

Monika Soroczyńska - Cybula

**WPŁYW ZMIAN EKSPRESJI GENÓW
KONTROLUJĄCYCH CYKL KOMÓRKOWY NA
ZABURZENIA PROLIFERACJI
LIMFOCYTÓW T
U OSÓB CHORYCH NA REUMATOIDALNE
ZAPALENIE STAWÓW.**

(rozprawa doktorska)

**Katedra i Zakład Fizjopatologii
Akademii Medycznej w Gdańsku**

Promotor:

dr hab. n. med. Jacek Maciej Witkowski, prof. ndzw.

Gdańsk 2007

**Niniejszą pracę dedykuję
moim kochanym Rodzicom i Mężowi**

Serdecznie dziękuję
dr. hab.prof. nadz. Jackowi M. Witkowskiemu

za opiekę, życzliwość, cierpliwość i zawsze konstruktywne rady

dr hab. Ewie Bryl

za życzliwość i praktyczne rady

Wszystkim pracownikom, doktorantom i studentom
Katedry i Zakładu Fizjopatologii

za stworzenie wspaniałej atmosfery pracy

SPIS TREŚCI

Wykaz najważniejszych skrótów używanych w pracy	7
1. Wstęp	
1.1. Reumatoidalne Zapalenie Stawów.....	9
1.2. Rola limfocytów CD4 ⁺ w odpowiedzi immunologicznej.....	12
1.3. Zmiany ekspresji cząsteczki CD28 na limfocytach CD4 ⁺	13
1.3.1. Regulacja ekspresji CD28.....	15
1.4. Rola limfocytów CD4 ⁺ w patogenezie R.Z.S.....	17
1.5. Proliferacja limfocytów CD4 ⁺	19
2. Cel pracy	23
3. Materiały i metody	24
3.1. Charakterystyka badanych osób.....	24
3.2. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej od osób zdrowych oraz pacjentów z R.Z.S.....	26
3.3. Hodowle komórkowe.....	26
3.3.1. Zakładanie hodowli komórkowych.....	26
3.4. Izolacja limfocytów CD4 ⁺	28
3.4.1. Metoda kolumnowa negatywnej separacji magnetycznej	28
3.4.2. Metoda probówkowa negatywnej separacji magnetycznej	29
3.5. Ocena fenotypu badanych komórek poprzez znakowanie antygenów powierzchniowych.....	30
3.5.1. Pomiary cytometryczne i analiza wyników.....	31
3.6. Poszukiwanie genów aktywnych w limfocytach CD4 ⁺ zawierających sekwencje homologiczne do regulacyjnej sekwencji α w genie CD28.....	31
3.7. Wykrywanie produktu badanych genów w komórkach CD4 ⁺ techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).	32
3.7.1. Izolacja całkowitego RNA.....	32

3.7.2. Reakcja syntezy cDNA.....	33
3.7.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	34
3.7.4. Elektroforeza agarozowa.....	35
3.7.4.1. Analiza żeli.....	35
3.8. PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR).....	36
3.8.1. Krzywe wzorcowe.....	36
3.8.1.a.PCR.....	36
3.8.1.b. Izolacja DNA z żelu agarozowego	37
3.8.2. Oznaczanie poziomu ekspresji genów (PCR w czasie rzeczywistym.....)	37
3.9. Potwierdzenie obecności lub braku białka Klotho u pacjentów z R.Z.S i u osób zdrowych.....	38
3.9.1. Uzyskiwanie materiału białkowego.....	38
3.9.1.a. Oznaczanie stężenie białka metodą Bradford.....	38
3.9.2. Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE.....	39
3.9.3. Western Blotting.....	39
3.10. Cytometryczna metoda ilościowego oznaczania aktywności beta glukuronidazy.	41
3.11. Analiza statystyczna.....	42
4. Wyniki.....	43
4.1. Porównanie fenotypu limfocytów krwi obwodowej osób chorych na R.Z.S. i zdrowych.....	43
4.2. Porównanie dynamiki proliferacji limfocytów CD4 ⁺ u osób zdrowych i chorych na R.Z.S.....	47
4.3. Analiza ekspresji badanych genów metodą PCR.....	53
4.4. Analiza ekspresji badanych genów metodą Real Time PCR.....	56

4.5. Korelacja ekspresji genu KLOTHO i antygenów aktywacyjnych...	63
4.6. Analiza ekspresji białka Klotho metodą Western Blotting.....	65
4.7. Porównanie aktywności β -glukuronidazy przypisywanej Klotho w komórkach CD4 ⁺ od osób zdrowych i chorych na R.Z.S.....	67
5. Dyskusja.....	71
6. Podsumowanie.....	83
7. Wnioski.....	84
8. Literatura.....	85
9. Streszczenie.....	108
10. Abstract	111

Wykaz najważniejszych skrótów używanych w pracy:

- ❖ AICD – ang. activation – induced cell death, śmierć komórek indukowana przez aktywację
- ❖ BSA – ang. bovine serum albumine - albumina surowicy wołowe
- ❖ CD – ang. cluster of differentiation, antygeny różnicowania leukocytów – używany dla oznaczenia receptorów powierzchniowych
- ❖ CDK - cyklinozależna kinaza
- ❖ CFSE – ang. carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
- ❖ CQ – ang. chloroquine, chlorochina inhibitor dla enzymów z grupy β -glukuronidaz
- ❖ DSL – ang. dissaccharolactone, disacharolakton inhibitor dla Klotho - enzymatycznej aktywności β -glukuronidazy
- ❖ EDTA – kwas etylenodwuaminoczeroctowy
- ❖ FACS – ang. fluorescence activated cell sorter, cytometr przepływowy
- ❖ FITC – ang. fluorescein isothiocyanate, związek fluoresceiny używany do znakowania białek o długości fali 519 nm
- ❖ FSC – ang. forward scatter channel, detector rejestrujący rozproszenie światła od przodu, zgodnie z kierunkiem wiązki laserowej
- ❖ GMFI – ang. geometric mean fluorescence intensity, średni geometryczny poziom fluorescencji
- ❖ IL - interleukina
- ❖ MFI – ang. mean fluorescence intensity, średni poziom fluorescencji
- ❖ MHC – ang. major histocompatibility complex – główny układ zgodności tkankowej
- ❖ PBMC – ang. peripheral blood mononuclear cells – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
- ❖ PBS – ang. Phosphate buffered saline - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
- ❖ PE – ang. phycoerythrin, fikoerytryna, białko emitujące światło o długości 578 nm
- ❖ PerCP – ang. peridinin chlorophyll protein, białko emitujące światło o długości 675 nm
- ❖ pH - ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych

- ❖ RAR β -2 - ang. Retinoic Acid Receptor β 2 – receptor β 2 kwasu retinowego
- ❖ RT-PCR – odwrotna transkrypcja i łańcuchowa reakcja polimerazy
- ❖ RTPCR – ang. real time PCR łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym
- ❖ R.Z.S. – reumatoidalne zapalenie stawów
- ❖ SDS – siarczan dodecyłu
- ❖ SSC – detektor w cytometrze, mierzący ilość światła rozproszonego pod kątem 90 stopni od osi optycznej
- ❖ TCR –ang. T cell receptor – receptor limfocytów T
- ❖ TEMED – czteroetyłodwuamina
- ❖ TNF – ang. tumor necrosis factor – czynnik martwicy nowotworów
- ❖ TRIS – hydroksyetylo-aminometan

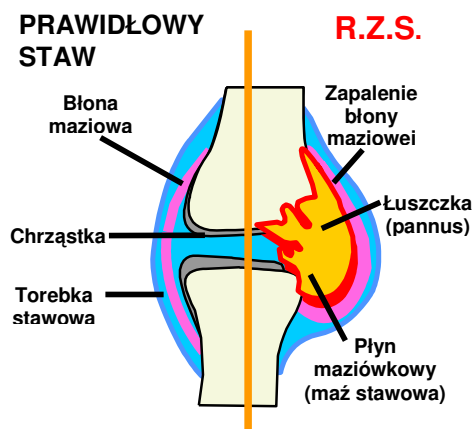
1. WSTĘP

1.1. Reumatoidalne Zapalenie Stawów.

W patogenezie chorób reumatycznych zasadniczą rolę odgrywa układ immunologiczny, który, w wyniku pobudzenia, przejawia objawy agresji wobec tkanki łącznej (choroby z autoagresji). Ich przejawem jest toczący się proces zapalny z udziałem komórek należących do tego układu, szczególnie zaś limfocytów T i makrofagów.

Reumatoidalne zapalenie stawów (R.Z.S.) jest to przewlekła, zapalna, autoimmunologiczna, układowa choroba tkanki łącznej, której przyczyną są uwarunkowania genetyczne i, być może, zakażenie wirusami bądź innymi drobnoustrojami. Mogą tu również mieć znaczenie czynniki hormonalne, palenie papierosów oraz stres.

Charakterystyczne dla tej choroby jest zapalenie błony maziowej stawów. W miarę pogłębiania się procesu chorobowego, komórki błony maziowej zaczynają się rozrastać (prowadząc do pogrubienia maziówki i w efekcie obrzęku zajętego stawu), naciekać i niszczyć chrząstkę oraz kość w obrębie stawu (Ryc. 1). Choroba ta prowadzi do niepełnosprawności, kalectwa, a nawet przedwczesnej śmierci.



Rycina.1. Porównanie stawu prawidłowego i stawu z R.Z.S.

Reumatoidalne zapalenie stawów wydaje się być powodowane zwiększoną aktywnością limfocytów T, co w efekcie prowadzi do uszkodzenia chrząstki i kości.

Zaktywowane limfocyty T są skumulowane w maziówce, choć krążą również we krwi obwodowej, przechodzą klonalną ekspansję i hamowane są poprzez proces apoptozy (1).

Zaburzenia w komórkach układu odpornościowego mogą być przyczyną obserwowanych w R.Z.S. uszkodzeń funkcji innych narządów i układów organizmu. W chorobie tej obserwujemy kliniczne cechy nadmiernej reaktywności limfocytów T, objawiające się powiększeniem węzłów chłonnych (limfadenopatia), jak również – paradoksalnie - wyraźne cechy proliferacyjnej starości tych komórek (w szczególności CD4⁺) między innymi obniżoną proliferację in vitro, zmianę fenotypu niektórych antygenów powierzchniowych - w tym zwłaszcza utratę antygeny CD28 (nabycie fenotypu CD4⁺CD28⁻ a także CD8⁺CD28⁻) i skrócenie telomerów (2,3). Część CD28 jest jedną z najważniejszych części cząsteczek kostymulujących w błonie komórkowej limfocytów T [patrz niżej] (4-6).

W reumatoidalnym zapaleniu stawów zaktywowane limfocyty T wykazują in vivo większą spontaniczną produkcję i wydzielanie cytokin prozapalnych, do grupy których m. in. należy TNF oraz IL-1, IL-6, IL-8 (7)(Ryc. 2). TNF jest główną cytokiną, która daje początek kaskadzie cytokin prozapalnych i która podtrzymuje proces zapalny w R.Z.S. Jest uważany za kluczowy element patogenezy tej choroby. W reumatoidalnym zapaleniu stawów wykryto także zwiększoną, w odniesieniu do osób zdrowych, produkcję i wydzielanie TNF do środowiska w hodowlach komórek jednojądrzastych wyizolowanych z płynu stawowego i błony maziówkowej (8).

Kluczową rolę TNF w patogenezie R.Z.S. odkryto w hodowlach jednojądrzastych komórek z błony maziówkowej, w których po podaniu przeciwciała anti-TNF stwierdzono zmniejszenie wydzielania IL-1, IL-6 i IL-8, co sugerowało główną rolę TNF w wydzielaniu tych cytokin (9). To pozwoliło na przypuszczenie, że blokada TNF może mieć istotny wpływ przeciwzapalny oraz ochronny na chrząstkę stawową i kości stawów. Udział TNF w kontrolowaniu aktywności R.Z.S. potwierdzono u myszy z indukowanym zapaleniem stawów, u których podawanie przeciwciała anti-TNF zmniejszyło obrzęki stawów i nadżerki stawowe (10-12).

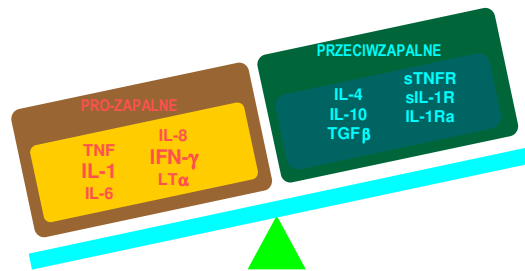
W surowicy krwi u pacjentów z R.Z.S. stwierdzono zwiększone stężenie TNF (13,14), co jest powiązane ze nadmienioną powyżej, zwiększoną spontaniczną produkcją TNF przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej hodowane in vitro oraz po stymulacji mitogenami (15,16, Ryc.2). Zauważono również zwiększoną produkcję TNF przez jednojądrzaste komórki z błony maziówkowej (15,17).

TNF- α jest uważany za główny modulator procesów patogennych w reumatoidalnym zapaleniu stawów (18), dlatego też uważa się, że podwyższony poziom TNF- α in vivo może bezpośrednio wpływać na fenotyp i funkcję komórek T. Szczegółowa analiza błony maziówkowej (głównego miejsca choroby), szczególnie immunohistochemiczne badania świadczące o wzroście ekspresji TNF i TNFR w błonie maziówkowej oraz skuteczne zastosowanie anti-TNF w modelu zwierzęcym zapalenia stawów indukowanego kolagenem, pozwoliły na wprowadzenie nowej terapii z zastosowaniem anti-TNF (19). Dzięki kilkuletnim obserwacjom klinicznym stwierdzono, że terapia anti-TNF nie tylko hamuje aktywność choroby, zmniejsza objawy kliniczne, ale również zapobiega destrukcji stawów (20). Wykazano, że terapia anti-TNF zwiększa reaktywność (proliferację) ludzkich limfocytów CD4⁺ mierzoną metodą wbudowania radioaktywnej tymidyny po aktywacji przeciwciałem anti-CD3 czy mitogenami (21). Dlatego też pojawia się sugestia, że TNF funkcjonuje jako czynnik immunosupresyjny w R.Z.S., co poniekąd może tłumaczyć paradoks istniejący w patogenezie tej choroby. Paradoks ten polega na tym, że z jednej strony R.Z.S. jest przewlekłą chorobą zapalną o podłożu autoimmunologicznym, a więc powinna cechować się nadmierną aktywacją limfocytów T, z drugiej zaś strony limfocyty T pochodzące od pacjentów cierpiących na R.Z.S. charakteryzują się obniżoną reaktywnością w odpowiedzi na stymulację mitogenami in vitro, skróceniem telomerów, obniżeniem TRECs (T cell receptor rearrangement excision circles), a więc cechami komórek „wyczerpanych” proliferacyjnie.

Choroby, w których wykryto wspomniany wyżej podwyższony odsetek limfocytów CD4⁺CD28⁻ we krwi obwodowej (reumatoidalne zapalenie stawów i AIDS), charakteryzują się jednocześnie zwiększonym wydzielaniem TNF. Skojarzony wzrost wydzielania TNF (22-24) i liczniejsze występowanie limfocytów o fenotypie CD4⁺CD28⁻ jest obserwowane także u ludzi zdrowych w podeszłym wieku, co może świadczyć o istnieniu związku między tymi zjawiskami (25-27). Zwiększona produkcja TNF nie dotyczy jednak wszystkich osób w podeszłym wieku, ale jest powiązana z gorszym stanem zdrowia w obrębie tej grupy i niską aktywnością cytotoksyczną NK (23,28,29).

Istnieją przesłanki, iż TNF działa regulacyjnie na gen CD28. W kilku badaniach wykryto, że TNF- α hamuje in vitro aktywność minimalnego promotora dla genu CD28 (30,31), doprowadzając do obniżenia ilości CD28 na powierzchni

komórki. Wykazano także, że ekspozycja limfocytów T osób chorych na R.Z.S. na działanie TNF- α in vivo również obniża poziom CD28 na ich powierzchni (32).



Rycina 2. Przewaga cytokin prozapalnych w R.Z.S.

1.2. Rola limfocytów CD4⁺ w odpowiedzi immunologicznej.

Limfocyty CD4⁺, zwane pomocniczymi, są komórkami, które pełnią główną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu. Zaktywowane komórki CD4⁺ proliferują i wydzielają cytokiny, w zależności od rodzaju których, potrafią oddziaływać na pracę innych komórek układu immunologicznego. Wśród limfocytów CD4⁺ można wyróżnić trzy podtypy (Th), które charakteryzowane są na podstawie wydzielanych cytokin. Typ Th1 wydzielają interleukinę 2, czynnik martwicy nowotworów TNF, interferon gamma – produkcja tych cytokin prowadzi do odpowiedzi komórkowej typu cytotoksycznego), Th2 -(interleukina 4, interleukina 6 i interleukina 13) - wywołuje odpowiedź humoralną, czyli w kierunku produkcji przeciwciał. Natomiast typ Th3 został zdefiniowany na podstawie wydzielania czynnika transformującego beta (TGF β). Komórki o takim fenotypie pełnią funkcję hamującą odpowiedź immunologiczną. Podsumowując, działanie regulacyjne komórek CD4⁺ może być dwojakie, powodujące pobudzenie bądź osłabienie odpowiedzi immunologicznej (33,34). Trzeba oczywiście pamiętać, że najczęściej nie ma odpowiedzi immunologicznej w jednym kierunku – Th1 lub Th2, ale aktywowane są one jednocześnie i od stopnia tego pobudzenia zależy wypadkowa odpowiedź układu immunologicznego.

Do rozpoczęcia odpowiedzi immunologicznej limfocytów T konieczne jest rozpoznanie antygenów prezentowanych przez komórkę prezentującą antygeny

(APC). Powierzchnia limfocyta T jest świetnie przystosowana do rozpoznawania antygeny i wywoływania odpowiedniej odpowiedzi immunologicznej, ponieważ posiada receptor limfocyta T – TCR, który w kompleksie z CD3 rozpoznaje obcy peptyd prezentowany przez komórkę APC. Istnieje wiele rodzajów receptorów TCR (ze względu na strukturę wysoce zmiennych części, które decydują o ich swoistości) i ta różnorodność (szeroki „repertuar” TCR) umożliwia rozpoznanie każdego potencjalnego obcego antygeny. Niestety samo związanie obcego peptydu przez TCR/CD3 jest niewystarczające do prawidłowej aktywacji limfocyta T (35). Do aktywacji musi być zaangażowana określona liczba receptorów TCR/CD3, aby przekroczyć próg aktywacji (36). Wykazano, że przy braku kostymulacji z CD28 liczba pobudzonych receptorów TCR musi wynosić około 8000, podczas gdy w obecności kostymulacji CD28 wystarczy ich około 1500 (37). Uważa się, że bez sygnału kostymulującego z cząsteczki CD28, równoległego do sygnału z TCR, nie może dojść do prawidłowej aktywacji limfocyta T i możliwe są dwie alternatywne sytuacje: zupełny brak aktywacji i wprowadzenie limfocyta w stan anergii (38), bądź śmierć limfocyta drogą apoptozy (39).

1.3. Zmiany ekspresji cząsteczki CD28 na limfocytach CD4⁺.

Cząsteczka CD28 jest to glikoproteina powierzchniowa o masie 90 kDa (40), pełniąca zasadniczą rolę kostymulującą w procesie aktywacji limfocyta T w odpowiedzi na prezentację antygenów w fazie indukcji odpowiedzi immunologicznej (2, 41). Ligandem dla CD28 są cząsteczki CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2) obecne na komórkach prezentujących antygeny (42, 43). Kostymulacja przez cząsteczkę CD28 doprowadza do zwiększenia produkcji interleukiny 2 (IL-2) (2,44), głównego czynnika wzrostowego limfocytów T. Aktywacja poprzez receptor CD28 może doprowadzić do podwyższenia ekspresji receptora dla interleukiny (IL-2) na powierzchni zaktywowanego limfocyta (45), co razem z podwyższoną produkcją IL-2 może spowodować wejście w cykl komórkowy przez zaktywowanego limfocyta i doprowadzić w konsekwencji do proliferacji (46, 47). Nie należy zapominać o tym, że limfocyty krwi obwodowej są w fazie G₀ cyklu komórkowego i dopiero po odebraniu odpowiedniego sygnału aktywacyjnego mogą wejść w cykl komórkowy i

rozpocząć proliferację (48). Dowiedziono, że kostymulacja CD28 jest odpowiedzialna za początkowe etapy wchodzenia w cykl komórkowy (przejście z fazy G_0 do G_1) limfocytów T (32, 49).

Cząsteczka CD28 może wpływać na proliferację limfocytów również poprzez mechanizm niezależny od produkcji IL-2 (46, 49).

Właściwości kostymulujące cząsteczki CD28, potwierdzono również wykazując wpływ ekspresji CD28 na poziom aktywacji limfocytów T. Zablokowanie kostymulacji przez CD28 prowadzi do zwiększonej podatności limfocytów T na apoptozę (50).

U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów stwierdzono duży wzrost odsetka limfocytów $CD4^+$, które nie wykazują ekspresji powierzchniowej cząsteczki CD28 (51,52). Limfocyty o tym fenotypie ($CD4^+CD28^-$) są komórkami aktywnymi, które produkują znaczne ilości IFN- γ i IL-2, co umożliwia wywołanie odpowiedzi prozapalnej; w pewnych warunkach posiadają również właściwości cytotoksyczne, przez co mogą uczestniczyć w uszkodzaniu tkanek (18,53). Przypuszcza się, że kumulacja komórek o takim fenotypie odgrywa ważną rolę w zjawiskach autoimmunologicznych obserwowanych w R.Z.S.

Nie wiemy, czy zmiany związane z limfocytami $CD4^+$, obecne w R.Z.S. mają charakter pierwotny czy wtórny, jakie czynniki mają wpływ na powstawanie istniejących zmian. Ze względu na główną pozycję limfocytów $CD4^+$ w wywołaniu odpowiedzi immunologicznej i jej ukierunkowaniu, jakiegokolwiek zaburzenia funkcji tych komórek wywołują skutki dotyczące całego układu odpornościowego, a w konsekwencji całego organizmu.

1.3.1. Regulacja ekspresji CD28.

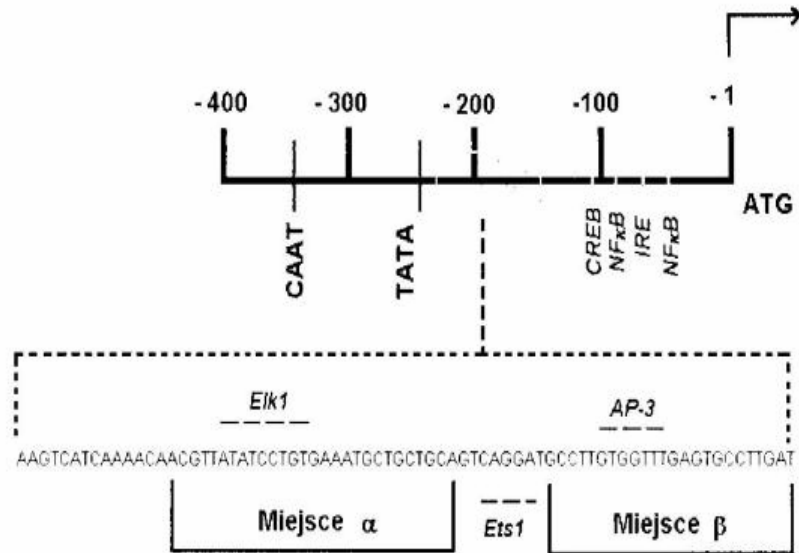
Istnienie komórek CD4⁺, które nie posiadają na swojej powierzchni antygenu CD28 (CD4⁺CD28⁻), a także komórek CD4⁺ z obniżoną ilością cząsteczek CD28, wskazuje na to, że ekspresja genu CD28 musi podlegać regulacji (nie jest konstytutywna).

Gen CD28 występuje na chromosomie 2 (54), w jednej kopii, składającej się z 4 egzonów (55,56).

Niedawno zdefiniowano minimalny promotor dla genu CD28 i zlokalizowano go w obszarze 400 bp w kierunku 5' regionu tego genu nie podlegającego transkrypcji (25) (Ryc.3). W obrębie minimalnego promotora genu CD28 zidentyfikowano nie opisane wcześniej sekwencje DNA odpowiedzialne za wiązanie z nie w pełni jeszcze poznanymi białkami regulatorowymi, określane jako miejsca wiążące α i β (Ryc.2). Limfocyty, które posiadają na swojej powierzchni cząsteczkę CD28, bądź jej nie mają różnią się zawartością białek wiążących się do tych nowo zlokalizowanych miejsc wiążących (25). Ekstrakty jądrowe z limfocytów T wykazujących powierzchniową ekspresję CD28 zawierają białka wiążące się do obydwu miejsc (α i β), podczas gdy ekstrakty jądrowe z limfocytów T nie wykazujących powierzchniowej ekspresji CD28 są ich pozbawione (25, 57). W ekstraktach jądrowych dla różnych linii komórkowych oraz klonów z limfocytów T o fenotypie CD4⁺ i CD8⁺ wykazano zgodność ekspresji powierzchniowej cząsteczki CD28 i obecności białek wiążących α i β . Doświadczenia te umożliwiły stwierdzenie, że białka wiążące α i β są specyficzne dla ekspresji genu CD28 (25).

Ostatnio wykazano, że obniżenie ekspresji CD28 występujące u osób w podeszłym wieku i u chorych na R.Z.S., wynika również ze zmniejszenia ekspresji kompleksu jądrowych białek regulujących tę ekspresję przez wiązanie się do odpowiednich miejsc (α i β) w minimalnym promotorze genu dla CD28 (25,58).

Aktywności wiążące α i β , są więc uważane za specyficzne dla ekspresji genu CD28 i niezbędne dla aktywności transkrypcyjnej minimalnego promotora genu CD28, inicjując ten proces – stąd nazwa $\alpha\beta$ -INR (an inoperative transcriptional initiator (INR)).



Rycina 3. Schemat minimalnego promotora dla genu CD28 wg 53.

Jak już wcześniej wspomniałam, zarówno u osób w podeszłym wieku, jak i u chorych na R.Z.S. wykazano, że obniżenie ekspresji CD28 wynika z braku ekspresji specyficznego kompleksu jądrowych białek regulujących tę ekspresję przez wiązanie się do odpowiednich miejsc w minimalnym promotorze genu dla CD28 (25,58). Dwa białka, nukleolina i izoforma A niejednorodnej jądrowej rybonukleoproteiny-D0 (hnRNP-D0A), zostały zidentyfikowane jako kluczowe składniki kompleksu wiążącego się do miejsca α . Nukleolina i hnRNP-D0A pełnią rolę w trans-aktywacji CD28 $\alpha\beta$ -INR (59). Rola nukleoliny i hnRNP-D0A, jako aktywatorów transkrypcji jest specyficzna dla $\alpha\beta$ -INR (60).

Niedawno wykazano, że sekwencja α nie jest unikatowa. Występuje ona (a raczej jej homolog) nie tylko w promotorze genu CD28, ale znajduje się również w obszarze promotorowym genu RAR β 2, który podobnie jak CD28 ulega ekspresji w ludzkich limfocytach T (61,62) (Ryc.4).

Miejsce α : *ACGTTATATCCTGTGTGAAAT*

RAR β 2: *ATCTTTCATTCTGTGTGACAG*

Rycina 4. Homologia w sekwencji alfa i genie RAR β 2 (pogrubione litery oznaczają identyczne nukleotydy).

RAR β -2 (ang. Retinoic Acid Receptor β 2) to wcześniej opisana, występująca w ludzkich limfocytach T forma receptora dla kwasu retinowego, który jest substancją hamującą proliferację i nasilającą różnicowanie się wielu typów komórek (61,62). Kwas retinowy i jego pochodne są znanymi czynnikami antyproliferacyjnymi i powodującymi różnicowanie komórek, stosowanymi w hemato-onkologii (63). Substancja ta, ze względu na swoje właściwości, stosowana jest czasem w terapii R.Z.S., hamując m.in. ekspresję kolagenazy — enzymu, który bierze udział w niszczeniu chrząstki i kości stawów w przebiegu R.Z.S. (61,62). Ze względu na wspomniany wyżej mechanizm, możliwe, że w przypadku R.Z.S. działanie kwasu retinowego sprowadza się nie tylko do hamowania kolagenazy, ale może być bardziej ogólne i prowadzić m.in. do zahamowania proliferacji limfocytów T, co jednak nie zostało jak dotychczas udowodnione.

1.4. Rola limfocytów CD4⁺ w patogenezie R.Z.S.

Reumatoidalne zapalenie stawów jest chorobą, w której znaczącą rolę w patogenezie i rozwoju pełnią limfocyty CD4⁺ (64). Jedną z hipotez dotyczącą patogenezy R.Z.S. jest to, że limfocyty CD4⁺ nieprawidłowo rozpoznają własne antygeny stawowe, co zapoczątkowuje chorobę i prowadzi do ataku na własne tkanki. Jednak, badania repertuaru receptora limfocytów T (TCR) w płynie stawowym i tkance wykazały, że limfocyty obecne w stawach są heterogenne, a nie wykazują jednego konkretnego klonotypu pomimo, że część klonotypów występowała bardziej licznie (65-67). To dostarczyło dowodów przeciwko istnieniu jednego swoistego antygeny, przeciwko któremu skierowana jest odpowiedź limfocytów T u osób chorych na R.Z.S. W związku z tym, badania roli limfocytów

CD4⁺ w R.Z.S. kierują się raczej ku poszukiwaniu zmian systemowych dotyczących limfocytów, a nie tylko ograniczonych do stawów.

