

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Emilia Sikora

Badania struktury i funkcji czynnika supresyjnego
swoistego dla nadwrażliwości kontaktowej
wywołanej przez oksazolon (OX-TsF) u myszy

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Krzysztof Bryniarski

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii UJ CM

Kierownik jednostki: prof. zwyczaj. med. Janusz Marcinkiewicz

Kraków, 2012r.

*Panu Dr. hab. Krzysztofowi Bryniarskiemu,
z podziękowaniami
za merytoryczne ukierunkowanie pracy,
czas poświęcony przy jej realizacji
i okazaną życzliwość*

SPIS TREŚCI

Wykaz używanych skrótów	3
1 Streszczenie	4
2 Abstract	5
3 Wstęp	6
3.1 Limfocyty T	8
3.1.1 Mechanizmy działania efektorowych limfocytów T	8
3.1.2 Mechanizmy działania regulatorowych limfocytów T	9
3.1.2.1 Limfocyty T regulacyjne CD4 ⁺	12
3.1.2.1.1 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	12
3.1.2.1.2 CD4 ⁺ Th3	14
3.1.2.1.3 CD4 ⁺ Tr1	15
3.1.2.1.4 CD4 ⁺ Th17	15
3.1.2.2 Limfocyty T regulacyjne CD4 ⁻ CD8 ⁻	16
3.1.2.3 Limfocyty T regulacyjne CD4 ⁺ CD8 ⁺	16
3.1.2.4 Limfocyty T regulacyjne CD8 ⁺	17
3.1.2.4.1 Regulacja poprzez interferencję RNA	17
3.2 Reakcje nadwrażliwości typu późnego (DTH)	21
3.2.1 Nadwrażliwość kontaktowa (CS)	22
3.2.1.1 Regulacja nadwrażliwości kontaktowej	26
3.2.1.1.1 Rola TsF w regulacji nadwrażliwości kontaktowej	27
4 Cel badań	29
5 Materiały i metody	31
5.1 Zwierzęta doświadczalne	31
5.2 Odczynniki	31
5.3 Linie komórkowe i przeciwciała monoklonalne	32
5.4 Podłoża hodowlane	32
5.5 Aparatura	33
5.6 Przygotowanie komórek i białek	33
5.6.1 Izolacja limfocytów węzłów chłonnych i śledzion	33
5.6.2 Znakowanie erytrocytów haptenami (OX i TNP)	34
5.6.3 Znakowanie białek oksazolonem	34
5.7 Produkcja i oczyszczanie OX-TsF	35
5.7.1 Immunizacja dożylna i naskórna	35
5.7.2 Hodowla komórek limfoidalnych i zbiór nadsączy	35
5.7.3 Izolacja egzosomów	36
5.7.4 Esktrakcja fenol-chloroform	36
5.7.5 Chromatografia powinowactwa (kolumny Qiagen)	37

5.7.6 Elektroforetyczny rozdział TsF na żelu agarozowym	38
5.8 Testy nadwrażliwości kontaktowej	39
5.8.1 Aktywne uczulenie haptenem w modelu nadwrażliwości kontaktowej u myszy	39
5.8.2 Adoptywny transfer nadwrażliwości kontaktowej	39
5.8.3 Test supresji nadwrażliwości kontaktowej	40
5.9 Selekcja negatywna komórek	41
5.10 Selekcja pozytywna komórek	41
5.11 Oznaczenia immunofluorescencyjne	42
5.11.1 Hodowla komórek	42
5.11.2 Preparatyka znakowania komórek do oznaczeń w cytofluorymetrze przepływowym	42
5.12 Badania aktywności sekrecyjnej komórek	42
5.12.1 Hodowla komórek	42
5.12.2 Oznaczanie cytokin metodą immunoenzymatyczną	43
5.13 Ocena aktywności OX-TsF <i>in vitro</i>	44
5.14 Statystyczne opracowanie wyników	44
6 Wyniki	45
6.1 Badanie fenotypu limfocytów efektorowych indukowanych oksazolonem w aktywnym uczuleniu u myszy szczepu CBA/J	45
6.2 Ocena supresyjnej aktywności OX-TsF	47
6.3 Rybonukleinowy charakter OX-TsF	57
6.4 Fenotyp komórek supresyjnych produkujących aktywny komponent czynnika supresyjnego swoistego dla nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon u myszy szczepu CBA/J	60
6.4.1 Selekcja negatywna	60
6.4.2 Selekcja pozytywna	62
6.5 Restrykcja MHC-zależna	64
6.6 Komponenty OX-TsF	66
6.7 Swoistość antygenowa czynników supresyjnych limfocytów T	68
6.8 Ocena indukcji apoptozy komórek efektorowych CS przez OX-TsF	71
6.9 Ocena wpływu OX-TsF na aktywność cytokinotwórczą efektorowych limfocytów oksazolonowo-swoistych	74
7 Dyskusja	75
8 Wnioski	93
Piśmiennictwo	95

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

Ab	- przeciwciało
Ag	- antygen
APC	- Antigen-presenting Cells - komórki prezentujące antygen
CD	- Cluster of Differentiation – antygeny różnicowania
CS	- Contact Hypersensitivity - nadwrażliwość kontaktowa
CTLA-4	- Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DAMPs	- Damage Associated Molecular Patterns – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem
DC	- komórka dendrytyczna
DNCB	- dinitrochlorobenzen
DNFB	- dinitrofluorobenzen
DPBS	- Dulbecco Phosphate Buffered Saline - zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna
DTH	- Delayed-Type Hypersensitivity - nadwrażliwość typu późnego
ELISA	- Enzyme-linked Immunosorbent Assay - test immunoenzymatyczny
FCS	- Fetal Calf Serum - surowica płodowa cielęca
ICAM	- Intercellular Adhesion Molecule - międzykomórkowa molekula adhezyjna
IFN	- interferon
IL	- interleukina
ILL	- Innate-Like Lymphocytes - limfocyty odpowiedzi nieswoistej
iTreg	- indukowalne regulacyjne komórki T
LC	- komórki Langerhansa (naskórkowe komórki dendrytyczne)
LFA	- Lymphocyte Function-associated Antigen - funkcjonalny antygen limfocytów
mAb	- przeciwciało monoklonalne
MGG	- mysia gamma globulina
MHC	- Major Histocompatibility Complex - główny układ zgodności tkankowej
miRNA	- mikro RNA
mRBC	- mysie krwinki czerwone
NF	- czynnik negatywny
nTreg	- naturalne regulacyjne komórki T
OX	- oksazol
OX-mRBC	- mysie krwinki czerwone znakowane oksazolonem
OX-TsF	- czynnik supresyjny swoisty dla nadwrażliwości kontaktowej na oksazol
PAMPs	- Pathogen Associated Molecular Patterns - wzorce molekularne związane z patogenami
PCE	- ekstrakt fenolowo – chloroformowy
PCI	- chlorek pikrylu (2,4,6-trinitrochlorobenzol)
RNAi	- RNA interference - interferencja RNA
TCR	- T-cell receptor - receptor limfocyta T
Tef	- efektorowy limfocyt T
TLR	- Toll-like Receptor – receptor Toll-podobny
TNP	- trójnitrofenol
TNP-mRBC	- mysie krwinki czerwone znakowane TNP
TNP-TsF	- czynnik supresyjny swoisty dla nadwrażliwości kontaktowej na TNP
TGFβ	- Transforming Growth Factor - transformujący czynnik wzrostu

1 STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było określenie struktury i funkcji czynnika supresyjnego, tzw. OX-TsF, wydzielanego przez limfocyty T i wykazującego zdolność zahamowania reakcji nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon u myszy szczepu CBA/J.

Przeprowadzone badania wykazały, że funkcjonalnie aktywną składową OX-TsF, uwalnianą przez limfocyty supresyjne CD8⁺, jest regulacyjny RNA. Aktywność regulacyjna OX-TsF wykazywana jest w jego ekstrakcie DNA/RNA z hodowli limfocytów supresyjnych oraz w czystej frakcji RNA. Regulacyjną funkcję poszczególnych form OX-TsF charakteryzuje efekt dawki. Badany czynnik wykazuje ponadto wrażliwość na działanie RNazy A, a jego rozdział na żelu agarozowym dowodzi, że frakcja rybonukleinowa zawiera odcinki o długości pomiędzy 10 a 90 nukleotydów.

W pracy wykazano, że OX-TsF wydzielany jest do nadsącza hodowli limfocytów supresyjnych w postaci egzosomów. Stanowią one mechanizm transportujący supresyjne RNA od komórek regulacyjnych do efektorowych, a błona mikropęcherzyka zapewnia miejsca wiążące fragmenty przeciwciał, warunkujących dostarczenie sygnału w sposób antygenowo specyficzny do ściśle określonej komórki efektorowej. Fragmenty te produkowane są przez limfocyty B1, indukowane w momencie naskórnego uczulenia haptentem.

Wywołanie supresji przez OX-TsF nie wymaga sygnalizacji przez układ zgodności tkankowej i zachodzić może na drodze indukcji apoptozy komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej.

Rozszerzeniem założeń pracy doktorskiej są przywołane w dyskusji jeszcze nie opublikowane wyniki uzyskane przez zespół dra hab. Krzysztofa Bryniarskiego. Obejmują one badania na myszach knock-out, definiujące komponenty: supresyjną oraz antygenowo-specyficzną czynników supresyjnych limfocytów T.

Efekt regulacyjny mediowany przez OX-TsF obserwowany jest w mysim modelu nadwrażliwości kontaktowej, służącym do oceny funkcji limfocytów T. Wydaje się prawdopodobnym, że supresyjna funkcja badanego przez nas czynnika może być w przyszłości wykorzystana w terapii schorzeń, których patogenezą związana jest z zaburzoną funkcją limfocytów T efektorowych.

2 ABSTRACT

The aim of this study was to define the structure and function of a suppressor factor (OX-TsF), released by T lymphocytes and possessing an ability to inhibit the contact hypersensitivity response to oxazolone in CBA/J mice.

The experiments performed revealed that the active compound of OX-TsF, secreted by suppressive CD8⁺ lymphocytes, belongs to the family of short regulatory RNAs. The function of OX-TsF was observed in both phenol-chloroform extract from supernatants of Ts cultures and chromatographically purified RNA fraction of the tested factor. Additionally, dose-response relation was shown to be a characteristic of OX-TsF action. The tested factor was sensitive to RNase treatment, and its electrophoresis on agarose gel proves that the RNA fraction comprises particles of the size of 10-90 nucleotides.

This work gives evidence for the exosomal mechanism of OX-TsF release by T lymphocytes into the culture supernatants. Not only do the exosomes transport the factor from regulatory to effector cells, but also provide the joint sites for the antibody fragments, which in turn enable the antigen-specific delivery of the suppressive signal. The antibody fragments are the second subfactor of OX-TsF, produced by B1 lymphocytes induced by skin sensitization with the tested hapten, oxazolone, and accounting for the antigen specific action of the factor.

OX-TsF mediates suppression of the contact hypersensitivity in non-MHC-restricted way and its function may tentatively involve the apoptosis of the effector cells.

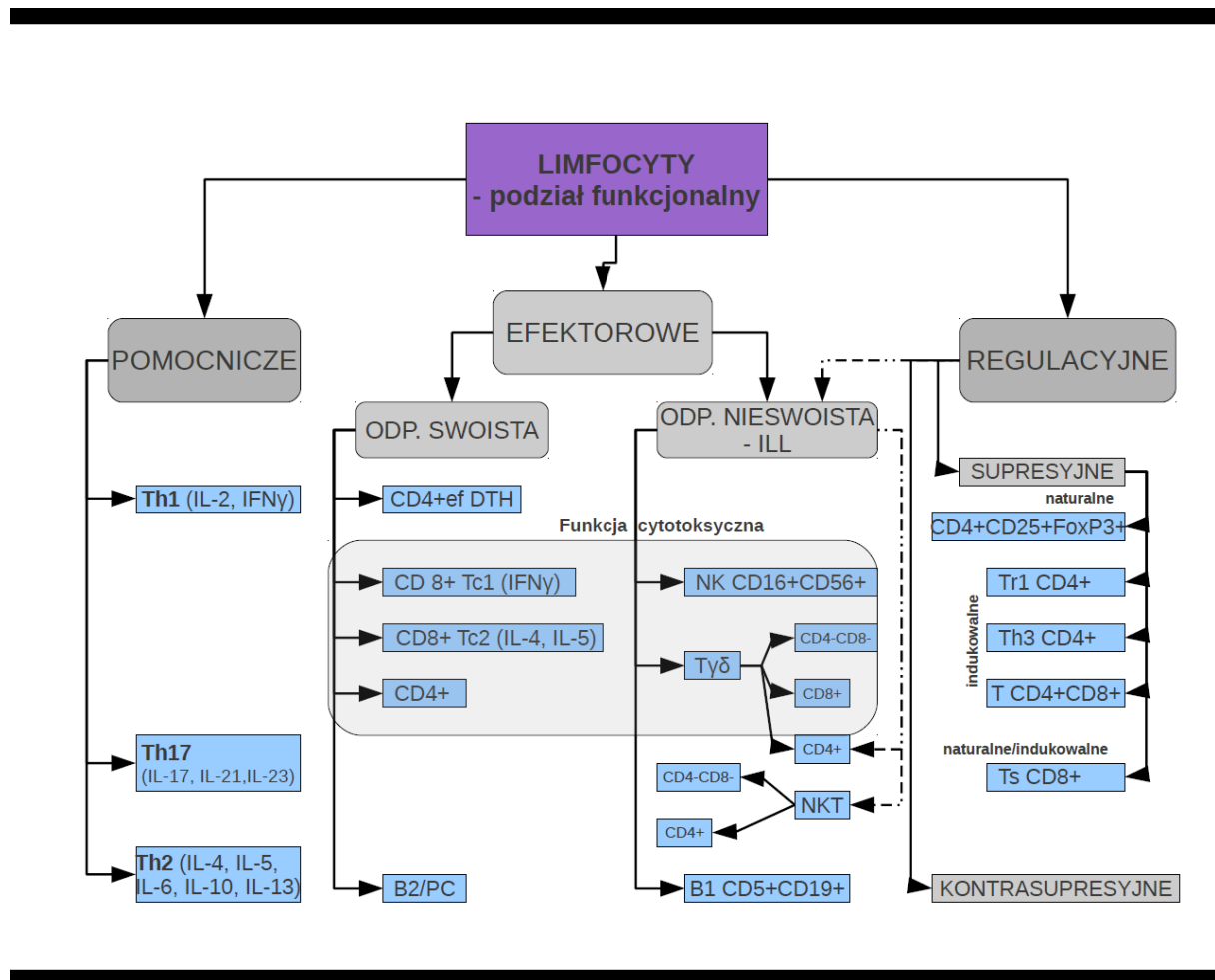
The topic of this thesis is extended in the latest work by Krzysztof Bryniarski. The reference to the unpublished results of the experiments of his group on gene knock-out mice can be found in the discussion and provides further insights into the nature of the compounds of antigen-specific T-cell suppressor factors.

In this work the regulatory role of OX-TsF is tested in the murine model of contact hypersensitivity, which is widely used as a tool to examine function of T lymphocytes. It seems likely that the observed suppressive effect in the future may be used in a therapeutic approach to the diseases which result from the impaired function of effector T cells.

3 WSTĘP

Komórki układu immunologicznego chronią ustrój przed wielorakimi patogenami

- atakującymi organizm przez tzw. wrota zakażenia (układ oddechowy, pokarmowy, uszkodzona skóra i śluzówki) a następnie szerzącymi się w ustroju zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo, oraz odgrywają rolę w kontroli komórek różniących się w zakresie antygenów MHC od komórek ustroju. Niezbędnym warunkiem tej ochrony jest istnienie mechanizmów umożliwiających prawidłowe odróżnienie czynników infekcyjnych i komórek obcych (prowadzące do odpowiedzi odpornościowej) od czynników nieszkodliwych i komórek własnych (prowadzące do tolerancji). Zaznaczyć trzeba, że jako obce rozpoznawane są także komórki własne, które uległy transformacji nowotworowej oraz nieprawidłowo dobrane przeszczepy, niezgodne pod względem antygenów MHC. W każdy ze wspomnianych procesów zaangażowane są odmienne typy komórek, spełniające swe funkcje za pośrednictwem wyspecjalizowanych mechanizmów. Mechanizmy te sklasyfikować można jako wrodzone, oparte na szybkiej i nieswoistej reakcji komórek tzw. pierwszej linii obrony (monocyty/makrofagi, neutrofile, limfocyty ILL) oraz nabyte, precyzyjnie ukierunkowane i złożone reakcje wynikające z interakcji wielu typów komórek i mediowane przez swoiste antygenowo limfocyty. Limfocyty są najbardziej zróżnicowaną populacją komórek układu immunologicznego. W zależności od fenotypu komórek, w obrębie limfocytów wyróżnia się szereg subpopulacji. Poszczególne subpopulacje różnią się też zakresem pełnionych funkcji. Niektóre z nich spełniają rolę efektorową (Tef, B), bezpośrednio reagując na cząstkę immunogenną, inne za pośrednictwem wydzielanych cytokin sterują aktywnością właściwych komórek wykonawczych odpowiedzi immunologicznej. Kolejną grupę stanowią limfocyty regulacyjne, które dzieli się na supresyjne (Ts) i kontrasupresyjne (Tcs), a efektem ich kooperacji jest optymalizacja odpowiedzi odpornościowej (Ryc. 3.1).



Ryc. 3.1
Podział limfocytów ze względu na pełnione funkcje

Limfocyty T o receptorze antygenowym TCR1 ($\gamma\delta$), limfocyty NKT wyposażone w TCR2 ($\alpha\beta$) o wąskiej swoistości i markery komórek NK oraz limfocyty B1 należą do wspomnianej powyżej grupy limfocytów odpowiedzi nieswoistej (ILL) []. Wszystkie te populacje zaangażowane są w początkowe stadia odpowiedzi odpornościowej. Wykorzystują one mechanizmy właściwe dla wyspecjalizowanych limfocytów T i B (cytotoksyczność komórkowa, produkcja przeciwciał), aczkolwiek skierowane nieswoiście przeciw grupom antygenów, np. polisacharydom bakteryjnym, białkom szoku cieplnego, antygenom komórkowym zmienionym podczas transformacji nowotworowej. Obok udziału ILL we wspomaganiu szybkiej odpowiedzi immunologicznej o niskiej swoistości podkreślić należy ich funkcję w regulacji odpowiedzi adocytywnej, zarówno na drodze supresji jak i kontrasupresji.

3.1 LIMFOCYTY T

3.1.1 MECHANIZMY DZIAŁANIA EFEKTOROWYCH LIMFOCYTÓW T

Reakcje odpornościowe mediowane przez limfocyty T określa się mianem odpowiedzi komórkowej. Obejmuje ona reakcje nadwrażliwości typu późnego (DTH), w klasycznej formie związane z Th1 CD4⁺, oraz reakcje cytotoksyczne limfocytów Tc CD8⁺ lub rzadziej CD4⁺ [2]. Faza indukcji odpowiedzi komórkowej zachodzi w strefie przykorowej węzłów chłonnych położonych w rejonie miejsca kontaktu z antygenem. Swoisty receptor TCR naiwnych limfocytów T rozpoznaje antygen prezentowany w kontekście MHC odpowiedniej klasy przez komórki APC. Najefektywniejszymi komórkami prezentującymi antygen są komórki dendrytyczne, wykazujące konstytutywną ekspresję zarówno MHC I, jak i MHC II. Jako APC funkcjonować mogą także makrofagi, zdolne do prezentacji antygenów sfagocytowanych drobnoustrojów oraz limfocyty B, prezentujące antygeny spinocytowane za pośrednictwem swoistych BCR. Do efektywnego rozpoznania antygeny niezbędne jest stabilne połączenie komórek, osiągane z udziałem molekuł adhezyjnych (ICAM-1 i ICAM-2 komórki APC oddziałują z LFA-1 limfocyta T, a CD2 limfocyta T z LFA-3 APC) i wspomagane przez współrozpoznanie MHC przez kooperujące limfocyty (MHCII w przypadku limfocytów CD4⁺, MHC I przez limfocyty CD8⁺). Kolejnym niezbędnym sygnałem jest rozpoznanie patogenności budowy antygeny, prowadzące do ekspresji molekuł B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) na komórkach APC, przekazujących następnie sygnał kostymulacji limfocytom T za pośrednictwem ich receptorów CD28, przy czym limfocyty T CD8⁺ wymagają silniejszego sygnału niż Th1 CD4⁺. Ostatnim komponentem jest środowisko cytokinowe, warunkujące typ wytwarzanej odpowiedzi immunologicznej. W wyniku wymienionych procesów dochodzi do aktywacji odpowiednich limfocytów efektorowych i wytworzenia limfocytów pamięci.

Faza efektorowa odpowiedzi komórkowej to reakcja uczulonych limfocytów na powtórnie napotkany swoisty antygen. W przypadku limfocytów efektorowych Th1 następuje ona w zakażonej tkance, do której komórki te migrują z naczyń krwionośnych w odpowiedzi na sygnał chemokinowy. Antygen prezentowany jest limfocytom efektorowym Th1 w kontekście MHC klasy II przez makrofagi, które nie są zdolne samodzielnie wyeliminować patogenu, m.in. w przypadku wewnątrzkomórkowych zakażeń bakteryjnych jak *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* czy *Leishmania donovani*. Celem interakcji tych komórek jest zwiększenie zdolności makrofagów do wewnątrzkomórkowego zabijania

drobnoustrojów. Ponadto nasileniu ulega migracja fagocytów do miejsca zakażenia. Aktywacja makrofagów jest stymulowana wydzielanym przez Th1 interferonem gamma oraz oddziaływaniem receptorowym pomiędzy CD40L (CD154) na komórkach T a CD40 na makrofagach.

Natomiast antygenowo-swoisty receptor TCR efektorowego limfocyta T cytotoksycznego CD8⁺ rozpoznaje ściśle określoną strukturę antygenu prezentowanego w kontekście MHC klasy I. W ten sposób prezentowane są antygeny powstałe wewnątrzkomórkowo, np. w trakcie infekcji wirusowych i niektórych bakteryjnych, a podczas procesu nowotworowego – antygeny nowotworowe bądź zmienione antygeny własne. Limfocyty cytotoksyczne biorą także udział w odrzucaniu przeszczepionych komórek, prezentujących odmienne MHC. Efektem rozpoznania przez komórki Tc jest indukcja apoptozy komórki-nośnika kompleksu Ag-MHCI. Prowadzi do niej precyzyjne uwalnianie z ziarnistości limfocyta Tc monomerów perforyny, które w obecności podwyższonego stężenia jonów wapnia polimeryzują tworząc w błonie atakowanej komórki pory, przez które dostają się do jej wnętrza cząstki o właściwym działaniu cytotoksycznym: proteolityczne granzymy A i B oraz granulizyna [3]. Mediatory te aktywują kaspazy, co prowadzi do aktywacji apoptozy [4,5]. Dodatkowym mechanizmem indukującym apoptotyczną śmierć komórki jest oddziaływanie ligandu Fas limfocyta z cząstką Fas na komórce docelowej, prowadzące do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c oraz aktywacji kaspaz [6]. Jak wcześniej wspomniano, zarówno komórki T CD8⁺ jak i T CD4⁺ wykazują aktywność cytotoksyczną. W przypadku tych pierwszych dominującym mechanizmem jest egzocytoza ziarnistości, natomiast te drugie w przewadze wykorzystują interakcję Fas-FasL [7]. Cytotoksyczność komórek T wzmagana jest przez uwalnianie przez nie cytokiny, głównie TNF α i IFN γ .

Limfocyt Tc jest zatem komórką wykonawczą, podczas gdy reakcja komórkowa mediowana przez limfocyty Th1 w fazie efektorowej wykorzystuje zdolności bójcze fagocytów. Oba typy odpowiedzi obserwuje się w reakcjach nadwrażliwości typu późnego.

3.1.2 MECHANIZMY DZIAŁANIA REGULATORYWYCH LIMFOCYTÓW T

Mechanizmy immunologiczne niosą ze sobą ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek organizmu, a więc muszą pozostawać pod kontrolą obwodów regulacyjnych. Kontrola ta obejmuje też wytworzenie stanu tolerancji na antygeny

niechorobotwórcze dla ustroju. Może ona być realizowana przez całkowitą fizyczną eliminację komórek immunologicznych, ich blokadę funkcjonalną lub ustalenie stanu niewrażliwości na antygeny. Początkowo uznawano, że funkcję tą realizuje specjalna klasa limfocytów T, tzw. limfocyty supresyjne (Ts) [8] o fenotypie CD8⁺. Obecnie wiadomo, że komórkami o funkcji supresyjnej mogą być limfocyty o fenotypie CD8⁺CD28⁻, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻, limfocyty T $\gamma\delta$, komórki NKT, a także produkujące interleukinę 10: komórki dendrytyczne, limfocyty B oraz komórki NK, jak również monocyty i makrofagi [9-12].

Zróznicowane populacje limfocytów T modulują odpowiedź odpornościową na różnych etapach jej rozwoju [13]. Indukcja odpowiedzi immunologicznej, zarówno komórkowej jak i humoralnej, podlega kontroli populacji limfocytów ILL, które ukierunkowują reakcje immunologiczne już we wrotach zakażenia, w momencie ekspozycji na obcy antygen, alergen czy autoantygen. Następnie dojrzewanie odpowiedzi immunologicznej modulowane jest poprzez dewiację immunologiczną, proces wzajemnej negatywnej regulacji limfocytów Th1 i Th2. Z kolei uruchomione już szlaki odpowiedzi immunologicznej pozostają pod nadzorem wyspecjalizowanych subpopulacji limfocytów regulacyjnych i ma to miejsce nie tylko w warunkach stymulacji patogenami (właściwa regulacja immunologiczna), lecz także w przypadku toczących się procesów alergicznych czy autoagresyjnych, w przebiegu których immunoregulacja często ulega zaburzeniu [14].

We wstępnej fazie odpowiedzi odpornościowej w procesie ukierunkowywania naiwnych limfocytów do różnicowania się do odmiennych subpopulacji biorą udział wspomniane wcześniej ILL. Stanowią one populacje regulacyjne wytwarzające odpowiednie do aktywującego bodźca antygenowego środowisko cytokinowe, które bezpośrednio moduluje dalszy przebieg reakcji odpornościowej. W zależności od sposobu indukcji, zaktywowane regulacyjne limfocyty T gamma delta CD4⁺ mogą wydzielać IL-4 bądź IL-12. W pierwszym przypadku dochodzi do generowania odpowiedzi o charakterze humoralnym, skierowanej na eliminację patogenów lub alergenów pozakomórkowych. Z kolei silna aktywacja limfocytów TCR1 i sekrecja IL-12 ukierunkowują reakcję immunologiczną na tor komórkowych procesów cytotoksycznych [15].

W płucach pod wpływem alergenów wziewnych dochodzi do indukcji innej populacji ILL - komórek NKT, produkujących znaczne ilości IL-4 i IL-13, co stymuluje rozwój i aktywację komórek Th2 oraz generowanie dojrzewania limfocytów B produkujących

IgE [16]. Natomiast NKT stymulowane patogenem produkują IL-17 i prowadzą do aktywacji neutrofilii w drogach oddechowych oraz do indukcji nadreaktywności dróg oddechowych [17].

Ważną rolę w ukierunkowywaniu odpowiedzi immunologicznej odgrywają też komórki dendrytyczne. Niedojrzałe DC wykazują wysoką ekspresję liganda Notch – Jagged-1, który odpowiada za uruchomienie reakcji mediowanych przez Th2. Natomiast stymulacja TLR na komórce dendrytycznej aktywuje jej dojrzewanie i pobudza odpowiedź Th1-zależną, co związane jest ze wzrostem ekspresji innego liganda Notch – Delta-4 [18].

Kolejnym mechanizmem regulacyjnym jest wzajemne negatywne oddziaływanie subpopulacji limfocytów Th1 i Th2, prowadzące do uprzywilejowania toczącej się odpowiedzi, określane mianem dewiacji immunologicznej [19,20]. Aktywacja kluczowych dla odporności humoralnej limfocytów Th2 powoduje równoczesne zahamowanie odpowiedzi komórkowej Th1-zależnej. Odbywa się to na drodze cytokinowej, bowiem wytwarzane przez limfocyty Th2 cytokiny (IL-4, IL-10 i IL-13) hamują produkcję cytokin wydzielanych przez limfocyty Th1 i odpowiedź przez nie mediowaną [21], aktywując jednocześnie odporność humoralną, z rearanżacją genów kodujących immunoglobuliny i przełączaniem klas przeciwciał. Odwrotnością tego stanu jest blokujący aktywność limfocytów Th2 wpływ interferonu gamma, podstawowej cytokiny wydzielanej przez limfocyty Th1. Stan zaburzonej równowagi między populacjami limfocytów pomocniczych może być uznawany za jedną z przyczyn chorób alergicznych i autoimmunizacyjnych.

Limfocyty T regulatorowe (Treg) modulują już aktywne procesy immunologiczne. Dużą ich grupę stanowią limfocyty CD4⁺ rozpoznające antygen w kontekście układu zgodności tkankowej klasy II (MHCII). Spośród nich za główne uznać można subpopulacje: CD25⁺Foxp3⁺, Th3 i Tr1. Ponadto, działanie regulacyjne wykazują również wspomniane wcześniej limfocyty T CD8⁺ [22], jak również nowo opisane limfocyty T CD4⁺CD8⁺ regulatorowe skórnej odporności immunologicznej [23] oraz limfocyty Th17. Limfocyty Treg, oprócz odmiennych fenotypów, różnią się między sobą miejscem powstawania, dojrzewania, mechanizmami aktywacji i działania.

Wśród czynników za pośrednictwem których komórki regulatorowe pełnią swą rolę wyróżnić należy cytokiny supresyjne IL-10 i TGFβ. Wpływają one na funkcje komórek efektorowych układu immunologicznego bezpośrednio, jak również poprzez zapewnienie środowiska dla indukcji odpowiednich Treg. Wydzielanie TGFβ stanowi

ważny element aktywności regulatorowych komórek Th3 i $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. TGF β wykazuje m.in. działanie hamujące na proliferację i aktywację komórek T oraz prezentację antygenów przez komórki APC [24]. Poprzez stymulację czynników transkrypcyjnych Smad i ATF cytokina ta powoduje zahamowanie ekspresji granzymów B i IFN γ w komórkach cytotoksycznych [25]. TGF β może hamować produkcję IL-4 przez limfocyty Th2 [21], z zachowaniem fenotypowego charakteru wytworzonej już populacji. TGF β spełnia istotną rolę w hamowaniu rozwoju astmy, poprzez redukcję zapalenia i reaktywności dróg oddechowych, w tym odpowiedzi zapalnej w płucach. Wykazano też, że TGF β uwalniany może być przez komórki nowotworów [26], co stanowi mechanizm prowadzący do unikania przez nie komórkowej odpowiedzi immunologicznej [25].

