

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM.

LUDWIKA HIRSZFELDA WE WROCŁAWIU

POLSKA AKADEMIA NAUK

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr. inż. Edyta Szurek

Rola czynnika transkrypcyjnego Aire w różnicowaniu
autoreaktywnych i regulatorowych limfocytów T CD4⁺.

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Leszek Ignatowicz

Praca zrealizowana w

Institute for Biomedical Sciences

Georgia State University

Wrocław, 2022

Chciałabym złożyć serdeczne podziękowania,

Profesorowi Leszkowi Ignatowiczowi za wsparcie podczas prowadzonych badań, przekazaną wiedzę, zaufanie i wyrozumiałość.

Moim najbliższym:

Mężowi oraz Dzieciom za wiarę i cierpliwość w okresie realizacji pracy i Rodzicom za wsparcie duchowe.

Dr Annie Cebuli za wspólny czas, pomoc w realizowaniu projektu i wsparcie w pracy laboratoryjnej.

Spis Treści

STRESZCZENIE	5
SUMMARY	7
WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	12
1.1. Nieswoista odpowiedź immunologiczna.....	12
1.2. Swoista odpowiedź immunologiczna.....	14
1.2.1. Limfocyty T.....	15
1.2.1.1. Dojrzewanie i różnicowanie limfocytów T	15
1.2.1.2. Powstanie kompleksu receptora limfocytów T (TCR).....	16
1.2.1.3. Selekcja pozytywna	17
1.2.1.4. Selekcja negatywna	17
1.2.2. Limfocyty B	18
1.3. Tolerancja immunologiczna.....	18
1.3.1. Centralna tolerancja immunologiczna limfocytów T	19
1.3.1.2. AIRE	21
1.3.1.3. Modele myszy z nokautem genu AIRE.....	25
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.....	29
3. MATERIAŁY I METODY.....	30
3.1. Materiały	30
3.1.1. Odczynniki chemiczne	30
3.1.2. Bufory, roztwory standardowe i pożywki hodowlane.	32
3.1.3. Przeciwciała	41
3.1.4. Linie komórek eukariotycznych.....	42
3.1.4.1. Komórki BW5147	42
3.1.5. Myszy	42
3.1.5.1. Myszy dostępne komercyjnie	42

3.1.5.2.	Myszy transgeniczne	42
3.2.	Metody	46
3.2.1.	Izolacja limfocytów T z narządów limfatycznych	46
3.2.2.	Izolacja limfocytów CD4 ⁺ z błaszki właściwej jelita grubego	47
3.2.3.	Izolacja komórek z prostaty, jąder i jajników	48
3.2.4.	Izolacja komórek z wątroby	48
3.2.5.	Izolacja komórek ze szpiku kostnego i ich różnicowanie w kierunku komórek dendrytycznych.....	49
3.2.6.	Izolacja surowicy z krwi obwodowej.....	50
3.2.7.	Analiza histologiczna	50
3.2.8.	Analiza markerów powierzchniowych metodą fluorymetrii przepływowej	50
3.2.9.	Izolacja limfocytów za pomocą cytometru przepływowego.....	51
3.2.10.	Hodowla komórek eukariotycznych.....	52
3.2.10.1.	Hodowla ustalonych linii komórkowych.....	52
3.2.10.2.	Hodowla limfocytów CD4 ⁺	52
3.2.10.3.	Krioprezewacja komórek	52
3.2.10.4.	Rozmrażanie komórek.....	53
3.2.11.	Produkcja hybrydom limfocytów T CD4 ⁺	53
3.2.12.	Przygotowanie lizatu białkowego z prostaty, wątroby i płuc.....	54
3.2.13.	Testowanie odpowiedzi immunologicznej hybrydom	55
3.2.14.	Test immunoenzymatyczny ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) na obecność przeciwciał IgG w surowicy.....	56
3.2.15.	Analiza cytokin w surowicy za pomocą testu LegendPlex	57
3.2.16.	Izolacja genomowego DNA	57
3.2.17.	Izolacja RNA.....	58
3.2.18.	Elektroforeza analityczna i preparatywna	58
3.2.19.	Oczyszczanie produktu reakcji PCR.....	58

3.2.20.	Izolacja DNA z żelu agarozowego.....	59
3.2.21.	Oznaczanie ilości DNA i RNA metodą spektrofotometryczną.....	59
3.2.22.	Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT).....	59
3.2.23.	Reakcja łańcuchowej polimerazy.....	60
3.2.24.	Przygotowanie biblioteki DNA do sekwencjonowania metodą Illumina	61
3.2.25.	Sekwencjonowanie metodą Illumina	63
3.2.26.	Analiza i obróbka danych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania metodą Illumina	64
3.2.27.	Analiza statystyczna.....	65
4.	WYNIKI	66
4.1.	Analiza kolonii pod kątem choroby autoimmunologicznej	66
4.2.	Analiza fenotypowa grasicy	68
4.3.	Analiza sekwencji populacji grasiczych limfocytów	69
4.4.	Strategia bramkowania.....	73
4.5.	Analiza fenotypowa węzłów limfatycznych i narządów nielimfoidalnych	75
4.6.	Analiza histologiczna	101
4.7.	Analiza sekwencji CDR3 receptora TCR w narządach nielimfoidalnych	102
4.8.	Odpowiedź hybrydom na stymulację TSA	106
5.	Dyskusja.....	110
6.	Literatura.....	123

STRESZCZENIE

Czynnik transkrypcyjny AIRE koduje antygeny tkankowo-specyficzne, które prezentowane są dojrzewającym tymocytom podczas ich edukacji grasiczej. Zaburzona ekspresja AIRE prowadzi do szeregu niedoborów immunologicznych objawiających się indukcją autoreaktywnych limfocytów T, naciekami limfocytarnymi do wielu tkanek, np. wątroby czy prostaty, co powoduje stany zapalne, ekspresją auto-przeciwciał oraz zaburzeniem płodności. W celu badań nad ludzkimi chorobami APCED oraz APS1 wynikającymi z zaburzonej ekspresji AIRE, stworzono szereg modeli mysich, z których jeden wykorzystano w niniejszej rozprawie.

Założeniem pracy było pokazanie wpływu zaburzonej ekspresji AIRE na rozwój i funkcję limfocytów pomocniczych CD4⁺, włączając w to limfocyty regulatorowe (Treg) CD4⁺Foxp3⁺. W tym celu skrzyżowano mysz z mutacją w genie *Aire* (*Aire*^{ko}) z myszą TCR^{mini} posiadającą ograniczony repertuar TCR oraz myszami reporterowymi Foxp3^{hCD2} (hCD2 znakuje limfocyty Treg) oraz Nur77GFP (poziom ekspresji GFP odpowiada aktywacji limfocyta T w odpowiedzi na antygen), uzyskując model myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini}Foxp3^{hCD2}Nur77GFP. Komórki te badano w grasicy, węzłach chłonnych, wątrobie, prostatie i jelicie grubym. W badaniach wykorzystano szereg technik, włączając w to cytometrię przepływową, sekwencjonowanie wysokoprzepustowe i produkcję hybrydom z limfocytów CD4⁺.

Niniejsze badania potwierdziły wiele doniesień naukowych (m. in. obecność autoreaktywnych immunoglobulin w surowicy myszy *Aire*^{ko}, zaburzenia w ekspresji wielu cytokin, nacieki limfocytarne do wielu narządów (przede wszystkim do wątroby)). W toku badań ustalono, iż zmiany w repertuarze receptorów limfocytów T w grasicy nie są specyficzne dla receptorów dominujących w limfocytach T CD4⁺ zarówno w populacji Foxp3⁺ jak i Foxp3⁻. Analizując sekwencje TCR w narządach nielimfoidalnych wytypowano potencjalnie autoreaktywne kłony tkankowo-specyficzne. Obecność zmian w repertuarze TCR wynikających z mutacji w genie *Aire* skutkowało zwiększonym powinowactwem do własnych antygenów gospodarza, naciekami limfocytarnymi i podwyższoną aktywacją i proliferacją limfocytów CD4⁺. Pokazano, że zaburzenie w prezentacji antygenów w rozwoju grasiczym skutkują zmniejszoną funkcją limfocytów Treg, badaną pod kątem ekspresji antygenów PD1 oraz CD73. Skutkowało to zmniejszoną kontrolą autoreaktywnych limfocytów efektorowych CD4⁺Foxp3⁻ oraz infiltracją

wielu organów. W głównej mierze atak tych komórek skierowany był przeciwko antygenom wątrobowym. Potwierdzono to zwiększoną aktywacją (mierzoną za pomocą CD44, CD62L oraz Nur77GFP), a także obecnością limfocytów CD4⁺ ekspresjonujących TCR rozpoznające antygeny wątrobowe, ale również autoreaktywnych, co pokazano z wykorzystaniem hybrydom. Dalsze badanie specyficzności reakcji autoimmunologicznej w tym modelu będzie prowadzone z wykorzystaniem myszy CNS^{mut}, w której efekt wynikający ze zwiększonej obecności komórek zaktywowanych nie będzie hamowany obecnością komórek pTreg.

Podsumowując, wykorzystanie nowego modelu mysiego Aire^{ko}TCR^{mini}Foxp3^{hCD2}Nur77GFP pozwoliło na ustalenie zmian w repertuarze TCR limfocytów T efektorowych i regulatorowych oraz ustalenie wpływu zaburzenia prezentacji własnych antygenów gospodarza kodowanych przez AIRE na rozwój choroby autoimmunologicznej manifestującej się zapaleniem prostaty i wątroby.

SUMMARY

AIRE transcription factor encodes tissue-specific antigens that are presented to thymocytes during their development. Perturbed expression of AIRE leads to many immunological deficiencies leading to activation of autoreactive T cells, their invasion to many organs, including liver and prostate, that induce inflammation, expression of auto-antibodies and infertility. Numerous mouse models have been developed in order to study APCED and APS1, human syndromes of AIRE deficiency, of which one was used in this dissertation.

The purpose of these studies was to address the AIRE deficiency on the development and function of helper T cells, including CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T lineage (Tregs). For this purpose, Aire^{ko} mouse was crossed with TCR^{mini} mouse that expresses a limited TCR diversity, and with reporter animals, Foxp3^{hCD2} (where hCD2 is expressed in the context of Foxp3 expression) and Nur77GFP (where GFP reports T cell activation in response to an antigen in a dose-dependent manner). This new mouse model Aire^{ko}TCR^{mini}Foxp3^{hCD2}Nur77GFP was used to study helper T cells in numerous organs, including the thymus, lymph nodes, liver, prostate, and large intestine. These studies utilized many techniques and technologies, including flow cytometry, high throughput sequencing, and the production of hybridomas from CD4⁺ cells.

The data obtained in this dissertation confirmed a number of published data (i.e., the presence of autoreactive immunoglobulins in the serum of Aire^{ko} mice, and invasion of T cells to several organs (with the liver being the most prominent one)). The studies showed that perturbations in TCR repertoire CD4⁺Foxp3⁻ and Foxp3⁺ cells in thymus were not directed towards dominant clones. Analysis of TCR sequences from non-lymphoid organs allowed to select limited number of T cell receptors that might be responsible for tissue damage directed towards TSAs. These changes resulted in the elevated affinity of TCRs to auto-antigens, increased presence of T lymphocytes in many organs, and enhanced activation and proliferation of CD4⁺ T cells. At the same time, reduced presentation of autoantigens to developing Tregs resulted in their decreased suppressive function and control of activated CD4⁺Foxp3⁻ autoreactive T cells, which was measured by their expression of CD73 and PD1. Elevated expression of CD44 and Nur77 and decreased expression of CD62L by effector T cells, as well as the increased frequency of CD4⁺ hybridomas recognizing tissue-specific auto-antigens, but also presence of autoreactive clones,

confirmed these data. Further experiments will be performed using mouse CNS^{mut} mouse model, where the effect of increased number of activated lymphocytes will not be overshadowed by presence of pTregs.

In conclusion, the novel mouse model Aire^{ko}TCR^{mini}Foxp3^{hCD2}Nur77GFP allowed deciphering the changes in helper T cells leading to the induction of autoimmune disease in mice with a mutation in AIRE transcription factor, especially manifested by inflammation in prostate and liver.

WYKAZ SKRÓTÓW

Aire	regulator autoimmunologiczny (ang. autoimmune regulator)
APECED	autoimmunologiczna polinendokrynopatia-kandydoza-dystrofia ektodermalna (ang. autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)
APC	komórki prezentujące antygen (np. komórki dendrytyczne) (ang. antigen presenting cells)
APS1	(ang. autoimmune polyglandular syndrome type 1)
CD3	białka kompleksu TCR/CD3, receptora dla antygeny na limfocytach T
CD4	koreceptor na limfocytach T pomocniczych
CD8	koreceptor na limfocytach T cytotoksycznych
CDR	region determinujący dopasowanie (ang. complementarity determining region)
DN	tymocyt podwójnie negatywny (CD4 ⁻ CD8 ⁻) (ang. double negative)
DNaza I	Deoksyribonukleaza I
dNTP	mieszanina deoksyrybonukleotydów (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DP	tymocyt podwójnie pozytywny (CD4 ⁺ CD8 ⁺) (ang. double positive)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
EtOH	etanol
FACS	cytofluorymetria przepływowa (ang. fluorescence-activated cell sorting)
FBS	bydłęca surowica (ang. fetal bovine serum)
Foxp3	czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla komórek Treg (od ang. forkhead box p3)
Foxp3 ^{hCD2+}	komórki regulatorowe CD4 ⁺ z myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{hCD2}
Foxp3 ^{hCD2-}	komórki efektorowe CD4 ⁺ z myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{hCD2}

GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HBSS	płyn Hanksa
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukina
ILC	nieswoiste komórki limfoidalne ILC (ang. innate lymphoid cells)
IgG	immunoglobulina G
iTreg (lub aTreg)	komórka CD4+Foxp3-, w której za pomocą IL-2 i TGF- β wyindukowana została ekspresja czynnika Foxp3 (ang. i=induced lub a=adaptive)
kpz	tysiąc par zasad
LPS	lipopolisacharyd
MHC	główny układ zdolności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
NaOAc	octan sodu (CH ₃ COONa)
NK	naturalne komórki cytotoksyczne (ang. natural killer)
nt	nukleotyd
PAMP	wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular patterns)
PBS	bufor fosforanowy z dodatkiem NaCl (ang. phosphate buffered saline)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PEG	glikol polietylenowy
PRR	receptory rozpoznające patogeny (ang. pattern recognition receptors)
pz	para zasad

RAG	gen aktywujący rekombianację (ang. r ecombination a ctivating g ene)
SP	tymocyt pojedynczo pozytywny (CD4 ⁺ lub CD8 ⁺) (ang. s ingle p ositive)
TCR	receptor antygenowy limfocytów T (ang. T -cell receptor)
TCR α^{ko}	mysz limfopeniczna, w której brak jest limfocytów T
TCR $^{\text{mini}}$	mysz z ograniczonym repertuarem TCR
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu β (ang. t ransforming g rowth f actor β)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów α (ang. Tumor necrosis factor α)
Treg	limfocyt T regulatorowy o fenotypie CD4 ⁺ Foxp3 ⁺
Tris	Tris(hydroksymetylo)aminoetan
WT	typ dziki (od ang. wild type)

1. WSTĘP

Układ immunologiczny to zespół komórek, związków i procesów, który chroni organizm przed patogenami o pochodzeniu zewnętrznym (wirusowym, bakteryjnym, pasożytniczym, grzybiczym), autologicznym (nowotwory) oraz od toksyn. W toku ewolucji organizmy wielokomórkowe atakowane przez różnego rodzaju mikroorganizmy, w odpowiedzi wytworzyły szereg mechanizmów obronnych wykorzystywanych do dziś. Pierwszą linią obrony, która utrzymuje mikroorganizmy poza ustrojem, są bariery zewnętrzne, w postaci np. skóry, rogówki, błon śluzowych układów oddechowego, pokarmowego i moczowo-płciowego. Niektóre z tych barier odgrywają również czynną rolę odpornościową, np. keratynocyty w skórze wydzielają peptydy przeciwbakteryjne (defensyny), a gruczoły potowe i łojowe wydzielają substancje hamujące rozwój mikroorganizmów (np. kwas mlekowy czy kwasy tłuszczowe). Błony śluzowe układów oddechowego, pokarmowego i moczowo-płciowego również zawierają substancje bakteriobójcze, np. lizozym, laktoferyna czy wydzielnicza immunoglobulina A. Ponadto wiele komórek układu odpornościowego, jak komórki tuczne, limfocyty śród nabłonkowe, czy komórki Langerhansa (pochłaniające i przetwarzające antygeny), jest zlokalizowanych w skórze. W rogówce znajdują się, doprowadzane przez naczynia włosowate rąbka, neutrofile, które w procesie fagocytozy neutralizują mikroorganizmy. W przypadku przełamania bariery zewnętrznej, infekujące organizmy zwalczane są przy pomocy dwóch typów odpowiedzi immunologicznej – odpowiedzi wrodzonej (nieswoistej) i odpowiedzi nabytej (swoistej). Odpowiedź wrodzona i nabyta są mechanizmami uzupełniającymi, a braki w każdym z tych mechanizmów skutkują zwiększoną podatnością na infekcje.

1.1. Nieswoista odpowiedź immunologiczna

Pierwszą linią obrony w przypadku infekcji mikroorganizmów jest odporność nieswoista/wrodzona, która jest uruchamiana natychmiast, lub w ciągu kilku godzin, po kontakcie z patogenem. Działanie odporności wrodzonej opiera się o receptory rozpoznające wzorce, inaczej receptory rozpoznające patogeny, w skrócie PRR (z ang. **p**attern **r**ecognition **r**eceptors), które umożliwiają ograniczonej liczbie komórek odpornościowych szybkie wykrycie i odpowiedź na

szeroką gamę patogenów, które posiadają wspólne cechy, zwane wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami, PAMP (z ang. **p**athogen **a**ssociated **m**olecular **p**atterns), jak np. składniki bakteryjnej ściany komórkowej (lipopolisacharydy – LPS) czy dwuniciowa nić RNA wytwarzana w trakcie infekcji wirusowej. Odporność nieswoista nie posiada “pamięci immunologicznej” dlatego nie rozpozna szybciej i silniej danego patogenu, jeśli dojdzie do ponownego kontaktu.

Cechą odporności nieswoistej jest szybka mobilizacja komórek układu odpornościowego do miejsca infekcji lub stanu zapalnego poprzez produkcję cytokin i chemokin (małych białek zaangażowanych w kontakt pomiędzy komórkami i ich mobilizację). We wczesnych etapach odpowiedzi na infekcję bakteryjną kluczowymi cytokinami zapalnymi są np. czynnik martwicy nowotworów TNF (ang. **t**umor **n**ecrosis **f**actor), interleukina 1 (IL-1) czy interleukina 6 (IL-6), które inicjują mobilizację komórek i lokalnie wywołują stan zapalny, powodując wyeliminowanie wielu patogenów.

W odpowiedź immunologiczną wrodzoną zaangażowany jest szereg różnego rodzaju komórek: fagocyty – komórki żerne (makrofagi i neutrofile), komórki dendrytyczne, komórki tuczne, bazofile, eozynofile, komórki NK (ang. **n**atural **k**iller) czy nieswoiste komórki limfoidalne.

Makrofagi znajdujące się w różnych tkankach w całym organizmie, w największej ilości w miejscach, w których ryzyko infekcji jest duże (płuca, jelito). W znacznych liczbach znajdują się również w tkance łącznej, w wątrobie i śledzionie. Są to komórki, które żyją długo i są jednymi z pierwszych komórek kontaktowych przy infekcji mikroorganizmów.

Neutrofile są krótko żyjącymi komórkami, które występują w dużej liczbie we krwi, ale nie występują w zdrowych tkankach. Są one szybko rekrutowane do miejsca infekcji przez aktywowane makrofagi i przez cząsteczki wydzielane przez same mikroorganizmy (np. peptydy zawierające formylometioninę).

Komórki dendrytyczne, tak jak makrofagi, również biorą udział w procesie fagocytozy i są zaangażowane w prezentację antygenów limfocytom T inicjując odpowiedź swoistą i pełniąc rolę łącznika pomiędzy odpowiedzią swoistą i nieswoistą [2].

Komórki tuczne i bazofile mają wiele wspólnych cech i są bardzo istotne w procesie inicjacji ostrej reakcji zapalnej organizmu, obserwowanej między innymi w reakcji alergicznej lub

w astmie. Komórki tuczne, ponadto, pełnią istotną funkcję w odpowiedzi na infekcję lub uraz, produkując cytokiny. Komórki tuczne najczęściej występują w tkankach okalających naczynia krwionośne jak również na powierzchni błon śluzowych, natomiast bazofile występują w układzie krwionośnym [3].

Eozynofile są granulocytami, które posiadają zdolności fagocytarne i odgrywają ważną rolę w odpowiedzi na pasożyty, które są często zbyt duże, aby ulec procesowi fagocytozy. Eozynofile również kontrolują mechanizmy uruchamiane podczas alergii i astmy [3].

Komórki NK odgrywają istotną rolę w procesie odrzucenia komórek nowotworowych i niszczenia komórek zainfekowanych przez wirusy, poprzez uwolnienie perforyn i granzymów (białek, które powodują lizę komórek docelowych) z granulek, co skutkuje indukcją apoptozy (zaprogramowywanej śmierci komórkowej) [3]. Komórki NK są również źródłem cytokiny interferon gamma (IFN- γ), która wspomaga mobilizację komórek prezentujących antygeny (ang. **antigen presenting cells, APC**) i pobudza rozwój efektywnej antywirusowej odpowiedzi immunologicznej.

Nieswoiste komórki limfoidalne ILC (ang. **innate lymphoid cells**) odgrywają rolę regulującą. W zależności od typu (np. ILC-1, ILC-2, ILC-3) produkują odpowiednie cytokiny, takie jak IFN- γ , IL-4, i IL-17, które wspomagają skierowanie właściwej odpowiedzi immunologicznej wobec specyficznego patogenu [4].

1.2. Swoista odpowiedź immunologiczna

Podstawowymi zadaniami swoistej/nabytej odpowiedzi immunologicznej są: rozpoznanie specyficznych obcych antygenów i odróżnienie ich od antygenów własnych; wytworzenie specyficznych dla danego patogenu szlaków efektorowych, mających na celów jego wyeliminowanie z organizmu, lub wyeliminowanie zainfekowanych nim komórek; wytworzenie pamięci immunologicznej, która pozwoli na szybkie usunięcie patogennego organizmu w przypadku ponownej infekcji [5]. Istotną cechą tej odpowiedzi jest zdolność do rozwinięcia pamięci immunologicznej, która umożliwia organizmowi szybszą i bardziej gwałtowną odpowiedź podczas ponownej ekspozycji na dany patogen. Swoista odpowiedź immunologiczna jest w związku z tym podstawą skutecznej immunizacji przeciwko chorobom zakaźnym.

Komórkami charakterystycznymi dla odpowiedzi swoistej są specyficzne dla antygeny limfocyty T, aktywowane do proliferacji poprzez komórki prezentujące antygen (APC) i limfocyty B, które różnicują w komórki plazmatyczne zdolne do produkcji przeciwciał.

1.2.1. Limfocyty T

1.2.1.1. Dojrzewanie i różnicowanie limfocytów T

Rozwój i dojrzewanie limfocytów T u ssaków rozpoczyna się od hematopoetycznych komórek macierzystych HSC (ang. **haematopoietic stem cells**) w wątrobie płodowej, które następnie różnicują w szpiku kostnym do multipotencjalnych komórek progenitorowych. Część z tych komórek inicjuje transkrypcję genów aktywujących rekombinację RAG1 i RAG2 (ang. **recombination activating gene**) i staje się zagruntowanymi komórkami progenitorowymi limfopoezy, a następnie wspólnymi progenitorowymi komórkami limfopoezy CLP (ang. **common lymphoid progenitors**). Niewielki odsetek komórek pluripotencjalnych migruje do grasicy i różnicuje we wczesne komórki progenitorowe grasicy ETP (ang. **early thymic progenitors**) [6].

Komórki ETP są multipotencjalne, stanowią nieliczną heterogenną populację i mają zdolność do intensywnej proliferacji. Mogą wygenerować limfocyty T, limfocyty B, komórki NK, komórki mieloidalne i dendrytyczne (DC). Komórki ETP, kierowane przez chemokiny CCL19 i CCL21, przedostają się do grasicy poprzez połączenie korowo-rdzeniowe. W zrębie grasicy komórki ETP wchodzi w kontakt ze znaczną liczbą ligandów do receptorów Notch i czynników wzrostu (np. IL-7), które inicjują ich różnicowanie i namnażanie [7].

W korze grasicy komórki ETP różnicują do komórek podwójnie negatywnych DN (ang. **double negative**), które nie wykazują ekspresji CD4 i CD8. Stadium DN2 rozwoju limfocytów inicjowane jest, kiedy komórki nabywają receptory CD25⁺ i CD44⁺. Na tym etapie komórki tracą zdolność do przekształcenia się w komórki B i zaczynają wykazywać ekspresję białek niezbędnych do późniejszej rearanzacji genów receptora limfocytów T, TCR (jak RAG1 i RAG2). W komórkach tych rozpoczyna się również ekspresja białek niezbędnych do wygenerowania i szlaku sygnałowego TCR, takich jak łańcuchy CD3, czy kinazy i fosfatazy (LCK, ZAP70, LAT) [8]. Na tym etapie (DN3) komórki mogą przejść dwie drogi różnicowania. Ekspresja łańcucha β ukierunkowuje tymocyty w kierunku komórek ekspresjonujących $\alpha\beta$ TCR (te limfocyty stanowią

większość (>90%) obwodowych komórek T), natomiast ekspresja łańcucha δ , różnicuje tymocyty w kierunku $\gamma\delta$ TCR (te komórki znajdowane są głównie w jelicie, skórze, płucach; ich główną rolą jest odpowiedź na mikroby i metabolity przez nie produkowane i w przeciwieństwie do komórek $\alpha\beta$ TCR, rozpoznają głównie antygeny lipidowe) [9]. Ekspresja łańcucha β receptora limfocytów T na etapie DN3, pociąga za sobą jednoczesną ekspresję cząsteczek CD4 i CD8, powodując w ten sposób przekształcenie komórek w podwójnie pozytywne (DP, ang. **double positive**), które są najbardziej dominującą populacją w grasicy [9].

1.2.1.2. Powstanie kompleksu receptora limfocytów T (TCR)

W czasie dojrzewania limfocyty T nabywają receptor (TCR), który jest w stanie rozpoznawać specyficzne antygeny. TCR składa się z dwóch zmiennych łańcuchów wiążących antygen - $\alpha\beta$ lub $\gamma\delta$, powiązanych z dodatkowymi niezmiennymi białkami (łańcuchy CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$, i CD247 $\zeta\zeta$), które są niezbędne do zainicjowania sygnału w momencie wiązania TCR do antygeny [10].

$\alpha\beta$ -TCR nie rozpoznaje antygenów w naturalnej postaci, ale rozpoznaje liniowe peptydy, które zostały przeprocesowane i zaprezentowane w kontekście MHCI lub MHCII. Peptydy prezentowane przez MHCI są raczej małe (8-10 aminokwasów) i mają pochodzenie wewnątrzkomórkowe, natomiast prezentowane przez MHCII są znacznie dłuższe (13-25 aminokwasów) i zazwyczaj są pochodzenia zewnątrzkomórkowego. $\alpha\beta$ -TCR komórek NK i $\gamma\delta$ -TCR mogą rozpoznawać glikolipidy i fosfolipidy prezentowane przez cząsteczki CD1.

Łańcuchy α i β receptora limfocytów T są polimorficzne, co wspomaga rozpoznawanie znacznej liczby różnych peptydów. Każdy łańcuch składa się z segmentu V (ang. **variable**), C (ang. **constant**) i zlokalizowanego pomiędzy nimi segmentu J (ang. **joining**). Łańcuch β posiada dodatkowo segment D (ang. **diversity**). Każdy z segmentów V posiada trzy zmienne sektory zwane regionami determinującymi komplementarność, CDR-1, -2 i -3 (ang. **complementarity-determining regions**) i jest zdolny do generowania unikalnych i zróżnicowanych receptorów, które będą miały razem zdolność do rozpoznawania szerokiej gamy antygenów. CDR3 α i β wiążą się do środkowej części prezentowanego peptydu. CDR3 jest najbardziej różnorodnym fragmentem TCR i jest uznawany za decydujący w procesie rozpoznania antygeny [10].

Rearanżacja genów TCR jest krytycznym procesem w trakcie rozwoju limfocytów T. Proces ten zachodzi niezależnie dla każdego z łańcuchów, a zaczyna się rekombinacją genów łańcucha β . Prawidłowa rearanżacja łańcucha β powoduje indukcję tzw. wyłączenia allelicznego, co prowadzi do zablokowania rearanżacji genów mogących kodować inny łańcuch β receptora TCR. W dalszych etapach następuje indukcja receptora α TCR oraz antygenów powierzchniowych CD8 lub CD4 w odpowiedzi na rozpoznanie peptydów prezentowanych w kontekście MHC klasy I lub klasy II [11].

1.2.1.3. Selekcja pozytywna

Na etapie podwójnie pozytywnym komórki z funkcjonalnymi receptorami limfocytów T, przechodzą test na powinowactwo do kompleksów peptyd-MHC (ang. **m**ajor **h**istocompatibility complex - główny kompleks zgodności tkankowej). W tym celu komórki epitelialne kory grasicy prezentują swoje peptydy w kontekście klasy I (MHCI) i klasy II (MHCII); przeżywają te limfocyty, które rozpoznają kompleks peptyd-MHC. Komórki podwójnie pozytywne, które są niezdolne do wiązania kompleksów poddawane są apoptozie. Rozpoznanie antygeny w kontekście klasy II MHC indukuje ekspresję ThPOK, co powoduje represję innego czynnika transkrypcyjnego, Runx3, i różnicuje tymocyty w kierunku komórek pomocniczych CD4. Jeśli zaś TCR rozpozna antygen prezentowany przez klasę I MHC, ThPOK nie ulega ekspresji i komórka różnicuje się w kierunku limfocytu cytotoksycznego CD8 dzięki niezaburzonej ekspresji Runx3. Pozytywna selekcja umożliwia zróżnicowanie komórek DP do populacji pojedynczo-pozytywnych SP (ang. **s**ingle **p**ositive) [12].

1.2.1.4. Selekcja negatywna

Pozytywnie wyselekcjonowane tymocyty są następnie testowane pod kątem powinowactwa TCR do własnych antygenów (autoantygenów). Komórki, które silnie rozpoznają autoantygeny prezentowane przez komórki epitelialne rdzenia grasicy, są eliminowane - w przeciwnym razie mogłyby indukować odpowiedź do tkanek gospodarza i wywoływać autoagresję (ang. autoimmunity). W toku pozytywnej i negatywnej selekcji, apoptozie ulega około 98% tymocytów. Ekspresja własnych antygenów gospodarza w grasiczych komórkach prezentujących antygen indukowana jest przez czynnik transkrypcyjny Aire (ang. **a**utoimmune **r**egulator) [13].

Zaburzenia w ekspresji AIRE są podstawą wielu chorób autoimmunologicznych wynikających z wadliwej selekcji grasiczych tymocytów.

1.2.2. Limfocyty B

Limfocyty B, tak jak limfocyty T, powstają ze wspólnej komórki progenitorowej, jednak dojrzewają i różnicują się w szpiku kostnym. Podobnie jak limfocyty T, komórki B rearanżują receptor antygenowy (w tym przypadku jest to BCR, ang. B cell receptor) przy udziale białek RAG. W przeciwieństwie jednak do TCR, receptor antygenowy limfocytów B może ulec ponownej rearanżacji oraz wprowadzeniu dodatkowej różnorodności przez indukcję hipermutacji somatycznych, przez co komórka unika śmierci w wyniku apoptozy, jeśli zrearanżuje BCR o odpowiednim powinowactwie do antygeny. Powierzchniowe BCR stanowią immunoglobuliny klasy M oraz D (IgM oraz IgD), które mogą ulec zmianie w inne klasy (IgG, IgA, IgE) przy udziale limfocytów CD4⁺ nazywanych limfocytami grudkowymi Tfh (ang. follicular CD4⁺ T cells). Terminalnym stadium limfocytów B są komórki plazmatyczne charakteryzujące się brakiem (lub niską ekspresją) powierzchniowych receptorów antygenowych, które wędrują do szpiku kostnego, i których główną rolą jest produkcja dużej ilości przeciwciał.

Ponieważ tematem niniejszej pracy jest „Rola czynnika transkrypcyjnego Aire w różnicowaniu autoreaktywnych i regulatorowych limfocytów T CD4⁺” we wstępie pominięto szczegółowy opis rozwoju limfocytów B jak i tolerancji immunologicznej wynikającej z ich obecności.

1.3. Tolerancja immunologiczna

Podstawą działania swoistej odpowiedzi immunologicznej opartej o odpowiedź na antygeny są wspomniane wyżej dwa typy komórek – limfocyty T i limfocyty B. Limfocyty T sterują odpowiedzią immunologiczną zarówno pośrednio, poprzez zapewnienie rozpuszczalnych i powiązanych z błonami sygnałów, które promują przetrwanie, namnożenie i różnicowanie limfocytów B (produkujących przeciwciała wspierające prawidłowo działającą odpowiedź humoralną), limfocytów CD8 (poprzez ekspresję IL-2, a także inne szlaki sygnałowe, np. 4-1BB-4-1BBL) jak również bezpośrednio poprzez zabijanie obcych i zainfekowanych komórek przy zastosowaniu komórkowych i rozpuszczalnych pośredników. Limfocyty T rozpoznają obce

antygeny poprzez unikalny i zróżnicowany zestaw receptorów (TCR – z ang. **T cell receptor**), które mają na celu pośredniczenie w odpowiedzi immunologicznej organizmu bez rozpoznania własnych antygenów gospodarza.

Tolerancja immunologiczna rozpoczyna się podczas rozwoju limfocytów T w grasicy i B w szpiku kostnym. Mechanizmy tolerancji, zachodzące podczas dojrzewania limfocytów nazywane są „tolerancją centralną”. Ponieważ nie wszystkie antygeny wymagające neutralności ze strony układu immunologicznego są obecne podczas rozwoju limfocytów, istnieją dodatkowe mechanizmy „tolerancji obwodowej” odpowiedzialne za tolerancję do antygenów obwodowych jak np. antygenów pokarmowych. Centralna i obwodowa tolerancja są niezbędne w celu uniknięcia patologicznej reakcji autoimmunologicznej [14].

1.3.1. Centralna tolerancja immunologiczna limfocytów T

Mechanizm centralnej tolerancji kształtowany jest w grasicy, pierwotnym organie limfatycznym, gdzie niedojrzałe limfocyty T przechodzą przez szereg procesów, które kształtują je w dojrzałe komórki rozpoznające obce antygeny z jednoczesnym zachowaniem tolerancji wobec antygenów własnych. Dojrzewanie limfocytów T przebiega w dwóch anatomicznych fragmentach grasicy – korze i rdzeniu [15]. Obie części grasicy charakteryzuje obecność wyspecjalizowanych komórek nabłonkowych, które zapewniają mikrośrodowisko do rozwoju i różnicowania limfocytów T. Komórki nabłonkowe kory grasicy niezbędne są do wczesnych etapów rozwoju, których skutkiem jest pozytywna selekcja funkcjonalnych limfocytów T [12]. Komórki nabłonkowe rdzenia grasicy odgrywają główną rolę podczas negatywnej selekcji autoreaktywnych komórek oraz podczas powstawania grasiczych limfocytów T regulatorowych (Treg) [16-18], są więc kluczowe w rozwoju mechanizmu centralnej tolerancji. Wśród nich znajdują się unikalne komórki, charakteryzujące się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Aire (**AutoImmune REgulator**) [13, 19], który reguluje prezentację tkankowo swoistych auto-antygenów podczas negatywnej selekcji.

1.3.1.1.1. Rozwój limfocytów regulatorowych (Treg)

Jak opisano powyżej, centralny mechanizm tolerancji eliminuje większość dojrzewających tymocytów, nie jest jednak w 100% skuteczny, czego dowodem jest istnienie chorób autoimmunologicznych, takich jak stwardnienie rozsiane czy cukrzyca typu 1. Ostatnia publikacja

z naszego laboratorium wskazuje, że centralna tolerancja może „przepuszczać” nawet 30% limfocytów z autoreaktywnymi TCR [20]. Najważniejszym mechanizmem tolerancji obwodowej są tzw. limfocyty T regulatorowe (Treg). Są to komórki pomocnicze CD4, które ekspresjonują łańcuch alfa receptora dla interleukiny 2 (IL2), czyli antygen CD25 [21]. Ponieważ CD25 ulega ekspresji we wszystkich limfocytach T po ich aktywacji przez kompleks TCR-MHC:antygen, obecnie Foxp3 (białko scurfina) uznawany jest za najlepszy marker komórek Treg (inne zaproponowane np. GITR czy CTLA4 również ulegają ekspresji w zaktywowanych limfocytach CD4). Uważa się, że komórki Treg ekspresjonują TCR o pośrednim powinowactwie do autoantygenów, poniżej siły sygnału indukującego negatywną selekcję [22]. Ekspresja Foxp3 ratuje te tymocyty przed apoptozą indukowaną w procesie selekcji negatywnej.

Tregi wykazują właściwości supresorowe i odpowiedzialne są za hamowanie odpowiedzi immunologicznej poprzez szereg mechanizmów (np. (1) wydzielają IL-10 i TGF- β , cytokiny o własnościach immunosupresyjnych, (2) wydzielają granzym B, który indukuje apoptozę (poprzez współpracę z perforyną i aktywację szlaku kaspazy 3) w komórkach, które Tregi hamują, (3) modulują dojrzewanie komórek dendrytycznych i ekspresję MHCII i białek kostymulujących (CD80 i CD86)) [23].

1.3.1.1.2. Pozagrasicze różnicowanie limfocytów T regulatorowych (Treg)

Komórki Treg jak wszystkie limfocyty T dojrzewają w grasicy i są określane jako tTreg (ang. „thymic Tregs”). tTreg stanowią znakomitą większość komórek regulatorowych. Ekspresja Foxp3 może również być indukowana na obwodzie w dojrzałych limfocytach T nieregulatorowych. Suboptymalna stymulacja TCR komórek CD4⁺Foxp3⁻ w środowisku bogatym w TGF- β i kwas retinowy (RA) (ma to miejsce szczególnie w tkance jelita, gdzie komórki dendrytyczne ekspresjonujące antygen CD103, wydzielają znaczne ilości RA [24]), powoduje częściową demetylację promotora *foxp* i indukcję tego czynnika transkrypcyjnego [25]. Tregi indukowane w tkankach obwodowych, to pTreg (ang. „peripherally-induced Tregs”). Rekrutacja pTreg pomaga w zwiększeniu ilości Tregów i rozszerza różnorodność repertuaru TCR. W jelitach, pTregi wspomagają tTregi w utrzymywaniu tolerancji do antygenów bakteryjnych, zapobiegając w ten sposób zapaleniu jelita [24]. Indukcję Foxp3 można także wywołać w warunkach *in vitro*, poprzez aktywację TCR limfocytów CD4⁺Foxp3⁻ (na przykład poprzez immobilizowane na płycie

hodowlanej przeciwciała monoklonalne anti-CD3) w obecności TGF- β [26], co wzmacniane jest w obecności kwasu retinowego (RA) [27]. Tregi indukowane *ex vivo* określa się jako iTregi.

Komórki pTreg i iTreg cechuje niestabilny poziom metylacji locus *foxp*, [28]. Ostatnie doniesienia pokazują, że za proces indukcji i stabilizacji Foxp3 odpowiadają trzy elementy w locus tego genu. Są to tzw. „**conserved non-coding DNA elements**”, CNS 1, 2 i 3 [29]. Wyłączenie poszczególnych regionów CNS w modelach mysich umożliwiło zbadanie ich wpływu na indukcję i stabilność białka Foxp3. CNS1 jest miejscem łączenia Smad3 indukowanego przez sygnał płynący z TGF- β . Nokaut lub mutacja CNS1 powoduje brak indukcji Foxp3 w odpowiedzi na tą cytokinę, a więc niemożność powstawania pTregów i iTregów. Do CNS2 łączy się Cbfb/Runx1-aktywacja tego elementu odpowiada za stabilność ekspresji Foxp3. Natomiast CNS3 jest pierwszym elementem, który, poprzez przyłączenie c-Rel, indukuje ekspresję Foxp3 poprzez otwarcie locus genu *foxp3*.

1.3.1.2. AIRE

AIRE jest czynnikiem transkrypcyjnym kodowanym przez gen *AIRE*. Białko AIRE ulega transkrypcji w rdzeniu grasicy i jest zaangażowane w kodowanie tkankowo-specyficznych antygenów (TSA, ang. tissue-specific antigens), które są prezentowane przez epitelialne komórki rdzenia grasicy dojrzewającym tymocytom. Gen *AIRE* został odkryty w 1997 w toku badań nad autoimmunologicznym zespołem niedoczynności wieloguczołowej typu 1 (APS1, ang. autoimmune polyglandular syndrome type I, lub APECED, ang. autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy) [30].

Jak wspomniano wyżej, AIRE wspomaga centralną tolerancję kodując antygeny gospodarza przez co dojrzewające tymocyty testowane są pod kątem produktywnych TCR, które nie rozpoznają tych antygenów z nadmiernym powinowactwem. Funkcja ta została poznana w toku badań z zastosowaniem myszy z nokautem ekspresji genu *AIRE*. Pokazano m.in., że antygeny insuliny są kodowane przez *AIRE* i ich brak związany z nokautem tego czynnika transkrypcyjnego powodował brak tolerancji limfocytów T do insuliny i indukcję cukrzycy autoimmunologicznej [31].

Mutacje w genie *AIRE* u ludzi skutkują tkankowo swoistą reakcją autoimmunologiczną znaną właśnie jako APS1, lub APECED [32]. U pacjentów z autoimmunologicznym zespołem niedoczynności wieloguczołowej typu 1 choroba przejawia się w postaci niedoczynności przytarczyc (wytwarzających hormon PTH odpowiedzialny za gospodarkę wapniowo-fosforanową w organizmie), hipogonadyzmu (zaburzenia produkcji hormonów przez jajniki lub jądra), niedoboru hormonów produkowanych przez nadnercza, cukrzycy typu 1 (czyli insulinozależnej) czy niedoczynności tarczycy. Dalszymi konsekwencjami, mogą być: całkowite wyłysienie, zapalenie rogówki i białek oczu, nieprawidłowości w szkliwie zębów, drożdżycą, anemia, nieprawidłowości układu trawiennego (zespół złego wchłaniania, biegunka), czy autoimmunologiczne przewlekłe zapalenie wątroby [33].

Autoimmunologiczny regulator *AIRE* u ludzi i myszy wykazuje 77% podobieństwa na poziomie nukleotydowym i 76% na poziomie aminokwasowym. U myszy ekspresję mRNA dla *AIRE* wykryto w grasicy, jajnikach, płucach, sercu, śledzionie, gruczołach nadnerczowych, gruczole tarczycowej, mięśniach szkieletowych, nerkach i jądrach [33]. Zaobserwowano również, iż myszy z nokautem genu *AIRE* wykazują cechy chorobowe przypominające te u pacjentów z APECED wliczając w to nacieki limfocytów w wielu tkankach, czy bezpłodność, jak również produkcję przeciwciał do swoistych antygenów wątroby, spermy, trzustki czy gruczołów nadnerczy [34].

