντομα και με συγκεκριμένη ένταση, προκειμένου να εξαιρεθεί ο κίνδυνος και να γυρίσει το σύστημα πάλι σε ομοιόσταση. Τα εν δυνάμει αυτοδραστικά T κύτταρα που ξεφεύγουν της κεντρικής ανοχής πρέπει μέσω άλλων μηχανισμών περιφερικής ανοχής να εξαιρεθούν ή να απενεργοποιηθούν προκειμένου να μην προκαλέσουν ανοσοαπάντηση στα αυτοαντιγόνα του οργανισμού που αναγνωρίζουν. Η μελέτη αυτών των μηχανισμών είναι αναγκαία για την κατανόηση της διατήρησης της ομοιόστασης τη περιφερικής δεξαμενής όπως και της διατήρησης της υγείας του οργανισμού.

Σε αυτήν την εργασία, χρησιμοποιώντας τα διαγονιδιακά για τον TCR F5 ποντίκια μελετήσαμε πώς ο ενδογενής TNF ρυθμίζει μία σειρά αποκρίσεων των T κυττάρων, όπως την επιβίωση, την ενεργοποίηση και την ανέργεια. Δείξαμε ότι απουσία TNF, η ικανότητα των T κυττάρων για επιβίωση είναι μειωμένη, όπως η ενεργοποίησή τους στο NP αντιγόνο. Επίσης, και η διατήρηση του ανέργου φαινοτύπου ήταν σε σημαντικό ελαττωματική. Τα στοιχεία μας προσέδωσαν στους νέους ρόλους του TNF που είχαν περιγραφεί (Διδακτορικό Χατζιδάκη Ι.) μία νέα μηχανιστική προσέγγιση.

Καταρχάς, μελετήθηκε η επιβίωση των παρθένων κυτταροτοξικών F5 T κυττάρων, μετά από ενδοφλέβια μεταφορά τους στην περιφέρεια ζώων αγρίου τύπου καθώς και F5TNF<sup>-/-</sup> στην περιφέρεια ζώων αγρίου τύπου ή ελλειμματικών ως προς την έκφραση του ενδογενούς TNF. Βρέθηκε ότι όταν F5 θυμοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε C57BL/10 επιζούσαν καλύτερα από τα αντίστοιχα F5TNF<sup>-/-</sup> με μεγάλη στατιστικά διαφορά στην ικανότητα για επιβίωση. Ωστόσο, όταν F5TNF<sup>-/-</sup> κύτταρα μεταφέρθηκαν στην περιφέρεια TNF<sup>-/-</sup> ζώων δεν κατάφεραν να επιβιώσουν περισσότερο από 10 μέρες μετά τη μεταφορά. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως απαίτηση των F5 κυττάρων να επιβιώνουν στην περιφέρεια με πλήρες TNF γενετικό υπόβαθρο. Αντίθετα, όταν περιφερικά λεμφοκύτταρα από F5 και F5TNF<sup>-/-</sup> δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους για επιβίωση στην περιφέρεια ζώων αγρίου τύπου δε βρέθηκαν αντίστοιχες διαφορές στην επιβίωση του πληθυσμού των αδιαίρετων κυττάρων. Το τελευταίο το τονίζουμε, διότι 3 από τα 5 ζώα της μεταφοράς F5 σε C57BL/10 εμφάνιζαν μεγάλο ποσοστό διαιρέσεων από πολύ νωρίς, γεγονός που μείωνε τον αριθμό των αδιαίρετων που εμείς μελετούσαμε, μια και δεν υπήρχε τρόπος μελέτης και των διαιρεμένων συνολικά.

