



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

**ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΚΑΙ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ ΣΤΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ: Τ ΚΥΤΤΑΡΟΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
ΤΩΝ IFN-Ι ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ
ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ**

ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ ΚΑΒΡΟΧΩΡΙΑΝΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΚΑΙ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ ΣΤΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ: Τ ΚΥΤΤΑΡΟΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
ΤΩΝ IFN-Ι ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ
ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ

ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ ΚΑΒΡΟΧΩΡΙΑΝΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ

ΤΜΗΜΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

ΟΜΑΔΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα 08-10-2010

.....
Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451-10
ΤΗΛ: (26510) 97265, 97277, 97294
FAX: (26510) 97064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Α.ΥΦΑΝΤΗ

Β Ε Β Α Ι Ω Σ Η

Βεβαιώνεται ότι η κ. **Αρχοντούλα Καβροχωριανού** του **Νικολάου**, με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών (Συνεδρία αριθμ. . 104/05-02-2008), έχει γίνει δεκτή για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, σύμφωνα με τα οριζόμενα στον Κανονισμό Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος.

Βεβαιώνεται ακόμη ότι:

Με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος (Συνεδρία αριθμ. 120/26-09-2008):

α) ορίσθηκε στην κ. Αρχοντούλα Καβροχωριανού Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή, αποτελούμενη από τους:

1. Γεώργιο Θυφρονίτη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέποντα
2. Σύλβα Χαραλάμπους, Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Μέλος.
3. Ουρανία Τσιτσιλώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος.

β) ορίσθηκε το ακόλουθο θέμα για τη διδακτορική της διατριβή:

«Βιολογικές δράσεις κυτταροκινών και ιντερφερονών στην λειτουργία των Τ λεμφοκυττάρων».

Η χρονική διάρκεια για το Διδακτορικό Δίπλωμα δεν μπορεί να υπερβαίνει τα δώδεκα (12) εξάμηνα και δεν μπορεί να διαρκέσει λιγότερο από έξι (6) εξάμηνα.

Η βεβαίωση αυτή χορηγείται στην ενδιαφερόμενη για κάθε νόμιμη χρήση.

Με εντολή της Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος



ΑΝΝΑ ΥΦΑΝΤΗ

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336, 7294
FAX: (26510) 07064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή
e-mail: grambet@cc.uoi.gr

Ιωάννινα, 22 Ιανουαρίου 2015
Αριθμ. Πρωτ.: 323

Προς τους κ.κ. :

1. **Γεώργιο Θυφρονίτη**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Πηγή Λυμπερή**, Ερευνήτρια Α', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
3. **Θεολόγο Μιχαηλίδη**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. **Αθανασία Μουζάκη**, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
5. **Ελένη Ντούνη**, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιοτεχνολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
6. **Ουρανία Τσιτσιλώνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ
7. **Σύλβα Χαραλάμπους**, Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Θέμα: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κας. Αρχοντούλας Καβροχωριανού»

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 222/16-01-2015, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε η κ. Αρχοντούλα Καβροχωριανού με τίτλο «Βιολογικές δράσεις κυτταροκινών και ιντερφερονών στη λειτουργία των T λεμφοκυττάρων».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται ο Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος κος Γεώργιος Θυφρονίτης.

Κοινοποίηση :
κα. Αρχοντούλα Καβροχωριανού

Με εντολή Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος



ANNA YFANTH

Ημερομηνία ορισμού έναρξης της εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής της
Βιολόγου Καβροχωριανού Αρχοντούλας από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 104/ 05-02-2008

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 120/26-09-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

-Δρ. Θυφρονίτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

-Δρ. Χαραλάμπους Σύλβα, Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

-Δρ. Τσιτσιλώνη Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 120/26-09-2008

Θέμα: «Βιολογικές δράσεις κυτταροκινών και ιντερφερονών στη λειτουργία των Τ λεμφοκυττάρων».

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 222/16-01-2015

1. Δρ. Θυφρονίτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Πρόεδρος της Επιτροπής

2. Δρ. Χαραλάμπους Σύλβα, Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Μέλος.

3. Δρ. Τσιτσιλώνη Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Μέλος.

4. Δρ. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.

5. Δρ. Λυμπέρη Πηγή, Ερευνήτρια Α', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Μέλος.

6. Δρ. Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Πατρών, Μέλος.

7. Δρ. Ντούνη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΔΕΚΑ» στις 19-03-2015

Η Πρόεδρος του Τμήματος
Θεώνη Τράγκα

Η Γραμματέας του Τμήματος
Άννα Υφαντή

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Διαγονιδιακής Τεχνολογίας από την Ομάδα Φλεγμονής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ) σε συνεργασία με το τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιου και την άμεση καθοδήγηση της υπεύθυνης του εργαστηρίου Δρ. Χαραλάμπους Σύλβας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Θυφρονίτη Γεώργιο, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να πραγματοποιήσω τη διατριβή αυτή στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Ιωαννίνων. Η ενεργός συμμετοχή του σε όλη τη διάρκεια της διατριβής, η καθοδήγηση για τη συγγραφή του κειμένου, καθώς και οι συμβουλές του σχετικά με την πορεία και τη σημασία της μελέτης, υπήρξαν καθοριστικές για την ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στη Δρ. Χαραλάμπους Σύλβα, που μου υπέδειξε και μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο θέμα μελέτης. Η συνεργασία μαζί της αποτέλεσε μία πηγή γνώσεων και εμπάθυνας στο γραπτό και προφορικό επιστημονικό μου λόγο. Επίσης, η επίβλεψη και η πολύτιμη υποστήριξη που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκειά της εκπόνησης της διατριβής με βοήθησε στην επιτυχή ολοκλήρωση της. Πέρα όμως από το επιστημονικό σκέλος, οι συμβουλές της και οι καθοδηγήσεις για τη ζωή είναι ανεκτίμητα εφόδια που θα κουβαλάω για πάντα.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Αθηνών, Τσιτσιλώνη Ουρανία, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής μου, για τη συνολική υποστήριξη στη πρόοδο της διατριβής μου μέχρι και την τελική παρουσίαση.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα νυν μέλη του Εργαστηρίου Διαγονιδιακής Τεχνολογίας, Ιωάννη Γρίβα, Μελίνα Μαρκογιαννάκη, Ελένη Μαλακτάρη και Φώτη Μπαντούνα, καθώς και τα πρώην μέλη Σταυρούλα Αλεξοπούλου και Αφροδίτη Κατούνα, για την άριστη συνεργασία, την αμοιβαιότητα και τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας. Ακόμη, ευχαριστώ όλα τα μέλη που πέρασαν από το Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής

του ΕΙΠ, Δρ Έρα Ταουφίκ, Δρ Μαρία Ευαγγελίδου, Δρ Βασιλική Κυραργύρη και Μαρία Καραμίτα. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στα μέλη του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του ΕΙΠ, Βαγιωνά Άγγελο, Βλαχογιάννη Νίκο, Κάρλες Αριάδνη και Λάππα Αργυρώ, και φυσικά στην υπεύθυνη κτηνίατρο Δρ Φραγκιαδάκη Ειρήνη, για την άψογη φροντίδα των ζώων εργαστηρίου και τη συνεργασία μας.

Δε θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην υποστήριξη των αδελφικών φίλων μου Βάσω, Βάλια, Δήμητρα, Δημήτρη, Παναγιώτη, Χρήστο, και Νίκο, οι οποίοι μου έδιναν δύναμη σε κάθε δύσκολη στιγμή.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφο της ζωής μου Αντώνη, για την πραγματικά τεράστια ψυχολογική υποστήριξη και την αισιοδοξία που πάντα μου προσέδιδε.

Ευχαριστώ πολύ την αδερφή μου Έλενα για το κουράγιο και την ηθική υποστήριξη. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τα θερμότερα ευχαριστώ στη μητέρα μου, Σοφία, η οποία στάθηκε δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού, παρά τις μεγάλες δυσκολίες που αντιμετώπισε η οικογένειά μου το τελευταίο διάστημα. Με τη διατριβή αυτή τιμώ τη μνήμη του πατέρα μου, Νικολάου Καβροχωριανού, ο οποίος ήταν πάντα στο πλευρό μου σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, και ο οποίος έφυγε για το πιο μακρύ ταξίδι λίγους μήνες πριν την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

*“Δεν υπάρχουν ιδέες,
υπάρχουν μονάχα άνθρωποι που κουβαλούν τις ιδέες,
κι αυτές παίρνουν το μπόι του ανθρώπου που τις κουβαλάει.”*

N. Καζαντζάκης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	17
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	19
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
Κεφάλαιο 1: Το ανοσοποιητικό σύστημα	21
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	21
1.2 Φυσική ανοσία	22
1.3 Επίκτητη ανοσία.....	22
1.3.1 Χυμική ανοσία.....	23
1.3.2 Κυτταρική ανοσία	24
1.3.3 Στάδια της επίκτητης ανοσίας	25
1.4 Ο ρόλος των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων: αποκρίσεις τύπου Th1, Th2 και Th17	27
1.5 Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα και ο ρόλος τους στην επίκτητη ανοσία	29
1.6 Κυτταροκίνες και χημειοκίνες	30
1.7 Μετανάστευση T λεμφοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής.....	31
1.8 Ανοχή και αυτοανοσία	33
Κεφάλαιο 2. Το νευρικό σύστημα	35
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά	35
2.2 Ο νευρώνας.....	35
2.3 Τα νευρογλοιακά κύτταρα	36
2.4 Ο εγκέφαλος.....	37
2.5 Ο νωτιαίος μυελός.....	37
2.6 Συνομιλία μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος.....	38
Κεφάλαιο 3: Σκλήρυνση κατά πλάκας	41
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου.....	41
3.1.1 Μορφές σκλήρυνσης κατά πλάκας.....	42
3.1.2 Στάδια και μοριακός μηχανισμός στην ΣΚΠ	42
3.2 Πειραματικά ζωικά πρότυπα της ΣΚΠ.....	46
3.2.1 Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)	47
3.2.2 Μορφές και αξιολόγηση της ΠΑΕ.....	49
3.3 Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την ΣΚΠ.....	50
Κεφάλαιο 4. Η βιολογία και ο ρόλος των ιντερφερονών (IFN)	53
4.1 IFNs και IFNRs.....	53
4.2 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος των IFN-I.....	54

4.2.1 Ρύθμιση μονοπατιού IFN-I.....	56
4.3 Συνομιλία ιντερφερονών τύπου I και II.....	58
4.4 Οι δράσεις των IFN-I.....	60
4.5 Ο φυσιολογικός ρόλος των IFN-I στη βιολογία των T λεμφοκυττάρων.....	61
4.6 Ο ρόλος των IFN-I σε παθολογικές καταστάσεις.....	64
4.7 Ο ρόλος της IFN-β στη ΣΚΠ και την ΠΑΕ.....	66
Κεφάλαιο 5: Διαγονιδιακά συστήματα για <i>in vivo</i> μελέτες	71
5.1 Διαγονιδιακά <i>in vivo</i> συστήματα.....	71
5.2 Διαγονιδιακά συστήματα μελέτης του <i>in vivo</i> ρόλου της σηματοδότησης των IFN-I.....	73
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	75
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	77
1. Αναλώσιμα.....	77
2. Διαλύματα.....	77
3. Μηχανήματα.....	80
4. Ζώα εργαστηρίου.....	80
4.1 Διαδικασίες ηθικής διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου.....	82
5. Βήματα δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων.....	83
5.1 Απομόνωση DNA από βιοψίες ουρών ποντικών.....	88
5.2 Ανίχνευση διαγονιδίου με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	88
5.2.1 Συμβατική τεχνική PCR (regular PCR).....	88
5.2.2 Παρασκευή γέλης αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση.....	89
5.2.3 Ποσοτική ανάλυση DNA (Real Time PCR, qPCR).....	90
6. Απομόνωση και ανάλυση mRNA.....	90
6.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	91
6.2 Ποιοτική ανάλυση mRNA (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR).....	91
6.3 Ποσοτική ανάλυση mRNA (Real Time RT-PCR, qRT-PCR).....	91
7. Ανίχνευση της έκφρασης πρωτεϊνών.....	91
7.1 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	92
7.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	92
7.1.2 Ανίχνευση πρωτεΐνης σε μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης.....	93
7.2 Κυτταρομετρία ροής.....	93
7.2.1 Προσδιορισμός κυτταρικών πληθυσμών.....	94
7.2.2 Προσδιορισμός εκκρινόμενων κυτταροκινών.....	95
8. Πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες.....	96
8.1 Απομόνωση λεμφικών οργάνων και κυττάρων.....	97

8.2 Πολυκλωνική και αντιγονοειδική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και εκτίμηση του πολλαπλασιασμού τους	97
8.3 Διαφοροποίηση παρθένων T λεμφοκυττάρων	98
9. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το νωτιαίο μυελό	99
10. Απομόνωση λευκοκυττάρων του αίματος.....	99
11. Επαγωγή πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), αξιολόγηση και χορήγηση ανασυνδυασμένης IFN-β.....	100
12. Ιστοπαθολογική ανάλυση.....	101
13. Ανάλυση μικροσυστοιχειών cDNA (cDNA microarray analysis).....	102
14. Στατιστική ανάλυση.....	103
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	105
Μέρος 1. Δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν τον IFNAR αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα	105
1.1 Δημιουργία και ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών	105
1.2 Ανάλυση των διπλά διαγονιδιακών σειρών σε επίπεδο λειτουργικής έκφρασης του διαγονιδίου, και λειτουργικότητας των T λεμφοκυττάρων μετά από διέγερσή τους.....	107
1.2.1 Έλεγχος της ιστοειδικής έκφρασης της IFNAR1 σε επίπεδο RNA	107
1.2.2 Έλεγχος της λειτουργικής έκφρασης της IFNAR1 σε επίπεδο πρωτεΐνης	109
1.2.2.1 Έλεγχος σε ιστούς.....	109
1.2.2.2 Έλεγχος σε T λεμφοκύτταρα.....	110
1.2.2.3 Έλεγχος του pSTAT1 ως δείκτη σηματοδότησης μέσω IFN-α/β-IFNAR.....	113
1.2.2.4 Έλεγχος της κυτταροειδικής έκφρασης του pSTAT1 σε λεμφικούς και μη ιστούς από τις διαγονιδιακές σειρές.....	114
1.2.3 Έλεγχος παραγωγής του ISG15, χαρακτηριστικού γονιδιακού προϊόντος του μονοπατιού των IFN-I	118
1.2.4 Άμεσος προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα των διαγονιδιακών ζώων	119
1.2.4.1 Έλεγχος σε μεταγραφικό επίπεδο	119
1.2.4.2 Έλεγχος σε μεταφραστικό επίπεδο.....	119
1.2.5 Έλεγχος της δομής του σπλήνα και το ποσοστό των T κυτταρικών υποπληθυσμών στα δευτερογενή λεμφικά όργανα	122
1.2.6 Έλεγχος της λειτουργικότητας των διαγονιδιακών T λεμφοκυττάρων	123
1.2.6.1 Μέτρηση πολλαπλασιασμού έναντι πολυκλωνικής διέγερσης	123
1.2.6.2 Μέτρηση πολλαπλασιασμού έναντι ειδικού MOG πεπτιδίου.....	124
1.2.6.3 Μέτρηση παραγωγής κυτταροκινών μετά από διέγερση του TCR.....	125

1.2.6.4 Έλεγχος ικανότητας διαφοροποίησης βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων.....	126
Μέρος 2. Επαγωγή Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ)	
στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια	127
2.1. Επίδραση της στοχευμένης στα Τ λεμφοκύτταρα σηματοδότησης των IFN-I στην ανάπτυξη της ΠΑΕ	127
2.2 Ιστοπαθολογική ανάλυση νωτιαίου μυελού κατά την ΠΑΕ	131
2.3 Ανάλυση χαρακτηριστικών των Τ λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια των IFNAR1 ^{Texcl} ποντικών κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ.....	132
2.3.1 Μέτρηση της παραγωγής κυτταροκινών από τα CD4 ⁺ Τ λεμφοκύτταρα κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ.....	132
2.3.2 Μελέτη της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών στα Τ λεμφοκύτταρα κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ.....	134
2.4 Ανάλυση χαρακτηριστικών των Τ λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια των IFNAR1 ^{Texcl} ποντικών κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ.....	137
2.4.1 Μέτρηση της παραγωγής κυτταροκινών από τα CD4 ⁺ Τ λεμφοκύτταρα κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ.....	137
2.4.2 Μελέτη της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών στα Τ λεμφοκύτταρα κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ.....	140
2.5 Έλεγχος της <i>ex vivo</i> πολλαπλασιαστικής ικανότητας των διαγονιδιακών Τ λεμφοκυττάρων έναντι του πεπτιδίου MOG ₃₅₋₅₅	142
2.6 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στα Τ λεμφοκύτταρα και στο νωτιαίο μυελό κατά την προσυμπτωματική και οξεία φάση της ΠΑΕ	144
Μέρος 3. Επαγωγή Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ)	
σε ποντίκια με MOG₃₅₋₅₅ αντιγονο-ειδικό TCR (2D2)	149
3.1 Επίδραση της σηματοδότησης των IFN-I επιλεκτικά στα MOG-ειδικά Τ λεμφοκύτταρα κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ	149
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	151
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	161
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	175

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιντερφερόνες τύπου I (IFN-I), κυρίως οι IFN-α και IFN-β, είναι πρωτεΐνες που παράγονται από την πλειονότητα των κυττάρων και εμπλέκονται στη φυσική και επίκτητη ανοσία συντελώντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις έχει δειχθεί ότι οι IFN-I εμφανίζουν πλειοτροπική δράση, που είναι άλλοτε προστατευτική και άλλοτε επιβλαβής. Συγκεκριμένα, στη σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), μία νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), που διαμεσολαβείται από τα T λεμφοκύτταρα, η IFN-β χορηγείται ως θεραπευτική αγωγή πρώτης γραμμής, χωρίς όμως να είναι πάντα αποτελεσματική. Η κυτταρο-ειδική δράση της IFN-β είτε σε ασθενείς, είτε στο καθιερωμένο ζωϊκό πρότυπο της ΣΚΠ, την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ), δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο *in vivo* ανοσοτροποποιητικός ρόλος της σηματοδότησης των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα κατά την ΠΑΕ, χρησιμοποιώντας ένα διαγονιδιακό ποντίκι που δημιουργήθηκε για το σκοπό αυτό, το λεγόμενο IFNAR1^{Texcl}. Το ποντίκι αυτό φέρει το γονίδιο *ifnar1* υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *cd2* γονιδίου σε IFNAR1 ελλειμματικό γενετικό υπόβαθρο (*ifnar1*^{-/-}), επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση του λειτουργικού IFN-I υποδοχέα (IFNAR) αποκλειστικά και μόνο στα T λεμφοκύτταρα. Τα IFNAR1^{Texcl} ζώα μετά την επαγωγή της ΠΑΕ, αφενός καθυστέρησαν να εμφανίσουν τα κλινικά συμπτώματα της νόσου, αφετέρου η ανάπτυξή της ήταν ήπιας μορφής. Η κλινική αυτή εικόνα συνδεόταν με μειωμένη διήθηση του ΚΝΣ από T λεμφοκύτταρα, και λιγότερη απομυελίνωση και εκφυλισμό των νευρώνων του ΚΝΣ, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου και τα *ifnar1*^{-/-} ζώα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν όταν, στα εν λόγω ζώα, με την πρόκληση της ΠΑΕ, χορηγήθηκε και ανασυνδυασμένη IFN-β ποντικού. Τα IFNAR1^{Texcl} ζώα καθυστέρησαν ακόμα περισσότερο να αναπτύξουν τη νόσο, γεγονός που δείχνει ότι η IFN-β, κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, εμπλέκεται σε μια προστατευτική διαδικασία, η οποία μένει να διερευνηθεί. *In vivo* μελέτες στα περιφερικά λεμφικά όργανα έδειξαν ότι πριν την έναρξη της νόσου, η σηματοδότηση των ενδογενών IFN-I αποκλειστικά

στα T λεμφοκύτταρα οδήγησε σε μειωμένη απόκριση τύπου Th17 και χαμηλότερο ποσοστό CCR6⁺CD4⁺ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια, κατά τη φάση ανάπτυξης της νόσου, στο σπλήνα των IFNAR1^{Texcl} ζώων, μετρήθηκε υψηλότερο ποσοστό βοηθητικών T λεμφοκυττάρων που παράγαγαν IL-10 και IFN-γ. Παράλληλα, στα περιφερικά T λεμφοκύτταρα βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *irgm1*, το οποίο επάγεται από την IFN-γ. Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν έναν έως τώρα άγνωστο προστατευτικό *in vivo* ρόλο των IFN-I, οι οποίες δρουν διαφοροποιώντας άμεσα τα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των περιφερικών T λεμφοκυττάρων κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ. Η πληροφορία αυτή αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στο σχεδιασμό καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών για τη ΣΚΠ, που σχετίζονται με τη δράση της IFN-β στα T λεμφοκύτταρα.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ελληνικοί όροι

ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα

ΠΑΕ: πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα

ΣΚΠ: σκλήρυνση κατά πλάκας

Ξενόγλωσσοι όροι - ελληνική μετάφραση

APC: Antigen Presenting Cell – αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο

BCR: B Cell Receptor – υποδοχέας Β λεμφοκυττάρων

BSA: bovine serum albumin – αλβουμίνη από ορό βοοειδούς

CD: cluster of differentiation (antigens) – συνάθροισμα αντιγόνων διαφοροποίησης

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid – αιθυλενδιάμινοτετραοξικό οξύ

FITC: Fluorescein isothiocyanate – ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη

h: human – ανθρώπινο

IFN: interferon – ιντερφερόνη

IFN-I: type I interferon – ιντερφερόνες τύπου I

IFNAR: type I interferon receptor – υποδοχέας ιντερφερονών τύπου I

IL: interleukin – ιντερλευκίνη

i.p.: intraperitoneally - ενδοπεριτοναϊκά

ISG: interferon stimulated gene – γονίδιο επαγόμενο από τις ιντερφερόνες

Ligand: προσδέτης

MFI: Mean Fluorescence Intensity – Μέση Ένταση Φθορισμού

MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein – ολιγοδενδροκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης

min: minute - λεπτό

NS: not significant – μη στατιστικά σημαντικό

PBS: phosphate buffered saline – ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων

PE: phycoerythrin - φυκοερυθρίνη

PFA: paraformaldehyde – παραφορμαλδεΐδη

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate - μυριστικός οξικός εστέρας της φορβόλης

s.c.: subcutaneously - υποδόρια

SEM.: standard error of the mean – τυπικό σφάλμα του μέσου όρου

STAT: Signal transducers and activators of transcription – μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής

TCR: T Cell Receptor – υποδοχέας T λεμφοκυττάρων

Tg: Transgenic - διαγονιδιακός

Th: T helper cells – βοηθητικά T λεμφοκύτταρα

TNF: tumor necrosis factor – παράγοντας νέκρωσης των όγκων

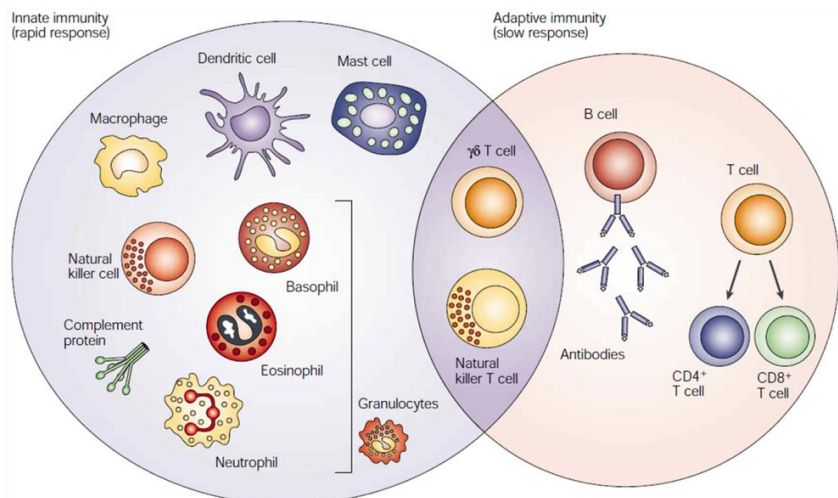
WT: wild type – αγρίου τύπου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κεφάλαιο 1: Το ανοσοποιητικό σύστημα

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο όρος ανοσία αναφέρεται στο σύνολο των λειτουργιών του οργανισμού που επιτελούνται προκειμένου να προστατευτεί από εξωτερικούς παράγοντες (α-νοσία) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1910 (1). Αντίστοιχα, ο αγγλικός όρος “immunity” προέρχεται από το λατινικό επίθετο *immunis*, και αναφέρεται σε κατάσταση ελεύθερη από φορτία. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί την άμυνα του οργανισμού και συνίσταται από ένα σύνολο οργάνων, κυττάρων και μορίων που συνεργάζονται στενά μεταξύ τους. Η αποτελεσματικότητά του εξασφαλίζεται μέσω της ικανότητάς του να ενεργοποιεί κατάλληλους μηχανισμούς, ικανούς να καταστρέφουν μεγάλη ποικιλία εισβολέων. Οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τη φυσική ή έμφυτη ανοσία (*innate immunity*) και την επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία (*adaptive immunity*) (Εικόνα 1.1). Οι δύο τύποι ανοσίας είναι συμπληρωματικοί, ενώ θεωρείται ότι υπάρχει μία θεμελιώδης σύνδεση μεταξύ τους. Η ένταση και η ποιότητα της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης εξαρτάται από σήματα που προέρχονται από τη φυσική απόκριση στη μόλυνση (1,2).



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της φυσικής (*innate*) και της επίκτητης (*adaptive*) ανοσίας (1).

1.2 Φυσική ανοσία

Η φυσική ή έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή και περιλαμβάνει ανατομικούς σχηματισμούς, που λειτουργούν ως φραγμοί στην είσοδο ξένων παραγόντων, διαλυτούς παράγοντες- πρωτεΐνες του πλάσματος (όπως αυτές του συμπληρώματος) που προκαλούν λύση των βακτηρίων, καθώς και πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, μαστοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), μονοκύτταρα και μακροφάγα (I). Εφόσον οι μικροοργανισμοί καταφέρουν να διαπεράσουν τους επιθηλιακούς φραγμούς, επιστρατεύονται τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, τα οποία μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRRs), αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνους μικροοργανισμούς (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs), τους οποίους στη συνέχεια φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν ενδοκυττάρια (I). Στην κατηγορία των PRRs ανήκει η οικογένεια των υποδοχέων τύπου Toll (Toll Like Receptors, TLRs), οι οποίοι διεγείρουν την παραγωγή μικροβιοκτόνων ουσιών και κυτταροκινών, μικρών πρωτεϊνικών μορίων, από τα μακροφάγα, συνδέοντας με αυτό τον τρόπο τη φυσική με την επίκτητη ανοσία.

1.3 Επίκτητη ανοσία

Συστατικά της επίκτητης ανοσίας αποτελούν τα λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα τους. Τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ειδικά, μέσω υποδοχέων, μολυσματικές και μη ουσίες, οι οποίες ονομάζονται αντιγόνα (I). Οι επίκτητες ανοσολογικές απαντήσεις δημιουργούν εξειδικευμένους μηχανισμούς για την αντιμετώπιση διαφόρων τύπων λοιμώξεων. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στην ειδική ανοσολογική απάντηση είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα των ιστών, κύτταρα Langerhans του δέρματος), καθώς και τα T και B λεμφοκύτταρα.

Η επίκτητη ανοσία διαχωρίζεται από τη φυσική ανοσία με βάση τις τρεις παρακάτω ιδιότητες (II):

1. Ειδικότητα: Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει την ιδιότητα να διακρίνει διαφορές ανάμεσα σε τουλάχιστον ένα δισεκατομμύριο διαφορετικά αντιγόνα. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων αποτελείται από

πολλούς διαφορετικούς κλώνους, καθένας εκ των οποίων εκφράζει έναν ειδικό αντιγονικό υποδοχέα.

2. Μνήμη: Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να «θυμάται» τα αντιγόνα με τα οποία έχει έρθει σε επαφή, με αποτέλεσμα, μετά από επανέκθεση στο ίδιο αντιγόνο, να εμφανίζει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη αντίδραση έναντι αυτού και όχι έναντι άλλων αντιγόνων.

3. Αυτορρύθμιση: Οι ανοσολογικές απαντήσεις είναι αυτοπεριοριζόμενες και εξασθενούν καθώς εξαλείφονται οι λοιμώξεις, οπότε το ανοσοποιητικό σύστημα επιστρέφει σε κατάσταση ηρεμίας και είναι έτοιμο να αποκριθεί σε νέες λοιμώξεις.

Η επίκτητη ανοσία διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: τη χυμική και την κυτταρική ανοσία. Η συντονισμένη δράση αυτών είναι καίριας σημασίας για την αποτελεσματική εξάλειψη του αντιγόνου και την προστασία του οργανισμού.

1.3.1 Χυμική ανοσία

Στη χυμική ανοσία, κύριο ρόλο παίζουν τα Β λεμφοκύτταρα και ο κυτταρικός «χυμός» που παράγουν, δηλαδή τα αντισώματα. Τα Β λεμφοκύτταρα εκφράζουν έναν ειδικό υποδοχέα που αναγνωρίζει αντιγονικούς καθοριστές, τους επιτόπους. Ο Β κυτταρικός υποδοχέας (B Cell Receptor, BCR) είναι ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης, το οποίο συγκρατείται στην επιφάνεια των κυττάρων από τη σταθερή του περιοχή (Fc). Στις Τ εξαρτώμενες απαντήσεις, έναντι πρωτεϊνικών αντιγόνων, προκειμένου τα Β λεμφοκύτταρα να ενεργοποιηθούν, απαιτείται επιπλέον η δράση των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων (T helper cells, Th). Υπό την επίδραση των εκκρινόμενων από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα κυτταροκινών, τα Β λεμφοκύτταρα, που έχουν προηγουμένως αναγνωρίσει το αντιγόνο, διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες ελαφρές και δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες, το αμινοτελικό άκρο των οποίων σχηματίζει ένα θύλακο, όπου προσδένεται το αντιγόνο (υπερμεταβλητές περιοχές CDRs εντός του Fab τμήματος). Τα εκκρινόμενα αντισώματα διακρίνονται ανάλογα με τη μοριακή τους δομή σε διάφορες τάξεις (IgD, IgM, IgG, IgA, IgE) και υποτάξεις (άνθρωπος: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGA1, IgGA2, ποντίκι: IgG1, IgG2a, IgG2b και IgG3), που

χαρακτηρίζουν τον τύπο της ανοσολογικής απόκρισης. Σε απάντηση στις κυτταροκίνες που εκκρίνονται, τα Β λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μεταστροφή τάξης βαριών αλυσίδων (isotype switching) (3,4). Για παράδειγμα, η παραγόμενη ιντερφερόνη γ (IFN- γ) από τα Th1 λεμφοκύτταρα προάγει την έκκριση ανοσοσφαιρινών του ισοτύπου IgG2a ή IgG3, ενώ οι ιντερλευκίνες 4 και 13 (IL-4 και IL-13) που παράγονται από τα Th2 λεμφοκύτταρα προάγουν την έκκριση ανοσοσφαιρινών του ισοτύπου IgG1 και IgE (5,6). Τα παραγόμενα αντισώματα εκκρίνονται στην κυκλοφορία και στα υγρά των βλεννογόνων, όπου προσδένονται στους μικροοργανισμούς, ως αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, συμβάλλοντας στην απομάκρυνση τους από τον οργανισμό.

1.3.2 Κυτταρική ανοσία

Στην κυτταρική ανοσία τον κύριο ρόλο έχουν τα Τ λεμφοκύτταρα. Η αναγνώριση των αντιγόνων γίνεται με την παρουσίασή τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen presenting cells, APCs) στα Τ λεμφοκύτταρα. Κατά το στάδιο αυτό, το παθογόνο υφίσταται επεξεργασία στο εσωτερικό του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, με αποτέλεσμα την κατάτμηση των πρωτεϊνών του σε πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά (αντιγονικοί επίτοποι) παρουσιάζονται στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου συζευγμένα με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και II (Major Histocompatibility Complex I, II, MHC-I, MHC-II). Η παρουσίαση των επιτόπων οδηγεί τελικά στην αναγνώριση τους από τα ειδικά για αυτούς Τ λεμφοκύτταρα μέσω του αντιγονικού υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCR), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και την κλωνική επέκταση (clonal expansion) των ειδικών, για το παθογόνο, Τ λεμφοκυττάρων (I). Ο TCR είναι ένα ετεροδιμερές διαμεμβρανικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η πλειονότητα των Τ λεμφοκυττάρων εκφράζουν TCR τύπου $\alpha\beta$, ενώ 5% των λεμφοκυττάρων εκφράζουν TCR τύπου $\gamma\delta$. Κάθε ώριμο Τ λεμφοκύτταρο περιορίζεται στην αναγνώριση του αντιγονικού επιτόπου από τα MHC μόρια (MHC-περιορισμός) και εκφράζει στην επιφάνειά του χαρακτηριστικά μόρια CD4 ή CD8. Τα μόρια αυτά ονομάζονται συνυποδοχείς, επειδή λειτουργούν μαζί με τον TCR και συνδέονται με συντηρημένες επικράτειες των μορίων MHC. Τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα δρουν ως βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (Th), παράγουν κυτταροκίνες

και αναγνωρίζουν αντιγόνα που προσλαμβάνονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον και παρουσιάζονται από μόρια MHC II, τα οποία εκφράζονται μόνο από τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα. Τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα δρουν ως κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T lymphocytes, CTLs ή Tc), τα οποία αναγνωρίζουν πεπτίδια που προέρχονται από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και συνδέονται με μόρια MHC I, τα οποία εκφράζονται σε όλα τα εμπύρηννα κύτταρα (I). Υπάρχουν δύο κυτταρικοί πληθυσμοί που δεν ανήκουν σαφώς στη φυσική ή την επίκτητη ανοσία, αλλά θεωρείται ότι αποτελούν συνδετικό κρίκο μεταξύ τους (Εικόνα 1.1). Τα γδ T λεμφοκύτταρα δεν περιορίζονται από τα κλασικά MHC μόρια, οπότε δεν αναγνωρίζουν πεπτιδικούς αντιγονικούς επιτόπους. Όπως και τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, αναγνωρίζουν PAMPs και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας, εκκρίνοντας όμως κυτταροκίνες, οι οποίες επάγουν την επίκτητη ανοσολογική απόκριση (I).

Επιπλέον, τα NKT κύτταρα εκφράζουν χαρακτηριστικούς δείκτες των NK κυττάρων (CD161), καθώς και το μόριο CD3 και μορφές TCR, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μόρια που μοιάζουν με τα MHC (CD1d). Θεωρείται ότι τα NKT κύτταρα αποτελούν ένα σύστημα ταχείας απόκρισης, ενώ η συμβατική απόκριση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων βρίσκεται ακόμα υπό ανάπτυξη (I).

1.3.3 Στάδια της επίκτητης ανοσίας

Κατά το σχηματισμό, την εξέλιξη, τον περιορισμό και την επανενεργοποίηση των ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων, το σημαντικότερο ρόλο διαδραματίζουν τα T λεμφοκύτταρα. Η εξάλειψη ενός αντιγόνου από τον οργανισμό πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια της ανοσολογικής απόκρισης, τα οποία περιγράφονται περιληπτικά παρακάτω (I) (Εικόνα 1.2):

i. Αναγνώριση του αντιγόνου: Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα επεξεργάζονται την πρωτεΐνη ενδοκυτταρικά και τελικά παρουσιάζουν τμήματά τους στην επιφάνειά τους, συνδεδεμένα με MHC μόρια. Το σύμπλεγμα MHC-πεπτίδιο αναγνωρίζεται από τα T λεμφοκύτταρα, μέσω του TCR.

ii. Ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων: Για την πλήρη ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων απαιτούνται δύο σήματα: α. το αντιγόνο, το οποίο επάγει ειδική

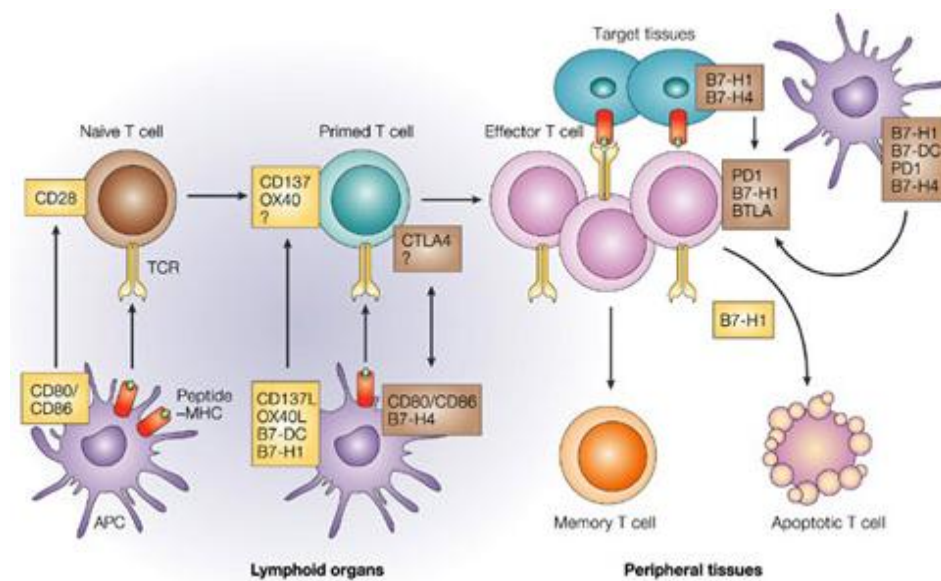
ανοσολογική απόκριση έναντι αυτού, και β. τα συνδιεγερτικά σήματα, τα οποία είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των T λεμφοκυττάρων. Τα σήματα αυτά προέρχονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ μη αντιγονοειδικών συνδιεγερτικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών (CD80, CD86) και των T λεμφοκυττάρων (CD28). Μετά την αλληλεπίδραση TCR-CD3-MHC-πεπτιδίου, τα παρθένα λεμφοκύτταρα εισέρχονται στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, ενώ επάγεται η μεταγραφή του γονιδίου της IL-2, η έκκριση της οποίας επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων.

Επιπλέον, κυτταροκίνες που εκκρίνονται κυρίως από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα διαμορφώνουν ένα τοπικό περιβάλλον που ρυθμίζει τη μοίρα των παρθένων T λεμφοκυττάρων. Οι κυτταροκίνες αυτές αποτελούν το τρίτο σήμα, που απαιτείται, ώστε τα ήδη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα να διαφοροποιηθούν προς διαφορετικά δραστικά (effector) μονοπάτια, τα οποία αναλύονται παρακάτω (σ. 27). Ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων απουσία συνδιέγερσης οδηγεί σε ανέργεια (αδυναμία απόκρισης στο αντιγονικό ερέθισμα) ή σε απόπτωση αυτών των κυττάρων.

iii. Δραστική φάση των ανοσολογικών αποκρίσεων: Κατά τις χυμικές ανοσοαπαντήσεις, τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα υποκινούν την ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων και την έκκριση από αυτά ειδικών αντισωμάτων, τα οποία δεσμεύονται στα αντιγόνα, συμβάλλοντας στην απομάκρυνσή τους. Κατά τις κυτταρικές ανοσοαπαντήσεις τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν τα μακροφάγα και άλλα λεμφοκύτταρα, ώστε να εξαλείψουν τα φαγοκυτταρωμένα αντιγόνα, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου και λυσοσωματικά ένζυμα και ενεργοποιώντας, με αυτόν τον τρόπο, μηχανισμούς οξείας φλεγμονής. Τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T λεμφοκύτταρα παράγοντας περφορίνες, θρυμματίνες, τον παράγοντα Fas, καταστρέφουν άμεσα το κύτταρο-στόχο οδηγώντας το προς απόπτωση.

iv. Καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης: Εφόσον τα αντιγόνα έχουν απομακρυνθεί από τον οργανισμό, το ανοσοποιητικό σύστημα επιστρέφει σε κατάσταση ηρεμίας, ώστε να αποφευχθεί η περαιτέρω πρόκληση ιστικών βλαβών. Στο στάδιο αυτό σημαντικό ρόλο παίζουν τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (T

Regulatory cells, Tregs), παρεμποδίζοντας τη δραστηριότητα των δραστικών CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων με μηχανισμούς που περιγράφονται στη συνέχεια (7). Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, εφόσον δεν δέχονται πλέον το πρώτο σήμα ενεργοποίησής τους (δηλαδή το αντιγόνο), οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση (Activation Induced Cell Death, AICD), μέσω του υποδοχέα Fas (8). Με το μηχανισμό αυτό διατηρείται η ομοιόσταση των T λεμφοκυττάρων, ενώ παραμένουν στον οργανισμό B και T λεμφοκύτταρα μνήμης.



Εικόνα 1.2 Τα T λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο θύμο αδένα και μετά την έξοδό τους από το θύμο, μόλις παρουσιαστεί κάποιο αντιγόνο από σύμπλεγμα MHC-πεπτίδιο υπόκεινται σε κλωνική επέκταση και διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά, μνήμης, κατασταλτικά και βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Μετά τη μετανάστευση στους περιφερικούς ιστούς, τα δραστικά T λεμφοκύτταρα υπόκεινται ξανά σε ρύθμιση από σήματα των APCs. Στο στάδιο αυτό, κυριαρχούν τα ανασταλτικά σήματα, προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή καταστροφή των ιστών. Επιπλέον, τα σήματα αυτά καθορίζουν τη διαδικασία απόπτωσης των δραστικών T λεμφοκυττάρων (9).

1.4 Ο ρόλος των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων: αποκρίσεις τύπου Th1, Th2 και Th17

Η αναγνώριση ενός συμπλέγματος αντιγόνου-MHC-II από το Th λεμφοκύτταρο επάγει την έκκριση πρωτεϊνών από αυτά. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται κυτταροκίνες, έχουν ιδιότητες διαμεσολαβητικών-ρυθμιστικών παραγόντων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και ρύθμιση της δράσης των B

και Tc λεμφοκυττάρων. Σε διαφορετικές μολύνσεις, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα πολώνονται, εκκρίνοντας διακριτά πρότυπα κυτταροκινών. Αυτές οι κυτταροκίνες δρουν ως τρίτα σήματα στα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, διαφοροποιώντας τα προς τους κύριους υποπληθυσμούς Th1, Th2 και Th17 (Εικόνα 1.3).

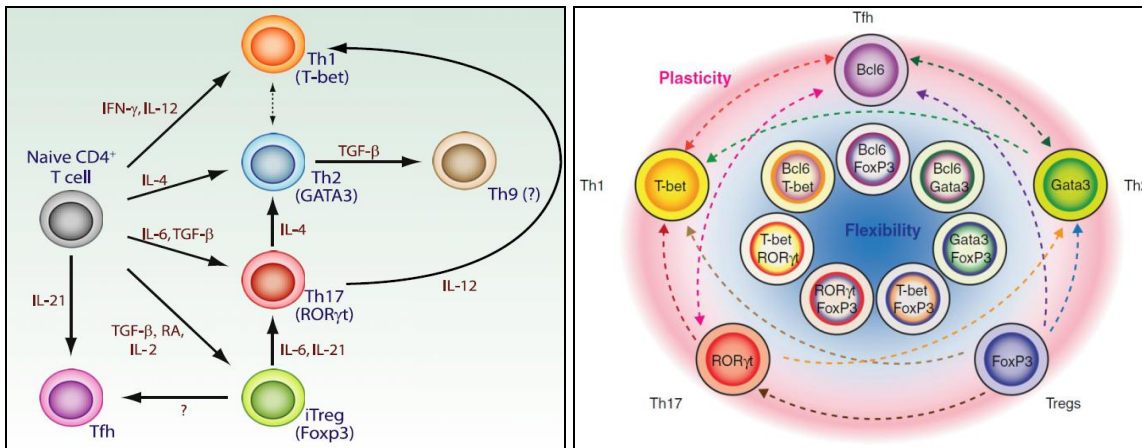
Ο Th1 υποπληθυσμός εκκρίνει κυτταροκίνες όπως, IL-2, TNF-α και IFN-γ που ευνοούν την κυτταρική ανοσία και τη φαγοκυττάρωση, καθώς και την έκκριση ανοσοσφαιρινών IgG2a, και γενικά θεωρείται υπεύθυνος για την ανοσία έναντι των ενδοκυττάρων παθογόνων. Επίσης τα Th1 λεμφοκύτταρα εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου (Delayed Type Hypersensitivity reactions, DTH) (10). Η διαφοροποίηση προς Th1 επάγεται από τις IL-12 και IFN-γ και καθοδηγείται από τον μεταγραφικό παράγοντα T-bet (T box expressed in T cells).

Ο Th2 υποπληθυσμός εκκρίνει κυτταροκίνες όπως, IL-4, IL-5, IL-13 και IL-10 και ευνοεί την χυμική ανοσία, περιορίζοντας την ικανότητα επιβίωσης των μικροβίων στα επιθήλια και τους βλεννογόνους. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η παραγωγή των IgE αντισωμάτων οφείλεται στις IL-4 και IL-13, ενώ η παρεμπόδιση της δράσης των μακροφάγων οφείλεται στην IL-10. Η διαφοροποίηση προς Th2 επάγεται από την επίδραση της IL-4 και καθοδηγείται από τον μεταγραφικό παράγοντα GATA3 (GATA binding protein 3).

Ο Th17 υποπληθυσμός ανακαλύφθηκε την τελευταία δεκαετία, και εκκρίνει κυρίως IL-17A, IL-17F, IL-21 αλλά και IL-1-β, IL-6 και IL-22. Ενώ ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι η προστασία έναντι βακτηρίων και μυκήτων, λόγω των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που παράγουν, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών παθήσεων, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη σκλήρυνση κατά πλάκας, τις αλλεργίες κ.ά. Η διαφοροποίηση προς Th17 επάγεται από τον παράγοντα TGF-β (Transforming Growth Factor-β) σε συνδυασμό με την IL-6, και καθοδηγείται από τον μεταγραφικό παράγοντα RORγt (Retinoic acid-related Orphan Receptor γt).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η καθιερωμένη αντίληψη σύμφωνα με την οποία, τα Th1, Th2 και Th17 λεμφοκύτταρα αποτελούν τελικώς διαφοροποιημένους κυτταρικούς πληθυσμούς, αναθεωρείται τα τελευταία χρόνια. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3Α, οι Th υπότυποι εμφανίζουν σημαντική

πλαστικότητα, καθώς πραγματοποιείται μετατροπή τους σε άλλους φαινοτύπους (11). Μία πρόσφατη υπόθεση για αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με την «ευελιξία» (flexibility) στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, που θεωρούνται «κύριοι ρυθμιστές» της διαφοροποίησης, δηλαδή ότι, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα εκφράζουν περισσότερους από έναν «κύριους ρυθμιστές» (Εικόνα 1.3B) (12).



Εικόνα 1.3 (Α) Τα Th1 και Th2 λεμφοκύτταρα εμφανίζουν πιο σταθερούς φαινοτύπους σε σύγκριση με τα iTreg και Th17 λεμφοκύτταρα που μπορούν να αλλάξουν το Th πρόγραμμά τους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τα iTregs μπορούν να γίνουν Th17 λεμφοκύτταρα μετά από διέγερση με IL-6 και IL-21. Τα Th17 μπορούν να μετατραπούν σε Th1 ή Th2 λεμφοκύτταρα, όταν διεγερθούν με IL-12 ή IL-4, αντίστοιχα. Επίσης υποστηρίζεται ότι τα Th2 μπορούν να μετατραπούν σε T λεμφοκύτταρα που παράγουν IL-9 ως απάντηση στον TGF-β, μολονότι δεν είναι σαφές αν τα “Th9” λεμφοκύτταρα όντως αντιπροσωπεύουν μία διακριτή Th σειρά. (Β) Μετατροπή των Th υποτύπων λόγω «ευελιξίας» των μεταγραφικών παραγόντων (11,12).

1.5 Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα και ο ρόλος τους στην επίκτητη ανοσία

Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs) είναι ένας υποπληθυσμός των T λεμφοκυττάρων, που αποτελεί 3-5% του γενικού πληθυσμού αυτών. Ο χαρακτηρισμός τους έγινε το 1995, όταν παρατηρήθηκε ότι η απαλοιφή τους οδηγεί στην εκδήλωση πολλαπλών αυτοάνοσων ασθενειών σε ποντίκια (13). Δύο είναι οι κύριοι πληθυσμοί των Tregs: τα φυσικά ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (natural Tregs, nTregs), τα οποία ωριμάζουν στο θύμο αδένα, και τα επαγόμενα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (induced Tregs, iTregs), τα οποία διαφοροποιούνται στην περιφέρεια μετά από ενεργοποίηση από κάποιο αντιγόνο παρουσία κατάλληλων κυτταροκινών. Οι κατασταλτικοί μηχανισμοί δράσης των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων

πραγματοποιούνται με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους: μέσω παραγωγής κατασταλτικών κυτταροκινών IL-10 και TGF- β , μέσω κυτταρικής λύσης (παραγωγή λυτικών παραγόντων: περφορίνης, θρυμματινών A και B), μέσω τροποποίησης της ωρίμανσης ή λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων, και μέσω απόπτωσης των δραστικών T λεμφοκυττάρων λόγω έλλειψης της IL-2 (προσδέεται με υψηλή συγγένεια στον IL-2R α των Tregs) (7). Παρ' όλα αυτά, η ύπαρξη επιπλέον μηχανισμών δράσης των Tregs, καθώς και ο ακριβής *in vivo* ρόλος τους δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί.

1.6 Κυτταροκίνες και χημειοκίνες

Η ικανότητα επικοινωνίας, συντονισμού και μετανάστευσης των επιμέρους συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος, καθορίζει την ανοσολογική απόκριση, και επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία ονομάζονται κυτταροκίνες.

Οι κυτταροκίνες μπορεί να είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες και μπορούν να δράσουν σε τρία επίπεδα: στο ίδιο κύτταρο που τις παράγει (αυτοκρινής δράση), σε ένα παρακείμενο κύτταρο (παρακρινής δράση) ή, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, σε ένα μακρινό κύτταρο στόχο (ενδοκρινής δράση). Οι κυτταροκίνες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους αναπτυξιακούς παράγοντες, οι οποίοι ευνοούν την ανάπτυξη και ωρίμανση ορισμένων κυττάρων, όπως οι NGF (Neuronal Growth Factor) και EGF (Epidermal Growth Factor). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις ανοσορρυθμιστικές κυτταροκίνες, οι οποίες επιδρούν στην ωρίμανση και ανάπτυξη ορισμένων υποπληθυσμών T λεμφοκυττάρων, όπως οι IL-2, IL-4 και IFN- γ . Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που είναι απαραίτητες για την έναρξη και διατήρηση της φλεγμονής, όπως οι TNF, IL-1 και IL-6. Τέλος, η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που ελέγχουν και καταστέλλουν τη δράση των κυτταροκινών της προηγούμενης ομάδας, όπως οι TGF- β και IL-10.

Οι χημειοκίνες είναι μία σημαντική κατηγορία κυτταροκινών, που δρουν ως χημειοτακτικοί παράγοντες επάγοντας τη μετανάστευση των κυττάρων προς περιοχές υψηλής συγκέντρωσής τους (14). Διακρίνονται σε δύο λειτουργικές υποομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις ομοιοστατικές χημειοκίνες, που εκφράζονται

φυσιολογικά και συμμετέχουν στην ανάπτυξη και τη συντήρηση των λεμφικών οργάνων (CCL14, CCL25, CCL27), και η δεύτερη περιλαμβάνει τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες που επάγονται από παθογόνα και συμμετέχουν στην κινητικότητα και μετανάστευση των δραστικών κυττάρων προς τις περιοχές της φλεγμονής, όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) στην περίπτωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας (15) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Χημειοκίνες που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με ΣΚΠ (14).

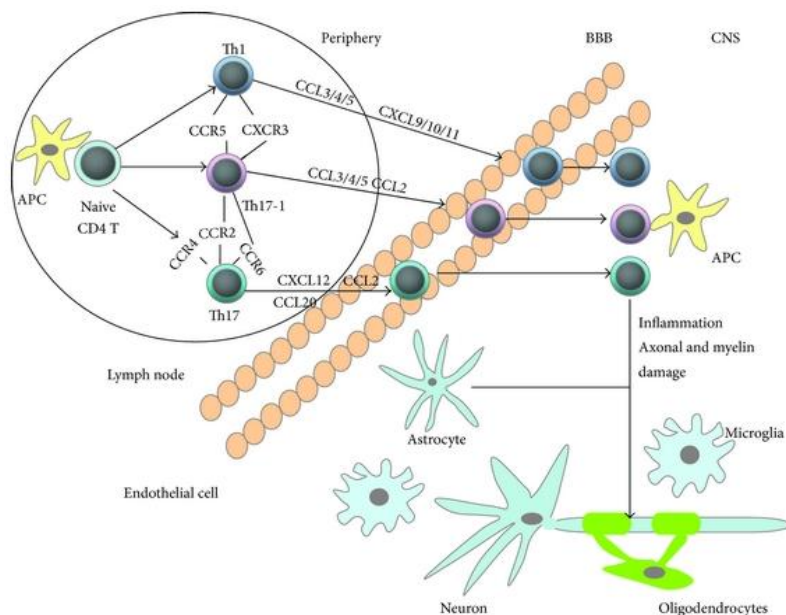
Chemokine system name	Human ligand (old name)	Target cells	Chemokine receptors
CCL2 [33]	MCP-1	T cells, NK cells, B cells, monocytes, and dendritic cells	CCR1, CCR2
CCL3 [36]	MIP-1 α	T and B cells, macrophage, and neutrophils	CCR1, CCR4, CCR5
CCL4 [39]	MIP-1 β	T cells, microglia, and macrophage	CCR5
CCL5 [33]	RANTES	T cells, macrophage, eosinophils, and dendritic cells	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7 [40]	MCP-3	T cells, B and NK cells, dendritic cells, and monocytes	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL8 [40]	MCP-2	T cells, monocytes, and dendritic cells	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL11 [17]	Eotaxin	T cells, dendritic cells, eosinophils, and basophils	CCR3
CCL17 [41]	TARC	T cells	CCR4
CCL19 [3]	ELC	T and B cells, and dendritic cells	CCR7
CCL20 [42]	LARC	T cells, monocytes	CCR6
CCL21 [43]	SLC	T and NK cells, dendritic cells	CCR7
CXCL1 [40]	GRO- α	monocytes, neutrophils	CXCR2
CXCL8 [41]	IL-8	monocytes, neutrophils, and fibroblasts	CXCR1, CXCR2
CXCL9 [44]	MIG	T and NK cells	CXCR3
CXCL10 [45]	IP-10	T and NK cells, macrophages, and astrocytes	CXCR3
CXCL11 [33]	I-TAC	T and NK cells	CXCR3, CXCR7
CXCL12 [46]	SDF-1	T and B cells, dendritic cells, and monocytes	CXCR4, CXCR7
CXCL13 [46]	BCA-1	T and B cells, dendritic cells, and monocytes	CXCR5
CX3CL1 [47]	Fractalkine	T and NK cells, monocytes	CX3CR1

1.7 Μετανάστευση T λεμφοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής

Η πλήρης ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και η διαφοροποίησή τους συνοδεύεται και από σημαντικές αλλαγές στην ικανότητά τους για μετανάστευση (16). Τόσο τα T_c, όσο και τα T_h λεμφοκύτταρα είναι αναγκαίο να μεταναστεύσουν από τον περιφερικό λεμφικό ιστό, όπου ενεργοποιούνται, στο σημείο της μόλυνσης (Εικόνα 1.4). Αρχικά, η έξοδός τους από τους λεμφικούς ιστούς ρυθμίζεται από την ικανότητα απόκρισής τους στο χημειοτακτικό λιπίδιο φωσφορική σφινγγοσίνη 1

(sphingosine 1-phosphate, S1P) μέσω των υποδοχέων S1P₁. Στη συνέχεια, η εξαγγελία των λεμφοκυττάρων συνδέεται άμεσα με την αύξηση των επιπέδων του μορίου προσκόλλησης ιντεγκρίνη α₄β₁, γνωστού ως VLA-4 (Very Late Antigen-4), το οποίο προσδένεται στο μόριο προσκόλλησης VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein-1) των αγγειακών ενδοθηλιακών κύτταρων στην περιοχή της φλεγμονής. Επειδή ο εποικισμός των εστιών φλεγμονής από τα δραστικά λεμφοκύτταρα δεν εξαρτάται από την αναγνώριση αντιγόνου, όλα τα δραστικά λεμφοκύτταρα που δημιουργήθηκαν σε απόκριση σε αντιγόνο, εισέρχονται στην εστία φλεγμονής. Ωστόσο, μόνο τα ειδικά για το αντιγόνο T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται ξανά μετά την επαφή τους με το αντιγόνο, οπότε τα επίπεδα έκφρασης του VLA-4 αυξάνονται σε αυτά, και τα λεμφοκύτταρα προσδένονται ισχυρά στους ιστούς κοντά στην περιοχή της φλεγμονής. Αντίθετα, τα μη ειδικά T λεμφοκύτταρα που μεταναστεύουν στην εστία φλεγμονής, εισέρχονται στα λεμφαγγεία και επιστρέφουν στην κυκλοφορία ή υπόκεινται σε αποπτωτικό θάνατο (1).

Σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων στις περιοχές της φλεγμονής διαδραματίζουν οι χημειοκίνες, οι οποίες καθοδηγούν την κινητικότητα των δραστικών T λεμφοκυττάρων. Την τελευταία δεκαετία, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι κατά τη ΣΚΠ, συγκεκριμένοι υποδοχείς χημειοκινών εκφράζονται στην επιφάνεια των Th1, Th2 και Th17 λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1.4). Έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς CCR5, CXCR3, και CXCR6 εκφράζονται κατά προτίμηση, αν και όχι αποκλειστικά στα Th1 λεμφοκύτταρα, οι υποδοχείς CCR3, CCR4, και CCR8 εκφράζονται στα Th2 λεμφοκύτταρα, ενώ ο υποδοχέας CCR6 εκφράζεται στα Th17 κύτταρα. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι η χημειοκίνη CCL20 (προσδέτης του CCR6) εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) του ΚΝΣ, κατά τα πρώτα στάδια της νόσου, οπότε έλκει τα Th17 λεμφοκύτταρα προς τον ΑΕΦ μέσω του άξονα CCR6-CCL20 (15).



Εικόνα 1.4 Μετανάστευση και εκτελεστική λειτουργία των T λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ κατά τη ΣΚΠ (14).

1.8 Ανοχή και αυτοανοσία

Στις αρχές του περασμένου αιώνα (1900), ο Paul Ehrlich διαπίστωσε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορούσε να παρεκκλίνει και να αντιδράσει εναντίον εαυτών αντιγόνων (αυτοαντιγόνων), οδηγώντας σε παθολογική κατάσταση. Αυτή η διαδικασία αρχικά ονομάστηκε «αυτοτοξικός τρόμος» (*horror autotoxicus*). Το 1957 όμως, ο Frank Macfarlane Burnet διαπίστωσε ότι κατά την ανάπτυξη του οργανισμού, αυτοδραστικά B και T λεμφοκύτταρα υπόκεινται σε θετική και αρνητική επιλογή στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, ως ένας από τους μηχανισμούς, που διασφαλίζουν την ακεραιότητα του οργανισμού, όπως αναλύεται παρακάτω. Επιπλέον, το 1991 προτάθηκε από τον Stratis Avrameas η θεωρία του «γνώθι σ' εαυτόν», η οποία εστιάζει στην αναγνώριση του εαυτού από φυσικά αντισώματα, συμβάλλοντας στην ομοίωση του οργανισμού (17).

Η ανοχή (*tolerance*) είναι μία φυσιολογική κατάσταση μη απόκρισης του οργανισμού έναντι ενός αντιγόνου (I, III), που επιτυγχάνεται με δύο βασικούς μηχανισμούς. Ο πρωτογενής μηχανισμός, ονομάζεται κεντρική ανοχή (*central tolerance*), συντελείται στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, το μυελό των οστών και το θύμο αδένα, και εξαλείφει τους B και T κυτταρικούς κλώνους, που φέρουν υποδοχείς, που αναγνωρίζουν εαυτά αντιγόνα με συγγένεια μεγαλύτερη από ένα κατώτατο όριο (κλωνική εξάλειψη). Αρκετά αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα διαφεύγουν της

κεντρικής ανοχής προς τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, οπότε υπάρχουν επιπρόσθετοι μηχανισμοί που περιορίζουν τη δραστηριότητά τους. Αυτοί περιλαμβάνουν την περιφερική ανοχή (peripheral tolerance), που καθιστά τα λεμφοκύτταρα ανεργικά στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, οπότε δεν αποκρίνονται σε αντιγονικό ερέθισμα, ή τα οδηγεί προς προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή περιορίζει τη δραστηριότητά τους μέσω των Tregs. Όλα τα υγιή άτομα διαθέτουν ώριμα κυκλοφορούντα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα, τα οποία, ρυθμιζόμενα με τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν, δεν οδηγούν σε αυτοάνοση νόσο. Αυτοάνοση νόσος είναι το φαινόμενο κατά το οποίο, η δράση των αυτοαντιδρώντων κυττάρων προκαλεί βλάβη του «εαυτού», δηλαδή των ιστών του οργανισμού και θεωρείται ότι προκαλείται λόγω δυσλειτουργίας της ανοχής (18). Οι παθογενετικοί μηχανισμοί των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι ακόμη άγνωστοι, ενώ γενικά θεωρείται ότι στην εκδήλωσή τους συμβάλλουν περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως λοιμώξεις από ιούς και βακτήρια (19-21), γενετικοί παράγοντες (22,23), ορμονικοί παράγοντες που δικαιολογούν την εμφάνισή τους σε γυναίκες σε αναλογία 10 προς 1 σε σχέση με τους άνδρες, καθώς και ψυχολογικοί παράγοντες στους οποίους συμπεριλαμβάνεται και το στρες. Τα αυτοάνοσα νοσήματα προσβάλλουν το 5-8% του γενικού πληθυσμού (18,24). Διακρίνονται σε συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, τα οποία προσβάλλουν σειρά οργάνων του ατόμου, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και το σύνδρομο Sjögren, καθώς και σε οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα, τα οποία προσβάλλουν ένα μόνο ιστό-στόχο, όπως η νόσος Hashimoto, κατά την οποία προσβάλλεται ο θυρεοειδής αδένας, και η σκλήρυνση κατά πλάκας, κατά την οποία προσβάλλεται το ΚΝΣ.

Κεφάλαιο 2. Το νευρικό σύστημα

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το νευρικό σύστημα ρυθμίζει και ελέγχει τη λειτουργία όλων των οργάνων του σώματος, καθώς επίσης και τη μεταξύ τους αρμονική συνεργασία. Επιπλέον, μέσω των αισθητήριων οργάνων, συμβάλλει στην αντίληψη του περιβάλλοντος και αποτελεί την έδρα των ψυχικών λειτουργιών. Αποτελείται από το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα και το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ).

i. Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ): Αποτελείται από τα νεύρα, τα οποία εκτείνονται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, και διακλαδίζονται στην περιφέρεια του σώματος, τους μύες, τους αδένες και τα αισθητήρια όργανα, άγοντας τις πληροφορίες από και προς το ΚΝΣ.

ii. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ): Αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, οι οποίοι προστατεύονται από το κρανίο και τη σπονδυλική στήλη, αντίστοιχα. Αποτελούν τα κύρια κέντρα ελέγχου για τη ρύθμιση και το συντονισμό της λειτουργίας του οργανισμού, μέσω της μεταφοράς της νευρικής πληροφορίας.

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από δύο κατηγορίες κυττάρων, τους νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα.

2.2 Ο νευρώνας

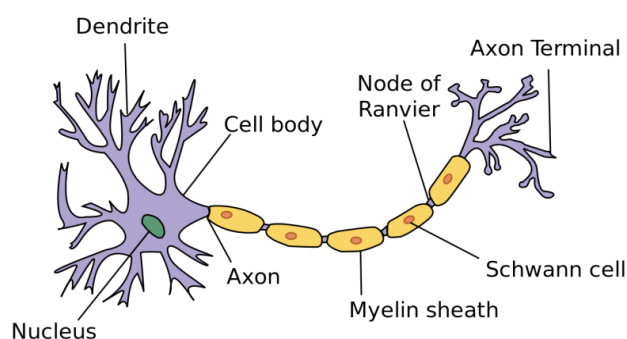
Με τον όρο “νευρώνας” ορίζεται το νευρικό κύτταρο, που αποτελεί δομικό μέρος του νευρικού συστήματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι νευρώνων, οι οποίοι διαφέρουν στη μορφή, ενώ χαρακτηριστικό τους είναι η μεγάλη ασυμμετρία στο σχήμα. Ένας νευρώνας αποτελείται από:

i. **Το κυτταρικό σώμα**, το μεγαλύτερο κεντρικό τμήμα του κυττάρου μεταξύ των δενδριτών και του νευράξονα.

ii. **Τον νευράξονα**, που ονομάζεται και νευρική ίνα, μια λεπτή απόφυση που μπορεί να είναι μέχρι και δεκάδες χιλιάδες φορές μεγαλύτερη σε μήκος από τη διάμετρο του κυτταρικού σώματος. Αυτή η δομή μεταφέρει τα νευρικά σήματα από το κυτταρικό σώμα του νευρώνα. Κάθε νευρώνας διαθέτει μόνο έναν νευράξονα, που μπορεί να

διακλαδίζεται έντονα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η επικοινωνία με πολλά κύτταρα-στόχους. Οι νευράξονες περιβάλλονται από μια λιπιδικής σύστασης μονωτική ουσία, τη μυελίνη, η οποία διατάσσεται γύρω από το νευράξονα με διακριτά κενά μεταξύ τους, που ονομάζονται κόμβοι του Ranvier (Εικόνα 2.1). Τα λιπαρά έλυτρα μυελίνης επιτρέπουν τη μεταπήδηση των νευρικών σημάτων από τον ένα κόμβο στον επόμενο (αλματώδης αγωγή), η οποία αποτελεί τη βάση της ταχείας νευρικής μεταγωγής.

iii. **Τους δενδρίτες**, σχετικά βραχείες διακλαδιζόμενες κυτταρικές προεξοχές ή αποφυάδες (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Βασική δομή νευρικού κυττάρου. Διακρίνονται το κυτταρικό σώμα (cell body) με τον πυρήνα (nucleus) και τους δενδρίτες (dendrite), και ο νευράξονας (axon) με το μυελινικό έλυτρο (myelin sheath), τα κύτταρα Schwann και τους κόμβους (nodes) του Ranvier (www.utexas.edu/courses/bio365r/Images/neuron.JPG).