Wyłączenie genu *AIRE* ma wpływ na negatywną selekcję podczas rozwoju limfocytów T w grasicy. W przypadku braku prezentacji antygenów tkankowo swoistych (TSA – ang. tissue specific antigens) rozwijającym się komórkom, nie dochodzi do delecji potencjalnie autoreaktywnych klonów. Komórki autoreaktywne, które „uciekną” negatywnej selekcji w trakcie rozwoju w grasicy podlegają mechanizmom tolerancji obwodowej i mogą być kontrolowane poprzez obecność limfocytów T regulatorowych. W jaki sposób autoreaktywne komórki T wymykają się spod kontroli limfocytów regulatorowych pozostaje niewyjaśnione. Opublikowano natomiast, że podczas obniżenia poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 dochodzi w organizmie do spontanicznej aktywacji naiwnych komórek T i rozwoju objawów choroby autoimmunologicznej [21].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o znaczącej roli czynnika transkrypcyjnego *AIRE* również podczas procesu pozytywnej selekcji limfocytów T regulatorowych w grasicy.

Pojawiają się ponadto tezy, iż upośledzenie tego mechanizmu może mieć większy wpływ na rozwój choroby autoimmunologicznej niż ucieczka auto-reaktywnych klonów do tkanek obwodowych. Zmniejszoną ilość grasiczych limfocytów T regulatorowych u myszy z defektem genu *AIRE* zaobserwowano w szczególności we wczesnym okresie po urodzeniu (do dnia 10-tego). Zmiana ilości limfocytów regulatorowych u myszy dorosłej jest wciąż poddawana dyskusji przez różne grupy badawcze i być może jest zależna od modelu stosowanego do eksperymentów. Niektóre doniesienia sugerują również, że rozwój tylko specyficznych klonów CD4⁺Foxp3⁺, a nie całej populacji, może być zależny od ekspresji *AIRE* [35, 36]. Czynniki decydujące o tym, który klon CD4⁺Foxp3⁺ wymaga ekspresji *AIRE* i jak bardzo upośledzenie procesu pozytywnej selekcji w tym przypadku wpływa na rozwój choroby autoimmunologicznej wymagają dalszych eksperymentów [17, 18, 35, 36].

1.3.1.2.1. Struktura *AIRE*

Ludzkie białko *AIRE* należy do grupy białek, zdolnych do wiązania chromatyny i regulowania procesu transkrypcji [37]. Zaczynając od N-końca, *AIRE* składa się z domeny rekrutującej kaspazy (CARD, ang. **caspase-activation and recruitment domain**), z sygnału lokalizacji jądrowej (NLS, ang. **nuclear localization signal**), domeny SAND (nazwanej od Sp100, *AIRE*-1, NucP41/75, DEAF-1) i z dwóch motywów (palców cynkowych) homeodomenu roślinnej (PHD, ang. **plant-homeodomain**) [38]. Na poziomie wewnątrzkomórkowym, *AIRE* zlokalizowane jest w małych, jednolicie rozłożonych punktach przypominających wyglądem ciała jądrowe. Ponadto *Aire* zlokalizowano w cytoplazmie różnych komórek, gdzie tworzy przypominające siatkę rusztowanie analogiczne do mikrotubul [39].

Obecna przy N-końcu domena rekrutująca kaspazy (CARD) jest elementem charakterystycznym w białkach pro-apoptotycznych [40, 41], a dwu lub trzyczęściowy NLS umożliwia *AIRE* transport do i z jądra [42].

W środku łańcucha aminokwasowego domena SAND (aminokwasy 180-280) zawiera moduł podstawowych aminokwasów, które pośredniczą w wiązaniu *AIRE* do grup fosforanowych DNA. Główną rolą domeny SAND jest jednak prawdopodobnie zapewnienie miejsca do wiązania heterologicznych białek [43]. CARD, NLS i SAND zawierają większość reszt lizynowych w *AIRE*, które są miejscami acetylacji [44]. Jest to kluczowy proces zapewniający właściwą lokalizację białka oraz umożliwiającą zaangażowanie w kompleksy wielocząsteczkowe.

Przy C-końcu AIRE znajdują się dwa motywy (palce) homeodomeny roślinnej (PHD1 – aminokwasy 299-340 i PHD2 – aminokwasy 434-475), rozdzielone regionem bogatym w prolinę. PHD są fragmentami bogatymi w cysteinę, których elementem charakterystycznym jest motyw: cztery cyteiny, jedna histydyna, trzy cysteiny, koordynujący dwa jony cynkowe [45]. Motywy PHD odczytują stopień metylacji przy ogonie histonu H3. AIRE PHD1 należy do podrodziny PHD, która rozpoznaje brak metylacji ogona histonu H3 jako znaczącą cechę epigenetyczną [46]. Na poziomie cząsteczkowym przeciwne ładunki ułatwiają interakcje elektrostatyczne pomiędzy PHD1 i H3, jednocześnie metylacja niektórych aminokwasów w histonie H3 (zwłaszcza Arginy 2 i Lizyny 4) powoduje ich dysocjację [47]. Pomimo strukturalnego podobieństwa do PHD1, PHD2 posiada na powierzchni ładunek dodatni, co sprawia, że nie jest dobrym kandydatem do interakcji z histonami, jest jednak niezbędny do inicjacji transkrypcji [48].

AIRE posiada również cztery motywy LxxLL (L-Leucyna), które są charakterystyczne dla białek wiążących receptory jądrowe i działających jako czynniki wpływające na aktywację lub hamowanie transkrypcji [49].

1.3.1.2.2. Mechanizm działania AIRE

AIRE działa odmiennie w porównaniu do innych czynników transkrypcyjnych. Białko to bierze udział w skoordynowanym ciągu wydarzeń, przeprowadzonym przez kompleksy wielocząsteczkowe. Ważną właściwością AIRE jest homomeryzacja do dimerów i tetramerów, co umożliwia wiązanie do konkretnych motywów oligonukleotydowych [50]. Znaczące jest, iż fragmenty promotorowe kilku genów, włączając w to niektóre geny kodujące antygeny tkankowo specyficzne, będące celem ataku komórek autoreaktywnych w myszach z nokautem genu *Aire*, zawierają motywy oligonukleotydowe podatne na tego typu wiązanie [51]. Zdolność do homomeryzacji jest przypisana do N-końca AIRE (aminokwasy 1-100). Patogeniczne warianty AIRE i konstrukty zawierające delecję w tym regionie, blokują tworzenie oligomerów i rozpoczęcie transkrypcji genów [52].

Pierwszym zidentyfikowanym partnerem dla AIRE jest białko wiążące CREB (czyli białko wiążące się z CRE, CBP), które umiejscowione jest w ciałkach jądrowych (NB, ang. nuclear bodies) i jest koaktywatorem kilku czynników transkrypcyjnych [53]. CBP stabilizuje również wewnątrzkomórkową dystrybucję AIRE [54].

Kolejnymi partnerami dla AIRE są czynniki elongacyjny P-TEFb (ang. **positive transcription elongation factor b**) oraz kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-PK, ang. DNA-dependent protein kinase) [55]. W eksperymentach *in vitro* DNA-PK fosforyluje AIRE, w miejscu treoniny 68 i seryny 156 [56], ponadto DNA-PK wraz z innymi cząsteczkami immunoprecypitującymi razem z AIRE, należy do wielocząsteczkowego kompleksu zaangażowanego w naprawę DNA przez niehomologiczne łączenie końców [57]. Kolejnym silnym partnerem dla AIRE jest topoiizomeraza II α DNA (DNA-TOP) [58]. Topoiizomerazy DNA powodują usuwanie dodatnich i ujemnych superzwojów DNA poprzez generowanie tymczasowych przerw, co skutkuje miejscowym rozluźnieniem chromatyny i ułatwia rozpoczęcie transkrypcji genu [59]. DNA-TOPII α doprowadza do przerw w dwuniciowym DNA oraz przyciąga DNA-PK i polimerazę poli(ADP-rybozy)-1 (PARP1). W eksperymentach na myszach wykazano, że wraz z powyższymi partnerami Aire umiejscawia się w długich ciągach chromatyny zwanych superwzmacniaczami, które służą jako magazyny komórkowo specyficznych wielocząsteczkowych kompleksów zaangażowanych w transkrypcję i zawierają miejsca rozpoczęcia transkrypcji większości genów zależnych od Aire. W tym samym badaniu udowodniono, iż DNA-TopI, enzym wprowadzający przerwy w jednoniciowym DNA, jest głównym partnerem dla Aire przed DNA-TopII α i DNA-TopII β [60]. AIRE wykazuje funkcje podobne do kamptotecyny lub etopozydu, powodując hamowanie aktywności DNA-TopI i DNA-TopII (ponowna ligacja). Następstwem tego są zmiany w chromatynie, powodujące transkrypcję genów o niskim poziomie ekspresji [61].

Również oddziałująca z homeodomeną kinaza białkowa typu 2 (HIPK2 - seryno-treoninowa kinaza białkowa zlokalizowana w ciałkach jądrowych) fosforyluje AIRE (i CBP) i ma na nie hamujący wpływ [62].

1.3.1.3. Modele myszy z nokautem genu AIRE

Dostępne i stosowane obecnie modele zwierzęce posiadające nokaut genu *Aire* generowane były w oparciu o dwie metody: 1) generowanie mutacji analogicznej do mutacji występującej u pacjentów, lub 2) celowane mutacje mające na celu usunięcie eksonów kodujących funkcjonalne domeny Aire.

Pierwszy model został wygenerowany w laboratorium Peltonnena w oparciu o mutację powszechnie występującą u fińskich pacjentów z APECED [52]. Mutacja ta skutkuje zastąpieniem cytozyny (C) przez tyminę (T) w pozycji 889, co powoduje przedwczesne zatrzymanie procesu translacji i skrócenie eksonu 6 u ludzi. Ten myszy model, cechujący się limfocytarnymi infiltratami w różnych organach, obecnością auto-przeciwciał oraz problemami z płodnością na skutek infiltracji organów rozrodczych autoreaktywnymi limfocytami T, został użyty w niżej opisanych eksperymentach.

Drugi myszy model odzwierciedla mutację w locus *Aire* wśród anglo-amerykańskiej populacji pacjentów z APECED [63]. Mutacja ta polegała na usunięciu fragmentu o długości 13pb w eksonie 8, co spowodowało zaburzenie domeny białkowej PHD1. Konsekwencją tej mutacji była zwiększona ilość zaktywowanych limfocytów T i obecność autoprzeciwciał. Samce posiadające tę mutację były bezpłodne.

Trzeci model myszy wygenerowany w oparciu o istniejącą mutację u pacjentów włoskich [64] posiada mutację punktową w pozycji 809 (G – guanina na T-tymina), powodując zastąpienie w łańcuchu aminokwasowym domeny SAND glicyny przez tryptofan.

W kolejnym modelu myszy z nokautem genu *Aire* przedwczesne zakończenie eksonu 1 powoduje usunięcie eksonu 2 wraz z kilkoma okalającymi intronami, co skutkuje powstaniem niefunkcjonalnego białka *Aire* [31]. W konsekwencji, myszy te cechują się infiltratami zaktywowanych/autoreaktywnych limfocytów T w wielu organach (np. wątrobie czy śliniankach), obecnością autoprzeciwciał w surowicy.

W ostatnim mysim modelu *Aire* k/o, kasetą neomycynową zastąpiono fragment od eksonu 5 do eksonu 12 w locus genu *Aire*, co spowodowało skrócenie białka *Aire*, które nie zawierało dużego fragmentu z jego domeny funkcjonalnej [65]. Konsekwencją tej mutacji była indukcja choroby podobnej do syndromu Sjogrena z infiltracją limfocytów T do gruczołów łzowych, co powodowało redukcję łzawienia u tych myszy.

W tabeli 1.1 podsumowano w skrócie różnice zarówno w rodzaju mutacji dostępnych modeli, jak i ich charakterystykę i objawy chorobowe. Model myszy, który stosujemy w laboratorium ma niezbyt silne objawy, co utrudnia analizę, jest jednak dużo bardziej adekwatny do badań nad ludźmi, ponieważ ma bezpośrednie przełożenie na pacjentów z APECED.

Poznanie mechanizmów, które leżą u podstaw chorób autoimmunologicznych (na przykładzie autoimmunologicznego zespołu niedoczynności wielogruczołowej typu 1) może wpłynąć na opracowanie ulepszonych protokołów użycia swoistych klonów limfocytów T regulatorowych w terapii chorób autoimmunologicznych.

Mysz									
	Model 11	Model 12	Model 13	Model 4			Model 5		
	Peltonen	Scott	Anderson	Mathis			Matsumoto		
Mutacja występująca w modelu	Przedwczesny kodon STOP w eksonie 6 (C-T, 889)	Wycięcie fragmentu o długości 13 pz w eksonie 8 (967-979)	Mutacja punktowa Gly228Trp (G-T, 809 w eksonie 6)	Delecja eksonu 2 i części okalających go intronów, powodująca skrócenie białka zaraz za eksonem 1			Zastąpienie eksonów 5-12 kasetą neomycyny, skutkujące powstaniem skróconego białka AIRE		
Mutacja u ludzi odpowiadająca modelowi mysie mu	p.R257X (populacja Fińska (1,250), Niemiecka i północnych Włoch)	c.1094_1106del p.L323EX373 (populacja Anglo Amerykańska)	Gly228Trp mutacja autosomalna dominująca (populacja Włoska)	Brak odpowiednika			Brak odpowiednika		
Domena funkcjonalna dotknięta przez mutację	PHD1, PHD2	PHD1	SAND	CARD			PHD1, PHD2, SAND		
Źródło embryonalnych komórek macierzystych	J129	C57BL/6J (B6)	129/ola i Sv/129	Sv129			TT2		
Szczep myszy	C57BL/6J (B6)	C57BL/6J (B6)	C57BL/6J (B6)	NOD i BALB/c	C57BL/6J (B6)	BALB/cJ	NOD/LJ	SJL/J	C57BL/6J (B6) i BALB/cJ
Fenotyp	Bezpodność, czasami powiązana z zanikiem jajników i jąder; autoimmunologiczne zapalenie wątroby, zanik gruczoły nadnerczy; narządów rozrodczych.	Bezpodność u samic, zapalenie błony naczyniowej oka, zapalenie ciała szklistego.	Cukrzyca, zapalenie ziołek, neuropatia (nerw kulszowy), zapalenie trzyczek.	Bezpodność, zwyrodnienie siatkówki oka.					
Nacieki limfocytarne	Wątroba Jądra Jajniki Trzustka	Gruczoły ślinowe Gruczoły łzowe Ślinianki Przysadzie	Gruczoły łzowe Gruczoły ślinowe Trzustka Płuca	Płuca Próstata Oczy Gruczoły ślinowe	Płuca Próstata Jajniki Oczy Złołdek Gruczoły ślinowe	Prostata Jajniki Trzustka Tarczycza Oczy Złołdek Gruczoły ślinowe Płuca Wątroba	Złołdek Oczy Gruczoły ślinowe Płuca Wątroba Próstata Jajniki Trzustka	Złołdek Gruczoły ślinowe Płuca Wątroba Próstata Jajniki Trzustka	Trzustka (komórki goniaste) Wątroba Płuca Gruczoły ślinowe Tarczycza Próstata
Wykryte przeciwciała organo-specyficzne	Plemniki Trzustka Dekarboksylaza kwasu glutaminowego, Anti-GAD (trzustka) Hepatocyty (wątroba) Kora nadnerczy	Trzustka Jądra Płuca Wątroba Złołdek	Nie sprawdzano	Mucyna 6	Jajniki Oczy Gruczoły ślinowe Złołdek	Oczy Złołdek	Oczy Trzustka Złołdek Jajniki	Alfa-fetyna (białko wiążące aktywne) Błona śluzowa złołdka	PDIP (trzustka)

Tabela 1.1 Zestawienie obecnie stosowanych mysich eksperymentalnych zawierających mutację w genie

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Celem pracy jest zbadanie wpływu prezentacji zależnych od Aire antygenów tkankowo-swoistych na rozwój, różnorodność i auto-reaktywność limfocytów T regulatorowych w grasicy i organach obwodowych, jak również identyfikacja klonów odpowiedzialnych za uszkodzenia organów w myszy posiadającej nokaut genu *Aire* [52].

Do realizacji postawionych celów zastosowano mysz transgeniczną o ograniczonym repertuarze TCR (TCR^{mini}) [66]. Powyższa mysz została skrzyżowana z myszą TCR α^{ko} (brak ekspresji łańcucha α TCR skutkująca brakiem limfocytów T), a następnie z myszą transgeniczną B6Foxp3^{hCD2}, ekspresjonującą jako ludzkie białko fuzyjne hCD2-CD52 pod promotorem genu *Foxp3* [67].

Limfocyty T z wyżej przedstawionego modelu myszy, charakteryzują się ekspresją jednego łańcucha V beta (V β 14) oraz jednego V alfa (V α 2), mogącego naturalnie rearanżować z jednym z dwóch segmentów J (J α 2 lub J α 26), skutkiem tego różnorodność receptorów komórek T CD4⁺ z heterozygoty TCR^{mini} ograniczona jest jedynie do zmienności generowanej w regionie CDR3 łańcucha TCR α (ang. Complementarity - **D**etermining **R**egion). Ponieważ Foxp3 uważany jest obecnie za najbardziej swoisty marker komórek regulatorowych CD4⁺, ekspresja ludzkiego CD2 (hCD2) pod jego promotorem umożliwia śledzenie dystrybucji tych komórek w różnych organach oraz upraszcza ich identyfikację i izolację.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Odczynniki chemiczne

Odczynnik	Producent
agaroza	Thermofisher
alkohol etylowy	Thermofisher
alkohol izopropylowy	Thermofisher
bromek etydyny	Sigma
chlorek amonu	Sigma
dATP	Thermofisher
dCTP	Thermofisher
dekstroza	Sigma
deoksurybonukleaza I (DNaza I)	Roche
dGTP	Thermofisher
DMSO	Cellgro
dTTP	Thermofisher
EDTA	Sigma
endogenne aminokwasy (100x)	Corning
FBS	HyClone
fenol/chloroform/alkohol izoamylowy	Thermofisher
czerveń fenolowa	Sigma
formalina	Thermofisher
gentamycyna	Gibco
glikogen	Gibco
HAT	Gibco
heparyna	Sigma

HT	Gibco
kolagenaza typu D	Roche
kwas solny (HCl)	Thermofisher
L-glutamina	Gibco
MEM (ang. Minimal Eagle Medium)	Gibco
2-merkaptoetanol	Sigma
nadsiarczan amonu	Sigma
niezbedne aminokwasy (50x)	Gibco
octan amonu (CH ₃ COONH ₄)	Sigma
odwrotna transkryptaza (SuperScript III)	Invitrogen
odwrotna transkryptaza (MMLV)	Promega
PBS	Gibco
penicylina G	Sigma
pirogronian sodu	Sigma
Polimeraza Perfect Taq	5 PRIME
polimeraza Taq (AccuPrime)	Invitrogen
polimeraza Taq (DreamTaq)	Thermofisher
proteinaza K	Invitrogen
przypadkowe heksamery	Invitrogen
RNaza H	Invitrogen
RNaza OUT	Invitrogen
SDS	Sigma
streptomycyna	Sigma
Tris	Sigma
Tween 20	Sigma
wodorotlenek sodu (NaOH)	Sigma
wodorowęglan sodu (NaHCO ₃)	Sigma
zestaw do izolacji RNA	Qiagen
zestaw do oczyszczania produktu PCR	Qiagen
zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego	Qiagen

zestaw do oznaczania cytokin w surowicy krwi (LEGENDplex)	Biolegend
zestaw do testu immunoenzymatycznego ELISA na obecność przeciwciał IgG w surowicy	Invitrogen

3.1.2. Bufory, roztwory standardowe i pożywki hodowlane.

Użyte w pracy bufory, roztwory standardowe i pożywki hodowlane pochodziły zarówno ze źródeł komercyjnych, jak również były przygotowywane własnoręcznie.

- **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

Roztwór stosowany jako składnik buforu do lizy tkanek komórkowych, jak również w trakcie izolacji komórek T pochodzących ze ściany jelita grubego.

Skład na 0,5 litra roztworu	
EDTA	93,05g
Woda Mili-Q	↑0,5L

pH ustalano przy pomocy 10M NaOH. Po przefiltrowaniu przez 0,22μm filtr, roztwór przechowywano w temperaturze pokojowej.

- **Bromek etydyny (10mg/mL)**

Roztwór używany w celu wizualizacji DNA po rozdziale w procesie elektroforezy.

Skład na 50 mililitrów	
Bromek etydyny	500mg
Woda Mili-Q	↑50mL

Po rozpuszczeniu roztwór przechowywano w temperaturze pokojowej, chroniąc od słońca.

- **0,1 M Bufor boranowy**

Bufor stosowany do rozcieńczania przeciwciał anti-CD3 oraz anti-CD28 przy oplaszczaniu płytek do hodowli limfocytów T regulatorowych.

Skład na 1 litr roztworu	
H ₃ BO ₃	6.18g
Woda Mili-Q	↑1L

Bufor o pH 8.5 autoklawowano i przechowywano w 4°C.

- **Bufor dla odwrotnej transkryptazy (zestaw SuperscriptIII, 10x) firmy „Invitrogen“**

Bufor zakupiony gotowy w firmie „Invitrogen”, przechowywany w temperaturze -20°C.

Skład	
Tris-HCl (pH 8,4)	200mM
KCl	500mM

- **Bufor dla polimerazy AccuPrime Taq (10×)**

Bufor zakupiony gotowy w firmie „Invitrogen”, przechowywany w temperaturze -20°C, pH 8,9.

Skład	
Tris-SO ₄	600mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2mM
dATP	2mM
dTTP	2mM
dGTP	2mM
dCTP	2mM
Glicerol	10%

- **Bufor dla polimerazy PerfectTaq (10×) firmy 5 PRIME**

Bufor zawiera 15mM MgCl₂. Skład szczegółowy zastrzeżony przez producenta.

- **Bufor do lizy końcówek mysich ogonów**

Bufor stosowany w procesie genotypowania kolonii do trawienia fragmentów obciętego ogona ponumerowanej myszy.

Skład na 100 mililitrów roztworu	
1 M Tris, pH 8,0	10mL
0,5 M EDTA	1mL
10% SDS	3mL
5 M NaCl	4mL
Proteinaza K (20mg/mL)	3mL
Woda Mili-Q	↑100mL

Bufor przechowywano w temperaturze pokojowej.

- **Bufor obciążający (6x stężony)**

Bufor stosowany do nanoszenia próbek DNA na żel agarozowy.

Skład na 50 millilitrów	
Sacharoza	20g
Błękit bromofenolowy	125mg
Woda Mili-Q	↑50mL

- **Buforowany chlorek amonu (pH 7.2)**

Bufor stosowany do lizy erytrocytów.

Skład na 1 litr roztworu	
NH ₄ Cl	8,3g
KHCO ₃	1g
Czerwień fenolowa	0,5%
Woda Mili-Q	↑1L

Po przefiltrowaniu przez 0,22 µm filtr, bufor przechowywano w temperaturze pokojowej.

- **Buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej bez wapnia i magnezu (PBS, od ang. Phosphate Buffered Saline)**

Bufor stosowany do rozpuszczania substancji stosowanych przy pracy z komórkami eukariotycznymi, jak również do rozcieńczania przeciwciał. Roztwór przygotowywany przez rozpuszczenie proszku o składzie:

Skład na 1 litr roztworu	
KCl	0,2g
KH ₂ PO ₄	0,2g
NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	1,15g

pH ustalano przy pomocy 10M NaOH. Po autoklawowaniu bufor przechowywano w 4°C.

- **Buforowany roztwór Hanksa (HBSS, od ang. Hank's Buffered Salt Solution, pH 7,1-7,2)**

Bufor stosowany w trakcie izolacji, przemywania, jak również w trakcie barwienia i analizy cytometrycznej komórek eukariotycznych. Roztwór przygotowywany przez rozpuszczenie proszku o składzie:

Skład na 1 litr roztworu	
KCl	0,4g
KH ₂ PO ₄	0,06g
NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	0,0477g
D-Glukozą	1g

pH ustalano przy pomocy 10M NaOH w obecności czerwieni fenolowej. Po przefiltrowaniu przez 0,22 µm filtr, bufor przechowywano w temperaturze 4°C.

- **Bufor TBE**

Bufor do przeprowadzania elektroforezy DNA z firmy „National Diagnostics”. Stężenie końcowe (1×) przygotowywano przez rozcieńczenie 10× stężonego roztworu wodą milliQ. Skład 10×TBE przedstawiono poniżej:

Skład na 1 litr roztworu	
TRIS	108g
EDTA (pH 8.0)	40mL
H ₃ BO ₃	55g
Woda Mili-Q	↑1L

- **Pożywka CTM** (od ang. Complete Tumor Medium)

Komórki eukariotyczne hodowano w pełnej pożywce Minimal Eagle Medium uzupełnionej następującymi dodatkami:

Skład na 0,5 L roztworu	
αMEM	500mL
„tumor cocktail”	30mL
FBS (termicznie inaktywowana)	50mL
L-glutamina (200 mM)	5mL

- **Roztwór do zamrażania komórek eukariotycznych**

Skład	
αMEM	858,5mL
„Tumor cocktail”	51,5mL
FBS	500mL
DMSO	250mL
2-merkaptoetanol	5,8μL

Całość filtrowano przez filtr 0,22 μm, porcjowano po 12 mL i przechowywano w -20°C.

- **„Tumor cocktail”**

Mieszanina związków potrzebnych komórkom do wzrostu dodawana do pożywki hodowlanej, przechowywana w porcjach po 30 mL w temperaturze -20°C.

Skład	
αMEM	351mL
Dekstroza	7,5g

Niezbędne aminokwasy (50x)	75mL
Endogenne aminokwasy (100x)	140mL
Pirogronian sodu (100x)	100mL

Przy użyciu 10 M NaOH doprowadzono pH do wartości 7,0, następnie dodając:

NaHCO ₃	8,5g
Gentamycyna	500mg
Penicylina G	600mg
Streptomycyna (siarczan)	1g
2-merkптоetanol	34μL

Całość filtrowano przez filtr 0,22 μm, porcjowano po 30 mL do probówek i przechowywano w temperaturze -20°C.

- **Zestaw do izolacji RNA firmy „Qiagen”** zawiera:

Bufor RLT do lizy komórek, suplementowany w 0,14 M 2-merkптоetanol

Bufor RW1 do pierwszego przemywania kolumny

Bufor RDD do rozcieńczania DNazy I

Bufor RPE do ponownego przemywania kolumny, zawiera etanol

Szczegółowy skład buforów zastrzeżony przez producenta.

- **Zestaw do oczyszczania produktu PCR firmy „Qiagen”** zawiera:

Bufor PB do związania fragmentów DNA do kolumny

Bufor PE do przemywania kolumny zawiera etanol

Bufor EB do wmywania fragmentów DNA z kolumny. Szczegółowy skład buforów zastrzeżony przez producenta.

- **Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego firmy „Qiagen”** zawiera:

Bufor QG do rozpuszczania żelu agarozowego i wiązania fragmentów DNA do kolumny

Bufor PE do przemywania kolumny, zawiera etanol

Szczegółowy skład buforów zastrzeżony przez producenta.

- **Zestaw do testu immunoenzymatycznego ELISA na obecność przeciwciał IgG w surowicy** zawiera:

250x stężone przeciwciało wychwytyjące

250x stężone przeciwciało wykrywające – zmiareczkowane anty-mysie poliklonalne przeciwciało do IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową

Standard: liofilizowany myszy izotyp białka IgG, po rozpuszczeniu w stężeniu 200 ng/mL

Bufor do opłaszczania: 10x stężony buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (PBS)

Bufor do testu: 20x stężony bufor A (PBS, 1% Tween 20, 10% albuminy surowicy bydlęcej BSA (ang. Bovine Serum Albumin)

Roztwór substratu: roztwór tetrametylobenzydyny (TMB)

- **Zestaw do oznaczania cytokin w surowicy krwi (LEGENDplex)** zawiera (panel Th3):

Odczynnik	Ilość
Kulki kalibracyjne: FITC	1mL
Kulki kalibracyjne: PE	1mL
Kulki kalibracyjne: czyste	1mL
Streptawidyna PE	Sigma
LEGENDplex matryca B, liofilizowana	1 ampułka
Bufor do testu (zastrzeżony skład)	25mL
Bufor do płukania (20x stężony)	25mL
Kulki kalibracyjne, specyficzne do panelu Th3 (zmieszane)	3,5 mL
Przeciwciała do detekcji	3,5mL
Liofilizowana mieszanka standard dla panelu Th3	1ampułka

Panel Th3 zawierał kulki kalibracyjne do detekcji mysich cytokin IFN γ , IL-5, TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-22 i IL-13.

- **Zielony bufor dla polimerazy DreamTaq (10×) firmy „Thermo Scientific”**

Zielony bufor, zawiera w składzie związek obciążający, który eliminuje konieczność stosowania buforu obciążającego, oraz dwa barwniki służące do śledzenia migracji DNA na żelu agarozowym. Barwnik niebieski migruje na 1% żelu agarozowym równoległe z fragmentami 3-5 pz, natomiast barwnik żółty migruje szybciej, niż fragment o długości 10 pz. Bufor zawiera również KCl i (NH₄)₂SO₄ w stężeniach zastrzeżonych przez producenta.

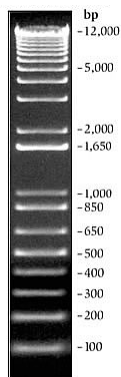
Skład	
MgCl ₂	20mM
Nonoxynol-3	<0,9%
Glikol polietylenowy	7-13%
Sacharoza	10-30%

- **Żel agarozowy 1%**

Żel stosowany był do rozdzielania kwasów nukleinowych.

Skład na 100 mililitrów	
Agaroz	1 g
1 x TBE	100mL
Bromek etydyny	5 µl

- **Standardy DNA wykorzystywane podczas pracy z kwasami nukleinowymi**



Rysunek 3.1. Standard DNA używany podczas analizy kwasów nukleinowych (pz- para zasad) DNA 1Kb Plus DNA Ladder firmy Invitrogen.

- **Startery oligonukleotydowe**

Startery oligonukleotydowe w formie liofilizowanej syntetyzowane były w firmie Invitrogen. Po rozpuszczeniu w wodzie Mili-Q do stężenia 100μM, startery były przechowywane w -20°C. Do reakcji PCR stosowanej w celu genotypowania myszy, używano 20μM roboczych roztworów starterów oligonukleotydowych.

Nazwa	Sekwencja starterów stosowanych do genotypowania myszy
mAct_rev	5'- GAT GTC GCG CAC AAT CTC ACG TTC AG -3'
mAct_s	5'- TGT CAT GGT AGG TAT GGG TCA GAA GG -3'
PTB-Jb2.6_3'	5'- TAC TAT CGA TTT CCC TCC CGG AGA TTC C -3'
TB179	5'- ACG ACC AAT TCA TCC TAA GCA C -3'
PTA JαNO7	5'- GAC TTA CCT GGC TTT ATA ATT AGC TTG -3'
Vα-Jα_5'	5'- TAA CAC TTG GCA AGA GTT ACT CAT TTA G -3'
hCD2 For.	5'- TCT CAG ACT CAG GAT GAC TGT -3'
hCD2 WT Rev	5'- ATT GCT TGA GGC TGC GTA TGA -3'
hCD2 KI Rev	5'- GGC TTC GGC CAG TAA CGT TA -3'
Nur77 F	5'- CGG GTC AGA AAG AAT GGT GT -3'
Nur77 R	5'- CAG TTT CAG TCC CCA TCC TC -3'
Aire 2000T	5'- CCG TGA TAT TGC TGA AGA GC -3'
Aire 7R	5'- CTC ACT GGG GAG GGA TGG A -3'
Aire 6F	5'- CAT TCA GGT TGG GGG AGA GT -3'

Nazwa	Sekwencja starterów stosowanych do przygotowania materiału do sekwencjonowania metodą Illumina
TCR_Cα3	5'- TCG GCA CAT TGA TTT GGG AGT C -3'
Vα2_88s	5'- CAG CAG GTG AGA CAA AGT CCC C -3'
Vα2 ill	5'- CAC TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT CTA CAG ACT CTC AGC CTG GAG ACT CAG CT -3'
Cα1 ill	5'- GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTT AAC TGG TAC ACA GCA G -3'

D7...	5'- CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC -3'
D5...	5'- AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT -3'

Nazwa	Sekwencje indeksów 5 (i5)	Sekwencje indeksów 7 (i7)
1	TATAGCCT	ATTACTCG
2	ATAGAGGC	TCCGGAGA
3	CCTATCCT	CGCTCATT
4	GGCTCTGA	GAGATTCC
5	AGGCGAAG	ATTCAGAA
6	TAATCTTA	GAATTCGT
7	CAGGACGT	CTGAAGCT
8	GTA CTGAC	TAATGCGC
9	TTCGGATG	CGGCTATG
10	ACTCATAA	TCCGCGAA

3.1.3. Przeciwciała

Antygeny białkowe wykrywano metoda cytometrii przepływowej przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami.

Przeciwciało	Klon	Koniugat	Stężenie (mg/mL)	Rozcieńczenie	Producent
anty-CD4	GK1.5	BV510	0,2	1:400	BioLegend
anty-CD4	GK1.5	APC	0,2	1:400	BioLegend
anty-CD8	SK1	PE-Cy5.5	0,2	1:300	BioLegend
anty-hCD2	S5.2	BV610	0,2	1:300	eBioscience
anty-CD44	IM7	e-Fluor 450	0,2	1:200	Thermofisher
anty-CD62L	MEL-14	APC-Cy7	0,2	1:200	BioLegend
anty-PD-1	J43	SB702	0,2	1:200	BioLegend
anty-CD73	TY/11.8	PE	0,2	1:200	BioLegend

anty-CD71	RI7217	PE/Dazzle594	0,4	1:200	BioLegend
anty-CD11c	N418	APC	0,4	1:200	BioLegend
anty-TCR V α 2	B20.1	PE	0,2	1:400	BioLegend

3.1.4. Linie komórek eukariotycznych

3.1.4.1. Komórki BW5147

Komórki BW5147 stosowano do generowania hybrydom limfocytów T. Jest to linia komórkowa mysiego grasiczaka BW5147 opisana przez [68], charakteryzująca się brakiem ekspresji łańcuchów α i β receptora limfocytów T. Komórki hodowano w pełnej pożywce CTM w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C.

3.1.5. Myszy

Myszy hodowano w zwierzętarni Georgia State University w środowisku wolnym od patogenów. Hodowlę jak również eksperymenty na zwierzętach prowadzono zgodnie z wytycznymi komisji bioetycznej Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Georgia State University.

3.1.5.1. Myszy dostępne komercyjnie

Myszy o tle genetycznym C57BL6\TCR α ^{ko}, zostały zakupione w firmie „The Jackson Laboratory” (Bar Harbor, ME, USA). Myszy TCR α ^{ko} cechuje brak receptora alfa i beta komórek T, w ich grasicy nie występują komórki CD4⁺CD8⁻ i CD4⁻CD8⁺. Myszy C57BL6, TCR α ^{ko} używano do krzyżowania z myszami transgenicznymi TCR^{mini}, Foxp3^{hCD2}, Nur77GFP i Aire^{ko}. Szpik pochodzący z myszy TCR α ^{ko} był używany do stymulacji hybrydom.

3.1.5.2. Myszy transgeniczne

3.1.5.2.1. Mysz transgeniczna TCR^{mini}

Model myszy transgenicznej TCR^{mini} został skonstruowany w laboratorium Dr. Leszka Ignatowicza i opisany w artykule z 2006 roku [66]. Mysz transgeniczna TCR^{mini} charakteryzuje się ekspresją poliklonalnego lecz zredukowanego zestawu receptorów limfocytów T (TCR – T Cell Receptor). W myszy TCR^{mini} wszystkie limfocyty T ekspresjonują ten sam transgeniczny łańcuch V β 14-J β 2.6, ale różne łańcuchy TCR α , które powstają w czasie naturalnej rearanzacji transgenicznego mini-locus. Myszy te są heterozygotami w odniesieniu do transgenicznego mini-locus V α 2-J α 26(J α 2), nie posiadają również endogennego łańcucha TCR α , w związku z czym różnorodność repertuaru TCR jest ograniczona jedynie do regionu CDR3 (ang. **Complementarity-Determining Region 3**) pojedynczego, transgenicznego łańcucha TCR α .

Kombinacyjna różnorodność repertuaru limfocytów T w myszy TCR^{mini} jest niewielka, jednak przypadkowe dodawanie i usuwanie nukleotydów w obrębie regionu CDR3 generuje w przybliżeniu 10⁵ różnych receptorów alfa i beta obwodowych komórek T (w porównaniu do szacowanej liczby 10¹⁰ różnych receptorów w myszy typu dzikiego). W myszy transgenicznej TCR^{mini} można poprzez sekwencjonowanie regionu CDR3 receptora komórek T porównywać i śledzić komórki CD4⁺, posiadające te same lub unikalne receptory w różnych populacjach i organach.

Mysz TCR^{mini} powstała poprzez skrzyżowanie myszy posiadającej ekspresję konstruktów genowych V α 2.9J α 2/J α 26 z myszą transgeniczną TCR β .

Aby wygenerować wektor ekspresyjny, który kodował fragmenty genów V α 2 i J α 26 łańcucha α receptora $\alpha\beta$ limfocytów T specyficznego do AbEp63K w linii zarodkowej, zamplifikowano odpowiednie fragmenty genów ze sztucznego chromosomu bakteryjnego (BAC) przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Fragment DNA o długości 1,5 kbp zawierający gen V α 2 został zamplifikowany z klonu BAC20, a fragment DNA o długości 1,2 kbp zawierający J α 26 został zamplifikowany z klonu BAC77. Produkty PCR-ów zostały następnie zsekwencjonowane, i oba fragmenty zostały połączone poprzez miejsce restrykcyjne dla enzymu *SacI*, i wklonowane do kasety ekspresyjnej pT α [69] przeciętej enzymatycznie przy zastosowaniu enzymów restrykcyjnych *XmaI* i *NotI*. Powstały konstrukt posiadał gen V α 2 w linii zarodkowej, następnie fragment intronu o długości 1.4kbp i J α 26. Dodatkowo fragment J α 2 był umiejscowiony poniżej segmentu J α 26 i był on częścią wektora ekspresyjnego. Taki konstrukt użyto do mikroiniekcji do zapłodnionej komórki jajowej myszy C57/BL6. Otrzymałą mysz krzyżowano z

myszą transgeniczną TCR β , którą otrzymano przez mikroiniekcję konstruktów V β 14-D β 2-J β 2.6 łańcucha V β oraz kasetę pT do zapłodnionej komórki jajowej myszy (C57BL/6 \times CBA/Ca) [70]. W końcowym etapie, otrzymaną mysz skrzyżowano z myszą TCR α ^{ko}, aby usunąć endogenne łańcuchy TCRV α i uzyskać ekspresję jedynie transgenicznego łańcucha TCRV α 2, uzyskując mysz TCR^{mini}.

3.1.5.2.2. Mysz transgeniczna Nur77GFP

Konstrukt użyty przy tworzeniu myszy Nur77GFP powstał poprzez wprowadzenie cDNA białka fuzyjnego GFP-Cre w miejsce startu genu Nr4a1 (Nur77) przy użyciu sztucznego chromosomu bakteryjnego (Bacterial Artificial Chromosome) o długości 167pz. Fragment tego wektora o długości około 135pz został wycięty przy pomocy miejsc restrykcyjnych dla enzymu BsiWI i wprowadzony przy pomocy mikroiniekcji do embrionów myszy C57Bl/6J (B6) w Laboratorium Mysiej Genetyki (Mouse Genetics Laboratory) na Uniwersytecie Minesoty (University of Minnesota) [71].

3.1.5.2.3. Mysz transgeniczna Foxp3^{hCD2}

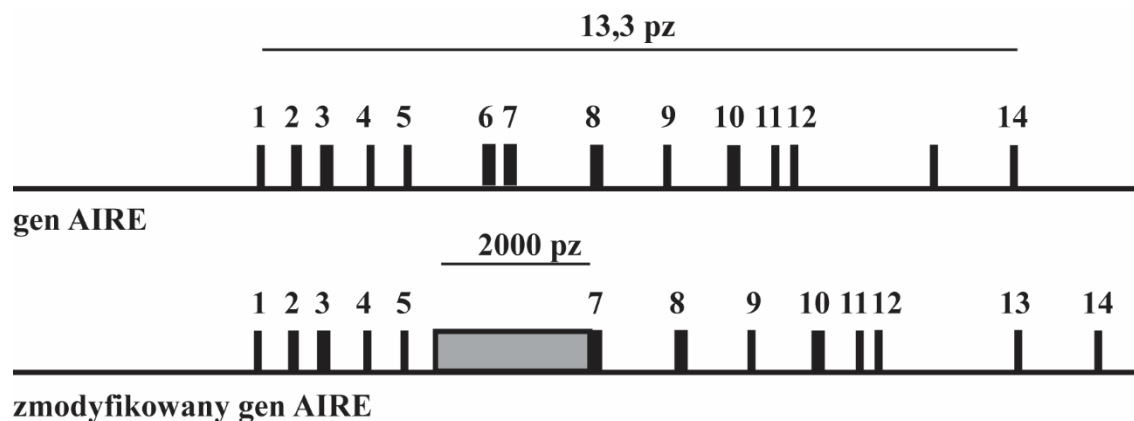
Mysz transgeniczna Foxp3^{hCD2} [67], wygenerowana w laboratorium Shohei Hori w celu wizualizacji i izolacji żywych limfocytów regulatorowych, ekspresjonuje ludzkie białko fuzyjne (hCD2-CD52) pod promotorem genu Foxp3. Dzięki ekspresji reporterowego białka fuzyjnego hCD2-CD52 możliwa jest wizualizacja populacji limfocytów T regulatorowych przy użyciu przeciwciała monoklonalnego anty-hCD2 metodą cytofluorometrii przepływowej, oraz sortowania żywych komórek w celu hodowli in vitro bez konieczności znakowania wewnątrzkomórkowego. W celu wygenerowania konstruktów do myszy Foxp3^{hCD2}, 5,4pz fragment genu Foxp3 zawierający ekson 10-11 został wklonowany do wektora pBluescript przy zastosowaniu miejsc dla enzymów restrykcyjnych EcoRI i SmaI. Kasetę IRES-hCD2 wygenerowano zastępując sekwencję kodującą białko zielonej fluorescencji (EGFP) w wektorze MIGR1 fragmentem cDNA kodującym hCD2-CD52 i następnie dołączono fragment markera selekcyjnego neomycyny otoczony sekwencjami loxP. Końcowy konstrukt powstał przez wklonowanie kasety IRES-hCD2-CD52-loxP-Neo-loxP pomiędzy sekwencje kodonu stop a sekwencje kodujące sygnał poliadenylacji w genie Foxp3 w miejscu specyficznym do enzymu restrykcyjnego MscI. Ostatecznym krokiem było wklonowanie markera selekcyjnego w postaci

kinazy tymidynowej na końcu 3' konstrukt, który następnie został zlinearyzowany enzymem restrykcyjnym *ClaI* i wprowadzony do komórek macierzystych, wygenerowanych z myszy B6, przy pomocy elektroporacji. Rekombinacja homologiczna została potwierdzona w koloniach komórkowych opornych na neomycynę przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), jak również metody hybrydyzacji Southerna, a pozytywne komórki macierzyste zostały wstrzyknięte do zarodków myszy C57BL/6 w stadium blastocysty.

3.1.5.2.4. Mysz transgeniczna *Aire*^{ko}

Mysz transgeniczna *Aire*^{ko} [72] wygenerowana w laboratorium Leena Peltonen została zaprojektowana w taki sposób, aby możliwie jak najbliżej imitować najczęściej występującą u ludzi mutację w genie *AIRE*, skutkującą terminacją sekwencji kodującej w eksonie 6.

