ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και έλεγχος δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην έκφραση κυτταροκινών σε παρθενικά και μνημονικά Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα»

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΔΑΒΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Το έργο συγχρημοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2ος Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ 2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και έλεγχος δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην έκφραση κυτταροκινών σε παρθενικά και μνημονικά Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα»

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΔΑΒΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αθανασία Μουζάκη
Εργαστήριο Αιματολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΠΑΤΡΑ 2023

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Αθανασία Μουζάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Διονύσιος Δραΐνας, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ιωάννης Ζαρκάδης, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Αθανασία Μουζάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Διονύσιος Δραΐνας, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ιωάννης Ζαρκάδης, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Καρολίνα Ακινόσογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γεώργιος Θυφρονίτης, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παναγιώτης Παπαθανασόπουλος, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ελευθερία Ροσμαράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

Πρόλογος 9
Περίληψη 11
Abstract 15
1. Εισαγωγή 18
Μέρος 1 18
1.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα 19
1.2 Τ λεμφοκύτταρα 24
1.2.1 Τ Βοηθητικά λεμφοκύτταρα 24
1.2.2 Τ Κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα 25
1.2.3 Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα 25
1.2.4 Παρθενικά Th λεμφοκύτταρα 26
1.2.5 Μνημονικά Th λεμφοκύτταρα 27
1.3 Ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων 28
1.4 Διαφοροποίηση Τ λεμφοκυττάρων 29
1.4.1 Th1 λεμφοκύτταρα 30
1.4.2 Th2 λεμφοκύτταρα 31
1.4.3 Th17 διαφοροποίηση 32
1.4.4 Tregs 34
1.5 Κυτταροκίνες 35
Μέρος 2 38
2.1 Ets-2 39
2.2 NFAT (Nuclear factor of activated T cells) 42
2.3 NF-κB (Nuclear factor-kappa B) 44
2.4 AP-1 (Activator protein 1) 48
2.5 Foxp3 (Forkhead box P3) 50
2.6 GATA-3 (GATA-binding protein 3) 52
2.7 T-bet (T-box transcription factor, TBX21) 54
2.8 RORγt (RAR-related orphan receptor γt) 55
Μέρος 3 58
3.1 Ανοσολογική ανοχή και αυτοανοσία 59
3.2 Σκλήρυνση κατά πλάκας 60
2. Σκοπός 62
3. Υλικά και μέθοδοι 65
3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών 66

3.1.1 Ψύξη κυττάρων 66
3.1.2 Απόψυξη κυττάρων 67
3.1.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων 67
3.2 Παροδική διαμόλυνση (transfection) κυττάρων με πλασμιδιακό DNA 67
3.3 Ενεργοποίηση των κυττάρων 69
3.4 Απομόνωση RNA από τα κύτταρα 69
3.5 Κατασκευή cDNA, RT-PCR 71
3.6 Quantitive Real Time polymerase chain reaction (qPCR) 72
3.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 74
3.7.1 Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση 75
3.8 Ανάλυση πρωτεϊνών 76
3.8.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από τα κύτταρα 76
3.8.2 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 76
3.8.3 Ανοσοαποτύπωμα Western 77
3.8.4 Διαλύματα για Western blot 78
3.9 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) 79
3.9.1 Διαλύματα για την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης 83
3.10 Ανοσοφθορισμός 83
3.10.1 Διαλύματα για τον ανοσοφθορισμό 85
3.11 Συλλογή δειγμάτων ολικού αίματος υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ 86
3.11.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) από ολικό αίμα 87
3.12 Κυτταρομετρία ροής 88
4. Αποτελέσματα 92
Μέρος 1 92
4.1 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του λεμφοτροπικού παράγοντα NFAT2 93
4.2 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του λεμφοτροπικού παράγοντα NF-κB p65 96
4.3 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης των λεμφοτροπικών παραγόντων c-Jun και c-Fos 98
Μέρος 2 101
4.4. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα 102
4.5. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα 103

4.6 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα RORγt σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα 104

4.7. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα 105

Μέρος 3 107

4.8 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 108

4.9 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 στην ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 110

4.10 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα RORγt 113

4.11 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα RORγt στην ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 114

4.12. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 117

4.13. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 στην ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 119

4.14 Αποσιώπηση του Ets-2 προκαλεί αύξηση της έκφρασης του Foxp3 121

4.15 Ο μεταγραφικός παράγοντα Ets-2 καταστέλλει την έκφραση του Foxp3 μέσω της πρόσδεσης του στον υποκινητή του Foxp3 125