Objawy reumatoidalnego zapalenia stawów, to nie tylko wynik toczącego się procesu zapalnego, takie jak podwyższone stężenia białek ostrej fazy CRP, a także cytokin prozapalnych, takich jak: TNF, IL-1, IL-6, IL-15 (44,68-70), ale także bardziej specyficzne dla tej choroby zmiany dotyczące limfocytów CD4⁺. Badania właściwości limfocytów CD4⁺ krążących we krwi obwodowej osób chorych wykazały:

- Obniżenie zdolności proliferacyjnej limfocytów CD4⁺ pobranych z krwi obwodowej od pacjentów z R.Z.S. (przeгляд w 2).
- Krótsze telomery w limfocytach CD4⁺ izolowanych z krwi obwodowej pacjentów z R.Z.S. w porównaniu do komórek CD4⁺ izolowanych z krwi obwodowej od zdrowych ochotników (przeгляд w 2).
- Ograniczenie repertuaru receptora TCR β . Zjawisko to dotyczy komórek naiwnych sugerując, że zmiany związane są z limfocytami T już na etapie ich powstawania, a nie są skutkiem ich nadmiernej aktywacji (71-73). Ograniczenie repertuaru TCR β na CD4⁺ jest swoiste dla R.Z.S. (74), ale występuje także w procesach fizjologicznych np. starzeniu się, natomiast nie jest typowe dla innych chorób autoimmunologicznych.
- Zmniejszona liczba TRECs w komórkach CD4⁺ u pacjentów z R.Z.S. w porównaniu do osób zdrowych (przeгляд w 2). TRECs (T cell receptor rearrangement excision circles) są fragmentami DNA wyciętymi z genomu w wyniku rearanżacji łańcucha α TCR w grasicy (75,76). Wykazano, że TREC (kolisty fragment DNA) pozostaje w limfocycie T po wyjściu na obwód, nie duplikuje się podczas mitozy, i jest stabilny (77,78). Obniżenie liczby TRECs (obserwowane w obrębie populacji komórek CD4⁺ u chorych na R.Z.S. a także na AIDS oraz u osób w podeszłym wieku) można tłumaczyć dwojako: albo mniejszą emigracją nowych, dojrzałych limfocytów T z grasicy, bądź rozprzestrzenianiem się dojrzałych limfocytów CD4⁺ na obwodzie, w odpowiedzi na stymulację antygenową. Udowodniono, że proliferacja nie ma wpływu na bezwzględną liczbę TRECs, a zwiększenie liczby komórek T poprzez proliferację wywołuje zmniejszenie względnej ilości TRECs w danej populacji komórek (79).

- Podwyższenie proporcji limfocytów CD4⁺, które nie posiadają na swojej powierzchni cząsteczki CD28, określanych jako komórki CD4⁺CD28⁻. Podobnie jak u ludzi w podeszłym wieku, większy odsetek tej subpopulacji występuje u pacjentów z R.Z.S. w porównaniu do zdrowych ochotników w tym samym wieku (**3, 51,52**). Podobnie jak u osób zdrowych, wykazano, że klony komórek o takim fenotypie nie są komórkami nieaktywnymi; wykazano, że produkują one cytokiny t.j. IFN γ , IL-2, IL-4, nie tylko spontanicznie, ale także w wyniku aktywacji (**80**).

1.5. Proliferacja limfocytów CD4⁺.

Istnieją dwa procesy regulujące liczbę komórek w organizmie, są nimi: proliferacja i apoptoza (**81-83**).

Normalne ludzkie komórki posiadają ograniczoną zdolność namnażania się w hodowli, tzw. limit Hayflicka - graniczna liczba podziałów do jakiej zdolna jest komórka, która nie ulega transformacji nowotworowej. Po osiągnięciu określonej liczby populacji, komórki przestają się dzielić i wchodzi w stan replikacyjnej starości (pojawienie się charakterystycznych zmian morfologicznych i czynnościowych, określanych jako fenotyp komórek starych). Komórki znajdujące się w stanie replikacyjnej starości charakteryzują się, poza obniżoną aktywnością proliferacyjną, zmianami w aktywności wielu enzymów i ekspresji genów, zmianami wydzielania cytokin i czynników wzrostu (**84-86**).

Ludzkie limfocyty dzielą się pod wpływem stymulacji antygenowej *in vivo* lub mitogenowej *in vitro* raz na około 15-20 godzin (**87- 89**). U zdrowych osób produkcja limfocytów jest adekwatna do aktualnej potrzeby organizmu i jest to regulowane przez eliminację apoptotyczną (activation – induced cell death, AICD).

Niekontrolowane podziały komórkowe są jednym z czynników predysponujących prawidłowe komórki do transformacji nowotworowej (**90, 91**). Ewolucyjnie organizmy wykształciły co najmniej dwa mechanizmy, które hamują niekontrolowane podziały komórkowe i zapobiegają nowotworom: starzenie się (prowadzi do nieodwracalnego zatrzymania podziału komórek) i apoptozę (**92- 94**).

Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego jest zależny od prawidłowego współdziałania cyklinozależnych kinaz (CDK) z cyklinami (białkowe aktywatory), czego wynikiem jest ekspresja genów, których produkty odgrywają istotną rolę w procesie podziału. Warunkiem przejścia komórki z fazy G_1 do S, a tym samym rozpoczęcia następnych etapów cyklu komórkowego, jest fosforylacja, która inaktywuje białko pRb i uwolnienie będącego z nim w kompleksie czynnika transkrypcyjnego E2F, który aktywuje geny niezbędne w fazie S **(95-97)**.

Wiadomo, że niestymulowane limfocyty krwi obwodowej są w fazie G_0 cyklu komórkowego, i dopiero po odebraniu odpowiedniego sygnału aktywacyjnego (kontaktu ze swoistym dla siebie antygenem *in vivo* lub miogenem *in vitro*) mogą wejść w cykl komórkowy i rozpocząć proliferację **(48)**.

Wiadomo również, że przejście $G_0 \rightarrow G_1$ i sama faza G_1 jest najdłuższą i najbardziej regulowaną fazą cyklu komórkowego **(98)**.

Jeden z głównych czynników, który decyduje o efektywnej odpowiedzi immunologicznej jest wydolność proliferacyjna limfocytów T (zdolność limfocytów T do maksymalnej liczby podziałów, których efektem są klony żywych komórek efektorowych). Jak już wspomniałam, limfocyty T osób chorych na R.Z.S. prezentują dwie, po części sprzeczne, charakterystyki: z jednej strony wykazują cechy komórek bardzo aktywnych, intensywnie namnażających się i produkujących cytokiny, z drugiej zaś, cechy komórek 'starych', o obniżonej aktywności (w tym proliferacyjnej). Do tej pory obniżenie aktywności proliferacyjnej limfocytów osób chorych na R.Z.S. obserwowano głównie stosując metodę wbudowania radioaktywnej tymidyny, które pozwala jedynie na określenie intensywności syntezy DNA w badanych komórkach **(99-101)**. W związku z tym nie wiadomo, czy obniżona aktywność proliferacyjna limfocytów T u osób chorych na R.Z.S., związana jest z ich proliferacyjną starością (obniżenie zdolności do podziału), czy zmianami w dynamice cyklu komórkowego.

Niedawno opublikowano badania dotyczące proliferacji limfocytów CD4 i CD8 pochodzących od zdrowych osób w podeszłym wieku, wykonane techniką DCT (ang. Dividing cell tracking), pozwalającą na zbadanie parametrów cyklu komórkowego z równoczesnym określeniem fenotypu badanych komórek **(102, 103)**. Badania te potwierdziły, że globalna efektywność proliferacyjna (całkowita

liczba powstających komórek) jest obniżona u osób starszych, natomiast komórki T jeszcze zdolne do podziału, dzielą się szybciej, a jedynie przejście z fazy G_0 do fazy G_1 następuje w nich z opóźnieniem. To ostatnie zjawisko jest bezpośrednio skorelowane z poziomem ekspresji CD28 na badanych limfocytach. Wspomniane wyżej podobieństwa pomiędzy właściwościami limfocytów T osób chorych na R.Z.S. i zdrowych osób w podeszłym wieku sugerują, że dopuszczalna jest hipoteza, iż komórki osób chorych na R.Z.S. będą zachowywały się podobnie do limfocytów zdrowych starszych osób także w odniesieniu do dynamiki ich proliferacji.

Poziom proliferacji limfocytów $CD4^+$ zależy od rodzaju stymulatora, poziomu produkcji cytokin, współistnienia chorób modulujących odpowiedź immunologiczną i od wieku (104).

Badania zdolności proliferacyjnej i czynności limfocytów T w wyniku stymulacji *in vitro*, takie jak m.in. ocena wbudowania trytowanej tymidyny, produkcji niektórych cytokin, czy „sygnału wapniowego” przeciwciałem anti-CD3, wskazują na obniżenie, opisanych powyżej, parametrów (zmniejszenie liczby TRECs, czy skrócenie telomerów) w limfocytach T osób chorych na R.Z.S., sugerując zmniejszenie zdolności proliferacyjnych (105).

U osób zdrowych w podeszłym wieku również obserwujemy, takie cechy jak np. zmniejszenie liczby TRECs, czy skrócenie telomerów, a także obniżenie zdolności proliferacyjnych, co uważane jest za zjawisko fizjologiczne, związane ze starzeniem się organizmu. Obserwacja identycznych właściwości limfocytów T osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów, może więc sugerować istnienie zjawiska przyspieszonego starzenia układu immunologicznego (102).

Powyższe różnice w potencjale proliferacyjnym limfocytów T, pochodzących od chorych na R.Z.S., mogą częściowo wynikać ze zmienionych proporcji zasadniczych subpopulacji limfocytów T u tych osób. Stwierdzono między innymi, że stymulacja limfocytów T od chorych na R.Z.S. przy użyciu przeciwciał anti-CD3 i cytokin, których rolą jest ‘polaryzacja’ odpowiedzi komórkowej w kierunku fenotypu Th1 lub Th2, prowadzi do zaburzenia tej polaryzacji z przewagą fenotypu Th1 i nadprodukcją cytokin dla niego charakterystycznych, np. γ -IFN, co zaprzecza teorii, że komórki T osób chorych na R.Z.S. wykazywały wyłącznie ‘starcze’ obniżenie funkcji. (106).

Obniżenie zdolności do proliferacji jest kojarzone z wspomnianą powyżej utratą przez część limfocytów T antygeny CD28, oraz z obniżoną zdolnością ulegania apoptozie (3,51,52). Wykazano, że u chorych na R.Z.S. odsetek komórek CD4 pozbawionych CD28 może sięgać nawet 40% wszystkich krążących limfocytów CD4⁺ i ponad 70% limfocytów CD8⁺, podczas gdy u zdrowych odpowiednio 5 i 35%. Taka sytuacja może być przyczyną zaburzeń funkcji limfocytów T osób chorych na R.Z.S.

Pomimo wcześniej wspomnianej regulacji genu CD28 poprzez sekwencje α i β i stwierdzonej zależności pomiędzy poziomem TNF, a ekspresją CD28, nie znamy, jak dotychczas, mechanizmów powstawania komórek CD4⁺ pozbawionych ekspresji CD28; nie wiadomo czy należą one do oddzielnej linii rozwojowej, czy powstają z komórek wykazujących początkową ekspresję antygeny CD28. Wśród badaczy zajmujących się immunologią przeważa pogląd, że limfocyty które nie wykazują ekspresji CD28 powstają z limfocytów CD4⁺CD28⁺ pod wpływem ich aktywacji lub proliferacyjnego starzenia, w wyniku czego uważane są one za komórki 'stare immunologiczne' (26,107).

Samo stwierdzenie wspomnianych podobieństw właściwości proliferacyjnych i innych czynności limfocytów CD4⁺ od osób chorych na R.Z.S. i zdrowych osób w podeszłym wieku nie wyjaśnia jednak mechanizmu(ów) tych podobieństw i zwłaszcza „przyspieszonego starzenia” komórek CD4⁺ od chorych na R.Z.S. Stwierdzenie, że istotny mechanizm kontroli proliferacji, jakim jest poziom ekspresji CD28, zależny od prawidłowej interakcji pomiędzy określonymi sekwencjami DNA w obrębie minimalnego promotora genu CD28 a pewnymi białkami jądrowymi, prawdopodobnie występuje także jako element regulujący ekspresję genu receptora RAR β 2, należącego do mechanizmów bezpośrednio kontrolujących proliferację różnych typów komórek sugeruje, że być może w limfocytach CD4⁺ istnieją także inne, analogicznie regulowane geny, których ekspresja jest istotna dla poziomu proliferacji tych komórek.

2. CEL PRACY

Celem pracy była:

- Ocena aktywności proliferacyjnej limfocytów CD4⁺ osób chorych na R.Z.S., w porównaniu ze zdrowymi.
- Próba identyfikacji możliwych genów koregulowanych z CD28 i ocena poziomu ich ekspresji w limfocytach CD4⁺ osób chorych na R.Z.S., w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami w podobnym wieku.
- Poszukiwanie związku możliwych zaburzeń ekspresji badanych genów w limfocytach CD4⁺ z zaburzeniami cyklu komórkowego u chorych na R.Z.S.

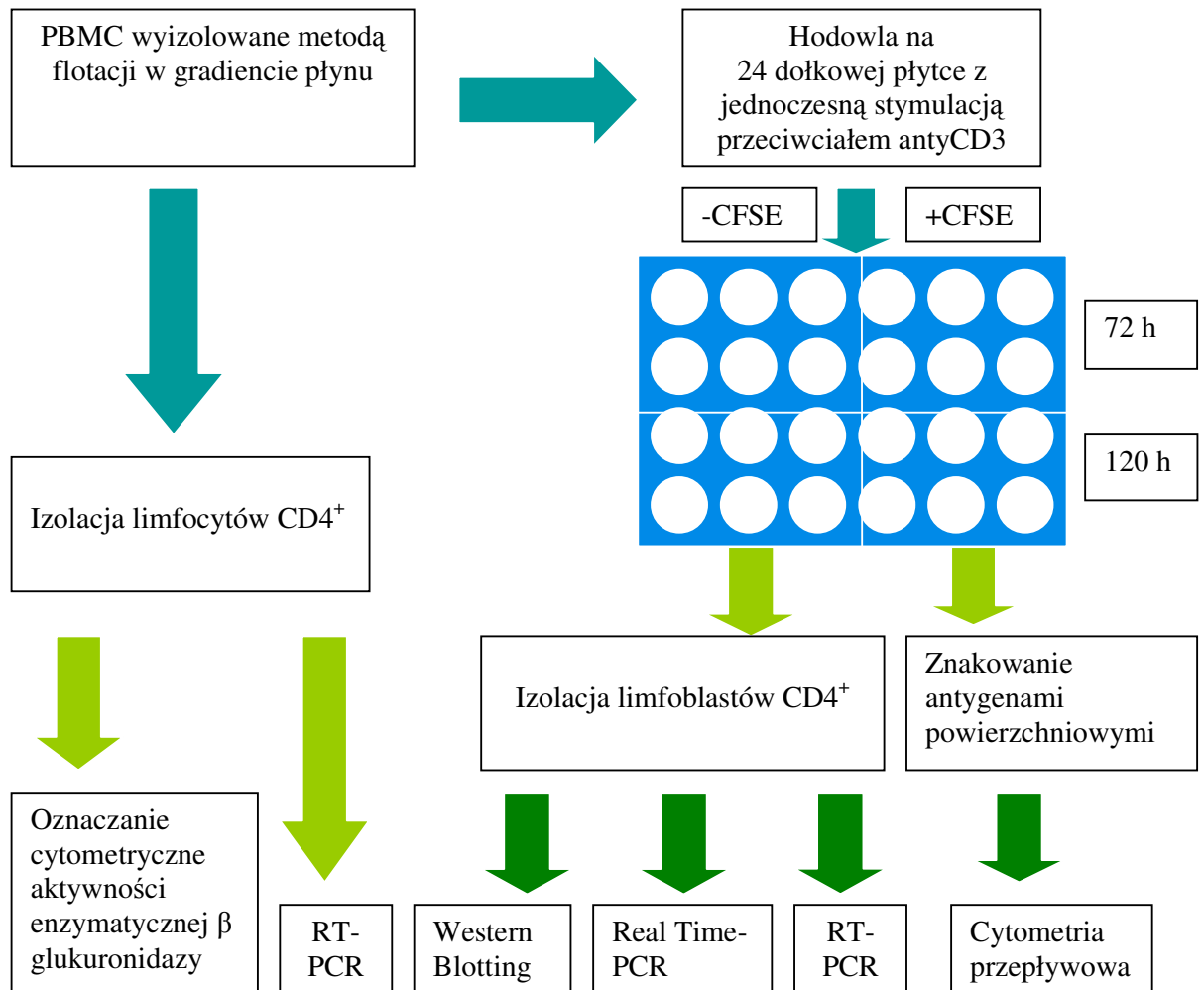
3. MATERIAŁY I METODY.

3.1. Charakterystyka badanych osób.

Do grup badanych zakwalifikowano 40 osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (33 kobiet, 7 mężczyzn, średni wiek $47,09 \pm 16,28$ lat, zakres od 21 do 98) oraz 30 zdrowych osób (21 kobiet, 9 mężczyzn, średni wiek $44,01 \pm 17,45$ lat, odchyl. stand., zakres od 25 do 70 lat). Chorzy na R.Z.S. kwalifikowani byli przez lekarzy ze Szpitala Reumatologicznego w Sopocie, na podstawie obowiązujących kryteriów (American College of Rheumatology, ACR) (108). U pacjentów oceniano stan kliniczny: określano bolesność dla 28 stawów (współczynnik TEN28), obrzęk dla 28 stawów (SW28) oraz wizualną analogową skalę bólu (WAS). W szczególności, u wszystkich chorych oznaczano wskaźnik DAS-28 (według kryteriów ustalonych przez The European League Against Rheumatism (EULAR) (109), co pozwoliło na ocenę stopnia aktywności choroby w momencie badania. Czas trwania choroby wynosił od 2 miesięcy do 22 lat (średnio 3,2 lata). 21 chorych poddano badaniom bezpośrednio po rozpoznaniu choroby (przed podjęciem leczenia farmakologicznego), natomiast pozostali w momencie opisywanych badań przyjmowali głównie metotrexat, encorton, a także anty-TNF α (RemicadeTM) w dawkach typowych dla leczenia R.Z.S. Zdrowi ochotnicy rekrutowali się spośród studentów, pracowników, rodzin. Stan zdrowia osób w wieku powyżej 65 lat oceniano w kierunku spełniania kryteriów 'protokołu Seniora' (110). Z obydwu grup badanych wykluczono osoby wykazujące cechy ostrego procesu zapalnego, trwającej infekcji, chorujące na cukrzycę i inne choroby układu dokrewnego, a także na nowotwory i/lub choroby przewlekłe układu krążenia, oddechowego i wydalniczego.

W ramach oceny stanu klinicznego u chorych na R.Z.S. wykonano podstawowe badania hematologiczne (morfologia krwi) oraz badania określające uogólniony stan zapalny, takie jak: stężenie białka C-reaktywnego w surowicy (CRP) i odczyn opadania krwinek czerwonych po 1 godzinie (OB). Większość z podstawowych badań laboratoryjnych (morfologia krwi) nie wykazywało odchyień od wyników prawidłowych; jedynie stwierdzono istotnie podwyższony poziom

płytek krwi (R.Z.S. $338,76 \pm 119,62$ (odch. stand.), zdrowi $256,78 \pm 42,09$ $p=0,007$ $N_{zdr}=20$ $N_{RZS}=38$), co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (111).



Ryc.5. Schemat procedur doświadczalnych.

3.2. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej od osób zdrowych oraz pacjentów z R.Z.S.

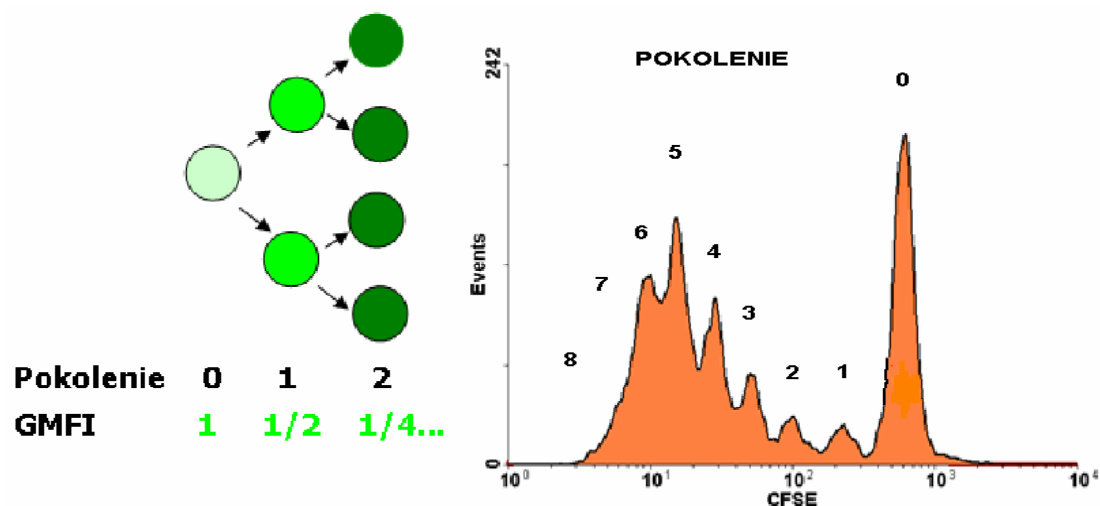
Ogólny schemat procedur doświadczalnych pokazano na Ryc. 5.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) izolowano jałowo metodą flotacji na gradiencie płynu do izolacji limfocytów. Krew żylną pobraną na EDTA wirowano w gradiencie gęstości HistopaqueTM 1077 (Sigma Chemical Co., USA), następnie pobierano warstwę limfocytów i monocytów, odpłukiwano płyn izolacyjny i zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA) zawierającym 10% surowicy płodowej cielęcej (FCS, Sigma Chemical Co., USA), 2 mM L-glutaminy (Sigma Chemical Co., USA), 50 U/ml penicyliny oraz 50 µg/ml streptomycyny (Sigma Chemical Co., USA). Komórki liczone przy użyciu kamery hematologicznej Burkera oraz oceniano żywotność komórek przy użyciu metody barwienia błękitem trypanu (Sigma Chemical Co., USA).

3.3. Hodowle komórkowe.

3.3.1. Zakładanie hodowli komórkowych.

W pracy stosowano nową metodę oceny proliferacji limfocytów przy użyciu cytometrii przepływowej, określaną jako DCT (ang. Dividing cell tracking) (60,112). Metoda ta umożliwia śledzenie podziałów komórkowych za pomocą przyżyciowego barwnika fluorescencyjnego CFSE (ang. carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Sigma Chemical Co., USA), który ma zdolność wbudowywania się trwale do komórek i ulega rozcieńczeniu w stosunku 1:2 przy każdym podziale komórkowym (112) (Ryc.6). Pozwala to zaobserwować liczbę podziałów komórkowych, liczbę komórek prekursorowych, które odpowiedziały na stymulację, czas trwania pojedynczego cyklu komórkowego jak również czas przejścia limfocytów T spoczynkowych fazy G₀ do aktywnej fazy cyklu G₁ (112). Równocześnie możliwe jest badanie fenotypu powierzchni po barwieniu odpowiednimi przeciwciałami.



Ryc. 6. Zasada metody oceny proliferacji z użyciem CFSE .

Sterylnie, 24-dółkowe, hodowlane płytki plastikowe (Becton Dickinson, USA), pokrywano przeciwciałem anti-CD3 (BD Pharmingen USA, 1mg/ml) w stężeniu 1µg/ml i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze 4⁰C w celu związania przeciwciała z powierzchnią plastiku (immobilizacji). Po tym czasie nadmiar przeciwciała usuwano, a dołki przepłukiwano zimnym PBSem. Tak przygotowane płytki były używane do hodowli PBMC.

Komórki PBMC nieznakowane lub znakowane 2µM CFSE przez 15 minut w ciemności i w temperaturze 37⁰C zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym i nanoszono do dołków w płytkach hodowlanych uprzednio opłaszczonych przeciwciałem anti-CD3 oraz do dołków nie opłaszczonych traktowanych jako kontrola, w ilości 2x10⁶ /dółek. Komórki inkubowano w temperaturze 37⁰C, w atmosferze 5% CO₂ o 100% wilgotności. Hodowla prowadzona była przez 5 dni (120 godzin), komórki pobierano z płytki po 72 i 120 godzinach, płukano, liczone, a następnie oceniano parametry cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej (DCT). Obliczenia dotyczące parametrów proliferacji na podstawie danych wykonywano programem „Progeny[®] 16.3” (autor J.M. Witkowski, AM Gdańsk, 60). W celu odróżnienia populacji proliferujących limfocytów umożliwiającego ich dalszą analizę, po zakończeniu hodowli zawieszinę komórek znakowanych CFSE barwiono zewnątrzkomórkowo odpowiednimi kombinacjami przeciwciał PE-Cy5/anti-CD4 (DAKO Cytomation,

Dania) PE/anty-CD28 (Becton Dickinson USA), PE-Cy5/anty-CD8 (DAKO Cytomation, Dania) i poddawano analizie cytometrycznej.

3.4. Izolacja limfocytów CD4⁺.

Izolacja limfocytów CD4⁺ prowadzona była po izolacji PBMC oraz (w celu uzyskania odpowiedniej liczby stymulowanych limfocytów CD4⁺) po 120 godzinach hodowli z immobilizowanym przeciwciałem anty-CD3. Komórki oczyszczane były dwiema metodami negatywnej selekcji magnetycznej, metodą kolumnową (za pomocą separatora kolumnowego MACS, Miltenyi Biotech) i próbówką (Dyna Bead, Miltenyi Biotech). Dwoch metod izolacji używano, ponieważ po 120 godzinnej hodowli wielkość komórek uniemożliwiała izolację metodą kolumnową (komórki z trudem przeciskały się przez kolumnę, przez co drastycznie zmniejszał się uzysk izolowanych komórek). Dlatego też komórki CD4⁺ po 120 godzinnej hodowli separowano metodą próbówką.

Czystość populacji komórek CD4⁺, pomiędzy tymi dwiema metodami, była porównywalna i oscylowała pomiędzy 90-96% (ocena cytometryczna). Badano również żywotność komórek metodą barwienia błękitem trypanu, która podobnie jak w przypadku świeżo izolowanych komórek PBMC wynosiła zawsze powyżej 95%.

Na komórkach CD4⁺, pochodzących z PBMC (ex vivo, bez hodowli), jak również po 72h i 120h hodowli, wykonano doświadczenia celem wykrycia różnic w ekspresji badanych genów. Ponieważ w pilotowych badaniach nie stwierdzono wpływu 72h i 120h hodowli na poziom ekspresji badanych genów, dalsze badania wykonywano na komórkach CD4⁺ wyizolowanych po 120 godzinnej hodowli (przede wszystkim ze względu na liczebność uzyskiwanych komórek CD4⁺).

3.4.1. Metoda kolumnowa negatywnej separacji magnetycznej (Miltenyi Biotech Macs CD4⁺ T Cell Isolation Kit).

Zasadą tej metody jest bezpośrednie wyizolowanie komórek CD4⁺ pochodzących z ludzkich PBMC. Pozostałe komórki, takie jak np. komórki B, monocyty, komórki NK, komórki dendrytyczne i inne są magnetycznie usuwane

przy użyciu koktajlu z przeciwciał: CD8, CD11b, CD16, CD19 i CD56, z którymi łączą się ziarna magnetyczne MACS MicroBeads, co powoduje że tak wyznakowane komórki są zatrzymywane w siatce ferromagnetycznej w MACS kolumnie w przyłożonym zewnętrznym polu magnetycznym.

Po wyizolowaniu PBMC z krwi obwodowej usuwano supernatant i osad zawieszano w buforze (PBS, 0,5% albumina z surowicy bydlęcej i 2 mM EDTA) na 1×10^7 komórek. Następnie dodawano Hapten-antibody Cocktail i inkubowano przez 10 min w temp. 6 – 12°C, po wypłukaniu i odwirowaniu komórek dodawano MACS Anti-Hapten MicroBeads i inkubowano 15 min. w temp. 6 – 12°C. Wypłukane i odwirowane komórki zawieszano w buforze do izolacji i наносono na uprzednio przygotowaną kolumnę. Zbierano eluat, jako negatywną frakcję, reprezentującą komórki Th CD4⁺. Komórki liczone, płukano i wirowano w celu zagęszczenia zawiesiny, część komórek używano do wybarwienia powierzchniowego celem sprawdzenia czystości zebranych CD4⁺, natomiast resztę komórek, po usunięciu supernatantu, poddawano głębokiemu mrożeniu w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych badań.

3.4.2. Metoda probówkowa negatywnej separacji magnetycznej (DynaL Biotech, CD4 Negative Isolation Kit).

Podobnie, jak metoda kolumnowa opisana powyżej, metoda probówkowa polega na wyseparowaniu ludzkich komórek T CD4 przy użyciu ziaren magnetycznych i mieszanki przeciwciał. Ta mieszanka przeciwciał (CD14, CD16, CD56, CD36, CD8, HLA Class II DR/DP i Glikoforyna A) umożliwia oddzielenie nieinteresujących nas komórek, i ziarna magnetyczne mają za zadanie związać się z tymi komórkami, co pozwala na oczyszczenie populacji komórek CD4.

Wyizolowane PBMC z krwi obwodowej zawieszano w buforze PBSu i 0,1% albuminy z surowicy bydlęcej. Następnie na 1×10^7 komórek dodawano 20 µl FCS (płodowa surowica cielęca, Sigma Chemical Co., USA) i 20 µl mieszanki przeciwciał, inkubowano przez 10 min w temp. 6 – 12°C, po wypłukaniu buforem PBSu i 0,1% albuminy z surowicy bydlęcej i odwirowaniu komórek (1300 rpm, 8 min., wirówka MPW 342) dodawano Dynal MicroBeads i inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zawiesinę mieszano i dodawano 2 ml buforu

do separacji, inkubowano 2 min. w temperaturze pokojowej w statywie probówkowym z polem magnetycznym, supernatant odpipetowano do kolejnej probówki. Komórki wirowano, liczone i płukano (jak wyżej), część komórek używano do wybarwienia powierzchniowego celem sprawdzenia czystości zebranych CD4⁺, resztę poddawano głębokiemu mrożeniu w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych badań.