2.3 Τα νευρογλοιακά κύτταρα

Εκτός από τους νευρώνες, το ΚΝΣ περιέχει και νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία είναι διαφορετικοί τύποι υποστηρικτικών κυττάρων, που διασφαλίζουν τη φυσιολογική λειτουργία και επικοινωνία των νευρώνων (V). Τα κύτταρα αυτά διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

i. Τα ολιγοδενδροκύτταρα: έχουν αποφυάδες οι οποίες περιτυλίγονται γύρω από τους νευράξονες, δημιουργώντας ένα έλυτρο μυελίνης. Τα κύτταρα Schwann εκτελούν την ίδια λειτουργία με τα ολιγοδενδροκύτταρα, εντοπίζονται όμως γύρω από τους νευράξονες στο ΠΝΣ, ενώ οι αποφυάδες τους περιτυλίγονται γύρω από ένα νευράξονα μόνο.

ii. Τα αστροκύτταρα: είναι αστεροειδούς σχήματος κύτταρα με πολλαπλές αποφυάδες με ακτινωτή διάταξη. Έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του

αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) και την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ νευρώνων – τριχοειδών, όπως και στην επούλωση τραυμάτων, με το σχηματισμό ουλώδους ιστού στις περιοχές του ΚΝΣ που έχουν υποστεί βλάβη.

iii. Τα επενδυματικά κύτταρα: είναι κυλινδρικά, επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό νευρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Τα κύτταρα αυτά είναι κροσσωτά, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο τη ροή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

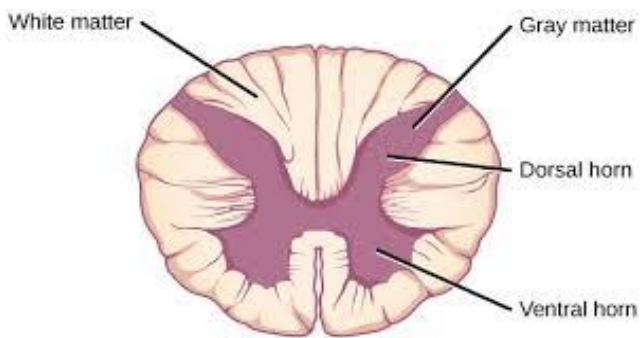
iv. Η μικρογλοία: αντιπροσωπεύει το φαγοκυτταρικό σύστημα του νευρικού ιστού και προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Κατόπιν ενεργοποίησης, τα κύτταρα αυτά υφίστανται μεταβολές στη μορφολογία και το φαινότυπό τους, αποσύροντας τις αποφυάδες τους, οπότε αποκτούν τα χαρακτηριστικά των μακροφάγων. Με αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα αποκτούν αυξημένη κινητικότητα ώστε να μπορούν να μεταφερθούν στις περιοχές φλεγμονής, όπου εκτελούν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και ενεργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν ανοσορρυθμιστικές κυτταροκίνες και φροντίζουν για την αποκομιδή ανεπιθύμητων κυτταρικών υπολειμμάτων, που προέρχονται από βλάβες του ΚΝΣ.

2.4 Ο εγκέφαλος

Στον εγκέφαλο διακρίνονται δύο περιοχές: η εξωτερική φαιά ουσία, που αποτελείται από κυτταρικά σώματα νευρώνων, δένδριτες, μικρογλοιακά κύτταρα και τριχοειδή, και η εσωτερική λευκή ουσία, που αποτελείται κυρίως από εμμύελους νευράξονες.

2.5 Ο νωτιαίος μυελός

Στο νωτιαίο μυελό διακρίνονται επίσης οι δύο περιοχές της φαιάς και της λευκής ουσίας. Σε αντίθεση όμως με τον εγκέφαλο, η φαιά ουσία βρίσκεται στο εσωτερικό του νωτιαίου μυελού σε σχήμα πεταλούδας και αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα και τους δένδριτες των νευρώνων. Η λευκή ουσία, που περιβάλλει τη φαιά ουσία, αποτελείται από εμμύελες νευρικές ίνες, νευρογλοία και αιμοφόρα αγγεία (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση διαγράμματος τομής νωτιαίου μυελού. Διακρίνεται εξωτερικά η λευκή ουσία (white matter), εσωτερικά η φαιά ουσία (grey matter) καθώς και οι θέσεις του πρόσθιου (ventral) και του οπισθίου (dorsal) κέρατος.
<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/the-nervous-system-35/the-central-nervous-system-202/spinal-cord-769-12002/>

2.6 Συνομιλία μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος

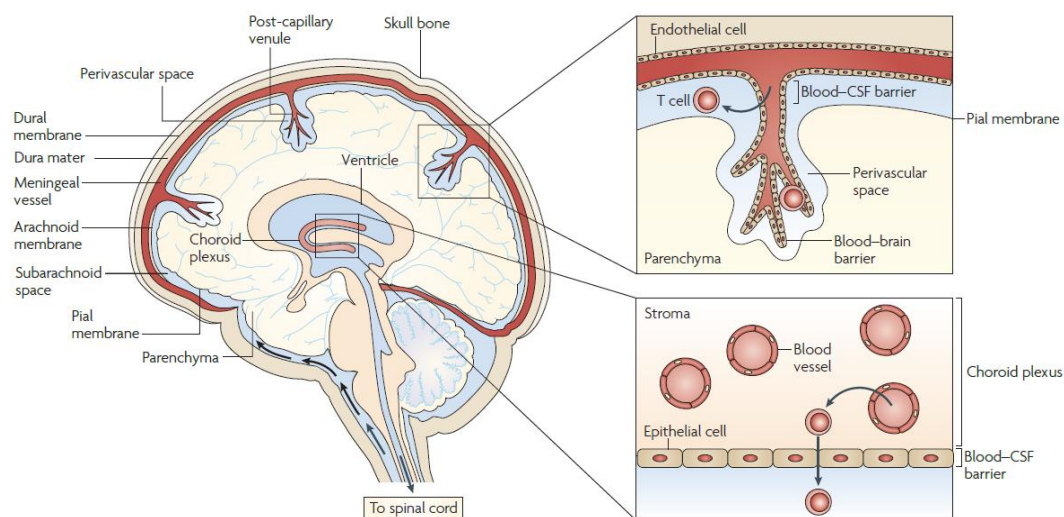
Το ΚΝΣ αποτελεί ένα δομικά και λειτουργικά μοναδικό σύστημα, αλλά, όπως και τα υπόλοιπα συστήματα των ζώντων οργανισμών, απαιτεί αποτελεσματικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς, προκειμένου να προστατεύεται από πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες. Σύμφωνα με μελέτες που ξεκίνησαν το 1921, σάρκωμα αρουραίου που μεταμοσχεύθηκε μέσα στο παρέγχυμα του εγκεφάλου ποντικών, αναπτύχθηκε κανονικά, ενώ όταν εμφυτεύθηκε υποδόρια ή ενδομυϊκά, απορρίφθηκε (25). Αυτό το εύρημα επεκτάθηκε στη συνέχεια σε μελέτες μεταφοράς βακτηρίων, ιών ή και ιστικών μοσχευμάτων στο παρέγχυμα του εγκεφάλου, όπου δείχθηκε ότι αυτά απέφυγαν την αναγνώριση από το ανοσοποιητικό σύστημα και αναπτύχθηκαν κανονικά (26). Το 1953 οι ερευνητές αναφέρθηκαν σε αυτήν την ιδιότητα του ΚΝΣ με τον όρο “ανοσολογικό προνόμιο” (immune privilege), διότι η χορήγηση αντιγόνων στο παρέγχυμα του ΚΝΣ δεν επάγει την ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης, η οποία θα μπορούσε να είναι επιβλαβής για τον οργανισμό (27). Πρόσφατα ευρήματα έρχονται να ανατρέψουν αυτή τη θεώρηση, δείχνοντας ότι το ΚΝΣ είναι μία περιοχή ενεργούς επιτήρησης (28) από το ανοσοποιητικό σύστημα, η οποία επιτυγχάνεται είτε με άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων των δύο συστημάτων (cell-cell contact), είτε μέσω διαλυτών παραγόντων που παράγονται από αυτά.

Η ανταλλαγή ουσιών μεταξύ του αίματος και του εξωκυττάριου υγρού στο ΚΝΣ είναι διαφορετική από τη διάχυση των ουσιών μεταξύ του αίματος και του εξωκυττάριου υγρού σε άλλα όργανα του σώματος. Ειδικοί φραγμοί ασκούν αυστηρό έλεγχο στις ουσίες που εισέρχονται στο ΚΝΣ, ελαχιστοποιώντας την ικανότητα πολλών

επιβλαβών ουσιών να φτάσουν στους νευρώνες, και ελαττώνοντας την πρόσβαση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ (29).

Οι φραγμοί αυτοί είναι τρεις: αίματος - εγκεφάλου (Blood Brain Barrier, BBB, εικόνα 2.3), αίματος - νωτιαίου μυελού (Blood Spinal Cord Barrier, BSCB) και αίματος - εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Blood Cerebrospinal Fluid Barrier, BCSFB).

Το ΚΝΣ αποτελεί έναν πολύτιμο ιστό, όπου πρέπει να επικρατεί μία λεπτή ισορροπία μεταξύ της ανοσολογικής επιτήρησης (immune surveillance) και του ανοσολογικού προνομίου (immune privilege). Ενώ στο υγιές ΚΝΣ πραγματοποιείται επιτήρηση ρουτίνας από τα T λεμφοκύτταρα, που εισέρχονται στον υπαραχνοειδή χώρο (subarachnoid space, SAS), η αυξημένη επιτήρηση οδηγεί σε αυτοανοσία. Έχει βρεθεί ότι στο ΚΝΣ υγιών ατόμων, T λεμφοκύτταρα μνήμης περνούν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), ανεξάρτητα από την αντιγονική τους ειδικότητα. Εκεί, εκτίθενται σε ποικιλία APCs, τα οποία παρουσιάζουν αντιγόνα του ΚΝΣ. Αν τα T λεμφοκύτταρα δεν αναγνωρίσουν κάποιο αντιγόνο, εξέρχονται από τον υπαραχνοειδή χώρο και εισέρχονται στην κυκλοφορία (30). Μία εναλλακτική υπόθεση είναι ότι, ενώ το ΚΝΣ υπολείπεται λεμφικού ιστού, το ΕΝΥ λειτουργεί ως λέμφος, και μέσω αυτού, αντιγόνα του ΚΝΣ μεταφέρονται στους τραχηλικούς λεμφαδένες (cervical lymph nodes), όπου ενεργοποιούνται τα T λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 2.3 Ανατομική οργάνωση του εγκεφάλου. Απεικονίζονται οι πιθανές οδοί εισόδου ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων (27). CSF: cerebrospinal fluid (εγκεφαλονωτιαίο υγρό), subarachnoid space (υπαραχνοειδής χώρος).

Ενώ οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσα στο ΚΝΣ θεωρούνται επιβλαβείς για τον ιστό, πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι μπορεί να ασκούν επωφελή, ακόμα και νευροπροστατευτική δράση (31). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να παράγουν νευροτροφικούς παράγοντες διαφόρων οικογενειών (32). Η αντίληψη της «νευροπροστατευτικής ανοσίας» έχει εμφανείς υπαινιγμούς για την παθογένεια νευρολογικών νόσων, όπου εμπλέκεται το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως τη σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ). Συνεπώς, η ισορροπία μεταξύ επιβλαβών και επωφελών συστατικών της φλεγμονής είναι κρίσιμη και οι μη επιλεκτικές ανοσοκατασταλτικές αγωγές είναι πιθανό να καταστέλλουν και τα δύο είδη δράσης της φλεγμονής. Η καλύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών και του τρόπου διατήρησης των ισορροπιών θα καθιστούσε εφικτή την ανάπτυξη ανοσοτροποποιητικών θεραπειών που θα κατέστειλαν την επιβλαβή δράση της φλεγμονής, διατηρώντας ή ενισχύοντας την επωφελή δράση της (33,34).

Κεφάλαιο 3: Σκλήρυνση κατά πλάκας

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ) είναι από τις πιο συχνές παθήσεις του ΚΝΣ, ωστόσο η αιτιολογία της δεν έχει διαλευκανθεί και η πορεία της είναι απρόβλεπτη. Αποτελεί την κύρια αιτία νευρολογικής αναπηρίας σε νέους ανθρώπους στις δυτικές κοινωνίες (Βόρεια Αμερική και Ευρώπη), όπου επηρεάζει περισσότερα από 2,5 εκατομμύρια άτομα (35). Η ΣΚΠ έχει επιπτώσεις στη λειτουργία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, και οφείλεται σε απώλεια της μυελίνης και εκφυλισμό των νευρώνων. “Κατά πλάκας” ονομάζεται λόγω των πολλαπλών περιοχών απομυελίνωσης που παρατηρούνται στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό, οι οποίες εμφανίζονται σαν πλάκες, ενώ “σκλήρυνση” ονομάζεται λόγω του ουλώδους ιστού που σχηματίζεται και παρεμποδίζει τη ροή μηνυμάτων μεταξύ των νευρών και μεταξύ μυών και νευρών.

Η ΣΚΠ εμφανίζεται σε γενετικά ευάλωτα άτομα, ενώ καταλυτική είναι και η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Ανάλυση του γονιδιώματος σε διαφορετικούς πληθυσμούς και γεωγραφικές περιοχές, με τη χρήση τεχνολογιών αιχμής, δείχνει ότι ένα ή περισσότερα ευπαθή γονίδια στο χρωμόσωμα 6p21 πιθανά ευθύνονται για το 10-60% του κινδύνου εμφάνισης ΣΚΠ (36). Στα γονίδια αυτά συγκαταλέγονται τα μόρια μείζονος ιστοσυμβατότητας HLA-DRB1, HLA-DB5, HLA-DQA1 και HLA-DQB2 (37). Επιπλέον, στα γονίδια που ενισχύουν τον κίνδυνο κληρονομικής εμφάνισης της ΣΚΠ συγκαταλέγονται οι α αλυσίδες των υποδοχέων της IL-7 και της IL-2 (38). Πιθανή θεωρείται επίσης, η πυροδότηση της ΣΚΠ από μικροοργανισμούς, που ενεργοποιούν ανοσολογική απόκριση έναντι εαυτών αντιγόνων του ΚΝΣ, είτε μέσω μοριακής μίμησης, είτε μέσω παραγωγής σημάτων κινδύνου (Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs). Στο πλαίσιο αυτό, παθογόνοι ιοί, όπως ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 6 (Herpes Simplex Virus-6, HSV-6) και ο ρετροϊός Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV), έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ΣΚΠ (21).

3.1.1 Μορφές σκλήρυνσης κατά πλάκας

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια εξαιρετικά ετερογενής νόσος που εμφανίζεται με τις ακόλουθες μορφές, ανάλογα με τα συμπτώματα, το χρόνο και τη διάρκεια εκδήλωσής τους (VI):

i. Πρωτοπαθής προϊούσα μορφή (Primary progressive MS – PPMS). Προοδευτικώς επιδεινούμενη συμπτωματολογία, η οποία μπορεί να διακόπτεται από μικρές περιόδους σταθερότητας ή βελτίωσης. Αφορά στο 15% των ασθενών και είναι η πιο δύσκολη μορφή διότι ανταποκρίνεται λιγότερο στις διάφορες θεραπείες (35).

ii. Δευτεροπαθής προϊούσα μορφή (Secondary progressive MS – SPMS). Η αρχική πορεία της νόσου χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις αλλά μετά από έτη διαπιστώνεται προοδευτική εξέλιξη, κατά την οποία μπορεί να εμφανισθούν υποτροπές, περίοδοι σταθερότητας ή και ήπιες υφέσεις των συμπτωμάτων.

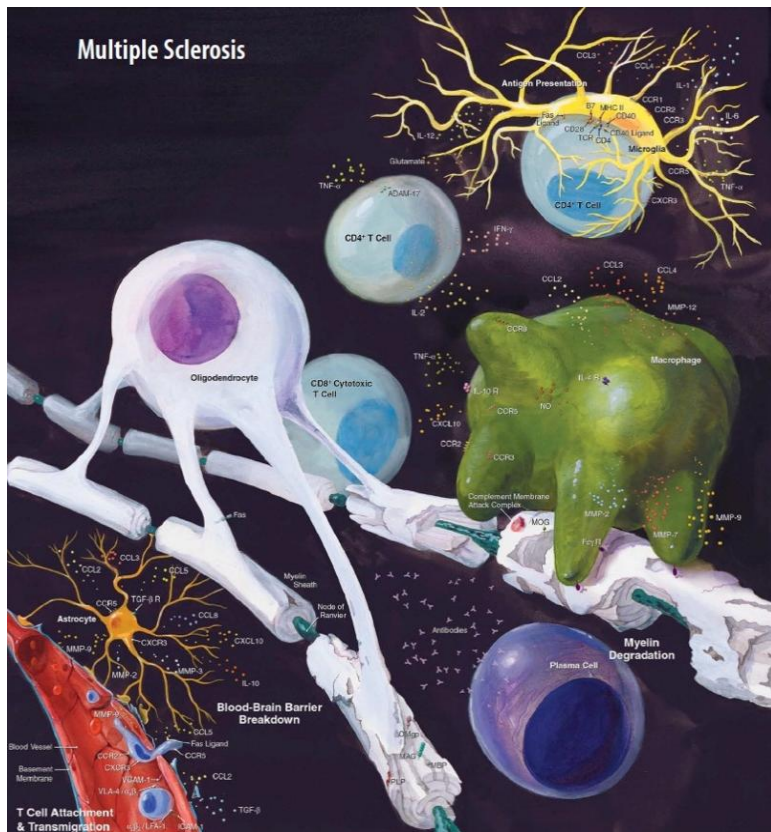
iii. Υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα μορφή (Relapsing-Remitting MS – RRMS). Το 85% των ασθενών εμφανίζουν σαφώς καθοριζόμενες υποτροπές με πλήρη ή μερική αποκατάσταση (35). Μετά από 8-20 χρόνια η πλειονότητα των ασθενών εισέρχεται σε δευτεροπαθή προϊούσα μορφή.

iv. Προοδευτική - υποτροπιάζουσα μορφή (Progressive-Relapsing MS – PRMS). Οι ασθενείς εμφανίζουν προοδευτική εξέλιξη των συμπτωμάτων της νόσου, αλλά με σαφείς, οξείες υποτροπές οι οποίες υφίστανται πλήρως ή μερικώς. Η πορεία της νόσου μεταξύ των υποτροπών χαρακτηρίζεται από προοδευτική επιδείνωση.

3.1.2 Στάδια και μοριακός μηχανισμός στην ΣΚΠ

Η θεώρηση που κυριαρχεί σήμερα είναι ότι η ΣΚΠ αποτελεί μία πρωτογενώς αυτοάνοση νόσο, όπου απορρυθμισμένα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα της περιφέρειας εισέρχονται στο ΚΝΣ, όπου μαζί με μακροφάγα και B λεμφοκύτταρα προχωρούν σε απομυελίνωση και εκφυλισμό των νευρώνων (39) (Εικόνα 3.1). Το πρότυπο αυτό ονομάζεται 'outside-in' και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

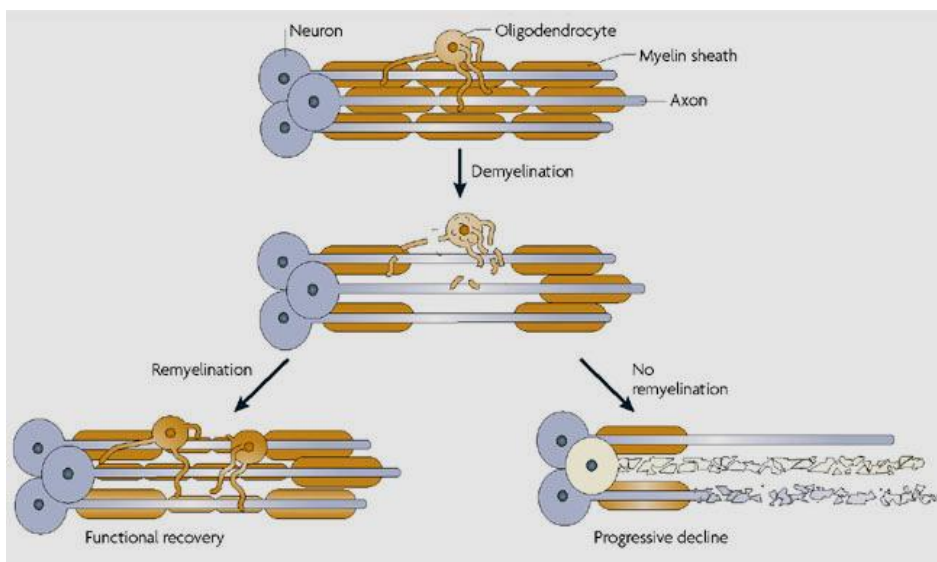
i. Φλεγμονή του ΚΝΣ: Τα αυτοδραστικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται στην περιφέρεια αφού αναγνωρίσουν το αντίστοιχο αντιγόνο, με μηχανισμούς που δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι παράγοντες που συμβάλλουν χαρακτηριστικά στη δημιουργία του προφλεγμονώδους περιβάλλοντος περιλαμβάνουν κυτταροκίνες



Εικόνα 3.1 Η παθολογία της ΣΚΠ έχει χαρακτηριστικά σημάδια αυτοάνοσης διαταραχής, περιλαμβανομένης φλεγμονώδους απόκρισης, διάρρηξης του ΑΕΦ καθώς και διήθησης του ΚΝΣ από λευκοκύτταρα. Η ΣΚΠ συνοδεύεται από μία σειρά αλλαγών στα ενδοθήλια των αιμοφόρων αγγείων, στα κύτταρα που εδρεύουν στο ΚΝΣ και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (http://www.rndsystems.com/poster_detail_objectname_autoimmunity.aspx).

που εκκρίνονται από τα Τ και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως IL-12, IFN-γ και IL-17. Τα ενεργοποιημένα αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα κινούνται προς τον ΑΕΦ μέσω χημειοτακτικών μορίων, δεσμεύονται σε αυτόν συνδεδόμενα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω μορίων πρόσδεσης, όπως ιντεγκρίνες (LFA-1 και VLA-4) και σελεκτίνες (ICAM-1 και VCAM-1), διαπερνούν τη μεσοκυττάρια ουσία με τη βοήθεια ενζύμων αποδόμησης, όπως των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-9), και εισέρχονται στο ΚΝΣ (Εικόνα 3.1). Μέσα στο ΚΝΣ, τα Τ λεμφοκύτταρα επανενεργοποιούνται από μικρογλοιακά κύτταρα και ακολούθως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι IFN-γ, IL-23, και TNF-α, και χημειοκίνες, όπως οι RANTES, IP-10 και IL-8, επιστρατεύουν και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος της περιφέρειας, όπως μονοκύτταρα, CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα και Β λεμφοκύτταρα (40).

ii. Απομυελίνωση: Τα Τ λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και η μικρογλοία μέσα στο ΚΝΣ εκκρίνουν μεταξύ άλλων IL-23, IFN- γ και TNF και καταστρέφουν τα ολιγοδενδροκύτταρα. Παράλληλα, τα πλασματοκύτταρα παράγουν αντισώματα έναντι της μυελίνης, τα οποία αλληλεπιδρούν με το σύστημα του συμπληρώματος, προκαλώντας απώλεια του ελύτρου μυελίνης, γνωστή ως απομυελίνωση (41) (Εικόνα. 3.2). Οι περιοχές με απομυελίνωση αποκαλούνται “αλλοιώσεις” ή “πλάκες” και εντοπίζονται με μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI) στη λευκή ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Οι νευράξονες χωρίς μυελίνη δεν μπορούν πλέον να μεταδώσουν σωστά τα ηλεκτρικά σήματα, και αυτό συνεπάγεται νευρολογικά συμπτώματα, που εκδηλώνονται τυπικά κατά τη διάρκεια υποτροπής της νόσου.

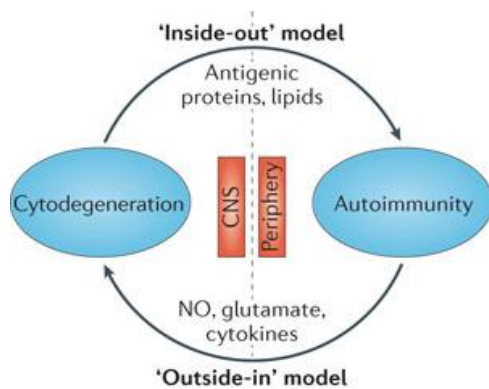


Εικόνα 3.2 Διεργασία απομυελίνωσης της λευκής ουσίας. Η φλεγμονώδης δράση των κυττάρων στο ΚΝΣ προκαλεί τη λεπτύνση ή την πλήρη απώλεια του στρώματος της μυελίνης, και πιο σπάνια, την αποκοπή των νευρικών αξόνων ή των διακλαδώσεών τους. Όταν η μυελίνη αποικοδομηθεί, τα νευρικά κύτταρα δεν μπορούν πλέον να μεταφέρουν σωστά τα ηλεκτρικά τους σήματα (42).

iii. Νευροπροστασία και νευροεκφυλισμός: Μόλις υποχωρήσει η φλεγμονή, η κατεστραμμένη μυελίνη ενδέχεται να αντικατασταθεί, ώστε να αποκατασταθεί η νευρολογική λειτουργία, όπως φαίνεται από τον παροδικό χαρακτήρα της έξαρσης της ΣΚΠ. Στην αποκατάσταση συμβάλλουν η απομάκρυνση των υπολειμμάτων μυελίνης από τα φαγοκύτταρα, η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των

αστροκυττάρων, η επικράτηση νευροπροστατευτικών κυτταροκινών, όπως των IL-10 και TGF- β , η έκκριση αυξητικών παραγόντων από τα κύτταρα του ΚΝΣ, η ενεργοποίηση πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων και η αποκατάσταση των απομυελινωμένων περιοχών από τα εναπομείναντα ολιγοδενδροκύτταρα (40). Ωστόσο, σε περιπτώσεις σοβαρής και παρατεταμένης απομυελίνωσης, οι νευρώνες μπορεί να καταστραφούν προτού αντικατασταθεί το προστατευτικό περίβλημα της μυελίνης. Οι εκφυλισμένοι νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα αντικαθίστανται από ουλώδη ιστό, ο οποίος περιορίζει τη δυνατότητα ανασυγκρότησης του ιστού, οπότε ο νευροεκφυλισμός αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης μόνιμων νευρολογικών βλαβών (35).

Το 'outside-in' πρότυπο που περιγράφηκε παραπάνω, ανταγωνίζεται μία νέα θεώρηση, το inside-out πρότυπο, κατά το οποίο η αρχική δυσλειτουργία συμβαίνει μέσα στο ΚΝΣ, παρόμοια με άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως τη νόσο του Alzheimer και του Parkinson. Στο πλαίσιο του προτύπου αυτού, ως αρχικό γεγονός της ΣΚΠ θεωρείται ο πρωτογενής εκφυλισμός (πιθανά εντοπισμένος στο σύμπλεγμα ολιγοδενδροκυττάρων-μυελίνης), όπου, αντιγονικά συστατικά που απελευθερώνονται, προάγουν δευτερευόντως φλεγμονώδη απόκριση στον ξενιστή, οδηγώντας σε περαιτέρω εκφυλισμό (43) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση, όπου αντιπαρατίθενται τα δύο πρότυπα επαγωγής της ΣΚΠ (42).

Η άποψη αυτή στηρίζεται σε ευρήματα από ασθενείς, στους οποίους, ενώ εντοπίστηκαν αλλοιώσεις στη φαιά ουσία του εγκεφαλικού φλοιού, τα κύτταρα φλεγμονής και τα φαγοκύτταρα ήταν ελάχιστα, και ο ΑΕΦ δεν παρουσίαζε σημεία διάρρηξης, όπως θα αναμενόταν (42).

3.2 Πειραματικά ζωικά πρότυπα της ΣΚΠ

Προκειμένου να διερευνηθούν οι παθογενετικές, κλινικές και θεραπευτικές πτυχές της ετερογενούς ανθρώπινης νόσου, έχουν αναπτυχθεί διάφορα ζωικά πρότυπα, κυρίως σε ποντίκια (44). Για την επιλογή του κατάλληλου ζωικού προτύπου της ΣΚΠ, πρέπει κανείς να αναρωτηθεί τι ακριβώς προσπαθεί να προτυποποιήσει, δεδομένου ότι η ΣΚΠ έχει τέσσερις μορφές, η καθεμία από τις οποίες παρουσιάζει ετερογένεια σε διαφορετικά επίπεδα. Έχουν αναπτυχθεί πρότυπα απομυελίνωσης, τα οποία δημιουργούνται με διάφορους τρόπους, όπως με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με τοξικούς ή ιικούς παράγοντες, καθώς και με τεχνικές διαγένεσης (45). Αναλυτικά, τα πρότυπα αυτά περιγράφονται παρακάτω:

i. Πρότυπα που διαμεσολαβούνται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος:

Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) βοηθά στη μελέτη των ανοσολογικών πτυχών της ΣΚΠ και πραγματοποιείται με δύο τρόπους: η ενεργητική ΠΑΕ επάγεται με ανοσοποίηση με κατάλληλα αντιγόνα σε ποντικούς, αρουραίους και μη-ανθρώπινα πρωτεύοντα, και η παθητική ΠΑΕ επάγεται με τη χορήγηση αντιγονοειδικών T λεμφοκυττάρων από δότες που νοσούν, σε υγιείς δέκτες. Το πρότυπο της ΠΑΕ περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια (σ. 47).

ii. Τοξικά πρότυπα απομυελίνωσης και επαναμυελίνωσης:

Η κατανόηση των μηχανισμών επαναμυελίνωσης των νευραξόνων είναι σημαντική για το χειρισμό και πιθανά την ίαση της προοδευτικής ΣΚΠ, ενώ δεν είναι δυνατή με τη χρήση της ΠΑΕ (45). Η μελέτη της επαναμυελίνωσης καθίσταται εφικτή με τη χορήγηση τοξινών, σύμφωνα τα παρακάτω πρότυπα: α. το cuprizone, ένα χηλικό μόριο που δεσμεύει ιόντα χαλκού, δίνεται μέσω της τροφής σε ποντίκια ευπαθών στελεχών για 4-6 εβδομάδες και προκαλώντας δυσλειτουργία του μιτοχονδριακού συμπλέγματος IV, οδηγεί σε τοξικότητα των ολιγοδενδροκυττάρων, τα οποία αποπίπτουν 3 εβδομάδες μετά τη χορήγηση του cuprizone. Μετά την απομάκρυνση της τοξίνης από την τροφή, επακολουθεί επαναμυελίνωση. β. Αντίστοιχα, μικροένωση με λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) στη λευκή ουσία οδηγεί σε αντίστοιχο φαινότυπο, προκαλώντας φαγοκυττάρωση της μυελίνης (43).

iii. **Ιικά πρότυπα:**

Εκτός από τον ρόλο των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στη ΣΚΠ, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι, και τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό της ανοσολογικής απόκρισης στο ΚΝΣ (46). Η ενεργητική ΠΑΕ ενεργοποιεί κατά κύριο λόγο CD4⁺ και όχι CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Ο περιορισμός αυτός έχει αρθεί με τη χρήση ανασυνδυασμένων ιών, που εκφράζουν μυελινικά αντιγόνα και ενεργοποιούν τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ (47). Επιπλέον, μια ιδιαίτερη κατηγορία προτύπου απομυελίνωσης είναι με τη χρήση ιών, όπως του Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV) και του ιού της ηπατίτιδας Mouse Hepatitis Virus (MHV), όταν αυτοί χορηγούνται στο ΚΝΣ ποντικών. Πιο σπάνια χρησιμοποιείται η μόλυνση με τους ιούς Semliki Forest Virus (SFV) και Sindbis Virus (SV) (48).

i.v. **Γενετικά πρότυπα:**

Για τη μελέτη των γεγονότων που επάγουν αυτοανοσία στο ΚΝΣ προκαλώντας τη ΣΚΠ, καταλληλότερη είναι η χρήση διαγονιδιακών ζώων, στα οποία η νόσος εκδηλώνεται αυθόρμητα. Σε αυτά τα πρότυπα συγκαταλέγονται ανθρωποποιημένα διαγονιδιακά ποντίκια, που εκφράζουν TCR ειδικό για πεπτίδια της μυελίνης, σε συνδυασμό με ανθρώπινα μόρια ιστοσυμβατότητας (49). Σε κάθε περίπτωση, το ποσοστό αυθόρμητης εμφάνισης της νόσου ποικίλλει ανάλογα με το διαγονίδιο που έχει χρησιμοποιηθεί.

3.2.1 Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)

Η ΠΑΕ είναι μια φλεγμονώδης νόσος του ΚΝΣ, που επάγεται με ανοσοποίηση με κατάλληλα αντιγόνα και διαμεσολαβείται από T λεμφοκύτταρα (50). Αποτελεί το πιο διαδεδομένο ζωικό πρότυπο της ΣΚΠ, αναπαριστώντας ανοσολογικές πτυχές της ανθρώπινης νόσου, αλλά όχι τη νόσο στο σύνολό της (51). Η απομυελινωτική εγκεφαλομυελίτιδα εμφανίστηκε αρχικά σε ανθρώπους, ως παρενέργεια του εμβολίου της λύσσας που παρήγαγε ο Louis Pasteur το 1885. Συγκεκριμένα, μετά τον εμβολιασμό με απενεργοποιημένο ιό της λύσσας που είχε αναπτυχθεί στον εγκέφαλο κουνελιού, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις λόγω φλεγμονής στον εγκέφαλο των ανθρώπων. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι οι αλλοιώσεις δεν προέρχονταν από τον

απενεργοποιημένο ιό, αλλά από αντιγόνα του εγκεφάλου του κουνελιού, που περιείχε το εμβόλιο (35). Οι μετέπειτα προσπάθειες των Rivers (52), Kabat (53) και Freund (54) να δημιουργήσουν πειραματικά ζωικά πρότυπα επαγόμενης ανοσίας στο νευρικό σύστημα οδήγησε στην καθιέρωση της ΠΑΕ. Ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο των ζώων (γένος, είδος, στέλεχος), το αντιγόνο του ΚΝΣ που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση, και τον τρόπο επαγωγής της ασθένειας, εμφανίζονται διαφορές στους παθογόνους μηχανισμούς και κατ' επέκταση στην κλινική εικόνα (55). Αυτό αποτελεί μεθοδολογικό πλεονέκτημα εφόσον, εφαρμόζοντας επιλεγμένο τρόπο επαγωγής της ΠΑΕ μπορεί να μελετηθούν αυτόνομα διάφοροι μηχανισμοί ανάπτυξης της νόσου.

Ο συνηθέστερος τρόπος επαγωγής της ΠΑΕ είναι η ενεργητική ανοσοποίηση ζώων, δηλαδή η ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι αντιγόνων του ΚΝΣ (56). Τα μυελινικά αντιγόνα αναμειγνύονται με ανοσοενισχυτικό του Freund για το σχηματισμό του γαλακτώματος ανοσοποίησης, το οποίο εμπλουτίζεται με *Mycobacterium tuberculosis* που ενεργοποιεί τους μηχανισμούς φυσικής ανοσίας. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται τοξίνη από το βακτήριο *Bordetella pertussis* (PTx) σε ενέσιμη μορφή, η οποία έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί μηχανισμούς φυσικής ανοσίας μέσω του υποδοχέα τύπου Toll 4 (TLR4) (57). Το πρώτο εγκεφαλιτογόνο μόριο που προσδιορίστηκε ήταν η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP). Σύντομα προσδιορίστηκαν και άλλα εγκεφαλιτογόνα που μπορούσαν να επάγουν ΠΑΕ, όπως η γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται στη μυελίνη (Myelin-Associated glycoprotein, MAG), η μυελινική ολιγοδενδροκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη (Myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG), και η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (Proteolipid Protein, PLP) (58).

Ένας άλλος τρόπος επαγωγής της ΠΑΕ, είναι η παθητική ανοσοποίηση, η οποία αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά, όταν, κύτταρα από τους λεμφαδένες αρουραίων, που είχαν ανοσοποιηθεί με ομογενοποίημα νωτιαίου μυελού, μεταφέρθηκαν σε υγιή ζώα, μεταφέροντας και την ΠΑΕ (59). Στη συνέχεια, η παθητική ανοσοποίηση πραγματοποιήθηκε με μεταφορά μόνο T λεμφοκυττάρων και στη συνέχεια με μεταφορά μόνο MHC II περιοριζόμενων T λεμφοκυττάρων, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ΠΑΕ επάγεται από CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Σήμερα πλέον, η παθητική ΠΑΕ χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η παθογένεια των CD4⁺ T






λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών ενεργοποιημένων έναντι μυελινικών αντιγόνων, όπως των Th1 και Th17 κυττάρων (60). Με αυτό τον τρόπο αποδείχθηκε ότι οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί των T λεμφοκυττάρων επάγουν διαφορετική παθολογία της ΠΑΕ, υποδηλώνοντας ότι η ποικιλομορφία της παθογένειας της ΣΚΠ μπορεί να οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους δραστικών T λεμφοκυττάρων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη της νόσου (60).

Στο πλαίσιο της μεταφραστικής έρευνας, με τη χρήση της ΠΑΕ ως πρότυπο της ΣΚΠ, έχουν προσδιοριστεί μοριακοί και κυτταρικοί στόχοι που οδήγησαν στην ανάπτυξη ιδιαίτερα αποτελεσματικών θεραπειών για τη ΣΚΠ, όπως το Glatiramer Acetate (Copaxone) και το Natalizumab. Αντίθετα, ενώ η χορήγηση παραγόντων αδρανοποίησης του TNF ήταν επωφελής κατά την ΠΑΕ, στην κλινική πράξη είχε επιβλαβή αποτελέσματα. Φαίνεται επομένως ότι, το πρότυπο της ΠΑΕ, όπως και κάθε ζωικό πρότυπο, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Επιπλέον, ο μικρός αριθμός ζώων και το βραχυπρόθεσμο διάστημα των μελετών αδυνατούν να προβλέψουν πιθανές χρόνιες συνέπειες της χορήγησης των εκάστοτε παραγόντων. Παρ' όλα, αυτά η ΠΑΕ αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο πρότυπο, γιατί μπορεί να δώσει γρήγορα και αποτελεσματικά ενδείξεις για την επίδραση ενός υπό εξέταση παράγοντα στην *in vivo* κατάσταση, προσομοιάζοντας διαφορετικές εκδηλώσεις της ΣΚΠ (61).

3.2.2 Μορφές και αξιολόγηση της ΠΑΕ

Το πρότυπο της τυπικής ΠΑΕ προκαλεί σταδιακή, ανιούσα παράλυση, που ξεκινά από την ουρά και καταλήγει στα πρόσθια άκρα του ζώου, ενώ χαρακτηρίζεται από φλεγμονή κυρίως του νωτιαίου μυελού σε αντίθεση με τα πρότυπα της άτυπης ΠΑΕ, που χαρακτηρίζονται από αυξημένη φλεγμονή του εγκεφάλου (62).

Στο πλαίσιο της τυπικής ΠΑΕ, ανάλογα με το είδος και το γενετικό υπόβαθρο του ζώου καθώς και με το μυελινικό αντιγόνο που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση, επάγονται τρεις μορφές ασθένειας: η δριμεία-μονοφασική μορφή, η προοδευτική-υποτροπιάζουσα μορφή και η χρόνια μορφή. Η κλινική εικόνα των ζώων με ΠΑΕ περιγράφεται με βάση μια αυθαίρετη κλίμακα βαθμών, που βασίζεται στα σταδιακά εξελισσόμενα συμπτώματα της νόσου (Εικόνα. 3.4).

Score	Mouse posture	Βαθμός κλινικής εικόνας (clinical score)	Κλινικό σύμπτωμα
A		0	Φυσιολογική κατάσταση – απουσία συμπτωμάτων
B		0.5	Παράλυση άκρου ουράς
C		1	Παράλυση ουράς από τη βάση
		2	Αδυναμία οπίσθιων άκρων – δυσκολία συντονισμένης κίνησης
		2.5	Παράλυση ενός οπίσθιου άκρου
D		3	Παράλυση και των δύο οπίσθιων άκρων
		3.5	Αδυναμία των πρόσθιων άκρων
		4	Παράλυση των πρόσθιων άκρων
E		5	Ετοιμοθάνατο ζώο – απουσία κίνησης, κρύο σώμα, μεταβολές στην αναπνοή

Εικόνα 3.4 Η κλίμακα βαθμών κλινικής εικόνας περιγράφει τα συμπτώματα που εμφανίζονται στην ΠΑΕ κατά την κλινική αξιολόγηση του ζώου. Ως τελικό σημείο ορίζεται η συμπτωματολογία που αντιστοιχεί στον κλινικό βαθμό 5, οπότε τα ζώα υπόκεινται σε ευθανασία.

3.3 Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την ΣΚΠ

Ο Αμερικάνικος οργανισμός ελέγχου φαρμάκων και τροφίμων (Food and Drug Administration, FDA –USA) έχει εγκρίνει θεραπείες που τροποποιούν την έκβαση της ΣΚΠ (Disease-modifying therapies, DMTs), όπως αναφέρεται παρακάτω (63):

- Διάφοροι τύποι IFN-I: ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IFNβ-1a που παράγεται από κύτταρα θηλαστικών (Avonex®, Biogen-Idex), ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IFNβ-1b που παράγεται από βακτηριακά κύτταρα (Betaseron®/Betaferon® Berlex), και τροποποιημένη ανθρώπινη IFNβ-1a που παράγεται από κύτταρα θηλαστικών (Rebif®, MerckSerono). Η IFN-β ενεργοποιεί την παραγωγή της IL-10 καθώς και νευροτροφικούς παράγοντες, εμποδίζει τη διάρρηξη του ΑΕΦ, παρεμποδίζοντας τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και -9, και περιορίζει την προσκόλληση των T λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ΑΕΦ. Πρόσφατα εγκρίθηκε η χορήγηση IFN-β-1a συζευγμένης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (Polyethylene glycol, PEG) με την ονομασία Plegridy® (Biogen-Idex). Η προσθήκη του PEG οδηγεί στην παραμονή της IFN-β-1a στην κυκλοφορία του οργανισμού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, λόγω αύξησης του μεγέθους της, και συνεπώς αύξησης του χρόνου ημιζωής της IFN-β-1a.
- Το natalizumab (Tysabri®, Biogen-Idex και Elan), ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) που στοχεύει την α4β1 ιντεγκρίνη (VLA-4) των T λεμφοκυττάρων (σ. 43), και παρεμποδίζει την είσοδό τους στο ΚΝΣ (64).

- Το fingolimod (Gilenya®, Novartis), έναν ανταγωνιστή του υποδοχέα της φωσφορικής σφιγγοσίνης-1 (S1P1) των T λεμφοκυττάρων, που παρεμποδίζει την έξοδο των κυττάρων αυτών από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, και συνεπώς την είσοδό τους στο ΚΝΣ (σ. 31-32).
- Το Glatiramer Acetate (GA) (Copaxone®, Teva), ένα τυχαίο πολυμερές τεσσάρων αμινοξέων των Ala, Lys, Glu και Tyr με ποικίλο μήκος και καθορισμένη μοριακή αναλογία, που ανταγωνίζεται τα αυτοαντιγόνα για πρόσδεσή τους σε MHC- II, προωθεί την ανοσολογική απόκριση προς Th2 πρότυπο, και επάγει νευροτροφικούς παράγοντες στην περιοχή του εγκεφάλου (65-67).
- Το μονοκλωνικό αντίσωμα Alemtuzumab (Lemtrada®, Sanofi) προσδένεται στα λευκοκύτταρα (anti-CD52), προκαλώντας τη λύση τους και εγκρίθηκε το Νοέμβριο του 2014.
- Ο παράγοντας Teriflunomide (Aubagio®, Sanofi) αναστέλλει τη βιοσύνθεση πυριμιδίνης, και συνεπώς το διπλασιασμό των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, εμποδίζοντας τη δράση της διϋδροοροτικής δεϋδρογενάσης. Η χορήγησή του από το στόμα (*per os* χορήγηση) εγκρίθηκε το 2013.
- Ο παράγοντας BG-12 ή dimethyl fumarate (Tecfidera®, Biogen-Idec), εστέρας φουμαρικού οξέος, μειώνει τη μετανάστευση μέσω ενδοθηλίων και ενεργοποιεί αντιοξειδωτικά μονοπάτια, προσφέροντας νευροπροστασία, ενώ ο ακριβής μηχανισμός δράσης παραμένει άγνωστος. Η χορήγησή του από το στόμα (*per os*) εγκρίθηκε το 2013.

Στη διαδικασία κλινικών δοκιμών φάσης III βρίσκονται τα μονοκλωνικά αντισώματα Rituximab (anti-CD20) και Daclizumab (anti-CD25), που προσδένονται στα B κύτταρα και τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα, ενώ στη διαδικασία κλινικών δοκιμών φάσης III βρίσκεται ένας ακόμη παράγοντας που χορηγείται από το στόμα (*per os* χορήγηση), το Laquinimod.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την ανάπτυξη νευροπροστατευτικών παραγόντων, για τη διατήρηση της ακεραιότητας των νευραξόνων και την ενίσχυση της επαναμυελίνωσης και αναγέννησής τους (68).

Μολονότι η επιστημονική κοινότητα έχει προχωρήσει στον προσδιορισμό νέων θεραπευτικών παραγόντων, η τάση που επικρατεί είναι η βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχοντων. Στο πλαίσιο αυτό, η θεραπεία με IFN-β συνεχίζει να βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας. Σε μία πρόσφατη μελέτη, ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα νωτιαίου μυελού (hBMMSCs) χρησιμοποιήθηκαν ως οχήματα χορήγησης (delivery vehicles) του γονιδίου της *ifnb*. και παρεμπόδισαν την εξέλιξη της ΠΑΕ (69). Η διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών ανοίγει νέους δρόμους προς τη βελτιστοποίηση της ανοσοτροποποιητικής θεραπείας με IFN-β και το σχεδιασμό νέων στρατηγικών χορήγησής της.

Κεφάλαιο 4. Η βιολογία και ο ρόλος των ιντερφερονών (IFN)

4.1 IFNs και IFNRs

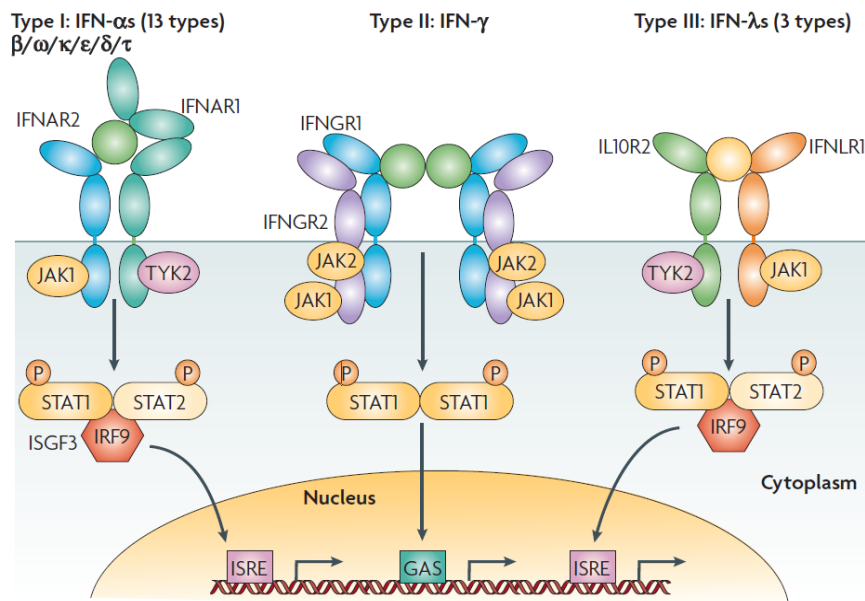
Οι ιντερφερόνες (interferons, IFNs) ανήκουν στη μεγάλη κατηγορία των κυτταροκινών (σ.24) και ανακαλύφθηκαν από τους Alick Isaacs και Jean Lindenmann (70). Επιδράζοντας τμήματα της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου μαζί με ανενεργό ιό γρίπης, παρατηρήθηκε η έκκριση ενός διαλυτού παράγοντα, ο οποίος παρενέβαινε (interfered) στον πολλαπλασιασμό του ζωντανού ιού σε μετέπειτα επώαση. Στη δημοσίευση των αποτελεσμάτων τους, το 1957, αναφέρθηκαν σ' αυτόν τον αντιικό παράγοντα με τον όρο ιντερφερόνη (interferon). Το 1978, η IFN απομονώθηκε και καθαρίστηκε για πρώτη φορά, προκειμένου να αναλυθεί και να χαρακτηριστεί (71).

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί οι εξής τύποι ιντερφερονών (72) (Εικόνα 4.1):

i. **IFN τύπου I:** εδώ ανήκουν οι IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-δ, IFN-ε, IFN-τ, IFN-ω και IFN-ζ. Για την IFN-α έχουν περιγραφεί 13 υπότυποι: οι IFN-α1, IFN-α2, IFN-α4, IFN-α5, IFN-α6, IFN-α7, IFN-α8, IFN-α10, IFN-α13, IFN-α14, IFN-α16, IFN-α17 και IFN-α21. Για την IFN-β έχουν περιγραφεί 2 υπότυποι: οι IFN-β1 και IFN-β3. Τα γονίδια όλων των IFN τύπου I έχουν εντοπιστεί ως μία ομάδα στο χρωμόσωμα 9 στον άνθρωπο, και στο χρωμόσωμα 4 στο ποντίκι. Όλες οι IFNs τύπου I προσδέονται σε ένα συγκεκριμένο υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, τον IFNAR, ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες, την IFNAR1 και την IFNAR2 και εκφράζεται σε όλους τους εμπύρηνους κυτταρικούς τύπους.

ii. **IFN τύπου II:** μοναδικό μέλος είναι η IFN-γ. Είναι ένα αντιπαράλληλο ομοδιμερές, που προσδέεται σε συγκεκριμένο υποδοχέα, τον IFNGR, ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες, την IFNGR1 και την IFNGR2, και εκφράζεται σε όλους τους εμπύρηνους κυτταρικούς τύπους.

iii. **IFN τύπου III:** εδώ ανήκει η IFN-λ, η οποία έχει τρεις υπότυπους, οι οποίοι ονομάζονται IFN-λ1, IFN-λ2 και IFN-λ3 ή IL-29, IL-28A και IL-28B αντίστοιχα. Οι IFN-III συνδέονται με ένα σύμπλεγμα υποδοχέων, που αποτελείται από τον IL-10R2 (ή IL-10RB) και τον IFNLR1 (ή IL-28RA), και εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων του επιθηλίου και του ήπατος.



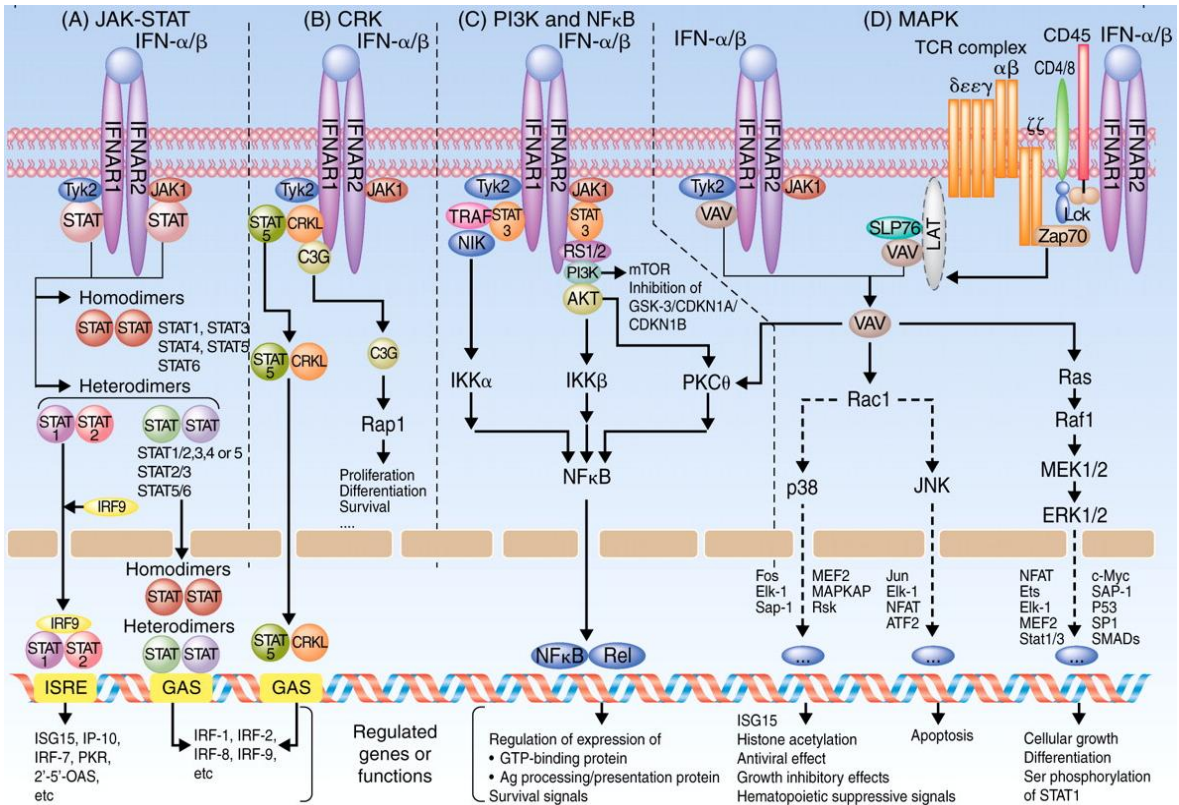
Εικόνα 4.1 Οι υπότυποι και οι αντίστοιχοι υποδοχείς των ιντερφερονών τύπου I, II και III, καθώς και τα επαγόμενα από αυτές μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (72).

4.2 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος των IFN-I

Παρ' όλο που υπάρχουν ενδείξεις για την ενεργοποίηση πολλών διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης των IFN-I, το JAK-STAT (JAK-STAT signaling pathway) είναι το καλύτερα μελετημένο (Εικόνα 4.1). Ο υποδοχέας IFNAR έχει δύο υπομονάδες, γνωστές ως α και β (IFNAR1 και IFNAR2 αντίστοιχα). Η β υπομονάδα του IFNAR έχει τρεις διαφορετικές ισομορφές – μία διαλυτή, την IFNAR2a, και δύο διαμεμβρανικές διαφορετικού μήκους, τις IFNAR2b και IFNAR2c. Οι διαφορετικές ισομορφές προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου. Για να είναι δυνατή η σηματοδότηση των IFN-I, απαιτείται η συνέκφραση των IFNAR1 και IFNAR2 υπομονάδων. Καθεμία από αυτές σχετίζεται δομικά με ένα μέλος της οικογένειας των JAK κινασών: η υπομονάδα IFNAR1 σχετίζεται με την TYK2 κινάση, ενώ η υπομονάδα IFNAR2 σχετίζεται με την JAK1 κινάση. Μελέτες πρόσδεσης δείχνουν ότι, μεταξύ των IFNAR1, IFN-I και IFNAR2 σχηματίζεται ένα τριμερές σύμπλεγμα σε στοιχειομετρία 1:1:1, ως διαδικασία δύο βημάτων. Ο συνδέτης αρχικά προσδένεται στη μία εκ των δύο υπομονάδων προσελκύνοντας στη συνέχεια τη δεύτερη υπομονάδα (72), σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο το τριμερές σύμπλεγμα. Ακολουθεί ενεργοποίηση των σχετιζομένων κινασών, προκαλώντας τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων

τυροσίνης στο κυτταροπλασματικό μέρος του υποδοχέα, οπότε σχηματίζονται θέσεις δέσμησης (docking sites) για τους STAT μεταγραφικούς παράγοντες (Signal Transducers and Activators of Transcription), οι οποίοι ενεργοποιούνται και φωσφορυλιώνονται. Από τις IFN-I ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 και STAT6. Μετά τη φωσφορυλίωσή τους, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή των STAT μετατοπίζονται ενδοπυρηνικά, όπου προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις υποκινητών διαφόρων ISG γονιδίων (IFN Stimulated Genes), επάγοντας τη μεταγραφή τους. Οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών συμπλεγμάτων στους υποκινητές των ISGs αντιστοιχούν σε στοιχεία που ονομάζονται ISREs, (IFN Stimulated Response Elements) ή GAS (IFN γ Activated Sites). Από τα εκατοντάδες ISGs γονίδια, υπάρχουν κάποια μόνο με στοιχεία ISREs ή GAS, ενώ υπάρχουν γονίδια που στον υποκινητή τους περιέχονται και τα δύο στοιχεία (73). Ένα σημαντικό μεταγραφικό σύμπλεγμα που επάγεται από τις IFN-I, είναι το ISGF3 (ISG Factor 3). Αποτελείται από το ετεροδιμερές φωσφορυλιωμένων STAT1 και STAT2, καθώς και από τον παράγοντα IRF9 (IFN Regulatory Factor 9). Το ISGF3 προσδέεται σε στοιχεία ISREs του υποκινητή ορισμένων ISG γονιδίων. Άλλα συμπλέγματα που επάγονται από τις IFN-I περιλαμβάνουν τα ομοδιμερή STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT4-STAT4, STAT5-STAT5 και STAT6-STAT6, και τα ετεροδιμερή STAT1-STAT2, STAT1-STAT3, STAT1-STAT4, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3 και STAT5-STAT6, τα οποία προσδένονται σε στοιχεία GAS του υποκινητή ISG γονιδίων.

Εκτός από τα παραπάνω μονοπάτια μεταγωγής σήματος, οι IFN-I μπορούν να ενεργοποιήσουν κι άλλα μονοπάτια, όπως τα CrkL (v-crkl sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like), PI3K (phosphoinositide 3-kinase), MAP κινασών (mitogen activated protein kinase) (Εικόνα 4.2). Κάποια από αυτά είναι ανεξάρτητα του μονοπατιού JAK-STAT, ενώ άλλα συνεργάζονται με παράγοντες STAT. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι, τα μονοπάτια MAPK και PI3K εμπεριέχουν ενεργοποίηση μοτίβων τυροσίνης, που βρίσκονται σε αρκετούς υποδοχείς κυτταροκινών, προτείνοντας ότι υπάρχει συνομιλία μεταξύ του IFNAR και άλλων υποδοχέων (74).



Εικόνα 4.2 Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μέσω του IFNAR, όπου φαίνεται η συνομιλία μεταξύ διαφορετικών μονοπατιών, η οποία εξαρτάται από το είδος και το βαθμό ενεργοποίησης του κυττάρου που αποκρίνεται (73).

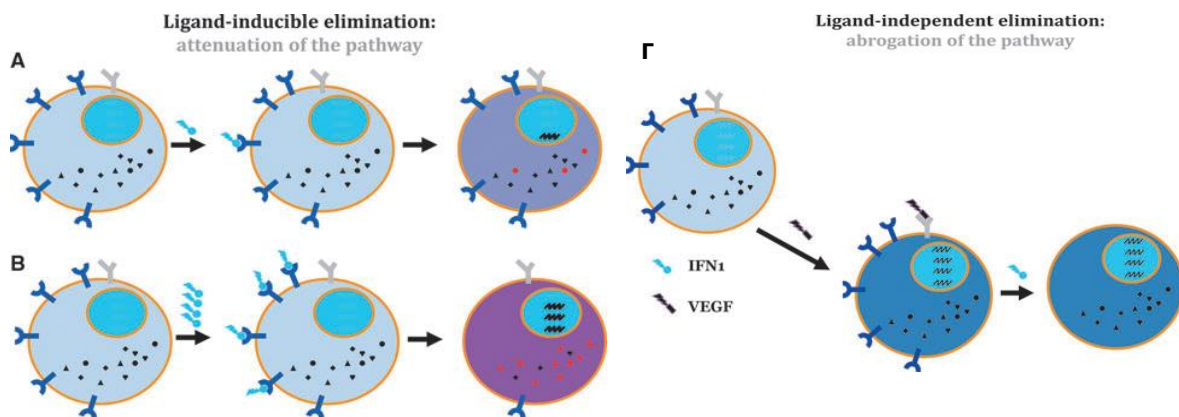
Η διαφορετική δράση των υποτύπων των IFN-I οφείλεται στη διαφορετική συγγένεια των συνδετών προς τον υποδοχέα, τη σταθερότητα του συμπλέγματος που σχηματίζεται σε κάθε περίπτωση, καθώς και τον αριθμό των IFNAR υπομονάδων στην επιφάνεια του κυττάρου, ο οποίος ρυθμίζεται μέσω μηχανισμών, που περιγράφονται παρακάτω (75-79).

4.2.1 Ρύθμιση μονοπατιού IFN-I

Όπως οι περισσότερες κυτταροκίνες, έτσι και οι IFN-I επάγουν ισορροπημένες αποκρίσεις. Τα σήματα ενεργοποίησης, που επάγουν αντιική δράση και προωθούν προφλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις, εξισορροπούνται από κατασταλτικά σήματα, που περιορίζουν την τοξικότητα προς τον ξενιστή (80). Η ρύθμιση αυτών των ανοσολογικών αποκρίσεων πραγματοποιείται σε πολλαπλά επίπεδα, ώστε να εξασφαλίζεται η άμυνα και η επιβίωση του ξενιστή:

ι. στο επίπεδο του υποδοχέα IFNAR:

Μετά την πρόσδεση του συνδέτη (Εικόνα 4.3Α και Β), το τριμερές σύμπλεγμα IFNAR1-IFN-I-IFNAR2 οδηγείται σε ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση (81,82). Μόρια ουμπικιτίνης προστίθενται στην IFNAR1 υπομονάδα, η οποία αποικοδομείται στα λυσοσώματα, ενώ η πορεία της IFNAR2 υπομονάδας εξαρτάται από τον υπότυπο της IFN-I που προσδένεται. Σε κάθε περίπτωση, το αποτέλεσμα της σηματοδότησης και της μείωσης των επιπέδων των υποδοχέων είναι η εξασθένηση της σηματοδότησης σε επόμενη πρόσδεση των IFN-I. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η IFNAR1 υπομονάδα αποικοδομείται και απουσία συνδέτη, μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων σερίνης (Ser535) στο κυτταροπλασματικό μέρος της IFNAR1 (83) (Εικόνα 4.3Γ). Εκτός από το σηματοδοτικό μονοπάτι IFN-I-IFNAR, η φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης επάγεται, και από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως VEGF/ VEGFR/ PKD2/ pSer535 ή TNF-α/ TNFR/ p38α/ pSer532/ CK1α/ pSer535, μέσω «διασταυρωτά περιοριζόμενης» σηματοδότησης (cross-eliminative signaling) (84).



Εικόνα 4.3 (Α) Εξάλειψη επαγόμενη από το συνδέτη. Μετά την απόκριση σε χαμηλή δόση IFN-I, περιορίζεται ο αριθμός των υποδοχέων στο κύτταρο, οπότε η απόκριση σε μετέπειτα χορήγηση IFN-I είναι περιορισμένη. (Β) Μετά την απόκριση σε υψηλή δόση IFN-I, αποικοδομούνται σχεδόν όλοι οι υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου, το οποίο δεν μπορεί να σηματοδοτήσει σε μετέπειτα έκθεση σε IFN-I. (Γ) Ενώ η επαγόμενη από συνδέτη εξάλειψη του IFNAR εξασθενεί τη σηματοδότηση των IFN-I, η εξάλειψη του IFNAR λόγω «διασταυρωτά περιοριζόμενης» σηματοδότησης, την καταργεί (82).

ii. στο επίπεδο παραγωγής μορίων κατασταλτικών των κυτταροκινών:

Προκειμένου να οριοθετηθεί η έκταση και η διάρκεια των αποκρίσεων στις IFN-I, οι ίδιες επάγουν, ως μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης, την έκφραση πρωτεϊνών-καταστολέων της σηματοδότησης των κυτταροκινών (SOCS-suppressor of cytokine signaling), όπως των SOCS1 και SOCS3, και της πρωτεΐνης USP18 (ubiquitin specific peptidase 18). Οι μεν SOCS πρωτεΐνες ανταγωνίζονται τους παράγοντες STAT για την πρόσδεση στον IFNAR, ενώ η USP18 παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της IFNAR2 υπομονάδας με την κινάση JAK1 (85).

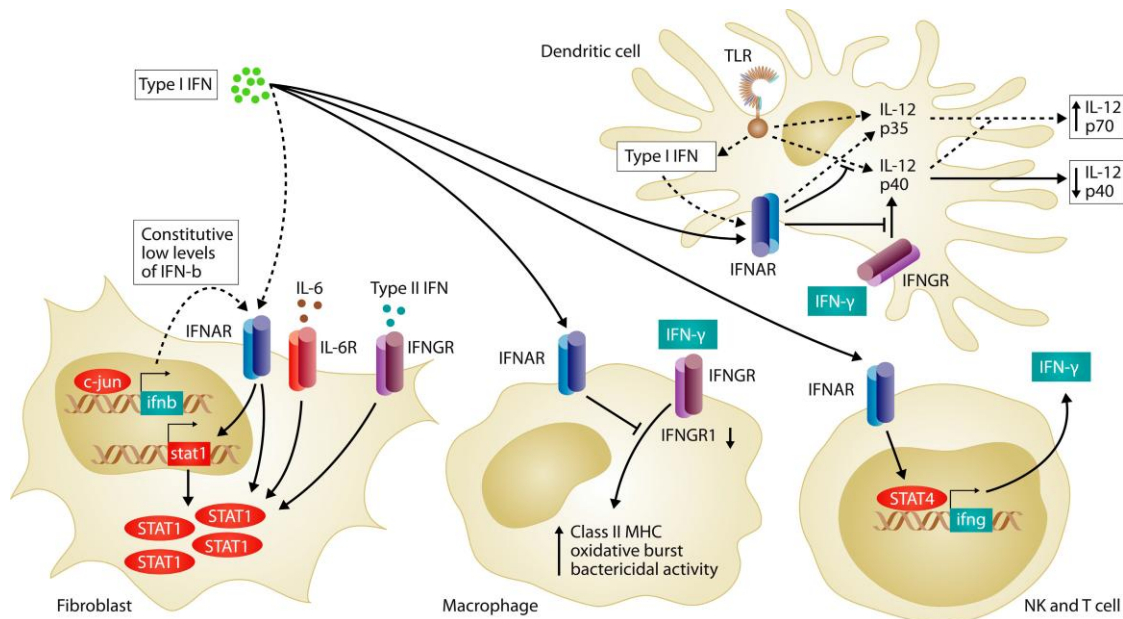
iii. στο επίπεδο των miRNA: Οι αποκρίσεις των IFN-I ρυθμίζονται επιπλέον από miRNA (microRNAs). Ενδεικτικά, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το miR-155 επάγεται κατά την κυτταρική ενεργοποίηση από προφλεγμονώδη μηνύματα, προσδέεται στο mRNA γονιδίων του JAK-STAT μονοπατιού, καταστέλλοντας τη σηματοδότηση των IFN-I μέσω αυτού (86).

4.3 Συνομιλία ιντερφερονών τύπου I και II

Παρ' όλο που οι IFN-I και IFN-II έχουν διακριτούς ρόλους στις ανοσολογικές αποκρίσεις, υπάρχει σημαντική επικάλυψη μεταξύ των γονιδιακών στόχων, τη μεταγραφή των οποίων ρυθμίζουν (Εικόνα 4.4). Η έλλειψη βασικών επιπέδων IFN-β ή η αδυναμία απόκρισης στις IFN-I (π.χ. στα *ifnar1*^{-/-} ζώα) μειώνει την κυτταρική απόκριση όχι μόνο στις IFN-I, αλλά και σε μη άμεσα σχετιζόμενες κυτταροκίνες, όπως η IFN-γ και η IL-6 (87). Αντίστροφα, έχει δειχθεί ότι, η θεραπεία με IFN-β για την αντιμετώπιση της ΠΑΕ δεν είναι αποτελεσματική, όταν απουσιάζει η σηματοδότηση της IFN-γ (88).

Οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί της συνομιλίας των δύο τύπων IFN δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί, ενώ δύο πρότυπα έχουν προταθεί: α. οι IFN-I ενισχύουν τις αποκρίσεις άλλων κυτταροκινών μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με υβριδικούς υποδοχείς, που αποτελούνται από υπομονάδες διαφορετικών κυτταροκινών. Μέχρι σήμερα, έχουν προταθεί δύο υβριδικοί υποδοχείς, οι IFNAR1-IFNγR2 και IFNAR1-IL-6β. Τα βασικά επίπεδα της IFN-β θεωρείται ότι οδηγούν στη συγκρότηση αυτών των υποδοχέων, δημιουργώντας θέσεις δέσμευσης για τους STAT1 και STAT3 μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφή των *ifnγ*

και *il6* γονιδίων (87). β. Χαμηλά επίπεδα IFN-α/β ρυθμίζουν την έκφραση ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων, όπως των μεταγραφικών παραγόντων STAT1 και STAT4 (Εικόνα 4.4). Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο, απουσία βασικών επιπέδων των IFN-β ή του IFNAR, μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης των STAT, που αποτελούν ISG γονιδιακά προϊόντα. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνονται ακολούθως οι STAT-εξαρτώμενες βιολογικές αποκρίσεις άλλων κυτταροκινών, όπως αυτές των IFN-γ και IL-6. Δεδομένου του μεγάλου αριθμού των ενδιάμεσων μορίων σηματοδότησης των κυτταροκινών, τα οποία επάγονται από το μονοπάτι JAK-STAT, η έλλειψη βασικής σηματοδότησης των IFN-I οδηγεί σε έλλειψη ενδιάμεσων μορίων που απαιτούνται για μία σειρά ποικίλων αποκρίσεων (89) (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4 Συνομιλία μεταξύ των IFN τύπου I και II. Χαμηλά βασικά επίπεδα IFN-I (διακεκομμένα βέλη) ενεργοποιούν τα κύτταρα για μετέπειτα αποκρίσεις σε IFN-I, IFN-γ και IL-6, ευνοώντας την έκφραση του STAT1 (π.χ. στους ινοβλάστες, fibroblasts). Επίσης, οι IFN-I επάγουν άμεσα την παραγωγή IFN-γ από τα NK κύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα, μέσω ενεργοποίησης του STAT4 (87).

4.4 Οι δράσεις των IFN-I

Οι ιντερφερόνες τύπου I εκφράζονται από όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και κατέχουν αντιικές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες (90), ενώ σε φυσιολογικές καταστάσεις ρυθμίζουν ομοιοστατικές διεργασίες (87,91).

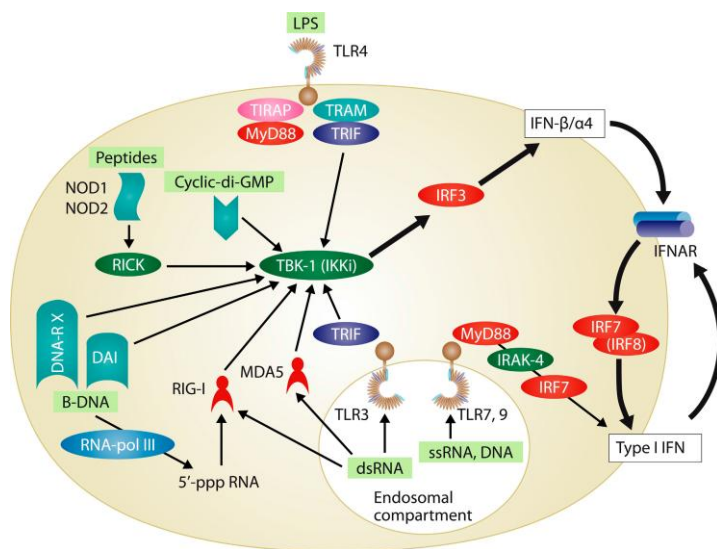
Υπό φυσιολογικές καταστάσεις, οι IFN-I παράγονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, με αποτέλεσμα να είναι οριακά ανιχνεύσιμες με τις διαθέσιμες τεχνικές (92). Έχει προταθεί ότι, τα κύτταρα παράγουν βασικά επίπεδα IFN-I (constitutive expression), διατηρώντας τα κύτταρα σε ενεργοποιημένη κατάσταση και διευκολύνοντας ταχύτερες αποκρίσεις σε πιθανά επικείμενα ερεθίσματα (85). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι συντελούν στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας, καθώς και στην αντικαρκινική ανοσία (87). Σε παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από ιικές και βακτηριακές μολύνσεις, ή από χημικά ερεθίσματα, παράγονται υψηλά επίπεδα IFN-I, κυρίως IFN- α και IFN- β , ως κυτταροκίνες πρώιμης απάντησης (early response cytokine), προκειμένου να ενεργοποιήσουν την επίκτητη ανοσία. Η αναγνώριση των ιών, βακτηρίων ή άλλων ερεθισμάτων γίνεται μέσω της πρόσδεσης των PAMPs σε υποδοχείς PRRs, όπως TLRs (Toll Like Receptors), NLRs (NOD Like Receptors), και RLHs (RIG-I Like Helicases) (Εικόνα 4.5) (92).

Inducer	Source	Receptor	Localization	Responding cell
ssRNA, dsRNA	Viruses	RIG-I and MDA5	Cytoplasm	Multiple cell types
Cytosolic DNA	Viruses or bacteria	STING, DAI and RNA polymerase III	Cytoplasm	Multiple cell types
dsRNA	Viruses	TLR3–TRIF	Endosomes	Macrophages, cDCs and epithelial cells
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4–TRIF	Plasma membrane	Macrophages and cDCs
Viral glycolipids	Viruses	TLR4–TRIF	Plasma membrane	Macrophages and cDCs
ssRNA	Viruses or damaged host cells	TLR7–MYD88	Endosomes	pDCs, cDCs and macrophages
Imiquimod	Synthetic	TLR7–MYD88	Endosomes	pDCs, cDCs and macrophages
ssRNA	Viruses	TLR8–MYD88	Endosomes	cDCs
CpG DNA	Bacteria or viruses	TLR9–MYD88	Endosomes	pDCs, cDCs and macrophages

Εικόνα 4.5 Επαγωγείς των IFN-I και κύτταρα που αποκρίνονται από αυτές (93).

Στη συνέχεια, μέσω διαφορετικών μεταβολικών οδών, όλοι οι κυτταρικοί τύποι παράγουν IFN-I. Τα κύτταρα όμως που παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες IFN-I είναι τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid Dendritic Cells,

pDCs) (94) (Εικόνα 4.6). Οι παραγόμενες IFN-I εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο και προσδένονται στους υποδοχείς, είτε των εκκρινόντων κυττάρων (αυτοκρινής δράση) ή γειτονικών κυττάρων (παρακρινής δράση), είτε απομακρυσμένων κυττάρων (ενδοκρινής δράση) μέσω της κυκλοφορίας (Εικόνα 4.6).



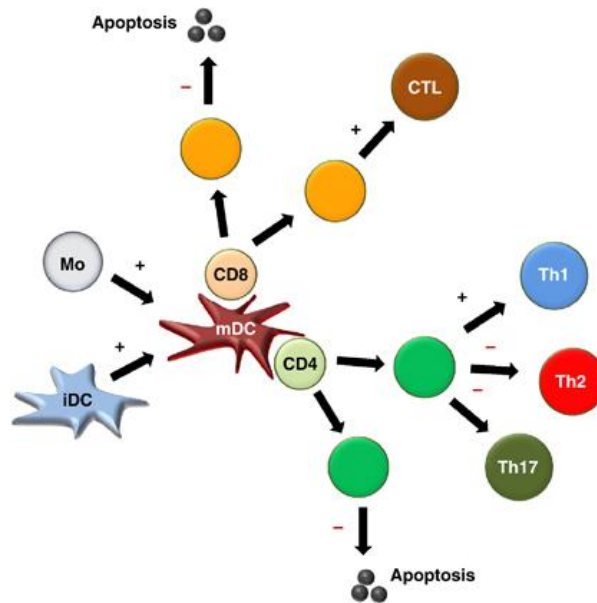
Εικόνα 4.6 Μηχανισμοί παραγωγής IFN- I (87).

Οι ανοσοτροποποιητικές δράσεις των IFN-I έχουν μελετηθεί *in vitro* και *in vivo* προκειμένου να αναδειχθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι οι IFNα/β συντελούν: στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 καθώς και των MHC I και II από τα δενδριτικά κύτταρα (95), στη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα (96), στην παραγωγή IL-15 μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και μέσω αυτής, στην παράταση της επιβίωσης των T λεμφοκυττάρων μνήμης (97,98) και στην παραγωγή IL-10, και την έκφραση του υποδοχέα Fas (99), ενώ νέοι μηχανισμοί ανακαλύπτονται συνεχώς.

4.5 Ο φυσιολογικός ρόλος των IFN-I στη βιολογία των T λεμφοκυττάρων

Οι IFN-I αποτελούν ένα συστατικό της φυσικής απόκρισης στη μόλυνση, το οποίο επάγεται ραγδαία, παρέχοντας το σήμα για την έναρξη της επίκτητης ανοσολογικής

απόκρισης (2). Ο πιο σημαντικός κυτταρικός τύπος, που εμπλέκεται στη μετάβαση από τη φυσική στην επίκτητη απόκριση, είναι τα δενδριτικά κύτταρα (DC). Η συμμετοχή λοιπόν των IFN-I στις ανοσολογικές αποκρίσεις έγκειται στην παραγωγή τους από τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα και στις διεγερτικές δράσεις τους στα δενδριτικά κύτταρα. Στη φυσική ανοσία οι IFN-I συμμετέχουν εκδηλώνοντας την αντιική τους δράση, ενώ στην επίκτητη ανοσία επάγουν την ωρίμανση των DCs, συμβάλλοντας έμμεσα στην ενεργοποίηση των B και T λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα, η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από τις IFN-I έχει μελετηθεί εκτενώς *in vitro*. Συμβατικά δενδριτικά κύτταρα (conventional DCs, cDCs) απομονωμένα από το σπλήνα ποντικών ελλειμματικών για την IFN-β ή την IFNAR1, έχουν εμφανώς μειωμένη ικανότητα παρουσίασης αντιγόνων σε παρθένα T λεμφοκύτταρα, οδηγώντας σε μειωμένο πολλαπλασιασμό τους (100). Έχει δειχθεί ότι η διεγερτική ικανότητα δενδριτικών κυττάρων ελλειμματικών για την IFN-β αποκαθίσταται με την προσθήκη εξωγενούς IFN-I (0,1 U/ml). Αξιοσημείωτο είναι ότι, η αποκατάσταση αυτή δεν παρατηρείται αν προστεθεί IFN-I σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (5–500U/ml), πιθανώς λόγω μηχανισμών αρνητικής ανάδρασης (98). Πέρα από την έμμεση δράση των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα όπως περιγράφηκε, τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν και άμεσο κυτταρικό στόχο των IFN-I, εφόσον φέρουν τον IFNAR υποδοχέα (Εικόνα 4.7). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι IFN-I επηρεάζουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα των T λεμφοκυττάρων, ανάλογα με το στάδιο ενεργοποίησης στο οποίο βρίσκονται. Συγκεκριμένα, η έκθεση παρθένων T λεμφοκυττάρων στις IFN-I εμποδίζουν την ικανότητά τους να πολλαπλασιαστούν μετά από έκθεση σε αντιγόνο, ενώ ενισχύουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα όταν τα T λεμφοκύτταρα είναι ήδη ενεργοποιημένα ως απόκριση σε κάποιο αντιγόνο (91,101).



Εικόνα 4.7 Τροποποίηση των T κυτταρικών αποκρίσεων από τις IFN-α/β. Με + και - απεικονίζονται οι θετικές ή αρνητικές δράσεις των IFN-α/β αντίστοιχα, όπου οι IFN-α/β δρουν μόνες ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες. Mo: μονοκύτταρα, iDC: ανώριμο DC, mDC: ώριμο DC, CTL: κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο (99).

Παρά τις *in vitro* παρατηρήσεις, η ικανότητα των IFN-I να δρουν σε όλα σχεδόν τα κύτταρα καθιστούν πολύ σύνθετη την *in vivo* μελέτη τους (99). *In vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι, στα ελλειμματικά για την IFN-β (*ifnβ^{-/-}*) ζώα παρουσιάζεται μεταβολή στη δομή του σπλήνα (απουσία θυλάκων B λεμφοκυττάρων και μη ξεκάθαρος διαχωρισμός B και T λεμφοκυττάρων) και μείωση του αριθμού των μακροφάγων που εδρεύουν στο σπλήνα (102). Επιπλέον, στα ζώα αυτά δεν εμφανίζονται ανωμαλίες στους πληθυσμούς των CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, το σπλήνα, τους λεμφαδένες και το θύμο αδένες. Εν τούτοις, τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα του σπλήνα και των λεμφαδένων εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τα αγρίου τύπου κύτταρα (100), υποδηλώνοντας έναν καθοριστικό ρόλο της ενδογενούς IFN-β στον T κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η σηματοδότηση μέσω του IFNAR στα T λεμφοκύτταρα είναι σημαντική για την απόκτηση των δραστικών λειτουργιών τους (103). Είναι όμως ακόμα ασαφές αν υπάρχουν και ποιες είναι, οι άμεσες δράσεις των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα, που επηρεάζουν την *in vivo* ανοσολογική απόκριση.

4.6 Ο ρόλος των IFN-I σε παθολογικές καταστάσεις

Όπως συμβαίνει με τις περισσότερες κυτταροκίνες, η δράση των IFN-I είναι πλειοτροπική, όντας άλλοτε προστατευτική και άλλοτε επιβλαβής, ακόμα και σε διαφορετικές φάσεις της ίδιας νόσου.

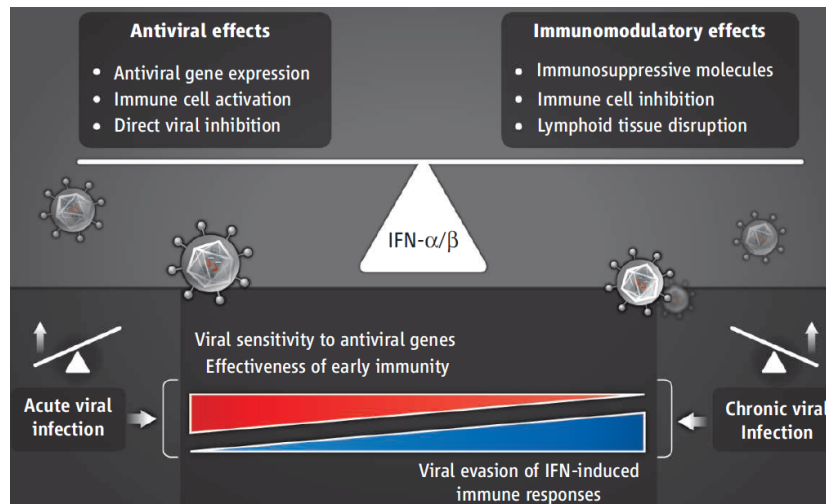
Οι IFN-I χρησιμοποιούνται ως αγωγή στη ΣΚΠ (IFN-β), όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.3, αλλά και ως αγωγή για την ηπατίτιδα και μία σειρά κακοηθειών, όπως το μελάνωμα, το λέμφωμα και τη λευχαιμία. Σήμερα, η IFN-α συζευγμένη με πολυαιθυλενική γλυκόλη (Polyethylene glycol, PEG), αποτελεί την πιο διαδεδομένη αγωγή για τη θεραπεία χρόνιας μόλυνσης με τον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C virus, HCV) (104).

Μέχρι το 2001, η IFN-α αποτελούσε διαδεδομένη αγωγή και για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Chronic Myelogenous Leukemia, CML) (105). Επιπλέον, η IFN-α έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη βελτιστοποίηση θεραπειών για το μυέλωμα (106), ενώ αποτελεί καθιερωμένη θεραπεία για το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (107).

Στο μελάνωμα, παρ' όλο που η χειρουργική αφαίρεση είναι η συνήθης άμεση θεραπευτική προσέγγιση, η μετέπειτα ανοσοενισχυτική (adjuvant) θεραπεία με IFN-α2b εφαρμόζεται για να επιτευχθεί παράταση της επιβίωσης των πασχόντων χωρίς κλινικά συμπτώματα, καθώς και αύξηση της συνολικής επιβίωσής τους (108). Σε ζωικό πρότυπο επαγωγής μελανώματος με τη χρήση καρκινικών κυττάρων B16, έχει δειχθεί ότι, η παρουσία του υποδοχέα IFNAR στα T λεμφοκύτταρα του ξενιστή είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ογκο-ειδικών CD8⁺ T λεμφοκυττάρων μνήμης, έπειτα από εμβολιασμό με αντικαρκινικά πεπτίδια και χορήγηση IFN-α ως ανοσοενισχυτικό (109).

Κατά την πειραματική μόλυνση με τον λεμφοκυτταρικό ιό της χοριομηνιγγίτιδας (Lymphocytic Choriomeningitis Virus, LCMV) σε ποντίκια, αναφέρθηκε ότι, ενώ οι IFN-I αναχάιτισαν την οξεία μόλυνση, συνεισέφεραν στη διατήρηση της χρόνιας λοίμωξης (110,111). Το βιολογικό αυτό φαινόμενο αποκαλέστηκε «παράδοξο της ιντερφερόνης» (interferon paradox) (Εικόνα 4.8). Τα παράδοξα κλινικά αποτελέσματα που παρατηρούνται σε ασθενείς με ιική μόλυνση, οι οποίοι λαμβάνουν IFN-I, μπορεί να εξηγούνται από το παραπάνω παράδοξο της ιντερφερόνης. Η ταυτοποίηση των μοριακών μηχανισμών που μεσολαβούν την αντι-ϊική έναντι της

ανοσοτροποποιητικής δράσης των IFN-I είναι απαραίτητη για τον εκλεκτικό χειρισμό αυτών των αντίθετων δράσεων.



Εικόνα 4.8 Η ισορροπία μεταξύ της αντιϊκής και της ανοσοτροποποιητικής δράσης των IFN-I, κατά την οξεία και τη χρόνια μόλυνση, αντίστοιχα (112).

Όπως συμβαίνει στις ιικές μολύνσεις, οι IFN-I έχουν πλειοτροπική δράση και έναντι των βακτηριακών μολύνσεων. Έχει βρεθεί ότι οι IFN-I παρεμποδίζουν τον ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό βακτηρίων του γένους *Chlamydia*, *Legionella* και *Salmonella*, ενώ συνδέονται και με καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης σε μόλυνση με *Listeria*, *Francisella* και *Mycobacterium*. Επιπλέον, κατά τη χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη σε ποντίκια (Lipopolysaccharide, LPS), ως μορίου προτύπου βακτηριακής μόλυνσης, παράγονται IFN-I, αλλά οι δράσεις τους είναι περίπλοκες και δεν ευνοούν πάντα την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή κατά του μολυσματικού παράγοντα (87).

Στα αυτοάνοσα νοσήματα, γενικά θεωρείται ότι οι IFN-I διαδραματίζουν παθογενετικό ρόλο, όπως στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (Systemic Lupus Erythematosus, SLE), το σύνδρομο Sjögren και το σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (Insulin Dependent Diabetes Mellitus, IDDM), ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση και τις λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις και επάγοντας την έκφραση χημειοκινών (78). Παρ' όλα αυτά, οι IFN-I εμφανίζουν και προστατευτική δράση στα αυτοάνοσα νοσήματα, καταστέλλοντας την παραγωγή και τη λειτουργία φλεγμονωδών

κυτταροκινών, τον πολλαπλασιασμό των παθογενετικών κυτταρικών τύπων και τις κυτταρικές αποκρίσεις τύπου Th17, όπως στη ΣΚΠ (78). Η διαφορική δράση των IFN-I έγινε πρόσφατα εμφανής και σε ένα πρότυπο επαγωγής κολίτιδας με θειικό νάτριο δεξτράνης (Dextran Sulfate Sodium, DSS), όπου η φάση και η βαρύτητα της φλεγμονώδους απόκρισης φάνηκε να καθορίζει τις προ- και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες των IFN-I (113). Το γεγονός ότι, οι ενδογενείς IFN-I προστάτευσαν τα ζώα από την εμφάνιση κολίτιδας, ενώ εν συνεχεία καθυστέρησαν την ανάρρωσή τους από τη νόσο, ίσως αποτελεί μία εξήγηση για τα ποικίλα αποτελέσματα κατά τη χορήγηση IFN-I σε ασθενείς με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease, IBD).

Δεδομένου ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από κυμαινόμενη έκφραση παραγόντων που ρυθμίζουν τις αποκρίσεις των IFN-I, όπως οι συνδέτες PRR και οι παραγόμενες κυτταροκίνες, είναι πιθανό οι αποκρίσεις να μεταβάλλονται με το χρόνο και κατά συνέπεια να διεγείρουν ή να καταστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε διαφορετικά στάδια της νόσου. Άλλες εκφάνσεις της πλειοτροπικής δράσης των IFN-I αναδεικνύονται, όταν αυτή χορηγείται ως αγωγή για μια νόσο, ενώ στη συνέχεια εμφανίζονται συμπτώματα μίας δεύτερης νόσου. Για παράδειγμα, ένα μέρος των ασθενών που λαμβάνουν IFN-α για την ηπατίτιδα C, αναπτύσσουν διαβήτη τύπου I (114) ή συμπτώματα ΣΚΠ (115), παρά το γεγονός ότι η IFN-β χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της ΣΚΠ (116).

Οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι IFN-I εκτελούν τις διαφορετικές λειτουργίες, και οι λόγοι για τους οποίους, αναχαιτίζουν την ανάπτυξη ορισμένων παθολογιών, ενώ αυξάνουν τη βαρύτητα άλλων, παραμένουν άγνωστοι. Η πλειοτροπική δράση των IFN-I φαίνεται να είναι συναρτημένη με τις συνθήκες που επικρατούν σε κάθε φάση της νόσου (κυτταρικός τύπος, περιβάλλον, επίπεδα IFN-I κλπ).

4.7 Ο ρόλος της IFN-β στη ΣΚΠ και την ΠΑΕ

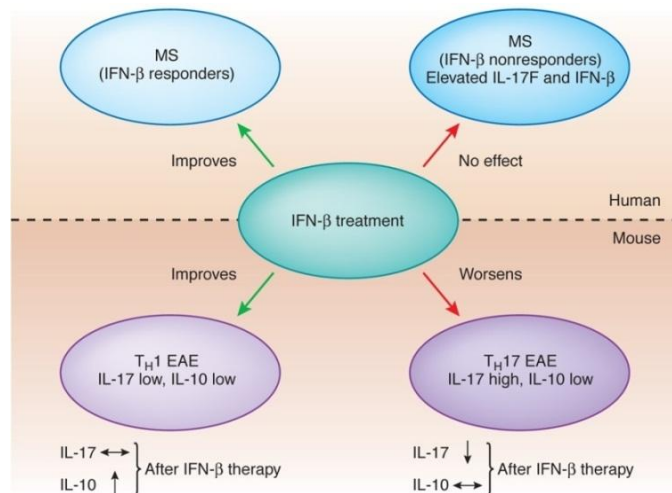
Μολονότι δεν έχει βρεθεί, μέχρι σήμερα, αγωγή για την ίαση της ΣΚΠ, η IFN-β, όπως αναφέρθηκε, χορηγείται ως θεραπευτική αγωγή πρώτης γραμμής για τον έλεγχο των εξάρσεων και της εξέλιξης της ΣΚΠ (116). Αποτελεί μια σημαντική θεραπευτική προσέγγιση, με αρκετές όμως παρενέργειες, όπως εμφάνιση συμπτωμάτων γρίπης

στην αρχή της θεραπείας, περιορισμένη δραστηριότητα που απαιτείται από τους ασθενείς και αποτυχία στις προοδευτικές μορφές της ΣΚΠ (36). Ευρήματα από *in vitro* και *in vivo* μελέτες, υποδηλώνουν ότι η δράση της IFN-β σε ασθενείς με ΣΚΠ είναι προστατευτική, επηρεάζοντας διάφορα επίπεδα της ανοσολογικής απόκρισης, ενώ φαίνεται να διαφοροποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο στον οποίο σηματοδοτεί.

Έχει αναφερθεί ότι η IFN-β επάγει την παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως των IL-4 και IL-10, από μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών, και μειώνει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως τις IL-17, IL-23, οστεοποντίνη, IFN-γ και TNF-α. Επιπλέον, επάγει την απόπτωση αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων, και τον πολλαπλασιασμό παρθένων ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (Tregs), ενώ τροποποιεί τη λειτουργία τους (117). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η IFN-β περιορίζει την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες, αυξάνοντας την έκφραση του δείκτη CD69, ο οποίος αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της φωσφορικής σφιγγοσίνης-1 (S1P1). Με αυτόν τον τρόπο μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης του S1P1 στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων, μειώνοντας την ικανότητα απόκρισής τους στη διαβάθμιση συγκέντρωσης S1P, καταστέλλοντας τελικά την έξοδό τους από τον λεμφαδένα. Επιπλέον, η IFN-β ελαττώνει την ικανότητα των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων να περάσουν τον ΑΕΦ και να εισέλθουν στο παρέγχυμα του ΚΝΣ, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης του VLA-4 στην επιφάνειά τους και του VCAM στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων του ΑΕΦ. Παράλληλα αυξάνει τον διαλυτό VCAM στον ορό, ο οποίος ανταγωνίζεται τις θέσεις πρόσδεσης του VCAM των ενδοθηλιακών κυττάρων του ΑΕΦ από το VLA-4 των T λεμφοκυττάρων. Επιπρόσθετα, η IFN-β μειώνει την παραγωγή της MMP-9 από τα T λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, εμποδίζοντας τη διάρρηξη του ΑΕΦ, και συμβάλλει στην ανάκαμψη του ΚΝΣ, επάγοντας την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα νευρώνων (neuronal growth factor, NGF).

Παρά την προστατευτική δράση της IFN-β στη ΣΚΠ, περίπου 30% των ασθενών δεν αποκρίνονται στη θεραπεία με IFN-β, ενώ σε μερικά άτομα η IFN-β επιδεινώνει τα συμπτώματα της νόσου (118). Πιθανοί λόγοι που έχουν αναφερθεί για τη μειωμένη αποτελεσματικότητα ή αρνητική επίδραση της θεραπείας είναι:

- i. η παραγωγή ουδετεροποιητικών αντισωμάτων (neutralizing antibodies, Nabs) τα οποία προσδένονται στην χορηγούμενη IFN-β (119),
- ii. ο T κυτταρικός υποπληθυσμός που εμπλέκεται στην εξέλιξη της νόσου κατά τη χορήγηση της IFN-β, σε κάθε ασθενή (Εικόνα 4.9). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η IFN-β έχει διττό ρόλο στην ΠΑΕ και τη ΣΚΠ: αμβλύνει τα συμπτώματα όταν στην εμφάνιση της νόσου εμπλέκονται Th1 λεμφοκύτταρα, ενώ προάγει την παθολογία καταστάσεων διαμεσολαβούμενων από Th17 λεμφοκύτταρα (120).
- iii. τα αυξημένα επίπεδα της ενδογενούς IFN-β και γονιδιακών προϊόντων της σηματοδότησής της, USP18, ISG15, MxA (myxovirus resistance A), πριν την έναρξη της θεραπείας με IFN-β. Έχει διαπιστωθεί ότι, μία πολύ συγκεκριμένη συγκέντρωση IFN-β πρέπει να διατηρείται, τουλάχιστον στην περίπτωση της ΣΚΠ: τόσο τα χαμηλότερα όσο και τα υψηλότερα επίπεδα οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις (121).
- iv. τα επίπεδα της IL-17F στον ορό, πριν την έναρξη της αγωγής με IFN-β (120,121), όταν αυτά ξεπερνούν ένα συγκεκριμένο όριο (200pg/ml) (122). Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η IL-17F δεν αποτελεί δείκτη χαμηλής απόκρισης στην IFN-β, και φαίνεται αυτό να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χρονική στιγμή στην οποία δόθηκε η IFN-β (122-124).



Εικόνα 4.9 Διαφορικές δράσεις της θεραπείας με IFN-β στη ΣΚΠ και την ΠΑΕ (125).

Κατά συνέπεια η ενδογενής IFN-β και η IL-17F μπορεί να αποτελούν δείκτες απόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με IFN-β (125,126), γεγονός ύψιστης σημασίας για την προγνωστική ταυτοποίηση των ασθενών που αποκρίνονται στη θεραπεία με IFN-β, και κατά συνέπεια στη λήψη αποφάσεων για τη χορήγησή της. Μία προσέγγιση προς αυτήν την κατεύθυνση είναι η εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών, οι οποίοι μπορεί να καθοδηγούν τη λήψη αποφάσεων για την κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση, δεδομένης της ποικιλίας θεραπειών που σήμερα είναι διαθέσιμες (Εικόνα 4.10). Ποικίλοι υποψήφιοι βιοδείκτες έχουν περιγραφεί στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με ΣΚΠ, αλλά δεν έχει αποδειχθεί ακόμα κάποιος με επαρκή αξιοπιστία πρόβλεψης για την καθημερινή κλινική χρήση (127,128).

<i>Potential biomarker</i>	<i>Clinical correlate</i>
Enhancing lesions on MRI while on IFNβ	Increased relapses
Increased CSF IL-10	Favorable clinical response
Neutralizing antibodies to IFNβ	IFNβ treatment resistance
Increased sVCAM	Decreased MRI activity
High baseline serum IFNβ	Poor clinical response
IL-7/IL-17; IL-4/IFNγ; IL-10/IFNγ; IL-10/IL-12 ratios	Clinical response
MMP9/TIMP	Clinical response
BDNF	Freedom from relapse

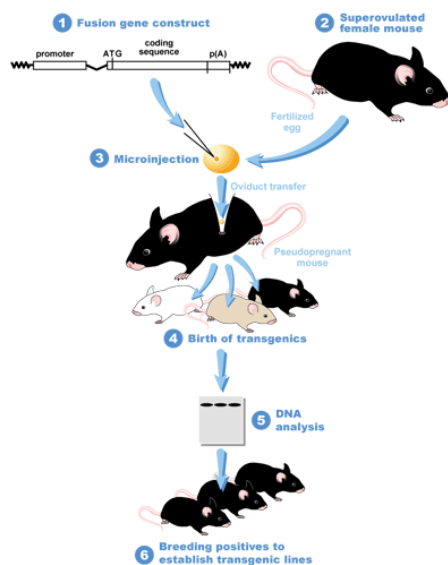
Εικόνα 4.10 Πιθανοί βιοδείκτες που σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με IFN-β (128).

Κεφάλαιο 5: Διαγονιδιακά συστήματα για *in vivo* μελέτες

5.1 Διαγονιδιακά *in vivo* συστήματα

Η χρήση των διαγονιδιακών συστημάτων, ως *in vivo* πειραματικά πρότυπα, συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση βιολογικών μηχανισμών, προσφέροντας γνώση και σημαντικές πληροφορίες, με απώτερο σκοπό το όφελος στην υγεία του ανθρώπου. Τα συστήματα αυτά αποτελούν εργαλεία, με τα οποία μπορεί να μελετηθεί, σε ζωντανούς οργανισμούς, η επίδραση τροποποιημένων γονιδίων, σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις. Η τροποποίηση των επιθυμητών γονιδίων αφορά είτε στην υπερέκφρασή τους (gain of function), είτε στην απαλοιφή τους (loss of function), και επιτυγχάνεται με διαφορετικούς τρόπους διαγένεσης. Δύο είναι οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι για την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών (VII):

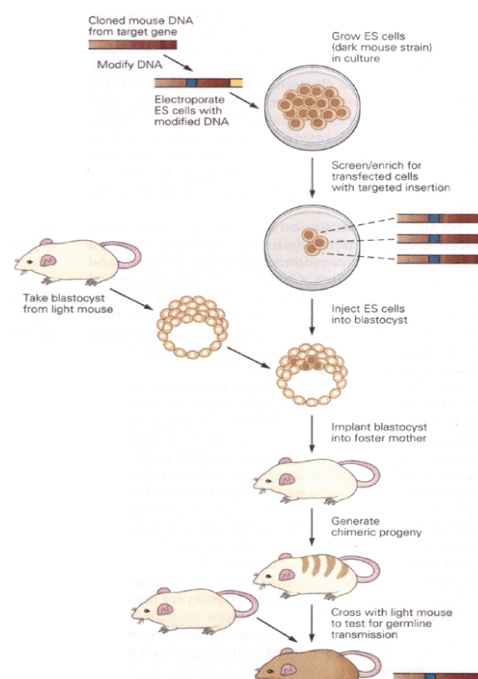
i. Εισαγωγή DNA σε προπυρήνα ζυγωτού (pronuclear microinjection): Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται υπερέκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου, με εισαγωγή του στον έναν εκ των δύο προπυρήνων ενός γονιμοποιημένου ωαρίου (Εικόνα 5.1). Η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα πραγματοποιείται μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού, και είναι τυχαία. Το γεγονός αυτό αποτελεί το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου, η οποία όμως εφαρμόζεται ευρέως και σήμερα, και αναλύεται εκτενέστερα στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (σ. 83).



Εικόνα 5.1 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών με τη μικροένεση DNA σε προπυρήνα ζυγωτού (VIII).

ii. Εισαγωγή DNA σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ES):

Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από έμβρυα ποντικού πολύ πρώιμου σταδίου, και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, όταν εισαχθούν σε άλλο έμβρυο ποντικού. Το εισαγόμενο DNA μπορεί να ενσωματωθεί, με ομόλογο ανασυνδυασμό, σε συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα του ποντικού. Η διαδικασία αυτή, παρέχει τη δυνατότητα αντικατάστασης κάποιου γονιδίου με το αδρανοποιημένο αντίστοιχό του (knockout, KO) σε κάποια από τα ES κύτταρα (Εικόνα 5.2). Τα ES κύτταρα που φέρουν την επιθυμητή κατασκευή ενίονται σε έμβryo-ξενιστή στο στάδιο της βλαστοκύστης, το οποίο απομονώνεται από ποντίκι διαφορετικού στελέχους και χρώματος, με αποτέλεσμα οι απόγονοι να είναι χμιαϊρικοί.



Εικόνα 5.2

Σχηματική απεικόνιση των σταδίων δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών με τη χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (VII).

Η βελτιστοποίηση της διαγένεσης με γνώμονα πάντα την πιο στοχευμένη παρέμβαση, είτε χρονοειδικά είτε ιστοειδικά, τη μείωση του κόστους, της δυσκολίας και του χρόνου δημιουργίας των διαγονιδιακών συστημάτων, έχει συντελέσει στην ανάπτυξη νέων συστημάτων, όπως το σύστημα ανασυνδυασμού Cre/loxP, το σύστημα Tet on/tet off, την τεχνική με νουκλεάσες δακτυλίων ψευδαργύρου (Zinc Finger Nuclease, ZFN), την εφαρμογή siRNAs, καθώς και τη στοχοθετημένη RNA-καθοδηγούμενη διάσπαση του DNA (clustered regularly interspaced short palindromic repeats CRISPR/Cas9), που αποτελεί και την πιο σύγχρονη μέθοδο διαγένεσης (129).

Παρ' όλα αυτά, η κλασική μεθοδολογία της μικροένεσης του επιθητικού DNA σε προπυρήνες ζυγωτών για τη δημιουργία υπερεκφραστών καθώς και της ένεσης κατάλληλα τροποποιημένων ES κυττάρων σε βλαστοκύστες ποντικών για τη δημιουργία KO ποντικών, χρησιμοποιείται ακόμα ευρέως.

5.2 Διαγονιδιακά συστήματα μελέτης του *in vivo* ρόλου της σηματοδότησης των IFN-I

Ελλειμματικά ποντίκια τόσο για τις ίδιες τις IFN-I, όσο και για τις υπομονάδες του υποδοχέα αυτών, IFNAR1 και IFNAR2, έχουν δημιουργηθεί και χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της σηματοδότησης αυτού του μονοπατιού. Επιπλέον έχουν δημιουργηθεί ποντίκια με υπερέκφραση της διαλυτής μορφής της IFNAR2 υπομονάδας (sIFNAR2), καθώς και ελλειμματικά ποντίκια για διάφορα μόρια που εμπλέκονται στο μονοπάτι της σηματοδότησης των IFN-I, όπως τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT1, STAT2 και άλλους.

Τα παραπάνω ζώα έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες για τη διερεύνηση του ρόλου των IFN-I σε πρότυπα ιικών, βακτηριακών και παρασιτικών λοιμώξεων, αυτοάνοσων νοσημάτων και επαγόμενου καρκίνου.

Συγκεκριμένα στην ΠΑΕ, έχουν χρησιμοποιηθεί ζώα ελλειμματικά τόσο για την IFN- β , όσο και για την IFNAR1, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο της σηματοδότησης της ενδογενούς IFN- β στην ανάπτυξη της ΠΑΕ (130-133).

Όμως με τη χρήση των ελλειμματικών ζώων εν γένει, και ειδικότερα για την IFNAR1 υπομονάδα, δεν είναι δυνατή η μελέτη της δράσης των IFN-I σε συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό. Στην επίλυση αυτού του ζητήματος συνέβαλε η χρήση των συστημάτων επιλεκτικής γονιδιακής στόχευσης. Το σύστημα ανασυνδυασμού Cre/loxP, που αναφέρθηκε παραπάνω, έχει εφαρμοστεί για την απαλοιφή της IFNAR1 υπομονάδας, και συνεπώς της σηματοδότησης των IFN-I, σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, έχουν δημιουργηθεί ποντίκια με απαλοιφή της IFNAR1 σε T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα, νευρικά κύτταρα και κύτταρα της μυελικής σειράς, με τη χρήση κατάλληλων υποκινητών των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα μόρια CD4, CD19, Nestin και LysM αντίστοιχα (127). Με τη χρήση αυτών των ζώων αναδείχθηκε ο ρόλος της σηματοδότησης των IFN-I σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και κατ' επέκταση στην έκβαση της νόσου.

Πρόσφατα δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν το εξωκυττάριο τμήμα του IFNAR ανθρώπου, συνδυασμένο με το διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τμήμα του IFNAR ποντικού, προκειμένου να είναι εφικτή η μελέτη ανθρωπίνων IFN-I σε προκλινικά στάδια σε ποντίκια (134).

Εν κατακλείδι, ο συνδυασμός των διαφόρων διαγονιδιακών συστημάτων μπορεί να αποκαλύψει την πλειοτροπική δράση των IFN-I κατά τη διάρκεια εξέλιξης της νόσου, και να οδηγήσει στην εύρεση νέων βιοδεικτών, σημαντικών για την πρόγνωση και διάγνωση της ΠΑΕ, και κατά της συνέπεια της ΣΚΠ.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η IFN-β χρησιμοποιείται ως ανοσοτροποποιητική θεραπεία πρώτης γραμμής για τη ΣΚΠ. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει ένα ποσοστό ασθενών που δεν αποκρίνεται στη θεραπεία, ενώ συχνά εμφανίζονται παρενέργειες. Την τελευταία δεκαετία έχει αναδειχθεί η, σε διαφορετικά επίπεδα, πλειοτροπική δράση των IFN-I, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4.6.

Η αποσαφήνιση του ρόλου των IFN-I στη ΣΚΠ, η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των ενδογενών και εξωγενών IFN-I κατά την εξέλιξη της ΣΚΠ και ο προσδιορισμός των κυτταρικών πληθυσμών, που διαμεσολαβούν στην εμφάνιση της προστατευτικής δράσης τους, αποτελούν ύψιστη ανάγκη και απαραίτητη προϋπόθεση για τη λήψη αποφάσεων, που αφορούν στην κατάλληλη θεραπευτική αγωγή των ασθενών.

Ενώ η επωφελής δράση της IFN-β αναδείχθηκε σε ποντίκια ελλειμματικά τόσο για την IFN-β (*ifnb^{-/-}*) (130,133), όσο και για την IFNAR1 υπομονάδα (*ifnar1^{-/-}*) (131,132), δεδομένου ότι οι IFN-I δρουν σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς, η *in vivo* μελέτη της δράσης τους σε επιλεγμένους κυτταρικούς τύπους καθίσταται πολύ σύνθετη (99). Για το σκοπό αυτό, είναι αναγκαία η δημιουργία κατάλληλων διαγονιδιακών ζώων, με επιλεκτική έκφραση του λειτουργικού υποδοχέα των IFN-I (IFNAR) στον κυτταρικό πληθυσμό που επιθυμεί κανείς να μελετήσει.

Δεδομένης της ανοσοτροποποιητικής δράσης της IFN-β στη ΣΚΠ, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του άμεσου ρόλου των IFN-I στη διαμόρφωση της συμπεριφοράς των T λεμφοκυττάρων κατά τη διαμεσολαβούμενη από τα T λεμφοκύτταρα ΠΑΕ, και μέσω αυτών, της επίπτωσή τους στην έκβαση της νόσου. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ζώα με επιλεκτική έκφραση του IFNAR μόνο στα T λεμφοκύτταρα.

Συγκεκριμένα, η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε ήταν η εξής:

i. η δημιουργία και ο χαρακτηρισμός του κατάλληλου συστήματος με αποκλειστική έκφραση του IFNAR στα T λεμφοκύτταρα:

- ενέσεις σε προπυρήνες ζυγωτών για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων και κατάλληλες διασταυρώσεις για την απόκτηση διπλά διαγονιδιακά ζώων (*cd2- ifnar1/ifnar1^{-/-}*) και
- ανάλυση των ζώων σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και λειτουργικό επίπεδο
- ii.** η επαγωγή ενεργητικής ΠΑΕ στα διαγονιδιακά ζώα και σε ζώα ελέγχου (αγρίου τύπου και *ifnar1^{-/-}*):
- παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου
- ιστολογική ανάλυση του νωτιαίου μυελού
- iii.** ο χαρακτηρισμός της συμπεριφοράς των T λεμφοκυττάρων της περιφέρειας κατά τη φάση ενεργοποίησης και τη δραστική φάση της ΠΑΕ:
- ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός
- παραγωγή κυτταροκινών
- έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών μετανάστευσης και προσκόλλησης στον ΑΕΦ του ΚΝΣ
- γονιδιακή έκφραση

Με την ολοκλήρωση της διατριβής θα έχει εμπλουτιστεί η ήδη υπάρχουσα γνώση, που αφορά στην κυτταροειδική δράση της IFN-β στην ΠΑΕ, ανοίγοντας το δρόμο για το μελλοντικό σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων με IFN-β στοχευμένων στα T λεμφοκύτταρα. Παράλληλα θα έχει δημιουργηθεί και αναλυθεί ένα διαγονιδιακό σύστημα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε πρότυπα άλλων ασθενειών, όπου τα T λεμφοκύτταρα και οι IFN-I διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, όπως στο επαγόμενο από B16 κύτταρα μελάνωμα και τη μόλυνση με τον ιό LCMV (109,135).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αναλώσιμα

Σωληνάρια τύπου falcon 50 και 15 ml (Greiner bio one, Switzerland)

Σωληνάρια τύπου erpendorf 1,5 ml (Sarstedt, France)

Σωληνάρια για απομόνωση αντισωμάτων 5 ml (Sarstedt)

Φιάλες κυτταροκαλλιέργειας 75 και 25 ml (Nunc, Denmark)

Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 6, 12, 24 και 96 φρεατίων (Corning, USA)

Πλαστικές πιπέττες των 10 ml, 5 ml και 2ml (Sarstedt, France)

Πιπέττες Pasteur κλειστές και ανοιχτές (CEB, France)

Τρυβλία Petri (BIBE, Ελλάδα)

Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International, UK)

Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Sigma)

Σύριγγες πλαστικές 1 ml, 5 ml και 10 ml (Πνοή, Ελλάδα)

Μεταλλική σήτα (60 μ m άνοιγμα, BD)

2. Διαλύματα

Διάλυμα μικροενέσεων (Microinjection buffer, MIJ)

Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH:7.4

Διάλυμα Tail buffer

Tris 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M, SDS 10%, ddH₂O

Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιεργειών RPMI (1x) 10%FBS:

50 ml Ορός εμβρύου βοός [Fetal Bovine Serum] FBS (Gibco)

50 ml RPMI (10x) (Sigma)

5 ml Glutamine

5 ml Penicillin/Streptomycin

14 ml Sodium Bicarbonate

Water for Injections (WFI) μέχρι 500ml και pH: 7

Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων Gey's:

Διάλυμα Α

17.5g NH₄Cl

0.925g KCl

0.75g Na₂HPO₄

0.06g KH₂PO₄

2.5g Glucose

0.025g Phenol Red

Water for Injections (WFI) μέχρι 500ml, φιλτράρισμα και φύλαξη στους 4°C

Διάλυμα Β

0.42g MgCl₂*6H₂O

0.14g MgSO₄*7H₂O

0.31g CaCl₂

Water for Injections (WFI) μέχρι 100ml, αποστείρωση και φύλαξη στους 4°C

Διάλυμα Γ

2.25g NaHCO₃

Water for Injections (WFI) μέχρι 100ml, αποστείρωση και φύλαξη στους 4°C

Για το τελικό διάλυμα Gey's αναμειγνύονται 40ml από το (Α), 10 ml από το (Β) και 10 ml από το (Γ) και συμπληρώνεται με WFI μέχρι 200ml και φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων ACK (πιο ήπιο):

8.29g NH₄Cl

2.00g KHCO₃

0.074g EDTA

Απεσταγμένο νερό μέχρι 1 L και pH: 7.2

Αποστείρωση και φύλαξη στους 4°C

Διάλυμα κυτταρομετρίας ροής FACS Buffer:

50 ml PBS

1,5 ml FBS

Διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS:

4g NaCl

0,1g KCl

0,3g Na₂HPO₄

0,1g KH₂PO₄

Water for Injections (WFI) μέχρι 500ml, αποστείρωση και φύλαξη στους 4°C

Παραφορμαλδεΰδη 2% w/v (PFA):

Σε 200 ml PBS προστίθενται 8g PFA για την παρασκευή PFA 4% w/v (αποθήκευση στους 4°C). Ακολουθεί ανάμειξη σε αναδευτήρα στους 65°C, μέχρι να θολώσει το διάλυμα, και προστίθενται λίγες σταγόνες NaOH 10N, ώσπου το διάλυμα να γίνει διαυγές. Αφού αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί Whatman και αποθηκεύεται στους -20°C. Πριν τη χρήση, το διάλυμα αραιώνεται με ίσο όγκο PBS.

Διάλυμα διάτρησης κυττάρων για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Permeabilization buffer):

50ml FACS buffer

0,25g σαπωνίνη (saponin)

Διαλύματα Percoll για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το νωτιαίο μυελό λόγω διαβάθμισης συγκέντρωσης

Διάλυμα A

SIP (d=1.123): Percoll:1,5M NaCl, 9:1 (v/v) (4°C)

Διάλυμα B

(d=1.08): σε 10ml SIP προστίθενται 5,7ml PBS

3. Μηχανήματα

- Ανάστροφο μικροσκόπιο για τη διεξαγωγή μικροενέσεων Nikon Diaphot TMD με σύστημα φωτισμού Nomarsky DIC
- Μικροχειριστές Leitz για το χειρισμό των πιπετών συγκράτησης και ενέσεων
- Οπτικές ίνες Leica CLS 150
- Στερεοσκόπια Nikon SMZ-U, SMZ-10A, όπου προσαρμόζονται οι οπτικές ίνες, για διεξαγωγή εμβρυομεταφοράς
- Σύστημα κατασκευής πιπετών μικροένεσης Kopf 80pipette puller
- Μηχάνημα κατασκευής πιπετών συγκράτησης των εμβρύων προς μικροένεση
- Κλίβανος επώασης εμβρύων RS Biotech Mini Galaxy A
- Κυκλοποιητής για ποσοτική PCR LightCycler system (Roche, Mannheim, Germany)
- Κυτταρομετρητής ροής FACS Calibur (BD, Biosciences)

4. Ζώα εργαστηρίου

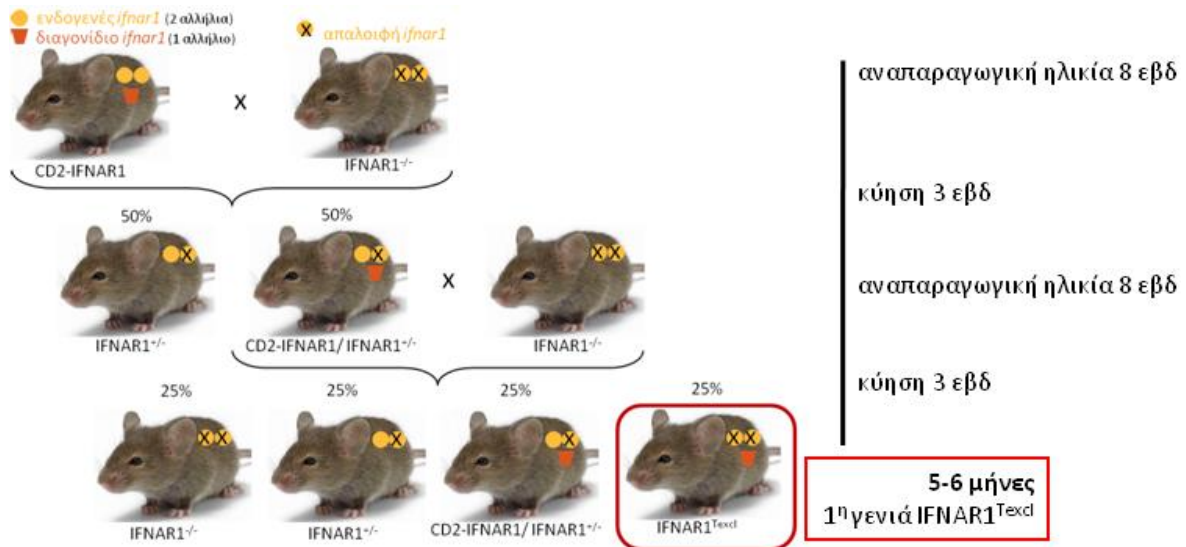
Τα *in vivo* πειράματα διεξήχθησαν σε ποντίκια του είδους *Mus musculus*. Τα αγρίου τύπου ζώα των παρακάτω στελεχών προμηθεύτηκαν από τον οίκο Harlan:

- ομομικτικό στέλεχος CBA/JCrHsd
- ομομικτικό στέλεχος C57BL/6J01aHsd
- ετερομικτικό στέλεχος HsdWin:NMRI για τη διαδικασία δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων (σ. 83)

Το υβριδικό στέλεχος F1 (♂CBA/JCrHsd x ♀C57BL/6J01aHsd) προμηθεύτηκε από τη μονάδα αναπαραγωγής του Τμήματος Ζωικών Προτύπων για τη Βιοϊατρική Έρευνα (ΤΖΠΒΕ) του ΕΙΠ, για τη διαδικασία δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων (σ. 83).

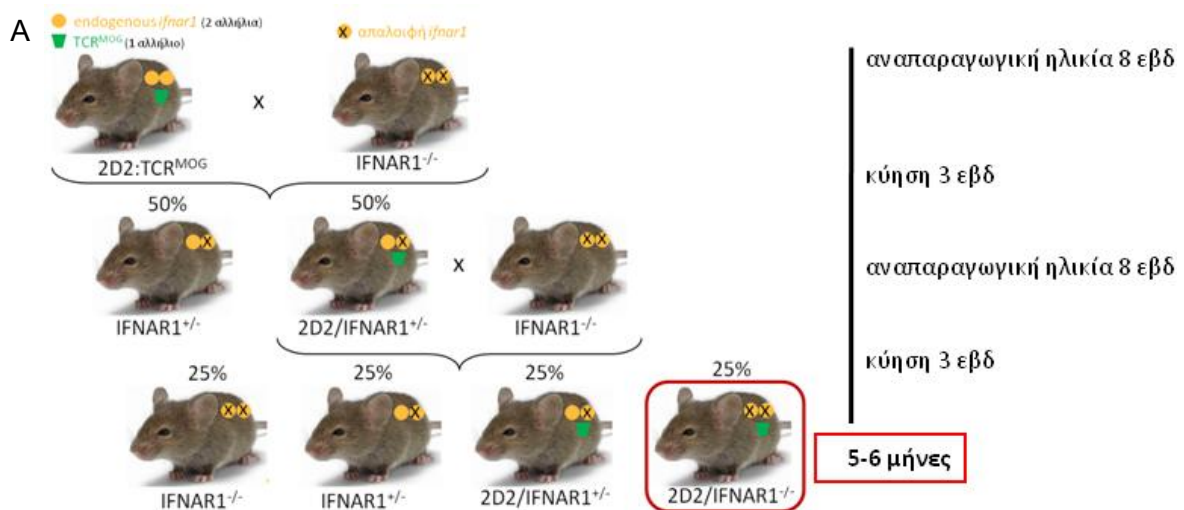
Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ζώα, ακολουθώντας συγκεκριμένες στρατηγικές αναπαραγωγής:

- ελλειμματικά για το γονίδιο της IFNAR1 (*ifnar1^{-/-}*) στελέχους C57BL/6 (136)
- διαγονιδιακά που φέρουν σε ημιζυγωτία το γονίδιο της IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα σε αγρίου τύπου (CD2-IFNAR1) και σε *ifnar1^{-/-}* γενετικό υπόβαθρο στελέχους C57BL/6 (IFNAR1^{T_{excl}}) (δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της διατριβής και η διαδικασία περιγράφεται στη συνέχεια). Ακολούθησε η παρακάτω στρατηγική αναπαραγωγής (Εικόνα 1):

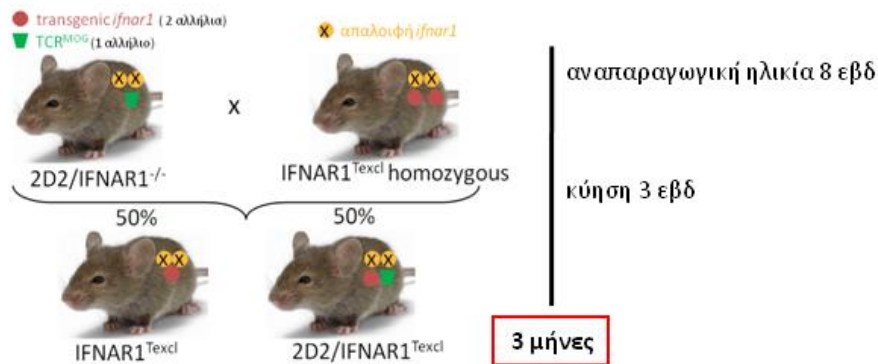


Εικόνα 1. Στρατηγική αναπαραγωγής για τη δημιουργία CD2-IFNAR1 ζώων σε *ifnar1*^{-/-} υπόβαθρο (IFNAR1^{Texcl}).

iii. διαγονιδιακά που φέρουν σε ετεροζυγωτία το γονίδιο του TCR για το πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ (2D2) στελέχους C57BL/6 (137), διπλά διαγονιδιακά 2D2/*ifnar1*^{-/-} και τριπλά διαγονιδιακά 2D2/IFNAR1^{Texcl}. Ακολούθησε η παρακάτω στρατηγική αναπαραγωγής (Εικόνα 2):



B



Εικόνα 2. Στρατηγική αναπαραγωγής για τη δημιουργία (A) ελλειμματικών *ifnar1* ζώων σε 2D2 υπόβαθρο. (B) Με τη διασταύρωση των 2D2/*Ifnar1*^{-/-} που προέκυψαν με ομόζυγα για το διαγονίδιο ζώα, προέκυψαν διαγονιδιακά ζώα σε 2D2 και *Ifnar1*^{-/-} υπόβαθρο (2D2/IFNAR1^{T_{excl}}).

4.1 Διαδικασίες ηθικής διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου

Όλα τα στελέχη διατηρούνται σε συνθήκες ελεύθερες ειδικών παθογόνων (specific pathogen free, SPF) στις εγκαταστάσεις του ΤΖΠΒΕ του ΕΙΠ, οι οποίες είναι αδειοδοτημένες από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Νομαρχίας Αττικής, με κωδικούς αδειών EL25BIO013 και EL25BIO012. Όλες οι διαδικασίες χειρισμού ζώων εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτόκολλων και από την Επιτροπή Αξιολόγησης, Φροντίδας και Χρήσης των ζώων εργαστηρίου του ΕΙΠ, και οι άδειες εκδόθηκαν από τις εθνικές αρχές σύμφωνα με τον Ελληνικό νόμο 56/2013 και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010/63/ΕΕ. Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της αρχής των 3R+1: Reduction, Replacement, Refinement, Respect, και σύμφωνα με τις Τυποποιημένες Διαδικασίες Λειτουργιών, ΤΛΔ (Standard Operating Procedures, SOPs). Κατά την εφαρμογή της ΠΑΕ ακολουθήθηκαν οι αρχές ARRIVE (Animals in Research: Reporting *in vivo* experiments) (138).

5. Βήματα δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων

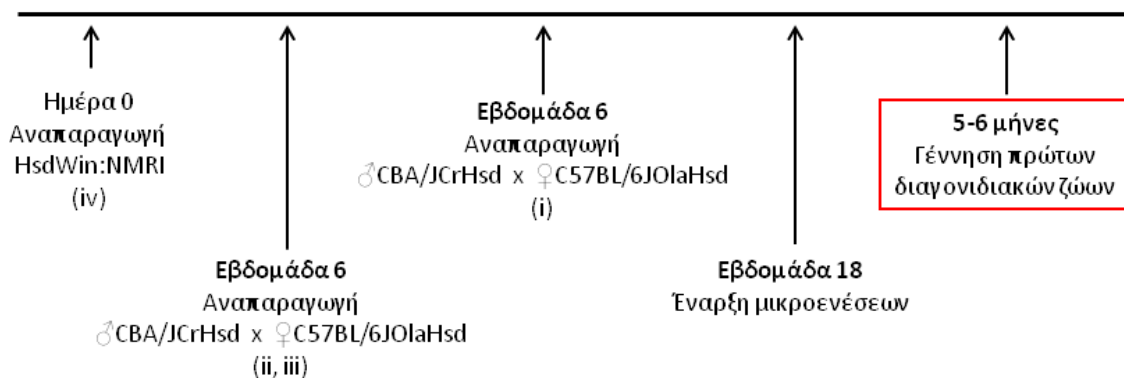
Τα βήματα που ακολουθούνται για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με τη μέθοδο της μικροένεσης σε προπυρήνες ζυγωτών (VIII) είναι:

- i. σχεδιασμός, παρασκευή, απομόνωση και καθαρισμός της διαγονιδιακής κατασκευής που πρόκειται να εισαχθεί στα γονιμοποιημένα ωάρια
- ii. απομόνωση γονιμοποιημένων ωαρίων με πρόκληση υπερωορρηξίας
- iii. μικροένεση του DNA σε ένα εκ των δύο προπυρήνων των ζυγωτών
- iv. εμβρυομεταφορά μικροενημένων ζυγωτών σε ψευδοέγκυα θηλυκά ποντίκια
- v. ταυτοποίηση ιδρυτών διαγονιδιακών σειρών (transgenic founders) και
- vi. διατήρηση αποικίας αυτών

Τα στελέχη των ποντικών και ο χρόνος που απαιτούνται για την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών είναι:

- i. Θηλυκά F1 ποντίκια ηλικίας 3 εβδομάδων για την παραγωγή των γονιμοποιημένων ωαρίων (7 εβδομάδες)
- ii. Αρσενικά F1 ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων για τη γονιμοποίηση των θηλυκών (i) (12 εβδομάδες)
- iii. Θηλυκά F1 ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων που χρησιμεύουν ως ψευδοέγκυα (pseudopregnants) (12 εβδομάδες)
- iv. Στείρα NMRI αρσενικά ποντίκια, μετά από αποκοπή του σπερματικού πόρου με μικροχειρουργική επέμβαση, για την απόκτηση ψευδοέγκυων θηλυκών (iii) (18 εβδομάδες).

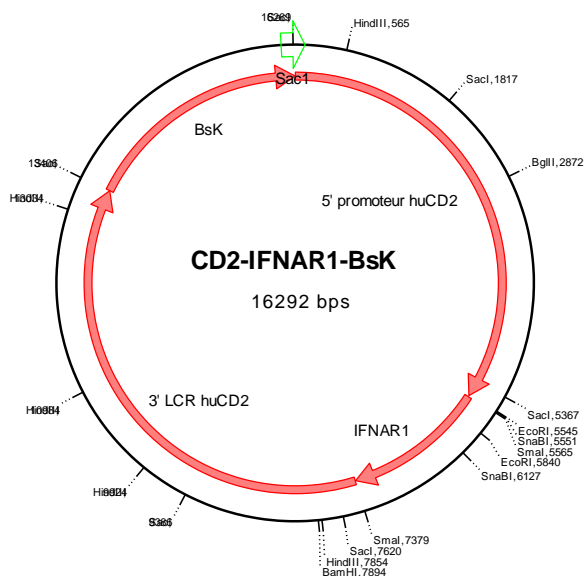
Στην εικόνα 3 απεικονίζεται το χρονοδιάγραμμα δημιουργία διαγονιδιακών ζώων από την ημέρα διασταύρωσης των κατάλληλων στελεχών ώστε να προκύψουν τα απαιτούμενα ζώα: i-iv.



Εικόνα 3. Χρονοδιάγραμμα για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών.

i. Σχεδιασμός, παρασκευή, απομόνωση και καθαρισμός της διαγονιδιακής κατασκευής

Η διαγονιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν τον IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα, σχεδιάστηκε από τον Δρ. Γ. Θυφρονίτη, και παρασκευάστηκε στο εργαστήριο CNRS UPR 9045, Laboratoire d'Oncologie Virale. Το cDNA του επιθυμητού γονιδίου *ifnar1* (1772 bp) ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στην *huCD2* κασέτα (5339 bp) (ευγενής προσφορά του Δρ. Δ. Κιούση) (139), ώστε να μεταγράφεται στα T λεμφοκύτταρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4. Η πιστή μεταγραφή του cDNA του *ifnar1* επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση (sequencing). Επιπλέον, η διαγονιδιακή κατασκευή έφερε την αλληλουχία FLAG, προκειμένου να είναι εφικτός ο διαχωρισμός του διαγονιδίου από το ενδογενές *ifnar1* στα πειράματα χαρακτηρισμού των διαγονιδιακών ζώων. Στη συνέχεια, η γονιδιακή κατασκευή κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα Bsk.



Εικόνα 4. Το πλασμίδιο που φέρει τη διαγονιδιακή κατασκευή.

Η γονιδιακή κατασκευή απομονώθηκε από τον φορέα με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού KpnI (13421 bp) και XbaI (16287 bp), και καθαρίστηκε με τη χρήση B αγαράσης (New England Biolabs) και κολωνών Elutip-d (Whatman, Schleicher & Schuell). Πριν από τη χρήση του διαγονιδίου για μικροένεση, καθαρίστηκε περαιτέρω μέσω ώσμωσης (dialysis tubing) σε ρυθμιστικό διάλυμα μικροενέσεων (σ. 77) και προσδιορίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση χρήσης του.

ii. Παραγωγή και απομόνωση γονιμοποιημένων ωαρίων

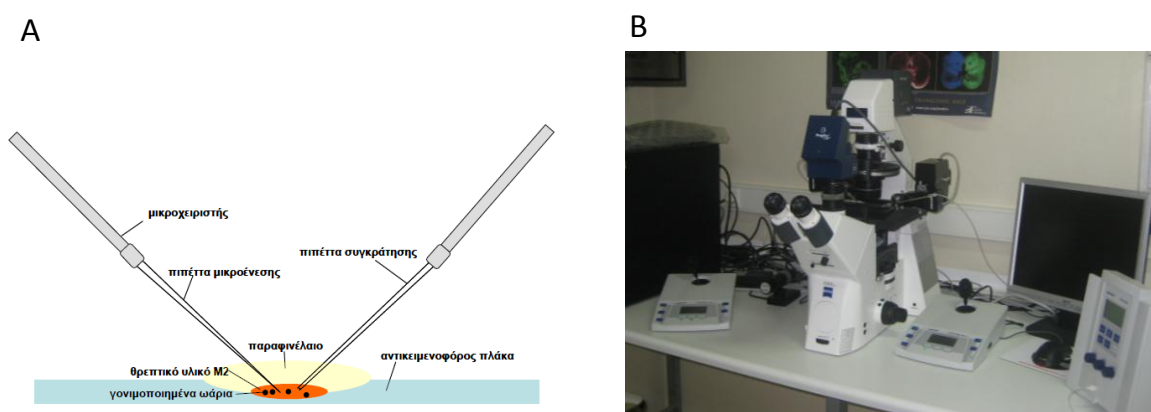
Επάγεται υπερωορρηξία (superovulation) σε θηλυκά ποντίκια με i.p. χορήγηση γοναδοτροπινών. Χρησιμοποιείται γοναδοτροπίνη ορού εγκύου φοράδας [PMSG, Intergonan (10IU, Intervet)], η οποία μιμείται την ενδογενή FSH – θυλακιοτρόπο ορμόνη, καθώς και ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη [hCG, Chorulon (10IU, Intervet)], η οποία μιμείται την LH ωχρινοτρόπο ορμόνη.

Η χορήγηση 10 UI Intergonan και 10 UI Chorulon στα ζώα πραγματοποιείται με διαφορά 46–48 ωρών, τα οποία εν συνεχεία διασταυρώνονται με αρσενικά ποντίκια. Την επόμενη ημέρα τα θηλυκά ποντίκια υπόκεινται σε ευθανασία σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO₂ και οι ωαγωγοί (oviducts) συλλέγονται και τοποθετούνται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό M2 (Sigma). Τα ωάρια που απελευθερώνονται με εκτομή του ωαγωγού, καθαρίζονται από τα ωοθυλακικά κύτταρα με προσθήκη υαλουρονιδάσης (10 mg/ml), ξεπλένονται σε M2, και μεταφέρονται σε τρυβλίο με

θρεπτικό υλικό M16 (Sigma), το οποίο τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO₂), μέχρι τη διεξαγωγή των μικροενέσεων.

iii. Μικροένεση του DNA στα γονιμοποιημένα ωάρια

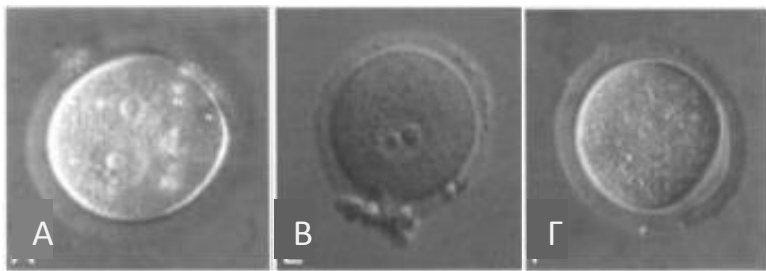
Για τις μικροενέσεις DNA (microinjections) στα ζυγωτά απαιτείται ένα ανάστροφο μικροσκόπιο με μικροχειριστές (Εικόνα 5). Μέχρι και 30 ζυγωτά εκπλένονται σε θρεπτικό μέσο M2 και μεταφέρονται σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα, που φέρει κοιλότητα στο κέντρο. Παράλληλα κατασκευάζεται μια πιπέττα συγκράτησης του ωαρίου (holding pipette), καθώς και μια πιπέττα μικροένεσης (injection pipette), χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο εξοπλισμό (σ. 80).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση (A) της αντικειμενοφόρου πλάκας, όπου γίνονται οι μικροενέσεις DNA στα γονιμοποιημένα ωάρια και (B) του μικροσκοπίου μικροενέσεων του Εργαστηρίου Διαγονιδιακής Τεχνολογίας (ΕΔΤ) του ΕΙΠ.

