ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ « ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ
ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ»**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗΣ ΟΔΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 10 ΑΠΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΜΠΟΥΜΠΑΛΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΠΑΤΡΑ 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ « ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ

ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗΣ ΟΔΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ

ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 10 ΑΠΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΜΠΟΥΜΠΑΛΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΠΑΤΡΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παληογιάννη Φωτεινή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δημητρακόπουλος Γεώργιος, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών

Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Παπαβασιλείου Αθανάσιος, Καθηγητής Βιοχημείας, Παν. Αθηνών

Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παληογιάννη Φωτεινή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών

Δημητρακόπουλος Γεώργιος, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών

Παπαβασιλείου Αθανάσιος, Καθηγητής Βιοχημείας, Παν. Αθηνών

Αναστασίου Ευάγγελος, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών

Ζαρκάδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας, Παν. Πατρών

Χρυστοφίδου Μυρτώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών

Κολονίτσου Φεβρονία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Παν. Πατρών

Στον Θάνο και στον Ανδρέα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	9
1.1.1 Φυσική και επίκτητη ανοσία	9
1.1.2 Φάσεις των ανοσοαπαντήσεων	12
1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	13
1.2.1 Τ-Λεμφοκύτταρα.....	14
1.2.2 Τ-Κυτταρικός Υποδοχέας	16
1.2.3.Ενεργοποίηση Τ Λεμφοκυττάρων	18
1.2.4 Υποπληθυσμοί Τ Λεμφοκυττάρων	22
1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	25
1.3.1 Ιντερλευκίνη-10 (IL-10).....	28
1.3.2.Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)	31
1.3.3 Ιντερλευκίνη-4(IL-4)	32
1.4 ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ	33
1.4.1 Σηματοδότηση μέσω υποδοχέων που δεσμεύουν G πρωτεΐνες	35
1.4.2 G-πρωτεΐνες.....	36
1.4.3.Ασβέστιο.....	37
1.Δημιουργία σημάτων που κινητοποιούν το ασβέστιο.....	39
2.Μηχανισμοί που αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβεστίο	39
3.Ασβεστιοεξαρτώμενες διεργασίες.....	40
4. Μηχανισμοί που απομακρύνουν το κυτταροπλασματικό ασβέστιο	42
1.4.3.1 Ασβέστιο και Τ λεμφοκύτταρα	44
1.4.3.2Καλμοδουλίνη	46
1.4.3.3.Ca/calmodulin-dependent protein kinase.....	49
1.4.3.4 CaM Kinase II και Τ λεμφοκύτταρα	52
1.4.3.5.CaMKIV.....	53
1.4.3.6.Καλσινευρίνη.....	55
1.5.ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	57
1.5.1 Μεταγραφικός παράγοντας MEF2.....	59
1.5.2. Μεταγραφικός παράγοντας CREB	62
1.5.3 Μεταγραφικός παράγοντας NF-kB	64
1.6 ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	64
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	67
1 ΥΛΙΚΑ.....	67
2 ΜΕΘΟΔΟΙ	73
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	73
2.1.1 Διαλύματα	73
2.1.2 Απομόνωση ανθρώπινων μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με χρήση διαλύματος Φικόλης	73
2.1.3 Μέτρηση κυττάρων και προσδιορισμός βιωσιμότητας	76
2.1.4 Διαχωρισμός Τ λεμφοκυττάρων	77
2.1.4.1Προετοιμασία Ερυθρών κυττάρων Προβάτου	77

2.1.4.2 Μέθοδος διαχωρισμού E-rosetting	78
2.1.5 Τεχνική απομάκρυνσης των μονοκυττάρων με τη χρήση L-λευκίν-μέθυλ-εστέρα (Leucine-methyl-ester).....	80
2.1.6 Διαχωρισμός υποπληθυσμού ανθρωπίνων μνημονικών Τ λεμφοκυττάρων μέσω στηλών μαγνητικού διαχωρισμού MACS	80
2.1.7 Σήμανση κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα για ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής.	82
2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	83
2.2.1 Διέγερση φυσιολογικών ανθρωπίνων Τ κυττάρων	83
2.2.1.1 Ακίνητοποίηση μονοκλωνικού αντισώματος του Τ κυτταρικού υποδοχέα σε φρεάτια επώασης.	84
2.2.1.2 Διέγερση Τ λεμφοκυττάρων παρουσία rhIL-2	84
2.2.2 Προσδιορισμός επιπέδων κυτταροκινών (Ιντερλευκίνης-10, Ιντερλευκίνης-2 και Ιντερλευκίνης-4) σε υπερκείμενα φυσιολογικών Τ λεμφοκυττάρων ή Τ λεμφοκυτταρικών σειρών.	84
ΚΑΛΣΙΝΕΥΡΙΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ CaM KinaseII ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	86
2.3.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα	86
2.3.2 Έλεγχος ποιότητας νουκλεϊνικών οξέων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	87
2.3.3. Προσδιορισμός επιπέδων παραγωγής mRNA ειδικού για την Ιντερλευκίνη-10 από φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα	88
2.3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase chain reaction)	89
2.3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	91
2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ	93
2.4.1 In vivo έλεγχος ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων και υποκινητών	93
2.4.1.1 Μετασχηματισμός στελέχους E.coli με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (transformation).....	93
2.4.1.2 Καλλιέργεια/Πολλαπλασιασμός μετασχηματισμένων κυττάρων	93
2.4.1.3 Απομόνωση πλασμιδίων με στήλες καθαρισμού.....	94
2.4.1.4 Έλεγχος ποιότητας και ειδικότητας του πλασμιδιακού DNA	95
2.4.1.5 Μέθοδος διαμόλυνσης Τ λεμφοκυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA (transfection by electroporation).....	96
2.4.1.6 Πλασμίδια	98
2.4.1.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης πυρηνικών εκχυλισμάτων με μεθοδολογία BRADFORD.....	99
2.4.1.8 Έλεγχος αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης	100
2.4.2 In vitro έλεγχος δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων	102
2.4.2.1 Σήμανση του 5' άκρου των ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών DNA (5' end labeling)	102
2.4.2.2 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	103
2.4.2.3 Έλεγχος δέσμησης πυρηνικών πρωτεϊνών σε τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων	104
2.4.2.4 DNA consensus ανιχνευτές.....	107
2.4.3 Έλεγχος σημείων πρόσδεσης και προσδιορισμός δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή του γονιδίου της IL ₁₀	107
3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ	108
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	109
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ & ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	109

4.1.1. Επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II στο στάδιο της πρωτεϊνοσύνθεσης της IL-10.	109
4.1.2. Η μείωση της παραγωγής της IL-10 μέσω των αναστολέων CsA ΚΑΙ KN-62 από φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα δεν διαμεσολαβείται από την IL-2.....	113
4.1.3. In vivo μελέτη της επίδρασης της καλσινευρίνης και CaM-Kinase II στην παραγωγή IL-10 μέσω υπερέκφρασης των γονιδίων τους σε ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα.....	114
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΚΑΛΣΙΝΕΥΡΙΝΗ ΚΑΙ CaM KINASE II ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	115
4.2.1. Επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II στο στάδιο παραγωγής mRNA της IL-10.....	115
4.2.2. Η καλσινευρίνη και η CaM Kinase II αυξάνουν εκλεκτικά τη ενεργότητα του υποκινητή IL-10 στα φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα.....	116
4.2.3. Η CaM Kinase II μειώνει την ενεργότητα των υποκινητών της IL-2 και της IL-4	118
4.2.4 Η αύξηση του ασβεστίου αυξάνει την ενεργότητα των 500 πρώτων βάσεων του υποκινητή της IL-10	120
4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΣΗΜΕΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΙΣ 500 ΠΡΩΤΕΣ ΒΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΗΣ IL-10 ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ CONSITE.....	122
4.4. In vivo ΚΑΙ in vitro ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	125
4.4.1 Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου αυξάνει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 in vivo.....	125
4.4.2 Η CsA και το KN-62 μειώνουν την δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 in vitro.....	128
4.4.3 Η CaM K II μειώνει την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων NF-kB και CREB.....	129
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
5.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	132
5.1.1 Παραγωγή κυτταροκινών από τα εν ηρεμία Τ λεμφοκύτταρα	132
5.1.2. Παραγωγή IL-10 από διεγερμένα Τ λεμφοκύτταρα	132
5.2 ΑΣΒΕΣΤΙΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	134
5.2.1 Ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της παραγωγής πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 από φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα	134
5.2.2 Η ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 από φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα δεν είναι IL-2-εξαρτώμενη	135
5.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΤΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	136
5.3.1 Ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση του υποκινητή της IL-10 σε φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα	136
5.3.2 Επίδραση της CaM Kinase II στην ενεργότητα των υποκινητών της IL-2 και της IL-4.....	137
5.3.3 Ασβέστιο -εξαρτώμενη ρύθμιση του σταθερού mRNA της IL-10 από φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα.....	138
5.3.4 Ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση τμημάτων του υποκινητή της IL-10 από φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα.....	139
5.4 Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ MEF2 ΚΑΙ CREB ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ IL-10 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	141
5.4.1 In vivo μελέτη του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στον υποκινητή της IL-10.....	141

5.4.2 Επίδραση της CaM Kinase II στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2.....	142
5.4.3 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα CREB	143
5.4.4 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ	144
6 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	145
7 ABSTRACT	147

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ανοσία είναι η αντίσταση του οργανισμού σε μια νόσο και ειδικότερα σε ένα λοιμώδες νόσημα. Το άθροισμα των κυττάρων, ιστών και μορίων που μεσολαβούν την αντίσταση σε λοιμώξεις ονομάζεται ανοσοποιητικό σύστημα και η συντονισμένη αντίδραση των κυττάρων και των μορίων αυτών ονομάζεται ανοσοαπάντηση ή ανοσοαπόκριση. Ανοσολογία είναι η μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος και των απαντήσεων του στους εισβάλλοντες παθογόνους μικροοργανισμούς. Η φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι να αναχαιτίζει τις λοιμώξεις και να εξαλείφει τις ήδη εγκατεστημένες λοιμώξεις.

Η σπουδαιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος για την υγεία υποδεικνύεται από την παρατήρηση ότι άτομα με ανεπαρκείς ανοσοαπαντήσεις είναι ευπαθή σε σοβαρές ή και απειλητικές για την ζωή τους λοιμώξεις. Αντίστροφα, η διέγερση της ανοσοαπάντησης κατά των μικροβίων με τον εμβολιασμό είναι η πλέον αποτελεσματική μέθοδος για την προστασία των ατόμων από τις λοιμώξεις και η μοναδική προσέγγιση που οδήγησε στην παγκόσμια εξάλειψη της ευλογιάς. Η εμφάνιση του συνδρόμου της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τη δεκαετία του 1980, υπογράμμισε με τραγικό τρόπο τη σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος στην προστασία του ατόμου από τις λοιμώξεις. Ωστόσο, η σημασία της ανοσολογίας εκτείνεται και πέρα από τα λοιμώδη νοσήματα. Η ανοσοαπάντηση αποτελεί το μεγαλύτερο εμπόδιο για την επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνων, θεραπεία που εφαρμόζεται όλο και συχνότερα σε ανεπάρκειες οργάνων. Σε πολλά κακοήθη νοσήματα γίνονται προσπάθειες θεραπείας, με διέγερση της ανοσοαπάντησης κατά των καρκινικών κύτταρων. Επιπλέον, ακατάλληλες ανοσοαπαντήσεις είναι η αιτία πολλών νοσημάτων με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα.

1.1.1 Φυσική και επίκτητη ανοσία

Οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή περιλαμβάνουν τη φυσική ανοσία, που μεσολαβεί την αρχική φάση της προστασίας απέναντι στις λοιμώξεις, και την επίκτητη ανοσία, που αναπτύσσεται πιο αργά και μεσολαβεί το όψιμο, αλλά και πιο

αποτελεσματικό, στάδιο της άμυνας απέναντι στα μικρόβια. Ο όρος φυσική ανοσία αναφέρεται στο γεγονός ότι ο τύπος αυτός της άμυνας του ξενιστή υπάρχει πάντα σε υγιή άτομα, έτοιμος είτε να σταματήσει την είσοδο των μικροοργανισμών ή και να απομακρύνει άμεσα όσους κατάφεραν να εισέλθουν στους ιστούς του ξενιστή. Επίκτητη ανοσία είναι ο τύπος της άμυνας του ξενιστή που διεγείρεται από τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν στους ιστούς, και προσαρμόζεται ειδικά στο είδος του παθογόνου.

Η μη ειδική ανοσία αποτελεί χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των ζωικών και φυτικών οργανισμών και δεν διαθέτει ειδικότητα, με αποτέλεσμα να μην είναι εξειδικευμένη για διαφορετικά είδη παθογόνων. Σημαντικοί μεσολαβητές της μη ειδικής ανοσίας είναι διάφοροι φυσικοί φραγμοί, μη εξειδικευμένα λεμφοκύτταρα γνωστά ως φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα, ένα σύμπλοκο περίπου 20 πρωτεϊνών, γνωστό ως το σύστημα του συμπληρώματος και η αντίδραση φλεγμονής στην οποία συμμετέχουν πολλά είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε συνδυασμό με άλλες ουσίες. Οι μεσολαβητές της μη ειδικής ανοσίας, με διαδοχική σειρά αντιδράσεων, καταστρέφουν τους εισβολείς και επιδιορθώνουν τους προσβληθέντες ιστούς (Abbas & Lichtman, 2001), (Goldsby RA, 2004).

Στην ειδική ανοσία συμμετέχουν όργανα, διάσπαρτοι ιστοί και ανεξάρτητα κύτταρα με απώτερο σκοπό την προστασία των οργανισμών από μολυσματικούς παράγοντες, τα τοξικά τους προϊόντα και ξένα υλικά, για την πλήρη αντιμετώπιση των οποίων δεν επαρκεί η μη ειδική ανοσία (Abbas & Lichtman, 2001).

Σε αντίθεση με τη μη ειδική ανοσία που χαρακτηρίζεται από μη εξειδικευμένη αντίδραση του οργανισμού προς όλα τα παθογόνα, η ειδική ανοσία χαρακτηρίζεται από μεγάλη διάρκεια μνήμης έναντι ξένων εισβολέων, και από τη δυνατότητα αναγνώρισης και διάκρισης με υψηλή εξειδίκευση ανάμεσα στο 'ξένο' και το 'εαυτό' βιομόριο. Η επιλεκτική εξάλειψη των ανοσοαποκρίσεων του οργανισμού για τα δικά του βιομόρια οδηγεί σε ανοσοανοχή. Αν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν έχει αυτή την ικανότητα, τότε προκαλούνται αυτοάνοσες αντιδράσεις (autoimmune reactions) γεγονός που συμβαίνει σε ορισμένες καταστάσεις όπως στην απόρριψη μοσχευμάτων καθώς και σε αυτοάνοσα νοσήματα (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Σημαντική προϋπόθεση για την έναρξη μιας ανοσοαπόκρισης είναι η αναγνώριση από τον οργανισμό πρωτεϊνών, υδατανθράκων, νουκλεϊκών οξέων ή λιπιδίων, προερχόμενα από τον ξένο οργανισμό και τα οποία είναι γνωστά ως αντιγόνα (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Εικόνα 1-1. Σύγκριση ανάμεσα στη Φυσική και την επίκτητη ανοσία ως προς τα κύτταρα που συμμετέχουν, βασικές λειτουργίες τους. (RIKEN Yokohama Institute)

Όταν πλέον τα παθογόνα αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα οι ανοσοαποκρίσεις του προσβληθέντος οργανισμού διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με τη φύση τους. Στην πρώτη κατηγορία, ανήκει η κυτταρική ανοσία, κατά την οποία εξειδικευμένα κύτταρα αντιδρούν κατευθείαν και καταστρέφουν ξένα αντιγόνα που παρουσιάζονται στην επιφάνεια άλλων κυττάρων του οργανισμού. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει η χυμική ανοσία, κατά την οποία η ανοσοαπόκριση πραγματοποιείται με τη διαμεσολάβηση εξειδικευμένων πρωτεϊνών, γνωστών ως αντισώματα. Τα αντισώματα κυκλοφορούν στο αίμα και στα άλλα υγρά και εκκρίματα του σώματος, αναγνωρίζουν και δεσμεύονται ειδικά με τα προερχόμενα από παθογόνα αντιγόνα, τα παγιδεύουν και προάγουν την καταστροφή και την απομάκρυνση τους μέσω ειδικών για την διαδικασία αυτή κυττάρων, τα φαγοκύτταρα (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

1.1.2 Φάσεις των ανοσοαπαντήσεων

Οι ανοσοαπαντήσεις αποτελούνται από διαδοχικές φάσεις: την αναγνώριση του αντιγόνου, την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, την εξάλειψη του αντιγόνου, την εξασθένιση της απάντησης και τη μνήμη. Κάθε φάση αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη αντίδραση των λεμφοκυττάρων και άλλων στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της φάσης αναγνώρισης, παρθένα λεμφοκύτταρα, ειδικά για το συγκεκριμένο αντιγόνο, εντοπίζουν και αναγνωρίζουν τα αντιγόνα των μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων απαιτεί την ύπαρξη τουλάχιστον δύο τύπων σημάτων. Η πρόσδεση του αντιγόνου στους αντιγονικούς υποδοχείς των λεμφοκυττάρων (σήμα 1) απαιτείται για την έναρξη κάθε ανοσοαπάντησης. Επιπλέον, για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων χρειάζονται και σήματα (που ονομάζονται συλλογικά σήμα 2), τα οποία παρέχονται από τους ίδιους μικροοργανισμούς μέσω των ανοσοαπαντήσεων φυσικής ανοσίας έναντι των μικροοργανισμών. Η απαίτηση αυτή για ένα δεύτερο σήμα το οποίο επάγεται από τους μικροοργανισμούς, εξασφαλίζει το ότι οι επίκτητες ανοσοαπαντήσεις προκαλούνται από μικροοργανισμούς και όχι από αβλαβείς μη λοιμώδεις παράγοντες.

Κατά τη φάση της ενεργοποίησης, οι κλώνοι των λεμφοκυττάρων που έχουν συναντήσει αντιγόνα υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίρεση, δημιουργώντας ένα μεγάλο αριθμό απογόνων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κλωνική επέκταση ή κλωνικός πολλαπλασιασμός. Ορισμένα από τα λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται από κύτταρα που αναγνωρίζουν αντιγόνα σε κύτταρα που παράγουν ουσίες που θα εξαλείψουν το αντιγόνο και ονομάζονται δραστικά λεμφοκύτταρα. Για παράδειγμα τα Β λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα, ενώ ορισμένα Τ λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα που φονεύουν μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή. Τα δραστικά κύτταρα και τα προϊόντα τους εξουδετερώνουν τους μικροοργανισμούς συχνά με τη βοήθεια στοιχείων της φυσικής ανοσίας. Η φάση αυτή της εξάλειψης του αντιγόνου λέγεται δραστική φάση της ανοσοαπάντησης.

Από τη στιγμή που η λοίμωξη έχει αντιμετωπισθεί, το ερέθισμα για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων παύει να υπάρχει. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα περισσότερα από τα κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί από το αντιγόνο πεθαίνουν μέσω μιας ελεγχόμενης διαδικασίας κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται απόπτωση

και τα νεκρά κύτταρα απομακρύνονται γρήγορα από τα φαγοκύτταρα χωρίς να προκαλείται κάποια βλαπτική αντίδραση. Όταν η ανοσοαπάντηση υποχωρήσει, τα κύτταρα που παραμένουν είναι λεμφοκύτταρα μνήμης, τα οποία μπορεί να επιβιώσουν σε κατάσταση ηρεμίας για μήνες ή έτη, παραμένοντας ικανά να απαντήσουν γρήγορα σε μια νέα επαφή με τον μικροοργανισμό (Abbas & Lichtman, 2001).

1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η διέγερση τόσο της φυσικής όσο και της ειδικής ανοσίας εξαρτάται από τη δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων ή λευκοκυττάρων που προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Τα πρόδρομα αυτά κύτταρα δίνουν γένεση σε τρεις κατηγορίες κυτταρικών υποπληθυσμών, που με βάση την εμφάνιση τους στο φωτονικό μικροσκόπιο υποδιαιρούνται σε i) κοκκιοκύτταρα που

Εικόνα 1-2. Το λεμφικό σύστημα: Πρωτογενή ή κεντρικά όργανα: ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών. Δευτερογενή ή περιφερικά όργανα: λεμφαδένες, σπλήνας.

υποδιαιρούνται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα, ii) μονοκύτταρα, τα οποία εγκαταλείποντας το αίμα ωριμάζουν σε μακροφάγα και μαζί με τα ουδετερόφιλα αποτελούν τα κύρια φαγοκύτταρα του οργανισμού, και iii) λεμφοκύτταρα, τα οποία μετά την παραγωγή τους στο μυελό των οστών μεταναστεύουν στους ιστούς, κυκλοφορούν στα αιμοφόρα αγγεία και σε ένα εξειδικευμένο σύστημα οργάνων, το λεμφικό σύστημα, για να συμμετάσχουν στις

ανοσοαντιδράσεις. Το λεμφικό σύστημα αποτελείται από όργανα τα οποία διακρίνονται στα πρωτογενή ή κεντρικά και στα δευτερογενή ή περιφερικά λεμφικά όργανα. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα συμπεριλαμβάνονται ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών, ενώ στα δευτερογενή συμπεριλαμβάνονται οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και οι διάφοροι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων (Εικόνα 1-2) (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Τα λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε δυο διακριτές κατηγορίες:

- Τα Β λεμφοκύτταρα τα οποία όταν διεγερθούν μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα από τα οποία παράγονται τα αντισώματα, υπεύθυνα για τη χυμική ανοσοαπόκριση.
- Τα Τ λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1-3), τα οποία διαμεσολαβούν την κυτταρική ανοσοαπόκριση (Abbas & Lichtman, 2001).

Εικόνα 1-3 Ανθρώπινο Τ λεμφοκύτταρο: εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (scanning electron microscope – SEM). Copyright © 2007 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

1.2.1. Τ-Λεμφοκύτταρα

Τα πρόδρομα κύτταρα των Τ λεμφοκυττάρων μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο θύμο αδέν, όπου και ωριμάζουν. Τα διαφοροποιημένα στάδια ωρίμανσης των Τ λεμφοκυττάρων μπορούν να διακριθούν από τη διαφορική έκφραση στην επιφάνειά τους του συμπλόκου του Τ κυτταρικού υποδοχέα και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών γνωστών ως δεικτών επιφανείας (CD4, CD8 κ.α.). Η σύνθεση των δεικτών επιφανείας διαφοροποιείται μετά την ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Τα Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν ωριμάσει στο θύμο αδέν αλλά δεν έχουν συναντήσει ακόμα αντιγόνα, ονομάζονται παρθένα ή αθώα (naïve) λεμφοκύτταρα. Η συνάντηση Τ λεμφοκυττάρων-αντιγόνου πραγματοποιείται στα δευτερογενή λεμφικά

όργανα μετά από αλληλεπίδραση του αντιγόνου με τον T κυτταρικό υποδοχέα που υπάρχει στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων και ο οποίος έχει ειδικότητα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο (Abbas & Lichtman, 2001).

Εικόνα 1-4. Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση T λεμφοκυττάρων μετά από επιτυχημένη αναγνώριση ξένου αντιγόνου. (Nature Reviews1).

Η ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου γίνεται μέσω του μορίου του T κυτταρικού υποδοχέα (TCR: T Cell Receptor) σε απάντηση σε μια συγκεκριμένη αντιγονική μονάδα. Η επαφή του T κυτταρικού υποδοχέα με το αντιγόνο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη των ειδικών ανοσολογικών απαντήσεων. Ένα παρθένο T λεμφοκύτταρο που έρχεται σε επαφή με αντιγόνο, σταματά να μεταναστεύει και πολλαπλασιάζεται (Εικόνα 1-4). Το κύτταρο διαιρείται, δυο ή τέσσερις φορές κάθε 24 ώρες για τρεις με πέντε μέρες, ώστε από το αρχικό T λεμφοκύτταρο να δημιουργηθεί ένας κλώνος περίπου 1000 θυγατρικών κυττάρων πανομοιότυπης ειδικότητας (κλωνική έκπτυξη). Τα κύτταρα αυτά στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα ικανά να καταστρέψουν τα μολυσμένα κύτταρα ή να ενεργοποιήσουν άλλα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, μετά από μετανάστευση τους μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων στις περιοχές λοιμώξεως (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Μερικά από τα αντιγόνο-ειδικά κύτταρα που αναπτύσσονται από την κλωνική έκπτυξη των παρθένων T λεμφοκυττάρων, γνωστά ως μνημονικά T λεμφοκύτταρα (memory T cells), παραμένουν και μετά την απομάκρυνση του αντιγόνου και αποτελούν τη βάση της ανοσολογικής μνήμης, η οποία εξασφαλίζει μια πιο ταχεία και αποτελεσματική απόκριση σε μια δεύτερη συνάντηση με το ίδιο παθογόνο και συνεπώς διασφαλίζει ανοσία στον οργανισμό (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα επικοινωνούν με το περιβάλλον τους μέσω μιας σειράς εξειδικευμένων κυτταρικών υποδοχέων επιφάνειας, οι οποίοι

προσλαμβάνουν σήματα που επηρεάζουν την ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου από το αντιγόνο και άλλες απόψεις της T κυτταρικής βιολογίας (Abbas & Lichtman, 2001).

1.2.2. T-Κυτταρικός Υποδοχέας

Ο TCR αναγνωρίζει ως αντιγόνα μόνο πεπτίδια συνδεδεμένα με MHC μόρια, τα οποία του παρουσιάζονται από συγκεκριμένα κύτταρα -π.χ. δενδριτικά κύτταρα ή μακροφάγα, γνωστά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την έναρξη των ανοσοαποκρίσεων (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Πρόκειται για μια ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δυο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γνωστές ως α και β αλυσίδες, καθεμιά από τις οποίες αποτελείται από δύο περιοχές ομόλογες των περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Τα αμινοτελικά άκρα των δύο αλυσίδων αποτελούν τη μεταβλητή (V, Variable) περιοχή του μορίου και σχηματίζουν τη θέση πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου. Τα

Εικόνα 1-5. Το σύμπλοκο T κυτταρικού υποδοχέα/CD3 μορίου/ζ αλυσίδας. (Abbas & Lichtman, 2001)

καρβοξυτελικά τμήματα αποτελούν τη σταθερή (C, Constant) περιοχή του μορίου και χρησιμεύουν για τη σύνδεσή του υποδοχέα με την κυτταρική μεμβράνη, συμμετέχοντας ταυτόχρονα στην έναρξη της δραστηρικής λειτουργίας του κυττάρου (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Για την έκφραση του TCR στη μεμβράνη του T κυττάρου, είναι απαραίτητη η μη ομοιοπολική σύνδεσή του με ένα σύμπλεγμα τριών τουλάχιστον διαμεμβρανικών

πολυπεπτιδίων γνωστών ως μόριο CD3 (Εικόνα 1-5). Το CD3 αποτελείται από τρεις πολυπεπτικές αλυσίδες γ, δ και ε, και είναι ειδικό για τα Τ κύτταρα. Οι αλυσίδες του TCR και του CD3, συνδέονται στενά και με ένα άλλο μόριο, που αποτελείται από δύο ζ αλυσίδες που περιέχουν εξειδικευμένες περιοχές, τα ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motifs). Στα αμινοξέα που απαρτίζουν αυτές τις δομές γίνεται η φωσφορυλίωση που αποτελεί το πρώτο συμβάν στη σηματοδότηση που καταλήγει στο εσωτερικό των Τ λεμφοκυττάρων (Reth et al., 2004). Η ενεργοποίηση του Τ λεμφοκυττάρου πυροδοτεί μια σειρά βιοχημικών αλληλεπιδράσεων, συγκεκριμένα φωσφορυλιώσεων, οι οποίες είναι ικανές να μεταφέρουν το σήμα ενεργοποίησης από την επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα του. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές διαμεσολαβούνται από πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (protein tyrosin kinases-PTK) και ρυθμίζονται ποιοτικά και ποσοτικά από φωσφατάσες τυροσινών και άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες.

Έτσι, ένα από τα άμεσα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο Τ λεμφοκύτταρο αμέσως μετά την δέσμευση ενός αντιγόνου στον Τ κυτταρικό υποδοχέα είναι η

Εικόνα 1-6. Α) Ο μη ενεργοποιημένος Τ κυτταρικός υποδοχέας. Β) Τα πρώιμα στάδια μεταγωγής σήματος που έπονται της ενεργοποίησης του Τ κυτταρικού υποδοχέα.

ενεργοποίηση της οικογένειας των Src-κινάσων, και συγκεκριμένα της Lck, η οποία φωσφορυλιώνει το μοτίβο ITAM που υπάρχει στις ζ αλυσίδες του συμπλόκου του Τ κυτταρικού υποδοχέα και του CD3 (Εικόνα 1-6). Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ZAP-70 η οποία μεταφέρει το σήμα ενεργοποίησης εσωτερικότερα στο Τ λεμφοκύτταρο. Τα παραπάνω γεγονότα, διαδραματίζονται σε

εξειδικευμένες μικροπεριοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του T λεμφοκυττάρου που περιέχουν υψηλές ποσότητες χοληστερόλης και γλυκοσφιγκολιπιδίων και είναι γνωστές ως lipid rafts (Reth et al., 2004).

Ένα είδος TCR που εκφράζεται στην επιφάνεια των αθώων θυμοκυττάρων, καθώς και σε μικρό ποσοστό περιφερικών T κυττάρων, αποτελείται από γ και δ αντί α και β αλυσίδες. Ο γ/δ TCR εμφανίζει περιορισμένη ετερογένεια σε σχέση με τον α/β, με τον οποίο ουδέποτε συνεκφράζεται στο ίδιο κύτταρο. Τα κύτταρα που εκφράζουν γ/δ TCR, βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ορισμένους επιθηλιακούς ιστούς και διαφέρουν από εκείνα που εκφράζουν α/β TCR ως προς τους μηχανισμούς αναγνώρισης του αντιγόνου, τις συνθήκες ενεργοποίησης και το ρόλο τους στην ανοσιακή απάντηση (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Εικόνα 1-7. Αντιγονοπαρουσίαση από τα APCs, μέσω των MHC I και MHC II μορίων, στα T λεμφοκύτταρα. (Source: Cancer Control 2003, H. Lee)

1.2.3.Ενεργοποίηση T Λεμφοκυττάρων

Τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν μόνο πεπτιδικά αντιγόνα τα οποία εκτίθενται από τα MHC μόρια της επιφανείας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Τα MHC μόρια αποτελούν μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διακρίνονται σε δύο τάξεις, την τάξη I (MHC I) και την τάξη II (MHC II):

- Τα MHC μόρια τάξης I, είναι γλυκοπρωτεΐνες που μεσολαβούν την παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων, αποτελούμενων από 8-9 αμινοξέα, στα CD8 T λεμφοκύτταρα. Τα πεπτίδια προέρχονται από ενδογενείς πρωτεΐνες που έχουν συντεθεί ενδογενώς και έχουν διασπαστεί ενζυμικά στο κυτταρόπλασμα, (Εικόνα 1-7).
- Τα MHC μόρια τάξης II, είναι γλυκοπρωτεΐνες που μεσολαβούν την παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων, που αποτελούνται από 13-18 αμινοξέα, στα CD4 T λεμφοκύτταρα. Τα πεπτίδια συνήθως προέρχονται

από ενδοκυτταρικά διασπασμένες εξωγενείς πρωτεΐνες, (Εικόνα 1-7) (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Η ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα, αποτελεί γεγονός υψίστης σημασίας για την επιβίωση του T λεμφοκυττάρου, καθώς μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα αποκρίσεις που κυμαίνονται από τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων ή την παραγωγή των κυτταροκινών έως την ανεργία και την απόπτωση. Ως ανεργία χαρακτηρίζεται η κατάσταση εκείνη κατά την οποία τα T λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν κατά την αντιγονο-παρουσίαση του κατάλληλου αντιγόνου τους (Romagnani, 2006).

Εικόνα 1-8. Ο υψιλής συγγένειας υποδοχέας της IL-2. Αποτελείται από 3 αλυσίδες, α, β και γ, εκ των οποίων η α αλυσίδα εκφράζεται μετά από ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου.

Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης του T λεμφοκυττάρου οδηγεί το T κύτταρο από τη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου στην G1 και ακολουθείται από τη συγκέντρωση διαφόρων μεμβρανικών μορίων ανάμεσα στα οποία και η α αλυσίδα του T κυτταρικού υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (IL-2 Receptor-IL-2R) καθώς και την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών π.χ. IL-2, IL-3, IL-4. Τα μη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν έναν χαμηλής συγγένειας IL-2 υποδοχέα, ο οποίος αποτελείται από β και γ αλυσίδες. Η σύνδεση αυτών με την νεο-συντεθείσα α αλυσίδα δημιουργεί έναν υποδοχέα υψιλής συγγένειας για την IL-2 (Εικόνα 1-8).

Έτσι, η IL-2, η οποία εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα, συνδέεται στον υποδοχέα αυξημένης συγγένειας και επάγει ένα σήμα πολλαπλασιασμού για τα ίδια τα κύτταρα (αυτοκρινές σύστημα πολλαπλασιασμού) (Cantrell et al., 1983). Αυτή η δράση της IL-2 οδηγεί στη μετάβαση του T κυττάρου από τη G1 φάση προς τη φάση S και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των υποδοχέων

υψηλής συγγένειας, οι οποίοι είναι παρόντες πάνω στα κύτταρα καθώς και από τη

Εικόνα 1-9. Η έκφραση του υψηλής συγγένειας IL-2 υποδοχέα μετά από ενεργοποίηση του Τ λεμφοκυττάρου αποτελεί σημαντικό γεγονός για τον πολλαπλασιασμό του.(Garland Science,2005).

διάρκεια της επαφής. Μετά τη διαίρεση και απουσία της IL-2, ο αριθμός των υποδοχέων μειώνεται και τα κύτταρα μπορούν να επανέλθουν στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου (Cantrell et al., 1984) (Εικόνα 1-9).

Η βέλτιστη ενεργοποίηση ενός Τ λεμφοκυττάρου προϋποθέτει δυο σήματα (Εικόνα 1-10). Το πρώτο σήμα δίδεται από το σύνολο των μορίων του Τ κυτταρικού υποδοχέα και το σύμπλοκο MHC/αντιγόνο και ευθύνεται για την ειδικότητα της ανοσοαπόκρισης. Το δεύτερο σήμα, γνωστό και ως συνδιέγερση, παρέχεται από συνδιεγερτικά μόρια στην επιφάνεια των αθών Τ λεμφοκυττάρων που συνδέονται με μόρια της επιφανείας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και ενισχύουν την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (Alegre et al., 2001; Frauwirth et al., 2002; Weaver et al., 2008).

Το CD28 αποτελεί το πρώτο συνδιεγερτικό μόριο στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων που αναγνωρίστηκε, αρχικά ως T44 και τελικά το 1987 ως CD28. πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη 44 kDa η οποία εκφράζεται σε 90 % των CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων και σε 50 % των CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο. Συνδέτες του CD28 στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων είναι τα μόρια

CD80 (B7.1) και CD86 (B7.2), των οποίων η έκφραση είναι απύσχα ή πολύ χαμηλή στα εν ηρεμία αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) αλλά επάγεται μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών. Συνοπτικά, το CD28 συνεργάζεται με το σήμα 1 χαμηλώνοντας τον ουδό της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων και επάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους, την παραγωγή κυτταροκινών, τη διαφοροποίηση τους σε Τ βοηθητικά κύτταρα (Weaver et al., 2008).

Ενώ αρχικά θεωρείτο πως η έλλειψη του δευτέρου σήματος ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων οδηγεί σε ανεργία, επακόλουθες μελέτες έδειξαν ότι ο ρόλος της συνδιέγερσης είναι ποσοτικός και όχι απόλυτος. Έτσι τα ισχυρά σήματα 1, μέσω Τ κυτταρικού υποδοχέα, βασίζονται λιγότερο στο δεύτερο σήμα ενεργοποίησης, μέσω CD28. Επίσης τα Τ διεγερμένα λεμφοκύτταρα αφού ενεργοποιηθούν έχουν μειωμένη ανάγκη για την συνδιέγερση συγκριτικά με τα αθώα Τ λεμφοκύτταρα (Weaver et al., 2008).

Εικόνα 1-10. Σημασία συνδιέγερσης στην ενεργοποίηση του Τ λεμφοκυττάρου. Α) Παρουσία μόνο του σήματος 1 το Τ λεμφοκύτταρο οδηγείται σε ανεργία. Β) Παρουσία και των 2 σημάτων ενεργοποίησης το Τ λεμφοκύτταρο ενεργοποιείται, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται.

Σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενός Τ λεμφοκυττάρου έχει επίσης ένα άλλο μόριο γνωστό ως CTLA-4 ή CD152. Το CTLA-4 αποτελεί ομόλογο του CD28 μορίου, χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης στα μόρια CD80 και CD86, και έχει ανασταλτική δράση ως προς τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων (Alegre et al., 2001; Bashian et al., 1997; Frauwirth et al., 2002).

Αφού ενεργοποιηθούν, τα Τ λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν πρωτεΐνες, γνωστές ως κυτταροκίνες, που ενεργούν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και

δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς, διεγείροντας τα κύτταρα και αλλάζοντας τη δραστηριότητά τους (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

1.2.4 Υποπληθυσμοί Τ Λεμφοκυττάρων

Τα Τ λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε υποπληθυσμούς ανάλογα με τη δράση τους. Τα Τ λεμφοκύτταρα που οι υποδοχείς τους δεσμεύονται με αντιγόνα που τους παρουσιάζονται από την ΜHC τάξη Ι ωριμάζουν σε κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (T_C : T cytotoxic cells), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία του μορίου CD8 στην επιφάνειά τους και φονεύουν με άμεσο μηχανισμό θανάτωσης κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ενδοκυττάρια παθογόνα ή εκφράζουν ξένα ή νεοπλασματικά αντιγόνα (Abbas & Lichtman, 2001) (Goldsby RA, 2004).

Τα Τ λεμφοκύτταρα των οποίων οι υποδοχείς συνδέονται με αντιγόνα σε σύμπλοκο με μόρια ΜHC τάξης ΙΙ ωριμάζουν σε βοηθητικά Τ κύτταρα (T_H : T helper cells). Κατά κανόνα φέρουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD4 και απαντούν στον αντιγονικό ερεθισμό με έκκριση κυτταροκινών που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση τόσο των ίδιων των Τ λεμφοκυττάρων όσο και των Β λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, για την πλήρη εξάλειψη των παθογόνων από τον οργανισμό. Τα βοηθητικά Τ κύτταρα υποδιαιρούνται σε δυο βασικές υποομάδες, γνωστές ως T_H1 και T_H2 , οι οποίες διαφέρουν ως προς τις λειτουργίες των κυττάρων τους και διαχωρίζονται με βάση τις κυτταροκίνες που αυτά εκκρίνουν (Εικόνα 1-11). Μια τρίτη υποομάδα βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων που περιγράφηκε τελευταία και

Εικόνα 1-11 Η επίδραση των κυτταροκινών στην διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.

έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον των επιστημών είναι γνωστή ως T_H17 (Romagnani, 2006).