3.5. Ocena fenotypu badanych komórek poprzez znakowanie antygenów powierzchniowych.

Komórki PBMC pobrane jałowo, tuż po izolacji, jak również po hodowli z immobilizowanym anty-CD3 lub/i z barwnikiem przyżyciowym CFSE, płukano dwukrotnie w PBS (buforowana fosforanami sól fizjologiczna, Sigma Chemical Co., USA) poprzez wirowanie przez 7 minut przy 1300 obr./min. (500 g, Eppendorf Centrifuge 5810R). Próbkę do znakowania przeciwciałami stanowiło 200 tys. komórek zawieszonych w 100 µl PBS w probówkach cytometrycznych (Falcon, Becton Dickinson USA). Następnie inkubowano komórki przez 30 minut na lodzie z następującymi przeciwciałami:

- FITC/anty-CD3, PE/anty-CD25, PE/anty-CD28, PE-/anty-CD95, PE-Cy5/anty-CD4, PE-Cy5/anty-CD8 (wszystkie wymienione wyżej przeciwciała z firmy DAKO Cytomation, Dania);

- PE/anty-CD69, PE-/anty-HLA-DR, PE-Cy5/anty-CD16⁺56⁺ (wszystkie wymienione wyżej przeciwciała z firmy Becton Dickinson USA);

w ilości 5 µl na próbkę w celu określenia cech fenotypowych i oceny zmian ekspresji antygenów w wyniku stymulacji.

Kontrolą izotypową była mieszanina sprzężonych z fluorochromami mysich immunoglobulin bez swoistości antygenowej (FITC/IgG1 + PE/IgG2a + PE-Cy5/IgG1, DAKO Cytomation, Dania), używana również w ilości 5 µl na 100 tys. komórek.

Po upływie 30 minut komórki płukano jednokrotnie w 3 ml PBS (wirowanie przy 1300 obr./min. przez 7 minut (wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R),

następnie zawieszano w PBS i przechowywano na lodzie, aż do momentu analizy cytometrycznej.

3.5.1. Pomiary cytometryczne i analiza wyników.

Ekspresję powierzchniową antygenów badano metodą cytometrii przepływowej używając cytometru FACScan (Becton Dickinson, USA). Dane dla każdej próbki zbierano z 20 000 komórek PBMC używając oprogramowania CellQuest (BD, USA).

Wyniki analizowano z użyciem programu komputerowego WinMDI w. 2.9. (J. Trotter, The Scripps Research Institute, USA) umożliwiającego ocenę odsetka komórek różniących się fenotypem oraz graficzne przedstawienie dystrybucji znakowanych komórek.

3.6. Poszukiwanie genów aktywnych w limfocytach CD4⁺, zawierających sekwencje homologiczne do regulacyjnej sekwencji α w genie CD28.

Jak już wspomniałam we wstępie (pkt. 1.3.1), wykazano że obniżenie ekspresji CD28 występujące u osób w podeszłym wieku i u chorych na R.Z.S. wynika z braku ekspresji specyficznego kompleksu jądrowych białek regulujących tę ekspresję przez wiązanie się do odpowiednich miejsc w minimalnym promotorze genu dla CD28; określanym jako α i β (25,58). Obserwacja homologicznej do α sekwencji w promotorze genu receptora kwasu retinowego RAR β 2 kontrolującego proliferację wielu typów komórek świadczy, że sekwencja ta nie jest unikatowa, i być może znajduje się w obszarze promotora lub okolicy regulatorowej innych genów, których ekspresja może być związana z aktywacją i/lub proliferacją limfocytów T.

W celu odnalezienia takich genów przeszukano bazę danych GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) używając programu on-line NCBI Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pod kątem sekwencji homologicznych do sekwencji α . Wykryto trzy sekwencje o wysokiej homologii do sekwencji α , zlokalizowane w obszarze promotorowym lub stosunkowo blisko genów, o których wiadomo, że ulegają one ekspresji w ludzkich limfocytach T i/lub mogą mieć znaczenie dla badanych zjawisk. Podstawowymi kryteriami były: wielkość homologii oraz lokalizacja sekwencji w pobliżu genu wskazująca na możliwość jej udziału w regulacji ekspresji. Genami tymi są: znany i opisany wcześniej RAR β -2, GRAP-2, i KLOTHO (patrz niżej).

3.7. Wykrywanie produktu badanych genów w komórkach CD4⁺ techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR).

3.7.1. Izolacja całkowitego RNA.

Ze wszystkich zamrożonych porcji komórek (2 mln) izolowano całkowite RNA za pomocą odczynnika TRIAGENT (Sigma Chemical Co., USA).

Po zwirowaniu próbek (wirówka Sigma 2K15) z szybkością 2,500 rpm (500g) przez 3 min, dodawano 1 ml TRIAGENT do każdej próbki, inkubowano wytrząsając w temp. pokojowej przez 5 min, następnie dodawano 200 μ l mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego (24:1, Sigma Chemical Co., USA).

W międzyczasie przygotowywano nowe próbki z 500 μ l izopropanolu i przechowywano w temp. -20 °C.

Po zwirowaniu (szybkość 13000 rpm (15000 g) przez 30 min.), zbierano czystą wodną warstwę górną (ok. 500 μ l) zawierającą RNA, a wolną od białka i DNA, przenoszono do próbek z przygotowanym wcześniej izopropanolem i umieszczano próbki w temp. - 80⁰C, co najmniej na noc.

Po 24 godzinach zwirowywano próbki (temp. 4°C, przez 30 min. z szybkością 13000 rpm (15000 g)), następnie usuwano supernatant. Do osadu dodawano 1 ml 75% alkoholu etylowego i energicznie mieszano, następnie próbki odwirowywano (szybkość 13000 rpm, w temp. 4°C przez 10 min.) i usuwano supernatant powtarzając powyższą procedurę. Tak wyplukane próbki RNA suszono przy użyciu wirówki próżniowej (firmy JWElectronic, Polska), w temp. 30°C przez 15 min. do momentu pozostania małej kropli na dnie. Stężenie uzyskanego RNA oceniano na podstawie stosunku gęstości optycznych przy długościach fali 260 nm i 280 nm, przy użyciu spektrofotometru Biophotometer Eppendorf.

3.7.2. Reakcja syntezy cDNA.

Przy użyciu matrycowego RNA, uzyskanego jak w pkt. 3.7.1., przeprowadzano reakcję syntezy cDNA standardową techniką odwrotnej transkrypcji, stosując zestaw Improm-IITM Reverse Transcription System, PROMEGA.

Pierwszym etapem jest łączenie matrycowego RNA i primera cDNA oligo-dT. Probówki umieszczano w temperaturze 70°C (ThermoBlock TDB-120, BIOSAN) na 5 min. i po tym czasie natychmiast schładzano na lodzie przez 5 min., następnie wirowano przez 10 s, aby zebrać kondensat i próbki trzymano na lodzie do momentu dodania mieszaniny z odwrotną transkryptazą.

Drugi etap to odwrotna transkrypcja przeprowadzana przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy, inhibitora rybonukleazy, mieszaniny dNTP, jonów magnezu, 5 x buforu do reakcji RT, wody wolnej od RNAz w stężeniach zgodnych z rekomendacją producenta (Improm-IITM Reverse Transcription System, Promega). Trzecim etapem jest etap przyłączania enzymu; próbki umieszczano w bloku grzewczym w temperaturze 25°C na 5 min. Czwarty etap zwany wydłużaniem polega na inkubacji próbek w 42⁰C przez 60 min., następnie 15 min. w 70°C, aby zinaktywować odwrotną transkryptazę. Wytworzone cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania łańcuchowej reakcji polimerazy.

3.7.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).

Łańcuchową reakcję polimerazy ze starterami dla badanych genów: KLOTHO, GRAP-2, RAR- β 2 (produkcja: DNA-Gdańsk II) oraz β -aktyny (PROMEGA) jako genu referencyjnego, prowadzono w termocyklerze Master Cycler Personal (Eppendorf), używając następujących odczynników: bufor polimerazy DNA wolny od jonów Mg^{2+} , roztwór $MgCl_2$, PCR mieszanina nukleotydów (DTP), matryca oraz termostabilna polimeraza Taq i H_2O w stężeniach zgodnych z rekomendacją producenta (zestaw do PCR, PCR Core System, PROMEGA). Liczba cykli oraz odpowiednia temperatura przyłączenia zostały wytypowane po wcześniejszym przeprowadzeniu doświadczenia, w którym wykonano reakcje PCR uwzględniając gradient temperatur i stosując różną ilość powtórzeń cyklu dla poszczególnych genów (w aparacie Master Cycler Gradient, Eppendorf). Zastosowana liczba powtórzeń cyklu była charakterystyczna dla poszczególnych starterów i gwarantowała wykładniczy przebieg amplifikacji.

Ostatecznie stosowano następujące warunki reakcji: wstępna denaturacja $94^{\circ}C$ przez 10 min., następnie 32 cykle dla genów KLOTHO i GRAP-2, a 30 cykli dla genu RAR β 2 - $94^{\circ}C$, 30 s, temperatura przyłączenia $55^{\circ}C$, 30 s, temperatura wydłużania $72^{\circ}C$, 30 s, po ostatnim cyklu: terminacja $72^{\circ}C$ przez 10 min., zakończenie reakcji w $4^{\circ}C$.

Sekwencje starterów dla KLOTHO, GRAP-2 i RAR β 2 zostały zaprojektowane z pomocą programu Primer3 Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tab.1). Swoistość starterów dla ludzkich genów została potwierdzona za pomocą programu NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). W przypadku β -aktyny zastosowano parę starterów oferowanych przez PROMEGA, USA).

Do oceny produktów RT-PCR zastosowano metodę rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym (agarozą- Sigma Chemical Co., USA) z bromkiem etydyny (2 μ l 10mg/ml, Sigma Chemical Co., USA) z buforem TBE (108g Tris - Bio-Rad Laboratories, Niemcy; 55g kwas borowy- POCh „Chemia”, Gliwice; 0,5M EDTA- POCh „Chemia”, Gliwice; dopełnione wodą do 1l, pH=8,3).

Gen	sekwencje starterów
β -aktyna	P 5' CACCTTCACCGTTCCAGTTT 3' L 5' GTCCACCTTCCAGCAGATGT 3'
KLOTHO	L 5'GCTTTCCTGGATTGACCTTG 3' P 5' TGTAACCTCTGTGCCACTCG 3'
RAR β 2	P 5' GGGTCAATCCACTGAAGCAT 3' L 5' CTGGGAAAAAGACCAACAGC 3'
GRAP-2	P 5' CACTTCAAGGTCATGCGAGA 3' L 5' TTCATCGAAGGTCGGATTTC 3'

Tab. 1. Sekwencje zastosowanych starterów

P – sekwencja sensowna

L-sekwencja antysensowna

3.7.4. Elektroforeza agarozowa.

Próbki nanoszono w ilości 12 μ l/studzienkę, równocześnie prowadzono rozdział wzorca masowego 50-3000bp (Sigma Chemical Co., USA). Elektroforetyczny rozdział produktów prowadzono w aparacie do elektroforezy w żelu agarozowym SUBMINI prod. Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, przy stałym napięciu 100 V przez 40-60 minut. Po przeprowadzeniu elektroforezy fluorescencję indukowano światłem UV i zbierano w aparacie do archiwizacji żeli GDS-8000 System (UVP Bioimaging System, Wlk. Brytania). Uzyskane obrazy zapisywano komputerowo w formie cyfrowej i analizowano densytometrycznie.

3.7.4.1. Analiza żeli

Analiza densytometryczna, umożliwiająca oznaczenie aktywności genów, została przeprowadzona przy pomocy programu komputerowego Scion Image

(National Institutes of Health, USA, (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm). W analizie wykorzystano ekspresję genu β -aktyny (referencyjnego), jako standard (100%) do którego porównywano poziom ekspresji pozostałych genów.

3.8. PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR).

W pracy została zastosowana metoda PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I, łączącego się z mniejszą bruzdą dsDNA, ale nie wiążącego się z ssDNA. W celu analizy ilościowej uprzednio przygotowano krzywe wzorcowe dla relacji między ilością DNA a wielkością sygnału fluorescencyjnego dla każdego z badanych genów.

3.8.1. Krzywe wzorcowe

3.8.1.a. PCR

Celem uzyskania produktów niezbędnych do wykonania krzywych wzorcowych, łańcuchową reakcją polimerazy ze starterami dla badanych genów prowadzono, używając następujących odczynników: startery (jak w Tab.1, 2,5 μ M), bufor polimerazy DNA wolny od jonów Mg^{2+} , roztwór $MgCl_2$, PCR mieszanina nukleotydów, matryca oraz termostabilna polimeraza Taq i H_2O , stosując warunki reakcji opisane w punkcie 3.7.3. Następnie dokonywano rozdzielania elektroforetycznego otrzymanych produktów w 2% żelu agarozowym, analogicznie do procedury opisanej w punkcie 3.7.4.

3.8.1.b. Izolacja DNA z żelu agarozowego (zestaw Gel-Out, A&A BIOTECHNOLOGY).

Żel agarozowy zawierający interesujące nas DNA rozpuszczano w roztworze R7S zawierającym sole chaotropowe. W następnej fazie dodawano izopropanol i próbkę nanoszono na minikolumnę z żywicą krzemionkową. DNA przechodząc przez złożę wiąże się z nim, podczas gdy zanieczyszczenia przepływają wolno przez kolumnę. Pozostałości zanieczyszczeń usuwano podczas płukania. Tak uzyskane DNA wmywano z kolumny wodą i używano, bez dodatkowych procedur oczyszczania. Wzorcowe DNA przechowywano w 4⁰C do momentu przeprowadzenia Real Time PCR.

3.8.2. Oznaczanie poziomu ekspresji genów (PCR w czasie rzeczywistym).

PCR w czasie rzeczywistym ze starterami dla genów: KLOTHO, RAR- β 2, GRAP-2 oraz genu referencyjnego β -aktyny, prowadzono w aparacie LightCycler ROCHE, używając zestawu odczynników firmy ROCHE (Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I). Na wstępie w pilotowych doświadczeniach zoptymalizowano warunki reakcji: stężenie MgCl₂, temperaturę przyłączenia, ilość matrycy, a także liczbę cykli. Po ustaleniu optymalnych warunków reakcji dla wszystkich badanych próbek przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 1 μ l Master SYBR Green I (10x stęż.), MgCl₂ o stężeniu 3 mM, odpowiednie startery (2,5 μ M), 1 μ l matrycy (badane cDNA lub produkt uzyskany w p. 3.9.1.c) i H₂O (do 9 μ l całkowitej objętości). Reakcję prowadzono stosując następujące warunki: aktywacja 95⁰C przez 10min., amplifikacja: 40 cykli: 95⁰C przez 10 s; 55⁰C przez 5 s; 72⁰C przez 10 s; chłodzenie: 40 ⁰C przez 30s. Wyniki reakcji zapisywano i analizowano za pomocą programu LightCycler Software 4.05.

3.9. Potwierdzenie obecności lub braku białka Klotho w izolowanych limfocytach CD4⁺ pacjentów z R.Z.S. i osób zdrowych techniką Western Blotting.

3.9.1. Uzyskiwanie materiału białkowego.

Wcześniej wyizolowane immunomagnetycznie i zamrożone w -80⁰C komórki CD4⁺ zawieszano w 25 µl buforu lizującego (300mM NaCl, 50mM Tris pH7,6, 0,15% Tryton X-114 (Sigma Chemical Co., USA), 0,5mM MgCl₂, zawierającego inhibitory proteaz o stężeniu 10µM (jodoacetamid 18mg/ml, leupeptyna 10mg/ml, aprotynina 10mg/ml, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 20mg/ml) i przez godzinę inkubowano na lodzie. Następnie próbki wirowano przy 14000 obr/min przez 4 min. Supernatant (20 µl) zbierano do osobnych próbek, dodawano 0,5 µl 10% SDS i tak przygotowany materiał był natychmiast używany do elektroforezy poliakrylamidowej i testu Western Blot, bądź przechowywany w -20⁰C.

3.9.1.a. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford.

Oznaczanie białka w próbkach wykonywano standardową metodą Bradford, stosując odczynnik Bradford (Sigma Chemical Co., USA) zgodnie z procedurą opisaną w (113) i odczytując wartości ekstynkcyj przy długości fali 450nm, potem przy 590nm, przy użyciu aparatu BioPhotometer (Eppendorf). Krzywą wzorcową sporządzono używając roztworów 0,1%, 0,01%, 0,001% BSA.

3.9.2. Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE.

W pracy wykorzystano metodę elektroforezy z SDS według Laemmli (114).

Przygotowywano żel poliakrylamidowy: żel rozdzielający 10% i zagęszczający 4,5%, w następujący sposób: żel dolny, rozdzielający w wyniku połączenia akrylamidów (Sigma Chemical Co., USA): 2,5 ml buforu dolnego (1,5mM Tris/HCl pH8,8, woda), 3,3 ml 30% mieszaniny akrylamidów/bisakrylamidów, 4,1 ml H₂O, 0,1 ml 10% SDS (BioRad), 0,05 ml 10% nadsiarczan amonu (APS) (Sigma Chemical Co., USA), 0,005 ml TEMEDu (BioRad); 4,5 % żel górny zagęszczający: 1,25 ml buforu górnego (0,5M Tris/HCl pH 6,8, woda), 0,75 ml 30% mieszaniny akrylamidów/bisakrylamidów, 2,8 ml H₂O, 0,05ml 10% SDS, 0,03 ml APS, 0,005 ml TEMEDu.

Białko z limfocytów CD4⁺ przygotowane jak w pkt.3.9.1. (z około 2,5 mln komórek odpowiadające 3μg białka/studzienkę), oraz standard białkowy (Precision Plus Protein™ Standard, All Blue, BioRad) mieszano w stosunku 1:1 z buforem obciążająco-lizującym (0,5mM Tris-HCl, 10% glicerol, 10% SDS, 5% β-2-merkaptotanol, 1% błękit bromofenolowy) i umieszczano w probówkach Eppendorfa, w bloku grzewczym w 100⁰C na 5 min., celem denaturacji. Na dołek nanoszono próby w ilości 20 μl/studzienkę. Rozdział prowadzono w buforze elektrodowym (25mM Tris/HCl, 192mM glicyna, 0,1% SDS, pH8,3, woda), przy napięciu 100V, przez około 1 godzinę przy użyciu aparatu do elektroforezy poliakrylamidowej (Mini Protean II™ firmy BioRad). Po dojściu czoła barwnika (błękitu bromofenolowego) na ok. 1 cm od końca żelu, kończono elektroforezę. Po elektroforezie wyjmowano ostrożnie żel i przygotowywano do przeprowadzenia transferu.

3.9.3. Western Blotting

Po zakończeniu elektroforezy żel poliakrylamidowy wyjmowano z aparatu i po usunięciu żelu górnego, formowano tzw. „kanapkę” (ang. sandwich). Pierwsza warstwa to bibuła (Extra Trick Blot Paper, Criterion™ Size, BioRad), następnie

błona nitrocelulozowa (PROTRAN NITROCELLULOSE, 0,45µm, Schleicher&Schuell), następnie żel poliakrylamidowy, który obficie polewano buforem transferowym (25mM Tris/HCl, 192mM glicyna, 5% metanol, pH=8,3), a wszystko to przykrywano kolejną bibułą i polewano buforem transferowym. Całość przykrywano pokrywą górną aparatu (Semi Dry-Transfer, BioRad) i włączano prąd 20V na 15 min.

Po zakończeniu transferu, wyjmowano błonę nitrocelulozową z aparatu i płukano w roztworze płuczającym (PBS z 0,05% Tween 20) przez 5 min. Wszystkie płukania i inkubacje wykonywano w temperaturze pokojowej z jednoczesnym wytrząsaniem. Błonę umieszczano w buforze blokującym białko (3% odtłuszczone mleko w proszku w PBS z 0,05% Tween 20) na 1 godzinę, w 37⁰C. Po blokowaniu płukano w roztworze płuczającym (PBS z 0,05% Tween 20) – 6 razy, po około 5 min., każdorazowo zmieniając roztwór. Następnie umieszczano błonę na całą noc w temp. 4⁰C, w roztworze specyficznych przeciwciał: Klotho (Rabbit Anti-Mouse KL affinity pure 2µg/ml w 5 ml — firmy GENTAUR) lub β-aktyny (Mouse monoclonal to beta actin — Loading Control – firmy ABCAM 0,5mg/ml, rozcieńcz. 1:1000). Ze względu na to, że nie istnieje, jak dotychczas przeciwciało przeciwko ludzkiemu Klotho zastosowano produkowane przeciwciało przeciwko mysiemu Klotho, na podstawie informacji producenta o homologii rozpoznawanego epitopu do odpowiedniego fragmentu ludzkiego białka, a także po przeprowadzeniu pilotowych oznaczeń Western blot w obfitym w białko Klotho materiale z ludzkiej nerki, w którym wykazano obecność produktu o spodziewanej masie cząsteczkowej. Nadmiar przeciwciał odmywano przez sześciokrotne płukanie w 200 ml 0,1 % BSA w TBS, po 10 min. Następnie inkubowano w roztworze przeciwciał anti-IgG powiązanych z peroksydazą chrzanową, przez 1 godzinę (Rabbit Polyclonal to Mouse IgG H&L (HRP), 2mg/ml, rozcieńcz. 1:2000 – firmy ABCAM). Odmywano nadmiar przeciwciał płuczając w buforze płuczającym przez 10 min., a następnie pięć razy w 200 ml PBS po 10 min.

Błonę inkubowano w roztworze wywołującym (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate — PIERCE) przez 5-10 min. w temperaturze pokojowej. Końcowym etapem była ekspozycja błony nitrocelulozowej na kliszy rentgenowskiej (firmy Foton Trading).

3.10. Cytometryczna metoda ilościowego oznaczania aktywności beta-glukuronidaz.

Beta (β -) glukuronidaza należy do grupy enzymów z rodziny glukozydaz (**115,116**). B-glukozydazy biorą udział w syntezie i degradacji oligo- i polisacharydów (**117**), które są zaangażowane w systemy walki z patogenem (**118,119**), detoksykacji (**120,121**), kontrolę transdukcji sygnału (**122**) i zmiany hormonalne (**123**). Ze względu na to, że białku Klotho przypisywana jest aktywność β -glukuronidazy, a także na brak danych odnośnie aktywności β -glukuronidaz w limfocytach T chorych na R.Z.S., w pracy oznaczano całkowitą aktywność beta-glukuronidaz oraz aktywność beta-glukuronidazową przypisywaną białku Klotho.

Aktywność β -glukuronidaz w limfocytach T oznaczano cytometrycznie, stosując di- β -D-glukuronid fluoresceiny (FDGlcU) jako substrat, którego hydroliza powoduje wzrost fluorescencji badanych komórek (**124**) Pięćdziesiąt μ l zawiesiny oczyszczonych limfocytów CD4⁺ o stężeniu 4×10^6 /ml zawieszano w 1 ml PBS, zawierającym 11 mM glukozę (Sigma Chemical Co., USA) i 4% FCS (medium barwiące) i preinkubowano 10 min. w temp. 37°C przed dodaniem substratu. Aby wykazać, że obserwowana fluorescencja to wynik specyficznej hydrolizy substratu przy udziale β -glukuronidazy, część próbek komórek inkubowano przez 30 min. w temp. 37°C ze specyficznymi inhibitorami β -glukuronidaz: 5 mM 1,4-disacharolaktonem (Sigma Chemical Co., USA) uważanym za inhibitor β -glukuronidazowej aktywności białka Klotho (**125**) lub 0,3 mM chlorochiną (Sigma Chemical Co., USA) – uniwersalnym inhibitorem β -glukuronidaz (**126**), po czym do wszystkich próbek dodawano substrat (1mM fluorescein-di- β -D-glukuronid, Sigma Chemical Co., USA) i inkubowano 60 minut w temp. 37°C. Po tym czasie przerywano reakcję, 10-krotnie rozcieńczając komórki lodowatym medium barwiącym i dokonywano odczytu cytometrycznego.

Całkowita aktywność beta-glukuronidaz odpowiadała różnicy pomiędzy fluorescencją komórek inkubowanych z FDGlcU bez udziału inhibitorów a fluorescencją komórek inkubowanych bez substratu, natomiast aktywność beta-glukuronidazową przypisywaną białku Klotho stanowiła różnica pomiędzy maksymalną fluorescencją komórek inkubowanych z FDGlcU a ich fluorescencją obserwowaną w obecności 1,4-disacharolaktonu. Wreszcie za całkowitą aktywność

β -glukuronidaz przyjęto różnicę między fluorescencją komórek inkubowanych z FDGlcU bez udziału inhibitorów i fluorescencją obserwowaną w obecności chlorochiny. Komórki przetrzymywano na lodzie do momentu odczytu na cytometrze, aby uniknąć wycieku produktu fluorescencyjnego. Bezpośrednio przed odczytem, komórki wirowano (1300 obr./min. przez 7 minut, wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R) i zawieszano w 300 μ l świeżego medium barwiącego wzbogaconego 1 μ g/ml jodku propidyny, celem odróżnienia martwych limfocytów.

3.11. Analiza statystyczna.

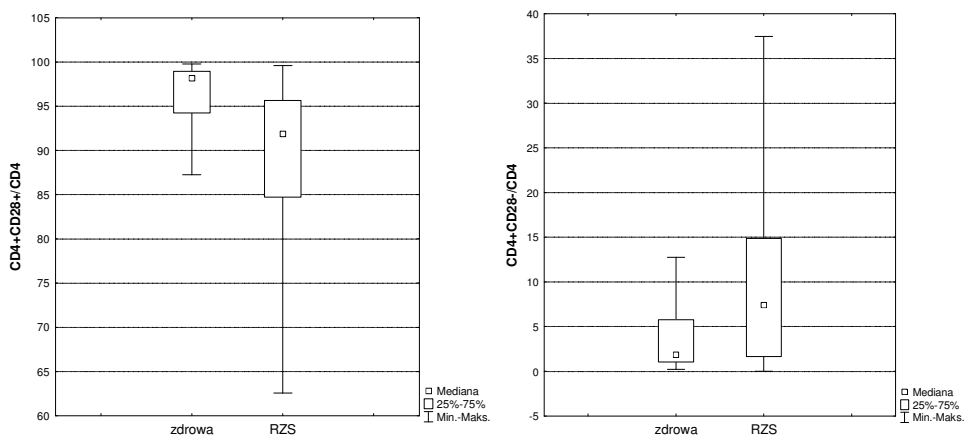
Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica 7.1.(Stat Soft Inc.). Ze względu na zaobserwowane odstępstwa od założeń o normalności rozkładu wyników, do analizy oprócz testu T Studenta zastosowano test nieparametryczny - test U Manna — Whitney).

4. WYNIKI

4.1. Porównanie fenotypu limfocytów krwi obwodowej osób chorych na R.Z.S. i zdrowych.

Fenotyp limfocytów od osób zdrowych i chorych na R.Z.S. badano zarówno w komórkach spoczynkowych (ex vivo), jak i po 120-godzinnej stymulacji immobilizowanym anty-CD3.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy odsetkiem subpopulacji $CD4^+CD28^+$ i $CD4^+CD28^-$ u osób zdrowych i osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów (Ryc.7). Zaobserwowano jednak wyraźną, chociaż statystycznie nieznamienne tendencję spadkową dla $CD4^+CD28^+$ i odpowiednio tendencję wzrostową dla $CD4^+CD28^-$ pojawiającą się u osób chorych, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (18, 51,52,) Szczegółowe zestawienie statystyczne dla obu badanych grup przedstawiono poniżej w **Tabeli 2**.

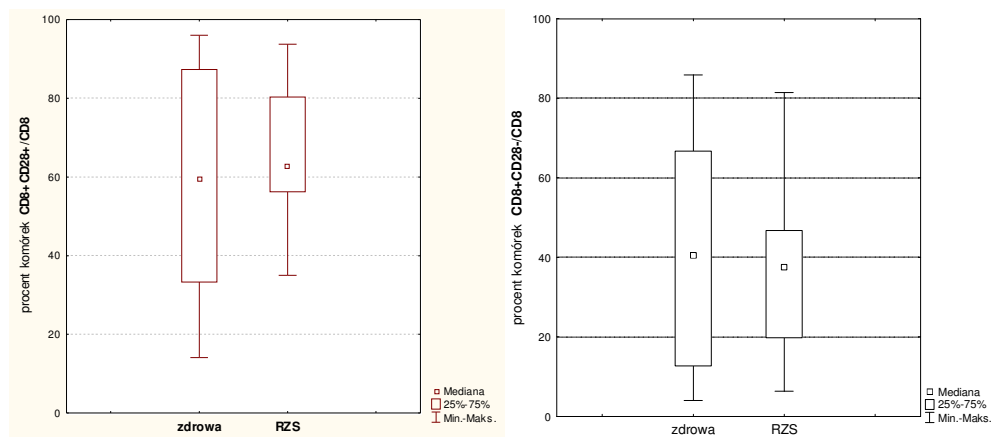


Rycina 7. Brak statystycznie istotnych różnic w odsetku komórek $CD4^+$ posiadających na swojej powierzchni cząsteczkę CD28 i komórek bez CD28, w grupie osób zdrowych i chorych na R.Z.S. $p=0,8$, N_{zd} = 26, N_{RZS} = 41.

GRUPA	% CD4 ⁺ CD28 ⁺		% CD4 ⁺ CD28 ⁻	
	Zakres min - max	mediana	Zakres min - max	mediana
ZDROWI n = 26	87,26 – 99,76	97,67	0,24 – 12,74	2,32
R.Z.S. n = 41	62,30 – 99,98	92,30	0,02 – 37,7	7,70

Tab.2. Porównanie proporcji (%) komórek CD4⁺ bez ekspresji CD28 (CD4⁺CD28⁻) i wykazujących tę ekspresję (CD4⁺CD28⁺), u osób zdrowych i pacjentów z R.Z.S.

W populacji limfocytów CD8⁺, stwierdzono nie tylko brak istotnych różnic w proporcji komórek CD8⁺CD28⁺ i CD8⁺CD28⁻ pomiędzy grupą pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, a osobami zdrowymi, ale także brak zauważalnych tendencji do zróżnicowania tych wartości. Należy podkreślić bardzo znaczny rozrzut wartości odsetkowych populacji CD28⁻, a w przypadku komórek CD8⁺ także CD28⁺ (Tabela 3, Rycina 8).