Sekwencja docelowa mysiego genu *Aire* została sklonowana z mysiej fagowej biblioteki genomowej przy użyciu cDNA ludzkiego genu *AIRE* jako sondy. Docelowy konstrukt wygenerowano poprzez wprowadzenie dwóch fragmentów mysiego genu *Aire* do plazmidu pPNT. Pierwszy fragment o długości 5,3 pz, zawierający sekwencje okalające intronu 6 (16 pz przy końcu 3') i eksony 7-12 (5270 pz), został wprowadzony w miejsce cicia dla enzymu restrykcyjnego *XbaI*, skutkując umiejscowieniem genu oporności na kinazę tymidynową w pozycji 3' od tego fragmentu. Drugi fragment o długości 1,8 pz, zawierający eksony 4-5 (588pz) i sekwencje okalające intron 5 (1177pz), został wprowadzony w miejsce cicia dla enzymu restrykcyjnego *XhoI*, skutkując umiejscowieniem genu oporności na neomycynę w miejscu sąsiadującym z uszkodzonym eksonem 6. Następnie inserty z mysiego genu *Aire* zostały zamplifikowane przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR z ang. **P**olymerase **C**hain **R**eaction) i starterów zawierających sekwencje dla trawienia enzymów restrykcyjnych *XbaI* i *XhoI*. Po weryfikacji orientacji przy użyciu sekwencjonowania, docelowy konstrukt zlinearyzowano przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *NotI* i wprowadzono do linii komórek macierzystych J129 w procesie elektroporacji. Pozytywne komórki macierzyste wyselekcjonowano przy użyciu G418 (gentamycyna) i Gancyklowiru. Homologiczna rekombinacja została potwierdzona przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy, pozytywne komórki macierzyste zostały wstrzyknięte do zarodków myszy C57BL/6 w stadium blastocysty.



Rysunek 3.2. Konstrukcja wektora użytego do produkcji myszy Aire^{ko}.

Na schemacie przedstawiono modyfikacje wektora użytego do ukierunkowanego zakłócenia genu *Aire*.

3.2. Metody

3.2.1. Izolacja limfocytów T z narządów limfatycznych

Limfocyty izolowano z grasicy, węzłów chłonnych obwodowych: pachowych, ramieniowych, pachwinowych, lędźwiowych, krzyżowych oraz węzłów chłonnych krezkowych. Po izolacji narządy limfatyczne umieszczano w roztworze HBSS z dodatkiem 5% FBS. Zawiesinę komórek przygotowywano przez mechanicznie rozcieranie w woreczkach nylonowych o wielkości porów 100µm. Komórki zawieszano w 3mL HBSS z dodatkiem 5% FBS, liczone w aparacie Z1 Coulter Counter (Beckman-Coulter), a następnie wirowano przez 10 minut z prędkością 300×g. Pelet zawieszano w 1mL roztworu HBSS z 5% FBS i filtrowano przez filtr nylonowy (wielkość porów 40µm). Tak otrzymaną zawiesinę komórek znakowano przeciwciałami monoklonalnymi i izolowano na sorterze do komórek firmy Sony (rozdział 3.2.9), lub alternatywnie 10⁶ komórek przenoszono na dołek 96-cio dołkowej płytki okrągłodennej, znakowano przeciwciałami monoklonalnymi, a następnie analizowano na cytometrze przepływowym (rozdział 3.2.8).

3.2.2. Izolacja limfocytów CD4⁺ z blaszki właściwej jelita grubego

Po otwarciu jamy brzusznej i wyizolowaniu węzłów krezkowych ostrożnie odsuwano okalającą jelito tkankę tłuszczową. Jelito cienkie izolowano odcinając je w miejscu zakończenia żołądka i rozpoczęcia dwunastnicy, jednocześnie usuwając tłuszcz przylegający do ściany jelita.

W celu oczyszczenia światła jelita po rozcięciu tkanki wzdłuż całego odcinka jelito umieszczano w 10cm szalce Petriego zawierającej 10mL zimnego roztworu HBSS z 5% FBS i wypłukiwano zawartość poprzez energiczne mieszanie tkanki. Procedurę powtarzano do uzyskania klarownego roztworu.

W celu usunięcia warstwy komórek epitelialnych, oczyszczone odcinki jelita cięto na 1,5cm fragmenty i umieszczano w probówce 50mL typu Falcon z 15mL roztworu HBSS zawierającego 10% FBS oraz 2 μ M EDTA w temperaturze 37°C w celu chelatowania jonów wapnia niezbędnych do zachowania kontaktu komórka-komórka. Fragmenty inkubowano 15 minut w cieplarni w temperaturze 37°C, wytrząsając delikatnie z prędkością 140 obrotów na minutę. Procedurę tę powtarzano 3 razy, używając każdorazowo świeżego roztworu.

Po usunięciu warstwy epitelialnej fragmenty jelita przepłukiwano dokładnie roztworem HBSS w celu pozbycia się EDTA, które wpływa na proces trawienia enzymatycznego. Po osuszeniu na papierowym ręczniku, fragmenty jelita przenoszone były na 60mm szalkę Petriego, a następnie cięte na miazgę przy użyciu nożyczek chirurgicznych. Następnie w celu uwolnienia limfocytów z blaszki właściwej, fragmenty tkanki umieszczane były w 50mL probówce typu Falcon zawierającej 15mL pożywki hodowlanej MEM z dodatkiem 10% FBS i 1mg/mL kolagenazy D wraz z 0,1mg/mL DNazy I ogrzanej do 37°C. Trawienie enzymatyczne przeprowadzone było przez 20 minut w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością 140 obrotów na minutę. Po upływie 20 minut próbki wirowano przy prędkości 300xg przez 5 minut w celu usunięcia enzymów z roztworu. Pelet komórek i pozostałości tkankowych zawieszano w 15mL buforu HBSS zawierającego 10% FBS a następnie filtrowano przez filtr o średnicy porów 100 μ m. Fragmenty, które pozostały na filtrze rozcierano mechanicznie i łączono z przesączem.

Zawiesina była następnie przepuszczana przez kolumnę z upakowaną watą szklaną w celu eliminacji martwych komórek oraz pozostałości śluzu. Wata szklana umieszczana była luźno na

wysokość 4cm w 10mL strzykawce. Przed przepuszczeniem zawiesiny kolumna była równoważona poprzez przelanie 10mL buforu HBSS w temperaturze pokojowej. Po przefiltrowaniu zawiesiny, kolumna była 3-krotnie przepłukana 10mL buforu HBSS. Przesącz zbierano do czystej probówki 50mL typu Falcon. Komórki następnie wirowano, a pelet zawieszano w 1mL buforu HBSS z dodatkiem 5% FBS i umieszczano na lodzie.

3.2.3. Izolacja komórek z prostaty, jąder i jajników

Prostatę, jądra i jajniki izolowano do roztworu bufor HBSS z dodatkiem 5% FBS. Po osuszeniu na papierowym ręczniku, organy przenoszone były na 60mm szalkę Petriego (Fisher), a następnie cięte na miążgę przy użyciu nożyczek chirurgicznych. Następnie w celu uwolnienia limfocytów, fragmenty tkanki umieszczane były w 50mL probówce typu Falcon zawierającej 15mL pożywki hodowlanej MEM z dodatkiem 10% FBS i 1mg/mL kolagenazy D wraz z 0,1mg/mL DNazy I ogrzanej do 37°C. Trawienie enzymatyczne przeprowadzone było przez 60 minut w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością 140 obrotów na minutę. Po upływie 60 minut probówki wirowano przy prędkości 300xg przez 5 minut w celu usunięcia enzymów z roztworu. Pelet komórek i pozostałości tkankowych zawieszano w 15mL buforu HBSS zawierającego 10% FBS a następnie filtrowano przez filtr o średnicy porów 100µm. Fragmenty, które pozostały na filtrze rozcierano mechanicznie i łączono z przesączem.

Zawiesina była następnie przepuszczana przez kolumnę z upakowaną watą szklaną w celu eliminacji martwych komórek. Wata szklana umieszczana była luźno na wysokość 4 cm w 10mL strzykawce. Przed przepuszczeniem zawiesiny kolumna była równoważona poprzez przelanie 10mL buforu HBSS w temperaturze pokojowej. Po przefiltrowaniu zawiesiny, kolumna była 3-krotnie przepłukana 10mL buforu HBSS. Przesącz zbierano do czystej probówki 50mL typu Falcon. Komórki następnie wirowano, a pelet zawieszano w 1mL buforu HBSS z dodatkiem 5% FBS i umieszczano na lodzie.

3.2.4. Izolacja komórek z wątroby

Po rozcięciu myszy i odsłonięciu wątroby pozbywano się większości krwi poprzez wypłukanie jej 30mL roztworu HBSS wstrzykniętego dosercowo. Następnie wątroba była dokładnie cięta na miążgę i umieszczana w 50mL probówce typu Falcon zawierającej 15mL pożywki hodowlanej MEM z dodatkiem 10% FBS i 1mg/mL kolagenazy D wraz z 0,1mg/mL

DNazy I ogrzanej do 37°C. Trawienie enzymatyczne przeprowadzone było przez 20 minut w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością 140 obrotów na minutę. Po upływie 30 minut próbówki wirowano przy prędkości 300xg przez 5 minut w celu usunięcia enzymów z roztworu. Pelet komórek i pozostałości tkankowych zawieszano w 15mL buforu HBSS zawierającego 10% FBS a następnie filtrowano przez filtr o średnicy porów 100µm. Fragmenty, które pozostały na filtrze rozcierano mechanicznie i łączono z przesączem.

Zawiesina była następnie przepuszczana przez kolumnę z upakowaną watą szklaną w celu eliminacji martwych komórek oraz pozostałości śluzu. Wata szklana umieszczana była luźno na wysokość 4cm w 10mL strzykawce. Przed przepuszczeniem zawiesiny kolumna była równoważona poprzez przelanie 10mL buforu HBSS w temperaturze pokojowej. Po przefiltrowaniu zawiesiny, kolumna była 3-krotnie przepłukana 10mL buforu HBSS. Przesącz zbierano do czystej próbówki 50mL typu Falcon. Komórki następnie wirowano, a osad komórek zawieszano w 4mL buforu PBS. Do 15mL próbówki dodawano 3mL roztworu do separacji limfocytów (Corning), a następnie delikatnie nakładano nad niego zawiesinę komórek. Probówka była następnie wirowana przez 30min przy prędkości 400xg. Po zwirowaniu zbierano komórki, które zgromadziły się na połączeniu warstw włączając w to 1mL ponad granicą i 1mL poniżej granicy międzyfazowej. Komórki następnie płukano 10mL buforu PBS, wirowano przez 10min. przy prędkości 500xg, powstały osad komórek zawieszano w 1mL buforu HBSS z dodatkiem 5% FBS i umieszczano na lodzie.

3.2.5. Izolacja komórek ze szpiku kostnego i ich różnicowanie w kierunku komórek dendrytycznych

Szpik kostny izolowano z kości udowych oraz piszczelowych myszy TCR α^{ko} . Po odcięciu kończyn od reszty tułowia, kości manualnie oczyszczano ze skóry i mięśni, a następnie po odcięciu nasad kości, szpik wypłukiwano sterylnym buforem HBSS do szalki 60mm (Fisher) przy użyciu strzykawki 0,5mL. Zawiesinę komórek przenoszono do próbówki 15mL typu Falcon. Po zwirowaniu (10 minut 300xg), pelet komórek zawieszano w 15mL buforowanego roztworu chlorku amonu i inkubowano 5 minut w celu lizy erytrocytów. Komórki ponownie wirowano i opłukiwano 10mL buforu HBSS, a po zwirowaniu komórki zawieszano w 4mL pożywki hodowlanej CTM i filtrowano przez filtr o wielkości porów 70µm. Następnie komórki liczone i zawieszano w pełnej pożywce hodowlanej CTM w ilości 0,5x10⁶/mL.

Do komórek szpiku kostnego zawieszonych w pożywce CTM dodawano 10ng/mL GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie granulocytów i makrofagów; z ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (PeproTech)), w celu zróżnicowania i dojrzewania komórek dendrytycznych. Na każdej 10mm szalce Petriego (Fisher Scientific) umieszczano 10mL zawiesiny komórek i hodowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po upływie 3 dni, do każdej płytki dodawano dodatkowo 10mL pełnej pożywki CTM zawierającej 10ng/mL GM-CSF i umieszczano w inkubatorze na kolejne 3 dni. Dojrzałe komórki dendrytyczne zbierano, znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko CD11c, w celu sprawdzenia efektywności różnicowania. Zróżnicowane komórki dendrytyczne były następnie zamrażane w ilości 3 milionów na każdą próbkę do mrożenia i przetrzymywane w -80°C do czasu użycia.

3.2.6. Izolacja surowicy z krwi obwodowej

W myszarni z podgrzanego i naciętego ogona dorosłej myszy pobierano kilka kropel krwi do próbki zawierającej 250µL HBSS, a następnie zostawiano w temperaturze pokojowej na co najmniej 2 godziny, w celu wytworzenia skrzepu. Następnie próbki wirowano przez 10 min. przy 10000xg w temperaturze pokojowej. Po zwirowaniu surowicę odzyskiwano zbierając pipetą nad osadu, porcjowano i zamrażano w -80°C do czasu eksperymentu.

3.2.7. Analiza histologiczna

Analizę histologiczną przeprowadzono w celu identyfikacji naciekających limfocytów związanych z postępującą chorobą autoimmunologiczną w narządach myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Świeżo wyizolowane narządy umieszczano natychmiast w 2,5mL 10% buforowanego roztworu formaliny, a następnie próbki wysyłało do firmy HistoWiz (New York), gdzie były procesowane, barwione i analizowane przez histopatologa.

3.2.8. Analiza markerów powierzchniowych metodą fluorymetrii przepływowej

Analizę markerów zewnątrzkomórkowych komórek eukariotycznych przeprowadzono przy użyciu cytometrii przepływowej, znakując molekuly przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z fluorochromami. Próbkę analizowano w cytometrze przepływowym typu CytoFLEX (B5-R3-V5, Beckman Coulter), wyposażonym w trzy lasery (405nm, 488nm, 638nm)

i zestaw filtrów dających możliwość detekcji 13 różnych fluorochromów. Komórki do analizy przenoszono bezpośrednio z płytki hodowlanej, lub po izolacji z organów, filtrowaniu, zbierano i przenoszono w ilości 1×10^6 na każdy dołek 96 dołkowej płytki okrągło-dennej. Płytkę wirowano, usuwano supernatant i następnie dodawano monoklonalnego przeciwciała, blokującego fragmenty receptora Fc mysich IgG, inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a następnie komórki znakowano 15uL roztworem odpowiedniej mieszanki przeciwciał rozcieńczonych w buforze HBSS przez 30min w 4°C. Komórki znakowano przeciwciałami skierowanymi przeciwko następującym molekułom: CD4, CD8, CD11c, CD44, CD62L, CD71, CD73, PD-1, TCR V α 2. Po zakończeniu inkubacji, próbki były opłukiwane dwukrotnie buforem HBSS, a następnie zawieszano w 150uL buforu z dodatkiem 2% FBS i analizowano na cytometrze przepływowym. Komórki bramkowano elektronicznie na podstawie wielkości oraz kształtu i wewnętrznych ziarnistości, wykorzystując parametry FSC (Forward Scatter), rejestrujący rozproszenie na wprost zgodnie z kierunkiem wiązki laserowej i SSC (Size Scatter) rejestrujący rozproszenie pod kątem 90C. Jako kontrole używano komórki nieznakowane przeciwciałem. Dane analizowano przy użyciu programu FlowJo V10 (Becton Dickinson).

3.2.9. Izolacja limfocytów za pomocą cytometru przepływowego

Homogenne populacje limfocytów CD4⁺Foxp3^{hCD2-}, CD4⁺Foxp3^{hCD2-}CD44⁺CD62L⁻, CD4⁺Foxp3^{hCD2-}CD44⁻CD62L⁺ oraz CD4⁺Foxp3^{hCD2+} otrzymywano poprzez sortowanie na sorterze firmy Sony (SH800, 4 lasery) uprzednio zaznakowanych markerami powierzchniowymi zawieszin komórkowych otrzymanych w wyniku izolacji z narządów limfatycznych i nielimfatycznych. W celu znakowania komórek przeznaczonych do sortu, do 1mL zawiesiny dodawano odpowiednią ilość przeciwciał bezpośrednio ze stoku komercyjnego, a następnie barwiono w ciemności w temperaturze 4°C przez 30min. Po dwukrotnym opłukaniu 5mL roztworu HBSS z 5% FBS, komórki zawieszano w stężeniu 10^7 komórek/mL w buforze HBSS z 5% FBS i filtrowano przez filtr nylonowy dołączony do probówek typu Falcon (30 μ m). Komórki sortowano do buforu HBSS z dodatkiem 10% FBS w 5mL lub 15mL polipropylenowych probówkach typu Falcon. Czystość otrzymanych po sorcie populacji (zwykle >95%), analizowano na cytometrze typu CytoFLEX. Komórki hodowano następnie w pełnej pożywce CTM w celu unieśmiertelnienia lub izolowano z nich całkowite RNA.

3.2.10. Hodowla komórek eukariotycznych

3.2.10.1. Hodowla ustalonych linii komórkowych

Komórki eukariotyczne hodowano w pełnej pożywce hodowlanej CTM, w sterylnych warunkach w plastikowych 96-cio, 24- lub 6-cio dołkowym formacie, jak również w butelkach hodowlanych o pojemności 25cm², 75cm² (Costar) w inkubatorze hodowlanym w stałej temperaturze 37°C i stałym dopływie CO₂ na poziomie 5%. utrzymującym się na poziomie 5%. Pożywka hodowlana dla komórek HT-2 zawierała dodatkowo IL-2 w ilości zapewniającej przeżycie nie dłuższe, niż 24h, natomiast hybridomy T natomiast hodowano w obecności 1× HAT (hipoksantyna/aminopteryna/tymidyna). Pasaże komórek prowadzono pod laminarem komórkowym, przy użyciu sterylnych, plastikowych pipet (Costar).

3.2.10.2. Hodowla limfocytów CD4⁺

W procesie generowania hybridom limfocyty T uprzednio wysortowane musiały przejść przez proces generowania tak zwanych blastów w celu otrzymania krytycznej liczby zaaktywowanych limfocytów. Wyizolowane komórki CD4⁺Foxp3^{hCD2-} hodowano na szalkach hodowlanych opłaszczonych przez noc w temperaturze 4°C przeciwciałem anti-CD3/anti-CD28 o stężeniu odpowiednio 10µg/mL oraz 1µg/mL w PBS. Niezwiązane do plastiku przeciwciało zbierano, a następnie płytkę opłukiwano 3 razy 5mL roztworu PBS. Wyizolowaną populację komórek CD4⁺Foxp3^{hCD2-} liczono, opłukiwano 5mL roztworu HBSS zawierającego 5% FBS i zawieszano w pełnej pożywce hodowlanej CTM w gęstości 1x10⁶/mL. Komórki hodowano w inkubatorze hodowlanym w temperaturze 37°C w atmosferze CO₂ 5% przez 3 dni, po czym do dzielących się zaktywowanych limfocytów dodawano interleukinę-2 w stężeniu końcowym 5ng/mL i fuzjowano z linią komórkową BW po czasie nie dłuższym niż 48h.

3.2.10.3. Krioprezewacja komórek

Komórki eukariotyczne hodowane w pożywce CTM w sterylnym naczyniu zbierano do probówki 15mL, wirowano przez 10 minut z prędkością 300×g. Otrzymany pelet komórkowy opłukiwano dwukrotnie buforem HBSS wzbogaconym w 2% FBS, wirowano ponownie i

zawieszano w odpowiedniej objętości pełnego medium hodowlanego CTM. Po zawieszeniu komórek dodano równą objętość mieszaniny do mrożenia komórek o stężeniu końcowym DMSO 7,5%, mieszano i przenoszono do probówek przeznaczonych do mrożenia komórek eukariotycznych (Corning). Probówki z komórkami umieszczano w pojemniku z izopropanolem i pozostawiano na noc w temperaturze -80°C . Następnego dnia komórki przenoszono do banku komórkowego w ciekłym azocie.

3.2.10.4. Rozmrażanie komórek

Probówki z zamrożonymi komórkami przechowywane w banku komórkowym w ciekłym azocie przenoszono do łaźni wodnej o temperaturze 37°C do czasu aż lód w roztworze przestawał być widoczny. Następnie komórki sterylnie przenoszono do 15mL probówki typu Falcon, i trójstopniowo rozcieńczano DMSO obecny w medium do mrożenia poprzez dodawanie za każdym razem równej objętości buforu HBSS zawierającego 10% FBS. Probówkę następnie wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej z prędkością $300\times g$, po czym komórki zawieszano w odpowiedniej ilości pożywki hodowlanej CTM i umieszczano w sterylnym naczyniu hodowlanym w inkubatorze (37°C , 5% CO_2).

3.2.11. Produkcja hybrydom limfocytów T CD4^+

W celu przetestowania specyficzności i swoistości antygenowej receptorów TCR limfocytów konieczne jest ich unieśmiertelnienie poprzez fuzjowanie z komórkami grasiczaka BW, który charakteryzuje się brakiem ekspresji łańcuchów α i β receptora dla komórek T. Komórki $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ wyizolowane z organów i/lub węzłów chłonnych bezpośrednio po przesortowaniu na sorterze SONY poddawane były ekspansji in vitro na płytkach opłaszczonych przeciwciałami anty-CD3/anty-CD28. Namnożone i zaktywowane limfocyty poddawano procesowi fuzji z komórkami grasiczaka BW.

Namnożone komórki przenoszono z płytki do 50mL probówki typu Falcon i mieszano z komórkami BW w proporcji 1:5, przy czym ilość komórek grasiczaka nie mogła być mniejsza, niż 1×10^7 . Zmieszane komórki były odmywane dwukrotnie od surowicy poprzez płukanie ocieploną do temperatury 37°C pożywką MEM. Po każdym płukaniu komórki były wirowane przez 5 minut przy prędkości $300\times g$ w pokojowej temperaturze. Po ostatnim płukaniu i zdekantowaniu

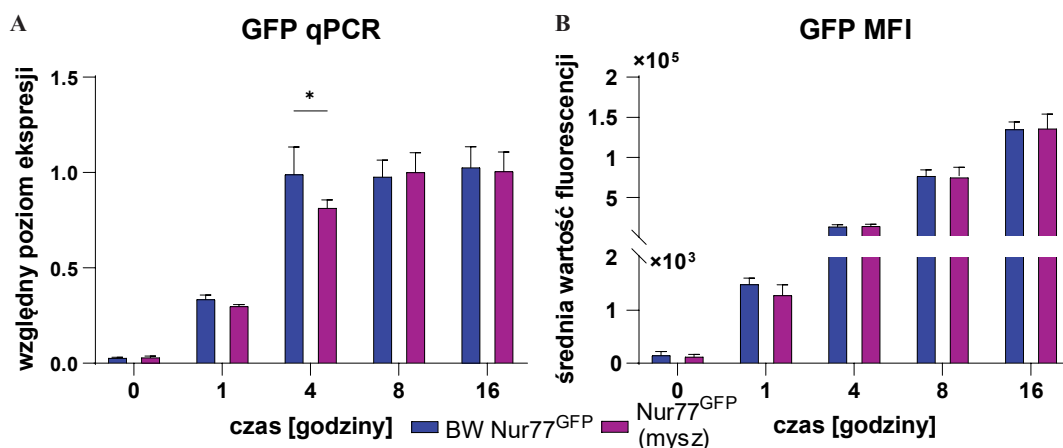
supernatantu znad osadu, probówka była ponownie wirowana przez 1 minutę, w celu zebrania pozostałości pożywki MEM, która osadziła się na ściankach. Supernatant z ostatniego wirowania zbierany był przy użyciu pipety o objętości 1mL, następnie do peletu komórek dodawano 1mL roztwór glikolu polietylenowego PEG1450 zmieszanego z pożywką MEM w proporcji 1:1, podgrzanego do temperatury 37°C, i przefiltrowanego przez filtr o wielkości porów 40µm. Po dodaniu glikolu, komórki mieszano i umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 90 sekund. Następnie do mieszanki komórek i PEG-u dodawano stopniowo 10mL pożywki MEM w temperaturze 37°C, dodając co 30 sekund odpowiednio 1mL, 2mL, 3mL i 4mL jednocześnie delikatnie obracając probówkę. W ostatnim etapie całość uzupełniono pożywką MEM do objętości 50mL, następnie delikatnie obracano probówkę do góry nogami w celu wymieszania i rozcieńczenia PEG-u w pożywce MEM. Całość inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 5 min, wirowano 5 min 300×g, płukano świeżą porcją pożywki MEM i zawieszano w pełnej pożywce hodowlanej CTM. Komórki przenoszono na płytki płaskodenne 96-cio dołkowe firmy Costar w objętości 100µL na dołek i hodowano w inkubatorze komórkowym (37°C, w atmosferze CO2 5%). Po 24 godzinach do każdego dołka dodawano 50uL pożywki CTM zawierającej 3× stężony HAT (hipoksantyna/aminopteryna/tymidyna), umożliwiającej wzrost komórek hybrydowych. Po 7-10 dniach zbierano pojawiające się klony i testowano je na obecność CD4 oraz receptora TCR. Podwójnie pozytywne hybrydomy przenoszono na 24 dołkowe płytki (Costar) w celu dalszej propagacji. Po odpowiednim namnożeniu hybrydom, były one testowane pod względem odpowiedzi na antygen poprzez wzrost ekspresji czynnika Nur77 obserwowany jako wzrost ekspresji białka zielonej fluorescencji.

3.2.12. Przygotowanie lizatu białkowego z prostaty, wątroby i płuc.

Lizat białkowy z prostaty, wątroby, jajników i płuc myszy Aire^{ko}TCR^{mini} stosowano do stymulacji hybrydom. Prostata, wątroba i płuca izolowane z myszy umieszczono na 35mm szalce w 3mL buforu PBS, a następnie przetarto przez woreczek nylonowy o wielkości porów 100µm. Komórki wraz z buforem przenoszono do 15mL probówek Falcon i sonikowano przy użyciu aparatu Branson Sonifier 450 (VWR Scientific). Lizat filtrowano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,45µm, mierzono stężenie białka przy użyciu spektrofotometru typu NanoDrop, porcjonowano do probówek do mikro-wirowania i mrożono w -80°C.

3.2.13. Testowanie odpowiedzi immunologicznej hybrydom

W jednej z ostatnich publikacji pochodzących z naszego laboratorium pokazano wyższą czułość i dokładność testu sprawdzającego odpowiedź hybrydom na antygen w oparciu o poziom ekspresji Nur77GFP (pochodzący z fuzji limfocytów T z tymomą BWNur77GFP) w porównaniu do testu z wykorzystaniem komórek HT-2 mierzącego produkcję IL-2 [73]. W myszach Aire^{ko}TCR^{mini} i kontrolnych myszach TCR^{mini} wprowadzono transgeniczny GFP pod promotorem Nur77. Odpowiedź hybrydom na stymulację antygenem mierzona jest więc oparciu o Nur77GFP pochodzący z komórek myszy transgenicznej a nie z tymomy. Poniżej przedstawiono porównanie tych dwóch rodzajów ekspresji, pokazujące, iż obydwie metody mogą być stosowane zamiennie.



Rysunek 3.3. Poziom ekspresji GFP w odpowiedzi na indukcję Nur77.

Porównano ekspresję GFP indukowaną w odpowiedzi na indukcję Nur77 pochodzącego z limfocytów CD4⁺ z myszy transgenicznej Nur77GFP z ekspresją pochodzącą z tymomy BWNur77GFP. Lewy panel przedstawia ekspresję GFP mierzona za pomocą PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Prawy panel pokazuje ekspresję białka mierzona za pomocą cytometru. Pomiary dokonywano w czasie 0, 1, 4, 8 i 16 godzin po aktywacji hybrydom za pomocą przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 immobilizowanych na płycie hodowlanej. Pokazano uśrednione wyniki z 10 hybrydom.

Odpowiedź immunologiczną hybrydom T, otrzymanych w wyniku fuzji hodowanych w obecności przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 limfocytów T izolowanych z węzłów chłonnych naciekowych i z narządów nielimfatycznych, charakteryzowano poprzez analizę ekspresji białka Nur77GFP w stymulowanych hybrydomach. Odpowiedź na antygeny tkankowo specyficzne obecne w białkowych lizatach z narządów nielimfatycznych testowano przez inkubację hybrydom T z prezentującymi te antygeny komórkami dendrytycznymi różnicowanymi ze szpiku. Do testu komórki dendrytyczne po rozmrożeniu i odplukaniu DMSO zawieszano w pożywce hodowlanej

CTM i nakładano w ilości 2×10^4 komórek na każdy dołek okrągło-dennej 96-cio dołkowej płytki, po czym dodawano antygen (lizat białkowy) na w stężeniu 20ng/mL. Na okres sześciu godzin. Po okresie inkubacji, komórki dendrytocyty były dwukrotnie odpłukiwane buforem PBS i mieszane z hybridomami w proporcji 1:10. Po szesnastu godzinach stymulacji wzrost ekspresji Nur77GFP określano przy użyciu cytometru przepływowego CytoFLEX w komórkach o fenotypie $CD4^+V\alpha 2^+$. Jako kontrole stosowano hybridomy bez komórek dendrytycznych, hybridomy z DCs, bez antygeny oraz hybridomy stymulowane anty-CD3/anty-CD28 (w stężeniu odpowiednio 1ng/mL i 0,1ng/mL) związanymi do uprzednio przygotowanych płytek płaskodennych 96-cio dołkowych. Każda z hybridom testowania była co najmniej trzykrotnie na każdy z warunków.

3.2.14. Test immunoenzymatyczny ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) na obecność przeciwciał IgG w surowicy

Test immunoenzymatyczny ELISA IgG służył do wykrywania stężenia IgG w surowicy pobranej z myszy TCR^{mini} oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$ z użyciem anty-mysiego przeciwciała poliklonalnego anty-IgG, skoniugowanego z enzymem, peroksydazą chrzanową. Każdy dołek przeznaczony do testu z płytki dostarczonej razem z zestawem został opłaszczony 100 μ L roztworu do opłaszczania (1xPBS) zawierającego 250x rozcieńczone przeciwciało wychwytyjące. Po szczelnym zakryciu płytka poddana została całonocnej inkubacji w temperaturze 4°C, a następnie przepłukana dwukrotnie buforem do przemywania (1x PBS, 0.05% Tween 20) w ilości 300 μ L na każdy dołek. Do każdego z dołków następnie dodano 250 μ L roztworu blokującego (1x) i zostawiono do inkubacji przez noc w temperaturze 4°C. Następnie bufor blokujący został usunięty i płytka została dwukrotnie przepłukana buforem do przemywania (1x PBS, 0.05% Tween 20) w ilości 300 μ L na każdy dołek. Przygotowano serię dwukrotnych rozcieńczeń standardów w buforze do testu (bufor A) i dodano do odpowiednich dołków na płytce w powtórzeniu. Do pozostałych dołków dodano w powtórzeniu badane preparaty surowicy (10 μ L) oraz 90 μ L buforu A rozcieńczone 10000 razy. Następnie do każdego z dołków dodano 50 μ L przeciwciała do detekcji. Po inkubacji przez 2 godziny w temperaturze pokojowej i wytrząsaniu (400 rpm), z dołków usunięto płyn, przemyto czterokrotnie buforem do przemywania i do każdego dołka dodano po 100 μ L roztworu substratu. Po inkubacji (15 minut), reakcję przerywano przez dodanie roztworu

hamującego i dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 450 (badana próbka) oraz 570 (tło) nm.

3.2.15. Analiza cytokin w surowicy za pomocą testu LegendPlex

Pomiar cytokin w tej metodzie zachodzi przy użyciu cytometru. Przeciwciała do detekcji danej cytokiny immobilizowane są na kulkach o różnej wielkości, które są dodatkowo wyznakowane za pomocą fluorochromów (PE oraz APC). Pozwala to na badanie 13 cytokin w każdej próbce w tym samym czasie. Standardy oraz próbki rozcieńczone 10000 razy umieszczono na płytce dołączonej do zestawu. Krzywą standardową przygotowano przez dwukrotne rozcieńczenie seryjne standardów. Badane próbki oraz standardy umieszczano na płytce w powtórzeniu. Następnie do każdego z dołków dodano mieszaniny immobilizowanych przeciwciał do detekcji i inkubowano przez 2 godziny. Po czterokrotnym odmyciu (200µL 1x PBS, 0.05% Tween 20), do próbek dodawano 100µL roztworu przeciwciał do detekcji znakowanych biotyną, inkubowano przez 1 godzinę. Po czterokrotnym przemyciu dołków (200µL 1x PBS, 0.05% Tween 20), do dołków wprowadzano 100µL roztworu streptawidyny, inkubowano przez 30 minut po czym czterokrotnie przemywano (200µL 1x PBS, 0.05% Tween 20). Próbki zawieszano w 200 µL PBS i analizowano na cytometrze po uprzednim bramkowaniu na sygnał pochodzący od PE oraz APC z kulek o różnej wielkości wykrywanych przez SSC oraz FSC. Wartość fluorescencji dla każdej z próbek liczony był przez program po doniesieniu do krzywej standardowej.

3.2.16. Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} izolowano z fragmentów ogonów. Tkanki umieszczano w buforze lizującym (rozdział 3.1.2) i poddawano całonocnemu trawieniu w temperaturze 56°C. Uzyskany lizat oczyszczano mieszkanką fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1; v/v) w stosunku 1:1 (lizat:mieszanka), wytrząsano przez 15 sekund i wirowano przez 10 minut przy prędkości 16000xg. DNA wytrącano z warstwy wodnej za pomocą 100% etanolu w proporcji 2,5:1 (etanol:warstwa wodna) i ponownie wirowano przez 10 minut przy prędkości 16000xg. Etanol usuwano, pelet DNA przemywano 75% etanolem, wirowano (10 minut przy prędkości 16000xg), suszono i rozpuszczano w 150µL wody miliQ. 1µL DNA używano do genotypowania metodą PCR (rozdział 3.2.23).

3.2.17. Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowany był z komórek przy użyciu zestawu „RNeasy Mini kit” (Qiagen), według zaleceń producenta. Komórki lizowano w buforze RLT (350µL). Po dodaniu jednakowej objętości 70% etanolu, całość ładowano na kolumnę do izolacji RNA. Po zwirowaniu (1 minuta, 16000xg), RNA związane na membranie kolumny przemywano 500µL buforu RW1 i poddawano trawieniu DNazą I w celu usunięcia genomowego DNA. Po 15 minutach trawienia, kolumnę przemywano 500µL buforu RW1, następnie 750µL buforu RPE zawierającego etanol. Po zwirowaniu (1 minuta, 16000xg), pustą kolumnę wirowano ponownie (1 minuta, 16000xg) w celu pozbycia się resztek etanolu. Na kolumnę wlewano 50µL wody wolnej od RNaz, czekano minutę i RNA eluowano przez wirowanie (1 minuta, 16000xg). Otrzymany preparat analizowano spektrofotometrycznie.

3.2.18. Elektroforeza analityczna i preparatywna

Otrzymane w wyniku reakcji PCR fragmenty DNA analizowano przez rozdział w 1% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (0.1mg/mL, v/v). Prążki DNA porównywano do markera mas (1 kb+, Invitrogen) przez ekspozycję światłem UV (system dokumentacji żeli DocXR, BioRad). W celu izolacji DNA (elektroforeza preparatywna), prążki DNA odpowiedniej wielkości izolowano przez wycięcie z żelu przy pomocy skalpela. Fragmenty DNA izolowano jak w rozdziale 3.2.20.

3.2.19. Oczyszczanie produktu reakcji PCR

Produkty reakcji PCR oczyszczano przy użyciu zestawu “QIAquick PCR Purification Kit” firmy Qiagen zgodnie z zaleceniami producenta. Do produktu PCR dodawano pięciokrotny nadmiar buforu PB i całość nanoszono na kolumnę znajdującą się w zestawie. Po zwirowaniu (1 minuta, 16000xg), związane do kolumny DNA przemywano 750µl buforu PE zawierającego etanol. Po zwirowaniu (1 minuta, 16000xg), pustą kolumnę wirowano ponownie (1 minuta, 16000xg) w celu pozbycia się resztek etanolu. Na kolumnę wlewano 50µl wody wolnej od nukleaz, czekano minutę i DNA eluowano przez wirowanie (1 minuta, 16000xg). Otrzymany preparat analizowano spektrofotometrycznie (rozdział 3.2.21).

3.2.20. Izolacja DNA z żelu agarozowego

Fragmenty DNA rozdzielone w żelu agarozowym (rozdz. 1.2.4.3) izolowano przy użyciu zestawu „Gel Extraction Kit” firmy Qiagen, zgodnie z zaleceniami producenta. Fragment żelu zawierający DNA umieszczano w probówce typu Eppendorf, do której wlewano bufor QG w objętości 300µL na każde 100mg żelu. Probówkę umieszczano w temperaturze 56°C do czasu rozpuszczenia się żelu. Następnie otrzymany roztwór nakładano na kolumnę znajdującą się w zestawie, wirowano (1 minuta, 16000xg) i przemywano 750µL buforu PE zawierającego etanol. Po zwirowaniu (1 minuta, 16000xg), pustą kolumnę wirowano ponownie (1 minuta, 16000xg) w celu pozbycia się resztek etanolu. Na kolumnę wlewano 50µL wody wolnej od nukleaz, czekali minutę i DNA eluowano przez wirowanie (1 minuta, 16000xg). Otrzymany preparat analizowano spektrofotometrycznie (rozdział 3.2.21).

3.2.21. Oznaczanie ilości DNA i RNA metodą spektrofotometryczną

Stężenie kwasów nukleinowych oraz określenie stopnia czystości wykonano spektrofotometrycznie przy użyciu NanoDrop One C (Fisher Scientific). 1µL preparatu nakładano na elektrodę i uzyskiwano stężenie oraz czystość preparatu (stosunek absorbancji przy długościach fali 260 i 280nm). Typowo uzyskiwano stosunek 260/280nm 1.8 dla DNA i 2.0 dla RNA.

3.2.22. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Syntezę pierwszej nici cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, ang. Reverse Transcription) prowadzono z użyciem zestawu “Superscript III” firmy Invitrogen zgodnie z zaleceniami producenta z RNA wyizolowanym z homogennych CD4⁺Foxp3^{hCD2+}, CD4⁺Foxp3^{hCD2-}, CD4⁺Foxp3^{hCD2-}CD44⁺CD62L⁻, CD4⁺Foxp3^{hCD2-}CD44⁻CD62L⁺ jako matrycą. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem startera TCRCα3 zawierającego sekwencję komplementarną do region stałego łańcucha TCRα. Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę:

- 10× bufor dla odwrotnej transkryptazy (stężenie końcowe- 1×);
- 25mM MgCl₂ (stężenie końcowe 5mM);
- 0,1M DTT (stężenie końcowe 10mM);

- 40U/ μ l Inhibitor RNaz (RNazeOUT) (stężenie końcowe 2 U);
- 2 μ M Genowo-specyficzny starter TCRC α 3 (stężenie końcowe 0,1 μ M);
- 10mM dNTP (stężenie końcowe 0,5mM);
- 200U/ μ l SuperScript III RT (stężenie końcowe 10 U);
- Woda wolna od RNaz do 20 μ l

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w termocyklerze Eppendorf przez 80 minut w 50°C, następnie podwyższano temperaturę do 85°C na okres 5 minut, po czym reakcję chłodzono do 4°C.

Po reakcji RT, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 1 μ L RNazy H (2U/ μ L) w celu specyficznej degradacji RNA w hybrydach RNA:DNA. Całość inkubowano 20 minut w 37°C.

Otrzymane w ten sposób cDNA używano jako matrycę do wprowadzenia sekwencji adaptorowych i indeksów niezbędnych w do sekwencjonowania metodą Illuminy.

3.2.23. Reakcja łańcuchowej polimerazy

Myszy genotypowano przy użyciu reakcji PCR, używając 50ng genomowego DNA przygotowanego jak opisano w rozdziale 3.2.15. Do każdej reakcji użyto:

- 1x bufor do polimerazy (rozcieńczony z 10x stężonego preparatu): 2 μ l
- startery (20 μ M): 0.4 μ L każdego
- DNA (50 ng): 1 μ L
- polimeraza Taq (5U/ml): 0.1 μ L
- woda: do 20 μ L

Kontrolę negatywną stanowiła reakcja, w której zamiast DNA dodano wody. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler nexus (Eppendorff) w poniższych warunkach, kroki 2-4 powtarzano 35 razy:

- 1) 95°C, 1 minuta
- 2) 95°C, 30 sekund
- 3) 56°C, 30 sekund

- 4) 72°C, 1 minuta
- 5) 72°C, 10 minut
- 6) 4°C, nieskończoność

3.2.24. Przygotowanie biblioteki DNA do sekwencjonowania metodą Illumina

Biblioteki DNA przygotowywano z całkowitego RNA ekstrahowanego z homogennych populacji limfocytów T CD4⁺Foxp3GFP⁺ oraz CD4⁺Foxp3GFP⁺, na matrycy którego syntezowano cDNA (rozdz. 3.2.23).

Do sekwencjonowania wysokoprzepustowego metodą Illumina drugą nić cDNA dosyntezywano wypełniając pierwszą nić w reakcji katalizowanej przez polimerazę Taq AccuPrime (Invitrogen) przy użyciu startera Vα2_88, zawierającego sekwencję komplementarną do sekwencji łańcucha Vα. Skład mieszaniny reakcyjnej:

- cDNA otrzymane w poprzednim kroku;
- 10× bufor dla polimerazy AccuPrime, zawierający dNTP oraz jonu Mg²⁺ (stężenie końcowe 1×);
- 2μM starter Vα2_88 (stężenie końcowe 0,1μM);
- 5U/μL AccuPrime (stężenie końcowe 1U).

Reakcję prowadzono w następujących warunkach:

- 1) 94°C, 2 minuty
 - 2) 94°C, 10 sekund
 - 3) 50°C, 10 sekund
 - 4) 72°C, 30 sekund
 - 5) 94°C, 10 sekund
 - 6) 59°C, 10 sekund
 - 7) 72°C, 30 sekund
 - 8) 72°C, 1 minuta
- } 2x
- } 3x

9) 4°C, nieskończoność

Kolejne etapy służyły wprowadzeniu indeksów i sekwencji niezbędnych do przeprowadzenia sekwencjonowania. Ponieważ były to długie fragmenty, zostały one wprowadzone dwuetapowo. W pierwszym używano starterów Vα2ill i CA1ill w stężeniu końcowym 0,5μM, i ponownie reakcja była prowadzona przy użyciu polimerazy AccuPrime.

- 10× bufor dla polimerazy AccuPrime, zawierający dNTP oraz jonu Mg²⁺ (stężenie końcowe 1×);
- 10μM starter Vα2ill (stężenie końcowe 0,5μM);
- 10μM starter CA1ill (stężenie końcowe 0,5μM);
- 5U/μL AccuPrime (stężenie końcowe 1U).

Reakcję prowadzono w następujących warunkach:

95°C	1 minuta	
94°C	10 sekund	} 2x
60°C	10 sekund	
72°C	45 sekund	
94°C	10 sekund	
68°C	15 sekund	} 18x
72°C	45 sekund	
72°C	2 minuty	
4°C	∞	

Po tym etapie niezbędne było oczyszczanie produktów PCR, w celu zmniejszenia niespecyficznej syntezy PCR w kolejnym etapie dołączania indeksów do Illuminy w reakcji PCR. Ostatni etap przeprowadzany był w składzie mieszaniny:

- 10× bufor dla polimerazy AccuPrime, zawierający dNTP oraz jonu Mg²⁺ (stężenie końcowe 1×);
- 10μM starter D50... (stężenie końcowe 0,5μM);
- 10μM starter D70... (stężenie końcowe 0,5μM);

- 5U/ μ L AccuPrime (stężenie końcowe 1U).