Τα T_H1 κύτταρα θεωρούνται προφλεγμονώδη κύτταρα, εκκρίνουν ιντερλευκίνη-2 και ιντερφερόνη- γ και βοηθούν στην ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Τα T_H2 κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-4 (IL-4), ιντερλευκίνη-5 (IL-5), ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ιντερλευκίνη-10 (IL-10) και ιντερλευκίνη-13 (IL-13), επάγουν την ανοσολογική απόκριση που διαμεσολαβείται από τα B λεμφοκύτταρα και έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν αρνητικά τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις κυρίως μέσω της παραγωγής της IL-10. Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός ότι η διέγερση των T λεμφοκυττάρων παρουσία ιντερλευκίνης-12 οδηγεί σε φαινότυπο τύπου T_H1 αναστέλλοντας τον T_H2 φαινότυπο, ενώ η διέγερση τους παρουσία IL-4 οδηγεί σε φαινότυπο τύπου T_H2 και αναστέλλει τον T_H1 (Romagnani, 2006).

Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν επίσης σε κύτταρα T_H17 φαινότυπου αν ενεργοποιηθούν παρουσία IL-23 παραγόμενης από δενδριτικά κύτταρα ενώ η διαφοροποίησή τους αναστέλλεται παρουσία IL-4 παραγόμενης από τα T_H2 κύτταρα και IFN- γ παραγόμενης από τα T_H1 κύτταρα. Τα κύτταρα της T_H17 υποομάδας παράγουν IL-17 και IL-22 ενώ έχουν εμπλακεί στην παθογένεση φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου (Romagnani, 2006).

Μια άλλη υποομάδα των T λεμφοκυττάρων είναι τα T ρυθμιστικά κύτταρα. Πρόκειται για $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα, τα οποία πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, τις χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, τον καρκίνο καθώς και αλλεργίες.

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δυο κατηγορίες, τα τύπου I ρυθμιστικά T κύτταρα ($Tr1$) και τα φυσιολογικά ρυθμιστικά κύτταρα (nTreg: naturally occurring Treg), οι οποίες διαφέρουν ως προς σημαντικά βιολογικά χαρακτηριστικά τους συμπεριλαμβανομένων της παραγωγής κυτταροκινών, των δεικτών επιφανείας τους και τον τρόπο δράσης τους (O'Garra et al., 2004a; Rouse, 2007; Wu et al., 2007).

Τα τύπου I ρυθμιστικά T κύτταρα ($Tr1$ cells) ορίζονται ως $CD4^+$ κυρίως T κύτταρα η διαφοροποίηση των οποίων επάγεται από πρόδρομα αθώα κύτταρα παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης IL-10 και παράγουν IL-10 με ρυθμιστική δράση.

Επίσης η διαφοροποίηση τους μπορεί να επαχθεί από διαφοροποιημένα T_H1 και T_H2 μετά από συνθήκες χρόνιας διέγερσης, στην περίπτωση αυτή όμως η παραγωγή κυτταροκινών τους περιορίζεται μόνο στην IL-10. Κατά την ενεργοποίηση τους παράγουν μεταβαλλόμενες ποσότητες των κυτταροκινών TGF- β , IL-5 χαμηλές ποσότητες IFN- γ , καθόλου IL-4 και μεγάλες ποσότητες IL-10, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί μόλις 4 ώρες μετά την ενεργοποίηση τους και να φτάσει τη μέγιστη συγκέντρωση της 12 με 24 ώρες αργότερα (O'Garra et al., 2004a; Wu et al., 2007).

Τα φυσιολογικά ρυθμιστικά κύτταρα (nregT ή CD4+CD25+Foxp3+ T cells) συνεκφράζουν στην επιφάνεια τους σαν δείκτη επιφανείας και την α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 (IL-2R α) (CD25) για τούτο και χαρακτηρίζονται από τον φαινότυπο CD4+CD25+. Δεδομένου του ότι η επιλογή τους πραγματοποιείται στο θύμο αδένα, έχουν προδιαγεγραμμένη αντιγονική ειδικότητα και μεταναστεύουν στο περιφερικό αίμα ως ώριμα κύτταρα. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ασκούν τις δράσεις τους μέσω κυτταρικών αλληλεπιδράσεων (cell to cell contact) και όχι μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από κυτταροκίνες και εκφράζουν συνεχώς τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 (forkhead box transcription factor). Αντιθέτως, τα Tr1 επάγουν την έκφραση του Foxp3 στα CD4 T λεμφοκύτταρα μόνο μετά από ενεργοποίηση τους (O'Garra et al., 2004a; Rouse, 2007). Ο Foxp3 θεωρείται σημαντικός παράγοντας για τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων σε T ρυθμιστικά κύτταρα (Jonsson et al., 2005; O'Garra et al., 2004a).

Το εάν ένα T λεμφοκύτταρο θα διαφοροποιηθεί σε βοηθητικό ή ρυθμιστικό T λεμφοκύτταρο μετά από την αλληλεπίδραση του με το αντιγόνο, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και εξαρτάται από τη συγγένεια του για τον T κυτταρικό υποδοχέα, τις συνδιεγερτικές ιδιότητες των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και τις κυτταροκίνες που υπάρχουν στο μικρό-περιβάλλον που λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων (Horwitz et al., 2003).

Τα μνημονικά T λεμφοκύτταρα, τέλος, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην προφύλαξη του οργανισμού από επαναλαμβανόμενες επαφές του με τα ίδια παθογόνα, μέσω αποκρίσεως που χαρακτηρίζεται κυρίως από την άμεση παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων δραστικών μορίων, των κυτταροκινών. Η διαφοροποίηση τους ξεκινά από τα αθώα T λεμφοκύτταρα όταν αυτά διεγερθούν μέσω του συμπλόκου αντιγόνου-MHC-T κυτταρικού υποδοχέα και συνδιεγερτικών μορίων. Μετά την ενεργοποίηση τους μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα ενεργοποιούνται οι βιοχημικές αντιδράσεις στο εσωτερικό του κυττάρου που έχουν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή

της παραγωγής της IL-2 και την επακόλουθη ρύθμιση γονιδίων στόχων που οδηγούν στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων σε μνημονικά T λεμφοκύτταρα, μέσω διαδικασιών που παραμένουν άγνωστοι παρόλο που ερευνώνται διεξοδικά από διάφορα εργαστήρια (Chandok et al., 2004).

Τα μνημονικά T λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση στην επιφάνεια τους μιας φωσφατάσης τυροσίνης γνωστή ως CD45. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, οι φωσφατάσες τυροσίνης αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της φωσφορυλίωσης των τυροσινών μετά την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω απευθείας εξουδετέρωσης της ενεργότητας των κινασών. Το CD45 συναντάται σε αφθονία στα T λεμφοκύτταρα και σε πολλαπλά ισομερή. Τα μνημονικά T λεμφοκύτταρα εκφράζουν το χαμηλού μοριακού βάρους ισομερές CD45RO, ενώ τα αθώα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν τα CD45RA (ανθρώπινα) και CD45RB (ποντικίσια) ισομερή. Τα δραστικά T λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να εκφράζουν οποιοδήποτε από τα ισομερή ανάλογα με το σήμα ενεργοποίησης τους (Chandok et al., 2004).

1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής ανοσοαπάντησης εμπλέκει λεμφοειδή κύτταρα, κύτταρα φλεγμονής και αιμοποιητικά κύτταρα. Οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων αυτών ρυθμίζονται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που ονομάζονται κυτταροκίνες, λόγω του ρόλου τους στις αλληλεπιδράσεις κύτταρου με κύτταρο. Οι κυτταροκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του αίματος, ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Οι πρωτεΐνες αυτές ασκούν επικουρικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των ανοσοδραστικών κυττάρων και μερικές από αυτές, μάλιστα, διαθέτουν την ικανότητα ανάπτυξης άμεσης δράσης (Goldsby R., 2003)..

Οι κυτταροκίνες δεσμεύονται σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων στόχων, πυροδοτώντας μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος, με τελικό αποτέλεσμα τη μεταβολή του προτύπου της γονιδιακής τους έκφρασης. Η ευαισθησία ενός κυττάρου στόχου στην επίδραση μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης εξαρτάται από την παρουσία κατάλληλου ειδικού υποδοχέα στη μεμβράνη του. Γενικά οι κυτταροκίνες και οι υποδοχείς τους επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια στη μεταξύ τους σύνδεση, με σταθερές αποσύνδεσης που κυμαίνονται από 10^{-10} έως 10^{-12} M. Εξαιτίας

της υψηλής συγγένειας, οι κυτταροκίνες ασκούν τη βιολογικής τους δράση σε συγκεντρώσεις των picomol .

Μια συγκεκριμένη κυτταροκίνη είναι δυνατό να συνδέεται με υποδοχείς, στην επιφάνεια του ίδιου του κυττάρου που την παράγει, εκδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο αυτοκρινή δράση. Είναι δυνατόν, επίσης, να προσδένεται με υποδοχείς της επιφάνειας κυττάρων-στόχων που βρίσκονται σε μικρή απόσταση από το κύτταρο που την παράγει, εκδηλώνοντας παρακρινή δράση. Σε λίγες περιπτώσεις, μπορεί να προσδένονται σε κύτταρα-στόχους που βρίσκονται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος, παρουσιάζοντας ενδοκρινή δράση. Οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν την ένταση και τη διάρκεια μίας ανοσολογικής απόκρισης, μέσω διέγερσης ή αναστολής της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού και/ή της διαφοροποίησης διάφορων κυττάρων, καθώς και μέσω του ελέγχου έκκρισης αντισωμάτων ή άλλων κυτταροκινών.

Η σύνδεση μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης στα κατάλληλα κύτταρα προκαλεί αύξηση της έκφρασης υποδοχέων κυτταροκινών, καθώς και έκκριση άλλων κυτταροκινών που επηρεάζουν με τη σειρά τους, άλλα κύτταρα στόχους. Με αυτόν τον τρόπο οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται ακόμα και από ένα μικρό αριθμό λεμφοκυττάρων, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από ένα αντιγόνο, μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα αρκετών κυττάρων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς της ανοσολογικής απόκρισης. Για παράδειγμα, οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα T_H κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των B , των T_C και των φυσικών φονικών (NK) κυττάρων, καθώς και των μακροφάγων, των κοκκιοκυττάρων και των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, δραστηριοποιώντας έτσι ένα ολόκληρο δίκτυο αλληλεπιδρώντων κυττάρων (Gadina et al., 2001).

Οι κυτταροκίνες χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες του πλειοτροπισμού, της συνέργειας, του ανταγωνισμού και της επαγωγής φαινομένων ενίσχυσης, οι οποίες παρέχουν την δυνατότητα ρύθμισης της κυτταρικής δραστηριότητας με ένα συντεταγμένο και διαδραστικό τρόπο. Μία δεδομένη κυτταροκίνη, που παρουσιάζει διαφορετική βιολογική δράση σε διαφορετικά κύτταρα-στόχους, διαθέτει πλειοτροπική δράση. Η συνεργιστική δράση των κυτταροκινών λαμβάνει χώρα όταν η συνδυασμένη δράση δύο κυτταροκινών έχει ισχυρότερο αποτέλεσμα από το αντίστοιχο που προκαλείται όταν δρουν χωριστά. Σε μερικές περιπτώσεις, οι κυτταροκίνες παρουσιάζουν ανταγωνιστική συμπεριφορά και έτσι η δράση της μιας,

παρεμποδίζει ή αντισταθμίζει τα αποτελέσματα της δράσης της άλλης. Τα φαινόμενα ενίσχυσης εκδηλώνονται όταν η δράση μιας κυτταροκίνης σε ένα κύτταρο στόχο, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της παραγωγής μιας ή περισσότερων άλλων κυτταροκινών, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν άλλα κύτταρα-στόχους να παράγουν άλλες κυτταροκίνες (Goldsby et al., 2003).

Παρόλο που μία ποικιλία κυττάρων μπορεί να παράγει κυτταροκίνες, οι δύο κύριες πηγές παραγωγής είναι τα T_H κύτταρα και τα μακροφάγα. Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τους δύο αυτούς πληθυσμούς κυττάρων, ενεργοποιούν ένα ολόκληρο δίκτυο αλληλεπιδρώντων κυττάρων (Εικόνα 1.12). Μεταξύ των πολυάριθμων φυσιολογικών αποκρίσεων που προϋποθέτουν την εμπλοκή κυτταροκινών,

Εικόνα 1-12. Το δίκτυο των κυτταροκινών και η αλληλεπίδραση τους με άλλες κυτταροκίνες και κύτταρα.

περιλαμβάνονται η ανάπτυξη κυτταρομεσολαβητικής και χυμικής ανοσίας, η επαγωγή ανάπτυξης φλεγμονής, η ρύθμιση της αιμοποίησης, ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης και η διαδικασία επούλωσης τραυμάτων. Παρόλο που η ανοσολογική απόκριση σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο,

μπορεί να περιλαμβάνει την παραγωγή κυτταροκινών, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι κυτταροκίνες δρουν κατά μη αντιγονοειδικό τρόπο. Έτσι, μπορούν να επηρεάσουν οποιαδήποτε κύτταρα προσεγγίσουν, με την προϋπόθεση ότι τα τελευταία διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς και βρίσκονται σε μία φυσιολογική κατάσταση που τους επιτρέπει να αποκριθούν.

1.3.1 Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)

Η ιντερλευκίνη-10 (IL-10) αποτελεί μια ζωτικής σημασίας πλειοτρόπο κυτταροκίνη με ανοσορυθμιστικές ιδιότητες. Πρόκειται για μια κυτταροκίνη με ισχυρή αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση. Η IL-10 ανήκει στην τάξη II οικογένεια κυτταροκινών, η οποία εκτός από την IL-10 συμπεριλαμβάνει επίσης τις τύπου I Ιντερφερόνες και την Ιντερφερόνη-γ. Η ταξινόμηση της οικογένειας των κυτταροκινών της IL-10 βασίζεται σε μελέτες ανάλυσης αλληλουχίας και σε τρισδιάστατες αναλύσεις των δομών της ανθρώπινης και της προερχομένης από τον ιό Epstein-Barr IL-10. Τα μέλη της προερχόμενης από τον ιό Epstein-Barr IL-10 παρουσιάζουν ομοιότητες στην αλληλουχία τους με την ανθρώπινη IL-10 κατά 80 %. Η ανθρώπινη IL-10 είναι μια πρωτεΐνη 160 αμινοξέων, μοριακού βάρους 18.5 kDa που υπάρχει σαν ένα 37 kDa ομοδιμερές (Mege et al., 2006; Moore et al., 1993; Pestka et al., 2004).

Η οικογένεια των IL-10 κυτταροκινών πληθαίνει συνεχώς και συμπεριλαμβάνει υποομάδες κυτταρικών και ιικών μορφών της IL-10. Η υποομάδα που περιέχει τις κυτταρικές IL-10 συμπεριλαμβάνει εκτός από την IL-10 και πέντε παραλλαγές της, τις IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 και IL-26. Η κυτταρική μορφή της IL-10 παράγεται από ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Β λεμφοκυττάρων, των δενδριτικών και των ηωσινόφιλων. Σημαντικότερες πηγές παραγωγής της κυτταρικής μορφής της IL-10 ωστόσο θεωρούνται τα Τ-λεμφοκύτταρα, ειδικότερα τα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, και τα μακροφάγα (Mege et al., 2006; O'Garra et al., 2004b; Pestka et al., 2004).

Επίσης, η παρουσία βακτηρίων, ιών, παρασίτων ή των προϊόντων τους είναι ικανή να επάγει την παραγωγή της IL-10 από τα κύτταρα-ξενιστές. Οι ιικές μορφές της IL-10 θεωρείται ότι χρησιμεύουν σαν μοριακό δέλεαρ για την καθοδήγηση της ανοσολογικής απόκρισης. Η υποομάδα των ιικών μελών της IL-10 συμπεριλαμβάνει την IL-10 του ιού Epstein-Barr και επτά μέλη που εμπεριέχονται σε μεγάλους DNA

ιούς (π.χ. ιό του έρπητα) (Moore et al., 1993) Η παραγωγή της IL-10 ρυθμίζεται τόσο σε μεταφραστικό όσο και σε μεταγραφικό επίπεδο (Mege et al., 2006).

Ο κύριος ρόλος της έγκειται στην αναστολή της δράσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, οδηγώντας σε αναστολή της T_H1 -διαμεσολαβούμενης απόκρισης. Στην πόλωση της ανοσολογικής απόκρισης προς T_H1 ή T_H2 κατεύθυνση η IL-10 θεωρείται σημαντική αν και προσφάτως έχει εμπλακεί και στη διαφοροποίηση σε άλλους υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων όπως τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs) (O'Garra et al., 2004b; Rouse, 2007; Taylor et al., 2006; Wu et al., 2007).

Εικόνα 1-13. Οι υποδοχείς της οικογένειας των τύπου ιντερφερόνης κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-10.

Οι βιολογικές δράσεις της IL-10 λαμβάνουν χώρα μετά την ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο ενεργοποιείται μετά από την πρόσδεση της IL-10 στον υποδοχέα της που εκφράζεται στην επιφάνεια κυττάρων στόχων της, π.χ. μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα κ.α.. Ο υποδοχέας της IL-10, ανήκει στην ομάδα υποδοχέων που είναι γνωστοί ως υποδοχείς τύπου ιντερφερόνης-γ (Εικόνα 1-13) (Ozaki et al., 2002). Οι υποδοχείς της ομάδας αυτής αποτελούνται γενικά από ένα εξωκυττάριο μόριο όπου προσδένεται η πρωτεΐνη, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα, ενώ για να είναι λειτουργικοί σαν υποδοχείς είναι απαραίτητη η έκφραση δυο υπομονάδων ανά υποδοχέα. Ο υποδοχέας της IL-10 (IL-10R) ειδικότερα, αποτελείται από τις υπομονάδες IL-10R1 και IL-10R2. Η υπομονάδα IL-10R1 εμπεριέχει το σημείο πρόσδεσης της IL-10 ενώ η IL-10R2 αποτελεί βοηθητική υπομονάδα που εμπλέκεται στην ενδοκυττάρια μεταγωγή του

σήματος που ενεργοποιεί η πρόσδεση της IL-10 (Mege et al., 2006; Moore et al., 2001; Pestka et al., 2004).

Εικόνα 1-14. Μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου αμέσως μετά την πρόσδεση της κυτταροκίνης, π.χ. ιντερλευκίνη-10, στον υποδοχέα της. Το μήνυμα μεταφέρεται σταδιακά στον πυρήνα όπου επάγεται η μεταγραφή γονιδίων/στόχων.

Η πρόσδεση της IL-10 στον υποδοχέα της, ενεργοποιεί ένα μηχανισμό μεταγωγής σήματος που καταλήγει στο εσωτερικό του κυττάρου στόχου της, ο οποίος είναι κοινός για την κατηγορία υποδοχέων αυτού του τύπου. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της IL-10, η αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα της έχει σαν αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της JAK κινάσης. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και οδηγεί στην επακόλουθη προσέλκυση μελών της οικογένειας των STAT πρωτεϊνών, και ειδικότερα των STAT1, STAT3 και STAT5, οι οποίες μετά από τη φωσφορυλίωση και το διμερισμό τους, ενεργοποιούνται και μετατοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου όπου και παρεμβαίνουν στην μεταγραφή γονιδίων-στόχων τους (Εικόνα 1-14). Η STAT3 αποτελεί τον πιο κοινό μεταγραφικό παράγοντα –στόχο της IL-10, και διαμεσολαβεί τις περισσότερες ανασταλτικές δράσεις της κατά τη διάρκεια των ανοσοαποκρίσεων. Ανάμεσα στα γονίδια που ενεργοποιούνται από την IL-10 συμπεριλαμβάνονται οι SOCS-1 και SOCS-3. Η SOCS-1 αποτελεί τον κύριο φυσιολογικό αναστολέα των επαγομένων μηχανισμών μεταγωγής σήματος των κυτταροκινών IFN- γ , IL-10 και IL-4 (Mege et al., 2006; Moore et al., 2001; Pestka et al., 2004).

Οι βιολογικές δράσεις της Ιντερλευκίνης-10 συμπεριλαμβάνουν:

- Αναστολή της παραγωγής κυτταροκινών (π.χ. IL-12, IL-18) καθώς και την παρεμπόδιση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80, CD86 και MHC II από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.
- Αναστολή της έκφρασης της IL-2, του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), και της IL-5, επηρεάζοντας τη λειτουργία των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων.
- Αναστολή της δράσης άλλων κυτταροκινών, όπως IL-2, TNF- α , IFN- γ και IL-4.
- Ενίσχυση της δράσης των B λεμφοκυττάρων, αυξάνοντας την επιβίωση τους.
- Άσκηση ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω αναστολής της παραγωγής TNF και IL-1 σε καταστάσεις οξείας ανοσιακής διέγερσης και φλεγμονής.
- Προστασία από σηπτικό σοκ προκαλούμενο από τοξίνες Gram(+) όσο και LPS Gram(-) βακτηρίων, τόσο σε *in vivo* όσο και όσο και σε *in vitro* πειραματικά μοντέλα.
- Ρύθμιση της παραγωγής μεταγραφικών παραγόντων. Π.χ. ενεργοποιεί τους NF κ B και AP-1 σε CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αλλά την αναστέλλει σε μονοκύτταρα και σε αναστέλλει CD4⁺ T λεμφοκύτταρα.

Το γεγονός πως όλες οι διαφορετικές υποομάδες των T λεμφοκυττάρων μπορούν να παράγουν διαφορετικές ποσότητες IL-10 ανάλογα με το σήμα που δέχονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον τους, προσδίδει στην κυτταροκίνη αυτή έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης (O'Garra et al., 2004a; O'Garra et al., 2007; O'Garra et al., 2004b).

1.3.2.Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)

Η IL-2 παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, και σε μικρότερες ποσότητες από τα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για κυτταροκίνη που λειτουργεί ως αυτοκρινής ή παρακρινής διεγέρτης του πολλαπλασιασμού των T και B λεμφοκυττάρων (Hidaka, et al., 1996) (Gomperts, Kramer, & Tatham, 2002).

Η ενεργοποίηση των T κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση της IL-2 και του υποδοχέα της (IL-2 receptor, IL-2R) που εκφράζεται στην επιφάνεια της

κυτταρικής μεμβράνης των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια την αυτοκρινή διέγερση των T-λεμφοκυττάρων για διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό. Με τον τρόπο αυτό η IL-2 ευθύνεται για τη μετάπτωση των T λεμφοκυττάρων από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Εκτός από τα T κύτταρα, και άλλα κύτταρα π.χ. B-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-2, διεγείρονται με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση τους και τον πολλαπλασιασμό τους. Η IL-2 αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της μεταγωγής σήματος μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα (Gaffen et al., 2004).

Άλλες λειτουργίες της IL-2 συμπεριλαμβάνουν την ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των φυσικών κυτταροκτόνων (NK κυττάρων) καθώς και τη διέγερση των B-λεμφοκυττάρων ως προς τη σύνθεση και την έκκριση αντισωμάτων (Gaffen et al., 2004).

1.3.3 Ιντερλευκίνη-4(IL-4)

Κύρια κυτταρική πηγή της IL-4 είναι ο υποπληθυσμός T_H2 των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων, επί των οποίων, καθώς και επί των βασεόφιλων κυττάρων των ιστών, ασκεί αυτοκρινή δράση αυξητικού παράγοντα. Στην πραγματικότητα, η παραγωγή της IL-4 αποτελεί κριτήριο κατάταξης των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων στον υποπληθυσμό των T_H2 , ενώ το αντίστοιχο κριτήριο κατάταξης στον υποπληθυσμό T_H1 είναι η παραγωγή της IFN- γ . Βασική της λειτουργία είναι η ρύθμιση των αλλεργικών αντιδράσεων. Επάγει την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων, στα οποία αυξάνει την έκφραση της τάξης II MHC μορίων, και αναστέλλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη που παράγεται κυρίως από μερικά T_H κύτταρα, από ιστιοκύτταρα και βασεόφιλα. Οι δράσεις της IL-4 περιλαμβάνουν:

- Τη διέγερση και τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων.
- Την αύξηση της έκφρασης των τάξης II MHC-μορίων στα B-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας αυτών των κυττάρων.
- Την αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που διευκολύνει την έξοδο των λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό χώρο.

- Την ελάττωση του ρυθμού σύνθεσης διαφόρων κυτταροκινών από μερικά T-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα.
- Ισοτυπική μεταστροφή προς IgE.

1.4 ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

Οι σηματοδοτικοί μηχανισμοί των κυττάρων ενεργοποιούνται από σηματοδοτικά μόρια (πρωτογενείς αγγελιοφόρους-first messengers), τα οποία ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις είναι ικανά να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στη λειτουργία των κυττάρων. Τα περισσότερα μηνυματοφόρα μόρια σηματοδοτούν την έναρξη μονοπατιών μεταγωγής σημάτων (signal transduction pathway ή signaling cascade) με την δέσμευση τους σε υποδοχείς υψηλής ειδικότητας στο εξωτερικό των κυττάρων, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, μετά τη δέσμευση τους στον υποδοχέα, δεν εισέρχονται τα ίδια στο κύτταρο αλλά οι πληροφορίες που μεταφέρουν (Hancock, 2005; Gomperts, Kramer, & Tatham, 2002; Hidaka, et al., 1996).

Τα μηνυματοφόρα μόρια μπορεί να προέρχονται από το ίδιο κύτταρο ή από ένα άλλο γειτονικό ή απομακρυσμένο κύτταρο ή ακόμη και από μη κυτταρική επιφάνεια. Διακρίνονται σε εξωγενή μόρια που δεσμεύονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας, σε εξωγενή μόρια που διαχέονται διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και σε μόρια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που ενεργοποιούνται με την επαφή τους με άλλες κυτταρικές ή όχι επιφάνειες. Σε κάθε περίπτωση ωστόσο, είναι σημαντικό να χαρακτηρίζονται από:

- Ειδικότητα, έτσι ώστε να επιφέρουν την επιθυμητή απόκριση/αλλαγή στο κύτταρο,
- Μικρό μέγεθος, ώστε να μπορούν να μετακινηθούν με ευκολία από το αρχικό σημείο δημιουργίας τους στο τελικό σημείο/αποδέκτη,
- Δυνατότητα γρήγορης σύνθεσης ή μετατροπής του επιτρέποντας την άμεση απόκριση του κυττάρου και
- Δυνατότητα αποσιώπησης της δράσης τους άμεσα μετά την επαγωγή της επιθυμητής απάντησης του κυττάρου.

Η δέσμευση ενός μηνυματοφόρου μορίου στον υποδοχέα του έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη μιας αλληλουχίας αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν δευτερογενείς διαμεσολαβητές ή δευτερογενείς αγγελιοφόροι (second messengers) όπως το κυκλικό-AMP (cAMP) και το ασβέστιο (Ca^{2+}). Οι δευτερογενείς διαμεσολαβητές αποτελούν σηματοδοτικά μόρια που παράγονται από το ίδιο το κύτταρο σαν απάντηση σε ένα πρωτογενές μηνυματοφόρο μόριο π.χ. στη δέσμευση ενός εξωκυττάριου συνδέτη στον υποδοχέα του κυττάρου. Στη συνέχεια του μονοπατιού, ενεργοποιούνται ένζυμα, αποδέκτες των δευτερογενών διαμεσολαβητών, τα οποία ενισχύουν το σήμα στο εσωτερικό των κυττάρων και το μεταφέρουν στους επόμενους αποδέκτες του μονοπατιού, για να επιτευχθούν έτσι ειδικές αλλαγές στο μηχανισμό της λειτουργίας του κυττάρου π.χ. ρύθμιση έκφρασης γονιδίων (Εικόνα 1-15).

Εικόνα 1-15. Γενική αρχή της κυτταρικής επικοινωνίας και της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος.

Η μεταγωγή ενός σήματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν αρκετές διακριτές πρωτεΐνες. Κάθε πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αλληλουχία των αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια της μεταγωγής ενός σήματος αλλάζει τη διαμόρφωση της από τη δράση μιας προηγούμενης πρωτεΐνης και αυτή με τη σειρά της αλλάζει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης που ακολουθεί. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των διαφόρων πρωτεϊνών κατά μήκος ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, οι οποίες οφείλονται σε φωσφορυλιώσεις, που είναι προσθήκη φωσφορικών ομάδων, ή αποφωσφορυλιώσεις, αφαίρεση φωσφορικών ομάδων, αντίστοιχα.

Ένα σηματοδοτικό μόριο είναι δυνατόν να οδηγήσει σε παραπάνω από μια αλλαγές στο κύτταρο καθώς και να ενεργοποιήσει παραπάνω από ένα σηματοδοτικά μονοπάτια, για το λόγο αυτό η ενορχήστρωση των σηματοδοτικών μονοπατιών αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη σωστή λειτουργία του κυττάρου. Η μεταγωγή σημάτων είναι σημαντικός παράγοντας και για την επιβίωση των κυττάρων καθώς με τη μικρότερη δυνατή δαπάνη ενέργειας τα κύτταρα παράγουν ευέλικτες και ακριβείς αποκρίσεις ανάλογα με το σήμα που δέχονται από το περιβάλλον τους.

1.4.1 Σηματοδότηση μέσω υποδοχέων που δεσμεύουν G πρωτεΐνες

Στα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων σημαντικό ρόλο κατέχουν οι υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν ειδικά τα μηνυματοφόρα μόρια και μεταφέρουν την πληροφορία τους στον επόμενο αποδέκτη του μονοπατιού. Οι υποδοχείς που μετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια διακρίνονται σε:

- σε πυρηνικούς υποδοχείς,
- σε υποδοχείς που είναι ή συνδέονται με κινάσες τυροσίνης,
- σε υποδοχείς που δημιουργούν ιοντικούς διαύλους και
- σε υποδοχείς στους οποίους συνδέονται G-πρωτεΐνες.

Οι υποδοχείς που δεσμεύουν ενδοκυτταρικά G-πρωτεΐνες είναι η πολυπληθέστερη οικογένεια υποδοχέων και δεσμεύουν διαφόρων τύπων μηνυματοφόρα μόρια όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, παράγωγα αμινοξέων ή λιπαρών οξέων. Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη επτά φορές (Εικόνα 1-16) και μπορούν να δράσουν σαν μονομερή, ομοδιμερή, ετεροδιμερή ή σαν ολιγομερή υψηλότερης τάξης (Hancock, 2005; Gomperts, Kramer, & Tatham, 2002).

Εικόνα 1-16. Δομή υποδοχέων που δεσμεύουν ενδοκυτταρικά G-πρωτεΐνες

1.4.2 G-πρωτεΐνες

Οι G-πρωτεΐνες απαντούν στην κυτταροπλασματική πλευρά και συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, διαμέσου λιπιδικών αλυσίδων, ομοιοπολικά. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δυο κύριες τάξεις, τις μονομερείς G-πρωτεΐνες που αποτελούνται από ένα πολυπεπτίδιο και τις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες που αποτελούνται από τρεις υπομονάδες γνωστές ως α , β και γ υπομονάδες (Malbon, 2005).

Εικόνα 1-17. Μεταγωγή σήματος μέσω υποδοχών που συνδέονται ενδοκυττάρια με G πρωτεΐνες. α) Ο υποδοχέας σε ανενεργή μορφή, πριν έρθει σε επαφή με το συνδέτη του. β) Ο υποδοχέας έρχεται σε επαφή με το συνδέτη του και ενεργοποιείται η G πρωτεΐνη. γ) Η G πρωτεΐνη απενεργοποιείται μετά τη μεταγωγή του σήματος στους μετέπειτα στόχους της.

Οι G-πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Στις G_s -πρωτεΐνες που επάγουν την ενεργοποίηση ενός ένζυμου-στόχου ($G_{stimulatory}$ -proteins), και στις G_i -πρωτεΐνες ($G_{inhibitory}$ -proteins) που αναστέλλουν την ενεργοποίηση ενός ένζυμου-στόχου τους. Οι α -υπομονάδες των G_s -πρωτεϊνών είναι γνωστές ως α_s -υπομονάδες ενώ των G_i -πρωτεϊνών ως α_i .

Η δέσμευση ενός μηνυματοφόρου μορίου σε έναν υποδοχέα που συνδέεται με μια G-πρωτεΐνη, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα και την ενδοκυττάρια αλληλεπίδραση του με την G-πρωτεΐνη, επάγοντας έτσι την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης (Εικόνα 1-17b). Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με

τη G-πρωτεΐνη οδηγεί στην απελευθέρωση του μορίου GDP από την G-πρωτεΐνη και την αντικατάστασή του με ένα μόριο GTP. Ακολουθεί μερική διάσπαση της G-πρωτεΐνης και απελευθέρωση των υπομονάδων της, α και $\beta\gamma$. Οι απελευθερωμένες υπομονάδες της G-πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με τους στόχους τους που έπονται στο μονοπάτι. Οι πιθανοί στόχοι για την α -υπομονάδα είναι διάφορα ένζυμα, π.χ. η αδενυλική κυκλάση στο cAMP-εξαρτώμενο μονοπάτι, ενώ για τη $\beta\gamma$ υπομονάδα οι πιθανοί στόχοι είναι ιοντικοί δίαυλοι. Στη συνέχεια το δεσμευμένο στην α -υπομονάδα GTP υδρολύεται σε GDP, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της α -υπομονάδας από το στόχο της και την επανασύνδεση της με τις $\beta\gamma$ υπομονάδες γεγονός που σηματοδοτεί την απενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης (Εικόνα 1-17c)(Malbon, 2005).

1.4.3. Ασβεστόιο

Τα ιόντα ασβεστίου αποτελούν ένα ενδοκυττάριο μήνυμα που εμπλέκεται σε πολλές πορείες μεταγωγής σήματος, όπως π.χ. στον καταρράκτη των φωσφοινοσιτιδίων και τη ρύθμιση της μυϊκής συστολής. Αλλά γιατί επέλεξε η φύση το ιόν αυτό ως ενδιάμεσο τόσο πολλών μηνυματοφόρων διεργασιών. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου θα πρέπει να διατηρούνται χαμηλά επειδή οι φωσφορικοί εστέρες βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα και το φωσφορικό ασβεστόιο είναι αρκετά δυσδιάλυτο. Όλα τα κύτταρα φέρουν συστήματα μεταφοράς για την αποβολή του ασβεστίου. Τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου στα αδρανή κύτταρα είναι τυπικά 0,1 μM , συγκέντρωση αρκετές τάξεις μικρότερη από την αντίστοιχη του εξωτερικού περιβάλλοντος. Αυτή η μεγάλη βαθμίδωση συγκέντρωσης προσδίδει στα κύτταρα μία ευκαιρία: η συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου μπορεί να αυξηθεί απότομα με σκοπό τη σηματοδότηση, μέσω μεταβατικής διάνοιξης καναλιών ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης ή κάποιας ενδοκυτταρικής μεμβράνης.

Μια δεύτερη ιδιότητα του Ca^{2+} , που το καθιστά πάρα πολύ κατάλληλο ως ενδοκυτταρικό μήνυμα, είναι η ικανότητα ισχυρής δέσμευσης με πρωτεΐνες. Τα αρνητικά φορτισμένα οξυγόνα (των πλευρικών αλυσίδων γλουταμινικού και ασπαραγινικού) και τα μη φορτισμένα οξυγόνα (καρβονύλια της κύριας αλυσίδας) δεσμεύουν Ca^{2+} . Η ικανότητα του ασβεστίου να σχηματίζει σύμπλοκα συναρμογής με πολλούς προσδέτες-έξι ως οκτώ άτομα οξυγόνου- του επιτρέπει να διασυνδέει διάφορα τμήματα μιας πρωτεΐνης και να επιφέρει μεγάλες αλλαγές στη στερεοδιάταξή της. Επιπλέον, η δέσμευση του ασβεστίου παρουσιάζει υψηλού

βαθμού επιλεκτικότητα. Το Mg^{2+} , ένας δυνητικός ανταγωνιστής μπορεί να απορριφθεί επειδή δεν παρουσιάζει σημαντική συγγένεια, για τα μη φορτισμένα άτομα οξυγόνου. Μία άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι το Mg^{2+} σχηματίζει κατά προτίμηση μικρά και συμμετρικά σύμπλοκα συναρμογής, ενώ το Ca^{2+} μπορεί να σχηματίσει ασύμμετρα σύμπλοκα μεγαλύτερης διαμέτρου. Για το λόγο αυτό είναι πολύ κατάλληλο για δέσμευση με πρωτεϊνικές κοιλότητες ανώμαλου σχήματος και επιλέγεται αντί του Mg^{2+} , ακόμα και όταν το δεύτερο είναι χίλιες φορές αφθονότερο.(Stryer L.1988).

Το ασβέστιο είναι ένα πανταχού παρόν ενδοκυττάριο σήμα υπεύθυνο για τον έλεγχο πολλών κυτταρικών διεργασιών όπως κυτταρική διαίρεση, έκκριση, ενδοκυττάρωση, γονιμοποίηση, μεταβολισμό και κυτταρική κίνηση. Τα ιόντα ασβεστίου όμως διαφέρουν πολύ από τα άλλα ενδοκυτταρικά σήματα όπως τα κυκλικά νουκλεοτίδια ή τα φωσφατίδια ινοσιτόλης, καθώς δεν είναι μία ουσία που συντίθεται ή αποδομείται ενζυματικά.(Karp G.,1999). Αντιθέτως, η δράση του οφείλεται στις διακυμάνσεις της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του με τον εξής απλό τρόπο. Κύτταρα εν ηρεμία έχουν συγκέντρωση ασβεστίου 100nM και ενεργοποιούνται όταν αυτή ανεβεί στα 1000nM περίπου. Πως όμως μπορεί αυτή η αύξηση να ρυθμίζει τόσες πολλές διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες; Η απάντηση βρίσκεται στην προσαρμοστικότητα του μηχανισμού σηματοδότησης του ασβεστίου όσο αφορά την ταχύτητα, το εύρος και στο χωροχρονικό μοτίβο. Αυτή η ευελιξία προκύπτει από την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού μορίων σηματοδότησης που οργανώνονται σε μια εργαλειοθήκη σηματοδότησης ασβεστίου και που μπορεί να συγκροτηθεί σε διάφορους συνδυασμούς, ώστε να προκύψουν σήματα με διαφορετικό χωροχρονικό προφίλ.

Το σηματοδοτικό δίκτυο του ασβεστίου μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις λειτουργικές μονάδες(Εικόνα 1.18)

- Η σηματοδότηση ξεκινά από ένα διεγέρτη που δημιουργεί ποικίλα σήματα κινητοποίησης του ασβεστίου.
- Τα σήματα αυτά ενεργοποιούν μηχανισμούς που αυξάνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου
- Τα ιόντα ασβεστίου δρουν ως μήνυμα που ενεργοποιεί πολλές ασβεστιοεξαρτώμενες κυτταρικές διεργασίες

- Τέλος ενεργοποιούνται μηχανισμοί που απομακρύνουν το ασβέστιο από το κυτταρόπλασμα

Εικόνα 1.18: Τα τέσσερα στοιχεία του ασβεστοεξαρτώμενου δικτύου που ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. (Berridge et al., 2000)

1. Δημιουργία σημάτων που κινητοποιούν το ασβέστιο.

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν εσωτερικές και εξωτερικές πηγές ασβεστίου για να αυξήσουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του. Οι εσωτερικές αποθήκες ασβεστίου βρίσκονται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου ή στο σαρκοπλασματικό δίκτυο των μυϊκών κυττάρων. Απελευθέρωση του ασβεστίου από αυτές τις αποθήκες ελέγχεται από πολλά κανάλια από τα οποία αυτό του υποδοχέα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης InsP_3R και του υποδοχέα της ρυανοδίνης RyR είναι τα πιο σημαντικά. Ο κύριος ενεργοποιητής των καναλιών αυτών είναι το ίδιο το ασβέστιο και η διαδικασία αυτή της ασβεστιοεπαγόμενης απελευθέρωσης ασβεστίου είναι πολύ σημαντική στη μεταγωγή σήματος μέσω ασβεστίου. Αυτό που καθορίζει αν το ασβέστιο μπορεί να ενεργοποιήσει αυτά τα κανάλια είναι μηνύματα που δημιουργούνται όταν διεγέρτες προσδένονται σε κυτταρικούς υποδοχείς. Ένα από αυτά είναι η φωσφορική ινοσιτόλη που διαχέεται μέσα στο κύτταρο που δεσμεύεται στον υποδοχέα της και απελευθερώνει το ασβέστιο από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ικανότητα του ασβεστίου να ενεργοποιεί τον υποδοχέα της ρυανοδίνης ελέγχεται από την κυκλική αδενολική ριβόζη (cADPR).