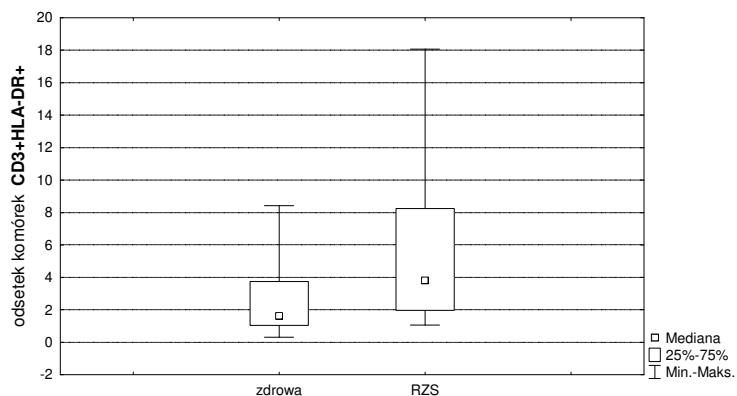


Rycina 8. Brak różnic w proporcji komórek CD8⁺ posiadających antygen powierzchniowy CD28 i komórek CD8⁺ charakteryzujących się brakiem tego antygeny w grupie osób chorych na R.Z.S. i osób zdrowych. $p = 0,66$ $N_{zdr} = 20$, $N_{RZS} = 30$.

GRUPA	% CD8 ⁺ CD28 ⁺		% CD8 ⁺ CD28 ⁻	
	Zakres min - max	mediana	Zakres min - max	mediana
ZDROWI n = 20	14,10 – 96,00	59,50	4,00 – 85,89	40,50
R.Z.S. n = 30	38,78 – 91,70	61,49	6,30 – 81,21	38,51

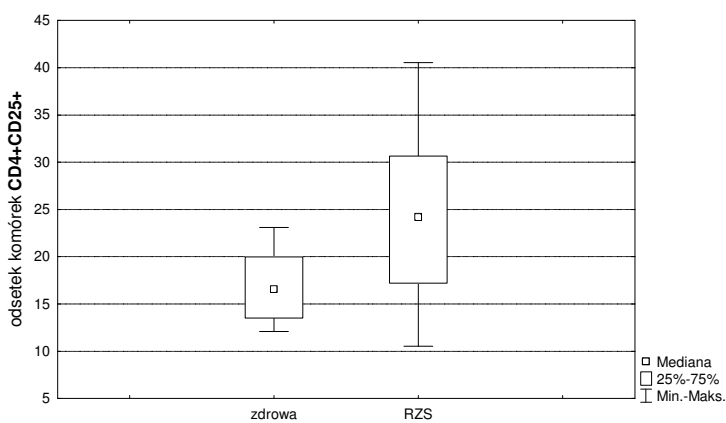
Tab. 3. Porównanie odsetka komórek CD8⁺CD28⁺ i CD8⁺CD28⁻ u osób zdrowych i chorych na R.Z.S.

Badając odsetki komórek wykazujących ekspresję antygenów aktywacyjnych stwierdzono istotnie podwyższony (dwukrotnie wyższy niż u zdrowych osób) odsetek komórek HLA-DR⁺ w obrębie populacji limfocytów CD3⁺ u osób chorych na R.Z.S. (Ryc. 9).



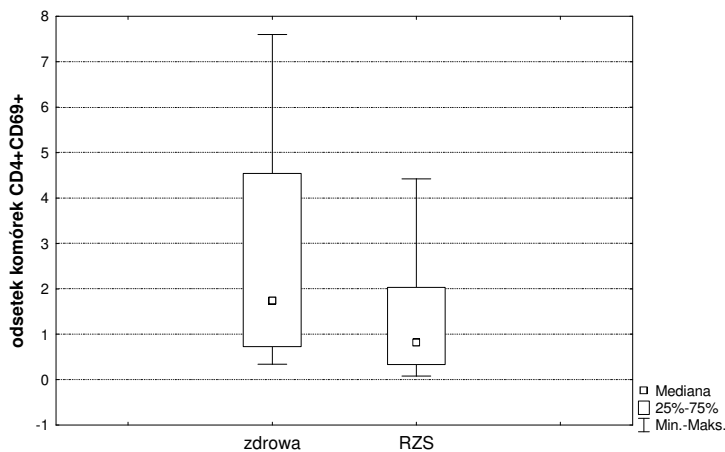
Rycina 9. Istotny wzrost odsetka komórek CD3⁺HLA-DR⁺ u osób z R.Z.S. w porównaniu do zdrowych ochotników. $p = 0,0028$, $N_{zdr} = 25$, $N_{RZS} = 40$.

Podobnie, w populacji limfocytów CD4⁺ osób chorych na R.Z.S. wykazano znamiennie podwyższony odsetek komórek CD4⁺CD25⁺ (Ryc. 10).



Rycina 10. Znamienny wzrost odsetka komórek CD4⁺CD25⁺ u osób z R.Z.S. w porównaniu do zdrowych ochotników. $p=0.017$ $N_{zdr} = 20$, $N_{RZS} = 26$.

W przypadku komórek o fenotypie $CD4^+CD69^+$ (komórki w stadium wczesnej aktywacji), zaobserwowano obniżenie odsetka tychże w grupie osób chorych w porównaniu do zdrowych, na granicy istotności (Ryc. 11).

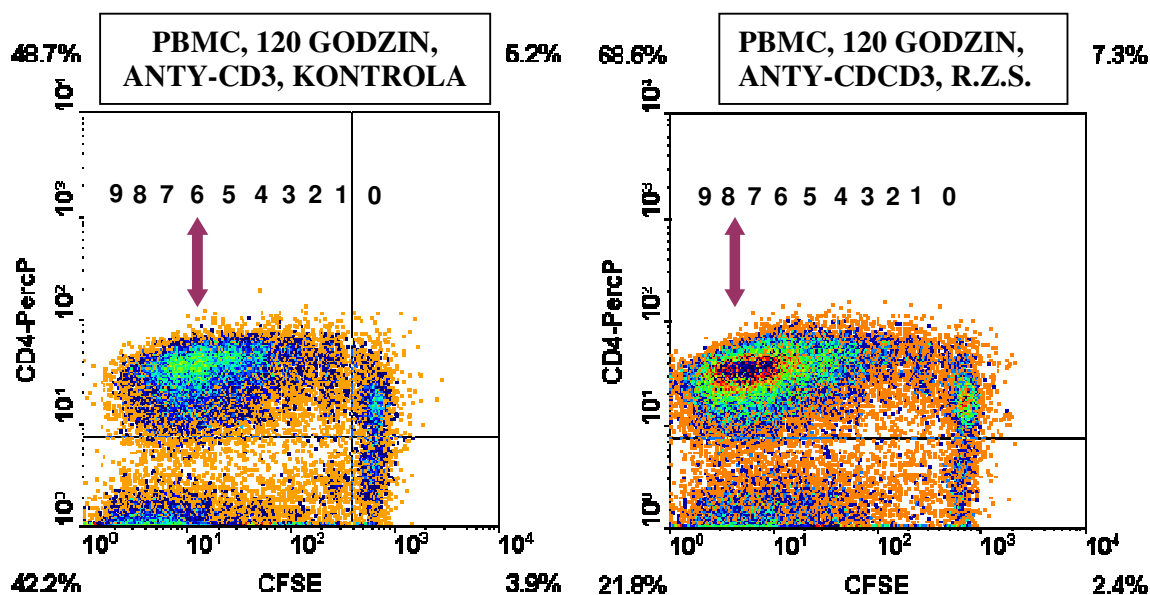


Rycina 11. Granicznie istotny spadek odsetka komórek $CD4^+/CD69^+$ u osób z R.Z.S. w porównaniu do zdrowych ochotników. $P = 0,056$, $N_{zdr} = 25$, $N_{RZS} = 25$.

4.2. Porównanie dynamiki proliferacji limfocytów $CD4^+$ u osób zdrowych i chorych na R.Z.S.

Dynamikę proliferacji komórek $CD4^+$ u osób zdrowych i pacjentów z R.Z.S., badano cytometryczną metodą oceny proliferacji DCT po 72 i 120 godzinnej stymulacji przeciwciałem anti-CD3.

Przykładowe cytogramy znakowanych CFSE i anti-CD4 komórek PBMC osoby chorej na R.Z.S. i zdrowej po 120-godzinnej stymulacji przedstawiono poniżej (Ryc. 12).

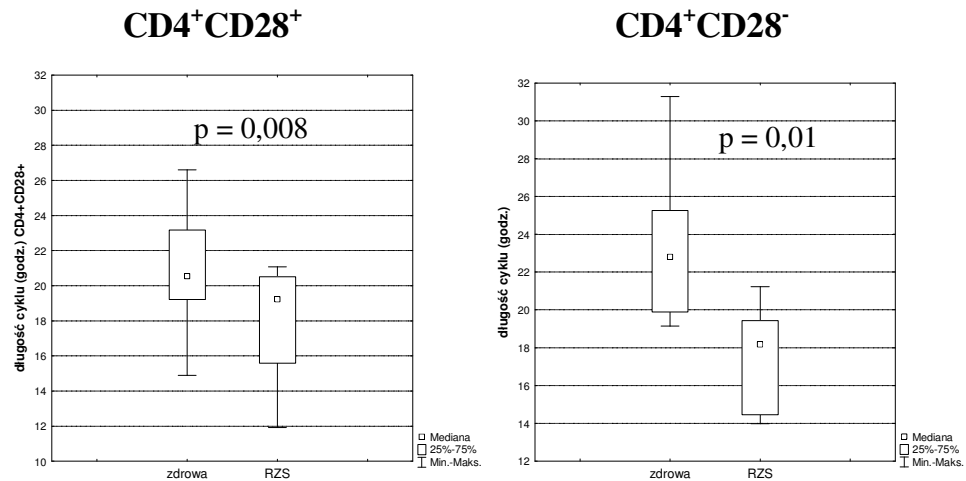


Rycina 12. Limfocyty CD4⁺ pochodzące od osoby chorej na R.Z.S dzielą się szybciej w trakcie 120 – godzinnej stymulacji anti-CD3 zgodnie z protokołem DCT niż komórki osoby zdrowej (kontrola). Liczby 0-9 oznaczają kolejne pokolenia komórek; strzałki wskazują na pokolenia o najwyższej liczebności komórek. Przykładowy cytogram.

Wykazano zmiany wartości dynamicznych parametrów proliferacji limfocytów CD4⁺ osób chorych na RZS w porównaniu do ludzi zdrowych. W szczególności zaobserwowano wydłużenie okresu pomiędzy rozpoczęciem stymulacji (kontakt komórek z immobilizowanym przeciwciałem anti-CD3) a początkiem pierwszego podziału (czasu przejścia z fazy G₀ → G₁), z jednoczesnym skróceniem czasu poszczególnych cykli komórkowych, w porównaniu do wielkości tych parametrów uzyskanych dla limfocytów pochodzących od zdrowych osób.

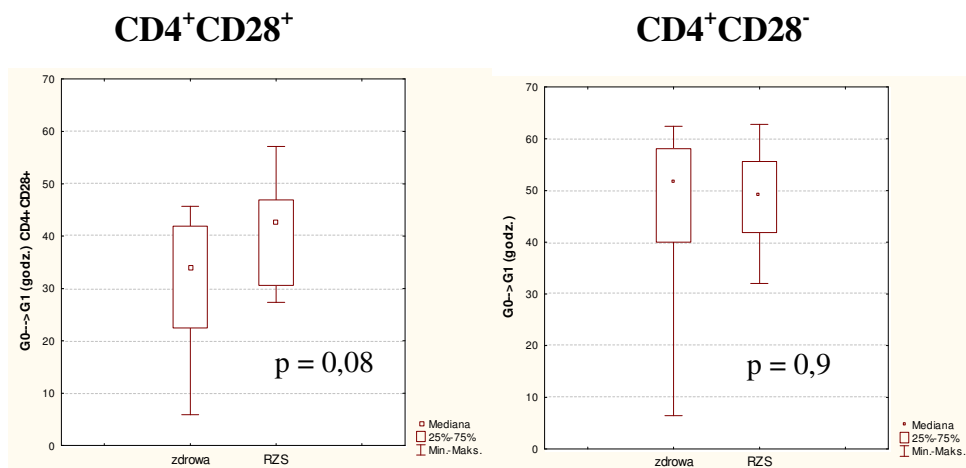
Ze względu na to, że populacja CD4⁺ od osób zdrowych i chorych charakteryzuje się różną proporcją komórek wykazujących ekspresję antygenu CD28, co mogłoby być przyczyną obserwowanych różnic w dynamice proliferacji, porównano w/w parametry podziałów limfocytów CD4⁺CD28⁺ i limfocytów CD4⁺CD28⁻, u osób zdrowych i osób chorych na R.Z.S.

Wykazano istotnie statystyczne skrócenie cyklu komórkowego zarówno dla komórek CD4⁺CD28⁺, jak i CD4⁺CD28⁻ osób chorych na R.Z.S. w porównaniu do komórek osób zdrowych (Ryc. 13).



Rycina 13. Statystycznie znaczne skrócenie cyklu komórkowego w komórkach CD4⁺CD28⁺ i CD4⁺CD28⁻ ($N_{zdr} = 24$, $N_{RZS} = 20$) u osób chorych na R.Z.S. w porównaniu do osób zdrowych; test Manna-Whitneya.

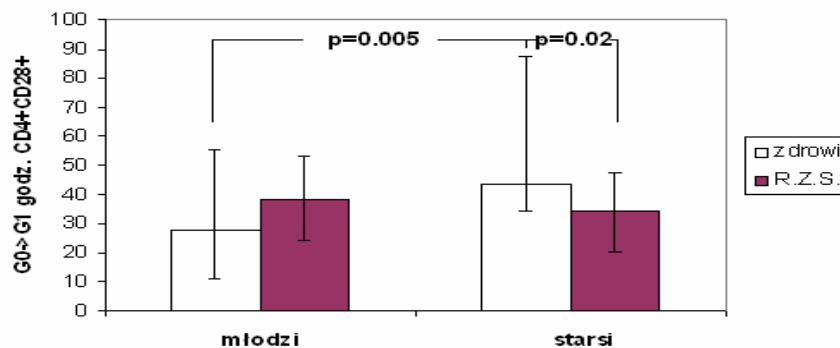
U osób chorych na R.Z.S. stwierdzono nieistotne wydłużenie czasu przejścia z fazy $G_0 \rightarrow G_1$ w komórkach CD4⁺CD28⁺ w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 14). Natomiast w komórkach CD4⁺CD28⁻ nie zauważono różnic dotyczących czasu przejścia z fazy $G_0 \rightarrow G_1$ w obu badanych grupach (Ryc. 14).



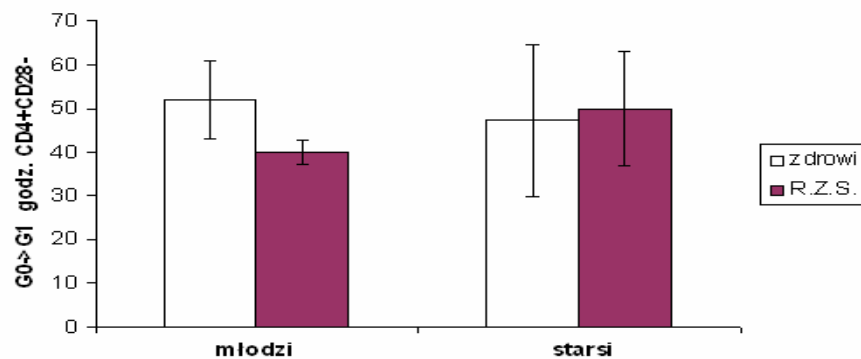
Rycina 14. Nieznacznie wydłużony czas przejścia z fazy $G_0 \rightarrow G_1$ w komórkach CD4⁺CD28⁺ osób chorych na R.Z.S. w porównaniu do komórek od osób zdrowych $N_{zdr} = 20$, $N_{RZS} = 21$; brak istotnych różnic w czasie przejścia z fazy $G_0 \rightarrow G_1$ komórkach CD4⁺CD28⁻ w grupie osób chorych na R.Z.S. i osób zdrowych, test Manna-Whitneya.

Grupę badanych osób (chorych na R.Z.S. i zdrowych) podzielono ze względu na wiek i zbadano czas przejścia z fazy G_0 do G_1 w komórkach $CD4^+CD28^+$ i $CD4^+CD28^-$. Potwierdzono, wcześniej opublikowane obserwacje (102), że komórki $CD4^+CD28^+$ osób zdrowych w podeszłym wieku mają wydłużony okres przejścia z fazy G_0 do G_1 oraz stwierdzono, że komórki młodych chorych na R.Z.S. wykazują wydłużenie czasu przejścia $G_0 \rightarrow G_1$ powodujące, że parametr ten nie różni się dla nich od obserwowanego dla limfocytów pochodzących zarówno od zdrowych osób w podeszłym wieku jak i od starszych chorych. Stymulowane in vitro komórki zdrowych osób w podeszłym wieku potrzebują istotnie więcej czasu, aby przejść z fazy G_0 do G_1 w porównaniu do limfocytów osób starszych chorujących na R.Z.S. Natomiast w przypadku komórek $CD4^+CD28^-$ nie stwierdzono istotnych różnic ze względu na wiek w obrębie obu badanych grup (Ryc. 15).

A.

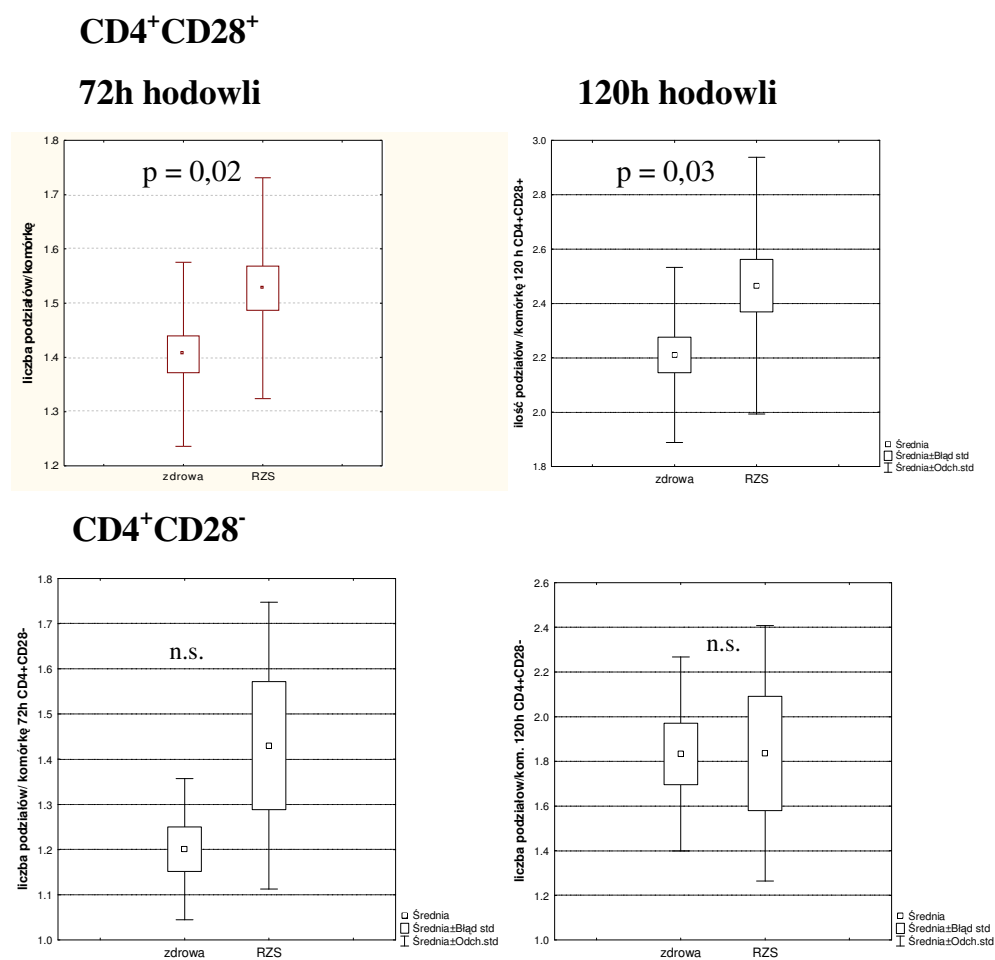


B.



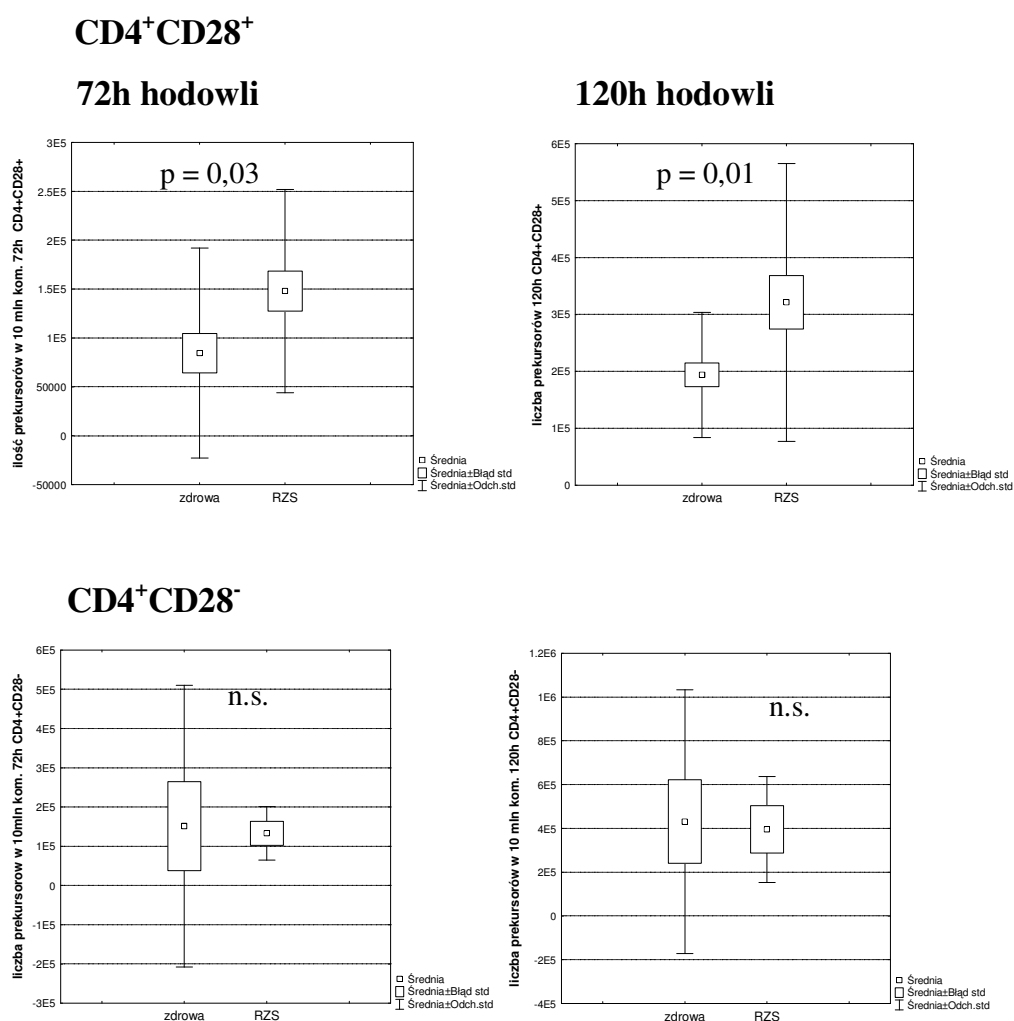
Rycina 15. A. Statystycznie istotnie wydłużony okres przejścia z fazy G_0 do fazy G_1 dla komórek $CD4^+CD28^+$ u zdrowych osób starszych w porównaniu do zdrowych młodych oraz brak takiej różnicy dla komórek osób chorych na R.Z.S. **B.** Brak istotnych statystycznie zmian dotyczących czasu przejścia z fazy G_0 do G_1 w komórkach $CD4^+CD28^-$ zarówno ze względu na rozpoznanie, jak i na wiek.

Kolejnym porównywanym parametrem proliferacji była średnia liczba podziałów, jakim ulegała dzieląca się komórka w danej populacji. Stymulowane in vitro i odpowiadające proliferacją komórki $CD4^+CD28^+$ pochodzące od chorych wykonują średnio znamienne więcej podziałów zarówno po 72-godzinnej, jak i po 120-godzinnej hodowli niż limfocyty osób zdrowych; natomiast w przypadku komórek $CD4^+CD28^-$ od osób cierpiących na R.Z.S., po 72-godzinnej hodowli stwierdzono niezamienny statystycznie wzrost liczby podziałów w porównaniu do limfocytów osób zdrowych i brak różnic po 120-godzinnej hodowli (Ryc. 16).



Rycina 16. Istotnie wyższa liczba podziałów na komórkę po 72 (test Studenta, $p = 0,02$) i 120 godzinach hodowli (test Studenta, $p = 0,03$) w komórkach $CD4^+CD28^+$ (górne panele) u osób chorych na R.Z.S. w porównaniu do osób zdrowych. Nieistotnie podwyższona liczba podziałów na komórkę po 72 godzinach hodowli w komórkach $CD4^+CD28^-$ u osób chorych na R.Z.S. i brak zmian dotyczących komórek $CD4^+CD28^-$ po 120-godzinnej hodowli pomiędzy grupą osób zdrowych a osobami chorymi na R.Z.S (n.s.); test T studenta, $N_{zd}=25$ $N_{RZS}=25$.

Równocześnie oznaczano liczbę prekursorów, czyli komórek które w czasie stymulacji podzieliły się co najmniej 1 raz, dając żywe potomne komórki. Stwierdzono, że liczba prekursorów w 1 milionie limfocytów $CD4^+$ jest istotnie wyższa po 72 i 120 godzinach hodowli wśród komórek $CD4^+ CD28^+$ u osób z R.Z.S. w porównaniu do osób zdrowych. Natomiast w populacji $CD4^+ CD28^-$ nie stwierdzono różnic w liczbie prekursorów pomiędzy osobami zdrowymi i chorymi na R.Z.S. (Ryc.17).



Rycina 17. Liczba prekursorów jest zmiennie wyższa po 72 godzinach ($p = 0,03$) i 120 godzinach stymulacji ($p = 0,01$) wśród komórek $CD4^+ CD28^+$ (górne panele) i nie różni się ($p = 0,9$, n.s.) w populacji $CD4^+ CD28^-$ (dolne panele) osób chorych na R.Z.S. w porównaniu z komórkami osób zdrowych, $N_{zdr}=25$ $N_{RZS}=25$, test T Studenta.

Stosowany do obliczania wartości dynamicznych parametrów proliferacji program Progeny™ pozwolił także na obliczenie odsetka komórek dzielących się w badanej populacji, jednak nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic wielkości tego współczynnika ani. wśród komórek CD4⁺CD28⁺ ani też CD4⁺CD28⁻ pomiędzy osobami zdrowymi i chorymi, dla obydwu czasów hodowli (72 i 120 godzin).

4.3. Analiza ekspresji badanych genów metodą PCR.

Po przeszukaniu (patrz pkt. 3.6.) bazy danych GenBank pod kątem sekwencji homologicznych do sekwencji alfa (α) w minimalnym promotorze genu CD28, wykryto trzy sekwencje o wysokiej homologii do α , zlokalizowane w lub stosunkowo blisko obszaru promotorowego genów, ulegających ekspresji w ludzkich lub mysich limfocytach T. Genami tymi są: KLOTHO, gen powierzchniowej β -glikozydazy (glukuronidazy), którego mutacja u myszy prowadzi do przedwczesnego starzenia, skrócenia czasu przeżycia, zaburzeń czynności osteoblastów i osteoklastów i limfopenii (127-133) (ekspresja genu KLOTHO w ludzkich limfocytach T nie została jak dotychczas opisana); GRAP-2, kodujący wykryte w ludzkich komórkach krwi białko adaptorowe, w limfocytach T biorące udział w transdukcji sygnałów stymulacyjnych pochodzących z kompleksu TCR-CD3 (134,135); znany i opisany wcześniej RAR β -2 (Retinoic acid receptor β 2), gen dla wyrażanego m.in. w ludzkich limfocytach T receptora dla kwasu retinowego (136) (Ryc.18).

Miejsce α : *ACGTTATATCCTGTGTGAAAT*

KLOTHO: *GCTCTATATCCTGTGTCCACA*

RAR β 2: *ATCTTTCATTCTGTGTGACAG*

GRAP-2: *TTGTGCACTCCTGTGTGTATAC*

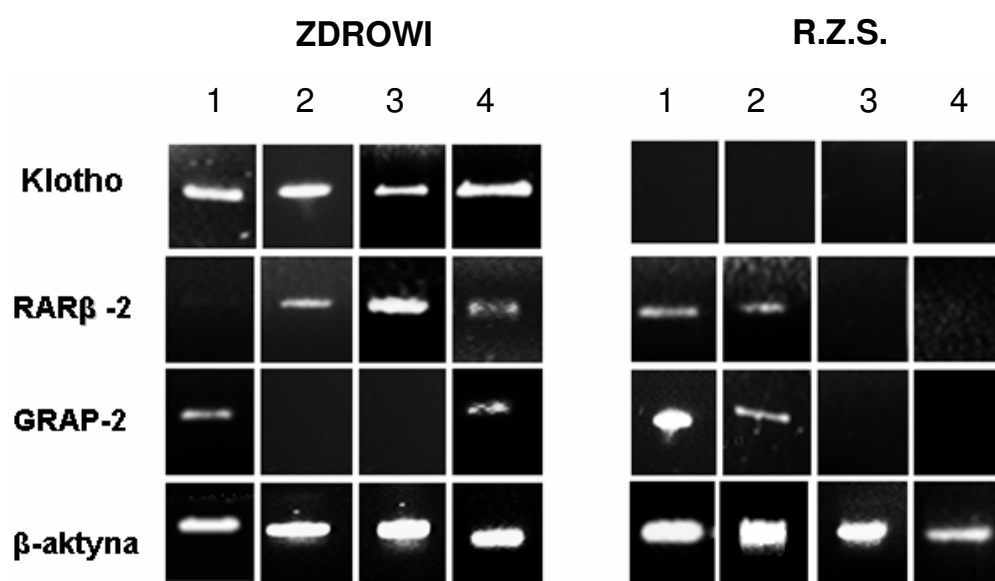
Ryc. 18 Sekwencje o wysokiej homologii do sekwencji alfa genu CD28 (Miejsce α), zlokalizowane w obszarze promotorowym genów KLOTHO, RAR β 2 i GRAP-2. Identyczne nukleotydy w porównywanych sekwencjach pogrubiono.