Η πιπέττα μικροένεσης πληρούται με το DNA και τοποθετείται στο μικροχειριστή. Η πιπέττα συγκράτησης πληρούται με υγρό Fluorinert (3M) και τοποθετείται στο δεύτερο μικροχειριστή. Οι δύο πιπέττες βυθίζονται στη σταγόνα M2 της αντικειμενοφόρου πλάκας, και με κατάλληλους χειρισμούς πραγματοποιούνται μικροενέσεις σε έναν εκ των δύο προπυρήνων (κατά προτίμηση στον πυρήνα του αρσενικού λόγω μεγαλύτερου μεγέθους). Τα ωάρια τοποθετούνται σε τρυβλίο με M16 εντός του επωαστικού κλιβάνου μέχρι την εμβρυομεταφορά.

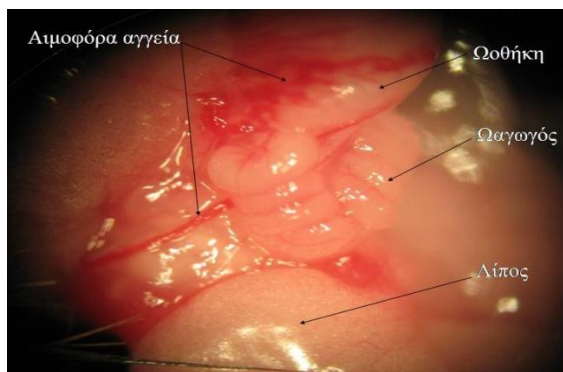
Επισημαίνεται ότι, η μορφολογία του ζυγωτού διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιτυχία των μικροενέσεων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Μορφολογία των ζυγωτών των ποντικών. Α. φυσιολογική μορφολογία, οι δύο προπυρήνες είναι εμφανείς, Β. θυλακοκύτταρα είναι ακόμη προσκολλημένα στη διαφανή ζώνη, γεγονός που δυσκολεύει τη μικροένεση, εμποδίζοντας το σωστό προσανατολισμό του ζυγωτού στην πιπέττα συγκράτησης, Γ. μη γονιμοποιημένο ζυγωτό, οι προπυρήνες δεν είναι ορατοί (Ανατύπωση από VIII).

iv. Μεταφορά εμβρύων σε ψευδοέγκυα θηλυκά ποντίκια

Αφού ολοκληρωθούν οι μικροενέσεις, ακολουθεί η μεταφορά τους (embryo transfer) στους ωαγωγούς ψευδοέγκυων θηλυκών (Εικόνα 7). Τα έμβρυα ξεπλένονται σε υλικό M2 και μεταφέρονται σε μια ειδικά κατασκευασμένη πιπέττα μεταφοράς (transfer pipette). Σε κάθε θηλυκό ποντίκι χορηγείται i.p. μίγμα αναισθητικού και μυοχαλαρωτικού διαλύματος (Rompun, Imalgene) σε αναλογία όγκων (0,8:1 v/v) σε 7,2ml 0,9% NaCl, και αναλγησία με χρήση καρπροφαίνης (Rimadyl) (200μl/20g). Εκτελείται ραχιαία τομή στο δέρμα και τομή στο περιτόναιο, οπότε αποκαλύπτεται ο ωαγωγός. Η εμβρυομεταφορά πραγματοποιείται κάτω από το στερεοσκόπιο, στο οποίο εφαρμόζεται εξωτερική πηγή ψυχρού φωτισμού. Διανοίγεται η μεμβράνη που καλύπτει την ωοθήκη και τον ωαγωγό με λεπτές λαβίδες, ώστε να εντοπισθεί η άκρη του ωαγωγού (infundibulum), όπου και εισάγεται η πιπέττα μεταφοράς και ακολουθεί απελευθέρωση των εμβρύων (Εικόνα 7). Μετά τη μικροχειρουργική επέμβαση, τα ζώα λαμβάνουν την κατάλληλη μετεγχειρητική φροντίδα.



Εικόνα 7. Τομή σε ψευδοέγκυο θηλυκό ποντίκι και εξαγωγή του ωαγωγού στην επιφάνεια, προκειμένου να γίνει η μεταφορά των εμβρύων (λήψη από το στερεοσκόπιο του ΕΙΠ, μεγέθυνση 4x).

Λεπτομέρειες και πιθανές εξηγήσεις τεχνικών προβλημάτων στη διαδικασία της δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών αναφέρονται στο βιβλίο *Manipulating the mouse embryo* (VIII).

v. Ταυτοποίηση διαγονιδιακών σειρών

Τα θηλυκά ποντίκια, στα οποία πραγματοποιήθηκε εμβρυομεταφορά, κυοφορούν για 19-21 ημέρες. Στα νεογέννητα, σε ηλικία 7 ημερών, γίνεται ταυτοποίηση για την ύπαρξη του διαγονιδίου σε DNA που απομονώνεται από βιοψία ουράς.

5.1 Απομόνωση DNA από βιοψίες ουρών ποντικών

Προκειμένου να σημανθούν τα ζώα, πραγματοποιείται αποκοπή της τελευταίας φάλαγγας του δακτύλου τους και συλλέγεται βιοψία ουράς. Χρησιμοποιώντας ειδικό διάλυμα φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης (24:24:1 v/v), το γονιδιωματικό DNA εκχυλίζεται στην υδατική φάση. Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και απομάκρυνση των αλάτων με χρήση διαλύματος αιθανόλης 70% και 100%, και τέλος ενυδάτωση του DNA, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω διαδικασίες.

5.2 Ανίχνευση διαγονιδίου με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει τη γρήγορη ανίχνευση ενός επιθυμητού γονιδίου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων DNA. Η βασική αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων και διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας.

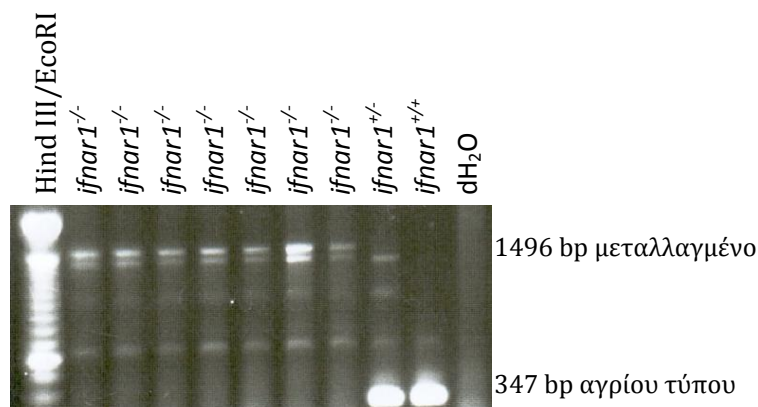
5.2.1 Συμβατική τεχνική PCR (regular PCR)

Η συμβατική τεχνική PCR περιλαμβάνει: αποδιάταξη αρχικού δείγματος DNA (denaturation), υβριδισμό (annealing) του με ειδικούς εκκινήτες, πολυμερισμό (extension) ή επιμήκυνση (elongation) του προς ενίσχυση τμήματος, αποδιάταξη προϊόντων και επαναλήψεις του κύκλου για συγκεκριμένο αριθμό, ανάλογα με την περίπτωση. Το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση εξασφαλίζει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μιας μονόκλωνης αλυσίδας DNA, και χρειάζεται ένα ελεύθερο OH. Το σημείο συνεπώς, στο οποίο θα αρχίσει η αντίδραση, καθορίζεται

από τους εκκινητές (primers), που υβριδίζονται στις συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες του DNA. Χρησιμοποιείται λοιπόν ένας εκκινητής για την κωδική αλυσίδα (sense primer) και ένας εκκινητής για τη μη κωδική αλυσίδα (antisense primer).

Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

- i. για το διαγονίδιο *cd2-ifnar1*: sense (huCD₂) 5'-CCAAAGGTAAGCATAAGAG-3', ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή του διαγονιδίου ώστε να μην ενισχυθεί και το ενδογενές γονίδιο, και antisense (IFNAR1) 5'-AGATTTCGTATGGTGTAAGT-3' (MWG)
- ii. για τη *neo* κασέτα: sense 5'-TCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTT-3' και antisense: 5'-ATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGA-3'.
- iii. για το διαχωρισμό αγρίου τύπου, ετερόζυγων και ελλειμματικών για το ενδογενές *ifnar1* ζώων (Εικόνα 8): οι εκκινητές προσδένονται σε εσώνια παραπλεύρως της *neo* κασέτας που είχε ενσωματωθεί στο *ifnar1* γονίδιο των *ifnar1*^{-/-} ζώων (136): sense 5'-AGCCATCTCACCAGCCCA-3' και antisense 5'-CCATGGCGGCTTCTTACC-3'
- iv. για το γονίδιο του TCR^{M0G}: sense 5'-CCCGGGCAAGGCTCAGCCATGCTCCTG-3' και antisense 5'-GCGGCCGCAATTCCCAGAGACATCCCTCC-3'.



Εικόνα 8. Ενδεικτική ποιοτική PCR για το διαχωρισμό αγρίου τύπου (347 bp), ετερόζυγων (347 bp και 1496 bp) και ελλειμματικών για το ενδογενές *ifnar1* (1496 bp) δειγμάτων.

5.2.2 Παρασκευή γέλης αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

Για τον προσδιορισμό των δειγμάτων που περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο καθώς και για να ελεγχθεί ότι το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Η γέλη που χρησιμοποιείται για την

ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR περιέχει 1% αγαρόζη. Ως ρυθμιστικό διάλυμα για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1x TBE (αραίωση 10x διαλύματος σε ddH₂O). Το μέγεθος του προϊόντος αναγνωρίζεται από τη σύγκριση με DNA από φάγο λ, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ένζυμα HindIII/EcoRI, και αποτελεί μάρτυρα γνωστού προτύπου μοριακών μεγεθών.

5.2.3 Ποσοτική ανάλυση DNA (Real Time PCR, qPCR)

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων ενδιαφέροντος, πραγματοποιείται με ποσοτική ή πραγματικού χρόνου PCR (qPCR ή Real Time PCR). Η μεθοδολογία της qPCR, με τη χρήση του Quanti-Fast SYBR Green kit (Qiagen), στηρίζεται στον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης για κάθε γονίδιο, η οποία δημιουργείται από τις τιμές των Ct (Cycle threshold) προς τους λογάριθμους των διαδοχικών αραιώσεων των DNA δειγμάτων με τη μέθοδο του ελάχιστου παραγώγου, για την εύρεση των τιμών A και B στην εξίσωση $Ct = A * \log(C_{DNA}) + B$. Η επιτρεπόμενη τιμή για το R² είναι > 0.99. Στο τέλος κάθε κύκλου, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης με κατάλληλο λογισμικό, προκειμένου να πιστοποιηθεί η ακεραιότητα και η ομοιογένεια των προϊόντων της qPCR.

Για τον προσδιορισμό των ομόζυγων για το διαγονίδιο ζώων, που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις μεταξύ των διαγονιδιακών ζώων, πραγματοποιήθηκε qPCR (140), με τη χρήση εκκινητών για τα γονίδια *ifnar1* and *ntn3* (QuantiTect Primer Assays, Qiagen). Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν με την αντίστοιχη τιμή για το γονίδιο της *gusb* του κάθε δείγματος, και η ανάλυση έγινε με λογισμικό LightCycler 480. Διπλάσια διαφορά στην ποσότητα DNA των δειγμάτων οδηγεί σε μείωση της τιμής Ct κατά μία μονάδα (140). Συνεπώς, τα δείγματα με την ίδια ποσότητα DNA αναμένεται να έχουν παρόμοιες τιμές Ct για ένα ενδογενές γονίδιο αναφοράς (*ntn3*), ενώ το ομόζυγο διαγονιδιακό ποντίκι να έχει μία μονάδα Ct λιγότερη για το γονίδιο *ifnar1*, συγκριτικά με το ημίζυγο για το διαγονίδιο ζώο.

6. Απομόνωση και ανάλυση mRNA

Η μελέτη της έκφρασης ενός γονιδίου αρχικά πραγματοποιείται στο επίπεδο της μεταγραφής του και συνεπώς της παραγωγής του mRNA του.

6.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από ιστούς και ηρεμούντα και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του διαλύματος TRizol (InVitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

6.2 Ποιοτική ανάλυση mRNA (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR)

Για την ποιοτική RT-PCR, RNA επεξεργασμένο με DNάση (Promega), για την αποικοδόμηση υπολειμμάτων DNA, μεταγράφηκε αντίστροφα με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega) και τυχαίων εξαμερών (Roche). Για την ανίχνευση του διαγονιδιακού *ifnar1* mRNA, το cDNA που προέκυψε από την αντίστροφη μεταγραφή, ενισχύθηκε με εκκινητές ειδικούς για το cDNA: 5'-GAAGAGTGTCTTGATGAAGA-3'; και την αλληλουχία FLAG της διαγονιδιακής κατασκευής: 5'-GAAAAGCTGGATATGATAGC-3', ώστε να μην ενισχυθεί και το ενδογενές *ifnar1* cDNA. Το PCR για την ενίσχυση του cDNA της ακτίνης χρησίμευσε ως θετικός μάρτυρας για την αντίστροφη μεταγραφή και οι εκκινητές ήταν οι εξής: sense 5'-CATCACTATTGGCAACGAGC-3' και antisense 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'.

6.3 Ποσοτική ανάλυση mRNA (Real Time RT-PCR, qRT-PCR)

Με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των παραγόμενων μορίων mRNA για συγκεκριμένα γονίδια ενδιαφέροντος (σ. 90). Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τα γονίδια *Ifnar1*, *Irgm1*, *Stap1*, *Slfn8*, *Gapdh* and *Gusb* (QuantiTect Primer Assays, Qiagen).

7. Ανίχνευση της έκφρασης πρωτεϊνών

Η μελέτη της έκφρασης ενός γονιδίου πραγματοποιείται στη συνέχεια σε επίπεδο της μετάφρασης του, και συνεπώς της παραγωγής της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε κυτταρικά ή ιστικά εκχυλίσματα, είτε επιφανειακά, είτε ενδοκυτταρικά, σε ζωντανά ή μη κύτταρα, είτε ακόμη και σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών.

7.1 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου αντιγόνου σε ένα μείγμα πρωτεϊνών (κυτταρικά ή ιστικά εκχύλισματά). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα παρασκευάζεται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι υπό διερεύνηση πρωτεΐνες να είναι διαλυτές και να μπορούν να διαχωριστούν σε γέλη (συνήθως πολυακρυλαμιδίου), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, βάσει των εξής ιδιοτήτων τους: α. μοριακό μέγεθος (η μέθοδος είναι γνωστή ως SDS-PAGE) β. ισοηλεκτρικό σημείο (ισοηλεκτρική εστίαση) και γ. μοριακό μέγεθος και ισοηλεκτρικό σημείο (η μέθοδος είναι γνωστή και ως ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων ή 2D). Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή πολυβινυλοφθοριδίου (PVDF) προκειμένου να ανιχνευθούν με ειδικά αντισώματα.

7.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Το εκχύλισμα των πρωτεϊνών επεξεργάζεται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι πρωτεΐνες να χάσουν κάθε άλλη διαμόρφωση πλην της πρωτοταγούς τους δομής. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση αναγωγικών ουσιών (β-μερκαπτοαιθανόλη, διθειοθρεϊτόλη κ.ά.), οι οποίες καταστρέφουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς με θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες. Παράλληλα, με τη χρήση ανιονικών απορρυπαντικών, όπως SDS (Sodium dodecyl sulfate, VWR), οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά, ούτως ώστε η ηλεκτοφόρηση να μην επηρεάζεται από το ηλεκτρικό τους φορτίο. Το μείγμα των πρωτεϊνών αναλύεται σε γέλη πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου, η σύσταση του οποίου εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Οι πρωτεΐνες υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου κατευθύνονται προς την άνοδο λόγω του αρνητικού τους φορτίου. Το μοριακό τους μέγεθος υπολογίζεται βάσει της διαδρομής που έχουν διανύσει πρότυπες πρωτεΐνες γνωστού μοριακού μεγέθους. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες είτε μεταφέρονται σε μεμβράνες, προκειμένου να ακολουθήσει ανοσοαποτύπωση, είτε οπτικοποιούνται στη γέλη με τη χρήση χρωστικών που δεσμεύονται στις πρωτεΐνες, όπως ο νιτρικός άργυρος.

7.1.2 Ανίχνευση πρωτεΐνης σε μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης

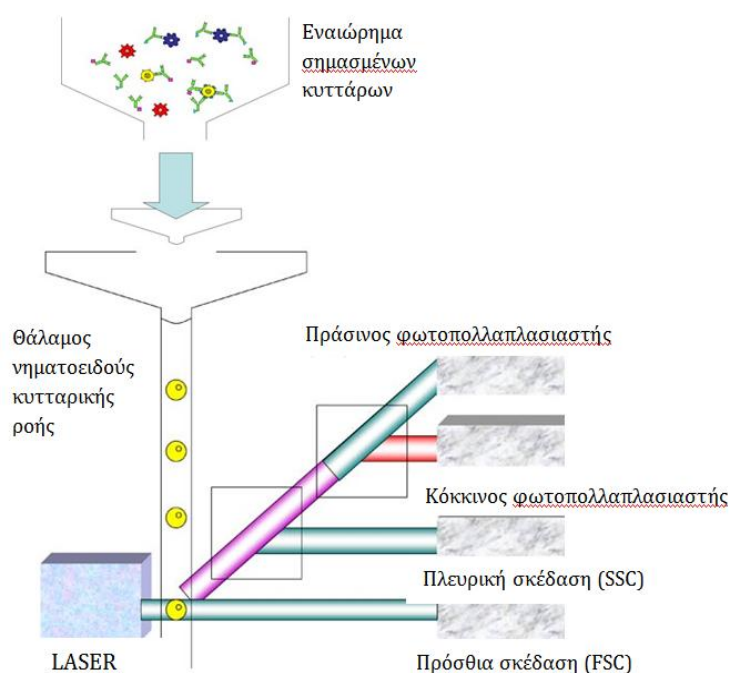
Εφόσον τα συστατικά ενός πρωτεϊνικού μείγματος έχουν αναλυθεί σε γέλη πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε κατάλληλες μεμβράνες υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι του αντιγόνου ενδιαφέροντος, αφού προηγουμένως οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος καλύπτονται με διάλυμα αποκλεισμού (αλβουμίνη, Sigma). Η περίσσεια των μη συνδεδεμένων αντισωμάτων απομακρύνεται με έκπλυση της μεμβράνης και ακολουθεί επώαση με ένα δεύτερο αντίσωμα έναντι των σταθερών περιοχών των ειδικών αντισωμάτων, το οποίο έχει συζευχθεί με κάποιο ένζυμο (συνήθως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση). Τέλος, η μεμβράνη επωάζεται με το υπόστρωμα του ενζύμου, και από την ενζυμική αντίδραση εκπέμπεται φθορισμός ή χημειοφωταύγεια. Μέσω αυτών, η εξεταζόμενη πρωτεΐνη ανιχνεύεται μετά από έκθεση της μεμβράνης είτε σε σύστημα ψηφιακής λήψης είτε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Στη διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, ακολούθησε επώαση με το ECL (GE Healthcare Amersham) και ανίχνευση των προϊόντων σε σύστημα ψηφιακής λήψης Phosphorimager. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Αντίσωμα από ποντικό έναντι pSTAT1 ανθρώπου (1:2000, BD Transduction Laboratories)
- Αντίσωμα από ποντικό έναντι Actin ποντικού (1:7000, BD Transduction Laboratories)
- Αντίσωμα από γίδα έναντι της IgG ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) (1:1000, Jackson Immunoresearch)
- Αντίσωμα από κόνικλο έναντι ISG15 ανθρώπου (1:1000, Cell Signaling Technology)
- Αντίσωμα από γίδα έναντι της IgG κόνικλου, συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) (1:1000, Jackson Immunoresearch)

7.2 Κυτταρομετρία ροής

Ανίχνευση πρωτεϊνών μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής, μία μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο για εξωκυττάρια όσο και για ενδοκυττάρια αντιγόνα. Αυτή η μέθοδος συνδυάζει την ανοσοϊστοχημική τεχνική (χρήση ειδικών αντισωμάτων για ένα αντιγόνο) με ένα σύστημα ανίχνευσης

που βασίζεται στις ακτίνες laser. Συγκεκριμένα, όταν μια μονήρης διάταξη κυττάρων διέρχεται μπροστά από μια δέσμη ακτίνων laser, το φως σκεδάζεται ανάλογα με το μέγεθος του κυττάρου, την κυτταρική μεμβράνη και την κοκκίωση εσωτερικά του κυττάρου. Επιπλέον, αν τα κύτταρα φέρουν στην επιφάνεια τους αντιγόνα, τα οποία έχουν συνδεθεί με αντισώματα συζευγμένα με φθορίζοντα μόρια, όπως φυκοερυθρίνη (PE) ή ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), αυτά διεγείρονται από τις ακτίνες laser, ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των κυττάρων που φέρουν τα αντιγόνα (Εικόνα 9). Ανάλογα με τις δυνατότητες του κυτταρομετρητή ροής, είναι δυνατή η ταυτόχρονη σήμανση με παραπάνω του ενός αντισώματα, αρκεί το κάθε ένα από αυτά να είναι συζευγμένο με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική (multi colour flow cytometry). Οι πληροφορίες συλλέγονται και αναλύονται με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (CellQuest, BD).



Εικόνα 9. Αρχή μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής.

7.2.1 Προσδιορισμός κυτταρικών πληθυσμών

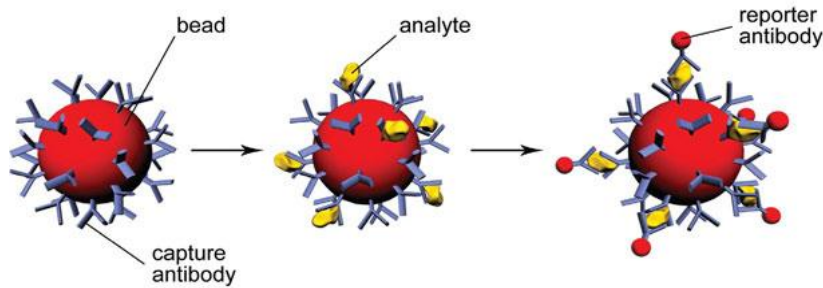
Η προετοιμασία των δειγμάτων για την κυτταρομετρία ροής περιγράφεται παρακάτω. Τα κύτταρα απομονώνονται από τον προς εξέταση ιστό (σ. 97) και μεταφέρονται σε διάλυμα FACS (σ. 78) δημιουργώντας ένα μονοκυτταρικό εναιώρημα. Ακολουθεί χρώση των κυττάρων με κατάλληλα αντισώματα, αφού έχει

προηγηθεί τιτλοδότηση καθενός από αυτά. Μετά από επώαση στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου (ανάλογα το αντίσωμα) για 30 λεπτά, τα κύτταρα εκπλένονται από το αντίσωμα και επαναιωρούνται σε διάλυμα FACS. Σε περίπτωση που το προς μελέτη αντιγόνο είναι ενδοκυτταρικό, προηγείται μονιμοποίηση των κυττάρων με 2% PFA σε PBS, για 20 λεπτά, στους 4°C, και διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης με ειδικό διάλυμα διάτρησης (σ. 79) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε περίπτωση που το προς μελέτη αντιγόνο βρίσκεται ενδοπυρηνικά του κυττάρου, μετά τη μονιμοποίηση των δειγμάτων, ακολουθεί προσθήκη ψυχρού διαλύματος μεθανόλης για 50 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί ενδοκυττάρια χρώση και επαναιώρηση σε διάλυμα FACS. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: anti-CD3-FITC, anti-CD3-APC, anti-CD4-APC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-pSTAT1-PE, anti-VLA4-PE, anti-CCR5-PE, anti-CD69-PE, anti-CCR6-APC, anti-Foxp3-PE, anti-CD25-APC, anti-IFN γ -PE, anti-IL17-PE, anti-IL10-PE (BD Biosciences) και anti-IFNAR1-PE (eBioscience).

7.2.2 Προσδιορισμός εκκρινόμενων κυτταροκινών

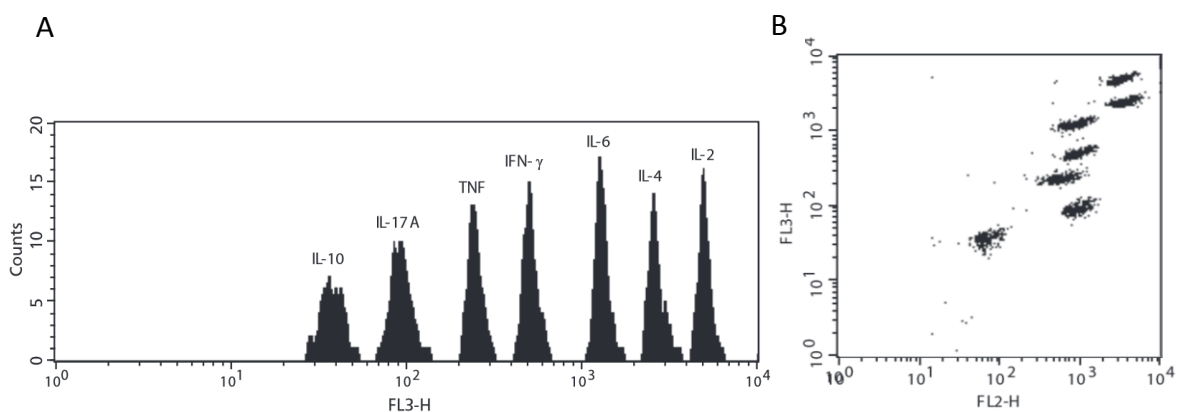
Μία ακόμα εφαρμογή του κυτταρομετρητή ροής, η οποία χρησιμοποιείται σε αυτή τη διατριβή, είναι η χρήση του Cytometric Bead Array (CBA, BD). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση εκκρινόμενων κυτταροκινών στο υπερκείμενο μίας κυτταρικής καλλιέργειας.

Κάθε κυτταροκίνη που περιέχεται στο υπερκείμενο, προσδένεται αφενός σε μία ομάδα σφαιριδίων που φέρουν το αντίστοιχο αντίσωμα (capture antibody) και συγκεκριμένη ποσότητα φθορίζουσας χρωστικής που εκπέμπει στα 650nm, και αφετέρου σε αντίσωμα-ανιχνευτή (reporter antibody), anti-IgG-PE. Οι ομάδες σφαιριδίων, λόγω της διαφορετικής ποσότητας φθορίζουσας χρωστικής που φέρουν, διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση τη μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescent intensity, MFI). Τα προς μελέτη υπερκείμενα αναμιγνύονται με τα σφαιρίδια και με το αντίσωμα-ανιχνευτή, anti-IgG-PE, βάσει του πρωτοκόλλου του κατασκευαστή (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης της κάθε κυτταροκίνης του δείγματος στο αντίστοιχο αντίσωμα (capture antibody) του κάθε σφαιριδίου (bead) και στο αντίσωμα-ανιχνευτή (reporter antibody) (FCAP Array v2.0 Software Quick Start Guide).

Η ένταση του φθορισμού της PE από κάθε σύμπλεγμα σφαιρίδιο-κυτταροκίνη-anti-IgG-PE αντιστοιχεί στη συγκέντρωση κάθε κυτταροκίνης στο υπερκείμενο. Τα αποτελέσματα αναλύονται και επεξεργάζονται με το λογισμικό FCAP array 3.0 software (Soft flow, Inc) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Ενδεικτικά γραφήματα του CBA array kit (Th1,Th2,Th17), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. (A) Τα σφαιρίδια των 7 διαφορετικών κυτταροκινών διαχωρίζονται με βάση τη διαφορετική ένταση φθορισμού (FL3-H). (B) Ένα τυχαίο δείγμα, όπου φαίνεται η ένταση φθορισμού κάθε κυτταροκίνης (FL3-H) στο υπό εξέταση δείγμα (PE-FL2-H).

8. Πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες

Τα προς μελέτη δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διατριβή αυτή προέρχονται από όργανα και κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από ποντίκια. Ως εκ τούτου, ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της μελέτης αυτής αποτελεί η απομόνωση των οργάνων και των κυττάρων και οι πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες.

8.1 Απομόνωση λεμφικών οργάνων και κυττάρων

Για τη λήψη λεμφικών οργάνων (θύμου, σπλήνα και λεμφαδένων) τα ζώα υπόκεινται σε ευθανασία σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO₂, και μετά από λαπαροτομή, τα εν λόγω όργανα απομονώνονται άσηπτα. Αυτά τοποθετούνται σε στείρο θρεπτικό υλικό (RPMI 1640 + 10% FBS) στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Για την απομόνωση κυττάρων ακολουθεί προσεκτική σύνθλιψη των οργάνων με τα σκέλη ανατομικής λαβίδας και τα κύτταρα απελευθερώνονται σε κυτταρικό εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 450 g για 8 λεπτά στους 4°C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Beckmann, και εν συνεχεία το ίζημα επαναδιαλύεται σε ίσο όγκο ισοτονικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS. Κατόπιν, ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων με ειδικό διάλυμα Gey's και τέλος προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων ανά ml με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου Neubauer. Σε αρκετά πειράματα ακολούθησε εμπλουτισμός του κυτταρικού εναιωρήματος σε CD3⁺ T λεμφοκύτταρα, μέσω διοχέτευσής του σε κολώνες εμπλουτισμού αρνητικής επιλογής των CD3⁺ T λεμφοκυττάρων (R&D Systems) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η καθαρότητα του κυτταρικού εναιωρήματος σε CD3⁺ T λεμφοκύτταρα ήταν >90%, όπως διαπιστώθηκε με χρώση με κατάλληλο αντίσωμα για το CD3ε συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική PE και χρήση κυτταρομετρία ροής.

8.2 Πολυκλωνική και αντιγονοειδική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και εκτίμηση του πολλαπλασιασμού τους

Η διέγερση των T λεμφοκυττάρων μπορεί να είναι είτε πολυκλωνική, χρησιμοποιώντας αντισώματα για τα CD3 και CD28 αντιγόνα, είτε αντιγονοειδική, χρησιμοποιώντας το ειδικό αντιγόνο-πεπτίδιο, που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενη ενεργοποίηση *in vivo*. Η μέτρηση του διπλασιασμού του DNA μπορεί να γίνει με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης της ραδιενεργούς θυμιδίνης. Περιληπτικά, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο, όπου περιέχεται ο παράγοντας διέγερσης, όπως επίσης και η ραδιενεργή θυμιδίνη, η οποία ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων σε κάθε διπλασιασμό τους. Έτσι, τα κύτταρα σημαίνονται με ραδιενέργεια, η οποία εν συνεχεία μπορεί να μετρηθεί με μετρητή ακτινών β.

Ο δείκτης διέγερσης (stimulation index) υπολογίστηκε από το λόγο:

$$\frac{\text{ραδιενέργεια/δείγμα+αντιγόνο}}{\text{ραδιενέργεια/δείγμα-αντιγόνο}}$$

Η ραδιενέργεια που μετράται στο υπό μελέτη δείγμα κυττάρων είναι ανάλογη της σύνθεσης του DNA και κατ' επέκταση του πολλαπλασιασμού τους.

Η πολυκλωνική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων εξετάστηκε σε σπληνοκύτταρα και κύτταρα λεμφαδένων, τα οποία απομονώθηκαν από ποντίκια και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία πολλαπλών φρεατίων, όπου είχε επιστρωθεί το anti-CD3 αντίσωμα σε διαδοχικές αραιώσεις (0-3μg/ml, BD) παρουσία ή απουσία του anti-CD28 αντισώματος (1μg/ml, BD). Επίσης, τα φρεάτια, τα οποία δεν επιστρώθηκαν με αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας.

Για να ελεγχθεί η αντιγονοειδική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, ζώα ανοσοποιήθηκαν στη βάση της ουράς με γαλάκτωμα, το οποίο περιείχε 50 μg του πεπτιδίου 33-55 της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG₃₅₋₅₅, Biotrend) σε πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's Adjuvant, CFA, Sigma) και 400 μg *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, Difco). Δέκα μέρες αργότερα απομονώθηκαν σπληνοκύτταρα και κύτταρα λεμφαδένων και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία του MOG πεπτιδίου σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 μg/ml ή παρουσία της λεκτίνης κονκαναβαλίνη A (ConA, Sigma) σε συγκέντρωση 5 μg/ml, ως θετικός μάρτυρας.

8.3 Διαφοροποίηση παρθένων T λεμφοκυττάρων

Μετά την απομόνωση των κυττάρων, ακολούθησε πολυκλωνική διέγερση με anti-CD3/anti-CD28 αντισώματα, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα παρθένα T λεμφοκύτταρα, και συγκεκριμένα ο υποπληθυσμός των βοηθητικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, δύναται να διαφοροποιηθεί προς βοηθητικά Th1, Th2 ή Th17 λεμφοκύτταρα, ανάλογα με το περιβάλλον των κυτταροκινών. Για να επιτευχθεί διαφοροποίηση προς Th1 λεμφοκύτταρα, στην καλλιέργεια των T λεμφοκυττάρων προστέθηκε IL-12 (10 ng/ml) και anti-IL-4 (10 μg/ml), ενώ για τη διαφοροποίηση προς Th17 λεμφοκύτταρα προστέθηκαν IL-6 (20 ng/ml), TGF-β (10 ng/ml) (Peprotech), IL-23 (20 ng/ml) (eBioscience) και anti-IFN-γ (10 μg/ml) (R&D systems). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν 4 μέρες, ενώ τις τελευταίες 3 ώρες

επαναδιεγέρθηκαν με 1 μg/ml ιονομυκίνης και 10 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA), παρουσία 5μg/ml μπρεφελδίνης A (Sigma). Στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση των κυττάρων έναντι του επιφανειακού αντιγόνου CD4, τα οποία μονιμοποιήθηκαν με 2% PFA σε PBS για 20 λεπτά, στους 4°C και έγιναν διαπερατά με ειδικό διάλυμα διάτρησης για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε χρώση με αντισώματα έναντι των ενδοκυτταρικών κυτταροκινών IFN-γ και IL-17, συζευγμένα με PE (BD Biosciences).

9. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το νωτιαίο μυελό

Για να μελετηθεί η έκφραση κυτταροκινών από T λεμφοκύτταρα στο ΚΝΣ, ήταν αναγκαία η απομόνωσή τους από τον ιστό. Για το σκοπό αυτό, τα ζώα υπόκεινται σε ευθανασία σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO₂, και μετά από λαπαροτομή απομονώνεται άσηπτα η σπονδυλική στήλη. Με τη χρήση σύριγγας διοχετεύεται PBS στο νωτιαίο σωλήνα, οπότε απομονώνεται ο νωτιαίος μυελός, ο οποίος τοποθετείται σε στείρο θρεπτικό υλικό (RPMI 1640 + 10% FBS). Για την απομόνωση των κυττάρων ακολουθεί προσεκτική σύνθλιψη του ιστού και τα κύτταρα απελευθερώνονται ως κυτταρικό εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 450 g για 8 λεπτά, στους 4°C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Beckmann, και εν συνεχεία το ίζημα επαναιωρείται σε ίσο όγκο ισοτονικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS). Κατόπιν, προστίθενται δύο διαλύματα Percoll (σ. 79) διαφορετικής συγκέντρωσης και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 λεπτά, για το σχηματισμό διαβάθμισης συγκέντρωσης. Στην ανώτερη στοιβάδα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρωση, συγκεντρώνονται τα μονοπύρηννα κύτταρα του νωτιαίου μυελού, τα οποία απομονώνονται με τη βοήθεια πιπέττας Pasteur, και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

10. Απομόνωση λευκοκυττάρων του αίματος

Για το σκοπό αυτό, τα ζώα υπόκεινται σε ευθανασία σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO₂, και συλλέγεται μετά από καρδιακή παρακέντηση, σε σωλήνα συλλογής με αντιπηκτικό, ηπαρίνη (100IU/20μl, LEO Pharmaceutical Hellas). Ακολουθεί προσθήκη ήπιου διαλύματος λύσης ερυθροκυττάρων (σ. 78), ανάδευση και

φυγοκέντρηση στα 450 g, για 8 λεπτά, στους 4°C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Beckmann. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου το ίζημα αποκτήσει λευκό χρώμα, οπότε τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό (RPMI 1640 + 10% FBS) και διατηρούνται στους 4°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

11. Επαγωγή πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), αξιολόγηση και χορήγηση ανασυνδυασμένης IFN-β

Για την επαγωγή της ΠΑΕ χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια με γενετικό υπόβαθρο C57BL/6, ηλικίας 8-12 εβδομάδων, στα οποία χορηγήθηκε το πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ (Biotrend). Το πεπτίδιο (50 µg/ποντίκι) ομογενοποιήθηκε σε 100 µl CFA, που περιείχε 400 µg *Mycobacterium tuberculosis*. Το γαλάκτωμα ενέθηκε s.c. στη βάση της ουράς του ποντικού. Την ημέρα που πραγματοποιήθηκε η ανοσοποίηση, καθώς και δύο ημέρες μετά, χορηγήθηκαν i.p. 200 ng τοξίνης του βακτηρίου *Bordetella pertussis* (PTx, Sigma) σε κάθε ζώο. Τα ποντίκια παρακολουθήθηκαν ως προς τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου και ζυγίζονταν καθημερινά. Τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ αξιολογήθηκαν με βάση την παρακάτω κλίμακα:

0 = απουσία κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ,

1 = αδυναμία ή παράλυση της ουράς,

2 = παραπάρεση (ατελής παράλυση ενός ή και των δύο οπίσθιων άκρων),

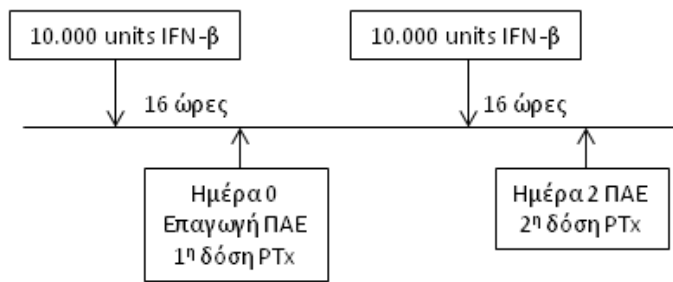
3 = παραπληγία (πλήρης παράλυση και των δύο οπίσθιων άκρων),

4 = παραπληγία με αδυναμία ή παράλυση των πρόσθιων άκρων (ποντίκια με βαθμό 4 για περισσότερες από μία ημέρες, υπόκεινται σε ευθανασία),

5 = ετοιμοθάνατα ή νεκρά ζώα.

Ενδιάμεσες διαβαθμίσεις της παραπάνω κλίμακας αντιστοιχούν σε ενδιάμεση κλινική εικόνα. Για την αρτιότερη διατροφή των παράλυτων ζώων, στη βάση του κλουβιού τοποθετήθηκαν συμπληρωματικά, τροφή και νερό (*ad libitum*).

Σε συγκεκριμένα πειράματα, χορηγήθηκε στα ποντίκια ανασυνδυασμένη IFN-β ποντικού i.p. (10^4 U/100µl/ποντίκι, PBL Assay Science) 16 ώρες πριν την επαγωγή της ΠΑΕ και 16 ώρες πριν τη δεύτερη δόση PTx την ημέρα 2 (Εικόνα 12). Τα ποντίκια ελέγχου ενέθηκαν αντίστοιχα με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS.



Εικόνα 12. Απεικόνιση του σχήματος χορήγησης IFN-β κατά την ΠΑΕ.

12. Ιστοπαθολογική ανάλυση

Η ιστολογία πραγματοποιείται με σκοπό την ανίχνευση πιθανής παθολογίας στους υπό μελέτη ιστούς με ιστοχημεία ή ανοσοϊστοχημεία. Στη συγκεκριμένη διατριβή, πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική ανάλυση του σπλήνα και του νωτιαίου μυελού, μετά από αιμοδιήθηση των ποντικών με 4% PFA σε συνθήκες βαθιάς αναισθησίας χωρίς ανάνηψη. Οι ιστοί συλλέχθηκαν και μονιμοποιήθηκαν περαιτέρω στο ίδιο μονιμοποιητικό μέσο καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C.

Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε επεξεργασία για ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα: αφυδάτωση των ιστών σε ιστοκινέτα, έγκλιση των ιστών σε παραφίνη, παραγωγή τομών (μικροτόμος), χρώση τομών και μικροσκοπική αξιολόγηση. Για την παρατήρηση της φλεγμονής χρησιμοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H&E), για την απομυελίνωση χρώση Luxol Fast Blue και για την καταστροφή των νευρώνων αργυρή χρώση Bielschowsky. Για να εκτιμηθεί ο βαθμός διείδυσης του νωτιαίου μυελού από T λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (141). Η αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων (unmasking) στις τομές παραφίνης έγινε σε κατάλληλη συσκευή παραγωγής ατμού μέσα σε διάλυμα 10 mM EDTA (pH 8.5) για 1 ώρα στους 95–100°C. Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν από κόνικλο έναντι του CD3 ποντικού (1:300, Cell Marque), το δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ήταν από γίδα έναντι της IgG κόνικλου (1:1000, Jackson ImmunoResearch), και τέλος σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης και διαμινοβενζιδίνη (DAB, Vector Laboratories).

13. Ανάλυση μικροσυστοιχειών cDNA (cDNA microarray analysis)

Προκειμένου να μελετηθούν αλλαγές στο γονιδίωμα των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ποντικών κατά την ΠΑΕ, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μικροσυστοιχειών cDNA από διάφορους ιστούς.

Αρχικά, ολικό RNA απομονώθηκε από το νωτιαίο μυελό και CD3⁺ εμπλουτισμένα σπληνοκύτταρα από 3-5 ζώα ανά γονότυπο, χωριστά, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε με τη χρήση φωτομέτρου Nanodrop και το RNA ομαδοποιήθηκε σε ίσες ποσότητες από κάθε ζώο ανά ομάδα.

Σε συνεργασία με τη Μονάδα Μικροσυστοιχειών, του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας (ITE), 100 ng RNA επεξεργάστηκαν με το WT Expression kit (Ambion) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το μονόκλωνο cDNA που παράχθηκε, σημάνθηκε και υβριδοποιήθηκε σε μικροσυστοιχειές GeneChip Mouse Gene ST 1.0 array (Affymetrix). Οι μικροσυστοιχειές ξεπλύθηκαν, χρώστηκαν με τη χρήση του hybridization wash and stain kit (Affymetrix) και σαρώθηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Affymetrix Model 3000 scanner). Οι τιμές έκφρασης δημιουργήθηκαν με το λογισμικό Microarray Expression console (Affymetrix) και κανονικοποιήθηκαν με τον αλγόριθμο RMA (Robust Mult-chip Average), προκειμένου να αποκτηθούν οι τιμές έκφρασης για κάθε ομάδα ανιχνευτών (probe set). Με βάση τις κανονικοποιημένες τιμές υπολογίστηκε αύξηση ή μείωση στις τιμές έκφρασης, και οι αλλαγές μεγαλύτερες από 1,5 φορές στη γονιδιακή έκφραση χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή σημαντικών αποτελεσμάτων με χρήση Excel (MS Office). Όταν υπήρχαν ασυμφωνίες ως προς την κατεύθυνση της έκφρασης μεταξύ πολλαπλών ομάδων ανιχνευτών, το γονίδιο δε συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση. Τα πειράματα μικροσυστοιχειών συμμορφώθηκαν με τις οδηγίες Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) και είναι διαθέσιμα στη βάση δεδομένων ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, αριθμός πρόσβασης, E-MTAB-2989). Σε συνεργασία με τη Δρ Δωροθέα Καζάζη του Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ, πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των γονιδίων βάσει της λειτουργίας τους, σύμφωνα με την ιστοσελίδα του National Institute of Allergy and Infectious Diseases Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (<http://www.david.abcc.ncifcrf.gov>).

14. Στατιστική ανάλυση

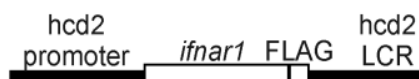
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Sigma Plot 11.0. Για τον προσδιορισμό των σημαντικών διαφορών σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολούθησαν, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Mann Whitney Rank Sum Test. Τιμές p μικρότερες ή ίσες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέρος 1. Δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν τον IFNAR αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα

1.1 Δημιουργία και ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών

Προκειμένου να επιτευχθεί επιλεκτική σηματοδότηση των IFN-I μέσω των T λεμφοκυττάρων, αρχικά δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ζώα που υπερέκφραζαν την IFNAR1 υπομονάδα στα T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1.1).

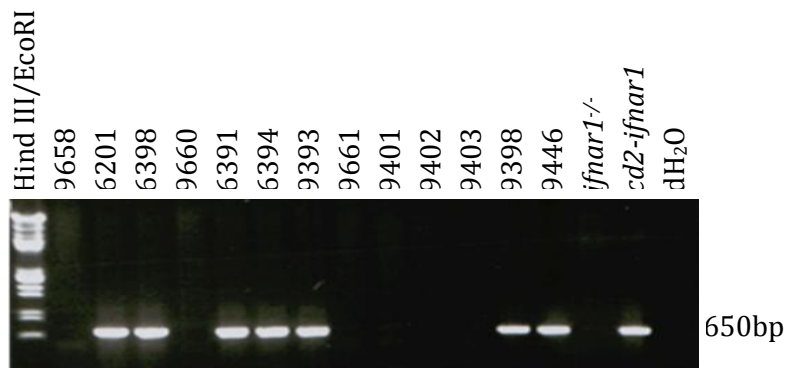


Εικόνα 1.1 Διαγονιδιακή κατασκευή που φέρει το *ifnar1*cDNA ποντικού υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *hcd2* γονιδίου, και ακολουθείται από το FLAG και την περιοχή LCR (Locus Control Region) του *hcd2* γονιδίου.

Μετά τη διεξαγωγή μικροενέσεων, προέκυψαν επτά διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με PCR, σε DNA που απομονώθηκε από βιοψία ουράς των ποντικών (Εικόνα 1.2). Πέντε από τα επτά διαγονιδιακά ζώα μεταβίβαζαν το διαγονίδιο στους απογόνους τους με Μενδελιανό τρόπο, οπότε αποτέλεσαν τους ιδρυτές των διαγονιδιακών σειρών (Tg, Transgenic founders) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών. Οι ιδρυτές που μεταβίβαζαν το διαγονίδιο στους απογόνους απεικονίζονται με μπλε χρώμα.

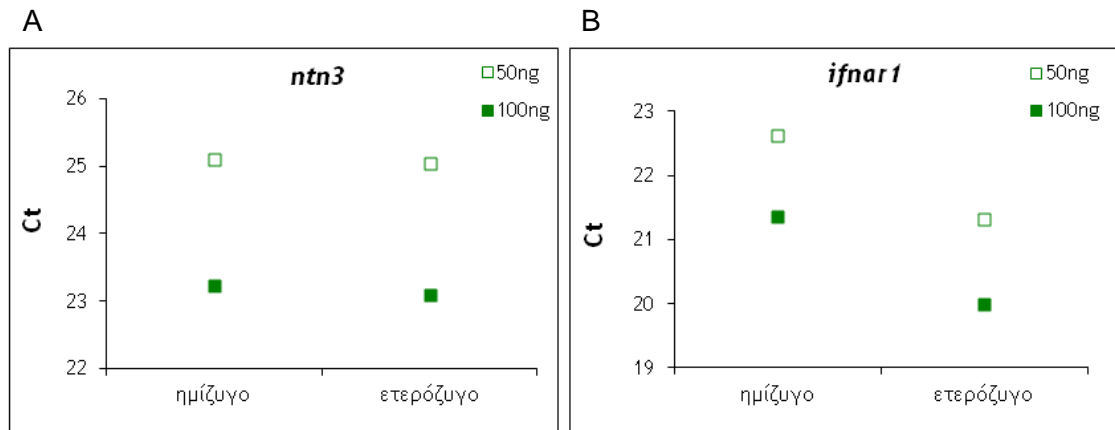
Γονιμοποιημένα ωάρια που μεταφέρθηκαν σε ψευδέγκυα θηλυκά	175
Απόγονοι που γεννήθηκαν	19 (11%)
Διαγονιδιακές σειρές	Tg6201, Tg6391, Tg6394 Tg6398, Tg9393, Tg9398, Tg9446 (37%)



Εικόνα 1.2 Ανίχνευση του διαγονιδίου στο γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από βιοψία ουράς.

Τα ζώα υπερεκφραστές διασταυρώθηκαν στη συνέχεια με ζώα ελλειμματικά για την IFNAR1 υπομονάδα (*ifnar1*^{-/-}) για 12 γενιές, ακολουθώντας τη στρατηγική αναπαραγωγής, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (σ. 81), ώστε να προκύψουν τα διπλά διαγονιδιακά ζώα που θα εκφράζουν την IFNAR1 αποκλειστικά και μόνο στα Τ λεμφοκύτταρα.

Από τις διασταυρώσεις μεταξύ των ημίζυγων διαγονιδιακών ζώων, προέκυψαν ομόζυγοι για το διαγονίδιο απόγονοι, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) (135) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Διαχωρισμός ετερόζυγων και ομόζυγων για το διαγονίδιο ζώων. Απεικονίζονται οι τιμές Ct για το *ntn3*, που χρησίμευσε ως γονίδιο αναφοράς και για το επιθυμητό γονίδιο *ifnar1*. Το γονιδιωματικό DNA από ημίζυγο ζώο χρησίμευσε ως ζώο αναφοράς με γνωστή ζυγωτία (A). Ο διπλασιασμός της ποσότητας του διαγονιδίου, που εκφράζεται με μείωση της τιμής Ct κατά μία μονάδα, αρκεί για το διαχωρισμό των ημίζυγων και των ομόζυγων ζώων (B).

Βρέθηκε ότι τόσο για τα ομόζυγα όσο και για τα ημίζυγα για το διαγονίδιο ζώα, η διπλάσια ποσότητα DNA αντιστοιχίσε σε μείωση της τιμής Ct κατά μία μονάδα για το

ενδογενές γονίδιο *ntn3* (Εικόνα 1.3A). Παράλληλα, το ομόζυγο ζώο διαχωρίστηκε από το ημίζυγο, λόγω μειωμένης τιμής Ct για το διαγονίδιο *ifnar1*, χρησιμοποιώντας ίδια ποσότητα DNA (σ. 90) (Εικόνα 1.3B).

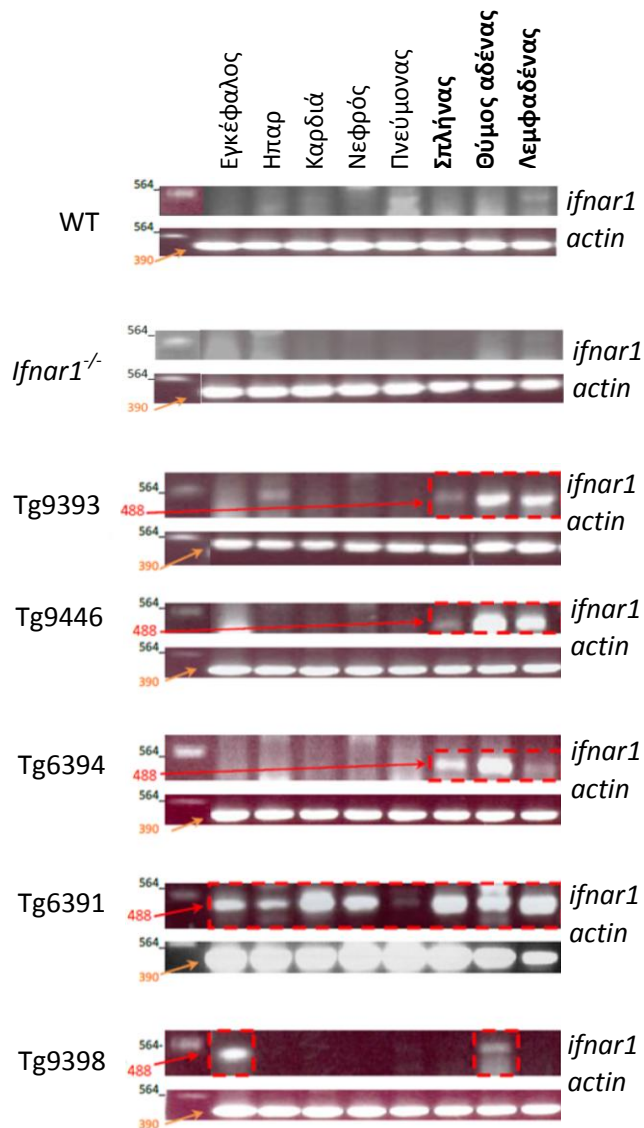
Τόσο οι ημίζυγοι, όσο και οι ομόζυγοι για το διαγονίδιο απόγονοι εξέφραζαν παρόμοια επίπεδα IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα, καθώς και παρόμοια επίπεδα φωσφορυλίωσης του STAT1 μεταγραφικού παράγοντα μετά τη διέγερση με IFN-I (Εικόνα 1.15). Για το λόγο αυτό, κι επειδή βάσει βιβλιογραφίας (κεφ. 4.2.1) υψηλά επίπεδα του υποδοχέα ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι των IFN-I, στα πειράματα της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν μόνο ημίζυγα διαγονιδιακά ζώα.

1.2 Ανάλυση των διπλά διαγονιδιακών σειρών σε επίπεδο λειτουργικής έκφρασης του διαγονιδίου, και λειτουργικότητας των T λεμφοκυττάρων μετά από διέγερσή τους

Στα διπλά διαγονιδιακά ζώα όλων των σειρών ακολούθησε ανάλυση σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο, ώστε να επιλεγούν οι σειρές που εκφράζουν την IFNAR1 ειδικά στα T λεμφοκύτταρα, σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των αγρίου τύπου ζώων, ώστε να διασφαλιστεί σε μεγαλύτερο βαθμό η προσομοίωση με τη φυσιολογική κατάσταση. Προκειμένου οι πειραματικές διαδικασίες που θα εφαρμοστούν για τον χαρακτηρισμό των διπλά διαγονιδιακών ποντικών να είναι οι άριστες δυνατές, προηγήθηκε βελτιστοποίηση αυτών (προσδιορισμός συγκέντρωσης IFN- α/β και χρόνου επώασης με αυτήν) σε δείγματα από αγρίου τύπου ποντίκια του ίδιου στελέχους. Στις πειραματικές διαδικασίες, ποντίκια ελλειμματικά για τον υποδοχέα (*ifnar1*^{-/-}) και αγρίου τύπου (WT) χρησίμευσαν ως ομάδες ελέγχου.

1.2.1 Έλεγχος της ιστοειδικής έκφρασης της IFNAR1 σε επίπεδο RNA

Για την επιβεβαίωση της μεταγραφής του διαγονιδίου ειδικά στους λεμφικούς ιστούς, RNA που απομονώθηκε από οκτώ διαφορετικούς ιστούς, μεταγράφηκε αντίστροφα σε cDNA, και με τη χρήση της RT-PCR ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 Ιστοειδική έκφραση του *ifnar1* mRNA με RT-PCR. Χρησιμοποιήθηκε εκκινητής ειδικός για το FLAG τμήμα της διαγονιδιακής κατασκευής, οπότε ενισχύθηκε το θραύσμα 488 bp που υπάρχει μόνο στο μετάγραφο του διαγονιδιακού *ifnar1*.

Μετάγραφα του γονιδίου *ifnar1* ανιχνεύθηκαν ειδικά στους λεμφικούς ιστούς ζώων από τις σειρές Tg6394, Tg9393 και Tg9446, ενώ απουσίαζαν στον εγκέφαλο, το ήπαρ, την καρδιά, το νεφρό και τον πνεύμονα (Εικόνα 1.4). Στις σειρές Tg6391 και Tg9398 παρατηρήθηκε έκφραση του *ifnar1* μεταγράφου σε μη λεμφικούς ιστούς, οπότε φάνηκε η μη ειδική έκφραση του γονιδίου *ifnar1* σε αυτές. Μετάγραφα του ενδογενούς γονιδίου *ifnar1* δεν ανιχνεύθηκαν στους ιστούς των αγρίου τύπου ζώων, λόγω της χρήσης ειδικών εκκινητών για το FLAG τμήμα της διαγονιδιακής κατασκευής (σ. 91).

1.2.2 Έλεγχος της λειτουργικής έκφρασης της IFNAR1 σε επίπεδο πρωτεΐνης

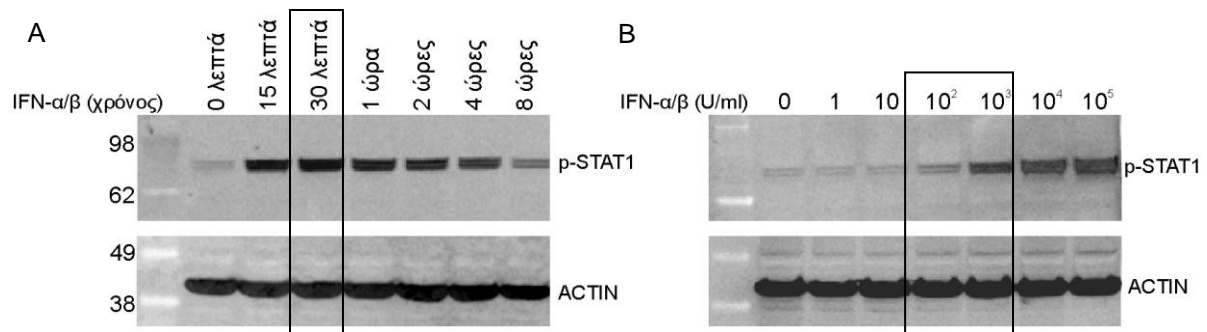
Εν συνεχεία, όλες οι σειρές ελέγχθηκαν για τον προσδιορισμό της λειτουργικής έκφρασης του διαγονιδίου αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ανιχνεύοντας το φωσφορυλιωμένο STAT1 (p-STAT1), ένα μόριο που εμπλέκεται στα πρώτα στάδια της σηματοδότησης των IFN.

1.2.2.1 Έλεγχος σε ιστούς

Η ιστοειδική λειτουργική έκφραση της IFNAR1 στα διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχθηκε μέσω της μέτρησης του pSTAT1 με τη χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

α. Προσδιορισμός άριστης συγκέντρωσης IFN-α/β και χρόνου επώασης σε αγρίου τύπου σπληνοκύτταρα

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση του pSTAT1 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης Western, σπληνοκύτταρα αγρίου τύπου ποντικών επώαστηκαν με IFN-α/β συγκέντρωσης 0-10⁵ U/ml για 0-8 ώρες (Εικόνα 1.5).

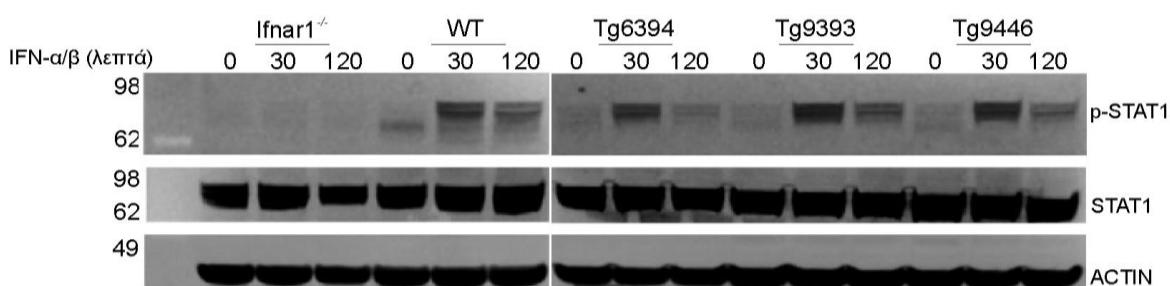


Εικόνα 1.5 Ανίχνευση του pSTAT1 σε ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μετά από διέγερση WT σπληνοκυττάρων με 250 U/ml IFN-α/β για διάφορα χρονικά διαστήματα (A) και με διάφορες συγκεντρώσεις IFN-α/β για 15 λεπτά (B). pSTAT1: 89/91 kDa, ACTIN: 42 kDa.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βέλτιστη συνθήκη για την ανίχνευση του pSTAT1 είναι η επώαση με IFN-α/β από 100-1000 U/ml για 30 λεπτά (Εικόνα 1.5).

β. Έλεγχος της έκφρασης του pSTAT1 σε σπληνοκύτταρα από τις διαγονιδιακές σειρές

Οι επιλεγμένες συνθήκες επώασης εφαρμόστηκαν σε σπληνοκύτταρα ποντικών των διαγονιδιακών σειρών, Tg6394, Tg9393 και Tg9446, στις οποίες υπήρχε έκφραση του *ifnar1* mRNA μόνο στους λεμφικούς ιστούς (Εικόνα 1.4). Ως δείγματα ελέγχου χρησίμευσαν σπληνοκύτταρα από *ifnar1*^{-/-} και WT ποντίκια.



Εικόνα 1.6 Ανίχνευση του pSTAT1 σε ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μετά από διέγερση σπληνοκυττάρων με 250 U/ml IFN-α/β για τους χρόνους που δείχνονται. STAT1 και pSTAT1: 89/91 kDa, ACTIN: 42kDa

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.6, και στις τρεις διαγονιδιακές σειρές ήταν εμφανής η επαγωγή φωσφορυλίωσης του STAT1 μετά την επώαση με IFN-α/β, σε παρόμοια επίπεδα με αυτά των WT δειγμάτων, υποδηλώνοντας τη λειτουργική έκφραση του διαγονιδιακού IFNAR1 στα ζώα αυτά. Όπως αναμενόταν, στα *ifnar1*^{-/-} δείγματα ο pSTAT1 δεν ανιχνεύθηκε σε καμία χρονική στιγμή. Επιπλέον, δε βρέθηκε διαφορά στα επίπεδα του ολικού STAT1 σε καμία από τις διαγονιδιακές σειρές, επιβεβαιώνοντας ότι τα επίπεδα pSTAT1 που ανιχνεύθηκαν, ήταν λόγω της επώασης με IFNα/β και όχι λόγω αυξημένων ολικών επιπέδων STAT1.

1.2.2.2 Έλεγχος σε T λεμφοκύτταρα

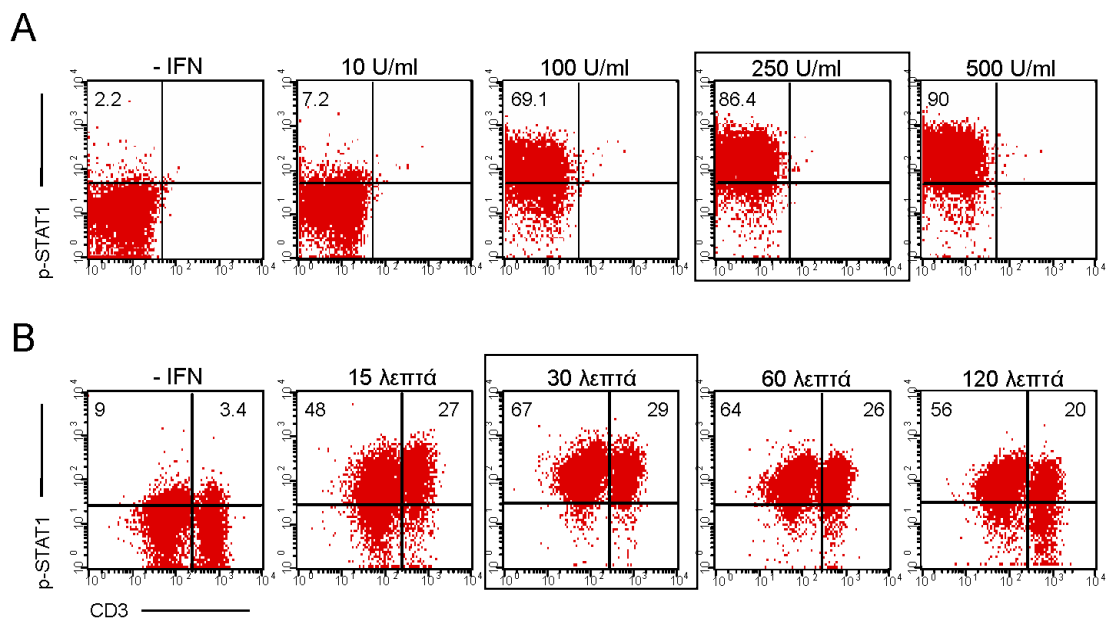
Επειδή τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εκχύλισμα ολικών σπληνοκυττάρων, δεν ήταν δυνατή η μελέτη της έκφρασης του pSTAT1 σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Για το σκοπό αυτό, η κυτταροειδική έκφραση της IFNAR1 στα διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχθηκε μέσω της μέτρησης του pSTAT1 με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, όπου είναι εφικτή η διπλή χρώση μεμονωμένων

κυττάρων για pSTAT1 αλλά και για επιφανειακούς μάρτυρες, ειδικούς για κάθε κυτταρικό τύπο.

α. Προσδιορισμός άριστης συγκέντρωσης IFN- α/β και χρόνου επώασης σε T λεμφοκύτταρα από σπλήνα αγρίου τύπου

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση του pSTAT1 με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, σπληνοκύτταρα αγρίου τύπου ποντικών επωάστηκαν με IFN- α/β συγκέντρωσης 0-500 U/ml για 0-2 ώρες.

Ο pSTAT1 ανιχνεύθηκε με ενδοπυρηνική χρώση με αντίσωμα anti-pSTAT1-PE, ενώ τα T λεμφοκύτταρα προσδιορίστηκαν με αντίσωμα anti-CD3-FITC.

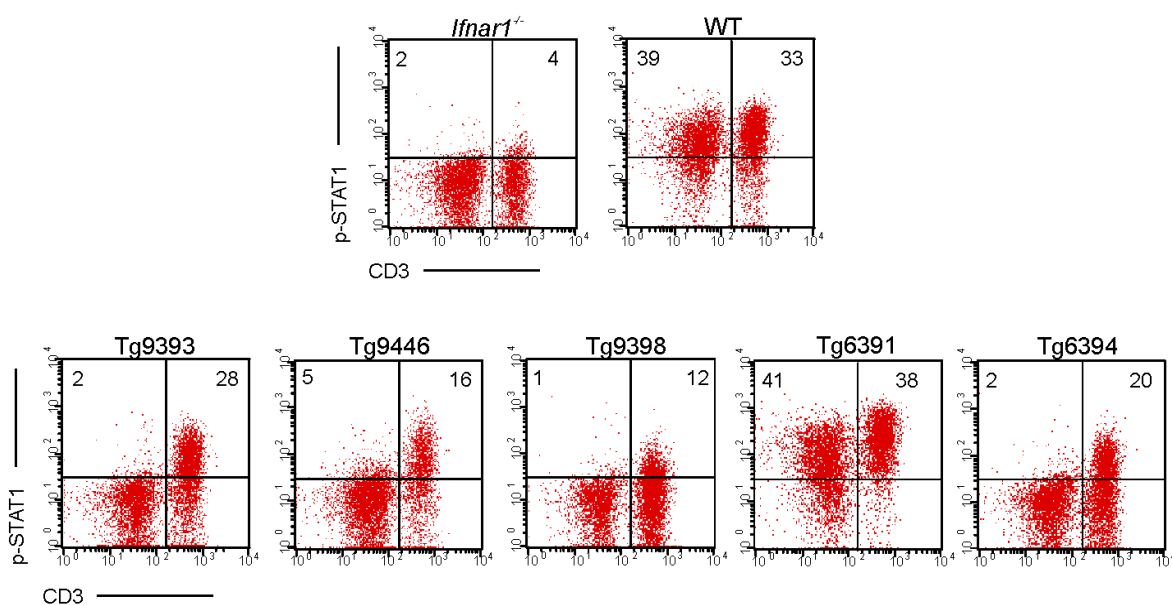


Εικόνα 1.7 Ανίχνευση του pSTAT1 ενδοπυρηνικά χωρίς (A) ή με διπλή χρώση έναντι του CD3 (B) μετά από διέγερση WT σπληνοκυττάρων με διάφορες συγκεντρώσεις IFN- α/β για 15 λεπτά (A), και με 250 U/ml IFN- α/β για διάφορα χρονικά διαστήματα (B). Σε όλα τα στικτογράμματα απεικονίζεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βέλτιστη συνθήκη επώασης για την ανίχνευση του pSTAT1 με ενδοπυρηνική χρώση και κυτταρομετρία ροής είναι η χρήση 250 U/ml IFN- α/β , για 30 λεπτά (Εικόνα 1.7).