2. Μηχανισμοί που αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο

Εξαρτώνται από κανάλια που ελέγχουν την είσοδο εξωκυτταρικού ασβεστίου ή την απελευθέρωση του από εσωτερικές αποθήκες. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχουν διάφορες οικογένειες καναλιών ασβεστίου που χαρακτηρίζονται από τον τρόπο που ενεργοποιούνται. Πολλά είναι γνωστά για τα κανάλια που ελέγχονται από

τα δυναμικά ενεργείας(VOLTAGE-OPERATED CHANNELS,VOCs). Επιπρόσθετα υπάρχουν πολλά κανάλια που ανοίγουν ως απάντηση στην ενεργοποίηση υποδοχέα(RECEPTOR OPERATED CHANNELS, ROCs) από εξωτερικά ερεθίσματα όπως η γλουταμίνη το ATP και η ακετυλοχολίνη. Άλλα κανάλια είναι ευαίσθητα σε σήματα που δημιουργούνται μετά από την ενεργοποίηση υποδοχέα όπως η διακυλογλυκερόλη το αραχιδονικό οξύ ή το άδειασμα των εσωτερικών αποθηκών. Από αυτά, πολύ σημαντικά φαίνεται να είναι τα κανάλια που ενεργοποιούνται μετά το άδειασμα των εσωτερικών αποθηκών ασβεστίου(STORE OPEATED CHANNELS, SOCs) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, τα οποία παρέχουν το σήμα ασβεστίου που ελέγχει πολλές κυτταρικές διεργασίες. Τώρα τελευταία έχει προταθεί ότι οι υποδοχείς της τριφωσφορικής ινοσιτόλης είναι άμεσα συνδεδεμένοι με τα SOCs.

Αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου προέρχεται επίσης από τις εσωτερικές αποθήκες ασβεστίου μέσω καναλιών που αναφέρθηκαν παραπάνω, αυτά του υποδοχέα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και του υποδοχέα της ρυανοδίνης. Αυτά τα δύο κανάλια ελέγχονται από πολλούς παράγοντες, με πιο σημαντικό το ίδιο το ασβέστιο., το οποίο ελέγχει την απελευθέρωση του ασβεστίου δρώντας είτε στην κυτταροπλασματική είτε στην εσωτερική πλευρά του καναλιού. Αυξάνοντας τα επίπεδα ασβεστίου στην εσωτερική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου, ενισχύεται η ευαισθησία του υποδοχέα της ρυανοδίνης και το ίδιο ισχύει για τον υποδοχέα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης. Η δράση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου είναι πιο πολύπλοκη: μπορεί να είναι είτε κατασταλτική είτε διεγερτική. Η διαδικασία της αυτοεπαγόμενης απελευθέρωσης ασβεστίου καθιστά ικανή την επικοινωνία των υποδοχέων της ρυανοδίνης και της τριφωσφορικής ινοσιτόλης με στόχο την δημιουργία σημάτων ασβεστίου που οργανώνονται σε πολλαπλά κύματα. Έτσι, η κύρια λειτουργία των μηνυμάτων που κινητοποιούν το ασβέστιο φαίνεται να είναι η αλλαγή της ευαισθησίας των υποδοχέων στη διεγερτική δράση του ασβεστίου.

3.Ασβεστιοεξαρτώμενες διεργασίες

Σαν αποτέλεσμα όλων των παραπάνω μηχανισμών τα ιόντα ασβεστίου εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του, δημιουργώντας έτσι αυτό που ονομάζουμε σήμα ασβεστίου. Όμως η συγκέντρωση του ασβεστίου που μετράμε στα κύτταρα χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους είναι μόνο η κορυφή του παγόβουνου γιατί τα περισσότερα ιόντα ασβεστίου που

εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα δεσμεύονται γρήγορα από διάφορα κυτταροπλασματικά μόρια όπως η προαλβουμίνη (pivalbumin), η καλμπιντίνη-D (Calbindin-D) και η καλρετινίνη (Calretinin). Τα μόρια αυτά εμπλέκονται στο καθορισμό του εύρους αλλά και της διάρκειας των σημάτων ασβεστίου. Επίσης, περιορίζουν τη διάχυση τοπικών σημάτων ασβεστίου.

Εφόσον έχει αυξηθεί η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ενεργοποιούνται πολλές κυτταρικές διεργασίες που είναι ασβεστιοεξαρτώμενες. Αυτό γίνεται μέσω πολλών πρωτεϊνών που δεσμεύουν το ασβέστιο και που μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την λειτουργία τους σε δύο κατηγορίες: αυτές που ρυθμίζουν το εύρος και τη διάρκεια του σήματος ασβεστίου και που αναφέρθηκαν προηγουμένως και τις λεγόμενες πρωτεΐνες αισθητήρες. Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες αισθητήρες είναι η τροπονίνη C και η καλμοδουλίνη, που περιέχουν τέσσερα «χέρια EF» (Εικόνα 1.19) που δεσμεύουν το ασβέστιο και αλλάζουν τη στερεοδομή τους για να ενεργοποιήσουν άλλα μόρια στόχους. Η τροπονίνη C έχει ως μοναδική λειτουργία να ελέγχει την αλληλεπίδραση της ακτίνης και της μυοσίνης κατά τη συστολή του καρδιακού και σκελετικού μυός. Η καλμοδουλίνη, αντιθέτως, ελέγχει πολλές διαδικασίες, όπως τη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων, τη μεταγραφή γονιδίων, τη διαφοροποίηση ιοντικών καναλιών, τον μεταβολισμό αλλά και την επικοινωνία σηματοδοτικών μονοπατιών. Στο ίδιο κύτταρο, μπορεί να χρησιμοποιούνται διαφορετικές πρωτεΐνες αισθητήρες για να ενεργοποιηθούν διαφορετικές διεργασίες. Για παράδειγμα στο σκελετικό μυ, η τροπονίνη C ελέγχει την συστολή, ενώ η καλμοδουλίνη ενεργοποιεί φωσφορυλικές κινάσες για να βεβαιώσει παράλληλη αύξηση στο παραγόμενο ATP.

Εικόνα 1.19 : Τα σημεία δέσμευσης ιόντων Ca σχηματίζονται από μονάδα διαμόρφωσης έλικας-θηλειας-έλικας (Stryer L.,1988).

Η προσαρμοστικότητα της σηματοδότησης μέσω ασβεστίου αυξάνεται σημαντικά όταν αυτό συνδέεται με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η ικανότητα του ασβεστίου να ενεργοποιεί μόρια, όπως το κυκλικό AMP και τις MAPK είναι ιδιαίτερα εμφανής στον έλεγχο της μεταγραφής γονιδίων στους νευρώνες.

4. Μηχανισμοί που απομακρύνουν το κυτταροπλασματικό ασβέστιο

Τα ιόντα ασβεστίου απομακρύνονται γρήγορα από το κυτταρόπλασμα από διάφορες αντλίες που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη όπως η Ca^{2+} -ATPase και η αντλία $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ενώ στο ενδοπλασματικό ή στο σαρκοπλασματικό δίκτυο μία άλλη ATPase επιστρέφει τα ιόντα ασβεστίου στις εσωτερικές αποθήκες. Τα μιτοχόνδρια είναι επίσης πολύ σημαντικά γιατί απομονώνουν τα ιόντα ασβεστίου πολύ γρήγορα κατά την φάση ανάπτυξης του σήματος ασβεστίου και στη συνέχεια το απελευθερώνουν αργά κατά τη φάση επαναφοράς. Αυτό καθιστά τα μιτοχόνδρια ικανά να διαμορφώνουν το εύρος αλλά και χωροχρονικό μοτίβο του σήματος ασβεστίου. (Berridge et al., 2000).

Τα ενδοκυττάρια μηνύματα που ελέγχονται από την συγκέντρωση ασβεστίου διαφέρουν ακόμη περισσότερο λόγω της δυνατότητας δημιουργίας σημάτων ασβεστίου με διαφορετικό χωροχρονικό μοτίβο. Οι διαφορές που εμφανίζονται στα σήματα ασβεστίου είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού βαθμού ευαισθησίας που επιδεικνύουν οι υποδοχείς της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της ρυανοδίνης ανάλογα με το μήνυμα που κινητοποιεί το ασβέστιο. Σε χαμηλά επίπεδα διέγερσης ενεργοποιούνται λίγοι υποδοχείς και αυτό καταγράφεται σαν μικρές αυξήσεις ενδοκυττάριου ασβεστίου (quarks or blips). Αυτό βέβαια είναι σπάνιο και συνήθως έχουμε την συνεργιστική αλληλεπίδραση των υποδοχέων οπότε και δημιουργούνται μεγαλύτερης έκτασης σήματα ασβεστίου (puffs or sparks). Αυτά τα σήματα ασβεστίου συνεισφέρουν στη δημιουργία κυμάτων ασβεστίου που διαδίδονται στα γειτονικά κύτταρα, συντονίζοντας την λειτουργία τους. Επιπρόσθετα, σήματα τέτοιου τύπου μεταδίδουν το μήνυμα ασβεστίου σε αυστηρά τοπικές κυτταρικές περιοχές. Για παράδειγμα, σε κύτταρα HeLa, η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου συγκεντρώνεται γύρω από τον πυρήνα, με αποτέλεσμα την είσοδο των ιόντων ασβεστίου μέσα στον πυρήνα.

Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου εμφανίζεται συχνότερα ως σύντομες ακίδες. Σε μερικές περιπτώσεις, αυτές είναι ικανές να ενεργοποιήσουν κυτταρικές απαντήσεις όπως η συστολή του σκελετικού μυός. Όταν όμως απαιτείται μεγαλύτερη

διάρκεια σήματος τότε αυτές οι ακίδες επαναλαμβάνονται δίνοντας κύματα με διαφορετικές συχνότητες που ποικίλουν από 1-60 δευτερόλεπτα ως και 24 ώρες. Τα κύτταρα λοιπόν απαντούν στην ένταση του εξωκυττάριου σήματος ρυθμίζοντας ανάλογα τη συχνότητα του κύματος ασβεστίου. Υπάρχουν δύο ασβεστιοεξαρτώμενες πρωτεΐνες που μπορούν να αποκωδικοποιήσουν τη συχνότητα των κυμάτων ασβεστίου και είναι η CAM Kinase II και η πρωτεϊνική κινάση PKC (Berridge et al., 2000).

Το 1953 ήταν η πρώτη φορά που αναδείχθηκε η σημασία των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης στην μεταγωγή σήματος όταν βρέθηκε ότι κάποια εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια ενεργοποιούν την ενσωμάτωση ραδιενεργού φωσφόρου στην φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη(PI), ένα ασήμαντο λιπίδιο των κυτταρικών μεμβρανών. Αργότερα αποδείχθηκε ότι αυτή η ενσωμάτωση ήταν αποτέλεσμα της αποδόμησης και της επακόλουθης ανασύνθεσης φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης. Τα φωσφολιπίδια ινοσιτόλης που βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά στη μεταγωγή σήματος ήταν δύο φωσφορυλιωμένα παράγωγα της PI, η PIP και η PIP₂.

Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 1.20: Σχηματισμός DAE διάκυλογλυκερόλης και τριφωσφορικής ινοσιτόλης μετά την ενεργοποίηση της φωσφολιπιδίας C.

Η αλυσίδα των αντιδράσεων που οδηγεί στην αποδόμηση της διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης ξεκινά όταν ένα σηματοδοτικό εξωκυττάριο μόριο προσδένεται σε υποδοχέα συνδεδεμένο με G πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας. Η ενεργοποίηση μιας ετεροτριμερούς G πρωτεΐνης που ονομάζεται G_q ενεργοποιεί μία φωσφοινοσιτιδάση, τη φωσφολιπάση C. Αυτό το μεμβρανικό ένζυμο υδρολύει σε δευτερόλεπτα τον φωσφοδιεστερικό δεσμό που ενώνει τη φωσφορυλιωμένη ομάδα ινοσιτόλης με την ακυλιωμένη μορφή γλυκερόλης. Τα δύο μηνύματα, η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη IP_3 και η διακυλογλυκερόλη DAG, σχηματίζονται από τη διάσπαση της PIP_2 και αποτελούν σημαντικά μόρια στη μεταγωγή σήματος μέσα στο κύτταρο(εικόνα 1.20). Η IP_3 , είναι ένα μικρό υδατοδιαλυτό μόριο που διαχέεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα, που προκαλεί γρήγορη απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο και ανοίγει τα κανάλια ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης. Η διακυλογλυκερόλη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C(Alberts B.,1994).

1.4.3.1 Ασβέστιο και T λεμφοκύτταρα

Το ασβέστιο παίζει σημαντικό ρόλο στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα T, B λεμφοκύτταρα και τα ιστιοκύτταρα όπου ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και τη μεταγραφή γονιδίων(Εικόνα 1.21). Οι συνέπειες της ενδοκυττάριας αύξησης του ασβεστίου μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το αν επηρεάζουν άμεσες ή μακροπρόθεσμες λειτουργίες του κυττάρου. Οι πρώτες διαμεσολαβούνται μέσα σε λίγα λεπτά και είναι ανεξάρτητες από την έκφραση νέων γονιδίων. Περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της κινητικότητας των λεμφοκυττάρων και την αποκοκκιοποίηση των ευαισθητοποιημένων από αλλεργιογόνο ιστιοκυττάρων ή των ενεργοποιημένων T κυτταροτοξικών $CD8^+$ λεμφοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση των T κυττάρων με τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα τα οποία έχουν δεσμεύσει αντιγονικά πεπτίδια προκαλεί μία γρήγορη αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, η οποία σταματάει την κίνηση των T κυττάρων και τους επιτρέπει να σχηματίσουν σταθερές ανοσολογικές συνάψεις, μία διαδικασία που είναι κρίσιμη και την περαιτέρω λειτουργία τους. Όταν δεν υπάρχει υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο και λείπει το συνδεδεμένο σήμα, τότε τα T λεμφοκύτταρα συνδέονται με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για μικρό χρονικό διάστημα, γεγονός που προκαλεί μικρή αύξηση ενδοκυττάριας ασβεστίου. Οι μακροχρόνιες επιπτώσεις του σήματος

ασβεστίου περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων την έκφραση γονιδίων, παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών, τη διαφοροποίησή τους σε δραστικά ή κύτταρα μνήμης και απουσία συνδιέγερσης σε ανεργία, μία κατάσταση μη απάντησης σε αντιγόνο. Αυτές οι λειτουργίες απαιτούν συνεχή εισροή ασβεστίου ώστε η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του να παραμένει πάνω από τα επίπεδα ηρεμίας για πολλές ώρες. (Oh-hora M.& Rao A.,2008).

Στα λεμφοκύτταρα ο κύριος μηχανισμός για την είσοδο του εξωκυττάριου ασβεστίου είναι διαμέσου καναλιών ασβεστίου στην πλασματική μεμβράνη που ενεργοποιούνται μετά το άδειασμα των εσωτερικών αποθηκών του ασβεστίου (Calcium-release-activated-calcium channels, CRACs). Το άνοιγμα αυτών των καναλιών οδηγεί σε μία συνεχή αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου και σε μακροπρόθεσμες κυτταρικές απαντήσεις. Τα κανάλια αυτά ανοίγουν ως απάντηση στην πρόσδεση στον T κυτταρικό υποδοχέα αντιγονικών συμπλόκων. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης και τη δημιουργία μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων από πρωτεΐνες προσαρμογής, που έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση τυροσινών και την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC)-γ. Στη συνέχεια η φωσφολιπάση-Cγ υδρολύει την διφωσφορική φωσφοδυλοϊνοσιτόλη σε δύο δευτερογενή μηνύματα την τριφωσφορική φωσφαδυλοϊνοσιτόλη (IP_3) και την διακυλογλυκερόλη (DAG).

Η IP_3 προσδένεται στους υποδοχείς της στο ενδοπλασματικό δίκτυο και προκαλεί απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου, ενώ αυτό με τη σειρά του προκαλεί την διάνοιξη των καναλιών ασβεστίου στην κυτταρική μεμβράνη (CRAC channels), με αποτέλεσμα τη συνεχή είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Έτσι, ενεργοποιούνται πολλές πρωτεΐνες και μεταγραφικοί παράγοντες όπως η φωσφατάση καλσινευρίνη και ο άμεσος στόχος της NF-AT, η Cam κινάση και ο μεταγραφικός παράγοντας CREB, ο MEF-2 που ενεργοποιείται και από την καλσινευρίνη και από την CaM κινάση και επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB. Ταυτόχρονα, η παραγωγή της διακυλογλυκερόλης ενεργοποιεί την Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) και την πρωτεϊνική κινάση C, που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 και NF-κβ. Δηλαδή το ασβέστιο συνεργάζεται με άλλες οδούς μεταγωγής μηνυμάτων και αυτό προκύπτει στο επίπεδο πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA, ενεργοποιώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση κυτταροκινών (Oh-hora M.& Rao A.,2008).

Εικόνα 1.21: Επίδραση της ενδοκυττάριας αύξησης της συγκέντρωσης του ασβεστίου στην μεταγραφή γονιδίων κατά την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (Berridge et al., 2000)

1.4.3.2 Καλμοδουλίνη

Η καλμοδουλίνη είναι μία μικρή πανταχού παρούσα πρωτεΐνη που μεταφέρει το σήμα ασβεστίου στις πρωτεΐνες. Κανένα άλλο μόριο δεν τονίζει τόσο έντονα την εξελικτική σημασία της οδού μεταγωγής μηνύματος μέσω του ασβεστίου. Και αυτό γιατί έχει αλλάξει σε πολύ μικρό βαθμό στη διάρκεια 1,5 δισεκατομμυρίων χρόνων και μεταγράφεται από τρία διαφορετικά χρωμοσώματα στον άνθρωπο (Clapham

D.,2007). Ένα τυπικό ζωικό κύτταρο περιέχει πάνω από 10^7 μόρια καλμοδουλίνης, που συνιστά το 1% των συνολικών πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Αποτελείται από μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα 150 αμινοξέων με τέσσερις θέσεις δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου με υψηλή συγγένεια, και αλλάζει στερεοδομή αφού δεσμεύσει το ασβέστιο.(Εικόνα 1.22) Η καλμοδουλίνη δεν παρουσιάζει δραστηριότητα παρά μόνο όταν προσδεθεί σε άλλες πρωτεΐνες. Σε μερικές περιπτώσεις, η καλμοδουλίνη λειτουργεί ως μόνιμη ρυθμιστική υπομονάδα ενός ενζυματικού συμπλόκου, αλλά πιο συχνά η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της καλμοδουλίνης με άλλες πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο αλλάζοντας έτσι την ενεργότητα τους.(Albert B et al. 1994).

Εικόνα 1.22: Δομή της καλμοδουλίνης (Tan Song,2001)

Όταν τα ιόντα ασβεστίου προσδένονται στην καλμοδουλίνη, αλλάζει η στερεοδομή της με αποτέλεσμα να μπορεί να ενεργοποιήσει άλλες πρωτεΐνες με το να αναστέλλει αυτοκατασταλτική δράση, να αναδομεί ενεργές περιοχές ή να διμερίζει πρωτεΐνες (Hoeflich & Ikura,2002). Εκατοντάδες πρωτεΐνες περιέχουν θέσεις δέσμευσης της καλμοδουλίνης που χαρακτηρίζονται από διάσπαρτα βασικά και υδροφοβικά αμινοξέα που περιβάλλονται από αρωματικά κατάλοιπα. Οι θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου έχουν διαφορετική συγγένεια για τα ιόντα ασβεστίου, που συχνά αυξάνει με την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες στόχους. Η δέσμευση του ασβεστίου συνδέεται με μια μεγάλη αλλαγή στην στερεοδομή και έκθεση των υδροφοβικών επιφανειών κάθε περιοχής, που ενεργοποιεί την αισθητήρια ικανότητα της καλμοδουλίνης στη συγκέντρωση ασβεστίου(Clapham D., 2007).Η καλμοδουλίνη

προσδένεται και ενεργοποιεί ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών στόχων (Εικόνα 1.23). Οι πιο καλά μελετημένες όμως είναι οι κινάσες και οι φωσφατάσες. Αυτά τα ένζυμα ενεργοποιούνται με την απομάκρυνση μιας αυτοκατασταλτικής περιοχής που είναι προσδεμένη στο ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών σε φάση ηρεμίας. Η καλμοδουλίνη ενεργοποιεί αυτές τις πρωτεΐνες αφού προσδεθεί κοντά ή πάνω στην αυτοκατασταλτική περιοχή, προκαλώντας την αποσύνδεση της από το ενεργό κέντρο. Οι πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται με αυτό τον τρόπο, μπορούν να καταστούν συνεχώς ενεργές δηλαδή ανεξάρτητες από την καλμοδουλίνη και τα ιόντα ασβεστίου, είτε κόβοντας ολόκληρη την ρυθμιστική περιοχή (που περιέχει την αυτοκατασταλτική περιοχή και τη θέση δέσμησης της καλμοδουλίνης) ή απομακρύνοντας μόνο την αυτοκατασταλτική περιοχή. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η κινάση της μυοσίνης (myosin light chain kinase MLCK) και η καλμοδουλίνη εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση II, CaMKII.

Εικόνα 1.23: Πρωτεΐνες-στόχοι της καλμοδουλίνης(Ο'Day,2003).

Η καλμοδουλίνη ρυθμίζει επίσης και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην δημιουργία δευτερογενών μηνυμάτων, όπως η συνθετάση του νιτρικού οξειδίου και η φωσφοδιεστεράση κυκλικών νουκλεοτιδίων(PDE). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η καλμοδουλίνη αλληλεπιδρά και με πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, όπως η σπρεκτίνη και η μυοσίνη I.(Eldic L.&Watterson M.,1998).

Ανάμεσα στους στόχους της καλμοδουλίνης είναι πολλά ένζυμα και πρωτεΐνες μεταφορείς της κυτταρικής μεμβράνης. Σε πολλά κύτταρα, για παράδειγμα η καλμοδουλίνη δεσμεύεται και ενεργοποιεί την αντλία Ca^{2+} -ATPάση της πλασματικής μεμβράνης, που εξωθεί το ασβέστιο έξω από το κύτταρο. Οι περισσότερες όμως συνέπειες της ενεργοποίησης της καλμοδουλίνης διαβιβάζονται μέσα στο κύτταρο μέσω των πρωτεϊνικών κινασών που εξαρτώνται από την καλμοδουλίνη, τις λεγόμενες Ca/calmodulin-dependent protein kinases, CaM-Kinases.

1.4.3.3.Ca/calmodulin-dependent protein kinase

Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της οικογένειας Cam/Calmodulin-dependent protein kinases (CaM-kinases) οι οποίες φωσφορυλιώνουν διάφορα υποστρώματα, διαβιβάζοντας έτσι το μήνυμα μέσα στο κύτταρο. Οι πρώτες CaM kinases που ανακαλύφθηκαν - η κινάση της μυοσίνης που ενεργοποιεί την συστολή των λείων μυϊκών ινών και η κινάση της φωσφορυλάσης που ενεργοποιεί την αποδόμηση του γλυκογόνου – έχουν υψηλή ειδικότητα υποστρώματος. Αργότερα, ανακαλύφθηκαν και άλλες Cam kinases που έχουν μεγαλύτερο εύρος υποστρώματος και φαίνεται ότι είναι υπεύθυνες για πολλές από τις επιπτώσεις της αύξησης του ενδοκυττάριας ασβεστίου στα ζωικά κύτταρα.

Οι περισσότερες κυτταρικές απαντήσεις στην ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου διαμεσολαβούνται από την οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που εξαρτώνται από την καλμοδουλίνη, Ca-calmodulin(CaM)-dependent kinases, (CaM Ks). Η οικογένεια περιλαμβάνει τις CaMKI, CaMKII και την CaMKIV. Αυτές οι πρωτεϊνικές κινάσες, που συνδέονται με το ασβέστιο μέσω του πανταχού παρόντος ενδοκυτταρικού υποδοχέα του ασβεστίου Καλμοδουλίνη, έχουν κοινά αλλά και μοναδικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη δομή τους ,τη ρύθμιση και ενεργοποίηση. Οι CaMKI και η CaMKIV έχουν υψηλή ομολογία και ξεχωρίζουν από την CaMKII αν και όλες έχουν ένα ευρύ και επικαλυπτόμενο φάσμα υποστρωμάτων, αφού η ενεργοποίησή τους ενισχύεται από τη φωσφορυλίωσή τους

από άλλες κινάσες. Η CaMKII, όπως η CaMKI και η CaMKIV, έχει μία αυτορυθμιστική περιοχή που περιορίζει ή και αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα απουσία Ca/καλμοδουλίνης. Όταν προσδένεται η Ca/καλμοδουλίνη φτάνει για να έχει μέγιστη ενεργοποίηση ενώ οι CaMKI CaMKIV απαιτούν φωσφορλίωση από μία άλλη CaMK για να φτάσουν την μέγιστη ενεργότητά τους. Η CaMKII φωσφορυλιώνεται από μία εσωτερική αντίδραση στην αυτορυθμιστική περιοχή ή στην θέση δέσμευσης της καλμοδουλίνης, έτσι ώστε να δημιουργούνται διαφορετικά αποτελέσματα στην αυτορύθμισή της και στην ευαισθησία της στην καλμοδουλίνη. Για παράδειγμα, η αυτοφωσφορλίωση της έχει ως συνέπεια την μεταβολή της σε μία κινάση που διατηρεί την ενεργότητα της ακόμα και απουσία Ca/καλμοδουλίνης, χωρίς να επηρεάζεται η μέγιστη ενεργότητά της. Η αυτοφωσφορλίωση της συνδέεται επίσης με μια αύξηση ως και 1000 φορές στην συγγένεια της με την Ca/καλμοδουλίνη. Αντιθέτως, η αυτοφωσφορλίωση στην περιοχή Ca/καλμοδουλίνης, του ενεργοποιημένου/αυτοφωσφορυλιωμένου ενζύμου εμποδίζει την επανασύνδεση της Ca/καλμοδουλίνης. Ο μηχανισμός και οι συνέπειες της αυτοφωσφορλίωσης είναι πολύ σημαντικός στην πολυπλοκότητα της αυτορρύθμισης του ενζύμου και πιθανότατα είναι αυτό που καθιστά ικανή την CaMKII να ενεργοποιείται διαφορετικά σε διαφορετικές συχνότητες ασβεστίου. Έτσι, η CaMKII λειτουργεί ως ανιχνευτής των αυξομειώσεων της συγκέντρωσης ασβεστίου που μπορεί να αποκωδικοποιεί την συχνότητα αυτών των αυξομειώσεων και να τις μεταφράζει σε κατάλληλες κυτταρικές απαντήσεις (Schulman H.&Hudmon A.,2002).

Εικόνα 1.24: Οι διαφορετικές λειτουργικές περιοχές της δομής της CaM Kinase II. Το T αντιπροσωπεύει θέσεις θρεονίνης που είναι κρίσιμες θέσεις φωσφορλίωσης (Lishman J. et al,2002).

Όταν εξετάσει κανείς το ρόλο της CaM κινάσης II στην μεταγωγή σήματος μέσω ασβεστίου πρέπει να λάβει υπόψιν ότι οι λειτουργίες της διεξάγονται από μία οικογένεια ισομερών που προέρχονται από τέσσερα παρόμοια αλλά ξεχωριστά γονίδια (α,β,γ και δ). Στον εγκέφαλο συναντάμε περισσότερο τα ισομερή α και β ενώ τα γ και δ ισομερή μόνο σε ποσοστό 0,02% περίπου. Η CaM κινάση II είναι ένα ολοένζυμο που αποτελείται από πολλές υπομονάδες(8-12), με M.B. 460000-654000Da. Μια υπομονάδα της CaM κινάσης αποτελείται από τρεις περιοχές, μια καταλυτική, μία αυτορυθμιστική και μια περιοχή σύνδεσης (Εικόνα 1.24), ενώ όλα τα ισομερή παρουσιάζουν 89-93% ομοιότητα στην αλληλουχία τους στις δύο πρώτες περιοχές.

Η CaM kinase II μπορεί να φωσφορυλιώσει πάνω από 40 πρωτεΐνες *in vitro*, οι οποίες εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό, στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, στη δομή του κυτταροσκελετού στην ομοιοστάση των ιόντων ασβεστίου και στην έκφραση γονιδίων. Η CaM κινάση II είναι άφθονη στον εγκέφαλο όπου αποτελεί το 1% των συνολικών πρωτεϊνών και ιδιαίτερα στη μετασυναπτική περιοχή και έτσι φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων στον εγκέφαλο.(Eldik L.&Watterson M.,1998).

Η CaM κινάση II έχει μία μοναδική ιδιότητα μπορεί να λειτουργεί σαν μία μοριακή μηχανή μνήμης, που ενεργοποιείται μετά από την πρόσδεση της καλμοδουλίνης και παραμένει ενεργή και αφού απομακρυνθεί το ασβέστιο. Αυτό γίνεται διότι η κινάση αυτή μπορεί και φωσφορυλιώνει τον εαυτό της όπως και άλλες πρωτεΐνες στόχους, όταν είναι ενεργοποιημένη. Στη φάση αυτοφωσφορυλίωσης το ένζυμο μένει ενεργό απουσία ασβεστίου και έτσι παρατείνεται η διάρκεια της ενεργότητας της κινάσης πέρα από τη διάρκεια του αρχικού σήματος ασβεστίου; η ενεργότητα παραμένει έως ότου η δράση των φωσφατασών υπερισχύσει της αυτοφωσφορυλιωτικής ικανότητας του ενζύμου και έτσι το απενεργοποιήσει. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας η ενεργοποίηση της CaM κινάσης II μπορεί να αποθηκεύσει πληροφορίες μετάδοσης σήματος και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε μερικές διαδικασίες μνήμης και μάθησης στο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών(Zhang & Brown, 2004, Passier et al.,2000).

1.4.3.4 CaM Kinase II και T λεμφοκύτταρα

Τα ιόντα ασβεστίου είναι ένα σημαντικό δευτερογενές μήνυμα στα T λεμφοκύτταρα που συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού, στην ανεργία και στον κυτταρικό θάνατο. Έτσι, μπορεί να επηρεάζει την άμεση ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων όσο και τη μακροπρόθεσμη αντίδραση στο αντιγόνο. Σαν το πιο σημαντικό διαμεσολαβητή της ενεργοποίησης της καλμοδουλίνης, η CaMKII έχει το απαιτούμενο βιοχημικό σχεδιασμό για να ελέγχει την ενεργοποίηση, την ανεργία και τη μνήμη των T λεμφοκυττάρων. Η CaMKII έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην μακροπρόθεσμη και μόνιμη μνήμη στον εγκέφαλο, καθώς η αποκοπή ή μετάλλαξη της Thr²⁸⁶ σε Ala (θέση αυτοφωσφορυλίωσης) της CaMKII προκαλεί ελαττωματική μακροπρόθεσμη μνήμη και μάθηση. Οι Nghiem et al.(1993), κατασκεύασαν μία μεταλλαγμένη μορφή της CaMKII, στην οποία αντικατέστησαν τη θέση αυτοφωσφορυλίωσης Thr²⁸⁷ με ένα αρνητικά φορτισμένο ασπαρτικό οξύ, που είχε σαν αποτέλεσμα την αυτόνομη ενεργότητα της CaMKII σε ποσοστό 37%, ανεξάρτητα από την παρουσία ασβεστίου. Σε κύτταρα Jurkat, η CaMKIIγB αυτή μείωσε την παραγωγή της IL-2, και αυτό ερμηνεύτηκε ως ένδειξη ότι η CaMKII πιθανά διαμεσολαβεί ανεργία στα T λεμφοκύτταρα. Επίσης, Hama et al.(1995) έδειξαν ότι η CaMKII αναστέλλει την ενεργότητα των υποκινητών της IL-2 και IL-4 σε συμφωνία με την προηγούμενη αναφορά ενισχύοντας την άποψη ότι η CaMKII εμπλέκεται στην παραγωγή κυτταροκινών από τα T λεμφοκύτταρα. Για να ελέγξουν πως η CaMKII ρυθμίζει την φυσιολογία των T λεμφοκυττάρων οι Bui et al (2000), δημιούργησαν διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή της CaMKII στα T-λεμφοκύτταρα και έδειξαν ότι η CaMKII εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων και στη δημιουργία μνημονικών T λεμφοκυττάρων, καθώς παρατήρησαν ότι στα ποντίκια αυτά υπήρχε μια αύξηση του αριθμού των T λεμφοκυττάρων που είχαν φαινότυπο μνημονικών κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Αργότερα οι Lin et al (2005) μελέτησαν την επίδραση της CaMKII σε T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με αντιγόνο, εισάγοντας μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου, συνεχώς ενεργές και ανενεργές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η CaMKII προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση και κυτταροτοξική δράση, μειωμένη παραγωγή IL-2 και επαγωγή ανεργίας. Τέλος, οι McGargill et al., απέδειξαν ένα καινούργιο ρυθμιστικό ρόλο για την CaMKII βρίσκοντας ότι η CaMKII ανήκει σε ένα αρνητικό βρόχο ανάδρασης που διαφοροποιεί την ένταση του σήματος

ενεργοποίησης από τον T κυτταρικό υποδοχέα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η θετική επιλογή των T λεμφοκυττάρων στο θύμο.

Οι Hughes et al.(1998),μελετώντας την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε T λεμφοκύτταρα, ανέφεραν ότι η καλμοδουλίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην φωσφορυλίωση του IκB, μιας πρωτεϊνικής κινάσης που αναστέλλει την ενεργότητα του NF-κB,χρησιμοποιώντας διάφορους αναστολείς της καλμοδουλίνης. Το σημαντικό εύρημα ήταν ότι η καλμοδουλίνη είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF- κB και όχι μόνο διαμέσου της ενεργοποίησης της καλσινευρίνης. Αργότερα,οι ίδιοι ερευνητές(Hughes et al.,2001) απέδειξαν ότι η CaMKII είναι το ένζυμο που διαμεσολαβεί την φωσφορυλίωση του IκB, σε T λεμφοκύτταρα. Τέλος, οι Ishiguro et al.(2006), έδειξαν ότι η CaMKII ενισχύει την ενεργοποίηση του NF-κB, διαμέσου της CARMA1, μιας κινάσης αλληλεπιδρά με την Bcl10, μετά την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από τον T κυτταρικό υποδοχέα και μαζί ελέγχουν την ενεργότητα του NF-κB. Συγκεκριμένα, η CaMKII, φωσφορυλιώνει την CARMA1 στην Ser109,και αυτή η φωσφορυλίωση διευκολύνει την αλληλεπίδραση της CARMA1 με την Bcl10.

Ένας άλλος σημαντικός ρόλος της CaMKII στα T λεμφοκύτταρα διαφαίνεται από την εμπλοκή της στην παραγωγή του GM-CSF, μιας κυτταροκίνης που παράγεται από T και B λεμφοκύτταρα ως απάντηση σε λοίμωξη και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η παραγωγή της επάγεται από την ενεργοποίηση του T κυτταρικού υποδοχέα και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ασβέστιο εξαρτωμένη καλσινευρίνη είναι αυτή που ενεργοποιεί την μεταγραφή της, όταν αυξάνεται το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Οι Liu et al.(2002), έδειξαν ότι το ασβέστιο ρυθμίζει και αρνητικά την μεταγραφή του GM-CSF, μέσω της CaMKII, η οποία φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα Ets-1, μην επιτρέποντας την δέσμευση του στον υποκινητή της GM-CSF. Η παραγωγή δηλαδή αυτής της κυτταροκίνης φαίνεται ότι μπορεί να ρυθμίζεται και θετικά και αρνητικά διαμέσου του ασβεστίου, γεγονός που δεν είναι παράξενο αν σκεφθεί κανείς την τεράστια ποικιλία σημάτων που μπορεί να μεταφέρει το ασβέστιο ανάλογα με τη συχνότητα και το εύρος των αυξομειώσεων στη συγκέντρωσή του.

1.4.3.5.CaMKIV

Η CaMKIV είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που έχει εντοπιστεί στον πυρήνα σε περιοχές του εγκεφάλου στα T λεμφοκύτταρα και στα

γενετικά κύτταρα. Όταν μελετάει κανείς τον φυσιολογικό της ρόλο είναι σημαντικό να αναφέρει και τις άλλες δύο κινάσες της οικογένειας των CaM κινασών, CaMKII και CaMKI. Ενώ κάθε κινάση φωσφορυλιώνει περιοχές με ξεχωριστά χαρακτηριστικά, και οι τρεις αναγνωρίζουν την κοινή αλληλουχία R-X-X-S/T, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει αρκετή επικάλυψη στα υποστρώματα που αναγνωρίζουν. Η ενεργοποίηση της CaMKIV περιλαμβάνει τρία βήματα: 1) πρόσδεση της καλμοδουλίνης, 2) φωσφορυλίωση στη Thr 196 από μια CaMKK και 3) αυτοφωσφορυλίωση στις θέσεις Ser 11 και 12.

Η CaMKIV είναι η κινάση που είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB μετά την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Οι Anderson et al. (1997) δημιούργησαν διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν μία μεταλλαγμένη ανενεργή μορφή της CaMKIV στα T λεμφοκύτταρα του θύμου αδένος. Τα λεμφοκύτταρα αυτά επέδειξαν δραματική μείωση στην ικανότητά τους να φωσφορυλιώνουν τον CREB και να παράγουν IL-2. Λίγο αργότερα οι ίδιοι ερευνητές (Anderson et al., 2002) βρήκαν ότι σε μεταλλαγμένα ποντίκια CaMKIV^{-/-}, ένας υποπληθυσμός T λεμφοκυττάρων με επιφανειακούς δείκτες που χαρακτηρίζουν τα μνημονικά T λεμφοκύτταρα, παρουσίαζε ελαττωματική παραγωγή ιντερλευκίνης-2, καθώς και μειωμένη παραγωγή IL-4 και ιντερφερόνης -γ, λόγω της ανικανότητάς τους να φωσφορυλιώσουν τον μεταγραφικό παράγοντα CREB. Αντίθετα, τα αθώα T λεμφοκύτταρα ήταν φυσιολογικά στην ικανότητα τους να παράγουν ιντερλευκίνη 2 και παρουσίαζαν κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι, απέδειξαν ότι υπάρχουν διαφορετικές απαιτήσεις για την ενεργοποίηση παραγωγής κυτταροκινών μεταξύ δύο υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων.

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η CaMKIV παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της IL-2 από T λεμφοκύτταρα όταν αυτά ενεργοποιούνται μέσω του CD5 υποδοχέα (Gringhuis et al., 1997) σε μεταγραφικό αλλά και μετα-μεταγραφικό επίπεδο σταθεροποιώντας το mRNA της IL-2. Η οδός μεταγωγής σήματος στα T λεμφοκύτταρα μέσω του CD5 κυτταρικού υποδοχέα περιλαμβάνει την παραγωγή της ιντερλευκίνης 2 μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, χωρίς να επηρεάζει άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον NF-AT, τον NF-κB, τον Oct και άλλους που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-2. Η ενεργοποίηση αυτή του AP-1 διαμεσολαβείται από την CaMKIV και είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση άλλων κινασών όπως οι MAPK jun και erk ή την CaMKII. Άλλωστε, οι Jang et al. (2001), απέδειξαν ότι η CaMKIV αλληλεπιδρά και

φωσφορυλιώνει την p65 υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, συμβάλλοντας στην ενεργοποίησή του.