Poziom ekspresji badanych genów: GRAP-2, RAR β 2 i KLOTHO oceniano techniką RT-PCR w immunomagnetycznie oczyszczonych limfocytach CD4⁺, pochodzących od osób zdrowych i chorych na R.Z.S. Jako gen referencyjny stosowano β -aktynę.

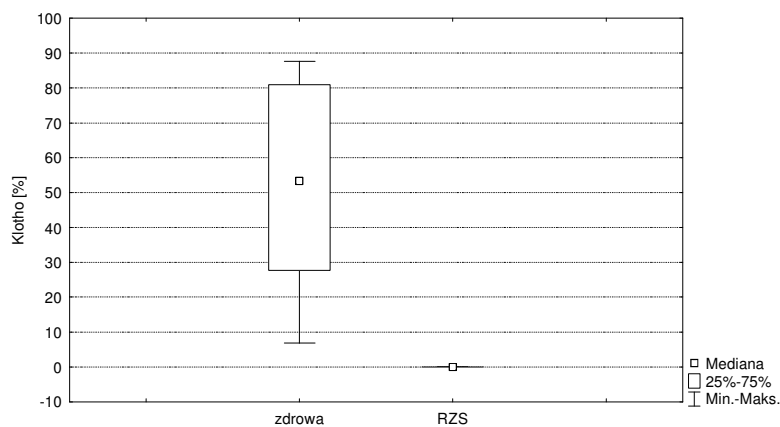
Wykazano, że ekspresja genu KLOTHO (na poziomie mRNA) jest niewykrywalna metodą RT-PCR w immunomagnetycznie izolowanych limfocytach CD4⁺ (czystość fenotypu 96% sprawdzona cytometrycznie) – nie stwierdzono jej w komórkach żadnej z 14 osób chorych na R.Z.S. niezależnie od wieku, wobec wykrycia go u wszystkich badanych (14 osób) w komórkach CD4⁺ osób zdrowych (Ryc. 19, Ryc. 20).

W limfocytach CD4⁺ pochodzących od tych samych 14 badanych osób chorych na R.Z.S ekspresja genu RAR β 2 była średnio nieco obniżona w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu w komórkach osób zdrowych, jednak obserwowane różnice nie były statystycznie istotne; brak różnic ekspresji zaobserwowano dla genu GRAP-2 (Ryc. 19, 21 22).

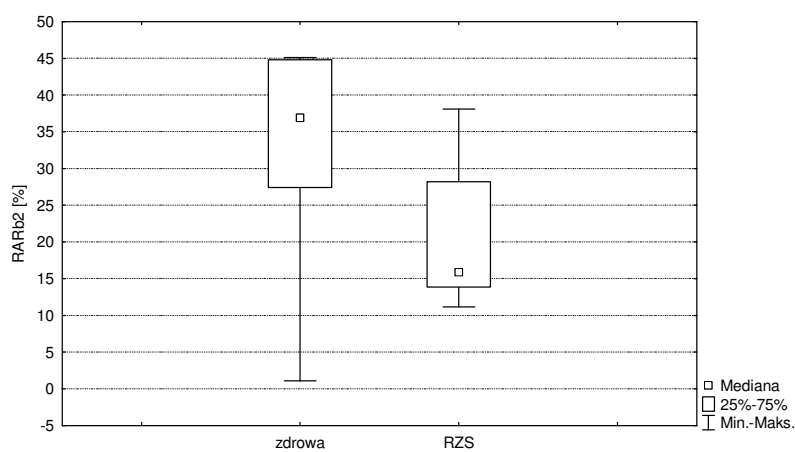
Ani czas trwania choroby, ani też poziom jej aktywności (DAS-28), ani wreszcie stosowana terapia nie miały istotnego wpływu na poziomy ekspresji badanych genów.



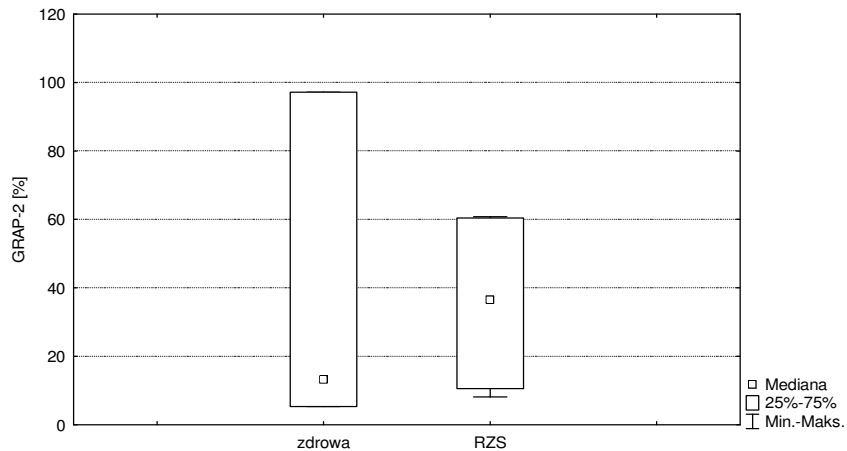
Rycina 19. Porównanie ekspresji genów KLOTHO, RAR β 2 i GRAP-2 w limfocytach 4 przykładowych osób chorych na R.Z.S. i 4 osób zdrowych. RT-PCR.



Rycina 20. Brak ekspresji genu KLOTHO u pacjentów z R.Z.S. w stosunku do zróżnicowanej ekspresji tego genu u osób zdrowych. Wielkość ekspresji KLOTHO wystandaryzowano jako odsetek poziomu ekspresji β -aktyny, ocenianego densytometrycznie i wyrażono jako medianę oraz 25 i 75 percentyle. $p = 0,0006$, $N = 14$, test Manna-Whitneya.



Rycina 21. Nieistotnie statystycznie obniżenie ekspresji genu RAR β 2 u osób z R.Z.S. w porównaniu do osób zdrowych. Wielkość ekspresji RAR β 2 wystandaryzowano jako odsetek poziomu ekspresji β -aktyny, ocenianego densytometrycznie i wyrażono jako medianę oraz 25 i 75 percentyle. $p = 0,3$, $N = 8$, test Manna-Whitneya.

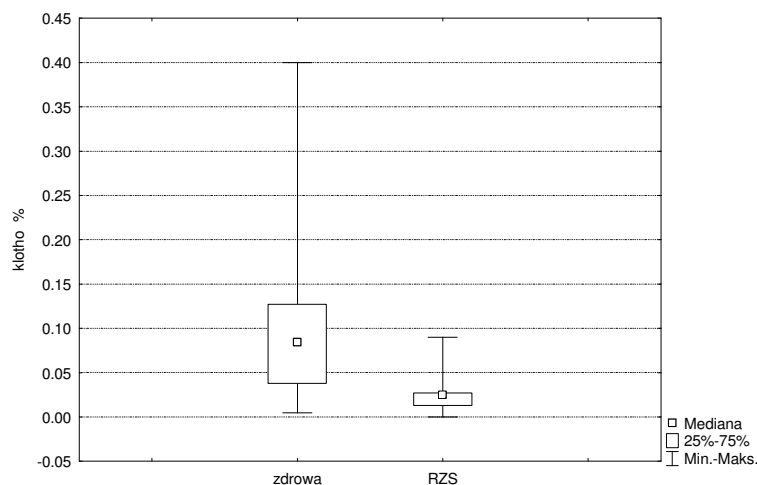


Rycina 22. Brak różnic w poziomie ekspresji genu GRAP-2 u osób chorych na R.Z.S. w zestawieniu z badaną grupą osób zdrowych. Wielkość ekspresji GRAP-2 wystandaryzowano jako odsetek poziomu ekspresji β -aktyny, ocenianego densytometrycznie i wyrażono jako medianę oraz 25 i 75 percentyle. N = 7, p = 1, test Manna-Whitneya.

4.4. Analiza ekspresji badanych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR).

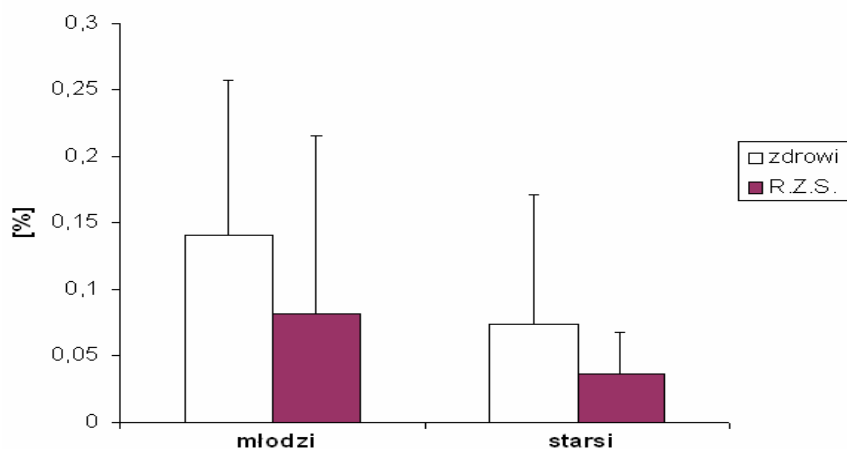
Chcąc sprawdzić, czy brak ekspresji genu KLOTHO w limfocytach CD4⁺ od chorych na R.Z.S. wykazany metodą PCR wynika z rzeczywistej inaktywacji genu, czy może poziom transkrypcji jest tak niski, że metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) jest za mało czuła, użyto PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). Ekspresja dwóch pozostałych genów (GRAP-2 i RAR β 2) w komórkach CD4⁺ od chorych i zdrowych osób została również przebadana tą metodą.

W przypadku ‘genu starzenia’ KLOTHO, czułą metodą Real Time PCR wykryto bardzo niską (w porównaniu do ekspresji genu β -aktyny) ekspresję w limfocytach CD4⁺ nawet u osób zdrowych; aktywność KLOTHO w komórkach CD4⁺ u osób chorych była jednak także widoczna, ale znamienne niższa w porównaniu do ludzi zdrowych. (Ryc. 23).



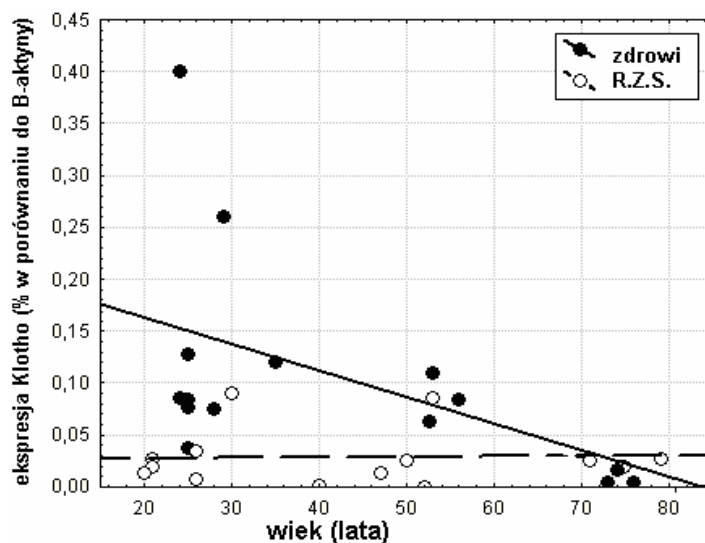
Rycina 23. Istotnie statystycznie obniżenie ekspresji genu KLOTHO wykryte metodą PCR w czasie rzeczywistym w komórkach CD4⁺ osób chorych na R.Z.S. Klotho % - wielkość ekspresji KLOTHO wyrażona jako odsetek ocenianej analogicznie ekspresji genu β-aktyny. Test Manna-Whitneya, N_{RZS} = 14, N_{zd} = 14, p = 0,036.

Stwierdzono również różnice w ekspresji genu KLOTHO w limfocytach CD4⁺ ze względu na wiek osób badanych i rozpoznanie, a w szczególności wyższy poziom ekspresji genu KLOTHO u osób zdrowych młodych w porównaniu do osób zdrowych starszych i podwyższoną ekspresję u osób chorych młodych w porównaniu do osób chorych starszych. Stwierdzono również wyższą aktywność genu dla osób młodych zdrowych w porównaniu do osób młodych chorych i osób zdrowych starszych w porównaniu do chorych starszych (Ryc. 24). Można więc stwierdzić, że wraz z wiekiem spada poziom ekspresji genu KLOTHO zarówno u osób zdrowych, jak i chorych, z tym, że u osób chorych ten spadek jest znacznie większy. Poziom ekspresji genu KLOTHO u osób młodych chorych jest zbliżony do ekspresji KLOTHO osób zdrowych starszych (Ryc. 24).



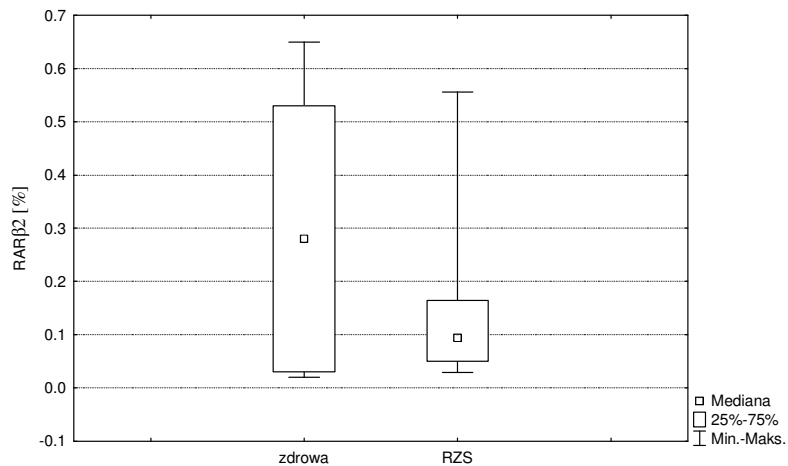
Rycina 24. Porównanie ekspresji genu KLOTHO badanej techniką PCR w czasie rzeczywistym i wyrażonej jako odsetek ekspresji genu β -aktyny (%) ze względu na wiek i rozpoznanie osób badanych (młodzi - do 35 roku życia, starsi powyżej 35 roku). $n = 14$. $p_{zdr} = 0,09$, $p_{RZS} = 0,03$, $p_{młodzi} = 0,04$, $p_{starsi} = 0,026$.

Powyższe wyniki sugerowały możliwość istnienia korelacji pomiędzy aktywnością ekspresji genu KLOTHO w limfocytach T, a wiekiem. Wykazano istnienie ujemnej korelacji, ale jedynie dla osób zdrowych, podczas u chorych na R.Z.S. nawet w bardzo młodym wieku ekspresja genu była bardzo niska (Ryc. 25).



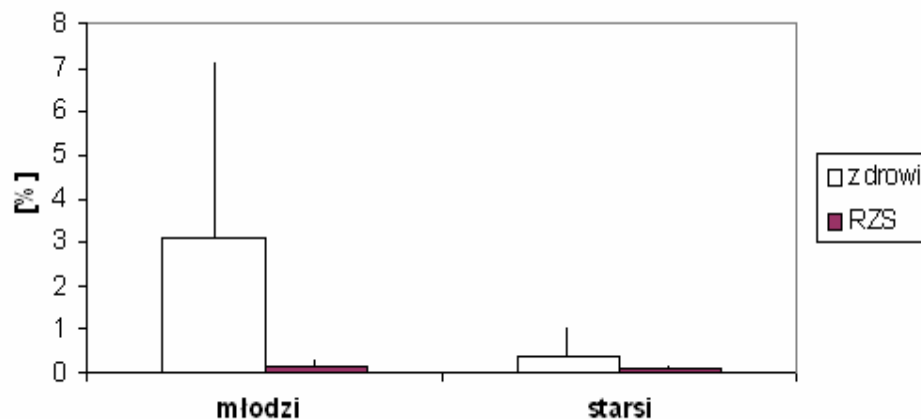
Rycina 25. Istotna, ujemna korelacja pomiędzy poziomem ekspresji genu KLOTHO a wiekiem występuje tylko dla badanych osób zdrowych. (czarne kropki, $r = -0.51$, $p = 0.025$), dla R.Z.S. (białe kropki, $r = 0.05$, $p = 0.87$).

W przypadku genu RAR β 2, wyniki otrzymane techniką PCR czasu rzeczywistego były zgodne z uzyskanymi metodą RT-PCR. Wykazano niezamiennie niższą ekspresję RAR β 2 w limfocytach CD4⁺ u osób z R.Z.S. w stosunku do osób zdrowych (Ryc. 26).



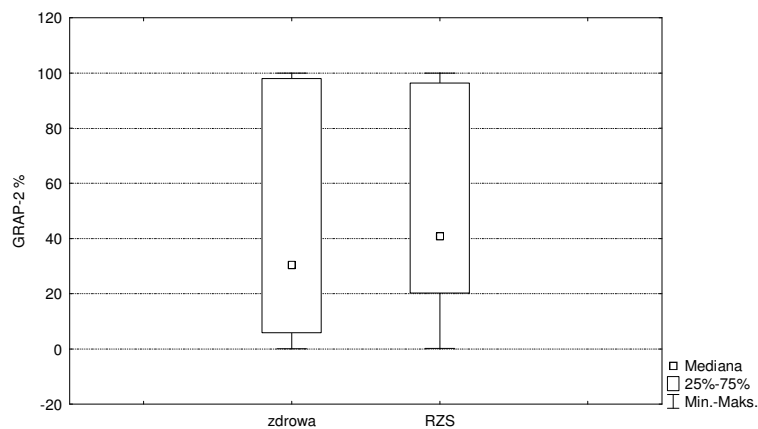
Rycina 26. Niezamiennie niższa ekspresja genu RAR β 2 w komórkach CD4⁺ u chorych ze zdiagnozowanym R.Z.S. w porównaniu do osób zdrowych, wykryta techniką Real Time PCR; $p = 0,35$ $N_{zdr} = 10$ $N_{RZS} = 13$, test Manna-Whitneya.

Ze względu na znaczny rozrzut wyników dokonano ich powtórnej analizy dzieląc badanych na dwie grupy wiekowe. Zaobserwowano różnicę (istotnie statystyczne) w ekspresji RAR β 2 pomiędzy grupą osób zdrowych młodych i zdrowych starszych i brak różnic w obrębie grupy chorych ze względu na wiek (Ryc. 27).

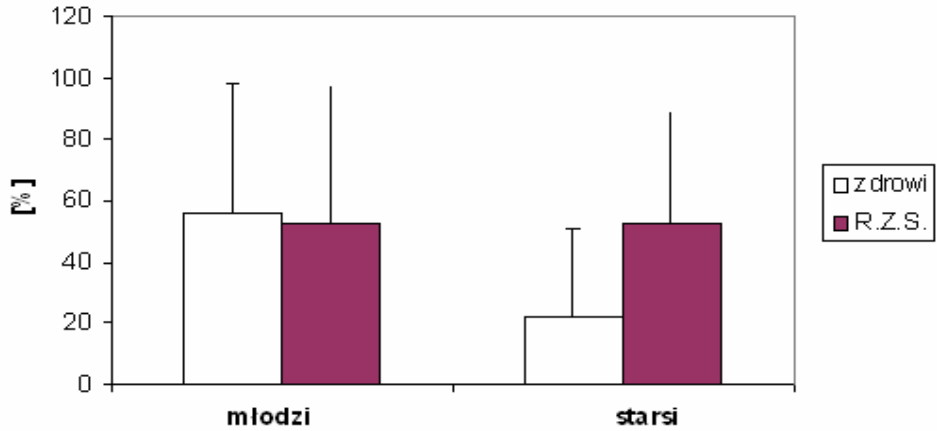


Rycina 27. Porównanie ekspresji genu RAR β 2 (wyrażonej jako % ekspresji β -aktyny, Real Time PCR) względem zależności od wieku i rozpoznania w obrębie grup badanych. $n = 12$, $p_{zdr} = 0,03$, $p_{młodzi} = 0,06$.

Badania techniką PCR czasu rzeczywistego ekspresji genu GRAP-2 w limfocytach CD4⁺ nie wykazały różnic w obrębie grup badanych, chorych na R.Z.S. i zdrowych. Wyniki były wysoce heterogenne (Ryc. 28). Po podziale na grupy wiekowe, zaobserwowano jedynie obniżenie ekspresji genu GRAP-2 w komórkach CD4⁺ ludzi zdrowych w podeszłym wieku w porównaniu do komórek młodych osób zdrowych (Ryc. 29).

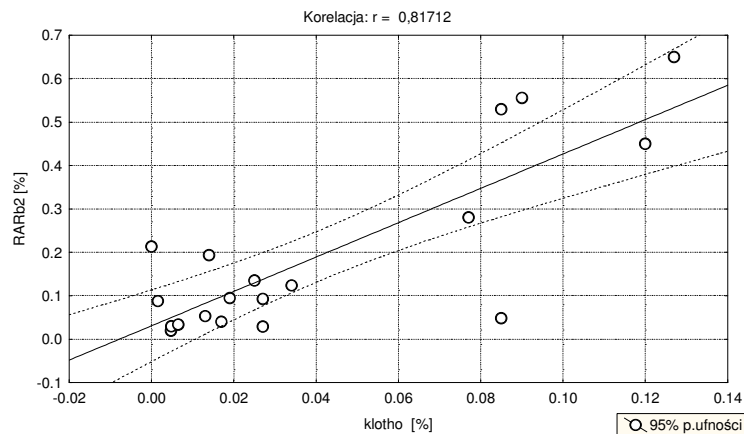


Rycina 28. Brak różnic w ekspresji genu GRAP-2 w limfocytach CD4⁺ u osób chorych na R.Z.S. w porównaniu ze zdrowymi osobami. Test Manna-Whitneya, $p = 0,49$, $N = 12$.



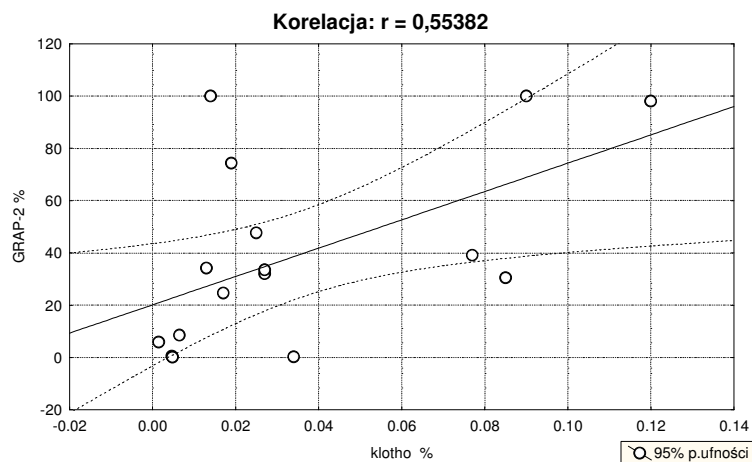
Rycina 29. Brak różnic w poziomie ekspresji genu GRAP-2 ze względu na wiek, jedynie obserwowalne obniżenie nieistotne ekspresji genu GRAP-2 w komórkach CD4⁺ ludzi zdrowych w podeszłym wieku w porównaniu do komórek młodych osób zdrowych. $p_{zdr}=0,07$.

Skoro zaobserwowano znaczące zmiany poziomów ekspresji dotyczące genów KLOTHO i RARβ2, próbowano znaleźć zależność pomiędzy tymi dwoma. Okazało się, że istnieje istotna dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją genu KLOTHO i RARβ2 w limfocytach CD4⁺ (Ryc. 30)



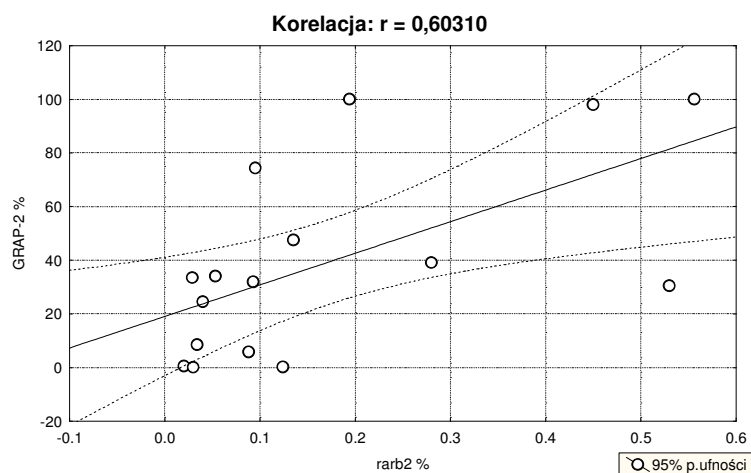
Rycina 30. Korelacja między ekspresją genu KLOTHO a RARβ2 z komórek CD4⁺ dla osób chorych na R.Z.S. i zdrowych. $p = 0,00002$, $n=19$

Stwierdzono także, że poziom ekspresji genu GRAP-2 dodatnio koreluje z ekspresją genu KLOTHO (Ryc. 31)



Rycina 31. Istotna korelacja między ekspresją genu GRAP-2, a genu KLOTHO w limfocytach CD4⁺.
 $p=0,009$, $n=14$.

Zaobserwowano również dodatnią korelację (ale o mniejszym poziomie statystycznej istotności) pomiędzy poziomem ekspresji genu GRAP-2, a RARβ2 (Ryc. 32)



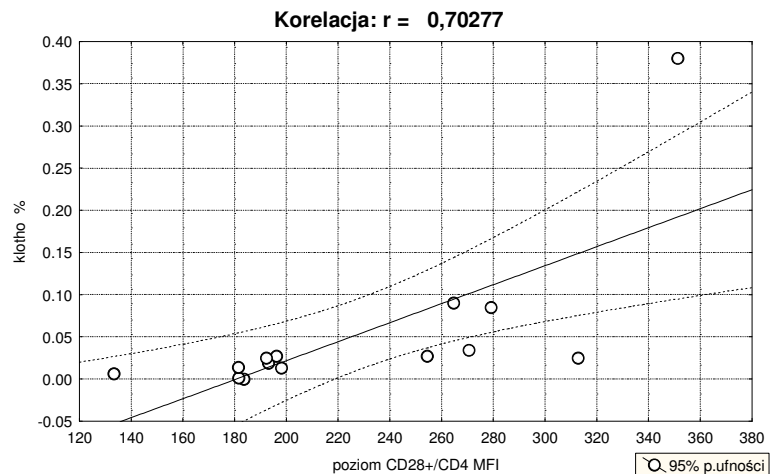
Rycina 32. Korelacja między ekspresją genu RARβ2 a ekspresją genu GRAP-2 w limfocytach CD4⁺.
 $p=0,01$, $n=16$.

Stwierdzenie powyższych zależności, sugerowało możliwość wspólnego czynnika, od którego zależy ekspresja badanych genów.

Ponieważ obniżenie ekspresji genu KLOTHO (zmniejszenie ekspresji w komórkach CD4⁺ u osób starszych i cierpiących na R.Z.S.), jest analogiczne do zmniejszenia ekspresji cząsteczki CD28 obserwowanego w tych samych grupach,

postanowiono sprawdzić czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją genu KLOTTHO i CD28 w limfocytach CD4⁺.

Zaobserwowano znamienne, dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji CD28 ocenianej cytometrycznie jako średnia fluorescencja znakowanych komórek CD4⁺/CD28⁺, a ekspresją genu KLOTTHO u osób chorych na R.Z.S. (Ryc. 33). Nie stwierdzono takiej zależności w przypadku komórek osób zdrowych, prawdopodobnie ze względu na niewielkie zmiany w poziomie ekspresji CD28 w tej grupie badanej.

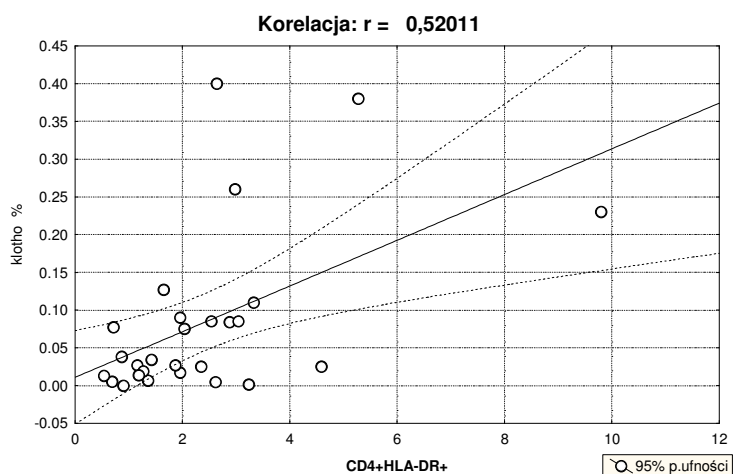


Rycina 33. Korelacja pomiędzy ekspresją (średnią fluorescencją) CD28⁺ na komórkach CD4⁺, a ekspresją genu KLOTTHO u chorych na R.Z.S.. $p=0,005$, $n=14$

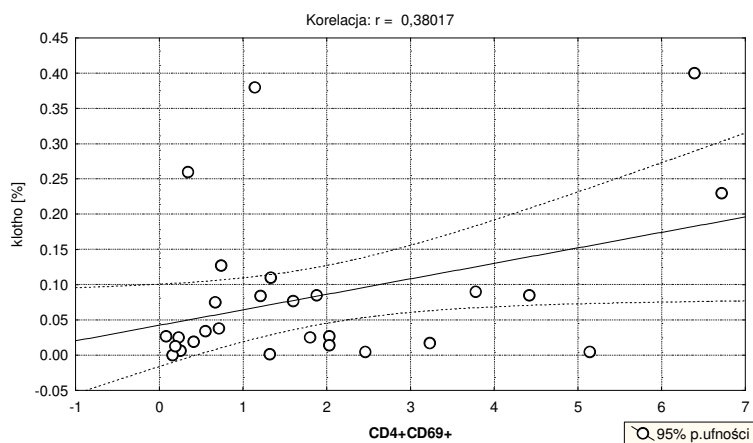
4.5. Korelacja ekspresji genu KLOTTHO i antygenów aktywacyjnych.

Moje wcześniejsze wyniki (patrz ryciny 9, 10, 11) wykazują znamienne różnice w poziomie antygenów aktywacyjnych u osób zdrowych i chorych na R.Z.S. Postanowiono więc sprawdzić, czy istnieje jakakolwiek zależność, pomiędzy ekspresją tych antygenów, a ekspresją genu KLOTTHO, który, jak niedawno wykazano, może mieć wpływ na aktywność proliferacyjną poprzez interferencję z białkami p21/p53 (137).