4.16. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην ρύθμιση της έκφρασης του TGF-β 127

Μέρος 4 130

4.17. Μελέτη της έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας 131

4.17.1. Έκφραση και κυτταρικός εντοπισμός του Ets-2 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ 133

4.17.2. Έκφραση και κυτταρικός εντοπισμός του Foxp3 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ 135

5. Συζήτηση 138

6. Βιβλιογραφία 148

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αιματολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας μελέτης, κα. Αθανασία Μουζάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Χωρίς τις πολύτιμες συμβουλές της και τη συνεχή υποστήριξη, τόσο επιστημονική όσο και ηθική, θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση της εν λόγω διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Διονύσιο Δραΐνα και τον κ. Ιωάννη Ζαρκάδη, που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς συμβουλετικής επιτροπής και για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια εκόνησής της, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κα. Καρολίνα Ακινόσογλου, κ. Γεώργιο Θυφρονίτη, κ. Παναγιώτη Παπαθανασόπουλο και κα. Ελευθερία Ροσμαράκη για το χρόνο τους και την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν σε αυτήν.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα παλαιότερα και νεότερα μέλη του εργαστηρίου Αιματολογίας, για την άψογη συνεργασία μας καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν όλα αυτά τα χρόνια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Τάσο Γεωργακόπουλο, για την καθοδήγηση, τις συμβουλές του και τις εύστοχες παρατηρήσεις του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Γιάννη Παναγούλια, καθώς ήμουν τυχερή που βρεθηκα υπο την επίβλεψή του στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και για την επιστημονική καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, καθώς και την Ιωάννα Αγγελετοπούλου , της οποίας η βοήθεια και η συμπαράσταση ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμη και με βοήθησε να ανταπεξέλθω στις διάφορες δυσκολίες που συνάντησα. Ακόμη ευχαριστώ τη Ρούλα Αναστασοπούλου για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθειά της όλα αυτά τα χρόνια, όπως και την Ευανθία Τουρκοχρήστου και τη Βάσω Θεοδωράκη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παλιότερα μέλη του εργαστηρίου Άννα-Λίζα Δελαστίκ, Μαρία Ρόδη και Φώτη Καραγιάννη με τα οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ στο παρελθόν.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου και τους αγαπημένους μου φίλους για την συνεχή συμπαράστασή τους και για την πίστη που επέδειξαν στις δυνατότητες μου από την αρχή της πορείας μου. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε επιλογή μου.

Περίληψη

Η ενεργοποίηση και η διαφοροποίηση των Τ βοηθητικών (Th) κυττάρων είναι διαδικασίες καθοριστικής σημασίας για τη διατήρηση επαρκούς άμυνας και τη ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ενεργοποίηση των Th κυττάρων επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση σημαντικών λεμφοτροπικών παραγόντων όπως των NFAT, NF-κB και AP-1, οι οποίοι εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της IL-2. Η IL-2 είναι η πρώτη κυτταροκίνη που παράγεται όταν τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε επαγώγιμα Th0 λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με μελέτη του εργαστηρίου μας, ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2 προσδένεται στην περιοχή ARRE-2 του υποκινητή της IL-2 σε παρθενικά Th κύτταρα και καταστέλλει την έκφρασή της. Κατά την ενεργοποίηση των παρθενικών Th κυττάρων, ο Ets-2 μετακινείται στην ARRE-1 περιοχή του υποκινητή της IL-2 και χάνει την κατασταλτική του δράση ενώ παράλληλα τα επίπεδα έκφρασής του μειώνονται .

Μετά την ενεργοποίησή τους ως αποτέλεσμα της αντιγονοπαρουσίασης τα παρθενικά Th κύτταρα ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του αντιγόνου, την ισχύ του σήματος TCR, το κυτταροκινικό περιβάλλον στο οποίο επιτελέστηκε η ενεργοποίηση και τη διαφορική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων διαφοροποιούνται στους διαφορετικούς υπολληθυσμούς Th κυττάρων.

Η παρούσα διατριβή στοχεύει στη διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης του Ets-2, καθώς και του ρόλου του στη ρύθμιση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στις διαδικασίες της ενεργοποίησης και διαφοροποίησης των Th κυττάρων. Η συγκεκριμένη μελέτη θα εξετάσει επίσης την πιθανή εμπλοκή του Ets-2 στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων λόγω δυσλειτουργίας των μηχανισμών ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Th κυττάρων.