Τέλος, οι Pan et al. (2005) ανέφεραν ότι η CaMKIV φωσφορυλιώνει απευθείας την Cabin 1, ένα αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2. Ο MEF2 είναι συνεχώς προσδεδεμένος στο DNA στον πυρήνα και μπορεί να ενεργοποιεί ή να καταστέλλει την έκφραση γονιδίων. Όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου είναι χαμηλή ο MEF2 παραμένει ανενεργός στον πυρήνα, μέσω της αλληλεπίδρασής του με καταστολείς όπως ο Cabin1 και διακετυλάσες ιστόνης (HDACs).

1.4.3.6.Καλσινευρίνη

Η καλσινευρίνη είναι μία φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης η οποία είναι συντηρημένη σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και μοναδική στην ικανότητά της να διαμεσολαβεί τα ενδοκυτταρικά μηνύματα από το ασβέστιο μέσω της ενεργοποίησης της από την καλμοδουλίνη. Ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε από την Claude Klee και Philip Cohen στο τέλος της δεκαετίας του '70, αλλά ήρθε στο προσκήνιο όταν ανακαλύφθηκε από τους Stuart Schreiber Irving Weissman ότι είναι στόχος των ανοσοκατασταλτικών κυκλοσπορίνη A και FK506. Την ίδια χρονιά το εργαστήριο του G. Crabtree έδειξε ότι η κυκλοσπορίνη A εμποδίζει την είσοδο στο πυρήνα του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και το 1993 η A. Rao απέδειξε ότι οι πρωτεΐνες του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT αποφωσφορυλιώνονται από την καλσινευρίνη. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην αποκάλυψη ενός κεντρικού μονοπατιού σηματοδότησης που συνέδεε την καλσινευρίνη με τη ρύθμιση της μεταγραφής. Από τότε, η καλσινευρίνη και οι πρωτεΐνες του NF-AT έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού, νευρικού μυοσκελετικού και καρδιαγγειακού συστήματος. Παράλληλες μελέτες σε μικροβιακά συστήματα αποκάλυψαν ότι οι βασικοί μηχανισμοί της δράσης της καλσινευρίνης είναι συντηρημένοι από τους μονοκύτταρους ως τους πολυκύτταρους οργανισμούς (Aramburu et al., 2004).

Εικόνα 1.25: Δομή καλσινευρίνης(Klee et al.,1998)

Στα T λεμφοκύτταρα ένα κύριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μετά την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου είναι αυτό της καλσινευρίνης /NF-AT, που είναι πλέον πολύ καλά χαρακτηρισμένο. Η Καλσινευρίνη αποτελείται από μία καταλυτική υπομονάδα καλσινευρίνη A και μία ρυθμιστική υπομονάδα, την καλσινευρίνη B(Εικόνα 1.25). Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές της καλσινευρίνης A, CnAα, CnAβ, και CnAγ και δύο ισομορφές της καλσινευρίνης B, CnB1 και CnB2. Ο NF-AT αποτελείται από μία οικογένεια τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων,(NFAT1-4, γνωστών ως και NFATc1-c4. Όλοι, εκτός από τον NFAT3 εκφράζονται στα περιφερικά λεμφοκύτταρα. Μια αύξηση στο ενδοκυττάριο ασβέστιο, έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της καλμοδουλίνης στην καλσινευρίνη και ενεργοποίηση της. Η αποφωσφορυλίωση του NFAT από την καλσινευρίνη έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση του στον πυρήνα. Η έκφραση γονιδίων που ρυθμίζεται από τον NFAT είναι σε άμεση εξάρτηση με την παρατεταμένη αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου και την ενεργότητα της καλσινευρίνης γιατί έχει παρατηρηθεί ότι μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου ή η προσθήκη του αναστολέα της καλσινευρίνης, κυκλοσπορίνη A, έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη έξοδο του NFAT από τον πυρήνα, λόγω της φωσφορυλίωσής του από κινάσες όπως η κινάση της σύνθεσης γλυκογόνου, η κινάση της καζεΐνης, και κινάσες διπλής ειδικότητας φωσφορυλίωσης τυροσίνης (Oh-hora et al.,2008). Η σημασία του

μεταγραφικού παράγοντα NFAT στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων φαίνεται από γενετικές αναλύσεις. Σε δύο ανθρώπινες οικογένειες, η μη ενεργοποίηση του NFAT λόγω ελαττωματικής εισόδου των ιόντων ασβεστίου από τις εσωτερικές αποθήκες, συνδέεται με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια, ενώ χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές από αυτούς τους ασθενείς αποδείχθηκε ότι ο NFAT είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση περίπου του 75% των ασβεστιοεξαρτώμενων γονιδίων στα T λεμφοκύτταρα. Η χρησιμοποίηση της τεχνικής της γονιδιακής ανάλυσης με DNA microarrays, αποκάλυψε ότι τα περισσότερα γονίδια που ενεργοποιούνται στα T λεμφοκύτταρα καταστέλλονται από αναστολές της καλσινευρίνης (Savignac et al. 2007).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB μπορεί να ενεργοποιηθεί πλήρως μόνο με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κίνησης C, απουσία σήματος ασβεστίου. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι υπερέκφραση συνεχώς ενεργούς καλσινευρίνης, υποβοηθά την ενεργοποίηση του NF-κB, και μάλιστα μπορεί να ανασταλεί αυτή η ενεργοποίηση κατά 40-70% από την κυκλοσπορίνη A ή το FK506. Αυτό υποδεικνύει ότι είναι πιθανό σε μερικές περιπτώσεις η πλήρης ενεργοποίηση του NF-κB, να χρειάζεται την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης (Frantz et al., 1994).

Ο AP-1 μεταγραφικός παράγοντας αποτελείται από πρωτεΐνες fos και Jun, ενώ η μεταγραφή γονιδίων που εξαρτώνται από αυτόν δεν φαίνεται να αναστέλλεται από την κυκλοσπορίνη A ή το FK506. Όμως έχει βρεθεί ότι μία περιοχή στον υποκινητή της ιντερλευκίνης -2 στην οποία προσδένεται η πρωτεΐνη junD και ίσως η Jun-c, απαιτεί την δράση της καλσινευρίνης για πλήρη ενεργοποίηση (Ulman et al., 1993).

Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που φαίνεται να εξαρτάται από την καλσινευρίνη είναι ο MEF2. Ο μηχανισμός ρύθμισης των πρωτεϊνών του MEF2 από την καλσινευρίνη φαίνεται ότι γίνεται μέσω της αποδέσμευσης του από την ιστόνη διακετυλάσης 4 (Lu et al. 2000), γεγονός που οδηγεί τα T λεμφοκύτταρα σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nur77 (Youn et al. 1999).

1.5.ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι τρεις βασικές αποφάσεις ενός κυττάρου για το αν θα διαιρεθεί, θα διαφοροποιηθεί ή θα πεθάνει, επηρεάζονται σημαντικά από εξωκυττάρια μηνύματα που δέχεται από το περιβάλλον του. Τα σήματα αυτά καταλήγουν στον πυρήνα του

κυττάρου όπου ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται γονίδια των οποίων τα προϊόντα ρυθμίζουν την κυτταρική συμπεριφορά. Συνεπώς, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί κομβικό σημείο για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού.

Σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης παίζει η συμμετοχή και η δράση ειδικών πρωτεϊνών, των *μεταγραφικών παραγόντων*. Για τον σκοπό αυτό οι μεταγραφικοί παράγοντες:

- δεν πρέπει να φέρουν λειτουργικές ανωμαλίες λόγω μεταλλάξεων,
- πρέπει να παράγονται σε φυσιολογικές ποσότητες μέσα στο κύτταρο,
- πρέπει να εκφράζονται στον κατάλληλο τύπο κυττάρου και στο σωστό χρόνο.

Εάν δεν καλύπτονται οι παραπάνω προϋποθέσεις το αποτέλεσμα μπορεί να έγκειται ανάμεσα σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών καταστάσεων, από αναπτυξιακές διαταραχές έως την εμφάνιση καρκίνου (Papavassiliou, 1995a; Papavassiliou, 1995b).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες, λειτουργούν ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και αλληλεπιδρούν με ειδικές αλληλουχίες πάνω στο DNA. Το τμήμα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA έχει τη διαμόρφωση *α* έλικας, και περιέχει ή πρόσκειται σε θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία αλληλεπιδρούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA. Τα βασικότερα δομικά μοτίβα του μορίου των μεταγραφικών παραγόντων, για την αλληλεπίδραση τους με το DNA, είναι τέσσερα: (*α*) *έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix)*, (*β*) «*δάκτυλα*» *ψευδαργύρου (zinc fingers)*, (*γ*) «*φερμουάρ*» *λευκίνης (leucine zipper)* και (*δ*) *έλικα-βρόχος-έλικα (helix-loop-helix)*. Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε *υποκινητές* και *ενισχυτές*, που αποτελούν ειδικές ρυθμιστικές θέσεις του DNA των γονιδίων. Επιπλέον, επειδή συνήθως δρουν σε σχηματισμό συμπλόκων με άλλες πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής, χρησιμοποιούν διακριτές επιφάνειες του μορίου τους που ονομάζονται περιοχές ενεργοποίησης ή καταστολής (Papavassiliou, 1995b).

Η υπεροικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων χαρακτηρίζεται από εξαιρετικό ποικιλομορφισμό και περιλαμβάνει πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα ενεργών και ανενεργών μορφών. Η μετατροπή της μορφής των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να επάγεται τόσο από εξωκυττάρια όσο και από ενδοκυττάρια μηνύματα. Υπάρχουν μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι οδηγούνται στον πυρήνα του κυττάρου αμέσως μετά τη σύνθεσή τους ενώ βρίσκονται ήδη στην ενεργό μορφή

τους. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες μεταφέρονται και παραμένουν στον πυρήνα σε ανενεργή μορφή και για την ενεργοποίησή τους είναι απαραίτητη η σύνδεσή τους με κατάλληλα υποστρώματα, τα οποία μεταφέρονται στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα. Κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες, σε ενεργή μορφή, μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μόνο ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις οι μεταγραφικοί παράγοντες οδηγούνται στον πυρήνα σε ενεργό ή ανενεργό μορφή και αδρανοποιούνται ή ενεργοποιούνται αντίστοιχα εκεί από κινάσες ή φωσφατάσες, ειδικά ένζυμα ενεργότητας των οποίων έχει επαχθεί από εξωκυττάρια σήματα και που οδηγούν την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (Papavassiliou, 1995a; Papavassiliou, 1995b).

1.5.1 Μεταγραφικός παράγοντας MEF2

Ο μεταγραφικός παράγοντας *MEF2* (*Myocyte Enhancer Factor-2*) πρωτο-περιγράφηκε ως μεταγραφικός παράγοντας μυϊκών κυττάρων, που είχε την ικανότητα να προσδένεται σε μια πλούσια σε A/T βάσεις αλληλουχία DNA παρούσα στις ρυθμιστικές περιοχές διαφόρων μυο-ειδικών γονιδίων (Brand, 1997). Στη συνέχεια, αποδείχτηκε ότι ενώ η έκφραση του είναι ιδιαίτερα υψηλή στα μυϊκά κύτταρα, εκφράζεται επίσης σε υψηλά επίπεδα στα νευρικά κύτταρα και λιγότερο σε διαφόρους τύπους κυττάρων (McKinsey *et al.*, 2002).

Ο MEF2 αποτελεί ομάδα των μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην οικογένεια MADS (MADS-box family of transcription factors), το όνομα της οποίας προέρχεται από τα αρχικά των τεσσάρων πρώτων μεταγραφικών παραγόντων-μελών της που αναγνωρίστηκαν (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς του, ο MEF2 λειτουργεί μετά από αλληλεπίδραση του σε πρωτεϊνικό επίπεδο (protein-protein interaction) με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και παρεμβαίνει στη μεταγραφή ειδικών γονιδίων στόχων του, ωστόσο δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλους παράγοντες της οικογένειας των MADS-box (Black *et al.*, 1998; Brand, 1997).

Υπάρχουν 4 *mef2* γονίδια στα σπονδυλωτά, *mef2a*, *-b*, *-c*, *-d*, τα οποία εκφράζονται κατά την εμβρυογένεση και στους ιστούς ενηλίκων, όλα σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το γονίδιο *mef2d* είναι το πιο κοινά εκφραζόμενο στα T λεμφοκύτταρα (Liu, 2005). Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 μπορεί

να ρυθμιστεί μεταγραφικά, μεταφραστικά και μετα-μεταφραστικά (Black *et al.*, 1998).

Εικόνα 1-26. Δομή του MEF2. Όλες οι πρωτεΐνες του MEF2 έχουν παρόμοια δομή, περιέχοντας μια MADS περιοχή στο N-άκρο τους, η οποία διαμεσολαβεί την όμο- και ετεροδιμεροποίηση αλλά και την πρόσδεση του MEF2 στην DNA αλληλουχία CTA(A/T)₄TAG/A. Δίπλα στη MADS περιοχή υπάρχει μια MEF2-ειδική περιοχή η οποία επηρεάζει τη συγγένεια πρόσδεσης στο DNA και τις αλληλεπιδράσεις του με τους συνενεργοποιητές του. Οι πρωτεΐνες του MEF2 περιέχουν περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής στο C-άκρο τους. Υπάρχουν αρκετές MEF2-αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές επάγουν την ενεργοποίηση του MEF2 (ενεργοποιητές) ενώ άλλες καταστέλλουν τη λειτουργία του (καταστολείς). Ενδεικτικά παραδείγματα παραθέτονται στην εικόνα.

Οι MEF2 πρωτεΐνες (Εικόνα 1-26) είναι σχεδόν πανομοιότυπες ως προς το N άκρο τους, το οποίο εμπεριέχει ένα MADS-box (ένα τμήμα 57 αμινοξέων) και ένα MEF2 domain (γειτονικό τμήμα 29 αμινοξέων). Το MADS-box, το οποίο περιέχει αλληλουχίες που είναι ομόλογες ανάμεσα στον MEF2 και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των MADS-box μεταγραφικών παραγόντων, είναι απαραίτητο για την αναγνώριση, την υψηλής συγγένειας δέσμευση και το διμερισμό της DNA αλληλουχίας CTA(A/T)₄TAG/A. Το MEF2 domain είναι μοναδικό για τους MEF2 μεταγραφικούς παράγοντες και είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση του MEF2 με άλλες πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής. Το MADS-box και το MEF2 domain συνεργάζονται μεταξύ τους και είναι επαρκή για την αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA, ωστόσο δεν περιέχουν αυτόνομη μεταγραφική δραστηριότητα, για την οποία είναι απαραίτητο το C άκρο της πρωτεΐνης (McKinsey *et al.*, 2002).

Όταν το κύτταρο βρίσκεται σε ηρεμία, ο MEF2 είναι συνδεδεμένος με καταστολείς της ενεργότητας του, όπως η Cabin1 και οι ιστονο-δεκετυλάσες της τάξης II (Histone deacetylases class II-HDACs) που συμπεριλαμβάνουν τις HDAC4, 5, 7 και 9 (Εικόνα 1-27a). Η Cabin1 είναι μια πρωτεΐνη γνωστή και ως cain, η οποία πρωτο-ανακαλύφθηκε εξαιτίας της ικανότητας της να αλληλεπιδρά με την καλσινευρίνη (σημαντικό διαμεσολαβητή του άσβεστο-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος), να αναστέλλει την ενεργότητα της και συνεπώς να ρυθμίζει το

άσβεστο-εξαρτώμενο μονοπάτι. Οι HDACs διακρίνονται σε 3 τάξεις ανάλογα με την ομολογία των τριών δομικά και βιοχημικά διαφορετικών ενζύμων που πρωτο-αναγνωρίστηκαν στους μύκητες (Liu, 2005; McKinsey *et al.*, 2002).

Μετά από κατάλληλο σήμα, ο MEF2 αποδεσμεύεται από τους καταστολείς του μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης τους από πρωτεϊνικές κινάσες που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση του (Εικόνα 1-27b). Π.χ. στο άσβεστο-εξαρτώμενο μονοπάτι, η άσβεστο-καλμοδουλινο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (CaMK) φωσφορυλιώνει τις HDACs, αλλά και την Cabin1, δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης των μεταφορέων-πρωτεϊνών 14-3-3, οι οποίες επάγουν την έξοδο και τη μεταφορά τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και την επακόλουθη απελευθέρωση του MEF2. Στο σημείο όπου άλλοτε ο MEF2 ήταν συνδεδεμένος με τον καταστολέα του, δημιουργείται θέση πρόσδεσης με συνενεργοποιητές του, όπως π.χ. η ιστονο-ακετυλάση p300, οι οποίοι οδηγούν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του (Liu, 2005; McKinsey *et al.*, 2002).

Εικόνα 1-27. Τρόπος ρύθμισης μεταγραφής μέσω του μεταγραφικού παράγοντα MEF2. α) Όταν το κύτταρο βρίσκεται σε ηρεμία ο MEF2 βρίσκεται στη μη ενεργοποιημένη του μορφή, συνδεδεμένος με καταστολείς της ενεργοποίησής του, όπως η Cabin1 και οι HDACs, μη παρεμβαίνοντας στη βασική μεταγραφική μηχανή. β) Μετά από κατάλληλο σήμα, ο MEF2 απελευθερώνεται από τους καταστολείς του μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης τους από κινάσες που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση του παρεμβαίνει στη μεταγραφική μηχανή επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του.

Η απελευθέρωση από τους καταστολείς του και η επακόλουθη ενεργοποίηση του MEF2 φαίνεται να είναι αποτέλεσμα συντονισμένης συνεργασίας περισσοτέρων του ενός σηματοδοτικού μονοπατιού (Liu, 2005; McKinsey *et al.*, 2002) ενώ ο MEF2 αποτελεί τον τελικό αποδέκτη διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών σε διαφορετικά κύτταρα (Black *et al.*, 1998; Liu, 2005; McKinsey *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005a; Yang *et al.*, 1999) (Belfield *et al.*, 2006). Στα T λεμφοκύτταρα, ο μεταγραφικός παράγοντας MEF2 αποτελεί τελικό αποδέκτη του ενδοκυττάριου σήματος της αύξησης της συγκέντρωσης του ασβεστίου (Belfield *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2004), εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση σαν απάντηση στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω του υποδοχέα τους (Pan *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 1999) και ρυθμίζει τη μεταγραφή κυτταροκινών π.χ. της ιντερλευκίνης-2 (Pan *et al.*, 2004).

1.5.2. Μεταγραφικός παράγοντας CREB

Ο παράγοντας μεταγραφής CREB (*cAMP-Responsive element-binding protein*) διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση των cAMP-επαγομένων γονιδίων μετά από πρόσδεση του στη συντηρημένη περιοχή CRE (*cAMP-Responsive element*). Η CRE, η οποία πρωτο-αναγνωρίστηκε στον υποκινητή της somatostatin, περιέχει την παλινδρομική αλληλουχία βάσεων TGACGTCA και εμπεριέχεται στις ρυθμιστικές περιοχές των περισσοτέρων γονιδίων αποδεκτών του cAMP-εξαρτώμενου μονοπατιού (De Cesare *et al.*, 1999; Fimia *et al.*, 2001; Sands *et al.*, 2008; Sassone-Corsi, 1998; Torgersen *et al.*, 2002), ενώ η μεταγραφική δραστηριότητα του CREB συνδέεται με διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων του καρδιακού ρυθμού, της μνήμης και της σπερματογένεσης (De Cesare *et al.*, 1999).

Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 3 διαφορετικά γονίδια στα θηλαστικά, CREB, CREM και ATF-1, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα ισομερή των μεταγραφικών παραγόντων CREB, CREM και ATF-1. Οι CREB και ATF-1 εκφράζονται σε όλους τους τύπους των κυττάρων, ο CREM εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους νευρο-ενδοκρινικούς (neuroendocrine) ιστούς (Mayr *et al.*, 2001). Και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην γενικότερη οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν στη βασική περιοχή τους «φερμουάρ» λευκίνης (basic-domain-leucine-zipper, bZip). Μετά από τη φωσφορυλίωση του, ο CREB, αλληλεπιδρά με διάφορους συνεργοποιητές του και σχηματίζει ομο- και ετεροδιμερή

που συνδέονται στο CRE ρυθμιστικό τμήμα των γονιδίων στόχων του επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση τους. Αυτό συμβαίνει διότι ανάμεσα στα διαφορετικά ισομερή του CREB, υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως ενεργοποιητές (transactivators) και άλλες που λειτουργούν ως αναστολείς της γονιδιακής μεταγραφής των στόχων τους (De Cesare *et al.*, 1999).

Το N άκρο του CREB περιέχει μια περιοχή ενεργοποίησης (Activation domain), η οποία υποδιαιρείται σε 2 ανεξάρτητα τμήματα. Το πρώτο τμήμα είναι γνωστό ως πλαίσιο φωσφορυλίωσης (Phosphorylation box-P box) αποτελείται από περίπου 60 αμινοξέα και περιέχει ένα σύνολο θέσεων/στόχων φωσφορυλίωσης διαφόρων κινασών, ανάμεσα τους και την σερίνη¹³³ που αποτελεί άμεσο στόχο φωσφορυλίωσης της PKA. Το δεύτερο τμήμα της περιοχής ενεργοποίησης, περιέχει 2 πλούσιες σε γλουταμίνη περιοχές, τις Q1 και Q2 περιοχές, οι οποίες οριοθετούν το πλαίσιο φωσφορυλίωσης και συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα με τα συστατικά της μεταγραφικής μηχανής (Εικόνα 1-28). Το P box συνεργάζεται με τουλάχιστον μια από τις Q1 και Q2 περιοχές, ειδικότερα με την Q2 περιοχή, και είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του CREB (De Cesare *et al.*, 1999; Mayr *et al.*, 2001). Το C άκρο του CREB όπως και των υπολοίπων μελών της οικογένειας του, περιέχει το «φερμουάρ» λευκίνης (basic-domain-leucine-zipper, bZip) (Mayr *et al.*, 2001).

Η φωσφορυλίωση του CREB επάγεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια π.χ. το p38 σηματοδοτικό μονοπάτι και το άσβεστο-εξαρτώμενο μονοπάτι, και αποτελεί απάντηση σε ποικίλα ερεθίσματα π.χ. στρες και μιτογόνα ερεθίσματα (Mayr *et al.*, 2001).

Εικόνα 1-28. Δομή του CREB. Στην εικόνα φαίνονται οι πλούσιες σε γλουταμίνη περιοχές (Q1 και Q2), η περιοχή πρόσδεσης του DNA, η οποία περιέχει τη βασική περιοχή (basic domain) και το φερμουάρ λευκίνης (Leucine zipper), και το κουτί φωσφορυλίωσης (P-box). Ενδεικτικά σημειώνεται και η θέση της σερίνης¹³³, η οποία αποτελεί το σημείο φωσφορυλίωσης από την PKA.

1.5.3 Μεταγραφικός παράγοντας NF-κB

Η Rel/NF-κB οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων αποτελείται από πολλές δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες που σχηματίζουν όμο- και έτεροδιμερή (Chen&Ghosh,1999). Στα σπονδυλωτά, η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει p50/p105, p52/p100, RelA(p65), c-rel και RelB. Τα διμερή αυτά προσδένονται σε μία περιοχή στο DNA που αποτελείται από 10bp, και λέγονται κB περιοχές, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση πολλών γονιδίων. Στα περισσότερα κύτταρα, οι Rel/NF-κB μεταγραφικοί παράγοντες βρίσκονται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα, όπου είναι συνδεδεμένοι με έναν αναστολέα που λέγεται IκB. Πολλοί διεγέρτες μπορούν να ενεργοποιήσουν γρήγορα αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες, αφού τους απελευθερώσουν από τον αναστολέα τους και καθιστώντας τους έτσι ικανούς να μετακινηθούν στον πυρήνα. Στα θηλαστικά, το πιο κοινό διμερές αποτελείται από p50 και RelA πρωτεΐνες και ονομάζεται NF-κB (Pahl et al., 1999).

Ο NF-κB αποκαλείται συχνά ως ο κεντρικός ρυθμιστής της ανθρώπινης ανοσιακής απάντησης και ο λόγος είναι προφανής αν σκεφτεί κανείς τον μεγάλο αριθμό μορίων που τον ενεργοποιούν αλλά και των μορίων-στόχων του NF-κB (Pahl H., 1999). Τα τελευταία περιλαμβάνουν 150 σχεδόν γονίδια και τα περισσότερα από αυτά συμμετέχουν στην ανοσιακή απάντηση. Συγκεκριμένα, αυτά είναι 27 διαφορετικές κυτταροκίνες και χημειοκίνες, υποδοχείς απαραίτητοι στην αναγνώριση αντιγόνου, όπως τα μόρια MHC, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση αντιγόνου και υποδοχείς που παίζουν ρόλο στην προσκόλληση των ουδετόφιλων και τη διαμετακίνηση τους ανάμεσα στα τοιχώματα των αγγείων.

Στα T-λεμφοκύτταρα έχει αναφερθεί ότι η ασβεστιο-εξαρτώμενη οδός ενεργοποίησης παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της καλσινευρίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C (Sergey et al., 1999), ενώ φαίνεται ότι και η καλμοδουλίνη είναι σημαντική στην ενεργοποίηση του (Hughes et al., 1998, Antonsson et al., 2002), μέσω της CaM Kinase II, η οποία ενεργοποιεί την IKK, μια κινάση που στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον αναστολέα του NF-κB, IκB (Hughes et al., 2001).

1.6 ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Μέχρι σήμερα η ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 έχει μελετηθεί κυρίως σε μονοκύτταρα. Οι βασικότερες μελέτες των Platter *et al.* έχουν αποδείξει ότι η αύξηση

της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της cAMP έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της IL-10 από μονοκύτταρα (Platzer *et al.*, 1999; Platzer *et al.*, 1995). και μάλιστα έχει αποδειχτεί ότι για αύξηση αυτή της παραγωγής της IL-10 από τα μονοκύτταρα ευθύνονται συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων CREB και ATF-1, παρούσες στον υποκινητή του γονιδίου της IL-10 κοντά στο TATA box (Platzer *et al.*, 1999).

Η μελέτη της παραγωγής της IL-10 από λεμφοκύτταρα μέχρι στιγμής περιορίζεται σε δεδομένα από κυτταρικές σειρές, ή σε σύστημα ποντικού όπου τα δεδομένα υποδεικνύουν το ρόλο του SP1, SP3 και c-JUN μεταγραφικών παραγόντων. Ιδιαίτερα τονίζεται η σημασία της 3-UTR περιοχής, όπου υπάρχουν αλληλουχίες που εμπλέκονται στην αποσταθεροποίηση του mRNA της IL-10, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ρύθμιση της μπορεί να γίνεται και σε μέτα-μεταγραφικό επίπεδο. (Powell *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005b, Tone *et al.*, 2000). Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που εμπλέκουν και τον μεταγραφικό παράγοντα Stat3 στην ρύθμιση της μεταγραφής της IL-10, ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή της στις -120bp (Heitbrock *et al.*, 2003, Benkhart *et al.*, 2000).

Λίγα δεδομένα υπάρχουν ως σήμερα όσο αφορά την παραγωγή της IL-10 στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία δείχνουν ότι η ασβέστιο-εξαρτώμενη οδός ενεργοποίησης είναι σημαντική για τη ρύθμιση της IL-10 μέσω της καλσινευρίνης (Rafiq *et al.*, 2000), ενώ έχει αναφερθεί ότι και στα μονοκύτταρα, η αύξηση του ασβεστίου ενισχύει την παραγωγή της IL-10 (Lehmann *et al.*, 1998). Επίσης, οι Mori *et al.* (1997), μελετώντας τη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 σε T κυτταρικές σειρές, παρατήρησαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB είναι πιθανό να εμπλέκεται στη ρύθμιση αυτή. Πρόσφατη μελέτη που έγινε στο εργαστήριο μας εμπλέκει τον μεταγραφικό παράγοντα MEF2 στην ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 σε μετα-μεταγραφικό και μεταγραφικό επίπεδο, μέσω της οδού ενεργοποίησης που ελέγχεται από το cAMP (Liopeta *et al.*, 2008).

2 ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η διερεύνηση της συμμετοχής του σηματοδοτικού μονοπατιού που ελέγχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου στην ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 από φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα όπου δεν υπάρχουν ως τώρα αρκετά δεδομένα, καθώς τα μέχρι σήμερα δεδομένα προέρχονται από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε T κυτταρικούς κλώνους και σε T κυτταρικές σειρές.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΥΛΙΚΑ

..... Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού.

A

Άγαρ από *DIFCO*

Αγαρόζη από *GIBCO BRL*

Αιθανόλη από *MERCK*

Αιθανόλη από *MERCK*

Ακρυλαμίδιο από *SIGMA*

Αμπικιλίνη από *SHOERING PLOUGH*

B

β-μερκαπτοαιθανόλη από *MERCK*

Βρομιούχο αιθίδιο από *SIGMA*

Γ

γ-³²P ATP από *Amersham Pharmacia Biotech*

Γενταμυκίνη από *SCHERING PLOUGH*

Γλυκερόλη από *SIGMA*

Δ

Δείκτες DNA μοριακού μεγέθους από *GIBCO BRL*

Διάλυμα Φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (125:24:1) από *SIGMA*

Διαλύματα εμφάνισης φιλμ από *KODAK*

Δις-ακρυλαμίδιο από *SIGMA*

E

Ερυθρά Προβάτου από *Virion/Serion D*

I

Ισοπροπυλική Αλκοόλη από *MERCK*

K

Κυανό του τρυπανίου (Trypan blue) από *BIOCHROM*

O

Οξικό οξύ από *MERCK*

Σ

Στήλη μαγνητικού πεδίου LS από *MACS*

Φ

Φιλμ αυτοραδιογραφίας από *KODAK*

X

Χλωριούχο αμμώνιο από *AppliChem*

Χλωροφόρμιο από *SIGMA*

8-Br-cAMP από *SIGMA*

A

Actinomycin D από *PROMEGA*

AET από *SIGMA*

Anti-goat από *SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY*

Anti-MEF2D από *SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY*

B

Bactopeptone από *DIFCO (BECTON DICKINSON)*

BIORAD Protein Assay από *BIORAD*

Bromophenol blue από *SERVA*

BSA από *SIGMA*

C

CD3-FITC από *IMMUNOTECH Beckman Coulter*

CD45RA-PE από *IMMUNOTECH Beckman Coulter*

CD45RO-PE από *IMMUNOTECH Beckman Coulter*

Coomassie Brilliant Blue R250 από *MERCK*

D

DEPC από *SIGMA*

DH5a Competent Cell Kit από *INVITROGEN*

DNA Labeling System από *INVITROGEN*

DTT από *SIGMA*

Dual Luciferase Reporter Assay System από *PROMEGA*

E

EDTA (αιθυλενο-διαμυνο-τετραοξικό οξύ) από *SIGMA*

EGTA από *GIBCO BRL*

F

FBS από *GIBCO BRL*

Ficol-Hypaque-1077 από *SIGMA*

FORSKOLIN από *SIGMA*

Freezing Medium από *GIBCO BRL*

H

HCl από *MERCK*

HEPES (N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζινο-N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ) από *SIGMA*

I

IgG-FITC από *IMMUNOTECH Beckman Coulter*

IgG-PE από *IMMUNOTECH Beckman Coulter*

IL-10 ELISA kit από *BIOSOURCE*

IL-2 ELISA kit από *BIOSOURCE*

IL-4 ELISA kit από *BIOSOURCE*

Ionomycin από *SIGMA*

K

KCl από

KCl από *MERCK*

KH₂PO₄ από *SIGMA*

L

L-Leucine-methyl-ester από *SIGMA*

M

Memory CD4⁺ T cell Isolation Kit από *Miltenyi Biotech*

MgCl₂ από *MERCK*

N

NaCl από *MERCK*

NaOH από *MERCK*

Nonidet P-40 (NP-40) ή IGEPAL CA630 από *SIGMA*

O

Oligo-DTs από *INVITROGEN*

P

PBS από *GIBCO BRL*

pCREB-Luc πλασμίδιο από *STRATAGENE*

PGE2 από *SIGMA*

pGL3 από *PROMEGA*

PMA από *SIGMA*

PMSF από *SIGMA*

Poly dIdC από *ROCHE*

pRL-TK από *PROMEGA*

R

rhIL-2 από *R&D SYSTEMS*

ROLIPRAM από *SIGMA*

Rp-8-Br-cAMP από *BioLog*

RPMI 1640 από *GIBCO BRL*

RT-PCR Kit IL-4 από *MAXIM Biotech Inc.*

RT-PCR Kit 18S από *MAXIM Biotech Inc.*

RT-PCR Kit IL-10 από *MAXIM Biotech Inc.*

S

SDS από *MERCK*

Sodium acetate από *SIGMA*

SuperScriptII Reverse Transcriptase (SSIIRT) από *INVITROGEN*

T

TBE από *INVITROGEN*

TBS από *GIBCO*

TEMED από *SIGMA*

Tris-HCl pH 7.4 από *GIBCO BRL*

TRIZOL από *INVITROGEN*

Y

Yeast extract από *DIFCO*

.....Τα .. πλαστικά .. σωληνάρια .. μιας .. χρήσης .. 15, .. 50ml, .. οι .. φιάλες ..
κυτταροκαλλιέργειας, οι πλάκες μικροκαλλιιεργιών 96 φρεατίων με κοίλο και/ή
επίπεδο πυθμένα, τα σωληνάρια τύπου errendorf και τα κρυοάντοχα σωληνάρια των
2ml ήταν της εταιρίας *CORNING COSTAR*.

2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.1.1 Διαλύματα

Όλες οι καλλιέργειες των φυσιολογικών κυττάρων, καθώς και των Τ-λεμφοκυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκαν με χρήση του θρεπτικού υλικού RPMI 1640 (+ HEPES, + Glutamine της GIBCO BRL), μετά από προσθήκη 10% εμβρυικού ορού μόσχου (Fetal Bovine Serum) και 40 µg/ml γενταμικίνης.

2.1.2 Απομόνωση ανθρώπινων μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με χρήση διαλύματος Φικόλης

Αρχή μεθόδου:

Το Histopaque-1077 είναι ένα διάλυμα πολυσακχαρίτη με πυκνότητα 1.077 ± 0.001 g/ml το οποίο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα με την εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hypaque). Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι τα λεμφοκύτταρα και τα άλλα μονοπύρηνια κύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα (εικόνα 2-1).

Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων

Εικόνα 2-1. Διαχωρισμός των συστατικών του ολικού αίματος μετά από χρήση Φικόλης.

Περιφερικό αίμα, που λαμβάνεται από υγιείς αιμοδότες, επιστιβάζεται προσεκτικά στην επιφάνεια του υγρού στρώματος φικόλης (Ficoll-Hypaque). Η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων, αλλά μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των στοιβάδων σε θερμοκρασία δωματίου, αφού στη θερμοκρασία των 4° C δεν επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των κυτταρικών στοιχείων του αίματος καθώς κάνουν συσσωματώματα. Κατά τη φυγοκέντρηση, τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα διέρχονται διαμέσου της φικόλης για να σχηματίσουν ίζημα στον πυθμένα του φιαλιδίου, ενώ τα λεμφοκύτταρα και τα άλλα μονοπύρρηνα κύτταρα παραμένουν πάνω από το στρώμα της φικόλης, στη μεσοστιβάδα, και μπορούν να παραληφθούν κατά το τέλος από το στρώμα διαχωρισμού. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC).

Υλικά και όργανα:

- ~ Διάλυμα Ficoll-Isopaque (ή Ficoll-Hypaque, Lymphoprep, Histopaque)
- ~ Αίμα από υγιείς αιμοδότες
- ~ Αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου FALCON 50 ml,
- ~ Φυγόκεντρος τύπου SORVAL
- ~ Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 + 10% FBS + 40μg/ml γενταμικίνης
- ~ Πιπέττες Pasteur, πιπέττες Gilson και tips
- ~ Μικροσκόπιο
- ~ Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες
- ~ Χρωστική Trypan blue (άλας νατρίου 0.5 % (w/v) σε PBS)

Πορεία:

Περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών, αραιώνεται (1:1) με στείρο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, απουσία δισθενών ιόντων (PBS χωρίς Mg^{+2}/Ca^{+2}) και επιστιβάζεται με αναλογία 1:2 προσεκτικά στην επιφάνεια υγρού στρώματος 15 ml Histopaque-1077, αφού έχει έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε 400 x g, 30 min, 20 °C και διαχωρίζονται σε ζώνες. Το επάνω στρώμα περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα, το στρώμα της φικόλης περιέχει τα κοκκιοκύτταρα ενώ στον πυθμένα βρίσκονται τα ερυθρά και τα νεκρά κύτταρα. Το επάνω στρώμα απομακρύνεται με πιπέττα Pasteur, χωρίς να διαταραχθεί η στιβάδα των λεμφοκυττάρων, η οποία μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο τύπου FALCON στο οποίο προστίθενται έως 50 ml PBS. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 250 x g, 10 min, 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται με πιπέττα. Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 50 ml PBS και φυγοκεντρώνονται για 2 ακόμα φορές στις προαναφερθείσες συνθήκες (250 x g, 10 min, 4°C). Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα λεμφοκύτταρα αραιώνονται σε 10 ml RPMI 1640 ή PBS και ελέγχονται μικροσκοπικά σε κυτταρομετρική πλάκα Neubauer ως προς το φαινότυπο και τον ακριβή αριθμό τους.

Τα κύτταρα μπορούν να φυλαχτούν για μικρό χρονικό διάστημα ωρών στους 4°C σε ισότονο στείρο διάλυμα PBS ή θρεπτικό μέσο RPMI 1640 μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τις ανάγκες των πειραμάτων.

2.1.3 Μέτρηση κυττάρων και προσδιορισμός βιωσιμότητας

Για την παρατήρηση και μέτρηση τους τα κύτταρα που βρίσκονται σε 10 ml RPMI 1640 ή PBS, αραιώνονται 1:10 σε διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου 0.05 %, το οποίο χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα μπλε. Μετά από προσεκτική αναδιάλυση και αναμονή 5 λεπτών, μικρή ποσότητα (~10μl) τοποθετείται στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (εικόνα 2-2) κάτω από καλυπτρίδα, ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων και προσδιορισμός του ποσοστού βιωσιμότητάς τους.

Εικόνα 2-2. Σχηματική απεικόνιση Αιμοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer).