Na aktywność limfocytów Th1 wpływa także IL-10. Cytokina ta negatywnie reguluje ich proliferację, przeżywanie i aktywność cytokinotwórczą. W przypadku silnego pobudzenia TCR limfocytów Th1 komórki te uwalniają IL-10, która zwrótnie hamuje toczącą się odpowiedź immunologiczną [27,28]. Pod wpływem IL-10 zmniejszeniu ulega także ekspresja MHC klasy II i molekuł B7 (CD80/86) oraz ICAM-1 (CD54) na makrofagach, co zmniejsza ich zdolność do efektywnej prezentacji antygenów, a w efekcie prowadzi do zahamowania odpowiedzi komórkowej [29]. Za pośrednictwem IL-10 limfocyty Treg1 oraz T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ aktywują produkcję IgG4 i hamują IgE, a także wzmagają wydzielanie IgA2 na śluzówkach. IL-10 na drodze mechanizmów wspólnych z TGF β bierze udział w supresji rozwoju astmy [30]. Z badań doświadczalnych w modelach autoimmunizacyjnych EAE czy cukrzycy typu 1 wynika, że IL-10 może być wydzielana przez komórki NKT w miejscu aktywacji procesu autoagresji i aktywować sygnały autotolerancji, modulując proces dewiacji immunologicznej [16,17].

3.1.2.1. LIMFOCYTY T REGULACYJNE $CD4^+$

3.1.2.1.1. $CD4^+CD25^+Foxp3^+$

Obecnie najwięcej uwagi poświęca się limfocytom T regulacyjnym o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Klasyfikuje się je jako naturalne Treg (nTreg) [30,31]. Dojrzewają one w grasicy, gdzie w przeciwieństwie do pozostałych komórek T, w procesie selekcji pozytywnej muszą się wykazać wyższym powinowactwem do antygenów własnych, gdyż ich funkcją jest zapobieganie procesom autoimmunizacyjnym. Mogą też powstawać na obwodzie – na drodze transformacji od fenotypu $CD4^+CD25^-$ do

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ pod wpływem niskich dawek antygeny, TGFβ i IL-2, a także kwasu retinowego czy witaminy D [22]. Proces ten zachodzić może podczas infekcji patogenami lub w procesie odpowiedzi przeciwnowotworowej, a nowopowstałe limfocyty regulacyjne iTreg Foxp3⁺, tak jak naturalne Treg Foxp3⁺, wykazują działanie supresyjne zarówno na komórki T efektorowe – Th1, Th2 i Th17, jak i na komórki dendrytyczne [16].

TGFβ jest niezbędnym czynnikiem warunkującym powstanie TregFoxp3⁺ w grasicy. Wpływ TGFβ na ten proces zaznacza się w pobudzaniu ekspresji markera charakterystycznego dla omawianych komórek, czynnika transkrypcyjnego Foxp3 oraz hamowaniu ich apoptozy w mechanizmie anergii klonalnej [32]. Wydzielanie TGFβ stanowi ponadto istotny mechanizm regulacyjny wykorzystywany przez omawiane komórki: poprzez bezpośrednią supresję aktywności komórek efektorowych i prezentujących antygen, jak również przez zapewnienie odpowiedniego środowiska cytokinowego do różnicowania naiwnych komórek T w kierunku iTreg oraz Th17. TGFβ jest też autokrynnym czynnikiem pobudzającym indukcję i proliferację iTregFoxp3⁺ [32]. Poza wydzielaniem TGFβ omawiane komórki pełnią swe funkcje również za pośrednictwem wspomnianego czynnika Foxp3, który oddziałując z czynnikiem transkrypcyjnym AML1/Runx1 w efektorowych limfocytach T hamuje ekspresję genów IL-2 oraz IFNγ w tych komórkach, co prowadzi do zahamowania ich aktywacji i proliferacji [33]. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ mogą również wydzielać IL-10 oraz hamować aktywację komórek efektorowych przez receptorowe oddziaływanie z komórkami APC. Ten mechanizm supresji polega na interakcji CTLA-4 (CD152) i LAG-3 (lymphocyte activation gene) na naturalnych regulacyjnych limfocytach T z ich ligandami na komórce prezentującej (APC) - odpowiednio: CD80/86 i MHCII, co powoduje zahamowanie dojrzewania i aktywacji limfocyta efektorowego w mechanizmie anergii klonalnej. Ponadto interakcja CD152-CD80/86 pobudza sekrecjęIDO (idoleamine 2,3-dioxygenase), która aktywuje przemianę tryptofanu do proapoptotycznych metabolitów [30,31,34] uruchamiając kolejny mechanizm supresji. Oprócz wspomnianej roli w utrzymaniu autotolerancji, limfocyty CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ biorą udział w zapobieganiu odrzucaniu przeszczepów, a u myszy zmniejszają eozynofilię w drogach oddechowych. Brak regulacyjnych komórek CD25⁺, będący skutkiem defektu genu *FOXP3*, powoduje XLAAD (X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome), zespół objawiający się egzemą, wzrostem poziomu IgE, eozynofilią, alergiami pokarmowymi, a w końcu

autoimmunizacją [16,34,35]. Obniżony poziom limfocytów FOXP3⁺ i wydzielanego przez nie TGFβ obserwuje się u pacjentów z astmą.

Nie zawsze jednak nTreg są wystarczająco efektywne, by zahamować rozwój procesu autoimmunologicznego. Dzieje się tak m.in. w cukrzycy I typu, kiedy to komórki nTreg wykazują zmniejszoną efektywność, a autoreaktywne limfocyty CD4⁺ są odporne na supresję przez nie mediowaną. Dodatkowym czynnikiem jest niestabilność nTreg, które w obecności prozapalnego środowiska cytokinowego, towarzyszącego procesowi autoimmunizacyjnemu, mogą ulegać różnicowaniu w kierunku Th1 lub Th17. Pojawiły się jednak doniesienia o iTreg, które wykazują właściwości supresyjne nTreg, są stabilne *in vivo*, a dodatkowo mają zdolność przekształcania się w komórki pamięci [36]. Komórki te są indukowane *in vitro* z naiwnych limfocytów CD4⁺ w ściśle określonych warunkach: obecności cytokin IL-2 i TGFβ oraz unieruchomionego przeciwciała anti-CD3. Badania nad tymi iTreg zostały przeprowadzone w mysim modelu cukrzycy o podłożu autoimmunizacyjnym. Stwierdzono, że komórki te zapobiegały rozwojowi cukrzycy, a w przypadku już toczącego się procesu miały działanie terapeutyczne. Efekt regulacyjny iTreg wywoływany był przez wydzielane cytokiny: TGFβ i IL-10, które hamują proliferację naiwnych komórek T, różnicowanie limfocytów pomocniczych i wydzielanie IFNγ przez komórki efektorowe. Ponadto, iTreg wydzielają IL-2, która jest czynnikiem promującym przeżywanie nTreg, a wspólnie z TGFβ stymuluje różnicowanie iTreg z naiwnych CD4⁺ *in vivo*. Omawiane komórki wykazują stabilność *in vivo*, niezależnie od środowiska cytokinowego. Stwierdzono, że jest to wynikiem transferu ze środowiska *in vitro* do *in vivo* i związanym z tym zanikiem stymulacji TCR i cytokinowej, co prowadzi do przekształcenia iTreg w komórki pamięci. Zmniejszeniu ulega ekspresja receptora IL-2 (CD25), zwiększeniu natomiast ekspresja receptora IL-7, cytokiny warunkującej proliferację komórek pamięci CD4⁺. Tak zróżnicowane komórki są długowieczne – w modelu mysim wykazywały zdolność przeżycia i funkcjonowania do dwóch lat [37].

3.1.2.1.2 CD4⁺Th3

Inną grupą komórek regulacyjnych są limfocyty pomocnicze typu 3 (CD4⁺ Th3), które powstają na obwodzie z naiwnych limfocytów CD4⁺CD25⁻ w wyniku indukcji antygenami własnymi bądź obcymi, podawanymi drogą pokarmową [31]. Są

regulacyjną funkcję spełniają głównie w przewodzie pokarmowym, gdyż tam występują komórki dendrytyczne produkujące zarówno IL-10, jak i TGF β , cytokiny niezbędne do ich rozwoju. Limfocyty Th3 za pośrednictwem wydzielanego TGF β mogą hamować obie populacje limfocytów pomocniczych – Th1 i Th2, wzmagając jednocześnie produkcję IgA, a w modelach doświadczalnych hamują też autoreaktywne limfocyty [16].

3.1.2.1.3 CD4⁺ Tr1

Z kolei limfocyty Tr1 o fenotypie CD4⁺CD25⁻ to indukowana grupa komórek regulacyjnych, które podobnie jak Th3, powstają z naiwnych limfocytów T na obwodzie, w wyniku stymulacji antygenowej. Regulują odpowiedź immunologiczną głównie w układzie oddechowym, gdzie komórki DC produkują IL-10 niezbędną do ich rozwoju. Fizjologicznie Tr1 za pośrednictwem wydzielanej IL-10 mogą regulować zarówno Th1, jak i Th2. Alergeny dostające się do układu oddechowego w normalnych warunkach indukują Tr1, co prowadzi do stanu tolerancji [16,22]. Nieodpowiednie środowisko cytokinowe – niedostateczna produkcja IL-10 a zwiększona IL-4 i IL-13 prowadzić mogą do zniesienia tolerogennego działania Tr1 oraz rozwoju alergii i astmy.

3.1.2.1.4 CD4⁺ Th17

Stosunkowo niedawno opisana populacja limfocytów Th17 wymaga do różnicowania odpowiedniej sygnalizacji cytokinowej, będącej mieszaniną pro- i przeciwzapalnych cytokin – odpowiednio IL-6 i TGF β , a charakteryzuje się silną sekrecją prozapalnej IL-17A. Fizjologicznie aktywuje ona obronę przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. W przebiegu infekcji szczególnie trudnymi do eliminacji patogenami, ostry proces zapalny może przekształcić się w długotrwały i destrukcyjny proces chroniczny. Stymulacja Th17 wysokimi dawkami autoantygenów ze zniszczonych procesem zapalnym tkanek własnych prowadzi często do indukcji autoagresji [38].

Populacja limfocytów Th17 nie jest jednorodna; w zależności od konfiguracji cytokin (głównie stężenia TGF β) indukowane komórki charakteryzują się ekspresją odmiennych czynników transkrypcyjnych oraz sekrecją różnych cytokin. Brak lub niedobór TGF β podczas indukcji Th17 skutkuje zróżnicowaniem w kierunku fenotypu zbliżonego do Th1 oraz rozwojem reakcji autoimmunizacyjnych. Ponadto, populacja

ta jest niestabilna – w warunkach braku TGFβ może tracić zdolność sekrecji IL-17 na korzyść IFNγ [39].

3.1.2.2 LIMFOCYTY T REGULACYJNE CD4⁻CD8⁻

Uwagę badaczy i klinicystów zwracają także podwójnie negatywne (CD4⁻CD8⁻) regulacyjne limfocyty T o poliklonalnym receptorze TCRαβ. Opisano udział tych komórek w indukcji tolerancji po przeszczepach allogenicznych, zapobieganiu reakcji przeszczep przeciw biorcy oraz supresji rozwoju cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym w modelu zwierzęcym [40]. Komórki te nie są populacją jednorodną, nie wyróżniono markera dla nich charakterystycznego, co może być związane z postulowanymi różnymi drogami ich różnicowania [40]. Przypuszcza się, że mogą być wczesnymi niezróżnicowanymi komórkami grasiczniezależnymi lub powstawać w grasicy na drodze alternatywnego do uznawanego toku ontogenezy limfocytów T. Inne hipotezy zakładają ich powstawanie na obwodzie, poprzez odróżnicowanie komórek pojedynczo pozytywnych w odpowiedzi na bodźce nie do końca jeszcze sprecyzowane. Mechanizmy wykorzystywane przez limfocyty CD4⁻CD8⁻ także cechują się różnorodnością. Mogą uwalniać IFNγ [41] i IL-10 [40], działać cytotoksycznie na efektorowe komórki CD8⁺ [42] i CD4⁺ [40], komórki DC [43], NK [44] oraz limfocyty B [45], czy w końcu hamować ekspresję molekuł kostymulujących na komórkach DC [43], zmniejszając ich zdolność do pobudzania limfocytów efektorowych. Podwójnie negatywne limfocyty regulacyjne do swej aktywacji wymagają kontaktu z komórkami dendrytycznymi, od których pozyskują prezentowany antygen wraz z fragmentem błony zawierającym kompleks MHC-Ag (*trogocytosis*) [42]. Za pośrednictwem tego antygeny mogą oddziaływać z antygenowo-swoistymi limfocytami CD8⁺, by następnie zaindukować ich apoptozę. W przeciwieństwie do już szeroko testowanych w klinice limfocytów nTreg Foxp3⁺, komórki podwójnie negatywne pełnią zatem swe funkcje wyłącznie na drodze antygenowo-specyficznej, co warunkuje możliwość ich bezpieczniejszego stosowania w terapii [40].

3.1.2.3 LIMFOCYTY T REGULACYJNE CD4⁺CD8⁺

Eksperymentalne badania aktywacji procesu tolerancji poprzez transdermalną indukcję komórek regulacyjnych różnymi białkami dowodzą, że przezskórna aplikacja różnych białek (MBP, OVA) indukuje u myszy powstanie populacji limfocytów

regulacyjnych o fenotypie CD4⁺CD8⁺. Komórki te wykazują zdolność sekrecji TGFβ, który mediuje antygenowo-nieswoistą tolerancję na hapteny i białka alergenów wywołujących nadwrażliwość typu późnego i nadwrażliwość kontaktową w modelu mysim [23,46]. Populacja ta, indukowana poprzez aplikację białka drogą naskórną, wykazuje także silne działanie immunosupresyjne na aktywnie toczące się procesy autoagresyjne w modelu mysiego stwardnienia rozsianego - experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [47,48] czy mysiego modelu reumatoidalnego zapalenia stawów – collagen induced arthritis (CIA) [49]. Najnowsze wyniki badań klinicznych nad wprowadzeniem transdermalnej indukcji autotolerancji na antygeny białka osłonki mielinowej (MBP) u ludzi chorych na stwardnienie rozsiane dokumentują możliwość indukcji swoistych limfocytów regulacyjnych, które prowadzą do istotnego zmniejszenia dolegliwości a także częstości nawrotów rzutów choroby w tej jednostce autoagresyjnej [50]. Nie potwierdzono możliwości indukcji u ludzi populacji regulacyjnej limfocytów T CD4⁺CD8⁺, którą opisano w modelu mysim. Uzyskane wyniki badań wskazują, że u człowieka funkcję immunoregulacyjną po transdermalnej aktywacji swoistym białkiem MBP przejmuje indukowalna i antygenowo swoista populacja limfocytów Treg1 o fenotypie CD4⁺ IL-10⁺. Istotny jest fakt, że limfocyty te aktywują supresję toczącego się procesu autoagresyjnego u chorych na stwardnienie rozsiane [50].

3.1.2.4 LIMFOCYTY SUPRESYJNE T CD8⁺

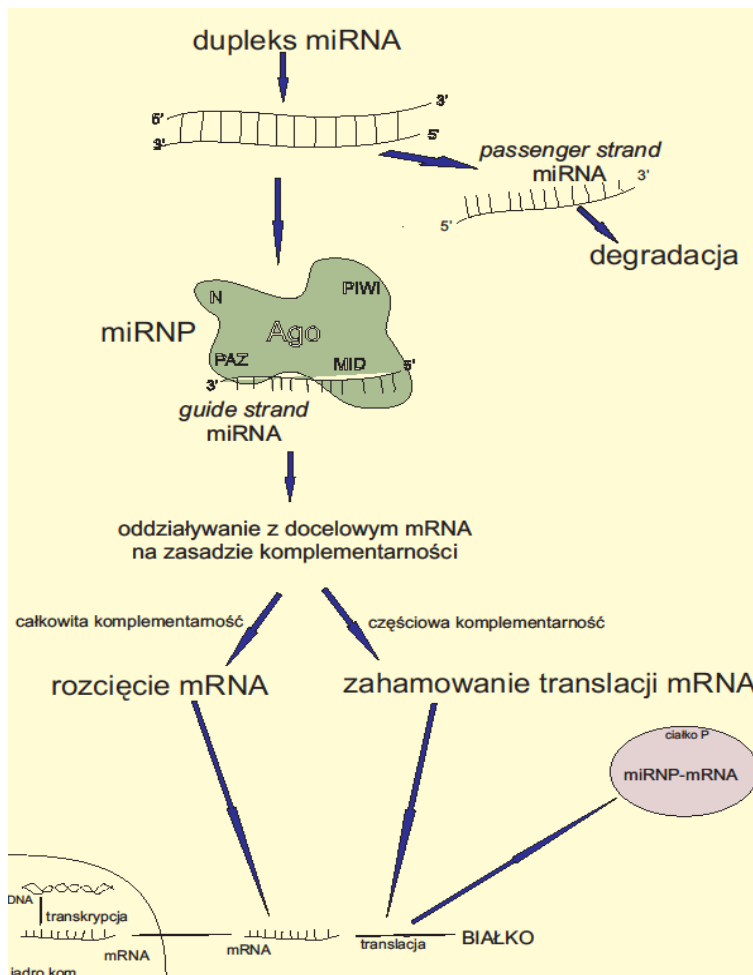
Aktywność immunoregulacyjna (głównie supresyjna) limfocytów supresyjnych T CD8⁺ realizuje się z udziałem cytokin hamujących odpowiedź komórkową (TGFβ i IL-10), mechanizmu złuszczenia receptorów TCR [51,52] blokujących rozpoznanie autoantygeny na APC oraz przypuszczalnie poprzez nowoodkryty mechanizm sekrecji mikroRNA [53-55].

3.1.2.4.1 Regulacja poprzez interferencję RNA

Odkrycie zjawiska hamowania ekspresji genów przez dwuniciowy RNA (dsRNA, double-stranded RNA) - interferencji RNA (RNAi) [56], zasugerowało możliwość regulacji procesów fizjologicznych, w tym funkcjonowania układu immunologicznego, przez interferencyjny RNA. Stwierdzono, że krótkie odcinki RNA, działające wspólnie z katalitycznym białkiem Ago-2, indukować mogą zahamowanie ekspresji komplementarnych do siebie odcinków mRNA [57], a więc zablokowanie syntezy

odpowiedniego białka. Szacuje się, że nawet 30% genomu podlega regulacji przez RNA [58], co czyni go istotnym elementem kontroli procesów wzrostu, różnicowania i metabolizmu większości komórek ustroju. Małe, regulacyjne RNA (srRNA, short regulatory RNA) podzielone zostały na szereg klas, wśród których za główne uważa się micro RNA (miRNA) i small interfering RNA (siRNA). MiRNA jest fizjologicznym (endogennym) regulatorem ekspresji genów. MiRNA charakteryzują się długością pomiędzy 20 a 23nt, a ich formy prekursorowe (pri-miRNA) zakodowane są w genomie. Geny kodujące miRNA mogą stanowić odrębne jednostki transkrypcyjne, ale najczęściej są elementem intronów genów kodujących białka. Pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA), o długości mogącej przekraczać 1000nt [54], generowany jest przez RNA polimerazę II w jądrze, a następnie podlega katalizowanej obróbce przez enzymy z klasy RNaz III. Na pierwszym etapie, katalizowanym przez rybonukleazę Drosha, powstaje 60-70-nukleotydowy pre-miRNA, o strukturze spinki do włosów, a więc zawierającej fragment dwuniciowy. Jest on transportowany do cytoplazmy w sposób aktywny (w obecności GTP) [59] z udziałem kompleksu białkowego o aktywności GTPazy i zawierającego receptor dsRNA. U ssaków białkiem tym jest eksportyna 5 (Xpo5) [60]. W cytoplazmie rybonukleaza Dicer generuje dwuniciowy RNA, zawierający na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy. Jest on 20-23-nukleotydowym dupleksem, od którego jedna z nici (tzw. miRNA*) jest następnie uwalniana i zwykle degradowana przez białko z rodziny Argonaute/Piwi, Ago2. Druga nić, czyli dojrzały miRNA, tworzy hybrydę z kompleksem efektorowym RNP, która skanuje nić mRNA w poszukiwaniu docelowej sekwencji, przynajmniej częściowo komplementarnej do miRNA, w czym uczestniczy importyna P [61]. Głównym komponentem RNP jest białko z rodziny Argonaute/Piwi (Ago/Piwi). Ma ono budowę domenową, a poszczególne domeny pełnią istotne funkcje w realizacji interferencji RNA. Sąsiadująca z domeną N-końcową domena PAZ oraz środkowa MID, odpowiadają za wiązanie odpowiednio 3' i 5' końca interferującego RNA. Domena C-końcowa, Piwi, wykazuje aktywność RNazy H [62] a więc jest endonukleazą swoistą dla dwuniciowych RNA [63]. W zależności od stopnia dopasowania między interferującym a wyciszonym RNA, skutkiem ich interakcji może być enzymatyczne (katalizowane przez Ago-2) rozcięcie oraz całkowita degradacja mRNA bądź zmniejszenie ekspresji białka przez zahamowanie translacji, co wiąże się uniemożliwieniem przyłączenia czynnika inicjującego translację (eIF4E) lub przedwczesną dysocjacją rybosomów [64].

Pierwszy mechanizm zachodzi w przypadku całkowitej komplementarności między regulacyjnym RNA a mRNA. Jeśli dopasowanie ma miejsce jedynie pomiędzy tzw. seed region (odcinek o długości 6-7 nukleotydów na 5' końcu miRNA) a elementami rozpoznających miRNA (MREs, miRNA recognition elements) na 3' końcu mRNA [65], dochodzi do zahamowania translacji. Oprócz powyżej opisanej regulacji na poziomie potranskrypcyjnym (PTGS, post-transcriptional gene silencing) RNA może kontrolować ekspresję genów na poziomie transkrypcji (TGS, transcriptional gene silencing) - przez modyfikacje epigenetyczne materiału genetycznego, np. metylację chromosomów i formowanie heterochromatyny [66]. We wszystkich przypadkach końcowym efektem jest zablokowanie syntezy białka kodowanego przez wyciszony mRNA (Ryc. 3.2).



Ryc. 3.2
MECHANIZM REGULACJI
EKSPRESJI BIAŁEK PRZEZ
INTERFERUJĄCE RNA [67].

Wspomniane wyżej różne mechanizmy wyciszenia docelowego mRNA, polegające na zahamowaniu translacji, degradacji transkryptu czy zmianie struktury chromatyny, różnią się rodzajem efektorowego kompleksu białkowo-rybonukleinowego (RNP), z

którym dana klasa srRNA oddziałuje. I tak rozcięcie docelowej nici RNA odbywa się z udziałem kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex), zahamowanie translacji wymaga kompleksu miRNP (microribonucleoprotein), a regulacja ekspresji genu przez wpływ na strukturę chromatyny jest realizowana w kooperacji z kompleksem RITS (RNA-induced transcriptional gene silencing) [68]. Rola TGS w regulacji ekspresji genów u ludzi nie jest jeszcze do końca potwierdzona. Mechanizm supresji translacji opisano natomiast m.in. dla białek enzymatycznych, cytokin, białek promujących apoptozę, czynników transkrypcyjnych, a nawet białek niezbędnych wirusom do replikacji [69,70]. Dlatego naturalnym wydaje się szeroki zakres funkcji miRNA jako regulatorów ekspresji genów, realizowanych m.in. na wielu płaszczyznach funkcjonowania układu immunologicznego [57]. Dotychczas opisano szereg cząstek miRNA (m.in. odcinki nazwane miR-150 [71], miR-181a [72], miR-223 [73]), które pełnią istotną funkcję w regulacji rozwoju, różnicowania i apoptozy komórek układu immunologicznego. Niektóre regulują odpornościową odpowiedź swoistą i nieswoistą ustroju poprzez wpływ na wydzielanie cytokin prozapalnych (np. miR-146 [74], miR-155 [75], miR-16 [76]), inne kontrolują aktywność enzymów regulujących funkcję limfocytów T (miR-181a [72]), czy produkcję przeciwciał (miR-155 [77]). Ponadto biorą udział w interakcjach wirus-gospodarz (np. miR-32 [78]), jak również w hamowaniu rozprzestrzeniania się ruchomych elementów genetycznych, takich jak transpozony (klasa piRNA) [70].

Integralność mechanizmów generujących miRNA w limfocytach regulacyjnych (supresyjnych) warunkuje ich skuteczność w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że selektywny knock-out rybonukleazy Dicer w komórkach Treg Foxp3⁺ prowadzi do ich dysfunkcji, co ujawnia się odblokowaniem kontroli limfocytów efektorowych i systemową aktywacją reakcji autoimmunologicznych [79]. Wyniki badań tych wskazują, że funkcja limfocytów supresyjnych jest związana z miRNA, nie dają jednak odpowiedzi, jaki jest jej mechanizm - czy miRNA wytworzone w danej komórce działają w jej obrębie, regulując aktywność supresyjną, czy też są eksportowane poza komórki i na zasadzie parakrynej lub endokrynej wpływają hamująco na komórki docelowe.

Mechanizm wydzielania egzosomów i mikropęcherzyków jest istotnym komponentem komunikacji międzykomórkowej. Ich źródłem mogą być prawdopodobnie wszystkie komórki, w tym zarówno komórki macierzyste i leukocyty, jak i płytki krwi oraz komórki guza nowotworowego [80], wykorzystujące egzosomy do transportu

bioaktywnych lipidów, białek oraz mRNA. Komunikacja poprzez wydzielanie kwasów rybonukleinowych upakowanych w pęcherzykach błonowych została już opisana m.in. dla zarodkowych komórek macierzystych, mastocytów i komórek z tkanki guza. Zarodkowa komórka macierzysta wydziela egzosomy zawierające swoiste mRNA, transportowane następnie do komórek progenitorowych układu hematopoetycznego i stymulujące w nich określone zmiany fenotypowe [81]. Opisano też mikropęcherzyki wydzielane przez tkankę guza, transportujące mRNA do monocytów w bezpośrednim sąsiedztwie guza, aktywujące je do wydzielania cytokin nasilających wzrost guza i tłumiących odpowiedź immunologiczną [82]. Co więcej, egzosomy zawierać mogą też cząstki miRNA [83]. Postawiono hipotezę, że mikropęcherzyki obecne we krwi obwodowej w warunkach fizjologicznych zawierają miRNA, co związane jest z ich funkcją w komunikacji pomiędzy komórkami różnych tkanek i indukcji w nich zmian ekspresji genów [84]. Ostatnie doniesienia dowodzą, że miRNA transportowany między komórkami w mikropęcherzykach jest aktywny biologicznie [85]. Badano mikropęcherzyki wydzielane przez komórki ludzkiej linii monocytowo-makrofagowej (THP-1). W odpowiedzi na bodźce zapalne komórki te selektywnie upakowywały i wydzielały w pęcherzykach miR-150. MikroRNA to pełni swą funkcję poprzez supresję czynnika transkrypcyjnego c-Myb, odgrywającego rolę w regulacji proliferacji, różnicowania i migracji komórek [86]. Celem zdefiniowania wpływu miR-150 przekazywanego w pęcherzykach, inkubowano THP-1 z ludzkimi komórkami śródbłonna (HMEC-1). W komórkach tych zaobserwowano znaczny wzrost miR-150, który nie korelował ze wzrostem pre-miR150, co wskazuje na internalizację pęcherzyków, a nie pobudzenie ekspresji endogennego miR-150. Egzogenny miR-150 zmniejszał ekspresję c-Myb w komórkach-biorcach i aktywował zdolność migracji HMEC-1.

3.2 REAKCJE NADWRAŻLIWOŚCI TYPU PÓŹNEGO (DTH)

Nadwrażliwość typu późnego (DTH) jest alergiczną odpowiedzią komórkową [87]. Reakcja ta przeciwstawiana jest pozostałym trzem typom alergii według podziału Gella i Coombsa, zdominowanym przez mechanizmy humoralne. Komórkowa odpowiedź immunologiczna w DTH mediowana jest przez specyficzne limfocyty T: CD4⁺ (w przypadku uczulenia antygenami bakteryjnymi) lub rzadziej CD8⁺ (w przypadku antygenów wirusowych). Nadwrażliwość typu późnego pełni istotną rolę w obronie organizmu przed bakteriami wewnątrzkomórkowymi, między innymi takimi

jak *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis* i *Mycobacterium species*. Jak wspomniano, reakcje obserwowane w przebiegu DTH mogą być mediowane zarówno przez limfocyty Th1 CD4⁺ [88] jak i Tc CD8⁺ [89], a więc mogą stanowić model działania limfocytów efektorowych w procesach odpowiedzi komórkowej na patogeny oportunistyczne, odrzucania przeszczepów, reakcji przeszczep przeciw biorcy (GvHD), odporności przeciwnowotworowej czy w końcu niektórych procesów autoimmunologicznych.

3.2.1 NADWRAŻLIWOŚĆ KONTAKTOWA (CS)

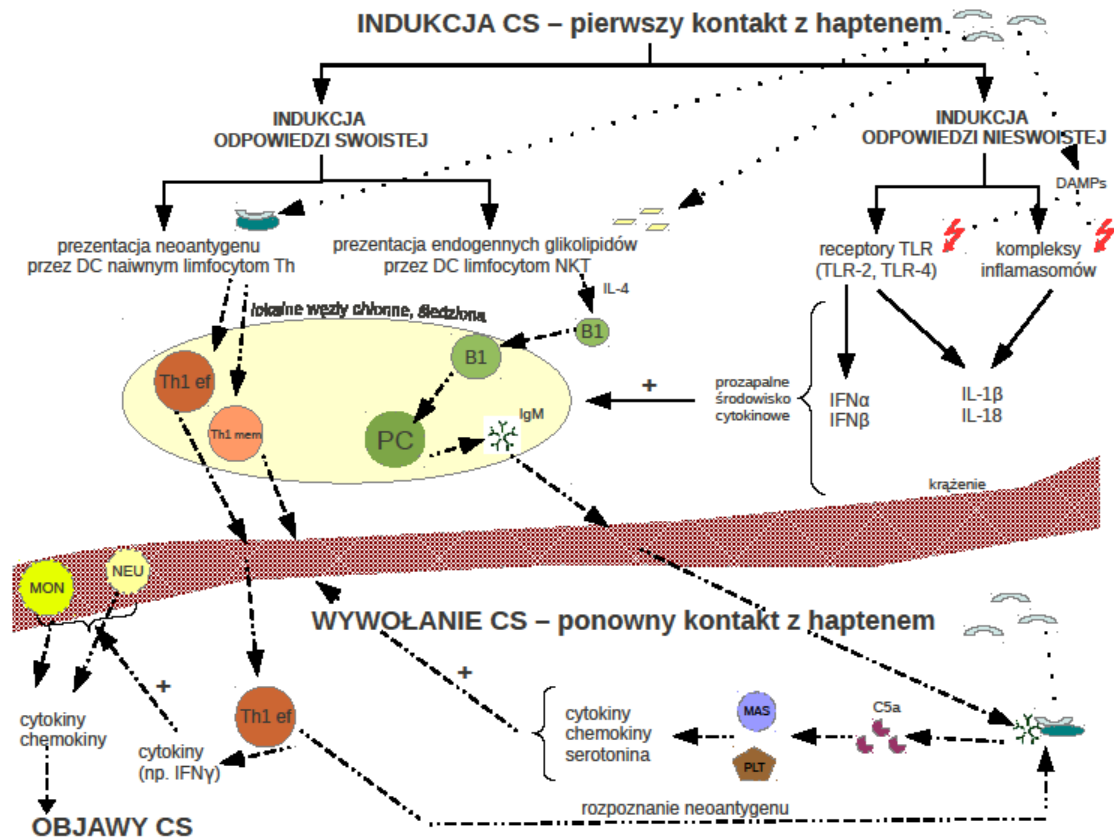
Nadwrażliwość kontaktowa (CS) jest formą nadwrażliwości typu późnego [90]. Alergia ta rozwija się po miejscowym naskórnym lub przez nabłonkowym (skóra, błony śluzowe) kontakcie z haptenami, którymi mogą być takie substancje jak związki chemiczne (np. używane w przemyśle kosmetycznym i fotograficznym), substancje naturalne (np. pentadekakatechol bluszczu trującego), leki (penicylina, chinina), czy jony metali ciężkich takich jak nikiel czy chrom. W reakcji CS wyróżnia się dwie fazy: indukcji i efektorową.