Startery D50... i D70... były na tym etapie zmienne, każda populacja z biblioteki otrzymała indywidualny zestaw indeksów w celu właściwej identyfikacji po sekwencjonowaniu.

Reakcję prowadzono w następujących warunkach:

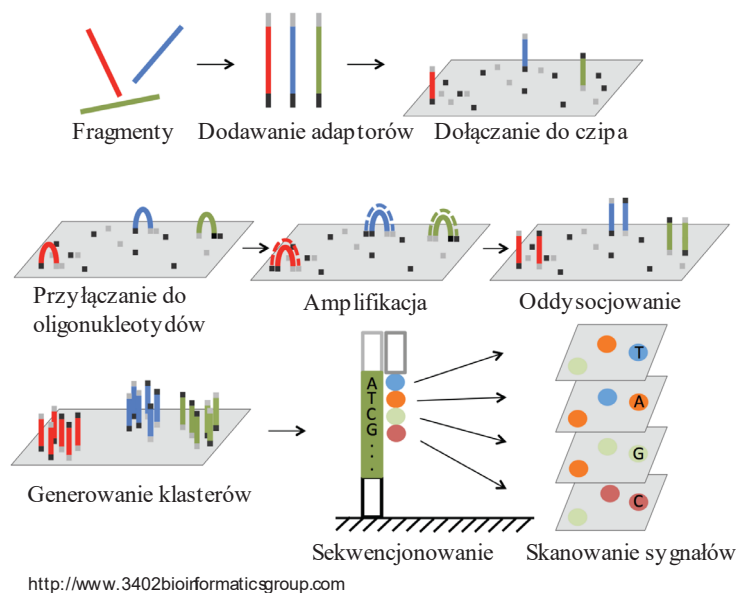
95°C	1 minuta	
94°C	10 sekund	} 2x
60°C	10 sekund	
72°C	45 sekund	
94°C	10 sekund	
68°C	15 sekund	} 18x
72°C	45 sekund	
72°C	2 minut	
4°C	∞	

Produkt reakcji nanoszono na żel agarozowy i prowadzono elektroforezę preparatywną (rozd. 3.2.20.). Fragment DNA o wielkości 200pz izolowano z żelu agarozowego, wytrącano z roztworu (rozd. 3.2.19). Zawieszano w wodzie miliQ preparat i przechowywano w -20°C do momentu sekwencjonowania (rozd. 3.2.25.).

3.2.25. Sekwencjonowanie metodą Illumina

Opis przygotowania próbki do sekwencjonowania znajduje się w rozdziale 3.2.24. Rysunek 3.4 przedstawia schemat sekwencjonowania wysokoprzepustowego metodą Illumina, która bazuje na zmodyfikowanej metodzie sekwencjonowania Sangera. W sekwencjonowaniu Illumina, fragmenty adaptorów wprowadzone przy pomocy PCR do sekwencjonowanego kwasu nukleinowego łączą się (hybrydują) do oligonukleotydów zimmobilizowanych do szklanej matrycy czipa. Materiał jest następnie amplifikowany z użyciem fluorescencyjnych dideoksynukleotydów (ddNTP; każdy nukleotyd (A, T, C, oraz G) jest wyznakowany cząsteczką emitującą światło o różnej długości fali), które po inkorporacji zatrzymują dalszą syntezę. W każdym z tych cykli sekwenator robi zdjęcie i szereg tych zdjęć jest analizowany po zakończeniu reakcji. W sekwencjonowaniu Illumina są używane enzymy, które, po wykonaniu zdjęcia przez maszynę, modyfikują ddNTP do dNTP, umożliwiając dalszą syntezę. Wydłużany fragment DNA

łączy się do kolejnego oligonukleotydu związanego na czipie, komplementarnego do drugiego adaptera wprowadzonego podczas przygotowania próbki do sekwencjonowania. W ten sposób powstaje „most” (z ang. bridge), który ulega amplifikacji. Powielone fragmenty DNA tworzą klastry (z ang. clusters) umożliwiające analizę cząsteczek poprzez zdjęcia wykonywane przez maszynę, wykrywającą fluorescencję (kolor, a więc rodzaj wincorporowanego nukleotydu).



Rys. 3.4 Schemat sekwencjonowania metodą Illumina.

3.2.26. Analiza i obróbka danych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania metodą Illumina

Wstępna analiza jakości sekwencjonowania przeprowadzana jest bezpośrednio po sekwencjonowaniu, w trakcie pierwszej obróbki danych w programie BaseSpace i obejmowała zastosowanie programu usuwanie sekwencji o niskiej jakości. Błędy typu ‘indel’ (od ang. insertion-deletion), które mogą powodować przesuwanie ramki odczytu, a co za tym idzie zmianę sekwencji stałych w porównaniu z sekwencją znaną, wzorcową, usuwane były poprzez porównywanie każdego z otrzymanych w wyniku sekwencjonowania odczytów do regionów stałych segmentu V α 2 oraz J α 2 lub J α 26. Sekwencje różniące się od wzorca w regionach stałych były eliminowane z analizy. Sekwencje analizowano z wykorzystaniem programu zaprojektowanego przez Wessam Elhefnawy [20], przy pomocy którego automatycznie porównywano sekwencje do BLAST, co pomaga w identyfikacji i porównywaniu znanych

regionów V i J. Ponadto do sekwencjonowania metodą Illumina stosowano opcję sekwencjonowania dwustronnego, co było dodatkowym krokiem pozwalającym eliminować potencjalne błędy. Jeżeli obustronne sekwencjonowanie tego samego fragmentu, nie skutkowało powstaniem dwóch identycznych sekwencji, wówczas taka były one eliminowane z analizy. Po otrzymaniu listy gotowych sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych były one wprowadzane do wygenerowanej dla naszego laboratorium bazy danych i poddawane dalszej, celowanej analizie porównawczej.

3.2.27. Analiza statystyczna

Dane analizowano z użyciem testu t-Studenta (w przypadku, gdy analizowane były dwie grupy) lub ANOVA (w przypadku, gdy analizowane były więcej niż dwie grupy). Analiza była statystycznie istotna dla wartości $p < 0,05$ i oznaczana na rysunkach za pomocą gwiazdek (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programów Prism (wersja 9, GraphPad) oraz Origin Pro (wersja 9.95; OriginLab).

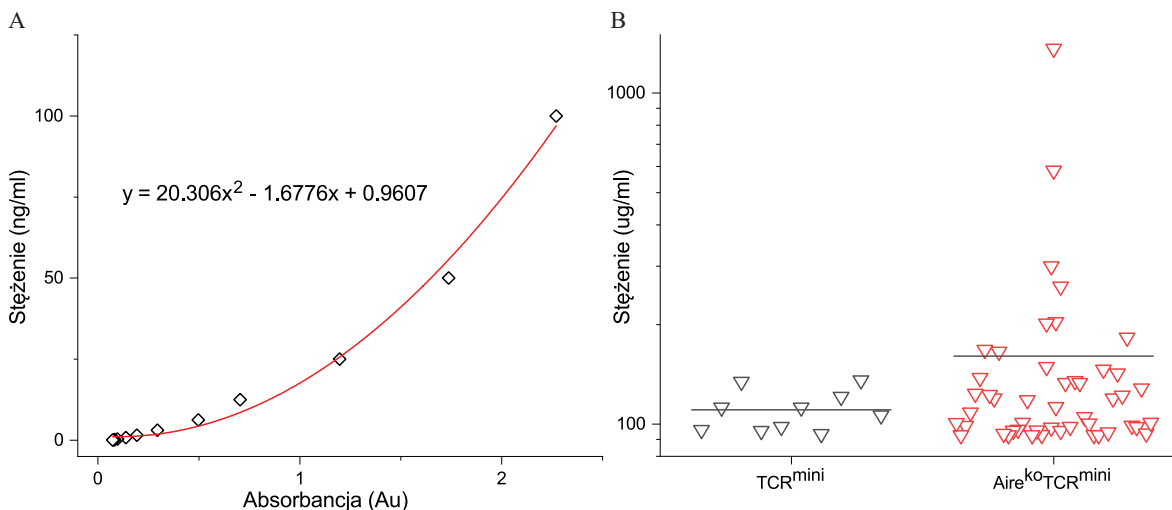
4. WYNIKI

4.1. Analiza kolonii pod kątem choroby autoimmunologicznej

Myszy z nokautem genu *Aire* po przekrzyżowaniu na różne szczepy wykazują różnice w natężeniu objawów choroby autoimmunologicznej [64]. Ponadto modele mysie z różnymi mutacjami genu *Aire* mogą manifestować główne objawy chorobowe w różnych narządach, a osobniki z tym samym typem mutacji mogą posiadać ich zróżnicowane natężenie (Tabela 1). Jest to analogiczne do różnic obserwowanych wśród pacjentów chorujących na APECED, wynikających prawdopodobnie z różnic środowiskowych i innego tła genetycznego.

W pierwszej publikacji opisującej model myszy z nokautem genu *Aire* [72] stosowany w niniejszej pracy pokazano, że około 40-73% osobników wykazywało objawy choroby autoimmunologicznej, głównie z symptomami w wątrobie, jądrach, jajnikach i trzustce (Tabela 1). Dodatkowo ograniczenie repertuaru limfocytów T powoduje osłabienie/opóźnienie występujących objawów (na przykładzie myszy *Scurfy* [20]), dlatego konieczne było wytypowanie w kolonii *Aire*^{ko}*TCR*^{mini} osobników wykazujących symptomy choroby autoimmunologicznej, które mogły być następnie użyte do dalszych eksperymentów. W tym celu oznaczono za pomocą testu ELISA poziom IgG w surowicy z myszy *Aire*^{ko}*TCR*^{mini} i typu dzikiego (*TCR*^{mini}). Podwyższony poziom IgG jest częstym wskaźnikiem rozwijającej się choroby autoimmunologicznej. Na rysunku 4.1 przedstawiono wyniki pomiaru stężenia IgG w surowicy myszy *Aire*^{ko}*TCR*^{mini} oraz myszy kontrolnych *TCR*^{mini}. Podpunkt A przedstawia krzywą standardową dla tego testu, podpunkt B przedstawia właściwy pomiar dla wybranej grupy myszy kontrolnych (n=10) i myszy *Aire*^{ko}*TCR*^{mini} (n=48). Porównanie stężenia IgG pomiędzy myszami *TCR*^{mini} i z mutacją genu *Aire*, pokazało jej podwyższony poziom (>1.5x) w przypadku 25% myszy (12 na 48), a połowa z nich (6 na 12) miała stężenie IgG co najmniej dwukrotnie większe, niż myszy kontrolne. Z dwunastu myszy *Aire*^{ko}*TCR*^{mini} wykazujących podwyższony poziom IgG tylko jedna była w wieku 3 miesięcy, pozostałe były w wieku od siedmiu do dziewięciu miesięcy. Do wstępnej analizy wytypowano więc myszy czterotygodniowe (w których mógł być jeszcze

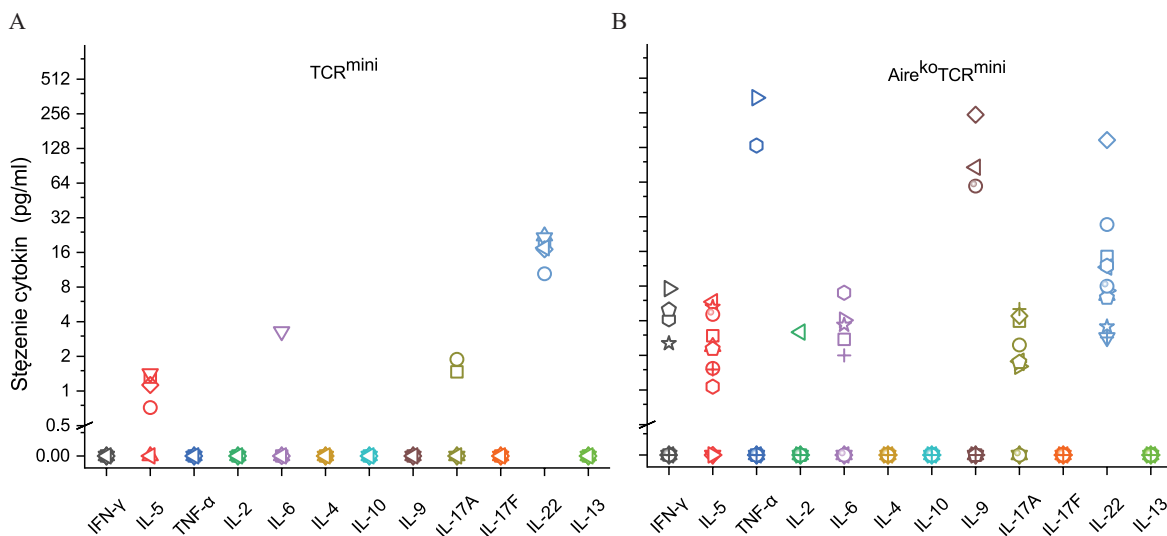
widoczny wpływ selekcji grasiczej na fenotyp tymocytów) i takie, które miały więcej, niż sześć miesięcy (w których można było zaobserwować symptomy choroby autoimmunologicznej w postaci podwyższonego poziomu IgG w surowicy).



Rysunek 4.1 Pomiar stężenia immunoglobulin typu G w surowicy myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. A) Krzywa standardowa do pomiaru stężenia IgG w surowicy. B) Porównanie stężenia IgG w surowicy pomiędzy myszami TCR^{mini} (czarne trójkąty) i myszami Aire^{ko}TCR^{mini} (czerwone trójkąty). Zmierzono stężenie n=10 myszy kontrolnych i n=48 myszy z nokautem genu *Aire*.

Surowica z wybranych myszy, wykazujących podwyższony poziom IgG została następnie przeanalizowana pod kątem zmiany stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych w odniesieniu do myszy kontrolnych.

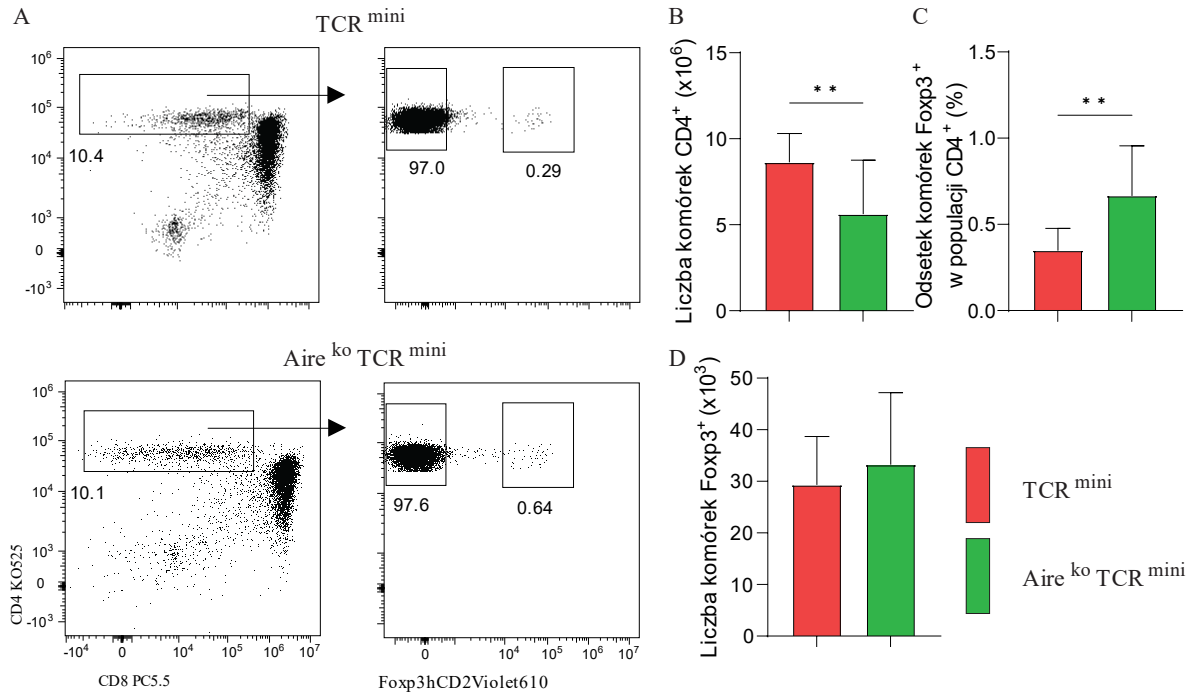
W porównaniu stężenia cytokin w surowicy myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} stwierdzono wzrost stężenia cytokin prozapalnych.: interferonu gamma (IFN- γ) u czterech z dwunastu myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, interleukiny 5 (IL-5) u dziesięciu myszy, u trzech z nich natomiast nastąpiło podwyższenie poziomu czynnika martwicy nowotworu TNF- α (z ang. **tumor necrosis factor**). Dodatkowo istotny wzrost nastąpił w przypadku cytokiny prozapalnej – interleukiny 6 (IL-6). Podwyższony poziom pozostałych testowanych cytokin wystąpił u pojedynczych osobników lub nie odstępował od poziomu zaobserwowanego w myszach kontrolnych.



Rysunek 4.2 Pomiar stężenia cytokin w surowicy myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. A) Stężenie wybranych cytokin w surowicy myszy TCR^{mini}. B) Stężenie wybranych cytokin w surowicy myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Do testu wybrano 6 myszy TCR^{mini} oraz 12 myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, które wykazywały podwyższony poziom IgG w teście ELISA (Rys. 4.1). Symbole przy każdej z cytokin odpowiadają tej samej myszy.

4.2. Analiza fenotypowa grasicy

Ponieważ autoantygeny kontrolowane przez Aire biorą udział w selekcji tymocytów, przeprowadzono analizę porównawczą grasic z czterotygodniowych myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. Rysunek 4.3A przedstawia przykładowe barwienie markerów limfocytów pomocniczych T (CD4) oraz limfocytów T regulatorowych (CD4⁺Foxp3⁺) w grasiczej populacji komórek pojedynczo pozytywnych SP (ang. **single positive**) CD4⁺CD8⁻. Podpunkty B, C oraz D na rysunku 4.3 przedstawiają uśrednioną wartość z wszystkich eksperymentów oraz próg istotności statystycznej liczby komórek CD4⁺ (B), proporcji komórek Foxp3⁺ w populacji CD4⁺ (C) oraz liczby komórek CD4⁺Foxp3⁺ (D). W młodych myszach TCR^{mini} zaobserwowano statystycznie więcej komórek CD4⁺, w porównaniu do myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Udział procentowy komórek regulatorowych w myszy TCR^{mini} był mniejszy w stosunku do myszy z nokautem genu *Aire*, natomiast różnica w liczbie komórek regulatorowych nie była statystycznie znacząca.



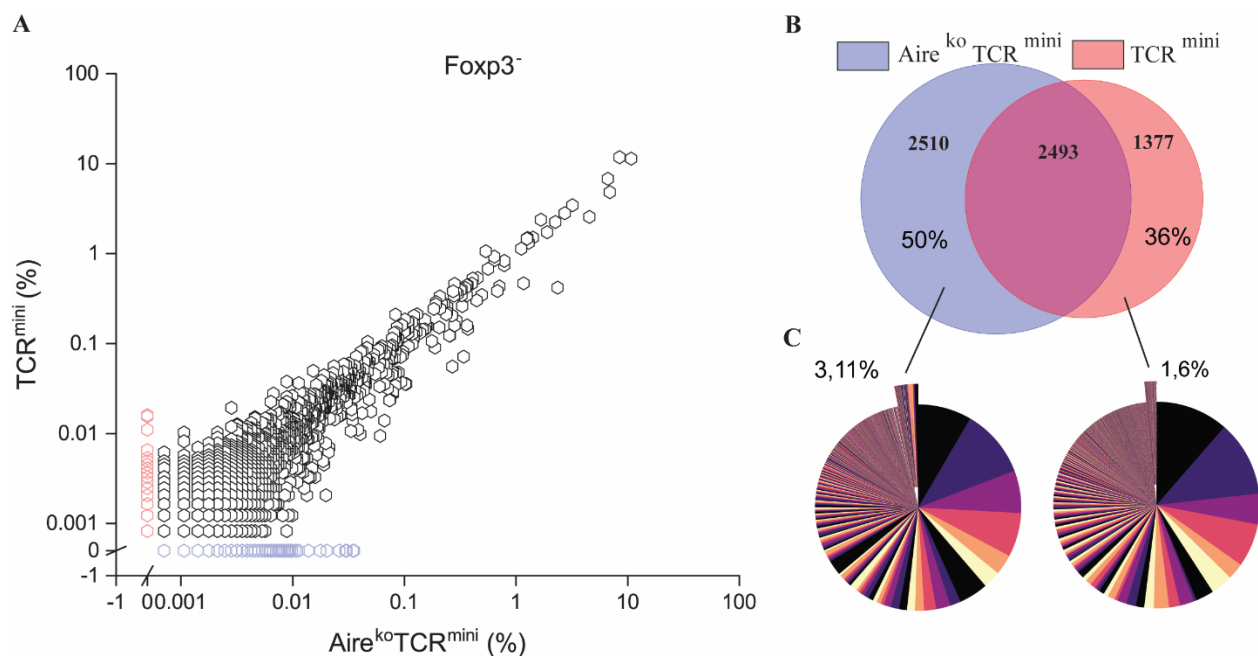
Rysunek 4.3 Analiza cytometryczna grasiczych limfocytów T z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}. A) Dwuwymiarowy wykres kropkowy przedstawiający barwienie CD4/CD8 oraz CD4/Foxp3 w bramkowanej populacji CD4⁺CD8⁻. B) Wykres słupkowy przedstawiający uśrednioną liczbę grasiczych komórek CD4⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek Foxp3⁺ w populacji grasiczych limfocytów CD4⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający uśrednioną liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺ w grasicy. Każdy z wykresów słupkowych (B, C, D) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej dziesięciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.

4.3. Analiza sekwencji populacji grasiczych limfocytów

W celu zlokalizowania potencjalnego ubytku w repertuarze grasiczych receptorów limfocytów T pomocniczych, wynikającego z upośledzonej selekcji w trakcie rozwoju grasiczego, wysortowano komórki CD4⁺Foxp3⁻ oraz CD4⁺Foxp3⁺ pochodzące z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} i zsekwencjonowano region CDR3 ich receptorów antygenowych (TCR). Tak powstałą bazę danych receptorów zastosowano do wzajemnego porównania takich samych populacji pochodzących z różnego rodzaju myszy.

W pierwszej kolejności zbadano wzajemne relacje sekwencji TCR dla komórek CD4⁺Foxp3⁻ w obu rodzajach myszy (Rys. 4.4). Rysunek 4.4A przedstawia wzajemne ułożenie

tych samych receptorów pochodzących z populacji $CD4^+Foxp3^-$ z myszy TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$ w zależności od częstości ich występowania w danym rodzaju myszy. W analizie uwzględniono sekwencje, które w bazie danych były reprezentowane co najmniej dwukrotnie. Diagram Venna przedstawiony na rysunku 4.4B porównuje do siebie indywidualne sekwencje, bez względu na częstość ich występowania w grasiczym repertuarze danej myszy. Wykres kołowy na rysunku 4.4C przedstawia częstość występowania indywidualnych sekwencji w analizowanej populacji, gdzie każdy wycinek reprezentuje indywidualną sekwencję; takie same kolory wycinków nie odnoszą się do tych samych sekwencji. Wystający fragment tego wykresu kołowego przedstawia jaką część bazy danych TCR w danym rodzaju myszy stanowią sekwencje, które nie są dla nich wspólne.

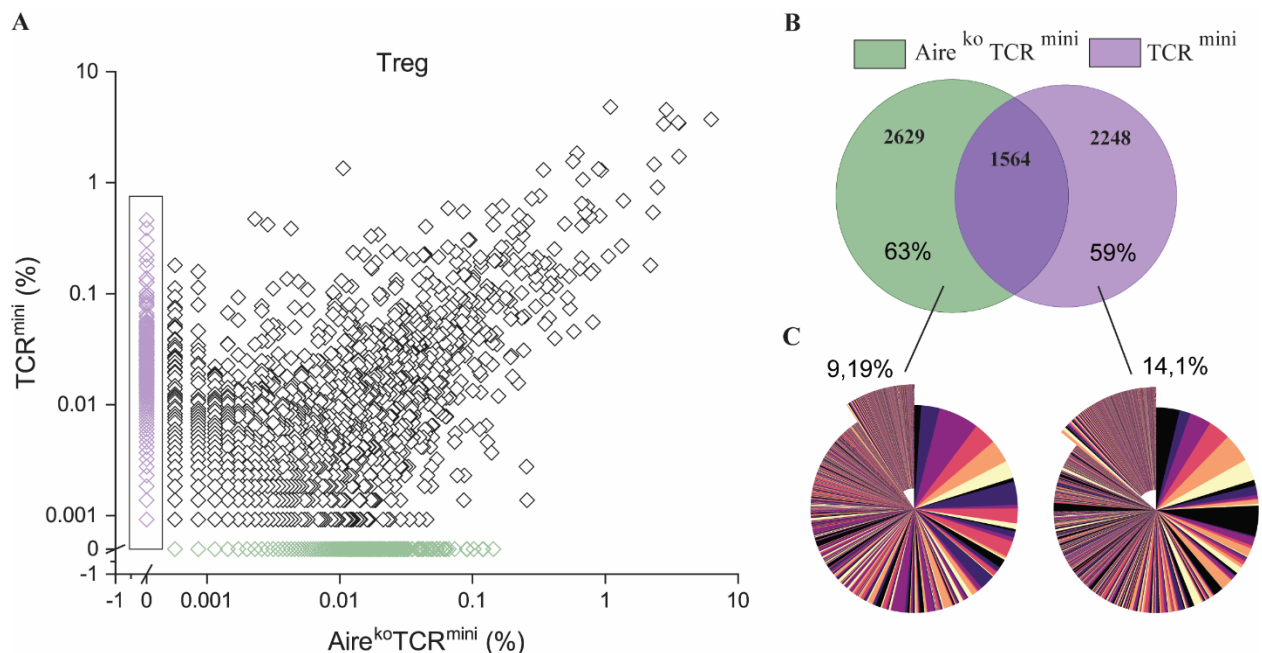


Rysunek 4.4 Analiza porównawcza repertuaru receptorów grasiczych limfocytów T (TCR), populacji $CD4^+Foxp3^-$ z myszy TCR^{mini} oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$. A) Dwuwymiarowy wykres typu kropkowego przedstawiający procentową zawartość poszczególnych grasiczych receptorów w populacjach $CD4^+Foxp3^-$ pomiędzy myszami TCR^{mini} oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$. B) Diagram Venna przedstawiający wzajemne relacje indywidualnych grasiczych receptorów limfocytów T z populacji $CD4^+Foxp3^-$. C) Wykres kołowy przedstawiający procentową zawartość poszczególnych grasiczych receptorów limfocytów T z populacji $CD4^+Foxp3^-$ myszy TCR^{mini} oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$. Fragmenty wystające poza obręb koła przedstawiają sekwencje, które nie są wspólne pomiędzy dwoma testowanymi rodzajami myszy.

Z powyższej analizy można wywnioskować, iż upośledzenie negatywnej selekcji wynikające z braku prezentacji niektórych antygenów tkankowo-specyficznych w wyniku nokautu genu *Aire*, nie powoduje znaczącego wzrostu czy spadku częstotliwości występowania

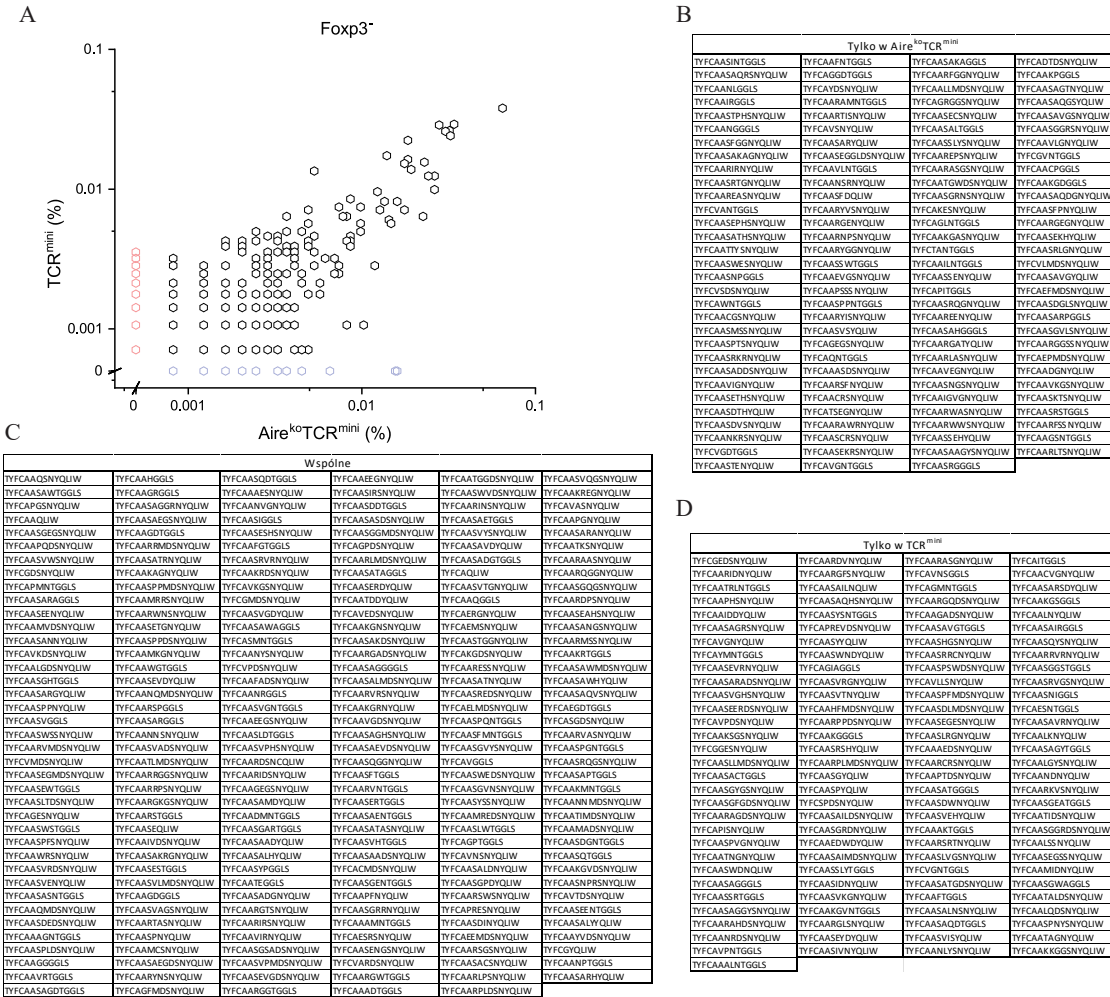
dominujących receptorów w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} w stosunku do myszy TCR^{mini}. Jak widać na wykresie 4.4A, sekwencje dominujące w populacji CD4⁺Foxp3⁻ w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} występowały w porównywalnej frekwencji w myszy TCR^{mini}, natomiast sekwencje nie znalezione w jednym modelu myszy, w drugim pojawiały się w częstotliwości nie większej niż 0,06%. Porównanie różnych sekwencji (niezależnie od ich frekwencji) pomiędzy myszami (Rys. 4.4B) wykazało, iż 50% sekwencji pochodzących z myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, i 36% sekwencji pochodzących z myszy TCR^{mini} nie nakłada się. Uwzględniając ich zawartość procentową (Rys. 4.5C), wykazano, iż sekwencje te zajmują nieznaczną część całkowitej bazy danych receptorów poszczególnych myszy, 3,11% w przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i 1,6% w przypadku TCR^{mini}.

Podobne porównanie jak przedstawiona powyżej analiza populacji CD4⁺Foxp3⁻ zostało przeprowadzone dla populacji grasiczych CD4⁺Foxp3⁺ z myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} (Rys. 4.5). Na rysunku 4.5A przedstawiono wzajemną relację pomiędzy dystrybucją receptorów w bazie danych komórek regulatorowych w myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. Populacja regulatorowa jest zdecydowanie bardziej różnorodna w porównaniu do populacji Foxp3⁻, więc wzajemne rozłożenie receptorów nie układa się tak równomiernie, jak widać na rysunku 4.4A. Dominujące sekwencje w obu myszach rozkładają się na wykresie w zbliżony sposób. W porównaniu do populacji Foxp3⁻ częstotliwość występowania sekwencji znalezionych tylko w jednym rodzaju myszy jest wyższa i jest nie większa niż 1% w przypadku myszy TCR^{mini} i 0,2% w przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Porównując indywidualne receptory w bazach danych z każdego rodzaju myszy (Rys. 4.5B) widać, iż część wspólna pomiędzy nimi jest mniejsza (1564 sekwencje, 37% populacji z myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i 41% z myszy TCR^{mini}) niż w przypadku populacji CD4⁺Foxp3⁻, a sekwencje, które nie są wspólne pomiędzy obiema myszami zajmują większą część bazy danych (Rys. 4.5C), niż w przypadku populacji CD4⁺Foxp3⁻ (9,19% dla myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i 14,1% dla myszy TCR^{mini}). Większy odsetek sekwencji, które nie były wspólne, w populacji regulatorowej z myszy TCR^{mini} i w populacji CD4⁺Foxp3⁻ w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} mógł być spowodowany upośledzoną negatywną selekcją i obecnością dodatkowych, potencjalnie autoreaktywnych klonów w grasicy, nie stanowiły one jednak klonów dominujących. Na wykresie 4.5A dodatkowo wyszczególniono sekwencje, które występowały w bazie danych komórek regulatorowych pochodzących z myszy TCR^{mini}, a nie występowały w tym samym rodzaju komórek w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Analizę wzajemnej dystrybucji tych sekwencji w bazie danych w populacji CD4⁺Foxp3⁻ pokazuje rysunek 4.6.



Rysunek 4.5 Analiza porównawcza repertuaru grasiczych limfocytów T, populacji CD4⁺Foxp3⁺ z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}. A) Dwuwymiarowy wykres typu kropkowego przedstawiający procentową zawartość poszczególnych grasiczych receptorów w populacjach CD4⁺Foxp3⁺ pomiędzy myszami TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}. Na wykresie wyszczególniono sekwencje, które występują w bazie danych myszy TCR^{mini}, a są nieobecne w bazie danych Aire^{ko}TCR^{mini}. Lista tych sekwencji i ich wzajemna dystrybucja w populacji CD4⁺Foxp3⁻ przedstawiona została na rysunku 4.6 B) Diagram Venna przedstawiający wzajemne nakładanie się indywidualnych grasiczych receptorów limfocytów T z populacji CD4⁺Foxp3⁺ myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}. C) Wykres kołowy przedstawiający procentową zawartość poszczególnych grasiczych receptorów limfocytów T z populacji CD4⁺Foxp3⁺ myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}. Fragmenty wystające poza obręb koła przedstawiają sekwencje, które nie są wspólne pomiędzy dwoma testowanymi rodzajami myszy.

Na rysunku 4.6A przedstawiono wzajemną relację pomiędzy dystrybucją receptorów wyszczególnionych na rysunku 4.5A w bazie danych sekwencji pochodzących z populacji CD4⁺Foxp3⁻ w myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. Porównanie to miało na celu wytypowanie komórek, które w grasicy myszy TCR^{mini} wyselekcjonowały się jako limfocyty T regulatorowe, a w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} znalazły się w populacji CD4⁺Foxp3⁻, z potencjałem różnicowania w komórki zaktywowane w momencie kontaktu z obwodowymi antygenami. Podobnie do rysunku 4.4A na rysunku 4.6A widać, iż sekwencje te nie stanowią znaczącego odsetka w bazie danych obydwu myszy. W tabelkach wylistowano sekwencje wspólne dla obu populacji (4.6C), obecne tylko w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} (4.6B) oraz tylko w myszy TCR^{mini} (4.6D).

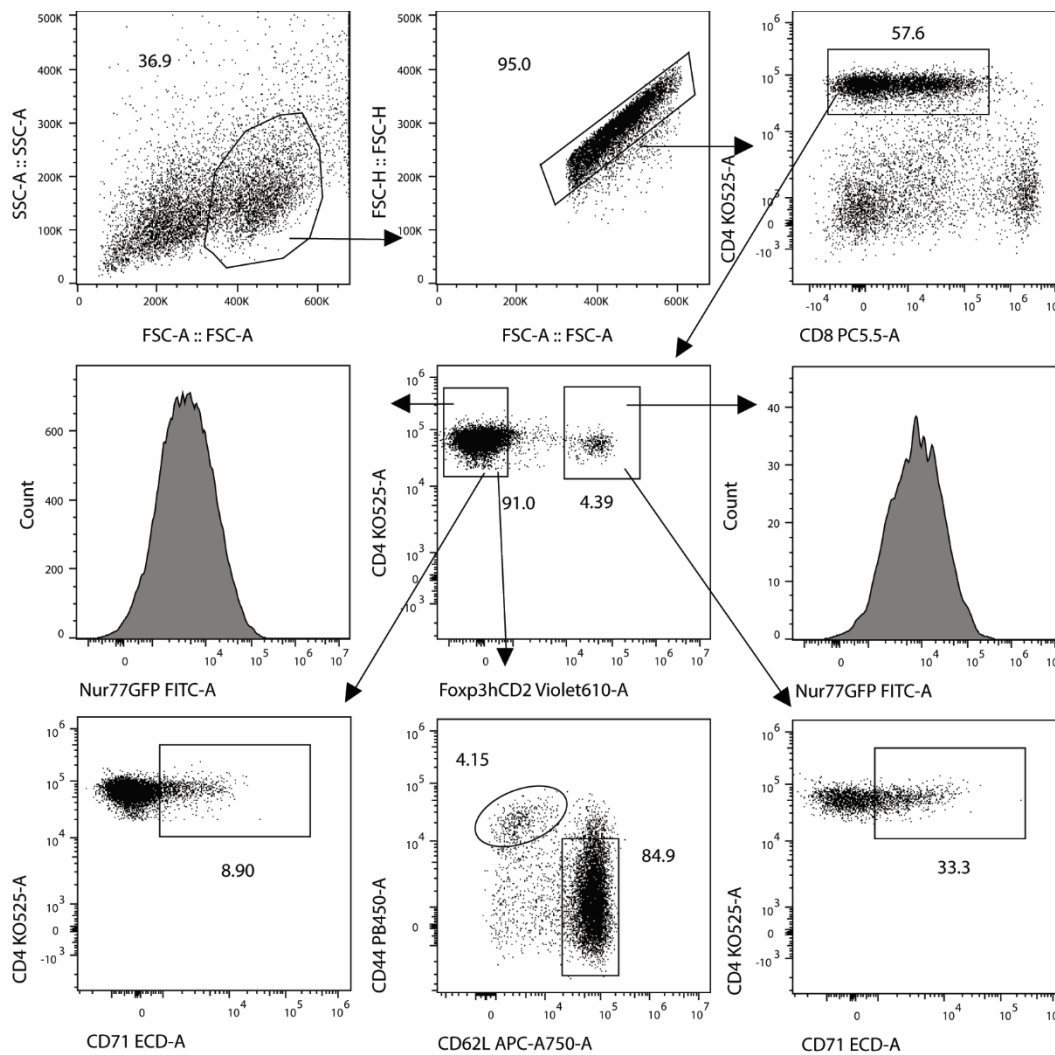


Rysunek 4.6 Analiza porównawcza repertuaru grasiczych limfocytów T, populacji CD4⁺Foxp3⁻ z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} ograniczona do sekwencji Tregów obecnych w myszy TCR^{mini} a nie w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. A) Dwuwymiarowy wykres typu kropkowego przedstawiający procentową zawartość poszczególnych grasiczych receptorów w populacjach CD4⁺Foxp3⁻ pomiędzy myszami TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}. B) Lista sekwencji receptorów limfocytów T obecnych tylko w bazie danych pochodzącej z myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. C) Lista sekwencji receptorów limfocytów T obecnych zarówno w bazie danych pochodzącej z myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, jak i w z myszy TCR^{mini}. D) Lista sekwencji receptorów limfocytów T obecnych tylko w bazie danych pochodzącej z myszy TCR^{mini}.

4.4. Strategia bramkowania

Rysunek 4.7 przedstawia strategię bramkowania zastosowaną w czasie analizy cytometrycznej węzłów limfatycznych i wybranych narządów wewnętrznych, pochodzących z młodych (czterotygodniowych) i starych (ponad sześciomiesięcznych) myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. Analiza cytometryczna była przeprowadzona przy użyciu maszyny CytoFLEX

firmy Beckman. Pierwszym etapem było oddzielenie limfocytów ze względu na ich wielkość (FSC, z ang. **f**orward **s**catter) oraz ziarnistość (SSC, z ang. **s**ide **s**catter), a następnie wykluczenie z analizy dubletów komórek (FSC-H/FSC-A) - analiza pojedynczych komórek. Kolejnym etapem było rozdzielenie od siebie limfocytów T pomocniczych ($CD4^+$) od cytotoksycznych ($CD8^+$) i w oparciu o bramkowanie komórek $CD4^+$ przeprowadzono dalszą analizę fenotypową. Pierwszym etapem analizy limfocytów T pomocniczych było bramkowanie komórek regulatorowych $CD4^+$ ekspresjonujących czynnik transkrypcyjny Foxp3, Ponieważ Foxp3 jest ekspresjonowany wewnątrzkomórkowo, do barwienia użyto transgenicznej myszy, w której ekspresja Foxp3 była skorelowana z ekspresją ludzkiego błonowego białka fuzyjnego hCD2-CD52, które umożliwiło użycie przeciwciała monoklonalnego anti-hCD2 do barwienia powierzchniowego. Zarówno komórki Foxp3 pozytywne jak i negatywne zostały następnie zbadane pod kątem ekspresji białka Nur77 (z ang. **n**uclear **r**eceptor 4A1), który jest białkiem ekspresjonowanym w końcowym odcinku szlaku aktywacji TCR, a jego ekspresja w limfocytach T jest wykrywalna kilka godzin po stymulacji receptora (TCR) antygenem [71, 74]. W tym celu ekspresja Nur77 powiązana została z ekspresją białka zielonej fluorescencji GFP (ang. **g**reen **f**luorescent **p**rotein). Limfocyty T $CD4^+Foxp3^-$ dodatkowo zostały zanalizowane pod kątem markerów aktywacji komórek T, CD44 i CD62L: komórki zaktwowane/komórki pamięci, potencjalnie autoreaktywne, posiadały fenotyp $CD44^+CD62L^-$. Proliferację *in situ* mierzono poprzez analizę ekspresji CD71 (receptor dla transferyny, niezbędny dla rozwoju i dzielenia się komórek), białka powierzchniowego, które ekspresjonowane jest we wszystkich stadiach cyklu komórkowego, z wyjątkiem G0 [75]. Ekspresja CD71 całkowicie pokrywa się z ekspresją Ki-67, najczęściej stosowanego markera proliferacji komórek. Użycie CD71 zamiast Ki-67 ułatwia analizę ze względu na jego ekspresję powierzchniową, a nie wewnątrzkomórkową, jak w przypadku Ki-67.