Stwierdzono istnienie dodatniej, statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy ekspresją genu KLOTHO, a odsetkiem limfocytów CD4⁺ HLA-DR⁺ (Ryc. 34) a także odsetkiem komórek CD4⁺CD69⁺ (Ryc. 35).

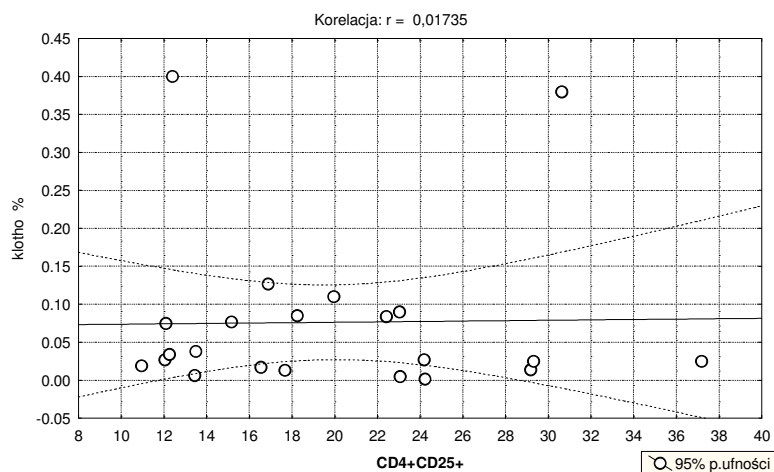


Rycina 34. Istotna dodatnia korelacja między ekspresją genu KLOTHO i odsetkiem komórek CD4⁺HLA-DR⁺. $p = 0,0054$, $n=24$.



Rycina 35. Dodatnia korelacja między ekspresją KLOTHO a odsetkiem limfocytów CD4⁺ z wczesnym antygenem aktywacyjnym CD69⁺ na powierzchni. $p = 0,05$, $n = 27$.

Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy ekspresją genu KLOTHO, a antygenem aktywacyjnym CD25 (Ryc. 36).

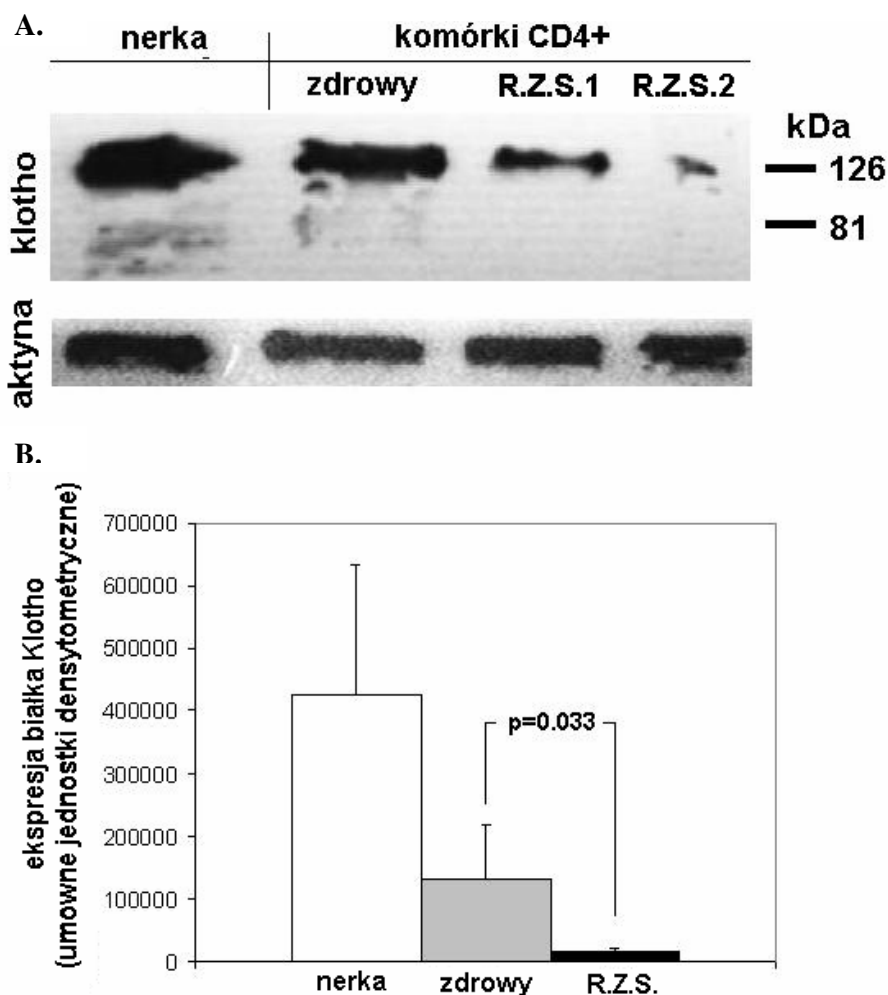


Rycina 36. Brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genu KLOTHO a odsetkiem komórek CD4⁺CD25⁺. n = 22, p = 0,9.

4.6. Analiza ekspresji białka Klotho metodą Western Blotting.

Wiedząc, że istnieje duża różnica pomiędzy ekspresją genu KLOTHO pomiędzy grupą chorych na R.Z.S. a grupą zdrowych, ocenianą na poziomie mRNA, postanowiono sprawdzić, czy istnieją różnice w poziomie białka Klotho pomiędzy tymi grupami.

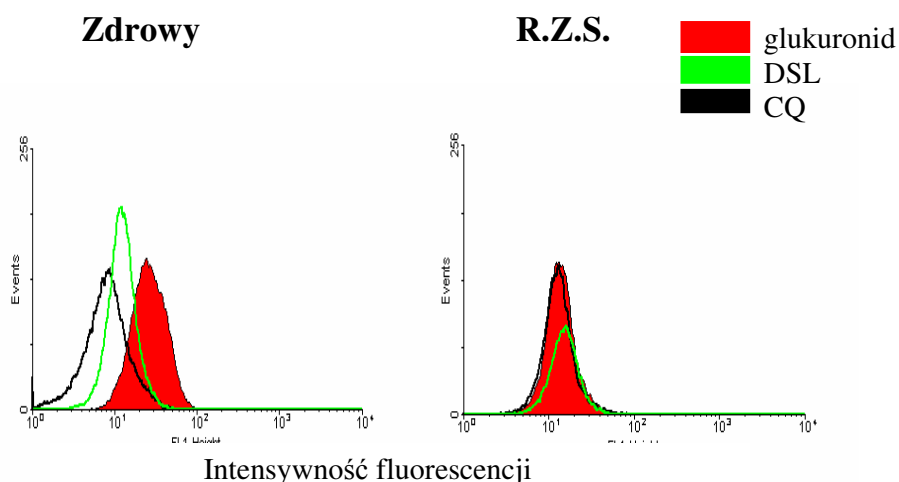
Wykazano (metodą Western blot) obecność formy błonowej białka Klotho, zarówno w limfocytach CD4⁺ osób cierpiących na R.Z.S., w komórkach osób zdrowych, jak i w kontroli pozytywnej (lizat z tkanki nerki). Ilość wykrytego białka Klotho w limfocytach CD4⁺ u osób zdrowych była niska (5-10 krotnie niższa niż z analogicznej ilości całkowitego białka pochodzącego z homogenatu ludzkiej nerki). W komórkach CD4⁺ osób chorych ilość białka Klotho była znacząco niższa w porównaniu do limfocytów CD4⁺ osób zdrowych. Co interesujące, zarówno w materiale z ludzkiej tkanki nerki i limfocytów CD4⁺ osób zdrowych stwierdzono pojawienie się drugiego prążka o masie około 58 kDa; prążek ten odzwierciedla prawdopodobnie formę sekrecyjną białka Klotho (138). Formy tej nie zaobserwowano w próbkach pochodzących od osób chorych (Ryc.37).



Rycina 37. Znaczący spadek ilości białka Klotho pochodzącego z limfocytów CD4⁺ od pacjentów z R.Z.S. w porównaniu do ludzi zdrowych. **A.** reprezentatywne wyniki ilości białka Klotho i aktyny, w komórkach CD4⁺ pochodzących od przykładowej osoby zdrowej i 2 przykładowych cierpiących na R.Z.S. Jako kontrolę pozytywną zastosowano ilość białka Klotho z tkanki nerki. **B.** Analiza statystyczna. Ilość białka Klotho w 1 milionie komórek CD4⁺ przedstawiono w umownych jednostkach densytometrycznych. Znaczący spadek ekspresji białka KLOTHO w komórkach chorych na R.Z.S. w porównaniu z osobami zdrowymi (średnia + SD; p =0,033, test T Studenta dla danych niezależnych, n = 4).

4.7. Porównanie aktywności β — glukuronidazy przypisywanej KLOTHO, w komórkach CD4⁺ od osób zdrowych i chorych na R.Z.S.

Ostatnio wykazano, że KLOTHO może wykazywać enzymatyczną aktywność β -glukuronidazy (126). Technika cytometrii przepływowej wykazała znamienne spadki całkowitej aktywności β -glukuronidazy i aktywności β -glukuronidazy KLOTHO, w limfocytach CD4⁺ pacjentów z R.Z.S i spadek tych aktywności powiązany z podeszłym wiekiem (Ryc. 38).

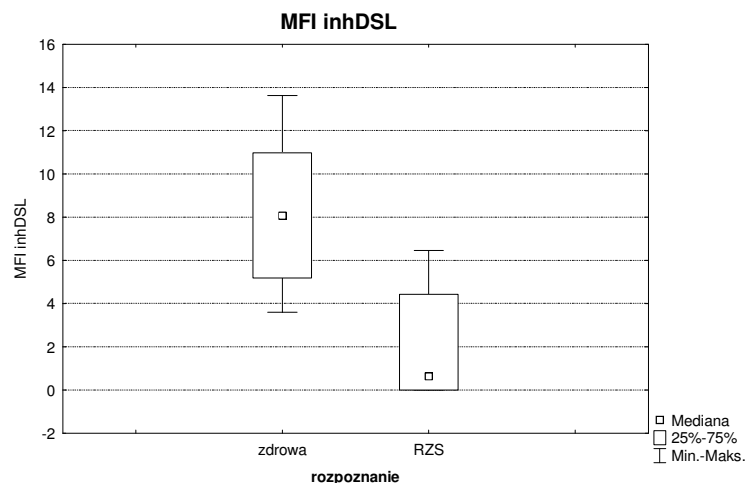


Rycina 38. Zmiany aktywności enzymatycznej przy braku i w obecności inhibitorów beta-glukuronidaz, chlorochiny (CQ) i 1,4 disacharolaktonu (DSL) u młodej osoby zdrowej i u młodej osoby ze zdiagnozowanym R.Z.S. Reprezentatywne histogramy analizy cytometrii przepływowej całkowitej (chlorochino-wrażliwa (CQ)) i specyficznej dla KLOTHO (disacharolaktono-wrażliwa (DSL)) aktywności β -glukuronidazy uzyskanej z oczyszczonych limfocytów CD4⁺ od osób zdrowych i chorych na R.Z.S. glukuronid – intensywność fluorescencji substratu dla enzymu niczym nie traktowanych komórek CD4⁺; CQ – fluorescencja komórek traktowanych 0,3mM chlorochiną; DSL fluorescencja komórek traktowanych 5mM disacharolaktonem.

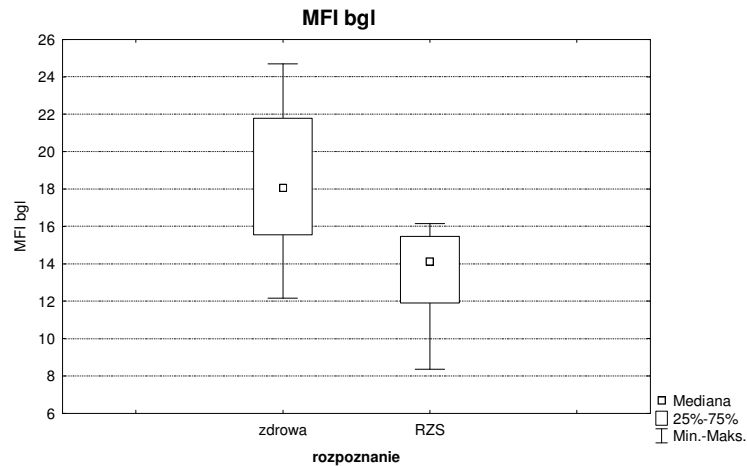
Porównano całkowite (wrażliwe na chlorochinę) i Klotho-zależne (wrażliwe na disacharolakton) aktywności β -glukuronidazy (124,126) w oczyszczonych

limfocytach CD4⁺ osób chorych na R.Z.S. i osób zdrowych. Zauważono, że obie aktywności β -glukuronidazy, całkowita i Klotho-zależna, są istotnie obniżone w limfocytach CD4⁺ osób chorych na R.Z.S., w porównaniu do komórek CD4⁺ osób zdrowych. (Ryc. 39, 40) Proporcja tego ostatniego (aktywność β -glukuronidazy potencjalnie związanej z KLOTHO) w całkowitej aktywności enzymu w limfocytach CD4⁺ była również istotnie obniżona w komórkach pacjentów z R.Z.S. Aktywność β -glukuronidazy przypisywana KLOTHO znacząco koreluje z ilością produktu mRNA genu KLOTHO.

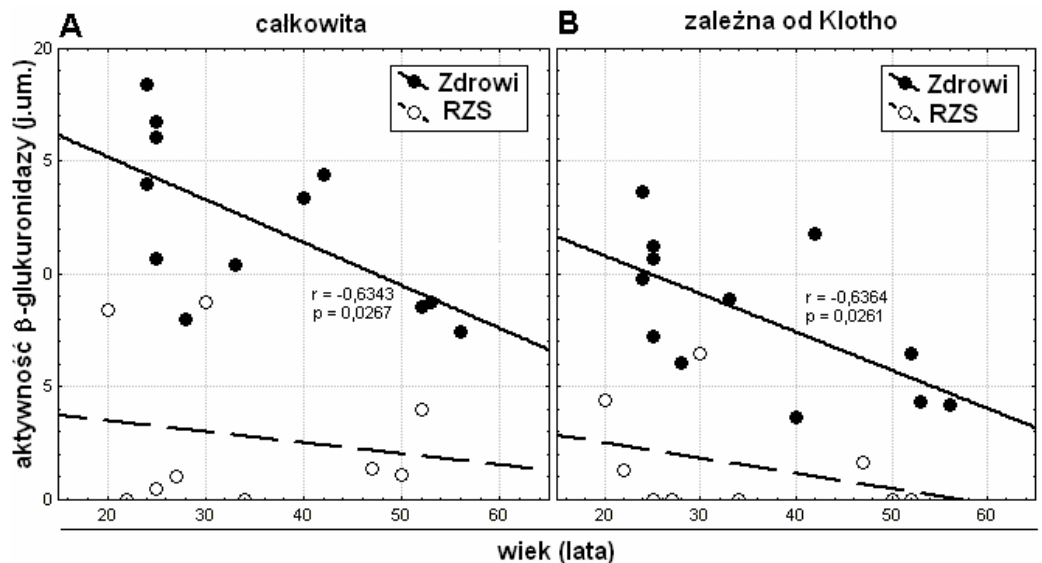
Dodatkowo, obie aktywności, całkowita i aktywność β glukuronidazy przypisywana KLOTHO, istotnie statystycznie, ujemnie korelują z wiekiem, ale tylko w obrębie grupy zdrowych osób; brak takiej korelacji w komórkach pacjentów z R.Z.S. (Ryc. 41)



Rycina 39. Istotnie statystycznie obniżenie aktywności enzymatycznej β -glukuronidazy zależnej od Klotho (hamowanej 1,4-disacharolaktonem), w limfocytach CD4⁺ osób chorych na R.Z.S. (test Manna-Whitneya, $p = 0,0007$, $n=12$).

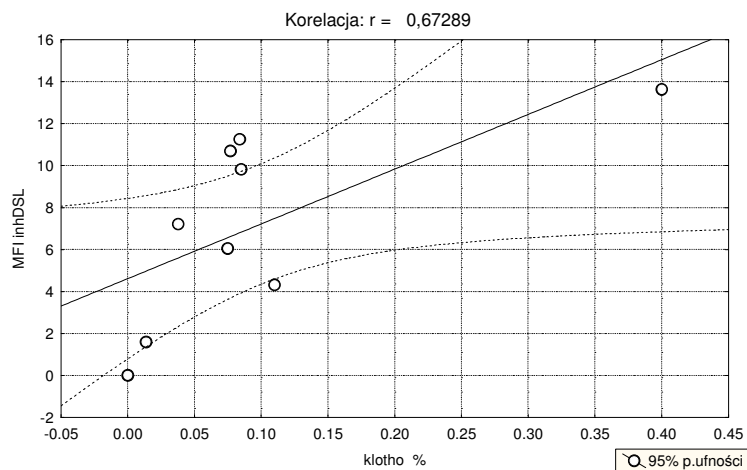


Rycina 40. Znamiennej statystycznie spadek całkowitej aktywności enzymów z grupy β -glukuronidaz hamowanej chlorochiną stwierdzony u osób chorych na R.Z.S. (test Manna-Whitneya, $p = 0,002$, $n=12$).



Rycina 41. . Ujemna korelacja całkowitej i zależnej od Klotho aktywności β -glukuronidazy w limfocytach $CD4^+$ z wiekiem w obrębie grupy osób zdrowych. Brak istotnej korelacji dla chorych na R.Z.S.

Wreszcie, wykazano także istnienie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genu KLOTHO a aktywnością KLOTHO, jako β -glukuronidazy w obu grupach (zdrowych i chorych)(Ryc. 42).



Rycina 42. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją KLOTHO na poziomie mRNA, a aktywnością KLOTHO jako β -glukuronidazy. $n = 9$, $p = 0,04$.

Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji pomiędzy aktywnością KLOTHO, jako β -glukuronidazy w komórkach $CD4^+$, a poziomem ekspresji $CD28^+$, zarówno w grupie zdrowych, jak i chorych osób.

5. DYSKUSJA

Dotychczasowe prace, w których badano zdolność limfocytów T pacjentów chorych na R.Z.S. do proliferacji *in vitro* wskazują na obniżenie tej zdolności. Badania te, wykonywano zwykle za pomocą oceny wbudowania 3H-tymidyny. Równocześnie jednak w przebiegu tej choroby zdarzają się okresy nasilonej aktywności proliferacyjnej limfocytów, manifestujące się jako powiększenie węzłów chłonnych (limfadenopatia).

W niniejszej pracy, w której do oceny parametrów proliferacji stosowałam cytometryczną technikę DCT, wykazałam przede wszystkim, że podziały mitotyczne stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 *in vitro* limfocytów CD4⁺ osób cierpiących na R.Z.S. rozpoczynają się znamienne później w porównaniu do komórek osób zdrowych, co wynika z wydłużenia czasu od stymulacji do wejścia komórek w cykl podziałowy ($G_0 \rightarrow G_1$) i może być odpowiedzialne za opisywaną wcześniej upośledzoną zdolność komórek do wbudowania 3H-tymidyny w próbie proliferacyjnej limfocytów od osób z R.Z.S. zwykle ocenianą po 48 godzinach stymulacji, gdy – według moich badań – wiele komórek T osób chorych znajduje się jeszcze w fazie G_0 (rozdz.1.5.) **(99,139-141)**. Wykazałam jednak również, że czas trwania pojedynczego cyklu podziałowego jest znamienne krótszy, natomiast średnia liczba podziałów na komórkę dzielącą się wyższa w limfocytach CD4⁺ u chorych, niż w limfocytach zdrowych osób.

Dzięki zastosowaniu metody DCT wykazano, że w warunkach optymalnej stymulacji *in vitro* immobilizowanym anti-CD3 tylko stosunkowo niewielki odsetek dojrzałych limfocytów od osób zdrowych ulega stymulacji, kończącej się podziałem. Spory odsetek limfocytów dzieli się tylko raz, natomiast nieliczne, zaledwie ok. 10%, powyżej pięciu razy w trakcie testu trwającego do 120 godzin. Zatrzymanie podziałów u większości stymulowanych limfocytów spowodowane jest inicjacją programowanej śmierci (AICD) **(142)**.

Zmiany te, dotyczące kinetyki proliferacji limfocytów CD4⁺ wykazane u osób z R.Z.S. odnoszą się przede wszystkim do komórek CD4⁺CD28⁺. Wiadomo, że u chorych na R.Z.S. nie tylko proporcja tych komórek ulega pewnemu obniżeniu, ale

przede wszystkim obniża się poziom ekspresji CD28 na tych limfocytach CD4⁺, na których jest on jeszcze wykrywalny (**18,31,32**) (co potwierdzają także moje prezentowane wyżej wyniki).

Porównując grupę osób młodych, chorych na R.Z.S. i grupę osób zdrowych w podeszłym wieku, stwierdziłam, że dynamika podziałów limfocytów CD4⁺ jest w nich podobna, co może świadczyć o przyspieszonym starzeniu się komórek układu immunologicznego u chorych. Uprzednio dowiedziono, że cykl komórkowy limfocytów CD4⁺ pochodzących od zdrowych w podeszłym wieku ulega znacznemu skróceniu (około 18 godzin/podział w przypadku komórek od zdrowych, młodych osób w porównaniu do około 12 godzin/podział limfocytach osób w podeszłym wieku). Badania wskazują, że pod względem średniej długości telomerów w limfocytach CD4⁺, liczby TRECs, jaki i dynamiki proliferacji limfocytów CD4⁺ osoba z R.Z.S. w wieku 20 lat ma parametry porównywalne do osób zdrowych w wieku 50-60 lat (**2, 3,74, 18, 80, 143**).

Wspomniana wyżej mniejsza liczba cząsteczek CD28 na powierzchni limfocytu CD4⁺ jest możliwą przyczyną dłuższego przejścia z fazy G₀ do fazy G₁, co zgodnie z teorią sumowania się sygnałów aktywacyjnych (**144, 145**) może doprowadzić do wolniejszej aktywacji. Zgodnie z wiedzą na temat znaczącej roli kostymulacji przy udziale cząsteczki CD28 we właściwym rozpoznawaniu i aktywacji limfocytów T, wydaje się, że obniżenie jej ekspresji na limfocycie T przed sygnałem aktywującym, może doprowadzić do wadliwego procesu aktywacji.

Istnieją prace, w których stwierdzono brak różnic w dynamice proliferacji limfocytów T krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowanym R.Z.S. i osób zdrowych (**146**). Przyczyną może być kilka czynników, jedną z możliwości jest różny poziom ekspresji CD28 na powierzchni badanych limfocytów, co wydaje się mieć wpływ na proliferację. Ponadto, jak wspomniałam wyżej, dotychczasowe badania proliferacji limfocytów T wykonywane były metodą wbudowania radioaktywnej tymidyny i oceniały przede wszystkim syntezę DNA (**99-101**), albo metodą wbudowania Br-dU i mierzyły odsetek proliferujących komórek w całej puli badanych komórek (**146**). Istotne jest również to, że prowadzone dotąd badania nad proliferacją limfocytów in vitro, dotyczyły czasu do 72 godzin, co mogło dawać zmniejszenie syntezy DNA dla limfocytów T od pacjentów z R.Z.S., biorąc pod uwagę długość trwania fazy G₀→G₁. Jak udowodniłam, limfocyty CD4⁺ pochodzące

od pacjentów z R.Z.S., mogą rozpoczynać cykl komórkowy po 2 dniach, w porównaniu do rozpoczętego cyklu u zdrowych 1-2 dni wcześniej.

W badanych przeze mnie grupach, zarówno pacjentów, jak i zdrowych, zaobserwowałam zmiany dotyczące proporcji limfocytów $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD28^-$ (niezamienne statystycznie zmniejszenie odsetka komórek $CD4^+CD28^+$ na powierzchni limfocytów $CD4^+$ u chorych na R.Z.S., w porównaniu do komórek $CD4^+$ od osób zdrowych). W żadnej z powyższych grup nie stwierdziłam istotnych różnic w odsetkach komórek $CD4^+CD28^-$, porównując ten odsetek w stosunku do wszystkich limfocytów krwi obwodowej, jak i wobec komórek $CD4^+$. Wcześniej opisywano gromadzenie się komórek $CD4^+CD28^-$ we krwi osób chorych na R.Z.S. (25). Część autorów zajmujących się tym tematem, nie zgadza się jednak z występowaniem zwiększonej proporcji komórek $CD4^+$ bez ekspresji CD28 we krwi obwodowej pacjentów z R.Z.S. (100). Ten rozdzźwięk pomiędzy autorami może wynikać z wyboru różnych pacjentów do badań. Pacjenci nie stanowią jednorodnej grupy, zarówno pod względem aktywności choroby, jej klinicznego zaawansowania czy czasu trwania, co może mieć znaczenie dla proporcji limfocytów $CD4^+$ z ekspresją, czy bez ekspresji CD28.

W reumatoidalnym zapaleniu stawów, przynajmniej w niektórych okresach tej choroby dochodzi do nadmiernej aktywacji limfocytów. Z opublikowanych danych wiadomo, że w wyniku aktywacji klonów limfocytów T przez stymulację przeciwciałem anti-CD3 in vitro, może dochodzić do obniżenia powierzchniowej ekspresji cząsteczki CD28 (58). Wiadomo również, że aktywacja limfocytów T przy udziale przeciwciała anti-CD3 wywołuje obniżenie ekspresji cząsteczki CD3 (37). Niedawno również opisano, że utrata części cząsteczek CD4 przez stymulowane limfocyty T, jest zależna od aktywacji (147).

Obok różnic w odsetku komórek $CD4^+$ posiadających antygen CD28, wykazałam istotny statystycznie wzrost odsetka komórek $CD4^+/HLA-DR^+$ i $CD4^+CD25^+$ u osób z R.Z.S. w porównaniu do zdrowych ochotników, co wskazuje na toczący się proces aktywacji tych komórek.

W tej ostatniej subpopulacji limfocytów $CD4^+$ mogą się znajdować komórki regulatorowe $CD4^+CD25^+$.

Dane na temat istnienia regulatorowych komórek $CD4^+CD25^+$ we krwi obwodowej uzyskano początkowo u zwierząt doświadczalnych na modelach chorób

autoimmunizacyjnych, gdzie wykazano, że zmniejszona liczba tych komórek we krwi obwodowej, powoduje przyspieszenie pojawienia się objawów, natomiast pozbycie się komórek CD4⁺CD25⁺ u myszy doprowadziło do wystąpienia wielu chorób autoimmunologicznych: zapalenie żołądka, czy zapalenie tarczycy (148-150). Doświadczenia na zwierzętach umożliwiły uznanie tych komórek za komórki supresorowe, które są odpowiedzialne za utrzymywanie tolerancji na własne antygeny (151), i które mogą regulować choroby autoimmunologiczne swoiste narządowo (152). Ostatnie badania sugerują, że komórki CD4⁺CD25⁺ pełnią funkcję w kontroli rozwoju chorób autoimmunologicznych u ludzi (153). Na podstawie badań, w których wykazałam, że u osób chorych na R.Z.S. jest znamienne podwyższony odsetek komórek CD4⁺CD25⁺ w porównaniu do ludzi zdrowych (rozdz. 4.1., Ryc. 10), możemy upatrywać jedną z przyczyn zmian dynamiki proliferacji limfocytów CD4⁺. Należy jednak podkreślić, że stwierdzenie fenotypu CD4⁺ CD25⁺ nie jest wystarczającym kryterium do uznania limfocyta za komórkę regulatorową, co utrudnia interpretacje tych wyników.

Obok komórek CD4⁺CD25⁺, badałam także procent komórek CD4⁺CD69⁺. Zaobserwowałam obniżenie odsetka tych komórek w grupie osób chorych, na granicy istotności, porównując do osób zdrowych. To zjawisko może być spowodowane wygaśnięciem wczesnej aktywacji (CD69 jest antygenem wczesnej aktywacji) i przekształceniem się jej w aktywację przewlekłą, sugerującą pojawienie się choroby autoimmunologicznej.

W powyższej pracy wykazałam, że istnieje ścisły związek pomiędzy obniżeniem ekspresji CD28 na limfocytach CD4⁺ a obniżeniem ekspresji genów takich jak KLOTHO i RARβ2 u osób ze zdiagnozowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów. Do dnia dzisiejszego niewiele wiadomo o regulacji transkrypcji genu CD28, niemniej jednak został zidentyfikowany fragment DNA, który pełni funkcję minimalnego promotora dla tego genu CD28 (25), niezbędnego dla jego transkrypcji.

W obrębie minimalnego promotora genu dla CD28 znaleziono sekwencje DNA, które wykazują specyficzną aktywność, która wiąże białka z ekstraktów jądrowych pochodzących z limfocytów posiadających CD28⁺ (25). Aktywności te nazwano alfa (α) i beta (β) i wykazano, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy fenotypem powierzchniowym CD28⁺, a występowaniem obu tych aktywności

wiązących w ekstraktach jąder komórkowych (25). W limfocytach krwi obwodowej o fenotypie CD28⁻ a także w klonach komórek o takim fenotypie stwierdzono brak tych aktywności (25).

Zlokalizowanie sekwencji, które odpowiadały tym aktywnościom w obrębie minimalnego promotora genu dla CD28 (25) prowadziło w kierunku stwierdzenia o ich kluczowej funkcji w procesie transkrypcji genu CD28; na tej podstawie zdefiniowano ich rolę jako składowej inicjatorowej dla transkrypcji genu CD28 (57).

W pracy szukałam odpowiedzi na pytanie, czy w ludzkich limfocytach CD4⁺ są obecne i aktywne geny posiadające homologiczną sekwencję dla lepiej poznanej sekwencji α promotora genu CD28, oraz, czy ich aktywność ma wpływ na cykl komórkowy tych komórek .

Badania sekwencji genów RAR β 2, KLOTHO, GRAP-2 (analiza komputerowa bazy GENBANK), wykazały że w regionach promotorowych tych genów znajdują się miejsca homologiczne do miejsc wiążących α w regionie promotorowym genu CD28, których aktywność jest niezbędna dla prawidłowej ekspresji tego ostatniego. Równoległe zmiany poziomu ekspresji genów RAR β 2, KLOTHO i GRAP-2 mogą wskazywać na wspólną regulację ich poziomu transkrypcji w limfocytach CD4⁺ oraz jej zależność od ekspresji CD28 lub istnienie wspólnego czynnika kontrolującego ekspresję wszystkich czterech genów.