Z chwilą pierwszej depozycji haptenu na skórę komórki układu immunologicznego otrzymują dwa sygnały – sygnał antygenowy, wynikający z połączenia haptenu z białkami ustroju z powstaniem neoantygeny oraz dodatkowy sygnał stymulujący, związany ze wzmożeniem uwalniania endogennych glikolipidów [91]. Neoantygen jest pochłaniany i przetwarzany przez naskórkowe komórki dendrytyczne (komórki Langerhansa, LC), które jednocześnie zaczynają wydzielać interleukinę 1 β . Interleukina ta poprzez zmniejszenie ekspresji E-kadheryny w komórkach LC umożliwia ich oderwanie od keratynocytów i rozpoczęcie procesu migracji do lokalnych węzłów chłonnych. Ekspresja E-kadheryny jest hamowana zarówno autokrynnym oddziaływaniem IL-1 β na LC, jak i stymulowanym tą cytokiną wydzielaniem TNF α przez keratynocyty [92]. Niezbędna dla efektywnej migracji komórek Langerhansa przez barierę skórno-naskórkową i skórę właściwą jest też nasilona ekspresja określonych molekuł adhezyjnych, metaloproteinaz i receptorów chemokinowych [93]. Wspomniane wcześniej cytokiny (IL-1 β i TNF α) stymulują również proces dojrzewania naskórkowych komórek dendrytycznych - LC, które dotarły do lokalnych węzłów chłonnych są już typowymi komórkami dendrytycznymi (DC), a więc wykazują silną ekspresję antygenów MHC klasy II i molekuł kostymulujących. DC aktywnie prezentują antygen swoistym, naiwnym limfocytom

Th1, warunkując ich proliferację jako efektorowych limfocytów $TCR\alpha\beta^+CD4^+$ (Th1) fazy późnej oraz komórek pamięci immunologicznej w 3.-4. dniu po immunizacji. Oprócz właściwości łączenia się z białkami ustroju z utworzeniem neoantygeny, haptenu pobudzają także odporność wrodzoną [94]. Nikiel, będący silnym alergenem kontaktowym u ludzi, ma zdolność aktywacji TLR-4 [95]. W przypadku większości haptenu nie jest to jednak efekt bezpośredni. Odpowiedź nieswoista mediowana jest za pośrednictwem wyzwolonych przez haptenu sygnałów zniszczenia komórki (DAMPs), takich jak wolne rodniki tlenowe (ROIs) czy ATP i prowadzi do pobudzenia receptorów TLR i oligomeryzacji inflamasomów [94]. ROIs indukują w komórce rozkład kwasu hialuronowego na niskocząsteczkowe pochodne, które są rozpoznawane przez TLR-2 i TLR-4. ATP natomiast za pośrednictwem błonowego receptora P2X7 aktywuje wewnątrzkomórkowy kompleks inflamasomu. Transdukcja sygnału na obu tych szlakach prowadzi do zwiększenia uwalniania prozapalnych cytokin IL-1 β i IL-18, a pobudzenie TLR-4 dodatkowo nasila uwalnianie IFN α i IFN β . Jak wykazano w mysich modelach, delekcja genów TLR-2 i TLR-4 [96] bądź elementów inflamasomu (cząstki adaptorowej Asc, białka z rodziny receptorów Nod-podobnych Nlrp, kaspazy1 [97,98]), znoszące nieswoistą komponentę indukcji nadwrażliwości kontaktowej, prowadzi do niemożności wywołania reakcji CS lub znacznego zmniejszenia jej nasilenia [94].

Drugim komponentem fazy indukcji CS jest prezentacja endogennych glikolipidów komórkom NKT przez komórki dendrytyczne skóry właściwej w kontekście nieklasycznych antygenów MHC I, CD1d. W wyniku tej interakcji NKT wydzielają IL-4, która natychmiastowo aktywuje limfocyty B1 do migracji z jamy otrzewnowej do lokalnych węzłów chłonnych i śledziony [99]. Tam w ciągu jednej doby przekształcają się w komórki produkujące przeciwciała klasy IgM swoiste dla aktywującego je haptenu. Przeciwciała te mają zasadnicze znaczenie w fazie efektorowej CS. W miejscu ponownego wprowadzenia do organizmu haptenu tworzą z nim kompleksy immunologiczne, co prowadzi do aktywacji układu dopełniacza z uwolnieniem fragmentów C5a. Fragmenty te stymulują wydzielanie cytokin, chemokin i serotoniny przez mastocyty i płytki krwi. Reakcja ta wywołuje zwiększony napływ powstałych w fazie indukcji limfocytów efektorowych Th1 do miejsca depozycji haptenu, rozpoznania antygeny prezentowanego przez profesjonalną APC – komórkę dendrytyczną i uwalniania szeregu cytokin. Wśród nich wyróżnić można cytokiny pobudzające proliferację komórek – IL-2 i GM-CSF oraz IFN- γ i TNF- α , indukujące w

keratynocytach ekspresję MHCII i molekuł adhezyjnych ICAM oraz sekrecję cytokin: IL-1, IL-6, GM-CSF [92]. ICAM-1 wiąże receptor LFA-1 (CD11a) obecny na powierzchni komórek limfo- i mieloidalnych.



Ryc. 3.3

MECHANIZM REAKCJI NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Opis ryciny w tekście.

B1 – limfocyt B1; C5a – fragmenty C5a dopełniacza; DAMPs – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem; DC – komórki dendrytyczne; MAS – mastocyty; MON – monocyty; NEU – neutrofile; NKT – limfocyty NKT; PC – komórka plazmatyczna; PLT – płytki krwi; Th1 ef – limfocyty Th1 efektorowe; Th1 mem – limfocyty Th1 pamięci; TLR – receptory Toll-podobne

Prowadzi to do infiltracji limfocytów do naskórka oraz mobilizacji monocytów i granulocytów krwi obwodowej do miejsca toczącej się reakcji. Dodatkowo wydzielane przez keratynocyty cytokiny stymulują aktywację i proliferację komórek T oraz DC. Makroskopowo procesy fazy efektorowej manifestują się charakterystycznym zaczerwienieniem i obrzękiem, osiągającym szczyt w 24-48h po kontakcie z haptenem [23] (Ryc. 3.3).

W 1968r. reakcje alergiczne typu komórkowego zostały wspólnie zaklasyfikowane przez Gella i Coombsa do IV typu nadwrażliwości [100]. Od tego czasu wiedza na temat subpopulacji limfocytów T i mnogości procesów przez nie mediowanych poszerzyła się znacznie, doprowadzając do wydzielenia podtypów DTH. W zależności od rodzaju syntetyzowanych przez limfocyty T cytokin, różne typy komórek mogą być aktywowane i obraz kliniczny DTH manifestuje się odmiennie [101]. Typ IVa, który odpowiada klasycznym reakcjom DTH i CS, wiąże się z aktywacją makrofagów przez IFN γ i TNF α wydzielane przez limfocyty Th1. Zaktywowane makrofagi są źródłem cytokin, chemokin i cytotoksyn. W typie IVb opisuje się aktywację eozynofili przy udziale uwalnianych przez limfocyty Th2 interleukin: 4, 5 i 13 oraz eotaksyny. Typ IVd obejmuje reakcje związane z rekrutacją neutrofilii przez limfocyty T produkujące interleukinę 8 i GM-CSF. Typ IVc związany jest z cytotoksycznością komórek T, zarówno CD8⁺ jak i CD4⁺ (udział perforyny i granzymów, co prowadzi do apoptozy). Ponadto sugeruje się, że cytotoksyczność komórkowa może współuczestniczyć w mechanizmie wszystkich czterech podtypów DTH [102]. Pichler i wsp. zauważyli, że obraz kliniczny nadwrażliwości na różne leki zależy od typu komórek zaangażowanych w daną odpowiedź alergiczną, co z kolei jest wynikiem struktury i chemicznej aktywności terapeutyku [101]. Lek może zachowywać się jak hapten i w sposób kowalencyjny modyfikować białka rozpuszczalne bądź powierzchniowe komórek, prowadząc do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Drugą koncepcją jest koncepcja prohaptenu, a więc uzyskania cechy immunogenowości przez chemicznie nieaktywny (tzn. niezdolny do łączenia się z białkami) lek dopiero po jego metabolicznej obróbce w komórce. Trzecią możliwością aktywacji CS jest bezpośrednio przyłączenie leku w sposób labilny do receptora TCR bądź do cząstki MHC, uwarunkowane właściwościami fizykochemicznymi oraz przestrzenną strukturą terapeutyku. Ten mechanizm nie wymaga processingu antygeny i prowadzi do szybkiego pobudzenia limfocyta T. Opisana różnorodność procesów prowadzących do nadwrażliwości mediowanej przez limfocyty T skutkuje odmiennym obrazem klinicznym, ale również przebiega według pewnych schematów, co implikuje konieczność dokładnego badania tych procesów i daje nadzieje na terapeutyczne wykorzystanie ich znajomości w przyszłości.

Wprowadzony w 1968r. przez Ashersona i Ptaka [103] myszy model nadwrażliwości kontaktowej do dziś pozostaje podstawowym narzędziem stosowanym do badania mechanizmów funkcjonowania limfocytów T *in vivo*. W modelu tym wykorzystuje się

możliwość aktywnego uczulenia zwierząt za pomocą szeregu haptenu (np. TNP, DNCB, OX) oraz przeniesienia stanu nadwrażliwości przez komórki limfoidalne węzłów chłonnych i śledzion osobników uczulonych na syngeniczne osobniki naiwne [103]. Podobnie jak to opisano dla nadwrażliwości typu późnego na leki, nadwrażliwość kontaktowa wywołwana przez haptenu cechuje się różnorodnością przebiegu. W zależności od rodzaju haptenu stosowanego w celu indukcji uczulenia, drogi jego podania i gatunku/szczepu zwierzęcia, komórką efektorową CS nie zawsze jest klasyczny efektorowy limfocyt $CD4^+$ Th1, jak to ma miejsce w przypadku stosowania haptenu chlorku pikrylu (TNP-PCI) u myszy CBA/J. Opisano mysie modele CS, w których centralną komórką jest limfocyt cytotoksyczny Tc1 (np. uczulenie haptenu DNFB, DNCB i OX myszy szczepów C57 i Balbc) [104-106]. Ponadto wykazano, że u myszy pozbawionych genu interleukiny 17 nie dochodzi do rozwoju pełnej alergii na DNFB, z czego wnioskować można o istotnym udziale limfocytów T $CD8^+$ wydzielających IL-17 w tej nadwrażliwości [107]. U myszy pozbawionych limfocytów T i B wykazano natomiast możliwość przeniesienia CS za pomocą wątrobowych komórek NK i zależność tego procesu od cytokin: IFN γ i IL-12 [108].

3.2.1.1 REGULACJA NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Fizjologicznie, po upływie 48-72 godzin od ponownego kontaktu z haptenu reakcja CS ulega wyciszeniu za pośrednictwem uwalnianej przez makrofagi i keratynocyty prostaglandyny E, hamującej produkcję IL-1 i IL-2. Znaczącą rolę odgrywają też cytokiny supresyjne (TGF β i IL-10) wydzielane głównie przez limfocyty regulatorowe, ale również przez keratynocyty [92]. TGF β hamuje rozprzestrzenianie się stanu zapalnego oraz blokuje proliferacyjne efekty IL-1 i IL-2 [23]. IL-10 natomiast hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α) oraz poprzez zmniejszenie ekspresji MHCII na APC obniża ich zdolność do prezentacji antygenów oraz antygenowo-swoistą proliferację komórek Th1. Ponadto keratynocyty, pomimo ekspresji MHCII, nie posiadają na swej powierzchni molekuł kostymulujących, co w konsekwencji prezentacji przez nie antygenów indukuje tolerancję na drodze anergii klonalnej limfocytów efektorowych. Również enzymatyczna i komórkowa degradacja kompleksu białkowo-haptenu ma wpływ na zahamowanie CS.

Jak wspomniano, w mysim modelu CS o charakterze odpowiedzi decyduje typ haptenu i droga jego podania (w tym typ komórek używanych jako nośnik haptenu)

oraz szczep zwierząt doświadczalnych [109]. Różne komórki efektorowe warunkują odmienny przebieg reakcji nadwrażliwości, a w konsekwencji uruchamiane mechanizmy supresji mogą być zróżnicowane. W przypadku nadwrażliwości na hapteny, limfocyty supresyjne aferentne (Ts aff) CD8⁺, indukowane dożylnym podaniem znakowanych haptenem immunoglobulin [110], na drodze jeszcze nie poznanego mechanizmu hamują powstawanie limfocytów efektorowych Th1 w fazie indukcji CS. Dożylne podanie wysokiej dawki antygeny lub syngenicznych komórek znakowanych haptenem indukuje natomiast limfocyty supresyjne eferentne (Ts eff) CD8⁺ [111]. Blokują one zdolność komórek efektorowych CS do przeniesienia nadwrażliwości na syngenicznych, naiwnych biorców. Postuluje się, że ich funkcja jest realizowana za pośrednictwem czynnika supresyjnego (TsF), którego istotną komponentą może być niskocząsteczkowy RNA [112]. Ten nowy mechanizm supresji komórkowej odpowiedzi immunologicznej jest tematem niniejszej pracy.

3.2.1.1.1. Rola TsF w regulacji reakcji nadwrażliwości kontaktowej

W układzie eksperymentalnym po dożylnym podaniu myszom haptenu w formie rozpuszczalnej lub wyznakowanych nim komórek syngenicznych (erytrocyt, limfocyt, makrofag) dochodzi do indukcji stanu tolerancji, w którym niemożliwe jest wywołanie reakcji uczuleniowej na dany haptenu [113,114]. Tolerancja ta warunkowana jest przez limfocyty supresyjne eferentne, które hamują fazę efektorową reakcji CS [110]. Limfocyty myszy, które otrzymały kolejno haptenu dożylnie i naskórnym wytwarzają także *in vitro* rozpuszczalny czynnik supresyjny (TsF), który hamuje funkcję uczulonych limfocytów efektorowych CS, podobnie jak czynią to komórki Ts [114]. Indukcję TsF przeprowadzać można przy użyciu różnych haptenu (TNP, DNP, OX), a otrzymane czynniki, testowane w formie nadsączy komórek limfoidalnych lub nadsączy wyizolowanych z nich komórek T [114] wykazują specyficzność antygenową [115]. Dotychczasowe badania wykazały, że TsF składa się z dwóch komponentów [111], z których żaden osobno nie działa supresyjnie, ale ich połączenie skutkuje pełną aktywnością supresyjną. Uczulenie naskórnym indukuje limfocyty B1 do uwalniania antygenowo-swoistego komponentu TsF, będącego częścią immunoglobuliny IgM (łańcuch lekki) [91]. Druga składowa indukowana jest dwukrotną immunizacją myszy dożylnym podaniem znakowanych haptenem syngenicznych erytrocytów mysich i jest produktem limfocytów supresyjnych. Zaproponowano, że jej działanie jest związane z obecnością niewielkich fragmentów

RNA (siRNA, miRNA lub rybozemu), które jak wykazano to w innych układach mają działanie regulacyjne na funkcjonowanie genów komórki [116]. Rybonukleinowy charakter aktywnego komponentu czynnika potwierdzony został na dwóch drogach. Wykazano, że TsF jest wrażliwy na RNazę, w tym RNazę III rozkładającą dwuniciowe RNA, ale nie na DNazę i proteazy (trypsynę i proteinazę K) [112]. Ponadto przeprowadzono oczyszczanie czynnika od nadsącza z nad hodowli komórek supresyjnych (TsF SN), przez wyekstrahowaną z niego metodą Chomczyńskiego frakcję fenolowo-chloroformową mieszaniny kwasów nukleinowych DNA i RNA (TsF PCE), aż do postaci czystego RNA (TsF QRNA), uzyskanego poprzez zastosowanie chromatografii na kolumnach Qiagen. We wszystkich trzech formach TsF wykazał zdolność znaczącego zahamowania rozwoju reakcji nadwrażliwości kontaktowej. Ponadto stwierdzono, że czysty izolat DNA z TsF PCE nie wykazuje żadnych właściwości supresyjnych. Kolejnym krokiem było poznanie struktury RNA w czynniku TNP-TsF QRNA. Aktywność TNP-TsF QRNA znoszona jest przez RNazę III, co dowodzi, że aktywną supresyjnie składową jest dwuniciowy kwas rybonukleinowy. Rozdział elektroforetyczny TNP-TsF QRNA na sekwencyjnym żelu poliakrylamidowym doprowadził do uzyskania w elektroforegramie pięciu prążków, z których dwa (stanowiące faktycznie jeden duży), wykazują aktywność immunosupresyjną. Szczegółowe badania wykazały, że ten odcinek RNA ma 75-80 zasad [117], a analiza bioinformatyczna wskazuje, że badaną cząstką może być miR150 lub jego prekursor [118]. Wykazano ponadto, że egzosomy wyizolowane z nadsącza komórek produkujących TsF posiadają właściwości supresyjne. TsF może więc być cząstką krótkiego, regulacyjnego RNA (miR150), transportowanego z komórki supresyjnej do efektorowej w formie egzosomów [119].

4 CEL BADAŃ

Tematem niniejszej pracy są badania struktury i funkcji czynnika supresyjnego indukowanego w modelu zwierzęcym poprzez dożylną indukcję tolerancji u myszy szczepu CBA/J wysokimi dawkami oksazonu skoniugowanego z syngenicznymi erytrocytami oraz następującą po niej naskórną immunizacją tym samym haptenem. Cel badań był wielostopniowy.

Na wstępie ze względu na niespójne dane literaturowe przeprowadzona została ocena fenotypu efektorowych limfocytów oksazonowo-swoistych indukowanych w aktywnym uczuleniu oksazonem u myszy szczepu CBA/J.

Głównym celem badań była jednak ocena własności biologicznych czynnika supresyjnego OX-swoistego z uwzględnieniem jego produkcji i kolejnych etapów oczyszczania (ekstrakcja, rozdział chromatograficzny):

- ocena dawki czynnika supresyjnego, koniecznej do zahamowania reakcji CS w modelu *in vivo* (w transferze z uczulonymi limfocytami T) i w systemie *in vitro* (w bioteście proliferacyjnym);
- określenie swoistości antygenowej OX-TsF;
- eksperymentalne zbadanie, czy czynnik supresyjny w generowaniu sygnału hamowania reakcji nadwrażliwości kontaktowej wykazuje restrykcję MHC-zależną;
- określenie, jaki jest fenotyp limfocytów odpowiedzialnych za produkcję składowej RNA czynnika supresyjnego oraz czy dla działania kompletnego czynnika OX-swoistego konieczne są molekularne interakcje między składnikami produkowanymi przez limfocyty B1 i Ts.

W ostatnim etapie badań podjęta została próba określenia mechanizmu działania czynnika supresyjnego na komórki efektorowe CS:

- określenie wpływu czynników supresyjnych na aktywność sekrecyjną wybranych cytokin efektorowych limfocytów T o charakterze zarówno prozapalnym (IFN- γ , IL-6 i IL-17), jak i przeciwzapalnym (IL-10);
- ocena wpływu działania czynnika supresyjnego na indukcję apoptozy efektorowych limfocytów CS metodą cytofluorymetryczną.

W świetle doniesień o możliwości aktywnego wydzielania przez komórki cząstek regulacyjnego RNA upakowanych w egzosomach [84] oraz naszych wstępnych badań w systemie uczulenia innym haptenem – TNP [117], przetestowana została również hipoteza o wydzielaniu czynnika supresyjnego w

postaci egzosomów w odniesieniu do komórek supresyjnych aktywnych w systemie uczulenia oksazolnem.

5 MATERIAŁY I METODY

5.1 ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE

W doświadczeniach używano myszy wśobnych szczepu CBA/J [H2k], Balbc [H2d] i C57/BL6 [H2b] obu płci, w wieku 8-10 tygodni. Zwierzęta pochodziły z hodowli Katedry Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie oraz zwierzętarni Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA)

Zwierzęta hodowano w warunkach standardowych, skarmiano paszą i poiono wodą *ad libitum*, zgodnie z zaleceniami komisji etycznej ds. zwierząt laboratoryjnych przy UJ. Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach uzyskano zgodę Komisji Etycznej nr 28/2009 z dnia 23.04.2009 oraz nr 40/2011 z dnia 28.05.2011.

5.2 ODCZYNNIKI

DPBS (zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}), aceton, EDTA (sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczeroctowego), wodorotlenek sodu, octan sodu (wszystkie P.O.Ch.S.A., Gliwice, Polska); kwas siarkowy (VI) (PPH Standard Sp. z o. o., Lublin, Polska); oksazolon (4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one; Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA); oliwa extra vergine (Basso Fedele Figli s.r.l., Włochy); błękit trypanu (Searle Diagnostic, High Wycombe Bucks, Anglia); kwas trójnitrobenzenosulfonowy TNBSA (Eastman Chemicals, Rochester, NY, USA); podwójnie rekrytalizowany chlorek pikrylu [chlorek 2,4,6-trinitrofenylu PCI] (Chemtronix, Swannanoa, NC, USA);

kwas kakodylowy i kakodylan sodu, fenol:chloroform 5:1 pH 4,7, fenol, etanol, chloroform, bromek 3[4,5-dwumetylotiazolo-2-yl]-2,5-dwufenyltetrazolu (MTT), RNaza A (wszystkie Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Qiagen® RNA/DNA kit, woda pozbawiona RNaz (Qiagen, Valencia, CA, USA); dopełniacz króliczy liofilizowany (Biomed Lublin, Lublin, Polska); surowica płodowa cielęca FCS (Gibco Invitrogen, Nowy Jork, USA); Goat Anti-Rat IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Niemcy), marker wielkości DNA pEGFPC1-C5/Masp I (Molecular Cellular and Developmental Biology, Yale University, New Haven, CT, USA), marker wielkości niskocząsteczkowego RNA (USB Corp., Cleveland, OH, USA)

bufor TBE 10x do elektroforezy, na 1litr buforu:

121,14g TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 3,72g Na₂EDTA, 51,32g kwasu borowego (oba P.O.Ch.S.A., Gliwice, Polska)
agaroza (Biorad, Hercules, CA, USA), bromek etydyny (American Bioanalytical, Natick, MA, USA)
zestawy do oznaczania cytokin metodą ELISA: BD OptEIA™ Set Mouse IFN-γ, BD OptEIA™ Set Mouse IL-6, BD OptEIA™ Set Mouse IL-10 (wszystkie BD Biosciences, San Diego, CA, USA) oraz mouse IL-17A ELISA Ready-Set-Go! (eBioscience, San Diego, CA, USA)
Zestaw do cytofluorymetrycznej oceny apoptozy AnnexinV-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)

5.3 LINIE KOMÓRKOWE I PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Linia komórkowa HT-2 (ATCC, Manassas, VA, USA)

Przeciwciała monoklonalne anti-CD4, wyizolowane metodą chromatografii powinowactwa na kolumnach ProtA Seph4B w Katedrze Immunologii UJ CM z supernatantów hybrydomy GK 1.5 Rat IgG2b anti-mouse CD4 (dzięki uprzejmości Yale University, New Haven, CT, USA).

Przeciwciała monoklonalne anti-CD8, wyizolowane standardową (j.w.) metodą chromatografii powinowactwa w Katedrze Immunologii UJ CM z supernatantów hybrydomy TIB105 Rat IgG2b anti-mouse CD8 (dzięki uprzejmości Yale University, New Haven, CT, USA).

Przeciwciała monoklonalne anti-CD3 znakowane APC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)

5.4 PODŁOŻA HODOWLANE

podłoże RPMI 1640 (CytoGen GmbH, Sinn, Niemcy)

bezbiałkowe podłoże MDM (przygotowywane w Katedrze Immunologii UJ CM):

podłoże RPMI 1640 (CytoGen GmbH, Sinn, Niemcy) suplementowane:

5mM 2-mekaptoetanol 100x, 2mM glutamina GlutaMAX 100x, 10mM Hepes - N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic Acid (wszystkie Gibco Invitrogen, Nowy Jork, USA); 100mM kwas pirogronowy, 0,1mM mieszanina aminokwasów NEAA - MEM Non-essential Amino Acid Solution 100X (oba Sigma-Aldrich CO LTD, Irvine, Wielka Brytania); gentamycyna (100mg/1000ml MDM) (KRKA, Novo Mesto, Słowenia) [120]

podłoże do hodowli linii HT-2

podłoże RPMI 1640 (CytoGen GmbH, Sinn, Germany) suplementowane:
5mM 2-mekaptoetanol, 2mM glutamina GlutaMAX 100x, 10mM HEPES 100X
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic Acid, 5% surowica płodowa
cielęca FCS (wszystkie Gibco Invitrogen, Nowy Jork, USA); 0,025M glukoza,
17,8mM dwuwęglan sodu (oba P.O.Ch.S.A., Gliwice, Polska); gentamycyna
(100mg/1000ml) (KRKA, Novo Mesto, Słowenia); ludzka rekombinowana IL-2
(rhIL-2) (100U/ml) (Sigma-Aldrich CO LTD, Irvine, Wielka Brytania)

5.5 APARATURA

Komora laminarna do pracy jałowej (Heraeus Instruments, Hannau, Niemcy);
wirówka z chłodzeniem (Heraeus Sepatech, Osterode, Niemcy); mikroskop świetlny
Jenaval (Carl Zeiss, Jena, Niemcy); komora Burkera do liczenia komórek (Fein-
Optik, Bad Blankenburg, Niemcy); śruba mikrometryczna (Mitutoyo, Japonia);
mieszadło hematologiczne (Wigo, Pruszków); spektrofotometr UV/VIS (Infinite M200
Tecan, Männedorf, Szwajcaria); ultrawirówka (Beckman Coulter, typ Optimal L-100
XP z rotorem SW32 Ti; Brea, CA, USA); cytofluorymetr Becton Dickinson FACS
Canto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); aparat do elektroforezy (EASY-
CAST™ Electrophoresis System, model nr B1A, Owl Scientific Inc., Owl Separation
System, Woburn, MA, USA); pipety automatyczne (FinPipet); jałowy sprzęt
jednorazowy wykonany z polipropylenu: próbówki 15ml, 50ml (Sarstedt, Tuttlingen,
Niemcy); butelki polistyrenowe hodowlane, płytki hodowlane (TPP Techno Plastic
Products AG, Trasadingen, Szwajcaria); płytki 96-cio dołkowe do testów ELISA
(Corning, Nowy Jork, USA), próbówki do ultrawirowania (Beckman Centrifuge Tubes
no. 344058; Beckman Coulter, Brea, CA, USA); sączi 0,45µm i 0,22µm (Millipore,
Billerica, MA, USA); sączi 0,1µm (Pall Life Sciences, NY, USA)

5.6 PRZYGOTOWANIE KOMÓREK I BIAŁEK

5.6.1 IZOLACJA LIMFOCYTÓW WĘZŁÓW CHŁONNYCH I ŚLEDZION

Węzły chłonne pachowe i pachwinowe oraz śledziony dawców komórek
limfoidalnych pobierano do zimnego (4°C) podłoża RPMI. Następnie narządy
rozcierano delikatnie między dwoma mikroskopowymi szkiełkami podstawowymi ze
szlifem, uzyskując zawiesinę komórkową. Zawiesina ta przesączona była przez
sącze nylonowy o średnicy oczek 80µm, a następnie kilkakrotnie przepłukana w

RPML, a ostatecznie zawieszona w DPBS i używana w dalszych procedurach (hodowle i transfery komórkowe).

5.6.2 ZNAKOWANIE ERYTROCYTÓW HAPTENAMI (OX i TNP)

Krew pobierano na antykoagulant (0,1% EDTA), poprzez skrwawianie (w narkozie wziewnej 30% Isoflurane) naiwnych syngenicznych dawców. Po zwirowaniu krwinki czerwone oddzielono od osocza.

Wstępnie przygotowano roztwór oksazolonu, rozpuszczając 10mg OX w 1ml alkoholu absolutnego (96%), a następnie wkraplając tak otrzymany roztwór do 20ml ogrzanego do ok.70°C DPBS. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej roztwór ten wykorzystano do wyznakowania 1ml upakowanych (100%) mysich erytrocytów, uprzednio zawieszonych w 9ml DPBS (10% mRBC). Krwinki znakowano przez 10 minut, w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, na mieszadle hematologicznym, po czym niezwiązany z erytrocytami nadmiar haptenu odpłukano w DPBS z 1% FCS, a następnie kilkakrotnie w czystym DPBS. Zawiesinę krwinek znakowanych OX (OX-mRBC) doprowadzono do koncentracji 10% i użyto do indukcji tolerancji dawców OX-TsF.

Procedurę znakowania TNP-mRBC wg Rittenberga i Pratta przedstawiono i opisano w pozycji [114]. Do znakowania 1ml upakowanych erytrocytów użyto 40mg TNP rozpuszczonego w 7ml buforu kakodylanowego (pH=7) i mieszaninę tą inkubowano przez 20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej na mieszadle hematologicznym [114], a następnie postępowano jak w przypadku procedury uzyskiwania OX-mRBC.

5.6.3 ZNAKOWANIE BIAŁEK OKSAZOLNEM

Mysią gamma-globulinę (MGG) izolowano z surowicy metodą strącania z siarczanem amonowym oraz kwasem kaprylowym [121] i poddano znakowaniu oksazolonom.

Wstępnie przygotowano 5mg/ml roztwór MGG w 0,05M buforze EDTA (pH 8,4) oraz 1% roztwór oksazolonu w 96% alkoholu. Otrzymane roztwory połączono w proporcji 0,75ml oksazolonu na 25ml białka, powoli wkraplając roztwór haptenu do białka i znakowano w temperaturze pokojowej, w ciemności na rolerze przez noc. W celu wychwycenia nadmiaru niezwiązanego haptenu następnego dnia przeprowadzono dializę otrzymanego roztworu do DPBS z 1% natywną surowicą FCS, a następnie roztwór OX-MGG dializowano wobec czystego DPBS. Stosunek molowy białka do

haptenu (OX) wyliczono po oznaczeniu ekstynkcji przy długości fali 280nm (charakterystycznej dla białka) oraz 330nm (swoistej dla oksazolonu) [122], przyjmując, że 1M OX wykazuje absorbancję równą 24000 [123].