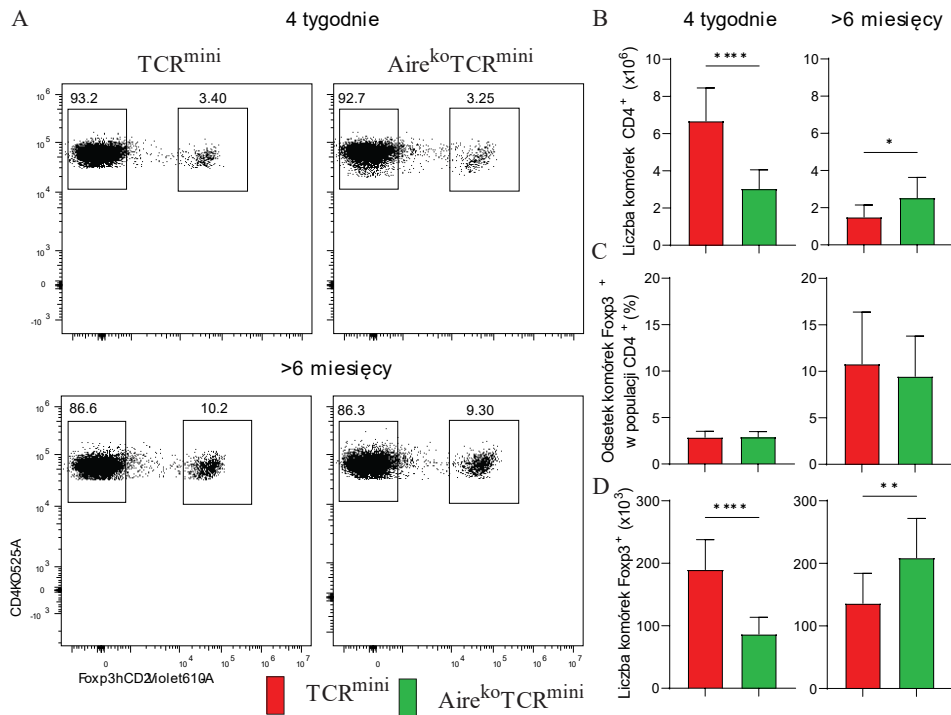


Rysunek 4.7 Strategia bramkowania w analizie cytometrycznej fenotypu komórek wyizolowanych z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini}.

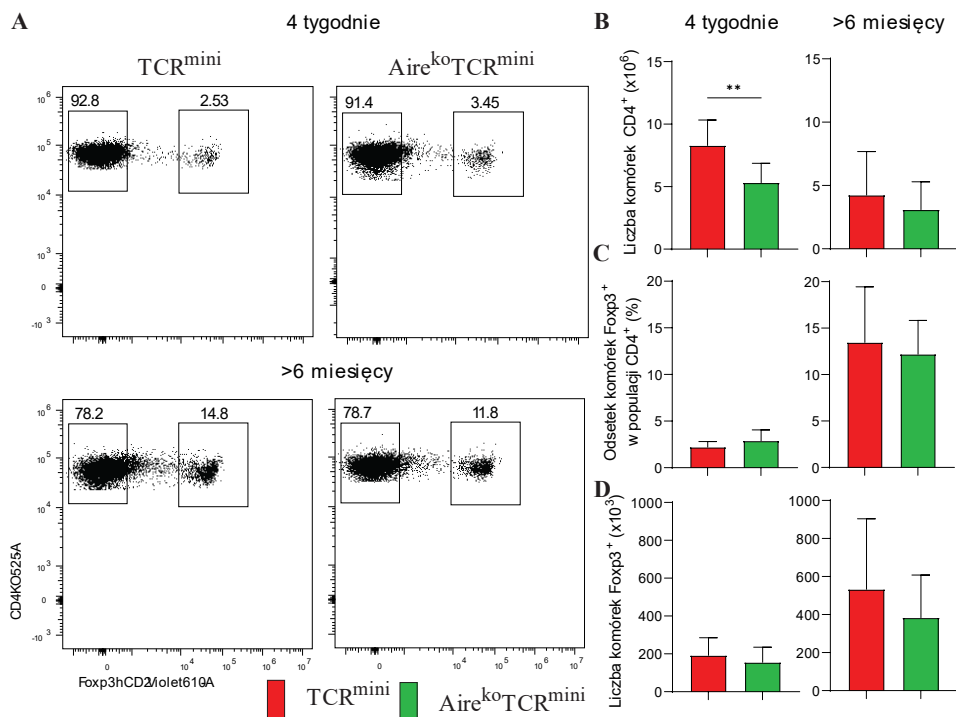
4.5. Analiza fenotypowa węzłów limfatycznych i narządów nielimfoidalnych

Analizę porównawczą limfocytów T pomiędzy myszami w zależności od wieku przeprowadzono zaczynając od liczby komórek CD4⁺, odsetka komórek regulatorowych (ekspresji Foxp3) oraz liczby komórek CD4⁺Foxp3⁺. Porównanie to zostało przedstawione na kolejnych sześciu rysunkach (od Rysunku 4.8 do Rysunku 4.13). Pierwsze trzy Rysunki odnosiły się do węzłów chłonnych (4.8, 4.9, 4.10), zarówno obwodowych, jak i zlokalizowanych bliżej w stosunku do narządów wewnętrznych (jak węzły krezkowe czy krzyżowe), kolejne trzy odnosiły

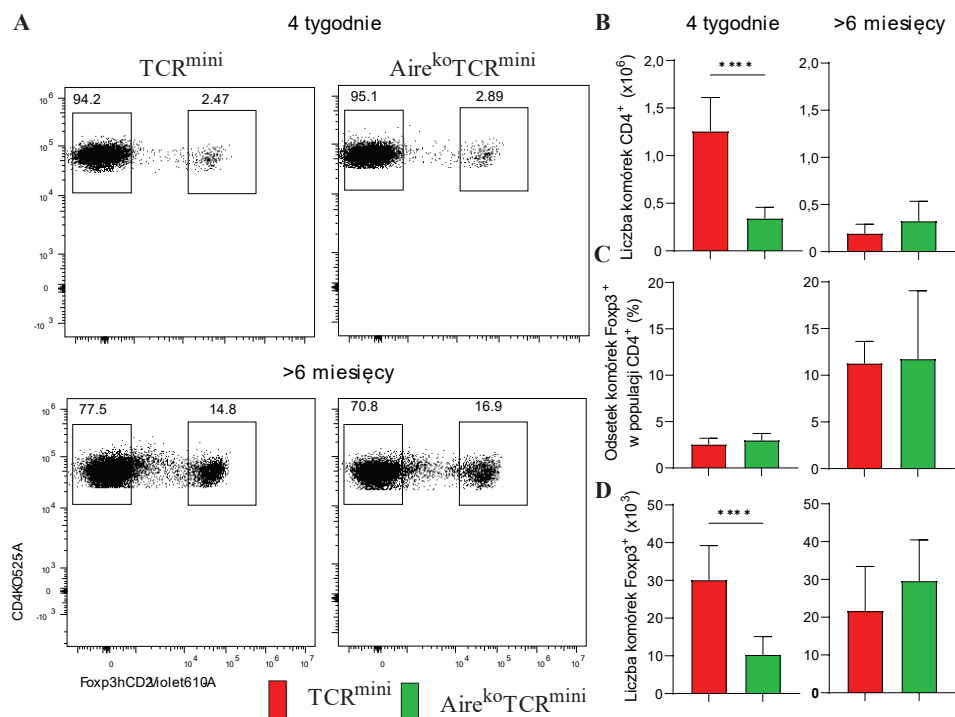
się do wybranych narządów wewnętrznych (4.11 – jelito grube, 4.12 – prostata, 4.13 – wątroba). Na każdym z Rysunków 4.8-4.13 w podpunkcie **A** przedstawiono przykładowe barwienia CD4/CD8 oraz CD4/Foxp3 limfocytów T myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} w wieku 4 tygodni oraz starszych, niż sześć miesięcy. Podpunkt **B** w każdym z wyżej wymienionych rysunków przedstawiał porównanie liczby komórek CD4⁺, podpunkt **C** przedstawiał odsetek, a podpunkt **D**, liczbę komórek regulatorowych (Foxp3⁺) w populacji CD4⁺. Każdy z wykresów słupkowych (B, C, D) przedstawiał wartość uśrednioną, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



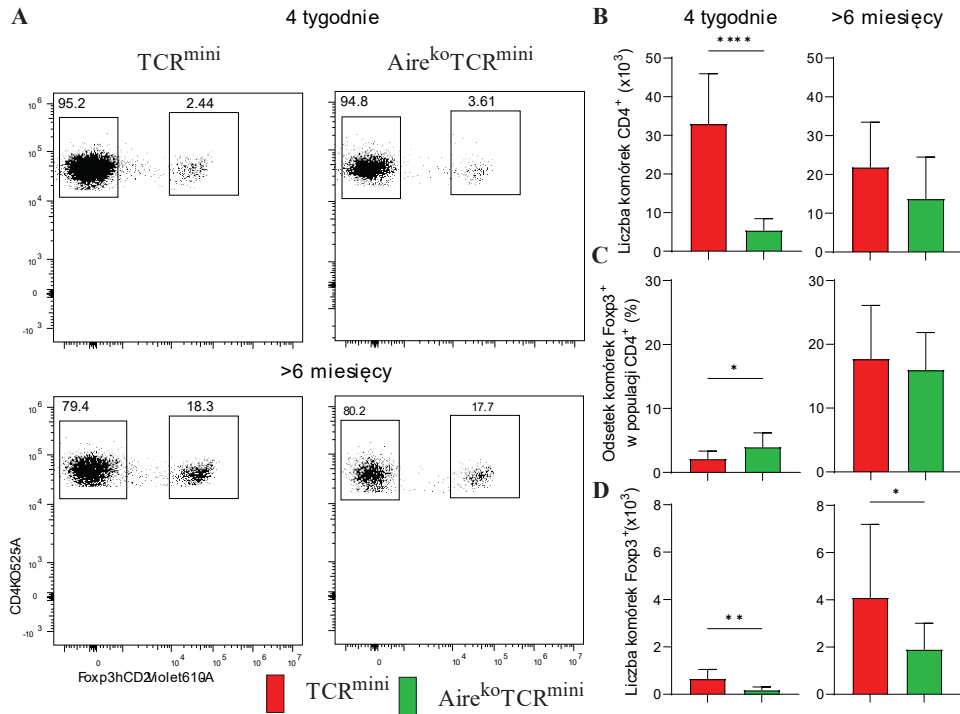
Rysunek 4.8 Analiza fenotypowa obwodowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD4 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3.



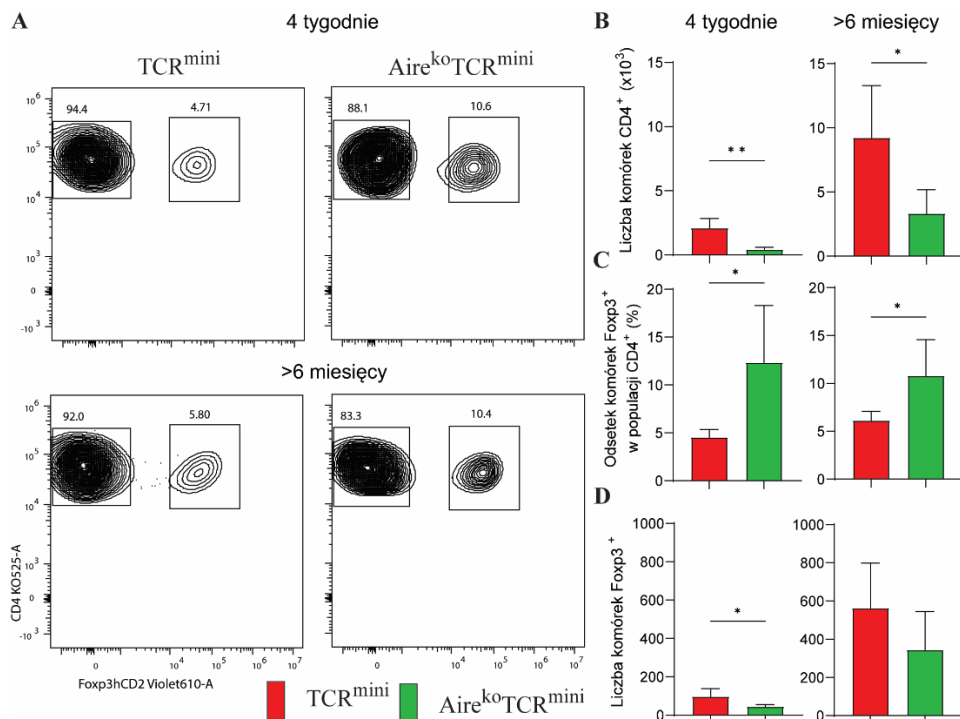
Rysunek 4.9 Analiza fenotypowa krezkowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD4 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3.



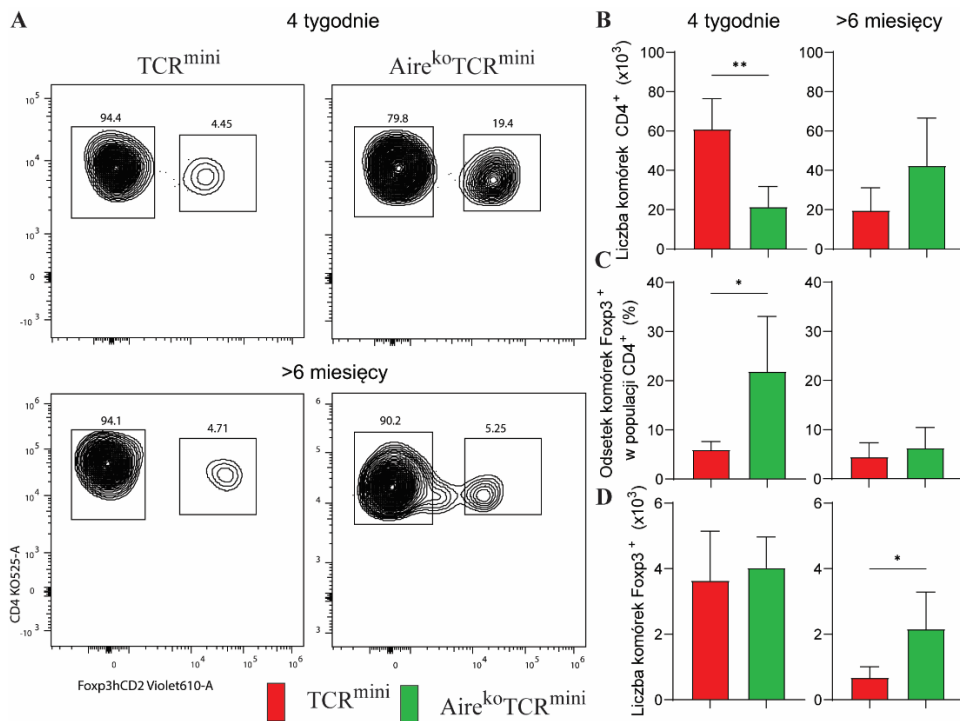
Rysunek 4.10 Analiza fenotypowa krzyżowych i biodrowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD4 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3.



Rysunek 4.11 Analiza fenotypowa jelita grubego z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD4 oraz czynnika transkrypcyjnego Fxp3.



Rysunek 4.12 Analiza fenotypowa prostaty z myszy TCR^{mini} (n=5) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=7) w oparciu o poziom ekspresji CD4 oraz czynnika transkrypcyjnego Fxp3.



Rysunek 4.13 Analiza fenotypowa komórek wątroby z myszy TCR^{mini} ($n=5$) oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$ ($n=5$) w oparciu o poziom ekspresji $CD4$ oraz czynnika transkrypcyjnego $Foxp3$.

Liczba komórek $CD4^+$ w każdym z analizowanych narządów i rodzaju węzłów limfatycznych była statystycznie większa w czterotygodniowej myszy kontrolnej w porównaniu do myszy z nokautem genu $Aire$, co było analogiczne do analizy grasicy z czterotygodniowych myszy (rysunek 4.3, 4.8B-4.13B). Różnica ta zanikała z wiekiem myszy. Ilość komórek $CD4^+$ w myszach kontrolnych z wiekiem znacząco się zmniejszała (z wyjątkiem prostaty, Rys. 4.12B), natomiast w myszach $Aire^{ko}TCR^{mini}$, ta ilość pozostawała podobna (Rys. 4.8B-4.13B). Ilościowe zmniejszenie komórek $CD4^+$ mogło być spowodowane inwolucją grasicy z wiekiem i zmniejszoną migracją limfocytów, natomiast wzrost liczby komórek występujących w myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ mogło być wynikiem reakcji zapalnej organizmu.

Węzły chłonne czterotygodniowych myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ i TCR^{mini} niezależnie od lokalizacji wykazują podobny odsetek komórek regulatorowych w populacji $CD4^+$. Ta równowaga ($TCR^{mini}/Aire^{ko}TCR^{mini}$) w węzłach chłonnych pozostała podobna, niezależnie od wieku, chociaż sam odsetek komórek $Foxp3^+$ wzrósł zarówno w myszy kontrolnej jak i z nokautem $Aire$ (Rys. 4.8C-4.10C). W przypadku jelita grubego, prostaty i wątroby czterotygodniowych myszy, widoczne były statystycznie znaczące różnice w częstotliwości występowania komórek regulatorowych na korzyść myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$. W jelicie grubym starszych myszy nastąpił

wzrost proporcji komórek Foxp3⁺ w porównaniu do osobników młodych (w obydwu typach myszy), co sugeruje konwersję naiwnych komórek CD4⁺Foxp3⁻ do komórek pTreg w obecności mikroflory w jelicie (Rys. 4.11C). W przypadku prostaty nie nastąpiła znacząca zmiana w proporcji komórek Foxp3⁺ w żadnym z rodzajów testowanych myszy i wciąż pozostała ona statystycznie większa w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} (Rys. 4.12C). W wątrobie ze starej myszy TCR^{mini}, proporcja komórek regulatorowych w stosunku do osobników czterotygodniowych nie uległa zmianie, natomiast w myszy z nokautem genu Aire widać znaczący jej spadek (Rys. 4.13C).

Liczba komórek CD4⁺Foxp3⁺ w przypadku analizy węzłów myszy czterotygodniowych pokazała również różnicę (w przypadku węzłów obwodowych i krzyżowych, znaczącą) na niekorzyść myszy Aire^{ko}TCR^{mini} (Rys. 4.8D, 4.9D), co zaobserwowano również w jelicie grubym i w prostacie (Rys. 4.11D, 4.12D). Analiza wątroby wykazała podobne proporcje komórek regulatorowych w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i TCR^{mini}. (Rys. 4.13D). W myszach starych liczba komórek CD4⁺Foxp3⁺ w węzłach krezkowych oraz w jelicie grubym wzrosła w obydwu rodzajach myszy, jednak ten wzrost był bardziej znaczący w myszy kontrolnej (Rys. 4.10D, 4.11D). W prostacie wzrost ilości komórek regulatorowych z wiekiem nastąpił w obu typach myszy, ale był bardziej znaczący w myszy TCR^{mini} (Rys. 4.12D). Pozostałe analizowane węzły nie wykazywały tego samego schematu dla obydwu typów myszy. W starych myszach TCR^{mini} nastąpił spadek ilości komórek regulatorowych, natomiast w myszach Aire^{ko}TCR^{mini}, wzrost w porównaniu do myszy młodych (Rys. 4.8D, 4.9D). W przypadku węzłów obwodowych ilość Tregów w starych osobnikach była znacząco (p=0,005) większa w myszach Aire^{ko}TCR^{mini}. Z wiekiem w wątrobie myszy kontrolnych jak i *Aire*⁻ ilość komórek regulatorowych uległa redukcji (Rys. 4.13D) i była statystycznie większa w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Pomimo tego, iż z wiekiem wątroba się powiększa, ilość zarówno komórek CD4⁺ jak i Foxp3⁺ w myszy kontrolnej malała, co może się wiązać z wyparciem ich przez inne rodzaje komórek. W przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini} zaobserwowano wzrost liczby komórek CD4⁺ powiązany ze spadkiem ilości i odsetka komórek regulatorowych, co może wskazywać na wzrost ilości innych subpopulacji komórek w populacji CD4⁺, np. komórek zaktywowanych, potencjalnie autoreaktywnych.

Analiza markerów aktywacji (CD44 i CD62L) na komórkach CD4⁺Foxp3⁻ miała na celu zidentyfikowanie narządu w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, który byłby najlepszym punktem odniesienia do dalszej analizy, w celu wyszukania potencjalnych klonów odpowiedzialnych za chorobę

autoimmunologiczną. Porównanie to zostało przedstawione na kolejnych sześciu rysunkach (od Rysunku 4.14 do Rysunku 4.19). Pierwsze trzy Rysunki odnosiły się do węzłów chłonnych (4.14, 4.15, 4.16) obwodowych, krezkowych i krzyżowych. Kolejne trzy odnosiły się do wybranych narządów wewnętrznych (4.17 – jelito grube, 4.18 – prostata, 4.19 – wątroba). Na każdym z Rysunków 4.14-4.19 w podpunkcie A przedstawiono przykładowe barwienia CD44/CD62L na populacji CD4⁺Foxp3⁻ z myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} w wieku 4 tygodni oraz starszych, niż sześć miesięcy. Podpunkt B w każdym z wyżej wymienionych rysunków przedstawiał porównanie proporcji, a podpunkt C liczby komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺CD62L⁻ pomiędzy myszami w zależności od wieku. Każdy z wykresów słupkowych (B, C) przedstawiał wartość uśrednioną, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta. Porównując komórki CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺CD62L⁻ pomiędzy myszami TCR^{mini}, a Aire^{ko}TCR^{mini} można zauważyć, iż w obwodowych i krzyżowych węzłach limfatycznych w młodych myszach odsetek komórek zaktywowanych był statystycznie wyższy w myszy kontrolnej (Rys. 4.14B, 4.16B). W węzłach krezkowych i w jelicie grubym młodych myszy proporcje komórek zaktywowanych były podobne w obu modelach (Rys. 4.15B, 4.17B). Również w prostatie i wątrobie młodych osobników różnice pomiędzy myszami TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} nie były statystycznie znaczące (Rys. 4.18B, 4.19B). Z wiekiem udział procentowy komórek CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺CD62L⁻ zwiększył się w e wszystkich węzłach chłonnych oraz w jelicie w przypadku obu rodzajów myszy i różnica pomiędzy myszami straciła znaczenie statystyczne. W prostatie z wiekiem nie nastąpiła zmiana w żadnym z rodzajów myszy (Rys. 4.18B), natomiast w wątrobie zmniejszył się odsetek komórek zaktywowanych w myszy TCR^{mini} (Rys. 4.19B).

Liczbowo limfocyty T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺CD62L⁻ również były mniejszej ilości w węzłach czterotygodniowych myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, co bezpośrednio skorelowało z analizowaną wcześniej ilością komórek CD4⁺. Z wiekiem u myszy TCR^{mini} zmniejszyła się ilość komórek aktywowanych w węzłach obwodowych (Rys. 4.14C) i krzyżowych (Rys. 4.16C), natomiast w węzłach krezkowych (Rys. 4.15C) ta ilość wzrosła. W przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini} w każdym z rodzajów testowanych węzłów ilość komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺CD62L⁻, była większa w myszach starych w stosunku do myszy młodych oraz, oprócz węzłów krezkowych, również nieznacznie wyższa w porównaniu do starych myszy TCR^{mini}.

Komórki jelita grubego wchodzące w skład środowiska, w którym duży wpływ na układ immunologiczny mają bakterie flory jelitowej, w analizie fenotypowej miały podobną charakterystykę jak węzły krezkowe. Odsetek zaktywowanych komórek CD4 (rys. 4.17B) u młodych osobników był bardzo podobny pomiędzy obydwoma rodzajami myszy i wzrósł wraz z wiekiem myszy. Ilościowo komórki zaktwowane pochodzące z węzłów krezkowych i z jelita grubego (rys. 4.17C) również wykazywały znaczne podobieństwo. Podobnie jak w innych analizowanych narządach, w jelicie grubym czterotygodniowych osobników, ilość komórek o fenotypie $CD4^+Foxp3^-CD44^+CD62L^-$ była wyższa w myszy TCR^{mini}. Wraz z wiekiem ilość ta u myszy Aire^{ko}TCR^{mini} zwiększyła się, pozostała jednak wciąż niższa w porównaniu do myszy TCR^{mini} w porównywalnym wieku.

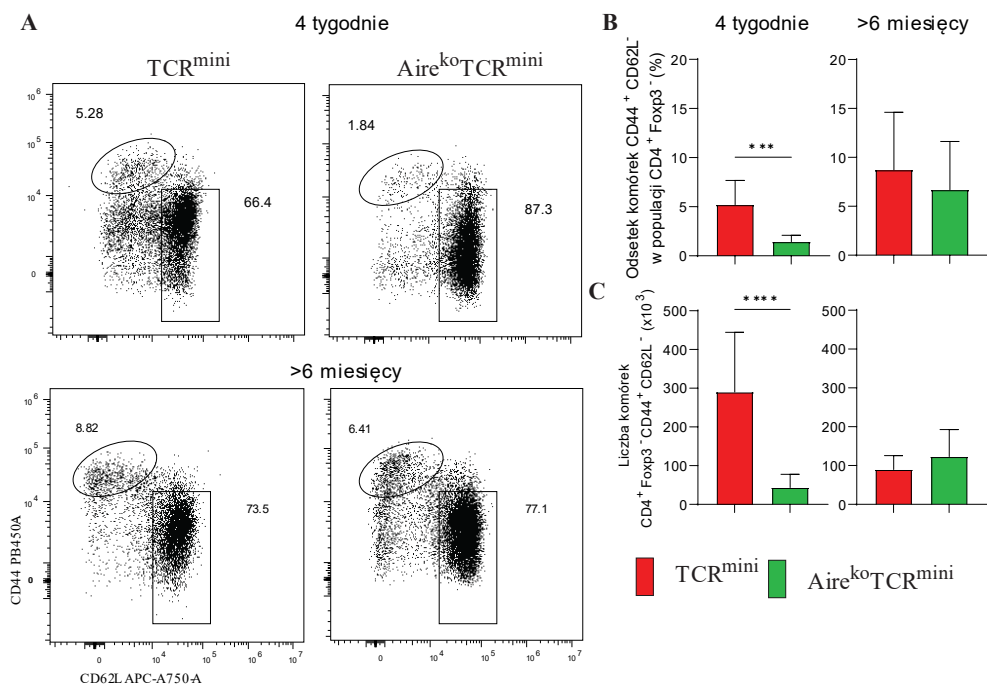
Prostata została wytypowana do analizy w oparciu o problemy z płodnością występującą wśród myszy z nokautem genu *Aire* [72]. Porównując proporcje komórek zaktwowanych (rys. 4.18B) w myszach czterotygodniowych oraz osobnikach starszych nie zaobserwowano znaczących różnic zarówno w porównaniu pomiędzy typami myszy, jak i w zależności od wieku.

Ilościowo w prostacie, porównywalnie do węzłów, w młodych myszach kontrolnych występowało znacząco więcej komórek zaktwowanych (rys. 4.18C). Z wiekiem, nastąpił wzrost ilości komórek $CD4^+Foxp3^-CD44^+CD62L^-$ w obu rodzajach myszy, co nie spowodowało zmiany stosunku ilości komórek pomiędzy różnymi modelami myszy.

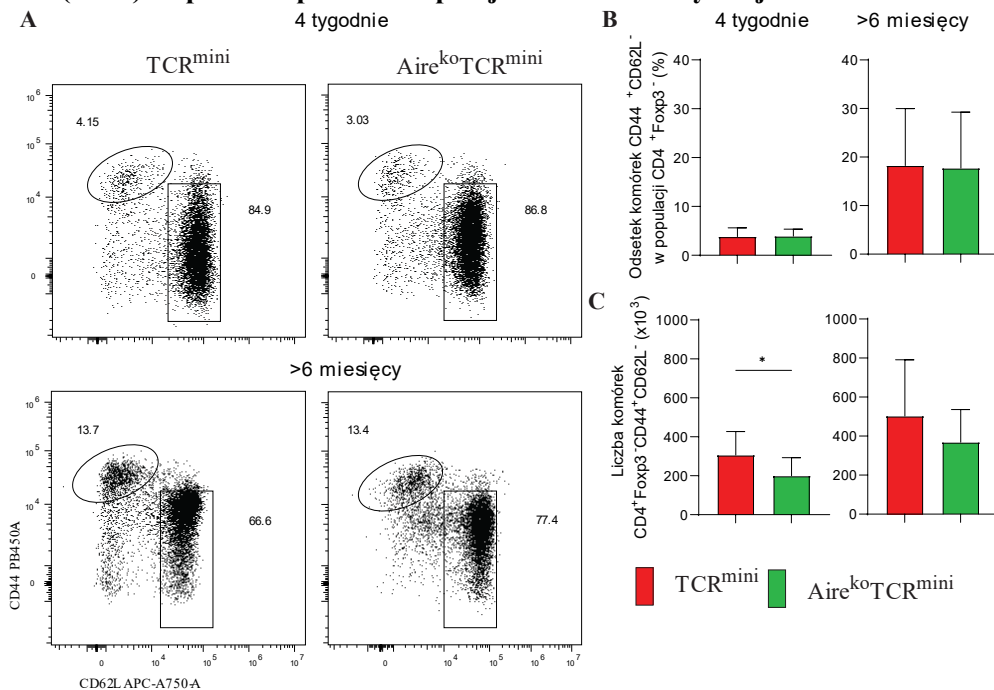
Wątroba była jednym z organów wymienianych w publikacjach jako cel ataku komórek autorekacyjnych w osobnikach z nokautem genu *Aire* [65]. Porównując odsetek komórek o fenotypie $CD4^+Foxp3^-CD44^+CD62L^-$ pochodzących z czterotygodniowych myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i TCR^{mini} widać już w tak młodej myszy statystyczną różnicę pomiędzy nimi, na korzyść myszy z nokautem genu *Aire*. W wątrobach starych myszy nastąpił spadek odsetka komórek o fenotypie $CD4^+Foxp3^-CD44^+CD62L^-$, bardziej znaczący w przypadku myszy kontrolnej, niż Aire^{ko}TCR^{mini}. Różnica pomiędzy myszami wciąż pozostała statystycznie znacząca na korzyść myszy z nokautem.

W wątrobie, tak jak w pozostałych badanych narządach liczbowo, w czterotygodniowych myszach więcej komórek o fenotypie $CD4^+Foxp3^-CD44^+CD62L^-$ występowało w myszy TCR^{mini}. Proporcja ta została odwrócona jednak w myszach starszych, gdzie w modelu TCR^{mini} nastąpił ich

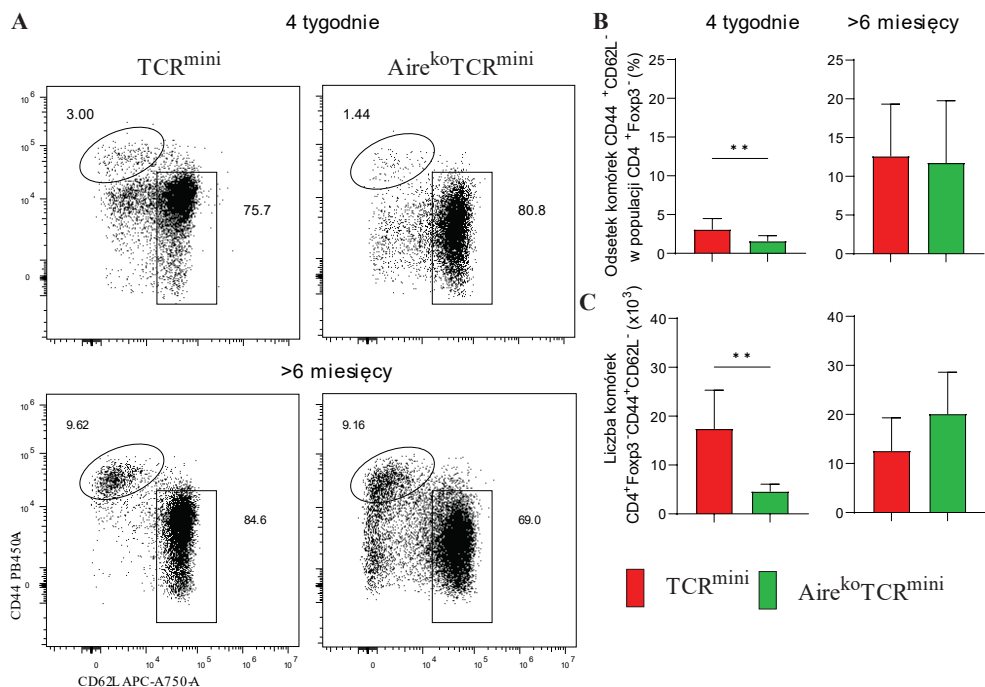
znaczący spadek, natomiast w modelu $Aire^{ko}TCR^{mini}$ wzrost, a różnica pomiędzy obiema myszami zrobiła się statystycznie istotna, na korzyść myszy z nokautem genu *Aire*.



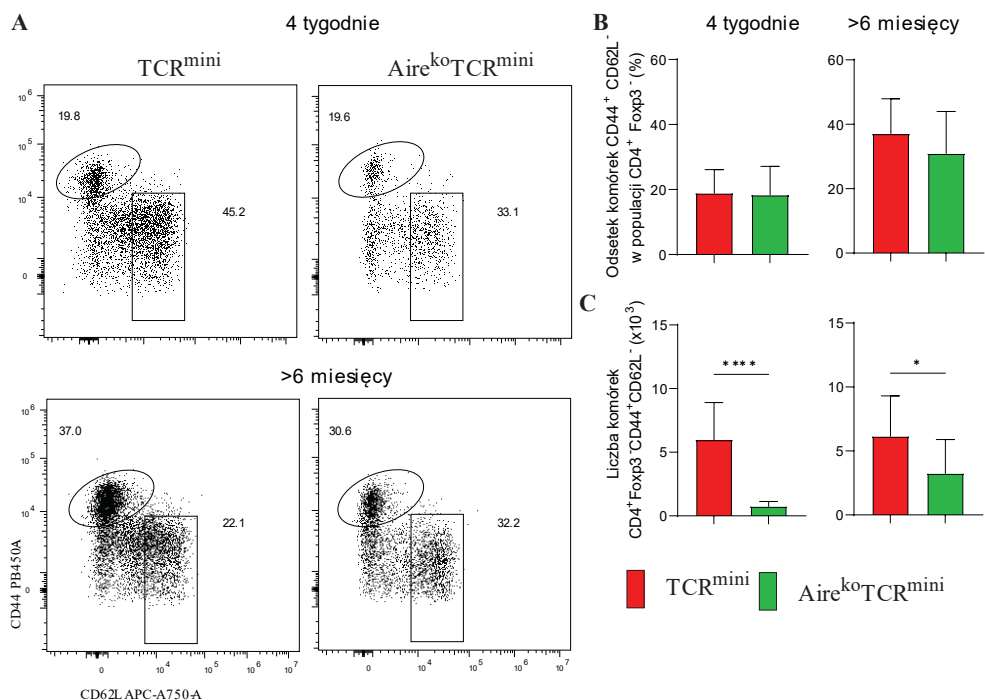
Rysunek 4.14 Analiza fenotypowa obwodowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$ (n=10) w oparciu o poziom ekspresji markerów aktywacji w komórkach $CD4^{+}Foxp3^{+}$.



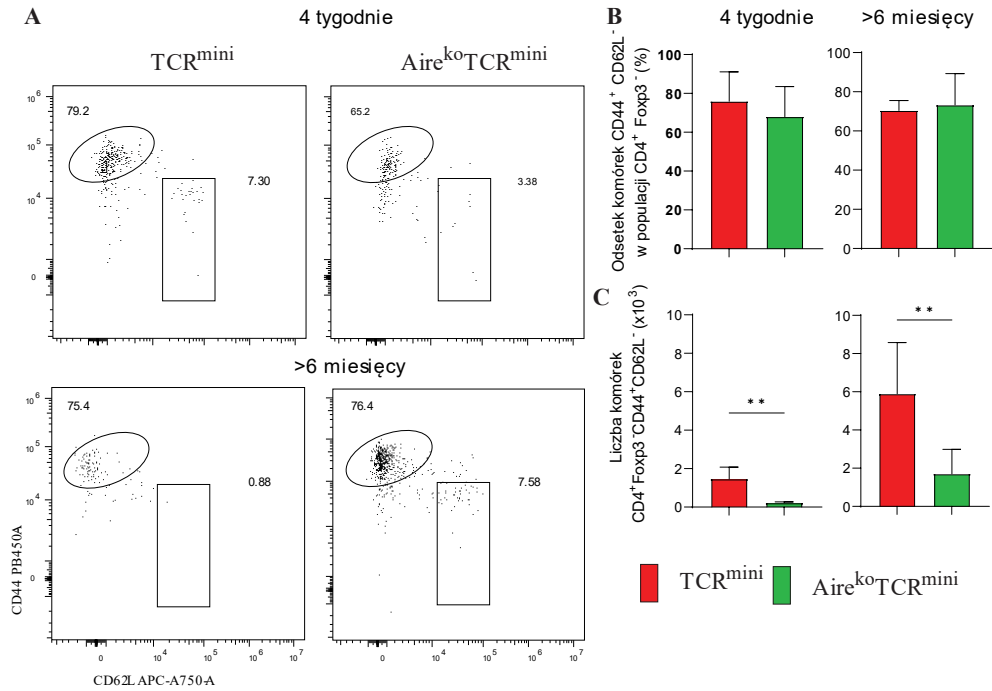
Rysunek 4.15 Analiza fenotypowa krezkowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz $Aire^{ko}TCR^{mini}$ (n=10) w oparciu o poziom ekspresji markerów aktywacji w komórkach $CD4^{+}Foxp3^{+}$.



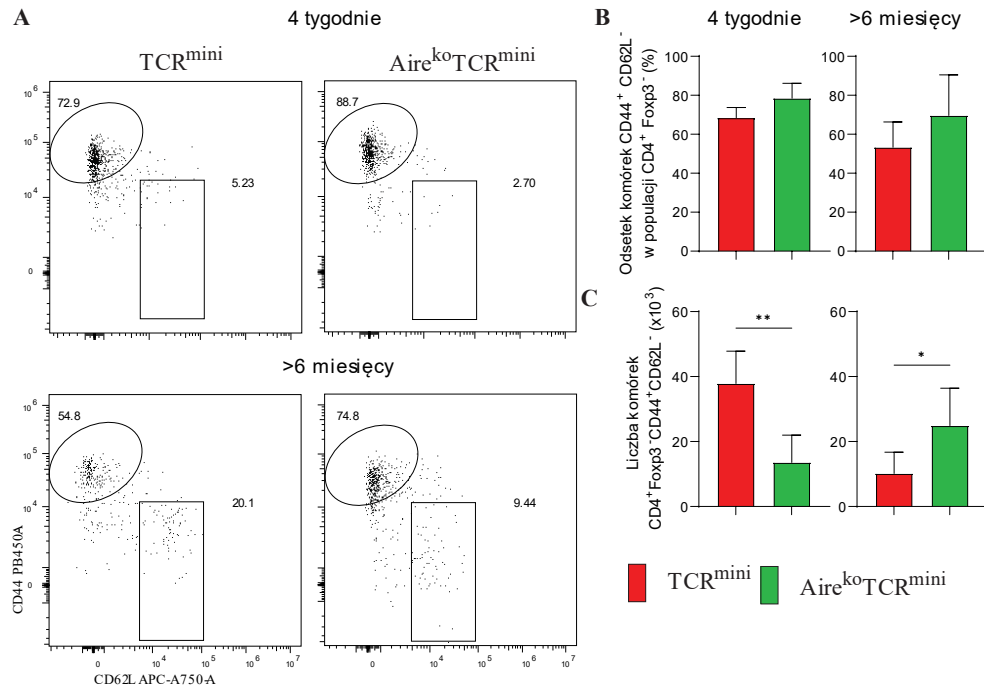
Rysunek 4.16 Analiza fenotypowa krzyżowych i biodrowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji markerów aktywacji w komórkach CD4⁺Foxp3⁺.



Rysunek 4.17 Analiza fenotypowa grubego jelita z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji markerów aktywacji w komórkach CD4⁺Foxp3⁺.

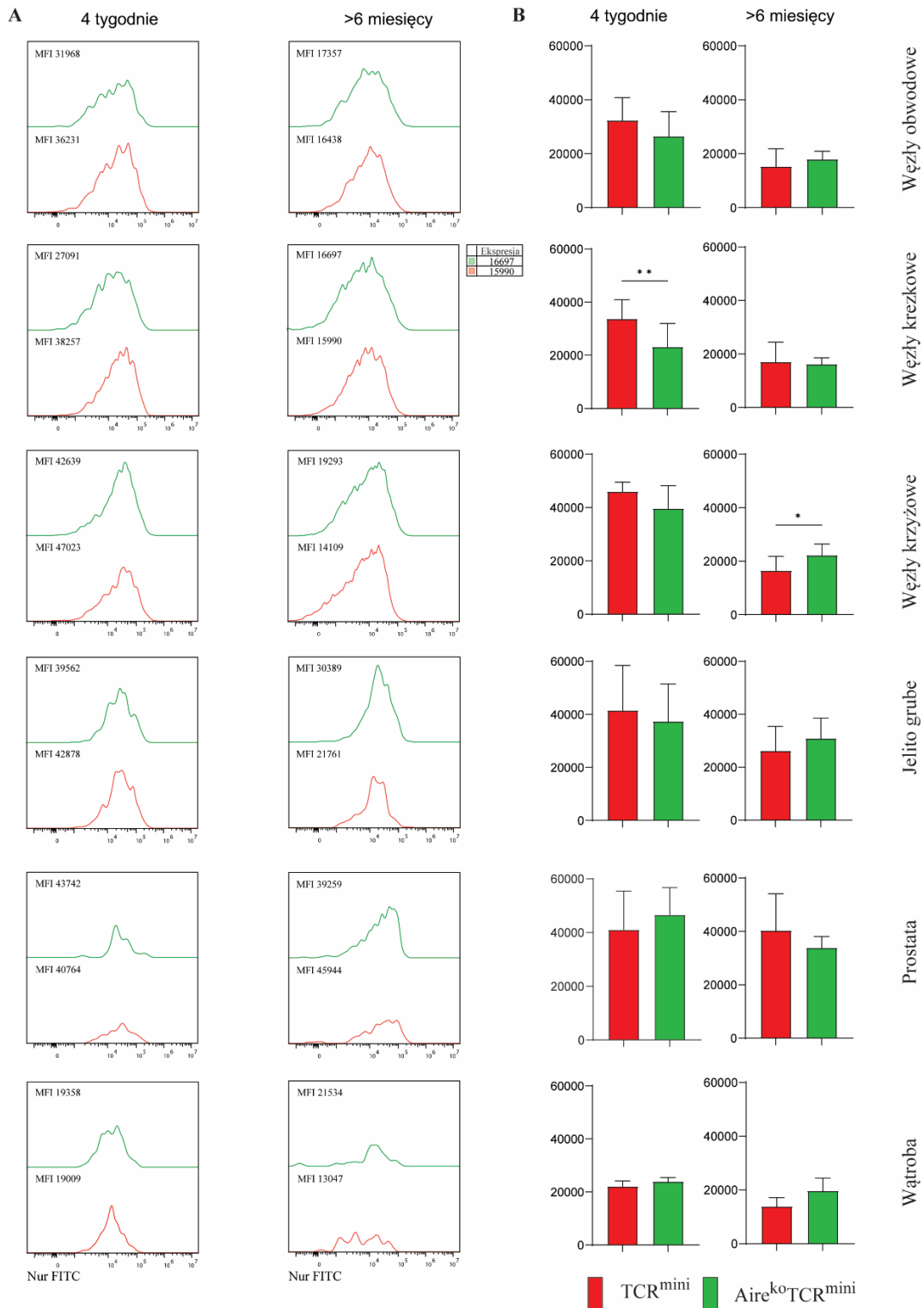


Rysunek 4.18 Analiza fenotypowa prostaty z myszy TCR^{mini} (n=5) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=7) w oparciu o poziom ekspresji markerów aktywacji w komórkach CD4⁺Foxp3⁻.