Αρχικά διερευνήσαμε το ρόλο του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης των λεμφοτροπικών παραγόντων NFAT2, NF-κB p65, c-Jun και c-Fos. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν στην κυτταρική σειρά Jurkat, προκύπτει ότι ο Ets-2 είχε επαγωγικό ρόλο στην έκφραση του NFAT2 και του c-Jun. Θετική ρύθμιση ασκεί στην έκφραση της πρωτεΐνης του NF-κB p65, ωστόσο δεν επέφερε κάποια αλλαγή στα επίπεδα του NF-κB p65 mRNA. Εξετάζοντας τη δράση

του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του c-Fos παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση του Ets-2 είχε ως αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων του c-Fos mRNA τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Ωστόσο οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του c-Fos μόνα στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Επομένως ο Ets-2 έχει επαγωγικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης λεμφοτροπικών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των Th λεμφοκυττάρων, είτε μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής του με τους εξεταζόμενους λεμφικούς παράγοντες, είτε μέσω της συμμετοχής του σε σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν άμεσα την έκφρασή τους.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στη μελέτης της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Th κυττάρων και συγκεκριμένα των: GATA-3, RORγt και Foxp3, σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα. Ακολούθως εξετάσαμε το ρόλο του Ets-2 στην έκφραση των GATA-3, RORγt και Foxp3 και το αντίστροφο με σκοπό να αποσαφηνισθεί η δράση του Ets-2 στη διαδικασία διαφοροποίησης των Th κυττάρων.

Ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που εξέτασαν τη δράση του Ets-2 στην έκφραση του RORγt, καθώς η υπερέκφραση του Ets-2 επέφερε μείωση των επιπέδων του RORγt μόνο στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Τα πειράματα διερεύνησης της δράσης του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3 καθώς και τα πειράματα μελέτης του ρόλου του Foxp3 στην έκφραση του Ets-2 παρουσίασαν επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν η υπερέκφραση του Ets-2 οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του Foxp3, αλλά και η υπερέκφραση του Foxp3 μείωσε τα επίπεδα του Ets-2. Για να επιβεβαιώσουμε την αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης των ανωτέρω μεταγραφικών παραγόντων προχωρήσαμε σε πειράματα αποσιώπησης του Ets-2 τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων έκφρασης του Foxp3, επιβεβαιώνοντας τον κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης του Ets-2 στον υποκινητή του Foxp3, αποδείξαμε ότι ο Ets-2 προσδένεται στον υποκινητή του Foxp3.

Καθώς η δυσλειτουργία των μηχανισμών ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Th κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία παθολογικών Th κλώνων και την επακόλουθη εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, επόμενο βήμα ήταν να διερευνήσουμε την πιθανή εμπλοκή του Ets-2 στο αυτοάνοσο νόσημα της σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣΚΠ). Για αυτό το λόγο εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασής του Ets-2 και του Foxp3 σε ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs) ασθενών με ΣΚΠ και προχωρήσαμε στη σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα των υγιών δοτών. Οι ασθενείς με ΣΚΠ παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του Ets-2 συγκριτικά με τους υγιείς δότες, ενώ παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα Foxp3 συγκριτικά με τα υψηλότερα επίπεδα των υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με αυτά των προηγούμενων πειραμάτων διερεύνησης του ρόλου του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2, ο οποίος υπερεκφράζεται στα Τ ρυθμιστικά κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ, μπορεί να ασκεί αρνητική ρύθμιση στην έκφραση του Foxp3. Τα χαμηλά επίπεδα του Foxp3 που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς μπορεί να υποδηλώνουν δυσλειτουργία στο μηχανισμό καταστολής της έκφρασης της IL-2 με αποτέλεσμα την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της. Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ένα κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των Tregs και την επακόλουθη εμπλοκή του στην παθογένεια της ΣΚΠ.

Abstract

The activation and differentiation of naive T helper (Th cells) is crucial for the maintenance of adequate defense and immune regulation. Activation of Th cells induces signaling pathways that lead to the activation of key lymphotropic factors such as NFAT, NF-κB and AP-1, which are involved in the activation of IL-2 transcription. IL-2 is the first cytokine produced when naive Th cells are activated and differentiate into proliferating pre-Th0 precursors. According to our previous work, the IL-2 gene is repressed in naive Th cells by the transcription factor Ets-2, which binds to the ARRE-2 element of the proximal IL-2 promoter. When naive Th cells are activated, Ets-2 shifts to the ARRE-1 region of the IL-2 promoter, loses its repressive effect and its expression level is reduced.