5.7 PRODUKCJA I OCZYSZCZANIE OX-TsF [114] (Ryc. 5.1)

5.7.1 IMMUNIZACJA DOŻYLNNA I NASKÓRNA

W celu uzyskania kompletnego czynnika OX-TsF, mysich dawców tego czynnika immunizowano dwukrotnie (w dniu 0. i 4.), dożylnym podaniem 10% syngenicznych erytrocytów znakowanych oksazolonem (OX-mRBC, metodyka w punkcie 5.6.2) w ilości 200µl/biorcę. Następnie, w 8. dniu dawców tych uczulono naskórną 3% roztworem OX w alkoholu absolutnym, aplikowanym na ogoloną skórę brzucha oraz łapy w ilości 150µl/biorcę.

Alternatywnie stosowano dwie grupy dawców, uczulanych tylko dożylnie, bądź tylko naskórną. Zwierzęta te posłużyły do otrzymania odpowiednio komponentu RNA oraz białkowego czynnika supresyjnego.

Do doświadczeń badających swoistość antygenową czynników supresyjnych przygotowano dodatkowo czynnik supresyjny swoisty dla haptenu TNP. Dawców immunizowano analogicznie do dawców OX-TsF, w pierwszym etapie podając dwukrotnie *i.v.* po 200µl 10% TNP-mRBC (w 0. i 4. dniu), a następnie nakładając (w 8. dniu) na ogoloną skórę brzucha oraz łapy po 150µl 5% roztworu PCI w mieszaninie acetonu i alkoholu 96% (w stosunku 1:3).

Kontrolny czynnik Sham-F uzyskiwano według analogicznej procedury, jednak bez użycia haptenu, t.j. myszy dwukrotnie szczepiono dożylnie 10% syngenicznymi nieznakowanymi erytrocytami, a następnie nakładano im na ogoloną skórę brzucha mieszaninę acetonu i alkoholu 96%.

5.7.2 HODOWLA KOMÓREK LIMFOIDALNYCH I ZBIÓR NADSĄCZY

W dniu 11. dawców OX-TsF poddano narkozie i zabito przez dyslokację kręgosłupa szyjnych i pobrano od nich węzły pachowe, pachwinowe oraz śledziony. Z otrzymanych narządów wyizolowano komórki limfoidalne (Materiały i Metody, punkt 5.6.1), które następnie zawieszono w koncentracji 2×10^7 komórek/ml w bezbiałkowym podłożu MDM i hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po 48h nadsącz z nad hodowli zebrano, zwirowano przy 700g przez 10 minut, osad odrzucono (usunięcie żywych oraz martwych komórek). Nadsącz ponownie

zwirowano, przy 3000g w ciągu 30 minut. Otrzymany OX-TsF SN był bezpośrednio używany do dalszych testów, przechowywany w temperaturze -20°C bądź służył do dalszego oczyszczania OX-TsF.

Jednocześnie produkowano kontrolny czynnik negatywny (NF), otrzymywany jako nadsącz hodowli (j.w.) komórek limfoidalnych naiwnych dawców.

5.7.3 IZOLACJA EGZOSOMÓW

Egzosomy izolowane były zarówno ze świeżego, jak i uprzednio zamrożonego nadsączu hodowli komórek limfoidalnych dawców OX-TsF, a także z nadsączu hodowli komórek limfoidalnych dawców naiwnych (źródło kontrolnego czynnika negatywnego, NF). Posłużono się zmodyfikowaną metodą wg Théry et. al. (2006) [124].

Wstępnie nadsącz zwirowano przy przyspieszeniu kolejno 700g przez 10 minut oraz 3000g przez 30minut, w temperaturze 4°C . Etap ten pozwala na usunięcie martwych komórek oraz komórkowego debris, które po każdym wirowaniu odrzucane są w postaci pelety. Dodatkowo przeprowadzono oczyszczanie tak otrzymanych supernatantów metodą ultrafiltrowania, za pomocą sączenia z użyciem sączków o średnicy oczek kolejno: $0,45 \rightarrow 0,22 \rightarrow 0,1 \mu\text{m}$.

Tak przygotowany nadsącz poddany został procedurze ultrawiwiania, przy prędkości 100 000g przez 70minut, w temperaturze 4°C . Nadsącz odrzucono, a peletę odpłukano w DPBS i powtórnie poddano ultrawiwianiu (100 000g, 70min, 4°C).

Ostateczny supernatant odrzucono, a uzyskaną peletę zawieszono w małej ilości DPBS (~1/100 objętości supernatantu użytego do izolacji egzosomów) i testowano w modelu nadwrażliwości kontaktowej.

5.7.4 EKSTRAKCJA MIESZANINĄ FENOL-CHLOROFORM

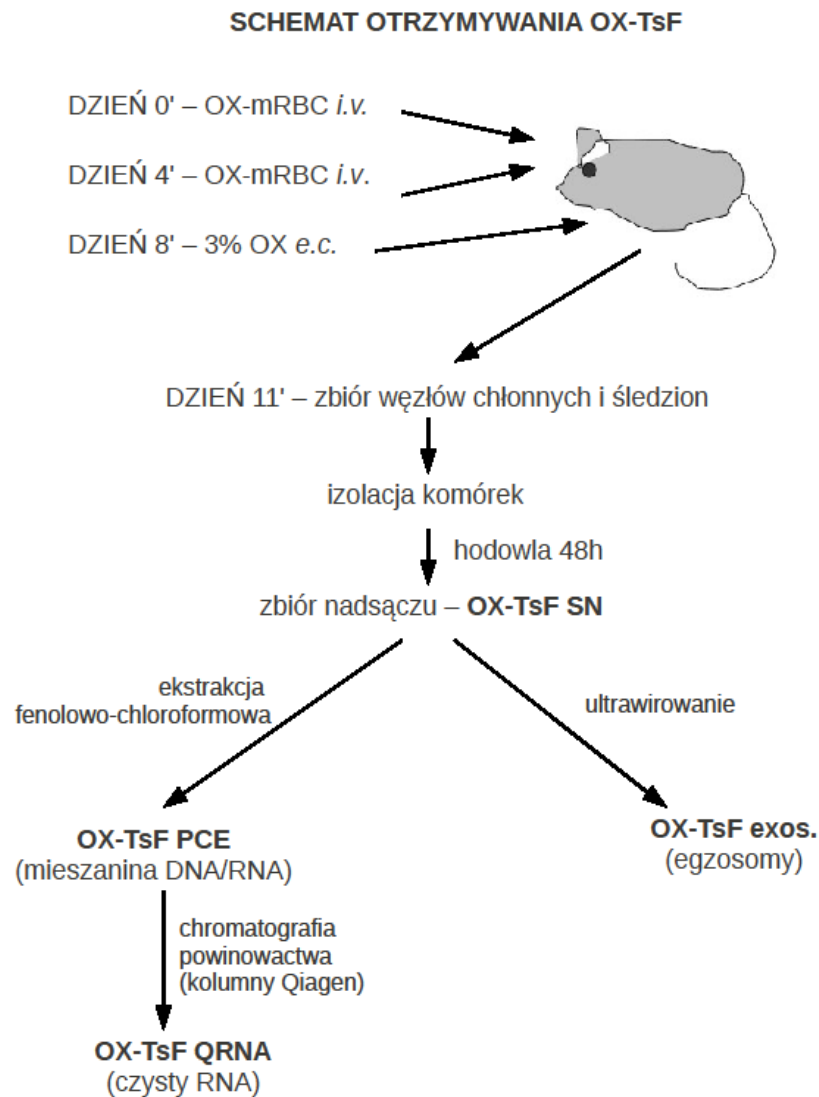
Czynnik supresyjny poddano ekstrakcji wg Chomczyńskiego [125].

OX-TsF SN zmieszano z równą ilością mieszaniny fenol:chloroform (5:1, pH 4,7), wytrząsano przez 2 minuty i poddano wirowaniu przy 2500g, w temperaturze 4°C , przez 20minut. Otrzymano 2 frakcje; górną - wodną, zawierającą DNA i RNA, oraz dolną - fenolowo-chloroformową, do której zostały wyekstrahowane białka oraz zanieczyszczenia, np. barwnik. Frakcję wodną zebrano i poddano powtórnej ekstrakcji z mieszaniną fenol-chloroform (5:1, pH 4,7), tym razem w stosunku 1:0,66.

Frację wodną zebrano i w celu wytrącenia kwasów nukleinowych dodano 3M octan sodu (w ilości 0,1 objętości fazy wodnej) oraz 96% etanol (w ilości 3-krotnej objętości frakcji wodnej i octanu sodu), a mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze -20°C . Następnego dnia całość wirowano (4000g, przez 35 minut, w temperaturze 4°C). Supernatant odrzucono, osad rozpuszczono w wodzie destylowanej i poddano reekstrakcji z fenolem (pH 8), w stosunku 1:1. Otrzymaną po wirowaniu (4000g, 20 minut, w temperaturze 4°C) frację wodną zebrano i ekstrahowano chloroformem, dodanym w ilości 1/3 objętości frakcji wodnej, a następnie wirowano (4000g, 10 minut, w temperaturze 4°C) w celu usunięcia zanieczyszczeń próbki, jak i pozostałości fenolu. Kwasy nukleinowe obecne we frakcji wodnej ponownie zostały poddane strącaniu z octanem sodu i alkoholem oraz inkubacji przez noc (j.wcz.), po czym próbkę wirowano (4000g, 35 minut, w temperaturze 4°C), supernatant odrzucono a osad (zawierający RNA i DNA) przepłukano 75% etanolem (usuwając octan) i rozpuszczono w wodzie destylowanej wolnej od RNaz. Czystość otrzymanego ekstraktu fenolowo-chloroformowego OX-TsF (OX-TsF PCE) oceniono poprzez spektrofotometryczny pomiar absorbancji przy długościach fali 260 oraz 280nm. Uzyskany stosunek absorbancji 260/280, wyższy od 1,7, uznawano za właściwe oczyszczenie kwasów nukleinowych z kontaminacji białkowej.

5.7.5 CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA (KOLUMNY QIAGEN)

Ekstrakt fenolowo-chloroformowy OX-TsF, jak i NF oczyszczano do postaci czystego RNA (QRNA) na kolumnkach chromatograficznych, zgodnie z instrukcją producenta Qiagen RNA/DNA kit, numer katalogowy 14162.



Ryc. 5.1
SCHEMAT INDUKCJI I OCZYSZCZANIA CZYNNIKA SUPRESYJNEGO
SWOISTEGO DLA NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ NA OKSAZOLON

5.7.6 ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ CZYNNIKÓW SUPRESYJNYCH LIMFOCYTÓW T NA ŻELU AGAROWYM

2,5% żel do elektroforezy otrzymano przez rozpuszczenie 7,5 gramów agarozы w 300ml uprzednio przygotowanego buforu TBE. Roztwór agarozы kilkakrotnie doprowadzono do wrzenia w kuchence mikrofalowej, po czym po ostudzeniu do ok. 50°C dodano 15µl bromku etydyny, stosowanego w stężeniu 10mg/ml. Żel wylano do komory aparatu z nałożonym w celu utworzenia studzienek startowych grzebieniem.

Po zastygnięciu agarozы komorę uzupełniono buforem startowym TBE, a grzebień usunięto.

Rozdziałowi elektroforetycznemu poddano ekstrakty fenolowo-chloroformowe OX-TsF, TNP-TsF oraz NF, a także ich frakcje DNA i RNA, otrzymane w wyniku rozdziału chromatograficznego na kolumnach Qiagen. Do odpowiednich studzienek nakładano po ok. 10µl próbki, zawierającej odpowiednio rozcieńczony (od 0,5 do 1µg) badany czynnik bądź jego frakcję w znanym i stałym pomiędzy próbkami stężeniu oraz 10x stężone: bufor TBE oraz barwnik barwiący agarozę.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w czasie 25 minut przy napięciu 110V i natężeniu 50mA. Elektroforezę przeprowadzono względem standardu wielkości. Odczytu rozdziału dokonywano w UV, a obraz fotografowano i poddano obróbce programem Photoshop.

5.8 TESTY NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

5.8.1 AKTYWNE UCZULENIE HAPTENEM W MODELU NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ U MYSZY

W modelu tym uczulenie następuje w ciągu 4-7 dni po depozycji haptenu na ogoloną skórę brzucha. W tym czasie następuje indukcja haptenu-swoistych limfocytów efektorowych. Ponowna aplikacja tego samego haptenu (challenge) na małżowiny uszne powoduje po 24-48h od challenge ich obrzęk. Wielkość obrzęku obliczana jest jako różnica między grubością małżowiny, zmierzoną za pomocą śruby mikrometrycznej, przed challenge i po nim, a wyrażana jest w jednostkach $U \times 10^{-2} \text{mm}$.

W modelu nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon do uczulenia stosuje się 3% roztwór tego haptenu w alkoholu 96%, nakładany w ilości 150µl na ogoloną skórę brzucha oraz łapy, a do wywołania reakcji CS (challenge) – 0,4% roztwór oksazolonu w mieszaninie oliwy i acetonu (1:1), w ilości po 10µl na obie powierzchnie obu uszu.

5.8.2 ADOPTYWNY TRANSFER NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Nadwrażliwość kontaktową przenieść można za pomocą limfocytów efektorowych od uczulonych dawców na naiwnych, syngenicznych biorców, tak że już pierwszy bezpośredni kontakt z haptenu (w momencie challenge) wywoła u tych zwierząt reakcję alergiczną. Komórki efektorowe przed ich dożylnym transferem poddawać można manipulacjom *in vitro*, takim jak inkubacja z czynnikiem supresyjnym bądź

selekcja negatywna lub pozytywna z użyciem przeciwciał, stąd jest to podstawowe narzędzie badawcze stosowane w niniejszej pracy.

Do transferu CS używano mieszaniny komórek węzłów chłonnych (2/3 transferowanych komórek) i śledzion (1/3 transferowanych komórek) (Materiały i Metody, punkt 5.6.1) uczulonych dawców w ilości 7×10^7 komórek w przeliczeniu na syngenicznego biorcę.

Wynik reakcji nadwrażliwości kontaktowej obrazuje przyrost grubości małżowiny usznej – różnica między pomiarem bazalnym, wykonanym przed transferem, a pomiarem w 24-48h po powtórny kontakt z haptenem (challenge) (Materiały i Metody, 5.8.1). W każdym doświadczeniu wykorzystującym test nadwrażliwości kontaktowej wyodrębnia się obok grup badanych grupę kontroli negatywnej oraz kontroli pozytywnej. Kontrola negatywna to grupa zwierząt naiwnych, u których dokonano jedynie kontrolnego nałożenia haptenu na małżowinę uszną (challenge), bez wcześniejszego transferu komórek. Wielkość nieswoistego opuchnięcia obserwowanego w tej grupie odejmowana jest każdorazowo od wartości obrzęku dla grup badanych oraz kontroli pozytywnej. Kontrolę pozytywną transferu stanowią biorcy limfocytów uczulonych, których nie poddawano *in vitro* żadnym manipulacjom, a obrzęk małżowiny usznej u tej grupy zwierząt, po odjęciu wartości kontroli negatywnej, traktujemy jako 100% odpowiedzi CS w transferze. Odpowiedź CS grup badanych jest porównywana do kontroli pozytywnej i wyrażana w standardowych jednostkach CS lub procentach odpowiedzi pozytywnej. Jeśli odpowiedź CS ulega zahamowaniu, to supresja ta może być wyrażona w procentach i jest ona procentową różnicą pomiędzy odpowiedzią w grupie kontroli pozytywnej a grupie badanej, w której zaobserwowano zahamowanie reakcji CS [103].

5.8.3 TEST SUPRESJI NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Supresję CS wywoływano przez inkubację komórek efektorowych bezpośrednio przed transferem z zawiesiną komórek supresyjnych (4×10^7 komórek supresyjnych/ 7×10^7 komórek efektorowych) lub z badanym czynnikiem supresyjnym w ilościach zależnych od stopnia oczyszczenia czynnika: supernatant OX-TsF 3ml/ 7×10^7 komórek efektorowych, ekstrakt fenolowo-chloroformowy OX-TsF 32µg/ 7×10^7 komórek efektorowych, czyste RNA OX-TsF 6µg/ 7×10^7 komórek efektorowych. Inkubację przeprowadzano w łaźni wodnej (temp. 37°C), przez 30

minut, a następnie komórki odpłukiwano w MDM. Osad komórek zawieszano w DPBS i przesączało przez sączone nylonowy bezpośrednio przed ich transferem. Zahamowanie supresji CS uzyskiwano poprzez łączną inkubację (40 minut, łaźnia wodna temp. 37°C) komórek efektorowych, komórek supresyjnych/czynnika supresyjnego oraz RNazy A. W celu zniesienia funkcji komórek supresyjnych enzym ten stosowano w 5-krotnym nadmiarze, w stosunku do wymaganej minimalnej ilości 50µg/biorcę. W przypadku ekstraktu fenolowo-chloroformowego zastosowano 9µg RNazy na każdy mikrogram czynnika. Minimalne stężenie RNazy usuwające aktywność biologiczną wyznaczono *in vitro* poprzez elektroforezę trawionego standardowego RNA rybonukleazą A.

5.9 SELEKCJA NEGATYWNA KOMÓREK

Do negatywnej selekcji komórek użyto przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciw markerom powierzchniowym charakterystycznym dla głównych subpopulacji limfocytów T oraz dopełniacza króliczego. Przeciwciała monoklonalne stosowano w ilości 100µg/10⁸ komórek. Dopełniacz, zgodnie z zaleceniem producenta, wstępnie rozcieńczano DPBS (w stosunku 1:24) i używano w ilości 1ml/10⁷ komórek. Komórki poddawane selekcji negatywnej inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami oraz dopełniaczem przez 45minut, w temperaturze 37°C, w łaźni wodnej. Następnie mieszaniny wirowano przy 1200rpm przez 7 minut, nadsącz odrzucano. Komórki przesączało, przeliczano i zawieszano w DPBS.

5.10 SELEKCJA POZYTYWNA KOMÓREK

Do pozytywnej selekcji komórek użyto mikroziarenek paramagnetycznych opłaszczonych kozimi przeciwciałami anty-szczurzymi. Przeciwciała te wiążą łańcuchy ciężkie i lekkie IgG monoklonalnych przeciwciał anty-CD8, którymi uprzednio opłaszczano komórki limfoidalne. Pozytywnej selekcji dokonano zgodnie z protokołem producenta mikroziarenek MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Niemcy).

5.11 OZNACZENIA IMMUNOFLUORESCENCYJNE

5.11.1 HODOWLA KOMÓREK

Komórki efektorowe CS uzyskiwano uczulając ich dawców oksazolonem naskórnym (Materiały i Metody, punkt 5.7.1). Zawiesinę komórek w koncentracji 10^6 komórek/ml podłoża MDM hodowano w obecności antygenu OX-MGG (100 μ g/ml) na płytkach płaskodennych, w dołkach w objętości 2ml. W celu zbadania wpływu czynnika supresyjnego na indukcję apoptozy komórek efektorowych CS, do wybranych dołków dodawano OX-TsF w postaci PCE (5 μ g/ml) lub egzosomów (25 μ l/ml) bądź kontrolnie odpowiednio NF PCE i egzosomy czynnika Sham-F. Kontrolę stanowiły komórki efektorowe hodowane w MDM jedynie w obecności OX-MGG.

Komórki kontrolne hodowano w sześciu dołkach, grupy badane natomiast w triplikatach. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Nadsącza zbierano po 24h hodowli.

5.11.2 PREPARATYKA ZNAKOWANIA KOMÓREK DO OZNACZEŃ W CYTOFLUORYMETRZE PRZEPŁYWOWYM

W celu określenia indukcji apoptozy limfocytów efektorowych, uzyskane z hodowli (Materiały i Metody, punkt 5.11.1) komórki znakowano odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3 sprzęgniętymi z barwnikiem APC, sprzężoną z pochodną fluoresceiny (FITC) aneksyną V (przyłączającą się do komórek apoptotycznych) oraz jodkiem propidyny, wnikałym do wnętrza martwych komórek i barwiącym ich DNA na czerwono (marker nekrozy lub późnej apoptozy). Do analizy użyto cytofluorymetr BD FACS Canto™ II z oprogramowaniem FACSDiVa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

5.12 BADANIE AKTYWNOŚCI SEKRECyjNEJ KOMÓREK

5.12.1 HODOWLA KOMÓREK

Komórki efektorowe CS uzyskiwano uczulając ich dawców oksazolonem naskórnym (Materiały i Metody, punkt 5.7.1). Zawiesinę komórek (w koncentracji 10^6 komórek/ml podłoża MDM) hodowano w obecności antygenu OX-MGG (100 μ g/ml) na 24-dołkowych płytkach płaskodennych, w objętości 2ml. W celu zbadania wpływu czynnika supresyjnego na aktywność cytokinotwórczą komórek efektorowych CS, do wybranych dołków dodawano OX-TsF w postaci PCE (5 μ g/ml), QRNA

(3 μ g/7x10⁷komórek) lub egzosomów (25 μ l/ml) bądź analogiczne stężenia odpowiednich form NF (PCE, QRNA, egzosomy). Kontrolę stanowiły komórki efektorowe hodowane w MDM jedynie w obecności antygenu OX-MGG.

Wszystkie grupy przygotowano w trzech powtórzeniach. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂, suplementując 5% FCS w 2. godzinie (czas wymagany do aktywacji komórek czynnikami TsF). Nadsącza zebrano po 24h (do oznaczeń IL-6 i IFN γ) oraz po 48h (do oznaczeń IL-10 oraz IL-17).

5.12.2 OZNACZANIE CYTOKIN METODĄ IMMUNOENZYMATYCZNĄ

Ilościowe oznaczenie cytokin przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną ELISA z użyciem odpowiednich swoistych dla cytokin przeciwciał oraz swoistych przeciwciał II-rzędowych znakowanych enzymem, z wywołaniem reakcji barwnej z użyciem chromogenu swoistego dla enzymu i jej oceną spektrofotometryczną. Podstawą oceny poziomów cytokin jest proporcjonalność wartości absorbancji chromogenu do stężenia cytokin.

Aktywność cytokinotwórczą badanych komórek oznaczono metodą ELISA, zgodnie z protokołem producenta odpowiednich zestawów.

96-cio-dołkowe płaskodenne płytki o silnej adsorbcji białka pokryto przeciwciałem wiążącym i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia wszystkie dołki wypłukano, a miejsca na płytce, które nie związały Ab zablokowano roztworem 1% FCS w DPBS. Po odpłukaniu na płytkę nakładano odpowiednie rozcieńczenia próbki standardowej oraz badanych. Po inkubacji płytki ponownie odpłukiwano i do wszystkich dołków dodawano biotynylowane przeciwciało II-rzędowe, inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, odpłukiwano, a następnie do dołków dodawano peroksydazę sprzężoną ze streptawidyną. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę odpłukano i celem wywołania reakcji barwnej, do wszystkich dołków dodano substrat (chromogen) specyficzny dla zastosowanego enzymu (TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna i H₂O₂). Po odpowiednim czasie (wymaganim do rozwinięcia reakcji barwnej) reakcję enzymatyczną zatrzymywano kwasem siarkowym (VI) i w przeciągu 30 minut dokonywano pomiaru absorbancji przy $\lambda=450\text{nm}$. Oznaczona wartość absorbancji chromogenu jest proporcjonalna do stężenia cytokin, które wyliczane jest w oparciu o krzywą standardową.

5.13 OCENA AKTYWNOŚCI OX-TSF *IN VITRO*

Test MTT jest kolorymetrycznym testem stosowanym do oceny proliferacji komórek *in vitro*. Linia komórkowa HT-2 do podziałów wymaga interleukiny-2. Wykorzystywany w teście barwnik MTT metabolizowany jest do formazanów w mitochondriach proliferujących komórek HT-2, a więc tych z zachowaną sygnalizacją związaną ze wspomnianą cytokiną [126]. Komórki HT-2 hodowane są w podłożu wzbogaconym IL-2 (100U/ml) oraz m.in. glukozą i FCS (Materiały i Metody, punkt 5.4). Przed testem *in vitro* komórki są odpłukiwane od IL-2, a następnie nakładane na płytkę testową w ilości 4×10^4 /dołek. Aktywność ekstraktów czynników supresyjnych w systemie *in vitro* przejawia się zahamowaniem proliferacji komórek HT-2 [127]. Negatywną kontrolę testu stanowią komórki HT-2 hodowane bez IL-2, pozytywną natomiast te same komórki suplementowane 3U/ml IL-2. Badane czynniki testowane są w postaci nierozcieńczonej oraz w seriach rozcieńczeń 3-krotnych: 3x, 9x oraz 27x, z którymi hodowane są komórki HT-2. Wynik testu oceniany jest kolorymetrycznie, poprzez pomiar absorpcji formazanów przy $\lambda_{\max}=570\text{nm}$, co jest proporcjonalne do aktywności proliferacyjnej komórek linii HT-2. Punktem odcięcia w teście jest zahamowanie 50% proliferujących komórek, wyznaczane względem wartości absorpcji formazanów uzyskanych dla kontroli negatywnej i pozytywnej. Efekt ten oceniany jest w zależności od stopnia oczyszczenia badanych czynników (nadsącz, ekstrakt fenolowo-chloroformowy, czyste RNA) i wyrażany jako minimalne stężenie czynnika wystarczające dla uzyskania efektu 50% zahamowania proliferacji HT-2.

5.14 STATYSTYCZNE OPRACOWANIE WYNIKÓW

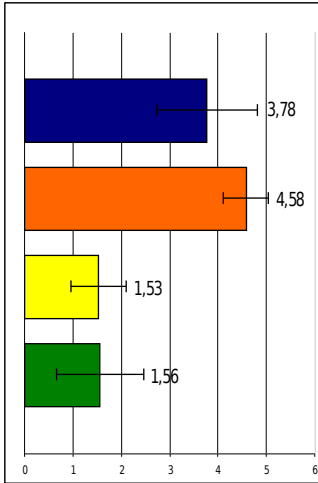
Wyniki doświadczeń przedstawiano jako średnie arytmetyczne dla odpowiednich grup \pm odchylenie standardowe. Obliczenia statystyczne wykonywano przy pomocy programów Microsoft Excel 2003 (Microsoft) oraz Statistica 9 (StatSoft Polska). Statystyczną istotność otrzymanych wyników oceniano, po sprawdzeniu założenia jednorodności wariancji, z wykorzystaniem analizy wariancji ANOVA. Do porównań międzygrupowych jako testu *post-hoc* używano testu Tukeya, natomiast do porównań grup badanych z grupą kontrolną – testu Dunetta. We wszystkich przypadkach za znamienne statystycznie uznano analizy, dla których $p < 0,05$.

6 WYNIKI

6.1 BADANIE FENOTYPU LIMFOCYTÓW EFEKTOROWYCH INDUKOWANYCH OKSAZOLONEM W AKTYWNYM UCZULENIU U MYSZY SZCZEPU CBA/J

Rozwój nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon indukowany jest u myszy naskórną immunizacją roztworem tego haptenu (Materiały i Metody, 5.8.1). Komórki limfoidalne węzłów chłonnych i śledzion (komórki efektorowe CS, Tef), pobrane w 4. dniu po uczuleniu, zdolne są do przenoszenia reakcji na naiwnych, syngenicznych biorców. Zjawisko to nazywane jest biernym (adoptywnym) transferem nadwrażliwości kontaktowej (Materiały i Metody, 5.8.2). Wywołanie reakcji CS u myszy-biorców komórek efektorowych następuje już po pierwszym kontakcie z antygenem aplikowanym podczas challenge. W celu określenia fenotypu komórek przenoszących CS na oksazolon u myszy szczepu CBA/J, komórki limfoidalne lokalnych węzłów chłonnych poddano selekcji negatywnej z udziałem przeciwciał monoklonalnych oraz dopełniacza (Materiały i Metody, 5.9).

W teście nadwrażliwości kontaktowej wykazano, że wyeliminowanie komórek CD8⁺ z puli komórek limfoidalnych znosi ich zdolność do przeniesienia CS w badanym układzie (Ryc. 6.1.1, grupy C i D) (wielkość reakcji odpowiednio: $1,5 \pm 0,56$ i $1,6 \pm 0,47$). Eliminacja komórek CD4⁺ natomiast nie wpływała na zdolność komórek do przenoszenia reakcji CS ($4,6 \pm 0,90$) (Ryc. 6.1.1, gr. B).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja: mAb + c'	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Ux10 ⁻² mm] ± SD	% odpowiedzi CS
				
A	+	-	3,78	100
B	+	antyCD4	4,58	121
C	+	antyCD8	1,53	40
D	+	antyCD4 + antyCD8	1,56	41

Ryc. 6.1.1

WPŁYW NEGATYWNEJ SELEKCJI KOMÓREK EFEKTOROWYCH NA TRANSFER CS

Naiwnym myszom szczepu CBA/J podano dootrzewnowo komórki efektorowe OX-CS (7×10^7 komórek/biorcę), uzyskane od syngenicznych dawców (gr. A, kontrola pozytywna transferu) (Materiały i Metody, pkt. 5.8.2). W celu oceny fenotypu tych komórek przed transferem poddano je selekcji negatywnej z zastosowaniem mAb anty-CD4 lub/i anty-CD8 oraz dopełniacza (grupy B, C, D). Następnie w celu wywołania reakcji CS na obie strony małżowin usznych myszy nałożono haptenu, a po 24h oceniono wielkość reakcji CS dokonując pomiaru grubości małżowiny usznej śrubą mikrometryczną (Mitutoyo). Wyniki testu przedstawiono w jednostkach przyrostu grubości małżowiny usznej [Ux10⁻²mm], po ich pomniejszeniu o wartość opuchnięcia obserwowanego w grupie kontroli negatywnej, która poddana została jedynie nałożeniu haptenu na małżowinę uszną (grupa nieujęta w wynikach). Wyniki wyrażone są jako średnie arytmetyczne ± SD.

Każda z grup doświadczalnych liczyła po 5 myszy.

Znamienność statystyczna:

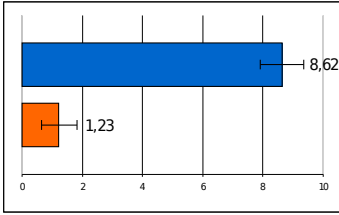
gr. A vs gr. C, gr. A vs gr. D → $p < 0,05$

gr. B vs gr. C, gr. B vs gr. D → $p < 0,01$

gr. A vs gr. B → brak znamienności

6.2 OCENA SUPRESYJNEJ AKTYWNOŚCI OX-TSF

Nadwrażliwość kontaktowa jest negatywnie regulowana przez limfocyty supresyjne (Ts), indukowane dożylnym podaniem dużych dawek haptenu sprzężonego z błoną syngenicznych erytrocytów. Komórki te uniemożliwiają rozwój reakcji CS w modelu aktywnego uczulenia, a inkubowane z komórkami efektorowymi przed ich transferem do naiwnych biorców znoszą zdolność Tef do przeniesienia reakcji CS. Rycina 6.2.1 przedstawia aktywację tolerancji na oksazonon przez dożylną podanie wysokich dawek tego haptenu (gr. B, wielkość reakcji $1,2 \pm 0,58$). W stanie tym nie jest możliwe wywołanie reakcji CS, która obserwowana jest w grupie kontrolnej (gr. A; $8,6 \pm 0,72$).