Όταν F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5Rag1<sup>-/-</sup>TNF<sup>-/-</sup> κύτταρα μεταφέρθηκαν σε αποδέκτες C57BL/10, τα κύτταρα των δοτών χάθηκαν μέσα στις 13 μέρες μετά τη μεταφορά (εικόνα 1.Δ). Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία, ότι τα Rag1<sup>-/-</sup> κύτταρα έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι επιβίωσης και έντονες διαφορές στην ικανότητα για επιβίωση από κύτταρα που αναπτύσσονται σε Rag1<sup>+/+</sup> γενετικό υπόβαθρο. Δεν μπορούμε να πούμε ξεκάθαρα πού οφείλεται η εξαφάνιση των κυττάρων τόσο πρόωμα, αν οφείλεται δηλαδή σε ελάττωμα του Rag1<sup>-/-</sup> γενετικού υποβάθρου σε κάποιους άλλους παράγοντες κλπ.

Επειδή τα αποτελέσματά μας αντικατοπτρίζουν πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί μία φορά από 5-6 ζώα στο κάθε πείραμα, κρίνουμε σκόπιμο την επανάληψη κάποιων και τη διεξαγωγή νέων πειραμάτων όπου θα γίνεται ταυτόχρονη μεταφορά κυττάρων από F5 και F5TNF<sup>-/-</sup> ζώα σε αγρίου τύπου ή/και TNF<sup>-/-</sup>. Η μεθοδολογία που βασίζεται η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση απαιτεί τη σήμανση με διαφορετικές χρωστικές –πράσινη-CFSE και κόκκινη-SNARF- των F5 και F5TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων που πρόκειται να μεταφερθούν και μέτρηση της επιβίωσης του πληθυσμού των αδιαίρετων κυττάρων στον ίδιο οργανισμό -αποδέκτη. Επίσης, προτείνεται η ενδελεχής μελέτη της μεγάλης απώλειας των T κυττάρων που μεταφέρονται στις πρώτες 10 μέρες, η οποία έχει επαναληφθεί σε όλα τα πειράματα. Η πειραματική προσέγγιση που προτείνεται είναι η τακτική καθημερινή αιμοληψία και η παρακολούθηση των κυτταροεπιφανειακών μαρτύρων ενεργοποίησης.

Δείχθηκε ότι η TNF μεταλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένους αριθμούς περιφερικών F5 T κυττάρων. Όπως έχει περιγραφεί, η επιβίωση των παρθένων T κυττάρων εξαρτάται σημαντικά από την σηματοδότηση μέσω TCR μετά από αλληλεπίδρασή του με MHC μόρια που φέρουν πεπτίδια εαυτού και εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα (Freitas, 1999). Από την άλλη, αξιοσημείωτο είναι ότι κατά τη μεταφορά TNF<sup>-/-</sup> κυττάρων σε ποντίκια TNF<sup>-/-</sup> που δεν είναι διαγονιδιακά για έναν συγκεκριμένο υποδοχέα TCR δεν παρατηρήθηκε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης των μεταφερθέντων CD8<sup>+</sup> T κυττάρων σε σχέση με το κοντρόλ (C57BL/10 σε C57BL/10 ). Από δικές μας παρατηρήσεις και άλλων (Kim EY, 2001) έχει διατυπωθεί ένα μοντέλο ως προς τη δράση του TNF. Ο TNF επιδρά σηματοδότηση που εκπορεύεται από τον TCR μειώνοντάς τη, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένο χρόνο ζωής των παρθένων CD8<sup>+</sup> T κυττάρων και σε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων. Έτσι, μπορεί η επιβίωση των F5 T κυττάρων να εξαρτάται από την παρουσία του TNF κατά την ανάπτυξη τους και την παραμονή τους στην περιφέρεια, ενώ η επιβίωση κάποιων άλλων άλλων κλώνων που πιθανά έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για το σύμπλοκο πεπτίδιο εαυτού-MHC που αναγνωρίζουν όχι. Αυτή είναι μία υπόθεση, η οποία χρήζει περαιτέρω πειραματικής επιβεβαίωσης.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ώριμα παρθένα T κύτταρα διαιρούνται στην περιφέρεια μη λεμφοπενικών ζώων, μια διαδικασία που έχει περιγραφεί ως **basal cycling** (Jameson S, 2002). Σε όλα τα πειράματα κυτταρικής μεταφοράς που πραγματοποιήσαμε και