β. Έλεγχος της T κυτταροειδικής έκφρασης του pSTAT1 σε σπληνοκύτταρα από τις διαγονιδιακές σειρές

Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν από τα παραπάνω πειράματα, εφαρμόστηκαν σε σπληνοκύτταρα ποντικών όλων των διαγονιδιακών σειρών, καθώς και *ifnar1*^{-/-} και WT ποντικών. Εφαρμόστηκε διπλή χρώση έναντι των pSTAT1 και CD3 και ελέγχθηκε η T κυτταροειδική σηματοδότηση των IFN-I.



Εικόνα 1.8 T κυτταροειδική έκφραση του pSTAT1 σε σπληνοκύτταρα, όλων των υπό εξέταση ομάδων μετά από επώαση με 250 U/ml IFN- α/β για 30 λεπτά, και χρώση έναντι των CD3 και p-STAT1. Στα στικτογράμματα απεικονίζεται το ποσοστό των διπλά θετικών κυττάρων στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού και παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα ανά γονότυπο.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.8, στη διαγονιδιακή σειρά Tg6391, ο pSTAT1 εκφραζόταν τόσο στον CD3⁺ όσο και στον CD3⁻ κυτταρικό πληθυσμό, συνεπώς αυτή η σειρά απορρίφθηκε λόγω μη κυτταροειδικής έκφρασης της IFNAR1. Αντίθετα, οι υπόλοιπες τέσσερις σειρές εμφάνισαν T κυτταροειδική έκφραση του pSTAT1 στο σπλήνα. Μεταξύ αυτών, οι σειρές Tg6394 και Tg9398 παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης pSTAT1 στο σύνολο των CD3⁺ T λεμφοκυττάρων, συγκριτικά με αυτά των WT ζώων, οπότε κρίθηκαν ακατάλληλες για τις μελέτες που ακολούθησαν.

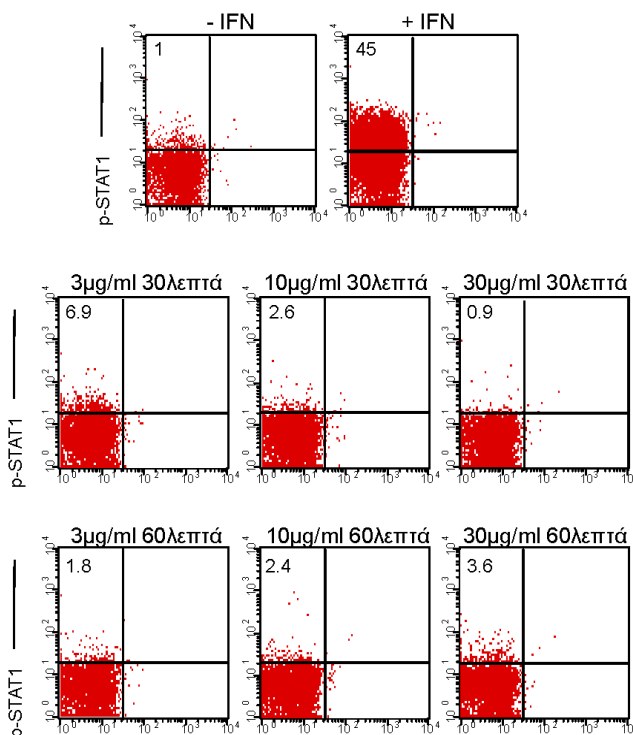
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, από τις πέντε διαγονιδιακές σειρές που προέκυψαν και εξετάστηκαν για σηματοδότηση των IFN-I αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα, επιλέχθηκαν οι Tg9393 και Tg9446 για περαιτέρω ανάλυση.

1.2.2.3 Έλεγχος του pSTAT1 ως δείκτη σηματοδότησης μέσω IFN-α/β-IFNAR

Για την περαιτέρω ανάλυση των επιλεγμένων διαγονιδιακών σειρών έπρεπε να επιβεβαιωθεί ότι τα επίπεδα pSTAT1 που ανιχνεύονται, προέρχονται μόνο μέσω της σύνδεσης της IFN-α/β στον IFNAR. Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκε η ικανότητα αναστολής της φωσφορυλίωσης του STAT1 παρουσία αντισώματος εξουδετέρωσης της IFNAR1 υπομονάδας πριν την επώαση με IFN-α/β.

α. Προσδιορισμός άριστης συγκέντρωσης αντισώματος εξουδετέρωσης της IFNAR1 και χρόνου επώασης σε αγρίου τύπου θυμοκύτταρα

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι άριστες συνθήκες για την αναστολή της φωσφορυλίωσης του STAT1, θυμοκύτταρα αγρίου τύπου ποντικών επώαστηκαν με 3 έως 30 μg/ml αντίσωμα εξουδετέρωσης IFNAR1 υπομονάδας για 0, 30 και 60 λεπτά πριν την επώαση με 250 U/ml IFN-α/β για 30 λεπτά και ο pSTAT1 ανιχνεύθηκε ενδοπυρηνικά με κυτταρομετρία ροής.

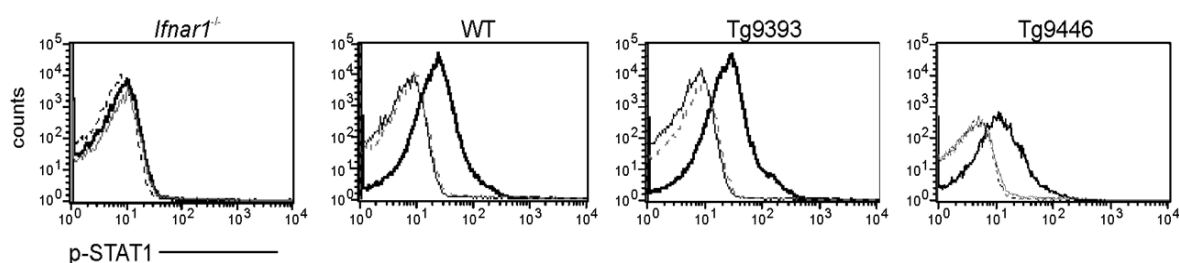


Εικόνα 1.9 Αναστολή του μονοπατιού σηματοδότησης των IFN-I μετά από επώαση WT θυμοκυττάρων με διάφορες συγκεντρώσεις anti-IFNAR1, για διάφορα χρονικά διαστήματα, πριν την επώαση με IFN-α/β, και ανίχνευση του pSTAT1. Σε όλα τα στικτογράμματα απεικονίζεται το ποσοστό των pSTAT1⁺ κυττάρων στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού.

Τα πειράματα έδειξαν ότι οι άριστες συνθήκες για την αναστολή της φωσφορυλίωσης του STAT1 είναι η επώαση των κυττάρων με 30μg/ml αντίσωμα εξουδετέρωσης για 30 λεπτά, και με 3μg/ml αντίσωμα για 60 λεπτά. Μεταξύ αυτών, επιλέχθηκε η συνθήκη με τη χαμηλότερη συγκέντρωση αντισώματος (Εικόνα 1.9).

β. Έλεγχος αναστολής της φωσφορυλίωσης του STAT1 σε θυμοκύτταρα από τις διαγονιδιακές σειρές

Οι παραπάνω συνθήκες επώασης εφαρμόστηκαν σε θυμοκύτταρα των επιλεγμένων σειρών, Tg9393 και Tg9446.



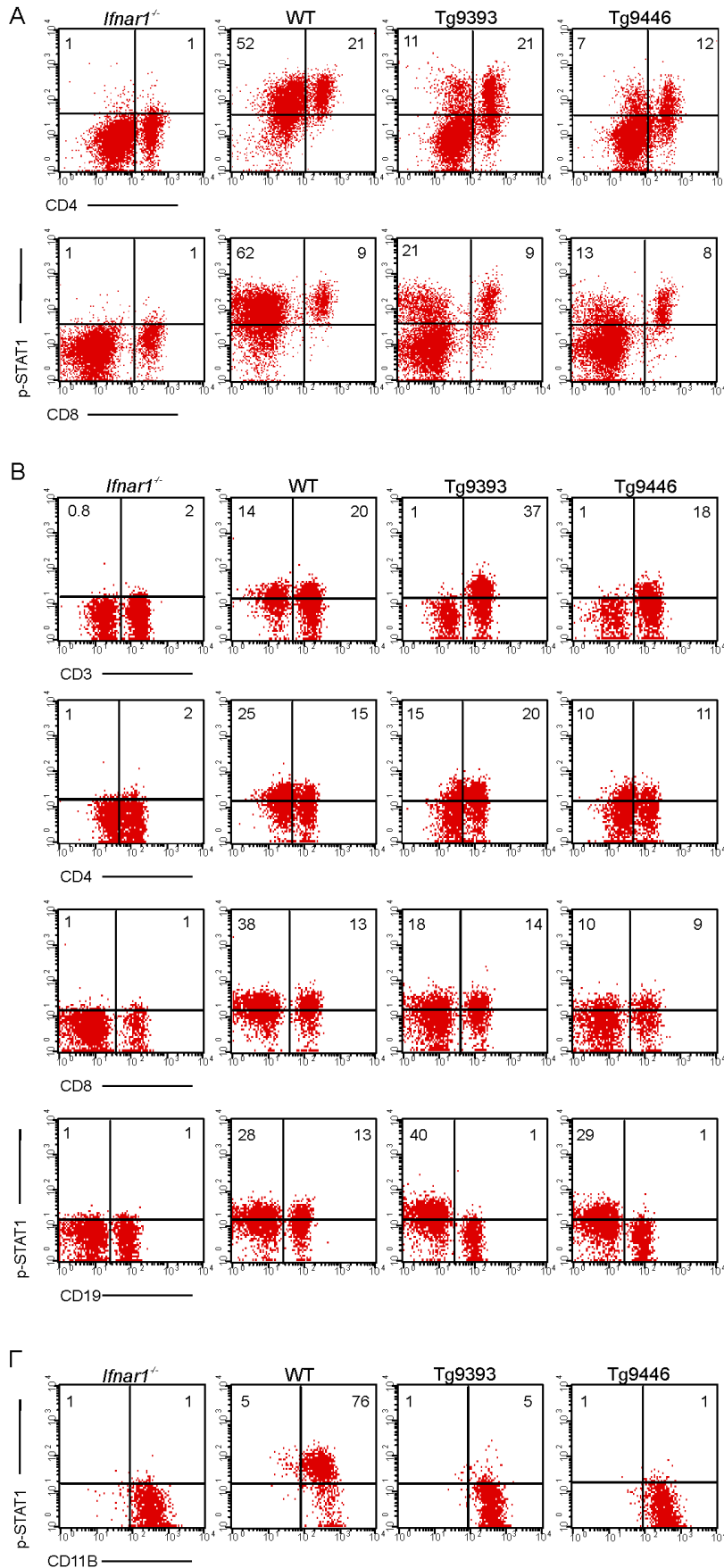
Εικόνα 1.10 Αναστολή του μονοπατού σηματοδότησης των IFN-I μετά από επώαση θυμοκυττάρων με anti-IFNAR1 (3μg/ml) για 60 λεπτά πριν την επώαση με 250 U/ml IFN-α/β, και χρώση έναντι του p-STAT1. Στα ιστογράμματα απεικονίζονται τα p-STAT1⁺ κύτταρα στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού (IFN: σκούρα μαύρη γραμμή, Ab + IFN: γκρι γραμμή, καμία επώαση: διακεκομμένη γραμμή).

Στα θυμοκύτταρα και των δύο διαγονιδιακών σειρών, το αντίσωμα εξουδετέρωσης ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από IFN-α/β φωσφορυλίωση του STAT1, επιβεβαιώνοντας τη χρήση του pSTAT1 ως δείκτη σηματοδότησης των IFN-I στο *in vitro* σύστημά μας (Εικόνα 1.10).

1.2.2.4 Έλεγχος της κυτταροειδικής έκφρασης του pSTAT1 σε λεμφικούς και μη ιστούς από τις διαγονιδιακές σειρές

Προκειμένου να μελετηθεί η σηματοδότηση των IFN-I στους βασικούς υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων (CD4, CD8) των ζώων των σειρών Tg9393 και Tg9446, σπληνοκύτταρα (Εικόνα 1.11A) και κύτταρα από λεμφαδένες (Εικόνα 1.11B) επώαστηκαν με IFN-α/β και ακολούθησε χρώση έναντι του pSTAT1 και των επιφανειακών μορίων CD4 και CD8. Αντίστοιχα ελέγχθηκε η απουσία

σηματοδότησης μέσω IFNAR1 στα B λεμφοκύτταρα των λεμφαδένων των διαγονιδιακών ζώων πραγματοποιώντας χρώση έναντι των CD19 και pSTAT1 (Εικόνα 1.11B), καθώς και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα περιτοναίου των διαγονιδιακών ζώων, πραγματοποιώντας χρώση για τα CD11b και pSTAT1 (Εικόνα 1.11Γ).

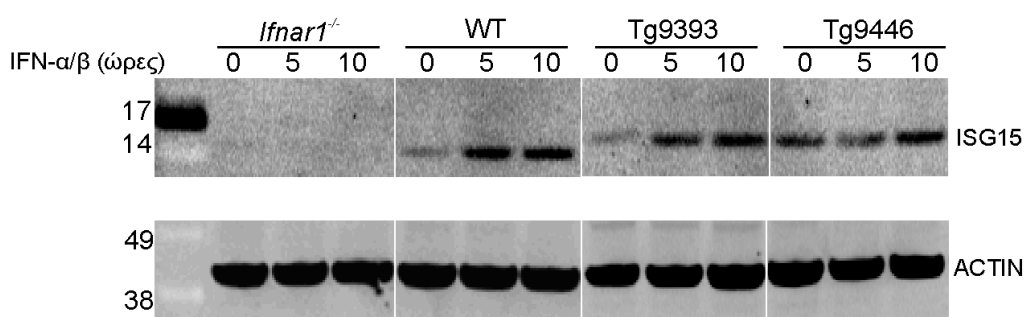


Εικόνα 1.11 Έλεγχος της T κυτταροειδικής έκφρασης σε ζώα των σειρών Tg9393 και Tg9446. **(A)** Επώαση σπληνοκυττάρων με 250 U/ml IFN- α/β για 30 λεπτά και χρώση έναντι των CD4 ή CD8 και του p-STAT1. **(B)** Επώαση κυττάρων λεμφαδένων στις ίδιες συνθήκες (A) και χρώση έναντι των CD3, CD4, CD8 ή CD19 και του p-STAT1. **(Γ)** Επώαση μακροφάγων περιτόναιου στις ίδιες συνθήκες (A) και χρώση έναντι των CD11b και p-STAT1. Σε όλα τα στικτογράμματα απεικονίζεται το ποσοστό των διπλά θετικών κυττάρων στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού και παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό στικτογράμμα ανά ομάδα.

Στα σπληνοκύτταρα και των δύο διαγονιδιακών σειρών παρατηρήθηκε έκφραση του pSTAT1 στους CD4 και CD8 υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων, παρόμοια με αυτή των σπληνοκυττάρων των αγρίου τύπου ζώων, ενώ στα *ifnar1*^{-/-} δείγματα, ο pSTAT1 ήταν απών (Εικόνα 1.11A). Αντίστοιχα, στους λεμφαδένες, έναν άλλο περιφερικό λεμφικό ιστό, παρατηρήθηκε έκφραση του pSTAT1 αποκλειστικά στον T κυτταρικό πληθυσμό (CD3⁺), καθώς και στους CD4⁺ και CD8⁺ υποπληθυσμούς τους. Σε κάθε περίπτωση, η έκφραση του pSTAT1 ήταν παρόμοια με αυτή των T λεμφοκυττάρων των αγρίου τύπου ζώων. Στα *ifnar1*^{-/-} δείγματα, ο pSTAT1 ήταν απών από όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν, όπως αναμενόταν (Εικόνα 1.11B). Δεν παρατηρήθηκε έκφραση του pSTAT1 στα B λεμφοκύτταρα (CD19⁺) των διαγονιδιακών σειρών, σε αντίθεση με τα B λεμφοκύτταρα των ζώων αγρίου τύπου, όπου ο pSTAT1 εκφραζόταν (Εικόνα 1.11B). Επιπλέον, η χρώση περιτοναϊκών μακροφάγων με CD11b και pSTAT1 έδειξε ότι στις διαγονιδιακές σειρές ο pSTAT1 δεν εκφραζόταν στα μακροφάγα, υποδηλώνοντας τη μη έκφραση της IFNAR1 στα κύτταρα αυτά, σε αντίθεση με τα μακροφάγα των ζώων αγρίου τύπου, στα οποία ο pSTAT1 εκφραζόταν (Εικόνα 1.11Γ).

1.2.3 Έλεγχος παραγωγής του ISG15, χαρακτηριστικού γονιδιακού προϊόντος του μονοπατιού των IFN-I

Προκειμένου να μελετηθεί η ακεραιότητα της σηματοδότησης των IFN-I στα T κύτταρα των διαγονιδιακών ζώων, εξετάστηκε η έκφραση του ISG15 (interferon stimulated gene 15), ενός γονιδιακού προϊόντος επαγόμενου από τις IFN-I, σε ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από σπληνοκύτταρα ύστερα από επώαση με 250 U/ml IFN- α/β για 0-10 ώρες.



Εικόνα 1.12 Ανίχνευση του ISG15 σε ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μετά από διέγερση σπληνοκυττάρων με 250 U/ml IFN- α/β για 0, 5, και 10 ώρες. ISG15:15kDa και ACTIN: 42kDa.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.12, στα σπληνοκύτταρα και από τις δύο διαγονιδιακές σειρές ήταν εμφανής η επαγωγή της έκφρασης του ISG15 μετά την επώαση με IFN- α/β , όπως σε αυτά των αγρίου τύπου ζώων, υποδηλώνοντας τη φυσιολογική λειτουργία του διαγονιδιακού IFNAR1 στα κύτταρα αυτά. Όπως αναμενόταν, στα *ifnar1*^{-/-} κύτταρα δεν ανιχνεύθηκε ISG15 σε καμία χρονική στιγμή.

Εφόσον και στις δύο διαγονιδιακές σειρές (Tg9393 και Tg9446) τα επίπεδα έκφρασης του pSTAT1, και κατά συνέπεια τα επίπεδα σηματοδότησης των IFN-I μέσω του IFNAR, αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα, ήταν παρόμοια, επιλέχθηκε η Tg9393 ως αντιπροσωπευτική διαγονιδιακή σειρά για μελέτες προτυποποίησης ανθρώπινων ασθενειών, ονομάστηκε δε IFNAR^{Texcl} (IFNAR1 T exclusively), χάριν της αποκλειστικής έκφρασης της IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα.

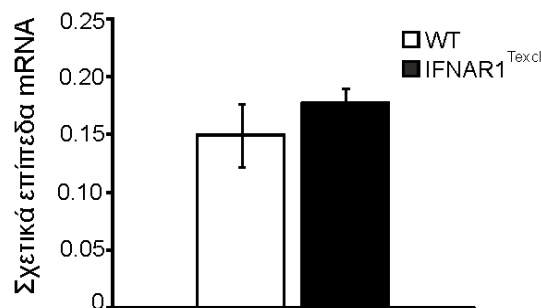
Πριν χρησιμοποιηθούν τα IFNAR^{Texcl} ποντίκια σε *in vivo* μελέτες, θεωρήθηκε αναγκαίο να ελεγχθούν, τα επίπεδα έκφρασης του *ifnar1* διαγονιδίου με άμεσο τρόπο, η αρχιτεκτονική των λεμφικών οργάνων και τα ποσοστά των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων σε αυτά, καθώς και η λειτουργικότητα των T λεμφοκυττάρων.

1.2.4 Άμεσος προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα των διαγονιδιακών ζώων

Τα επίπεδα έκφρασης της IFNAR1 ελέγχθηκαν στα IFNAR^{Texcl} ποντίκια σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης.

1.2.4.1 Έλεγχος σε μεταγραφικό επίπεδο

Ολικό RNA απομονώθηκε από CD3⁺- εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα και το *ifnar1* mRNA ενισχύθηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής RT-PCR (qRT-PCR).



Εικόνα 1.13 Ποσοτική RT-PCR για τη μέτρηση των επιπέδων του *ifnar1* μεταγράφου σε CD3⁺-εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα από διαγονιδιακά και αγρίου τύπου ποντίκια. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=4/γονότυπο).

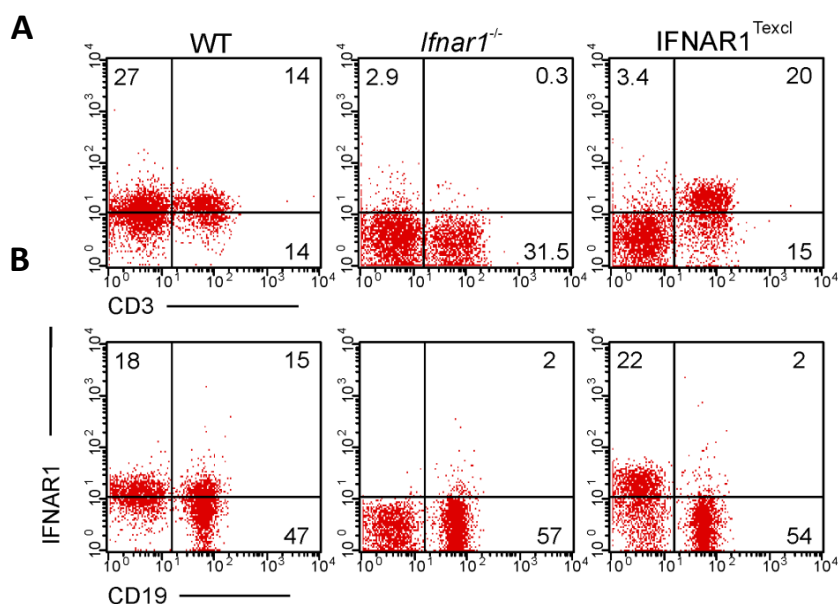
Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.13, το μετάγραφο του *ifnar1* εκφράζεται σε παρόμοια επίπεδα στα T λεμφοκύτταρα των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων.

Λόγω υψηλής ρύθμισης των επιπέδων της IFNAR1 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Εισαγωγή κεφ. 4.2.1), ήταν απαραίτητος ο έλεγχος των επιπέδων της πρωτεΐνης IFNAR1 στα IFNAR^{Texcl} ζώα.

1.2.4.2 Έλεγχος σε μεταφραστικό επίπεδο

Η παρασκευή και η εμπορική διάθεση ενός αντισώματος, ειδικού για την IFNAR1 συζευγμένου με PE, κατέστησε δυνατή την άμεση ανίχνευση αυτής της πρωτεΐνης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Για να επιβεβαιωθεί η αποκλειστική έκφραση της IFNAR1 στα T λεμφοκύτταρα, ελέγχθηκε η έκφρασή της σε δύο κυτταρικούς

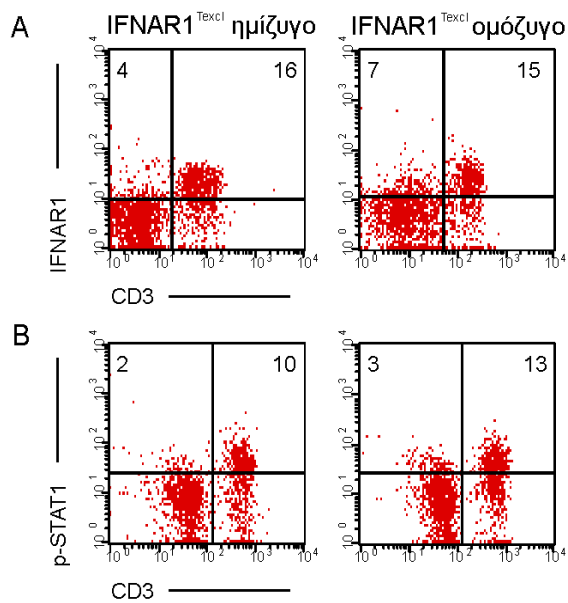
πληθυσμούς (T και B) σπληνοκυττάρων, με διπλή χρώση CD3/IFNAR1 και CD19/IFNAR1.



Εικόνα 1.14 Χρώση σπληνοκυττάρων έναντι της IFNAR1 και των μορίων CD3 **(A)** ή CD19 **(B)**. Τα στικτογράμματα απεικονίζουν το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η IFNAR1 υπομονάδα εκφράζεται στην επιφάνεια των T (CD3⁺) και όχι των B (CD19⁺) λεμφοκυττάρων του σπλήνα των IFNAR1^{Texcl} ζώων, επιβεβαιώνοντας την T κυτταροειδική έκφραση του διαγονιδίου (Εικόνα 1.14). Όπως αναμενόταν, η IFNAR1 εκφραζόταν τόσο στα CD3⁺ όσο και στα CD19⁺ κύτταρα των αγρίου τύπου ζώων, ενώ δεν εκφραζόταν σε κανέναν κυτταρικό πληθυσμό των *ifnar1*^{-/-} ζώων (Εικόνα 1.14).

Εν συνεχεία, ελέγχθηκε η T κυτταροειδική έκφραση της IFNAR1 σε ομόζυγα για το διαγονίδιο ζώα, που προέκυψαν μετά από κατάλληλες διασταυρώσεις. Επιπλέον, μετρήθηκε η λειτουργικότητα του IFNAR στα ομόζυγα, συγκριτικά με τα ημίζυγα για το διαγονίδιο ζώα, μέσω μέτρησης του pSTAT1 μετά από επώαση με IFN-α/β.

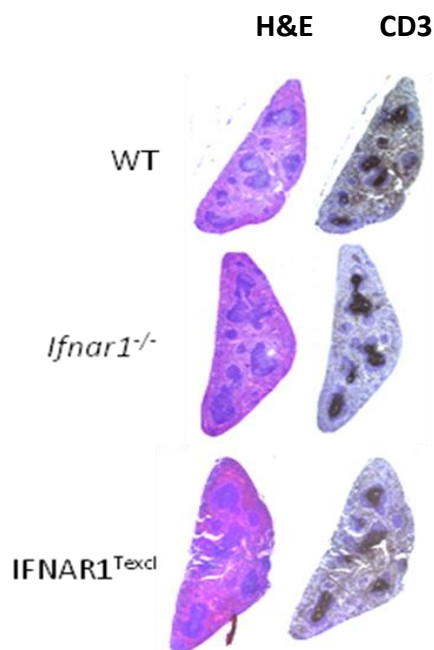


Εικόνα 1.15 Ανίχνευση της IFNAR1 στα CD3⁺ σπληνο-κύτταρα από ημίζυγα και ομόζυγα για το διαγονίδιο ζώα (A). Ανίχνευση του pSTAT1 στα CD3⁺ σπληνοκύτταρα, μετά από διέγερσή τους με 250 U/ml IFN-α/β για 30 λεπτά (B). Σε όλα τα στικτογράμματα απεικονίζεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.15, τα επίπεδα έκφρασης τόσο της IFNAR1 όσο και του pSTAT1 στα κύτταρα του σπλήνα, ήταν παρόμοια μεταξύ των ημίζυγων και των ομόζυγων για το διαγονίδιο ζώων. Παρ' όλο που αυτό το γεγονός προκαλεί εντύπωση, δεδομένου ότι το ομόζυγο ζώο έχει διπλάσια ποσότητα του *ifnar1* γονιδίου συγκριτικά με το ημίζυγο ζώο, βάσει βιβλιογραφίας (κεφ. 4.2.1.), η IFNAR1 υπόκειται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις καθώς και σε αρνητική ρύθμιση λόγω υψηλών επιπέδων έκφρασης. Για τους λόγους αυτούς, στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ημίζυγα για το διαγονίδιο ζώα.

1.2.5 Έλεγχος της δομής του σπλήνα και το ποσοστό των T κυτταρικών υποπληθυσμών στα δευτερογενή λεμφικά όργανα

Στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν, η ύπαρξη του διαγονιδίου στα T λεμφοκύτταρα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών προκάλεσε μεταβολή στην αρχιτεκτονική του σπλήνα (Εικόνα 1.16) και στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων του σπλήνα και των λεμφαδένων (Πίνακας 2).



Εικόνα 1.16 Ιστολογική ανάλυση του σπλήνα πραγματοποιήθηκε με χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης (HE) και ανίχνευση των CD3⁺ λεμφοκυττάρων σε τομή σπλήνα από ζώα όλων των γονοτύπων (4x).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, τόσο η δομή του σπλήνα (Εικόνα 1.16), όσο και οι πληθυσμοί των CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ κυττάρων στο σπλήνα και τους λεμφαδένες (Πίνακας 2) των διαγονιδιακών ζώων, δεν παρέκκλιναν του φυσιολογικού, όπως αξιολογήθηκε με ιστολογία και ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Ποσοστά T λεμφοκυττάρων και υποπληθυσμών αυτών στους βασικούς δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς των διαγονιδιακών και ζώων ελέγχου.

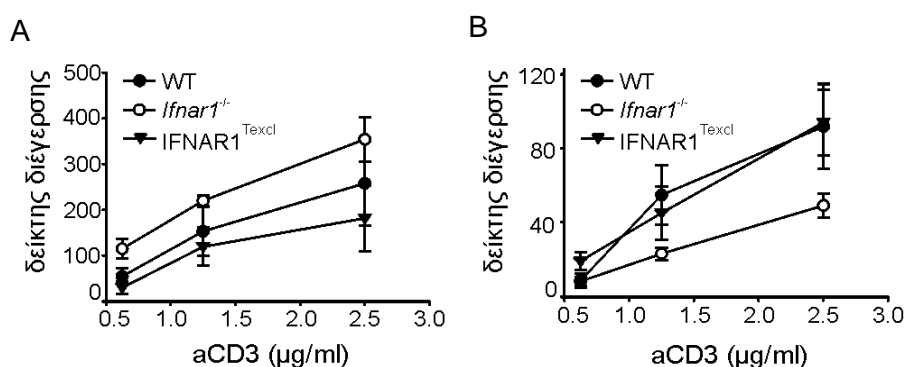
	Σπλήνας (%)			Λεμφαδένες (%)		
	WT	<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	IFNAR1 ^{Texcl}	WT	<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	IFNAR1 ^{Texcl}
CD3⁺	45	41	42	57	59	69
CD4⁺	25	31	24	40	42	41
CD8⁺	17	12	16	21	28	30

1.2.6 Έλεγχος της λειτουργικότητας των διαγονιδιακών T λεμφοκυττάρων

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η σηματοδότηση των IFN-I επηρεάζει τη διαμεσολαβούμενη από τον TCR διέγερση των T λεμφοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους και το προφίλ των κυτταροκινών που παράγουν (91,100,102). Για το λόγο αυτό ακολούθησε πολυκλωνική διέγερση σπληνοκυττάρων υπό συνθήκες διαφοροποίησης προς Th1 και Th17 ή όχι, καθώς και *ex vivo* επαναδιέγερση κυττάρων από ανοσοποιημένα ζώα με MOG πεπτίδιο.

1.2.6.1 Μέτρηση πολλαπλασιασμού έναντι πολυκλωνικής διέγερσης

Σπληνοκύτταρα και κύτταρα από λεμφαδένες διεγέρθηκαν *in vitro* με 0,5-3 $\mu\text{g/ml}$ αντίσωμα έναντι του CD3 και 1 $\mu\text{g/ml}$ αντίσωμα έναντι του CD28. Μετά από καλλιέργεια τριών ημερών, μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (Εικόνα 1.17).

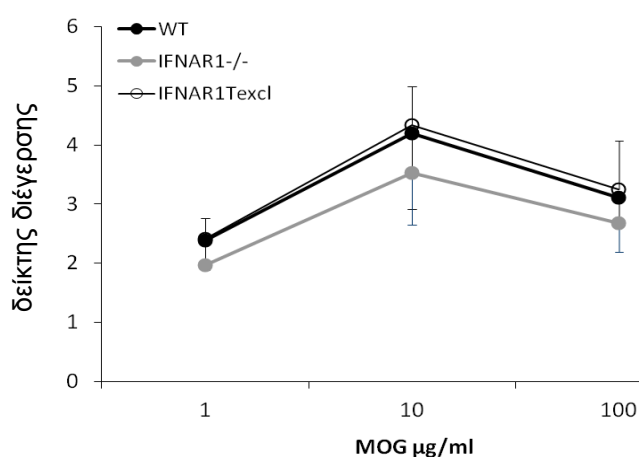


Εικόνα 1.17 Απεικονίζεται ο μέσος δείκτης διέγερσης, που εκφράζει το βαθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του σπλήνα σπλήνα (A) και των λεμφαδένων (B), δηλ. το λόγο της μέτρησης της ραδιενέργειας που ενσωματώθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία anti-CD3/anti-CD28, προς τη μέτρηση στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα σημάνθηκαν με ³H θυμιδίνη και η ραδιενέργεια που ενσωματώθηκε μετρήθηκε σε μετρητή β ακτινοβολίας. Το γράφημα είναι αντιπροσωπευτικό τριών πειραμάτων και τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέση τιμή \pm SEM (n=5/γονότυπο).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.17, τα T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το σπλήνα και τους λεμφαδένες των διαγονιδιακών ποντικών, και διεγέρθηκαν πολυκλωνικά, εμφανίζουν φυσιολογική ικανότητα πολλαπλασιασμού, παρόμοια με αυτήν των αγρίου τύπου ποντικών.

1.2.6.2 Μέτρηση πολλαπλασιασμού έναντι ειδικού MOG πεπτιδίου

Στο επίπεδο του χαρακτηρισμού των διαγονιδιακών ζώων ελέγχθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων των δευτερογενών λεμφικών οργάνων συνολικά. Για το σκοπό αυτό, σπληνοκύτταρα και κύτταρα από λεμφαδένες, απομονωμένα από ποντίκια 10 μέρες μετά την ανοσοποίηση με MOG₃₅₋₅₅ πεπτίδιο, ομαδοποιήθηκαν και επαναδιεγέρθηκαν *ex vivo* με το ίδιο πεπτίδιο για 4 μέρες και μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός τους.

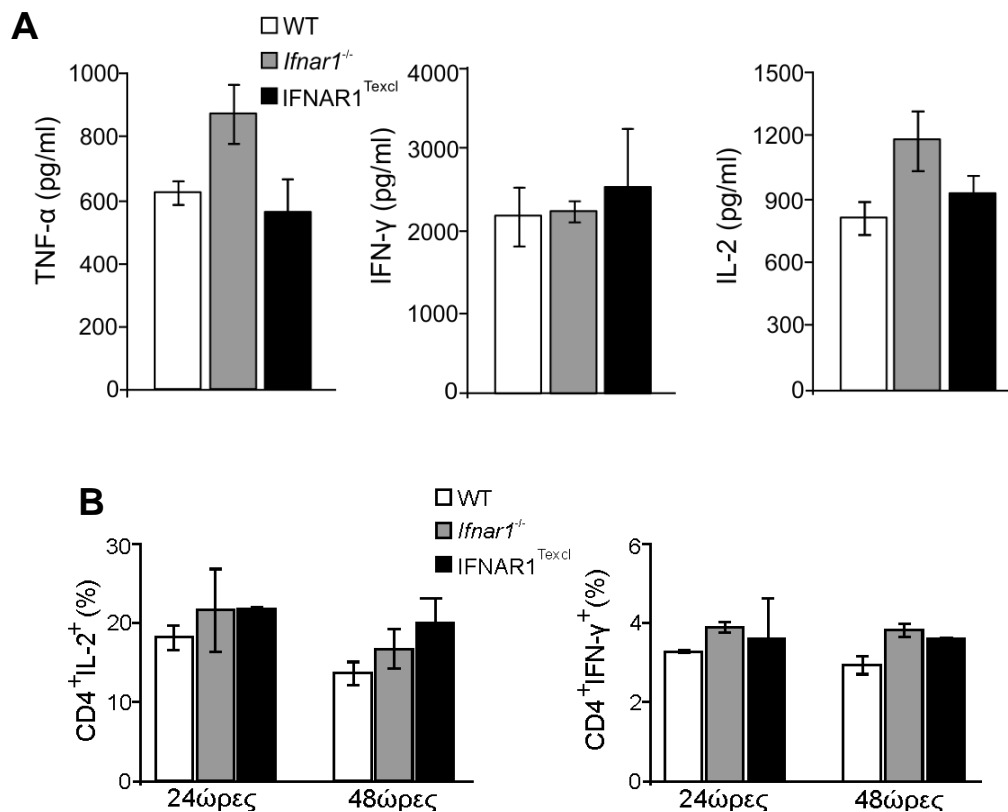


Εικόνα 1.18 Απεικονίζεται ο μέσος δείκτης διέγερσης, που εκφράζει το βαθμό πολλαπλασιασμού κυττάρων. Μετά την καλλιέργεια παρουσία MOG₃₅₋₅₅ πεπτιδίου, τα κύτταρα σημάνθηκαν με H³ θυμιδίνη και η ραδιενέργεια που ενσωματώθηκε μετρήθηκε σε μετρητή β ακτινοβολίας. Το γραφήμα είναι αντιπροσωπευτικό δύο πειραμάτων και τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=4/γονότυπο).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.18, η ικανότητα πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων και κυττάρων από λεμφαδένα, που απομονώθηκαν από τα διαγονιδιακά ποντίκια μετά από διέγερση με ειδικό αντιγόνο (MOG₃₅₋₅₅ πεπτίδιο), είναι παρόμοια με αυτήν των ποντικών ελέγχου.

1.2.6.3 Μέτρηση παραγωγής κυτταροκινών μετά από διέγερση του TCR

Σπληνοκύτταρα και κύτταρα από λεμφαδένες διεγέρθηκαν πολυκλωνικά και μετρήθηκε η παραγωγή κυτταροκινών στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών τους καθώς και ενδοκυτταρικά με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης κυτταροκινών (προσθήκη PMA/ ιονομυκίνης/brefeldin A).

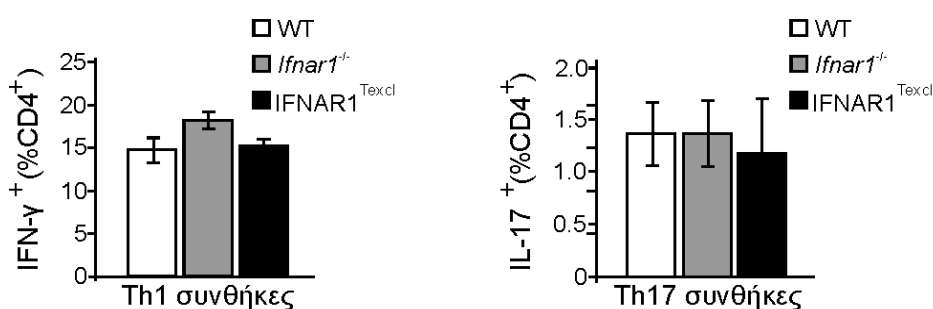


Εικόνα 1.19 Παραγωγή κυτταροκινών από κύτταρα σπλήνα WT, *Ifnar1*^{-/-} και IFNAR1^{Texcl} ζώων μετά από διέγερση με anti-CD3/anti-CD28 (A) για 72 ώρες, όπως μετρήθηκε στο υπερκείμενο καλλιιεργειών και (B) για 24 και 48 ώρες όπως μετρήθηκε ενδοκυτταρικά μετά τη διέγερση με PMA/ιονομυκίνη. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=5/γονότυπο).

Τα λεμφοκύτταρα των διαγονιδιακών ζώων παρουσίασαν παρόμοιες αποκρίσεις συγκριτικά με αυτές των WT και *Ifnar1*^{-/-} κυττάρων, με παρόμοια ικανότητα παραγωγής και έκκρισης TNF-α, IFN-γ και IL-2 (Εικόνα 1.19).

1.2.6.4 Έλεγχος ικανότητας διαφοροποίησης βοηθητικών T λεμφοκυττάρων

Για να ελεγχθεί η ικανότητα των παρθένων διαγονιδιακών βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (Th) να διαφοροποιούνται προς τους υπότυπους Th1 και Th17, συγκρίθηκε η παραγωγή κυτταροκινών από CD3⁺-εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα, τα οποία διεγέρθηκαν με anti-CD3/anti-CD28 αντισώματα υπό συνθήκες διαφοροποίησης προς Th1 και Th17, και μετρήθηκαν ενδοκυττάρια οι IFN-γ και IL-17 αντίστοιχα.



Εικόνα 1.20 Ικανότητα διαφοροποίησης Th κυττάρων. Διέγερση CD3⁺-εμπλουτισμένων T λεμφοκυττάρων υπό Th1 και Th17 συνθήκες διαφοροποίησης και χρώση έναντι ενδοκυτταρικής IFN-γ και IL-17A. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τα θετικά για την κυτταροκίνη κύτταρα στο σύνολο του CD4 θετικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέση τιμή ± SEM και είναι αντιπροσωπευτικά τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων (n=5 ζώα/γονότυπο/πείραμα).

Η ανάλυση έδειξε παρόμοια ποσοστά CD4⁺ IFN-γ⁺ και CD4⁺ IL-17⁺ T κυττάρων σε όλες τις ομάδες, υποδηλώνοντας ότι τα διαγονιδιακά T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται φυσιολογικά προς Th1 και Th17 λεμφοκύτταρα *in vitro* (Εικόνα 1.20).

Συμπεράσματα Μέρους 1:

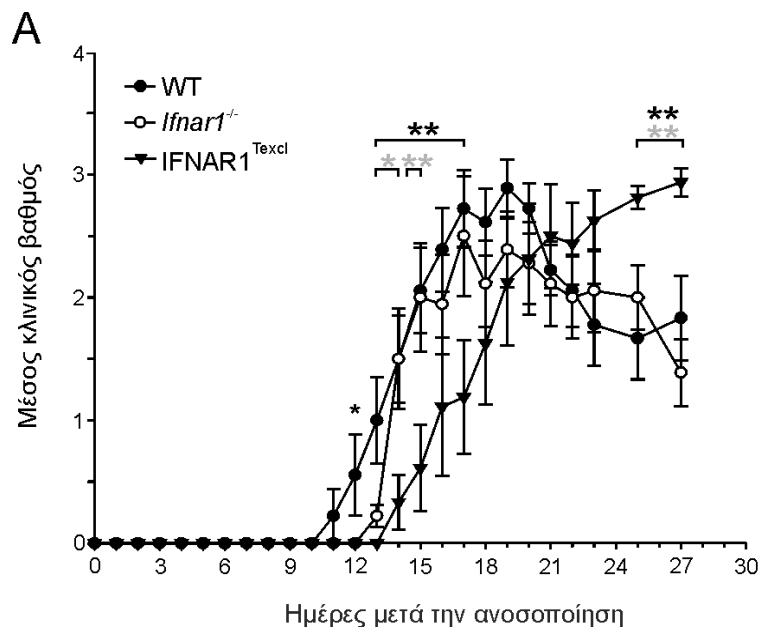
Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι, η IFNAR1 υπομονάδα της διαγονιδιακής σειράς που επελέγη, εκφράζεται αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα και η σηματοδότηση του μονοπατιού των IFN-I μέσω του IFNAR είναι φυσιολογική. Επιπλέον, η έκφραση της διαγονιδιακής IFNAR1 δεν τροποποιεί την ικανότητα των T λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται, να διαφοροποιούνται και να παράγουν κυτταροκίνες μετά από πολυκλωνική και αντιγονο-ειδική διέγερση.

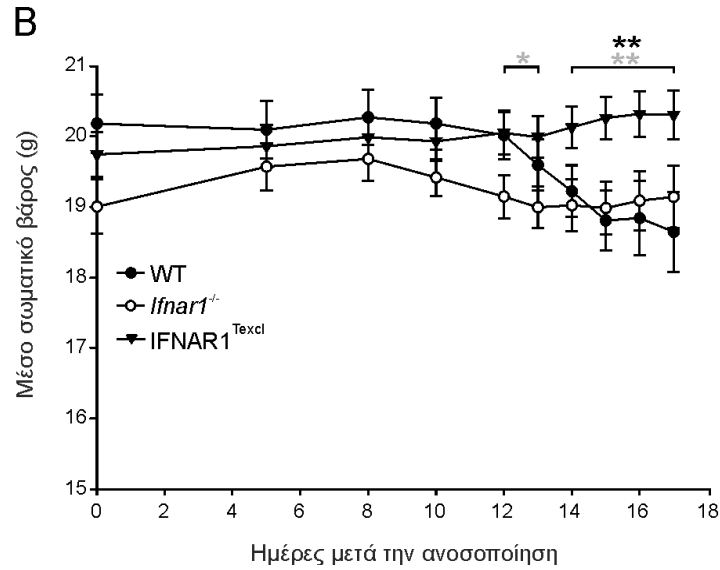
Μέρος 2. Επαγωγή Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια

Για να μελετηθεί η επίπτωση της σηματοδότησης των IFN-I επιλεκτικά στα T λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια μίας νόσου που διαμεσολαβείται από T λεμφοκύτταρα, εφαρμόστηκε στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια ΠΑΕ, επαγόμενη από το πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅, που προσομοιάζει τη σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), στην οποία η IFN-β χορηγείται ως θεραπευτικός παράγοντας.

2.1. Επίδραση της στοχευμένης στα T λεμφοκύτταρα σηματοδότησης των IFN-I στην ανάπτυξη της ΠΑΕ

Προκειμένου να μελετηθεί η *in vivo* δράση των ενδογενών IFN-I επιλεκτικά στα T λεμφοκύτταρα κατά την ΠΑΕ, ποντίκια WT, *Ifnar1*^{-/-} και IFNAR1^{Texcl} ανοσοποιήθηκαν με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ σύμφωνα με το κλασικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (σ. 100), και η κλινική εικόνα τους (κλινικός βαθμός και σωματικό βάρος) καταγραφόταν καθημερινά.





Εικόνα 2.1 Επαγωγή της ΠΑΕ σε WT, *Ifnar1*^{-/-} και IFNAR1^{Texcl} ποντίκια. (Α) Μέσος κλινικός βαθμός μετά την ανοσοποίηση με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ (n=9 ζώα/γονότυπο). Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM. (Β) Μέσο σωματικό βάρος WT (n=30), *Ifnar1*^{-/-} (n=28) και IFNAR1^{Texcl} (n=32) ποντικών, μετά την ομαδοποίηση των δεδομένων από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM.*p<0.05, **p<0.01: σύγκριση IFNAR1^{Texcl} με WT ποντίκια, και *p<0,05, **p<0,01: σύγκριση IFNAR1^{Texcl} με *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια.

Τα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια παρουσίασαν στατιστικά σημαντική καθυστέρηση στην έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου, πιο ήπια ανάπτυξη, καθώς και μειωμένο αθροιστικό κλινικό βαθμό, συγκριτικά με τα WT και *Ifnar1*^{-/-} ζώα (Εικόνα 2.1Α, Πίνακας 3). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι, ενώ το βάρος των ζώων μειωνόταν στις ομάδες ελέγχου κατά την εξέλιξη της νόσου, παρέμεινε σταθερό στα IFNAR1^{Texcl} ζώα, υποδηλώνοντας καλύτερη φυσική κατάσταση, που αντιστοιχούσε στα μειωμένα συμπτώματα της νόσου (Εικόνα 2.1Β).

Πίνακας 3. Βαρύτητα της νόσου, ημέρα έναρξης, ημέρα εμφάνισης του μέγιστου κλινικού βαθμού της ΠΑΕ στα IFNAR1^{Texcl} και ποντίκια ελέγχου, μέχρι την ημέρα 25 της ΠΑΕ.

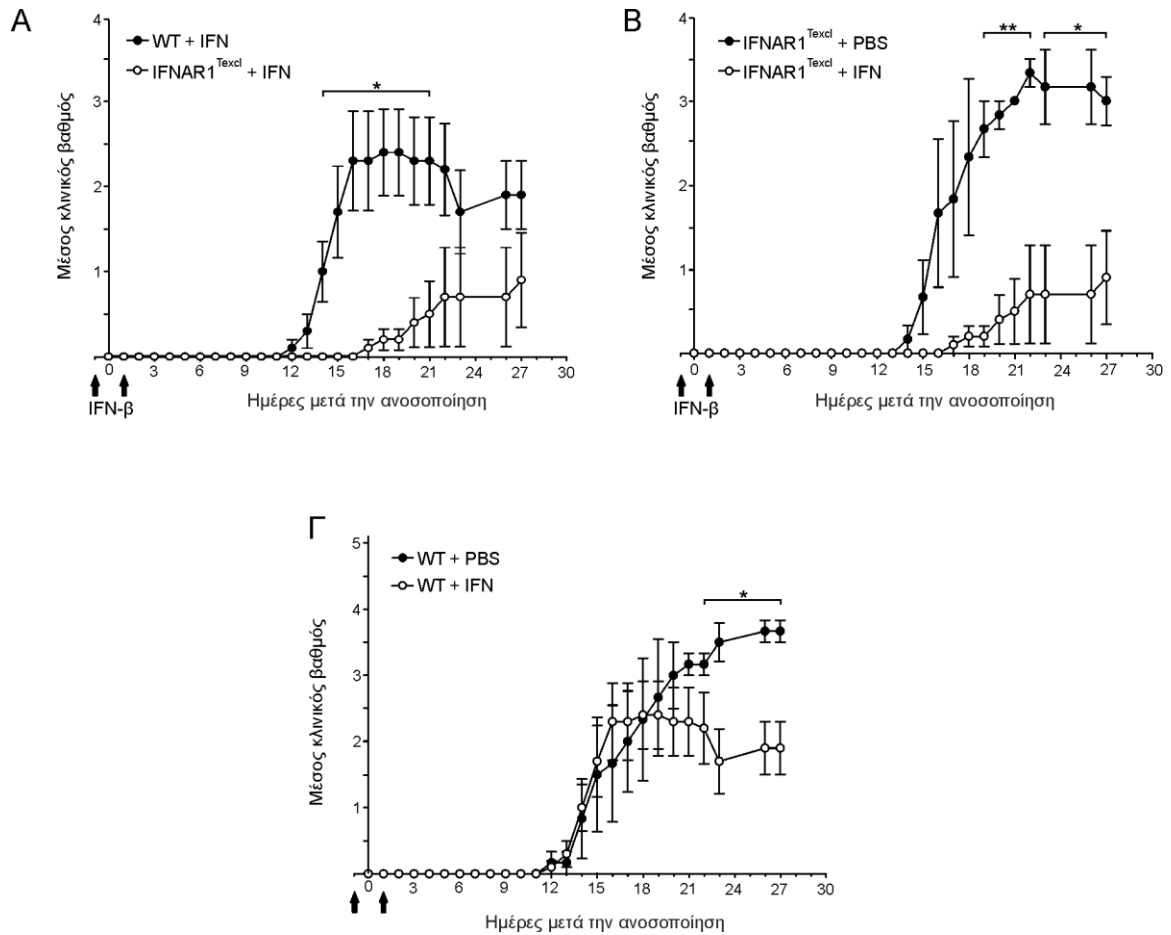
Ομάδα ποντικών	Ημέρα έναρξης	Μέγιστος κλινικός βαθμός	Ημέρα μέχρι το μέγιστο βαθμό	Αθροιστικός κλινικός βαθμός
WT	13,1 ± 0,6	3,3 ± 0,1	16,9 ± 0,8	31,7 ± 2,6
<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	14,1 ± 0,6	3,3 ± 0,1	16,6 ± 0,6	35,8 ± 2,4
IFNAR1 ^{Texcl}	16,6 ± 0,8 ^{β,γ}	3,5 ± 0,2	20,8 ± 1,2 ^{α,δ}	25,3 ± 4,7 ^γ

^α p < 0,05, ^β p < 0,01, συγκρίσεις μεταξύ IFNAR1^{Texcl} και WT ποντικών

^γ p < 0,05, ^δ p < 0,01, συγκρίσεις μεταξύ IFNAR1^{Texcl} και *Ifnar1*^{-/-} ποντικών

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιλεκτική σηματοδότηση των ενδογενών IFN-I μέσω των T λεμφοκυττάρων τροποποιεί την έναρξη και την εξέλιξη της ΠΑΕ.

Δεδομένης της ευεργετικής δράσης των ενδογενών IFN-I στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια κατά την ΠΑΕ, και της καταστολής της νόσου με τη χορήγηση ανασυνδυασμένης IFN-β (126,130), διερευνήθηκε η δράση της εξωγενούς IFN-β στο ίδιο πρότυπο ασθένειας. Τα WT και IFNAR1^{Texcl} ποντίκια έλαβαν δύο δόσεις ανασυνδυασμένης IFN-β ποντικού, κατά τις ημέρες -1 και +1 ως προς την επαγωγή της ΠΑΕ σύμφωνα με το σχήμα χορήγησης (σ. 101).



Εικόνα 2.2 Επαγωγή της ΠΑΕ παρουσία ή απουσία εξωγενούς IFN-β. WT και IFNAR1^{T^{excl}} ποντίκια έλαβαν PBS ή IFN-β (10^4 IU) τις ημέρες -1 και +1 ως προς την επαγωγή της ΠΑΕ (βέλη). Μέσος κλινικός βαθμός (Α) WT και IFNAR1^{T^{excl}} ποντικών μετά τη χορήγηση IFN-β, (Β) IFNAR1^{T^{excl}} ποντικών που έλαβαν IFN-β ή PBS και (Γ) WT ποντικών που έλαβαν IFN-β ή PBS. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=5$ ζώα/γονότυπο/πείραμα). * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση IFN-β στα IFNAR1^{T^{excl}} ποντίκια οδήγησε σε στατιστικά σημαντική καθυστέρηση έναρξης συμπτωμάτων και συνολικά μειωμένη βαρύτητα της νόσου, συγκριτικά με τα αντίστοιχα WT ζώα (Εικόνα 2.2Α, Πίνακας 4), αλλά και με τα IFNAR1^{T^{excl}} ποντίκια που δεν έλαβαν αγωγή (Εικόνα 2.2Β, Πίνακας 4). Όπως αναμενόταν, βάσει βιβλιογραφίας (126,130), η χορήγηση IFN-β προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της βαρύτητας της νόσου στα WT ποντίκια (Εικόνα 2.2Γ).

Πίνακας 4. Βαρύτητα της νόσου σε WT και IFNAR1^{Texcl} ποντίκια μετά τη χορήγηση PBS ή IFN-β κατά την ΠΑΕ, μέχρι την ημέρα 27 της ΠΑΕ.

Ομάδα ζώων	Χορήγηση	Μέγιστος κλινικός βαθμός	Αθροιστικός κλινικός βαθμός
IFNAR1 ^{Texcl}	PBS	3,7 ± 0,2	27,8 ± 2,5
IFNAR1 ^{Texcl}	rIFN-β	0,9 ± 0,1 ^{α,γ}	4,4 ± 3,1 ^{α,γ}
WT	PBS	4 ± 0,0	31 ± 9,5
WT	rIFN-β	2,5 ± 0,5	24,8 ± 5,5

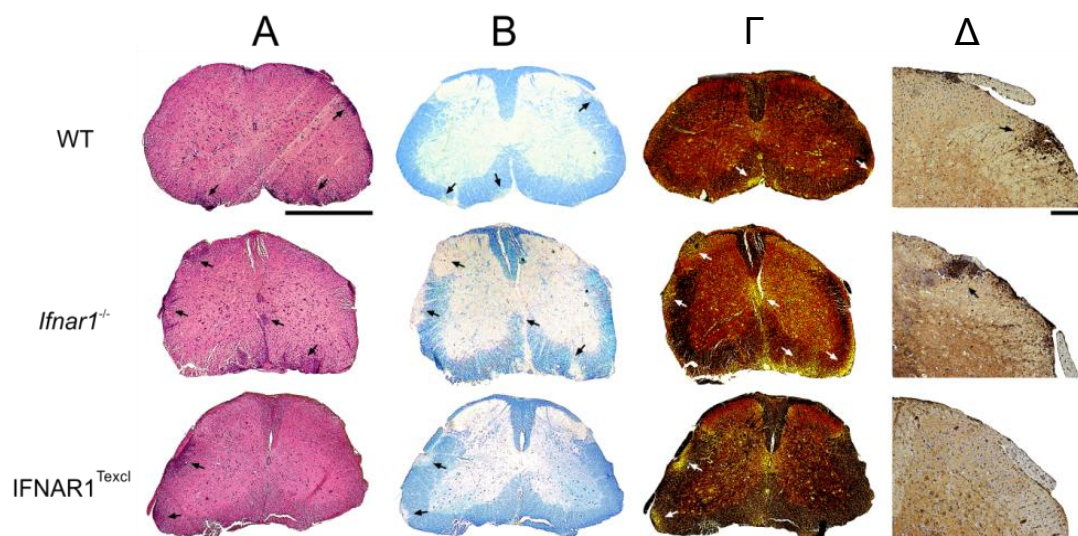
^α p < 0,05, ^β p < 0,01 σύγκριση με IFNAR1^{Texcl} ποντίκια που έλαβαν PBS

^γ p < 0,001 σύγκριση με WT ποντίκια που έλαβαν IFN-β

Τα αποτελέσματα ενίσχυσαν περαιτέρω το αρχικό μας εύρημα, ότι δηλαδή η σηματοδότηση των IFN-I επιλεκτικά στα T λεμφοκύτταρα είναι κρίσιμη κατά την αρχική φάση της ΠΑΕ.

2.2 Ιστοπαθολογική ανάλυση νωτιαίου μυελού κατά την ΠΑΕ

Εκτός από την κλινική εικόνα των ζώων, η βαρύτητα της ΠΑΕ τυπικά συσχετίζεται με τη διήθηση λευκοκυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (142). Για να διερευνηθεί εάν ο διαφοροποιημένος φαινότυπος της ΠΑΕ στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια αντιστοιχούσε σε διαφορές στη νευροπαθολογία τους, εξετάστηκε ιστολογικά το ΚΝΣ. Συγκεκριμένα, ο νωτιαίος μυελός ποντικών όλων των ομάδων συλλέχθηκε την ημέρα 17 της ΠΑΕ, όταν ο μέσος κλινικός βαθμός των IFNAR1^{Texcl} ποντικών ήταν στατιστικά χαμηλότερος από αυτόν των WT και *Ifnar1*^{-/-} ποντικών (Εικόνα 2.1A).



Εικόνα 2.3 Ιστοπαθολογία νωτιαίου μυελού κατά την ΠΑΕ. (Α-Δ) Τομές νωτιαίου μυελού από WT, *Ifnar1*^{-/-} και IFNAR1^{Texcl} ποντίκια (n=3 ζώα/γονότυπο) ελήφθησαν 17 μέρες μετά την επαγωγή της ΠΑΕ και πραγματοποιήθηκε χρώση με H&E (Α), Luxol fast blue (Β) και χρώση αργυρού Bielschowsky (Γ). Πραγματοποιήθηκε επίσης ανοσοϊστοχημεία έναντι του μορίου CD3 των Τ κυττάρων (Δ). Τα βέλη δείχνουν την παρουσία φλεγμονής (Α), απομυελίνωση (Β), νευροεκφυλισμό (Γ) και διηθούντα CD3⁺ Τ λεμφοκύτταρα στο παρέγχυμα του ΚΝΣ. Ράβδος κλίμακας: 1 mm (Α-Γ), 200μm (Δ).

Η παρουσία φλεγμονής, η απομυελίνωση και ο εκφυλισμός των νευρώνων αξιολογήθηκαν σε τομές νωτιαίου μυελού με τη χρήση χρώσεων H&E, Luxol Fast Blue και Bielschowsky, αντίστοιχα (Εικόνα 2.3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τομές νωτιαίου μυελού από τα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια περιείχαν λιγότερα φλεγμονώδη διηθούντα κύτταρα, όπως και λιγότερες εστίες απομυελίνωσης και καταστροφής των νευρώνων, συγκριτικά και με τις δύο ομάδες ελέγχου. Επιπλέον, λιγότερα CD3⁺ Τ λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκαν στο νωτιαίο μυελό των IFNAR1^{Texcl} ποντικών, σε σχέση με τα WT και *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια (Εικόνα 2.3Δ).

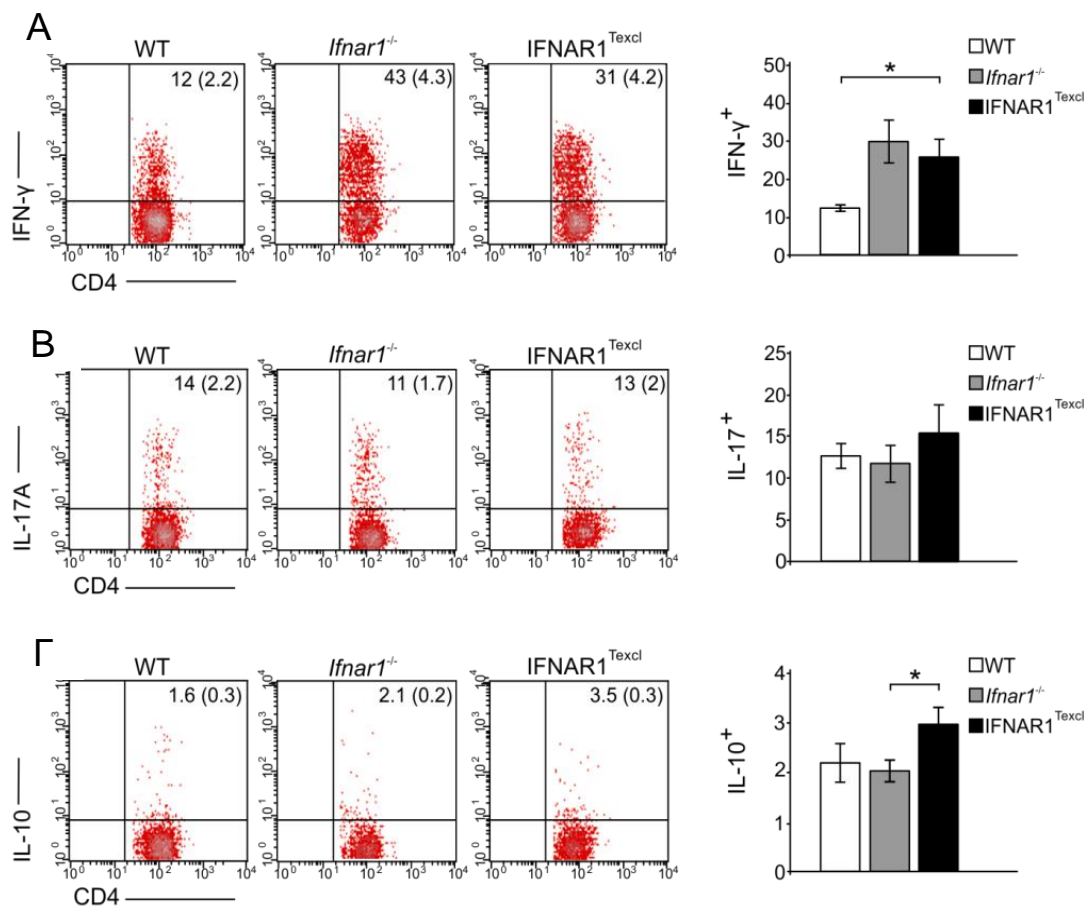
Συμπερασματικά, η μειωμένη ιστοπαθολογία στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια συμφωνεί με τη μειωμένη εκδήλωση συμπτωμάτων της ΠΑΕ των IFNAR1^{Texcl} ποντικών.

2.3 Ανάλυση χαρακτηριστικών των Τ λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια των IFNAR1^{Texcl} ποντικών κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ

Είναι γνωστό ότι, τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα παράγουν χαρακτηριστικές κυτταροκίνες, δημιουργώντας ένα περιβάλλον, το οποίο επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την εξέλιξη της ΠΑΕ (143). Για το λόγο αυτό, μετρήθηκε η έκφραση των χαρακτηριστικών κυτταροκινών από τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα, καθώς και η έκφραση χαρακτηριστικών επιφανειακών δεικτών σε αυτά.

2.3.1 Μέτρηση της παραγωγής κυτταροκινών από τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ

Αρχικά μελετήθηκε εάν η μειωμένη βαρύτητα της ΠΑΕ στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια σχετιζόταν με διαφορετική παραγωγή κυτταροκινών από τα Τ λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια και το ΚΝΣ των ποντικών. Τα ποσοστά των CD4⁺ Τ κυττάρων που παράγουν κυτταροκίνες σχετιζόμενες με την ΠΑΕ (IL-17, IFN-γ και IL-10), μετρήθηκαν στο σπλήνα και στους επιχώριους λεμφαδένες (draining LNs) την ημέρα 17 της ΠΑΕ.



Εικόνα 2.4 Ποσοστά CD4⁺ T κυττάρων του σπλήνα που παράγουν κυτταροκίνες την ημέρα 17 της ΠΑΕ. Τα στικτογράμματα και ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν λεμφοκύτταρα που παράγουν IFN- γ (A), IL-17A (B) και IL-10 (Γ) στο σύνολο του CD4⁺ πληθυσμού (οι τιμές στην παρένθεση δείχνουν το ποσοστό στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού). Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέση τιμή \pm SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα ανά γονότυπο, *p<0,05.

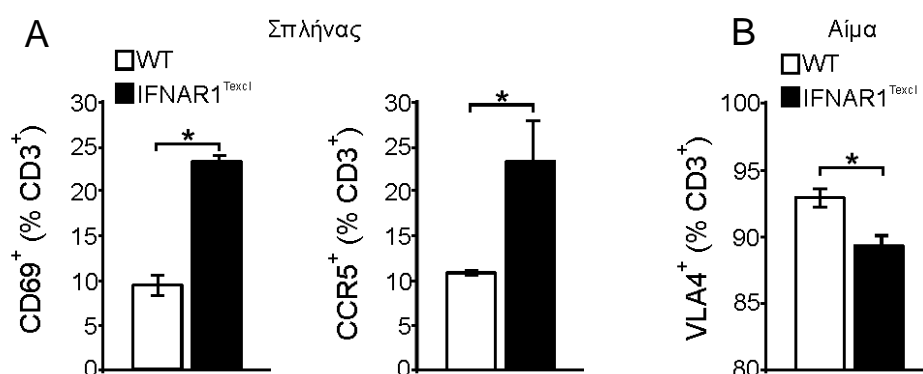
Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση στο ποσοστό των CD4⁺IL-10⁺ κυττάρων στο σπλήνα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών συγκριτικά με αυτό των WT και *Ifnar1*^{-/-} ποντικών (Εικόνα 2.4Γ, Πίνακας 5), ενώ παράλληλα το ποσοστό των CD4⁺ IFN- γ ⁺ σπληνοκυττάρων ήταν αυξημένο συγκριτικά με αυτό των WT ποντικών (Εικόνα 2.4A, Πίνακας 5). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο ποσοστό των CD4⁺ IL-17⁺ σπληνοκυττάρων (Εικόνα 2.4B, Πίνακας 5), ή σε οποιονδήποτε υπότυπο CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες μεταξύ των τριών ομάδων μελέτης (Πίνακας 5).

Η μέτρηση των κυτταροκινών στα μονοπύρρηνα κύτταρα του ΚΝΣ δεν ήταν εφικτή στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια, λόγω του ελάχιστου αριθμού διηθούντων κυττάρων που υπήρχαν στο νωτιαίο μυελό τους (Πίνακας 5).