GRUPA:	OX-mRBC <i>iv</i>	OX <i>ec</i>	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ²] ± SD	% odpowiedzi CS
				
A	-	+		100
B	+	+		14

Ryc. 6.2.1
INDUKCJA TOLERANCJI W MODELU AKTYWNEGO UCZULENIA KONTAKTOWEGO

Reakcję CS indukowano w sposób aktywny (Materiały i Metody 5.8.1), immunizując naskórną myszy szczepu CBA/J (gr. A i gr. B). Zwierzęta w grupie B uprzednio poddane zostały indukcji tolerancji poprzez dożylną podanie wysokiej dawki haptenu sprzężonego z błoną syngenicznych erytrocytów (OX-mRBC). Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym.

Grupy badane liczyły po 5 osobników.

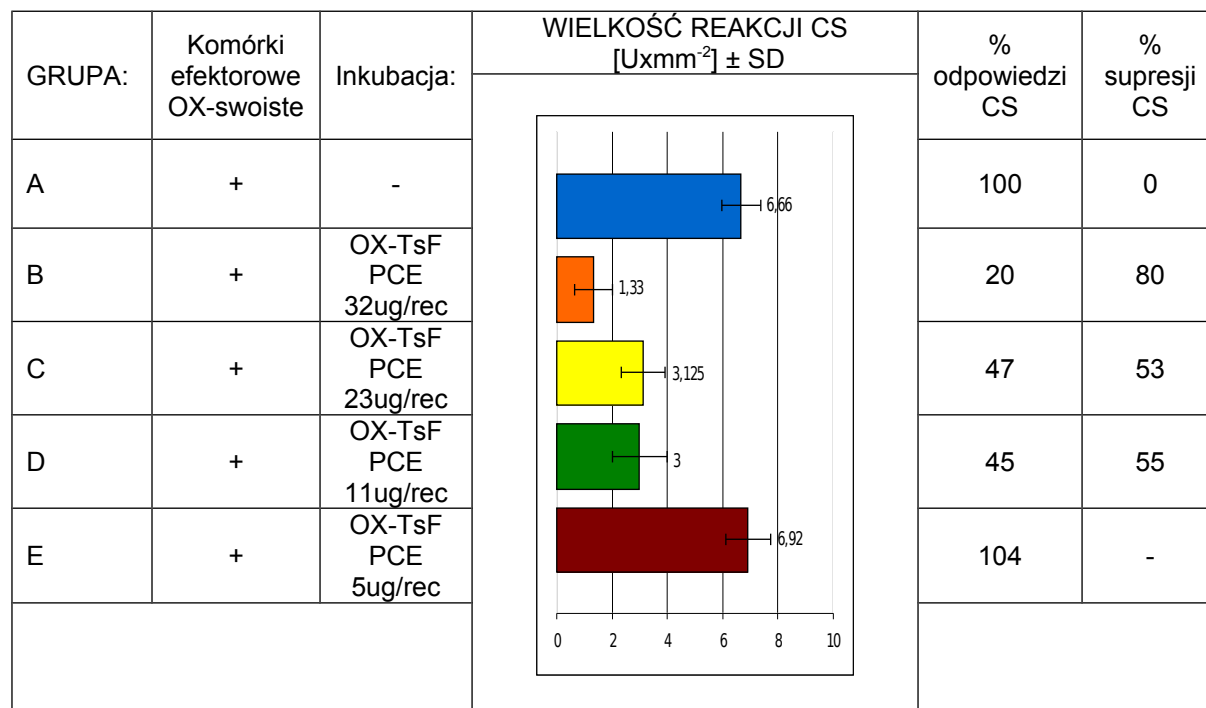
Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B → $p < 0,01$

W modelu nadwrażliwości kontaktowej na chlorek pikrylu wykazano, że limfocyty węzłów chłonnych i śledzion myszy, które otrzymały hapten kolejno dożylnie i naskórnice wydzielają tzw. czynnik supresyjny limfocytów T (TsF), wykazujący aktywność supresyjną – hamowania zdolności komórek efektorowych do biernego transferu CS. Analogiczny czynnik można indukować w systemie uczulenia oksazolonom.

Czynnik supresyjny swoisty dla nadwrażliwości kontaktowej indukowanej przez oksazon (OX-TsF) w podstawowej formie uzyskiwany jest jako nadsącz z hodowli komórek supresyjnych (OX-TsF SN). Nadsącz ten wykazuje aktywność supresyjną, wyrażaną w zdolności zahamowania transferu biernego nadwrażliwości kontaktowej na oksazon przez swoiste komórki efektorowe. W porównaniu do kontroli pozytywnej transferu, zastosowanie OX-TsF SN powoduje zmniejszenie wielkości CS o 45-97%. W doświadczeniach przeprowadzonych w niniejszej pracy, OX-TsF SN stosowany jest jako kontrola supresji CS (patrz m.in. Ryc. 6.3.1, 6.4.2, 6.6.1). Nadsącz ten może być poddany ekstrakcji fenolowo-chloroformowej do postaci mieszaniny DNA-RNA (OX-TsF PCE), z którego następnie metodą chromatografii powinowactwa wyizolować można czysty RNA (OX-TsF QRNA). Utrzymująca się w miarę oczyszczania czynnika zdolność OX-TsF do zahamowania transferu CS sugerowała, że to kwas rybonukleinowy jest właściwą cząstką mediującą supresję. W celu potwierdzenia tej tezy przeprowadzono doświadczenia badające zależność między obserwowanym efektem regulacyjnym a dawką OX-TsF. Zależność tą testowano zarówno w odniesieniu do mieszaniny kwasów nukleinowych czynnika (OX-TsF PCE) (Ryc. 6.2.2) jak i czystego RNA (OX-TsF QRNA) (Ryc. 6.2.3). W pierwszym z doświadczeń komórki efektorowe nadwrażliwości kontaktowej na oksazon przed ich transferem do naiwnych biorców poddano inkubacji z czterema różnymi dawkami ekstraktu fenolowo-chloroformowego czynnika. Analiza wpływu różnych dawek OX-TsF PCE na nadwrażliwość kontaktową na oksazon (Ryc. 6.2.2, gr. B - 32µg/biorcę, gr. C – 23µg/biorcę, gr. D – 11µg/biorcę, gr. E – 5µg/biorcę) przyniosła potwierdzenie istnienia zależności pomiędzy dawką czynnika a obserwowaną supresją. Trzy najwyższe spośród zastosowanych dawek wykazywały statystycznie istotne działanie supresyjne (odpowiednio: 1,3±0,68; 3,1±0,78; 3,0±0,99). Najwyższą efektywność zahamowania CS otrzymano w grupie B, choć analiza statystyczna nie wykazała różnic pomiędzy wielkością reakcji w grupach B, C i D. Wpływ OX-TsF na przeniesienie nadwrażliwości kontaktowej nie

był natomiast obserwowany u zwierząt z grupy E, którym transferowano komórki efektorowe inkubowane z najniższą (5µg/biorcę) dawką OX-TsF PCE.



Ryc. 6.2.2
OCENA EFEKTU DAWKI W DZIAŁANIU OX-TsF PCE

Komórki efektorowe CS na oksazolon przed ich transferem do naiwnych biorców CBA/J inkubowano z ekstraktem fenolowo-chloroformowym (PCE) czynnika supresyjnego swoistego dla oksazolonu w czterech różnych dawkach (gr. B, C, D, E). Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym i porównano do grupy kontrolnej (gr. A).

Grupy badane liczyły po 4 osobniki.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B → p<0,005

gr. A vs gr. C, gr. A vs gr.: D → p<0.05

gr. A vs gr. E → brak znamienności

gr. B vs gr. C vs gr. D → brak znamienności

Podobną zależność wykazały wyniki kolejnego doświadczenia, w którym analizie poddano związek pomiędzy stężeniem zastosowanego czystego RNA (OX-TsF QRNA, Ryc. 6.2.3) a wielkością supresji CS. OX-TsF QRNA inkubowano z komórkami efektorowymi w trzech dawkach: 6 μ g, 1 μ g oraz 0,3 μ g na 7x10⁷komórek (Ryc. 6.2.3, grupy odpowiednio: B, C, D). Statystycznie istotną supresję obserwowano w grupach, którym podano OX-TsF QRNA w ilości 6 μ g i 1 μ g (odpowiednio: 3,9 \pm 1,56, i 7,8 \pm 0,32). Najniższa zastosowana dawka QRNA (0,3 μ g) badanego czynnika nie była wystarczająca do wywołania efektu supresji (gr. D; 9,6 \pm 0,69). Jednocześnie wykazano, że frakcja jednoczasowo wyizolowanego chromatograficznie DNA nie posiada właściwości supresyjnych (gr. E). W grupie tej zaobserwowano przyrost grubości małżowiny usznej o 10,1 \pm 1,01, porównywalny do wielkości reakcji w grupie kontrolnej (gr. A; 9,8 \pm 1,7).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja:	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ²] ± SD		% odpowiedzi CS	% supresji CS
A	+	-	9,79		100	0
B	+	OX-TsF QRNA 6ug/rec	3,92		40	60
C	+	OX-TsF QRNA 1ug/rec	7,75		79	21
D	+	OX-TsF QRNA 0,3ug/rec	9,56		98	2
E	+	OX-TsF QDNA 6ug/rec	10,1		103	0

Ryc. 6.2.3

AKTYWNOŚĆ SUPRESYJNA FRAKCJI QRNA I QDNA CZYNNIKA SUPRESYJNEGO. OCENA EFEKTU DAWKI W DZIAŁANIU OX-TsF QRNA

Aktywność frakcji czystego DNA i RNA OX-TsF oceniano w modelu biernego transferu CS. Komórki efektorowe uczulonych oksazolonem dawców (7×10^7 komórek/biorcę) bezpośrednio przed transferem do naiwnych, syngenicznych biorców poddawano inkubacji z OX-TsF QRNA oraz OX-TsF QDNA w ilościach podanych w tabeli oraz Materiałach i Metodach, punkt 5.8.3. Sposób wywołania i oceny reakcji CS znajduje się w opisie Ryc. 1, jak i w rozdziale Materiały i Metody, punkt 5.8.2.

Grupy badane liczyły po 4 myszy.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B, gr. A vs gr. C → $p < 0,05$

gr. A vs gr. D, gr. A vs gr. E → brak znamienności

Ponadto podjęta została próba izolacji egzosomów bezpośrednio z supernatantu hodowli komórek produkujących OX-TsF. Aktywność uzyskanych egzosomów przetestowano w modelu biernego transferu CS (Ryc. 6.2.4). Egzosomy te (OX-TsF exos, gr. D) wykazują aktywność porównywalną do OX-TsF SN (gr. B) (odpowiednio: $0,8 \pm 0,24$ i $0,2 \pm 0,22$) i stabilną dla supernatantów przechowywanych przed izolacją egzosomów w temp. -20°C (gr. F) ($1,9 \pm 0,59$). Kontrolnie w modelu CS przetestowano aktywność supresyjną nadsączy znad pelety egzosomów po ich izolacji metodą ultrawirowania (gr. E i gr. G) (Materiały i Metody, punkt 5.7.3). Uzyskane wyniki wskazują na brak ich aktywności supresyjnej (wielkość reakcji CS odpowiednio: $5,7 \pm 0,86$ i $4,4 \pm 0,89$). Nadsączy znad hodowli komórek limfoidalnych węzłów chłonnych i śledzion zwierząt naiwnych (NF SN, gr. C), egzosomów z nich izolowanych (NF exos, gr. H), jak i nadsączy znad egzosomów NF (gr. I) nie wykazywały zdolności supresji reakcji CS (wielkość reakcji CS odpowiednio: $5,5 \pm 0,79$; $4,8 \pm 0,51$; $7,2 \pm 0,59$).

GRUPA:	Komórki efektorowe	Inkubacja: TsF	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ²] ± SD		% odpowiedzi CS	% supresji CS
			Barwa	Wartość		
A	+	-	5,13	5,13	100	0
B	+	OX-TsF SN	0,22	0,22	4	96
C	+	NF SN	5,47	5,47	106	0
D	+	OX-TsF exos.	0,78	0,78	15	85
E	+	SN znad OX-TsF exos.	5,66	5,66	110	0
F	+	OX-TsF exos. zamr.	1,88	1,88	37	63
G	+	SN znad OX-TsF exos. zamr.	4,38	4,38	85	15
H	+	NF exos.	4,84	4,84	94	6
I	+	SN znad NF exos.	7,17	7,17	140	0

Ryc. 6.2.4
AKTYWNOŚĆ SUPRESYJNA EGZOSOMÓW IZOLOWANYCH Z SUPERNATANTÓW KOMÓREK SUPRESYJNYCH

Egzosomy izolowano metodą ultrawierowania (Materiały i Metody, punkt 5.7.3) z supernatantów komórek produkujących OX-TsF, zarówno świeżych, jak i przechowywanych w temp. -20°C, a kontrolnie także z supernatantów komórek dawców naiwnych. Do inkubacji z komórkami efektorowymi OX-CS stosowano dawkę egzosomów uzyskaną ze standardowej ilości supernatantu niezbędnego do zahamowania reakcji CS (3ml/biorcę). Aktywność poszczególnych czynników oznaczano testem uszным nadwrażliwości kontaktowej. Każda z grup badanych liczyła 4 myszy.

Znamiennosc statystyczna:

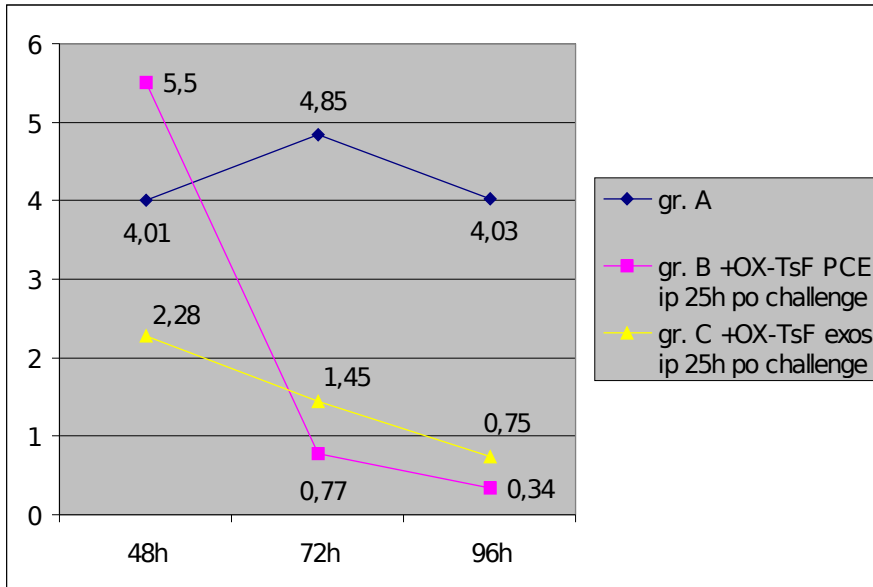
gr. A vs gr. B → p < 0,0001

gr. A vs gr. D → p < 0,0005

gr. A vs gr. F → p < 0,01

gr. A vs gr. C, gr. A vs gr. E, gr. A vs gr. G, gr. A vs gr. H, gr. A vs gr. I; gr. D vs gr. F
→ brak znamiennosci

Większość doświadczeń w niniejszej pracy przeprowadzona została w modelu biernego transferu CS, ze względu na wspomnianą możliwość poddawania komórek określonym manipulacjom *in vitro*. Doświadczenia te dowodzą hamującego wpływu czynnika na wywołanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej. Dla pełniejszego określenia funkcji OX-TsF jego aktywność przetestowano także w modelu aktywnego uczulenia, badając wpływ czynnika na toczącą się reakcję CS. OX-TsF podawano osobnym grupom eksperymentalnym dootrzewnowo w 25. godzinie po challenge w dwóch formach: ekstraktu fenolowo-chloroformowego, w dawce 250µg na biorcę, lub egzosomów, w ilości 500µl na mysz. Pomiary przeprowadzono w 48., 72. oraz 96. godzinie po wywołaniu reakcji CS (Ryc. 6.2.5). W okresie tym wartość opuchnięcia małżowiny usznej w grupie kontroli pozytywnej utrzymywała się na stałym poziomie (średnia wartość±odchylenie standardowe odpowiednio: 4,0±1,8; 4,9±2,23; 4,0±1,58). Zaobserwowano natomiast stopniowe zmniejszenie nasilenia reakcji CS u zwierząt, którym podano OX-TsF – zarówno w formie PCE, jak i egzosomów. W porównaniu do wielkości reakcji CS obserwowanej w odpowiednich punktach czasowych w grupie kontroli pozytywnej, efekt supresji nadwrażliwości kontaktowej przez OX-TsF PCE i egzosomy OX-TsF wykazywał statystyczną istotność w 72. (odpowiednio: 0,8±1,08 i 1,5±1,4) oraz 96. godzinie (odpowiednio: 0,3±0,53 i 0,8±1,16). Tendencję do zahamowania reakcji CS przez egzosomy OX-TsF obserwowano już w 48. godzinie po challenge (2,3±1,9), chociaż nie była ona statystycznie istotna. Dla OX-TsF dostarczanego w formie PCE okres 24 godzin nie był wystarczający do optymalnej dystrybucji sygnału supresyjnego w warunkach toczącej się odpowiedzi CS (5,5±1,30).



Ryc. 6.2.5
WPLYW OX-TsF NA ZAHAMOWANIE TOCZĄCEJ SIĘ REAKCJI CS

Czynnik podawano biorcom z rozwiniętą nadwrażliwością kontaktową na oksazonon po 25 godzinach od jej wywołania. Stosowano OX-TsF w dwóch postaciach: PCE (w dawce 250µg/mysz) oraz egzosomów (w dawce 500µl/mysz). Obie formy czynnika podawane były dootrzewnowo, a wielkość reakcji oceniana w teście uszным w 48, 72. i 96. godzinie po challenge.

Grupy badane liczyły po 4 osobniki.

Znamiennosc statystyczna:

po 48 godzinach:

gr. A vs gr. B, gr. A vs gr. C, gr. B vs gr. C → brak znamiennosci

po 72 godzinach:

gr. A vs gr. B → $p < 0,01$

gr. A vs gr. C → $p < 0,05$

gr. B vs gr. C → brak znamiennosci

po 96 godzinach:

gr. A vs gr. B, gr. A vs gr. C → $p < 0,005$

gr. B vs gr. C → brak znamiennosci

Obok aktywności supresyjnej w modelu *in vivo* OX-TsF wykazuje właściwości regulacyjne *in vitro* - zdolność zahamowania proliferacji linii komórkowej IL-2 zależnej (Tab. 6.2.1). Supresja ta nie jest antygenowo specyficzna, gdyż obserwowana jest zarówno w przypadku czynnika TNP- jak i OX-swoistego. Ponadto, aktywność czynników badana testem HT-2 wzrasta w miarę oczyszczania czynnika – od supernatantu, przez PCE do najwyższej w przypadku QRNA.

Próbka	Najniższe stężenie aktywne supresyjnie [ilość/dolek]=[ilość/10 ⁴ kom.] ± SD	Ilość powtórzeń
OX-TsF SN	200µl	5
TNP-TsF SN	100µl	5
NF SN	brak aktywności w ilości 200µl	2
OX-TsF PCE	0,68µg ± 0.62	9
TNP-TsF PCE	0,22µg ± 0.21	23
NF PCE	brak aktywności w ilości 3,7µg	16
OX-TsF QRNA	0,20µg ± 0.05	3
TNP-TsF QRNA	0,13µg ± 0.08	13
NF QRNA	brak aktywności w ilości 2µg	2

Tab. 6.2.1

WPŁYW CZYNNIKÓW SUPRESYJNYCH NA AKTYWNOŚĆ PROLIFERACYJNĄ IL-2-ZALEŻNEJ LINII KOMÓRKOWEJ HT-2

W tabeli przedstawiono najmniejsze ilości czynnika supresyjnego oksazonowo-swoistego, trójnitrofenolowo-swoistego oraz negatywnego czynnika kontrolnego w formach supernatantu (SN), ekstraktu fenolowo-chloroformowego (PCE) i frakcji RNA (RNA), powodujące 50% zahamowanie proliferacji linii komórkowej IL-2-zależnej (HT-2). Efekt ten oceniany jest kolorymetrycznie, poprzez pomiar absorbancji formazanów, powstających w mitochondriach proliferujących komórek.

6.3 RYBONUKLEINOWY CHARAKTER OX-TSF

Jak wspomniano, czynniki supresyjne zachowują swą aktywność podczas oczyszczania od nadsączy znad hodowli limfocytów supresyjnych, przez ekstrakty fenolowo-chloroformowe do czystego RNA, a w miarę izolacji względna ilość czynnika potrzebnego do zahamowania funkcji limfocytów efektorowych spada (odpowiednio: 3ml, 32 μ g, 6 μ g/1 μ g). Sugeruje to, że aktywna regulacyjnie składowa OX-TsF jest cząstką RNA.

Ekstrakt fenolowo-chloroformowy OX-TsF jest oczyszczoną z białek mieszaniną kwasów nukleinowych, zawierającą 95% DNA i 5% RNA. Dodatkowe potwierdzenie tezy, że właściwym komponentem supresyjnym czynnika jest kwas rybonukleinowy uzyskano traktując OX-TsF PCE rybonukleazą A, a następnie testując tak otrzymaną postać czynnika w modelu adoptywnego transferu CS. W celu usunięcia pozostałości enzymu, PCE po inkubacji z RNazą (40minut, 37°C) poddano procesowi reekstrakcji z fenolem/chloroformem. W teście biernego przeniesienia nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon jako kontroli supresji użyto OX-TsF w formie nadsączu znad hodowli (Ryc. 6.3.1, gr. B) oraz pełnego ekstraktu fenolowo-chloroformowego (gr. C). W obu przypadkach zaobserwowano statystycznie istotne zahamowanie reakcji CS (wartość reakcji \pm odchylenie standardowe odpowiednio: 2,5 \pm 1,37 i 3,8 \pm 1,13), w stosunku do kontroli pozytywnej (gr. A; 9,1 \pm 2,29). Wykazano, że OX-TsF PCE traktowany RNazą utracił zdolność do supresji reakcji CS (gr. D; 9,5 \pm 2,50).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja z:	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD		% odpowiedzi CS	% supresji CS
			Barwa	Wartość		
A	+	-	Blue	9,125	100	0
B	+	OX-TsF SN	Orange	2,458	27	73
C	+	OX-TsF PCE	Yellow	3,75	41	59
D	+	OX-TsF PCE + RNaza	Green	9,542	104	0

Ryc. 6.3.1
WPŁYW RNazy NA AKTYWNOŚĆ OX-TsF W FORMIE PCE

Komórki efektorowe swoiste dla nadwrażliwości kontaktowej na oksazolony użyto bezpośrednio do transferu (kontrola pozytywna, grupa A) lub wcześniej poddano inkubacji z 3ml OX-TsF w formie nadsącza (grupa B) bądź z 32µg ekstraktu fenolowo-chloroformowego (grupy C i D). Do mieszaniny inkubacyjnej podawanej zwierzętom grupy D dodano również 0,3mg RNazy A (Materiały i Metody, punkt 5.8.3).

Grupy badane liczyły po 3 osobniki.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B → p<0,01

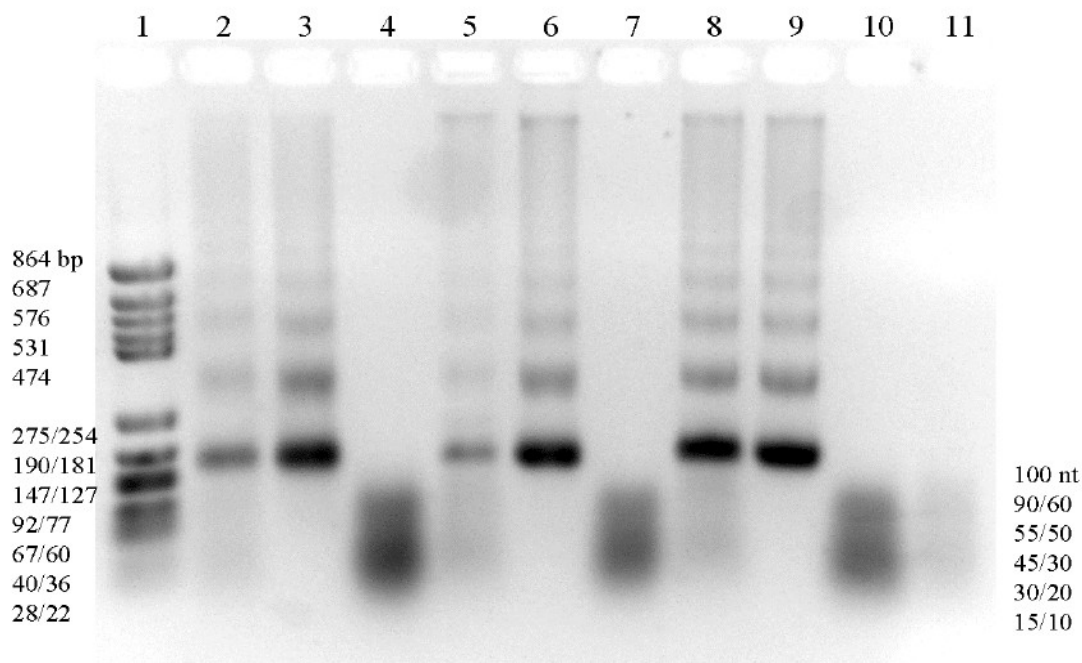
gr. A vs gr. C → p<0,05

gr. A vs gr. D → brak znamienności

gr. B vs gr. C → brak znamienności

W celu określenia wielkości rybonukleinowego komponentu oksazolono-swoistego czynnika supresyjnego przeprowadzono rozdział ekstraktów fenolowo-chloroformowych oraz czystych frakcji DNA i RNA badanego czynnika, czynnika swoistego dla TNP oraz czynnika negatywnego (NF) na żelu agarozowym (Materiały i Metody, punkt 5.7.6). Dla poszczególnych czynników uzyskano elektroforegramy o analogicznych wzorach prążkowych (Ryc. 6.3.2). Analiza ścieżek rozdziału pozwala zauważyć, że ekstrakty fenolowo-chloroformowe poszczególnych czynników (ścieżka 2. - NF PCE, ścieżka 5. - OX-TsF PCE, ścieżka 8. - TNP-TsF) składają się z sumy prążków charakterystycznych dla odpowiadających im indywidualnie rozdzielonych frakcji DNA (ścieżki 3., 6. i 9.) oraz RNA (ścieżki 4., 7. i 10.). Ponadto, uzyskane elektroforegramy dowodzą, że frakcja czystego RNA czynników, zawierająca interesujący nas komponent supresyjny (aktywność potwierdzona po elucji z żelu w

teście biernego transferu CS, dane nieprzedstawione) składa się z krótkich, prawdopodobnie niekodujących RNA, o długości pomiędzy 10 a 90 nukleotydów.



Ryc. 6.3.2

Elektroforegramy uzyskane w wyniku rozdziału ekstraktów fenolowo-chloroformowych oraz czystych frakcji DNA i RNA czynników supresyjnych limfocytów T (OX-TsF i TNP-TsF) oraz negatywnego czynnika kontrolnego (NF) w obecności wzorców wielkości: DNA i niskocząsteczkowych RNA.

Na poszczególne ścieżki nałożono:

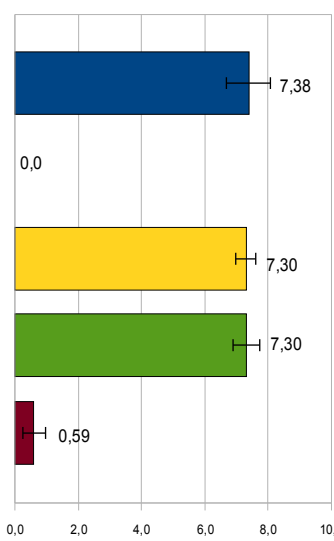
1. marker wielkości DNA pEGFPC1-C5/Masp I
2. NF PCE (DNA/RNA)
3. NF QDNA
4. NF QRNA
5. OX-TsF PCE (DNA/RNA)
6. OX-TsF QDNA
7. OX-TsF QRNA
8. TNP-TsF PCE (DNA/RNA)
9. TNP-TsF QDNA
10. TNP-TsF QRNA
11. marker wielkości niskocząsteczkowego RNA

6.4 FENOTYP KOMÓREK SUPRESYJNYCH PRODUKUJĄCYCH AKTYWNY KOMPONENT CZYNNIKA SUPRESYJNEGO SWOISTEGO DLA NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ NA OKSAZOLON U MYSZY SZCZEPU CBA/J

Fenotyp komórek produkujących składową RNA OX-TsF badany był z użyciem dwóch technik: selekcji negatywnej oraz selekcji pozytywnej.

6.4.1 SELEKCJA NEGATYWNA

Komórki supresyjne izolowane były z węzłów chłonnych i śledzion pobranych od dawców, u których zaindukowano produkcję OX-TsF (Materiały i Metody, punkt 5.7.1). W celu potwierdzenia właściwości supresyjnych tych komórek inkubowano je *in vitro* z komórkami efektorowymi CS, przed ich dożylnym transferem do naiwnych biorców. Grupa ta, stanowiąca kontrolę supresji, nie rozwinęła reakcji CS (Ryc. 6.4.1, gr. B, wartość reakcji $0,0 \pm 0,01$). Eliminacja limfocytów $CD8^+$ z puli komórek supresyjnych (z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anti- $CD8$ oraz dopełniacza) powodowała zniesienie efektu supresji i rozwój CS (gr. D, przyrost grubości małżowiny usznej $7,3 \pm 0,42$). Podobny efekt uzyskano poprzez dodanie do mieszaniny inkubacyjnej limfocytów efektorowych i supresyjnych rybonukleazy A (gr. C, wielkość reakcji CS $7,3 \pm 0,31$). Zjawisko braku supresji występujące po selekcji negatywnej limfocytów supresyjnych $CD8^+$ zrekonstruować można z użyciem OX-TsF uprzednio wyizolowanego do postaci czystego RNA (Materiały i Metody, punkt 3.7.5) (gr. E, wielkość reakcji CS $0,6 \pm 0,36$). Powyższe doświadczenie dowodzi, że komórkami produkującymi aktywny supresyjnie komponent OX-TsF są limfocyty $CD8^+$ oraz że czynnik ten przynajmniej w części składa się z kwasu rybonukleinowego.