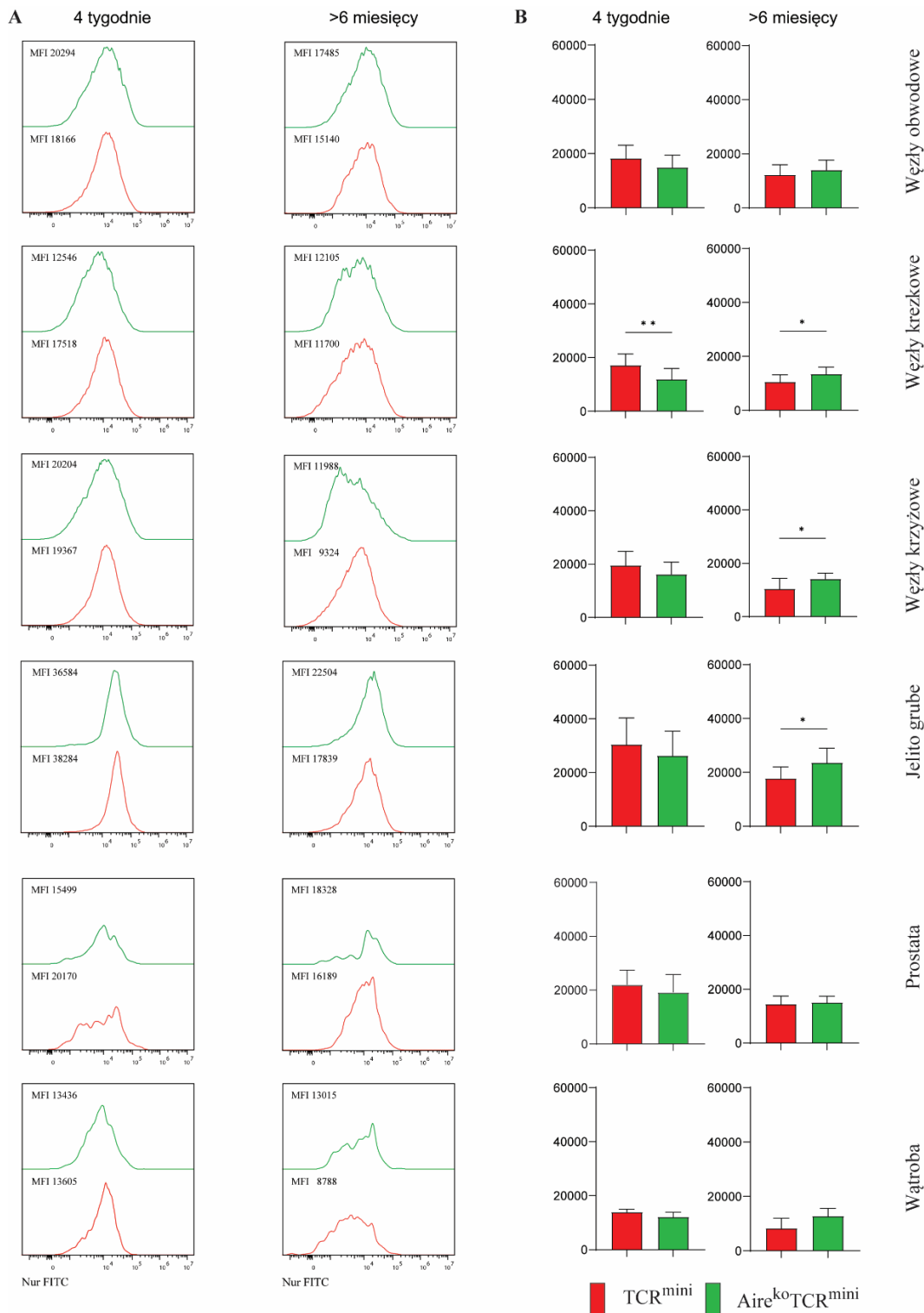


Rysunek 4.19 Analiza fenotypowa wątroby z myszy TCR^{mini} (n=5) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=5) w oparciu o poziom ekspresji markerów aktywacji w komórkach CD4⁺Foxp3⁻.

Analiza ekspresji Nur77GFP pokazana na Rys. 4.20 (dla komórek regulatorowych) i Rys. 4.21 (dla komórek Foxp3⁻) dostarczyła podobnych wniosków, jakie zaobserwowano podczas badań nad myszą Scurfy, która, wskutek braku Tregów, wykazuje ogólnoustrojowy proces zapalny będący następstwem aktywacji autoreaktywnych limfocytów T [20]. Również w przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini} zaobserwowano brak różnic w ekspresji Nur77GFP w limfocytach CD4⁺Foxp3⁻ oraz Treg między myszą zdrową a chorą (Rys. 4.20 i 4.21). Świadczyć to może o zwiększonej apoptozie komórek silnie zaktywowanych przez własne antygeny gospodarza (a więc silnie ekspresjonujące Nur77GFP). Tregi wykazują zwiększoną ekspresję Nur77, co zostało zaproponowane jako odpowiedź na zwiększone powinowactwo TCR do antygenów prezentowanych w czasie rozwoju w grasicy [76] – ta sama cecha została zaobserwowana w przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Odpowiedź limfocytów T do różnych antygenów z wykorzystaniem Nur77GFP przeprowadzono używając hybrydom (Rys. 4.34 i 4.35).



Rysunek 4.20 Analiza limfocytów T regulatorowych o fenotypie z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} w oparciu o poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nur77. A) Histogramy przedstawiające średnie wartości fluorescencji (MFI) Nur77GFP z reprezentatywnych próbek. B) Wykres słupkowy przedstawiający uśrednioną wartość MFI dla danego organu oraz odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



Rysunek 4.21 Analiza limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻ z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} w oparciu o poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nur77. A) Histogramy przedstawiające średnie wartości fluorescencji (MFI) Nur77GFP z reprezentatywnych próbek. B) Wykres słupkowy przedstawiający uśrednioną wartość MFI dla danego organu oraz odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.

Receptor transferyny CD71 jest ekspresjonowany na niskim poziomie w dojrzałych limfocytach w stanie spoczynku, a jego poziom zwiększa się w po aktywacji w proliferujących komórkach [75]. Jest to marker wygodniejszy w użyciu w porównaniu do Ki67, który jest również markerem proliferujących komórek, ze względu na jego ekspresję powierzchniową. Markery te są również wskaźnikami w różnym stadium aktywacji komórek przez receptor limfocytów T. Ekspresja Nur77 pojawia się najwcześniej, w kolejnym etapie pojawia się ekspresja CD71, a Ki-67 jest późnym markerem aktywacji limfocytów T [75].

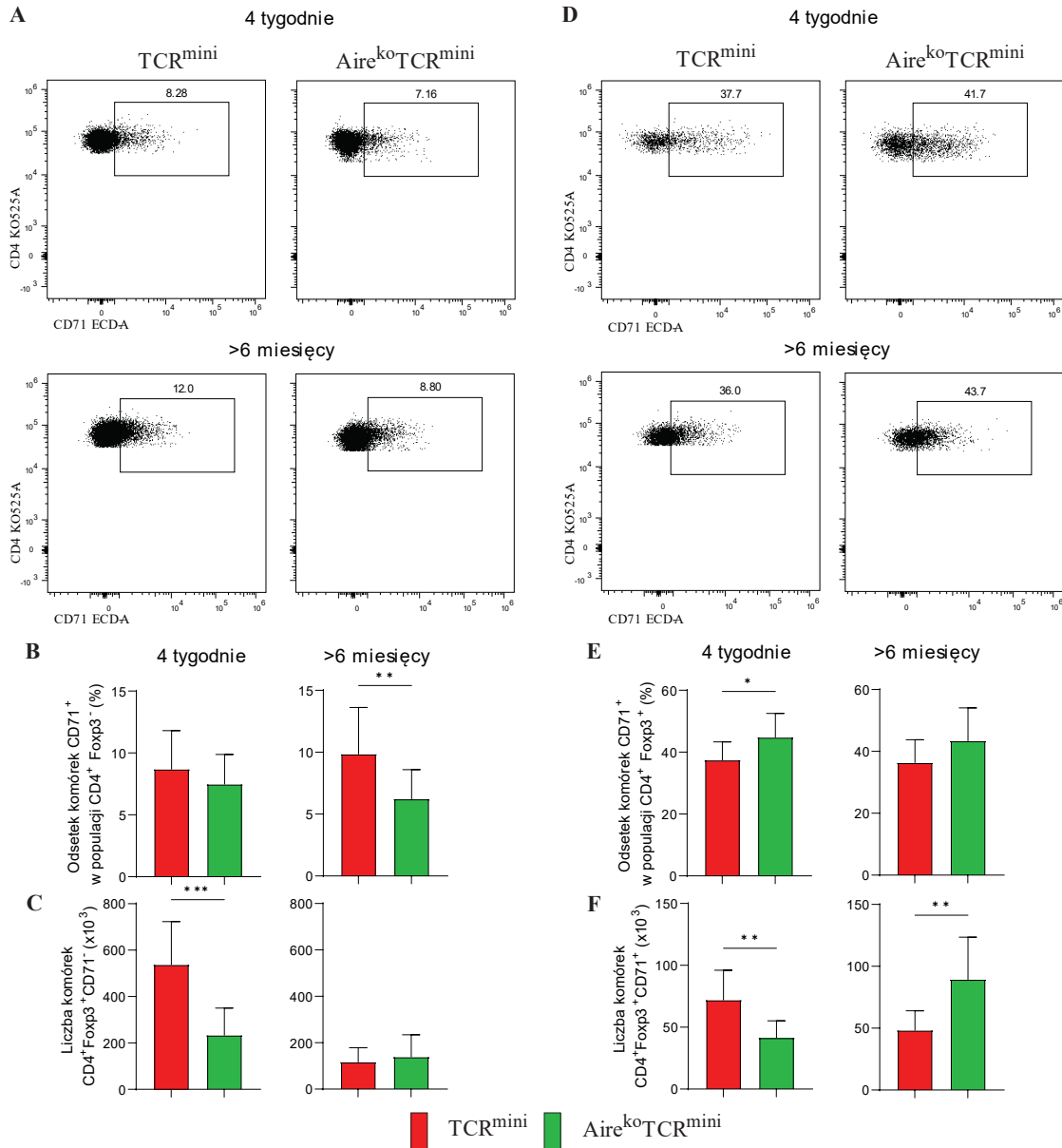
Porównując odsetek komórek $CD4^+Foxp3^-$ z podwyższoną ekspresją CD71 w czterotygodniowych myszach można zauważyć podobieństwo pomiędzy myszami TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$ w prawie wszystkich analizowanych narządach i węzłach limfatycznych, z wyjątkiem prostaty, gdzie w myszy z nokautem genu *Aire* było ich znacząco mniej. W starszych myszach TCR^{mini} w węzłach obwodowych widoczny był wzrost proporcji komórek z podwyższoną ekspresją CD71, natomiast w myszach $Aire^{ko}TCR^{mini}$, co w wypadku węzłów obwodowych spowodowało statystycznie znaczącą różnicę pomiędzy analizowanymi myszami. W jelicie grubym i węzłach krezkowych proporcja komórek z podwyższoną ekspresją CD71 w myszy kontrolnej była statystycznie wyższa niż, w myszy z nokautem *Aire*. W wątrobie starych myszy TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$ nastąpił proporcjonalny wzrost odsetka komórek $CD4^+Foxp3^-$ o podwyższonej ekspresji CD71, natomiast w prostacie myszy kontrolnej wartość ta pozostała stała, a w myszy z nokautem *Aire* wzrosła około dwukrotnie w porównaniu do myszy czterotygodniowej.

We wszystkich badanych organach i węzłach chłonnych czterotygodniowych myszy liczba komórek o wyższej ekspresji CD71 była większa w myszy TCR^{mini} , przy czym tylko w węzłach krezkowych ta różnica nie była statystycznie znacząca. W jelicie grubym i węzłach krezkowych myszy starszych ta wzajemna relacja została zachowana i wciąż była statystycznie znacząca na korzyść myszy TCR^{mini} , przy czym ta liczba spadła w przypadku obu myszy w węzłach krezkowych i w jelicie grubym myszy kontrolnej, a nieznacznie wzrosła w jelicie grubym myszy z nokautem *Aire*. Liczba komórek $CD4^+Foxp3^-$ o podwyższonej ekspresji CD71 w węzłach obwodowych i krzyżowych spadła w przypadku obu rodzajów myszy, ale w myszy TCR^{mini} ten spadek był bardziej znaczący, do poziomu porównywalnego do myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$. W prostacie w obydwu rodzajach myszy nastąpił proporcjonalny wzrost liczby komórek proliferujących,

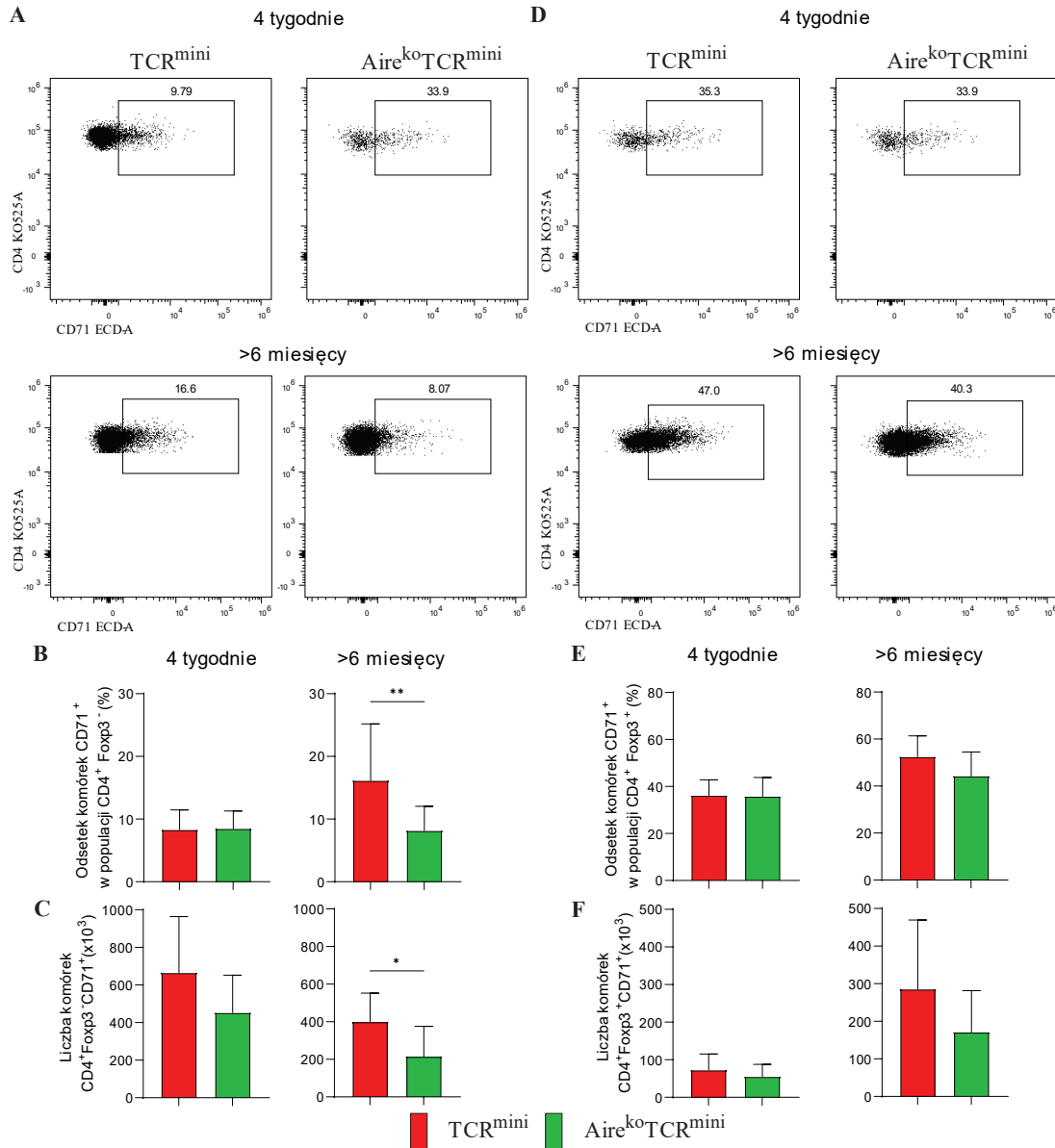
niepowodujący zaburzenia wzajemnego stosunku pomiędzy myszami, który pozostał statystycznie znaczący. W wątrobie myszy TCR^{mini}, tak jak w większości pozostałych organów i węzłów (oprócz prostaty), nastąpił spadek liczby komórek o podwyższonym poziomie CD71, natomiast w myszy z nokautem *Aire* nastąpił jej znaczący wzrost, co skutkowało odwróceniem wzajemnej proporcji na korzyść myszy Aire^{ko}TCR^{mini}.

Porównując odsetek komórek CD4⁺Foxp3⁺ z podwyższoną ekspresją CD71 w czterotygodniowych myszach można zauważyć podobny jego poziom w węzłach krzyżowych i krezkowych w obu typach myszy. W węzłach obwodowych ten poziom był wyższy natomiast we wszystkich badanych narządach statystycznie podobny w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. W węzłach obwodowych i krzyżowych nie nastąpiła zmiana w odsetku proliferujących Tregów w myszach starszych, a przypadku węzłów krezkowych i jelita grubego nastąpił jego w przypadku myszy kontrolnej. Również w wątrobie zaobserwowano wzrost odsetka komórek ekspresjonujących CD71, w odróżnieniu od prostaty, gdzie wzrost zaobserwowano w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, a spadek w myszy TCR^{mini}.

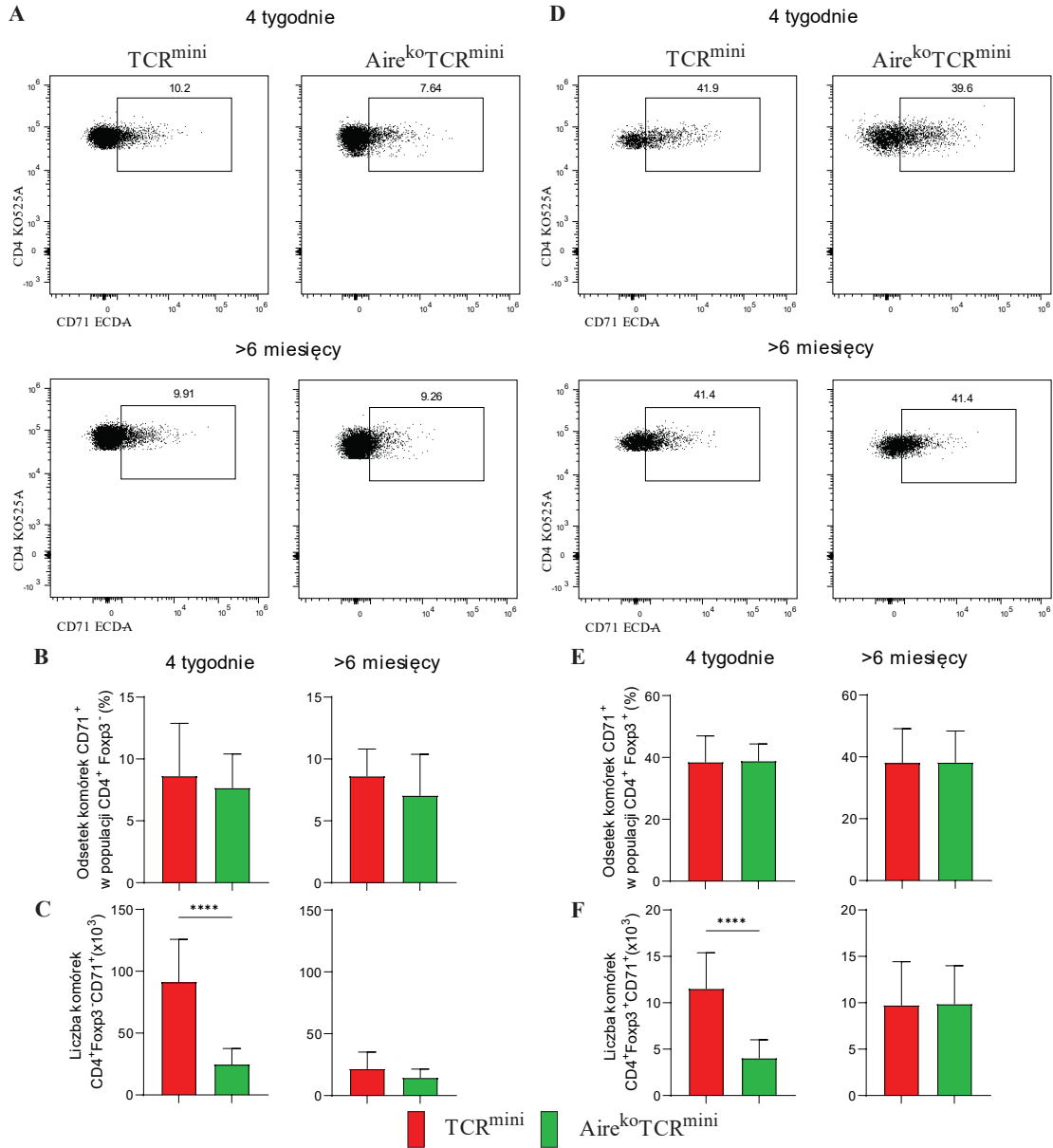
W prawie wszystkich badanych organach i węzłach chłonnych czterotygodniowych myszy (oprócz wątroby) liczba komórek o wyższej ekspresji CD71 była większa w myszy TCR^{mini}, przy czym w węzłach krezkowych i w prostaty ta różnica nie była statystycznie znacząca. W wątrobie zaobserwowano brak znaczącej różnicy pomiędzy czterotygodniowymi myszami. W jelicie grubym, węzłach krezkowych i prostaty z wiekiem w obu typach myszy wzrosła proporcjonalnie liczba proliferujących Tregów i wciąż w myszy kontrolnej ta liczba pozostała większa (w jelicie grubym ta różnica pozostała statystycznie znacząca). W węzłach obwodowych, krzyżowych oraz w wątrobie nastąpił spadek liczby komórek o profilu CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺ w myszach kontrolnych, a wzrost w myszach Aire^{ko}TCR^{mini} powodując odwrócenie wzajemnej zależności pomiędzy dwoma rodzajami myszy na korzyść modelu z nokautem *Aire*.



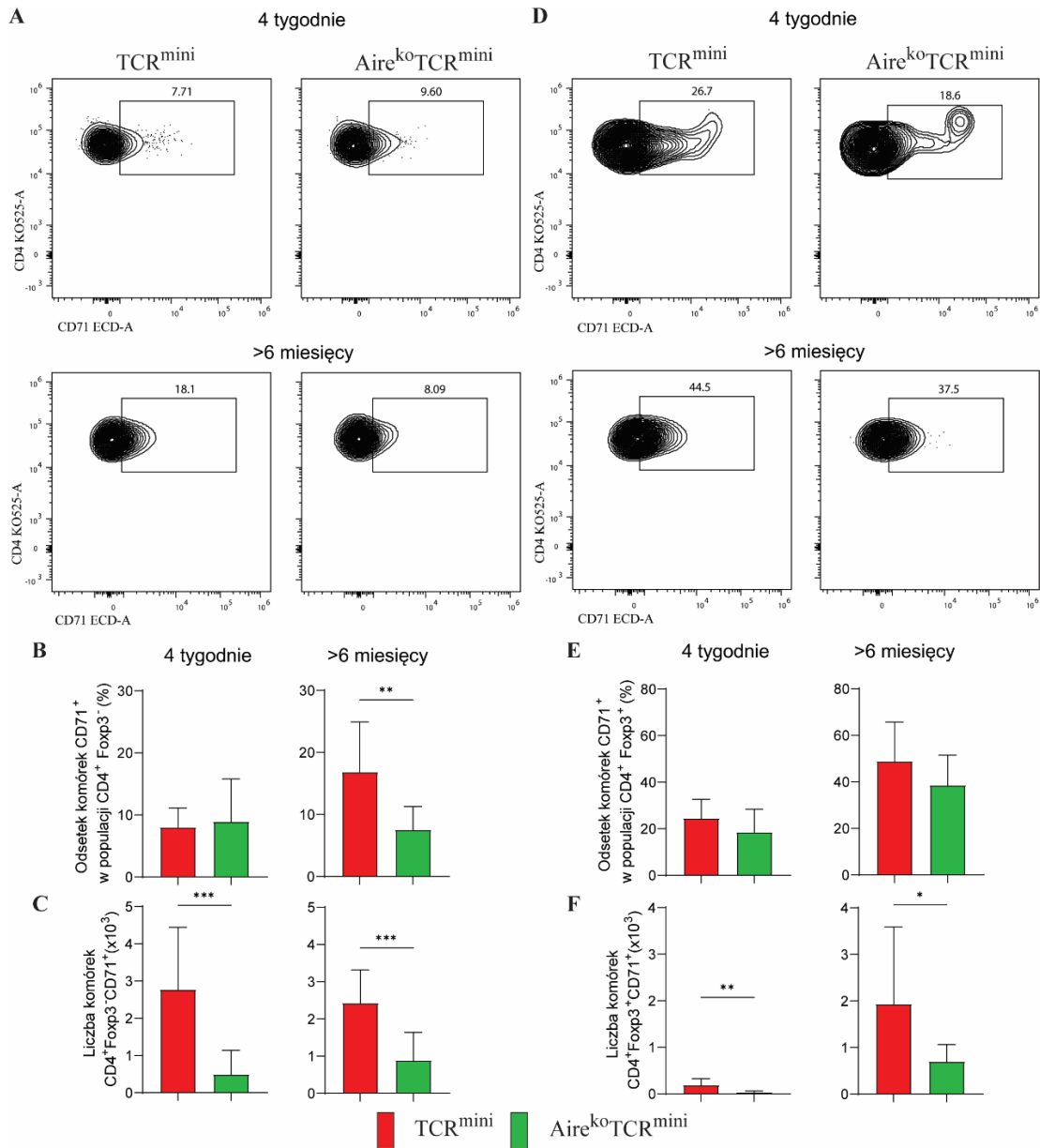
Rysunek 4.21 Analiza fenotypowa obwodowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD71 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zależności od wieku. A) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻. B) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. E) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. F) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. Każdy z wykresów słupkowych (C, D, E, F) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej dziesięciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



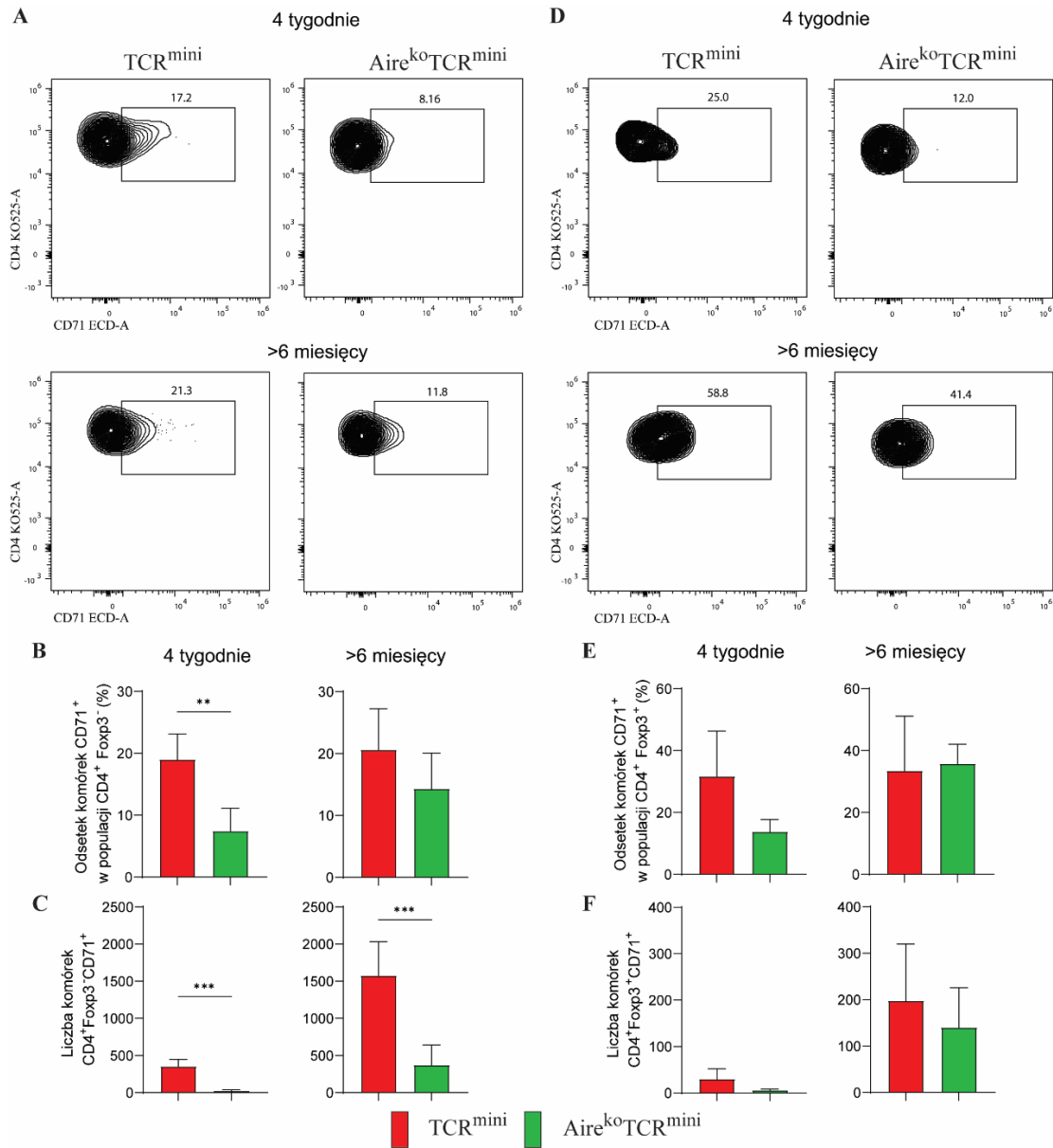
Rysunek 4.22 Analiza fenotypowa krezkowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD71 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zależności od wieku. A) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻. B) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. E) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. F) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. Każdy z wykresów słupkowych (C, D, E, F) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej dziesięciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



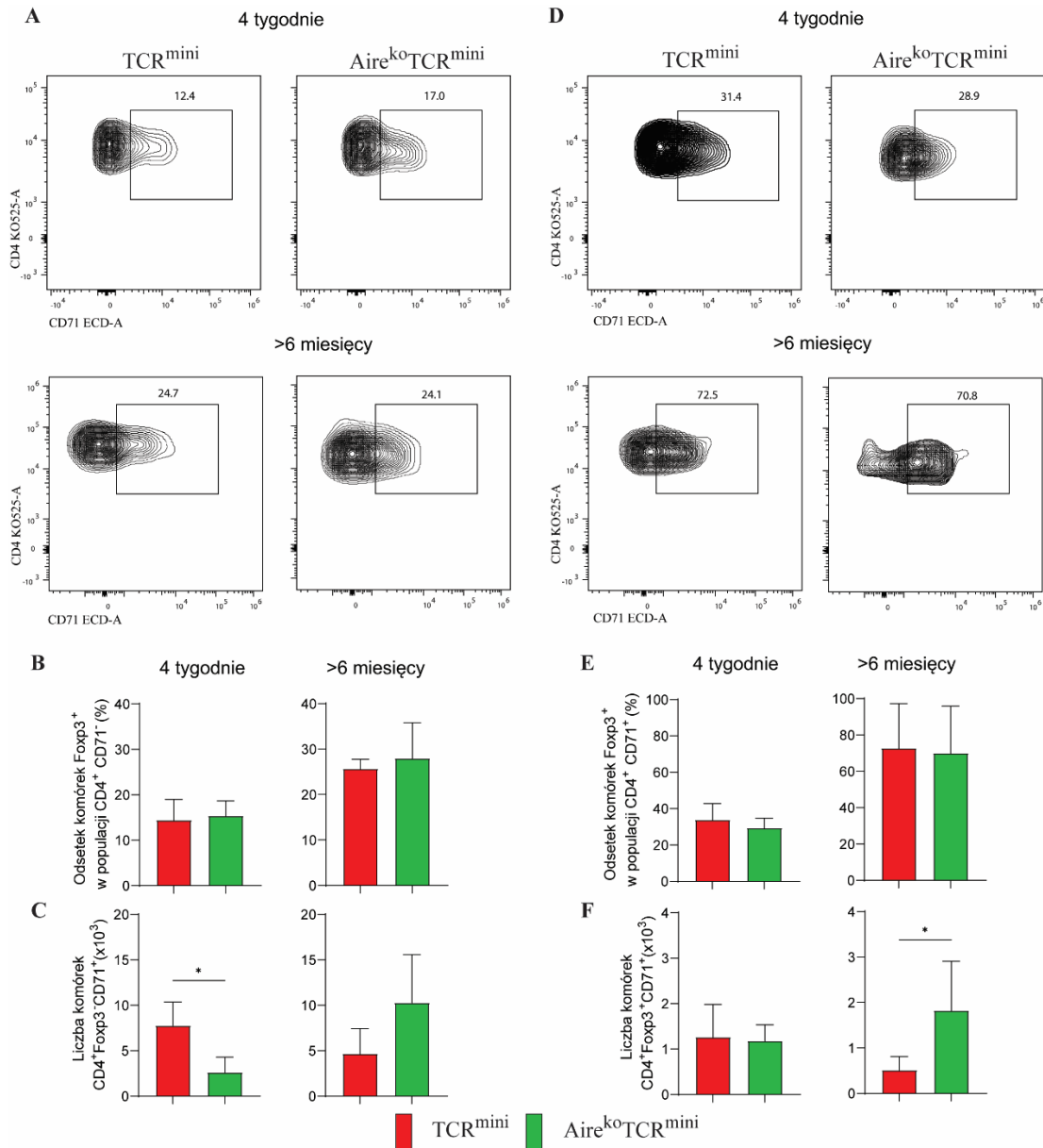
Rysunek 4.23 Analiza fenotypowa krzyżowych węzłów limfatycznych z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD71 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zależności od wieku. A) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻. B) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. E) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. F) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. Każdy z wykresów słupkowych (C, D, E, F) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej dziesięciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



Rysunek 4.24 Analiza fenotypowa jelita grubego z myszy TCR^{mini} (n=8) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=10) w oparciu o poziom ekspresji CD71 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zależności od wieku. A) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻. B) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. E) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. F) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. Każdy z wykresów słupkowych (C, D, E, F) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej dziesięciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



Rysunek 4.25 Analiza fenotypowa prostaty z myszy TCR^{mini} (n=5) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=7) w oparciu o poziom ekspresji CD71 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zależności od wieku. A) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻. B) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. E) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. F) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. Każdy z wykresów słupkowych (C, D, E, F) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej sześciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.

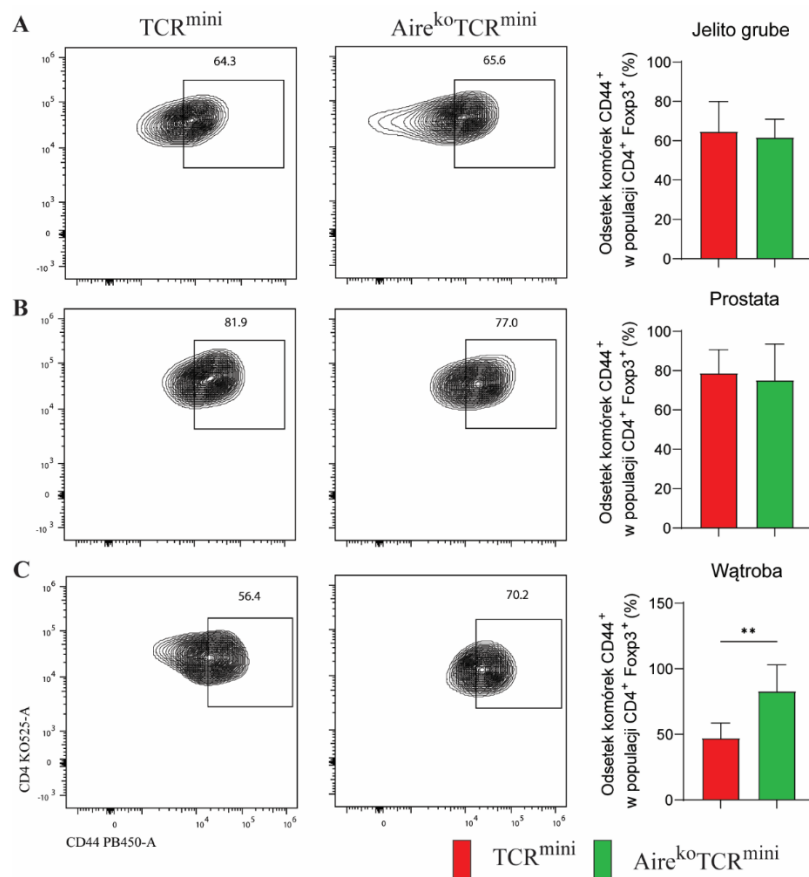


Rysunek 4.26 Analiza fenotypowa wątroby z myszy TCR^{mini} (n=5) oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (n=5) w oparciu o poziom ekspresji CD71 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zależności od wieku. A) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻. B) Przykładowe barwienie CD4/CD71 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺. C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. D) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁻CD71⁺. E) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. F) Wykres słupkowy przedstawiający średnią liczbę komórek CD4⁺Foxp3⁺CD71⁺. Każdy z wykresów słupkowych (C, D, E, F) przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej sześciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.

W dalszej analizie skupiono się na myszach starszych (> 6 miesięcy), ponieważ w nich można zauważyć fenotypowo większe skłonności do autoagresji w myszach Aire^{ko}TCR^{mini}. Z przeanalizowanych narządów największe zmiany można było zauważyć w wątrobie. Jelito grube i węzły krezkowe w porównaniu pomiędzy myszami w różnym wieku cechowały się bardzo podobnymi tendencjami, co prawdopodobnie związane było z większym wpływem bakterii na charakterystykę tych komórek. Kolejnym etapem na przyszłą analizę wpływu nokautu *Aire* na jelito grube byłaby analiza myszy, które nie posiadałyby indukowanych Tregów, jak również pozbawione byłyby bakterii (gnotobiotyczne), co pozwoliłoby na przetestowanie rzeczywistego wpływu *Aire* na komórki jelita. Prostata do analizy dalszej została uwzględniona bazując na problemach z płodnością myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, chociaż z wiekiem zauważalne są zmiany fenotypowe zarówno u myszy kontrolnych jak i z nokautem genu *Aire*.

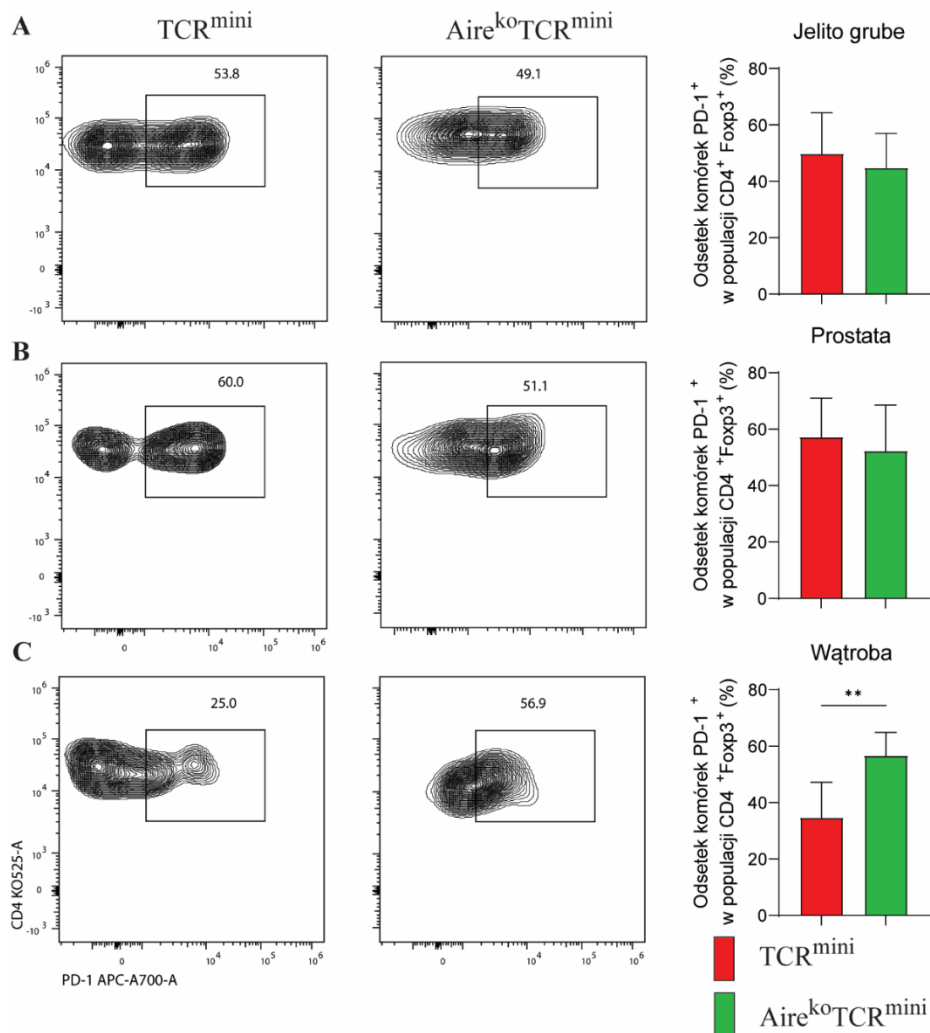
Jak pokazano na Rys. 4.26, odsetek wątrobowych komórek CD4⁺Foxp3⁻ jak i Treg ekspresjonujących CD71 wzrastał z wiekiem w obu myszach. Liczba Tregów malała również w obu myszach (Rys. 4.13), ale liczba proliferujących Tregów w myszach Aire^{ko}TCR^{mini} wykazywała tendencję wzrostową (Rys. 4.26), w przeciwieństwie do myszy kontrolnej. Analiza ekspresji markera aktywacji CD44 na komórkach CD4⁺Foxp3⁺ (Rys. 4.27) wykazała, iż w wątrobie w porównaniu do myszy kontrolnej większy ich odsetek ulegał aktywacji w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}. Na Rys. 4.28 pokazano ekspresję markera PD1 na Tregach w myszach Aire^{ko}TCR^{mini} w porównaniu do myszy TCR^{mini}. Większy poziom ekspresji PD1 w myszy z nokautem genu *Aire* może stanowić wskazówkę, dlaczego jest ich mniejsza liczba w wątrobie (Rys. 4.13), pomimo większej liczby komórek proliferujących. Proliferacja komórek CD4 jest następstwem ich aktywacji (zwiększonej ekspresji CD44), co prowadzi do ekspresji PD1, który jest naturalnym mechanizmem zapobiegającym nadmiernej aktywacji komórek T [77]. Uzyskane dane pokazały, że komórki Treg w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} ulegając zwiększonej aktywacji, a co za tym proliferacji, mogą ulegać eliminacji w związku z indukcją procesu apoptozy przez sygnał receptora PD1. Ten wniosek dodatkowo wspiera brak zwiększonej ilości komórek Treg ekspresjonujących Nur77 (Rys. 4.20), co sugeruje, że komórki regulatorowe ekspresjonujące TCR o wysokim powinowactwie do antygenów wątrobowych (czyli te, które mają wyższą ekspresję CD44), mogą ulegać eliminacji w wyniku procesu zwanego śmiercią na skutek indukowanej aktywacji (z ang. activation-induced cell death, AICD) inicjowanym m.in. przez PD1 [77, 78]. Podobną obserwację uzyskano analizując myszy z nokautem Foxp3 [20], gdzie brak był komórek

CD4 posiadających wysoką ekspresję Nur77, a które ekspresjonowały autoreaktywne TCR. Ponadto, analiza wątrobowych limfocytów regulatorowych pokazała również, że zaburzona jest ich funkcja supresorowa. Rys. 4.29 pokazuje zmniejszenie ekspresji CD73, jednego z kluczowych białek używanych przez Tregi do hamowania funkcji efektorowych limfocytów T. CD73 (NT5E) jest ektonukleazą, która indukuje konwersję AMP do adenozyiny wiążącej się do jej receptora [79]. Zwiększone stężenie tej molekuly zaburza metabolizm komórki. Zmniejszona ekspresja tej molekuly na wątrobowych komórkach Treg myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ jest dowodem na ich zaburzoną funkcję, powodując niehamowaną reakcję limfocytów T efektorowych. Podsumowując, powyższe dane pokazują zmniejszoną funkcję wątrobowych Treg w myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$, co stanowi dowód na indukcję procesu zapalnego w tym organie w myszy z nokautem *Aire*.