2.3.2 Μελέτη της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών στα T λεμφοκύτταρα κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ

Πέραν των χαρακτηριστικών κυτταροκινών, ποικίλα μόρια σχετίζονται με την ΠΑΕ, όπως οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CCR6, δείκτες των Th1 και Th17 κυττάρων αντίστοιχα, το CD69, δείκτης των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων, και το VLA4, ένα μόριο προσκόλλησης, της επιφάνειας των Th1 και Th17 κυττάρων που διευκολύνει την προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ΑΕΦ (144).

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η τροποποίηση της ΠΑΕ στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια σχετίζεται με διαφοροποίηση της έκφρασης των παραπάνω δεικτών, ελέγχθηκε, σε ένα πρόδρομο πείραμα, η παρουσία τους σε σπληνοκύτταρα και κύτταρα του αίματος που απομονώθηκαν κατά την ημέρα 17 της ΠΑΕ. Στο συγκεκριμένο πείραμα, δε συμπεριλήφθηκε ομάδα ελέγχου με ελλειμματικά ζώα, λόγω του μικρού αριθμού ζώων που προέκυψε από τις διασταυρώσεις για το σκοπό αυτό.



Εικόνα 2.5 Τα ποσοστά των CD69⁺ και CCR5⁺ κυττάρων στο σπλήνα (A) και το ποσοστό των VLA4⁺ στο αίμα (B) μετρήθηκαν την ημέρα 17 της ΠΑΕ με κυτταρομετρία ροής, και εκφράζονται ως % ποσοστό στο σύνολο του CD3⁺ πληθυσμού. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=3 ζώα/γονότυπο). *p<0,05.

Σύμφωνα με τα πρόδρομα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, υψηλότερο ποσοστό των IFNAR1^{Texcl} CD3⁺ T λεμφοκυττάρων του σπλήνα εξέφραζε τόσο το δείκτη ενεργοποίησης CD69, όσο και τον υποδοχέα CCR5, συγκριτικά με αυτό των WT κυττάρων (Εικόνα 2.5A). Επιπλέον, χαμηλότερο ποσοστό των IFNAR1^{Texcl} CD3⁺ T κυττάρων στα κύτταρα του αίματος εξέφραζε το μόριο προσκόλλησης VLA4 συγκριτικά με αυτό των WT κυττάρων (Εικόνα 2.5B).

Συμπερασματικά, το αυξημένο ποσοστό των CD4⁺ IFN- γ ⁺ κυττάρων (Εικόνα 2.4A), σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο ποσοστό των CD3⁺CCR5⁺ κυττάρων (δείκτης των Th1 κυττάρων), υποδηλώνει ότι υπάρχει ενισχυμένη απόκριση τύπου Th1 στην περιφέρεια των IFNAR1^{Texcl} ζώων. Παράλληλα, το μειωμένο ποσοστό των VLA4⁺ T λεμφοκυττάρων του αίματος υποδηλώνει μειωμένη ικανότητα αυτών των κυττάρων για προσκόλληση στον ΑΕΦ και συνεπώς μετανάστευση εντός του ΚΝΣ.

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τη μέτρηση κυτταροκινών που παράγονται από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την επαγωγή της ΠΑΕ, στους λεμφαδένες, το σπλήνα και το νωτιαίο μυελό.

Λεμφο- δένες	Ημέρα 10				Ημέρα 17			
	WT	<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	IFNAR1 ^{Texcl}	<i>p</i> value	WT	<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	IFNAR1 ^{Texcl}	<i>p</i> value
CD4+IFN γ ⁺	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	0,64±0,1	0,93±0,2	0,98±0,2	α 0,25
				ΔΠ				β 0,79
CD4+IL17 ⁺	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	0,48±0,1	0,8±0,2	0,6±0,1	α 0,29
				ΔΠ				β 0,46
CD4+IL10 ⁺	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	0,24±0,02	0,28±0,04	0,32±0,1	α 0,34
				ΔΠ				β 0,60
Σπλήνας								
CD4+IFN γ ⁺	1,6±0,2	1,8±0,4	1,8±0,5	α 0,63	1,75±0,3	3,2±0,9	3,2±0,5	α 0,027
				β 0,90				β 0,97
CD4+IL17 ⁺	0,7±0,1	0,8±0,1	0,2±0,04	α 0,003	1,62±0,5	1,93±0,3	1,9±0,2	α 0,37
				β 0,016				β 0,89
CD4+IL10 ⁺	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	0,3±0,05	0,19±0,02	0,28±0,03	α 0,59
				ΔΠ				β 0,026
Νωτιαίος μυελός								
CD4+IFN γ ⁺	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	13,44	8,7	MM γ	MM γ
CD4+IL17 ⁺	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	6,6	2,8	MM γ	MM γ

Τα δεδομένα που αναγράφονται είναι από 2 ανεξάρτητα πειράματα ανά χρονική στιγμή (n=5 ζώα/γονότυπο/πείραμα). Η μέτρηση των κυτταροκινών στα μονοπύρρηνα κύτταρα του νωτιαίου μυελού έγινε μία φορά. Όλα τα ποσοστά εκφράζονται ως μέση τιμή \pm SEM. Τα ποσοστά αντιπροσωπεύουν κύτταρα διπλά θετικά για CD4 και κυτταροκίνες, ως προς τον συνολικό πληθυσμό ζωντανών κυττάρων. Με έντονα γράμματα απεικονίζεται η στατιστική σημαντικότητα.

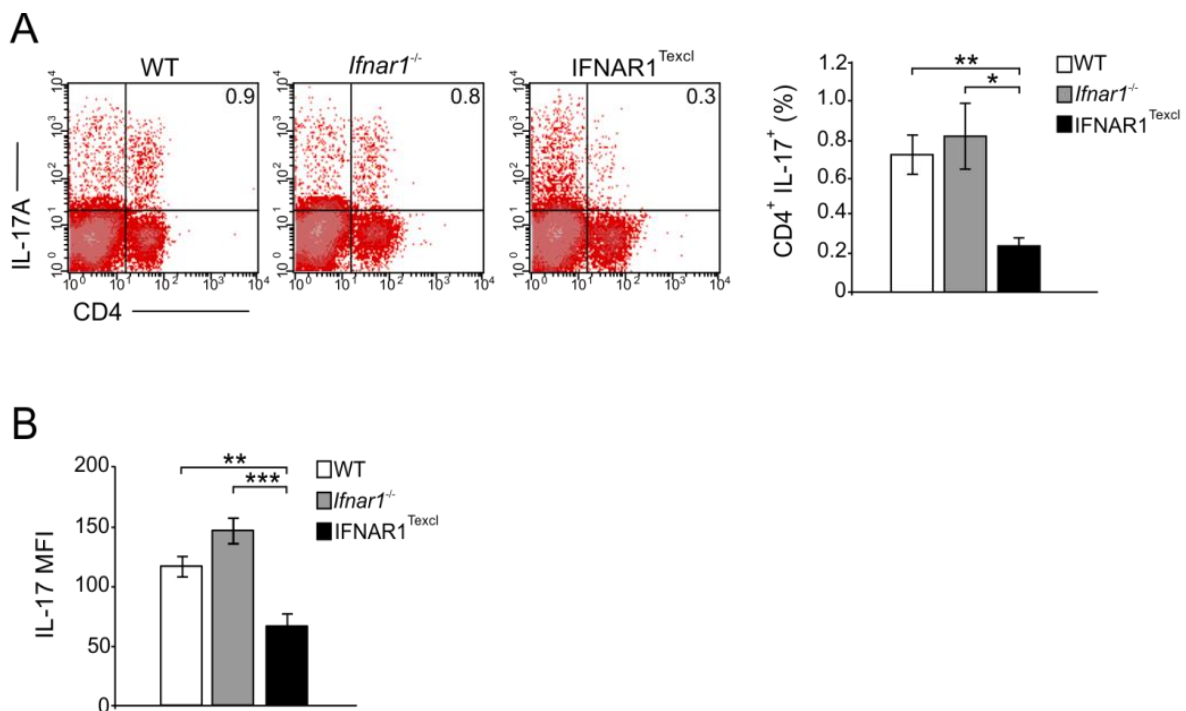
α συγκρίσεις μεταξύ IFNAR1^{Texcl} και WT ποντικών, β συγκρίσεις μεταξύ IFNAR1^{Texcl} και *Ifnar1*^{-/-} ποντικών, γ πολύ λίγα μονοπύρρηνα κύτταρα ανιχνεύθηκαν, οπότε δεν εφαρμόστηκε κυτταρομετρία ροής και στατιστική ανάλυση, ΔΠ (Δεν Πραγματοποιήθηκε), MM (Μη Μετρήσιμο).

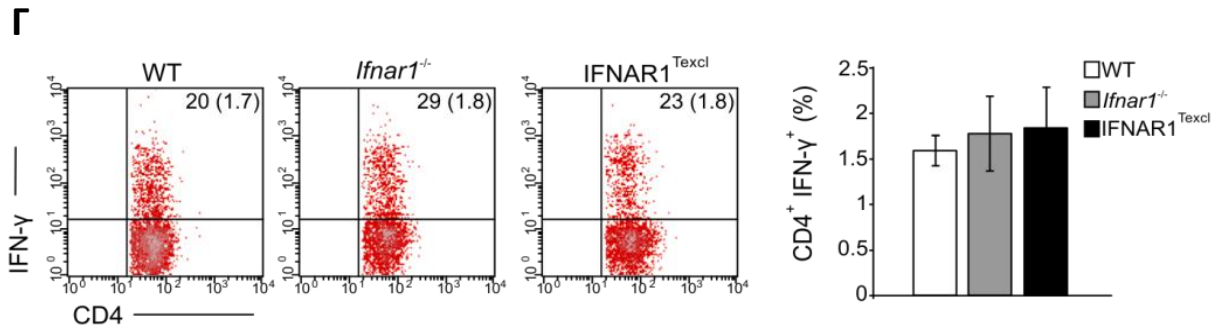
2.4 Ανάλυση χαρακτηριστικών των T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια των IFNAR1^{Texcl} ποντικών κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ

Κατά την ΠΑΕ, είναι γνωστό ότι, αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται στην περιφέρεια αρκετές μέρες πριν την είσοδό τους στο παρέγχυμα του ΚΝΣ και την εμφάνιση της νόσου (145,146). Η διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων καθορίζεται από το περιβάλλον των κυτταροκινών που παράγονται. Για να προσδιοριστούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των T λεμφοκυττάρων, όπως διαμορφώνονται με την άμεση επίδραση των IFN-I σε αυτά, στο προσυμπτωματικό στάδιο της νόσου, μετρήθηκε η έκφραση των χαρακτηριστικών κυτταροκινών από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, καθώς και η έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών σε αυτά, την ημέρα 10 της ΠΑΕ (Εικόνα 2.1).

2.4.1 Μέτρηση της παραγωγής κυτταροκινών από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ

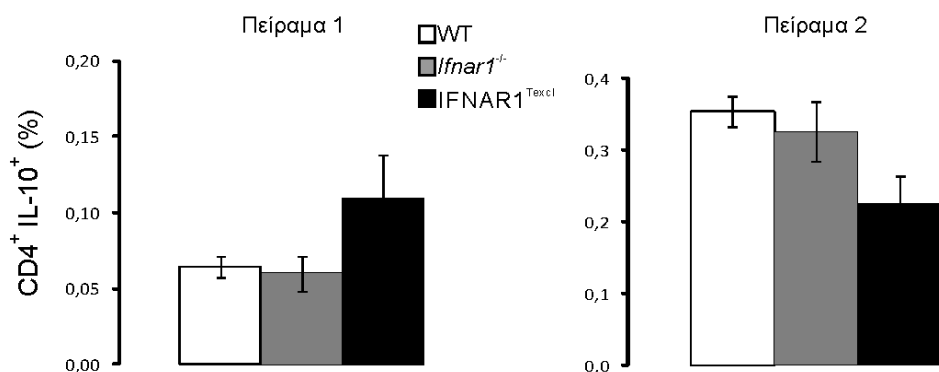
Σπληνοκύτταρα απομονώθηκαν την ημέρα 10 μετά την επαγωγή της ΠΑΕ και μετά από διέγερση με PMA/ionomycin και χρήση brefeldin A, ανιχνεύτηκαν ενδοκυτταρικά οι χαρακτηριστικές κυτταροκίνες IL-17, IFN- γ και IL-10.





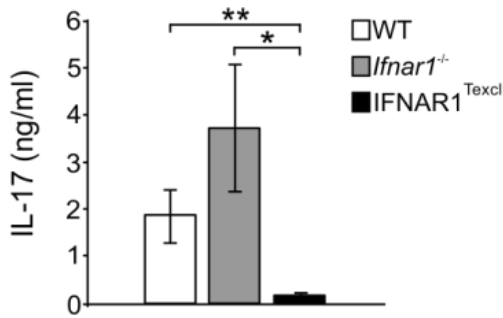
Εικόνα 2.6 Ποσοστά CD4⁺ T κυττάρων του σπλήνα που παράγουν κυτταροκίνες την ημέρα 10 της ΠΑΕ. Τα στικτογράμματα και ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν λεμφοκύτταρα που παράγουν IL-17A (A) και IFN-γ (Γ) στο σύνολο του CD4⁺ πληθυσμού (οι τιμές στην παρένθεση δείχνουν το ποσοστό στο σύνολο του ζωντανού πληθυσμού). (B) Τα επίπεδα έκφρασης της IL-17A από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα αξιολογήθηκαν μετρώντας τη Μέση Ένταση Φθορισμού (MFI). Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό στικτογράμμα ανά γονότυπο, *p<0,05.

Παρατηρήθηκε στατιστικά μειωμένο ποσοστό CD4⁺ IL-17⁺ σπληνοκυττάρων (Εικόνα 2.6A, Πίνακας 5) με χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης της IL-17 (Εικόνα 2.6B) στα IFNAR1^{Texcl}, συγκριτικά με τα WT και *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια. Δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στο ποσοστό των CD4⁺ IFN-γ⁺ σπληνοκυττάρων μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 2.6Γ), ενώ υπήρξαν αποκλίσεις στο ποσοστό των CD4⁺ IL-10⁺ T λεμφοκυττάρων μεταξύ των πειραμάτων (Εικόνα 2.7).

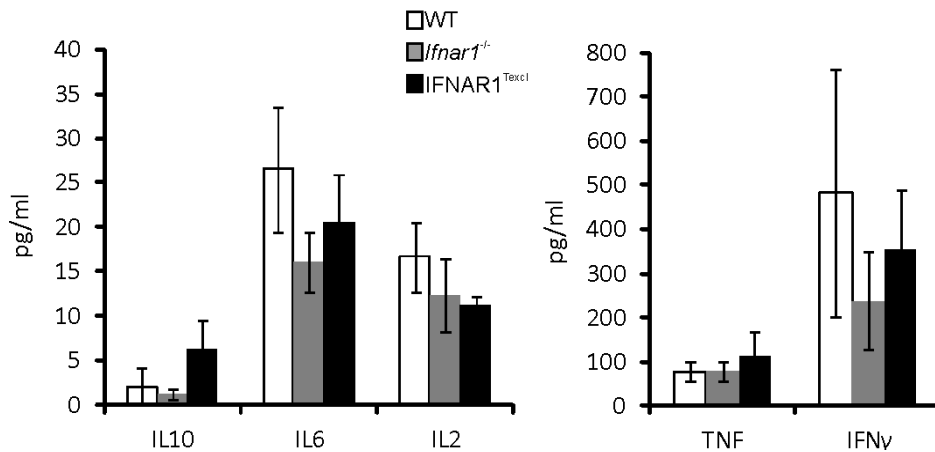


Εικόνα 2.7 Ποσοστά CD4⁺IL-10⁺ κυττάρων την ημέρα 10 της ΠΑΕ, από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και παρουσιάζονται οι αποκλίσεις μεταξύ των δύο πειραμάτων.

Επιπλέον, χαμηλότερα επίπεδα εκκρινόμενης IL-17 ανιχνεύθηκαν στο υπερκείμενο σπληνοκυττάρων από τα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια, μετά από *ex vivo* επαναδιέγερσή τους με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ (Εικόνα 2.8), ενώ τα επίπεδα των εκκρινόμενων IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10 και IL-6, ήταν παρόμοια μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.8 Μέτρηση της εκκρινόμενης IL-17A μετά από *ex vivo* επαναδιέγερση σπληνοκυττάρων με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ για 72 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

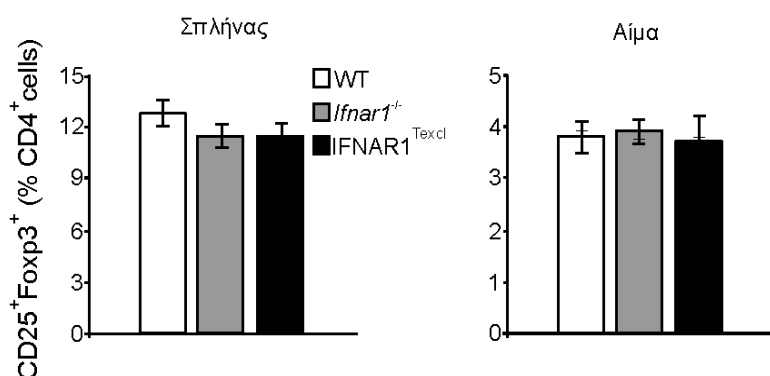


Εικόνα 2.9 Μέτρηση των εκκρινόμενων κυτταροκινών, μετά από *ex vivo* επαναδιέγερση σπληνοκυττάρων με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅ για 72 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι κατά την προσυμπτωματική φάση της νόσου, τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα της περιφέρειας των IFNAR1^{Texcl} ποντικών εμφανίζουν μειωμένη ανοσολογική απόκριση τύπου Th17 συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου.

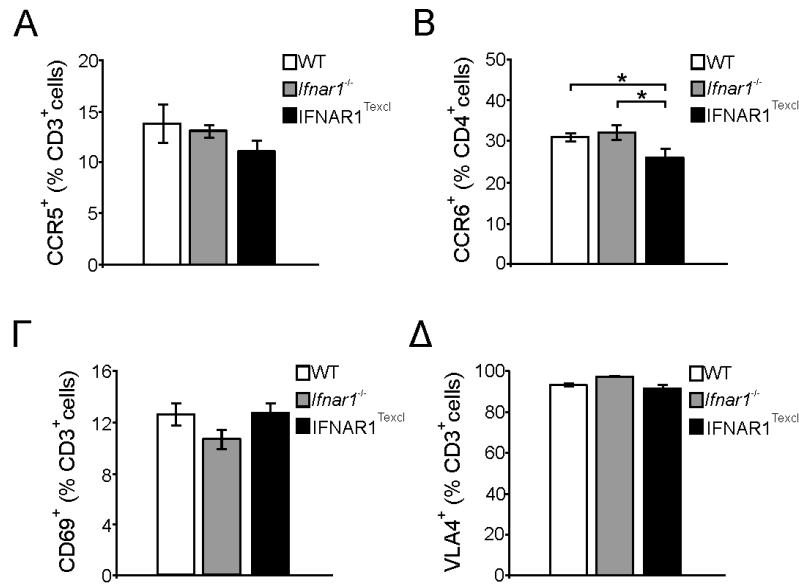
2.4.2 Μελέτη της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών στα T λεμφοκύτταρα κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ

Παράλληλα με τη μελέτη των κυτταροκινών που παράγονται από τα T λεμφοκύτταρα κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ, μετρήθηκε το ποσοστό των Tregs κυττάρων την ημέρα 10. Είναι γνωστό ότι τα Tregs παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή αυτοάνοσων φλεγμονωδών αποκρίσεων (147), ενώ παράλληλα έχει αναφερθεί ότι η IFN- β τροποποιεί τη συχνότητα των Tregs και την κατασταλτική ικανότητά τους στη ΣΚΠ και την ΠΑΕ (117,148). Επιπλέον, μετρήθηκε η έκφραση των δεικτών CCR5, CCR6, CD69 και VLA4 σε σπληνοκύτταρα και κύτταρα του αίματος.



Εικόνα 2.10 Συχνότητα ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων στο σπλήνα και στα κύτταρα του αίματος των ομάδων μελέτης, την ημέρα 10 της ΠΑΕ. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα.

Σε κανέναν ιστό μελέτης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο ποσοστό των CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων μεταξύ των ομάδων μελέτης (Εικόνα 2.10). Παράλληλα, στο σπλήνα βρέθηκε ότι, ενώ ο υποδοχέας CCR6 εκφραζόταν σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό των IFNAR1^{Texcl} CD4⁺ T λεμφοκυττάρων συγκριτικά με αυτό των WT και *Ifnar1*^{-/-} κυττάρων (Εικόνα 2.11B), οι δείκτες CD69, CCR5 και VLA4 είχαν παρόμοια έκφραση στα κύτταρα όλων των ομάδων μελέτης (Εικόνα 2.11).



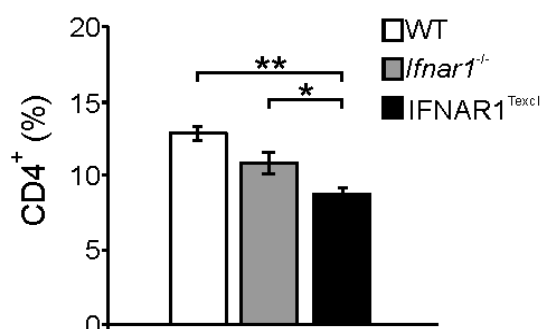
Εικόνα 2.11 Το ποσοστό των CCR5⁺ (Α), CCR6⁺ (Β), CD69⁺ (Γ) και VLA4⁺ (Δ) σπληνοκυττάρων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής την ημέρα 10 της ΠΑΕ, και εκφράζεται ως % ποσοστό στο σύνολο του CD3⁺ ή CD4⁺ πληθυσμού). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα. *p<0,05.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ήτοι το μειωμένο ποσοστό των CD4⁺ IL-17⁺ κυττάρων (Εικόνα 2.6Α) με χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης της IL-17 (Εικόνα 2.6Β), καθώς και τη μειωμένη ποσότητα εκκρινόμενης IL-17 (Εικόνα 2.8), σε συνδυασμό με το μικρότερο ποσοστό CD4⁺ CCR6⁺ κυττάρων (δείκτης των Th17 κυττάρων) (Εικόνα 2.11Β), προτείνεται ότι, η T κυτταρο-ειδική σηματοδότηση των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα οδηγεί σε μειωμένη ανοσολογική απόκριση τύπου Th17 των σπληνοκυττάρων στην προσυμπτωματική φάση της νόσου, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ήπια εξέλιξη της ΠΑΕ.

2.5 Έλεγχος της *ex vivo* πολλαπλασιαστικής ικανότητας των διαγονιδιακών T λεμφοκυττάρων έναντι του πεπτιδίου MOG₃₅₋₅₅

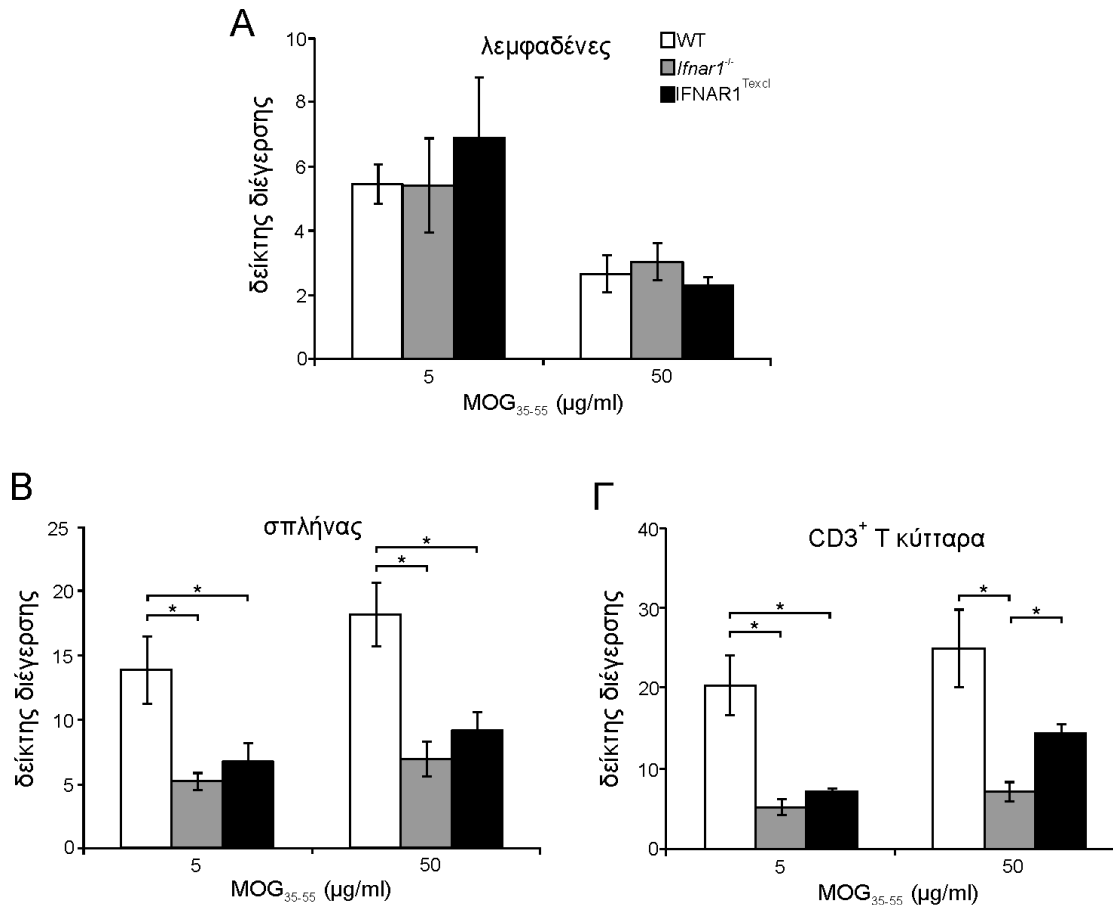
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι IFN-I φαίνεται να επηρεάζουν την κλωνική επέκταση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, είτε δρώντας άμεσα στα ίδια, είτε τροποποιώντας έμμεσα την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των APCs (100,149). Επιπλέον, επειδή η ΠΑΕ διαμεσολαβείται από T λεμφοκύτταρα, η αλλαγή της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας μπορεί να επηρεάζει την ανάπτυξη της νόσου. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και λόγω των μεταβολών που παρατηρήθηκαν στο επίπεδο των κυτταροκινών και των δεικτών στο σπλήνα κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ, αρχικά μετρήθηκε το ποσοστό των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στον ιστό αυτό.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένο ποσοστό CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στα IFNAR1^{Texcl} ζώα συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, υποδηλώνοντας μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του σπλήνα (Εικόνα 2.12).



Εικόνα 2.12 Το ποσοστό των βοηθητικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στο σύνολο των σπληνοκυττάρων, την ημέρα 10 της ΠΑΕ. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM (n=5 ζώα/γονότυπο) και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα. *p<0,05.

Επειδή όμως στις μελέτες χαρακτηρισμού των IFNAR1^{Texcl} ποντικών βρέθηκε φυσιολογική απόκριση του συνόλου των κυττάρων του σπλήνα και των λεμφαδένων έναντι του πεπτιδίου MOG₃₅₋₅₅ (Εικόνα 1.18), το παραπάνω εύρημα οδήγησε στον έλεγχο της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των σπληνοκυττάρων, των κυττάρων του επιχώριου λεμφαδένα και των CD3⁺ εμπλουτισμένων σπληνοκυττάρων, χωριστά.



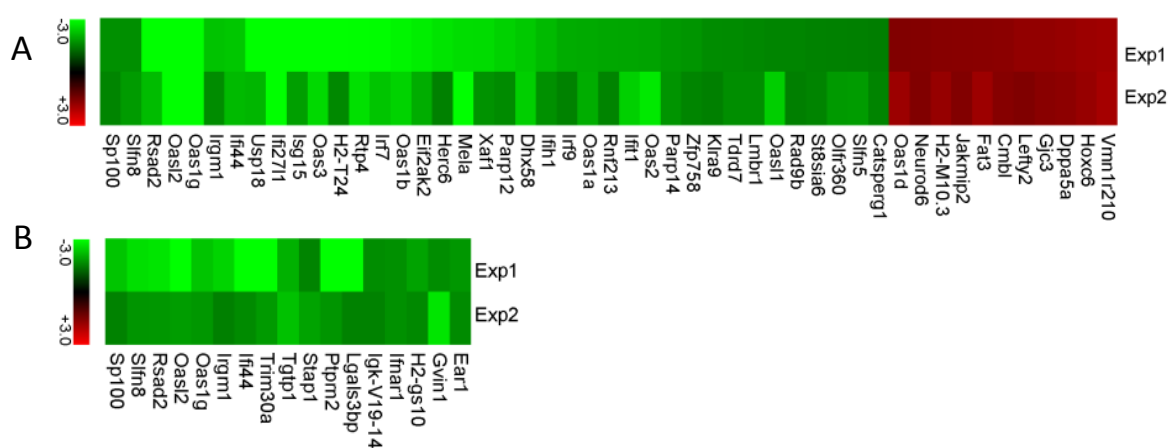
Εικόνα 2.13 *Ex vivo* πολλαπλασιασμός Τ κυττάρων από ποντίκια ανοσοποιημένα με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅. Τα ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με MOG₃₅₋₅₅/CFA και κύτταρα από τους επιχώριους λεμφαδένες και το σπλήνα απομονώθηκαν την ημέρα 10. Η ενσωμάτωση ³H θυμιδίνης μετρήθηκε 72 ώρες μετά την καλλιέργεια (Α) κυττάρων λεμφαδένων, (Β) σπληνοκυττάρων και (Γ) CD3⁺-εμπλουτισμένων Τ λεμφοκυττάρων σπλήνα καλλιεργούμενων με ακτινοβολημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παρουσία πεπτιδίου MOG₃₅₋₅₅. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα (n=5 ζώα/γονότυπο/πείραμα). p<0,05.

Τα κύτταρα των λεμφαδένων των IFNAR1^{Texcl} ποντικών παρουσίασαν παρόμοια απόκριση μετά την *ex vivo* επαναδιέγερση συγκριτικά με αυτή των WT and *Ifnar1*^{-/-} ποντικών (Εικόνα 2.13Α). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι η πολλαπλασιαστική ικανότητα των σπληνοκυττάρων των IFNAR1^{Texcl} ποντικών ήταν μειωμένη συγκριτικά με αυτή των WT, αλλά παρόμοια με αυτή των *Ifnar1*^{-/-} κυττάρων (Εικόνα 2.13Β). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα CD3⁺-εμπλουτισμένα Τ λεμφοκύτταρα (Εικόνα 2.13Γ). Φαίνεται ότι, οι IFN-I επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων του σπλήνα, όπως αναφέρθηκε (σ.

142). Παρ' όλα αυτά, η μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των σπληνοκυττάρων και των CD3⁺-εμπλουτισμένων T λεμφοκυττάρων, δε φαίνεται να συνδέεται με τη μειωμένη βαρύτητα της ΠΑΕ στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια, δεδομένου ότι και τα *Ifnar1*^{-/-} T λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα συγκριτικά με αυτή των WT κυττάρων, παρά την παρόμοια κλινική εικόνα της ΠΑΕ σε αυτά τα ζώα.

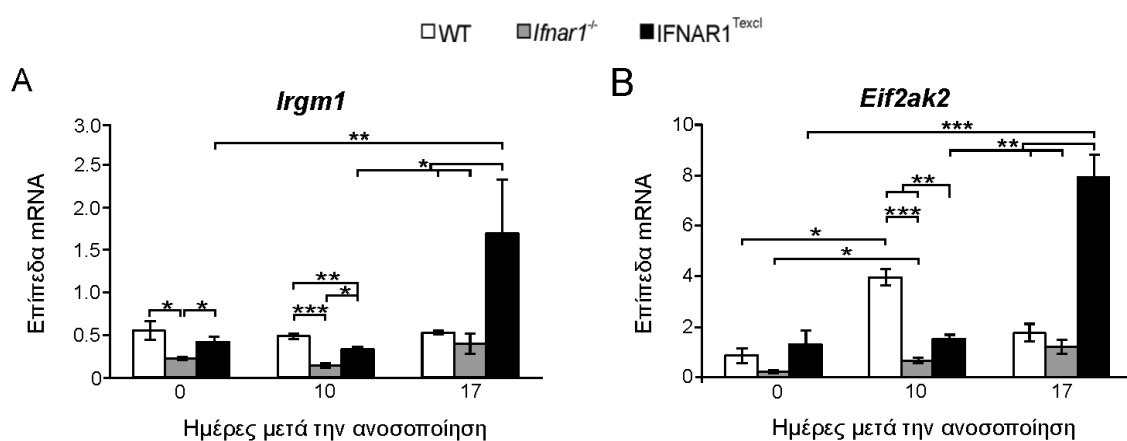
2.6 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στα T λεμφοκύτταρα και στο νωτιαίο μυελό κατά την προσυμπτωματική και οξεία φάση της ΠΑΕ

Η καθυστερημένη εμφάνιση των συμπτωμάτων της ΠΑΕ στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια ενδεχομένως να οφείλεται σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, κατά την εξέλιξη της νόσου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μεταγραφώματος σε CD3⁺-εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα από σπλήνα, και στο νωτιαίο μυελό, την ημέρα 10 της ΠΑΕ. Ως γονίδια με διαφορετική έκφραση (Differentially Expressed Genes, DEGs) ορίστηκαν αυτά, που παρουσίαζαν διαφορά στην έκφραση μεγαλύτερη από 1.5 φορά μεταξύ IFNAR1^{Texcl} και WT. Η ένταση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων από T λεμφοκύτταρα και νωτιαίο μυελό απεικονίστηκε σε ξεχωριστούς χάρτες χρωματικής έντασης (heat maps) (Εικόνα 2.14A-B).



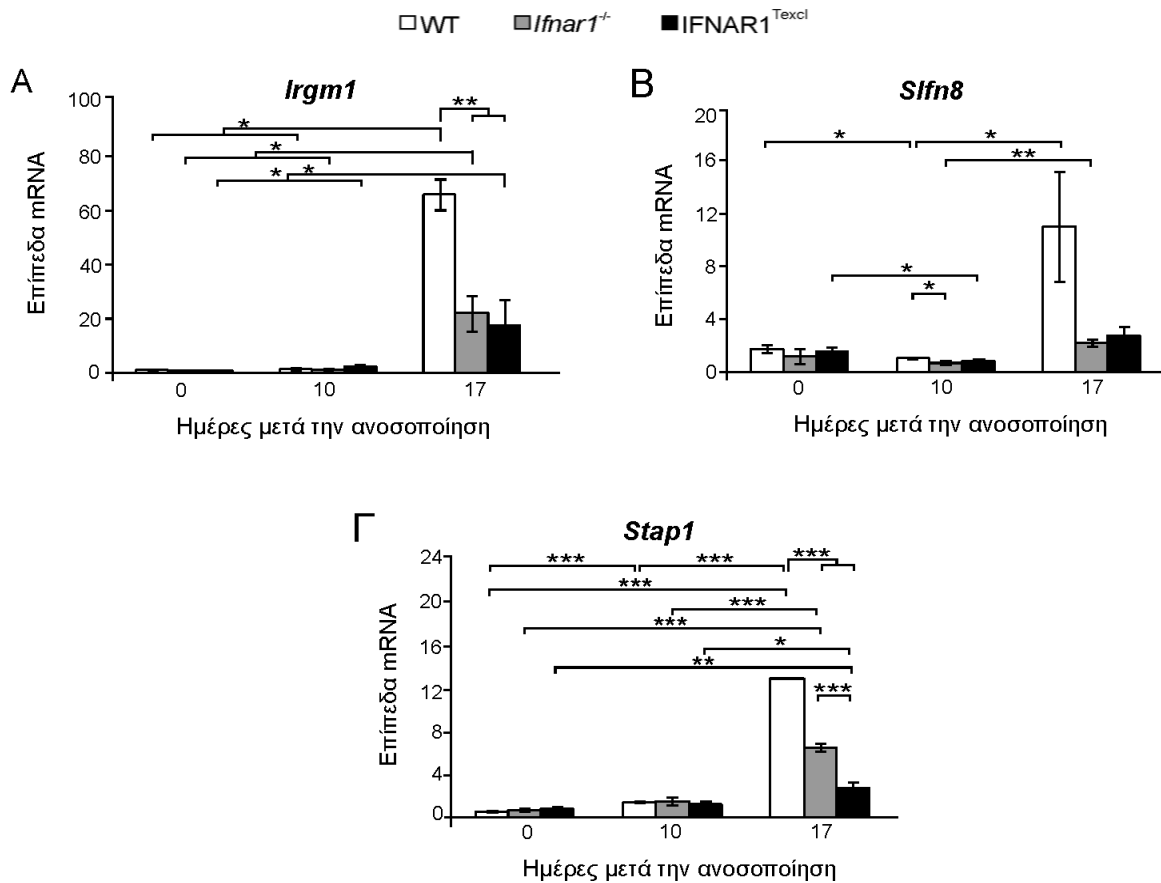
Εικόνα 2.12 Ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχειών σε CD3⁺-εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα και νωτιαίο μυελό. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση μικροσυστοιχειών σε RNA που απομονώθηκε από CD3⁺-εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα σπλήνα και από νωτιαίο μυελό WT και IFNAR1^{Texcl} ποντικών, την ημέρα 10 μετά την επαγωγή της ΠΑΕ. (A-B) Χάρτες χρωματικής έντασης που απεικονίζουν τη σχετική έκφραση γονιδίων που διαφοροποιούνται μεταξύ IFNAR1^{Texcl} και WT δειγμάτων από T λεμφοκύτταρα (A) και νωτιαίο μυελό (B) και ήταν κοινά σε δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Μεταξύ των DEGs στα T λεμφοκύτταρα βρέθηκαν γονίδια, που εμπλέκονται σε ανοσολογικές αποκρίσεις (*Parp14*, *Usp18*, *Ifit1*, *Slfn8* κ.ά.), απόπτωση/επιβίωση (*Xaf1*, *Eif2ak2*, *Ifih1*), διαδικασία βιοσύνθεσης IFN-I (*Irf7*, *Irf9*), αντιϊκές αποκρίσεις (*Oas1a*, *Oas1b*, *Isg15*, *Klra9*, *Rsad2*), ή απόκριση σε στρες (*Irgm1*, *Dhx58*). Μεταξύ των DEGs στο νωτιαίο μυελό βρέθηκαν γονίδια, που εμπλέκονται σε ανοσολογικές αποκρίσεις (*Irgm1*, *Oasl2*, *Rsad2*, *Oas1g*), κυτταρική διαφοροποίηση (*Stap1*) και κυτταρική προσκόλληση (*Lglas3bp*). Η διαφοροποιημένη έκφραση ορισμένων γονιδίων κρίθηκε αναγκαίο να επιβεβαιωθεί σε επίπεδο mRNA με ποσοτική RT-PCR (qRT-PCR). Επιπλέον, για να διερευνηθεί αν και πώς η T κυτταρο-ειδική σηματοδότηση των IFN-I μεταβάλλει την έκφραση αυτών των γονιδίων σε συνάρτηση με την εξέλιξη της νόσου, τα επίπεδα μεταγραφής τους ελέγχθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές της ΠΑΕ, στους ίδιους ιστούς από όλες τις ομάδες μελέτης (Εικόνα 2.15, 2.16). Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση τα εξής γονίδια: δύο γονίδια που σχετίζονται με τις IFN και εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ΠΑΕ, τα *Irgm1* (150,151) και *Eif2ak2* (152,153), ένα γονίδιο που σχετίζεται με τις IFN, αλλά δεν έχει συσχετιστεί με την ΠΑΕ μέχρι σήμερα, το *Slfn8* (154,155), και ένα γονίδιο που σχετίστηκε πρόσφατα με την επαγόμενη από τα μικρογλοιακά κύτταρα νευροτοξικότητα, το *Stap1* (156).



Εικόνα 2.15 Ποσοτική RT-PCR σε CD3⁺-εμπλουτισμένα T λεμφοκύτταρα. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μεταγράφων των γονιδίων *irgm1* (A) και *eif2ak2* (B) πραγματοποιήθηκε ποσοτική RT-PCR σε μεμονωμένα δείγματα ανά γονότυπο ανά χρονική στιγμή μελέτης (ημέρα 0: n=3-5 ζώα/γονότυπο, ημέρα 10: n=3-4 ζώα/γονότυπο, ημέρα 17: n=2-3 ζώα/γονότυπο). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Στα Τ λεμφοκύτταρα, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων των *Irgm1* και *Eif2ak2*, ήταν χαμηλότερα στα IFNAR1^{Texcl} δείγματα την ημέρα 10 της ΠΑΕ συγκριτικά με τα WT δείγματα, αλλά υψηλότερα συγκριτικά με τα *Ifnar1*^{-/-} δείγματα (Εικόνα 2.15). Την ημέρα 17 αυτή η εικόνα αντιστράφηκε, καθώς τα επίπεδα έκφρασής τους ήταν στατιστικά υψηλότερα στα Τ λεμφοκύτταρα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών έναντι και των δύο ομάδων ελέγχου.



Εικόνα 2.16 Ποσοτική RT-PCR στο νωτιαίο μυελό. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μεταγράφων των γονιδίων *irgm1* (A), *slfn8* (B) και *stap1* (Γ) γονιδίων πραγματοποιήθηκε ποσοτική RT-PCR σε μεμονωμένα δείγματα ανά ομάδα ανά χρονική στιγμή μελέτης (ημέρα 0: n=3-5 ζώα/γονότυπο, ημέρα 10: n=3-4 ζώα/γονότυπο, ημέρα 15: n=2-3 ζώα/γονότυπο). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM και είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Στο νωτιαίο μυελό, τα επίπεδα mRNA του *Irgm1* και του επαγόμενου από IFN-I γονιδίου, *Slfn8*, ήταν στατιστικά χαμηλότερα στα IFNAR1^{Texcl} δείγματα την ημέρα 17 της ΠΑΕ, συγκριτικά με τα WT, αλλά όχι με τα *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια (Εικόνα 2.16A-B). Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του *Stap1* mRNA, ενός γονιδίου χαρακτηριστικού

νευροτοξικότητας, ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα IFNAR1^{Texcl} δείγματα την ημέρα 17 της ΠΑΕ, συγκριτικά και με τις δύο ομάδες ελέγχου (Εικόνα 2.16Γ). Ένα ενδιαφέρον εύρημα που προέκυψε κατά την ανάλυση αυτή, ήταν ότι τα επίπεδα έκφρασης mRNA των *Irgm1*, *Sln8* και *Stap1* γονιδίων αυξήθηκαν στο νωτιαίο μυελό όλων των ομάδων μελέτης κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ, υποδηλώνοντας τη συσχέτιση των γονιδίων αυτών με την ΠΑΕ.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορετική έκφραση των γονιδίων *eif2ak2*, *irgm1*, *sln8* και *stap1* στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια, η οποία ενδεχομένως συμβάλλει στη διαφοροποιημένη εξέλιξη της ΠΑΕ στα ζώα αυτά, γεγονός που μένει να διαλευκανθεί.

Συμπεράσματα Μέρους 2:

Από το δεύτερο μέρος των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι, η επιλεκτική σηματοδότηση των ενδογενών IFN-I στα T λεμφοκύτταρα συμβάλλει στην καθυστέρηση της εμφάνισης συμπτωμάτων ΠΑΕ και στην ήπια ανάπτυξη της νόσου, ενώ η χορήγηση εξωγενούς IFN-β αναδεικνύει περαιτέρω αυτόν τον προστατευτικό ρόλο.

Υποθέτοντας ότι οι IFN-I ασκούν την επωφελή τους δράση διαμορφώνοντας τη συμπεριφορά των T λεμφοκυττάρων, φάνηκε ότι η βελτιωμένη εικόνα της ΠΑΕ συνδεόταν με:

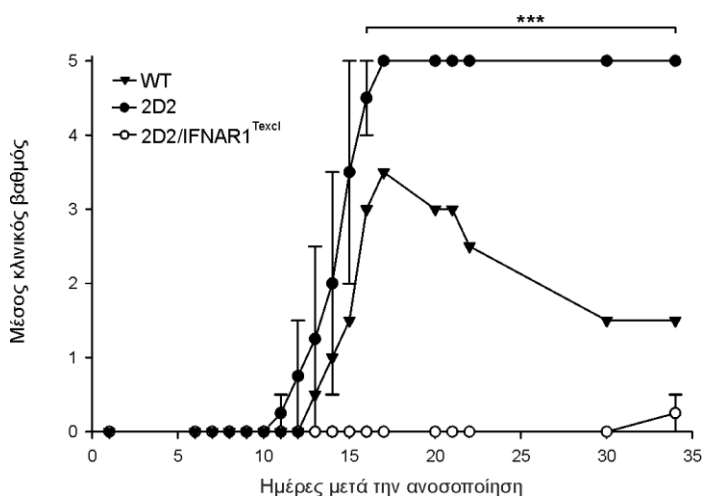
- μειωμένη διήθηση T λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ, και λιγότερη απομυελίνωση και εκφυλισμό των νευρώνων του ΚΝΣ κατά την οξεία φάση της νόσου, σε συνδυασμό με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *irgm1*, το οποίο συμβάλλει στη διάρρηξη του ΑΕΦ και του γονιδίου *stap1*, το οποίο εμπλέκεται στη νευροτοξικότητα,
- μειωμένη απόκριση τύπου Th17 και χαμηλότερο ποσοστό CCR6⁺ CD4⁺ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων στο σπλήνα κατά την προσυμπτωματική φάση της νόσου,
- υψηλότερο ποσοστό βοηθητικών T λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 στο σπλήνα κατά την οξεία φάση της νόσου,
- ενισχυμένη απόκριση τύπου Th1 στο σπλήνα, και μειωμένο ποσοστό T λεμφοκυττάρων του αίματος που εκφράζουν VLA4 κατά την οξεία φάση της νόσου, σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *irgm1*, το οποίο επάγεται από την IFN-γ.

Μέρος 3. Επαγωγή Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) σε ποντίκια με MOG₃₅₋₅₅ αντιγονο-ειδικό TCR (2D2)

Λόγω της ποικιλότητας του TCR, ακόμα και μετά την ανοσοποίηση των ποντικών, μόνο ένα μικρό ποσοστό T λεμφοκυττάρων είναι αντιγονο-ειδικό, γεγονός που δυσκολεύει τη μελέτη του ρόλου της σηματοδότησης των ενδογενών IFN-I στα αντιγονο-ειδικά T λεμφοκύτταρα κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ. Προκειμένου να ξεπεραστεί το παραπάνω εμπόδιο, ποντίκια όλων των ομάδων μελέτης διασταυρώθηκαν με 2D2 ποντίκια, τα οποία εκφράζουν TCR, που αναγνωρίζει ειδικά το MOG₃₅₋₅₅ πεπτίδιο (TCR^{MOG}) (137), σύμφωνα με την κατάλληλη στρατηγική αναπαραγωγής (σ. 81-82).

3.1 Επίδραση της σηματοδότησης των IFN-I επιλεκτικά στα MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος των IFN-I σε ένα καθαρά αντιγονο-ειδικό περιβάλλον, συγκεκριμένα δρώντας σε MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα ΠΑΕ σε 2D2/IFNAR1^{Texcl} και 2D2 ποντίκια, ενώ τα αγρίου τύπου ζώα (WT) χρησίμευσαν ως ομάδα ελέγχου. Λόγω της μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας και επιβίωσης των 2D2/*Ifnar1*^{-/-} ζώων, καθώς και λόγω του αυξημένου ποσοστού αυθόρμητης ΠΑΕ σε αυτά, η εν λόγω ομάδα δεν ήταν δυνατόν να συμπεριληφθεί στα δοκιμαστικά πειράματα.



Εικόνα 3.1. Επαγωγή της ΠΑΕ σε WT, 2D2 και 2D2/IFNAR1^{Texcl} ποντίκια (n=1-3 ζώα/ γονότυπο). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή του κλινικού βαθμού ± SEM. ***p<0,001: σύγκριση 2D2/IFNAR1^{Texcl} με 2D2 ποντίκια.

Παρατηρήθηκε ότι τα 2D2/IFNAR1^{Texcl} ποντίκια παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην εμφάνιση της ΠΑΕ, με τα πρώτα συμπτώματα να εμφανίζονται μόλις την ημέρα 34 (Εικόνα 3.1.), ενώ τα 2D2 ζώα εμφάνισαν όχι μόνο αυξημένη ευαισθησία στην ΠΑΕ συγκριτικά με τα αγρίου τύπου ζώα, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (137), αλλά και 100% θνησιμότητα από την ημέρα 18 μετά την ανοσοποίηση.

Παρ' όλο που το παραπάνω αποτέλεσμα έχει προκύψει από ένα πείραμα, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η σηματοδότηση των ενδογενών IFN-I αποκλειστικά και μόνο στα MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα καταργεί την ΠΑΕ, γεγονός το οποίο δε φαίνεται να ισχύει στα 2D2 ζώα, όπου οι IFN-I δρουν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Φαίνεται λοιπόν ότι, το προστατευτικό αυτό φαινόμενο των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα εξουδετερώνεται όταν οι IFN-I δρουν και στους άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, και συνεπώς, αυτός είναι ο λόγος που δεν εκδηλώνεται και στα 2D2 ζώα. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί αυτού του φαινομένου χρήζουν εκτεταμένης διερεύνησης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι IFN-I παράγονται από την πλειονότητα των κυττάρων και εμπλέκονται στην φυσική και επίκτητη ανοσία, συντελώντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Η δράση των IFN-I είναι πλειοτροπική, όντας άλλοτε προστατευτική και άλλοτε επιβλαβής σε παθολογικές καταστάσεις, ασκώντας πολλές φορές αντίθετες δράσεις ακόμα και κατά την εξέλιξη μιας νόσου. Ειδικά στη ΣΚΠ, μίας νόσου του ΚΝΣ, που διαμεσολαβείται από τα T λεμφοκύτταρα, η IFN-β χορηγείται ως θεραπευτική αγωγή πρώτης γραμμής. Παρά όμως την προστατευτική δράση της IFN-β στη ΣΚΠ, περίπου 30% των ασθενών δεν αποκρίνονται στη θεραπεία με IFN-β, ενώ σε μερικά άτομα η IFN-β επιδεινώνει τα συμπτώματα της νόσου (118).

Παρ' ότι υπάρχουν ευρήματα που υποδηλώνουν την πλειοτροπική δράση της IFN-β στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, η *in vivo* κυτταρο-ειδική δράση της στη ΣΚΠ και την ΠΑΕ, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Στην παρούσα μελέτη τέθηκε το ερώτημα πώς η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα IFNAR τροποποιεί τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των T λεμφοκυττάρων κατά την ΠΑΕ, διαφοροποιώντας την εξέλιξη της νόσου.

Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκαν ποντίκια με επιλεκτική έκφραση του IFNAR αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα, τα οποία αναφέρονται ως IFNAR1^{Texcl}. Τα διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασαν φυσιολογικό φαινότυπο, και μετά την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι, η μεταγραφή του διαγονιδίου πραγματοποιείται μόνο στους λεμφικούς ιστούς, η IFNAR1 εκφράζεται αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα και ο IFNAR είναι λειτουργικός στα T λεμφοκύτταρα και τους υποπληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺ αυτών, όπως ελέγχθηκε μέσω μέτρησης ενδιάμεσων μορίων του μονοπατιού σηματοδότησης των IFN-I (pSTAT1), καθώς και γονιδιακών προϊόντων αυτού (ISG15). Η έκφραση του διαγονιδίου δεν προκάλεσε δομικές αλλοιώσεις στην αρχιτεκτονική του σπλήνα, ενώ οι υποπληθυσμοί των T λεμφοκυττάρων, CD4⁺ και CD8⁺, στο σπλήνα και τους λεμφαδένες παρέμειναν αριθμητικά αμετάβλητοι παρά την ύπαρξη του διαγονιδίου σε αυτά. Επιπλέον, τα T λεμφοκύτταρα των διαγονιδιακών ζώων παρουσίασαν φυσιολογική ικανότητα πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης προς Th1 και Th17 υποπληθυσμούς, και παραγωγής κυτταροκινών

μετά από πολυκλωνική και αντιγονο-ειδική διέγερση του TCR τους, καταδεικνύοντας ότι το διαγονίδιο δεν έχει επιφέρει διαταραχή στις βασικές λειτουργίες τους.

Κατά το χαρακτηρισμό των πέντε διαγονιδιακών σειρών που δημιουργήθηκαν και εμφάνισαν T κυτταροειδική έκφραση της IFNAR1, δύο κρίθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω μελέτες. Αυτές οι διαγονιδιακές σειρές δύνανται να αποτελέσουν ένα *in vivo* σύστημα για τη μελέτη της δράσης των IFN-I με τη διαμεσολάβηση των T λεμφοκυττάρων σε διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις αυτοανοσίας, καρκίνου ή μόλυνσης με μικροοργανισμούς (ιούς, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα). Ειδικά σε παθολογίες, όπου τα T λεμφοκύτταρα είναι ο κύριος παθογενετικός πληθυσμός, όπως στην ΠΑΕ, θεωρήθηκε ότι τα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια μπορεί να αποτελέσουν ένα πολύτιμο εργαλείο για την κατανόηση του τρόπου, με τον οποίο η αγωγή με IFN-β επηρεάζει τη βιολογία των T λεμφοκυττάρων.

Όταν IFNAR1^{Texcl} ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με πεπτίδιο MOG₃₅₋₅₅, παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην εμφάνιση των συμπτωμάτων της ΠΑΕ, καθώς και πιο ήπια εξέλιξη της συγκριτικά με τα *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια (Εικόνα 2.1). Αυτό το εύρημα αποκαλύπτει μία, έως τώρα άγνωστη, *in vivo* προστατευτική δράση των ενδογενών IFN-I, όταν δρουν άμεσα και αποκλειστικά στα T λεμφοκύτταρα κατά την αρχική φάση της ΠΑΕ. Η δράση αυτή ενισχύθηκε όταν ανασυνδυασμένη IFN-β χορηγήθηκε προφυλακτικά, κατά την επαγωγή της ΠΑΕ, στα IFNAR1^{Texcl} ζώα, τα οποία παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη νόσο (Εικόνα 2.2).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, η επωφελής δράση των ενδογενών IFN-I όπως αυτή παρατηρήθηκε στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια δεν ήταν εμφανής στα αγρίου τύπου ζώα, παρά του ότι και σε αυτή την περίπτωση τα T λεμφοκύτταρα εξέφραζαν τον IFNAR. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι, ο προστατευτικός ρόλος των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα δεν αναδεικνύεται λόγω της σηματοδότησης των IFN-I σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, που έχει ως αποτέλεσμα τη δράση μηχανισμών αρνητικής ρύθμισης. Από τη βιβλιογραφία, και από την παρούσα μελέτη φαίνεται η επωφελής δράση της εξωγενούς IFN-β σε αγρίου τύπου ποντίκια (126,130). Η ενίσχυσή της όμως στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια συγκριτικά με αυτή στα αγρίου τύπου υποστηρίζει ακόμα περισσότερο την ορθότητα της υπόθεσης που διατυπώθηκε.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης των τρόπων, μέσω των οποίων πιθανά αναδεικνύεται η επωφελής δράση των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα, βρέθηκε ότι κατά την

προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ, στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια, η απόκριση τύπου Th17 ήταν μειωμένη στο σπλήνα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων καταστέλλεται από την IFN-β. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί *in vitro* ότι, η ενεργοποίηση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων παρουσία IFN-β οδηγεί σε μειωμένη έκφραση IL-17 από αυτά (126,157,158). Επιπλέον, *in vivo* μελέτες, με χορήγηση IFN-β κατά την ΠΑΕ, έδειξαν ότι τα σπληνοκύτταρα και τα κύτταρα από λεμφαδένες παρήγαγαν μειωμένη ποσότητα IL-17 συγκριτικά με αυτά των ζώων, στα οποία δε χορηγήθηκε IFN-β (159). Τέλος, σπληνοκύτταρα από *ifnar1*^{-/-} ζώα κατά την 12^η μέρα της ΠΑΕ έδειξαν υψηλότερη παραγωγή IL-17 (131). Από τις *in vivo* μελέτες όμως, δε φάνηκε αν η μειωμένη απόκριση τύπου Th17 επάγεται από την δράση της IFN-β άμεσα στα T λεμφοκύτταρα ή έμμεσα μέσω των APCs. Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι οι IFN-I, δρώντας απευθείας στα περιφερικά T λεμφοκύτταρα, οδηγούν σε μειωμένη απόκριση τύπου Th17 κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ (Εικόνα 2.6, 2.8).

Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το ποσοστό των CD4⁺ T κυττάρων που εκφράζουν τον επιφανειακό υποδοχέα CCR6 (Εικόνα 2.11B), ένα δείκτη που εμπλέκεται στη μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ κατά την ΠΑΕ (160-162), και ο οποίος εκφράζεται κυρίως στα Th17 λεμφοκύτταρα, είναι σημαντικά μειωμένο στο σπλήνα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι, μειωμένο ποσοστό αυτών των Th κυττάρων έχει ικανότητα μετανάστευσης κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει το μικρό αριθμό διηθούντων T λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ των IFNAR1^{Texcl} ποντικών, καθώς και τα ήπια νευροπαθολογικά ευρήματα, που παρατηρήθηκαν στη συνέχεια, κατά την οξεία φάση της νόσου.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι IFN-I δρουν άμεσα στα T λεμφοκύτταρα προκειμένου να παρεμποδίσουν την απόκριση τύπου Th17 κατά την προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ, με αποτέλεσμα την καθυστερημένη έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια.

Κατά την οξεία φάση της νόσου, ενώ οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στις αποκρίσεις τύπου Th17 μεταξύ των ομάδων εξομαλύνθηκαν, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό CD4⁺IL-10⁺ κυττάρων στην περιφέρεια των IFNAR1^{Texcl}

ποντικών, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου (Εικόνα 2.4Γ, Πίνακας 5). Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι η IFN-β επάγει την παραγωγή IL-10, με ευεργετικές επιπτώσεις κατά την ΠΑΕ (163,164), γεγονός ανάλογο με αυτό που παρατηρείται στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια. Επιπλέον όμως αυτού, παρατηρήθηκε και ενίσχυση της απόκρισης τύπου Th1 στο σπλήνα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών συγκριτικά με αυτή των αγρίου τύπου ποντικών (Εικόνα 2.4Α, Πίνακας 5). Μολονότι αρχικά υπήρχε η θεώρηση ότι τα Th1 λεμφοκύτταρα αποτελούν τον κύριο παθογενετικό υποπληθυσμό κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ και της ΣΚΠ (165,166), μετέπειτα μελέτες κατά την ΠΑΕ αποκάλυψαν ότι η παθογενετική δράση της IFN-γ, χαρακτηριστικής κυτταροκίνης των Th1 κυττάρων, είναι αμφιλεγόμενη (167). Μία εξήγηση για την ήπια κλινική εικόνα των IFNAR1^{Texcl} ζώων παρά την ενισχυμένη Th1 απόκριση, μπορεί να βασίζεται στην ύπαρξη «συνομιλίας» μεταξύ των μονοπατιών των IFN-I και IFN-II, η οποία φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά τη δράση της IFN-γ κατά την ΠΑΕ (86). Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, η χορήγηση IFN-γ κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ, μειώνει τα συμπτώματα της νόσου στα αγρίου τύπου ζώα, ενώ τα αυξάνει στα *Ifnar1*^{-/-} ζώα (86). Με βάση αυτά τα ευρήματα, ίσως μπορεί να εξηγηθεί γιατί, στην παρούσα μελέτη, στα *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια δε βελτιώθηκε η κλινική εικόνα, παρά την αυξημένη ανοσολογική απόκριση τύπου Th1. Αντίθετα όμως, η κλινική εικόνα τους ήταν παρόμοια με αυτή των αγρίου τύπου ζώων, τα οποία παρουσίαζαν μειωμένο ποσοστό CD4⁺IFN-γ⁺ κυττάρων. Εναλλακτικά, μία δεύτερη εξήγηση μπορεί να βασίζεται στην υπόθεση ότι, η IFN-γ δρα ευεργετικά σε συνέργεια με την IL-10, όταν η παραγωγή της IL-10 ξεπερνά μία συγκεκριμένη ουδό. Αυτή η συνθήκη φαίνεται να συμβαίνει στα IFNAR1^{Texcl}, αλλά όχι στα *Ifnar1*^{-/-} ποντίκια, τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγή IL-10, και για το λόγο αυτό η εξέλιξη της ΠΑΕ στις δύο ομάδες διαφέρει.

Μία άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορά στη συσχέτιση της αυξημένης απόκρισης τύπου Th1 στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια την ημέρα 17 της ΠΑΕ, με την έκφραση του γονιδίου *Irgm1* (Εικόνα 2.13Α). Το *Irgm1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Immunity Related GTPase family M member 1 και επάγεται κυρίως από την IFN-γ. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη *Irgm1* επιδεινώνει την ΠΑΕ, προάγοντας τη διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ), ενώ τα *Irgm1*^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ΠΑΕ. Στην παρούσα μελέτη, κατά την

οξεία φάση της νόσου (ημέρα 17), το *Irgm1* εκφραζόταν σε υψηλότερα επίπεδα στα σπληνικά T λεμφοκύτταρα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών, γεγονός που συμφωνεί με την αυξημένη παραγωγή IFN- γ στα ίδια ζώα. Παρ' όλα αυτά, την ίδια χρονική στιγμή, η έκφραση του *Irgm1* στο νωτιαίο μυελό των IFNAR1^{Texcl} ποντικών ήταν σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή των αγρίου τύπου ζώων (Εικόνα 2.16A). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα για ενισχυμένη απόκριση τύπου Th1 στην περιφέρεια των IFNAR1^{Texcl} ζώων, ενώ παράλληλα υποδηλώνουν χαμηλότερη διάρρηξη του ΑΕΦ. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω ευρήματα, προτείνεται ότι ο ΑΕΦ των IFNAR1^{Texcl} ποντικών περιορίζει τη μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ, γεγονός το οποίο συμφωνεί και με την ήπια παθολογία που παρατηρήθηκε. Επιπρόσθετα, προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την οξεία φάση της ΠΑΕ, με στόχο τη μελέτη της μετανάστευσης των T λεμφοκυττάρων, έδειξαν αυξημένο ποσοστό CD69⁺ και CCR5⁺ T κυττάρων στο σπλήνα των IFNAR1^{Texcl} ποντικών (Εικόνα 2.5A), το οποίο φαίνεται να δηλώνει την ύπαρξη ενεργοποιημένων Th1 λεμφοκυττάρων (15,168). Ταυτόχρονα, βρέθηκε μειωμένο ποσοστό περιφερικών T λεμφοκυττάρων των IFNAR1^{Texcl} ποντικών που εκφράζουν το μόριο προσκόλλησης VLA4 (Εικόνα 2.5B), υποδηλώνοντας ότι λιγότερα T λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ΑΕΦ και κατά συνέπεια να μεταναστεύουν στο ΚΝΣ (135). Αυτή η υπόθεση ίσως εξηγεί γιατί ανιχνεύθηκαν λιγότερα διηθούντα κύτταρα στο νωτιαίο μυελό των IFNAR1^{Texcl} ποντικών, το οποίο συμφωνεί και με το χαμηλότερο κλινικό βαθμό της ΠΑΕ κατά την οξεία φάση της νόσου.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματά μας, αλλά και τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, μία ενδιαφέρουσα υπόθεση που θα μπορούσε να διατυπωθεί, είναι ότι στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια, οι IFN-I επηρεάζουν διαφορικά τη συμπεριφορά των T λεμφοκυττάρων σε διακριτά στάδια της ΠΑΕ. Κατά τη φάση ενεργοποίησης, καταστέλλουν τις αποκρίσεις τύπου Th17, καθυστερώντας με αυτόν τον τρόπο την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων, ενώ κατά την οξεία φάση διεγείρουν την έκφραση της IL-10 και περιορίζουν τη μετανάστευση των Th1 κυττάρων μέσα στο ΚΝΣ, με αποτέλεσμα τη μειωμένη φλεγμονή στο ΚΝΣ και την πιο ήπια ανάπτυξη της ΠΑΕ.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι, στα πειράματα μικροσυστοιχειών, μεταξύ των γονιδίων που ανιχνεύθηκαν με διαφοροποιημένη έκφραση, τα επίπεδα έκφρασης δύο γονιδίων που δεν είχαν συνδεθεί στο παρελθόν με την ΠΑΕ, βρέθηκαν αυξημένα στο νωτιαίο μυελό των ζώων όλων των ομάδων, κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ. Πρόκειται για τα γονίδια *stap1* (signal transducing adaptor family member 1), και *slfn8* (schlafen 8) (Εικόνα 2.16B,Γ). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, η έκφραση του *stap1*, ενός γονιδίου πρόσφατα συνδεδεμένου με τον εκφυλισμό και την απόπτωση των νευρώνων, ήταν μειωμένη στο νωτιαίο μυελό των IFNAR1^{Texcl} ποντικών συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου, γεγονός που συνδέεται με τα μειωμένα νευροπαθολογικά ευρήματα που παρατηρήθηκαν σε αυτά τα ζώα. Τα δύο αυτά γονίδια θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως νέοι δείκτες για την παρακολούθηση της εξέλιξης της ΠΑΕ, απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες προκειμένου να εξαχθούν έγκυρα συμπεράσματα.

Προηγούμενες μελέτες έθεσαν το ερώτημα του ρόλου των ενδογενών IFN-I στους διάφορους κυτταρικούς τύπους και την ιστοειδική δραστικότητά τους κατά την ΠΑΕ. Οι Teige et al. (133,169) μελετώντας τα *Ifnb^{-/-}* ποντίκια συμπέραναν ότι, η ενδογενής IFN-β δεν επιδρά στη συμπεριφορά των T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, αλλά στην ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων, τα οποία δρουν ως APCs ενεργοποιώντας εκ νέου τα εγκεφαλιτογόνα T λεμφοκύτταρα. Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε σε αποτελέσματα που δείχνουν ότι κατά την ΠΑΕ, η απουσία σηματοδότησης της IFN-β δεν επιδρά στον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτταροκινών από τα T λεμφοκύτταρα των επιχώριων λεμφαδένων. Εν τούτοις, στην παρούσα μελέτη, τα T λεμφοκύτταρα του σπλήνα παρουσίασαν μεταβολή του προτύπου των κυτταροκινών που εκκρίνουν, η οποία σχετιζόταν με τη σηματοδότηση των IFN-I. Δύο συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από αυτήν την παρατήρηση: πρώτον, οι επαγόμενες από τις IFN-I χαρακτηριστικές κυτταροκίνες των υποτύπων των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων, στα διάφορα περιφερικά λεμφικά όργανα, δεν είναι απαραίτητα οι ίδιες, και δεύτερον, τα T λεμφοκύτταρα όχι μόνο των επιχώριων λεμφαδένων, αλλά και άλλων λεμφικών οργάνων, π.χ. του σπλήνα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΠΑΕ.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της κυτταροειδικής δράσης των IFN-I, δημιουργήθηκαν από τους Prinz et al., ποντίκια με απαλοιφή της IFNAR1 από τα T λεμφοκύτταρα

(Ifnar1^{f/f} CD4^{Cre}), τα Β λεμφοκύτταρα (Ifnar1^{f/f} CD19^{Cre}), τα νευρικά κύτταρα (Ifnar1^{f/f} Nes^{Cre}) και τα κύτταρα της μυελικής σειράς (Ifnar1^{f/f} LysM^{Cre}) (127). Κατά την επαγωγή της ΠΑΕ, ποντίκια ελλειμματικά για την IFNAR1 στα Τ λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν τον ίδιο φαινότυπο με τα αγρίου τύπου ζώα, στη χρόνια φάση της νόσου, οπότε οι ερευνητές συμπέραναν ότι η σηματοδότηση μέσω του IFNAR στα Τ λεμφοκύτταρα δεν είχε καμία επίπτωση στην έναρξη και την εξέλιξη της ΠΑΕ. Εν τούτοις, παρατηρήθηκε ότι, κατά την έναρξη της νόσου, τα ζώα αυτά παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερο κλινικό βαθμό, φαινόμενο όμως που δε διερευνήθηκε περαιτέρω στη μελέτη τους (127). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ένα σημαντικό προστατευτικό ρόλο της δράσης των IFN-I στα Τ λεμφοκύτταρα κατά την αρχική φάση της ΠΑΕ, μία υπόθεση που υποστηρίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την παρούσα μελέτη, με τη χρήση των IFNAR1^{Texcl} ποντικών.