When naive Th0 cells are activated, they differentiate into different subsets of Th cells depending on the type and concentration of antigen, the strength of TCR signaling, the cytokines present in the cell environment and the differential expression of certain transcription factors.

The aim of this work was to investigate the regulation of Ets-2 expression and its role in the expression of transcription factors involved in the activation and differentiation of Th cells, as well as its possible involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases due to a disturbance in the regulation of transcription factors involved in the differentiation of Th cells.

First, we investigated the possible influence of Ets-2 on the expression of the lymphotropic factors NFAT2, NF-κB p65, c-Jun and c-Fos. Our results showed that overexpression of Ets-2 in the Jurkat T cell line resulted in upregulation of NFAT2 and c-Jun levels. Although Ets-2 led to an increase in NF-κB p65 protein levels, it had no effect on NF-κB p65 mRNA synthesis. Finally, overexpression of Ets-2 increased c-Fos mRNA in both stimulated and non-stimulated Jurkat cells, whereas it increased c-Fos protein levels only in stimulated cells. Thus, Ets-2 induces the expression of important lymphotropic factors by either physically interacting with gene promoters or by participating in signaling pathways that directly affect their expression.

We then examined the gene expression of Ets-2 as well as the gene expression of the transcription factors GATA-3, RORγt and Foxp3, which are involved in Th cell

differentiation. We then examined the role of Ets-2 in regulating the expression of GATA-3, RORγt and Foxp3 and vice versa to investigate the role of Ets-2 in Th cell differentiation.

The results of the experiments investigating the influence of Ets-2 on the expression of RORγt showed that Ets-2 downregulated RORγt levels only in non-stimulated Jurkat cells. The experiments investigating the influence of Ets-2 on Foxp3 expression and vice versa showed that overexpression of Ets-2 led to a significant decrease in Foxp3 expression, while overexpression of Foxp3 downregulated Ets-2 levels. To confirm the inverse relationship between Ets-2 and Foxp3 we performed Ets-2 knockdown experiments which resulted in an increase in Foxp3 expression, confirming the suppressive role of Ets-2 in Foxp3 expression. Since Ets-2 has binding sites on the Foxp3 promoter, we subsequently performed CHIP analysis, which confirmed the binding of Ets-2 to the Foxp3 promoter.

Since perturbations in the regulation of transcription factors involved in Th cell differentiation can lead to the development of pathological Th cell clones and the subsequent occurrence of autoimmune diseases, we investigated the potential importance of Ets-2 in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). To this end, we examined the expression of Ets-2 and Foxp3 in regulatory Th cells (Tregs) derived from MS patients and healthy controls. We found that Foxp3 was significantly reduced in Tregs from MS patients, while Ets-2 was significantly increased compared to Tregs from healthy controls. These results, together with our previous work investigating the role of Ets-2 in Foxp3 expression, suggest that Ets-2, which is upregulated in Tregs of MS patients, may suppress Foxp3 expression. The decreased Foxp3 levels observed in MS patients may indicate a defect in the suppression mechanism of IL-2, leading to a subsequent increase in IL-2 expression. In conclusion, our results suggest a suppressive role of Ets-2 in the development and function of Tregs and its contribution to the pathophysiology of MS.