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja:	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD		% odpowiedzi CS	% supresji CS
						
A	+	-	7,38		100	0
B	+	+ kom. Ts	0,0		0	100
C	+	+ kom. Ts + RNaza A	7,30		99	1
D	+	+ (kom. Ts + mAbCD8 + c')	7,30		99	1
E	+	+ (kom. Ts + mAbCD8 + c') + OX-TsF QRNA	0,59		8	92

Ryc. 6.4.1
WPŁYW SELEKCJI NEGATYWNEJ KOMÓREK SUPRESYJNYCH NA REGULACJĘ CS

Swoiste dla OX komórki efektorowe CS (7×10^7 komórek/biorcę) przed transferem do naiwnych biorców inkubowane były *in vitro* z komórkami supresyjnymi OX-Ts (4×10^7 komórek/biorcę). W grupie C mieszaninę inkubacyjną traktowano RNazą A (Materiały i Metody, punkt 5.8.3), a w grupach D i E inkubowano z przeciwciałem monoklonalnym anti-CD8 oraz dopełniaczem króliczym (Materiały i Metody, punkt 5.9). Mieszanina transferowana do myszy z grupy E wzbogacona została ponadto OX-TsF QRNA. Odpowiednie mieszaniny podawane były biorcom dootrzewnowo. Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym. Grupy badane liczyły po 5 myszy.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B, gr. A vs gr. E → $p < 0,0005$

gr. B vs gr. C, gr. B vs gr. D → $p < 0,0005$

gr. C vs gr. E, gr. D vs gr. E → $p < 0,0005$

gr. B vs gr. E → brak znamienności

6.4.2 SELEKCJA POZYTYWNA

Część komórek supresyjnych indukowanych j.w., po izolacji i wyznakowaniu przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD8, poddano selekcji pozytywnej na ziarnach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami kozimi anti-szczurzymi IgG (Materiały i Metody, punkt 5.10). Uzyskano rozdział puli komórek na limfocyty CD8⁺ oraz komórki CD8⁻. Obie uzyskane populacje, jak i komórki nie poddane selekcji, hodowano przez 48h w bezbiałkowym podłożu MDM. Aktywność supresyjną uzyskanych supernatantów testowano w modelu biernego przeniesienia nadwrażliwości kontaktowej.

Analiza przedstawionych na Ryc. 6.4.2 wyników potwierdza, że komórki uwalniające OX-TsF mają fenotyp CD8⁺. Grupa B, otrzymująca komórki efektorowe inkubowane z OX-TsF SN stanowiła kontrolę supresji (wielkość reakcji $0,13 \pm 0,08$). Porównywalny wynik reakcji otrzymano w grupie, w której limfocyty T efektorowe przed transferem inkubowane były z OX-TsF uzyskanym w supernatancie limfocytów CD8⁺ (gr. C, $0,7 \pm 0,33$). Inkubacja komórek efektorowych z supernatantem komórek CD8⁻ nie spowodowała supresji reakcji CS (gr. D, $4,4 \pm 0,58$).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja: + OX-TsF SN	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD	% odpowiedzi CS	% supresji CS
A	+	-	14,49	100	0
B	+	Ts cells	0,125	3	97
C	+	CD8 ⁺ cells	0,65	14	86
D	+	CD8 ⁻ cells	4,39	98	2

Ryc. 6.4.2

WPLYW SELEKCJI POZYTYWNEJ KOMÓREK SUPRESYJNYCH CD8⁺ NA AKTYWNOŚĆ CZYNNIKÓW OTRZYMYWANYCH W SUPERNATANTACH HODOWLI

OX-swoiste komórki efektorowe (7x10⁷ komórek/biorcę) przed transferem do naiwnych biorców CBA/J poddawane były inkubacji z supernatantami hodowli komórek supresyjnych (OX-TsF SN) (gr. B), komórek supresyjnych CD8⁺ (gr. C) oraz komórek CD8⁻ (gr. D). Po inkubacji komórki efektorowe odplukano i podawano naiwnym biorcom dootrzewnowo. Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym. Grupy badane liczyły po 5 osobników.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B → p<0,001

gr. A vs gr. C, gr. C vs gr. D → p<0,01

gr. B vs gr. C → brak istotności

6.5 RESTRYKCJA MHC-ZALEŻNA

W celu określenia, czy OX-TsF w swym działaniu supresyjnym wykazuje restrykcję MHC-zależną, przetestowano zdolność czynnika uzyskanego od szczepu CBA/J (H2k) do zahamowania reakcji CS w grupach myszy odmiennych szczepów – Balbc (H2d) oraz C57B6 (H2b), u których CS indukowano biernym transferem syngenicznych komórek efektorowych OX-swoistych, w porównaniu do supresji obserwowanej u myszy CBA/J. Analiza wyników doświadczenia, przedstawionych na Ryc. 6.5.1, wykazała, że działanie OX-TsF nie wymaga sygnalizacji przez układ MHC. Czynniki supresyjny wykazywał aktywność zarówno w odniesieniu do kontrolnych komórek efektorowych szczepu CBA/J (gr. D) (wielkość reakcji CS $1,4 \pm 0,12$), jak i w pozostałych szczepach badanych – Balbc (gr. B) i C57/BL6 (gr. F) (wielkość reakcji CS odpowiednio: $2,0 \pm 0,56$ i $0,9 \pm 0,63$).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja: OX-TsF PCE	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD	% odpowiedzi CS	% supresji CS
A	Balbc	-		100	0
B	Balbc	CBA/J		38	62
C	CBA/J	-		100	0
D	CBA/J	CBA/J		34	66
E	C57/BL6	-		100	0
F	C57/BL6	CBA/J		19	81

Ryc. 6.5.1
OCENA RESTRYKCJI MHC-ZALEŻNEJ

Reakcję CS wywołano osobno w trzech szczepach myszy (Balbc [H2d], CBA/J [H2k] i C57/BL6 [H2b]), dokonując biernego transferu syngenicznych komórek efektorowych (gr. A, C, E). Grupom badanych: B, D oraz F podano dożylnie syngeniczne komórki efektorowe uprzednio inkubowane z OX-TsF PCE uzyskanym z supernatantów komórek supresyjnych myszy szczepu CBA/J. Znamienność statystyczna określana była dla par porównań: kontrola pozytywna – grupa badana, w obrębie danego szczepu. Dodatkowo przeprowadzono porównanie grup badanych pomiędzy szczepami.

Grupy badane liczyły po 4-5 osobników.

Znamienność statystyczna:

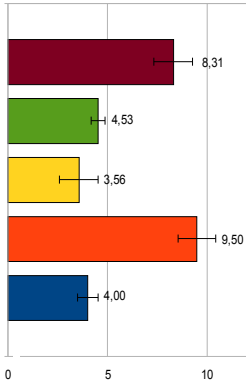
gr. A vs gr. B , gr. C vs gr. D, gr. E vs gr. F → $p < 0,05$

gr. B vs gr. D vs gr. F → brak znamienności

6.6 KOMPONENTY OX-TSF

Upřednio wykazano, że kompletny czynnik supresyjny składa się z dwóch komponentów [111]. Pierwszy z nich produkowany jest przez komórki supresyjne i wykazuje aktywność supresyjną, drugi natomiast nadaje czynnikowi specyficzność antygenową i produkowany jest przez limfocyty B1. Celem kolejnego eksperymentu było zbadanie, czy do pełnej aktywności czynnika niezbędne są oba jego komponenty. Czynnik indukowany był osobno w trzech grupach zwierząt – pierwsza poddana była standardowej procedurze indukcji OX-TsF (Materiały i Metody, punkt 5.7.1), druga uczulana była jedynie dożylnie syngenicznymi erytrocytami znakowanymi oksazoloniem, a trzecia otrzymała hapten jedynie naskórnice. Komórki limfoidalne węzłów chłonnych i śledzion poszczególnych grup zwierząt poddane były 48-godzinnej hodowli w bezbiałkowym podłożu MDM. Otrzymane supernatanty inkubowano z komórkami efektorowymi CS przed ich transferem do naiwnych biorców.

Wykazano aktywność supresyjną w trzech grupach (Ryc. 6.6.1). Wielkość reakcji w grupie B, której transferowane były komórki efektorowe inkubowane z kompletnym czynnikiem OX-TsF, w porównaniu do grupy kontrolnej A zmniejszyła się o 45% ($4,5 \pm 0,33$ vs $8,3 \pm 1,32$). Najwyższą supresję zaobserwowano jednak w grupie C, która otrzymała Tef inkubowane z supernatantem komórek indukowanych jedynie uczuleniem dożylnym (OX-mRBC-F) ($3,6 \pm 0,97$). Podobnie, inkubacja komórek efektorowych z mieszaniną supernatantów komórek zwierząt immunizowanych tylko dożylnie oraz tylko naskórnice powodowała statystycznie istotne zmniejszenie wielkości reakcji CS (gr. E) ($4,0 \pm 0,52$). Efekt ten w obu przypadkach nie był jednak statystycznie istotnie różny od wartości uzyskanych w grupie B. Supernatant hodowli komórek indukowanych jedynie immunizacją naskórną (OX-F) pozostawał bez negatywnego wpływu na zdolność komórek efektorowych do przeniesienia reakcji CS na naiwnych biorców (gr. D) ($9,5 \pm 0,96$).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja: komponent TsF	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD	% odpowiedzi CS	% supresji CS
					
A	+	-	8,31	100	0
B	+	OX-TsF compl.	4,53	55	45
C	+	OX-mRBC-F	3,56	43	57
D	+	OX-F	9,50	114	0
E	+	OX-mRBC-F + OX-F	4,00	48	52

Ryc. 6.6.1
KOMPONENTY CZYNNIKA OX-TsF

Myszom CBA/J podano komórki efektorowe inkubowane z OX-TsF kompletnym (gr. B) lub czynnikami niekompletnymi: indukowanymi tylko immunizacją dożylną (gr. C) bądź jedynie immunizacją naskórną (gr. D). Grupa E otrzymała komórki inkubowane z mieszaniną czynników niekompletnych. Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym.

Grupy badane liczyły po 4 osobniki.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. C → $p < 0,005$

gr. A vs gr. E → $p < 0,01$

gr. A vs gr. B → $p < 0,05$

gr. A vs gr. D → brak znamienności

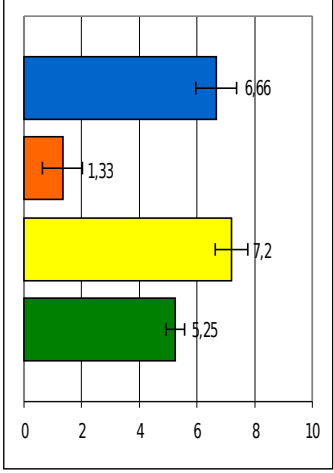
gr. B vs gr. C vs gr. E → brak znamienności

6.7 SWOISTOŚĆ ANTYGENOWA CZYNNIKÓW SUPRESYJNYCH LIMFOCYTÓW T

Swoistość antygenowa badanego czynnika supresyjnego w formie ekstraktu fenolowo-chloroformowego (OX-TsF PCE) badana była w dwóch układach. Testowano aktywność supresyjną czynnika indukowanego podwójnym uczuleniem trójnitrofenylem w modelu nadwrażliwości kontaktowej na oksazolone (Ryc. 6.7.1) i odwrotnie: czynnik supresyjny swoisty dla nadwrażliwości kontaktowej na oksazolone testowano w modelu nadwrażliwości kontaktowej na trójnitrofenyl (Ryc. 6.7.2). W obu przypadkach za kontrole supresji służyły czynniki indukowane haptentem zgodnym ze stosowanym modelem.

Wyniki obu doświadczeń wykazały, że czynniki supresyjne limfocytów T charakteryzują się specyficznością antygenową. CS indukowana oksazolone ulegała zahamowaniu jedynie pod wpływem swoistego czynnika OX-TsF (Ryc. 6.7.1; gr. B; $1,3 \pm 0,68$), a nie wpływały na nią TNP-TsF (gr. D; $7,2 \pm 0,56$) i czynnik negatywny, uzyskiwany z węzłów chłonnych i śledzion zwierząt naiwnych (NF) (gr. C, $5,3 \pm 0,31$).

Nadwrażliwość kontaktowa na trójnitrofenyl regulowana może być tylko czynnikiem indukowanym TNP (Ryc. 6.7.2, gr. B; $0,4 \pm 0,31$) i nie podlega supresji przez OX-TsF zastosowany nawet w wysokiej dawce (gr. C; $3,7 \pm 0,61$) oraz NF (gr. D; $4,0 \pm 0,08$).

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-swoiste	Inkubacja:	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD	% odpowiedzi CS	% supresji CS
					
A	+	-	6,66	100	0
B	+	OX-TsF PCE 32ug/rec	1,33	20	80
C	+	TNP-TsF PCE 32ug/rec	7,2	108	0
D	+	NF PCE 23ug/rec	5,25	79	21

Ryc. 6.7.1

SWOISTOŚĆ ANTYGENOWA CZYNNIKÓW SUPRESYJNYCH W MODELU NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ NA OKSAZOLON

Komórki efektorowe CS na oksazolone przed ich transferem do naiwnych biorców CBA/J inkubowano z czynnikiem supresyjnym swoistym dla oksazolonu (gr. B), czynnikiem supresyjnym swoistym dla trójnitrofenolu (gr. C) oraz czynnikiem negatywnym (gr. D). Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym. Grupy badane liczyły po 4 osobniki.

Znamiennosc statystyczna:

gr. A vs gr. B → p<0,005

gr. A vs gr. C, gr. A vs gr. D → brak znamiennosci

GRUPA:	Komórki efektorowe TNP-swoiste	Inkubacja:	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD		% odpowiedzi CS	% supresji CS
			Barwa	Wartość		
A	+	-	Cyjanowa	3,98	100	0
B	+	TNP-TsF PCE 32u/rec	Żółta	0,42	10	90
C	+	OX-TsF PCE 32u/rec	Fioletowa	3,7	93	7
D	+	NF PCE 21ug/rec	Niebieska	4	100	0

Ryc. 6.7.2

SWOISTOŚĆ ANTYGENOWA CZYNNIKÓW SUPRESYJNYCH W MODELU NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ NA TRÓJNITROFENYL

Komórki efektorowe CS na TNP przed ich transferem do naiwnych biorców CBA/J inkubowano z czynnikiem supresyjnym swoistym dla TNP (gr. B), czynnikiem supresyjnym swoistym dla OX (gr. C) oraz czynnikiem negatywnym (gr. D). Wielkość reakcji CS oceniono w teście usznym.

Grupy badane liczyły po 4 osobniki.

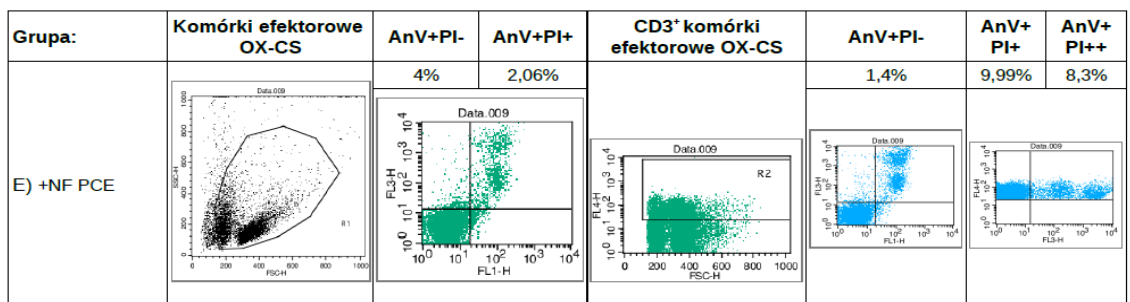
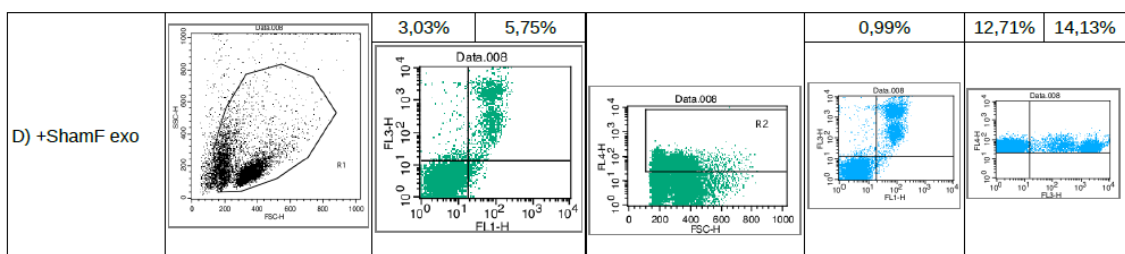
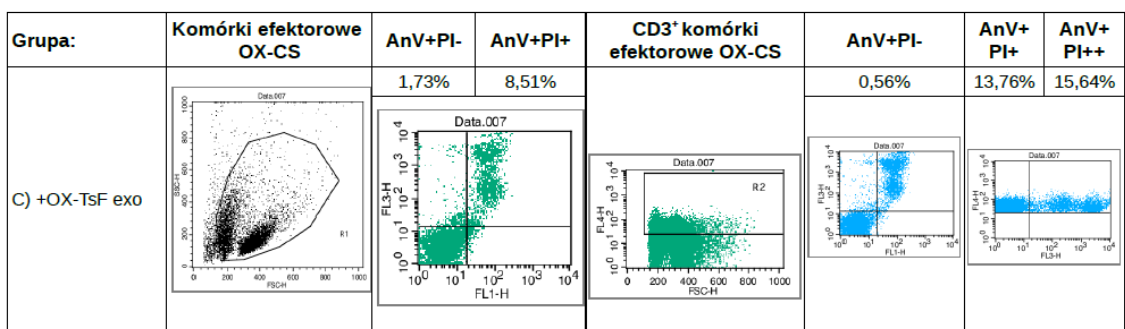
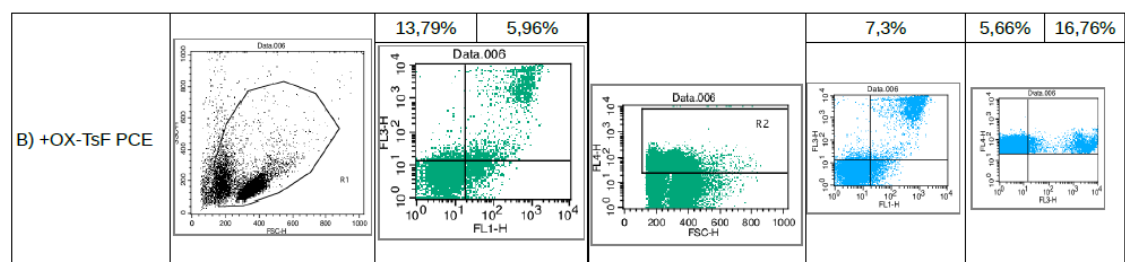
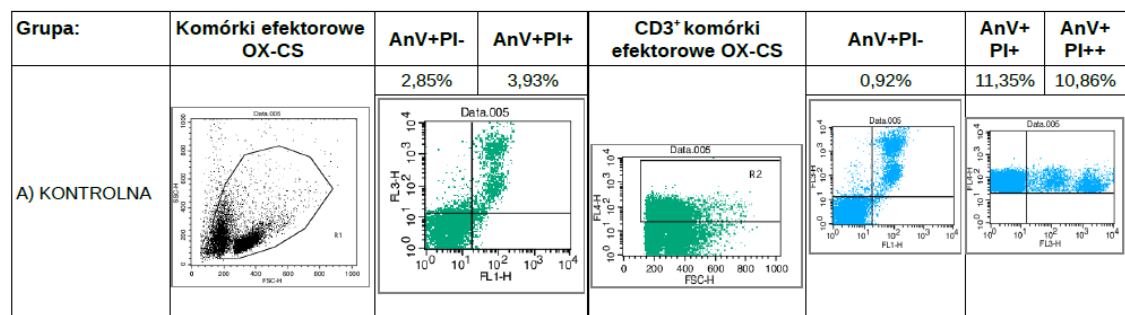
Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B → $p < 0,0005$

gr. A vs gr. C; gr. A vs gr. D → brak znamienności

6.8 OCENA INDUKCJI APOPTOZY KOMÓREK EFEKTOROWYCH CS PRZEZ OX-TsF

Jedną z metod służących do oceny apoptozy jest analiza cytofluorymetryczna z wykorzystaniem znakowania komórek aneksyną V sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny (AnV-FITC) oraz jodkiem propidyny (PI). Aneksyna posiada zdolność wiązania się z fosfatydyloseryną, która we wczesnym etapie programowanej śmierci komórki ulega przemieszczeniu z wewnątrzkomórkowej części błony na jej zewnętrzną warstwę. Komórki będące w tym stadium wykazują fluorescencję zieloną (FITC). Jednoczesna ocena czerwonej fluorescencji, pochodzącej od wiążącego się z DNA jodku propidyny, pozwala na zróżnicowanie komórek na wczesnoapoptotyczne (AnV+PI-) oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne (AnV+PI+) [128]. W niniejszej pracy metodę tą wykorzystano do zbadania wpływu czynnika supresyjnego oksazolonowo-swoistego w formie egzosomów oraz ekstraktu fenolowo-chloroformowego, jak i czynników kontrolnych: Sham-F (w postaci egzosomów) oraz NF (w postaci PCE), na indukcję apoptozy komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon. Ocenie poddano przeżywalność zarówno puli komórek, jak i wyselekcjonowanych spośród nich limfocytów CD3⁺. Analiza uzyskanych wyników (Ryc. 6.8.1) pozwala zauważyć tendencję do wzrostu odsetka komórek CD3⁺ znajdujących się w fazie nekrozy (AnV+PI++) w grupach hodowanych w obecności OX-TsF egzosomów (15,64%), OX-TsF PCE (16,76%) oraz Sham-F egzosomów (14,13%) w porównaniu do grupy kontrolnej (10,86%). Efekt ten nie występuje w grupie poddanej wpływowi NF PCE (8,3%). Zaobserwowano też zwiększenie ilości komórek będących w późnej fazie apoptozy (AnV+PI+) w grupach hodowanych w obecności egzosomów czynnika OX-TsF i czynnika Sham-F. Tendencja ta obserwowana była zarówno w puli komórek efektorowych CS (odpowiednio 8,51 i 5,75%), jak i limfocytów CD3⁺ (odpowiednio 13,67 i 12,71%) i porównywana do analogicznie wyznakowanych komórek kontrolnych (3,93 i 11,35%). Odsetek komórek znajdujących się we wczesnym stadium apoptozy był porównywalny między komórkami kontrolnymi a poddanymi inkubacji z egzosomami OX-TsF i Sham-F oraz NF PCE. OX-TsF natomiast powodował wzrost odsetka komórek wczesnoapoptotycznych z 2,85% w puli komórek kontrolnych do 13,79%, a wśród limfocytów CD3⁺ z 0,92% do 7,3%.



Ryc. 6.8.1

WPŁYW OX-TsF NA INDUKCJĘ APOPTOZY KOMÓREK EFEKTOROWYCH CS - ANALIZA CYTOFLUORYMETRYCZNA

W celu oceny indukcji apoptozy komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej komórki te hodowano przez 18h w obecności jedynie OX-MGG (gr. A) bądź łącznie z testowanymi czynnikami (gr. B – OX-TsF PCE, gr. C – egzosomy OX-TsF, gr. D – egzosomy Sham-F, gr. E – NF PCE), po czym poddano znakowaniu aneksyną sprzężoną z FITC oraz jodkiem propidyny. Dodatkowo zastosowane przeciwciało monoklonalne anty-CD3 skoniugowane z fluorochromem APC pozwoliło na selekcję komórek CD3⁺ oraz analizę przeżywalności właściwą dla tej populacji. Przedstawione w tabeli wartości procentowe uzyskano po odjęciu wartości fluorescencji uzyskanych dla kontroli testu – komórek nie znakowanych fluorochromami (wykazujących autofluorescencję).

FSC – detektor światła przechodzącego

SSC – detektor światła rozproszonego pod kątem 90°

FL1 – detektor fluorescencji zielonej (FITC)

FL3 – detektor fluorescencji czerwonej (PI)

FL4 – detektor fluorescencji niebieskiej (APC)

6.9 OCENA WPŁYWU OX-TsF NA AKTYWNOŚĆ CYTOKINOTWÓRCZĄ EFEKTOROWYCH LIMFOCYTÓW OKSAZOLONOWO-SWOISTYCH

Analiza wyników oceny sekrecji cytokinowej w nadsączach OX-swoistych limfocytów węzłów chłonnych hodowanych w obecności antygeny OX-MGG oraz poddanych działaniu OX-TsF wykazała brak wpływu czynnika na aktywację sekrecji badanych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych. We wszystkich oznaczeniach uzyskano wartości przyjęte za bazalne w badaniach aktywności sekrecyjnej limfocytów.

GRUPA:	CYTOKINY:	IL-6 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	IL-17 [pg/ml]	IFN γ [pg/ml]
Komórki efektorowe + OX-MGG		13,1	0,0	3,1	25,4
Komórki efektorowe + OX-MGG + OX-TsF PCE		13,1	0,0	4,2	25,4
Komórki efektorowe + OX-MGG + OX-TsF QRNA		13,1	0,0	3,1	25,4
Komórki efektorowe + OX-MGG + OX-TsF exos		13,1	0,0	3,1	25,4
Komórki efektorowe + OX-MGG + NF PCE		13,1	0,0	<3,1	25,4
Komórki efektorowe + OX-MGG + NF QRNA		13,1	0,0	3,1	25,4
Komórki efektorowe + OX-MGG + NF exos		13,1	0,0	<3,1	25,4

Tab. 6.9
OCENA WPŁYWU OX-TsF NA AKTYWNOŚĆ CYTOKINOTWÓRCZĄ KOMÓREK EFEKTOROWYCH OX-CS

Indukcja sygnałów cytokinowych w nadsączach znad hodowli limfocytów wyizolowanych z węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych od zwierząt aktywnie uczulonych oksazolonem (limfocyty efektorowe). Komórki hodowane były w obecności antygeny OX-MGG, a grupy badane poddane działaniu czynnika supresyjnego OX-TsF (PCE, QRNA, egzosomy) lub analogicznych form kontrolnego czynnika negatywnego (NF).

7 DYSKUSJA

Nadwrażliwość kontaktowa (CS) jest formą nadwrażliwości typu późnego (DTH), alergii mediowanej przez limfocyty T. Historycznie opisywano ją jako reakcję warunkowaną obecnością uczulonych, specyficznych limfocytów pomocniczych Th1, które za pośrednictwem wydzielanych cytokin rekrutują właściwe komórki wykonawcze fazy efektorowej – monocyty i granulocyty. Obecnie wiadomo, że limfocyty Th1 nie są jedynymi komórkami zaangażowanymi w rozwój IV typu nadwrażliwości. W modelach zwierzęcych opisano reakcje CS mediowane przez różne typy limfocytów, indukowanych w zależności od budowy chemicznej użytego do immunizacji haptenu, sposobu jego dostarczenia oraz szczepu zwierzęcia doświadczalnego. Obserwacje kliniczne i prace zespołu Pichlera dowodzą, że różne objawy alergii na leki związane są z odmienną budową terapeutyków, a obraz zmian klinicznych jest wynikiem różnych mechanizmów rozpoznania alergenów przez układ immunologiczny, prowadzących do aktywacji odmiennych komórek efektorowych.

Mysi model nadwrażliwości kontaktowej, w którym rozwój CS aktywowany jest przez naskórną aplikację haptenu (m.in. PCI, OX, DNFB) [103] stanowi optymalne narzędzie badawcze stosowane do oceny funkcji limfocytów T *in vivo*. Poznane dzięki możliwości biernego transferu CS na naiwnych biorców przez komórki limfoidalne uczulonych dawców [129] mechanizmy wywołania, rozwoju, a w końcu regulacji reakcji CS znacząco pogłębiły wiedzę na temat funkcjonowania subpopulacji limfocytów T.

Wykazano m.in., że dożylna immunizacja wysokimi dawkami haptenu w formie rozpuszczalnej [113] bądź sprzężonej z powierzchnią syngenicznych komórek (erytrocyt, limfocyt, makrofag) [114] wywołuje u myszy stan tolerancji, w którym niemożliwa jest indukcja CS (Ryc. 6.2.1). Stan ten jest wynikiem aktywacji odpowiednich populacji komórek, wśród których wyselekcjonowane supresyjne limfocyty T wykazują zdolność hamowania biernego transferu CS [114]. Jeśli po aktywacji tolerancji zwierzęta poddane są dodatkowo naskórnej aplikacji haptenu, limfocyty lokalnych węzłów chłonnych i śledzion uwalniają tzw. czynnik supresyjny. Doświadczalnie otrzymywany jest on *in vitro* jako bezkomórkowy nadsącz hodowli limfocytów supresyjnych, wykazujący aktywność równoważną komórkom supresyjnym w hamowaniu przenoszenia reakcji CS przez limfocyty efektorowe uczulonych dawców do naiwnych biorców.

W niniejszej pracy badano strukturę i funkcję czynnika supresyjnego swoistego dla oksazolonu, powstanie którego indukowano u myszy szczepu CBA/J poprzez dożylną indukcję tolerancji wysokimi dawkami oksazolonu skoniugowanego z syngenicznymi erytrocytami oraz następującą po niej naskórną immunizacją tym samym haptenem. Upřednio prowadzone badania nad supresją mediowaną przez czynniki supresyjne limfocytów T w głównej mierze dotyczyły czynnika swoistego dla nadwrażliwości kontaktowej na trójnitrofenyl (TNP). Odpowiedź CS na haptent TNP indukuje powstanie klasycznej populacji efektorowych limfocytów CD4⁺, co wg Pichlera prowadzi do rozwoju podtypu IVa nadwrażliwości typu późnego. Haptent TNP/PCI swą budową chemiczną różni się znacząco od oksazolonu, co sugerowało odmienny sposób indukcji odpowiedzi efektorowej CS przez te haptenty. Stanowiło też przesłankę do zbadania fenotypu limfocytów efektorowych zaangażowanych w odpowiedź indukowaną oksazolonom.

W początkowym etapie badań ze względu na niepełne dane literaturowe określony został fenotyp komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon u myszy szczepu CBA/J. Wyeliminowanie z puli komórek węzłów chłonnych i śledzion myszy CBA/J aktywnie uczulonych oksazolonom komórek CD8⁺ znosiło zdolność przeniesienia uczulenia w biernym transferze CS na naiwnych, syngenicznych biorców. Jednocześnie stwierdzono, że negatywna selekcja komórek CD4⁺ nie hamowała przeniesienia nadwrażliwości w transferze adoptywnym. Analiza wyników doświadczenia (Ryc. 6.1.1) dowodzi, że komórkami efektorowymi nadwrażliwości kontaktowej w uczuleniu na oksazolon u myszy szczepu CBA/J są limfocyty T o fenotypie CD8⁺.

Obserwacja ta pozostaje zbieżna z pracami opisującymi dominującą rolę limfocytów T cytotoksycznych CD8⁺ jako komórek efektorowych CS wywoływanej silnymi haptenami [130,131]. Nadwrażliwość kontaktową mediowaną przez te komórki opisano m.in. dla uczulenia kontaktowego myszy szczepu C57/BL6 na dinitrofluorobenzen (DNFB) [132] oraz na oksazolon [133]. Haptenowo-swoiste limfocyty CD8⁺ indukowane są podczas pierwszego kontaktu z antygenem, podobnie jak w przypadku Th1ef. W przeciwieństwie do klasycznego przebiegu uczulenia wymagają one prezentacji neoantygeny przez LC w kontekście MHC klasy I. W fazie wywołania CS już w 6. godzinie po ponownej aplikacji haptenu limfocyty Tc efektorowe dzięki receptorom zasiedlania CLA migrują z krwi do skóry, miejsca powtórnego kontaktu z haptenem. Rozwój fazy efektorowej manifestuje się indukcją

apoptozy keratynocytów przez infiltrujące nabłonek limfocyty Tc [132]. Obserwacje te potwierdzono w doświadczeniach, w których użyto myszy z niesprawnymi mechanizmami cytotoksyczności. Zwierzęta pozbawione genów warunkujących funkcjonowanie obu mechanizmów: wydzielania perforyny oraz receptorowego Fas/FasL nie rozwijały reakcji na DNFB, pomimo obecności limfocytów Tc CD8⁺, zdolnych do sekrecji IFN γ . Cytokina ta w rozwoju CS pełni jedynie funkcję wzmacniającą; indukując ekspresję receptora Fas na keratynocytach zwiększa ich podatność na indukcję apoptozy. W układzie tym limfocyty T CD4⁺ pełnią funkcję komórek regulatorowych, kontrolujących aktywność komórek efektorowych za pośrednictwem sekrecji cytokin: IL-4 i IL-10 [134]. Supresyjną funkcją limfocytów CD4⁺ z puli komórek limfoidalnych tłumaczyć można uzyskane przez nas (statystycznie nieistotne) zwiększenie reakcji CS u myszy, którym transferowano komórki efektorowe pozbawione limfocytów CD4⁺, w porównaniu do zwierząt, które otrzymały całą pulę komórek (Ryc. 6.1.1).