W pracy wykazałam, że istnieje różnica w ekspresji genu RAR β 2 zarówno, pomiędzy grupą osób zdrowych młodych i zdrowych starszych i w zależności od stanu klinicznego (wyższa ekspresja u osób zdrowych w porównaniu do osób z R.Z.S.). Nie zauważyłam różnic w obrębie grupy chorych ze względu na wiek. Natomiast zaobserwowałam obniżenie ekspresji tego genu u starszych osób zdrowych w porównaniu do osób zdrowych młodych i u osób chorych w porównaniu do osób zdrowych.

Początkowo, szczególnie interesujący ze względu na ewentualne powiązania z patogenezą R.Z.S., wydawał się być wcześniej opisany gen RAR β -2 (ang. Retinoic Acid Receptor β 2).

Jedną z aktywnych biologicznie form witaminy A (która jest stymulatorem układu immunologicznego, a jej brak jest związany z obniżeniem odporności na infekcje (154)), jest ATRA (ang. All trans retinoic acid), który wiąże się do

receptorów kwasu retinowego. Wcześniejsze badania udowodniły, że po zastosowaniu ATRA nastąpiło zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁ i indukcja apoptozy w ludzkich limfocytach białaczkowych T. Zatrzymanie cyklu w fazie G₁ spowodowane było aktywacją p21waf1 i zahamowaniem ekspresji cykliny D1 (155). Wykazano, że w komórkach B, kwas retinowy hamuje mechanizm cyklu komórkowego, odpowiedzialny za przejście z fazy G₁ do fazy S (156).

Kwas retinowy i jego pochodne są znanymi czynnikami antyproliferacyjnymi, wywołującymi różnicowanie komórek, stosowanymi w hemato-onkologii. Jest więc wielce prawdopodobne, że w przypadku R.Z.S. jego działanie nie ogranicza się jedynie do hamowania kolagenozy, ale może być bardziej ogólne i prowadzić m.in. do zahamowania proliferacji limfocytów T. Ponadto kwas retinowy działając jako czynnik antyproliferacyjny powoduje zahamowanie proliferacji limfocytów T poprzez indukcję enzymów niespecyficznego proteazy-kalpain. Wiadomo, że kwas retinowy wpływa na proliferację i różnicowanie szerokiej różnorodności transformowanych i rozwijających się komórek (63). Kwas retinowy pełni główną rolę w kontroli proliferacji i różnicowaniu normalnych i transformowanych komórek i w regulacji potencjału morfogenicznego podczas różnicowania zarodkowego (136,157- 159).

Retinoidy regulują transkrypcję genów poprzez zaktywowane receptory kwasu retinowego (RARy)/receptory retinowe X (RXRy). W genie RARβ zidentyfikowano trzy izoformy, RARβ1, RARβ2 i RARβ3. RARβ1 i RARβ2 są wygenerowane przez alternatywny splicing (160). Z trzech receptorów RAR (α, β, γ), RARβ2 jest uważany za gen supresorowy w procesie transformacji nowotworowej, obniżenie jego ekspresji lub całkowita utrata prowadzi do oporności komórek nowotworowych na leczenie retinoidami (161,162).

Pojawia się coraz więcej doniesień potwierdzających, że ekspresja genu RARβ2 jest bardzo obniżona w niektórych formach nowotworów występujących u ludzi (163), ale potencjalne przyczyny redukcji tej ekspresji są wciąż nieznane.

Jeżeli we krwi chorych na R.Z.S. wykazano względny niedobór retinoidów (164), a retinoidy regulują transkrypcję genu RARβ, to obniżenie ekspresji genu RARβ2 u chorych na R.Z.S. może być właśnie tego wynikiem. Konsekwencją mogłaby być niewrażliwość komórek CD4⁺ na retinoidy i przyspieszenie ich proliferacji (skrócenie cyklu komórkowego) co ma miejsce u osób chorych na R.Z.S.

Kolejnym, badanym przeze mnie genem, był GRAP-2. Badania prowadzone nad aktywnością genu GRAP-2 wykazały, że ekspresja tego genu w limfocytach CD4⁺ jest wysoce heterogenna, i nie zauważyłam istotnych różnic w ekspresji tego genu, ani u osób zdrowych, ani u osób z R.Z.S. Grap, cząsteczka adaptorowa, jest specyficznie wyrażana głównie w limfocytach T. Białko to jest członkiem rodziny Grb-2 białek, oddziałuje na ścieżki kostymulacyjne w komórkach T (134, 135), bierze udział w transdukcji sygnałów pochodzących z ścieżki Ras- MAPK (165). Białko kodowane przez ten gen zawiera jedną domenę SH2 i 2 domeny SH3 (166). Domena SH2 zawiera białko fosfatazę tyrozynową, która pełni funkcję w negatywnej regulacji dążąc do obniżenia sygnałowania receptorów cytokin, receptora kinaz tyrozynowych i receptora kompleksów systemu immunologicznego (167). Domena SH2 może wiązać się do pozostałych receptorów fosotyrozynowych lub innych białek adaptorowych takich jak SHC. Natomiast domeny SH3 wiążą się do „Ras Exchange factor SOS”, ale mogą również wiązać się do innych białek adaptorowych takich jak GAB1 i GAB2.

Ostatnie prace sugerują, że białka adaptorowe, takie jak Shc, LAT i przede wszystkim Grap, odgrywają główną rolę w transdukcji sygnałów od kompleksu TCR/CD3 limfocyta poprzez łączenie różnych enzymów w specyficzne kompleksy wielobiałkowe (168,169). Te białka są powszechnie wyrażane np. Shc, lub są przyporządkowane limfocytom i leukocytom, jak Grap i LAT (170). Cząsteczka Grap, specyficznie wyrażana w limfocytach (135), wiąże się w nich z białkami p36/38 (LAT), Shc, PLC- γ 1 i Fyn po aktywacji komórek T (171). Badania genetyczne i molekularne sugerują, że Grap pełni negatywną rolę regulatorową uczestnicząc w odpowiedzi mitogennej limfocytów poprzez zahamowanie transmisji sygnału poprzez ścieżkę Ras-Erk.

Grap pełni funkcję w pozytywnej, bądź negatywnej selekcji podczas limfopoezy komórek T. Rola Grap w obniżeniu produkcji Il-2 i proliferacji limfocytów sugeruje, że ta mała cząsteczka pełni główną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej (166, 172).

GRAP-2 pełni rolę negatywnego regulatora wewnątrzkomórkowej sygnalizacji stymulowanych receptorów komórek T (TCR) przez obniżenie sygnału regulacyjnego, przekazywanego poprzez ścieżkę Ras/Erk. (166, 172).

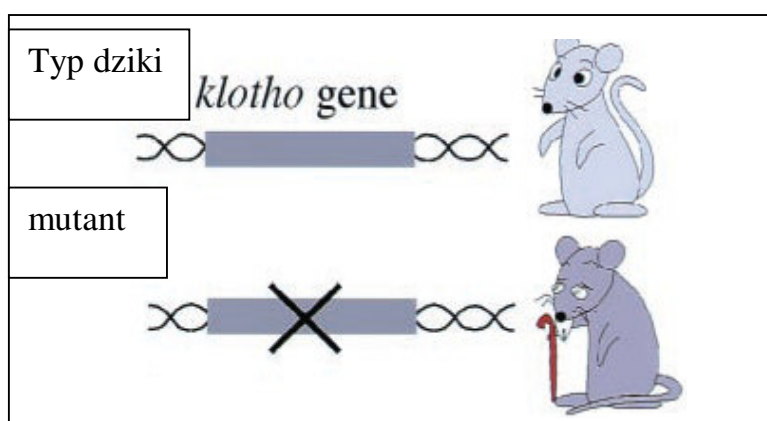
Pomimo istniejących, cytowanych wyżej doniesień dotyczących wpływu GRAP-2 na proliferację komórek T, na podstawie moich badań nie znalazłam bezpośrednich dowodów na wpływ zmian ekspresji genu GRAP-2 na zmiany dynamiki proliferacji limfocytów CD4⁺ osób chorych na R.Z.S. Ekspresja genu GRAP-2 jest wysoce heterogenna w obrębie obu badanych grup.

KLOTHO, po przeprowadzonych badaniach okazał się niezwykle interesującym genem. Nazwa genu pochodzi od jednej z Mojr, greckich bóstw losu. Gen „KLOTHO”, odkryto w roku 1997. Japońscy uczeni zaobserwowali wówczas, że u myszy pozbawionych białka kodowanego przez ten gen rozwijała się miażdżyca, osteoporoza, rozedma płuc i inne schorzenia charakterystyczne dla starości.

Od pewnego czasu wiadomo, że ten gen pełni podobną funkcję także u ludzi. Występuje w kilku odmianach, różniących się właściwościami kodowanego białka, co wpływa na ryzyko choroby wieńcowej, osteoporozy czy udaru (173).

Kodowane przez gen KLOTHO białko działa jak hormon zapobiegający starzeniu. Łącząc się z powierzchnią komórki hormon, blokuje mechanizm związany ze szlakiem insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu— 1(174). Wiadomo, że zahamowanie wspomnianego szlaku wydłuża życie robaków, muszek i myszy (174). Być może podobnie jest z ludźmi.

Największa ekspresja KLOTHO występuje w nerce i mózgu (175). Produkt tego genu jest powierzchniową β -glukuronidazą, której mutacja u myszy prowadzi do przedwczesnej starości, skrócenia czasu przeżycia, mnogich zaburzeń czynności osteoblastów i osteoklastów, a także limfopenii (127).



Rycina 43. Brak ekspresji genu KLOTHO ma udział w starzeniu (176).

KLOTHO pełni główną rolę w regulacji równowagi wapniowej i fosforanowej poprzez negatywną regulację syntezy aktywnej witaminy D (177). Gen KLOTHO posiada dwa transkrypty wytworzone przez aktywne składanie na poziomie RNA (178). Zewnątrzkomórkowa domena białka KLOTHO zawiera dwa wewnętrzne powtórzenia, które wyrażają sekwencje homologiczną do β -glukozydazy z bakterii i roślin (127, 179, 180).

Ludzkie KLOTHO wykazuje 86% podobieństwo aminokwasu z białkiem mysim i jest kodowane przez gen, który rozciąga się na ponad 50 kb na chromosomie 13q12 (138).

In vivo białko KLOTHO obniża produkcję NO, redukuje ciśnienie krwi i zapobiega fibrozie okołonaczyniowej w modelu szczurzym (181).

Defekt w ekspresji genu KLOTHO u myszy ma przełożenie na starzenie się u ludzi, w postaci krótkiej przeżywalności, bezpłodności, stwardnieniu tętnic, atrofii skórnej, osteoporozie i rozedmie u osób wykazujących ekspresję wariantu polimorficznego tego genu (182 – 184). Białko KLOTHO chroni system naczyń wieńcowych poprzez stymulację śródbłonna do produkcji NO (droga humoralna) (185). Dodatkowo, białko to może regulować limfopoezę komórek B i wpływać na mikrośrodowisko hematopoezy (183). Stwierdzono, że starzenie i choroby połączone z wiekiem są powiązane ze zmniejszeniem ekspresji KLOTHO (180, 186), ale mechanizm obniżenia nie jest jasny. Do czasu moich badań w literaturze nie było informacji na temat ekspresji KLOTHO w ludzkich limfocytach T i jej znaczenia dla tych komórek.

Zebrane wyniki moich doświadczeń zmierzają w kierunku stwierdzenia, że możliwą przyczyną reumatoidalnego zapalenia stawów jest starzenie się limfocytów CD4⁺ (187, 188). Mechanizmy starzenia się komórek T, pomimo usilnych starań, są trudne do uchwycenia (189-191). Uważa się, że wiele genów jest prawdopodobnie zaangażowanych w proces starzenia (192), ale tylko kilka z nich ma potwierdzony wpływ na ten mechanizm. Jednym z tych wybrańców jest KLOTHO, który jest powiązany ze starzeniem zarówno u myszy i u ludzi (127-133), i którego produkt białkowy został ostatnio nazwany „hormonem starzenia” (174, 178).

W mojej pracy przedstawiłam, że ekspresja KLOTHO na poziomie mRNA w spoczynkowych ludzkich limfocytach CD4⁺ zmniejsza się proporcjonalnie do

postępującego starzenia i jest silnie obniżona w komórkach CD4⁺ pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, niezależnie od wieku pacjentów.

Wykazałam również redukcję poziomu białka Klotho i spadek aktywności KLOTHO, jako β -glukuronidazy w limfocytach pacjentów z R.Z.S. Ani na aktywność transkrypcyjną genu KLOTHO, ani na aktywność enzymatyczną KLOTHO, jako β -glukuronidazy w limfocytach T pochodzących od pacjentów, nie miało wpływu leczenie farmakologiczne lub poziom aktywności choroby, badany przez DAS28. Moim zdaniem, te dane wskazują, że fenomen obniżenia ekspresji KLOTHO i aktywności enzymatycznej jest charakterystyczny dla choroby samej w sobie, powiązany raczej z jej mechanizmem, niż będący jej konsekwencją.

Moje obserwacje sugerują, że redukcja aktywności enzymatycznej KLOTHO jest co najmniej częściowo zależna od obniżenia aktywności transkrypcyjnej genu KLOTHO i zdolności mRNA KLOTHO do translacji; jakkolwiek brak znaczących powiązań pomiędzy tą aktywnością a poziomem mRNA KLOTHO w komórkach osób z R.Z.S., sugeruje to istnienie innego czynnika wpływającego na enzym, chociażby w przypadku komórek pochodzących od pacjentów.

Jak wykazałam, spadek ekspresji KLOTHO na poziomie mRNA koreluje z poziomem ekspresji CD28 na komórkach CD4⁺, zarówno w limfocytach zdrowych i limfocytach od pacjentów z R.Z.S. Ostatnio wykazano, że obniżenie ekspresji CD28 na komórkach osób chorych na R.Z.S. jest powiązane z wpływem czynnika martwicy nowotworu (TNF) na czynnik inicjatorowi/regulatorowy (zwany miejscem $\alpha\beta$) w regionie promotorowym genu CD28 (**18, 193**).

Przeprowadzony pilotowy (nie pokazany w tej pracy) test ruchliwości elektroforetycznej (EMSA), gdzie użyto próbki DNA o sekwencji identycznej z miejscem α promotora genu CD28 i znalezionej w okolicach genu KLOTHO sekwencji homologicznej do α wykazał, że ludzkie limfocyty CD4⁺ zawierają białka jądrowe wiążące się do obydwu sekwencji i że masa molekularna kompleksów α -DNA i homolog α -DNA są prawie identyczne. Te obserwacje mogą sugerować możliwość, że obydwa geny, KLOTHO i CD28 są koregulowane w limfocytach CD4⁺.

Równoległe zmiany poziomu ekspresji genów RAR β 2, KLOTHO i CD28 mogą wskazywać na wspólną regulację poziomu transkrypcji wszystkich trzech w

limfocytach CD4⁺ oraz jej zależność od wspólnej przyczyny, być może od działania TNF. Brak takiej zależności dla GRAP-2 może wynikać z nieco mniejszej, niż w przypadku KLOTHO i RARβ2, homologii sekwencji znalezionej w/przy promotorze tego genu do sekwencji α z promotora genu CD28.

KLOTHO istnieje w formie błonowej (1012 aminokwasów) i/lub sekrecyjnej (549 aminokwasów), wynikającej z alternatywnego splicingu tego genu (138). Udowodniono, że ilość sekrecyjnej formy białka KLOTHO maleje w ludzkiej surowicy wraz z wiekiem (178).

Moje obserwacje dotyczące zmniejszenia aktywności Klotho związanej z komórką mogą w jakimś stopniu tłumaczyć, że niższe poziomy białek związanych z komórką powinny produkować mniejszą ilość formy sekrecyjnej.

Pomimo istnienia szeregu powiązań w wielu procesach biochemicznych w procesie starzenia, włączając metabolizm fosforanu i hamowanie sygnalizacji insulina/IGF-1 (174) bezpośredni wpływ poprzez aktywność enzymatyczną KLOTHO, jako β-glukuronidazy pozostaje w większości nieznanymi. Wykazano, że ten enzym hydrolizuje i aktywuje kanał TRPV5 przewodzący jony K⁺ (194) i hydrolizuje β-glukuronidy sterydów (126). Kanały należące do rodziny TRPV są obecne w błonach komórek T i mogą być zaangażowane w aktywację komórek układu immunologicznego (195). Możliwy brak ich aktywacji powiązany z obniżeniem lub nawet zniesieniem aktywności KLOTHO może być jedną z przyczyn upośledzenia aktywacji komórek T zarówno u zdrowych starszych ludzi, jak i osób chorych na R.Z.S.

Ostatnio zasugerowano, że aktywność KLOTHO, hydrolizując glukuronidy sterydów, zmienia równowagę w kierunku wzrostu poziomów niezwiązanych, aktywnych form hormonów sterydowych (126). Jeśli udział w tym procesie brałby kortyzol i jego pochodne, bezpośrednie działanie KLOTHO dawałoby efekt przeciwzapalny (poprzez podniesienie poziomów glukokortykoidu) i jednocześnie spadek aktywności KLOTHO powinien wiązać się być może z nasileniem procesów zapalnych, jakie obserwujemy zarówno u osób w podeszłym wieku jak i u chorych na R.Z.S.

Niski stopień, częściowego subklinicznego zapalenia ostatnio został zapostulowany jako typowa cecha związana ze starzeniem systemu immunologicznego (196).

Różnica polegająca na obecności ekspresji genu KLOTHO w komórkach CD4⁺ zdrowych osób, a niesamowicie niskiej ekspresji tego genu w limfocytach CD4⁺ osób chorych na R.Z.S., może mieć związek z opisywanym fenotypem przedwczesnej starości proliferacyjnej (ang. proliferative senescence) limfocytów od osób chorych.

Najnowsze badania na ludzkich fibroblastach potwierdzają, że obniżenie ekspresji KLOTHO dramatycznie indukuje przedwczesne starzenie proliferacyjne tych komórek, co jest jednocześnie związane z podwyższeniem produkcji p21. Natomiast to podwyższenie jest powiązane z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G₁/S.

Uszkodzenie p53 w fibroblastach z uszkodzonym KLOTHO (stworzone komórki MRC-5) przywraca normalny wzrost i potencjał replikacyjny. Wyniki zaprezentowane w tej, jedynej jak dotychczas, pracy wiążącej działanie KLOTHO z proliferacją komórek potwierdzają, że KLOTHO reguluje starzenie komórkowe przez zahamowanie ścieżki p53/p21 (137).

Podsumowując, obserwowane u chorych na reumatoidalne zapalenia stawów zaburzenia proliferacji limfocytów mogą być związane z obniżoną aktywnością dwóch genów: RARβ2 i KLOTHO, regulowanych przez mechanizm, od którego zależy także regulacja ekspresji CD28.

6. PODSUMOWANIE

W reumatoidalnym zapaleniu stawów obserwuje się:

- obniżenie ekspresji CD28 na limfocytach CD4⁺ krwi obwodowej,
- zmiany dynamiki podziałów komórkowych *in vitro*, przede wszystkim wydłużenie czasu przejścia z fazy G₀ do G₁ i skrócenie pojedynczego cyklu komórkowego,
- redukcję ekspresji i funkcji genu KLOTHO, uczestniczącego w procesie starzenia się komórek i ekspresji genu RARβ2, wpływającego hamująco na cykl komórkowy.

W genach RARβ2, KLOTHO i GRAP-2 istnieje sekwencja homologiczna do regulatorowej sekwencji α, obecnej w promotorze genu CD28.

7. WNIOSKI.

1. Podobna dynamika podziałów limfocytów CD4⁺ osób zdrowych w podeszłym wieku i osób młodych cierpiących na R.Z.S. świadczy o przyspieszonym starzeniu komórek układu immunologicznego u chorych.
2. Wydłużenie czasu przejścia z fazy G₀ do G₁ cyklu komórkowego może wiązać się z obniżeniem ekspresji CD28 w limfocytach CD4⁺ osób chorych.
3. Spadek ekspresji RARβ2 może być przyczyną skrócenia cyklu komórkowego limfocytów CD4⁺ od pacjentów z R.Z.S.
4. Bardzo niska ekspresja i czynność genu KLOTHO w limfocytach CD4⁺ u chorych na R.Z.S. może się wiązać z przedwczesnym starzeniem układu immunologicznego.
5. Obecność sekwencji homologicznej do regulatorowej α z promotora genu CD28 i równoczesne obniżenie ekspresji CD28, KLOTHO i RARβ2, sugeruje możliwość wspólnej regulacji ekspresji tych genów.

8. LITERATURA.

1. Pawlik A., Ostanek L., Brzosko I., Brzosko M., Masiuk M., Sachaliński B., Gawrońska-Szklarz B. 2003. The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with rheumatoid arthritis.. *Arthritis Res and Ther*, 5: R210-R213;
2. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. 2000. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:9203-9208;
3. Schmidt D., Goronzy J.J., Weyand C.M. 1996. CD4+CD7-CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J.Clin.Inves.t* 97:2027-2037;
4. Green J.M., Noel P.J., Sperling A.I., Walunas T.L., Lenschow D.J., Stack R., Gray G.S., Blustone J.A.,Thompson C.B. 1995. T cell costimulation through the CD28 receptor. *Proc.Assoc.Am.Physicians* 107:41-46.
5. Azuma M., Cayabyab M., Buck D., Philips J.H., Lanier L.L. 1992. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 175:353-360.
6. Tuosto L., Acuto O. 1998. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur.J.Immunol.* 28:2131-2142.
7. Akatsuka H., Okubo, M., Ishida, H., Chiba, K., Imanishi, K., Uchiyama, T., Yamamoto, K., Kasukawa, R., and Nishimaki, T. 1997. Synovial mononuclear cells consist with T cells which produce high levels of tumor necrosis factor alpha. *Microbiol.Immunol.* 41:367-370.

8. al Janadi N., al Dalaan A., al Balla S., Raziuddin S. 1996. CD4+ T cell inducible immunoregulatory cytokine response in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 23:809-814.
9. Maini R.N., Brennan F.M., Williams R., Chu C.Q., Cope A.P., Gibbons D., Elliot M., Feldmann M. 1993. TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. *Clin.Exp.Rheumatol.* 11 Suppl.8:S173-175.
10. Maini R.N., Elliot M., Brennan F.M., Williams R.O., Chu C.Q., Paleolog E., Charles P.J., Taylor P.C., Feldmann M.1995. Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. *Immunol.Rev.* 144:195-223.
11. Joosten L.A., Helsen M.M., van De Loo F.A., van der Berg W.B. 1996. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum.* 39:797-809.
12. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York & London (chapter17), 863-910.1994.
13. Sakito S., Ueki Y., Eguchi K., Kawale Y., Nagataki S. 1995. Serum cytokines in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha with the characteristics of peripheral blood mononuclear cells. *Rheumatol.Int.* 15:31-37.
14. Okubo M., Brown M.P., Chiba K., Kasukawa R., Nishimaki T. 1998. Detection of TNF Ralpha and Fas ligand mRNA within synovial mononuclear cells by fluorescence in-cell labeling PCR (FICL-PCR). *Mol.Biol.Rep.* 25:217-224.
15. Klimiuk P.A., Sierakowski S., Latosiewicz R., Cylwik B., Skowronski J., Chwiecko J. 2001. Serum cytokines in different histological variants of rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 28:1211-1217.

16. Brennan F.M., Gibbons D.L., Mitchel T., Cope A.P., Maini R.N., Feldmann M. 1992. Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur.J.Immunol.* 22:1907-1912.
17. Feldmann M., Bondeson J., Brennan F.M., Foxwell B.M., Maini R.N. 1999. The rationale for the current boom in anti-TNF α treatment. Is there an effective means to define therapeutic targets for drugs that provide all benefits of anti-TNF α and minimise hazards? *Ann.Rheum.Dis.* 58 Suppl 1:I27-I31.
18. E. Bryl, Vallejo A.N., Weyand C.M., Goronzy J.J. 2001. Down-regulation of CD28 expression by TNF- α . *J.Immunol.* 167(6),3231
19. Taylor P.C. 2001. Anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Mol.Biotechnol.* 19:153-168.
20. Cope A.P., Londei M., Chu N.R., Cohen S.B., Elliot M.J., Brennan F.M., Maini R.N., Feldmann M. 1994. Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest.* 94:749-760.
21. Valitutti S., Lanzavecchia A. 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol.Today* 18:299-304.
22. Mysliwska J., Bryl E., Zorena K., Balon J., Foerester J., Mysliwski A. 1977. Overactivity of tumor necrosis factor- α but not interleukin 6 is associated with low natural killer cytotoxic activity in the elderly. *Gerontology.* 43:158-167.
23. Fagiolo U., Cossarizza A., Scala E., Fanales-Belasio E., Ortolani C., Cozzi E., Monti D., Franceschi C., Paganelli R. 1993. Increased cytokine production in mononuclear cells in healthy elderly people. *Eur.J.Immunol.* 23:2375-2378.

24. Boucher N., Dufeu-Duchesne T., Vicaut E., Farge D., Effros R.B., Schachter F. 1998. CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp. Gerontol.* 33:267-282.
25. Vallejo A.N., Nestel A.R., Schirmer M., Weyand C.M., and Goronzy J.J. 1998. Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4+ T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J.Biol.Chem.* 273:8119-8129.
26. Effros R.B., Allsopp R., Chiu C.P., Hausner M.A., Hirji K., Wang L., Harley C.B., Villeponteau B., West M.D., Giorgi J.V. 1996. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS.*10:F17-F22.
27. Mysliwska J., Bryl E., Foerster J., Mysliwski A. 1999. The upregulation of TNF alpha production is not a generalized phenomenon in the elderly between their sixth and seventh decades of life. *Mech.Ageing Dev.* 107:1-14.
28. Bryl E., Mysliwska J., Foerster J., Mysliwski A. 1997. The correlation between Nk cytotoxic activity and the production of the proinflammatory cytokines during the ageing process. *Folia Histochem.Cytobiol.* 35:75-76.
29. Green J.M., Thompson C.B. 1994. Modulation of T cell proliferative response by accessory cell interactions. *Immunol.Res.* 13:234-243.
30. Lewis D.E., Merched-Sauvage M., Goronzy J.J., Weyand C.M., Vallejo A.N. 2004. Tumor necrosis factor- α and CD80 modulate CD28 expression through a similar mechanism of T-cell receptor-independent inhibition of transcription. *J.Biol.Chem.* 279:29130-29138.
31. Bryl E., Vallejo A.N., Matteson E.L., Witkowski J.M., Weyand C.M., Goronzy J.J. 2005. Modulation of CD28 expression with anti-tumor necrosis factor α therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 52:2996-3003.

32. Vallejo A.N., Bryl E., Klarskov K., Naylor S., Weyand C.M., Goronzy J.J. 2002. Molecular basis for the loss of CD28 expression in senescent T cells. *J.Biol.Chem.* 277:46940-46949.
33. Romagnani S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm.Bowel.Dis.* 5:285-294.
34. Lafaille J. J. 1998. The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:139-151.
35. Brennan F.M., Chantry D., Jackson, A., Maini, R., Feldmann M. 1989. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2:244-247.
36. Viola A., Lanzavecchia A. 1996. T cell activation determined by t cell receptor number and tunable thresholds. *Science.* 276:104-106.
37. Boise L.H., Minn A.J., Noel P.J., June C.H., Accavitti M.A., Lindsten T., Thompson C.B. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* 3:87-98.
38. Ding L., Shevach E.M. 1994. Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur.J.Immunol.* 24:859-866.
39. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu.Rev.Immunol.* 14:397.
40. Edmead C.E., Lamb J.R., Hoyne G.F. 1997. The T cell surface protein, CD28. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29:1053-1057.

41. Carruthers D.M., Naylor W.G., Allen M.E., Kitas G.D., Bacon P.A., Young S.P. 1996. Characterization of altered calcium signalling in T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin.Exp.Immunol.* 105:291-296.
42. Grakoui A., Bromley S. K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 285:221-227.
43. Bromley S.K., Iaboni A., Davis S.J., Whitty A., Green J.M., Shaw A.S., Weiss A., Dustin M.L. 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat.Immunol.* 2:1159-1166.
44. Gracie J.A., Forsey R.J., Chan W.L., Gilmour A., Leung B.P., Greer M.R., Kennedy K., Carter R., Wei X.Q., Xu D., Field M., Foulis A., Liew F.Y., McInnes I.B. 1999. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest* 104:1393-1401.
45. Cerdan C., Martin Y., Courcoul M., Mawas C., Birg F., and Olive D. 1995. CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J.Immunol.* 154:1007-1013.
46. Appleman L.J., Berezovskaya A. et al. 2000. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J.Immunol.* 164(1):144-151.
47. Cerdan C., Martin Y., Courcoul M., Brailly H., Mawas C., Birg F., and Olive D. 1992. Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J.Immunol.* 149:2255-2261.

48. pod redakcją K. Ostrowskiego. *Histologia*. 41-106. 1998. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Rozdział Komórka.
49. Boonen, G.J., van Dijk, A.M., Verdonck, L.F., van Lier, R.A., Rijksen, G., Medea, R.H. 1999. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 29:789-798.
50. Lu L., Qian S., Starzl T.E., Lynch D.H., Thomson A.W. 1997. Blocking of the B7-CD28 pathway increases the capacity of FasL+ (CD95L+) dendritic cells to kill alloactivated T cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 417:275-282.
51. Namekawa T., Wagner U.G., Goronzy J.J., Weyand C.M. 1998. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* 41:2108-2116.
52. . Martens P.B., Goronzy J.J., Schaid D., Weyand C.M. 1997. Expansion of unusual CD4⁺ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40:1106-1114.
53. Bryl, E. 2003. Zmiany ekspresji cząsteczki CD28 na limfocytach CD4⁺ u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów; Rola czynnika martwicy nowotworów i konsekwencje dla odpowiedzi immunologicznej. *Annales Academiae Medicae Gedanesis*. Tom XXXIII.
54. Ward S.G. 1996. CD28: a signaling perspective. *Biochem.J.* 318:361-377.
55. Lee K., Taylor C., Petryniak B., Turka L.A., June C.H. and Thompson C.B. 1990. The genomic organization of the CD28 gene. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. *J.Immunol.* 145:344-352.
56. Aruffo A. and Seed B. 1987. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:8573-8577.