Το αιμοκυτταρόμετρο διαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα (π.χ. 6, 7, 8 και 9) με πλευρά 0.1 mm^3 το καθένα. Κατά την μέτρηση, μετρώνται τα κύτταρα που περιέχονται στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα στις γωνίες (π.χ. 6, 7, 8 και 9) και το άθροισμα διαιρείται με το 4 για να βρεθεί ο μέσος όρος των κυττάρων που αντιστοιχεί στο ένα μεγάλο τετράγωνο. Στη συνέχεια, ο αριθμός αυτός πολλαπλασιάζεται επί 10 ώστε να εκφραστούν τα αποτελέσματα στο 1 mm^3 :

$$\text{Εξίσωση 1.} \quad \text{κύτταρα} / \text{mm}^3 = \left(\frac{\text{μέσος}}{\text{όρος}} \right) \times 10$$

Σημαντικό είναι επίσης να μετρηθούν εκτός από τα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα, τα οποία έχουν βαφτεί μπλε, έτσι ώστε να υπολογιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Εξίσωση 2.} \quad \left(\frac{(\%) \text{βιωσιμότητα}}{\text{κυττάρων}} \right) = \frac{\left(\frac{\text{αριθμος νεκρών}}{\text{κυττάρων}} \right)}{\left(\frac{\text{αριθμος μετρηθέντων}}{\text{κυττάρων}} \right)} \times 100$$

2.1.4 Διαχωρισμός T λεμφοκυττάρων

Αρχή μεθόδου:

Ο διαχωρισμός των T λεμφοκυττάρων από τα B λεμφοκύτταρα επιτυγχάνεται με τους δείκτες επιφανείας τους. Ένα τυπικό B λεμφοκύτταρο, σε αντίθεση με ένα τυπικό T λεμφοκύτταρο, φέρει στη μεμβράνη του ανοσοσφαιρίνη και υποδοχείς για το συμπλήρωμα και το Fc κλάσμα της ανοσοσφαιρίνης IgG. Τα T λεμφοκύτταρα έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν ρόδακες (rosettes) με τα ερυθρά αιμοσφαίρια (E) του προβάτου μέσω του δείκτη επιφανείας CD2, αφού τα τελευταία έχουν προεπεξεργαστεί σε κατάλληλες συνθήκες με ειδικό διάλυμα 2-(2-Αμινοέθυλ-) διυδροβρωμική ισοθειουρία (AET) που αυξάνει την προσκολλητική τους ικανότητα. Ένα T λεμφοκύτταρο θεωρείται ότι έχει σχηματίσει ρόδακα με τα ερυθρά αιμοσφαίρια εφόσον έχουν προσκολληθεί τουλάχιστον τρία ή περισσότερα ερυθρά κύτταρα στην επιφάνειά του. Σε αντίθεση με τα T λεμφοκύτταρα, τα B λεμφοκύτταρα δεν χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα σχηματισμού ροδάκων με τα ερυθρά και μπορούν να απομακρυνθούν μετά από χρήση Φικόλης και πλύσεων σε ισότονο διάλυμα.

2.1.4.1 Προετοιμασία Ερυθρών κυττάρων Προβάτου

Υλικά και όργανα:

- 🦋 Φρέσκα ερυθρά προβάτου
- 🦋 Υδατόλουτρο 37°C
- 🦋 Φρέσκο διάλυμα AET που προετοιμάζεται ως ακολούθως:
 - ☑ 6.4 gr 2-(2-Αμινοέθυλ-) διυδροβρωμική ισοθειουρία (AET)
 - ☑ 3.2 ml 10 N NaOH
 - ☑ 156.8 ml dd H₂O.
- 🦋 Αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου FALCON 50 ml,
- 🦋 Φυσιολογικός ορός (0.9 % Χλωριούχο Νάτριο)
- 🦋 Φυγόκεντρος SORVAL
- 🦋 Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 + 10% FBS + 40μg/ml γενταμικίνης
- 🦋 Πιπέττες Pasteur
- 🦋 Μικροσκόπιο
- 🦋 Αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες
- 🦋 Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες
- 🦋 Χρωστική Trypan blue (κυανό του τρυπανίου 0.5 % (β/ο) σε PBS)

Πορεία:

25 ml φρέσκων ερυθρών προβάτου μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Falcon χωρητικότητας 50 ml και αφού προστεθεί φυσιολογικός ορός έως 50 ml σε κάθε φιαλίδιο, φυγοκεντρούνται σε 250 x g, 9 min, 4° C. Μετά την φυγοκέντρωση ακολουθεί προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου με πιπέττα Pasteur των 25 ml, και αφού ανακινηθεί προσεκτικά το φιαλίδιο ώστε να αναδιαλυθεί το ίζημα, προστίθεται φυσιολογικός ορός έως 50 ml. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται εκ νέου στις προαναφερθείσες συνθήκες για 2 ακόμα φορές. Κατά την διάρκεια της 3^{ης} φυγοκέντρωσης προετοιμάζεται σε αποστειρωμένο ογκομετρικό σωλήνα χωρητικότητας 200 ml, το διάλυμα AET που αυξάνει την προσκολλητική ικανότητα των ερυθρών με τα T λεμφοκύτταρα επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία E-ροδάκων. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται με πιπέττα Pasteur και μετά από προσεκτική αναδιάλυση του ιζήματος και προσθήκης 20 ml AET/φιαλίδιο, καταλήγοντας έτσι στην αναλογία 1:5 (ίζημα:υπερκείμενο), τα φιαλίδια επωάζονται για 20 λεπτά στους 37°C (υδατόλουτρο).

Μετά την επώαση προστίθεται φυσιολογικός ορός έως 50 ml σε κάθε φιαλίδιο και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 250 x g για 9 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά με πιπέττα τύπου Pasteur και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 5 ακόμα φορές. Στο τέλος της 6^{ης} πλύσης και μετά την προσεκτική αναδιάλυση του ιζήματος, προστίθεται θρεπτικό μέσο RPMI 1460 (+FBS+γενταμικίνη) έως 50 ml ανά φιαλίδιο.

Τα ερυθρά προβάτου μπορούν να φυλαχτούν στους 4° C για 1 μήνα, αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξεως τους. Σημαντικό επίσης είναι να ελέγχονται μικροσκοπικά πριν από κάθε χρήση τους, έτσι ώστε να επιβεβαιώνεται η βιωσιμότητά τους καθώς και η καθαρότητά τους από τυχόν μολύνσεις λόγω χειρισμού.

2.1.4.2 Μέθοδος διαχωρισμού E-rosetting

Υλικά και όργανα:

- Αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου FALCON 50 ml,
- Φυγόκεντρος SORVAL
- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 + 10% FBS + 40μg/ml γενταμικίνης
- PBS
- Πιπέττες Pasteur

🔪 Μικροσκόπιο

🔪 Αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες

🔪 Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες

🔪 Χρωστική Trypan blue (κυανού του τρυπανίου 0.5 % (w/v) σε PBS)

🔪 Λυτικό διάλυμα ερυθρών

☒ 8.3 gr/lit Χλωριούχου Αμμωνίου

☒ M Tris-HCl pH 7.5

Πορεία:

Αφού προσδιοριστεί ο αριθμός των T λεμφοκυττάρων, μετά το διαχωρισμό τους από το ολικό αίμα με τη χρήση του διαλύματος Φικόλης, τα κύτταρα μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Falcon, έτσι ώστε σε 200×10^6 T λεμφοκύτταρα/falcon να προστεθούν έως 25 ml θρεπτικού μέσου ή PBS συν 10 ml διαλύματος ερυθρών κυττάρων προβάτου. Τα φιαλίδια επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα $250 \times g$ στους 4°C και επωάζονται στους 4°C για 1 ώρα ή 12 ώρες.

Μετά το πέρας της επώασης οι ρόδακες έχουν σχηματισθεί και έχουν καθιζήσει στον πυθμένα του φιαλιδίου. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση και προσθήκη 15 ml διαλύματος Φικόλης ανά φιαλίδιο και φυγοκέντρωση στα $300 \times g$ σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Κατά τη φυγοκέντρωση τα κύτταρα διαχωρίζονται σε 3 φάσεις. Η πρώτη φάση περιέχει τη διάλυμα της Φικόλης, το οποίο και απορρίπτεται μετά τη φυγοκέντρωση. Η δεύτερη φάση περιέχει τα μονοκύτταρα και τα B λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα δηλαδή που δεν δημιούργησαν ρόδακες με τα ερυθρά προβάτου (E- κλάσμα) και τα οποία μπορούν να φυλαχθούν σε νέα φιαλίδια τύπου Falcon και να επεξεργαστούν για ερευνητικούς σκοπούς. Η τρίτη φάση περιέχει ρόδακες των T λεμφοκυττάρων με τα ερυθρά προβάτου, καθώς και τα ερυθρά τα οποία δεν δημιούργησαν ρόδακες με T λεμφοκύτταρα. Για να επιτευχθεί ο καθαρισμός του πληθυσμού των T λεμφοκυττάρων από τα ερυθρά προβάτου, προστίθενται στην 3^η φάση των κυττάρων 5 ml ειδικού για την λύση των ερυθρών προβάτου διαλύματος λύσης. Τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα λύσης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 7 λεπτά στα $250 \times g$ στους 4°C . Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης ακολουθούν διαδοχικά απόχυση του υπερκειμένου, ανασύσταση των κυττάρων, προσθήκη 4 ml διαλύματος λύσης ερυθρών, επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στα $250 \times g$ στους 4°C . Στη συνέχεια ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου

και ανασύσταση των κυττάρων. Προστίθενται 3 ml διαλύματος λύσης, επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις προαναφερθείσες συνθήκες. Μετά το πέρας της τελευταίας φυγοκέντρωσης, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 10 ml PBS και ελέγχονται μικροσκοπικά ως προς την καθαρότητα, την βιωσιμότητα και τον ολικό αριθμό τους.

2.1.5 Τεχνική απομάκρυνσης των μονοκυττάρων με τη χρήση L-λευκίν-μέθυλ-εστέρα (Leucine-methyl-ester).

Η προσθήκη του L-Leucine-methyl-ester οδηγεί στη ρήξη του λυσοσώματος και συνεπώς στον επιλεκτικό θάνατο των ανθρωπίνων μονοκυττάρων, επιτυγχάνοντας έτσι την καθαρότητα των T λεμφοκυττάρων μετά την απομόνωση τους .

Πορεία:

Η πορεία της μεθόδου βασίζεται στους (Thiele *et al.*, 1983). Συνοπτικά, 5×10^6 κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού- απουσία FBS και γενταμικίνης- επωάζονται σε 2.5 mM L-λεύκιν-μέθυλ-εστέρα σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται 3 φορές ($250 \times g$ στους $4^\circ C$ για 7 λεπτά) και το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 50ml θρεπτικού υλικού -απουσία FBS και γενταμικίνης-. Στο τέλος των πλύσεων, το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 10 ml θρεπτικού υλικού παρουσία FBS και γενταμικίνης, τα κύτταρα παρατηρούνται μικροσκοπικά και καταμετρούνται.

2.1.6 Διαχωρισμός υποπληθυσμού ανθρωπίνων μνημονικών T λεμφοκυττάρων μέσω στηλών μαγνητικού διαχωρισμού MACS

Αρχή μεθόδου:

Ο διαχωρισμός των μνημονικών (CD45RO+CD4+) από τα αθώα (CD45RA+CD4+) T λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit απομόνωσης μνημονικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, εμπορικά διαθέσιμου από την εταιρεία Miltenyi Biotech. Η πορεία της μεθόδου βασίζεται στην αρνητική επιλογή των μνημονικών T κυττάρων από τους υπολοίπους υποπληθυσμούς του περιφερικού αίματος, οι οποίοι επιλέγονται έμμεσα με κοκτέιλ μονοκλωνικών αντισωμάτων σημασμένων με βιοτίνη (έναντι των CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD56, CD123, TCR γ/δ και Glycophorin A - 1^η σήμανση) και στη συνέχεια με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της βιοτίνης των πρώτων αντισωμάτων σημασμένα

με μαγνητικά σφαιρίδια (anti-biotin - 2^η σήμανση). Τα κύτταρα τοποθετούνται σε στήλες διαχωρισμού MACS (μέγεθος LS) σε μαγνητικό πεδίο (εικόνα 2-3), με αποτέλεσμα τα κύτταρα που έχουν σημειωθεί με τα μαγνητικά σφαιρίδια να παραμένουν στη στήλη ενώ τα υπόλοιπα να περνούν τη στήλη και να εκλύονται (μνημονικά T λεμφοκύτταρα).

Η καθαρότητα των κυτταρικών υποπληθυσμών ελέγχεται περαιτέρω με κυτταρομετρία ροής.

Εικόνα 2-3. Σχηματική απεικόνιση του μαγνητικού διαχωρισμού των Μνημονικών T λεμφοκυττάρων με τη χρήση στηλών μαγνητικού διαχωρισμού σε μαγνητικό διαχωριστή MACS.

Υλικά και όργανα:

➤ Προετοιμασία Διαλύματος MACS:

- ☒ PBS pH 7.2
- ☒ 2 mM EDTA
- ☒ 0.5 % BSA

➤ Στήλη LS μαγνητικού διαχωρισμού MACS

➤ Μαγνητικός διαχωριστής MidiMACS

Πορεία:

Τα κύτταρα μετρούνται, φυγοκεντρούνται στα 300 x g για 10 λεπτά στους 4° C και 10⁷ κύτταρα ανασυστήνονται σε 40 µl παγωμένου διαλύματος MACS. Στη συνέχεια προστίθενται 10 µl Biotin-Antibody Coctail και μετά από καλή αναδιάλυση με πιπέττα τύπου Gilson και επώαση τους για 10 λεπτά στους 4° C προστίθενται 30 µl διαλύματος MACS και 20 µl Anti-Biotin Microbeads. Ακολουθεί καλή αναδιάλυση τους με πιπέττα και περαιτέρω επώαση για 15 λεπτά στους 4° C. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 1-2 ml διαλύματος MACS και φυγοκεντρούνται στα 300 x g για 10 λεπτά στους 4° C. Τέλος το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά με πιπέττα και τα κύτταρα ανασυστήνονται σε 500 µl διαλύματος MACS.

Αφού η στήλη μαγνητικού διαχωρισμού MACS τοποθετηθεί στην αντίστοιχη υποδοχή της, ξεπλένεται με 3 ml διαλύματος MACS. Στη συνέχεια, προστίθενται προσεκτικά τα κύτταρα και το έκλουσμα συλλέγεται σε φιαλίδιο τύπου Falcon. Η στήλη ξεπλένεται με 3 ml διαλύματος MACS 3 ακόμα φορές και τα κύτταρα που περνούν τη στήλη συλλέγονται στο ίδιο φιαλίδιο. Τέλος προστίθενται στη στήλη 5 ml διαλύματος MACS, και μετά από άσκηση πίεσης με το ειδικό έμβολο της στήλης, τα κύτταρα συλλέγονται σε νέο φιαλίδιο τύπου Falcon, φυγοκεντρούνται στα 300 x g για 10 λεπτά στους 4° C, αναδιαλύονται σε 2 ml PBS, ελέγχονται μικροσκοπικά και μετρούνται πριν ελεγχθεί η καθαρότητα τους με κυτταρομετρία ροής.

2.1.7 Σήμανση κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα για ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής.

Υλικά και όργανα:

- ✓ 20 µl CD45RO-PE
- ✓ 20 µl CD45RA-PE
- ✓ 20 µl IgG-PE
- ✓ 20 µl CD3-FITC
- ✓ 20 µl IgG-FITC

Πορεία:

Μετά την απομόνωση τους με Ficoll και τον περαιτέρω διαχωρισμό τους σε υποπληθυσμούς T κυττάρων, τα κύτταρα πλένονται 2 φορές σε PBS, μελετούνται μικροσκοπικά σε πλάκα NeuBaeur και μοιράζονται σε φιαλίδια τύπου Eppendorf έτσι ώστε 1x 10⁵ - 1x 10⁶ κύτταρα/100 µl PBS/ Eppendorf. Για κάθε δείγμα προς ανάλυση προετοιμάζονται 2 σωληνάκια ανάλυσης. Στο πρώτο σωληνάκι ανάλυσης προστίθενται 20 µl του αντισώματος προς μελέτη σημασμένου με φλουορεσεΐνη

(FITC) ή φυκοερυθρίνη (PE) και στο δεύτερο σωληνάκι 20 μl του αντιστοίχου ισοτυπικού μαρτυρά του. Τα κύτταρα προστίθενται στα αντίστοιχα σωληνάρια και επωάζονται είτε για ένα τέταρτο σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι είτε για μισή ώρα στους 4° C. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθενται 1 ml PBS/σωληνάριο ανάλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4° C για 7 λεπτά στα 1500 x g. Μετά από απόχυση του υπερκείμενου, προστίθενται 500 μl PBS/σωληνάριο, τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο και ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων στο μηχάνημα κυτταρομετρίας ροής FACS εντός διαστήματος 1 ώρας.

2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

2.2.1 Διέγερση φυσιολογικών ανθρωπίνων T κυττάρων

Αρχή μεθόδου:

Η μελέτη των διάφορων παραγόντων που εμπλέκονται στο μονοπάτι ενεργοποίησης που ελέγχεται από το ασβέστιο έγιναν στα στάδια που έπονται της ενεργοποίησης της καλμοδουλίνης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II στην παραγωγή της IL-10. με τη χρήση ειδικών αναστολέων των παραπάνω ενζύμων, κυκλοσπορίνη A (Borel et al., 1976) και KN-62 (Tokumitsu et al., 1990), αντίστοιχα.

Ο τρόπος διέγερσης των κυττάρων είναι κοινός τόσο για τα φυσιολογικά κύτταρα όσο και για τα κύτταρα των λεμφοκυτταρικών σειρών και επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση συνδυασμού ακινητοποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του T-κυτταρικού υποδοχέα (anti-CD3) (CALTAG) και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του συνδιεγερτικού μορίου CD28 (anti-CD28) (CALTAG), είτε τον συνδυασμό Ιονομυκίνης (Ionomycin) και φορβολικού εστέρα PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)) (SIGMA), που αποτελεί μέθοδο φαρμακευτικής διέγερσης κατά την οποία παρακάμπτεται ο υποδοχέας αντιγόνου (TCR) του T-λεμφοκυττάρου.

Πορεία:

Αφού ελεγχθούν μικροσκοπικά με χρωστική κυανού του τρυπανίου 0,05 % και μετρηθούν, $1-10 \times 10^6$ κύτταρα / ml θρεπτικού υλικού RPMI 1640 παρουσία 10 % FBS και 40 μg/ml γενταμικίνης μοιράζονται ανάλογα με το πλάνο του πειράματος σε πολυπροπυλενικές πλάκες επώασης 24 θέσεων ή φιαλίδια τύπου falcon και διεγείρονται για μισή ώρα με CsA (100ng/ml) SANTOZ ή με KN-62 (0,01mM)

MERCK σε κλίβανο διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια τα κύτταρα διεγείρονται περαιτέρω με τον συνδυασμό 1 $\mu\text{g/ml}$ Ιονομυκίνη συν 2.5 ng/ml PMA, ή με συνδυασμό 0,6 $\mu\text{g/ml}$ ακινητοποιημένου anti-CD3 και 0,6 $\mu\text{g/ml}$ διαλυτού anti-CD28, ή με 2 $\mu\text{g/ml}$ ακινητοποιημένου anti-CD3 μόνο, για χρονικά διαστήματα από 16 - 48 ώρες αναλόγως την πειραματική διαδικασία.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, οι καλλιέργειες συλλέγονται και φυγοκεντρούνται στα 250 x g, για 10 λεπτά, στους 4° C. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο κάθε καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών, ενώ το ίζημα των κυττάρων χρησιμοποιείται για την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

2.2.1.1 Ακινητοποίηση μονοκλωνικού αντισώματος του T κυτταρικού υποδοχέα σε φρεάτια επώασης.

Η ακινητοποίηση του anti-CD3 αντισώματος στην επιφάνεια των φρεατίων της πλάκας επώασης, πραγματοποιείται με προσθήκη της επιθυμητής συγκέντρωσης του μονοκλωνικού αντισώματος αραιωμένου σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 απουσία FBS και γενταμικίνης και επώαση της πλάκας επώασης για 1 ώρα στους 4° C). Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από τα φρεάτια με πιπέττα και προστίθεται θρεπτικό υλικό με FBS και γενταμικίνη, ο επιθυμητός αριθμός T λεμφοκυττάρων ανά φρεάτιο επώασης και οι αναστολείς ή οι διεγέρτες αναλόγως της πειραματικής διαδικασίας (Geppert *et al.*, 1986).

2.2.1.2 Διέγερση T λεμφοκυττάρων παρουσία rhIL-2

Στα πειράματα όπου ελέγχθηκε η συμβολή της IL-2 στην ρύθμιση της IL-10 ακολουθήθηκαν οι παραπάνω περιγραφείσες πειραματικές συνθήκες διέγερσης, με προσθήκη 20, 40 ή 60 $\mu\text{g/ml}$ (ng/ml) ανθρώπινης ανασυνδυασμένης human IL-2, εμπορικά διαθέσιμης από την εταιρεία R&D SYSTEMS.

2.2.2 Προσδιορισμός επιπέδων κυτταροκινών (Ιντερλευκίνης-10, Ιντερλευκίνης-2 και Ιντερλευκίνης-4) σε υπερκείμενα φυσιολογικών T λεμφοκυττάρων ή T λεμφοκυτταρικών σειρών.

Αρχή μεθόδου:

Ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Ιντερλευκίνης-10 (ή της Ιντερλευκίνης-2, ή της Ιντερλευκίνης-4) έχει ακινητοποιηθεί σε πολυστυρενική μικροπλάκα επώασης. Τα πρότυπα διαλύματα IL-10 (ή IL-2, ή IL-4) και τα δείγματα

προς ανίχνευση προστίθενται στην πλάκα και, κατά την επώαση τους, τυχόν πρωτεΐνη IL-10 (ή IL-2, ή IL-4) δεσμεύεται ειδικά στο ακινητοποιημένο στην πλάκα αντίσωμα. Ύστερα από συνεχείς πλύσεις, για την απομάκρυνση περισσείας μη συνδεδεμένης πρωτεΐνης, δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της IL-10 (ή IL-2, ή IL-4) συνδεδεμένο με ειδικό ένζυμο υπεροξειδάσης της αγριοραπανιδας προστίθεται στην πλάκα και επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, επιτρέποντας τη δημιουργία ενός σάντουιτς που αποτελείται από το πρώτο αντίσωμα-ιντερλευκίνη-10 (ή IL-2, ή IL-4)-δεύτερο αντίσωμα-υπεροξειδάση της αγριοραπανιδας (εικόνα 2-4).

Εικόνα 2-4. Σχηματική απεικόνιση της αρχής της Ανοσοενζυματικής Μεθόδου (ELISA).

Στη συνέχεια, κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο προστίθεται στην πλάκα με αποτέλεσμα τη δημιουργία χρώματος ανάλογου του ποσού πρωτεΐνης IL-10 (ή IL-2, ή IL-4) που έχει προστεθεί αρχικά. Η δημιουργία χρώματος τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος H_2O_2 και η ένταση της οπτικής απορρόφησης μετράται σε φασματοσκόπιο σε μήκος κύματος 490 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης της ιντερλευκίνης-10 (ή IL-2, ή IL-4) ανά δείγμα υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τις τιμές οπτικής απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων έναντι των συγκεντρώσεών τους.

Πορεία:

Ο προσδιορισμός των επιπέδων Ιντερλευκίνης-10 (IL-10) ή Ιντερλευκίνης-2 (IL-2) ή Ιντερλευκίνης-4 (IL-4) στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιείται με έτοιμο kit της Ανοσοενζυματικής Μεθόδου (ELISA) της εταιρείας BIOSOURCE. Η πορεία βασίζεται στις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας που περιγράφονται στο ειδικό ένθετο φυλλάδιο που συνοδεύει το προϊόν.

2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΛΣΙΝΕΥΡΙΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ CaM KinaseII ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

2.3.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα

Αρχή μεθόδου:

Ολικό RNA από Τ λεμφοκύτταρα απομονώθηκε με τη χρήση του διαλύματος Τριζόλης, ακολουθώντας τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας που συνοδεύουν το προϊόν.

Η TRIZOL είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς, και αποτελεί μια βελτιωμένη μορφή της μεθόδου απομονώσεως RNA των Chomczynski και Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987). Κατά την ομογενοποίηση των δειγμάτων και τη λύση τους η TRIZOL διατηρεί την ακεραιότητα του RNA, ενώ διασπά τις μεμβράνες των κυττάρων και το εσωτερικό τους. Η προσθήκη χλωροφορμίου και η ακόλουθη φυγοκέντρηση διαχωρίζει τα δείγματα σε δυο διαφορετικές φάσεις, μια ανόργανη και μια οργανική. Το RNA παραμένει στην ανόργανη φάση και συλλέγεται μετά από προσθήκη ισοπροπυλικής αλκοόλης, 75% αιθανόλης και αναδιάλυση του ιζήματος σε TE διάλυμα.

Υλικά και όργανα:

- Διάλυμα TRIZOL (Invitrogen)
- Αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Eppendorf 1.5 ml,
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος τύπου SORVAL για Eppendorf
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 + 10% FCS + 40μg/ml γενταμικίνης
- πιπέττες Gilson και tips
- H₂O ελεύθερου RNAσών
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπυλική Αλκοόλη
- 75% Αιθυλική Αλκοόλη σε (DEPC-treated H₂O)

Πορεία:

Σε φρέσκο ίζημα $5-10 \times 10^6$ κυττάρων προστίθενται 700 μ l TRIZOL και το ίζημα αναδιαλύεται καλά με σύριγγα. Τα κύτταρα με το διάλυμα μεταφέρονται σε νέα φιαλίδια τύπου erpendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 140 μ l Χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή αναδιάλυση με δυνατή ανακίνηση των φιαλιδίων για 15 sec. Τα φιαλίδια επωάζονται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται στα 12000 g και σε 4°C για 15 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση μεταφέρεται όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα της υδάτινης φάσης σε νέα φιαλίδια τύπου erpendorf και προστίθενται 350 μ l Ισοπροπυλικής Αλκοόλης. Ακολουθεί καλή ανάμειξη, τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρώνονται στα 12000 g, στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθενται 700 μ l 75% ο/ο Αιθυλικής Αλκοόλης στο ίζημα και μετά από καλή αναδιάλυση τα δείγματα επαναφυγοκεντρώνονται στα 7500 g, στους 4°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αποξηραίνεται στον αέρα προτού ανασυσταθεί σε 30 μ l διαλύματος TE ελεύθερου RNAσών.

2.3.2 Έλεγχος ποιότητας νουκλεϊνικών οξέων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Αρχή μεθόδου:

Η ανάλυση γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και στηρίζεται στο αρνητικό φορτίο και το μέγεθος των μορίων του DNA/RNA. Ο διαχωρισμός των τμημάτων γίνεται βάση του μοριακού τους βάρους, καθώς η κινητικότητα τους στην πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μεγέθους τους. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να αναλυθούν και συνήθως κυμαίνεται από 0,6-2% β./κ.ο. Η ανίχνευση των μορίων είναι δυνατή με την προσθήκη βρωμιούχου εθιδίου το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων των νουκλεϊνικών μορίων και έχει την ικανότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί στο υπεριώδες φως.

Πορεία:

Παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης που περιέχει τελική συγκέντρωση 1% αγαρόζης σε 1 x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE. Η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης ώστε μόλις να καλύπτεται. Στα

δείγματα του RNA προστίθεται αντίστοιχα όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης της πηκτής (gel loading buffer) που περιέχει 50% γλυκερόλη, 1mM EDTA, 6.25% κυανό της βρωμοφαινόλης και 0.25% κυανό του ξυλενίου. Τελικά τοποθετούνται στα φρεάτια της πηκτής και αποδιατάσσονται με ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα σε σταθερή διαφορά δυναμικού 120 Volt.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική συσκευή με λάμπα U.V. και κάμερα συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και αποτυπώνεται η εικόνα του RNA όπως έχει ηλεκτροφορηθεί. RNA του οποίου έχουν διαχωριστεί οι 2 υπομονάδες 28S και 18S χωρίς καμία άλλη ένδειξη άλλης ζώνης στην ηλεκτροφόρηση και χωρίς πρόσμιξη με DNA θεωρείται υψηλής καθαρότητας και ποιότητας νουκλεϊκό οξύ για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

2.3.3. Προσδιορισμός επιπέδων παραγωγής mRNA ειδικού για την Ιντερλευκίνη-10 από φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα

Η επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II στην παραγωγή mRNA για την IL-10 σε φυσιολογικά ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα ελέγχθηκε με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – polymerase chain reaction) είναι μία τεχνική για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η αλληλουχία της, η οποία είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε αλληλουχίες που εντοπίζονται στα αντίθετα άκρα της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του DNA (denaturation), που πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 90° C.
- 2) Πρόσδεση των εκκινητών στο DNA (annealing), όπου οι εκκινητές σε περίσσεια προσδένονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C.
- 3) Επιμήκυνση των εκκινητών (extension) από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων, με επώαση στους 72° C.

Σε κάθε κύκλο, ο οποίος επαναλαμβάνεται συνολικά 30-40 φορές, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

Η PCR τεχνολογία έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR – reverse transcription PCR).

2.3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase chain reaction)

Αρχή μεθόδου:

Η μετατροπή του απομονωμένου ολικού RNA σε cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί RNA ως μήτρα για να συνθέσει ένα κλώνο cDNA, παρουσία συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων dT που αποτελούν τους εκκινητές της αντίστροφης μεταγραφής.

Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής είναι εμπορικά διαθέσιμη από την εταιρεία Invitrogen. Η πορεία της αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής είναι βασισμένη στο ένθετο φυλλάδιο της εταιρείας που συνοδεύει το προϊόν.

Υλικά και όργανα:

- ✓ 2 µg ολικού RNA
- ✓ 1 µl DNTPs (10 mM)
- ✓ 1 µl oligoDTs
- ✓ 4 µl First Strand Buffer (5x)
- ✓ 2 µl DTT (0.1 M)
- ✓ 1 µl SSIIRT
- ✓ αποστειρωμένο ddH₂O
- ✓ σωληνάρια για PCR χωρητικότητας 0.2 ml
- ✓ μηχανήμα PCR

Πορεία:

Για την κάθε αντίδραση προστίθενται και αναμιγνύονται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο για PCR χωρητικότητας 0,2 ml τα εξής, αφού αναδευτούν και φυγοκεντρηθούν σύντομα:

Πίνακας 1.

Συγκεντρώσεις Υλικά	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Ποσότητα (μl) ανά 20 μl αντίδρασης
Ολικό RNA	2 μg	x μl
μείγμα dNTPs	10 mM	1 μl
μείγμα ολιγο- dT _s (15)	20 μg	1 μl
αποστειρωμέν ο ddH ₂ O		Έως 12 μl

Οι αντιδράσεις τοποθετούνται στον θερμικό ανακυκλωτή όπου επωάζονται στους 65° C για 5 λεπτά και μεταφέρονται σε πάγο. Σε κάθε αντίδραση προστίθενται:

Πίνακας 2.

Συγκεντρώσεις Υλικά	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Ποσότητα (μl) ανά 20 μl αντίδρασης
First Strand Buffer	5 x	4 μl
DTTs	0.1 M	2 μl
αποστειρωμένο ddH ₂ O		1 μl

Στη συνέχεια οι αντιδράσεις τοποθετούνται στον θερμικό ανακυκλωτή, επωάζονται στους 42° C για 2 λεπτά, μεταφέρονται σε πάγο και σε κάθε αντίδραση προστίθενται:

Πίνακας 3.

Συγκεντρώσεις Υλικά	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Ποσότητα (μl) ανά 20 μl αντίδρασης
SuperScript II RT	200 U/μl	1 μl

Οι αντιδράσεις τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή όπου επωάζονται αρχικά στους 42° C για 50 λεπτά και στη συνέχεια στους 70° C για 15 λεπτά για να αδρανοποιηθεί το ένζυμο και να ολοκληρωθεί η διαδικασία.

Το cDNA αποτελεί τη μήτρα για όλες τις αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που περιγράφονται στη συνέχεια.

2.3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στη τεχνική της συμβατικής PCR, με τη διαφορά ότι στην συμβατική PCR τα αποτελέσματα συλλέγονται με ανάλυση του τελικού προϊόντος μετά από διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης, ενώ στην RT-PCR η διαδικασία ενισχύσεως του τελικού προϊόντος καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση τεχνικών φθορισμού (Peters *et al.*, 2004). Με τον τρόπο αυτό ποσοτικοποιείται ρεαλιστικά το ποσόν του νουκλεϊνικού οξέος.

Το ειδικό μηχάνημα (Real Time PCR) που χρησιμοποιείται για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι το Rotor-Gene RG-3000 της εταιρείας CORBETT Research. Το μηχάνημα αυτό αποτελείται από ένα θερμικό κυκλοποιητή, ένα φθορίομετρο για την ανίχνευση του φθορισμού κατά την διάρκεια της φάσης των κύκλων και έναν υπολογιστή που συγκεντρώνει τα δεδομένα φθορισμού, τα οποία εμφανίζονται στην οθόνη με τη μορφή γραφημάτων μέσω ειδικού λογισμικού (Rotor gene, έκδοση 6 για Windows).

Αρχή μεθόδου:

Η παραγωγή mRNA για την IL-10 σε φυσιολογικά ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα πραγματοποιείται με προτυπωμένο κιτ της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου της εταιρείας Maxim Biotech Inc. Η πορεία βασίζεται στις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας που περιγράφονται στο ένθετο φυλλάδιο που συνοδεύει το προϊόν.

Πορεία:

Συνοπτικά, για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις. Η πρώτη παρουσία ειδικών εκκινητών για την IL-10 και η δεύτερη με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ελέγχου 18S. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται στα ειδικά για RT-PCR φιαλίδια, χωρητικότητας 0.1 ml. Τα αντιδραστήρια ανακινούνται, φυγοκεντρούνται σύντομα και προστίθενται στο φιαλίδιο, ως ακολούθως:

Πίνακας 4.

Συγκεντρώσεις Υλικά	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Ποσότητα (μl) ανά 25 μl αντίδρασης
ρυθμιστικό διάλυμα της RT-PCR	2x	12.5 μl
probes	10x	2.5 μl
Εκκινητές	10x	2.5 μl
Taq DNA πολυμεράση	5 U/μl	0.25 μl
cDNA (0.01)- 0.1μg)		2.5 μl
αποστειρωμένο ddH ₂ O		4.75 μl

Οι εκκινητές είναι εμπορικά διαθέσιμοι από την Maxim Biotech Inc. Τα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για τις αντιδράσεις συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.

CR προϊόν	Ε ριθμός κύκλων	Δ οδιάταξη	Απ οδιάταξη	Υβ ριδισμός	Επι μήκυνση	τελ ική επιμήκυνση
			95°	60°	72°	72°
L-10	5	C	10 sec	C 30 sec	C 30 sec	C 10 min
			95°	60°	72°	72°
L-4	5	C	10 sec	C 30 sec	C 30 sec	C 10 min
			95°	60°	72°	72°
8S	5	C	10 sec	C 30 sec	C 30 sec	C 10 min

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού λογισμικού του μηχανήματος της RT-PCR.

2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

2.4.1 *In vivo* έλεγχος ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων και υποκινητών

2.4.1.1 Μετασχηματισμός στελέχους *E.coli* με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (*transformation*)

Αρχή Μεθόδου:

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν την ιδιότητα υπό κατάλληλες συνθήκες να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν DNA μόρια, ιδιαίτερα όταν το DNA είναι πλασμιδιακό, από το θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται. Για την παραλαβή μεγάλων ποσοτήτων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* των στελεχών DH5α (competent cells), τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρεία Promega. Η επεξεργασία των βακτηριακών στελεχών του *E.coli* ώστε να καταστούν επιδεκτικά σε μετασχηματισμό έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο συνοδευτικό ένθετο του kit.

Πορεία:

Ένα φιαλίδιο επιδεκτικών κυττάρων DH5α (20μl competent cells), αποψύχεται σε παγόλoutρο και προστίθενται 10-50ng DNA (ανασυνδυασμένου πλασμιδίου). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά, μεταφορά για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 42°C και επώαση για 2 λεπτά στον πάγο. Στα κύτταρα προστίθενται 1 ml θρεπτικού μέσου SOC ή L-Broth σε στείρες συνθήκες και επωάζονται για 1-2 ώρες στους 37°C για την έκφραση του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στα 1200 x g για 5 λεπτά και το ίζημα των μετασχηματισμένων κυττάρων και της καλλιέργειά τους επιστρώνεται σε τρυβλίο με L-broth και 1.5 % άγαρ παρουσία αντιβιοτικού, που αποτελεί τη βάση επιλογής του βακτηρίου που φέρει το πλασμιδιακό DNA, και επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C.

2.4.1.2 Καλλιέργεια/Πολλαπλασιασμός *μετασχηματισμένων κυττάρων*

Από το τρυβλίο απομονώνονται 1 αποικία και εμβολιάζεται αρχικά σε 5ml LB θρεπτικού υλικού παρουσία αντιβιοτικού το οποίο αποτελεί τη βάση επιλογής του βακτηρίου που φέρει το πλασμιδιακό DNA. Ακολουθεί επώαση για 8 ώρες στους 37°C σε ανακινούμενο επωαστήριο και εμβολιασμός 1 ml από την 8-ωρη καλλιέργεια σε

250 ml L-broth πάλι παρουσία αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται για 24 ώρες στους 37° C σε ανακινούμενο επωαστήρα και στη συνέχεια συλλέγεται σε φιαλίδια τύπου Falcon 50 ml, φυγοκεντρείται για 7 λεπτά στα 2500 x g και 4° C και από το ίζημα απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA μέσω στηλών καθαρισμού.

2.4.1.3 Απομόνωση πλασμιδίων με στήλες καθαρισμού

Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων IL-10/Luc, pRL-TK από την καλλιέργεια των E.coli επιδεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το NucleoBond Xtra Maxi κιτ της εταιρίας Macherey-Nagel ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας που συνοδεύουν το κιτ.

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την απομόνωση γραμμικού αλλά και κυκλικού DNA (200-50,000bp) και βασίζεται στην ιδιότητα μιας πατενταρισμένης μεμβράνης της εταιρείας να συγκρατεί αρνητικά φορτισμένα DNA μόρια σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος pH. Η μεμβράνη είναι τοποθετημένη σε ειδικές στήλες με φίλτρο, στις οποίες προστίθενται τα βακτηριακά κύτταρα με το πλασμιδιακό DNA, αφού λυθούν με τη χρήση αλκαλικού διαλύματος. Το DNA που απελευθερώνεται, καθαρίζεται από τυχόν προσμίξεις του με πρωτεΐνες, RNA, χρωμοσωμικό DNA, και τελικά εκλύεται, καθαρό και ελεύθερο προσμίξεων από τη στήλη μέσω βαρύτητας (εικόνα 2-5). Η απόδοση της μεθόδου είναι $\sim \geq 90\%$ για 0.5-5μg πλασμιδιακό DNA.

Εικόνα 2-5. Σχηματική απεικόνιση της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη χρήση στηλών

Πορεία:

Τα βακτηριακά κύτταρα με το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύονται σε 12 ml παγωμένου διαλύματος ανασύστασης παρουσία RNAσης A (resuspension buffer RES + RNase A), σε φιαλίδια τύπου falcon των 50 ml. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται εξισορρόπηση της στήλης με 25 ml διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer EQU). Στα φιαλίδια με τα βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 12 ml διαλύματος λύσης (lysis buffer LYS) και, αφού ανακινηθούν 5-6 φορές, επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 12 ml διαλύματος εξουδετέρωσης (neutralization buffer NEU) και αφού τα φιαλίδια ανακινηθούν 10-15 φορές και το διάλυμα προστίθεται στο φίλτρο της στήλης. Αφού περάσει από το φίλτρο και τη στήλη όλο το διάλυμα με τη βοήθεια της βαρύτητας, στο φίλτρο και στήλη προστίθενται 15 ml διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer EQU). Ακολουθεί περαιτέρω πλύση της στήλης με την προσθήκη 25 ml διαλύματος πλύσης (wash buffer WASH) απευθείας στη στήλη. Στη στήλη προστίθενται 15 ml διαλύματος έκλουσης (elution buffer ELU), τα οποία συλλέγονται σε νέα φιαλίδια τύπου falcon. Στη συνέχεια η στήλη απορρίπτεται και στο διάλυμα που έχει το έκλουσμα προστίθενται 10,5 ml Ισοπροπυλικής αλκοόλης και τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται για 1 ώρα στα 7500g στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης και την επακόλουθη απόρριψη του υπερκειμένου, προστίθεται στο ίζημα 2 ml 70 % ο/ο αιθυλικής αλκοόλης και μετά από καλή ανάμειξη με πιπέττα το DNA μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια τύπου erpendorf. Τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται στα 15000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, μετά από προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου με πιπέττα τύπου Gilson, αφήνονται ανοιχτά για 10-15 λεπτά ώστε να εξατμιστεί εντελώς η αιθυλική αλκοόλη. Το ίζημα με το DNA αναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος TE, η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA φωτομετρείται και η ποιότητα του πλασμιδίου ελέγχεται σε πηκτή αγαρόζης.