Badania prowadzone przez Ptaka i wsp. w latach 80tych ubiegłego wieku wykazały, że niezbędna do indukcji czynników supresyjnych dwuetapowa – dożylna i naskórna - immunizacja tym samym haptenem prowadzi do aktywacji dwóch typów komórek [111]. Uczulanie naskórne haptenem aktywuje komórki Ly-1⁺ Ly-2⁻ (CD5⁺CD8⁻), produkujące antygenowo-specyficzny komponent TsF. Dożylna podanie haptenu natomiast indukuje komórki Ly-1⁻ Ly-2⁺ (CD5⁻CD8⁺), uwalniające drugą składową czynnika. Tylko kooperacja obu populacji skutkuje wytworzeniem czynnika w pełni aktywnego supresyjnie. W latach 80tych przypuszczano, że obie wspomniane populacje są limfocytami T [135,136]. Obecnie uważa się, iż wspomniane komórki CD5⁺ są limfocytami B1 [91]. Komórki te są aktywne w fazie indukcji CS. Do ich aktywacji dochodzi po naskórnym kontakcie z haptenem, a produkowane przez nie haptenowo-swoiste przeciwciała klasy IgM warunkują rozwój pełnej reakcji CS w fazie wywołania. Drugi etap indukcji czynnika supresyjnego - immunizacja naskórna - odpowiada procedurze aktywnego uczulenia kontaktowego. Wytwarzane przez komórki B1 przeciwciała pełnią tu jednak odmienną funkcję - suplementują supresyjną składową czynnika, nadając jej swoistość antygenową. Może mieć to związek z opisanym przez Ptaka i wsp. występowaniem antygenowo-specyficznego produktu zaindukowanych drogą uczulenia naskórnego limfocytów w różnych, monomerowych i polimerowych, formach [137]. Wykazano, że polimery dzięki posiadaniu wielu miejsc wiążących antygen współdziałają z komponentem

supresyjnym w hamowaniu reakcji CS, ale nie są zdolne przenieść nadwrażliwości na naiwnych biorców. Przeciwnie, forma monomerowa przenosi nadwrażliwość, ale nie bierze udziału w formowaniu aktywnego TsF.

Natomiast składowa indukowana podczas dożylniej aktywacji tolerancji produkowana jest przez właściwe komórki supresyjne, już w latach 80-tych określone jako limfocyty T [114]. Dokładny fenotyp tej populacji pozostawał jednak nieokreślony. W niniejszym projekcie przeprowadzono dwa typy doświadczeń służące uzupełnieniu tej wiedzy w odniesieniu do czynnika supresyjnego aktywnego w nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon (OX-TsF) u myszy szczepu CBA/J. Negatywna selekcja komórek limfoidalnych CD8⁺ węzłów chłonnych i śledzion myszy, u których zaindukowano produkcję OX-TsF prowadziła do zniesienia zdolności tych komórek do zahamowania transferu CS przez komórki efektorowe OX-swoiste. Dla potwierdzenia uzyskanego wyniku, część puli komórek węzłów chłonnych i śledzion dawców OX-TsF poddano selekcji pozytywnej na ziarenkach magnetycznych, ostatecznie otrzymując 3 grupy komórek: komórki nieselekcjonowane, komórki CD8⁺ oraz komórki CD8⁻. Wykazano, że tylko OX-TsF uzyskany z hodowli komórek nieselekcjonowanych oraz CD8⁺ wykazuje aktywność supresyjną. Spójne rezultaty obu doświadczeń dowodzą, że komórki produkujące aktywną składową OX-TsF należą do populacji limfocytów CD8⁺ (Ryc. 6.4.1 i 6.4.2).

Supresja nadwrażliwości kontaktowej na inny hapten, trójnitrofenyl, mediowana z udziałem wcześniej opisanego, TNP-swoistego czynnika również angażuje limfocyty Ts CD8⁺ [119]. Limfocyty supresyjne o fenotypie CD8⁺ stanowią pierwszą opisaną populację komórek regulatorowych. Obecnie natomiast znaczna część uwagi badaczy poświęcana jest komórkom regulatorowym o fenotypie CD4⁺. W przypadku CS na oksazolon opisano negatywną regulację warunkowaną przez komórki regulatorowe Treg CD4⁺CD25⁺ i Tr1 CD4⁺. Obie te populacje pełnią swe funkcje za pośrednictwem uwalnianej IL-10. Ponadto, komórki Treg CD4⁺CD25⁺ wpływają na proces toczenia i przylegania efektorowych komórek T do śródbłonka oraz na ich proliferację [138]. Komórki Tr1 natomiast hamują proces zapalny reakcji CS poprzez regulację dojrzewania i różnicowania komórek DC. Powodują również zmniejszenie syntezy IL-12 przez komórki APC [23]. Wiadomo także, że stosowana w niniejszym projekcie dożylna aktywacja tolerancji dużą dawką antygeny indukować może u zwierząt TCRα^{-/-} lub TCRβ^{-/-} limfocyty supresyjne TCRγδ (fenotyp CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD28⁺), które hamują bierny transfer CS za pośrednictwem wydzielanej IL-4 [139].

Udowodniony w niniejszej pracy CD8⁺ fenotyp limfocytów supresyjnych indukowanych *i.v.* podaniem wysokiej dawki oksazolonu myszom CBA/J, jest zgodny z fenotypem komórek produkujących aktywną składową TNP-TsF. Sugeruje to, że mimo różnych komórek efektorowych CS na TNP i OX, regulacja mediowana z udziałem czynników supresyjnych limfocytów T wykorzystuje podobne mechanizmy. Mechanizmy te prawdopodobnie są różne od sekrecji cytokin, charakterystycznej dla limfocytów CD4⁺ czy CD4⁺CD8⁻.

W przypadku czynnika supresyjnego swoistego dla TNP udowodniono, że aktywny komponent jest niskocząsteczkowym kwasem rybonukleinowym. Ekstrakt fenolowo-chloroformowy tego czynnika tracił swe właściwości w wyniku traktowania RNazą III, swoistą dla dwuniciowych RNA, a jego rozdział na sekwencjonującym żelu poliakrylamidowym doprowadził do wydzielenia 4 prążków, z których dwa (stanowiące faktycznie jeden duży) wykazywały właściwości supresyjne [117]. Prążki te miały wielkość ok. 70 par zasad, a więc odpowiadającą rozmiarowi odcinków prekursorowych regulacyjnych miRNA (pre-miRNA) [54].

Przypuszczono, że również w przypadku OX-TsF supresyjna składowa może mieć budowę RNA. Supernatant oksazolono-swoistych komórek supresyjnych, podobnie jak analogiczny supernatant uzyskiwany w modelu TNP-CS, poddany ekstrakcji do postaci mieszaniny DNA i RNA zachowywał swe właściwości biologiczne (Ryc. 6.2.2 i 6.3.1). Również kolejny krok oczyszczania, izolacja RNA z ekstraktu fenolowo-chloroformowego czynnika na kolumnach chromatograficznych, nie zniósł jego właściwości supresyjnych (Ryc. 6.2.3). Co więcej, wykazano że działanie OX-TsF QRNA charakteryzuje efekt dawki – supresja reakcji CS zmniejszała się w miarę obniżania stężenia QRNA w mieszaninie inkubacyjnej, aż do zaniku statystycznie istotnego zahamowania CS w przypadku najniższego badanego stężenia – 0,3µg na 7x10⁷komórek efektorowych (Ryc. 6.2.3). Podobny efekt zaobserwowano dla zmniejszających się dawek OX-TsF PCE (Ryc. 6.2.2). Ta zawierająca 95% DNA i 5% RNA mieszanina pozostawała aktywna supresyjnie stosowana w dawce 11µg, natomiast w dawce 5µg na 7x10⁷ komórek efektorowych nie wykazywała już właściwości regulacyjnych.

Dodatkowy dowód na rybonukleinowy charakter aktywnej składowej OX-TsF uzyskano wykorzystując enzymatyczną degradację czynnika. Zarówno oksazolono-swoiste komórki supresyjne, jak i OX-TsF (odpowiednio Ryc. 6.4.1, gr. E oraz Ryc. 6.3.1, gr. D) były wrażliwe na działanie RNazy A, tzn. inkubacja z tym

enzymem znosiła ich właściwości supresyjne. Przeprowadzony w ramach niniejszej pracy rozdział elektroforetyczny OX-TsF, TNP-TsF oraz NF dowiódł, że kwas rybonukleinowy będący aktywną składową czynników supresyjnych należy do grupy krótkich, regulacyjnych RNA (Ryc. 6.3.2). Mała rozdzielczość uzyskiwana na zastosowanym żelu agarozowym nie pozwoliła jednak na sprecyzowanie wielkości regulacyjnego komponentu OX-TsF.

Wstępne prace nad czynnikami supresyjnymi limfocytów T obejmowały również badania ich swoistości antygenowej. Czynniki uzyskiwano toleryzując ich dawców haptenami (TNP, DNP, OX) wolnymi lub sprzężonymi z mRBC, a następnie przeprowadzając immunizację naskórną odpowiednim haptenem. Wykazano, że wszystkie czynniki, testowane w formie nadsączy hodowli komórek suresyjnych, działają w sposób antygenowo specyficzny, tzn. mają zdolność supresji CS na hapten tożsamy z tym użytym podczas aktywacji tolerancji [114]. Wykazano również, że czynniki można oczyszczać metodą chromatografii powinowactwa na kolumnach Sepharose 4B opłaszczonych białkiem (bovine gamma globulin, BGG) sprzężonym z haptenami (TNBSA, DNP, OX). Frakcje wiążące się do odpowiednich kolumn wykazywały właściwości supresyjne w stosunku do CS wywołanej właściwym im haptenem. TNP-TsF wiążący się z kolumną TNP-BGG-Seph 4B hamował bierny transfer CS na TNP, a w mniejszym stopniu także CS na DNP, co mogło być związane z podobieństwem struktury haptenu [115]. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy dowiodły, że czynnik supresyjny OX-TsF zachowuje specyficzność antygenową w transferze komórek efektorowych CS pomimo ekstrakcji fenolowo-chloroformowej do formy PCE (Ryc. 6.7.1). Swoistość ta suplementowana jest prawdopodobnie drogą transferu z komórkami efektorowymi posiadającymi haptenu-swoistą składową białkową czynnika TsF.

Jak wspomniano, warunkiem pełnej aktywności czynników supresyjnych jest obecność obu ich składowych. Klasyczny proces indukcji TsF aktywuje w tym samym osobniku dwie różne populacje, produktem sekrecji których są komponenty czynnika. Nierozwiązanym do tej pory problemem był sposób, w jaki podjednostka antygenowo-specyficzna i supresyjna TsF oddziałują ze sobą, tworząc aktywny produkt.

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach struktury czynnika potwierdzono, uprzednio opisany dla TNP-TsF, supresyjny charakter czynnika oksazolono-swoistego powstałego po łącznej inkubacji supernatantów komórek

indukowanych osobno: naskórnym uczuleniem oksazolonem lub dożylnym szczepieniem OX sprzężonym z mRBC (Ryc. 6.6.1). We wcześniej przeprowadzanych doświadczeniach supernatanty komórek uzyskanych na drodze pojedynczej immunizacji stosowane osobno nie powodowały zahamowania reakcji CS, choć obserwowano pewną aktywność komponentu uzyskanego przez immunizację dożylną [111], znacząco jednak mniejszą od supresyjnego działania czynnika kompletnego czy zrekonstruowanego połączeniem supernatantów. Aktywność supresyjna komponentu indukowanego dożylnym podaniem oksazolonu sprzężonego z erytrocytami (OX-mRBC-F) w naszych doświadczeniach okazała się natomiast wysoka i statystycznie tożsama z zahamowaniem reakcji CS przez czynnik kompletny i połączenie jego komponentów.

Wyjaśnieniem obserwowanych przez nas zjawisk: swoistości antygenowej czynnika pozbawionego komponentu białkowego (OX-TsF PCE) oraz supresyjnej aktywności czynnika uzyskanego jedynie przez immunizację dożylną (OX-mRBC-F) może być potwierdzone przez nas występowanie TsF w formie egzosomów. Szukając odpowiedzi na pytanie o przekazywanie czynnika pomiędzy komórkami regulatorowymi a efektorowymi nadwrażliwości kontaktowej przetestowaliśmy hipotezę o transporcie czynników supresyjnych (zarówno TNP-TsF, jak i OX-TsF) w postaci egzosomów (Ryc. 6.2.4). Wyizolowane przez nas z supernatantów hodowli komórek limfoidalnych dawców toleryzowanych mikropęcherzyki okazały się być zdolne do hamowania transferu reakcji CS. Przypuszczamy, że błona egzosomu nie tylko stanowi zabezpieczenie dla przenoszonego regulacyjnego RNA, ale również zawiera miejsca wiążące przeciwciała lub ich fragmenty. W toku indukcji czynnika supresyjny RNA może być selektywnie wprowadzany do egzosomu, do którego przyłączane są również fragmenty przeciwciał, nadające całemu układowi specyficzność antygenową. Fragmenty te pochodzić mogą od zaktywowanych naskórną immunizacją limfocytów B1. Pamiętać należy, że komórki efektorowe CS otrzymywane są jako pula komórek węzłów chłonnych i śledzion, w której znajdują się też zaktywowane haptenowo-swoiste limfocyty B1. Niekompletny czynnik OX-mRBC-F może więc ulec rekonstrukcji w trakcie inkubacji poprzedzającej transfer. Podobnie, oczyszczony *in vitro* do postaci mieszaniny DNA-RNA, supresyjnie aktywny OX-TsF może zostać wprowadzony do egzosomów o swoistości antygenowej, przypuszczalnie wydzielanych przez limfocyty B1 obecne wśród komórek użytych do biernego transferu CS. Potwierdzeniem tych założeń mogą być

doświadczenia przeprowadzone przez Bryniarskiego i wsp. (dane nie opublikowane, artykuł zgłoszony do publikacji) z wykorzystaniem egzosomów wyizolowanych od dawców uczulonych chlorkiem pikrylu jedynie naskórną (PCI-F). Cząstki te nie wykazują aktywności supresyjnej, ale funkcja ta może być im nadana poprzez transfekcję czystym RNA czynnika supresyjnego (TsF QRNA) wyizolowanym z uprzednio wyprodukowanych czynników, niezależnie od ich swoistości antygenowej (TNP, OX), a nawet z czynnika pozbawionego swoistości antygenowej (Sham-F). Inkubacja PCI-F egzosomów z RNA czynnika negatywnego nie prowadzi do uzyskania przez nie aktywności supresyjnej. Bez względu na rodzaj komponentu supresyjnego, suplementowane nim PCI-F egzosomy wykazują zdolność supresji specyficzną względem haptenu TNP (dane nie opublikowane, artykuł zgłoszony do publikacji). Sugeruje to, że za swoistość antygenową czynników supresyjnych limfocytów T odpowiada składowa powstała po immunizacji naskórnej – egzosomy zaopatrzone w przeciwciała lub ich fragmenty. Potwierdzenie tej tezy przyniosły kolejne eksperymenty przeprowadzane przez Bryniarskiego i wsp. na myszach zmodyfikowanych genetycznie – pozbawionych genów związanych z produkcją przeciwciał (JHD^{-/-}). Myszy tego szczepu poddano indukcji tolerancji antygenowo-niespecyficzej oraz z użyciem haptenu TNP i OX, a z nadsączów hodowlanych odpowiednich komórek limfoidalnych otrzymano egzosomy, które nie wykazywały aktywności supresyjnej w modelu TNP-CS. Właściwość tą można było natomiast zaobserwować po inkubacji badanych egzosomów z syntetycznymi łańcuchami lekkimi przeciwciał, skierowanymi przeciw determinantom trójnitrofenolu. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, niezależnie od haptenu użytego do indukcji tolerancji, swoistość antygenowa egzosomów warunkowana była przez suplementowane *in vitro* łańcuchy lekkie – fragmenty rozpoznające haptenu TNP ukierunkowywały supresyjne działanie RNA na nadwrażliwość kontaktową na TNP [140].

Badania przeprowadzone do tej pory przez Bryniarskiego i wsp. pozwalają sądzić, że za regulacyjną funkcję czynników supresyjnych limfocytów T odpowiedzialne jest mikroRNA-150 [118]. Analiza molekularna TNP-TsF wykazała, że cząstka ta ulega nasilonej ekspresji w aktywnej supresyjnie frakcji czynnika. Ponadto, inkubacja TNP-TsF w postaci egzosomów lub chromatograficznie wyizolowanego RNA (QRNA) z sekwencjami komplementarnymi do miR-150 (antagomirami) znosi supresyjne działanie czynnika. Teza ta została również potwierdzona dla czynnika swoistego dla

oksazolonu. U myszy pozbawionych genu dla miR-150 uzyskanie stanu tolerancji na OX nie było możliwe (Suppl. ryc. 7.1), a nadsącz hodowli komórek limfoidalnych zwierząt poddanych immunizacji dożyłnej i naskórnej nie wykazywał zdolności zahamowania transferu CS na naiwnych biorców (Suppl. ryc. 7.2) (dane nieopublikowane, artykuł zgłoszony do publikacji). U zwierząt tych dochodziło jednak do rozwoju nadwrażliwości na ten hapten, co sugeruje, że brak miR-150 jest selektywnie związany z upośledzeniem funkcji komórek supresyjnych.

Ponadto wykazano [118], że nieaktywne regulacyjnie egzosomy OX-TsF wyizolowane z nadsączów hodowlanych komórek dawców miR-150^{-/-} zyskują właściwości supresyjne po inkubacji z syntetycznymi odcinkami miRNA-150. Myszy miR-150 ko oprócz interesującego nas mikroRNA 150 nie posiadają również jego partnera – nici miR-150*. Transfekcja egzosomów wyizolowanych od myszy wspomnianego szczepu syntetycznymi cząstkami miR-150*, lub kontrolnymi, nieaktywnymi regulacyjnie odcinkami krótkiego RNA nie przywracała im jednak właściwości supresyjnych.

GRUPA:	Aktywacja tolerancji OX	Aktywna immunizacja OX	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD	% odpowiedzi CS	% supresji CS
A (miR150ko)	-	+		100	0
B (miR150ko)	+	+		107	0
C (C57/Bl6)	-	+		100	0
D (C57/Bl6)	+	+		32	68

Supp. ryc. 7.1

PRÓBA WYWOŁANIA STANU TOLERANCJI U MYSZY POZBAWIONYCH GENU DLA miRNA150 (miR150^{-/-})

Reakcję nadwrażliwości kontaktowej wywołano poprzez aktywne uczulenie oksazolonom u myszy miR150^{-/-} (H2b)(gr. A), jak i u myszy szczepu C57/B6 (H2b) (gr. C). Próba toleryzacji zwierząt pozbawionych miRNA-150 nie powiodła się (gr. B), w przeciwieństwie do zahamowania reakcji CS obserwowanego w grupie toleryzowanych myszy C57/Bl6 (gr. D). Grupy badane liczyły po 4-5 osobników.

Znamienność statystyczna:

gr. A vs gr. B → brak znamienności

gr. C vs gr. D → p<0,0005

GRUPA:	Komórki efektorowe OX-CS	Inkubacja: egzosomy	WIELKOŚĆ REAKCJI CS [Uxmm ⁻²] ± SD	% odpowiedzi CS	% supresji CS
A	+	-		100	0
B	+	OX-TsF WT		29	71
C	+	OX-TsF miR150ko		118	0
D	+	NF WT		129	0
E	+	NF miR150ko		111	0

Supp. ryc. 7.2

TESTOWANIE SUPRESYJNYCH WŁAŚCIWOŚCI EGZOSOMÓW WYZIOLOWANYCH Z SUPERNATANTÓW KOMÓREK LIMFOIDALNYCH TOLERYZOWANYCH DAWCÓW SZCZEPU miR150^{-/-}

Aktywność supresyjną egzosomów testowano w transferze biernym po inkubacji z komórkami efektorowymi OX-CS uzyskanymi od dawców wild type (C57/B6). Testowano egzosomy uzyskane od dawców toleryzowanych, w porównaniu do egzosomów wyizolowanych z supernatantów komórek zwierząt naiwnych. W obu przypadkach użyto zarówno zwierząt szczepu C57/B6 (wild type), jak i myszy miR150^{-/-}.

Grupy badane liczyły po 5 osobników.

Znamiennność statystyczna:

gr. A vs gr. B → p<0,0005

gr. A vs gr. C, gr. A vs gr. D, gr. A vs gr. E → brak znamienności

gr. B vs gr. C, gr. B vs gr.D, gr.B vs gr.E → p<0,0005

Pomimo tego, że większość prac charakteryzujących miRNA została opublikowana w ostatniej dekadzie, już w latach pięćdziesiątych XX w. opisano tzw. *transfer factor* (TF), czynnik izolowany z leukocytów zwierząt uczulonych, zdolny do przenoszenia informacji immunologicznej (w tym wypadku nadwrażliwości kontaktowej) na osobniki naiwne. Wykazano, że *transfer factor* jest odporny na trawienie DNazą, trzustkową RNazą (rozkładającą jednoniciowy RNA) i trypsyną [141], natomiast działanie RNazy III (specyficznej dla dwuniciowych RNA) powodowało brak oczekiwanej aktywności TF [142]. *Transfer factor* był też cząstką na tyle małą, że przechodził przez błonę dializacyjną, nie mógł więc być ani białkiem, ani cząstką je kodującą [143]. Już wtedy sugerowano, że transdukcja sygnału za pośrednictwem kwasu rybonukleinowego może realizować się przez jego komplementarność bądź do cząstek hamujących transkrypcję białka bądź do określonego odcinka DNA, co prowadzić miało do aktywacji jego transkrypcji. Niemniej jednak, na skutek niedostatecznego rozwoju immunologii i biologii molekularnej w tamtym okresie badania te nie wywołały większego zainteresowania, a w związku z niemożnością sprecyzowania mechanizmu działania TF były traktowane jako swego rodzaju ciekawostka i nie doczekały się gruntownego zbadania ani kontynuacji [144].

W świetle obecnej wiedzy na temat interferencji RNA, teza o przekazywaniu informacji – zarówno przeniesienia nadwrażliwości, jak i sygnału supresyjnego, między komórkami układu immunologicznego za pośrednictwem niekodujących odcinków RNA jest uzasadniona. W przypadku czynników supresyjnych limfocytów T efektem regulacyjnego działania ich rybonukleinowego komponentu jest zahamowanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej.

W pracy przedstawiono dowody na to, że supresyjną składową OX-TsF jest miR-150, a więc regulacja mediowana przez opisywane przez nas egzosomy związana jest z zablokowaniem w komórkach biorących udział w przebiegu CS ekspresji mRNA o sekwencji przynajmniej częściowo komplementarnej względem miR-150. Doniesienia innych grup badawczych opisują wielokierunkowe działanie tego mikroRNA. W układzie immunologicznym zaznacza się ono szczególnie w trakcie różnicowania limfocytów T i B. MiR-150 jest regulatorem tych procesów, jego poziom jest niski w komórkach prekursorowych limfocytów, narasta w miarę ich dojrzewania, aż do stadium spoczynkowego limfocyta, po czym znowu spada w aktywowanych komórkach [145]. Wzrostowi poziomu miR-150 podczas różnicowania tymocytów od komórek podwójnie negatywnych do podwójnie pozytywnych, a następnie

pojedynczo pozytywnych towarzyszy spadek stężenia NOTCH3, jednej z cząstek regulowanych przez miR-150. W badaniach eksperymentalnych dowiedziono, że transfekcja linii białaczkowych z limfocytów T cząstkami miR-150 wywołuje efekt proapoptotyczny i antyproliferacyjny, prawdopodobnie również za pośrednictwem NOTCH3 [146]. Opisano również regulacyjny wpływ miR-150 na rozwój komórek NK oraz iNKT [147]. MikroRNA-150 wywiera odmienny wpływ na te populacje: pobudza różnicowanie i dojrzewanie NK, natomiast w przypadku iNKT powoduje spadek ich liczby. Ponadto, miR-150 blokując ekspresję czynnika transkrypcyjnego c-Myb kontroluje rozwój limfocytów B. Eksperymentalna nadekspresja miR-150 hamuje transformację komórek pro-B do pre-B i powoduje brak limfocytów B1, natomiast u zwierząt miR-150^{-/-} pomimo normalnego rozwoju limfocytów T i B2 obserwuje się znacznie zwiększoną liczbę komórek B1 [86]. Supresja wspomnianej cząstki c-Myb przez miR-150 prowadzić może do apoptozy komórek B, co związane jest z indukującym wpływem c-Myb na czynnik antyapoptotyczny Bcl-2 [148].

Prawdopodobnie również poprzez oddziaływanie z c-Myb miR-150 pobudza trombogenezę, aktywując różnicowanie komórek prekursorowej linii erytrocytarno-megakariocytarnej w kierunku megakariocytów [149]. Ponadto zmniejszony poziom miR-150 zaobserwowano u pacjentów z sepsą, jednocześnie nie stwierdzając u nich jednak zmian w liczbie krwinek białych. Sugeruje to wielopłaszczyznową regulację funkcjonowania układu immunologicznego przez miR-150. Oprócz wspomnianego wpływu na rozwój i różnicowanie komórek odpornościowych wykazano, że sekwencja miR-150 jest komplementarna do ok. 20 genów kodujących białka związane z przebiegiem odpowiedzi immunologicznej, m.in. MAPK, Wnt, ErbB i mTOR, w tym także cytokiny: IL-10, TNF α i IL-18. W przypadku pacjentów z sepsą stwierdzono negatywną korelację między poziomem miR-150 a stężeniem tych cytokin w surowicy, szczególnie zaznaczoną w przypadku IL-18, co doprowadziło do propozycji zastosowania stosunku stężenia miR-150 do IL-18 w osoczu jako markera sepsy i jej ciężkości [150]. IL-18 jest cytokiną o plejotropowym działaniu, w zależności od środowiska cytokinowego może brać udział w aktywacji zarówno odpowiedzi Th1-, jak i Th2- oraz Th-17-zależnej. W synergii z IL-12 pobudza uwalnianie cytokin związanych z odpowiedzią Th1-zależną (IFN γ , GM-CSF, TNF α , IL-1), aktywuje cytotoksyczność limfocytów T i NK oraz nasila ekspresję niektórych receptorów chemokinowych. Przy braku IL-12, IL-18 może natomiast indukować produkcję IL-4 i IL-13 w komórkach NK, mastocytach i bazofilach [151].

Istnieją również doniesienia dotyczące wpływu miR-150 na migrację komórek. W mysim modelu niedotlenienia mięśnia sercowego mikroRNA to hamując ekspresję receptora chemokinowego CXCR4 na komórkach jednojądrowych szpiku zmniejsza ich napływ do krwi obwodowej [152]. Przeciwnie, w badaniach *in vitro* wykazano, że transportowany w mikropęcherzykach miR-150 poprzez supresję c-Myb zwiększa migrację komórek śródbłonka HMEC-1 [85].

Nierozwiązana pozostaje kwestia, który z etapów rozwoju bądź modulacji CS regulowany jest przez badane czynniki supresyjne limfocytów T. Wyniki przeprowadzonych przez nas doświadczeń badających bezpośredni wpływ OX-TsF na aktywność cytokinotwórczą wyizolowanych komórek efektorowych CS na oksazolon nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi a poddanymi działaniu OX-TsF. Biorąc pod uwagę, że jedną z sekwencji regulowanych przez mikroRNA-150 jest czynnik c-Myb, indukujący antyapoptotyczne białko Bcl-2, przeprowadzono także analizę cytofluorymetryczną indukcji apoptozy komórek efektorowych CS przez OX-TsF. Uzyskane rezultaty powinny być jednak interpretowane z rozwagą. Znaczne zwiększenie odsetka komórek we wczesnej fazie apoptozy w grupie hodowanej w obecności OX-TsF PCE wynikać może raczej z zaburzenia homeostazy komórek przez wprowadzenie znacznej ilości kwasów dezoksyrybonukleinowych (95% ekstraktu fenolowo-chloroformowego OX-TsF), niż ze specyficznego działania supresyjnego RNA czynnika. Analiza wpływu egzosomów uwalnianych przez komórki limfoidalne uzyskane od dawców oksazolonowo-swoistego TsF, jak i haptenowo-niespecyficznego czynnika Sham-F sugeruje, że powodują one nasiloną nekrozę badanych komórek. Z analizy uzyskanych w trakcie doświadczenia wykresów typu dot-plot wynika, że w puli komórek CD3⁺ barwiących się zarówno FITC jak i PI wyróżnić można dwie subpopulacje, różniące się intensywnością fluorescencji pochodzącej od jodku propidyny. W pracy przyjęto, że populacja silniej fluoryzująca to komórki nekrotyczne, słabszy sygnał przypisany został limfocytom w stadium późnej apoptozy. Pamiętać należy jednak, że zastosowana metoda generalnie nie pozwala na odróżnienie komórek będących w późnej fazie apoptozy od komórek nekrotycznych – w obu przypadkach komórki są podwójnie pozytywne. Opisywany przez nas efekt nekrozy może być w rzeczywistości sygnałem późnej apoptozy subpopulacji komórek, do których sygnał supresyjny przekazywany w formie egzosomów (zarówno OX-TsF, jak i Sham-F) został dostarczony bardziej efektywnie – śmierć komórki nastąpiła istotnie wcześniej

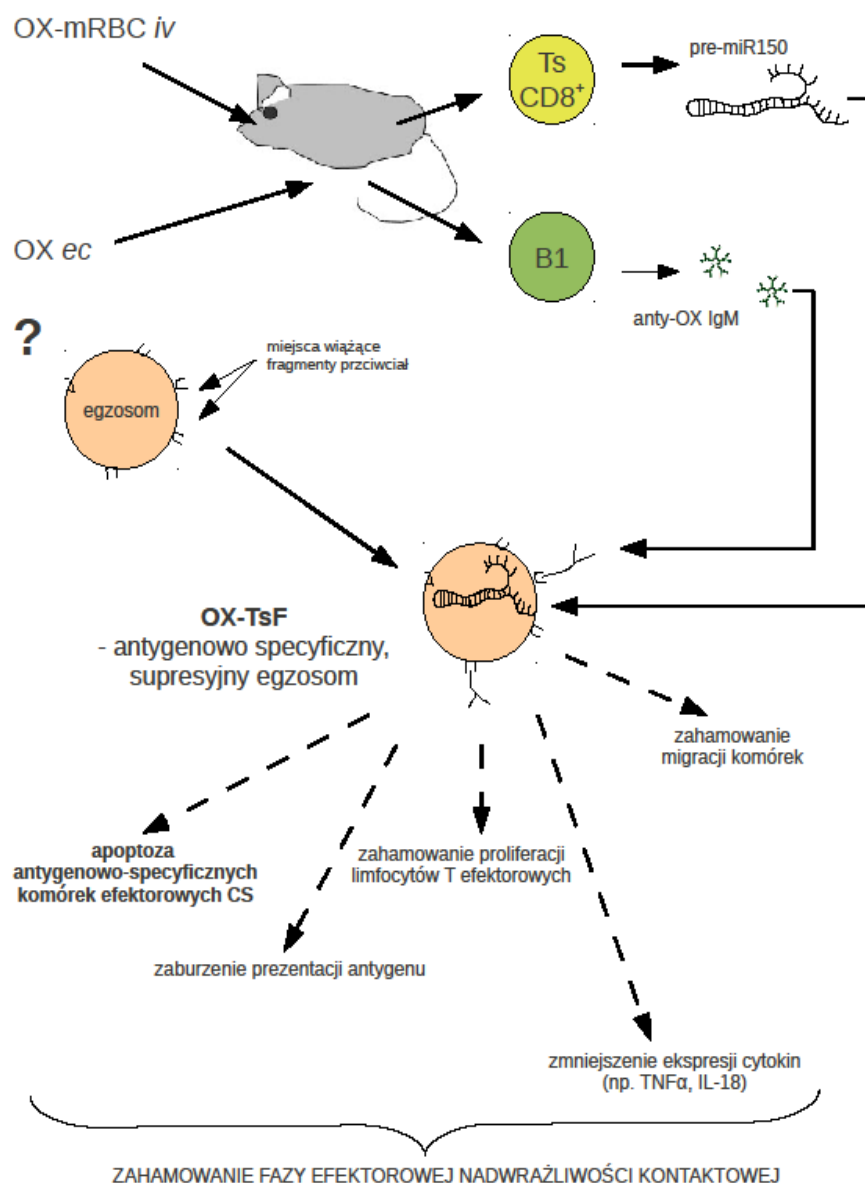
niż przeprowadzono pomiar. Nieznana kinetyka procesu apoptotycznego w odniesieniu do oddziaływania OX-TsF – komórki efektorowe, zapewne dodatkowo zależna od formy czynnika, uniemożliwia wyciągnięcie jednoznacznych wniosków co do mechanizmu śmierci badanych komórek. Sugestia o możliwym wpływie czynnika supresyjnego oksazolono-specyficznego na apoptozę limfocytów efektorowych specyficznych względem tego haptenu wydaje się być jednak słuszna (Ryc. 6.8.1).