στα οποία τα T κύτταρα επιβίωσαν περισσότερο από 2,5 εβδομάδες, διαπιστώσαμε τουλάχιστον μία διαίρεση σε έναν μικρό υποπληθυσμό. Το γεγονός αυτό δεν έχει περιγραφεί ξανά σε αντίστοιχα πειράματα στη βιβλιογραφία και είναι ενδιαφέρουσα η εύρεση και η κατανόηση των παραγόντων που κατευθύνουν αυτή τη μικρού βαθμού κυτταρική διαίρεση απουσία αντιγονικού μηνύματος ή μηνύματος ομοιοστατικού πολλαπλασιασμού. Στα αποτελέσματα που συλλέξαμε από τα πειράματα της *in vivo* μελέτης της επιβίωσης των T κυττάρων δεν είναι ξεκάθαρο αν στα παραπάνω εμπλέκεται η διαλυτή, η μεμβρανική ή και οι δύο μορφές του TNF, και θα είχε ενδιαφέρον η πραγματοποίηση πειραμάτων στα οποία θα αντικαθιστόταν η έκφραση του TNF εξωγενώς, όπως παρουσία κυττάρων που τον εκφράζουν ή προσφέροντας ανασυνδυασμένη κυττοκίνη στο σύστημα.

Τα αποτελέσματά μας σε αυτήν την εργασία δείχνουν ότι F5Rag1<sup>-/-</sup> T κύτταρα από TNF<sup>-/-</sup> ζώα έχουν ελαττωματική απόκριση στο αντιγόνο όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης των κυττοκινών IFN- $\gamma$  και IL-2. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιγόνου οι διαφορές μεταξύ των F5 Rag1<sup>-/-</sup> και F5TNF<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup> κυττάρων εξομαλύνονται, αλλά δεν μπορούν να αντιστραφούν παρουσία εξωγενούς ανασυνδυασμένης IL-2. Δηλαδή, η απώλεια του ενδογενούς TNF ανεβάζει τον πήχη του μηνύματος που πρέπει να δεχτούν τα F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> κύτταρα προκειμένου να αποκριθούν ικανοποιητικά σε αντιγόνο. Στις *in vitro* μελέτες μας χρησιμοποιήθηκαν κυρίως Rag1<sup>-/-</sup> για την παρουσίαση του πεπτιδίου στα F5 Rag1<sup>-/-</sup> και TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> για την αντιγονοπαρουσίαση στα F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup>. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια αν και με μικρότερες διαφορές όταν χρησιμοποιούνταν αντίστροφα οι αντιγονοπαρουσιαστές. Το τελευταίο συνηγορεί στην υπόθεση που θέλει την έλλειψη του TNF κυρίως από το T κύτταρο να οφείλεται για την ελαττωματική αντιγονική του διέγερση. Έτσι, οι διαφορές που παρατηρούμε δεν οφείλονται σε επίδραση του TNF στα τάξης I MHC μόρια ή σε άλλα μόρια (συνδιεγερτικά) των APCs αν και χρειάζονται περισσότερη επιβεβαίωση.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα αποτελέσματα δεν επαναλήφθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (διαφορετική αναλογία APCs προς δραστικά κά.). Σε καμία περίπτωση όμως δεν είδαμε αναστροφή του φαινομένου, της έκφρασης δηλαδή μεγαλύτερου επιπέδου κυττοκινών από τα F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup>. Φαίνεται ότι το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> στο συνολικό πληθυσμό των κυττάρων στα πειράματα διέγερσης παίζει σημαντικό ρόλο, γιατί όταν μεταβάλλεται, η διαφορά μεταξύ των F5 Rag1<sup>-/-</sup> και των F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> μειώνεται. Από την άλλη, μπορεί να υπάρχει διαφορετική αντιπροσώπευση των διαφόρων κυτταρικών τύπων στα Rag1<sup>-/-</sup> και TNF<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup> σπληνοκύτταρα. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της διέγερσης στο επίπεδο έκφρασης κυττοκινών των T κυττάρων προερχόμενα από F5Rag1<sup>-/-</sup> και F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup>ζώα με a-CD3ε αντίσωμα, δηλαδή απουσία αντιγονοπαρουσιαστών κυττάρων. Ήδη έχει δρομολογηθεί αυτή η πορεία και φαίνεται ότι τα F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> κύτταρα έχουν χαμηλότερη έκφραση IFN- $\gamma$  από τα F5Rag1<sup>-/-</sup> μετά από ενεργοποίηση με ακινητοποιημένο a-CD3ε αντίσωμα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Δείξαμε σε αντίστοιχες μελέτες μέτρησης του επιπέδου έκφρασης των κυττοκινών στα διπλά διαγονιδιακά F5NP Rag1<sup>-/-</sup> ποντίκια ότι απουσία TNF ο άνεργος φαινότυπος των κυττάρων αναστρέφεται σχεδόν πλήρως κυρίως ως προς την έκφραση της IFN- $\gamma$  και όχι της IL-2. Τα F5 κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια των F5NPRag1<sup>-/-</sup> ζώων δεν μπορούν να εκφράσουν IFN- $\gamma$  και IL-2 σε δευτερογενή διέγερσή τους από το αντιγόνο *in vitro*. Αυτό δηλώνει ότι τα κύτταρα έχουν περιέλθει σε άνεργη κατάσταση. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις άνεργων T κυττάρων η προσθήκη IL-2 αναστρέφει την υποδραστικότητά τους, στην περίπτωση των F5NPRag1<sup>-/-</sup> αυτό συνέβει μόνο σε πολύ μικρό βαθμό.