57. Vallejo A.N., Weyand C.M., and Goronzy J.J. 2001. Functional disruption of the CD28 gene transcriptional initiator in senescent T cells. *J.Biol.Chem.* 276:2565-2570.
58. Vallejo A.N., Brandes J.C., Weyand C.M., Goronzy J.J. 1999. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J.Immunol.* 162:6572-6579.
59. Kufmann J., Ahrens K., Koop R., Smale S.T., Muller R. 1998. CIF150, a human cofactor for transcription factor IID-dependent initiator function. *Mol.Cell.Biol.* 18:233-239.
60. Bryl E., Witkowski J.M. 2004. Decreased proliferative capability of CD4⁺ cells of elderly people is associated with faster loss of activation-related antigens and accumulation of regulatory T cells. *Exp. Gerontol.* 39: 587-595.
61. Folkers G.E., van der Burg B., van der Saag P.T. 1998. Promoter architecture, cofactors, and orphan receptors contribute to cell-specific activation of the retinoic acid receptor beta2 promoter. *J. Biol. Chem.* 273(48):32200-32212.
62. Brinckerhoff C.E. 1990. Retinoids and rheumatoid arthritis: modulation of extracellular matrix by controlling expression of collagenase. *Methods Enzymol.* 190:175-188.
63. Felli M.P., Vacca A., Meco D., Screpanti I., Farina A.R., Maruder M., Martinotti S., Petrangeli E., Frati L., Gulino A. 1991. Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-2 promoter via cis-regulatory sequences containing an octamer motif. *Molecular and Cellular Biology.* 11:4771-4778.
64. Bankhurst A. D., Husby G., Williams R. C., Jr 1976. Predominance of T cells in the lymphocytic infiltrates of synovial tissues in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 19:555-562.

65. Duby A. D., Sinclair A. K., Osborne- Lawrence S.L., Zeldes W., Kan L., Fox D. A. 1989. Clonal heterogeneity of synovial fluid T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:6206-6210.
66. Uematsu Y., Wege H., Straus A., Ott M., Bannwarth W., Lanchbury J., Panayi G., Steinmetz M. 1991. The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:8534-8538.
67. Paliard X., West S.G., Lafferty J.A., Clements J.R., Kappler J.W., Marrack P., Kotzin B.L. 1991. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 19;253:325-329.
68. Badolato R., Oppenheim J.J. 1996. Role of cytokines, acute phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Semin.Arthritis Rheum.*26:526-538.
69. Ziołkowska M., Koc A., Luskiewicz G., Ksiezopolska-Pietrzak K., Klimczak E., Chwalinska-Sadowska H., Maslinski W.2000. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J.Immunol.* 164:2832-2838.
70. Cush J.J., Jasin H. E., Johnson R., Lipsky P.E. 1990. Relationship between clinical efficacy and laboratory correlates of inflammatory and immunologic activity in rheumatoid arthritis patients treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 33:623-633.
71. Goronzy J.J., Bartz-Bazzanella P., Hu W., Jendro M.C., Walser-Kuntz D.R., Weyand C.M. 1994. Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4⁺ in rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest.* 94:2068-2076.
72. Schmidt D., Martens P.B., Weyand C.M., Goronzy J.J. 1996. The repertoire of CD4⁺CD28⁻ T cells in rheumatoid arthritis. *Mol.Med.* 2:608-618.

73. Imberti L., Sottini A., Signorini S., Gorla R., Primi D. 1997. Oligoclonal CD4⁺ CD57⁺ T-cell expansions contribute to the imbalanced T-cell receptor repertoire of rheumatoid arthritis patients. *Blood*.89:2822-2832.
74. Wagner U.G., Koetz K., Weyand C.M., Goronzy J.J. 1998. Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:14447-144452;
75. Okazaki K., Davis D.D., Sakano H. 1987. T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49:477-485;
76. Fujimoto S., Yamagishi H. 1987. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature* 327:242-243;
77. Livak F., Schatz D.G. 1996. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol.Cell.Biol.* 16:609-618;
78. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. 1998. Changes in thymic function with and during the treatment of HIV infection. *Nature*.396:690-695.
79. Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. 2001. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J.Mol.Med.* 79:631-640.
80. Weyand C. M., Brandes J. C., Schmidt D., Fulbright J. W., Goronzy J. J. 1998. Functional properties of CD4⁺CD28⁻ T cells in the aging immune system. *Mech.Ageing.Dev.* 102:131-147.
81. Sikora E. Mechanism of cell death (apoptosis). 1994. *Post. Biochem.* 40:150-160.

82. Sikora E. Cell cycle and apoptosis: death of a senescent cell. 1996. *Post. Biochem.* 42:108-113.
83. Zhang Y., Herman B. Ageing and apoptosis.2002. *Mec.h Age Dev.* 123:245-260.
84. Campisi J., Dimri G.P., Hara E. 1996. Control of replicative senescence. *Handbook of Biology of Aging.* Academic Press, 121-149.
85. Campisi J. 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo.* 14:183-188.
86. Hayflick L. 1980. Cell aging. *Annu.Rev.Gerontol.Geriat.* 1:26-67.
87. Darzynkiewicz Z., Evenson D., Staiano-Coico L., Sharpless T., Melamed M.R.1979. Relationship between RNA content and progression of lymphocytes through S phase of cell cycle.*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*76(1):358-62;
88. Hasbold J., Gett A.V., Rush J.S., Deenick E., Avery D., Jun J., Hodgkin P.D. 1999. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.*Immunol Cell Biol.*;77(6):516-22
89. Modiano J.F., Mayor J., Ball C., Chitko-McKown C.G., Sakata N., Domenico-Hahn J., Lucas J.J., Gelfand E.W. 1999. Quantitative and qualitative signals determine T-cell cycle entry and progression.*Cell Immunol*;197(1):19-29.
90. DePinho R. 2000.The age of cancer. *Nature.*408:248-254.
91. Suh Y. 2002. Cell signaling in aging and apoptosis.*Mech. Age Dev.*123:881-890.
92. Campisi J., Kim, S., Lim, C., Rubio, M. 2001.Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp.Gerontol.*36:1619-1637.
93. Smith J.R., Pereira-Smith O.1996.Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression.*Science.*273:63-67.

94. Campisi J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11:S27-S31.
95. Morgan D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature.* 347:131-134.
96. Jacks T., Weinberg R.A. 1998. The expanding role of cell cycle regulators. *Science.* 280:1035-1036.
97. Fuller G.M., Shields D. 2000. Cykl komórkowy i podział komórki. Apellton&Lange. *Podstawy molekularne biologii komórki.* Warszawa: PZWL, 143:152.
98. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J.D. 1994. Molecular Biology of the cell . *Garland Publishing, Inc.,* New York & London (chapter 17), 863-910.
99. Emery P., Panayi G. S., Nouri A. M. 1984. Interleukin-2 reverses deficient cell-mediated immune response in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 57:123-129.
100. Sfrikakis P. P., Zografou A., Vigilis V., Iniotaki-Theodoraki A., Piskontaki I., Tsokos G. C., Sfrikakis P., Choremi-Papadopoulou H. 1995. CD28 expression on T cell subsets in vivo and CD28- mediated T cell response in vitro in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38:649-654.
101. Van den B. M., Boeije L., Swaak T., Smeenk R., Aarden L. 1995. Functional analysis of synovial fluid and peripheral_blood T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol.Int.* 15:137-143.
102. Witkowski J. M., Bryl E. 2004. Paradoxical age-related cell cycle quickening of human CD4⁺ lymphocytes : a role for cyclin D1 and calpain. *Exp. Gerontol.* 39: 577-585.

103. Brzezinska A., Magalska A., Sikora E. 2003. Proliferation of CD8⁺ in culture of human T cells derived from peripheral blood of adult donors and cord blood of newborns. *Mech. Ageing* 124(4):379-87.
104. Croft M., Dubey C. 1997. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit Rev Immunol.*;17(1):89-118.
105. Carruthers D.M., Naylor W.G., Allen M.E., Kitas G.D., Bacon P.A., Young S.P. 1996. Characterization of altered calcium signalling in T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin.Exp.Immunol.* 105:291-296.
106. Asselin S., Conjeaud H., Fradelizi D., Breban M. 1998. In vitro differentiation of peripheral blood T cells towards a type 2 phenotype is impaired in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 114(2):284-292.
107. Effros R.B., Allsopp R., Chiu C.P., Hausner M.A., Hirji K., Wang L., Harley C.B., Villeponteau B., West M.D., Giorgi J.V. 1996. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8⁺ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS.*10:F17-F22.
108. Arnett F.C., Edworthy S., Bloch D., McShane D., Fries J., Cooper N., et al 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.
109. EULAR, Ocena kliniczna w reumatoidalnym zapaleniu stawów. 2000. University Hospital London.
110. Ligthart G.J., Corberand J.X., Fournier C., Galanaud P., Hijmans W., Kennes B., Muller-Hermelink H.K., Steinmann G.G. 1984. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech.Ageing Dev.* 28:47-55.
111. Śliwińska-Stańczyk P. 2005. Rola płytek krwi w procesach zapalnych. *Reumatologia.* 2.2:85-88.

112. Hasbold J., Gett A.V., Rush J.S., Deenick E., Afery D., Jun J., Hodgkin P.D. 1999. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology And Cell Biology* 77, 516-522.
113. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*72:248-254.
114. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
115. Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280:309-16.
- 116.Henrissat B., Bairoch A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 316:695-6.
117. Herscovics A. 1999. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.*1473:96-107. Review.
118. Wittstock U, Halkier BA. 2002. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends Plant Sci.* 7:263-70. Review.
- 119.Rask L., Andreasson E., Ekbom B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol.* 42:93-113. Review.
- 120.Gopalan V., Pastuszyn A., Galey W.R. Jr, Glew R.H. 1992. Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase.*J Biol Chem.* 267:14027-32.

121. LaMarco K.L., Glew R.H. 1986. Hydrolysis of a naturally occurring beta-glucoside by a broad-specificity beta-glucosidase from liver. *Biochem J.* 237:469-76.
122. Wells L., Vosseller K., Hart G.W. 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science.* 291:2376-8. Review.
123. Brzobohaty B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. 1993. Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science.* 262:1051-1054.
124. Lorincz M.C., Parente M.K., Roederer M., Nolan G.P., Diwu Z., Martin D.I.K., Herzenberg L.A., Wolfe J.H. 1999. Single cell analysis and selection of living retrovirus vector corrected mucopolysaccharidosis VII cells using a fluorescence activated cell sorting based assay for mammalian B-glucuronidase enzymatic activity. *The Journal of Biological Chemistry.* 274, no. 2: 657-655.
125. Levvy G.A. 1952. The preparation and properties of beta-glucuronidase. IV. Inhibition by sugar acids and their lactones. *Biochem. J.* 52:464-72.
126. Tohyama O. et al., 2004. KLOTHO is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* 279(11), 9777
127. Kuro-o M., Matsumura Y., Lizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kanale T., Kume E., Iwaszki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R., Nabeshima Y., I. 1997. Mutation of the mouse KLOTHO gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 390:45-51.
128. Kuro-o M. 2001. Disease model: human aging. *Trends Mol. Med.* 7(4)179.
129. Mullin B. H. et al., 2005. KLOTHO gene polymorphisms are associated with osteocalcin levels but not bone density of aged postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 77(3), 145.

130. Yamada Y. et al. 2005. Association of polymorphisms of the androgen receptor and KLOTHO genes with bone mineral density in Japanese women. *J. Mol. Med.* 83(1), 50.
131. Arking D. E. et al. 2003. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72(5), 1154.
132. Suga T. et al. 2000. Disruption of the KLOTHO gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22(1), 26.
133. Deary I. J. et al. 2005. KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals. *Neurosci. Lett.* 378(1), 22.
134. Ellis J.H., Ashman C., Burden M.N., Kilpatrick K.E., Morse M.A., Hamblin PA. 2000. GRID: a novel Grb-2-related adapter protein that interacts with the activated T cell costimulatory receptor CD28. *J Immunol.* 164(11):5805-14.
135. Feng G.S., Ouyang Y.B., Hu D.P., Shi Z.Q., Gentz R., Ni J. 1996. Grap is a novel SH3-SH2-SH3 adaptor protein that couples tyrosine kinases to the Ras pathway. *J. Biol. Chem.* 271:12129-12132.
136. Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.S. 1980. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2936-2940.
137. de Oliveira R.M. 2006. KLOTHO RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* 580(24):5753-5758.
138. Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. 1998. Identification of the human KLOTHO gene and its two transcripts encoding

membrane and secreted KLOTTHO protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*242:626-630.

139. Cope, A. P., Londei, M., Chu, N. R., Cohen, S. B., Elliott, M. J., Brennan, F. M., Maini, R. N., Feldman, M. 1994. Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest.* 94:749-760.

140. Verwilghen, J., Vertessen, S., Stevens, E. A., Dequeker, J., Ceuppens, J. L. 1990. Depressed T-cell reactivity to recall antigens in rheumatoid arthritis. *J.Clin.Immunol.* 10:90-98.

141. Hovedens, J., Hovedens, A.B., Egeland, T., Kvien, T. K. Mellbye, O. J. 1990. A study of effect of rheumatoid synovial fluid on proliferation and IL-2 production by total mononuclear cells and purified CD4+ cells of synovial fluid and peripheral blood. *Scand.J.Rheumatol.* 19:398-406.

142. Witkowski J.M. 2003. Nowe spojrzenie na cykl komórkowy limfocytów T. *Cytometria w diagnostyce lekarskiej.*

143. Vallejo A. N., Schrimmer M., Werand C. M., Goronzy J. J. 2000. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J.Immunol.* 165:6301-6307.

144. Lanzavecchia A., Sallusto F. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat.Immunol.* 2:487-492.

145. Rachmilewitz J., Lanzavecchia A. 2001. A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and peptide decoding. *Trends Immunol.* 23:592-595.

146. Berg L., Ronnelid J., Klareskog L., Bucht A. 2000. Down-regulation of the T cell receptor CD3 zeta chain in rheumatoid arthritis (RA) and its influence on T cell responsiveness. *Clin.Exp.Immunol.* 120:174-182.
147. Bryl, E., Gazda, M., Foerster, J., and Witkowski, J.M. 2001. Age-related increase of frequency of a new, phenotypically distinct subpopulation of human peripheral blood T cells expressing lowered levels of CD4. *Blood.* 98:1100-1107.
148. Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD4+CD25+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.* 162:5317-5326.
149. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., Takahashi, T. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol.Rev.* 182:18-32
150. Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int.Immunol.* 10:1969-1980
151. Takahashi, T., Sakaguchi, S. 2003. The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance. *Int.Rev.Cytol.* 225:1-32.
152. Chatenoud, L., Salomon, B., Bluestone, J. A. 2001. Suppressor T cells-they're back and critical for regulation of autoimmunity. *Immunol.Rev.* 182:149-163.
153. Leipe J, Skapenko A, Lipsky PE, Schulze-Koops H. 2005. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*;7(3):93.

154. Ross A.C. 1992. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proc.Soc.Exp Biol.Med.* 200:303.
155. Felli M.P., Vacca A., Meco D., Screpanti, I., Farina A.R., Maroder M., Martinotti S., Petrangelli E., Fratti L., Gulino A. 1991. Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-2 promoter via cis-regulatory sequences containing an octamer motif. *Molecular and Cellular Biology.*11:4771-4778.
156. Nader S., Blomhoff H.K. 1999. Retinoic acid prevents phosphorylation of pRB in normal human B lymphocytes: regulation of cyklin E, cyklin A i p21^{Cip1}. *Blood.*94:1348.
157. Rockers J.P.1989. Retinoids, homeobox genes and limb morphogenesis. *Neuron.* 2:1285-1294.
158. Roberts A.B., Sporn M.B. 1984. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 73:1381-1387.
159. Struckland S., Mahdavi M. 1978. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell.* 15:393-403.
160. Nagpal S., Zelent A., Chambon P. 1992. RAR- β 4 a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR- β 2 by alternative splicing and usage of CUG initiator codon. *Proc.Natl.Acad.Sci.*89:2718-2722.
161. Peng X, Maruo T., Cao Y., Punj V., Mehta R., Das Gupta T.K. 2004. A novel RARbeta isoform directed by a distinct promoter P3 mediated by retinoic acid in brest cancer cells. *Cancer Res* 64(24):8911-8.
162. Lefebvre B., Brand C., Flajollet S. and Lefebvre P. 2006. Down-regulation of the tumor suppressor gene RAR β 2 through the PI3K/Akt signaling pathway. *Molecular Endocrinology.* 10.1210/me.2005-0321.

163. Freemantle S.J., Spinella M.J., Dmitrovsky E. 2003. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene*. 22:7305-7315.
164. Dougados M., Lephoro M.A., Esmilaire L., Elaiba F., Amor B.1988. Plasma levels of vitamins A and E in hyperostosis, ankylosing spondylarthritis and rheumatoid polyarthritis. *Rev.Rheum.Mal.Osteoartic*.15:251-254.
165. Qiu M., Hua S., Agrawal M., Li G., Cai J., Chan E., Zhou H., Luo Y., Liu M.1998. Molecular cloning and expression of human grap-2, a novel leukocyte-specific SH2- and SH3-containing adaptor-like protein that binds to gab-1.*Biochem. Biophys.Res.Commun*. 253: 443-447.
166. Shen R., Ouyang Y., Qu C., Alonso A., Sperzel L., Mustelin T., Kaplan M.H., Feng G. 2002. Grap negatively regulates T-cell receptor –elicited lymphocyte proliferation and interleukin-2 induction. *Molecular and Cellular Biology*.22:3230-3236.
167. Mino P., Zadeh M.M., Rottapel R., Lebrun J.J., Ali S.2004. A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood*. 15;103(4):1398-407.
168. Peterson E.J., Clements J.L., Fang N., Koretzky G.A. 1998. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol*. 10:337-344.
169. Rudd C.E. 1999.Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell*.96:5-8.
170. Norian L.A., Koretzky G.A. 2000. Intracellular adapter molecules. *Semin.Immunol*. 12:43-54.
171. Trub T., Frantz J.D., Miyazaki M., Band H., Shoelson S.E. 1997. The role of lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling.

J.Biol.Chem. 272:894-902.

172. Cantrell D. 1990.T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu.Rev.Immunol.* 14:259-274.

173. Common Variation of KLOTHO gene associated with human life expectancy.www.hopkinsmedicine.org/press/2002/January/020114.html

174. Kurosu H.et al.2005.Suppression of aging in mice by the hormone KLOTHO. *Science.* 309(5742), 1829.

175. Negri A. L. 2005.The KLOTHO gene: a gene predominantly expressed in the kidney is a fundamental regulator of aging and calcium/phosphorus metabolism. *J. Nephrol.* 18(6), 654.

176. Takahashi Y., Kuro-o M., Ishikawa F. 2000. Aging mechanisms.*Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*97(23):12407-8.

177. Nabeshima Y., et al. 2002.KLOTHO a fundamental regulator of aging. *Ageing Res.Rev.* 1(4):627-638.

178. Xiao N.,M., Zhang Y.,M., Gu J. 2004. KLOTHO is a serum factor related to human aging. *Chin. Med. J.*117(5):742-747.

179. Grabnitz F., Seiss M., Rucknagel K.,P., Staudenbauer W.,L. 1991. Structure of the beta-glucosidase gene bglA of *Clostridium thermocellum*. Sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and beta-glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. *Eur.J.Biochem.*200:301-309.

180. Manya H., Inomata M., Fujimori T., Dohmae N., Sato Y., Takio K., Nabeshima Y., Endo T. 2002. KLOTHO protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain. *JBC Papers in Press.* 277:35503-35508.

181. Saito Y., Nakamura T., Ohyama Y., Suzuki T., Iida A., Shiraki-Iida T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Kurabayashi M., Nagai R. 2000. In vivo KLOTHO gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 276:767-772.
182. Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., et al.1998. KLOTHO protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 248:324-329.
183. Okada S., Yoshida T., Hong Z., Ishii G., Hatano M., Kuro O.M., et al. 2000. Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (KLOTHO) mice. *Int.Immunol.* 12:861-871.
184. Mori K., Yahata K., Mukoyama M., Suganami T., Makin H., Nagae T., et al. 2000. Disruption of KLOTHO gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*278:665-670.
185. Xu Z.L., Gao H., Ou-Yang K.Q., Cai S.X., Hu Y.H. 2004. Establishment of a cell-based assay to screen regulators for KLOTHO gene promoter. *Acta Pharmacol Sin.* 25(9):1165-70.
186. Ogata N., Matsumura Y., Shiraki M., Kawano K., Koshizuka Y., Hosoi T., et al. 2002. Association of KLOTHO gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone.* 31:37-42.
187. Weyand C. M., Fulbright J. W., and Goronzy J. J. 2003. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp. Gerontol.* 38(8), 833.
188. Goronzy J. J., and Weyand C. M. 2005.Rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 204:55-73., 55.

189. Swain S., Clise-Dwyer K., and Haynes L. 2005. Homeostasis and the age-associated defect of CD4 T cells. *Semin. Immunol.* 17(5), 370.
190. Hasler P. and Zouali M. 2005. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol.* 233(2), 102.
191. Pawelec G. et al., 2005. Human immunosenescence: is it infectious?. *Immunol. Rev.* 205:257-68., 257.
192. Vijg J. and Suh Y. 2005. Genetics of longevity and aging. *Annu. Rev. Med.* 56:193-212., 193. Vallejo N. et al., 2002. Molecular basis for the loss of CD28 expression in senescent T cells. *J. Biol. Chem.* 277(49), 46940.
193. Vallejo N. et al., 2002. Molecular basis for the loss of CD28 expression in senescent T cells. *J. Biol. Chem.* 277(49), 46940.
194. Chang Q. et al. 2005. The beta-glucuronidase KLOTHO hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 310(5747), 490.
195. Cui J. et al. 2002. CaT1 contributes to the stores-operated calcium current in Jurkat T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 277(49), 47175.
196. Martinis M. De, et al. 2005. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* 579(10), 2035 .

9. STRESZCZENIE

W dostępnej literaturze fachowej istnieją znaczne rozbieżności, dotyczące właściwości (w tym zmian fenotypu i dynamiki proliferacji), a także przyczyn zaburzeń czynności limfocytów T osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (R.Z.S.). Podnoszona jest możliwość przedwczesnego starzenia się limfocytów T, jako jednej z przyczyn lub konsekwencji choroby, na co istnieją częściowe dowody doświadczalne. Jednym ze zjawisk należących zarówno do obrazu R.Z.S., jak i do procesu starzenia się limfocytów T, jest częściowa lub całkowita utrata ekspresji zasadniczej cząsteczki ko-stymulatorowej – CD28, niezbędnej dla prawidłowej proliferacji tych komórek. W niniejszej pracy, postanowiłam porównać parametry dynamiki proliferacji *in vitro* a także prześledzić wielkość ekspresji wybranych genów mogących wpływać na dynamikę proliferacji limfocytów T CD4⁺ osób chorych na R.Z.S i zdrowych w różnym wieku.

Do oceny parametrów proliferacji zastosowałam cytometryczną technikę DCT i wykazałam, że podziały mitotyczne stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 *in vitro* limfocytów CD4⁺CD28⁺ (ale nie CD4⁺CD28⁻) osób cierpiących na R.Z.S. rozpoczynają się znamienne później w porównaniu do komórek osób zdrowych, co wynika z wydłużenia czasu od stymulacji do wejścia komórek w cykl podziałowy ($G_0 \rightarrow G_1$) i jest analogiczne do uprzednich obserwacji dotyczących zdrowych osób w podeszłym wieku, dla których wykazano zależność tego parametru od poziomu ekspresji CD28.

Wykazałam również, że czas trwania pojedynczego cyklu podziałowego jest znamienne krótszy, natomiast średnia liczba podziałów na komórkę dzielącą się wyższa w limfocytach CD4⁺ u chorych, niż w limfocytach zdrowych osób. Również w tym przypadku zjawiska dotyczące komórek osób chorych na R.Z.S. są analogiczne do obserwowanych u zdrowych osób w podeszłym wieku.

Powyższe obserwacje mogą świadczyć o przyspieszonym starzeniu się komórek układu immunologicznego u chorych. Potwierdzać to może moja obserwacja w badanej grupie chorych na R.Z.S. niezamienne statystycznie zmniejszenia odsetka komórek CD4⁺CD28⁺ i wzrost CD4⁺CD28⁻, w porównaniu do

osób zdrowych, analogicznego do opisywanego przez innych autorów u zdrowych osób w podeszłym wieku.

Wykazałam także, istotny statystycznie wzrost odsetka komórek CD4⁺/HLA-DR⁺ i CD4⁺CD25⁺ i obniżenie odsetka limfocytów CD4⁺CD69⁺ w grupie osób chorych z R.Z.S. w porównaniu do zdrowych ochotników, co wskazuje na toczący się proces aktywacji limfocytów T u tych chorych.

W pracy wykazałam, że istnieje ścisły związek pomiędzy obniżeniem ekspresji CD28 na limfocytach CD4⁺ u osób ze zdiagnozowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów a obniżeniem ekspresji genów wybranych na podstawie obecności w ich obszarze promotorowym lub regulatorowym sekwencji DNA homologicznej do sekwencji „alfa” (α) obecnej w minimalnym promotorze CD28 i niezbędnej dla jego prawidłowej ekspresji. Geny te to: KLOTHO („hormon starzenia” o aktywności β -glukuronidazy), RAR β 2 (receptor kwasu retinowego) i GRAP-2 (cząsteczka adapterowa w procesie transdukcji sygnału w limfocytach T).

Wykazałam, że ekspresja KLOTHO na poziomie mRNA w spoczynkowych ludzkich limfocytach CD4⁺ zmniejsza się proporcjonalnie do postępującego wieku u osób zdrowych, natomiast jest bardzo silnie obniżona (poniżej zakresu wykrywalności techniką RT-PCR i na granicy wykrywalności techniką PCR czasu rzeczywistego) w komórkach CD4⁺ pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, niezależnie od ich wieku.

Wykazałam również, redukcję poziomu białka Klotho i spadek aktywności Klotho, jako β -glukuronidazy w limfocytach pacjentów z R.Z.S. Ani na aktywność transkrypcyjną genu KLOTHO, ani na aktywność enzymatyczną Klotho, jako β -glukuronidazy w limfocytach T pochodzących od pacjentów, nie miało wpływu leczenie farmakologiczne lub poziom aktywności choroby, badany przez DAS28.

Jak wykazałam, spadek ekspresji KLOTHO na poziomie mRNA koreluje z poziomem ekspresji CD28 na komórkach CD4⁺, zarówno w limfocytach zdrowych i limfocytach od pacjentów z R.Z.S.

KLOTHO jest uważane za element kontrolujący proliferację komórek poprzez interferencję z systemem białek p53/p21; dlatego obniżenie jego ekspresji w komórkach CD4⁺ osób w podeszłym wieku i chorych na R.Z.S. może wpływać na obserwowane przeze mnie zaburzenia proliferacji tych komórek.

W pracy wykazałam także, obniżenie ekspresji genu $RAR\beta 2$ u starszych osób zdrowych w porównaniu do osób zdrowych młodych i u osób chorych w porównaniu do osób zdrowych. Kwas retinowy, będący ligandem receptora $RAR\beta 2$, wpływa hamująco na proliferację wielu typów komórek, a więc stwierdzenie spadku ekspresji jego receptora na limfocytach T może wiązać się z obserwowanymi zmianami dynamiki proliferacji (w szczególności skróceniem cyklu komórkowego) u chorych na R.Z.S. a także zdrowych osób w podeszłym wieku.

Ostatnim badanym w tej pracy genem, był $GRAP-2$. Wykazałam, że ekspresja tego genu w limfocytach $CD4^+$ jest wysoce heterogenna i nie zauważyłam istotnych różnic w ekspresji tego genu, ani u osób zdrowych, ani u osób z R.Z.S.

10. ABSTRACT.

There are still discrepancies in the available literature regarding the participation of CD4⁺ lymphocytes in the pathomechanism of rheumatoid arthritis (RA). They concern mostly phenotypical changes and proliferative dynamics of these cells. It is suggested that the CD4⁺ lymphocytes of RA patients undergo an accelerated aging, manifested for example by partial or total loss of CD28 from their surface. In this work I compared the dynamic proliferative parameters of in vitro stimulated CD4⁺ lymphocytes of RA patients and age-matched healthy individuals using the dividing cell tracking (DCT) flow cytometric technique. I have shown that CD4⁺CD28⁺ (but not CD4⁺CD28⁻) lymphocytes of RA patients require significantly more time to transit from G0 to G1 phase of the first cycle (suggesting the role of CD28 in controlling this phase of cell cycle), and that the duration of each cell cycle of CD4⁺ cells of the patients is shorter than that of age-matched healthy, especially for young group of patients. Both these observations are analogous to previously described differences in these parameters between the lymphocytes of healthy young and elderly individuals and support the hypothesis of accelerated aging of RA cells. I have also demonstrated an (although not statistically significant) increased proportion of CD4⁺CD28⁻ lymphocytes in the patients' peripheral blood, and some markers of T cell activation, including increased proportions of HLA-DR⁺ and CD25⁺ cells among the CD4⁺ population. Based on the knowledge on the specific nucleotide sequence called the α present in the promoter region of the CD28 gene and known to be necessary for its expression and functionally impaired in the lymphocytes of RA patients, I have searched the GENBANK for possible other genes possessing sequences homologous to α and found it in the KLOTHO (the 'aging hormone' with β -glucuronidase activity), RAR β 2 (the retinoic acid receptor affecting cellular proliferation and differentiation) and GRAP-2 (an adapter molecule specific for T cells). I have shown that both the expression of KLOTHO at mRNA and protein levels as well as its enzymatic activity is strongly reduced in the cells of healthy elderly and of all RA patients as compared to healthy young. The RA disease activity and type of pharmacological treatment had no influence on the phenomenon. Lowered KLOTHO expression was correlated with the decreased expression of CD28 and of RAR β 2. It was recently shown that KLOTHO interferes

with the p53/p21 protein system controlling the progression of the cell cycle; thus, its suppression in the RA cells might affect their proliferative dynamics. I have also shown similar reduction of RAR β 2 gene expression in the CD4⁺ cells of RA patients. Decreased activity of this retinoic acid receptor may be (partially) responsible for quickening of the cell cycle observed in the RA cells. Finally, I have found no differences in the expression of GRAP-2 between the cells of healthy and RA individuals regardless from their age.