Είναι αξιοσημείωτο ότι, η επωφελής δράση των IFN-I που παρατηρήθηκε στα IFNAR1^{Texcl} ποντίκια κατά την αρχική φάση της ΠΑΕ, παύει να υφίσταται στη χρόνια φάση της νόσου, όπου τα IFNAR1^{Texcl} ζώα εμφανίζουν υψηλότερο κλινικό βαθμό από τα αγρίου τύπου ζώα. Δεδομένου ότι στα IFNAR1^{Texcl} ζώα, οι IFN-I σηματοδοτούν μόνο μέσω των Τ λεμφοκυττάρων, φαίνεται ότι, η αυξημένη βαρύτητα της νόσου σε αυτά τα ζώα συγκριτικά με τα αγρίου τύπου ζώα, στη χρόνια φάση της ΠΑΕ, οφείλεται στην απουσία σηματοδότησης των IFN-I μέσω μη Τ κυτταρικών τύπων. Πράγματι, οι Prinz *et al.* (127) έδειξαν ότι σε αυτή τη φάση της νόσου, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η σηματοδότηση των IFN-I μέσω των κυττάρων της μυελικής σειράς, τροποποιώντας την έμφυτη ανοσολογική απόκριση των μυελικών κυττάρων του ΚΝΣ.

Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα και λαμβάνοντας υπ' όψιν την παραπάνω μελέτη, θα μπορούσε κανείς να εικάσει ότι οι IFN-I ασκούν προστατευτική δράση κατά την ΠΑΕ, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, μέσω του οποίου σηματοδοτούν, σε συνδυασμό με τη φάση της νόσου.

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει ότι, κατά την ΠΑΕ, οι ενδογενείς IFN-I δρουν προστατευτικά όχι μόνο στο ΚΝΣ, αλλά και στα σπληνικά Τ λεμφοκύτταρα, τροποποιώντας τη συμπεριφορά τους κατά την προσυμπτωματική φάση της νόσου. Το πιο σημαντικό όμως εύρημα είναι ότι, η χορήγηση εξωγενούς IFN-β στα

IFNAR1^{Texcl} ποντίκια παρεμποδίζει την ανάπτυξη της ΠΑΕ ως προς το χρόνο εκδήλωσης και τη βαρύτητα των συμπτωμάτων. Είναι γεγονός ότι, η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με IFN-β σε ασθενείς με ΣΚΠ φαίνεται να εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του προφίλ των εγκεφαλιτογόνων T λεμφοκυττάρων, των επιπέδων των ενδογενών IFN-I και άλλων (121,126). Με βάση το εύρημα της παρούσας μελέτης και το γεγονός ότι, η ΠΑΕ προσομοιάζει τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της ΣΚΠ, προτείνεται ότι, πέρα από τους παράγοντες που προέκυψαν από τις προαναφερθείσες μελέτες, η αποτελεσματικότητα της αγωγής με IFN-β σε ασθενείς με ΣΚΠ ίσως εξαρτάται από την ισορροπία θετικών και αρνητικών δράσεων που η IFN-β ασκεί στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, γεγονός που υποστηρίζει και πάλι την πλειοτροπική της δράση.

Για το λόγο αυτό, η ενδεδειγμένη διερεύνηση των μηχανισμών που υπόκεινται της ευεργετικής δράσης των IFN-I στα T λεμφοκύτταρα, θα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για το αν και πώς, θεραπείες βασισμένες στην IFN-β και στοχευμένες στα T λεμφοκύτταρα μπορούν να βελτιώσουν τις ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές παρεμβάσεις στη ΣΚΠ, που είναι και το ζητούμενο της ερευνητικής κοινότητας σήμερα.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο, οι IFN-I τροποποιούν άμεσα τη βιολογία των T λεμφοκυττάρων σε ένα *in vivo* σύστημα μελέτης, κατά την επαγωγή της ΠΑΕ. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, μας επιτρέπουν να θέσουμε νέα ερωτήματα, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικούς στόχους αυτής της εργασίας.

1. Μπορεί η IFN-β να διατηρήσει την ευεργετική της δράση μέσω των T λεμφοκυττάρων εάν χορηγηθεί θεραπευτικά, μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της ΠΑΕ; Στόχος είναι να μελετηθούν οι συνθήκες, κάτω από τις οποίες αναδεικνύεται η μέγιστη δυνατή θεραπευτική δράση της IFN-β, όπως η χρονική στιγμή χορήγησης, η συγκέντρωση IFN-β και το χρονικό διάστημα χορήγησης της IFN-β.
2. Με ποιους μηχανισμούς οι IFN-I συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των φαινοτυπικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των T λεμφοκυττάρων που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα διατριβή, στις διαφορετικές φάσεις της ΠΑΕ;
3. Σχετίζονται τα γονίδια, των οποίων η έκφραση βρέθηκε διαφοροποιημένη στην προσυμπτωματική φάση της νόσου, με τη δράση των ενδογενών IFN-I στη συμπεριφορά των T λεμφοκυττάρων; Αν ναι, με ποιον τρόπο;
4. Με ποιον τρόπο η IFN-β επηρεάζει τη μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων από τους περιφερικούς ιστούς στο ΚΝΣ κατά την ΠΑΕ; μετά τη διαπίστωση ότι η IFN-β συμβάλλει σε καθυστέρηση στην έναρξη των συμπτωμάτων, είναι σημαντικό να μελετηθεί *in vivo* η πορεία των T λεμφοκυττάρων μετά τη χορήγηση IFN-β κατά την ΠΑΕ, με τη χρήση οπτικής μικροσκοπίας, εφαρμόζοντας ειδικές τεχνικές για την παρακολούθηση ζώντων οργανισμών (*in vivo* imaging).

Απώτερος στόχος όλων των παραπάνω είναι η ανάδειξη πιθανών τρόπων, με τους οποίους μπορεί κανείς να χειριστεί τα κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ *in vitro* ή/και *in vivo*, ανάλογα με το στάδιο της νόσου στο οποίο βρίσκονται, προκειμένου να αναδειχθεί η προστατευτική επίδραση της χορηγούμενης IFN-β, στην κλινική πράξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBLIA

- I. Kenneth M., Janeway's Immunobiology, 2012, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC
- II. Abbas A.K., Lichtman A.H., Βασική Ανοσολογία (επιμέλεια: Σ.Ι. Τζάρτος, Α. Μαμαλάκη), 2004, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- III. Kindt T.J., Goldsbt R.A., Osborne B.A., Kuby Ανοσολογία (επιμέλεια: Α. Γαϊτανάκη, Κ. Μπαξεβάνης), 2007, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- IV. Vander A., Φυσιολογία του Ανθρώπου I και II, 2001, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- V. Junqueira L.C., Carneiro J., Basic Histology (επιμέλεια: Χ. Κίττας), 2004, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- VI. Atkins G., Amor S., Fletcher J.M., Mills K.H.G., The Biology of Multiple Sclerosis, 2012, Cambridge University Press
- VII. Pease S., Saunders T.L., Advanced Protocols for Animal Transgenesis, 2011, Springer
- VIII. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2003, 3rd edition, Cold Spring Harbor

ΑΡΘΡΑ

1. Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4: 11-22.
2. Le, B. A., and D. F. Tough. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 432-436.
3. Honjo, T., K. Kinoshita, and M. Muramatsu. 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 165-196.
4. Stavnezer, J. 1996. Antibody class switching. *Adv. Immunol.* 61: 79-146.
5. Burton, D. R. 1990. Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends Biochem. Sci.* 15: 64-69.
6. Davies, D. R., and H. Metzger. 1983. Structural basis of antibody function. *Annu. Rev. Immunol.* 1: 87-117.
7. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 523-532.
8. Budd, R. C. 2001. Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 356-362.

9. Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 336-347.
10. Romagnani, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 227-257.
11. Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 30: 646-655.
12. Nakayamada, S., H. Takahashi, Y. Kanno, and J. J. O'Shea. 2012. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 297-302.
13. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 2011. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. *J. Immunol.* 186: 3808-3821.
14. Rollins, B. J. 1997. Chemokines. *Blood* 90: 909-928.
15. Cheng, W., and G. Chen. 2014. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Mediators. Inflamm.* 2014: 659206.
16. Masopust, D., and J. M. Schenkel. 2013. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 309-320.
17. Avrameas, S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol. Today* 12: 154-159.
18. Sinha, A. A., M. T. Lopez, and H. O. McDevitt. 1990. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 248: 1380-1388.
19. Horwitz, M. S., L. M. Bradley, J. Harbertson, T. Krahl, J. Lee, and N. Sarvetnick. 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat. Med.* 4: 781-785.
20. Miller, S. D., C. L. Vanderlugt, W. S. Begolka, W. Pao, R. L. Yauch, K. L. Neville, Y. Katz-Levy, A. Carrizosa, and B. S. Kim. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* 3: 1133-1136.
21. Salvetti, M., G. Giovannoni, and F. Aloisi. 2009. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 22: 201-206.
22. Kukreja, A., and N. K. Maclaren. 1999. Autoimmunity and diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84: 4371-4378.
23. Ortonne, J. P. 1999. Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 140 Suppl 54: 1-7.
24. Jacobson, D. L., S. J. Gange, N. R. Rose, and N. M. Graham. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84: 223-243.
25. Galea, I., I. Bechmann, and V. H. Perry. 2007. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28: 12-18.
26. Byrnes, A. P., R. E. MacLaren, and H. M. Charlton. 1996. Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure

- to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination. *J. Neurosci.* 16: 3045-3055.
27. BILLINGHAM, R. E., and T. BOSWELL. 1953. Studies on the problem of corneal homografts. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 141: 392-406.
 28. Shrestha, R., O. Millington, J. Brewer, and T. Bushell. 2013. Is central nervous system an immune-privileged site? *Kathmandu. Univ Med. J. (KUMJ.)* 11: 102-107.
 29. Goverman, J. 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 393-407.
 30. Ransohoff, R. M., and B. Engelhardt. 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 623-635.
 31. Hohlfeld, R., M. Kerschensteiner, and E. Meinl. 2007. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology* 68: S58-S63.
 32. Kerschensteiner, M., C. Stadelmann, G. Dechant, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann. Neurol.* 53: 292-304.
 33. Amor, S., F. Puentes, D. Baker, and d. van, V. 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129: 154-169.
 34. Kerschensteiner, M., E. Meinl, and R. Hohlfeld. 2009. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158: 1122-1132.
 35. Trapp, B. D., and K. A. Nave. 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu. Rev. Neurosci.* 31: 247-269.
 36. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 683-747.
 37. Ramagopalan, S. V., J. C. Knight, and G. C. Ebers. 2009. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr. Opin. Neurol.* 22: 219-225.
 38. Hafler, D. A., A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg, and S. L. Hauser. 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 357: 851-862.
 39. Hohlfeld, R., and H. Wekerle. 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 Suppl 2: 14599-14606.
 40. Pender, M. P., and J. M. Greer. 2007. Immunology of multiple sclerosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7: 285-292.
 41. Steinman, L., and S. Zamvil. 2003. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 483-492.

42. Franklin, R. J., and C. Ffrench-Constant. 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 839-855.
43. Stys, P. K., G. W. Zamponi, M. J. van, and J. J. Geurts. 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 507-514.
44. Mix, E., H. Meyer-Rienecker, H. P. Hartung, and U. K. Zettl. 2010. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog. Neurobiol.* 92: 386-404.
45. Ransohoff, R. M. 2012. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat. Neurosci.* 15: 1074-1077.
46. Goverman, J., A. Perchellet, and E. S. Huseby. 2005. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 4: 239-245.
47. Huseby, E. S., C. Ohlen, and J. Goverman. 1999. Cutting edge: myelin basic protein-specific cytotoxic T cell tolerance is maintained in vivo by a single dominant epitope in H-2k mice. *J. Immunol.* 163: 1115-1118.
48. Ercolini, A. M., and S. D. Miller. 2006. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. *J. Immunol.* 176: 3293-3298.
49. Attfield, K. E., and L. Fugger. 2013. TCR transgenic mice that shed light on immune and environmental regulators in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 190: 3015-3017.
50. Gold, R., C. Linington, and H. Lassmann. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129: 1953-1971.
51. Lassmann, H. 2007. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* 163: 651-655.
52. Rivers, T. M., and F. F. Schwentker. 1935. ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS. *J. Exp. Med.* 61: 689-702.
53. Kabat, E. A., A. Wolf, and A. E. Bezer. 1947. THE RAPID PRODUCTION OF ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN RHESUS MONKEYS BY INJECTION OF HETEROLOGOUS AND HOMOLOGOUS BRAIN TISSUE WITH ADJUVANTS. *J. Exp. Med.* 85: 117-130.
54. FREUND, J., M. M. LIPTON, and L. R. MORRISON. 1950. Demyelination in the guinea pig in chronic allergic encephalomyelitis produced by injecting guinea pig brain in oil emulsion containing a variant of mycobacterium butyricum. *Arch. Pathol. (Chic.)* 50: 108-121.
55. Lassmann, H. 1983. Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Schriftenr. Neurol.* 25: 1-135.
56. Stromnes, I. M., and J. M. Goverman. 2006. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.* 1: 1810-1819.

57. Racke, M. K., W. Hu, and A. E. Lovett-Racke. 2005. PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. *Trends Immunol.* 26: 289-291.
58. Hemmer, B., J. J. Archelos, and H. P. Hartung. 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 291-301.
59. PATERSON, P. Y. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.* 111: 119-136.
60. Jager, A., V. Dardalhon, R. A. Sobel, E. Bettelli, and V. K. Kuchroo. 2009. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* 183: 7169-7177.
61. Steinman, L., and S. S. Zamvil. 2005. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol.* 26: 565-571.
62. Stromnes, I. M., and J. M. Goverman. 2006. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.* 1: 1952-1960.
63. Haghikia, A., R. Hohlfeld, R. Gold, and L. Fugger. 2013. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol. Med.* 19: 309-319.
64. DeAngelis, T., and F. Lublin. 2008. Neurotherapeutics in multiple sclerosis: novel agents and emerging treatment strategies. *Mt. Sinai J. Med.* 75: 157-167.
65. Aharoni, R., D. Teitelbaum, R. Arnon, and M. Sela. 1999. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 634-639.
66. Aharoni, R., B. Kayhan, R. Eilam, M. Sela, and R. Arnon. 2003. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 14157-14162.
67. Arnon, R., and R. Aharoni. 2009. Neuroprotection and neurogeneration in MS and its animal model EAE effected by glatiramer acetate. *J. Neural Transm.* 116: 1443-1449.
68. Wiendl, H., and R. Hohlfeld. 2009. Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. *Neurology* 72: 1008-1015.
69. Ryu, C. H., K. Y. Park, Y. Hou, C. H. Jeong, S. M. Kim, and S. S. Jeun. 2013. Gene therapy of multiple sclerosis using interferon beta-secreting human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed. Res. Int.* 2013: 696738.
70. ISAACS, A., and J. LINDENMANN. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 147: 258-267.
71. Pestka, S. 2007. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J. Biol. Chem.* 282: 20047-20051.

72. Borden, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster, and G. R. Stark. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 975-990.
73. Plataniias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 375-386.
74. Hervas-Stubbs, S., J. L. Perez-Gracia, A. Rouzaut, M. F. Sanmamed, B. A. Le, and I. Melero. 2011. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin. Cancer Res.* 17: 2619-2627.
75. Jaitin, D. A., L. C. Roisman, E. Jaks, M. Gavutis, J. Piehler, J. Van der Heyden, G. Uze, and G. Schreiber. 2006. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Mol. Cell Biol.* 26: 1888-1897.
76. Jaks, E., M. Gavutis, G. Uze, J. Martal, and J. Piehler. 2007. Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J. Mol. Biol.* 366: 525-539.
77. Kalie, E., D. A. Jaitin, Y. Podoplelova, J. Piehler, and G. Schreiber. 2008. The stability of the ternary interferon-receptor complex rather than the affinity to the individual subunits dictates differential biological activities. *J. Biol. Chem.* 283: 32925-32936.
78. Severa, M., M. E. Remoli, E. Giacomini, J. Ragimbeau, R. Lande, G. Uze, S. Pellegrini, and E. M. Coccia. 2006. Differential responsiveness to IFN-alpha and IFN-beta of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J. Leukoc. Biol.* 79: 1286-1294.
79. Uze, G., G. Schreiber, J. Piehler, and S. Pellegrini. 2007. The receptor of the type I interferon family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316: 71-95.
80. Ivashkiv, L. B., and L. T. Donlin. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 36-49.
81. Claudinon, J., M. N. Monier, and C. Lamaze. 2007. Interfering with interferon receptor sorting and trafficking: impact on signaling. *Biochimie* 89: 735-743.
82. Payelle-Brogard, B., and S. Pellegrini. 2010. Biochemical monitoring of the early endocytic traffic of the type I interferon receptor. *J. Interferon Cytokine Res.* 30: 89-98.
83. Liu, J., A. Plotnikov, A. Banerjee, K. G. Suresh Kumar, J. Ragimbeau, Z. Marijanovic, D. P. Baker, S. Pellegrini, and S. Y. Fuchs. 2008. Ligand-independent pathway that controls stability of interferon alpha receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 388-393.
84. Fuchs, S. Y. 2013. Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J. Interferon Cytokine Res.* 33: 211-225.
85. Malakhova, O. A., K. I. Kim, J. K. Luo, W. Zou, K. G. Kumar, S. Y. Fuchs, K. Shuai, and D. E. Zhang. 2006. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J.* 25: 2358-2367.

86. Gracias, D. T., E. Stelekati, J. L. Hope, A. C. Boesteanu, T. A. Doering, J. Norton, Y. M. Mueller, J. A. Fraietta, E. J. Wherry, M. Turner, and P. D. Katsikis. 2013. The microRNA miR-155 controls CD8(+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nat. Immunol.* 14: 593-602.
87. Gough, D. J., N. L. Messina, C. J. Clarke, R. W. Johnstone, and D. E. Levy. 2012. Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity.* 36: 166-174.
88. Naves, R., S. P. Singh, K. S. Cashman, A. L. Rowse, R. C. Axtell, L. Steinman, J. D. Mountz, C. Steele, S. P. De, and C. Raman. 2013. The interdependent, overlapping, and differential roles of type I and II IFNs in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 191: 2967-2977.
89. Trinchieri, G. 2010. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* 207: 2053-2063.
90. Gresser, I. 1990. Biologic effects of interferons. *J. Invest Dermatol.* 95: 66S-71S.
91. Dondi, E., L. Rogge, G. Lutfalla, G. Uze, and S. Pellegrini. 2003. Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation. *J. Immunol.* 170: 749-756.
92. Hertzog, P. J. 2012. Overview. Type I interferons as primers, activators and inhibitors of innate and adaptive immune responses. *Immunol. Cell Biol.* 90: 471-473.
93. Gonzalez-Navajas, J. M., J. Lee, M. David, and E. Raz. 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 125-135.
94. Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185: 1101-1111.
95. Biron, C. A. 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity.* 14: 661-664.
96. Tovey, M. G., C. Lallemand, J. F. Meritet, and C. Maury. 2006. Adjuvant activity of interferon alpha: mechanism(s) of action. *Vaccine* 24 Suppl 2: S2-S7.
97. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell. 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J. Exp. Med.* 189: 521-530.
98. 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: 591-599.
99. Selleri, C., T. Sato, V. L. Del, L. Luciano, A. J. Barrett, B. Rotoli, N. S. Young, and J. P. Maciejewski. 1997. Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 89: 957-964.
100. Zietara, N., M. Lyszkiewicz, N. Gekara, J. Puchalka, V. A. Dos Santos, C. R. Hunt, T. K. Pandita, S. Lienenklaus, and S. Weiss. 2009. Absence of IFN-beta impairs

- antigen presentation capacity of splenic dendritic cells via down-regulation of heat shock protein 70. *J. Immunol.* 183: 1099-1109.
101. Tough, D. F. 2012. Modulation of T-cell function by type I interferon. *Immunol. Cell Biol.* 90: 492-497.
 102. Deonarain, R., A. Verma, A. C. Porter, D. R. Gewert, L. C. Plataniias, and E. N. Fish. 2003. Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 13453-13458.
 103. Le, B. A., V. Durand, E. Kamphuis, C. Thompson, S. Bulfone-Paus, C. Rossmann, U. Kalinke, and D. F. Tough. 2006. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J. Immunol.* 176: 4682-4689.
 104. Feld, J. J., G. A. Lutchman, T. Heller, K. Hara, J. K. Pfeiffer, R. D. Leff, C. Meek, M. Rivera, M. Ko, C. Koh, Y. Rotman, M. G. Ghany, V. Haynes-Williams, A. U. Neumann, T. J. Liang, and J. H. Hoofnagle. 2010. Ribavirin improves early responses to peginterferon through improved interferon signaling. *Gastroenterology* 139: 154-162.
 105. Simonsson, B., H. Hjorth-Hansen, O. W. Bjerrum, and K. Porkka. 2011. Interferon alpha for treatment of chronic myeloid leukemia. *Curr. Drug Targets* 12: 420-428.
 106. Mandelli, F., G. Avvisati, S. Amadori, M. Boccadoro, A. Gernone, V. M. Lauta, F. Marmont, M. T. Petrucci, M. Tribalto, M. L. Vegna, and . 1990. Maintenance treatment with recombinant interferon alfa-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 322: 1430-1434.
 107. Escudier, B., A. Pluzanska, P. Koralewski, A. Ravaud, S. Bracarda, C. Szczylik, C. Chevreau, M. Filipek, B. Melichar, E. Bajetta, V. Gorbunova, J. O. Bay, I. Bodrogi, A. Jagiello-Gruszfeld, and N. Moore. 2007. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 370: 2103-2111.
 108. Ascierto, P. A., and J. M. Kirkwood. 2008. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J. Transl. Med.* 6: 62.
 109. Sikora, A. G., N. Jaffarzad, Y. Hailemichael, A. Gelbard, S. W. Stonier, K. S. Schluns, L. Frasca, Y. Lou, C. Liu, H. A. Andersson, P. Hwu, and W. W. Overwijk. 2009. IFN-alpha enhances peptide vaccine-induced CD8+ T cell numbers, effector function, and antitumor activity. *J. Immunol.* 182: 7398-7407.
 110. Teijaro, J. R., C. Ng, A. M. Lee, B. M. Sullivan, K. C. Sheehan, M. Welch, R. D. Schreiber, J. C. de la Torre, and M. B. Oldstone. 2013. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340: 207-211.
 111. Wilson, E. B., D. H. Yamada, H. Elsaesser, J. Herskovitz, J. Deng, G. Cheng, B. J. Aronow, C. L. Karp, and D. G. Brooks. 2013. Blockade of chronic type I

- interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340: 202-207.
112. Odorizzi, P. M., and E. J. Wherry. 2013. Immunology. An interferon paradox. *Science* 340: 155-156.
 113. Rauch, I., E. Hainzl, F. Rosebrock, S. Heider, C. Schwab, D. Berry, D. Stoiber, M. Wagner, C. Schleper, A. Loy, T. Urich, M. Muller, B. Strobl, L. Kenner, and T. Decker. 2014. Type I interferons have opposing effects during the emergence and recovery phases of colitis. *Eur. J. Immunol.* 44: 2749-2760.
 114. Yamazaki, M., A. Sato, T. Takeda, and M. Komatsu. 2010. Distinct clinical courses in type 1 diabetes mellitus induced by peg-interferon-alpha treatment for chronic hepatitis C. *Intern. Med.* 49: 403-407.
 115. Hoftberger, R., F. Garzuly, H. P. Dienes, J. Grubits, B. Rohonyi, G. Fischer, Z. Hanzely, H. Lassmann, and H. Budka. 2007. Fulminant central nervous system demyelination associated with interferon-alpha therapy and hepatitis C virus infection. *Mult. Scler.* 13: 1100-1106.
 116. 2001. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 57: S3-S9.
 117. de, A. C., C. Aristimuno, L. H. de, V, M. L. Martinez-Gines, M. Bartolome, R. Arroyo, J. Navarro, S. Gimenez-Roldan, E. Fernandez-Cruz, and S. Sanchez-Ramon. 2007. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 182: 204-211.
 118. Warabi, Y., Y. Matsumoto, and H. Hayashi. 2007. Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination. *J. Neurol. Sci.* 252: 57-61.
 119. Hegen, H., M. Schleiser, C. Gneiss, P. F. Di, R. Ehling, B. Kuenz, A. Lutterotti, T. Berger, and F. Deisenhammer. 2012. Persistency of neutralizing antibodies depends on titer and interferon-beta preparation. *Mult. Scler.* 18: 610-615.
 120. Axtell, R. C., C. Raman, and L. Steinman. 2013. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 44: 114-120.
 121. Comabella, M., J. D. Lunemann, J. Rio, A. Sanchez, C. Lopez, E. Julia, M. Fernandez, L. Nonell, M. Camina-Tato, F. Deisenhammer, E. Caballero, M. T. Tortola, M. Prinz, X. Montalban, and R. Martin. 2009. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 132: 3353-3365.
 122. Hartung, H. P., L. Steinman, D. S. Goodin, G. Comi, S. Cook, M. Filippi, P. O'Connor, D. R. Jeffery, L. Kappos, R. Axtell, V. Knappertz, T. Bogumil, S. Schwenke, E. Croze, R. Sandbrink, and C. Pohl. 2013. Interleukin 17F level and

- interferon beta response in patients with multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 70: 1017-1021.
123. Bushnell, S. E., Z. Zhao, C. C. Stebbins, D. Cadavid, A. M. Buko, E. T. Whalley, J. A. Davis, E. M. Versage, J. R. Richert, R. C. Axtell, L. Steinman, and R. Medori. 2012. Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFNbeta-1a in relapsing-remitting MS. *Neurology* 79: 531-537.
 124. Bustamante, M. F., J. Rio, Z. Castro, A. Sanchez, X. Montalban, and M. Comabella. 2013. Cellular immune responses in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Clin. Exp. Immunol.* 171: 243-246.
 125. Wekerle, H., and R. Hohlfeld. 2010. Molecular oracles for multiple sclerosis therapy. *Nat. Med.* 16: 376-377.
 126. Axtell, R. C., B. A. de Jong, K. Boniface, L. F. van der Voort, R. Bhat, S. P. De, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J. G. Castellanos, R. Mair, A. Christakos, I. Kolkowitz, L. Katz, J. Killestein, C. H. Polman, M. R. de Waal, L. Steinman, and C. Raman. 2010. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat. Med.* 16: 406-412.
 127. Dimisianos, N., M. Rodi, D. Kalavrizioti, V. Georgiou, P. Papathanasopoulos, and A. Mouzaki. 2014. Cytokines as Biomarkers of Treatment Response to IFN beta in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. Int.* 2014: 436764.
 128. Graber, J. J., and S. Dhib-Jalbut. 2014. Biomarkers of interferon Beta therapy in multiple sclerosis. *J. Interferon Cytokine Res.* 34: 600-604.
 129. Zheng, J., H. Jia, and Y. Zheng. 2014. Knockout of leucine aminopeptidase in *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *Int. J. Parasitol.*
 130. Galligan, C. L., L. M. Pennell, T. T. Murooka, E. Baig, B. Majchrzak-Kita, R. Rahbar, and E. N. Fish. 2010. Interferon-beta is a key regulator of proinflammatory events in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult. Scler.* 16: 1458-1473.
 131. Guo, B., E. Y. Chang, and G. Cheng. 2008. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J. Clin. Invest* 118: 1680-1690.
 132. Prinz, M., H. Schmidt, A. Mildner, K. P. Knobloch, U. K. Hanisch, J. Raasch, D. Merkler, C. Detje, I. Gutcher, J. Mages, R. Lang, R. Martin, R. Gold, B. Becher, W. Bruck, and U. Kalinke. 2008. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity.* 28: 675-686.
 133. Teige, I., A. Treschow, A. Teige, R. Mattsson, V. Navikas, T. Leanderson, R. Holmdahl, and S. Issazadeh-Navikas. 2003. IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 170: 4776-4784.
 134. Harari, D., R. Abramovich, A. Zozulya, P. Smith, S. Pouly, M. Koster, H. Hauser, and G. Schreiber. 2014. Bridging the species divide: transgenic mice humanized for type-I interferon response. *PLoS. One.* 9: e84259.

135. Aichele, P., H. Unsoeld, M. Koschella, O. Schweier, U. Kalinke, and S. Vucikuj. 2006. CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J. Immunol.* 176: 4525-4529.
136. Muller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918-1921.
137. Bettelli, E., M. Pagany, H. L. Weiner, C. Linington, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* 197: 1073-1081.
138. Baker, D., and S. Amor. 2012. Publication guidelines for refereeing and reporting on animal use in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 242: 78-83.
139. Zhumabekov, T., P. Corbella, M. Tolaini, and D. Kioussis. 1995. Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J. Immunol. Methods* 185: 133-140.
140. Haurogne, K., J. M. Bach, and B. Lieubeau. 2007. Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis. *Transgenic Res.* 16: 127-131.
141. Nicolussi, E. M., S. Huck, H. Lassmann, and M. Bradl. 2009. The cholinergic anti-inflammatory system limits T cell infiltration into the neurodegenerative CNS, but cannot counteract complex CNS inflammation. *Neurobiol. Dis.* 35: 24-31.
142. Rangachari, M., and V. K. Kuchroo. 2013. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J. Autoimmun.* 45: 31-39.
143. Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy, and K. H. Mills. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* 162: 1-11.
144. Glatigny, S., R. Duhon, M. Oukka, and E. Bettelli. 2011. Cutting edge: loss of alpha4 integrin expression differentially affects the homing of Th1 and Th17 cells. *J. Immunol.* 187: 6176-6179.
145. Kuerten, S., and P. V. Lehmann. 2011. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J. Interferon Cytokine Res.* 31: 907-916.
146. Targoni, O. S., J. Baus, H. H. Hofstetter, M. D. Hesse, A. Y. Karulin, B. O. Boehm, T. G. Forsthuber, and P. V. Lehmann. 2001. Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 166: 4757-4764.

147. Zozulya, A. L., and H. Wiendl. 2008. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4: 384-398.
148. Korporal, M., J. Haas, B. Balint, B. Fritzsching, A. Schwarz, S. Moeller, B. Fritz, E. Suri-Payer, and B. Wildemann. 2008. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch. Neurol.* 65: 1434-1439.
149. Shinohara, M. L., J. H. Kim, V. A. Garcia, and H. Cantor. 2008. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity.* 29: 68-78.
150. Wang, C., C. Wang, H. Dong, X. M. Wu, C. Wang, F. Xia, G. Li, X. Jia, S. He, X. Jiang, H. Li, and H. Xu. 2013. Immune-related GTPase Irgm1 exacerbates experimental auto-immune encephalomyelitis by promoting the disruption of blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier. *Mol. Immunol.* 53: 43-51.
151. Xu, H., Z. Y. Wu, F. Fang, L. Guo, D. Chen, J. X. Chen, D. Stern, G. A. Taylor, H. Jiang, and S. S. Yan. 2010. Genetic deficiency of Irgm1 (LRG-47) suppresses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting apoptosis of activated CD4+ T cells. *FASEB J.* 24: 1583-1592.
152. Chakrabarty, A., M. M. Danley, and S. M. LeVine. 2004. Immunohistochemical localization of phosphorylated protein kinase R and phosphorylated eukaryotic initiation factor-2 alpha in the central nervous system of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 76: 822-833.
153. Nakayama, Y., E. H. Plisch, J. Sullivan, C. Thomas, C. J. Czuprynski, B. R. Williams, and M. Suresh. 2010. Role of PKR and Type I IFNs in viral control during primary and secondary infection. *PLoS. Pathog.* 6: e1000966.
154. Geserick, P., F. Kaiser, U. Klemm, S. H. Kaufmann, and J. Zerrahn. 2004. Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *Int. Immunol.* 16: 1535-1548.
155. Mavrommatis, E., E. N. Fish, and L. C. Platanias. 2013. The schlafen family of proteins and their regulation by interferons. *J. Interferon Cytokine Res.* 33: 206-210.
156. Stoecker, K., K. Weigelt, S. Ebert, M. Karlstetter, Y. Walczak, and T. Langmann. 2009. Induction of STAP-1 promotes neurotoxic activation of microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 121-126.
157. Durelli, L., L. Conti, M. Clerico, D. Boselli, G. Contessa, P. Ripellino, B. Ferrero, P. Eid, and F. Novelli. 2009. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.* 65: 499-509.
158. Ramgolam, V. S., Y. Sha, J. Jin, X. Zhang, and S. Markovic-Plese. 2009. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J. Immunol.* 183: 5418-5427.
159. Martin-Saavedra, F. M., C. Gonzalez-Garcia, B. Bravo, and S. Ballester. 2008. Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4+ cells through the

- boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. *Mol. Immunol.* 45: 4008-4019.
160. Liston, A., R. E. Kohler, S. Townley, S. Haylock-Jacobs, I. Comerford, A. C. Caon, J. Webster, J. M. Harrison, J. Swann, I. Clark-Lewis, H. Korner, and S. R. McColl. 2009. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J. Immunol.* 182: 3121-3130.
 161. Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10: 514-523.
 162. Yamazaki, T., X. O. Yang, Y. Chung, A. Fukunaga, R. Nurieva, B. Pappu, N. Martin-Orozco, H. S. Kang, L. Ma, A. D. Panopoulos, S. Craig, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2008. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 181: 8391-8401.
 163. Hesse, D., M. Krakauer, H. Lund, H. B. Sondergaard, S. J. Limborg, P. S. Sorensen, and F. Sellebjerg. 2011. Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon-beta in multiple sclerosis? *Eur. J. Neurol.* 18: 266-272.
 164. Zhang, L., S. Yuan, G. Cheng, and B. Guo. 2011. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS. One.* 6: e28432.
 165. Kennedy, M. K., D. S. Torrance, K. S. Picha, and K. M. Mohler. 1992. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J. Immunol.* 149: 2496-2505.
 166. Renno, T., J. Y. Lin, C. Piccirillo, J. Antel, and T. Owens. 1994. Cytokine production by cells in cerebrospinal fluid during experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *J. Neuroimmunol.* 49: 1-7.
 167. Steinman, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13: 139-145.
 168. Hamann, J., H. Fiebig, and M. Strauss. 1993. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J. Immunol.* 150: 4920-4927.
 169. Teige, I., Y. Liu, and S. Issazadeh-Navikas. 2006. IFN-beta inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs. *J. Immunol.* 177: 3542-3553.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. Ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια

i. Cellular and Cytokine Interactions in Health and Disease, 2009, Lisbon, Portugal

A TRANSGENIC ANIMAL MODEL FOR THE INVESTIGATION OF THE ROLE OF TYPE I INTERFERONS IN T LYMPHOCYTE BIOLOGY.

Nadia Kavrochorianou^{1,4}, Maria Evangelidou², Michael Tovey³, George Thyphronitis⁴, Sylva Haralambous¹, ¹Laboratory of Transgenic Technology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, ²Laboratory of Molecular Genetics, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, ³Laboratory of Viral Oncology, CNRS, Institut Andre Lwoff, Villejuif, France, ⁴Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Type I interferons (IFNs) exhibit a wide range of biological activities and are major immunomodulators acting on virtually all immune cells. Among them, IFN α/β is already used for the treatment of diverse diseases including cancers, virus infections, multiple sclerosis, and are proposed as an immune adjuvant in vaccine protocols. How the therapeutic activity of type I IFNs relates to their effects on different cell types remains, however, largely unknown. Therefore animal models with tissue specific sensitivity to IFN α/β action are important for better understanding the role of this cytokine in health and disease. Given that IFN α/β modulates various T cell activities, we generated transgenic mice with tissue-specific expression of the α subunit of IFN α/β receptor (IFNAR1) on T lymphocytes. The construct used for pronuclear microinjection included murine ifnar1, under the control of human CD2 promoter. Three out of seven generated transgenic mice were selected for specific expression of the transgene and backcrossed with IFNAR1 deficient mice. The resultant IFNAR1^{-/-}T^{+/-} mice were analyzed at transcriptional, translational and functional level. Transcripts of IFNAR1 were found to be present only in lymphoid organs. Additionally, the phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (pSTAT1) protein levels were measured in vitro, as a dominant downstream molecule in IFN α/β signaling pathway, and in all three lines pSTAT1 was exclusively expressed on T lymphocytes. Furthermore, blocking IFNAR1 with the use of monoclonal neutralizing antibody prevented T cells from responding to administration of exogenous IFN α/β , as pSTAT1 levels were undetectable. The results show that our transgenic mice exhibit functional tissue-specific IFNAR1, able to transmit signals from the microenvironment. This transgenic mouse system is a promising model for dissecting the mechanisms through which type I IFNs affect T lymphocytes activities in cancer, viral infections and autoimmune diseases.

ii. 9th Transgenic Technology Meeting, TT2010, ISTT, 2010, Berlin, Germany
Lymphoid tissue-specific overexpression of IFNAR1 in mice for the evaluation of the role of IFN α / β

Nadia Kavrochorianou^{1,2}, Maria Evangelidou², Michael Tovey³, George Thyphronitis⁴ and Sylva Haralambous¹

¹Laboratory of Transgenic Technology

²Laboratory of Molecular Genetics, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

³Laboratory of Viral Oncology, CNRS, Institut Andre Lwoff, Villejuif, France

⁴Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Interferon alpha/beta (IFN α / β) belongs to type I interferons (IFNs), a large cytokine family with diverse activities. All type I IFNs bind to the same heterodimeric receptor (IFNAR) consisting of two subunits (IFNAR1 and IFNAR2), that are coexpressed on all nucleated cells. IFNAR is coupled to the JAK/STAT signal transduction machinery which, after ligand binding, transcriptionally regulates a panel of genes that mediate the pleiotropic effects of IFNs including their immunomodulatory activities. Since IFN α / β is already used for the treatment of diverse diseases, such as multiple sclerosis (MS) and cancer, it is important to further elucidate the mechanisms that mediate the essential *in vivo* role of IFNAR during immune responses. Recent *in vitro* and *in vivo* studies have shown strong evidence for a protective role of IFNAR1 in tumor and MS development. Given the importance of IFNAR1 and the key role of T lymphocytes in immune responses, in this study we focus on the investigation of the role of IFN α / β on these cells. We generated a transgenic mouse model with tissue-specific expression of IFNAR1 on T lymphocytes. cDNA of murine *ifnar1*, under the control of human *cd2* promoter, which drives gene expression specifically on T lymphocytes, was used for pronuclear microinjection. Three out of seven generated transgenic mice were selected for specific expression of the transgene and backcrossed with IFNAR1 deficient mice. The resultant IFNAR1^{-/-}T^{+/-} mice were analyzed at transcriptional, translational and functional level. Transcripts of IFNAR1 were found to be present only in lymphoid organs. Additionally, the dominant downstream molecule in IFN α / β signaling pathway, phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (pSTAT1), as well as interferon stimulated gene products (ISG15), in all three lines was exclusively expressed in T cells. The expression levels of these molecules were undetectable when IFNAR1 was neutralized using a specific monoclonal antibody. All these results show that our transgenic mice exhibit functional lymphoid tissue-specific IFNAR1, able to transmit signals from the microenvironment. This transgenic mouse system is a promising model for dissecting the mechanisms through which type I IFNs affect T lymphocytes activities. We currently use this system to study disease development in a cancer model, B16-induced melanoma and a model for MS, MOG35-55-induced EAE.

iii. 9th joint meeting of ICS/ISICR, Cytokines and Interferons: from the bench to the bedside, 2011, Florence, Italy

THE ROLE OF TYPE I INTERFERON SIGNALING VIA T CELLS IN THE EARLY PHASE OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE)

Nadia Kavrochorianou^{1,4}, Maria Evangelidou², Michael Tovey³, George Thyphronitis⁴ and Sylva Haralambous¹

¹Laboratory of Transgenic Technology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece,

²Laboratory of Molecular Genetics, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece,

³Laboratory of Biotechnology and Applied Pharmacology, CNRS UMR8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France,

⁴Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Although interferon beta (IFN β) is used widely as first-line treatment for multiple sclerosis (MS), only a subset of patients responds to treatment. Exogenous IFN β has a complex role in MS, due to the differential levels of endogenous type I IFNs and IFN-induced gene expression in responders and non-responders. The role of endogenous versus exogenous IFN β in the periphery and the central nervous system (CNS) remains enigmatic with often contradictory results. MS is a T cell-mediated autoimmune disease and it has been shown recently that, different subpopulations of T helper cells may differentially determine the efficacy of IFN β treatment in MS. The generation of transgenic mice, that express α subunit of the type I IFNs receptor (IFNAR1) exclusively on T lymphocytes, enables the effect of endogenous type I IFNs on T cells during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, to be investigated for the first time. The mean disease onset of MOG-induced EAE in the transgenic TgIFNAR1^{-/-}T^{+/-} mice is significantly delayed compared to both wild-type (WT) and IFNAR1 knockout (IFNAR1^{-/-}) mice, and the severity of EAE in the acute phase is also reduced. To explore this phenomenon further, we studied the role of T cells from these mice during the early phase of EAE, both in the periphery and the CNS. Peripheral T cells from WT, IFNAR1^{-/-} and TgIFNAR1^{-/-}T^{+/-} mice, re-stimulated with MOG in vitro, showed no differences in their proliferative capacity, whether or not they respond to type I IFNs. In addition, no significant differences were found in the population of peripheral T cells producing pro- and anti-inflammatory cytokines, in either case of diseased mice. The next step is to study these events in the CNS and in particular to determine the cytokine levels produced by encephalitogenic T cells in the CNS, as well as to analyze CNS histopathology, including demyelination, neurodegeneration and blood brain barrier (BBB) disruption. Our future goal is to study the effect of exogenous IFN β on the clinical outcome of the EAE in our transgenic mice, and the correlation with the observed beneficial effect of endogenous IFN β .

iv. 10th joint meeting of ICS/ISICR, Cytokines and Interferons, 2012, Geneva, Switzerland

THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF TYPE I INTERFERON SIGNALING IN T CELLS DURING THE ONSET OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE)

Nadia Kavrochorianou^{1,4}, Maria Evangelidou², Michael Tovey³, George Thyphronitis⁴ and Sylva Haralambous¹

¹Laboratory of Transgenic Technology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece,

²Laboratory of Molecular Genetics, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece,

³Laboratory of Biotechnology and Applied Pharmacology, CNRS UMR8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France,

⁴Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Introduction: Interferon beta (IFN β) is a widely used treatment for multiple sclerosis (MS) although not always successful. One possible explanation is the action of endogenous versus exogenous IFN β which remains enigmatic with often contradictory results. During experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an established induced animal model of MS, neuroantigen-specific T cells exist in the periphery before the clinical signs of the disease. Our present objective is to study how IFN β signaling in peripheral T cells affects the outcome of EAE.

Methods: To investigate the effect of type I IFNs on T cells during EAE, transgenic mice, that express functional type I IFN receptor (IFNAR1) exclusively on T lymphocytes, were generated. Wild-type (WT), IFNAR1 knockout (IFNAR1^{-/-}) and transgenic (TgIFNAR1^{-/-}T^{+/-}) mice were immunized with MOG35-55 peptide, to induce EAE. Clinical score was monitored and cytokine production by T cells in the periphery and the CNS was measured using flow cytometry in early phase of EAE. Additionally, spinal cord sections were assessed for inflammation, demyelination and axonal damage. To determine significant differences in clinical scores between study groups, the Mann-Whitney U test was performed.

Results: Transgenic mice exhibited a delayed onset and a milder progression of acute phase of EAE, as compared to WT and IFNAR1^{-/-} mice. No significant differences were detected in the proliferative capacity and the frequency of IL-17, IFN γ - or IL-10 producing T cells in spleen and draining lymph nodes, in either case of mice on day 17 of EAE. Moreover, no cells were detected within the CNS of TgIFNAR1^{-/-}T^{+/-} mice, which was in accordance with their clinical score.

However, IL-17 and IFN γ producing CD4⁺ cells were present in the spinal cord of WT and IFNAR1^{-/-} mice. Spinal cord sections from all groups showed lesions characteristic of EAE, although TgIFNAR1^{-/-}T^{+/-} mice showed lower extent of pathology compared to IFNAR1^{-/-}, but similar to that of WT mice, with a lower degree of inflammation and neuronal degeneration.

Conclusion: These results indicate a protective role of endogenously produced type I IFNs in EAE, when signaling is T cell restricted. This role seems not to be attributed either to pro- or anti-inflammatory cytokine profile of T cells in the periphery.

To investigate this phenomenon further, we study the immunological response in the periphery, at the pre-onset of EAE, when T effector cells are already present, highly inflammatory. Our future goal is first to investigate whether the observed beneficial effect of endogenous IFN β on the development of the disease, in our transgenic mice, is modulated when they are treated with IFN β , and then to explore possible differentiation of cytokine signature and immune responses at the pre onset of EAE. Thus, there will be evidence about contingent interaction between endogenous and exogenous IFN β before clinical onset of the pathology.

v. 1st meeting of ICIS, Cytokines: From Molecular Mechanisms to Human Disease, 2013, San Francisco, USA

A BENEFICIAL EFFECT OF TYPE I INTERFERON SIGNALING IN T CELLS IN THE EARLY PHASE OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE)

Nadia Kavrochorianou^{1,2}, Melina Markogiannaki^{1,2}, George Thyphronitis², Sylva Haralambous¹

¹Laboratory of Transgenic Technology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, ²Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Although interferon beta (IFN β) is widely used as first-line treatment for multiple sclerosis (MS), the precise mechanism of action remains ill defined and the role of endogenous type I IFNs versus exogenous IFN β is enigmatic with often contradictory results. During EAE, an established animal model of MS, neuroantigen-specific T cells exist in the periphery before the clinical signs of the disease. Our present objective is to study how IFN β signaling in peripheral T cells affects the outcome of EAE. For this purpose, transgenic mice expressing functional type I IFN receptor (IFNAR1) exclusively on T lymphocytes (CD2IFNAR1^{+/-}IFNAR1^{-/-}) were generated. According to our previous results, transgenic mice exhibited delayed onset and milder progression of the acute phase of EAE, as compared to wild-type (WT) mice, along with higher frequency IFN γ - and IL-10- producing CD4⁺ cells in spleen on day 17 of EAE. Additionally, spinal cord sections from transgenic EAE mice showed lower degree of inflammation, demyelination and neuronal degeneration. To investigate this phenomenon further, we studied the immunological response in the periphery, at the pre-onset of EAE, when highly inflammatory effector T cells are already present. No differences in the cytokine profile of T cells were detected in the periphery, although the splenocytes and blood cells of the transgenic mice demonstrated lower degree of activation. In order to identify genes responsible for modulation of the disease, we currently compare the mRNA expression profile by Affymetrix microarrays in several tissues of WT and transgenic mice, during the pre-symptomatic phase of EAE. Moreover, upon exogenous IFN β administration during EAE, an enhanced beneficial effect on the clinical outcome of EAE in our transgenic mice was demonstrated, as well as in mice with MOG-specific T cells expressing IFNAR1 (our transgenic mice x MOG-specific TCR transgenic mice). Future studies in EAE development and phenotype will be performed.

II. Δημοσίευση στο *Journal of Leukocyte Biology* (minor revision)

IFNAR signaling directly modulates T lymphocytes activity resulting in milder Experimental Autoimmune Encephalomyelitis development

Nadia Kavrochorianou*, Maria Evangelidou†, Melina Markogiannaki*, Michael Tovey‡, George Thyphronitis§,¹ and Sylva Haralambous*,¹

*Inflammation Research Group, Transgenic Technology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece;

†Laboratory of Molecular Genetics, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece;

‡Laboratory of Biotechnology and Applied Pharmacology ENS Cachan, 94235, Cachan, France;

§Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110, Ioannina, Greece;

¹ These authors contributed equally to this work.

Summary sentence: A non-yet described T cell-associated protective role of endogenous IFN-I in EAE was revealed using a novel transgenic mouse expressing IFNAR exclusively on T lymphocytes

Running title: T cell restricted IFN-I signaling in EAE

Correspondence: Dr Sylva Haralambous, Inflammation Research Group, Transgenic Technology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece, Tel 0030-2106478854 and e-mail address: sharalambous@pasteur.gr, or Dr George Thyphronitis, Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece, Tel 0030-2651007123 and e-mail address: gthyfron@uoi.gr

Keywords: Cytokine receptors, T cells, EAE/MS, inflammation, transgenic mice

Abbreviations

BBB, blood brain barrier

CNS, central nervous system

EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis

IFN: interferon

IFNAR1: type I interferon receptor 1

IL: interleukin

ISG15, interferon-stimulated gene 15

MOG₃₅₋₅₅, myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 peptide

MS, multiple sclerosis

p-STAT1, phosphorylated-STAT1

PTx, pertussis toxin

Th, T helper cells

Tregs, regulatory T cells

Abstract

Although IFN- β is used as first-line therapy for multiple sclerosis (MS), the cell type-specific activity of type I IFNs in MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), remains obscure. In this study, we have elucidated the *in vivo* immunomodulatory role of IFN-I signaling in T cells during EAE using a novel transgenic mouse, designated IFNAR1^{Texcl}, carrying a *cd2-ifnar1* transgene on a IFNAR1 null genetic background, thus allowing expression of the IFNAR1 subunit and hence a functional IFN-I receptor exclusively on T cells. IFNAR1^{Texcl} mice exhibited milder EAE with reduced T cell infiltration, demyelination and axonal damage in the CNS. Importantly, IFN- β administration in IFNAR1^{Texcl} mice generated a more pronounced protective effect against EAE compared to untreated littermates. *In vivo* studies demonstrated that prior to EAE onset, endogenous IFNAR signaling in T cells led to impaired Th17 responses, with a reduced fraction of CCR6⁺ CD4⁺ T cells in the periphery. At the acute phase, an increased proportion of IL-10- and IFN- γ producing CD4⁺ T cells was detected in the periphery of IFNAR1^{Texcl} mice, accompanied by up-regulation of the IFN- γ induced gene, *Irgm1*, in peripheral T cells. Together these results reveal a hitherto unknown T cell-associated protective role of IFN-I in EAE that may provide valuable clues for designing novel therapeutic strategies for MS.

Introduction

Type I interferons (IFN-I) are widely expressed cytokines that possess strong antiviral and immunomodulatory properties (1) and under physiological conditions regulate homeostatic processes (2;3). The most well defined type I IFNs, IFN- α and IFN- β are expressed ubiquitously (4). Both IFN-I subtypes signal through a heterodimeric receptor, the IFN alpha receptor (IFNAR), composed of two subunits, IFNAR1 and IFNAR2, that are expressed in almost every cell type (5). Pathogens and other environmental stimuli cross-regulate IFNAR-induced signaling cascades, which integrate at the gene level to control the transcription of numerous IFN-stimulated genes (ISGs), which contribute to a pro- and/or anti- inflammatory outcome (5-7). Type I IFNs are used for treatment of a wide range of diseases, with IFN- β as a first-line intervention for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) (8).

MS is a demyelinating disease of the CNS with unknown etiology, traditionally considered to be an autoimmune inflammatory disorder mediated by an aberrant T cell attack against CNS elements, particularly myelin (9). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the mouse model that simulates well the immune features of the human disease; it is induced by immunization with encephalitogenic antigens derived from CNS proteins (10). The disease course of EAE can be considered to occur in two stages: a priming phase, in which autoreactive T cells are activated and expanded in the periphery, and an effector phase, in which infiltrating inflammatory cells cause CNS inflammation, demyelination and axonal damage (11). Several studies implicate Th17 and Th1 cells as the main cell subsets involved in the pathogenesis of MS and EAE, however, the contribution of each subset remains contentious (12;13). How these T cell subsets interact *in vivo* among themselves and with the other regulatory and effector T cell subsets remains to be fully elucidated (11;12;14-16). In addition, recent findings suggest that Th17 cells can switch to other T helper cell subsets depending on the cytokine environment, thereby affecting autoimmune disorders, including EAE (17-19).

Although to date no curative therapy for MS is available, treatment with IFN- β is commonly used for controlling exacerbations and progression in MS (8). Cumulative findings obtained from various *in vitro* and *in vivo* systems, indicate that IFN- β treatment generates broad immunomodulatory effects and exerts beneficial effects on

MS patients by acting on different levels of the immune response, although the precise underlying mechanisms remain uncertain (20-22). Thus, it has been reported that IFN- β increases anti-inflammatory cytokines production, such as IL-4 and IL-10, decreases proinflammatory cytokines production, such as IL-17, IL-23, osteopontin, IFN- γ and TNF- α , induces apoptosis of autoreactive T cells, decreases leukocyte migration across the blood-brain barrier (BBB), and modulates function of Tregs, while inducing expansion of naïve Treg populations (20-22). Consistent with the beneficial effect of IFN- β in MS, EAE can be suppressed by injection of recombinant IFN- β (23;24). Furthermore, the immune suppressive activity of endogenously expressed IFN- β in EAE has also been recently shown, since *Ifnb* gene deletion strongly enhances the course of EAE (24;25). However, IFN- β therapy has been proven only partially effective, since often patients do not respond to therapy, whereas IFN- β can even exacerbate clinical symptoms in some individuals (26). Interestingly, recent studies show that IFN- β is a double-edged sword in autoimmune diseases; it alleviates symptoms in conditions with Th1 bias, whereas it promotes pathology in Th17 mediated diseases (23;27). Therefore, in order to improve therapeutic approaches, it is imperative to understand the mechanisms by which IFN- β exerts its pro- and anti-inflammatory functions. In this direction, an important task is to delineate the direct *in vivo* effects of IFN-I on different cell types. This task is largely complicated by the fact that almost all cell types respond to IFN-I.

In this study, we used a newly generated transgenic mouse strain, expressing functional IFNAR selectively on T lymphocytes, in order to investigate the direct role of type I IFNs on this cell type during EAE development. We show herein that T cell targeted endogenous and exogenous type I IFN signaling is crucial for the initiation phase of EAE, resulting in delayed onset and reduced severity of the disease at the acute phase. Importantly, IFN- β administration in IFNAR1^{Texcl} mice generated a more pronounced protective effect during EAE compared to untreated littermates. This attenuated EAE course was accompanied by decreased infiltration of immune cells into the CNS, as well as reduced demyelination and axonal loss. IFNAR signaling in T cells was associated with reduced Th17 profile of peripheral T cells prior to EAE onset, and increased proportion of CD4⁺ IFN- γ ⁺ and CD4⁺ IL-10⁺ T cells at the acute

phase of EAE. Moreover, the expression of IFN- γ induced gene, *Irgm1*, was up-regulated in peripheral T cells and down-regulated in the spinal cord of IFNAR1^{Texcl} EAE mice. Collectively, these data indicate that type I IFN signaling in T cells is an important regulator of EAE development, suggesting that T cell targeted IFN- β therapy might be beneficial in MS.

Materials and methods

Generation of CD2-IFNAR1 transgenic mice in *Ifnar1*^{-/-} background

Mouse IFNAR1 (mIFNAR1) cDNA was inserted in a human *cd2* (*hcd2*) promoter cassette (provided by Dr. D. Kioussis, National Institute for Medical Research, London, U.K.) (28), containing a FLAG tag and *hcd2* locus control region (LCR). The 13.4 kb KpnI-XbaI fragment was microinjected into pronuclei of F1 (CBA/Ca0la x C57BL/60laHsd) fertilized oocytes, as previously described (29). Five transgenic lines were produced (TgIFNAR1) that transmitted the transgene in a Mendelian way. To obtain mice with specific expression of IFNAR1 in T cells (*cd2- Ifnar1*^{+/-}/*Ifnar1*^{-/-}), the transgenic mice were backcrossed to the *Ifnar1*^{-/-} C57BL/6 background for at least twelve generations (30). To identify transgenic mice, genomic DNA was amplified with primers specific for *hcd2*: forward, 5'-CCA AAG GTA AGC ATA AGA G-3' and *mifnar1*: reverse, 5'-AGA TTC GTA TGG TGT AAC TG-3'. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in the facilities of the Department of Experimental Animal Models for Biomedical Research of Hellenic Pasteur Institute (Facilities License Number: ELBIO13, ELBIO12). All animal procedures were approved by institutional animal care and use committee and licenses were issued by national authorities according to the Greek law 56/2013 in conformity with European Union guidelines.

Primary cell cultures and CD3⁺- T cell enrichment

Lymph nodes, spleens and thymi were harvested and single cell suspensions prepared by standard procedures. For studies of T cells, cell suspensions were negatively selected using mouse CD3⁺ - T cell enrichment columns (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol, achieving >90% purity of CD3⁺ T cells, as determined by flow cytometry. Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 50 mM 2-ME and antibiotics (penicillin, streptomycin).

T cell priming and proliferation assays

Isolated splenocytes and lymph node cells were stimulated in triplicates at 2×10^6 cells/ml in flat-bottom, 96-well plates coated with 0.5-2.5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 mAb (clone 145-2C11; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 mAb (clone 37.51; BD Pharmingen) for 72 h. Cells were pulsed with 1 μCi per 2×10^5 cells of [^3H] thymidine (Perkin Elmer) for the last 16 h of culture, and [^3H] thymidine incorporation was measured by liquid scintillation counting (Wallac, Turku, Finland). Alternatively, T cells were primed *in vivo* by immunizing mice s.c. with 50 μg of myelin oligodendrocyte glycoprotein₃₅₋₅₅ peptide (MOG₃₅₋₅₅; Biotrend, Germany) emulsified in CFA (Sigma-Aldrich) supplemented with 400 μg of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, Detroit, MI). Draining lymph nodes (dLNs) and spleen were collected on day 10 after immunization, and isolated cells were cultured for 72 h in 96-well plates with increasing concentrations of MOG₃₅₋₅₅. Alternatively, CD3⁺-enriched T cells were co-cultured with irradiated splenocytes in the presence of MOG₃₅₋₅₅. Cell proliferation was measured, as described above. Results are expressed as the stimulation index (ratio between radioactivity counts of cells cultured in presence of antigen (Ag) and cells cultured with medium alone). In all cases, mitogenic stimulation with concanavalin A (conA) served as internal assay control.

Qualitative and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from selected tissues with TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For qualitative RT-PCR, DNase-treated (Promega) RNA was reverse transcribed with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) and random hexamers (Roche). For the detection of transgenic *Ifnar1* mRNA, cDNA was amplified with primers specific for IFNAR1: forward, 5'-GAA GAG TGT CTT GAT GAA GA-3'; and the FLAG sequence of the transgenic cassette: reverse, 5'-GAA AAG CTG GAT ATG ATA GC-3'. The specific PCR product was 488bp. Mouse actin PCR served as control for reverse transcription. For quantitative analysis of specific gene expression, quantitative RT-PCR was performed using Quanti-Fast SYBR green RT-PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. At the end of each PCR run, melting curve analysis was performed to verify the integrity and homogeneity of

PCR products. QuantiTect Primer Assays (Qiagen) were used for *Ifnar1*, *Irgm1*, *Stap1*, *Slfn8*, *Gapdh* and *Gusb*. All reactions were performed using the LightCycler 2.0 Instrument (Roche). Gene expression levels were calculated using standard curves for each gene. These standard curves were created by plotting threshold cycle (CT) values versus the logarithm of serial diluted RNA concentrations. Least-squares methods were used for the determination of A and B values in the equation $CT = A * \log(C_{RNA}) + B$. The coefficient of determination (R^2) was greater than 0.99. Gene expression levels were normalized to the internal control genes *Gapdh* and *Gusb*.

Western blot analysis

For assessment of p-STAT1 and ISG15 expression, thymocytes were incubated with rmIFN- β (250 U/ml, PBL Assay Science) at 37°C, 5% CO₂, for the indicated time and lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X, 0.1% SDS, 1 mM NaF, 1 mM benzamidine, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, and 0.2 mM PMSF. Western blot was performed using antibodies against phospho-STAT1 (Y701, BD Transduction Laboratories) and ISG15 (Cell Signaling Technology). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, USA) were used. Antibody binding was detected using the ECL Plus Detection System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). To normalize for protein content, membranes were stripped and reprobed with a pan-actin antibody (clone C4; Chemicon International).

Flow cytometry analysis

Cell staining and flow cytometric analysis were performed according to standard procedures using a FACSCalibur (BD Biosciences). For the detection of cell surface markers, cells were stained with FITC-labeled antibodies against CD3e, CD4, CD8, CD19 and CD11b, and APC-labeled Abs against CD4 and CCR6 (BD Biosciences). For the detection of intracellular p-STAT1, splenocytes and thioglycollate-activated peritoneal macrophages were incubated with rmIFN- β (250 U/ml) for 15min. Upon staining against cell surface markers, cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature, permeabilized using ice cold methanol for 20

minutes and stained using PE-labeled anti-phospho-STAT1 Ab (Y701, clone 4a, BD Pharmingen). Cells were then washed with FACS buffer (phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 3% FBS). Tregs were labeled using Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #1 (eBioscience). Data acquisition was done with CellQuest software (BD Biosciences). For the neutralization assay, thymocytes were incubated with 3 μ g/ml anti-IFNAR1 neutralizing antibody (MAR1-5A3, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 30 min at 37°C, 5% CO₂, prior to culture with rmIFN- β (500U/ml), and p-STAT1 expression was measured by flow cytometry, as described above.

Cytokine measurements

The mouse Th1/Th2/Th17 cytokine Cytometric Bead Array kit (BD Biosciences) was used to measure cytokine levels in lymphocyte cell culture supernatants according to the manufacturer's instructions. The cytokines measured were IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-17. Data acquisition was done with a FACSCalibur cytometer and CellQuest software (BD Biosciences) and data analysis with FCAP array 3.0 software (Soft flow, Inc).

In vitro Th cell differentiation and intracellular cytokine staining

CD3⁺ - enriched T cells were cultured under nonpolarizing as well as Th1- and Th17-polarizing conditions in the presence of anti-CD3 mAb (1 μ g/ml) and anti-CD28 mAb (1 μ g/ml). Cytokines added for Th1-polarization were, IL-12 (10 ng/ml) plus anti-IL-4 (10 μ g/ml), and for Th17-polarization were, IL-6 (20 ng/ml), transforming growth factor- β (TGF- β) (10 ng/ml) (Peprotech, London, UK), IL-23 (20 ng/ml) (eBioscience) plus anti-IFN- γ (10 μ g/ml) (R&D systems). Cells were cultured for 4 days and then restimulated for 3 h with 1 μ g/ml of ionomycin and 10 ng/ml of phorbol myristate acetate, in the presence of 5 μ g/ml of brefeldin A (all purchased from Sigma-Aldrich). Cells were stained with anti-CD4-APC Ab, and then fixed with 2% PFA in PBS for 10 min at RT. After being fixed, the cells were made permeable for 20 min at RT with permeabilization buffer (PBS, 3% FBS, 0.5% w/v saponin), before staining with anti-IFN- γ , and anti-IL-17- PE-conjugated Abs (BD Biosciences).

EAE induction and evaluation and IFN- β administration

Experiments were performed in female C57BL/6 wild-type (WT), *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice of 8–12 wk of age. EAE was induced by s.c. tail base injection of 50 μ g of MOG_{35–55} dissolved in 100 μ l of saline and emulsified in 100 μ l of CFA (Sigma-Aldrich) supplemented with 400 μ g of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). Mice also received an i.p. injection of 200 ng of Pertussis toxin (PTx; Sigma-Aldrich) on days 0 and 2. In EAE experiments with IFN- β administration, mice were injected i.p. with rmIFN- β (10⁴ U/100 μ l/mouse) 16 h prior to the induction of EAE, and 16 h prior to PTx boost on day 2 (24). Control mice were injected i.p. with phosphate buffered saline (PBS). Mice were assessed daily for clinical signs according to the following scale: 0, normal; 1, limp tail; 2, hind limb weakness; 3, hind limb paralysis; 4, forelimb paralysis; and 5, moribund or dead (0.5 gradations represent intermediate scores). Moribund animals were euthanized. Mice were allowed free access to food and water (*ad libitum*) throughout the experiment.

Histopathological analysis

Mice were transcardially perfused with ice-cold 4% PFA in PBS under deep anesthesia. Spine was postfixed in the same fixative overnight at 4°C. Spinal cord was isolated and processed for standard histopathological analysis. Inflammation was visualized by hematoxylin and eosin (H&E), demyelination by Klüver-Barrera (Luxol fast blue), and axonal damage by Bielschowsky's silver staining. Immunohistochemistry was performed, as previously described (31), using rabbit anti-CD3 Ab (1/300; Biodynamics), appropriate biotinylated secondary Abs, avidin-biotin complex and 3, 3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories). Antigen retrieval was performed in 10 mM EDTA buffer (pH 8.5) for 1 h, at 95–100°C, in a household food steamer.

cDNA microarray hybridizations and analysis

For all experiments, RNA from 3–5 animals per group was pooled and investigated. Total RNA was extracted from CD3⁺ -enriched splenic T cells and homogenized spinal cords, separately from each individual animal using TRIzol (Invitrogen), according to

the manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined using Nanodrop 2000 spectrophotometer and equal amounts of RNA from animals of the same group were pooled. Hybridizations for each experimental condition were repeated twice using samples from two independent experiments. For genome-wide expression, 100 ng of total RNA was processed using the WT Expression Kit (Ambion) according to the manufacturer's recommended protocols. The resultant single-stranded cDNA was fragmented labelled and hybridized to the GeneChip Mouse Gene ST 1.0 array (Affymetrix). The arrays were washed and stained using the Affymetrix Hybridization Wash, and Stain Kit on a Model 450 Fluidics Station and scanned using Affymetrix Model 3000 scanner according to the manufacturer's instructions. Expression values were generated by using the Microarray Expression console software (Affymetrix). The hybridizations were normalized with the RMA (Robust Mult-chip Average) algorithm to obtain summary expression values for each probe set. Normalized values were imported in Excel to calculate fold change and a >1.5-fold change in gene expression was used to extract the significant data. Microarrays complied with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) and are available at ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, accession number, E-MTAB-2989). When there were discrepancies in the direction of expression between multiple probe sets, the gene was not included. Significant overrepresentation of fifth-level gene ontology terms describing "biological process" annotation (GOTERM_BP_5) was identified with the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery Web site (<http://www.david.abcc.ncifcrf.gov>).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Sigma Plot 11.0 software. Data were evaluated using non-parametric Mann Whitney rank sum test and are given as mean value \pm SEM. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Generation and characterization of transgenic mice expressing IFNAR1 exclusively on T cells

To achieve IFNAR1 signaling exclusively in T lymphocytes, we first generated transgenic mice expressing IFNAR1, under the control of the human *cd2* promoter and enhancer (28) (Fig. 1A), which were further backcrossed to IFNAR1 deficient mice (*Ifnar1*^{-/-}) and analyzed for re-expression and functionality of IFNAR1 on T cells (*cd2-ifnar1*^{+/-/ifnar1}^{-/-}). Five transgenic lines were identified and characterized; mice from all lines developed normally, with no obvious phenotypic abnormalities. Two transgenic lines, Tg9393 and Tg9446, were further analyzed, while the Tg9393 line was selected as representative in this study. Due to the exclusive expression of IFNAR1 on T cells these transgenic mice, from now on, will be referred as IFNAR1^{T_{excl}}. The architecture of lymphoid organs and the percentages of T lymphocytes and CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations in the thymus, lymph nodes (LN), and spleen were normal, as determined by histological and flow cytometry analysis, respectively (data not shown). Transcripts of *ifnar1* were detected specifically in lymphoid tissues of IFNAR1^{T_{excl}} mice, but not in brain, liver and lung (Fig. 1B). The levels of *ifnar1* mRNA expression in IFNAR1^{T_{excl}} CD3⁺- enriched T cells were found similar to that of WT, as measured by quantitative RT-PCR (Fig. 1C), while IFNAR1 was detected specifically on the surface of splenic T but not B lymphocytes, verifying T cell specific expression of the transgene (Fig. 1D). Similar results were obtained from the analysis of the Tg9446 line (data not shown). To assess the integrity of IFN-I signaling in IFNAR1^{T_{excl}} T lymphocytes, thymocytes from all groups were treated with IFN- α/β and IFN activity, was evaluated by detection of phosphorylated-STAT1 (p-STAT1) and IFN-stimulated gene 15 (ISG15). Both proteins were detected only in IFN- α/β treated WT and IFNAR1^{T_{excl}} cells (Fig. 1E, 1F). A neutralizing antibody against IFNAR1 completely abrogated IFN- α/β -induced STAT1 phosphorylation, confirming normal IFN-I signaling in our setting (Fig. 1G).