Η έλλειψη του ενδογενούς TNF επηρέασε την ενεργοποίηση των F5NPTNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση της IFN- $\gamma$  σε επίπεδα παρόμοια με των F5TNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> κυττάρων. Έτσι λοιπόν, ο TNF μπορεί να επιδρά σε μονοπάτια διαφορετικά από εκείνα που έχουν περιγραφεί μέχρι πρόσφατα: της εγκαθίδρυσης περιφερικής ανοχής. Είναι χαρακτηριστικό σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ότι απουσία μηνύματος μόνο τα F5NPRag1<sup>-/-</sup> κύτταρα εξέφραζαν αν και σε πολύ χαμηλά επίπεδα IFN- $\gamma$ . Μάλιστα, η έκφραση IFN- $\gamma$  αυξήθηκε όταν στο σύστημα προσφέρθηκε εξωγενώς IL-2. Η έκφραση της IFN- $\gamma$  ίσως αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των άνεργων κυττάρων που έρχονται σε επαφή με το NP αυτοαντιγόνο στην περιφέρεια. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στα F5NPTNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> κύτταρα γεγονός που ίσως σημαίνει ότι έχουν μικρότερη ικανότητα να δεχτούν το σήμα από το αυτό-αντιγόνο προκειμένου να οδηγηθούν σε ανέργεια. Επειδή και σε αυτήν την περίπτωση δεν επαναλήφθηκαν πλήρως τα αποτελέσματα στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε πιθανόν για τους ίδιους λόγους, χρειάζονται και άλλες μελέτες για να καθοριστεί η δράση του TNF στις αποκρίσεις των CD8<sup>+</sup> T άνεργων κυττάρων, όπως με πειράματα ενεργοποίησης με ακινητοποιημένο αντίσωμα a-CD3ε.