2.4.1.4 Έλεγχος ποιότητας και ειδικότητας του πλασμιδιακού DNA

Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πιστοποιήθηκε μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού ειδικά για το κάθε πλασμίδιο με βάση τις πληροφορίες που δίνει ο χάρτης κάθε πλασμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης και ελέγχθηκε ο αριθμός και το μέγεθος των DNA θραυσμάτων με αντιστοίχιση με ειδικούς μοριακούς δείκτες DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης (Ready LoadTM 100bp DNA Ladder, Gibco BRL).

2.4.1.5 Μέθοδος διαμόλυνσεως T λεμφοκυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA (transfection by electroporation)

Αρχή μεθόδου:

Η ικανότητα εισαγωγής και ενσωμάτωσης ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA στο γονιδίωμα των -υπό μελέτη- ευκαρυωτικών κυττάρων (διαμόλυνση) επιτρέπει την μελέτη της λειτουργίας και ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων. Η έκφραση του πλασμιδιακού DNA που ενσωματώνεται στα κύτταρα μπορεί υπό κατάλληλες προϋποθέσεις να είναι μόνιμη ή παροδική. Στις συνθήκες που περιγράφονται παρακάτω η έκφραση των πλασμιδιακών DNA είναι παροδική. Τα κύτταρα εκφράζουν το DNA που ενσωματώνουν για 12-72 ώρες από τη στιγμή που της διαμόλυνσης. Ανάμεσα στις τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα θηλαστικών ή φυτών είναι αυτή της μεθόδου ηλεκτροδιάτρησης που εφαρμόζει παλμικό ηλεκτρικό πεδίο σε κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια. Η μέθοδος αν και απλή στην εφαρμογή της, επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους με αποτέλεσμα να υπάρχουν διακυμάνσεις στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου από εργαστήριο σε εργαστήριο. Παράμετροι που μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της ηλεκτροδιάτρησης είναι οι παρακάτω:

α) Η δύναμη του παλμικού ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται:

Σε χαμηλής έντασης ρεύμα, οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες δεν ανοίγουν διόδους αρκετές ώστε να μπορούν να ενσωματώσουν το ξένο πλασμιδιακό DNA. Αντίθετα σε υψηλής έντασης ρεύμα οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες καταστρέφονται ανεπανόρθωτα με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου. Για τα περισσότερα ανθρώπινα κύτταρα η μέγιστη απόδοση της μεθόδου επιτυγχάνεται όταν ασκείται ρεύμα έντασης μεταξύ 250V/cm. Σε αυτές τις συνθήκες περίπου 30 – 50 % των κυττάρων επιβιώνουν και μπορούν να εκφράζουν τα γονίδια προς μελέτη.

β) Ο χρόνος εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου είναι:

Συνήθως, ένας και μόνος ηλεκτρικός παλμός διέρχεται τη μεμβράνη των κυττάρων. Ορισμένες συσκευές ηλεκτροδιάτρησης επιτρέπουν τη ρύθμιση του μήκους και συχνότητας του ηλεκτρικού παλμού που θα διαπεράσει τα κύτταρα ώστε να τα κάνει επιδεκτικά στο πλασμιδιακό DNA που θέλουμε να τους ενσωματώσουμε. Ο βέλτιστος χρόνος έντασης του παλμικού ηλεκτρικού πεδίου που πρέπει να εφαρμόζεται για την καλύτερη επιβίωση των κυττάρων είναι 20-50sec.

γ) Η θερμοκρασία:

Η μέγιστη απόδοση της μεθόδου επιτυγχάνεται όταν τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου λίγο πριν, κατά τη διάρκεια, αλλά και λίγο μετά την πειραματική επεξεργασία. Υπάρχουν μελέτες ωστόσο που αναφέρουν ότι τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν τα κύτταρα διατηρούνται στους -4°C .

δ) Το σχήμα και η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA:

Παρόλο που έχει αναφερθεί ότι τόσο το γραμμικό όσο και το κυκλικό πλασμιδιακό DNA διαμολύνει ευκαρυωτικά κύτταρα επιτυχώς με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, η χρήση γραμμικού DNA είναι προτιμότερη και η καταλληλότερες συγκεντρώσεις προς χρήση κυμαίνονται στα 1-40 $\mu\text{g/ml}$.

ε) Ιοντική ισχύς και σύσταση του καλλιεργητικού υγρού:

Όταν η ιοντική ισχύς του διαλύματος που εφαρμόζεται η μέθοδος είναι σχετικά υψηλή (HEPES – buffered saline) τότε η μέθοδος δίνει καλύτερα αποτελέσματα.

Προετοιμασία- χειρισμός κυττάρων:

Τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών που προορίζονται για τα πειράματα διαμολύνσεως πρέπει να είναι σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, γιατί μόνο τότε ενσωματώνουν το ξένο DNA με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Τα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα για τον ίδιο σκοπό είναι σημαντικό να είναι υγιή και κατά τον μικροσκοπικό τους έλεγχο να μην υπάρχουν νεκρά κύτταρα, καθώς η ηλεκτροδιάτρηση είναι ένα μηχανικό stress που επιταχύνει τον κυτταρικό θάνατο.

Προετοιμασία πλασμιδιακού DNA:

Το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται στα πειράματα διαμόλυνσης είναι ελεύθερο πρωτεϊνών, RNA ή άλλων χημικών ουσιών. DNA κατακρημνισμένο με αιθανόλη πρέπει να ανασυσταθεί σε στείρο διάλυμα T.E. ή milli-Q – H_2O σε συγκέντρωση 0.2 – 1 mg/ml . Μία καλή ένδειξη για την καθαρότητα του DNA είναι ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm, όπου τιμές μεγαλύτερες του 1.8 είναι επιθυμητές.

Πορεία:

25×10^6 φρέσκα ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα/δείγμα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 1100 x g για 10 λεπτά στους 4°C . Παράλληλα, σε ειδική κυββέτα ηλεκτροδιάτρησης (0.4cm) προστίθενται 50 μg πλασμιδιακού DNA. Το ίζημα της φυγοκέντρησης αναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% ορού (FCS),

απουσία αντιβιοτικού, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 25×10^6 κύτταρα/0,3 ml θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια με αποστειρωμένη λεπτή πιπέττα τύπου Pasteur τοποθετούμε τα κύτταρα στην ειδική κυβέττα (25×10^6 κύτταρα/50μg πλασμιδίου/0,3 ml RPMI 1640+10% FCS/κυβέττα). Εφαρμόζουμε ρεύμα παλμικής έντασης στην κυβέττα (360Volt) με τη χρήση gene pulser (ECM[®] 399,BTX) και μεταφέρουμε τα κύτταρα σε φιαλίδια τύπου falcon με 5 ml θρεπτικού υλικού παρουσία αντιβιοτικού. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο του διοξειδίου του άνθρακα για 2 ώρες, πριν διεγερθούν με τους κατάλληλους για το σκοπό του πειράματος διεγέρτες για 16 ώρες. Στη συνέχεια τα διεγερμένα διαμολυσμένα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις $1100 \times g$ για 10 λεπτά στους 4°C και λύνονται με κατάλληλο λυτικό διάλυμα. Εναλλακτικά μετά τη φυγοκέντρηση τους, τα κύτταρα μπορούν να φυλαχθούν στους -70°C μέχρις ότου λυθούν με κατάλληλο διάλυμα λύσης.

2.4.1.6 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα διαμολύνσεως είναι τα εξής

- Το πλασμίδιο IL-10/Luc, το οποίο κωδικοποιεί το γονίδιο της firefly luciferase υπό τον έλεγχο ολόκληρου του υποκινητή του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 10 [1037bp – Z30175] (Platzer *et al.*, 1995) (κατασκευή κ. Μαυροθαλασσίτης).
- Το πλασμίδιο pRL-TK το οποίο κωδικοποιεί το γονίδιο της Renilla luciferase υπό τον έλεγχο του υποκινητή του απλού έρπητα (*Herpes simplex virus* thymidine kinase promoter) (Promega Corporation, Madison, WI).
- Τα πλασμίδια SecI, p3782, pVUII, BSU και DraI τα οποία κωδικοποιούν τη firefly luciferase υπό τον έλεγχο των πρώτων 135, 235, 310, 500 ή 1010 bp, αντιστοίχως πριν το κουτί TATA του υποκινητή της IL-10 (κατασκευή κ. Μαυροθαλασσίτης).
- Τα πλασμίδια MEF2/luc (προσφορά από Han *et al.*, 1995) και CREB/luc (STRATAGENE) κωδικοποιούν τη firefly luciferase υπό τον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων MEF2 και CREB αντιστοίχως.
- Το όχημα που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της καλσινευρίνης και της CaM Kinase II είναι το SRa. (Muramatsu *et al.*, 1989),
- ενώ το όχημα που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση των IL-10/Luc, SecI, p3782, pVUII, BSU και DraI ήταν το pGL3 (INVIVOGEN).

- ΔCAM-AI που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της καλσινευρίνης με συνεχή δραστικότητα φωσφατάσης (O'Keefe et al.,1992),δωρεά του Dr. R. L.Kincaid.
- γB*CAM-K που έχει το 40% της ενεργότητας της CaM K II απουσία Ca^{2+} -Καλμοδουλίνης (Hama et al.,1996).

2.4.1.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης πυρηνικών εκχυλισμάτων με μεθοδολογία BRADFORD.

Η μέθοδος προσδιορισμού πρωτεΐνης πυρηνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιείται με το BIORAD Protein Assay (5x) αντιδραστήριο, το οποίο αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου Bradford (Bradford, 1976) και είναι εμπορικά διαθέσιμο και βασίζεται στις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Αρχή μεθόδου:

Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για την εύκολη και με ακρίβεια ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε διάλυμα. Εμπεριέχει χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινο διάλυμα όπου έχει μέγιστη απορρόφηση στα 450 nm. Το χρώμα της ουσίας αυτής αλλάζει διαδοχικά μετά την προσθήκη διαδοχικών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμεύεται σε βασικά και αμινοξέα ειδικά αργινίνες.

Πορεία:

Παρασκευάζονται 5 διαδοχικές αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων π.χ. BSA σε εύρος συγκεντρώσεως αντίστοιχο με αυτό του αγνώστου διαλύματος υπό μέτρηση. Το εύρος της συγκέντρωσης που ανιχνεύει η μέθοδος είναι από 1.2μg/ml έως και 10μg/ml πρωτεΐνης σε διάλυμα.

Σε μικροπλάκα 96 θέσεων προστίθενται 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος ή 2 μl του δείγματος προς μέτρηση σε 48 μl διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια 250 μl διαλύματος BIORAD (1x) προστίθενται σε κάθε ένα από τα πρότυπα και τα δείγματα προς μέτρηση και αναμειγνύονται και με το ακροφύσιο της πιπέτας. Η μικροπλάκα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και τα δείγματα φωτομετρούνται το αργότερο εντός μιας ώρας καθώς η απορρόφηση αυξάνεται με την πάροδο της ώρας. Αφού καταγραφούν οι τιμές του φασματοφωτόμετρου για κάθε πρότυπο και δείγμα ξεχωριστά, ακολουθεί ο σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης με τις γνωστές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και τις τιμές των απορροφήσεών τους. Με

βάση αυτή την καμπύλη υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε άγνωστου δείγματος (σε $\mu\text{g/ml}$) από την τιμή της απορρόφησης του.

2.4.1.8 Έλεγχος αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσεως

Ο έλεγχος της έκφρασης από τα κύτταρα των υπό μελέτη πλασμιδίων, γίνεται με το kit της Promega “Dual-Luciferase Reporter Assay System” ακολουθώντας τις αναλυτικές οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας που συνοδεύουν το kit.

Αρχή μεθόδου:

Ο όρος ‘Dual reporter’ αναφέρεται στην ταυτόχρονη έκφραση και μέτρηση δύο διαφορετικών μεμονωμένων ενζύμων αναφοράς μέσα στο ίδιο ενιαίο σύστημα. Και τα δυο ένζυμα αναφοράς που χρησιμοποιούνται από το kit δεν χρειάζονται μετα-μεταφραστικές διαδικασίες για να ενεργοποιηθούν ενζυματικά και έτσι μπορούν να δράσουν απευθείας μετά το τέλος της διαδικασίας της μετάφρασης.

Τα πλασμίδια Luc (που χρησιμοποιούνται στα περιγραφόμενα πειράματα διαμόλυνσης αυτού του κεφαλαίου) έχουν τις κωδικοποιούσες περιοχές των υπό μελέτη υποκινητών, συνδεδεμένες με το Luc γονίδιο αναφοράς. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη λουσιφεράση (firefly luciferase από την πυγολαμπίδα *Photinus pyralis*). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν εκφράζεται από τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αλλά η έκφρασή της είναι ανάλογη του πλασμιδιακού DNA που ενσωματώνεται και εκφράζεται στο κύτταρο. Η μέθοδος βασίζεται στη ιδιότητα της λουσιφεράσης να καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της λουσιφερίνης παρουσία ATP. Αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η εκπομπή φωτός σε μήκος κύματος 562nm το οποίο ανιχνεύεται με τη χρήση κατάλληλου λουμινόμετρου. Το kit της Promega χρησιμοποιεί αυτό το γονίδιο αναφοράς για την ανίχνευση του ποσοστού έκφρασης των πλασμιδίων από τα κύτταρα.

Τα κύτταρα που διαμολύνονται με το υπό μελέτη πλασμίδιο Luc, συν-διαμολύνονται και με το πλασμίδιο pRL/TK που κωδικοποιεί την λουσιφεράση της *Renilla* (*Renilla luciferase* από την *Renilla reniformis*) κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του απλού έρπητα. Τα κύτταρα που έχουν ενσωματώσει επιτυχώς το συγκεκριμένο πλασμίδιο και το έχουν εκφράσει ως μέρος του γονιδιώματος τους, θεωρείται ότι έχουν ενσωματώσει και εκφράσει εξίσου επιτυχώς και το υπό μελέτη πλασμίδιο. Συνεπώς αυτό το γονίδιο αναφοράς αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα της τεχνικής, βάση του οποίου εξομαλύνονται οι τυχόν διακυμάνσεις στις τιμές των δειγμάτων που μπορεί να οφείλονται σε αντίστοιχες διακυμάνσεις είτε λόγω

βιωσιμότητας των κυττάρων είτε λόγω διαφοράς στην αποτελεσματικότητα της διαμολύνσεως.

Η μέθοδος ανίχνευσης της λουσιφεράσης είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και σχετικά εύκολη στους πειραματικούς χειρισμούς. Το εύρος ανίχνευσής της με αυτή τη μεθοδολογία είναι 10fg-10ng λουσιφεράσης. Η μέθοδος μειονεκτεί μόνο στο γεγονός ότι η παραγωγή φωτός είναι παροδική και σχετικά γρήγορη (peak 0.3-0.5sec) κάνοντας τους πειραματικούς χειρισμούς δύσκολους. Ωστόσο στη μεθοδολογία της Promega εφαρμόζεται η μέθοδος με το ακέτυλο συνένζυμο A (AcetylCoA), η παρουσία του οποίου βοηθάει στην παρατεταμένη παραγωγή και εκπομπή φωτός.

Πορεία:

Από διαμολυνθέντα κύτταρα απομονώνονται 40 μ l ($\approx$ 40 μ g) ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε σωληνάρια τύπου eppendorf και προστίθεται λουσιφερίνη, το υπόστρωμα της λουσιφεράσης. Οι ενεργότητες των δυο διαφορετικών ενζύμων αναφοράς, λουσιφεράσης της firefly και λουσιφεράσης της Renilla, μετριοούνται διαδοχικά στο ίδιο φιαλίδιο για κάθε δείγμα. Αρχικά προστίθενται 80 μ l από το αντιδραστήριο του kit που μετράει την ενεργότητα της λουσιφεράσης της firefly και στην συνέχεια προστίθενται 80 μ l από το αντιδραστήριο για τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης της Renilla, το οποίο και σταματά την αντίδραση της λουσιφεράσης της firefly και ξεκινά την αντίδραση της λουσιφεράσης της Renilla (εικόνα 2-6).

Εικόνα 2-6. Σχηματική απεικόνιση του ελέγχου έκφρασης πλασμιδίων μέσω της τεχνικής Dual Luciferase.

Στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικού λουμινόμετρου (Turner Designs DT20/20) ανιχνεύεται η εκπομπή του φωτός της αντίδρασης. Εφόσον στα δείγματα υπάρχει

λουσιφεράση που έχει εκφραστεί από τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί, αυτή θα αντιδράσει με το υπόστρωμά της και θα παραχθεί φως στα 562nm. Η έκφραση του γονιδίου είναι ανάλογη της ενεργότητας της λουσιφεράσης, κατά επέκταση ανάλογη της εκπομπής φωτός στα 562 nm και οι μονάδες μέτρησης της ενεργότητας είναι οι σχετικές μονάδες φωτός (RLU: Relative Light Units). Η ενεργότητα της λουσιφεράσης για κάθε δείγμα ανάγεται ανά mg ολικού ποσού πρωτεΐνης, που υπολογίζεται με βάση πρότυπη καμπύλη δειγμάτων αναφοράς (standards), διορθωμένη ως προς την τιμή της μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης της Renilla ανά δείγμα.

2.4.2 In vitro έλεγχος δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων

2.4.2.1 Σήμανση του 5' άκρου των ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών DNA (5' end labeling)

Αρχή μεθόδου:

Για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και αλληλουχιών DNA με τη μέθοδο της μετατόπισης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA), η αλληλουχία του DNA πάνω στην οποία δεσμεύεται ο υπό μελέτη παράγοντας μεταγραφής σημαίνεται ραδιενεργά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το εμπορικά διαθέσιμο κιτ το οποίο χρησιμοποιεί την T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση (PNK), της εταιρείας Promega. Η PNK καταλύει τη μεταφορά ενός τελικού ραδιενεργού φωσφόρου [γ -³²P] του ATP (Amersham Pharmacia Biotech) στο 5'-υδροξύ τελικό άκρο μορίου DNA. Όλα τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για τη σήμανση του DNA εμπεριέχονται στο προϊόν ενώ η πορεία της μεθόδου βασίζεται στο ειδικό ένθετο του κιτ.

Πορεία:

Σε φιαλίδιο τύπου eppendorf προσθέτουμε τα εξής:

Πίνακας 6.

Υλικά	Συγκεντρώσεις -όγκοι	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Ποσότητα (μl) ανά 20 μl αντίδρασης
[γ-³²P]		(3000 Ci/mmol)	2 μl
DNA υπόστρωμα		2 μg/ μl	1 μl
T₄ PNK buffer		10x	2 μl
T₄ κινάση		10 U/μl	2.5 μl
αποστειρωμένο ddH₂O			12.5 μl

Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά σε προθερμασμένο στους 37° C υδατόλουτρο και ο υβριδισμός των μονόκλωνου DNA και η μετατροπή του σε δίκλωνο πραγματοποιείται με θέρμανση αρχικά των δειγμάτων στους 95° C και στη συνέχεια βαθμιαία επαναφορά της θερμοκρασίας παραμένοντας στο δοχείο ζέσεως σε θερμοκρασία δωματίου. Το ραδιενεργό DNA καθαρίζεται από προϊόντα μη επιτυχούς ενσωμάτωσης ραδιενεργού φωσφόρου μέσω στήλης (ROCHE Diagnostics Co, Indianapolis, IN, USA) και μικρή ενδεικτική ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ποσοστού της ενσωμάτωσης ραδιοϊσοτόπου στην αλληλουχία DNA σε υγρό σπινθηρισμού και μετρητή β-ακτινοβολίας (β-counter). Το ποσοστό ενσωμάτωσης και εκπομπής ραδιενέργειας εκφράζεται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm/min).

2.4.2.2 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Αρχή μεθόδου:

Για την παραλαβή πυρηνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται μέθοδος απομόνωσης με ρυθμιστικά διαλύματα όπου αποφεύγεται η πρόσμιξη με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Dignam *et al.*, 1983). Η μέθοδος συνδυάζει την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών από μικρό σχετικά δείγμα κυττάρων με τη χρήση ενός υπότονου διαλύματος με το οποίο διασπάται η κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Διάλυμα Α) και ενός υπέρτονου διαλύματος με το οποίο διασπάται η πυρηνική μεμβράνη των κυττάρων και εκλούνται οι πυρηνικές πρωτεΐνες (Διάλυμα C).

Υλικά και όργανα:

Πίνακας 7.

Λυτικό Διάλυμα Α	Λυτικό Διάλυμα C
10 mM HEPES pH 7.9	20 mM HEPES
10 mM KCl	0.4 M KCl
0.1 mM EDTA	1 mM EDTA
0.1 mM EGTA	20 % Glycerol
1 mM DTT	1 mM DTT
0.5 mM PMSF	0.5 mM PMSF

Πορεία:

20 x 10⁶ απομονωμένων φυσιολογικών T λεμφοκυττάρων σε 10 ml TBS φυγοκεντρούνται στα 250 x g στους 4°C για 7 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 1 ml TBS και μεταφέρεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Eppendorf. Τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται στα 250 x g στους 4°C για 7 λεπτά και το

υπερκεείμενο απομακρύνεται με πιπέττα. Στη συνέχεια, 400 μl λυτικού διαλύματος A προστίθενται στα κυτταρικά ιζήματα και μετά από καλή αναδιάλυση τους τα ιζήματα επωάζονται για 15 λεπτά σε πάγο. Ακολουθεί η προσθήκη 25 μl 10 % ο/ο NP-40 και τα φιαλίδια αναμειγνύονται δυνατά σε μηχανήμα vortex για 10 δευτερόλεπτα προτού φυγοκεντρηθούν στα 250 x g στους 4°C για 4 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκεείμενο απορρίπτεται προσεκτικά με πιπέττα τύπου Gilson και προστίθενται 30 μl παγωμένου λυτικού διαλύματος C ανά κυτταρικό ίζημα και επώαση των φιαλιδίων σε πλατφόρμα ανακίνησης για 15 λεπτά στους 4° C. Τελικά τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται στα 250 x g στους 4° C για 10 λεπτά, και το υπερκεείμενο συλλέγεται με πιπέττα τύπου Gilson και φυλλάσσεται σε νέα φιαλίδια τύπου Eppendorf στους -70° C ή σε Υγρό Άζωτο (-196° C). Αφού τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έχουν απομονωθεί, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των δειγμάτων προσδιορίζεται όπως έχει ήδη περιγραφεί με τη χρήση του αντιδραστηρίου Biorad Protein Assay της εταιρείας Biorad (τεχνική Bradford).

2.4.2.3 Έλεγχος δέσμευσης πυρηνικών πρωτεϊνών σε τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων

Ο έλεγχος της δέσμευσης πρωτεϊνών σε σημασμένα με ^{32}P τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, έγινε σύμφωνα με προτυπωμένη μεθοδολογία (Ausubel F.M., et al, 1989 in: Current Protocols in Molecular Biology).

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-DNA να μεταναστεύουν πιο αργά σε πήκτωμα ακρυλαμίδης από ότι τα ελεύθερα τμήματα DNA ή δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Έτσι, πυρηνικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών (που περιέχουν τους παράγοντες μεταγραφής), επωάζονται με ραδιενεργά σημασμένο ^{32}P τμήμα DNA (στο 5' άκρο του) που εμπεριέχει την αλληλουχία δέσμευσης συγκεκριμένου παράγοντα μεταγραφής (π.χ. MEF2). Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες. Η αλληλεπίδραση παραγόντων μεταγραφής και DNA πιστοποιείται αυτοραδιογραφικά με την εμφάνιση ζώνης-επάρματος στο πήκτωμα που έχει διανύσει μικρότερο διάστημα από ότι το ελεύθερο τμήμα του DNA (probe). Η ειδικότητα της δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής στη συγκεκριμένη αλληλουχία DNA αποδεικνύεται με πειράματα «ανταγωνισμού». Συγκεκριμένα, πυρηνικές πρωτεΐνες

επώάζονται με μοριακή περίσσεια μη σεσημασμένου DNA, ίδιας ή διαφορετικής ειδικότητας με τον ραδιενεργό ανιχνευτή πριν τη προσθήκη του ραδιενεργού ανιχνευτή. Η περίσσεια του ειδικού ψυχρού ανιχνευτή θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δέσμευσης του ειδικού θερμού (εξαφάνιση ζώνης συμπλόκου), ενώ η περίσσεια του μη ειδικού δεν θα αναστείλει τη δέσμευση (παραμονή ζώνης συμπλόκου).

Υλικά και όργανα:

5 x διάλυμα δέσμευσης για τον MEF2

☒ 10 mM Tris HCl pH 7.5

☒ 50 mM NaCl

☒ 1 mM DDT

☒ 5% glycerol

4 µg BSA

4 µg PolyDIDC

Πορεία:

Για τον έλεγχο της δέσμευσης πρωτεϊνών σε σημασμένα με ^{32}P τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, προστίθενται σε στείρο φιαλίδιο τύπου errendorf κατά σειρά τα ακόλουθα:

Πίνακας 8.

Υλικά	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Ποσότητα (µl) ανά 18 µl αντίδρασης
πυρηνική πρωτεΐνη	10 µg	x µl
BSA	2 µg/ µl	2 µl
PolyDIDC	2 µg/ µl	2 µl
Διάλυμα δέσμευσης	5 x	4 µl
αποστειρωμένο ddH₂O		x µl

Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ραδιενεργά σημασμένη DNA αλληλουχία 2 pmol DNA probe ($2-5 \times 10^4$ cpm) σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά πάλι σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά 3 µl διαλύματος φόρτωσης πηκτής (gel loading buffer) προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο και τα δείγματά φορτώνονται προσεκτικά σε φρεάτια πηκτής του ακρυλαμιδίου (5 % χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες), αφού έχει προηλεκτροφορηθεί για τουλάχιστον 1 ώρα σε ρεύμα σταθερής έντασης 35 mA. Αφού προστεθούν τα δείγματα στο πήκτωμα, ρεύμα σταθερής έντασης 35 mA εφαρμόζεται για περίπου 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τελικό στάδιο, το πήκτωμα στεγνώνεται σε αφυγραντήρα και ακολουθεί η έκθεση του σε φιλμ αυτοραδιογραφίας στους -70°C σε κασσέτες εμφάνισης φιλμ με ενισχυτικές πλάκες για περίπου 12 ώρες ή παραπάνω ανάλογα με την ένταση του λαμβανόμενου σήματος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τεχνολογία PhosphorImager FUJIFILM FLA 3000 (FUJIFILM Europe) μέσω του λογισμικού AIDA για περιβάλλον Windows.

2.4.2.4 DNA consensus ανιχνευτές

Οι ακόλουθες consensus ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα EMSA:

α) MEF2 (παρούσα στην περιοχή του υποκινητή της IL-10):

5'-GTAGCCCATCCTAAAAATAGCTGTAATGC-3'

2.4.3 Ελεγχος σημείων πρόσδεσης και προσδιορισμός δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή του γονιδίου της IL-10

Ο προσδιορισμός των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένουν στις 500 πρώτες βάσεις του υποκινητή της IL-10 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος CONSITE (Sandelin *et al.*, 2004). Το CONSITE είναι διαθέσιμο online (<http://asp.iu.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite>) και εκτός από τον προσδιορισμό των μεταγραφικών παραγόντων προσδίδει επίσης σημαντικές λεπτομέρειες για την ειδικότητα πρόσδεσης τους στο DNA.

Το CONSITE αποτελεί ένα πολύ φιλικό για τον χρήστη πρόγραμμα το οποίο:

- ευθυγραμμίζει την αλληλουχία των υπό μελέτη υποκινητών,
- υπολογίζει το βαθμό συντήρησης/διατήρησης στην ευθυγραμμισμένη περιοχή,
- ελέγχει την αλληλουχία της για θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων με βάση συγκεκριμένα προφίλ,
- φιλτράρει τα αποτελέσματα με βάση το φυλογενετικό αποτύπωμα, εντοπίζοντας συντηρημένες αλληλουχίες ανάμεσα σε είδη
- εμφανίζει τα αποτελέσματα σε φιλική για τον χρήστη μορφή.

3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ~ Ψυχόμενη φυγόκεντρος τύπου *Sorvall RC5C*
- ~ Φασματοφωτόμετρο *Beckmann*
- ~ Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell *BioRad*
- ~ Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA/RNA Horizon 11-14 *Gibco BRL*
- ~ VORTEX Genie 2 *Scientific Industries*
- ~ Υδατόλουτρο 37°C *BioLine*
- ~ Θάλαμος καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων 37°C *Forma Scientific 3250*
- ~ Θάλαμος κάθετης (νηματικής) ροής *Holten HB 2448*
- ~ Τροφοδοτικό σταθερής έντασης Power/PAC 300 *BioRad*
- ~ Λουμινόμετρο *Turner Designs DT20/20*
- ~ Ψυχόμενη φυγόκεντρος τύπου *eppendorf* για φιαλίδια 1.5 ml *Eppendorf 5417R*
- ~ Στήλη απιονισμένου νερού και συσκευή απόσταξης
- ~ Συσκευές αποστείρωσης γυάλινων φιαλών και διαλυμάτων (αυτόκαυστο)
- ~ Αυτόματο πλυντήριο μικρό επωαστικής πλάκας 96-φρεατιών *Sorin Biomedica*
- ~ Αναλυτής σπινθηρισμού τύπου *Behkman*
- ~ Ψυχόμενη φυγόκεντρος τύπου *Hettich Universal 32R*
- ~ Πλάκα ανακίνησης-ανάδευσης *Swir KL-2 alpha scientific*
- ~ Rotor-Gene RG-3000 της εταιρείας *CORBETT Research*

Οι συσκευές που αναφέρονται βρίσκονται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας στα Προκλινικά κτίρια Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Το μηχάνημα PhosphorImager FUJIFILM FLA 3000 (FUJIFILM Europe) βρίσκεται στο εργαστήριο Βιοχημείας στα Προκλινικά κτίρια Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

.....

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ & ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

4.1.1. Επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II στο στάδιο της πρωτεϊνσύνθεσης της IL-10.

Η *in vitro* ενεργοποίηση των φυσιολογικών Τ λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους διέγερσης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία για τη μελέτη της παραγωγής κυτταροκινών από τα Τ λεμφοκύτταρα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο ‘Διέγερση φυσιολογικών Τ λεμφοκυττάρων’, του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι.

Ο πρώτος τρόπος διέγερσης των Τ λεμφοκυττάρων αφορά στη χρήση Ιονομυκίνης (Ionomycin-Ion) η οποία αυξάνει το ενδουττάριο ασβέστιο, και του φορβολικού εστέρα PMA που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C. Η διέγερση των Τ κυττάρων πραγματοποιήθηκε επίσης με τη βοήθεια των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του CD3 μορίου του Τ κυτταρικού υποδοχέα (anti-CD3) και του συνδιεγερτικού μορίου CD28 (anti-CD28). Η χρήση των συγκεκριμένων αντισωμάτων επάγει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων, μιμούμενη τη φυσιολογική (*in vivo*) ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μέσω του Τ κυτταρικού υποδοχέα τους και του συνδιεγερτικού μορίου.

Οι παραπάνω τρόποι διέγερσης μελετηθήκαν στις 24, στις 48 καθώς και στις 72 ώρες, έτσι ώστε να επιλεγεί η χρονική περίοδος εκείνη κατά την οποία επιτυγχάνονται η μέγιστη βιωσιμότητα των κυττάρων και ταυτόχρονα η ικανοποιητική παραγωγή ιντερλευκίνης 10 (IL-10). Το πρωτεϊνικό προϊόν της IL-10 αυξάνεται σταδιακά μέχρι τις 48 πρώτες ώρες μετά την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων όπου η IL-10 πρωτεΐνη έχει την μέγιστη τιμή της (peak) μετά τις 48 ώρες αρχίζει να μειώνεται σταδιακά. Με βάση το χρονοδιάγραμμα που προέκυψε από τα αρχικά αυτά πειράματα (Διάγραμμα 1), το χρονικό σημείο που κάλυπτε τις παραπάνω προϋποθέσεις και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε και ως χρόνος διεξαγωγής των πειραμάτων διέγερσης των Τ λεμφοκυττάρων ήταν οι 48 ώρες.

Διάγραμμα 1.: Κινητική παραγωγής πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 από ανθρώπινα φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα μετά από διέγερση με Ion/PMA, ή anti-CD3/anti-CD28.

Διάγραμμα 2: Παραγωγή πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 από παρθένα και μνημονικά ανθρώπινα φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα μετά από διέγερση με Ion/PMA, anti-CD3 ή anti-CD3/anti-CD28.

Για να ελέγξουμε τον υποπληθυσμό των Τ λεμφοκυττάρων που παράγουν IL-10 πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των Τ λεμφοκυττάρων σε μνημονικά Τ λεμφοκύτταρα (Memory T cells – CD45RO+) και σε Παρθένα Τ λεμφοκύτταρα (Naïve T cells – CD45RA+) πριν τη διέγερση τους. Οι δύο πληθυσμοί διεγέρθηκαν με τους δύο διαφορετικούς τρόπους για 24 ώρες, και όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3 η παραγωγή της IL-10 από τα μνημονικά Τ λεμφοκύτταρα είναι υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη των παρθένων Τ λεμφοκυττάρων.

Για την μελέτη της συμβολής του ασβεστιο-εξαρτωμένου μονοπατιού στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 από T λεμφοκύτταρα, και πιο συγκεκριμένα του ρόλου των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II χρησιμοποιήσαμε τους ειδικούς αναστολείς της δράσης των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II, κυκλοσπορίνη και KN-62 αντίστοιχα. Οι αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και οι καταλλήλες συγκεντρώσεις ήταν για την κυκλοσπορίνη 100ng/ml, ενώ για την CaM Kinase II 1μM. Σε προκαταρκτικά πειράματα ελέγχθηκε η δράση των φαρμακευτικών αναστολέων στη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη χρωστική trypan blue και αποδείχτηκε ασήμαντη. Παρουσία κυκλοσπορίνης η παραγωγή της IL-10 μειώθηκε κατά 80%-100%, ενώ παρουσία KN-62 η παραγωγή της IL-10 μειώθηκε κατά 70%-90%, σε όλα τα χρονικά διαστήματα στα οποία μελετήθηκε. Τα ποσοστά αναστολής ήταν ίδια και κατά τους δύο τρόπους διέγερσης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα διαγράμματα 3Α και 3Β.

Διάγραμμα 3Α:Κινητική της αναστολής της παραγωγής της ιντερλευκίνης-10 σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA παρουσία CsA ή KN-62

Διάγραμμα 3Β:Κινητική της αναστολής της παραγωγής της ιντερλευκίνης-10 σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA παρουσία CsA ή KN-62

4.1.2. Η μείωση της παραγωγής της IL-10 μέσω των αναστολέων CsA KAI KN-62 από φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα δεν διαμεσολαβείται από την IL-2

Η IL-2 που παράγεται στη διάρκεια ενεργοποίησης ενός T λεμφοκυττάρου αποτελεί αυξητικό παράγοντα για το λεμφοκύτταρο προσδεδεμένη στον υποδοχέα της. Δεδομένου του ότι στο υπό-μελέτη σύστημα τόσο η παραγωγή της IL-2 όσο και εκείνη της IL-10 μειώνονται ως αποτέλεσμα της δράσης της κυκλοσπορίνης, κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η πιθανή συμμετοχή της αναστολής της IL-2 στην αναστολή της IL-10. Έτσι, για να απαντηθεί το ερώτημα αν η παρατηρηθείσα αναστολή της παραγωγής της IL-10 είναι συνέπεια της αναστολής της παραγωγής της IL-2, εξωγενής IL-2 προστέθηκε στη διέγερση των φυσιολογικών ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων, τα οποία διεγέρθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο ‘Διέγερση φυσιολογικών T λεμφοκυττάρων παρουσία rh-IL-2’, του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι.

Διαγραμμα 5: Η αναστολή της IL-10 από την CsA σε T λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA δεν αναιρείται από την προσθήκη εξωγενούς IL-2

Στα πειράματα που ακολούθησαν (Διάγραμμα 5), η προσθήκη rh-IL-2 στα κύτταρα που διεγερθήκαν με I/PMA, παρουσία κυκλοσπορίνης Α δεν επανάφερε την παραγωγή της IL-10 στα επίπεδα του μάρτυρα (κύτταρα διεγερμένα με I/PMA).

4.1.3. In vivo μελέτη της επίδρασης της καλσινευρίνης και CaM-Kinase II στην παραγωγή IL-10 μέσω υπερέκφρασης των γονιδίων τους σε ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα

Επειδή οι φαρμακευτικοί αναστολείς δεν έχουν πάντα ένα μόνο στόχο για να μελετηθεί ακριβέστερα ο ρόλος των Calcineurin και Cam Kinase II προχωρήσαμε σε in vivo μελέτη της επίδρασης των προαναφερθέντων ενζύμων στην παραγωγή της IL-10. Αυτό πραγματοποιήθηκε με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των T-λεμφοκυττάρων με την μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα της καλσινευρίνης (ΔCAM-A) ή της CaM-Kinase II (γΒ*CAM-K) που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση μεταλλαγμένων μορφών των ενζύμων των οποίων η δραστηριότητα είναι ανεξάρτητη από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το πλασμίδιο pSRa το οποίο είναι το όχημα των δύο προηγούμενων πλασμιδίων για την διασφάλιση της σταθερότητας των πειραματικών συνθηκών. Ταυτόχρονα εισάγαμε στα κύτταρα πλασμίδιο pGFP το οποίο κωδικοποιεί φθορίζουσα πρωτεΐνη η οποία επιτρέπει τον ακριβή διαχωρισμό των διαμολυνθέντων κυττάρων με κυτταρομετρητή διαχωριστή φθορισμού. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με τον συνδυασμό ION/PMA όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Στα πειράματα αυτά αποδεικνύεται πως η παραγωγή της IL-10 αυξάνεται τρεις φορές στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της CaM-Kinase II και κατά τέσσερις φορές στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της καλσινευρίνης συγκριτικά με κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί μόνο με το πλασμίδιο pSRa. (Διάγραμμα 7).

Διαγραμμα 7 : Παραγωγή της ιντερλευκίνης-10 σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA μετά από διαμόλυνσή τους με τις ενεονές μορφές των ενζύμων καλσινευρίνη ή CaM Kinase II.