To ascertain T cell specificity of IFNAR signaling, p-STAT1 levels in various immune cell types were measured by flow cytometry in response to IFN- α/β (Fig 2A-2C). p-STAT1 was detected specifically in the IFNAR1^{T_{excl}} splenic T lymphocytes and their

major subsets, CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 2A), as well as in thymocytes (data not shown) at approximately similar levels to that of WT, but not in B cells or peritoneal macrophages (Fig. 2B, 2C), verifying T cell specific IFNAR signaling. As expected, p-STAT1 was detected in all different cell types from WT mice, but not from *Ifnar1*^{-/-} mice. Since previous studies demonstrated that IFN-I signaling can influence TCR-mediated T cell activation, proliferation and cytokine profile (2;32;33), splenocytes and LN cells from all groups were stimulated using anti-CD3 and anti-CD28 Abs. IFNAR1^{Texcl} lymphoid cells exhibited equivalent responses compared to that of WT and *Ifnar1*^{-/-} cells, showing a similar proliferation index (Fig. 2D, 2E) and similar production of TNF- α , IFN- γ and IL-2 (Fig. 2F, 2G). Finally, to ensure that IFNAR1^{Texcl} T helper cells preserve their differentiation capacity, we compared cytokine production by CD3⁺-enriched T cells under Th1- and Th17- polarizing conditions. FACS analysis showed similar frequencies of CD4⁺ IFN- γ ⁺ and CD4⁺ IL-17⁺ T cells in all groups, indicating that IFNAR1^{Texcl} T cells differentiate normally into Th1 (Fig. 2H) and Th17 cells *in vitro* (Fig. 2I). Collectively, these results show that transgenic IFNAR1 is expressed specifically on T lymphocytes and signals properly, without altering T cell capacity to proliferate, differentiate and produce cytokines upon TCR engagement.

T cell targeted type I IFN signaling attenuates EAE

To study the *in vivo* effect of endogenous type I IFN signaling selectively in T lymphocytes during EAE, WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide and the clinical manifestations and body weight were assessed daily. IFNAR1^{Texcl} mice exhibited a significantly delayed onset, milder development and a reduced accumulative score of EAE compared to both WT and *Ifnar1*^{-/-} mice (Fig. 3, Table I). Milder disease development was also observed using the second transgenic line, Tg9446 (data not shown). These data show that endogenous T cell specific IFN-I signaling modulates onset and progression of EAE. Given the beneficial effect of endogenous IFN-I in IFNAR1^{Texcl} mice during EAE and since EAE can be suppressed by administration of recombinant IFN- β (23;24), we explored the effect of exogenous IFN- β in the same disease model. WT and IFNAR1^{Texcl} mice received two doses of IFN- β , on days -1 and +1 relative to EAE induction. As expected, IFN- β treatment reduced the severity of the disease in WT mice (23;24) (Supplemental Fig.

1). It is important to note that, the mean maximum and accumulative score of IFN- β -treated IFNAR1^{Texcl} mice was several fold lower than that of untreated littermates and of treated WT animals (Fig. 4, Table II). These results further strengthen our initial finding, that T cell restricted IFNAR signaling is critical during the initial phase of EAE and collectively reveal for the first time that T cells are direct targets of IFN- β in EAE.

Fewer T cell infiltrates in the CNS and less severe neuropathology in IFNAR1^{Texcl} EAE mice

A hallmark of EAE pathology is leukocyte infiltration into the CNS, which typically correlates with the severity of clinical signs (34). To investigate whether the milder EAE phenotype in IFNAR1^{Texcl} mice was reflected by differences in neuropathology, we examined spinal cord from mice of all groups collected at day 17, when the mean clinical score of IFNAR1^{Texcl} mice was statistically lower than that of WT and *Ifnar1*^{-/-} mice (Fig. 3A). Infiltration by immune cells, demyelination and axonal damage were evaluated in spinal cord sections by H&E, Luxol Fast Blue and Bielschowsky silver stainings, respectively (Fig. 5A-5C). In accordance with the attenuated EAE phenotype, spinal cord sections from IFNAR1^{Texcl} mice exhibited less inflammatory infiltrates as well as less demyelinated foci and axonal damage compared with both control groups (Fig. 5A-5C). Most interestingly, fewer CD3⁺ T cells were observed in spinal cord sections of IFNAR1^{Texcl} mice, relative to WT and *Ifnar1*^{-/-} mice (Fig. 5D).

Increased frequency of IL-10⁺ and IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in the periphery of IFNAR1^{Texcl} mice at the acute phase of EAE

Because the Th profile of encephalitogenic T cells greatly influences the course of EAE, we next examined whether the observed differences between the groups, reflected distinct T cell-associated cytokine profiles in the periphery and in the CNS. For this purpose, the proportion of cytokine-producing cells, known to be associated with EAE, was measured in draining LNs (dLNs) and splenocytes from all groups of mice on day 17 of EAE. Intracellular staining revealed a significant increase in the frequency of CD4⁺ IL-10⁺ spleen cells in IFNAR1^{Texcl} compared to both WT and *Ifnar1*^{-/-} mice (Fig. 6A, Table III). Surprisingly, a higher frequency of CD4⁺ IFN- γ ⁺ spleen cells

was detected in IFNAR1^{Texcl} compared to WT mice (Fig. 6B, Table III). No differences were observed in the proportion of CD4⁺ IL-17⁺ spleen cells among the groups (Fig. 6C, Table III), or in any cytokine-producing CD4⁺ subset in the dLNs (Table III). The profile of cytokine-producing mononuclear cells could not be determined in the CNS of IFNAR1^{Texcl} mice, because cell infiltrates were almost undetectable in the spinal cord of these mice (Table III).

Impaired Th17 responses in the periphery of IFNAR1^{Texcl} mice at the pre-symptomatic phase of EAE

During T cell priming, CD4⁺ T cells differentiate to distinct cytokine expression profiles, depending on the cytokine environment. Moreover, in EAE, autoreactive T cells are detected in the periphery several days before entering the CNS parenchyma (10;35). To determine the phenotype of T cells at the preclinical stage of the disease, we isolated splenocytes on day 10 post immunization and measured the frequency of cytokine-producing CD4⁺ T cells. Interestingly, a decrease in the proportion of CD4⁺ T cells was observed in the spleen of IFNAR1^{Texcl} mice compared to WT and *Ifnar1*^{-/-} mice, although this was not statistically significant (data not shown). We observed a significantly lower proportion of CD4⁺ IL-17⁺ T cells (Fig. 7A, Table III) and lower expression levels of IL-17 (Fig. 7B), as evaluated by the MFI in IFNAR1^{Texcl} compared to both WT and *Ifnar1*^{-/-} mice. No difference was detected in the proportion of CD4⁺ IFN- γ ⁺ T cells (Supplemental Fig. 2A, III), whereas variable results were obtained between experiments, when measuring CD4⁺ IL-10⁺ T cells (data not shown). Moreover, lower secreted levels of IL-17 in the supernatant of IFNAR1^{Texcl} splenocytes were detected after ex vivo restimulation with MOG35-55 peptide (Fig. 7C), indicating a reduced Th17 profile in IFNAR1^{Texcl} mice. Notably, the secreted levels of other cytokines, i.e. IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-6, were not different among the groups (data not shown). In agreement with the reduced Th17 response, CCR6, a marker of Th17 cells, was found to be expressed in a significantly lower proportion of IFNAR1^{Texcl} CD4⁺ splenocytes (Fig. 7D). Tregs play a pronounced role in the suppression of autoimmune inflammatory responses (36) and IFN- β is reported to modulate frequency and suppressive capacity of Treg cells in MS (37;38). However, no differences in CD25⁺Foxp3⁺ Tregs were detected between IFNAR1^{Texcl}

mice and the control groups, as well as between the WT and *Ifnar1*^{-/-} mice, in agreement with previous studies (39) (Supplemental Fig. 2B). Collectively these data suggest that T cell specific IFNAR signaling leads to impaired Th17 immune response, thus contributing to a milder course of EAE.

Diminished ex vivo proliferative capacity of IFNAR1^{Texcl} T cells in response to MOG₃₅₋₅₅ peptide

There are data suggesting that IFN-I affects T cell expansion and proliferation either by acting directly on them, or indirectly by modulating the antigen presenting capacity of APCs (33;40). Since a lower proportion of splenic CD4⁺ T cells was observed in IFNAR1^{Texcl} mice on day 10 of EAE, we analyzed T cell proliferative capacity in our setting. Splenic and dLN cells from immunized mice were restimulated with MOG₃₅₋₅₅ *ex vivo*. dLN cells derived from IFNAR1^{Texcl} mice exhibited equivalent proliferative recall response upon antigen restimulation *ex vivo* as compared to WT and *Ifnar1*^{-/-} mice (Supplemental Fig. 3). The proliferative capacity of IFNAR1^{Texcl} splenocytes was impaired compared to that of WT, but similar to *Ifnar1*^{-/-} cells (Fig. 8A). Similar results were obtained when we co-cultured CD3⁺-enriched T cells with irradiated splenocytes in the presence of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Fig. 8B). Since differences in proliferation were observed between IFNAR1^{Texcl} and WT mice, but not between IFNAR1^{Texcl} and *Ifnar1*^{-/-} mice, we propose that variation in T cell proliferation is not a contributing factor for distinct EAE profiles among the mouse strains.

Differentially expressed genes (DEGs) in IFNAR1^{Texcl} mice at the pre-symptomatic and acute phase of EAE

In order to track down genes that could possibly account for the altered cytokine profile of IFNAR1^{Texcl} T cells, associated with the delayed EAE course demonstrated above, we performed transcriptome analysis on splenic CD3⁺-enriched T cells (thereafter referred to as T cells) and spinal cord tissues isolated on day 10 of EAE. Genes having at least 1.5 fold increased or decreased expression in two independent experiments, in IFNAR1^{Texcl} versus WT mice were considered as DEGs, and the magnitude of up- or down-regulation was depicted in heatmaps, separately for T cell

(Fig. 9A) and spinal cord (Fig. 9B) samples. Genes were then tabulated according to their biological function (Fig. 9C). Among the DEGs in T cells of IFNAR1^{Texcl} mice, there are genes involved in immune responses (*Parp14*, *Usp18*, *Ifit1*, *Slfn8* etc.), apoptosis/survival (*Xaf1*, *Eif2ak2*, *Ifih1*), type I IFN biosynthetic process (*Irf7*, *Irf9*), anti-viral responses (*Oas1a*, *Oas1b*, *Isg15*, *Klra9*, *Rsad2*), or response to stress (*Irgm1*, *Dhx58*). Among the DEGs in spinal cord tissues, there are genes involved in immune response (*Irgm1*, *Oasl2*, *Rsad2*, *Oas1g*), cell differentiation (*Stap1*), or cell adhesion (*Lgla3bp*). The differential expression of selected genes was validated by quantitative RT-PCR in T cell and spinal cord samples, from individual mice from two independent experiments. In order to explore how the expression profile of the selected genes changes with respect to disease progression, we performed quantitative RT-PCR in the same tissues from mice of all groups, sacrificed on day 17, at the acute phase of the disease (Fig. 9D-9G). Samples from *Ifnar1*^{-/-} mice sacrificed at the same timepoints were also included, in order to identify genes differentially regulated by IFN-I signaling. Expression levels of *Irgm1* mRNA, an IFN- γ inducible gene, were lower in IFNAR1^{Texcl} T cells on day 10 of EAE, compared to WT samples, but higher compared to *Ifnar1*^{-/-} samples (Fig. 8D), although this was reversed on day 17, with significant up-regulation in IFNAR1^{Texcl} -derived T cells versus both control groups. mRNA levels of *Irgm1* and the IFN-stimulated gene, *Slfn8*, were lower in IFNAR1^{Texcl} spinal cord at day 17 of EAE, compared with WT, but not *Ifnar1*^{-/-} mice (Fig. 9E, 9F). Moreover, the expression levels of *Stap1* mRNA, a neurotoxicity gene, were significantly lower in transgenic spinal cord samples compared to both control groups at day 17 (Fig. 9G). In conclusion, transcriptome analysis in combination with qRT-PCR revealed the differential expression of several genes in IFNAR1^{Texcl} mice during EAE. In addition, it is the first time that *Slfn8* and *Stap1* are reported to be associated with EAE.

Discussion

In this paper we addressed how IFNAR signaling directly modulates the activity of T cells in EAE, and subsequently impinges on the outcome of the disease. For this purpose, we generated mice that express IFNAR1 exclusively on T cells, denominated IFNAR1^{Texcl}. Transgenic T cells presented a normal capacity to proliferate, differentiate and produce cytokines upon TCR engagement. This newly generated transgenic mouse strain provides a unique *in vivo* system for studying the direct activities of IFN-I on T cells in various autoimmune, infectious, or neoplastic inflammatory conditions. IFNAR1^{Texcl} mice represent a valuable tool for understanding how IFN- β therapy affects T cell biology in particular for EAE, in which T cells are considered the main pathogenic population.

When IFNAR1^{Texcl} animals were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide, a significantly delayed onset and a milder progression of EAE was observed, in comparison to *Ifnar1*^{-/-} mice. This finding unravels a hitherto unknown *in vivo* protective effect of endogenous IFN-I when acting directly on T cells at the early phase of EAE. This beneficial effect observed in IFNAR1^{Texcl} mice was abrogated in IFNAR sufficient animals, suggesting that counterbalancing effects of IFN-I signaling on non T cell compartments obscure the protective effect of IFN-I on T cells. This interpretation was further supported by the observation that IFNAR1^{Texcl} animals demonstrated an impressive attenuated disease course, when exogenous IFN- β was administered prophylactically.

The beneficial effect of IFN-I in IFNAR1^{Texcl} EAE mice was found to be associated with down-regulation of the Th17 response at the pre-symptomatic phase of EAE in the periphery. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that differentiation of Th17 cells is inhibited by IFN- β (23;41-44). However, this is the first study showing that IFN-I acts directly on T cells, to reduce the percentage of CD4⁺IL17⁺ cells and the secreted IL17A in EAE, as illustrated in Fig 7. In addition to this, the frequency of CD4⁺ T cells expressing CCR6, a marker of both Th17 cells and migrating T cells in the CNS in EAE (45-47), was found significantly decreased in IFNAR1^{Texcl} mice. This finding indicates a lower migratory capacity of these CD4⁺ T cells at the priming phase of EAE that explains the low number of infiltrating T cells in the spinal cord of these animals

and the milder neuropathology at the acute phase. Overall, convergent findings in our study, advocate in favor of a direct IFN-I activity on T cells that restrains the pro-inflammatory Th17 response at the priming phase of EAE, leading to delayed onset of clinical manifestations in IFNAR1^{Texcl} mice.

At the acute phase of the disease Th17 differences among the groups were subdued, whereas IFNAR1^{Texcl} mice showed an increased proportion of IL-10-producing CD4⁺ T cells in the periphery compared with the control groups. Previous studies showed that increased IFN- β -induced IL-10 production has a beneficial effect in EAE (48;49), which is consistent with our results. It is intriguing that, in parallel to increased IL-10, an up-regulation of the Th1 pattern was observed in the spleen of IFNAR1^{Texcl} mice in comparison to WT. Although Th1 cells were initially thought to be the main pathogenic T cell subset in EAE and MS (50;51), subsequent studies revealed that the biological significance of IFN- γ , in EAE is ambiguous(52). A cross talk between type I and type II IFN pathways has been reported recently, which seems to determine the effect of IFN- γ itself in EAE. Thus, IFN- γ treatment at the effector phase of EAE attenuated disease in IFNAR sufficient mice, but had the opposite effect in *Ifnar1*^{-/-} mice (53). This may explain why *Ifnar1*^{-/-} mice in this study, do not benefit from the elevated Th1 pattern, and in contrast their disease evolution is similar to WT mice, that present low IFN- γ production. An alternative explanation is that IFN- γ acts beneficially in synergy with IL-10, when the production of IL-10 reaches a certain threshold. This condition is met in IFNAR1^{Texcl} but not in *Ifnar1*^{-/-} mice, that demonstrate low IL-10 production.

Congruent with the enhanced Th1 response in IFNAR1^{Texcl} mice was the expression of *Irgm1* gene. *Irgm1* encodes immunity-related GTPase family M member 1 and is induced mainly by IFN- γ . Recent studies revealed that *Irgm1* exacerbates EAE by promoting BBB disruption, while *Irgm1*^{-/-} mice are resistant to EAE (54;55). In our study, at the acute phase of the disease, *Irgm1* demonstrated higher expression in splenic T cells of IFNAR1^{Texcl} mice, in line with the increased IFN- γ production. However, at the same time, *Irgm1* expression in the spinal cord of IFNAR1^{Texcl} mice was significantly lower compared to WT mice. These results, taken together, concur with a high Th1 profile in the periphery of IFNAR1^{Texcl} mice, while implying lower BBB disruption. This suggests that BBB of IFNAR1^{Texcl} mice restricts crossing of T

cells into the CNS, which is in line with the milder pathology observed. In addition, preliminary experiments performed at the acute phase in order to examine the migration of T cells, showed enhanced proportion of CD69⁺ and CCR5⁺ T cells in the peripheral blood of IFNAR1^{Texcl} mice (unpublished data), that possibly represent activated Th1 cells (56;57), and at the same time a lower frequency of VLA4⁺ peripheral T cells in IFNAR1^{Texcl} mice (unpublished data), implying that fewer T cells have the capacity to adhere to BBB endothelial cells and transmigrate into the CNS (58). This hypothesis may explain why fewer cell infiltrates were detected in the spinal cord of IFNAR1^{Texcl} mice and is consistent with the lower EAE score at the acute phase of the disease. Additional studies are needed in order to confirm this hypothesis.

Taking into account our results and the aforementioned studies, a challenging hypothesis is that in the IFNAR1^{Texcl} mice, IFN-I differentially affects T cell behavior at discrete stages of EAE. At the priming phase it suppresses Th17 responses, thus delaying onset of clinical manifestations, while at the acute phase it stimulates IL-10 expression and regulates Th1 cells transmigration into CNS, eventually leading to milder development and reduced CNS inflammation.

Another interesting finding of the present study is that, among the DEGs detected in the microarray experiments, two genes, signal transducing adaptor family member 1 (*stap1*), and the IFN-inducible gene, schlafen 8 (*slfn8*) (59), never reported before to be associated with EAE, were up-regulated in the spinal cord in EAE mice of all groups. It is interesting to note that, expression of *stap1*, that was recently linked to neuronal apoptosis and degeneration (60), was decreased in IFNAR1^{Texcl} spinal cord relative to control groups, in line with the less severe neuropathology observed. These two genes may constitute new markers for monitoring the evolution of EAE but further studies are needed to confirm these observations.

Previous studies have addressed the question of the role of endogenous IFN-I on different cell types and its tissue specific activity in EAE. Teige *et al.* (25;61) examined *Ifnβ*^{-/-} mice and concluded that the anti-inflammatory activity of endogenous IFN-β is mainly exerted at the effector phase of the disease in the inflamed CNS, by down-regulating microglia activation. In agreement with our results, the authors observed

that proliferation and cytokine production of lymph node T cells, was not altered in the absence of IFN- β signaling. Based on these results the authors concluded that in EAE, IFN- β does not impact T cell behavior in the periphery. However, splenic T cells in the present study demonstrated IFNAR-associated skewing in cytokine response. Two conclusions can be drawn from this observation: first, the IFN-I-induced cytokine profile of Th subsets in different peripheral lymphoid organs is not necessarily the same and second, not only T cells derived from dLN, but also from other peripheral lymphoid organs, for instance the spleen, may play an important role in the evolution of EAE pathogenesis.

In their seminal study, Prinz *et al.* (62) generated several conditional knockout mouse lines in which IFNAR expression was ablated in different cell populations, to address the question of cell specific activity of IFN-I. Using mice with T cell restricted IFNAR1 deletion, they concluded that IFNAR triggering on T cells had no impact on EAE induction and progression. Nonetheless, the authors showed that during the priming phase of the disease these mice demonstrated a statistically higher clinical score, but this phenomenon was not further investigated in their study (62). This observation indicates a non-trivial protective T cell-associated role of IFN-I at the priming phase of EAE, a suggestion that is substantiated by our findings using IFNAR1^{Texcl} mice. It is of note that this benefit is reversed at the later stages of the disease (unpublished data), implying a T cell independent role of IFN-I in the chronic phase of EAE. Indeed, Prinz *et al.* (62) have shown that, at this phase IFN-I acts beneficially on myeloid cells. Based on their study and our results, one could speculate that IFN-I signaling may exert cell- and disease stage- specific protective activity in EAE.

The present study contributes to our understanding of how the protective effect of endogenous IFN-I extends beyond the inflamed CNS, acting on splenic T lymphocytes to modify their behavior during the priming phase of EAE. The finding with the most far reaching consequences is the observation that administration of exogenous IFN- β almost abrogated EAE in IFNAR1^{Texcl} mice. In fact, the effectiveness of IFN- β therapy in MS patients seems to depend on several factors including the profile of encephalitogenic T helper cells, levels of endogenous IFN-I as well as other factors (23;63). Based on the finding of the present study and the assumption that EAE recapitulates well the immune components of MS, we propose that in addition to the

factors that have emerged from the above studies, the responsiveness of MS patients to IFN- β treatment may also depend on the integration of positive and negative effects that IFN- β exerts on different cell types, in particular on the T cell and the non-T cell compartment, respectively. Thus, the investigation of underlying mechanisms of IFN-I activity on T cells would give useful information on whether T cell-targeted IFN- β -based therapies may improve existing therapeutic interventions in MS.

Authorship

G.T. and S.H. designed the study; N.K., G.T. and S.H. designed experiments; N.K. and M.M. performed experiments and analyzed the data; N.K. performed statistical analyses and prepared the figures; M.E. advised with immunological techniques and discussed the data; M.T. provided with key reagents; G.T. prepared the *cd2-ifnar1* transgenic construct; N.K. and S.H. generated and analyzed the IFNAR1^{Texcl} mouse strain; N.K., G.T. and S.H. wrote the manuscript; M.E. and M.T. provided valuable comments on the manuscript.

Acknowledgments

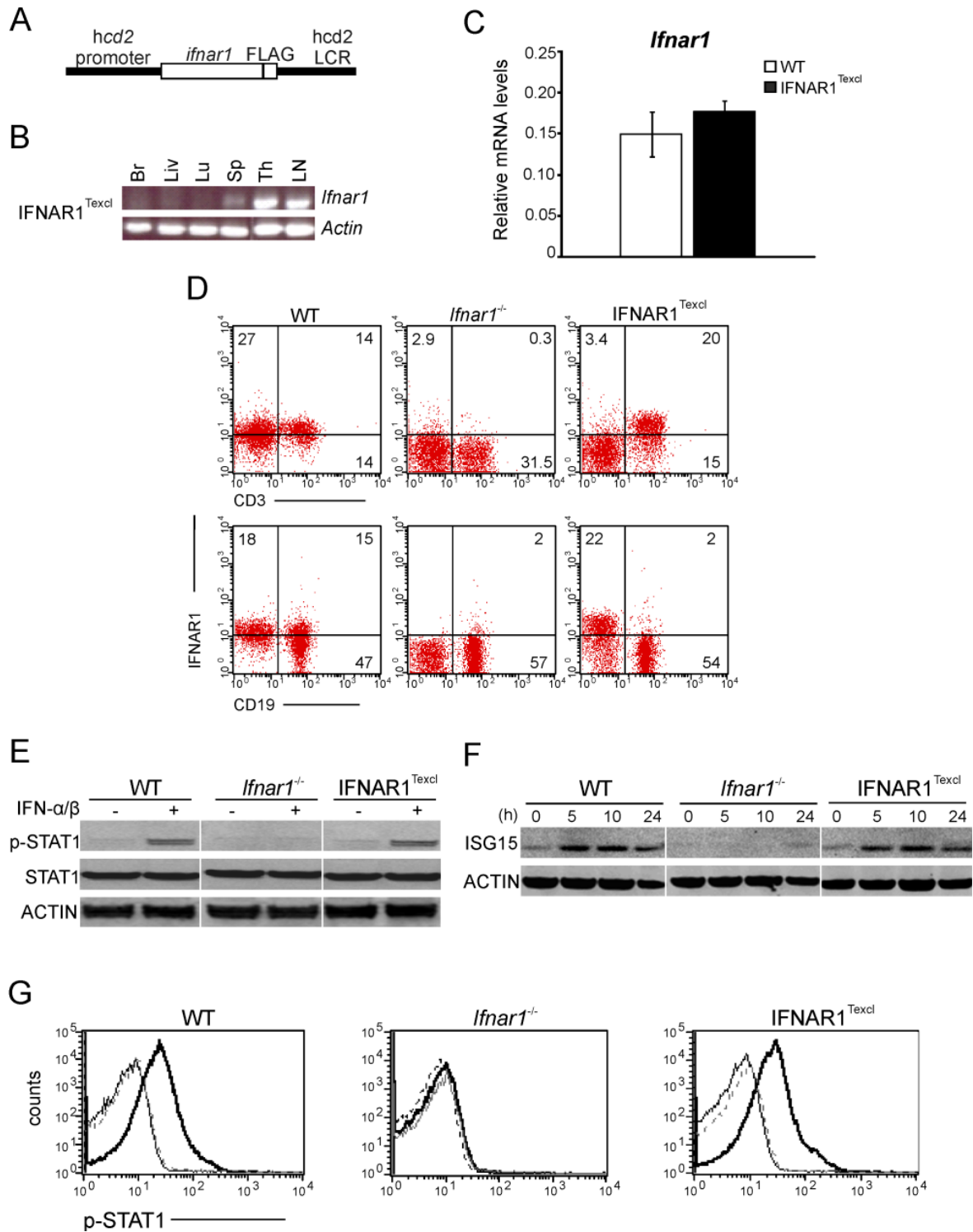
This work was performed in the context of InfeNeuTra project part of the KRIPIS action with code number MIS 450598 funded by the General Secretariat of Research & Technology (GSRT), the entire action was co-funded by Greece and the European Regional Development Fund of the European Union, through Operational Programme Competitiveness and Entrepreneurship of the National Strategic Reference Framework (NSRF) 2007-2013. The project was also supported by the Transgenic Technology Unit (TTU) of Hellenic Pasteur Institute. The authors thank the Microarray Facility of the Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas for performing microarray experiments and Dr D. Kazazi, Laboratory of Virology, Hellenic Pasteur Institute, for assisting on analysis of microarray experiments and submission of the results to ArrayExpress Database. We also thank Dr E. Douni and Dr T. Michaelidis for valuable comments on the manuscript, and the colleagues I. J. Grivas and E. Malaktari for technical assistance during the course of this work. N.K. was a fellow of the Hellenic Pasteur Institute and PhD candidate in the Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflict of interest.

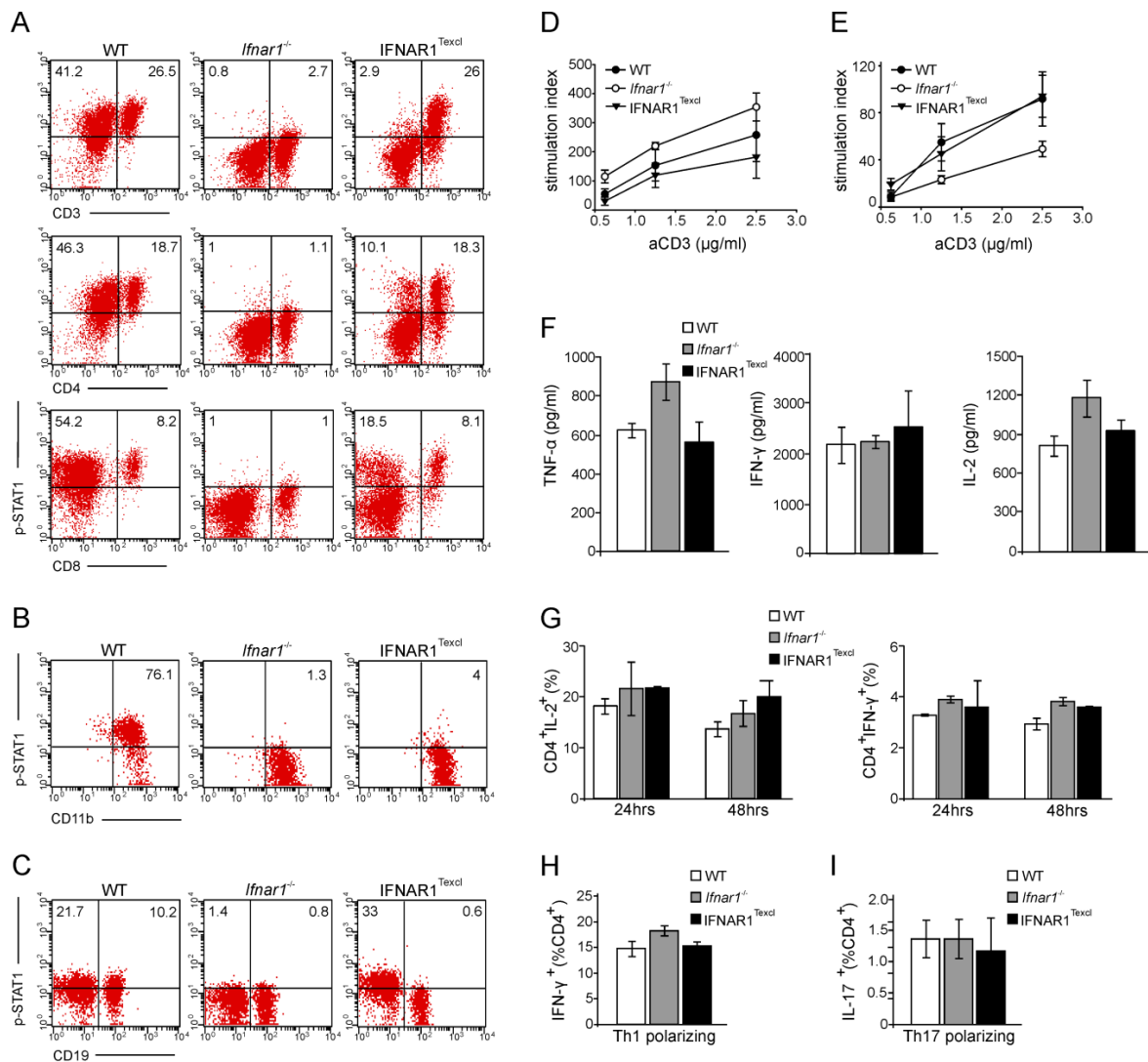
Figures

Figure 1



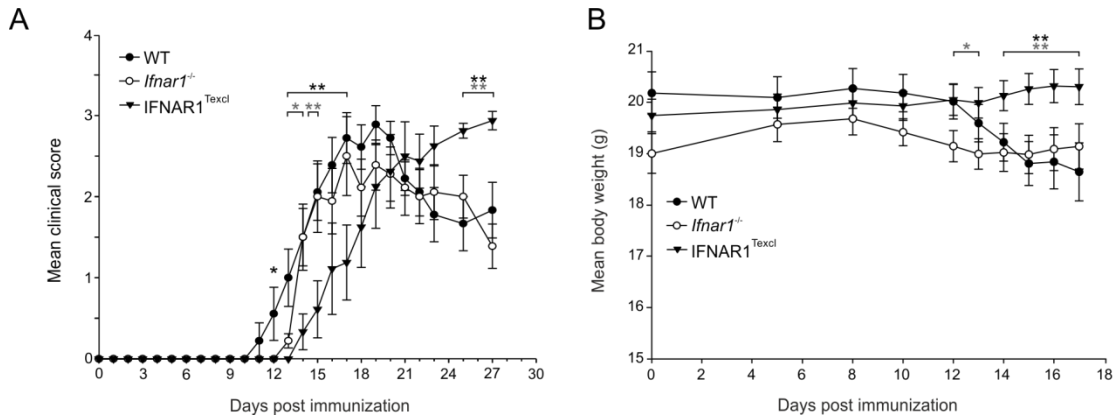
Transgenic IFNAR1 is specifically expressed on T cells of IFNAR1^{Texcl} mice and is functionally active. (A) Construct used to generate *cd2-ifnar1* transgenic mice. (B) RT-PCR demonstrated lymphoid tissue specific expression of transgenic *ifnar1*. Using a reverse primer for FLAG, this PCR reaction amplified *ifnar1* transcript only from transgenic mice. Br, brain; Liv, liver; Lu, lung; Sp, spleen; Th, thymus; LN, lymph nodes. (C) RNA was extracted from CD3⁺- enriched T cells and *ifnar1* mRNA was amplified by real-time RT-PCR. (D) Splenocytes from WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice were stained for CD3, CD19 and IFNAR1. (E, F) Splenocytes were stimulated by IFN- α/β for 30 min (E), or for the indicated time (F) and then analyzed by Western blot. STAT1 and p-STAT1:89/91 kDa, ISG15:15 kDa, ACTIN:42 kDa. The images were spliced and joined, as indicated by white lines for the sake of the presentation. (G) Thymocytes were incubated with anti-IFNAR1 neutralizing Ab prior to IFN- α/β treatment and stained with a p-STAT1 Ab. The histogram plots show the p-STAT1 positive cells in the total live-cell gate (IFN treatment: bold black line, Ab + IFN treatment: black line, no treatment: dotted line).

Figure 2



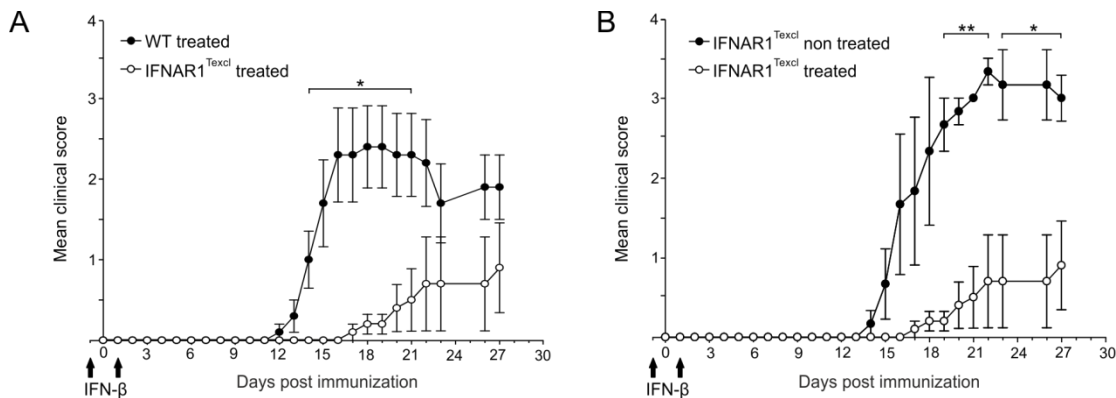
Transgenic IFNAR1 mediates IFN- α/β signaling exclusively in T lymphocytes, without altering their functionality upon TCR stimulation. (A-C) Splenocytes (A), peritoneal macrophages (B) and LN cells (C) were isolated from WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcd} mice. Cells were treated with IFN- α/β and double stained for CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, and for p-STAT1. Dot plots show the double positive cells in the total live-cell gate and a representative dot plot per group is shown. (D-E) Thymidine uptake after anti-CD3/anti-CD28 stimulation of splenocytes (D) and LN cells (E). Results shown are presented as mean values \pm SEM. (F) Cytokine production in splenocytes supernatants following stimulation with anti-CD3/anti-CD28. (G) Intracellular staining of splenocytes for IL-2 and IFN- γ after stimulation with anti-CD3/anti-CD28 followed by PMA/ionomycin/Brefeldin A incubation. (H-I) CD3⁺-enriched T cells were stimulated under Th1- and Th17-polarizing conditions and stained for IFN- γ (H) and IL-17A (I). The bars represent the double positive (CD4⁺ cytokine⁺) cells in the total live-cell gate. All data shown are representative of at least two independent experiments (n=5 mice/genotype/experiment).

Figure 3



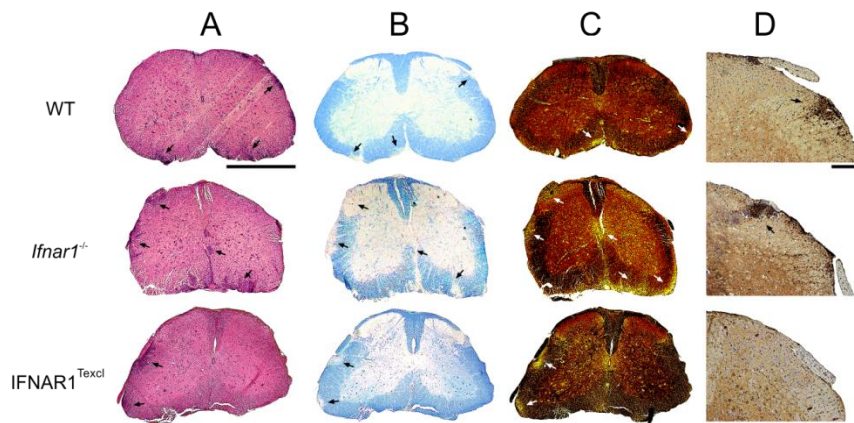
Endogenous IFN-I signaling selectively in T cells modulates onset and progression of EAE. (A) Mean clinical scores for WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice (n=9 mice/genotype) after immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide. Results shown are representative of three independent experiments and are presented as mean values \pm SEM. (B) Mean body weight of WT (n=30), *Ifnar1*^{-/-} (n=28) and IFNAR1^{Texcl} (n=32) mice after EAE induction, pooled from three independent experiments. Results shown are presented as mean values \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01: IFNAR1^{Texcl} versus WT mice, and * p <0.05, ** p <0.01: IFNAR1^{Texcl} versus *Ifnar1*^{-/-} mice.

Figure 4



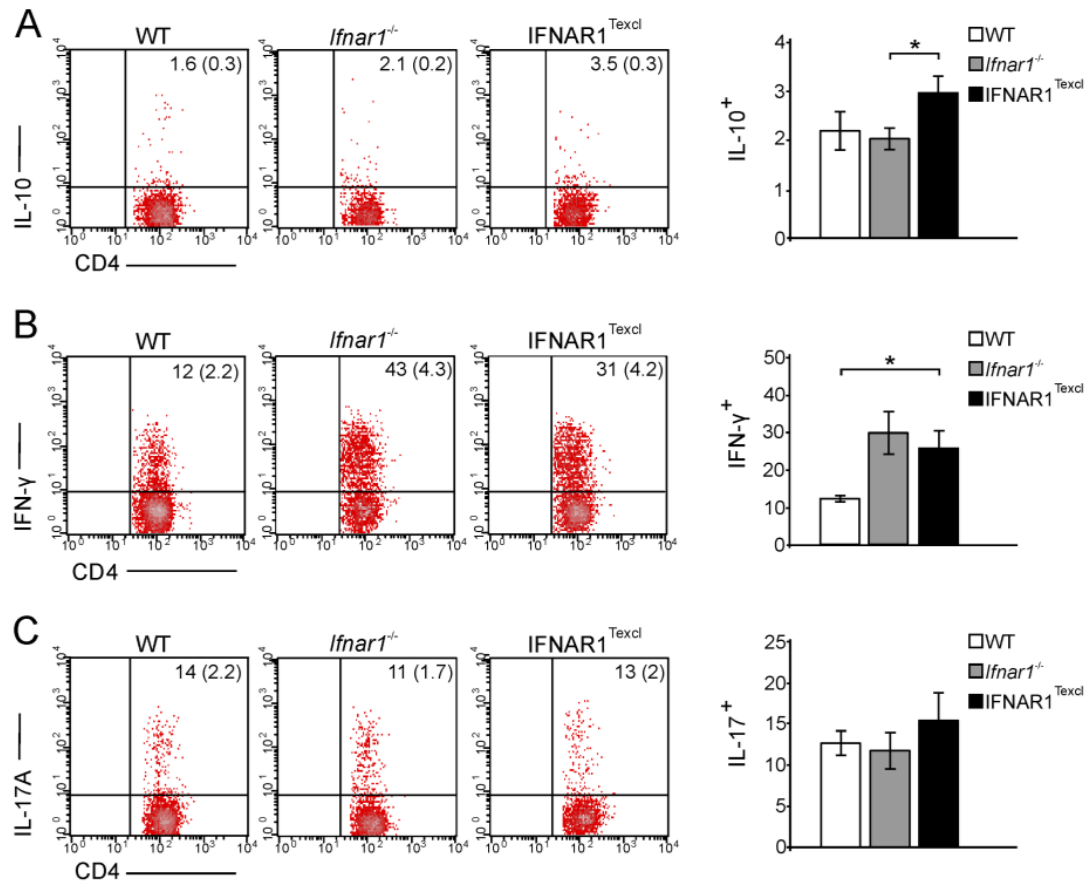
Exogenous IFN- β signaling selectively in T cells attenuates EAE. WT and IFNAR1^{Texcl} mice were treated or not with IFN- β (10^4 U/mouse) on days -1 and +1 relative to EAE induction, as indicated by arrows. (A) Comparison of WT and IFNAR1^{Texcl} mice upon treatment with IFN- β and (B) comparison of untreated IFNAR1^{Texcl} mice with IFN- β treated littermates. Results shown are presented as mean values \pm SEM and are representative of two independent experiments (n=5 mice/genotype/experiment). * p <0.05, ** p <0.01.

Figure 5



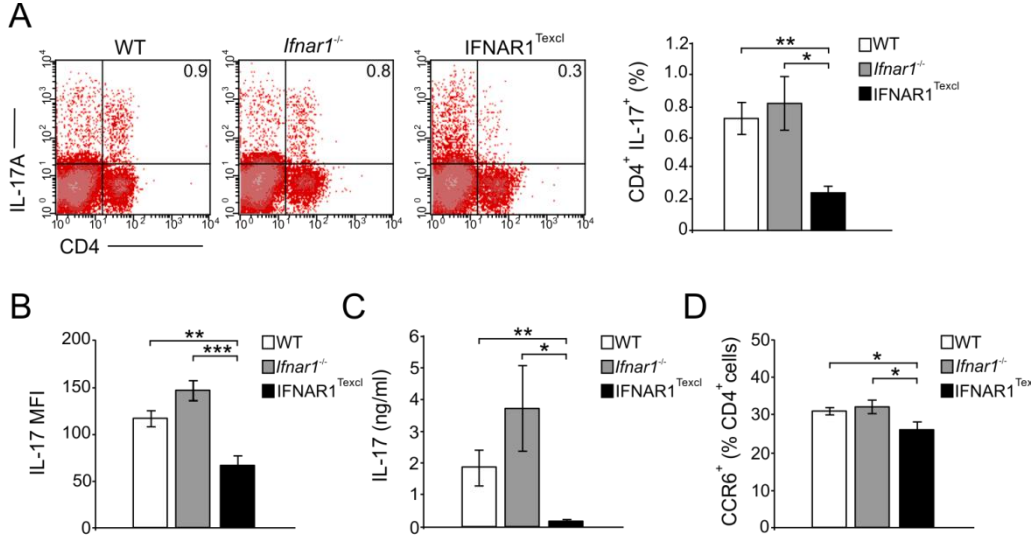
Neuropathology in IFNAR1^{T^{excl}} mice during EAE. (A-D) Spinal cord sections from WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{T^{excl}} mice (n=3mice/genotype) were prepared 17 days upon EAE induction and stained with H&E (A), Luxol fast blue (B) and Bielschowsky silver stain (C). Immunohistochemistry for CD3⁺ T cells was also performed (D). Arrows indicate immune cell infiltration (A), demyelination (B), axonal damage (C) and CD3⁺ T cells infiltration in the CNS parenchyma. Scale bar, 1 mm (A-C), 200 μ m (D).

Figure 6



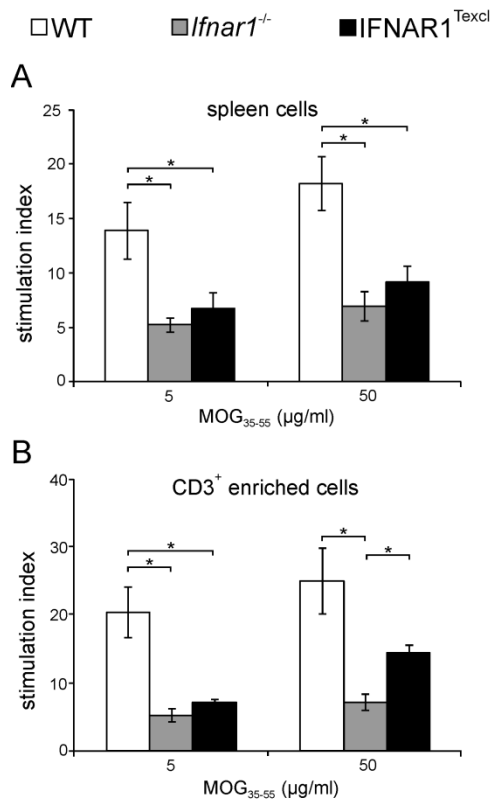
Frequency of cytokine producing splenic T cells at the acute phase of EAE. Mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide and on day 17 splenic cells were stimulated with PMA/ionomycin/brefeldin A, stained for intracellular cytokines and analyzed by flow cytometry. The dot plots and bars represent the IL-10- (A), IFN-γ- (B) and IL-17A- (C) producing cells gated on CD4⁺ population (values in the parentheses show percentage in the total live-cell gate). A representative dot plot per genotype is shown. Results are presented as mean ± SEM and are representative from two independent experiments with similar results (n=5 mice/genotype/experiment). *p<0.05.

Figure 7



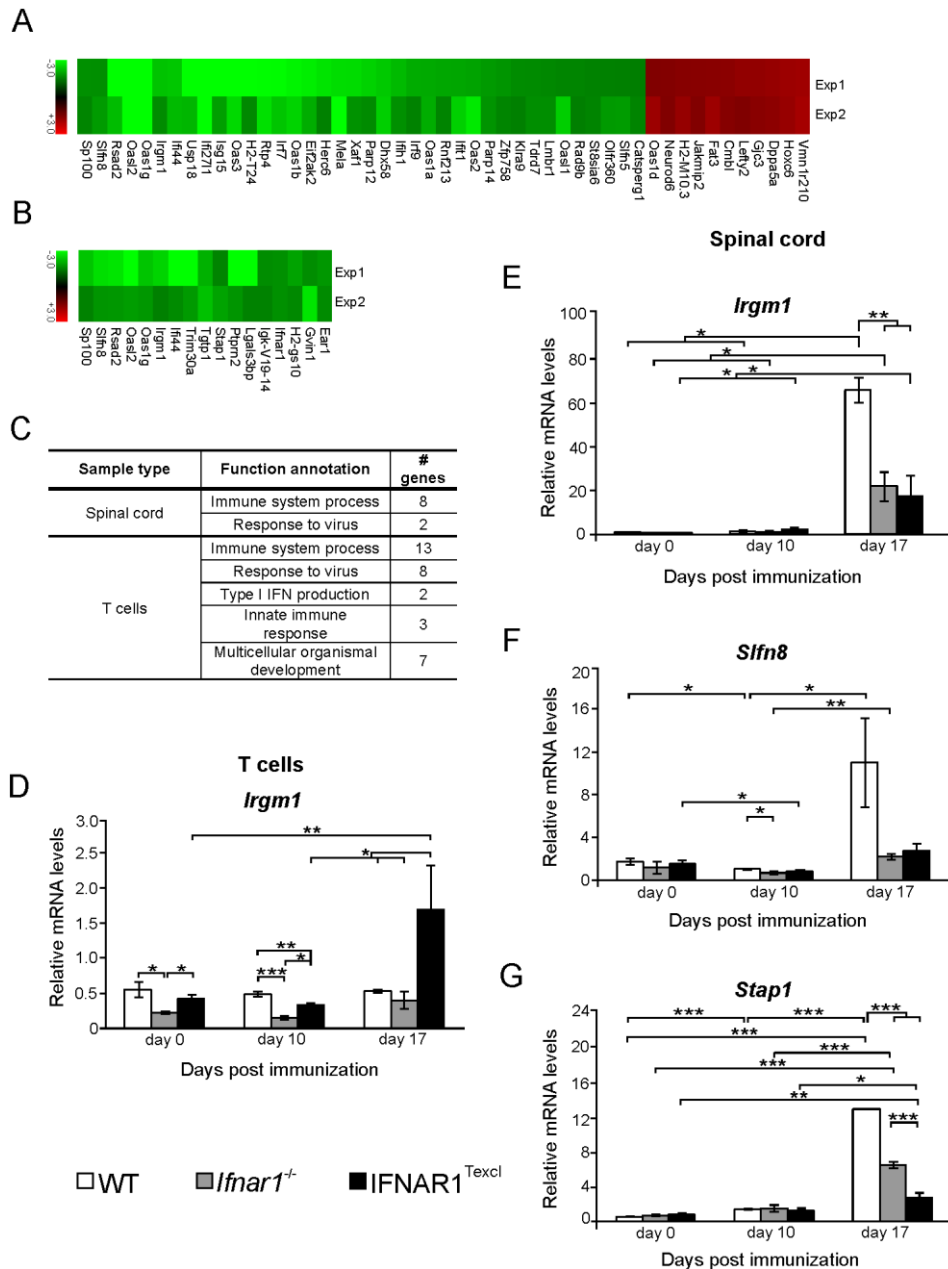
Selective T cell IFNAR signaling leads to decreased Th17 response at the pre-symptomatic phase of EAE. Splenocytes were isolated from WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice 10 days upon EAE induction. (A) Cells were stimulated with PMA/ionomycin/brefeldin A and frequency of IL-17A producing CD4⁺ T cells in the spleen was determined. The dot plots and bars represent IL-17A⁺ cells gated on total splenocytes. A representative dot plot per genotype is shown. (B) Expression levels of IL-17A by CD4⁺ T cells were evaluated by measuring Mean Fluorescence Intensity (MFI) from (A) dot plots. (C) Splenocytes from all groups were restimulated *ex vivo* with MOG₃₅₋₅₅ for 72 h and the levels of secreted IL-17A were measured. (D) Frequency of CCR6⁺ splenocytes was determined (gated on CD4⁺ compartment). All results are shown as mean ± SEM (n=5 mice/genotype) and are representative from two independent experiments with similar results. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Figure 8



Ex vivo proliferation of T cells from mice immunized with MOG₃₅₋₅₅. Mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅/CFA and spleen cells were isolated on day 10. Thymidine incorporation was measured 72 h upon culture of (A) spleen cells and (B) CD3⁺-enriched T cells co-cultured with irradiated APCs, in the presence of MOG₃₅₋₅₅. Data are shown as mean ± SEM and are representative of two independent experiments with similar results (n=5 mice/genotype/experiment).

Figure 9

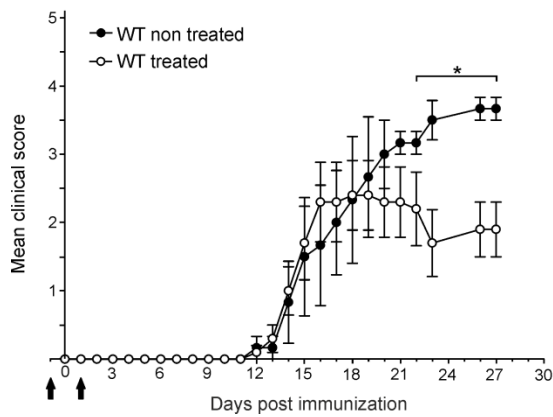


Microarray data analysis and qRT-PCR of CD3⁺- enriched T cells and spinal cord.

Microarray analysis was performed on RNA from splenic CD3⁺- enriched T cells and spinal cords from WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice, on day 0, 10 and 17 relative to EAE induction. (A-B) Heat map depicting the relative expression of selected genes that are different in expression between IFNAR1^{Texcl} and WT T cells (A) and spinal cord (B) samples and were common in two independent experiments. (C) Table showing the function and number of molecules per category, as assessed by DAVID microarray software. The levels of mRNA transcripts for selected genes were measured in T cells (D) and spinal cords (E-G) by qRT-PCR using single samples from each group at each time point [day 0: n=3-5 mice/genotype,

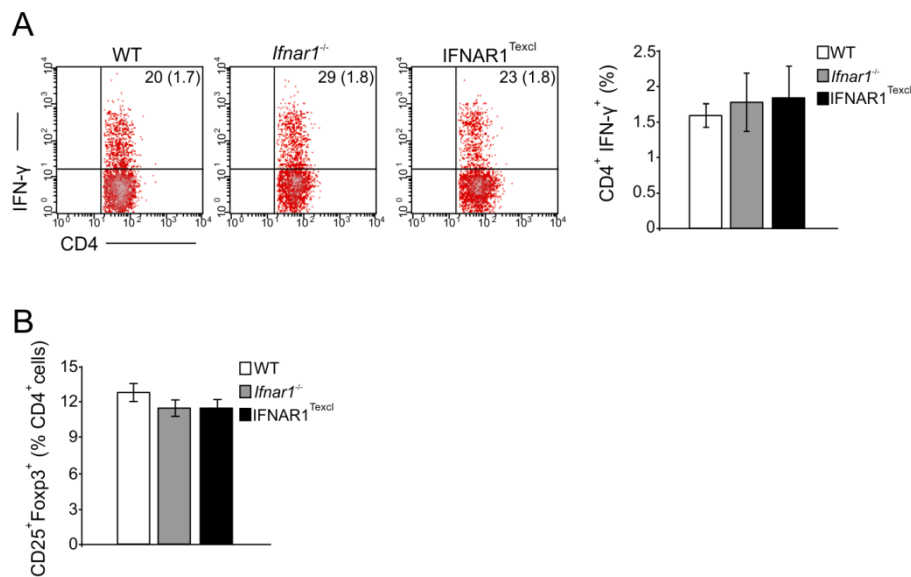
day 10: n=3-4 mice/ genotype, day 15: n=2-3 mice/genotype]. The results shown are the mean \pm SEM of samples from one representative of two independent EAE experiments with similar results. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Supplementary Figure 1



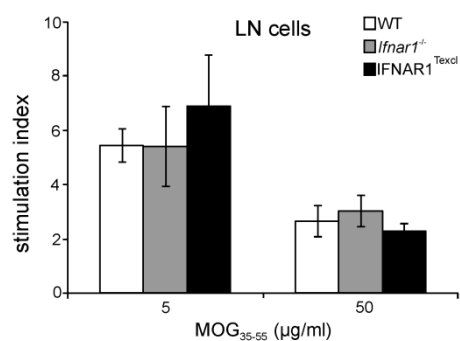
Exogenous IFN- β reduces EAE severity. WT mice were treated with IFN- β (104 U/mouse) or PBS on days -1 and +1 relative to EAE induction, as indicated by arrows. Results are presented as mean values \pm SEM and are representative of two independent experiments (n=5 mice/genotype/experiment). * p <0.05.

Supplementary Figure 2



IFN- γ production and Tregs percentage at the pre-symptomatic phase of EAE. (A) Frequency of IFN- γ producing CD4⁺ T cells in the spleen was determined 10 days upon EAE induction by flow cytometry. The dot plots and bars represent IFN- γ ⁺ cells gated on total splenocytes. A representative dot plot per group is shown. (B) Frequency of Tregs was determined by flow cytometry. All results are shown as mean \pm SEM and are representative from two independent experiments with similar results (n=5 mice/genotype/experiment).

Supplementary Figure 3



IFNAR signaling is dispensable for MOG-specific T cell proliferation in dLNs. WT, *Ifnar1*^{-/-} and IFNAR1^{Texcl} mice were immunized with MOG35-55/CFA and dLN cells were isolated on day 10. Thymidine uptake was measured 72 h upon culture in the presence of MOG35-55. Data are shown as mean \pm SEM and are representative of two independent experiments with similar results (n=5 mice/genotype/experiment).

References

1. Gresser,I. (1990) Biologic effects of interferons. *J. Invest Dermatol.*, 95, 66S-71S.
2. Dondi,E., Rogge,L., Lutfalla,G., Uze,G. and Pellegrini,S. (2003) Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation. *J. Immunol.*, 170, 749-756.
3. Gough,D.J., Messina,N.L., Clarke,C.J., Johnstone,R.W. and Levy,D.E. (2012) Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity.*, 36, 166-174.
4. Uematsu,S. and Akira,S. (2007) Toll-like receptors and Type I interferons. *J. Biol. Chem.*, 282, 15319-15323.
5. Platanias,L.C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 375-386.
6. Gonzalez-Navajas,J.M., Lee,J., David,M. and Raz,E. (2012) Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.*, 12, 125-135.
7. Ivashkiv,L.B. and Donlin,L.T. (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 36-49.
8. (2001) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology*, 57, S3-S9.
9. Sospedra,M. and Martin,R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 683-747.
10. Kuerten,S. and Lehmann,P.V. (2011) The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J. Interferon Cytokine Res.*, 31, 907-916.
11. Fletcher,J.M., Lalor,S.J., Sweeney,C.M., Tubridy,N. and Mills,K.H. (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 162, 1-11.
12. El-behi,M., Rostami,A. and Ciric,B. (2010) Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmune. Pharmacol.*, 5, 189-197.
13. Korn,T., Bettelli,E., Oukka,M. and Kuchroo,V.K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 485-517.
14. Domingues,H.S., Mues,M., Lassmann,H., Wekerle,H. and Krishnamoorthy,G. (2010) Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS. One.*, 5, e15531.
15. Murphy,A.C., Lalor,S.J., Lynch,M.A. and Mills,K.H. (2010) Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav. Immun.*, 24, 641-651.

16. Stromnes,I.M., Cerretti,L.M., Liggitt,D., Harris,R.A. and Goverman,J.M. (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.*, 14, 337-342.
17. Bailey-Bucktrout,S.L., Martinez-Llordella,M., Zhou,X., Anthony,B., Rosenthal,W., Luche,H., Fehling,H.J. and Bluestone,J.A. (2013) Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity.*, 39, 949-962.
18. Hirota,K., Duarte,J.H., Veldhoen,M., Hornsby,E., Li,Y., Cua,D.J., Ahlfors,H., Wilhelm,C., Tolaini,M., Menzel,U. *et al.* (2011) Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.*, 12, 255-263.
19. Zhou,L., Chong,M.M. and Littman,D.R. (2009) Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.*, 30, 646-655.
20. Dhib-Jalbut,S. and Marks,S. (2010) Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 74 Suppl 1, S17-S24.
21. Kieseier,B.C. (2011) The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS. Drugs*, 25, 491-502.
22. Markowitz,C.E. (2007) Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology*, 68, S8-11.
23. Axtell,R.C., de Jong,B.A., Boniface,K., van der Voort,L.F., Bhat,R., De,S.P., Naves,R., Han,M., Zhong,F., Castellanos,J.G. *et al.* (2010) T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat. Med.*, 16, 406-412.
24. Galligan,C.L., Pennell,L.M., Murooka,T.T., Baig,E., Majchrzak-Kita,B., Rahbar,R. and Fish,E.N. (2010) Interferon-beta is a key regulator of proinflammatory events in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult. Scler.*, 16, 1458-1473.
25. Teige,I., Treschow,A., Teige,A., Mattsson,R., Navikas,V., Leanderson,T., Holmdahl,R. and Issazadeh-Navikas,S. (2003) IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 170, 4776-4784.
26. Warabi,Y., Matsumoto,Y. and Hayashi,H. (2007) Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination. *J. Neurol. Sci.*, 252, 57-61.
27. Axtell,R.C., Raman,C. and Steinman,L. (2013) Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 44, 114-120.
28. Zhumabekov,T., Corbella,P., Tolaini,M. and Kioussis,D. (1995) Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J. Immunol. Methods*, 185, 133-140.

29. Ittner,L.M. and Gotz,J. (2007) Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat. Protoc.*, 2, 1206-1215.
30. Muller,U., Steinhoff,U., Reis,L.F., Hemmi,S., Pavlovic,J., Zinkernagel,R.M. and Aguet,M. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264, 1918-1921.
31. Nicolussi,E.M., Huck,S., Lassmann,H. and Bradl,M. (2009) The cholinergic anti-inflammatory system limits T cell infiltration into the neurodegenerative CNS, but cannot counteract complex CNS inflammation. *Neurobiol. Dis.*, 35, 24-31.
32. Deonarain,R., Verma,A., Porter,A.C., Gewert,D.R., Platanias,L.C. and Fish,E.N. (2003) Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 100, 13453-13458.
33. Zietara,N., Lyszkiewicz,M., Gekara,N., Puchalka,J., Dos Santos,V.A., Hunt,C.R., Pandita,T.K., Lienenklaus,S. and Weiss,S. (2009) Absence of IFN-beta impairs antigen presentation capacity of splenic dendritic cells via down-regulation of heat shock protein 70. *J. Immunol.*, 183, 1099-1109.
34. Rangachari,M. and Kuchroo,V.K. (2013) Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J. Autoimmun.*, 45, 31-39.
35. Targoni,O.S., Baus,J., Hofstetter,H.H., Hesse,M.D., Karulin,A.Y., Boehm,B.O., Forsthuber,T.G. and Lehmann,P.V. (2001) Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 166, 4757-4764.
36. Zozulya,A.L. and Wiendl,H. (2008) The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 4, 384-398.
37. Graber,J.J., McGraw,C.A., Kimbrough,D. and Dhib-Jalbut,S. (2010) Overlapping and distinct mechanisms of action of multiple sclerosis therapies. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 112, 583-591.
38. de,A.C., Aristimuno,C., de,L.H., V, Martinez-Gines,M.L., Bartolome,M., Arroyo,R., Navarro,J., Gimenez-Roldan,S., Fernandez-Cruz,E. and Sanchez-Ramon,S. (2007) Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 182, 204-211.
39. Liu,Y., Carlsson,R., Comabella,M., Wang,J., Kosicki,M., Carrion,B., Hasan,M., Wu,X., Montalban,X., Dziegiel,M.H. *et al.* (2014) FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nat. Med.*, 20, 272-282.
40. Shinohara,M.L., Kim,J.H., Garcia,V.A. and Cantor,H. (2008) Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity*, 29, 68-78.

41. Durelli,L., Conti,L., Clerico,M., Boselli,D., Contessa,G., Ripellino,P., Ferrero,B., Eid,P. and Novelli,F. (2009) T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.*, 65, 499-509.
42. Guo,B., Chang,E.Y. and Cheng,G. (2008) The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J. Clin. Invest.*, 118, 1680-1690.
43. Martin-Saavedra,F.M., Gonzalez-Garcia,C., Bravo,B. and Ballester,S. (2008) Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4+ cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. *Mol. Immunol.*, 45, 4008-4019.
44. Ramgolam,V.S., Sha,Y., Jin,J., Zhang,X. and Markovic-Plese,S. (2009) IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J. Immunol.*, 183, 5418-5427.
45. Liston,A., Kohler,R.E., Townley,S., Haylock-Jacobs,S., Comerford,I., Caon,A.C., Webster,J., Harrison,J.M., Swann,J., Clark-Lewis,I. *et al.* (2009) Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J. Immunol.*, 182, 3121-3130.
46. Reboldi,A., Coisne,C., Baumjohann,D., Benvenuto,F., Bottinelli,D., Lira,S., Uccelli,A., Lanzavecchia,A., Engelhardt,B. and Sallusto,F. (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.*, 10, 514-523.
47. Yamazaki,T., Yang,X.O., Chung,Y., Fukunaga,A., Nurieva,R., Pappu,B., Martin-Orozco,N., Kang,H.S., Ma,L., Panopoulos,A.D. *et al.* (2008) CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J. Immunol.*, 181, 8391-8401.
48. Hesse,D., Krakauer,M., Lund,H., Sondergaard,H.B., Limborg,S.J., Sorensen,P.S. and Sellebjerg,F. (2011) Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon-beta in multiple sclerosis? *Eur. J. Neurol.*, 18, 266-272.
49. Zhang,L., Yuan,S., Cheng,G. and Guo,B. (2011) Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS. One.*, 6, e28432.
50. Kennedy,M.K., Torrance,D.S., Picha,K.S. and Mohler,K.M. (1992) Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J. Immunol.*, 149, 2496-2505.
51. Renno,T., Lin,J.Y., Piccirillo,C., Antel,J. and Owens,T. (1994) Cytokine production by cells in cerebrospinal fluid during experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *J. Neuroimmunol.*, 49, 1-7.
52. Steinman,L. (2007) A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.*, 13, 139-145.

53. Naves,R, Singh,S.P., Cashman,K.S., Rowse,A.L., Axtell,R.C., Steinman,L., Mountz,J.D., Steele,C., De,S.P. and Raman,C. (2013) The interdependent, overlapping, and differential roles of type I and II IFNs in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 191, 2967-2977.
54. Wang,C., Wang,C., Dong,H., Wu,X.M., Wang,C., Xia,F., Li,G., Jia,X., He,S., Jiang,X. *et al.* (2013) Immune-related GTPase Irgm1 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting the disruption of blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier. *Mol. Immunol.*, 53, 43-51.
55. Xu,H., Wu,Z.Y., Fang,F., Guo,L., Chen,D., Chen,J.X., Stern,D., Taylor,G.A., Jiang,H. and Yan,S.S. (2010) Genetic deficiency of Irgm1 (LRG-47) suppresses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting apoptosis of activated CD4+ T cells. *FASEB J.*, 24, 1583-1592.
56. Cheng,W. and Chen,G. (2014) Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Mediators. Inflamm.*, 2014, 659206.
57. Hamann,J., Fiebig,H. and Strauss,M. (1993) Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J. Immunol.*, 150, 4920-4927.
58. Glatigny,S., Duhon,R., Oukka,M. and Bettelli,E. (2011) Cutting edge: loss of alpha4 integrin expression differentially affects the homing of Th1 and Th17 cells. *J. Immunol.*, 187, 6176-6179.
59. Mavrommatis,E., Fish,E.N. and Plataniias,L.C. (2013) The schlafen family of proteins and their regulation by interferons. *J. Interferon Cytokine Res.*, 33, 206-210.
60. Stoecker,K., Weigelt,K., Ebert,S., Karlstetter,M., Walczak,Y. and Langmann,T. (2009) Induction of STAP-1 promotes neurotoxic activation of microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 121-126.
61. Teige,I., Liu,Y. and Issazadeh-Navikas,S. (2006) IFN-beta inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs. *J. Immunol.*, 177, 3542-3553.
62. Prinz,M., Schmidt,H., Mildner,A., Knobloch,K.P., Hanisch,U.K., Raasch,J., Merkler,D., Detje,C., Gutcher,I., Mages,J. *et al.* (2008) Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity.*, 28, 675-686.
63. Comabella,M., Lunemann,J.D., Rio,J., Sanchez,A., Lopez,C., Julia,E., Fernandez,M., Nonell,L., Camina-Tato,M., Deisenhammer,F. *et al.* (2009) A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain*, 132, 3353-3365.