Τα παρατιθέμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι η έλλειψη του TNF στα F5NPRag1<sup>-/-</sup> ποντίκια οδηγεί σε ελαττωματική περιφερική ανοχή των CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, τα F5NPTNF<sup>-/-</sup>Rag1<sup>-/-</sup> περιφερικά CD8<sup>+</sup> T κύτταρα αποκρίνονται σε υψηλό βαθμό σε επαναδιέγερσή τους με το αντιγόνο *in vitro* φτάνοντας στα επίπεδα των F5Rag1<sup>-/-</sup>. Συνεπώς, η περιφερική ανοχή των T κυττάρων είναι αλλοιωμένη απουσία του ενδογενούς TNF. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η περιφερική ανέργεια CD8<sup>+</sup> T κυττάρων είναι μειωμένη σε διαγονιδιακά για TCR TNFRI<sup>-/-</sup> ζώα. Από τα αποτελέσματά μας προτείνεται ότι ο ενδογενής TNF μπορεί να ρυθμίσει την ενεργότητα εν δυνάμει αυτοδραστικών T κυττάρων μειώνοντας την παραγωγή δραστικών κυττοκινών όπως της IFN- $\gamma$ . Η ιδιότητα αυτή του TNF φαίνεται να εξαρτάται από τα T κύτταρα και πιθανά από την επίδρασή τους στους αντιγονοπαρουσιαστές (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexander-Miller, M.A., M.A. Derby, A. Sarin, P.A. Henkart, and J.A. Berzofsky. 1998. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II- mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, no. 8:1391.
2. Ashkenazi, A., and V.M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, no. 5381:1305.
3. Balkwill, F., B. Foxwell, and F. Brennan. 2000. TNF is here to stay! *Immunol Today* 21, no. 10:470.
4. Barbara, J.A., X. Van ostade, and A. Lopez. 1996. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol* 74, no. 5:434.
5. Baxter, G.T., R.C. Kuo, O.J. Jupp, P. Vandenabeele, and D.J. MacEwan. 1999. Tumor necrosis factor-alpha mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem* 274, no. 14:9539.
6. Boone, E., V. Vandevoorde, G. De Wilde, and G. Haegeman. 1998. Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and p38 MAPK by tumor necrosis factor (TNF) is mediated through the death domain of the 55-kDa TNF receptor. *FEBS Lett* 441, no. 2:275.
7. Cantrell, DA. 2001. Transgenic analysis of thymocytes signal transduction. *Nat Rev Immunol* 1, no. 1:20.
8. Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, no. 9:3666.
9. Chan, K.F., M.R. Siegel, and J.M. Lenardo. 2000. Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity* 13, no. 4:419.
10. Chu, Z.L., T.A. McKinsey, L. Liu, J.J. Gentry, M.H. Malim, and D.W. Ballard. 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, no. 19:10057.
11. Clements, J.L., N.J. Boerth, J.R. Lee, and G.A. Koretzky. 1999. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 17:89.
12. Cope, A.P., R.S. Liblau, X.D. Yang, M. Congia, C. Laudanna, R.D. Schreiber, L. Probert, G. Kollias, and H.O. McDevitt. 1997. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med* 185, no. 9:1573.

13. Di Renzo, M., D. Serrano, Z. Zhou, I. George, K. Becker, and C. Cunningham-Rundles. 2001. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol* 125, no. 1:117.
14. Dorfman, J.R., I. Stefanova, K. Yasutomo, and R.N. Germain. 2000. CD4+ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat Immunol* 1, no. 4:329.
15. Douni, E., K. Akassoglou, L. Alexopoulou, S. Georgopoulos, S. Haralambous, S. Hill, G. Kassiotis, D. Kontoyiannis, M. Pasparakis, D. Plows, L. Probert, and G. Kollias. 1995. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 47, no. 1-2:27.
16. Dubois, P.M., M. Pihlgren, M. Tomkowiak, M. Van Mechelen, and J. Marvel. 1998. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 161, no. 10:5260.
17. Erickson, S.L., F.J. de Sauvage, K. Kikly, K. Carver-Moore, S. Pitts-Meek, N. Gillett, K.C. Sheehan, R.D. Schreiber, D.V. Goeddel, and M.W. Moore. 1994. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372, no. 6506:560.
18. Freitas, A.A., and B. Rocha. 1999. Peripheral T cell survival. *Curr Opin Immunol* 11, no. 2:152.
19. Goldrath, A.W., and M.J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, no. 6759:255.
20. Green EA, Flavell RA. 2000. The temporal importance of TNFalpha expression in the development of diabetes. *Immunity*. 12(5):459-69.
21. Heller, R.A., and M. Kronke. 1994. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 126, no. 1:5.
22. Jameson S, 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature Rev Immunol*. 2:547.
23. Janeway C. et al, 2001. *Immunobiology*. Garland Publishing.
24. Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker. 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, no. 6212:225.
25. Kassiotis, G., and G. Kollias. 2001. TNF and receptors in organ-specific autoimmune disease: multi-layered functioning mirrored in animal models. *J Clin Invest* 107, no. 12:1507.
26. Kassiotis, G., and G. Kollias. 2001. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193, no. 4:427.