4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΚΑΛΣΙΝΕΥΡΙΝΗ ΚΑΙ CaM KINASE II ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

4.2.1. Επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM-Kinase II στο στάδιο παραγωγής mRNA της IL-10

Το ερώτημα που τέθηκε στη συνέχεια ήταν ποιο είναι το επόμενο ρύθμισης της παραγωγής της IL-10 μέσω των ενζύμων Calcineurin και CaM Kinase II. Για τον έλεγχο της ρύθμισης σε μεταγραφικό επίπεδο μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA κάτω από τη επίδραση των προαναφερθέντων αναστολέων των προαναφερθέντων ενζύμων, κυκλοσπορίνη και KN-62. Η μελέτη της επίδρασης του ασβεστίου στην παραγωγή mRNA της IL-10 πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 'Προσδιορισμός επιπέδων παραγωγής mRNA ειδικού για την Ιντερλευκίνη-10 από φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα, του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Φυσιολογικά ανθρώπινα λεμφοκύτταρα διεγέρθηκαν με συνδυασμό ION/PMA για 12 ώρες, απομονώθηκε RNA και ποσοτικοποιήθηκε με Real Time PCR.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το στάδιο στο οποίο εμπλέκονται η καλσινευρίνη και η CaM-Kinase II εξαρτάται από τον τρόπο διέγερσης των κυττάρων. Ειδικότερα όταν τα κύτταρα διεγείρονται μέσω TCR και του συνδιεγερτικού μορίου CD28 η αναστολή των παραπάνω ενζύμων δεν επηρεάζει την συσσώρευση του mRNA της IL-10, υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση γίνεται σε μεταγενέστερα της μεταγραφής στάδια, επηρεάζοντας πιθανά τη σταθερότητα του mRNA ή το ρυθμό μετάφρασής του. Όταν ο τρόπος διέγερσης των κυττάρων παρακάμπτει τον TCR τότε η αναστολή των προαναφερθέντων ενζύμων αναστέλλει την συσσώρευση mRNA για την IL-10 (διάγραμμα 8), υποδηλώνοντας ότι δρουν στο μεταγραφικό ή και μετα-μεταγραφικό μηχανισμό του κυττάρου.

Διάγραμμα 8 :Παραγωγή mRNA της ιντερλευκίνης-10 σε Τα λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA ή με CD3/CD28 για 12 ώρες παρουσία ή απουσία CsA ή KN-62.

4.2.2. Η καλσινευρίνη και η CaM Kinase II αυξάνουν εκλεκτικά τη ενεργότητα του υποκινητή IL-10 στα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα.

Στη συνέχεια, στα πλαίσια της μελέτης της μεταγραφικής ρύθμισης της IL-10 από την αύξηση του ασβεστίου, ελέγχθηκε η ενεργότητα ολόκληρου του υποκινητή (1327 βάσεις) του γονιδίου της IL-10 (Kube et al.,1995) (που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Κρήτης, κ. Μαυροθαλασσίτης) για να διαπιστώσουμε σε τι οφείλεται η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων του mRNA της IL-10 παρουσία των ειδικών αναστολέων κυκλοσπορίνης και KN-62 ως πρώτο στάδιο ρύθμισης της μεταγραφής της IL-10. Για τον σκοπό αυτό, φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί την ενεργότητα της λουσιφεράσης της Firefly υπό τον έλεγχο ολόκληρου του

υποκινητή της IL-10 όπως περιγράφεται στην παράγραφο ‘Μέθοδος διαμολύνσεως Τ λεμφοκυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA (transfection by electroporation)’ του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Μαζί με τον υποκινητή της IL-10 (Reporter plasmid) εισήχθηκαν πλασμίδια που κωδικοποιούν την καταλυτική υπομονάδα της καλσινευρίνης (ΔCAM-A) ή της CaM-Kinase II (γB*CAM-K) που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση μεταλλαγμένων μορφών των ενζύμων των οποίων η δραστηριότητα είναι ανεξάρτητη από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το πλασμίδιο pSRa το οποίο είναι το όχημα των δύο προηγούμενων πλασμιδίων για την διασφάλιση της σταθερότητας των πειραματικών συνθηκών. Για τον έλεγχο της αποδοτικότητας της διαμόλυνσης των Τ-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pRL-TK το οποίο κωδικοποιεί την Renilla luciferase κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του ιού του απλού έρπητα. Η παραγωγή της Firefly luciferase καθώς και της Renilla luciferase μετρήθηκε σε ολικές πρωτεΐνες με ειδικό κιτ Dual-Luciferase assay system.

Διάγραμμα 9 : Επίδραση των ενεργών ενζύμων καλσινευρίνη ή CaM Kinase II Α στην ενεργότητα του υποκινητή της IL-10 και στον υποκινητή του SV40 σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA

Παρατηρήσαμε ότι στα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία είχαμε διαμολύνει είτε με μεταλλαγμένη μορφή της καλσινευρίνης, είτε με την CaM-Kinase II, η ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-10 που παρατηρείται μετά από διέγερση με ION/PMA για 24 ώρες αυξήθηκε κατά 5 και 3 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί μόνο με το όχημα pSRa, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9. Για να ελέγξουμε αν η επίδραση της υπερέκφρασης των δύο ενζύμων είναι ειδική για τον υποκινητή της IL-10, μελετήσαμε την επίδραση της

καλσινευρίνης και της CaM-Kinase II στον υποκινητή του SV-40 ακολουθώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9 τα δύο ένζυμα δεν είχαν καμία επίδραση στον υποκινητή SV-40

Η επίδραση και των δύο ενζύμων (Calcineurin, CaM KinaseII) στη δραστικότητα του υποκινητή της IL-10 είναι σημαντική και αφορά τόσο τον τρόπο διέγερσης που μιμείται τον υποδοχέα αντιγόνου (Ion/PMA) όσο και αυτόν που στοχεύει σε ενδοκυττάρια διέγερση των σηματοδοτικών οδών που ελέγχουν η αύξηση του Ca^{++} και η ενεργοποίηση της PKC (CD3/CD28).(Διάγραμμα 10).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: Επίδραση της υπερέκφρασης των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II στην ενεργότητα ολόκληρου του υποκινητή του γονιδίου της IL-10 από φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα διεγερμένα είτε με Ion/PMA είτε με CD3/CD28.

4.2.3. Η CaM Kinase II μειώνει την ενεργότητα των υποκινητών της IL-2 και της IL-4

Στην συνέχεια, ελέγξαμε την επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II στην ενεργότητα των υποκινητών δύο άλλων κυτταροκινών, της IL-2 και της IL-4 για να διαπιστώσουμε την εκλεκτικότητα της δράσης της CaM Kinase II στην επίδρασή της στον υποκινητή της IL-10. Ταυτόχρονα, μελετήσαμε και την επίδραση της καλσινευρίνης στους δύο υποκινητές στο σύστημα μιας και είναι ήδη γνωστή η θετική της επίδραση .

Η δράση της CaM Kinase II είναι εκλεκτική για τον υποκινητή της IL-10 εφόσον τα ίδια ένζυμα μειώνουν την δραστικότητα του υποκινητή τόσο μιας άλλης Th2 κυτταροκίνης όπως η IL-4 (Διάγραμμα 11) όπως επίσης και της IL-2 (Διάγραμμα 12)

Διάγραμμα 11: Επίδραση της υπερέκφρασης των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II στην ενεργότητα ολόκληρου του υποκινητή του γονιδίου της IL-4 από φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα διεγερμένα είτε

Διάγραμμα 12 : Επίδραση της υπερέκφρασης των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II στην ενεργότητα ολόκληρου του υποκινητή του γονιδίου της IL-2 από φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα διεγερμένα είτε με Iον είτε με CD3/CD28.

4.2.4 Η αύξηση του ασβεστίου αυξάνει την ενεργότητα των 500 πρώτων βάσεων του υποκινητή της IL-10

Τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον προσδιορισμό συγκεκριμένων τμημάτων του υποκινητή της IL-10, τα οποία επηρεάζονται από την αύξηση του ασβεστίου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν Φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν αρχικά με πλασμίδια που φέρουν ολόκληρο ή τμήματα του υποκινητή της IL-10 (κατασκευές του εργαστηρίου κ.Μαυροθαλασσίτη) όπως περιγράφεται στην παράγραφο ‘Μέθοδος διαμολύνσεως Τ λεμφοκυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA (transfection by electroporation)’ του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι και στη συνέχεια διεγέρθηκαν με Ion/PMA ή με CD3/CD28 παρουσία ή απουσία KN-62.

Διάγραμμα 13 : Επίδραση του αναστολέα της CaM Kinase II, KN-62 σε τμήματα του υποκινητή της IL-10 σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA.

Επειδή η δράση της κυκλοσπορίνης έχει καλά χαρακτηριστεί όσον αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα στόχο της (NF-AT) εστίασαμε περισσότερο στη δράση της CAM Kinase II στη μελέτη πιθανών στόχων-παραγόντων μεταγραφής. Με τη χρήση του αναστολέα της KN-62 ή της ενεργής μορφής του ενζύμου της CaM Kinase II η δράση του ενζύμου εστιάζεται στις πρώτες 500 βάσεις. Τα τμήματα Sec I, p3782, pnu II , και BSU που αντιστοιχούν στις -135, -235, -310, -500 παρουσιάζουν σημαντικά ποσοστά αναστολής παρουσία KN-62 (Διάγραμμα 13).

Ταυτόχρονα, η υπερέκφραση του ενεργού ενζύμου της CaM Kinase II είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της ιντερλευκίνης 10 στις πρώτες 500 βάσεις.

Διάγραμμα 14 : Επίδραση της ενεργής μορφής του ενζύμου CaM Kínase II σε τμήματα του υποκινητή της IL-10 σε Τα λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA.

4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΣΗΜΕΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΙΣ 500 ΠΡΩΤΕΣ ΒΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΗΣ IL-10 ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ CONSITE

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CONSITE συγκρίθηκαν η συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στις 500 πρώτες βάσεις πριν από το TATA πλαίσιο του υποκινητή της IL-10 στον άνθρωπο (Human IL-10 promoter GeneBank: Z30175-1327bp) και με το αντίστοιχο τμήμα του γονιδίου της IL-10 του ποντικού (Mouse IL-10 gene GeneBank: M84340). Με τον τρόπο αυτό εντοπίστηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούν πιθανούς στόχους της ενδοκυτταριας αύξησης του ασβεστίου. Τα αποτελέσματα του προγράμματος παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 14. Με μπλε χρώμα παρατίθενται οι βάσεις του υποκινητή της IL-10 στον άνθρωπο (Human IL-10 promoter GeneBank: Z30175) ενώ με πράσινο χρώμα οι βάσεις του γονιδίου της IL-10 στο ποντίκι (Mouse IL-10 gene GeneBank: M84340). Επιπρόσθετα, στη γραφική παράσταση φαίνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένουν στις συντηρημένες (conserved) αλληλουχίες μεταξύ των 2 ειδών και τα ποσοστά ομοιότητας τους έναντι των θέσεων των νουκλεοτιδίων. Ανάμεσα στους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένουν στις βάσεις αυτές, στο σύστημα των T λεμφοκυττάρων μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην διεθνή βιβλιογραφία συγκεντρώνουν ο MEF2 και ο CREB, ενώ πίνακες με πληροφορίες για του παράγοντες αυτούς δίνονται στο Διάγραμμα 15.

Graphical view

Legend

<i>Human _IL10</i>	<i>Mouse_ IL10</i>	<i>Coding region</i>	<i>Non- displayed region</i>	<i>Detecte d binding site (clickable)</i>	<i>Conse rvation cutoff</i>	<i>Perc ent identity</i>

Conservation profile of *Human_IL10*

Conservation profile of *Mouse_IL10*

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. Γραφική αναπαράσταση αποτελεσμάτων προγράμματος CONSITE.

A)

ore	Sc	Positi	Sequence
302	16.	1037	Human_IL10
302	16.	1350	Mouse_IL10

I	MA00
D	52
N	MEF2
ame	Cl
ass	S
pecies	Sapiens
Se	
quence	
Li	
t ref	
M	
edline

A [1 0 57 2 9 6 37 2 56 6]
C [50 0 1 1 0 0 0 0 0 0]
G [0 0 0 0 0 0 0 0 0 2 50]
T [7 58 0 55 49 52 21 56 0 2]

B)

ore	Sc	Posi	Sequence
31	9.5	899	Human_IL10
116	10.	1207	Mouse_IL10

D ame ass pecies Se quence	I	MA00
	18	
	N	CREB
	Cl	bZIP
	S	Homo
t ref edline	sapiens	
	Se	
	Li	
	M

A [0 3 0 2 5 0 0 16 0 0 1 5]
C [7 5 3 3 1 0 0 0 16 0 5 6]
G [5 4 6 11 7 0 15 0 0 16 0 3]
T [4 4 7 0 3 16 1 0 0 0 10 2]

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. Μεταγραφικοί παράγοντες που πιθανόν προσδένονται στις 500 πρώτες βάσεις του υποκινητή της IL-10 με βάση το πρόγραμμα CONSITE.

4.4. In vivo ΚΑΙ in vitro ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

4.4.1 Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου αυξάνει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 in vivo

Δεδομένου του ότι ο MEF2 έχει ήδη συνδεθεί με την Ca^{2+} -εξαρτώμενη ρύθμιση κυτταροκινών σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων της T κυτταρικής σειράς Jurkat, θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί η συμμετοχή του και στο συγκεκριμένο σύστημα για πιθανή εμπλοκή του και στο ασβεστιο-εξαρτώμενο μονοπάτι. Φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που κωδικοποιεί τη firefly Luciferase υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 'Μέθοδος διαμολύνσεως T λεμφοκυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA (transfection by electroporation)' του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι και στη συνέχεια διεγέρθηκαν με CD3/CD28 παρουσία ή απουσία κυκλοσπορίνης A ή KN-62. Η ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 μειώθηκε κατά 60% σε T

λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA παρουσία κυκλοσπορίνης Α και κατά 70% παρουσία KN-62. .(Διαγραμμα 14).

Διάγραμμα 14 : Επίδραση του αναστολέα KN-62 στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 σε τα λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA.

Διάγραμμα 15 : Επίδραση της Cam Kinase II στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2

Μελετήσαμε επίσης την επίδραση της υπερέκφρασης του ενεργού ενζύμου της CaM Kinase II στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA. Η ενεργότητα του MEF2 αυξήθηκε ως και πέντε φορές παρουσία του ενεργού ενζύμου της CaM Kinase II. (Διαγραμμα 15). Η

ανασταλτική δράση της CsA έχει ήδη περιγραφεί για τον MEF2 στη συμμετοχή του στη μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 . Το νέο εύρημα από τα συγκεκριμένα πειράματα είναι ότι και η CaM Kinase II έχει στόχο τον MEF2 και ειδικότερα η ανασταλτική της δράση είναι αποτελεσματικότερη όταν τα λεμφοκύτταρα διεγείρονται μέσω του υποδοχέα αντιγόνου.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2D στην ενεργότητα του υποκινητή της IL-10 σε ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα εισάγοντας μαζί με το πλασμίδιο reporter (IL-10 Luc) και πλασμίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MEF2D, (δωρεά του dr S. Gregoir) όπως περιγράφεται στην παράγραφο ‘Μέθοδος διαμολύνσεως T λεμφοκυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA (transfection by electroporation)’ του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι και στη συνέχεια διεγέρθηκαν με Ion/PMA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο MEF2D επηρεάζει την ενεργότητα του υποκινητή της IL-10, αυξάνοντας την ενεργότητα του τρεις φορές σε σχέση με το control, που ήταν T-λεμφοκύτταρα που είχαμε διαμολύνει με το αδειο όχημα – πλασμίδιο (pCDNA)(Διαγραμμα 16).

Διαγραμμα 16 Επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2D στην ενεργότητα του υποκινητή της IL-10

4.4.2 Η CsA και το KN-62 μειώνουν την δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 *in vitro*

Η δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 σε πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φυσιολογικών Τ λεμφοκυττάρων, ελέγχθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο ‘*In vitro* έλεγχος δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων’ του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι.

Σε Τ λεμφοκύτταρα διεγερμένα με Ion/PMA ή με CD3/CD28 ανιχνεύεται δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 που μειώνεται κατά 50% περίπου παρουσία CsA και KN-62

Lane 1 : ION/PMA, Lane 2: ION/PMA + CsA, Lane 3: ION/PMA + KN-62,
Lane 4: CD3/CD28, Lane 5: CD3/CD28 + CsA, Lane 6: CD3/CD28 + KN-62
Lane 7: + COLD MEF-2D, Lane 8: + COLD AP-1

4.4.3 Η CaM K II μειώνει την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και CREB

Οι μεταγραφικοί παράγοντες CREB και NF-κB αποτελούν κοινούς στόχους του ασβεστιο-εξαρτωμένου μονοπατιού, θέσεις πρόσδεσής τους υπάρχουν μέσα στις 500 πρώτες βάσεις του IL-10 promoter και συνεπώς κρίθηκε απαραίτητο ο έλεγχος της συμμετοχής τους στο υπό μελέτη σύστημα. Αλλωστε έχει αποδειχθεί ότι σε κύτταρα HuT 78 ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 (Mori et al., 1997). Φυσιολογικά ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που κωδικοποιεί τη firefly Luciferase υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα CREB ή υπό τον έλεγχο του

Διάγραμμα 17: Επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kινase II στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF- κB σε Τα λεμφοκύτταρα διεγερμένα είτε με Iον είτε με PMA

Διάγραμμα 18: Επίδραση των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kινase II στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF- κB σε Τα λεμφοκύτταρα διεγερμένα είτε με Iον είτε με PMA

μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ταυτόχρονα με τις ενεργές μορφές των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II και στη συνέχεια διεγέρθηκαν με Ion/PMA.

Η CaM Kinase II μειώνει την ενεργότητα και των δύο μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και CREB κατά 50 % περίπου με όλους τους τρόπους διέγερσης σε αντίθεση με την καλσινευρίνη που την αυξάνει όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές. Απο τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι πιθανότατα η CaM Kinase II αυξάνει την παραγωγή της ιντερλευκίνης 10 αυξάνοντας τη δραστηριότητα του του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στα T λεμφοκύτταρα.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μέσω του συμπλόκου του Τ κυτταρικού υποδοχέα οδηγεί σε άμεση αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου. (Abbas & Lichtman, 2001; Barritt, 1992). Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου προκαλεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων και μεταγραφικών παραγόντων, που με τη σειρά τους πυροδοτούν την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τις λειτουργίες των Τ λεμφοκυττάρων. Γενικά, το ασβέστιο στα Τ λεμφοκύτταρα έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στην επαγωγή ανεργίας (Gallichio et al.,1994,Schwartz et. Al., 1997), στην απόπτωση (King & Ashwell, 1993) και στην ενεργοποίηση της καλσινευρίνης (Ho et. Al.,1996, Schreiber & Crabtree,1992), η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της IL-2 και της IL-4 (Paliogianni et al.,1996, Hama et al., 1996).

Ένας από τους σημαντικότερους τρόπους ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης είναι η ρύθμιση της παραγωγής των κυτταροκινών από τα κύτταρα που πρωταγωνιστούν σε αυτήν. Δεδομένου του ότι το ασβέστιο έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση, συμπεραίνει κανείς ότι η ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση των κυτταροκινών φαίνεται να είναι ιδιαίτερος σημαντική. Άλλωστε, οι Feske et al.,2001, απέδειξαν ότι μόνο το 25% όλων των ενεργοποιούμενων γονιδίων στα Τ λεμφοκύτταρα δεν εξαρτάται από το ασβέστιο, χρησιμοποιώντας ανάλυση με DNA microarrays.

Αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί ομάδα κινασών, οι οποίες φωσφορυλιώνουν άλλα υποστρώματα. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες στα Τ λεμφοκύτταρα είναι η CaM-κινάση II και η CaM-κινάση IV. Μέσω της καλμοδουλίνης ενεργοποιείται επίσης η φωσφατάση καλσινευρίνη, η οποία είναι το ένζυμο κλειδί για την ενεργοποίηση της IL-2, ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες ,NF-AT, OCT-1,και NF-κB.

Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η παραγωγή της IL-10 σε φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα εξαρτάται άμεσα από το μονοπάτι ασβεστίου/ καλσινευρίνης, καθώς η CsA καταστέλλει πλήρως την παραγωγή της IL-10 (Rafiq et al.,2001), σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες σε ποντικίσια κύτταρα (Weber CB et al, 1999,Tomkins PT et al.,1995,Durez P. Et al.,1993) αλλά και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Cohen SB et al.,1997). Παρόλο αυτά , δεν έχει βρεθεί ως τώρα ποιος μεταγραφικός παράγοντας εμπλέκεται σε αυτή τη ρύθμιση. Η συμμετοχή της IL-10 στην επαγωγή ανεργίας έχει

περιγραφεί σε ποικίλλα ερευνητικά πρωτόκολλα(Akdis et. al., 2000, Groux et al.,1994). Η CaM Kinase II, ένας σημαντικός αποδέκτης της ενδοκυττάριας αύξησης του ασβεστίου έχει εμπλακεί στην επαγωγή ανεργίας και στην αρνητική ρύθμιση της παραγωγής κυτταροκινών(Hama et al.,1995, Lin et al.,2005).Ο ρόλος της CaM Kinase II στην παραγωγή της IL-10 δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί σε φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα.

5.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

5.1.1 Παραγωγή κυτταροκινών από τα εν ηρεμία Τ λεμφοκύτταρα

Έχει αποδειχτεί ότι τα εν ηρεμία Τ λεμφοκύτταρα δεν παράγουν κυτταροκίνες. Η παραγωγή των κυτταροκινών επάγεται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων και εξαρτάται ποιοτικά και ποσοτικά από το σήμα ενεργοποίησης τους. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρήθηκε παραγωγή πρωτεϊνικού προϊόντος των υπό έλεγχο κυτταροκινών, IL-10, IL-2 και IL-4, από τα εν ηρεμία φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα.

5.1.2.Παραγωγή IL-10 από διεγερμένα Τ λεμφοκύτταρα

Ο έλεγχος της παραγωγής κυτταροκινών από Τ λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα ‘καθαρό’ και από το οποίο απουσίαζαν τα μονοκύτταρα, μετά από ειδική πειραματική μέθοδο. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκαν τα ενδοκυττάρια συμβάντα σε κεκαθαρμένο πληθυσμό κυττάρων.

Οι δύο τρόποι διέγερσης που χρησιμοποιήθηκαν για την in vitro ενεργοποίηση των φυσιολογικών Τ λεμφοκυττάρων (Ion/PMA, CD3/CD28,) χρησιμοποιούνται ως οι πλέον αποδεκτοί τρόποι ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων in vitro για την μελέτη παραγωγής κυτταροκινών καθώς και για την αποσαφήνιση των μονοπατιών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της παραγωγής τους. Η διέγερση με τη χρήση Ιονομυκίνης και PMA οδηγεί σε μη ειδική ενεργοποίηση μέσω αύξησης της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης του ασβεστίου και της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) αντίστοιχα (Barritt, 1992; Abbas & Lichtman, 2001).

Έτσι, η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων στην συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιείται, παρακάμπτοντας τον T κυτταρικό υποδοχέα και τα συνδιεγερτικά μόρια (Gaffen *et al.*, 2004), μέσω απευθείας ενεργοποίησης ενδοκυττάρων στόχων. Αντιθέτως η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του μορίου CD3 του T κυτταρικού υποδοχέα και του συνδιεγερτικού μορίου CD28 οδηγεί σε ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα τους (Geppert *et al.*, 1986; Manger *et al.*, 1987).

Η διέγερση και με τους δύο τρόπους είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής του πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 σε σύγκριση με τα επίπεδα της στα εν ηρεμία T λεμφοκύτταρα, σε συμφωνία με προηγούμενα δημοσιευμένες μελέτες. Η μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής της IL-10 παρατηρήθηκε μετά από διέγερση των T λεμφοκυττάρων με τη συνδυαστική χρήση Ιονομυκίνης και PMA, ενώ ακολουθεί η διέγερση με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του μορίου CD3 του T κυτταρικού υποδοχέα και του συνδιεγερτικού μορίου CD28.

Το γεγονός ότι η μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής του πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 παρατηρείται στα ενεργοποιημένα με Ion/PMA T λεμφοκύτταρα, μπορεί να οφείλεται στην ενίσχυση της παραγωγής της από την ενεργοποίηση και την επακόλουθη συμμετοχή/αλληλεπίδραση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία δεν ενεργοποιούνται μέσω TCR/CD28. Είναι κοινώς αποδεκτό ωστόσο, ότι η διέγερση με μονοκλωνικά αντισώματα αποτελεί τον πλησιέστερο στον φυσιολογικό τρόπο ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων, οπότε διεγείρουμε με αυτό τον τρόπο τα επίπεδα IL-10 αντανakλούν τα φυσιολογικά παραγόμενα.

Στα εν ηρεμία κύτταρα η παραγωγή της IL-10 είναι ιδιαιτέρως χαμηλή αλλά όχι μηδενική. Ίσως τα εν λόγω χαμηλά επίπεδα της IL-10 στα εν ηρεμία κύτταρα να διατηρούν το background τόνο του ανοσοποιητικού συστήματος και έτσι να ρυθμίζουν την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Μετά από το κατάλληλο σήμα ενεργοποίησης η παραγωγή της IL-10 ίσως ρυθμίζεται άμεσα, στις θέσεις της φλεγμονής, για να καταστείλει ή να επάγει τους μηχανισμούς των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και να επαναφέρει την ομοιόσταση.

5.2 ΑΣΒΕΣΤΙΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

5.2.1 Ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της παραγωγής πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 από φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου του οποίου κατέχουν τα Τ λεμφοκύτταρα σε μια ανοσολογική απόκριση, καθώς και του ότι οι περισσότερες δράσεις τους διαμεσολαβούνται από κυτταροκίνες, θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί ο ρόλος του μονοπατιού του ασβεστίου στη ρύθμιση της IL-10, η οποία κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσιακή απόκριση.

Αυτό έγινε μελετώντας την επίδραση στην παραγωγή της IL-10 δύο ενζύμων που εμπλέκονται άμεσα στο μονοπάτι ενεργοποίησης του ασβεστίου, την καλσινευρίνη και την CaM Kinase II. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος της καλσινευρίνης μέσω του γνωστού αναστολέως CsA και ο ρόλος της CaM Kinase II μέσω του φαρμακευτικού αναστολέως της KN-62, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η χρήση και των δύο αναστολέων είχε σαν αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της παραγωγής του πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 από διηγεμένα, και με τους δύο διαφορετικούς τρόπους ενεργοποίησης, Τ λεμφοκύτταρα. Η παρατηρηθείσα μείωση της IL-10 στο υπό μελέτη σύστημα της παρούσας μελέτης, δεν οφείλεται σε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς η βιωσιμότητα τους ελεγχόταν μικροσκοπικά καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν καθαρά τη σημασία της ασβέστιο-εξαρτώμενης οδού ενεργοποίησης στην παραγωγή της IL-10, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερες έρευνες (Rafiq et al.,2001). Το σημαντικό εύρημα όμως είναι ότι διαφαίνεται και ένας σημαντικός ρόλος της CaM Kinase II στην παραγωγή της IL-10 που δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία.

Μια άλλη προσέγγιση για την ταυτοποίηση του ρόλου των δύο ενζύμων στην παραγωγή της IL-10 έγινε διαμολύνοντας τα φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα με πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μεταλλαγμένες συνεχώς δραστικές μορφές των ενζύμων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών επιβεβαίωσαν την εμπλοκή της

ασβέστιο-εξαρτώμενης οδού ενεργοποίησης στην παραγωγή της IL-10. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της καλσινευρίνης σε φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα αύξησε την παραγωγή της IL-10 κατά τέσσερις φορές, ενώ και η υπερέκφραση της CaM Kinase II οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή IL-10 κατά τρεις φορές σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα, διεγερμένα με συνδυασμό Ιονομυκίνης και φορβολικού εστέρα υποδηλώνοντας την εξίσου σημαντική συμμετοχή και των δύο ενζύμων στην παραγωγή της IL-10. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παλαιότερες έρευνες σε ποντικίσια κύτταρα δείχνουν ότι η παραγωγή της IL-10 επηρεάζεται διαφορετικά από το ασβεστιο-εξαρτώμενο μονοπάτι ανάλογα με τον διεγέρτη και μάλιστα όταν τα κύτταρα διεγείρονται μέσω του CD3 η παραγωγή της IL-10 μειώνεται δραματικά από την κυκλοσπορίνη, ενώ όταν διεγείρονται με LPS τότε η κυκλοσπορίνη έχει αντίθετη επίδραση στην παραγωγή της IL-10 (Durez et al.,1993).Επίσης, σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει κυρίως σε μονοκύτταρα, άλλες οδοί ενεργοποίησης, όπως αυτή που διαμεσολαβείται από την αύξηση του κυκλικού cAMP αυξάνει την παραγωγή της IL-10 (Platzter *et al.*, 1999; Platzter *et al.*, 1995), ενώ πρόσφατη μελέτη της επίδρασης της αύξησης του κυκλικού cAMP στην επίδραση της παραγωγής της IL-10, που έγινε στο εργαστήριό μας (Liorpet et al.,2008), δείχνει ότι η αύξηση του κυκλικού cAMP μειώνει την παραγωγή της IL-10.

5.2.2 Η ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 από φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα δεν είναι IL-2-εξαρτώμενη

Ένα από τα πρώτα αποτελέσματα της ενεργοποίησης του T λεμφοκυττάρου είναι η επαγωγή της παραγωγής της IL-2 και η αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της στην επιφάνεια του. Με τον τρόπο αυτό η IL-2 αυτοκρινώς συμβάλλει στην ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου, στην πρόοδο του στον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση του. Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την παραγωγή της IL-2 καθώς και την έκφραση του υποδοχέα υψηλής συγγένειας της τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα ποντικίσια T λεμφοκύτταρα.

Συνεπώς η παρατηρηθείσα μείωση της παραγωγής της IL-10 θα μπορούσε να είναι δευτερογενής της αναστολής της IL-2, η οποία έχει αποδειχτεί να αναστέλλεται στο συγκεκριμένο αλλά και σε άλλα συστήματα. Η IL-2-εξαρτώμενη μείωση της παραγωγής κυτταροκινών έχει αποδειχτεί να λαμβάνει χώρα στην περίπτωση άλλων

κυτταροκινών όπως στην IL-5 (Heijink *et al.*, 2003). Η συμβολή της αναστολής της IL-2 στην αναστολή της IL-10 ελέγχθηκε με την εξωγενή προσθήκη IL-2 στα T λεμφοκύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με διαφορετικούς τρόπους. Στο υπό μελέτη σύστημα δεν παρατηρήθηκε άρση της αναστολής της IL-10, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αναστολή της παραγωγής της IL-10 δεν είναι IL-2-εξαρτώμενη, σε συμφωνία με παλιότερη μελέτη σε ανθρώπινες T κυτταρικές σειρές (Shara *et al.* 1997). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει ότι η δράση της ασβεστιοξαρτώμενης οδού ενεργοποίησης στην παραγωγή της IL-10 διεξάγεται στο πρώιμο στάδιο ενεργοποίησης του T-λεμφοκυττάρου και προηγείται της έκφρασης άλλων γονιδίων.

5.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ IL-10 ΑΠΟ ΤΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

5.3.1 Ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση του υποκινητή της IL-10 σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα

Για τον έλεγχο της μεταγραφικής ρύθμισης της IL-10 από το ασβέστιο θεωρήθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί αρχικά η ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της IL-10. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο, το οποίο κωδικοποιεί το γονίδιο της firefly Luciferase υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 10 (1327 βάσεις) [Z30175], σύμφωνα με την προηγούμενα δημοσιευμένη μελέτη των Platzer *et al.* (Platzer *et al.*, 1995).

Σε προηγούμενη μελέτη είχε προταθεί ότι η ενεργότητα του υποκινητή της IL-10 δεν αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων με Ion/PMA (Wang *et al.*, 2005). Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της IL-10 μετά από διέγερση των κυττάρων με Ion/PMA, η οποία αυξήθηκε σημαντικά μετά από υπερέκφραση της καλσινευρίνης και της CaM kinase II, υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο. Τα ίδια αποτελέσματα είχαμε και όταν διεγείραμε τα T λεμφοκύτταρα μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα και του συνδιεγερτικού μορίου γεγονός που δείχνει ότι η επίδραση και των δύο ενζύμων (καλσινευρίνη και CaM Kinase II) είναι σημαντική

και αφορά τόσο τον τρόπο διέγερσης που μιμείται τον υποδοχέα αντιγόνου (ION/PMA) όσο και αυτόν που στοχεύει σε ενδοκυττάρια διέγερση των σηματοδοτικών οδών που ελέγχουν η αύξηση του ασβεστίου και η πρωτεϊνική κνάση C (PKC). Αντιθέτως, η υπερέκφραση των δύο ενζύμων σε T λεμφοκύτταρα δεν είχε καμμία επίδραση στον υποκινητή του SV40, πράγμα που σημαίνει ότι η δράση των δύο ενζύμων είναι ειδική για τον υποκινητή της IL-10.

Ο λόγος της διαφοράς ανάμεσα στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και εκείνης των Wang et al. ίσως οφείλεται στη διαφορά της φύσης των κυττάρων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν. Η παρούσα μελέτη βασίστηκε σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φρέσκα T λεμφοκύτταρα, ενώ η ομάδα Wang et al χρησιμοποίησε κυτταρικές σειρές ποντικού για τη συλλογή των αποτελεσμάτων. Είναι γνωστό ότι τα μονοπάτια μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα σε ποντικίσια και ανθρώπινα μοντέλα.

5.3.2 Επίδραση της CaM Kinase II στην ενεργότητα των υποκινητών της IL-2 και της IL-4

Στην προσπάθεια να απαντηθεί το ερώτημα εάν η ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της IL-10, η οποία είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως κυτταροκίνη της οικογένειας των T_H2 παραγόμενων κυτταροκινών, είναι γενικότερη ιδιότητα και χαρακτηρίζει και τις άλλες T_H2 κυτταροκίνες ελέγχθηκε η συμβολή του μονοπατιού στη ρύθμιση της παραγωγής μιας αντιπροσωπευτικής για κάθε οικογένεια κυτταροκίνης. Έτσι, ελέγχθηκε η ρύθμιση της παραγωγής της IL-2, μιας αντιπροσωπευτικής T_H1 κυτταροκίνης και της IL-4, μιας χαρακτηριστικής T_H2 κυτταροκίνης σε T λεμφοκύτταρα. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η καλσινευρίνη ενεργοποιεί την ενεργότητα του υποκινητή της IL-2 και της IL-4 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ενώ η CaM Kinase II έχει την αντίθετη επίδραση και στους δύο υποκινητές, μειώνοντας σημαντικά την ενεργότητά τους (Paliogianni et al., 1996, Hama et al., 1996).

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε ο ρόλος και των δύο ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II στην ενεργότητα των υποκινητών της IL-2 και της IL-4 σε T-λεμφοκύτταρα με τον ίδιο τρόπο που ελέγχθηκε και η επίδραση των δύο προαναφερθέντων ενζύμων στον υποκινητή της IL-10. Στην περίπτωση της IL-2 χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο το οποίο κωδικοποιεί το γονίδιο της firefly Luciferase υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 2, ενώ για τον έλεγχο

της δραστηριότητας του υποκινητή της IL-4 χρησιμοποιήσαμε πλασμίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χλωροαμφενικόλης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της IL-4 (Paliogianni et al.,1995).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η υπερέκφραση της καλσινευρίνης αυξάνει σημαντικά την ενεργότητα και των δύο υποκινητών των κυτταροκινών, IL-2 και IL-4 σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα διηγεργμένα είτε μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα και του συνδιεγερτικού μορίου, είτε παρακάμπτοντας τον TCR (συνδυασμός ION/PMA). Αντιθέτως, η CaM Kinase II μείωσε την ενεργότητα των δύο υποκινητών. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες σε T-λεμφοκυτταρική σειρά Jurkat (Paliogianni et al.,1996, Hama et al., 1996) και αποδεικνύουν ότι η CaM Kinase II αυξάνει εκλεκτικά την ενεργότητα του υποκινητή της IL-10, ενώ η καλσινευρίνη φαίνεται να επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο την παραγωγή διαφορετικών κυτταροκινών από τα T λεμφοκύτταρα. Η εκλεκτική ρύθμιση της IL-10 από την CaM Kinase II είναι ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα διότι υποδεικνύει συγκεκριμένο στόχο στο μονοπάτι παραγωγής μιας ρυθμιστικής κυτταροκίνης, ανεξάρτητο από άλλα ένζυμα στο ίδιο μονοπάτι ενεργοποίησης που ελέγχουν την παραγωγή άλλων κυτταροκινών –τροφικών παραγόντων όπως η IL-2.

5.3.3 Ασβέστιο -εξαρτώμενη ρύθμιση του σταθερού mRNA της IL-10 από φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα

Μια από τις πιθανές αιτίες της προαναφερθείσας μείωσης της παραγωγής του πρωτεϊνικού προϊόντος της IL-10 σε T-λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA ή με CD3/CD28 παρουσία των δυο ειδικών αναστολέων της καλσινευρίνης και της CaM Kinase II, CsA και KN-62 αντίστοιχα, είναι η μείωση των ποσοτήτων του mRNA της συγκεκριμένης κυτταροκίνης. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την αποσαφήνιση αυτού του ζητήματος με την Real Time PCR τεχνολογία, έδειξαν πως το σταθερό ποσό mRNA της IL-10 μειώνεται παρουσία των δύο αυτών αναστολέων και μάλιστα σημαντικά, αλλά μόνο στα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν παρακάμπτοντας τον T κυτταρικό υποδοχέα. Αντιθέτως, οι δύο αυτοί ειδικοί αναστολείς, κυκλοσπορίνη και KN-62 δεν είχαν καμμία επίδραση όταν διεγείραμε τα κύτταρα μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα και του συνδιεγερτικού μορίου.

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι το επίπεδο ρύθμισης της παραγωγής IL-10 από τις καλσινευρίνη και CaM-Kinase II εξαρτάται από τον τρόπο διέγερσης των κυττάρων. Ειδικότερα όταν τα κύτταρα διεγείρονται μέσω TCR και του

συνδιεγερτικού μορίου CD28 η αναστολή των παραπάνω ενζύμων δεν επηρεάζει την συσσώρευση του mRNA της IL-10 υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση γίνεται σε μεταγενέστερα της μεταγραφής στάδια, επηρεάζοντας πιθανά τη σταθερότητα του mRNA ή το ρυθμό μετάφρασής του. Αντίθετα τόσο η Καλσινευρίνη όσο και η CaM Kinase II εμπλέκονται τόσο στη μεταγραφική όσο και στη μετα/μεταγραφική ρύθμιση της IL-10 όταν η διέγερση γίνεται μέσω παράκαμψης του T κυτταρικού υποδοχέα που φυσιολογικά εμπλέκει και σήματα από υποδοχείς κυτταροκινών. Η μετα/μεταγραφική ρύθμιση της IL-10 και από τα δύο ένζυμα άμεσα μετά τον αντιγονικό ερεθισμό μέσω TCR, εξυπηρετεί στην άμεση ρύθμιση των ποσοτήτων της IL-10 στην εστία της αντιγονικής διέγερσης γεγονός που εξασφαλίζει το επίπεδο/έκταση της απάντησης.

Άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι ένας σημαντικός αριθμός κυτταροκινών, όπως η IL-2, η IL-6 και η IL-3, ελέγχονται στο επίπεδο της σταθερότητας του mRNA τους (Gaffen *et al.*, 2004) ενώ σύμφωνα με μια μελέτη των Powell *et al.* που πραγματοποιήθηκε στην EL-4 κυτταρική σειρά, υπάρχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο 3'-UTR άκρο του IL-10 mRNA, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν τη σταθερότητα του (mRNA-destabilizing motifs) και έτσι να επηρεάζουν την παραγωγή της IL-10 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Powell *et al.*, 2000). Τα ευρήματά μας για πρώτη φορά περιγράφουν τη μετα/μεταγραφική ρύθμιση της IL-10 σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης μέσω της 3-UTR περιοχής παραμένει προς διερεύνηση.

5.3.4 Ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση τμημάτων του υποκινητή της IL-10 από φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα

Δεδομένου ότι η ενεργότητα του υποκινητή της IL-10 αυξάνεται παρουσία των δύο ενζύμων Καλσινευρίνη και CaM Kinase II μετά από ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και με τους δύο τρόπους, θεωρήθηκε απαραίτητο να εντοπισθεί το τμήμα του υποκινητή εκείνο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αύξηση αυτή και έτσι να είναι δυνατός ο εντοπισμός μεταγραφικών παραγόντων-πιθανών στόχων του μονοπατιού του ασβεστίου που ίσως να διαμεσολαβούν τη μεταγραφική ρύθμιση της IL-10. Λόγω του ότι είναι ήδη γνωστός ο κύριος στόχος της καλσινευρίνης εστίασαμε περισσότερο στην επίδραση της CaM kinase II στους μεταγραφικούς παράγοντες που πιθανά εμπλέκονται στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10.

Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν ειδικές κατασκευές (5' deletion mutants του υποκινητή), τα οποία περιείχαν συγκεκριμένα τμήματα του υποκινητή του γονιδίου της IL-10 (τις πρώτες 135, 235, 310, 500 ή 1010 bp πριν το TATA box) και τα οποία ελέγχουν τη Luciferase firefly, μια μέθοδος που συναντάται αρκετά συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προέκυψε ότι το τμήμα του υποκινητή του γονιδίου της IL-10 που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση στην ενεργότητα του παρουσία της CaM Kinase II εντοπίζεται στις 500 πρώτες βάσεις του. Η αύξηση αυτή σχεδόν ταυτίζεται με το αντίστοιχο που παρατηρήθηκε με χρήση ολοκλήρου του υποκινητή της IL-10 συνεπώς η ενισχυτική δράση της CaM Kinase II στην παραγωγή της IL-10 ίσως να οφείλεται εξ ολοκλήρου στο συγκεκριμένο τμήμα και σε μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αυτό.

Άλλωστε παρατηρήθηκε ότι και η αναστολή της ενεργότητας του υποκινητή της IL-10 σε T-λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA με τη χρήση του ειδικού αναστολέα της CaM Kinase II, KN-62 είναι σημαντική στις πρώτες 500bp του υποκινητή της IL-10, γεγονός που συμφωνεί με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι στα μονοκύτταρα όπου η αύξηση του cAMP- έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της IL-10, ευθύνονται συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων CREB και ATF-1, παρούσες στον υποκινητή του γονιδίου της IL-10 κοντά στο TATA box (Platzer *et al.*, 1999). Συνεπώς, φαίνεται ότι οι πρώτες 500 βάσεις του υποκινητή της IL-10 παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής της, ανεξάρτητα από το είδος κυττάρων.

Στο τμήμα των 500 βάσεων, όπου εντοπίστηκε η αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της IL-10 υπό την επίδραση της CaM Kinase II, με τη χρήση του προγράμματος CONSITE, εντοπίστηκαν δυο μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν συνδεθεί σε προηγούμενες μελέτες με την μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων κυτταροκινών και για αυτό και επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση της συμβολής τους στην ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της IL-10. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ο MEF2 και ο CREB.

5.4 Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ MEF2 ΚΑΙ CREB ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ IL-10 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

5.4.1 *In vivo* μελέτη του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στον υποκινητή της IL-10

Ο μεταγραφικός παράγοντας MEF2 παίζει σημαντικό ρόλο σε γονιδιακά προγράμματα που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, τη μορφογένεση, την επιβίωση και την απόπτωση σε μια μεγάλη λίστα κυτταρικών τύπων. Εκ των 4 ισομερών του στα σπονδυλωτά, ο MEF2D είναι εκείνος που εκφράζεται κυρίως στα Τ λεμφοκύτταρα (Brand, 1997; Liu, 2005). Τα μέλη της οικογένειας των MEF2 μεταγραφικών παραγόντων επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων/στόχων τους μετά από πρόσδεση τους ως ομο- ή ετεροδιμερή σε θέσεις πρόσδεσης τους παρούσες στους υποκινητές των γονιδίων αυτών. Πρόσφατη μελέτη, συνέδεσε τον MEF2 με την ασβέστιο-εξαρτώμενη ρύθμιση της παραγωγής της IL-2 στα Τ λεμφοκύτταρα, μετά από ανίχνευση της θέσης πρόσδεσης του κοντά στο πλαίσιο TATA του υποκινητή του γονιδίου της (Pan *et al.*, 2004) ενώ consensus MEF2 θέσεις πρόσδεσης έχουν ανιχνευτεί στους υποκινητές γονιδίων κυτταροκινών όπως των IL4, IL-9, IL-13 και IFN-γ (Esau *et al.*, 2001). Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη που συνδέει τον μεταγραφικό παράγοντα MEF2 με τη ρύθμιση της IL-10 στα Τ λεμφοκύτταρα.

Εν αντιθέσει με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα στα μη ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, π.χ. NFAT, και μετακινούνται στον πυρήνα μόνο μετά από την ενεργοποίησή τους, ο μεταγραφικός παράγοντας MEF2 εντοπίζεται στον πυρήνα συνέχεια συνδεδεμένος στο σημείο πρόσδεσης του σε υποκινητές γονιδίων στόχων του, ακόμα και σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα (McKinsey *et al.*, 2002). Η ενεργότητα του ωστόσο είναι αποσιωπημένη εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του με διαφόρους συναναστολείς της δράσης του, όπως οι τάξης II ιστονο-διασετυλάσες (Class II Histone Deacetylases-HDACs) και η Cabin1, οι οποίες απομακρύνονται από τον MEF2, απελευθερώνοντας τον και επιτρέποντας την ενεργοποίησή του μόνο μετά από κατάλληλα σήματα (Lu *et al.*, 2000).

Ο έλεγχος της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στην παραγωγή της IL-10 έγινε αρχικά μέσω υπερέκφρασης του σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα. Η υπερέκφραση του MEF2 αλλάζει την αναλογία του MEF2 με τους ενδογενείς αναστολείς του και έτσι αυξάνεται η μεταγραφική δραστηριότητά του, όπως έχει αναφερθεί (Youn et al.,2000, Pan et al.,2003). Στην παρούσα μελέτη η υπερέκφραση του MEF2D είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της IL-10 ως και τρεις φορές σε T λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στην ρύθμιση της παραγωγής της IL-10.

5.4.2 Επίδραση της CaM Kinase II στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2

Ο έλεγχος της ρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 έχει μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια και φαίνεται ότι εμπλέκονται πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι MAP Κινάσες αυξάνουν την μεταγραφική δραστηριότητα του MEF2 μέσω φωσφορυλίωσης του στην περιοχή ενεργοποίησης του (Han et al. 1997,Kato et al.,1997) με αποτέλεσμα την επαγόμενη αύξηση της έκφρασης κυτταροκινών (Esau *et al.*, 2001; McKinsey *et al.*, 2002; Savignac *et al.*, 2007) . Η καλσινευρίνη επίσης ενεργοποιεί τον MEF2 με έναν μετα-μεταφραστικό μηχανισμό που φαίνεται να απαιτεί την αλληλεπίδραση του με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-AT (Youn et al. 2000, McKinsey et al.,2000), ενώ το ασβέστιο-εξαρτώμενο μονοπάτι μέσω των CAM Κινάσων (CaM Kinases II και IV) φωσφορυλιώνει τις ιστονο-διακετυλάσες, απελευθερώνοντας τον MEF2 και επιτρέποντας την αλληλεπίδραση του με ενεργοποιητές του όπως το p300 (Brand, 1997; Liu, 2005; McKinsey *et al.*, 2002; Savignac *et al.*, 2007,Zhang et al.,2007).

Στην παρούσα μελέτη, η CaM Kinase II αυξάνει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα *in vivo* σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA, ενώ η ενεργότητα του MEF2 μειώθηκε σημαντικά όταν χρησιμοποιήσαμε τον ειδικό αναστολέα της CaM Kinase II, KN-62. Επίσης η δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στο DNA παρουσία των δύο ειδικών αναστολέων της καλσινευρίνης αλλά και της CaM Kinase II μείωσε την δέσμευση αυτή κατά 50% περίπου.

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι στο σύστημα μας η CaM kinase II εμπλέκεται άμεσα στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2. Ο MEF2 αποτελεί

έναν μεταγραφικό παράγοντα, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την συμμετοχή του σε σημαντικές λειτουργίες διαφόρων κυτταρικών τύπων, τα μονοπάτια που τον ενεργοποιούν, τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, την ρυθμιστική του δράση ως προς τα γονίδια/στόχους του αλλά και ως προς τις αυτό-ρυθμιστικές του ιδιότητες. Αν και στο παρόν πειραματικό μοντέλο είναι δύσκολο να ερευνήσουμε τη πιθανή συνεργασία του MEF2 με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ο ακριβής μηχανισμός της συμβολής του στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 αξίζει περαιτέρω διερεύνηση και αποσαφήνιση, καθώς θα μπορούσε να αποτελέσει και μελλοντικό φαρμακευτικό στόχο, μιας και τα ευρήματά μας αφορούν φυσιολογικά T- λεμφοκύτταρα και όχι κυτταρικές σειρές, που πολλές φορές μπορεί να διαφέρουν σημαντικά.

5.4.3 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα CREB

Ο μεταγραφικός παράγοντας CREB αποτελεί κυρίως τον διαμεσολαβητή της cAMP-εξαρτώμενης ρύθμισης γονιδίων/στόχων, μετά την φωσφορυλίωση του από την PKA στη θέση Ser¹³³. Η φωσφορυλίωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την επαγόμενη επιστράτευση των συνενεργοποιητών του CREB, CBP και p300, τη δημιουργία του συμπλόκου CREB/CBP/p300 και την επακόλουθη αλληλεπίδραση του συμπλόκου με την CRE αλληλουχία (Fimia *et al.*, 2001; Mayr *et al.*, 2001; Sands *et al.*, 2008; Sassone-Corsi, 1998; Torgersen *et al.*, 2002). Υπάρχουν όμως και μελέτες που δείχνουν ότι η επαγόμενη της ενεργοποίησης μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα φωσφορυλίωση του CREB στη θέση Ser¹³³ είναι αποτέλεσμα της δράσης της CaMK IV και της MAP κινάσης p38 (Yu *et al.*, 2001). Επιπρόσθετα, ενώ η CaM Kinase II έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει τον CREB *in vitro*, δεν μπορεί να τον ενεργοποιήσει μεταγραφικά. (Sun *et al.*, 1994, Matthews *et al.*, 1994, Bito *et al.*, 1996).

Στην παρούσα μελέτη, η υπερέκφραση της CaM Kinase II μειώνει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα CREB σε πειράματα διαμόλυνσης με πλασμίδιο που περιέχει αποκλειστικά θέσεις δέσμευσης για τον CREB, που έγιναν σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα διεγερμένα με ION/PMA, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι η φωσφορυλίωση του CREB από την CaM Kinase II έχει ανασταλτική επίδραση στην ενεργότητα του. μεταγραφικού παράγοντα CREB

Έτσι, ενώ στα μονοκύτταρα η αύξηση της ενδοκυττάριας cAMP οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα CREB και στην επακόλουθη αύξηση της παραγωγής της IL-10 (Platzner *et al.*, 1999), ο μηχανισμός ρύθμισης της IL-10 παραγωγής στα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα, δεν φαίνεται να διαμεσολαβείται από τον CREB, μια ακόμα εκλεκτική ρύθμιση της IL-10 στα T λεμφοκύτταρα.

5.4.4 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB έχει μελετηθεί εκτενώς στα T λεμφοκύτταρα αλλά και σε άλλα κύτταρα του συστήματος ανοσίας μιας και είναι σημαντικός για την ωρίμανση, επιβίωση και λειτουργία των T λεμφοκυττάρων (Weil *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2004). Επίσης, είναι γνωστό ότι η οδός μεταγωγής σήματος του ασβεστίου εμπλέκεται στην ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, και ότι η καλσινευρίνη είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του (Mattila *et al.*, 1990, Steffan *et al.*, 1995, Frantz *et al.*, 1994, Kanno *et al.*, 1996). Οι Hughes *et al.* (2001) απέδειξαν ότι η CaMKII είναι το ένζυμο που διαμεσολαβεί την φωσφορυλίωση του IκB, σε T λεμφοκύτταρα, ενώ οι Ishiguro *et al.* (2006), έδειξαν ότι η CaMKII ενισχύει την ενεργοποίηση του NF-κB, διαμέσου της CARMA1. Στην παρούσα μελέτη, η υπερέκφραση της CaM Kinase II μειώνει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε πειράματα διαμόλυνσης με πλασμίδιο που περιέχει αποκλειστικά θέσεις δέσμευσης για τον NF-κB που έγιναν σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα διεγερμένα είτε με ION είτε με PMA ενώ η καλσινευρίνη αυξάνει την ενεργότητα του.

Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες όσον αφορά τη επίδραση της καλσινευρίνης στην ενεργότητα του NF-κB, αλλά διαφωνούν στην επίδραση της CaM Kinase II. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι στο δικό μας σύστημα χρησιμοποιήσαμε φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα, ενώ οι προηγούμενες μελέτες έχουν γίνει σε κυτταρικές, σειρές που πολλές φορές διαφέρουν στα μονοπάτια ενεργοποίησης.

6 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ασβεστίο αποτελεί ένα σημαντικό δεύτερο μήνυμα που ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου αυξάνει την παραγωγή της IL-10 στα T-λεμφοκύτταρα, αλλά δεν είναι σαφές ποιά ενδοκυττάρια μόρια εμπλέκονται σε αυτή τη ρύθμιση. Σκοπός της μελέτης είναι η αποσαφήνιση της συμμετοχής του ασβεστίου στην παραγωγή της IL-10 από T-λεμφοκύτταρα και η εντόπιση των πιθανών ενδοκυττάρων στόχων.

Ο ρόλος των ενζύμων κλειδιών στην οδό ενεργοποίησης μέσω ασβεστίου καλσινευρίνης και CaM Kinase II μελετήθηκε με χρήση είτε ειδικών αναστολέων, κυκλοσπορίνης και KN-62 αντίστοιχα, είτε με πλασμίδια που κωδικοποιούν τις καταλυτικές υπομονάδες των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II.

Ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος διεγέρθηκαν με anti-CD3/anti-CD28 (διέγερση μέσω TCR), ή Ionomycin/PMA (ενδοκυττάρια στόχευση Ca^{++} και PKC) παρουσία ή απουσία των ειδικών αναστολέων. Το πρωτεϊνικό προϊόν της IL-10 μετρήθηκε με ELISA ενώ η παραγωγή mRNA της IL-10 με Real Time PCR. Η ενεργότητα του υποκινητή της IL-10, IL-2, IL-4 παρουσία ή απουσία των ενεργών ενζύμων ελέγχθηκε με διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδια που φέρουν τον υποκινητή του γονιδίου (1327 bp) ή τμήματα αυτού (-1010, -500, -310, -235, -135 bp).

Η δράση των ίδιων ενζύμων στην ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων MEF2, CREB και NF- κ B ελέγχθηκε με ταυτόχρονη έκφρασή τους *in vivo* με πειράματα διαμόλυνσεως με πλασμίδια που ελέγχουν την ενεργότητα της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο τους και *in vitro* σε πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με πειράματα EMSA. Η επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 στον υποκινητή της IL-10 έγινε μέσω υπερέκφρασης του *in vivo* σε πειράματα διαμόλυνσης.

Η IL-10 ανιχνεύεται 24 ώρες μετά τη διέγερση των κυττάρων, φτάνει στο μέγιστο στις 48 ώρες και μειώνεται μετά τις 72 ώρες. Παρουσία κυκλοσπορίνης η παραγωγή της IL-10 μειώθηκε κατά 80%-100%, ενώ παρουσία KN-62 η παραγωγή της IL-10 μειώθηκε κατά 70%-90%, σε όλα τα χρονικά διαστήματα στα οποία μελετήθηκε. Τα ποσοστά αναστολής ήταν ίδια και κατά τους δύο τρόπους διέγερσης. Όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν μέσω TCR και του συνδιεγερτικού μορίου CD28, η αναστολή των παραπάνω ενζύμων δεν επηρεάζει την συσσώρευση του mRNA της

IL-10, υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση γίνεται σε μεταγενέστερα της μεταγραφής στάδια, επηρεάζοντας πιθανά τη σταθερότητα του mRNA ή το ρυθμό μετάφρασής του. Όταν ο τρόπος διέγερσης των κυττάρων παρέκαμπε τον TCR τότε η ελάττωση της παραγωγής της IL-10 αντανakλούσε και σε επίπεδο mRNA.

Η ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-10 που παρατηρείται μετά από διέγερση με ION/PMA και CD3/CD28 αυξήθηκε κατά 5 και 3 φορές αντίστοιχα σε T λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τις ενεργές μορφές των ενζύμων καλσινευρίνη και CaM Kinase II σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί μόνο με το όχημα pSRa. Η δράση της CaM Kinase II είναι εκλεκτική για τον υποκινητή της IL-10 εφόσον το ίδιο ένζυμο μειώνει την δραστικότητα του υποκινητή τόσο μιας άλλης Th2 κυτταροκίνης όπως η IL-4 όπως επίσης και της IL-2, ενώ η καλσινευρίνη έχει θετική επίδραση στους υποκινητές και των τριών κυτταροκινών.

Το τμήμα του υποκινητή της IL-10 που επηρεάζεται από τα προαναφερθέντα ένζυμα καλσινευρίνη και CaM Kinase II βρίσκεται στις πρώτες 500 bp πριν το TATA box, και περιέχει σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων MEF-2, CREB και NFκB όπως ελέγχθηκε με το πρόγραμμα Consite. Η in vitro δραστικότητα του MEF-2 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων μειώθηκε κατά 50% παρουσία των αναστολέων της καλσινευρίνης και της CaM Kinase II ενώ η ενεργότητα του αυξήθηκε μετά από υπερέκφραση της CaM Kinase II. Αντίθετα η ενεργότητα τόσο του μεταγραφικού παράγοντα CREB όσο και του NFκB μειώθηκε παρουσία της CaM Kinase II, γεγονός που υποδεικνύει τον MEF2 ως ενδοκυττάριο στόχο της ασβεστιοεξαρτώμενης οδού ενεργοποίησης στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 από ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα. Το γεγονός ότι η υπερέκφραση του MEF2D σε T-λεμφοκύτταρα αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή της IL-10 αποδεικνύει ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση της παραγωγής της.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: ανοσοαπόκριση, ασβέστιο, καλσινευρίνη, CaM Kinase II, IL-10, φυσιολογικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα, μεταγραφή, μετα-μεταγραφή, mRNA, υποκινητής γονιδίου IL-10, μεταγραφικοί παράγοντες, MEF2, CREB, NF-kB.

7 ABSTRACT

Calcium is a second messenger playing a crucial role in the signal transduction which controls the immune response, while IL-10 is considered to be an important regulator of this response. Elevation of intracellular concentration of calcium has been shown to increase IL-10 production. The aim of this study was the elucidation of the role of calcium in IL-10 production by normal T lymphocytes, a mechanism that remains unclear.

Fresh Human T-lymphocytes derived from PBMC of healthy donors were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 or Ionomycin/PMA, in the presence or absence of the specific inhibitors of calcineurin and CaM Kinase II, CsA and KN-62 respectively while there were used plasmids coding the catalytic subunits of calcineurin and CaM Kinase II. The protein product of IL-10 was measured by ELISA, the production of IL-10 mRNA by Real Time PCR. The activity of IL-10 promoter was measured by luciferase reporter assay, after transfection of cells with plasmids carrying the wild type promoter (1327bp) or promoter fragments (constructs of -1010, -500, -310, -235, -135bp). Similarly, we studied the activity of IL-2 and IL-4 promoter. The presence of binding sites of transcription factors in the first 500bp of the IL-10 promoter, was validated using the web-based program CONSITE. The activity of MEF2 NF- κ B and CREB was investigated independently with transfection experiments using plasmids containing the luciferase reporter under the control of the transcription factors. Binding of the transcription factor MEF2 was investigated in nuclear extracts of stimulated human T cells with EMSA experiments, while its effect on IL-10 promoter was determined through transfection experiments, using a MEF2D plasmid.

IL-10 production reaches its peak at 48 hours and it is diminished after 72 hours. We observed a 80-100% reduction of IL-10 production in the presence of CsA and a 70-90% reduction in the presence of KN-62. The inhibition was the same regardless the way of stimulation. When the cells are stimulated through TCR and costimulatory molecule CD28 the inhibition of calcineurin and CaM Kinase II does not affect mRNA accumulation, suggesting that the mechanism of regulation is post-transcriptional, possibly through changes in mRNA stability or through different translation rate, while when cells are Ion/PMA stimulated the reduction of IL-10 protein is also observed at the mRNA level.

The induction of IL-10 promoter observed after Ion/PMA stimulation and CD3/CD28 is 3 and 5-fold increased in T cells transfected with the active forms of the enzymes calcineurin and CaM Kinase II. The effect of CaM Kinase II is selective only for the IL-10 promoter, as the same enzyme decreases the activity of IL-2 and IL-4 promoter, while Calcineurin has the same effect on all three promoters.

The part of the promoter of IL-10 that shows to be affected by the previously mentioned enzymes is the first 500 bp after the TATA box. This part contains binding sites for the transcription factors MEF-2 and CREB, as validated by the web-based program Consite. The binding of MEF2 to nuclear extracts of stimulated T cells is reduced by 50% in the presence of CsA and KN-62, while his activity is induced in t cells transfected with CaM Kinase II. On the contrary, CREB and NF-kB activities are reduced in the presence of CaM Kinase II, a fact indicating MEF2 as an impotent transcription factor for the regulation of IL-10 production. This is also shovn by the fact that overexpression of MEF2D in T cells increases the activity of IL-10 promoter.

KEYWORDS: immune response, calcium, IL-10, Fresh Human T cells, transcription, post-transcription, IL-10 mRNA, IL-10 promoter, transcription factos, MEF2, CREB, NF-kB.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas AK, & Lichtman AH (2001). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. USA: W.B. Saunders Company.

Alberts B., Jonshon A., lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1994
Molecular Biology of the Cell New York Garland Science

Barritt GJ (1992). *Communication within animal cells*. New York: Oxford University Press Inc.

Goldsby RA, Kindt TJ, & Osborne BA. (2004). *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company.

Gomperts BD, Kramer IM, & Tatham PE. (2002). *Signal Transduction*. USA: Elsevier Academic Press.

Hancock JT (2005). *Cell Signalling*. New York: Oxford University Press.

Hidaka H, Nairn AC, Krebs EG, Cohen P, Yamakawa T, Takaku F, και συν. (1996). *Intracellular Signal Transduction*. USA: Academic Press INC.

Karp G. 1999 Cell and Molecular Biology

Stryer L. 1988 Biochemistry W.H. Freeman and Company

Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; **1** (3):220-8.

Akdis G., Blaser K. IL-10 induced anergy in peripheral T cel and reactivation by microenviromental cytokines;two key steps in specific immunotherapy 1999
FASEB 13 603-609

Anderson K., Kane C. Ca/Calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signalling BioMetals 1998 11 331-343

Anderson K., Means A. Defective signalling in a subpopulation of CD4 T cells in the absence of CaM Kinase IV Mol.Cell.Biol. 2002 23-29

Anderson K., Ribar T., Illario M., Means A. Defective survival and activation of thymocytes in transgenic mice expressing a catalytically inactive form of Ca/Calmodulin-dependent protein inase IV Mol.Endocr. 1997 11(6)

Antonsson A., Hughes K., Edin S., Grundstrom T. Regulation of c-Rel nuclear localization by binding of Ca/calmodulin. *Mol.Cell.Biol.*2003;1418-1427

Aramburu J., Heitman J., Crabtree G. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes *EMBO* 2004 5 (4) 343-348

Bashian GG, Braun CM, Huang SK et al. Differential regulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses by the B-7 homologues, CD80 and CD86. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; **17** (2):235-42.

Belfield JL, Whittaker C, Cader MZ et al. Differential effects of Ca²⁺ and cAMP on transcription mediated by MEF2D and cAMP-response element-binding protein in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2006; **281** (38):27724-32.

Benkhart E., Siedlar M., Wedel M., Werner T., Loems Ziegler-Heitbrock Role of Stat3 in liposaccharide induced IL-10 gene expression *J Immun.* 2000 165 1612-1617

Berridge M., Lipp P., Bootman M. The versatility and universality of calcium signaling *Mol. Cell Biol.* 2000 1

Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14:167-96.

Borel JF. Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immun.* 1976 Oct;31(4):631-641.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Brand NJ. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2). *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29 (12):1467-70.

Bui J., Calbo S., Hayden-Martinez K., Kane L., Gardner P., Hedrick S. A role for CaMKII in T cell memory. *Cell* 2000 100; 457-467
Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 1984; 224 (4655):1312-6.

Cantrell DA, Smith KA. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med* 1983; 158 (6):1895-911.

Carafoli E. Calcium signaling: A tale for all seasons. *PNAS* 2002;99 1115-1122

Chandok MR, Farber DL. Signaling control of memory T cell generation and function. *Semin Immunol* 2004; 16 (5):285-93.

-
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162 (1):156-9.
- Clapham D. Calcium signaling *Cell* 2007 131 1047-1058
- Cohen S., Parry S., Feldmann M., Foxwell B. Autocrine and paracrine regulation of human T cell IL-10 production *J Immunol*. 1997 158 5596-5602
- Corcoran E., Means A. Defining Ca/calmodulin dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *JBC* 2001 276 (5):2975-
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 1999; 24 (7):281-5.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983; 11 (5):1475-89.
- Durez P., Abramowicz D., Gerard C. In vivo induction of IL-10 by anti-CD3 monoclonal antibody or liposaccharide differential modulation by cyclosporine A. *J. Exp. Med.* 1993 177 551
- Esau C, Boes M, Youn HD et al. Deletion of calcineurin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding domain of Cabin1 results in enhanced cytokine gene expression in T cells. *J Exp Med* 2001; 194 (10):1449-59.
- Feske S., Giltner J., Dolmetsch R., Staudt L., Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat. Imm.* 2001 4 2:316-328
- Fimia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* 2001; 114 (Pt 11):1971-2.
- Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 2002a; 16 (6):769-77.
- Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002b; 109 (3):295-9.
- Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 2004; 28 (3):109-23.
- Gallo EM, Cante-Barrett K, Crabtree GR. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol* 2006; 7 (1):25-32.

Geppert TD, Lipsky PE. Accessory cell-T cell interactions involved in anti-CD3-induced T4 and T8 cell proliferation: analysis with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986; 137:3065-73.

Gringhuis S., Lou F. M. De Leij, wayman G., Tokumitsu H., Vellenga E. The Ca/Calmodulin-dependent kinase type IV is involved yn the CD5-mediated signalling pathway in human T lymphocytes *J.Biol.Chem.* 1997 272(50) 31809-31820

Groux H., Bigler M., Vries J., Roncarolo M. I Interleukin-10 Induces a Long-Term Antigen-specific Anergic State in Human CD4 + T Cells 1996 *J.Exp. Med.* 184 19-29

Hama N., Paliogianni F., Fessler J., Boumpas D. Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells *J.Exp.Med.* 1995 181 1217

Han TH, Prywes R. Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter. *Mol Cell Biol* 1995; 15 (6):2907-15.

Heijink IH, Kauffman HF, Postma DS et al. Sensitivity of IL-5 production to the cAMP-dependent pathway in human T cells is reduced by exogenous IL-2 in a phosphoinositide 3-kinase-dependent way. *Eur J Immunol* 2003; 33 (8):2206-15.

Heitbrock L., Lotznerich M., Schaefer A., Werner T., Frankenberger M., Benkhart E. IFN- α induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat 3 *J.Immun.* 2003 171 285-290

Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. The role of the combination of IL-2 and TGF- β or IL-10 in the generation and function of CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 2003; 74 (4):471-8.

Hughes K., Edin S., Antonsson A., Grundstrom T. Calmodulin -dependent protein kinase II mediates T cell receptor/Cd3 and phorbol ester induced activation of I κ B kinase *J.Biol.Chem.* 2001 276(38) 36008-38013

Hughes K.,Antonsson A., Grundstrom T. Calmodulin dependence of Nf- κ B activation. *FEBS letters* 441(1998);132-136

Ishiguro K., Green T., Rapley J., Watclet H., Giallourakis C., Landry A., Cao Z., Lu N., Takafumi A., Goto H., Daly M., Xavier R. Ca/Calmodulin dependent protein kinase II is a modulator of CARMA1-mediated NF- κ B activation *Mol.Cell.Biol.* 2006 26(14) 5497-5508

Jang M., Goo Y., Sohn Y., Kim Y., Lee S., Kang H., Cheong J., Lee J. Ca/Calmodulin –dependent protein kinase IV stimulates NF- κ B via phosphorylation of the p65 subunit *J.Biol.Chem.* 2000; 276(23):20005-20010

Jonsson H, Peng SL. Forkhead transcription factors in immunology. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62 (4):397-409.

Koninck P., Schulman H. Sensitivity of CaM Kinase II to the frequency of Ca oscillations. *Science* 1998 278;227-230

Kube D., Platzer C., Knethe A., Straub H., Bohlen H., hafner M., Tesch H. Isolation of the human interleukine 10 promoter.Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines 1995 *Cytokine* 7 1-17

Lin M., Zl T., Ch'en I., Gascoigne N., Hedrick S. A pivotal role for the multifunctional CaM Kinase II In T cells:from activation to unresponsiveness *J* 2005 174 5583-5592

Liopeta, K., Boubali S., Virgilio L., Thyphronitis G., Mavrothalassitis G., Dimitrakopoulos G., Paliogianni F. cAMP regulates IL-10 production by normal human T lymphocytes at multiple levels: A potential role for MEF2. *Mol. Immunol.* 2008

Liu H., Grundstrom T. Calcium regulation of GM-CSF by CaM Kinase II phosphorylation of Ets1 *Mol.Biol.Cell* 2002 13 4497-4507

Liu JO. The yins of T cell activation. *Sci STKE* 2005; 2005 (265):re1.

Lu J, McKinsey TA, Nicol RL et al. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (8):4070-5.

Malbon CC. G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6 (9):689-701.

Malbon CC, Tao J, Wang HY. AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes. *Biochem J* 2004; 379 (Pt 1):1-9.

Manger B, Weiss A, Imboden J et al. The role of protein kinase C in transmembrane signaling by the T cell antigen receptor complex. Effects of stimulation with soluble or immobilized CD3 antibodies. *J Immunol* 1987; 139 (8):2755-60.

-
- Matthews R., Guthrie C., Wailes L., Zhao X., means A., mcknight S. Calcium/Calmodulin-Dependent protein Kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression *Mol.Cell.Biol.* 1994 6107-6116
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2 (8):599-609.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 2002; 27 (1):40-7.
- Mcgargill M., Sharp L., Bui J., Hedrick S., Calbo S. Active Ca/Calmodulin-dependent protein kinase II γ B impairs positive selection of T cells by modulating TCR signalling *J Immunol* 2005 175 656-664
- Mege JL, Meghari S, Honstetter A et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6 (9):557-69.
- Montminy M. Transcriptional activation. Something new to hang your HAT on. *Nature* 1997a; 387 (6634):654-5.
- Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1997b; 66:807-22.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
- Mori N., Prager D. Activation of the interleukine-10 gene in human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF-kB binding sites in the regulatory region of the interleukine-10 gene *Eur.J.Haem.* 1997;59 162-170
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
- Ngiem P., Ollick T., Gardner P., Schulman H. IL-2 transcriptional block by multifunctional CaM Kinase *Nature* 1994 371 347-350
- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004a; 10 (8):801-5.
- O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007; 7 (6):425-8.
- O'Garra A, Vieira PL, Vieira P et al. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004b; 114 (10):1372-8.
- Oh-hora M., Rao A. Calcium signaling in lymphocytes *Curr.Op.Immun.* 2008 20;250-258

Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 2002; 277 (33):29355-8.

Pahl H. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* (1999) 18;6853-6866

Paliogianni F., Hama N., Mavrothalassitis G., Thyphronitis G., Boumpas D. Signal requirements for interleukin 4 promoter activation in human T cells *Cell.Immun.* 1995 168 33-38

Pan F, Means AR, Liu JO. Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates nuclear export of Cabin1 during T-cell activation. *Embo J* 2005; 24 (12):2104-13.

Pan F, Ye Z, Cheng L et al. Myocyte enhancer factor 2 mediates calcium-dependent transcription of the interleukin-2 gene in T lymphocytes: a calcium signaling module that is distinct from but collaborates with the nuclear factor of activated T cells (NFAT). *J Biol Chem* 2004; 279 (15):14477-80.

Papavassiliou AG. Molecular medicine. Transcription factors. *N Engl J Med* 1995a; 332 (1):45-7.

Papavassiliou AG. Transcription factors: structure, function, and implication in malignant growth. *Anticancer Res* 1995b; 15 (3):891-4.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:929-79.

Peters IR, Helps CR, Hall EJ et al. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *J Immunol Methods* 2004; 286 (1-2):203-17.

Platzer C, Fritsch E, Elsner T et al. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29 (10):3098-104.

Platzer C, Meisel C, Vogt K et al. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. *Int Immunol* 1995; 7 (4):517-23.

Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 2007; 134 (23):4131-40.

Powell MJ, Thompson SA, Tone Y et al. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 2000; 165 (1):292-6.

-
- Rafiq K., Charitidou L., Bullens D., Kasran A., Lorre K., Ceuppens J., Gool S. Regulation of the IL-10 production by human T cells *Scand.J.Immun.* 2001 53 139-147
- Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36 (11):1357-66.
- Rouse BT. Regulatory T cells in health and disease. *J Intern Med* 2007; 262 (1):78-95.
- Sandelin A, Wasserman WW, Lenhard B. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 (Web Server issue):W249-52.
- Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 2008; 20 (3):460-6.
- Sassone-Corsi P. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30 (1):27-38.
- Savignac M, Mellstrom B, Naranjo JR. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch* 2007; 454 (4):523-33.
- Shin HM, Han TH. CD28-mediated regulation of the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor in Jurkat T cells. *Mol Immunol* 1999; 36 (3):197-203.
- Taylor A, Verhagen J, Blaser K et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006; 117 (4):433-42.
- Thiele DL, Kurosaka M, Lipsky PE. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J Immunol* 1983; 131 (5):2282-90.
- Tone M., powell M., Tone Y., Thompson S., Waldmann H. IL-10 gene is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3 *J.Immun.* 2000 165 286-291
- Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H et al. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal* 2002; 14 (1):1-9.
- Wang X, Tang X, Li M et al. Regulation of neuroprotective activity of myocyte-enhancer factor 2 by cAMP-protein kinase A signaling pathway in neuronal survival. *J Biol Chem* 2005a; 280 (17):16705-13.

Wang ZY, Sato H, Kusam S et al. Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins. *J Immunol* 2005b; 174 (4):2098-105.

Weaver TA, Charafeddine AH, Kirk AD. Costimulation blockade: towards clinical application. *Front Biosci* 2008; 13:2120-39.

Wu K, Bi Y, Sun K et al. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007; 4 (4):269-75.

Yang SH, Galanis A, Sharrocks AD. Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol* 1999; 19 (6):4028-38.

Youn H., Chatila T., Liu J. Intergation of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T cell apoptosis EMBO 2000 19(16) 4323-433

Yu CT, Shih HM, Lai MZ. Multiple signals required for cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) binding protein interaction induced by CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 2001; 166 (1):284-92.

Zhang T., Kohlhaas M., Backs J., Mishra S., Phillips W., Dybkova N., Chang S., Ling H., Bers D., Maier L., Olson E., Brown J. CaM Kinase II isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses 2007 J.Biol. Chem. 282(48)35078-35087

Tokumitsu H, T Chijiwa, M Hagiwara, A Mizutani, M Terasawa, H Hidaka KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II J.Biol Chem.1990; 265(8):4315-20.

Passier R, H Zeng, N Frey, F J Naya, R L Nicol, T A McKinsey, P Overbeek, J A Richardson, S R Grant, E N Olson CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo J. Clin. Invest. 2000; 105(10):1395-406.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AcetylcoA: Acetyl coenzyme A

AC: Adenylate Cyclase

Ag: Antigen

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

AKAPs: A Kinase Anchoring Proteins

AP: Alkaline Phosphatase

APCs: Antigen Presenting Cells

AP-1: Activator Protein-1

ATP: Adenosine Triphosphate

ATF-1: Activation of Transcription Factor-1

BCA: Bicichoninic Acid

BSA: Bovine Serum Albumin

bZip: Basic-domain-leucine-zipper

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

Ca²⁺: Calcium

CaMK: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases

CBP: CREB Binding Protein

CD3: Cluster of Differentiation 3

CD4: Cluster of Differentiation 4

CD8: Cluster of Differentiation 8

CD28: Cluster of Differentiation 28

CD45: Cluster of Differentiation 45

CNGs: Cyclic Nucleotide-Gated ion channels

CRE: Cyclic AMP Response Element

CREB: Cyclic AMP Response Element Binding Protein

CREM: Cyclic AMP Responsive Element Modulator

CTLA-4 (CD152): Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

CVI: Common Variable Immunodeficiency

DNA: Deoxyribonucleic acid

DNTPs: deoxyribonucleotide triphosphate

DTT: Dithiothreitol

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

Epacs: cAMP-stimulated GDP exchange factors

FITC: Fluorescein isothiocyanate

Foxp3: Forkhead box P3

GDP: Guanosine diphosphate

GEFs: Guanine Exchange Factors

G_i-protein: G_{inhibitory}-protein

G_s-protein: G_{stimulatory}-protein

GTP: Guanosine-5'-triphosphate

HDACs: Histone deacetylases

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HRP: Horse Radish Peroxidase

IFN: Interferon

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motifs

IgG: Immunoglobulin G

IgE : Immunoglobulin E

IFN-γ: Interferon -gamma

IL-1- IL-24 : Interleukin-1 - 24

IL-10 : Interleukin-10

IL-10R : IL-10 Receptor

IL-10R1 : IL-10 Receptor

IL-10R2 : IL-10 Receptor

IL-2 : Interleukin-2

IL-2R : IL-10 Receptor

Ion : Ionomycin

IκB: Inhibitor κB

JAK: Janus Kinases

JNK: Jun N-Terminal Kinases

Lck: leukocyte-specific protein tyrosine kinase

LPS : Lipopolysaccharide

Luc: Luciferase

MADS : MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor

MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MEF2 : Myocyte Enhancer Factor-2
MEF2D : Myocyte Enhancer Factor-2D
MHC: Major Histocompatibility Complex
MHC I: MHC class I
MHC II: MHC class II
mRNA: messenger RNA
nTreg : naturally occurring T regulatory cells
NF-κB : Nuclear Factor-κB
NK: Natural Killer
PBL: Peripheral Blood Leukocyte
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS: Phosphate Buffer Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDEs: Phosphodiesterases
PE: R-Phycoerythrin
PGE₂: Prostaglandin E₂
PKA: Protein Kinase A
PKA I: Protein Kinase A Type I
PKA II: Protein Kinase A Type II
PKC: Protein Kinase C
PKI: Protein Kinase Inhibitor
PMA: Phorbol Myristate Acetate
PMSF: Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluoride
PTK : Protein Tyrosine Kinase
PP-1: Protein Phosphatase 1
PP-2A: Protein Phosphatase 2A
PP-2B: Protein Phosphatase 2B
PP-2C: Protein Phosphatase 2C
rhIL-2: recombinant human IL-2
RI: Regulatory subunit I
RII: Regulatory subunit II
RLU: Relative Light Units

RNA: Ribonucleic Acid

Rp: Rolipram

Rp-8Br-cAMP:Rp- isomer **8-bromoadenosine-3',** 5'cyclic
monophosphorothioate

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium-Dodecyl-Sulphate

SDS-PAGE: SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SOCS-1: Suppressor of cytokine signaling 1

SOCS-3: Suppressor of cytokine signaling 3

SSIIRT : SuperScript II reverse transcriptase

STATs : Signal Transducing Activators of Transcription

TCR: T Cell Receptor

T_H1: T Helper cells 1

T_H2: T Helper cells 2

T_H17: T Helper cells 17

Tr1: T Regulatory cells 1

TBS: Tris-Buffered Saline

TGF: Transforming Growth Factor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

U.V.: Ultra Violet (Radiation)