Rysunek 4.27 Analiza fenotypowa jelita grubego, prostaty i wątroby z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} w oparciu o poziom ekspresji CD44 w limfocytach T regulatorowych starych myszy. A) Przykładowe barwienie CD4/CD44 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺ oraz wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek CD4⁺Foxp3⁺CD44⁺ w jelicie grubym. B) Przykładowe barwienie CD4/CD44 limfocytów T o fenotypie CD4⁺Foxp3⁺ oraz wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek CD4⁺Foxp3⁺CD44⁺ w prostaty. C) Przykładowe barwienie CD4/CD44

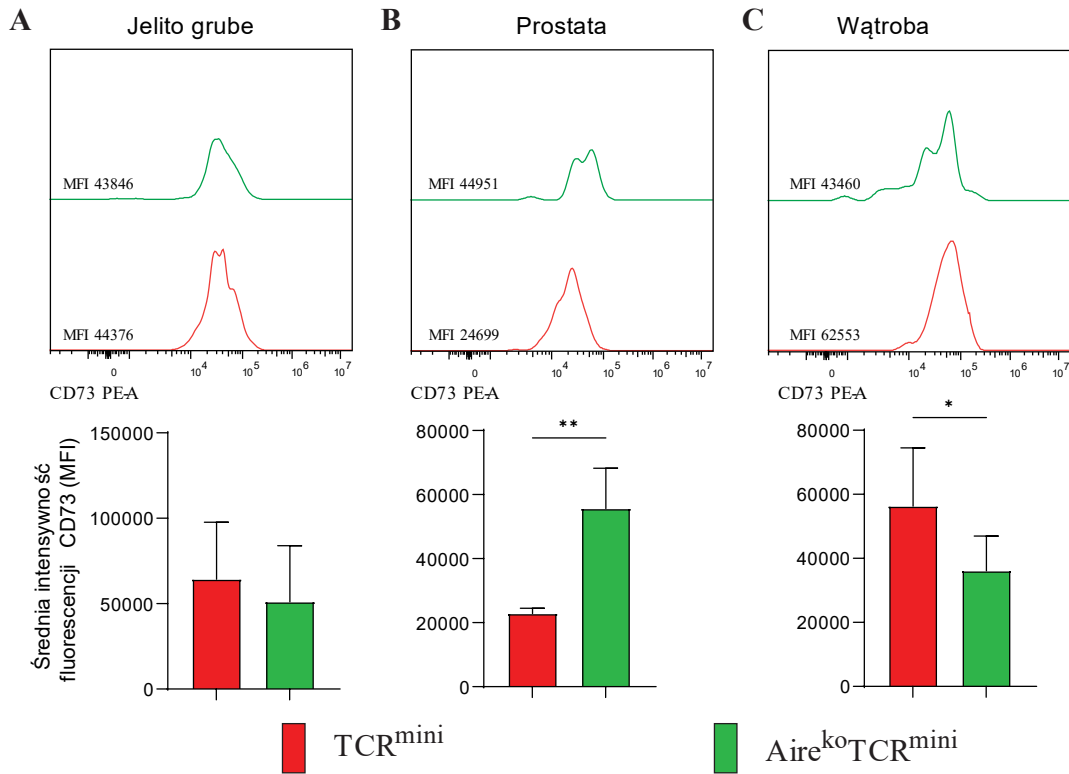
limfocytów T o fenotypie $CD4^+Foxp3^+$ oraz wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek $CD4^+Foxp3^+CD44^+$ w wątrobie. Każdy z wykresów słupkowych przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej sześciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.



Rysunek 4.28 Analiza fenotypowa jelita grubego, prostaty i wątroby z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} w oparciu o poziom ekspresji PD-1 w limfocytach T regulatorowych starych myszy. A) Przykładowe barwienie CD4/PD-1 limfocytów T o fenotypie $CD4^+Foxp3^+$ oraz wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$ w jelicie grubym. B) Przykładowe barwienie CD4/PD-1 limfocytów T o fenotypie $CD4^+Foxp3^+$ oraz wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$ w prostaty. C) Przykładowe barwienie CD4/PD-1 limfocytów T o fenotypie $CD4^+Foxp3^+$ oraz wykres słupkowy przedstawiający uśredniony odsetek komórek $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$ w wątrobie. Każdy z wykresów słupkowych przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej sześciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.

Analiza wątrobowych limfocytów regulatorowych pokazała również, że zaburzona jest ich funkcja supresorowa. Rys. 4.29 pokazuje zmniejszenie ekspresji CD73, które jest białkiem

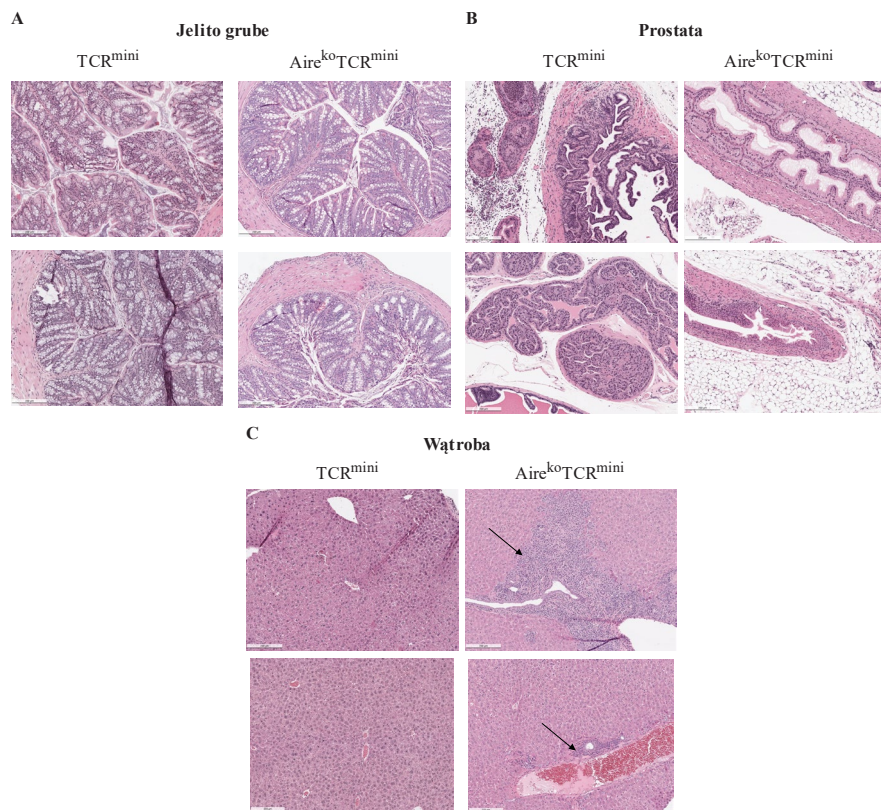
używanych przez Tregi do hamowania funkcji efektorowych limfocytów T. CD73 (NT5E) jest ektonukleazą, która indukuje konwersję AMP do adenozyliny wiążącej się do jej receptora. Zwiększone stężenie tej molekuly zaburza metabolizm komórki. Zmniejszona ekspresja tej molekuly na wątrobowych komórkach Treg myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ może być wskazówką na ich zaburzoną funkcję, powodując niehamowaną reakcję limfocytów T efektorowych. Podsumowując, powyższe dane pokazują zmniejszoną funkcję wątrobowych Treg w myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$, co stanowi dowód na indukcję procesu zapalnego w tym organie w myszy z nokautem *Aire*.



Rysunek 4.29 Analiza fenotypowa jelita grubego, prostaty i wątroby z myszy TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} w oparciu o średnią intensywność fluorescencji CD73 w limfocytach T regulatorowych starych myszy. Górne panele przedstawiają przykładowe histogramy przedstawiające porównanie średniej intensywności fluorescencji (MFI) CD73 w jelicie grubym (A) prostatie (B) i wątrobie (C) myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini}. Dolne panele przedstawiają wykresy słupkowe z uśrednionej wartości MFI dla poszczególnych organów. Każdy z wykresów słupkowych przedstawia wartość uśrednioną z co najmniej sześciu myszy, jak również odchylenie standardowe od tej wartości. Próg istotności statystycznej został obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta.

4.6. Analiza histologiczna

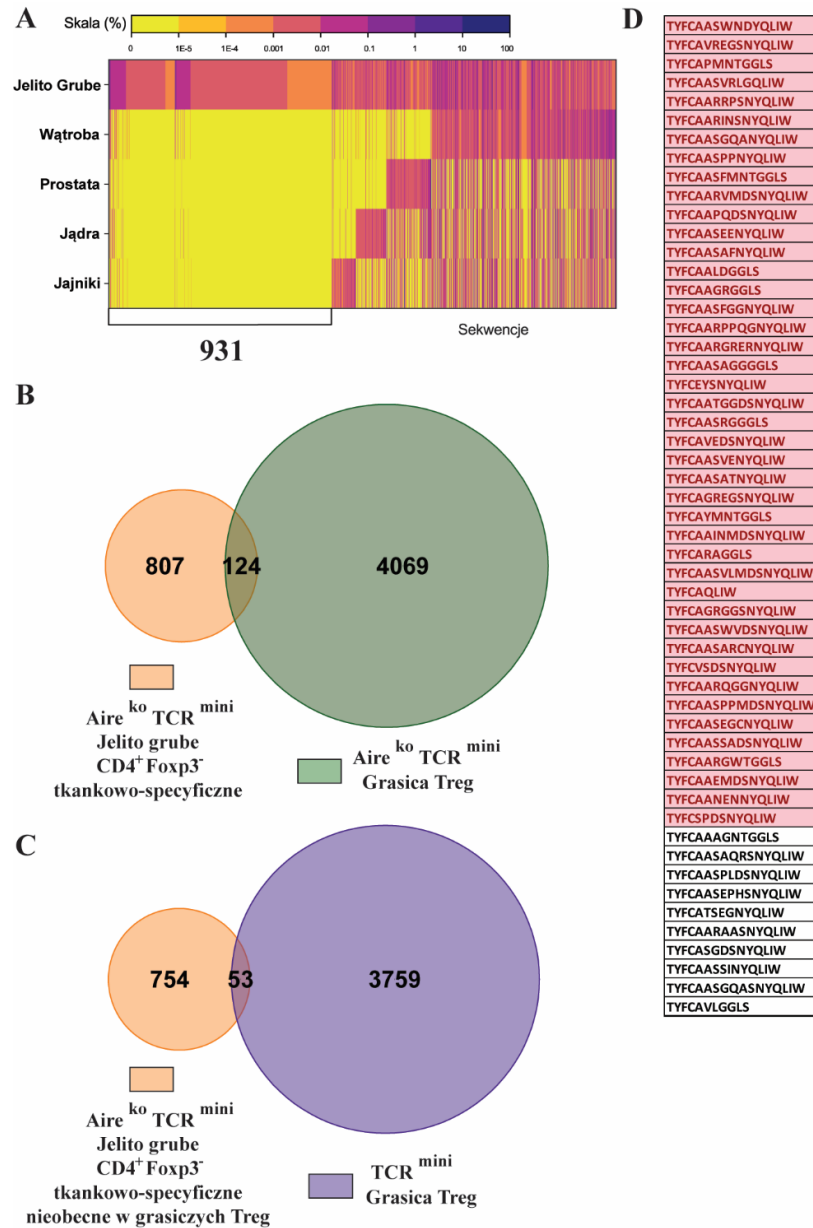
Barwienie histologiczne przeprowadzono dla wybranych narządów z pominięciem węzłów wewnętrznych, w których można oczekiwać zmian w związku z brakiem Tregów selekcyonowanych na antygenach tkankowo-specyficznych. Na rysunku 4.30 przedstawiono wycinek z fragmentu jelita grubego (A), prostaty (B) i wątroby (C) z dwóch przykładowych osobników z modelu TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$ w wieku powyżej sześciu miesięcy. W analizie histopatologicznej nie zauważono patologicznych zmian w jelicie grubym oraz prostatie zarówno myszy kontrolnej jak i z nokautem genu *Aire*. Z kolei w przypadku wątroby pochodzącej z myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ można było zaobserwować gromadzące się małe infiltrujące komórki o morfologii zgodnej z dojrzałymi limfocytami, jak również pleomorficzne poligonalne komórki różnej wielkości o amfofilowej cytoplazmie, które mogą być niedojrzałymi limfocytami (limfoblastami). Wątroba myszy TCR^{mini} nie wykazywała porównywalnych zmian patologicznych.



Rysunek 4.30 Barwienie histologiczne hematoksyliną i eozyną jelita grubego (A), prostaty (B) i wątroby (C) ze starych (> 6 miesięcy) myszy TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$. Na rysunku pokazano dwie reprezentacyjne myszy każdego rodzaju.

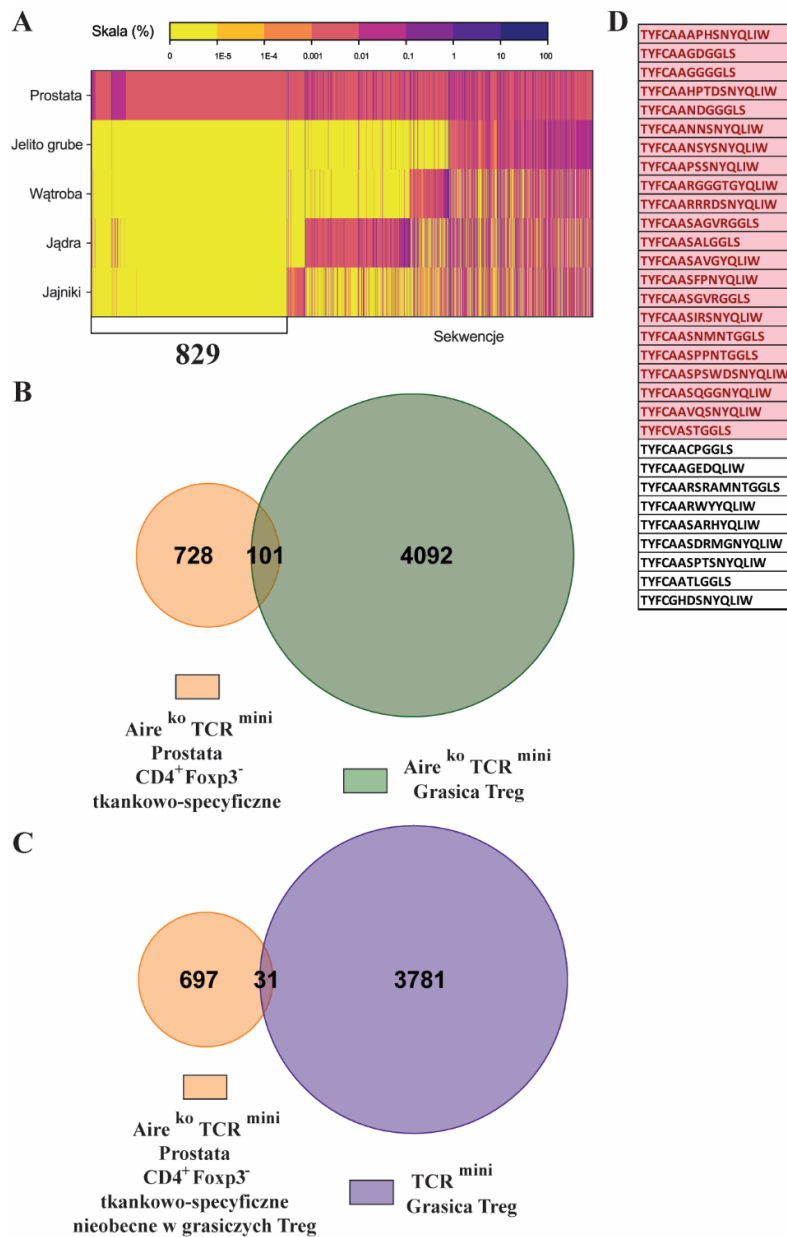
4.7. Analiza sekwencji CDR3 receptora TCR w narządach nielimfoidalnych

W celu wytypowania receptorów, które są potencjalnie autoreaktywne w badanych narządach wewnętrznych komórki $CD4^+Foxp3^-$ i $CD4^+Foxp3^+$ z jelita grubego, prostaty i wątroby z myszy TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$ wysortowano na sorterze komórkowym i zsekwencjonowano region CDR3 ich TCR. Na kolejnych trzech rysunkach przedstawiono analizę sekwencji komórek $CD4^+Foxp3^-$ odpowiednio dla jelita grubego (Rys. 4.31), prostaty (Rys. 4.32) i wątroby (Rys. 4.33). W każdym z rysunków podpunkt A przedstawia porównanie częstotliwości występowania sekwencji w analizowanym narządzie do ich częstotliwości w innych organach myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$. Porównanie to miało na celu wytypowanie sekwencji TCR potencjalnie tkankowo-specyficznych, czyli występujących w jednym narządzie, a nie występujących wcale, lub w bardzo małej częstotliwości w pozostałych narządach (co najmniej dziesięciokrotna różnica). Na tej podstawie wytypowano 931 sekwencji z jelita grubego (Rys. 4.31A), 829 z prostaty (Rys. 4.32A) i 1434 z wątroby (Rys. 4.33A). Na rysunku B porównano sekwencje wytypowane w podpunkcie A do bazy sekwencji komórek regulatorowych występujących w grasicy myszy z nokautem genu *Aire*. Celem tego porównania było wyeliminowanie sekwencji wspólnych, które pojawiły się w populacji $CD4^+Foxp3^-$ w badanym narządzie jak również w populacji grasiczych Tregów. Po tym kroku do dalszej analizy pozostało 807 sekwencji z jelita grubego, 728 sekwencji z prostaty i 1317 sekwencji z wątroby myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$. Kolejnym krokiem było porównanie sekwencji wytypowanych w kroku B do bazy danych sekwencji grasiczych Tregów pochodzących z myszy TCR^{mini} . Celem tego porównania było wytypowanie sekwencji wspólnych pomiędzy badanym narządem a grasiczymi Tregami z myszy kontrolnej. W końcowym etapie wytypowano 53 sekwencje pochodzące z jelita grubego, 31 z prostaty i 64 z wątroby, które pochodziły z populacji $CD4^+Foxp3^-$, były tkankowo-specyficzne, nie pojawiły się w populacji regulatorowej w rozwoju grasiczym w myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ a pojawiły się w populacji regulatorowej w grasicy myszy TCR^{mini} . W podpunktach D rysunków 4.31-4.33 wylistowano te sekwencje, a kolorem czerwonym zaznaczono dodatkowo sekwencje, które występowały w populacji komórek zaktywowanych w badanym narządzie myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$.



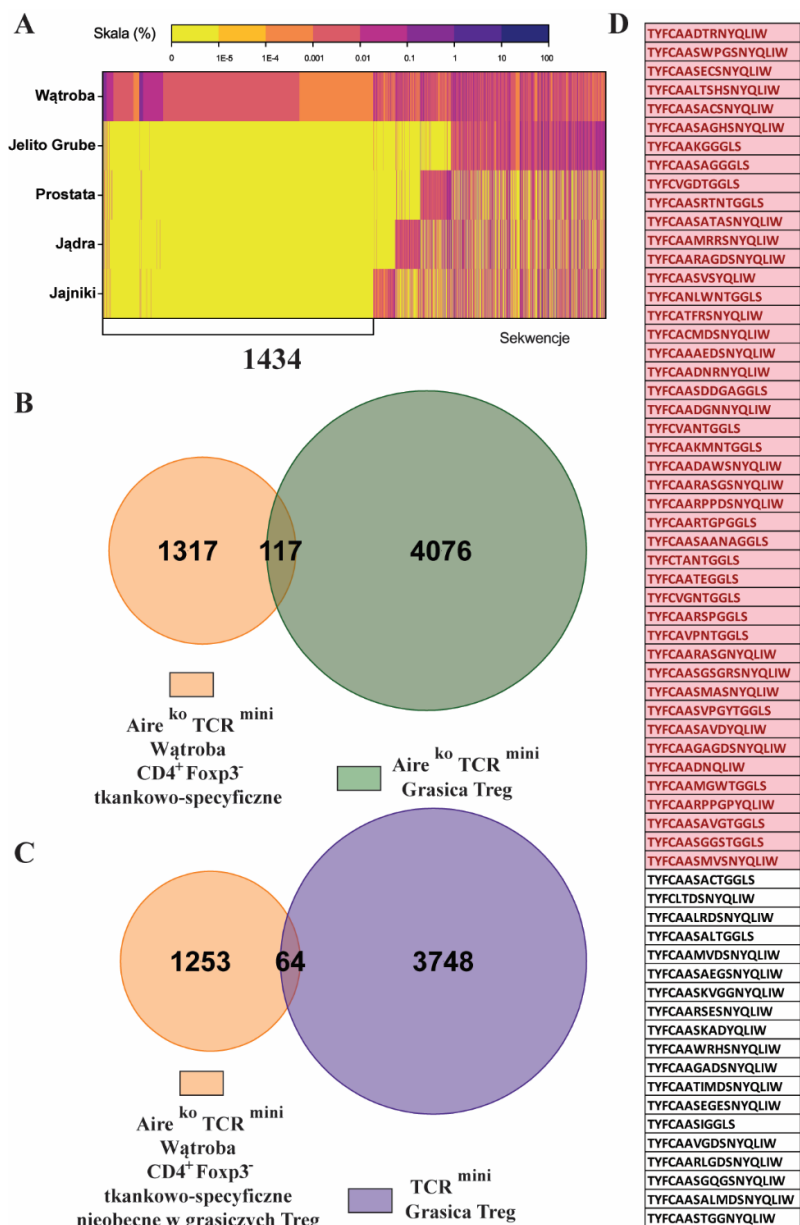
Rysunek 4.31 Analiza repertuaru limfocytów T tkankowo specyficznych z jelita grubego w populacji CD4⁺Foxp3⁻ myszy Aire^{ko}TCR^{mini}.

A) Mapa cieplna przedstawiająca zawartość procentową receptorów występujących z populacji CD4⁺Foxp3⁻ jelita grubego myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i ich jednoczesna dystrybucja w innych organach (wątroba, prostata, jądra, jajniki). Klony potencjalnie tkankowo specyficzne wybrano na podstawie założenia, iż w pozostałych narządach było ich co najmniej dziesięciokrotnie mniej. B) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się zbiorów sekwencji wytypowanych w podpunkcie A jako tkankowo specyficzne i grasiczych tymocytów regulatorowych w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} (klony zależne od *Aire*). C) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się zbiorów sekwencji wytypowanych w podpunkcie B jako tkankowo specyficzne, zależne od *Aire* (niewystępujące w populacji grasiczych Tregów w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}) i grasiczych tymocytów regulatorowych z myszy TCR^{mini}. D) Lista sekwencji wyselekcjonowanych w analizie na rysunkach 4.32A-C. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencje, występujące w populacji zaktywowanych limfocytów T pochodzących z jelita grubego.



Rysunek 4.32 Analiza repertuaru limfocytów T tkankowo specyficznych z prostaty w populacji CD4⁺Foxp3⁻ myszy Aire^{ko}TCR^{mini}.

A) Mapa cieplna przedstawiająca zawartość procentową receptorów występujących z populacji CD4⁺Foxp3⁻ prostaty myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i ich jednoczesna dystrybucja w innych organach (wątroba, jelito grube, jądra, jajniki). Klony potencjalnie tkankowo specyficzne wybrano na podstawie założenia, iż w pozostałych narządach było ich co najmniej dziesięciokrotnie mniej. B) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się zbiorów sekwencji wytypowanych w podpunkcie A jako tkankowo specyficzne i grasiczych tymocytów regulatorowych w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} (klony zależne od *Aire*). C) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się zbiorów sekwencji wytypowanych w podpunkcie B jako tkankowo specyficzne, zależne od *Aire* (niewystępujące w populacji grasiczych Tregów w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}) i grasiczych tymocytów regulatorowych z myszy TCR^{mini}. D) Lista sekwencji wyselekcjonowanych w analizie na rysunkach 4.33A-C. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencje, występujące w populacji zaktywowanych limfocytów T pochodzących z prostaty.



Rysunek 4.33 Analiza repertuaru limfocytów T tkankowo specyficznych z wątroby w populacji CD4⁺Foxp3⁻ myszy Aire^{ko}TCR^{mini}.

A) Mapa cieplna przedstawiająca zawartość procentową receptorów występujących z populacji CD4⁺Foxp3⁻ wątroby myszy Aire^{ko}TCR^{mini} i ich jednoczesna dystrybucja w innych organach (prostata, jelito grube, jądra, jajniki). Klony potencjalnie tkankowo specyficzne wybrano na podstawie założenia, iż w pozostałych narządach było ich co najmniej dziesięciokrotnie mniej. B) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się zbiorów sekwencji wytypowanych w podpunkcie A jako tkankowo specyficzne i grasiczych tymocytów regulatorowych w myszy Aire^{ko}TCR^{mini} (klony zależne od *Aire*). C) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się zbiorów sekwencji wytypowanych w podpunkcie B jako tkankowo specyficzne, zależne od *Aire* (niewystępujące w populacji grasiczych Tregów w myszy Aire^{ko}TCR^{mini}) i grasiczych tymocytów regulatorowych z myszy TCR^{mini}. D) Lista sekwencji wyselekcjonowanych w analizie na rysunkach 4.34A-C. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencje, występujące w populacji zaktywowanych limfocytów T pochodzących z wątroby.

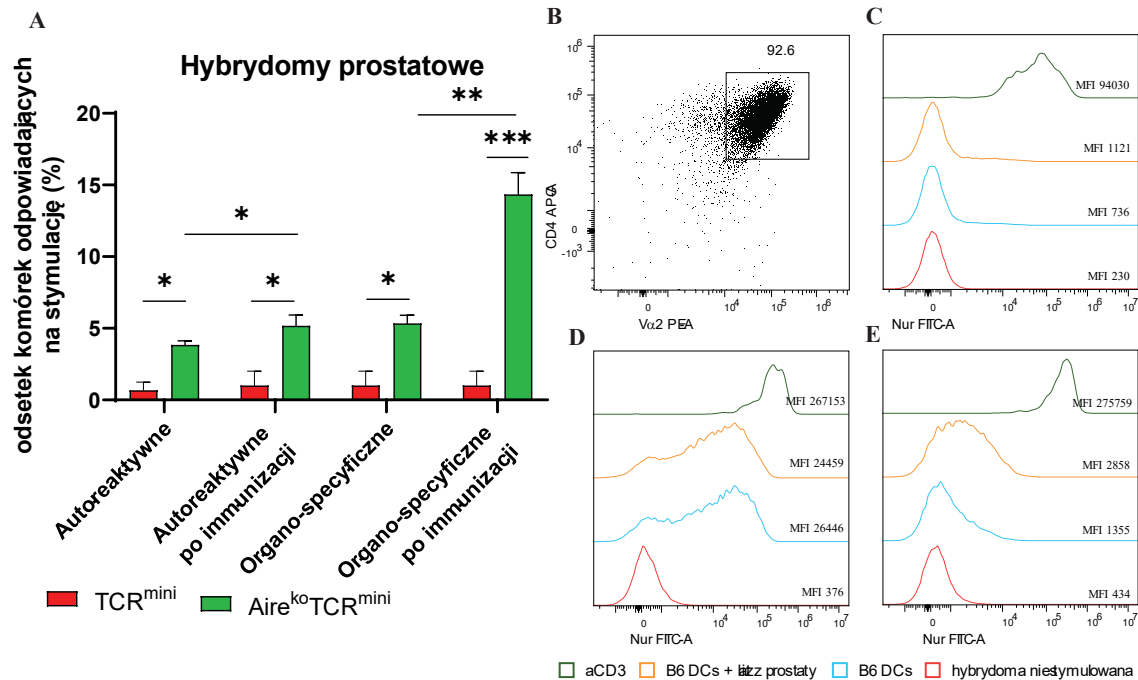
4.8. Odpowiedź hybrydom na stymulację TSA

Aby sprawdzić otrzymane sekwencje TCR o potencjale autoimmunologicznym w wybranych organach (prostata i wątroba), przeprowadzono szereg fuzji w celu uzyskania hybrydom z populacji CD4⁺Foxp3⁻ pochodzącej z danych organów i/lub węzłów bezpośrednio do nich przylegających w celu znalezienia klonów specyficznych do antygenów tkankowych. Odpowiedź na antygeny tkankowe (w formie lizatu białkowego przygotowanego z danego organu) prezentowane hybrydomom przez dojrzałe komórki dendrytyczne (DC, ang. dendritic cells) pochodzące ze szpiku kostnego oceniana była w kontekście wzrostu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nur77GFP w stosunku do ekspresji Nur77GFP w odpowiedzi hybrydom na własne antygeny prezentowane przez komórki DC na skutek tej stymulacji. Efektywność i nadrzędność tego testu w odniesieniu do testu HT-2 mierzącego stężenie produkowanej przez hybrydomy w czasie stymulacji interleukiny 2 została przez nas zademonstrowana przy użyciu jako partnera do fuzji tymomy BWNur77GFP [80]. Porównanie ekspresji Nur77GFP pochodzącego od partnera BW do Nur77GFP pochodzącego od myszy transgenicznej na skutek stymulacji przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 przedstawiono w metodach (rozdział 3.2.13).

Na rysunku 4.34 i 4.35 przedstawiono wyniki stymulacji hybrydom pochodzących z prostaty (Rys. 4.34) oraz z wątroby (Rys. 4.35) jako stosunek średniej fluorescencji (MFI) Nur77GFP hybrydom z DCs do samych hybrydom (autoreaktywne), lub jako stosunek MFI Nur77GFP hybrydom, którym prezentowane zostały białka prostatowe (Rys. 4.34A) lub wątrobowe (Rys. 4.35A) zawarte w lizacie z tego narządu do komórek z DCs (tkankowo-specyficzne). Liczba hybrydom odpowiadających na stymulację lizatem białkowym uzyskiwana z każdej fuzji była stosunkowo niska, dlatego jednym w jednym z etapów zaimmunizowano myszy danym lizatem z dodatkiem kompletnego adiuwantu Freuda (CFA), w celu zwiększenia ilości komórek specyficznych dla tego narządu. Rysunki 4.34B-4.34E przedstawiają histogramy z wybranych hybrydom, które przedstawiają na jakiej podstawie dana hybrydoma została zakwalifikowana jako odpowiadająca na stymulację.

W puli ponad tysiąca hybrydom prostatowych pochodzących z myszy Aire^{ko}TCR^{mini}, około 3% odpowiadało podwyższoną ekspresją Nur77GFP na stymulację jedynie komórkami dendrytycznymi (co najmniej 10-cio krotny wzrost ekspresji Nur77GFP). Te hybrydomy mają

potencjał do autoagresji nieskierowany do specyficznych tkanek. Po zaimmunizowaniu myszy lizatem z prostaty, odsetek hybrydom potencjalnie autoreaktywnych wzrósł do 5%. Wśród grupy hybrydom prostatowych wygenerowanych bez immunizacji, około 5% odpowiadało wzrostem ekspresji Nur77GFP na skutek prezentacji peptydów pochodzących z lizatu prostatowego (co najmniej dwukrotny wzrost ekspresji), natomiast liczba ta znacząco wzrosła po immunizacji, do około 14%. Jako kontrole użyto hybrydomy z tej samej lokalizacji pochodzące od myszy TCR^{mini}.

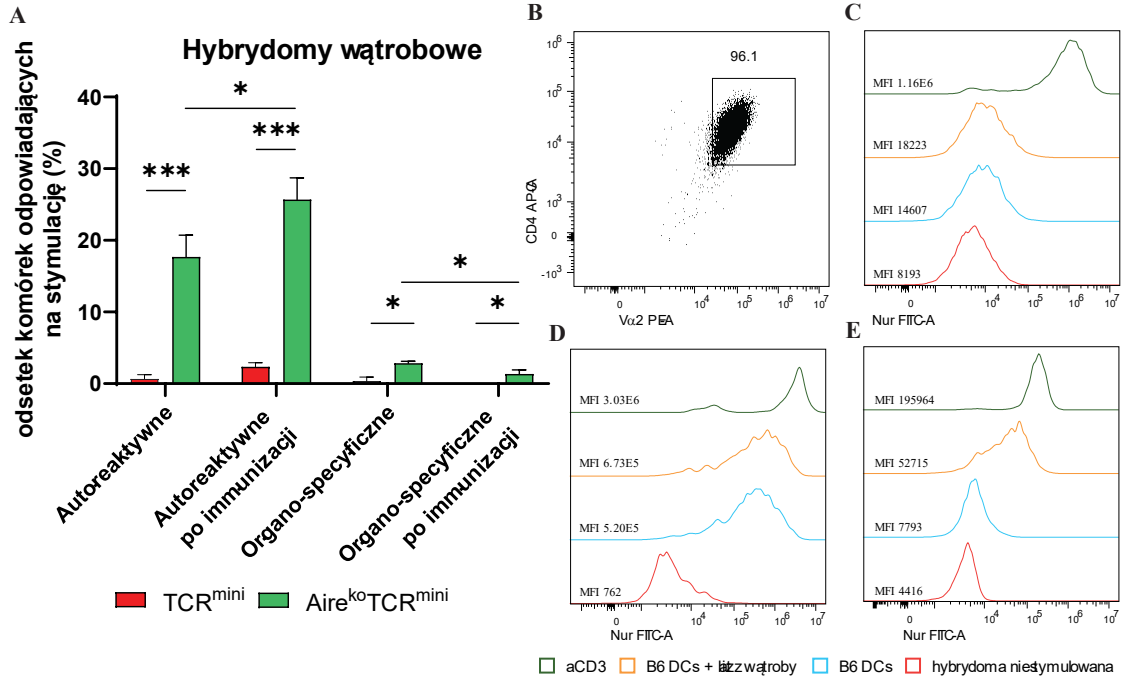


Rysunek 4.34 Analiza aktywacji hybrydom prostatowych z myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} pod wpływem stymulacji lizatem z prostaty. A) Wykres słupkowy przedstawiający porównanie ekspresji Nur77GFP w hybrydomach na skutek stymulacji komórkami dendrytycznymi (autoreaktywne) lub lizatem z prostaty (organo-specyficzne). B) Dwuwymiarowy wykres kropkowy przedstawiający przykładową hybrydomę pochodzącą z komórek wysortowanych z prostaty o fenotypie DC4⁺Vα2⁺. C) Histogram przedstawiający przykładową hybrydomę prostatową, w której nie nastąpił wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek stymulacji. D) Histogram przedstawiający przykładową hybrydomę prostatową, w której nastąpił statystycznie znaczący (co najmniej 10-krotny) wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek stymulacji komórkami dendrytycznymi. E) Histogram przedstawiający przykładową hybrydomę prostatową, w której nastąpił statystycznie znaczący (co najmniej 2-krotny) wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek prezentacji białek prostatowych przez komórki dendrytyczne.

Z powyższej puli hybrydom potencjalnie tkankowo-specyficznych wybrano około 20 hybrydom z różnymi receptorami, które odpowiadały aktywacją w momencie ekspozycji na lizat z prostaty prezentowany dla hybrydom przez komórki dendrytyczne i zsekwencjonowano ich TCR CDR3. 8 z tych TCR znajdowały się na liście sekwencji wytypowanych jako potencjalnie

reaktywne. Podjęto również próbę zidentyfikowania specyficznych peptydów, które mogłyby być odpowiedzialne bezpośrednio za aktywację komórek $CD4^+Foxp3^-$ w prostatie używając około 50 peptydów pochodzących z siedmiu różnych białek potencjalnie prostatowo-specyficznych, lecz niestety żaden z wybranych peptydów nie powodował znaczącego wzrostu ekspresji Nur77GFP na skutek stymulacji receptora TCR. Jest to więc wciąż otwarty projekt, ponieważ głównym celem byłaby identyfikacja specyficznych peptydów odpowiedzialnych za autoagresję w myszy Aire^{ko}.

Fuzje komórek pochodzących z wątroby doprowadziły do przetestowania około 400 hybridom o fenotypie $CD4^+V\alpha 2^+$, w warunkach porównywalnych do testu stosowanego dla hybridom wygenerowanych z komórek wyizolowanych z prostaty. W odróżnieniu od hybridom prostatowych, w wątrobie zauważono dużo więcej komórek, w których następował wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek kontaktu z komórkami dendrytycznymi bez obecności lizatu białkowego (około 17%), natomiast zaledwie 1% hybridom wykazywał odpowiedź na peptydy białkowe pochodzące z lizatu z wątroby. Po zaimmunizowaniu myszy lizatem z wątroby z dodatkiem CFA, nie nastąpił wzrost ilości hybridom odpowiadających na lizat z wątroby (jak w przypadku prostaty), a wzrost ilości komórek odpowiadających na stymulację DCs. Po zsekwencjonowaniu TCR hybridom odpowiadających specyficznie na prezentowane antygeny wątrobowe, otrzymano 3 różne sekwencje, z których dwie zawierały się w wytypowanej grupie sekwencji potencjalnie zaktywowanych, tkankowo – specyficznych.



Rysunek 4.34 Analiza aktywacji hybrydom wątrobowych z myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}TCR^{mini} pod wpływem stymulacji lizatem z wątroby.

A) Wykres słupkowy przedstawiający porównanie ekspresji Nur77GFP w hybrydomach na skutek stymulacji komórkami dendrytycznymi (autoreaktywne) lub lizatem z wątroby (organo-specyficzne). B) Dwuwymiarowy wykres kropkowy przedstawiający przykładową hybrydomę pochodzącą z komórek wysortowanych z wątroby o fenotypie DC4⁺Vα2⁺. C) Histogram przedstawiający przykładową hybrydomę wątrobową, w której nie nastąpił wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek stymulacji. D) Histogram przedstawiający przykładową hybrydomę wątrobową, w której nastąpił statystycznie znaczący (co najmniej 10-krotny) wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek stymulacji komórkami dendrytycznymi. E) Histogram przedstawiający przykładową hybrydomę wątrobową, w której nastąpił statystycznie znaczący (co najmniej 2-krotny) wzrost ekspresji Nur77GFP na skutek prezentacji białek wątrobowych przez komórki dendrytyczne.

5. Dyskusja

Autoimmunologiczny zespół niedoczynności wielogruczołowej typu 1 (APS1, APECED) jest autosomalnym recesywnym zespołem dolegliwości wywołanym przez mutacje na chromosomie 21 ludzkiego genu *AIRE*, który ekspresjonowany jest głównie w grasicy, a jego białkowy produkt (AIRE) jest niezbędnym elementem tolerancji immunologicznej [81]. APECED jest rzadką, objawiającą się już w dzieciństwie, zagrażającą życiu chorobą auto-immunologiczną atakującą wiele organów i występującą w zwiększonym natężeniu głównie w genetycznie izolowanych populacjach (np. populacja Fińska, Sardyńska, Irańskich Żydów) [82, 83]. Głównymi objawami klinicznymi wynikającymi z tej mutacji są: niedoczynność przytarczyc, niedoczynność tarczycy, niewydolność kory nadnerczy, cukrzyca insulinozależna (IDDM, ang. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus), niewydolność gonad, niedokrwistość złośliwa, zapalenie wątroby czy chroniczna kandydoza śluzówkowo-skórna (CMC, ang. Chronic mucocutaneous candidiasis) [33]. Pod względem immunologicznym syndrom APS1 charakteryzuje obecność przeciwciał organo-specyficznych, skierowanych do zróżnicowanych antygenów. Ponadto chroniczna kandydoza może wskazywać na defekt w procesie odpowiedzi limfocytów T na obecność patogenów.

Obecnie pacjenci z APECED w trakcie leczenia poddawani są mieszanym terapiom dostosowanym do ich potrzeb i symptomów. CMC jest jednym z najczęściej występujących objawów i jego leczenie wymaga codziennych dawek leków doustnych (przeciwgrzybicze: flukonazol, ketokonazol, amfoterycyna B) i dokładnego monitorowania w celu uniknięcia rozprzestrzenienia się infekcji, co może skutkować rozwojem nowotworu kolczystokomórkowego [84]. Pacjenci mogą również otrzymywać zastępczą terapię hormonalną, w skład której wchodzi hormony tarczycowe, mineralokortykosteroidy, hydrokortyzon i hormony płciowe, w celu uzupełniania ich niedoborów wynikających z niedoczynności przytarczyc, niewydolności kory nadnerczy czy niewydolności gonad [85, 86]. Symptomy powiązane z nadmierną aktywacją autoreaktywnych limfocytów T (zapalenie wątroby, autoimmunologiczna enteropatia czy śródmiąższowe zapalenie nerek) kontrolowane są poprzez leki immunosupresyjne takie jak [87]. Jednak podawanie leków immunosupresyjnych przez dłuższy czas może mieć bardzo poważne i

nieodwracalne skutki uboczne, np. opóźnienie wzrostu i dojrzewania u młodych pacjentów czy podatność na dodatkowe infekcje (w szczególności niebezpieczne dla pacjentów, u których jednym z objawów początkowych choroby jest chronologiczna kandydoza) [88]. W związku z tym wciąż istnieje zapotrzebowanie na badanie i wynalezienie bardziej celowanych terapii, które nie będą miały tak wielu skutków ubocznych. Na chwilę obecną pacjenci z APECED wciąż wykazują podwyższone ryzyko przedwczesnego zgonu [89] a ich leczenie jest bardzo skomplikowane i wymaga współpracy specjalistów z wielu dziedzin.

Aby lepiej zrozumieć patologię APECED u ludzi, a co za tym idzie wspomóc potencjalny rozwój leków wspomagających leczenie pacjentów, wygenerowano kilka różnych modeli myszy z mutacjami w genie *Aire* (rozdział 1.3.1.3). W powyższej pracy zastosowano jeden z pierwszych dostępnych modeli zwierzęcych imitujących mutację w genie *AIRE*, powszechnie występującą w Fińskiej populacji, która jednocześnie jest jedną z najczęściej występujących mutacji wśród pacjentów z APECED [72]. Mutacja ta powoduje zamianę cytozyny na tyminę w pozycji 889, co skutkuje przedwczesnym pojawieniem się kodonu stop i skróceniem eksonu 6 ludzkiego *AIRE* [37]. Aby wygenerować analogiczną mutację w modelu mysim zaprojektowano konstrukt, który poprzez rekombinację homologiczną wprowadzał kasetę neomycynową na początku eksonu 6 (rozdział 1.3.1.3).

Wygenerowany w ten sposób model myszy nie wykazywał różnic anatomicznych (np. rozmiar, waga) w porównaniu do myszy typu dzikiego. Mimo braku wizualnych różnic, 85% dorosłych homozygotycznych i 44% heterozygotycznych osobników nie było zdolnych do wyprodukowania potomstwa. Problemy z płodnością są również jednym z objawów pojawiających się u pacjentów z APECED, wynikającym z zaniku jąder i jajników. 42% myszy z nokautem genu *Aire* wykazywała zanik grasicy, nadnerczy lub jajników, a 50% osobników wykazywało akumulację limfocytów w sekcjach wątrobowych [72], co było analogiczne z zapaleniem wątroby występującym u 13% pacjentów [90].