27. Kassiotis, G., K. Kranidioti, and G. Kollias. 2001. Defective CD4T cell priming and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in TNF-deficient mice due to innate immune hypo-responsiveness. *J Neuroimmunol* 119, no. 2:239.
28. Kearney, E.R., K.A. Pape, D.Y. Loh, and M.K. Jenkins. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1, no. 4:327.
29. Kim, E.Y., and H.S. Teh. 2001. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol* 167, no. 12:6812.
30. Kollias, G., D. Kontoyiannis, E. Douni, and G. Kassiotis. 2002. The role of TNF/TNFR in organ-specific and systemic autoimmunity: implications for the design of optimized 'anti-TNF' therapies. *Curr Dir Autoimmun* 5:30.
31. Kollias, G., E. Douni, G. Kassiotis, and D. Kontoyiannis. 1999. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 169:175.
32. Kollias, G., E. Douni, G. Kassiotis, and D. Kontoyiannis. 1999. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1:I32.
33. Koretzky, G.A., Myung, P.S. 2001. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 1, no. 1:95.
34. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, no. 5466:675.
35. Mamalaki C, Elliott J, Norton T, Yannoutsos N, Townsend AR, Chandler P, Simpson E, Kioussis D. 1993. Positive and negative selection in transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for influenza nucleoprotein and endogenous superantigen. *Dev Immunol* 3(3):159-74.
36. Mamalaki C, Norton T, Tanaka Y, Townsend AR, Chandler P, Simpson E, Kioussis D. 1992. Thymic depletion and peripheral activation of class I major histocompatibility complex-restricted T cells by soluble peptide in T-cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec ;89(23):11342-6.
37. Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N.A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M.B. Lutz. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195, no. 1:15.
38. Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, no. 5443:1377.

39. O'Shea, J.J., Ma, A., Lipsky, P. 2001. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, no. 2:37.
40. Probert, L., K. Akassoglou, M. Pasparakis, G. Kontogeorgos, and G. Kollias. 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, no. 24:11294.
41. Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251, no. 4998:1225.
42. Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, no. 5:426.
43. Sreaton, G., and X.N. Xu. 2000. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol* 12, no. 3:316.
44. Seddon, B., G. Legname, P. Tomlinson, and R. Zamoyska. 2000. Long-term survival but impaired homeostatic proliferation of Naive T cells in the absence of p56lck. *Science* 290, no. 5489:127.
45. Spanopoulou, E., C.A. Roman, L.M. Corcoran, M.S. Schlissel, D.P. Silver, D. Nemazee, M.C. Nussenzweig, S.A. Shinton, R.R. Hardy, and D. Baltimore. 1994. Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice. *Genes Dev* 8, no. 9:1030.
46. Takeda, S., H.R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, no. 3:217.
47. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *Eur J Immunol* 25, no. 8:2127.
48. Tanchot, C., F.A. Lemonnier, B. Perarnau, A.A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, no. 5321:2057.
49. Tanchot, C., H.V. Fernandes, and B. Rocha. 2000. The organization of mature T-cell pools. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, no. 1395:323.
50. Tanchot, C., M.M. Rosado, F. Agenes, A.A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* 9, no. 6:331.
51. Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1, no. 1:47.

52. Walker L, Abbas A, 2002, The enemy within: keeping self-reactive cells at bay in the periphery. *Nature Reviews Immunology*.2, 11-19.
53. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, no. 5:591.
54. Χατζιδάκης Ι. Διδακτορική Διατριβή, 2002.