W większości doświadczeń w niniejszej pracy stosowano model biernego transferu nadwrażliwości za pośrednictwem komórek efektorowych dawców, a efektem supresji była niemożność wywołania fazy efektorowej u biorców. Potwierdzona została jednak także zdolność czynnika do zahamowania już rozwiniętej fazy efektorowej nadwrażliwości kontaktowej. W rozwoju i przebiegu tej fazy bezpośredni udział, obok limfocytów efektorowych fazy późnej i komórek pamięci, biorą również inne populacje, takie jak mastocyty, płytki krwi, komórki dendrytyczne, keratynocyty, a w końcu makrofagi i neutrofile oraz komórki regulacyjne: supresyjne i kontrasupresyjne. Migracja tych komórek oraz interakcje między nimi opierają się na wielorakich mechanizmach, takich jak sekrecja cytokinowa i chemokinowa, oddziaływanie receptorowe, a zapewne nierzadko również przekazywanie cząstek regulacyjnego RNA. Biorąc pod uwagę powyższe mechanizmy oraz w związku ze wspomnianym wielokierunkowym działaniem właściwego supresyjnego komponentu TsF – mikroRNA-150, założyć należy, że funkcja czynników supresyjnych limfocytów T nie musi być realizowana poprzez bezpośredni wpływ na komórki efektorowe CS. Za tezę tą przemawia również fakt, że niezależnie od fenotypu komórek efektorowych CS (Th1 CD4⁺ w przypadku CS na TNP, Tc CD8⁺ dla CS na OX) komponent supresyjny TsF jest taki sam. Sugeruje to ponadto, że efekt regulacyjny czynników supresyjnych limfocytów T realizowany jest na etapie wspólnym dla obu podtypów CS. Jest wysoce prawdopodobne, że etapem tym jest prezentacja antygeny, a TsF wpływa na aktywność limfocytów efektorowych CS za pośrednictwem komórek APC. Już wcześniejsze badania Ptaka i wsp. nad TsF wskazywały, że ma on zdolność wiązania się z makrofagami [115]. Opisano również, że obok wpływu na limfocyty efektorowe, czynniki supresyjne mogą kooperować z makrofagami, prowadząc do uwolnienia przez te ostatnie tzw. makrofagowego czynnika supresyjnego (MsF), wzmacniającego działanie TsF w sposób antygenowo niespecyficzny [153].

Wykazana w testach *in vitro* zdolność czynnika do zaburzenia odpowiedzi komórek na IL-2, objawiająca się zahamowaniem proliferacji linii komórkowej IL-2-zależnej, wskazywać może, że w obecności TsF aktywacja limfocyta efektorowego w momencie prezentacji antygeny ulega zahamowaniu.

Wspomnieć należy też o przeprowadzonych w latach 80tych doświadczeniach, mogących sugerować, że komórką docelową dla TsF jest limfocyt kontrasupresyjny [154]. Autorzy zwrócili uwagę, że do biernego transferu CS, oprócz komórek efektorowych, niezbędne są limfocyty kontrasupresyjne, znoszące funkcję naturalnych komórek supresyjnych biorcy. Eksperymentalna blokada tych ostatnich poprzez traktowanie cyklofosfamidem umożliwia rozwój reakcji CS, nawet w przypadku inkubacji transferowanych komórek z czynnikiem supresyjnym. Z puli komórek używanych do transferu CS to limfocyty kontrasupresyjne, wyizolowane dzięki ich zdolności do adherencji do lektyny *Vicia villosa*, okazały się być regulowanymi przez TsF, który znosząc ich ochronny wpływ na właściwe komórki efektorowe prowadził do uwidocznienia naturalnej supresji i niemożności wywołania nadwrażliwości kontaktowej u biorców komórek efektorowych [154].

Wspomniane mechanizmy działania TsF – indukcja apoptozy limfocytów efektorowych, wpływ na proces prezentacji antygeny lub na pozytywną regulację CS z pewnością nie są jedynymi możliwymi. Plejotropowość funkcji miR-150 skłania do przypuszczenia, że również wykorzystujący jego regulacyjne działanie TsF kontrolować może więcej niż jeden z elementów składających się na patomechanizm reakcji CS. Rozwiązanie tej kwestii wymaga dalszych badań (Ryc. 7.3).



Ryc. 7.3
MOŻLIWE MECHANIZMY DZIAŁANIA OX-TsF

Powstanie czynnika supresyjnego swoistego dla nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon wymaga indukcji dwóch typów komórek, Ts oraz B1, produktami których są odpowiednio komponent supresyjny i antygenowo-swoisty OX-TsF. Składowe te kooperują za pośrednictwem egzozomów, dostarczających sygnał supresyjny do komórek docelowych. Pochodzenie egzozomów nie jest pewne; mogą one być produktem komórek uwalniających komponenty czynnika lub mogą być wydzielane przez inne komórki. Funkcja OX-TsF realizowana jest z udziałem miRNA-150, który indukować może apoptozę komórek efektorowych CS. Pozostałe zasugerowane mechanizmy wynikają z opisanego przez inne grupy plejotropowego działania miR-150, a ich potwierdzenie w odniesieniu do OX-TsF wymaga dalszych badań.

Niemniej jednak, opisywany mechanizm regulacyjny, wykorzystujący supresję funkcji limfocytów T za pośrednictwem niekodujących odcinków RNA, w przyszłości stanowić może podstawę efektywnej terapii schorzeń w patomechanizmie których rolę odgrywa zaburzona funkcja komórek T. Wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doświadczeń, badających właściwości oksazolonowo-swoistego czynnika supresyjnego dowiodły, że regulacji mediowanej przez TsF podlegają nie tylko limfocyty Th1, ale również Tc, a zatem że mechanizm ten może być wykorzystywany do kontroli funkcji obu tych populacji. Wykazano również, że funkcja OX-TsF nie wymaga sygnalizacji przez układ zgodności tkankowej MHC, gdyż czynnik supresyjny pozostawał aktywny niezależnie od tego, czy stosowany był u myszy szczepu, u którego został zaindukowany, czy u zwierząt o odmiennych antygenach MHC. Dowiedziono ponadto, że czynniki supresyjne limfocytów T wydzielane są w formie egzosomów. Stosowana przez nas procedura indukcji czynnika aktywuje dwie populacje komórek, limfocyty B1 oraz supresyjne komórki T uwalniające odpowiednio antygenowo-swoistą i regulacyjną składową czynnika. W pracy wykazano, że kooperacja tych komponentów, która skutkuje wytworzeniem aktywnego czynnika możliwa jest dzięki wykorzystaniu struktury egzosomów. Pęcherzyki te stanowią układ transportujący sygnał regulacyjny, ukierunkowany antygenowo-specyficznie na docelowe komórki dzięki zakotwiczonym na ich powierzchni łańcuchom lekkim przeciwciał. W przyszłości umożliwić to może syntezę mikropęcherzyków przenoszących pożądaną informację regulacyjną do komórek wykazujących ekspresję określonego antygenu.

6. WNIOSKI

Przedmiotem niniejszej pracy był swoisty dla oksazolonu czynnik supresyjny (OX-TsF), o aktywności biologicznej hamowania reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CS) na oksazolon u myszy szczepu CBA/J.

1 **Wykazano, że komórkami efektorowymi tej reakcji są limfocyty T CD8⁺.**

2 **Dokonano oceny struktury OX-TsF:**

2.1 Do pełnej aktywności OX-TsF niezbędna jest obecność dwóch jego komponent, uwalnianych przez różne subpopulacje komórek - limfocyty B1 produkujące składową antygenowo-swoistą oraz limfocyty T supresyjne uwalniające komponent regulacyjny. Bezpośrednia kooperacja tych komórek nie jest niezbędna, czynnik może ulec rekonstytucji w warunkach *in vitro*, pod warunkiem obecności obu składowych.

2.2 Populacją uwalniającą aktywną składową czynnika są limfocyty supresyjne T CD8⁺.

2.3 Supresyjny komponent OX-TsF jest kwasem rybonukleinowym:

2.3.1 OX-TsF zachowuje aktywność po izolacji do formy mieszaniny DNA i RNA (OX-TsF PCE) oraz do czystej frakcji RNA (OX-TsF QRNA);

2.3.2 aktywność form czynnika: OX-TsF PCE i OX-TsF QRNA charakteryzuje efekt dawki, zanik efektu supresyjnego obserwowano przy stosowaniu OX-TsF w dawkach odpowiednio 5µg i 0,3µg na biorcę;

2.3.3 zarówno OX-TsF, jak i produkujące go komórki supresyjne są wrażliwe na działanie RNazy;

2.3.4 frakcja RNA czynnika zawiera krótkie odcinki kwasów rybonukleinowych (10-90 nukleotydów).

2.4 OX-TsF wydzielany jest w postaci egzosomów, stanowiących mechanizm przenoszący sygnał supresyjny do komórek docelowych oraz umożliwiających interakcje pomiędzy składowymi czynnika. Egzosomy te wykazują aktywność regulacyjną równoważną innym formom OX-TsF.

3 **Zdefiniowano funkcję OX-TsF:**

3.1 OX-TsF wykazuje zdolność zahamowania zarówno wywołania fazy efektorowej reakcji nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon w modelu biernego przeniesienia CS, jak i supresji aktywnego uczulenia.

- 3.2 Aktywność supresyjna OX-TsF obserwowana jest także *in vitro* – jako efekt zahamowania proliferacji linii komórkowej IL-2-zależnej (HT-2).
- 3.3 OX-TsF jest antygenowo swoisty, tzn. wykazuje zdolność zahamowania reakcji nadwrażliwości kontaktowej wywołanej przez oksazonon, ale nie przez inne hapteny.
- 3.4 Funkcja OX-TsF nie podlega restrykcji MHC; czynnik wykazuje aktywność supresji CS niezależnie od szczepów myszy dawców oraz biorców czynnika.
- 3.5 Nie wykazano regulacyjnego wpływu czynnika na sekrecję badanych cytokin przez limfocyty T efektorowe.
- 3.6 Jednym z możliwych mechanizmów działania czynnika jest indukcja apoptozy antygenowo-swoistych limfocytów efektorowych nadwrażliwości kontaktowej.

PIŚMIENICTWO:

1. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2001;1:177-86.
2. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:954602.
3. Fan Z, Zhang Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol* 2005; 2:259-64.
4. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003;15:553–559.
5. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol* 2003;15:533–543.
6. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:323–370.
7. Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995;146:57-79.
8. Gershon RK, Kondo K. (1971): Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-14.
9. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Houry SJ. Regulatory functions of CD8+CD28– T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 2003;112:1037–1048.
10. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:735–746.
11. Deniz G, Erten G, Kucuksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, Akdis CA, Akdis M. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2008;180:850–857.
12. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271–283.
13. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self tolerance. *Cell* 2000;101:455-458.
14. Bryniarski K, Sikora E, Obtułowicz K. Rola limfocytów T regulacyjnych w alergii i astmie. Aktualny stan wiedzy. *Alergologia Immunologia* 2010;7:89-93.
15. Ptak W, Ptak M, Szczepanik M. Podstawy immunologii. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
16. Akbari O, Stock P, DeKruyff R, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:627–633.
17. Taniguchi M, Tashiro T, Dashtsoodol N, Hongo N, Watarai H. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol* 2009;22:1-6.
18. Liotta F, Frosali F, Querci V, Mantei A, Fili L, Maggi E, Mazzinghi B, Angeli R, Ronconi E, Santarlasci V, Biagioli T, Lasagni L, Ballerini C, Parronchi P, Scheffold A, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human immature myeloid dendritic cells trigger a Th2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1000–1005.
19. Asherson GL, Stone SH. Selective and specific inhibition of 24 hour skin reactions in the guinea pig. I. Immune deviation: description of the phenomenon and the effect of splenectomy. *Immunology* 1965;9:205-217.
20. Maggi E. T cell responses induced by allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Immunol* 2010;161:10-18.

21. Zhu J, Paul W. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research* 2010;20:4-12.
22. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* 2009;31:438-449.
23. Majewska M, Szczepanik M. Reakcja nadwrażliwości kontaktowej, jej mechanizm i regulacja. *Postępy Hig Med Dosw* 2009;63:47-57.
24. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor beta in T cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002;2:46–53.
25. Thomas DA, Massagué J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8:369-380.
26. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor β cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature (Lond.)* 1985;316:701-705.
27. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10 mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007;204:285-297.
28. Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 2009;31:209-219.
29. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
30. Palomares O, Yaman G, Azkut AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010;40:1232-1240.
31. Lombardi V, Akbari O. Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma. *Drug News Perspect* 2009;22:445-451.
32. Tran DQ. TGF- β : the sword, the wand, and the shield of FOXP3⁺regulatory T cells. *J Mol Cell Biol* 2012;4:29-37.
33. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 2007;446:685–689.
34. McGuirk P, Higgins SC, Mills K. The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;10:21–28.
35. Bennett C, Christie J, Ramsdell F, Brunkow M, Ferguson P, Whitesell L, Kelly T, Saulsbury F, Chance P, Ochs H. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–21.
36. Li CR, Baaten BJ, Bradley LM. Harnessing memory adaptive regulatory T cells to control autoimmunity in type 1 diabetes. *J Mol Cell Biol* 2012;4:38-47.
37. Godebu E, Summers-Torres D, Lin MM, Baaten BJ, Bradley LM. Polyclonal adaptive regulatory CD4 cells that can reverse type I diabetes become oligoclonal long-term protective memory cells. *J Immunol* 2008; 181:1798–1805.
38. Strzępa A, Szczepanik M. IL-17-expressing cells as a potential target in therapy of immunological disorders. *Pharmacol Rep* 2011;63:30-44.
39. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Hirahara K, O'Shea JJ. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol* 2011;32:395-401.

40. Juvet SC, Zhang L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol* 2012; 4:48-58.
41. Hill M, Thebault P, Segovia M, Louvet C, Bériou G, Tilly G, Merieau E, Anegeon I, Chiffolleau E, Cuturi MC. Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and Epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant* 2011;11:2036-2045.
42. Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol* 2008;181:2271-2275.
43. Gao JF, McIntyre MS, Juvet SC, Diao J, Li X, Vanama RB, Mak TW, Cattral MS, Zhang L. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2011;41: 2699-2708.
44. He KM, Ma Y, Wang S, Min WP, Zhong R, Jevnikar A, Zhang ZX. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol* 2007;37:3455 –3466.
45. Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4⁺CD8⁻ T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 2010;88,771-780.
46. Ptak W, Szczepanik M, Bryniarski K, Tutaj M, Ptak M. Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigen-nonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:8–14.
47. Tutaj M, Szczepanik M. Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein induces TCR alpha⁺ CD4⁺CD8⁺ double positive suppressor cells that protect from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 2007;28:208-215.
48. Szczepanik M, Tutaj M, Bryniarski K, Dittel BN. Epicutaneously induced TGF-beta-dependent tolerance inhibits experimental encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005;164:105-14.
49. Marcińska K, Szczepanik M. Mechanisms involved in the regulation of immune response in animal model of rheumatoid arthritis in mice (CIA). *Postępy Hig Med Dośw* 2010;64:372-385.
50. Juryńczyk M, Walczak A, Jurewicz A, Jesionek-Kupnicka D, Szczepanik M, Selmaj K. Immune regulation of multiple sclerosis by transdermally applied myelin peptides. *Ann Neurol* 2010;68:593–601.
51. Fairchild RL, Kubo RT, Moorhead JW.: Soluble factors in tolerance and contact sensitivity to 2,4-dinitro-fluorobenzene in mice. IX. A monoclonal T cell suppressor molecule is structurally and serologically related to the alpha/beta T cell receptor. *J Immunol* 1988;141:3342-3348.
52. Paliwal V, Ptak W, Askenase PW. Regulation of allergic contact sensitivity in mice: soluble alpha beta T cell receptors, derived via cDNA transfection and enzymatic cleavage from the surface of T cells, protect contact sensitivity effector T cells from active T cell suppression. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:365.
53. Sikora E, Bryniarski K. Rola srRNA w regulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. *Alergologia Immunologia* 2009;6:61-64.
54. Davidson-Moncada J, Papavasiliou N, Tam W. MicroRNAs of the immune system. Roles in inflammation and cancer. *Ann NY Acad Sci* 2010;1183:183-194.

55. Lee C-C, Chiang B-L. RNA interference: New therapeutics in allergic diseases. *Curr Gene Ther* 2008;8:236-246.
56. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
57. Lindsay MA. Micro RNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008; 29:343-357.
58. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
59. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004;10:185-91.
60. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17:3011-3016.
61. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:111-22.
62. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the Argonautes. *Nat Chem Biol* 2007;3:36 –43.
63. Song JJ., Smith S.K., Hannon G. J., Joshua-Tor L.: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004;305:1434-1437.
64. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:1378-1398.
65. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:376-385.
66. Paddison PJ, Vogt PK. RNA interference. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008; 216-220.
67. Sikora E, Ptak W, Bryniarski K Immunoregulacja poprzez interferencyjny RNA – mechanizmy, rola, perspektywy. *Postepy Hig Med Dosw* 2011;65:482-495.
68. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343-9.
69. Xiao Ch, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;136:26-36.
70. Taganov KD, Boldin MT, Baltimore D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 2007;26:133-137.
71. Zhou B, Wang S, Mayr Ch, Bartel DP, Lodish HF. MiR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7080-7085.
72. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007;129:147-161.
73. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008;451:1125-1129.

74. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12481-12486.
75. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolisaccharide/TNF-(alpha) stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007;179:5082-5089.
76. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 2005;120:623-634.
77. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das PP, Miska EA, Rodriguez A, Bradley A, Smith KG, Rada C, Enright AJ, Toellner KM, MacLennan IC, Turner M. MicroRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007;27:847-859.
78. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005;308:557-560.
79. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, Bluestone JA. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008;205:1983-1991.
80. Belting M, Wittrup A. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 2008;183(7):1187-1191.
81. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20:847-856.
82. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M. Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett* 2007;113:76-82.
83. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654-659.
84. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE* 2008;3:e3694.
85. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang Ch-J. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010;39:133-144.
86. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007;131:146-159.
87. Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J* 1999;5:7.
88. Cher DJ, Mossman TR. Two types of murine helper T cell clones. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;138:3688-3694.

89. Krasteva M, Kehren J, Ducluzeau MT, Sayag M, Cacciapuoti M, Akiba H, Descotes J, Nicolas JF. Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur J Dermatol* 1999;9:65-77.
90. Askenase PW. Effector and regulatory mechanisms in delayed-type hypersensitivity. *Allergy: Principles and practice*. 4th ed. Eds. Middleton i inn. CV. Mosby Co, St Louis, 2002.
91. Szczepanik M, Akahira-Azuma M, Bryniarski K, Tsuji RF, Kawikova I, Ptak W, Kiener C, Campos RA, Askenase PW. B1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 2003;171:6225-35.
92. Kieć-Świerczyńska M. Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry. *Patomechanizm. Alergia* 2009;1:33-37.
93. Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004;14:284-295.
94. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012;1:114-24.
95. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 2010;11:814-819.
96. Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Dürr C, Heimesaat MM, Bereswill S, Fejer G, Vassileva R, Jakob T, Freudenberg N, Termeer CC, Johner C, Galanos C, Freudenberg MA. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J Exp Med* 2008;205:2151-62.
97. Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J, French LE. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2007;127:1956-1963.
98. Antonopoulos C, Cumberbatch M, Dearman RJ, Daniel RJ, Kimber I, Groves RW. Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice. *J Immunol* 2001;166:3672-3677.
99. Itakura A, Szczepanik M, Campos RA, Paliwal V, Majewska M, Matsuda H, Takatsu K, Askenase PW. An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J Immunol* 2005;175:7170-7178.
100. Coombs PRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell RRA, editor. *Clinical aspects of immunology*. Oxford: Oxford University Press; 1968;575-596.
101. Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med* 2003;139:683-693.
102. Lerch M, Pichler WJ. The immunological and clinical spectrum of delayed drug-induced exanthems. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:411-419.
103. Asherson GL, Ptak W. Contact and delayed hypersensitivity in the mouse I. Active sensitization and passive transfer. *Immunology* 1968;15:405-416.
104. Martin S, Lappin MB, Kohler J, Delattre V, Leicht C, Preckel T, Simon JC, Weltzien HU. Peptide immunization indicates that CD8⁺ T cells are the

- dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2000;115:260–266.
105. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004;14:131–138.
 106. Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Freed I, Howell BG, Shahid S, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN. CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol* 2000;165:6783–6790.
 107. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2006;177:6852–6858.
 108. Askenase PW, Majewska M, Szczepanik M. NK cell mediated contact sensitivity is elicitable 1-hour after immunization and depends on IFN- γ and IL-12 production. *Centr Eur J Immunol* 2008;33:11.88.
 109. Ptak W, Różycka D, Askenase PW, Gershon RK. Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1980;15:362–375.
 110. Marcinkiewicz J, Bereta M, Malinowski J, Ptak W. The induction of oxazolone-specific T suppressor afferent cells in mice by hapten-modified isologous IgG. *Eur J Immunol*. 1984;14:759-62.
 111. Ptak W, Ptak M, Rosenstein RW, Gershon RK. Interactions between molecules (subfactors) released by different T cell sets that yield a complete factor with biological (suppressive) activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2375-2378.
 112. Bryniarski K, Ptak M, Szczepanik M, Askenase PW, Ptak W. Role of low molecular weight RNA in contact sensitivity response – preliminary results. *Centr Europ J Immunol* 2005;30:9(30).
 113. Asherson GL, Ptak W. Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. III Depression of contact sensitivity by pre-treatment with antigen and the restoration of immune competence in tolerant mice by normal lymphoid and bone marrow cells. *Immunology* 1970;18:99-106.
 114. Ptak W, Różycka D, Rewicka M. Induction of suppressor cells and cells producing antigen-specific suppressor factors by haptens bound to self carriers. *Immunobiology* 1979;156:400-409.
 115. Rosenstein RW, Murray JH, Cone RE, Ptak W, Iverson GM, Gershon RK: Isolation and partial characterization of an antigen-specific T-cell factor associated with the suppression of delayed type hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:5821–5825.
 116. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;107:823-826.
 117. Bryniarski K, Ptak M, Sikora E, Szczepanik M, Guerrier-Takada C, Altman S, Askenase PW, Ptak W. Role of low molecular weight RNA in contact sensitivity response. *Congress Proceedings 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009*;183-186.
 118. Bryniarski K, Askenase PW. CD8⁺ T cell exosomes from tolerized mice deliver inhibitory miR-150 to antigen specifically suppress effector T cells. *Apr 2012, International Exosome Workshop, April, 2012; Gothenburg, Szwecja.*

119. Bryniarski K, Askenase PW. Suppressive T-cell derived exosomes deliver an miRNA *in vivo* to inhibit targeted immune effector T cells systematically. International Workshop on Exosomes (IWE) January, 19-22 2011; Paryż, Francja
120. Mishell BB, Shiigi SM. Selected methods in cellular immunology. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980;30-37.
121. Śłopek S. i wsp. Immunologia praktyczna. PZWL, 1970; 89-90.
122. Askenase PW, Asherson GL. Contact sensitivity to oxazolone in the mouse. VIII. Demonstration of several classes of antibody in the sera of contact sensitized and unimmunized mice by a simplified antiglobulin assay. *Immunology* 1972;23:289-298.
123. Yoshimura M, Cinader B. The effect of tolerance on the specificity of the antibody response: antibody to oxazolinated albumin of mice tolerant to the protein carrier. *J Immunol* 1966; 97:959-968.
124. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3:Unit 3.22.
125. Chomczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156.
126. Bryniarski K, Szczepanik M, Maresz K, Ptak M, Ptak W. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:27-35.
127. Ferreri NR, Herzog WR, Askenase PW. Inhibition of IL-2-dependent proliferation by a prostaglandin-dependent suppressor factor. *J Immunol* 1993;150:2102.
128. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184:39-51.
129. Ptak W, Asherson GL: Contact and delayed hypersensitivity in the Mouse II. The role of different cell populations. *Immunology* 1969;17:769-775.
130. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004;14:131-8.
131. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF.: Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009;64:1699-714.
132. Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kägi D, Kaiserlian D, Nicolas JF. Cytotoxicity is mandatory for CD8⁺ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1999;46:779–786.
133. Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Freed I, Howell BG, Shahid S, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN. CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol* 2000;165:6783-6790.
134. Bouloc A, Cavani A, Katz SI, Fong TA, Mosmann TR, Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1998;111:44-9.
135. Ptak W, Bereta M, Ptak M, Askenase PW: Isotype-like suppression of T cell-mediated immunity *in vivo* I. Delayed-type hypersensitivity. Specificity of T

- cell suppression induced by antigen-binding T cell factors that initiate contact sensitivity. *J Immunol* 1986;136:1554-63.
136. Herzog WR, Meade R, Pettinicchi A, Ptak W, Askenase PW. Nude mice produce a T cell-derived antigen-binding factor that mediates the early component of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1989;142:1803-12.
137. Ptak W, Gershon RK, Rosenstein RW, Murray JH, Cone RE. Purification and characterization of TNP-specific immunoregulatory molecules produced by T cells sensitized by picrylchloride (PCI-F). *J Immunol* 1983;131:2859-63.
138. Ring S, Schäfer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol* 2006;36:2981-92.
139. Szczepanik M, Ptak W, Askenase PW. Role of interleukin-4 in down-regulation of contact sensitivity by gammadelta T cells from tolerized T-cell receptor alpha^{-/-} mice. *Immunology* 1999;98:63-70.
140. Askenase PW, Bryniarski K. Antigen specific exosomes: a new way to target delivery of selected siRNAs. International Exosome Workshop, Apr 2012; Gothenburg, Szwecja.
141. Lawrence HS: The transfer of hypersensitivity of the delayed type in man. Cellular and humoral aspects of hypersensitivity states, ed Lawrence, H.S. (Paul B. Hoeber, Inc., New York), 1959;279-319.
142. Rosenfeld S, Dressler D. On the chemical nature of transfer factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974;71:4429-4434.
143. Lawrence HS, Al-Askari S, David J, Franklin E, Zweiman B. Transfer of immunological information in humans with dialysates of leukocyte extracts. *Trans Ass Amer Physicians* 1963;76:84-89.
144. Silverstein AM. A history of immunology. Academic Press, Inc., 1989; 140-141.
145. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 2010;84:1-16.
146. Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, Mussolin L, Ruggero K, Bonano L, Guffanti A, De Bellis G, Gerosa G, Stellin G, D'Agostino DM, Basso G, Bronte V, Indraccolo S, Amadori A, Zanovello P. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood* 2011;117:7053-62.
147. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med* 2011;DOI: 10.1084/jem.20111386.
148. Thomas MD, Kremer CS, Ravichandran KS, Rajewsky K, Bender TP. c-Myb is critical for B-cell development and maintenance of follicular B cells. *Immunity* 2005;23:275-286.
149. Edelstein LC, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *Blood* 2011;117:5289-96.
150. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, Nicoloso MS, Barbarotto E, Popa M, Stanciu O, Fernandez MH, Tulbure D, Bueso-Ramos CE, Negrini M, Calin GA. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* 2009;4:e7405.

151. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:53-72.
152. Tano N, Kim HW, Ashraf M. MicroRNA-150 regulates mobilization and migration of bone marrow-derived mononuclear cells by targeting CXCR4. *PLoS One* 2011;6:e23114. Epub 2011 Oct 19.
153. Ptak W, Zembala M, Hanczakowski-Rewicka M, Asherson GL. Nonspecific macrophage suppressor factor: its role in the inhibition of contact sensitivity to picryl chloride by specific T suppressor factor. *Eur J Immunol* 1978;8:645-649.
154. Flood P, Ptak W, Green DR. Mechanism of action of a T suppressor factor (TsF) in contact sensitivity: the T cell target for TsF activity in adoptive transfer of immunity is not effector cell. *J Immunol* 1986;137:1829-35.

Składam serdeczne podziękowania

*Panu Profesorowi Włodzimierzowi Ptakowi, za pomoc w realizacji
pracy oraz pasjonujące dyskusje*

*Wszystkim Pracownikom Katedry Immunologii UJ CM,
w szczególności Pani Doktor Marii Ptak i Pani Doktor Bernadecie
Nowak, za okazaną pomoc i życzliwość*

Panu Profesorowi Philip W. Askenase, za motywację i wsparcie

Moim Bliskim, za miłość, wiarę i cierpliwość