W przypadku pacjentów ze stwierdzoną mutacją w obrębie genu *AIRE*, którzy rozwinęli objawy choroby (APECED) potwierdzono podwyższony poziom immunoglobulin G w surowicy krwi [91]. Cechą charakterystyczną pacjentów z APECED jest obecność przeciwciał skierowanych do określonych narządów, co używane jest do celów diagnostycznych rozwijającej się choroby autoimmunologicznej. W trakcie 10-cio letnich badań, w czasie których

monitorowano 442 dzieci wykazujących podwyższony poziom przeciwciał IgG, 50% z nich rozwinęło pewien rodzaj choroby autoimmunologicznej [92]. Podwyższony poziom immunoglobulin G u ludzi ze stwierdzoną mutacją w genie *AIRE*, jak również z rozwijającą się w związku z tym chorobą immunologiczną objawiającą się śluzówkowo-skórną kandydozą, powiązany został również z podwyższonymi poziomami przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko cytokinom IL-17A, IL-17F, i/lub IL-22 [91, 93]. Również w niektórych modelach myszy z nokautem genu *Aire* zaobserwowano podwyższony poziom przeciwciał IgG w surowicy [93, 94].

Ramsey i współpracownicy nie zauważyli ilościowej różnicy w poziomie IgG w surowicy badanych myszy z nokautem genu *Aire*, ale 73% osobników zawierała przeciwciała skierowane do co najmniej jednego z czterech testowanych narządów (wątroba, jądra, trzustka i nadnercza), a 40% wykazywało obecność przeciwciał skierowanych przeciw co najmniej dwóm testowanym narządom [72].

W eksperymentach przeprowadzonych w niniejszej rozprawie sprawdzono poziom IgG w populacji myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini} obecnej w danym momencie w hodowli (n=48). Były to osobniki o różnym przekroju wiekowym, poczynając od czterotygodniowych (wkrótce po rozdzieleniu od rodziców) aż do 12 miesięcznych. Badania te potwierdziły wyniki opublikowane w oryginalnej publikacji [72]. Ramsey i współpracownicy testowali myszy w wieku 2-3 miesięcy i w tej grupie wiekowej nie zauważyli ilościowej różnicy pomiędzy myszami eksperymentalnymi a kontrolnymi. W eksperymentach wykonanych w tej rozprawie wykazano, iż większość osobników poniżej 6 miesięcy nie wykazywała ilościowych różnic w stężeniu IgG w surowicy. Z 25% osobników, które wykazywały wzrost stężenia IgG w stosunku do myszy kontrolnych tylko jeden był w wieku trzech miesięcy. Wzrost stężenia IgG wraz z wiekiem myszy świadczyć może o pogłębiającym się stanie zapalnym w organizmie i w powyższych eksperymentach został użyty jako wskaźnik do wytypowania myszy eksperymentalnych wykazujących objawy choroby autoimmunologicznej.

Nasze badania skupiły się na limfocytach CD4⁺, ponieważ postulowano ze antygeny, których ekspresja w grasicy jest regulowana przez *Aire* kierują rozwojem komórek CD4⁺ regulatorowych, które rozpoznaj te antygeny [35, 36] oraz ponieważ autoagresja w tym modelu jak i u ludzi myszach jest wywołana niekontrolowaną aktywacją komórek CD4⁺ [95, 96].

W wielu chorobach autoimmunologicznych czynniki inicjujące przełamanie tolerancji i indukcję patologicznej reakcji organizmu nie są do końca zdefiniowane. W patogenezie osobników z mutacją w *Aire* manifestacje autoimmunologiczne są amplifikowane przez prozapalne cytokiny. Badania dotyczące chorób autoimmunologicznych u ludzi przeprowadzone na modelach mysich ujawniły schemat działania cytokin prozapalnych, które wpływają na inicjację i postęp reakcji zapalnej organizmu, jak również cytokin przeciwzapalnych, które mają na celu wyciszenie stanu zapalnego. W powyższej pracy osobniki, które wykazywały podwyższony poziom immunoglobulin G zostały poddane testowi mającemu na celu zbadanie poziomu wybranych cytokin pro- i przeciw- zapalnych powiązanych z pomocniczymi komórkami T (IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-13).

Zaobserwowana jednoczesna produkcja IFN- γ , TNF- α oraz IL-2 w badanych myszach *Aire*^{ko}TCR^{mini} (Rys. 4.2) wskazuje na różnicowanie komórek CD4⁺ w kierunku linii Th1, natomiast CD8⁺, w kierunku Tc1, które wykazują właściwości prozapalne i są głównym typem limfocytów T indukujących ogólnoustrojowe lub narządowo-specyficzne stany zapalne lub autoagresję, mogące prowadzić do uszkodzenia organu/organów (np. zapalenie jelita, cukrzyca typu 1). Jednocześnie, podwyższony poziom IL-6 i TNF- α wskazuje na ogólnoustrojowy stan zapalny. U myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini} wykryto też IL-5 i IL-22. Obie te cytokiny wykazują właściwości przeciwzapalne (IL-5 produkowana jest przez komórki Th2, natomiast za produkcję IL-22 odpowiadają komórki Th17, Th22 oraz ILC3 (z ang. Innate Lymphoid Cells type 3)). IL-5 wzmacnia produkcję IgA, a IL-22 uczestniczy w szlaku IL-36 w procesach naprawczych w zapaleniu jelita. Podwyższony poziom IL-17A (oraz IL-17F w przypadku jednej myszy), może wskazywać na reakcję obronną organizmu, mającą na celu ochronę przed prozapalnymi komórkami Th1/Tc1. Dodatkowo, IL-6 w obecności TGF- β , indukuje komórki Th17 produkujące IL-17A/F. IL-9 także wykazuje właściwości przeciwzapalne, ale była ona produkowana przez nieznaczny odsetek myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini}. Brak indukcji IL-10, głównej cytokiny o właściwościach przeciwzapalnych sugeruje, że komórki Treg (główne źródło tej cytokiny) w myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini} nie są w pełni funkcjonalne, oraz że brak jest różnicowania komórek CD4⁺ w kierunku linii Tr1.

Wpływ czynnika transkrypcyjnego *Aire* na negatywną selekcję jest dobrze zbadany i udowodniony [34, 97], ale jego wpływ na pozytywną selekcję limfocytów T regulatorowych jest kontrowersyjny. Ekspresja tkankowo- specyficznych antygenów w komórkach mTEC promuje

rozwój tkankowo-specyficznych Tregów w grasicy [17, 18, 98]. Według niektórych publikacji, szczególnie na wczesnym etapie rozwoju (do dnia 10-tego) widoczny jest spadek w ilości Tregów [17], natomiast obniżony poziom grasiczych Tregów w późniejszym wieku jest przez różne grupy kwestionowany [17, 35, 98].

W naszym modelu myszy $Aire^{ko}$ nie zaobserwowano znaczącej różnicy pomiędzy grasiczymi Tregami z czterotygodniowych myszy kontrolnych i $Aire^{ko}TCR^{mini}$. Ilość Tregów w myszach starych (około 10-cio miesięcznych) nie została zbadana, ze względu na involucję grasicy w wieku starczym. Zaobserwowana ilość Tregów w myszach czterotygodniowych jest zgodna z wcześniejszą publikacją [17]. Różnica występuje jednak w odsetku komórek $CD4^+CD8^-Foxp3^+$, gdzie w powyższej publikacji czterotygodniowe myszy z nokautem genu *Aire* posiadają mniejszą proporcję grasiczych Tregów, a w naszej analizie (Rys. 4.3) ta liczba jest większa. Rozbieżność wyników może być związana z różnymi modelami myszy stosowanymi w obu testach.

W poprzednich publikacjach charakteryzujących myszy TCR^{mini} przedstawiono stroniczość w selekcji tymocytów $CD4^+$, wynikającą ze specyficzności pierwotnego TCR do kompleksu peptyd-MHCII. Dlatego proporcja tymocytów $CD4^+$ w tym modelu jest wyższa niż w myszy typu dzikiego. Jak widać jednak w naszym modelu występuje znacząca różnica w ilości limfocytów $CD4^+$ między myszami $Aire^{wt}$ i $Aire^{ko}$, co wskazuje na problem zaburzenia w rozwoju grasiczym. Zmniejszona liczba komórek $CD4^+$ w grasicy młodych myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ może być wytłumaczona poprzez opóźnioną emigrację dojrzewających limfocytów, która może wynikać z obniżonej ekspresji CCR4 i CCR7 [99], lub też z blokady ostatniego etapu dojrzewania grasiczych limfocytów pojedynczo pozytywnych [100]. Rozbieżność wyników dotyczących grasiczych Tregów z powyższej pracy z oryginalną publikacją tego modelu myszy $Aire^{ko}$, może być związana z różnym wiekiem myszy zastosowanych do analizy [72]. Największe różnice pomiędzy limfocytami grasiczymi występowały w młodych osobnikach (jeszcze młodszych, niż użyte w niniejszej rozprawie), i były niwelowane wraz z wiekiem [17], a jak wspomniano powyżej, analiza grasic w publikacji opisującej oryginalny model myszy opierał się o osobniki 2-3 miesięczne.

Znacząca różnica w ilości komórek $CD4^+CD8^-$ w myszach czterotygodniowych (Rys. 4.8-4.13) przekładała się na wszystkie testowane dodatkowo narządy i węzły chłonne, co jest kolejnym punktem wskazującym na prawdopodobną opóźnioną emigrację dojrzewających limfocytów

powodującą tymczasową limfopenię w myszach z nokautem genu *Aire*, jak zostało też pokazane w innych badaniach [99].

Analiza cytometryczna węzłów chłonnych nie wykazała znaczących różnic między poszczególnymi węzłami w myszach TCR^{mini} oraz Aire^{ko}TCR^{mini} (Rys. 4.8-4.19). W obu rodzajach myszy, procent i liczba limfocytów CD4⁺ zmniejszała się z wiekiem, ale populacja limfocytów regulatorowych ulegała zwiększeniu. Zmniejszenie ilości całkowitej populacji CD4⁺ wynika jest z procesu inwolucji grasicy związanej z wiekiem, natomiast zwiększenie ilości Tregów jest odpowiedzią na zwiększone zapotrzebowanie na zapobieganie procesom zapalnym i zwiększonej podatności na infekcje wraz ze starzeniem się organizmu. Znany jest także fenomen zmniejszenia właściwości supresorowych limfocytów CD4⁺Foxp3⁺ u starszych osobników, zarówno u myszy, jak i u ludzi [101]. Dodatkowo, w przypadku chorób autoagresywnych, dodatkowo nasila się niedobór funkcjonalnych Tregów [27]. Nasze badania potwierdzają te doniesienia - ilość tych limfocytów zwiększa się dramatycznie w przypadku myszy Aire^{ko}TCR^{mini} we wszystkich analizowanych węzłach chłonnych (Rys. 4.8-4.19). Zwiększona ekspresja markerów aktywacji Nur77 i CD44 oraz markera proliferacji CD71 dowodzi obserwowaną zwiększoną akumulację Tregów w starszych osobnikach (Rys. 4.14-4.26). Rozwój choroby u starszych myszy jest natomiast wynikiem upośledzenia funkcji regulatorowych Tregów. Wyniki badań pokazane na Rys. 4.13 dowodzą jednoznacznie na zwiększenie liczby i frekwencji Tregów naciekających wątrobę w starszej myszy Aire^{ko}TCR^{mini} w porównaniu do TCR^{mini}. Rozwój procesu zapalnego w tym organie pokazano na podstawie zwiększonej ekspresji PD1 (Rys. 4.27), który jest zarówno markerem aktywacji limfocytów T (co dodatkowo udowodniono korelacją ze zwiększoną ekspresją CD44), ale też markerem „wyciężenia” tych komórek [102]. Ekspresja PD1 inicjuje szlak sygnałowy apoptozy poprzez ligację z PDL1, ale też funkcjonalnej inaktywacji limfocytów T (anergii). Tregi są z natury anergiczne, jednak ich aktywacja w obecności IL-2 powoduje przełamanie stanu anergii. Zwiększona ekspresja PD1 może natomiast przywrócić (przynajmniej częściowo) stan anergii w tychże Tregach. Następuje więc proces aktywacji Tregów, przełamanie stanu anergii i zwiększenie ich proliferacji w odpowiedzi na zwiększoną aktywację limfocytów T nieregulatorowych, naturalny proces obronny organizmu, co tłumaczy zwiększenie ilości tych komórek z wiekiem myszy. Tym procesom nie towarzyszy jednak zwiększenie funkcji supresorowych Tregów. Badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie dowodzą proces odwrotny-zmniejszenie potencjału regulatorowego limfocytów CD4⁺Foxp3⁺ u

starszych myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$. Pokazano to na podstawie dramatycznie zmniejszonej ekspresji markera CD73 (Rys. 4.29), który jest ektonukleazą indukującą proces rozpadu AMP do adenozyiny, która moduluje metabolizm komórek będących celem supresji Tregów. Zmniejszona ekspresja CD73 nie pozwala więc w pełni hamować aktywacji i proliferacji komórek efektorowych przez Tregi. Dodatkowo, niniejsze badania pokazały upośledzenie produkcji IL-10 (Rys. 4.2), głównej cytokiny o właściwościach immunomodulujących. IL-10 jest produkowana głównie przez Tregi, w mniejszej ilości przez komórki $CD4^{+}$ zwane Tr1, a także przez pewne subpopulacje komórek mieloidalnych (np. makrofagi). Upośledzona funkcja genu *Aire* doprowadziło do indukcji cytokin prozapalnych (np. $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-6; Rys. 4.2), wydzielanych głównie przez komórki efektorowe $CD4^{+}$ i $CD8^{+}$

Podsumowując, mimo zwiększenia ilości Tregów we wszystkich badanych obwodowych tkankach limfatycznych myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$, ich funkcja supresorowa ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem, co prowadzi do niekontrolowanego procesu zapalnego prowadzonego przez efektorowe limfocyty T. Niniejsze badania prowadzą do wniosku, że mysz $Aire^{ko}TCR^{mini}$ jest doskonałym modelem autoimmunologicznego zapalenia wątroby (z ang. autoimmune hepatitis, AIH). AIH indukowany jest w tych myszach w sposób niemanipulowany, naturalnie, wraz z wiekiem, jak u ludzi. Dodatkowym atutem naszego modelu jest możliwość odkrycia, które receptory antygenowe TCR są odpowiedzialne za rozwój choroby, jak i pozwala zbadać zmiany w repertuarze TCR limfocytów $CD4^{+}Foxp3^{-}$ i $Foxp3^{+}$ wraz z rozwojem AIH. Dodatkowo, skrzyżowanie myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ z myszą $CNS1^{ko}$, która nie pozwala na indukcję pTregów, pozwoli na zbadanie zaangażowania tTregów i pTregów w postępującą chorobę autoimmunologiczną AIH.

W toku badań zaobserwowano zmniejszoną ilość Tregów w jelicie grubym oraz prostatie u starszych myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$ (Rys. 4.12-4.13). Jelito jest miejscem narażonym na dużą ilość antygenów pochodzących z pożywienia, a także mikrobów zasiedlających to środowisko. Naturalna tolerancja pokarmowa i mikrobiologiczna jest zapewniana głównie dzięki obecności zwiększonej ilości Tregów w jelicie, głównie jego końcowym odcinku. Prostata jest natomiast organem „uprzywilejowanym”, który nie ulega naciekaniu komórek odpornościowych jak w inne organy. Zmniejszenie ilości Tregów w obu tych organach u starszych myszy jest trudne do wyjaśnienia na tym etapie i wymaga to dalszych badań. Można pokusić się o tezę, że zmniejszona

plodność myszy *Aire*^{ko} jest wynikiem zwiększonego procesu zapalnego w organach rozrodczych, co zostało pokazane [72]. Niniejsze badania pomagają utwierdzić tę tezę przez pokazanie, że prawdopodobnie przyczyną tego procesu jest zmniejszona ilość prostatowych Tregów. Nie jest natomiast jasne, dlaczego ilość komórek CD4⁺Foxp3⁺ jest mniejsza w starszych myszach *Aire*^{ko}. Może to mieć związek ze zmniejszoną prezentacją własnych antygenów gospodarza dzięki nieobecności produktów AIRE w związku z jego nokautem, ale też prezentacja antygenów mikrobiologicznych w grasicy może być zaburzona. Ostatnie doniesienia dowodzą, że antygeny bakteryjne (a także prawdopodobnie inne antygeny mikrobów, np. grzybów) są prezentowane dojrzewającym tymocytom [103]. Podobieństwo fenotypu i ilości Tregów w węzłach chłonnych może być wynikiem translokacji Tregów jelitowych do węzłów obwodowych (Rys. 4.12). Dokładna przyczyna obserwowanych przez nas niedoborów jelitowych Tregów u myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini} wymaga jednak dalszych badań. Planowane jest w tym celu użycie myszy CNS1^{ko}*Aire*^{ko}TCR^{mini} (jak napisano powyżej w przypadku AIH), co pozwoli zbadać zmiany w ilości jelitowych pTregów i tTregów wraz z wiekiem w myszy z nokautem *Aire*. Opublikowane badania dowodzą, że *Aire* steruje tolerancją immunologiczną poprzez delecję klonalną komórek autoreaktywnych [104, 105]. Twierdzenie to opiera się głównie o dane pokazujące, że *Aire* jest niezbędny do procesu delecji w grasicy komórek reaktywnych do modelowego antygeny pod promotorem szczurzej insuliny w modelu mysim z transgenicznym TCR [34, 95, 97]. W późniejszym okresie zaobserwowano również, że *Aire* jest niezbędny do delecji limfocytów T reaktywnych w stosunku do naturalnego autoantygeny w myszach z transgenicznym TCR [106].

Aire może również wpływać na tolerancję poprzez sterowanie rozwojem grasiczych limfocytów T regulatorowych. Tregi pochodzące od pacjentów z APS-1, wykazują obniżoną aktywność hamującą, jak również obniżoną ekspresję FOXP3 [89, 107]. W modelach mysich pokazano, iż ektopowa ekspresja modelowego antygeny w komórkach wykazujących ekspresję *Aire* promuje rozwój Tregów z transgenicznym receptorem TCR specyficznych do tego antygeny [18]. W niektórych modelach myszy z nokautem *Aire* zauważono również obniżenie ilości grasiczych Tregów w młodych osobnikach [33], a w przypadku niniejszej pracy, obniżenie ilości komórek CD4⁺.

Wpływ genu *Aire* na selekcję negatywną jak i pozytywną był również zbadany poprzez sekwencjonowanie TCR, które umożliwia „śledzenie” pochodzenia grasiczych klonów TCR w

różnych narządach, zwłaszcza w myszach z transgenicznym receptorem TCR. Poprzednia publikacja z naszego laboratorium [108] zrobiona w oparciu o sekwencjonowanie limfocytów T w modelu $Aire^{ko}TCR^{mini}$ skupiała się na analizie dystrybucji receptorów TCR grasiczych, z węzłów chłonnych, płuc i ślinianek. Dane do tego artykułu były zgromadzone z zastosowaniem sekwencjonowania TCRs z pojedynczo sortowanych komórek. Pomimo limitowanej ilości sekwencji otrzymanych w sekwencjonowaniu tą metodą, ogólne wnioski wysunięte w tej publikacji pokrywają się z obserwacjami uzyskanymi poprzez sekwencjonowanie wysokoprzepustowe zastosowane w niniejszej rozprawie (Rys. 4.4 – 4.6). Asymetryczna dystrybucja TCR w grasiczych populacjach $CD4^{+}Foxp3^{-}$ and $CD4^{+}Foxp3^{+}$ nie została zaburzona poprzez nieobecność TSA kontrolowanych przez *Aire*, a dominujące receptory występujące w obu myszach nie były zależne od *Aire*, ponieważ ich dystrybucja nie została zmieniona pod jego nieobecność (Rys. 4.4 – 4.6). Większe podobieństwo pomiędzy myszą TCR^{mini} i $Aire^{ko}TCR^{mini}$ wykazywały populacje $CD4^{+}Foxp3^{-}$ niż $CD4^{+}Foxp3^{+}$, a receptory które potencjalnie mogły być zależne od *Aire* (nieobecne w Tregach w myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$, a obecne w myszy kontrolnej) stanowiły nieznaczną część bazy danych, co świadczy o tym, że były to raczej klony rzadkie (Rys. 4.5B i C).

Do analizy repertuaru TCR komórek $CD4^{+}$ pochodzących z narządów nielimfatycznych wykorzystano jelito grube, prostatę i wątrobę. Bazując na analizie fenotypowej pochodzącej z analizy cytometrycznej, (Rys. 4.19) oraz z analizy histologicznej (Rys. 4.30), stwierdzono, iż organem najbardziej dotkniętym w użytym modelu myszy była wątroba. Potwierdziło to wcześniejsze doniesienia, że myszy $Aire^{ko}$ mogą być używane jako model zwierzęcy autoimmunologicznego zapalenia wątroby (AIH, ang. autoimmune hepatitis) [109] dobrze odzwierciedlający AIH występujący u pacjentów cierpiących na APECED. Ze względu na zaobserwowane problemy z płodnością w kolonii myszy $Aire^{ko}TCR^{mini}$, również prostata mogła być organem docelowym do autoagresji, tym bardziej, iż w myszach z nokautem genu *Aire* często można zaobserwować objawy zapalenia prostaty, analogicznie jak wśród pacjentów z APECED [110, 111]. W analizie komórek pochodzących z jelita cienkiego dodatkowym interesującym aspektem byłoby przeanalizowanie rzeczywistego wpływu *Aire* na repertuar limfocytów T występujący w grasicy niezależnie od obecności bakterii, czyli w myszach gnotobiotycznych, które są w trakcie krzyżowania w myszarni Uniwersytetu stanowego Georgii.

Dotychczasowe badania ograniczyły się do analizy repertuaru limfocytów T w myszy z nokautem genu *Aire* pochodzących ze zmieszanych węzłów limfatycznych i śledziony oraz dodatkowo z prostaty [35]. Założenia analizy receptorów w narządach nielimfatycznych w tej publikacji były jednak odmienne od naszych. W analizie sekwencji TCR Malachow i wsp. [35] założyli, iż w myszy z nokautem genu *Aire*, receptory w populacji Foxp3^- mogą również występować w tej samej populacji w myszy dzikiej, ale te które są zależne od *Aire* występują tam w znacznie większej częstotliwości. Również w naszym laboratorium zostało pokazane, iż pula receptorów, które w zdrowej myszy potencjalnie mogą być autoreaktywne, jeżeli wydostaną się spod kontroli Tregów (równoznaczne z wnioskiem, iż delecja tych klonów w trakcie selekcji grasiczej nie jest absolutna, [97]), jest znacznie większa, niż do tej pory twierdzono [20]. Jednak, jeżeli zakładamy, iż receptory są specyficzne do danego antygeny (a tym bardziej te, które powstały jako zależne od *Aire*) teoretycznie w grasicy w populacji regulatorowej w myszy z nokautem genu *Aire* nie powinny się pojawić. Poza grasicą receptory te mogą się pojawić jako pTregi, niezależne w rozwoju od *Aire*. Również porównywanie receptorów pochodzących z prostaty (populacja $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$) do Tregów pochodzących z węzłów chłonnych i śledziony może nie być najbardziej właściwym porównaniem, dlatego nasza analiza skupiła się najpierw na wytypowaniu klonów potencjalnie tkankowo-specyficznych w populacji $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$, a następnie odniesieniu ich do wyjściowej puli receptorów limfocytów regulatorowych, czyli grasicy myszy $\text{Aire}^{\text{ko}}\text{TCR}^{\text{mini}}$, i TCR^{mini} . W ten sposób wytypowano z populacji $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ w każdym z testowanych organów receptory z populacji potencjalnie tkankowo-specyficznej, a następnie te z nich, które mogą być zależne od *Aire*, czyli obecne w populacji regulatorowej ($\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$) w grasicy myszy TCR^{mini} a nieobecne w grasiczych Tregach w myszy $\text{Aire}^{\text{ko}}\text{TCR}^{\text{mini}}$.

Hybrydomy pochodzące z prostaty odpowiadały znacznie słabiej na peptydy pochodzące z prostatowego lizatu białkowego i niestety nie udało nam się wytypować specyficznych białek i peptydów, które były za tą reakcję odpowiedzialne. Pomimo zastosowaniu peptydów pochodzących z białek, które znane są jako autoantygeny prostaty, jak np. transglutaminaza 4 (TGM4) [112] czy SVS2 (ang. seminal vesicle secretory protein 2) [110] odpowiedź na stymulację pozostała nadal w niskim zakresie. Prawdopodobna różnica w odpowiedzi na stymulację wyżej wymienionymi antygenami pomiędzy naszym modelem myszy, a modelem zastosowanym w powyższych publikacjach [110, 112] jest fakt różnic genetycznych i fenotypowych wynikających z innego typu mutacji w genie *Aire*.

Hybrydomy pochodzące z wątroby przede wszystkim odpowiadały bardzo silnie na stymulację komórkami dendrytycznymi, bez zastosowania lizatu białkowego jako antygeny. Około 17% wszystkich hybrydom wykazywało znaczący wzrost średniej fluorescencji czynnika transkrypcyjnego Nur77GFP, niewiele niższy niż poziom fluorescencji obserwowany podczas stymulacji hybrydom poprzez przeciwciało anti-CD3. Jest to znaczące odkrycie, gdyż proces selekcji grasiczej powinien usunąć autoreaktywne limfocyty CD4⁺, a nokaut genu *Aire* powinien skutkować pojawieniem się komórek reaktywnych w stosunku do antygenów tkankowo-specyficznych. Jednak jak wspomniano już wyżej, nasze ostatnie doniesienia [20] pokazują, iż selekcja w grasicy jest procesem niedoskonałym i przy braku Tregów, wiele efektorowych limfocytów CD4⁺Foxp3⁻ odpowiada na własne antygeny gospodarza (około 37% hybrydom pochodzących z myszy Scurfy, w której panuje ogólnoustrojowy stan zapalny odpowiada w silny sposób na obecność komórek dendrytycznych). W niniejszej rozprawie, myszy *Aire*^{ko}TCR^{mini} posiadają natomiast Tregi mające upośledzoną funkcję supresorową (jak napisano powyżej), a mimo to, kontroli nie ulegają limfocyty efektorowe naciekające wątrobę, ale nie inne narządy w tej samej myszy (np. węzłów chłonnych). Ten fenomen wymaga dalszych badań, pokazuje jednak użyteczność i unikalność naszego modelu mysiego. Hybrydomy nie odpowiadające na własne antygeny gospodarza użyto do testowania peptydów pochodzących z wątroby i w ten sposób zaleziono dwie hybrydomy o różnych sekwencjach, które odpowiadały specyficznie na prezentację przez DCs lizatu białkowego z wątroby. Podjęliśmy próbę identyfikacji specyficznych antygenów, których prezentacja mogłaby inicjować tak silną odpowiedź poprzez stymulację zsyntezowanymi peptydami pochodzącymi ze znanych antygenów wątrobowych jakimi są CYP2D6, FTCD (które są celem przeciwciał anti-LKM1 w AIH typu 1), oraz SEPSECS (który jest celem przeciwciał anti-LC1 w AIH typu 2 [113]). Niestety żaden z zaprojektowanych przez nas peptydów, jak i żaden opublikowany autoantygen [114] nie spowodował silnej odpowiedzi hybrydom podczas prezentacji przez DCs, jednak była to biblioteka zawierająca zaledwie 20 peptydów, niezbędne więc będzie przetestowanie znacznie większej biblioteki w celu wytypowania potencjalnych antygenów specyficznych do naszego modelu. Dodatkowo, będziemy szukać autoantygenów używając bibliotek ekspresyjnych pochodzących z wątroby, metody, która posłużyła nam do identyfikacji bakteryjnych peptydów indukujących Tregi [80]. Doniesienia z literatury opisują jednak, iż AIH występujący w myszach *Aire*^{ko} może być skutkiem na reakcję autoimmunologiczną skierowaną przeciwko wielu antygenom, które nie zawsze występują tylko

w wątrobie, ale charakteryzują się tam większą częstotliwością [109]. Dane z odpowiedzi hybrydom są więc zgodne z powyższymi doniesieniami, jednak jako cele potencjalnych terapii należałoby takie antygeny wyeliminować (czyli wcześniej zidentyfikować), aby nie wpływać na cały organizm tylko użyć terapii celowanej.

Podsumowując, założeniem niniejszej pracy było zbadanie wpływu prezentacji zależnych od Aire antygenów tkankowo-swoistych na rozwój, różnorodność i auto-reaktywność limfocytów T regulatorowych w grasicy i narządach obwodowych, jak również identyfikacja klonów odpowiedzialnych za uszkodzenia organów w mysim modelu autoimmunologicznego zespołu niedoczynności wielogruzołowej typu 1. W badaniach wykorzystano mysz Aire^{ko}, którą skrzyżowano z myszą reporterową Foxp3^{hCD2} Nur77GFP, aby móc badać limfocyty regulatorowe CD4⁺Foxp3⁺ (ekspresja reportera hCD2) oraz aktywację TCR limfocytów pomocniczych (ekspresja GFP). Jednocześnie, mysz tę skrzyżowano z myszą TCR^{mini}, co umożliwiło analizę sekwencji zmiennych TCR. W toku badań wykazano, że główne zmiany autoagresyjne związane z brakiem ekspresji Aire ujawniają się w postaci autoimmunologicznego zapalenia wątroby u starszych osobników. Choroba ta wynikała w głównej mierze z upośledzonej funkcji Tregów, a nie ze zmniejszonej ich liczby w tym organie. Analiza sekwencji TCR pochodzących z grasicy wykazała, iż brak ekspresji antygenów tkankowo-specyficznych w trakcie rozwoju grasiczego limfocytów T nie wpływa na wzajemną dystrybucję klonów dominujących zarówno w populacji CD4⁺Foxp3⁻ jak i CD4⁺Foxp3⁺ z myszy Aire^{ko}TCT^{mini} i TCR^{mini}, a klony potencjalnie autoreaktywne wymykające się w trakcie selekcji stanowią raczej niewielki odsetek repertuaru grasiczego. Natomiast analiza repertuaru populacji CD4⁺Foxp3⁻ pochodzących z narządów nielimfatycznych pozwoliła na wytypowanie zaktywowanych klonów potencjalnie tkankowo-specyficznych. Odpowiedzi hybrydom uzyskanych z limfocytów CD4⁺ wyizolowanych z wątroby, pokazały, iż w wątrobie występuje duży odsetek komórek autoreaktywnych, a znacznie mniejszy komórek odpowiadających na TSA. Dane zaprezentowane w niniejszej pracy są opracowywane w formie manuskryptu i będą zaprezentowane w formie publikacji. Uzyskane wyniki są podstawą do dalszych badań, które pozwolą ustalić antygeny odpowiedzialne za patologiczną odpowiedź limfocytów CD4⁺ skierowanych do białek wątrobowych, a także osłabioną funkcję Tregów zasiedlających ten organ. Kolejnym etapem projektu będzie również analiza wpływu flory bakteryjnej oraz pTregów na objawy choroby immunologicznej zarówno w wątrobie jak i jelicie

grubym, w celu określenia jak duży wpływ ma ona na patologiczny obraz wyżej wspomnianych narządów.

6. Literatura

1. Besnard, M., et al., *AIRE deficiency, from preclinical models to human APECED disease*. Dis Model Mech, 2021. **14**(2).
2. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
3. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S73-80.
4. Crome, S.Q. and P.S. Ohashi, *Immunoregulatory functions of innate lymphoid cells*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 121.
5. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
6. Yang, Q., J. Jeremiah Bell, and A. Bhandoola, *T-cell lineage determination*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 12-22.
7. González-García, S., et al., *Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **360**: p. 47-73.
8. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui, *Launching the T-cell-lineage developmental programme*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 9-21.
9. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
10. Wucherpfennig, K.W., et al., *Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(4): p. a005140.
11. Abbey, J.L. and H.C. O'Neill, *Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(2): p. 166-74.
12. Anderson, G. and Y. Takahama, *Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection*. Trends Immunol, 2012. **33**(6): p. 256-63.
13. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.

14. Abramson, J. and Y. Goldfarb, *AIRE: From promiscuous molecular partnerships to promiscuous gene expression*. Eur J Immunol, 2016. **46**(1): p. 22-33.
15. Rodewald, H.R., *Thymus organogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 355-88.
16. Cowan, J.E., et al., *The thymic medulla is required for Foxp3+ regulatory but not conventional CD4+ thymocyte development*. J Exp Med, 2013. **210**(4): p. 675-81.
17. Yang, S., et al., *Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance*. Science, 2015. **348**(6234): p. 589-94.
18. Aschenbrenner, K., et al., *Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 351-8.
19. Gotter, J. and B. Kyewski, *Regulating self-tolerance by deregulating gene expression*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 741-5.
20. Cebula, A., et al., *Dormant pathogenic CD4(+) T cells are prevalent in the peripheral repertoire of healthy mice*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4882.
21. Sakaguchi, S., et al., *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. **155**(3): p. 1151-64.
22. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.
23. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
24. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
25. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.
26. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.

27. Kuczma, M., et al., *Altered connexin 43 expression underlies age-dependent decrease of regulatory T cell suppressor function in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5261-71.
28. Polansky, J.K., et al., *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1654-63.
29. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 808-12.
30. Aaltonen, J., et al., *An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 83-7.
31. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
32. Anderson, M.S. and M.A. Su, *Aire and T cell development*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(2): p. 198-206.
33. Anderson, M.S., et al., *The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 227-39.
34. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 350-4.
35. Malchow, S., et al., *Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells*. Science, 2013. **339**(6124): p. 1219-24.
36. Perry, J.S.A., et al., *Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus*. Immunity, 2014. **41**(3): p. 414-426.
37. Björnses, P., et al., *Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(10): p. 1547-53.
38. Perniola, R. and G. Musco, *The biophysical and biochemical properties of the autoimmune regulator (AIRE) protein*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(2): p. 326-37.
39. Pitkänen, J., et al., *Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19597-602.
40. Ferguson, B.J., et al., *AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1723-1731.

41. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp, *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 155-6.
42. Ilmarinen, T., et al., *The monopartite nuclear localization signal of autoimmune regulator mediates its nuclear import and interaction with multiple importin alpha molecules*. Febs j, 2006. **273**(2): p. 315-24.
43. Carles, C.C. and J.C. Fletcher, *Missing links between histones and RNA Pol II arising from SAND?* Epigenetics, 2010. **5**(5): p. 381-5.
44. Saltis, M., et al., *Evolutionarily conserved and divergent regions of the autoimmune regulator (Aire) gene: a comparative analysis*. Immunogenetics, 2008. **60**(2): p. 105-14.
45. Aasland, R., T.J. Gibson, and A.F. Stewart, *The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(2): p. 56-9.
46. Koh, A.S., et al., *Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 15878-83.
47. Chakravarty, S., L. Zeng, and M.M. Zhou, *Structure and site-specific recognition of histone H3 by the PHD finger of human autoimmune regulator*. Structure, 2009. **17**(5): p. 670-9.
48. Yang, S., et al., *Aire's plant homeodomain(PHD)-2 is critical for induction of immunological tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(5): p. 1833-8.
49. Meloni, A., et al., *Role of PHD fingers and COOH-terminal 30 amino acids in AIRE transactivation activity*. Mol Immunol, 2008. **45**(3): p. 805-9.
50. Purohit, S., et al., *Mapping DNA-binding domains of the autoimmune regulator protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(3): p. 939-44.
51. Ruan, Q.G., et al., *The autoimmune regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7173-80.
52. Ramsey, C., A. Bukrinsky, and L. Peltonen, *Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(26): p. 3299-308.
53. Pitkänen, J., et al., *The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16802-9.

54. Musco, G. and P. Peterson, *PHD finger of autoimmune regulator: an epigenetic link between the histone modifications and tissue-specific antigen expression in thymus*. Epigenetics, 2008. **3**(6): p. 310-4.
55. Liiv, I., et al., *DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(1): p. 74-83.
56. Oven, I., et al., *AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8815-23.
57. Žumer, K., et al., *Unmodified histone H3K4 and DNA-dependent protein kinase recruit autoimmune regulator to target genes*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(8): p. 1354-62.
58. Abramson, J., et al., *Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance*. Cell, 2010. **140**(1): p. 123-35.
59. Pommier, Y., et al., *Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(11): p. 703-721.
60. Bansal, K., et al., *The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers*. Nat Immunol, 2017. **18**(3): p. 263-273.
61. Guha, M., et al., *DNA breaks and chromatin structural changes enhance the transcription of autoimmune regulator target genes*. J Biol Chem, 2017. **292**(16): p. 6542-6554.
62. Rattay, K., et al., *Homeodomain-interacting protein kinase 2, a novel autoimmune regulator interaction partner, modulates promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells*. J Immunol, 2015. **194**(3): p. 921-8.
63. Hubert, F.X., et al., *Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3902-18.
64. Su, M.A., et al., *Mechanisms of an autoimmunity syndrome in mice caused by a dominant mutation in Aire*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1712-26.
65. Kuroda, N., et al., *Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1862-70.
66. Pacholczyk, R., et al., *Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 249-59.

67. Komatsu, N., et al., *Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1903-8.
68. Kappler, J.W., et al., *Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition*. J Exp Med, 1981. **153**(5): p. 1198-214.
69. Kouskoff, V., et al., *A vector driving the expression of foreign cDNAs in the MHC class II-positive cells of transgenic mice*. J Immunol Methods, 1993. **166**(2): p. 287-91.
70. Kraj, P., R. Pacholczyk, and L. Ignatowicz, *Alpha beta TCRs differ in the degree of their specificity for the positively selecting MHC/peptide ligand*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2251-9.
71. Moran, A.E., et al., *T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse*. J Exp Med, 2011. **208**(6): p. 1279-89.
72. Ramsey, C., et al., *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(4): p. 397-409.
73. Kuczma, M.P., et al., *Self and microbiota-derived epitopes induce CD4(+) T cell anergy and conversion into CD4(+)Foxp3(+) regulatory cells*. Mucosal Immunol, 2021. **14**(2): p. 443-454.
74. Au-Yeung, B.B., et al., *A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. E3679-88.
75. Motamedi, M., L. Xu, and S. Elahi, *Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers*. J Immunol Methods, 2016. **437**: p. 43-52.
76. Hsieh, C.S. and A.Y. Rudensky, *The role of TCR specificity in naturally arising CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cell biology*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **293**: p. 25-42.
77. Riley, J.L., *PD-1 signaling in primary T cells*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 114-25.
78. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. Am J Clin Oncol, 2016. **39**(1): p. 98-106.

79. Joolharzadeh, P. and C. St Hilaire, *CD73 (Cluster of Differentiation 73) and the Differences Between Mice and Humans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(3): p. 339-348.
80. Kuczma, M.P., et al., *Commensal epitopes drive differentiation of colonic T(regs)*. *Sci Adv*, 2020. **6**(16): p. eaaz3186.
81. Villasenor, J., C. Benoist, and D. Mathis, *AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease*. *Immunol Rev*, 2005. **204**: p. 156-64.
82. Rosatelli, M.C., et al., *A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients*. *Hum Genet*, 1998. **103**(4): p. 428-34.
83. Zlotogora, J. and M.S. Shapiro, *Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews*. *J Med Genet*, 1992. **29**(11): p. 824-6.
84. Bockle, B.C., et al., *Oral mucous squamous cell carcinoma-an anticipated consequence of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)*. *J Am Acad Dermatol*, 2010. **62**(5): p. 864-8.
85. Napier, C. and S.H. Pearce, *Autoimmune Addison's disease*. *Presse Med*, 2012. **41**(12 P 2): p. e626-35.
86. Yeap, B.B., et al., *Endocrine Society of Australia position statement on male hypogonadism (part 2): treatment and therapeutic considerations*. *Med J Aust*, 2016. **205**(5): p. 228-31.
87. Schramm, C. and A.W. Lohse, *Role of mycophenolate mofetil in the treatment of autoimmune hepatitis*. *J Hepatol*, 2011. **55**(3): p. 510-511.
88. De Leonibus, C., et al., *Influence of inhaled corticosteroids on pubertal growth and final height in asthmatic children*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2016. **27**(5): p. 499-506.
89. Borchers, J., et al., *Patients With APECED Have Increased Early Mortality Due to Endocrine Causes, Malignancies and infections*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020. **105**(6): p. e2207-13.
90. Wang, C.Y., et al., *Cloning of Aire, the mouse homologue of the autoimmune regulator (AIRE) gene responsible for autoimmune polyglandular syndrome type 1 (ASPI)*. *Genomics*, 1999. **55**(3): p. 322-6.
91. Puel, A., et al., *Human autoantibodies underlying infectious diseases*. *J Exp Med*, 2022. **219**(4).

92. Lo, M.S., et al., *Hypergammaglobulinemia in the pediatric population as a marker for underlying autoimmune disease: a retrospective cohort study*. *Pediatric Rheumatology*, 2013. **11**(1): p. 42.
93. Karner, J., et al., *Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **171**(3): p. 263-72.
94. Gavanescu, I., C. Benoist, and D. Mathis, *B cells are required for Aire-deficient mice to develop multi-organ autoinflammation: A therapeutic approach for APECED patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(35): p. 13009-14.
95. DeVoss, J., et al., *Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen*. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2727-35.
96. Devoss, J.J., et al., *Effector mechanisms of the autoimmune syndrome in the murine model of autoimmune polyglandular syndrome type 1*. *J Immunol*, 2008. **181**(6): p. 4072-9.
97. Taniguchi, R.T., et al., *Detection of an autoreactive T-cell population within the polyclonal repertoire that undergoes distinct autoimmune regulator (Aire)-mediated selection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(20): p. 7847-52.
98. Lei, Y., et al., *Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development*. *J Exp Med*, 2011. **208**(2): p. 383-94.
99. Laan, M., et al., *Autoimmune regulator deficiency results in decreased expression of CCR4 and CCR7 ligands and in delayed migration of CD4+ thymocytes*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 7682-91.
100. Li, J., et al., *Developmental pathway of CD4+CD8- medullary thymocytes during mouse ontogeny and its defect in Aire-/- mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(46): p. 18175-80.
101. Palatella, M., et al., *The dark side of Tregs during aging*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 940705.
102. Hong, J.J., et al., *Re-evaluation of PD-1 expression by T cells as a marker for immune exhaustion during SIV infection*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e60186.
103. Zegarra-Ruiz, D.F., et al., *Thymic development of gut-microbiota-specific T cells*. *Nature*, 2021. **594**(7863): p. 413-417.
104. Mathis, D. and C. Benoist, *Aire*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 287-312.

105. Metzger, T.C. and M.S. Anderson, *Control of central and peripheral tolerance by Aire*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 89-103.
106. Zhu, M.L., A. Nagavalli, and M.A. Su, *Aire deficiency promotes TRP-1-specific immune rejection of melanoma*. Cancer Res, 2013. **73**(7): p. 2104-16.
107. Kekäläinen, E., et al., *A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1208-15.
108. Daniely, D., et al., *Diversity of TCRs on natural Foxp3+ T cells in mice lacking Aire expression*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6865-73.
109. Hardtke-Wolenski, M., et al., *Autoimmune hepatitis in a murine autoimmune polyendocrine syndrome type 1 model is directed against multiple autoantigens*. Hepatology, 2015. **61**(4): p. 1295-305.
110. Hou, Y., et al., *An aberrant prostate antigen-specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 2031-41.
111. Motrich, R.D., et al., *Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular autoimmune response to prostate antigens*. Hum Reprod, 2005. **20**(9): p. 2567-72.
112. Landegren, N., et al., *Transglutaminase 4 as a prostate autoantigen in male subfertility*. Sci Transl Med, 2015. **7**(292): p. 292ra101.
113. Terziroli Beretta-Piccoli, B., G. Mieli-Vergani, and D. Vergani, *Autoimmune hepatitis*. Cell Mol Immunol, 2022. **19**(2): p. 158-176.
114. Umeshappa, C.S., et al., *Suppression of a broad spectrum of liver autoimmune pathologies by single peptide-MHC-based nanomedicines*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2150.