1. Εισαγωγή

Μέρος 1

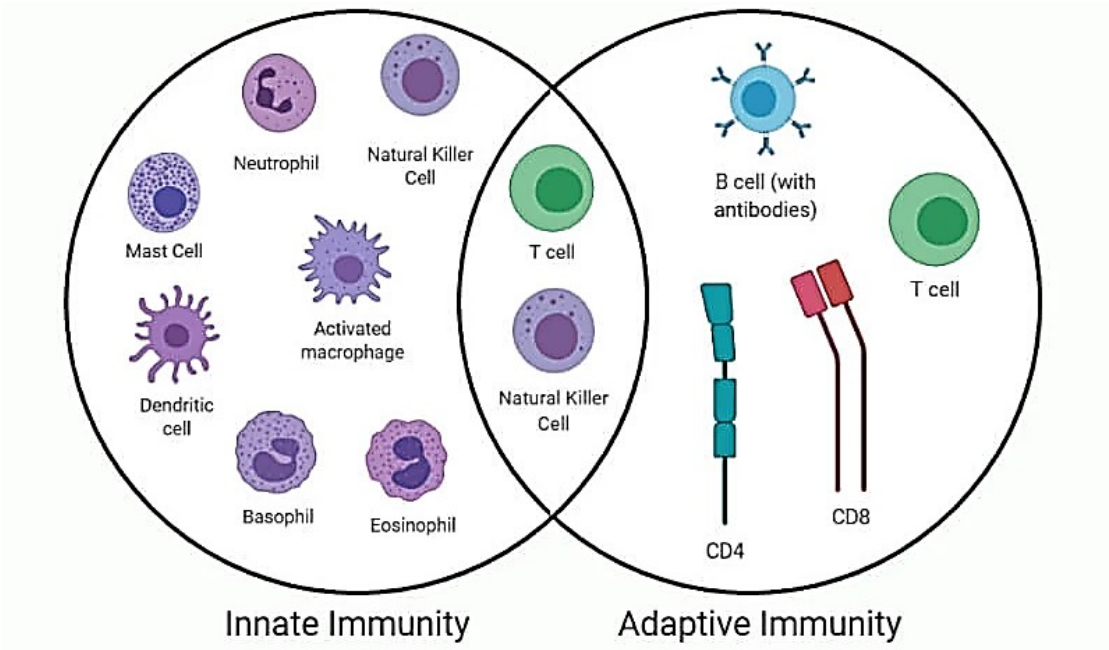
1.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο κυττάρων τα οποία είναι υπεύθυνα για την προστασία του οργανισμού από αντιγόνα. Ως αντιγόνα χαρακτηρίζονται διάφοροι παθογόνοι εισβολείς τους οποίους ο οργανισμός αναγνωρίζει ως ξένους. Τα αντιγόνα μπορεί να περιλαμβάνουν παθογόνους μικροοργανισμούς (μύκητες, βακτήρια, ιούς, παράσιτα), τοξίνες και μακρομόρια [1]. Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει μηχανισμούς ρύθμισης οι οποίοι του δίνουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζει και να διακρίνει τα αντιγόνα και να τα ξεχωρίζει από τα συστατικά που υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό (διάκριση εαυτού - μη εαυτού). Απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και ενεργοποίησή του έναντι συστατικών του οργανισμού μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων και σε αλλεργίες [2].

Η είσοδος ενός αντιγόνου στον οργανισμό πυροδοτεί την ανοσολογική απόκριση η οποία διακρίνεται στην έμφυτη ανοσία (innate immunity) η οποία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας και δεν παρουσιάζει εξειδίκευση στην αναγνώριση των διαφόρων αντιγόνων και στην επίκτητη ανοσία (adaptive immunity) η οποία είναι ειδική και χρειάζεται συνήθως περισσότερο χρόνο για να δράσει [3] [4]. Βασικά στοιχεία της έμφυτης ανοσίας αποτελούν: 1) φυσικοί και χημικοί φραγμοί οι οποίοι αποτρέπουν την είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών στον οργανισμό και περιλαμβάνουν το επιθήλιο καθώς και τις αντιμικροβιακές ουσίες που εκκρίνονται από αυτό, 2) φαγοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί δολοφόνοι (Natural killers-NK cells) τα οποία επιτίθενται στους παθογόνους μικροοργανισμούς που καταφέρνουν να εισέλθουν στον οργανισμό, 3) πρωτεΐνες του αίματος που περιλαμβάνουν μέλη του συμπληρώματος και παράγοντες που εμπλέκονται στο σχηματισμό της φλεγμονής, 4) κυτταροκίνες, οι οποίες είναι ειδικές πρωτεΐνες σημαντικές για την κυτταρική σηματοδότηση [4].

Στην επίκτητη ανοσία κυρίαρχο ρόλο έχουν τα Τ και τα Β λεμφοκύτταρα. Βασικά χαρακτηριστικά της είναι η ειδικότητα, δηλαδή η ικανότητα διάκρισης και ανάπτυξης εξειδικευμένης ανοσοαπόκρισης για την αντιμετώπιση του κάθε

αντιγόνου, αλλά και η ικανότητά να θυμάται και να αναγνωρίζει το αντιγόνο και να παράγει ταχύτερες και ισχυρότερες ανοσοαποκρίσεις σε επαναλαμβανόμενες μολύνσεις με αυτό. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της είναι η ετερογένεια δηλαδή η ικανότητα αντίδρασης με μεγάλο αριθμό παθογόνων μικροοργανισμών [3].

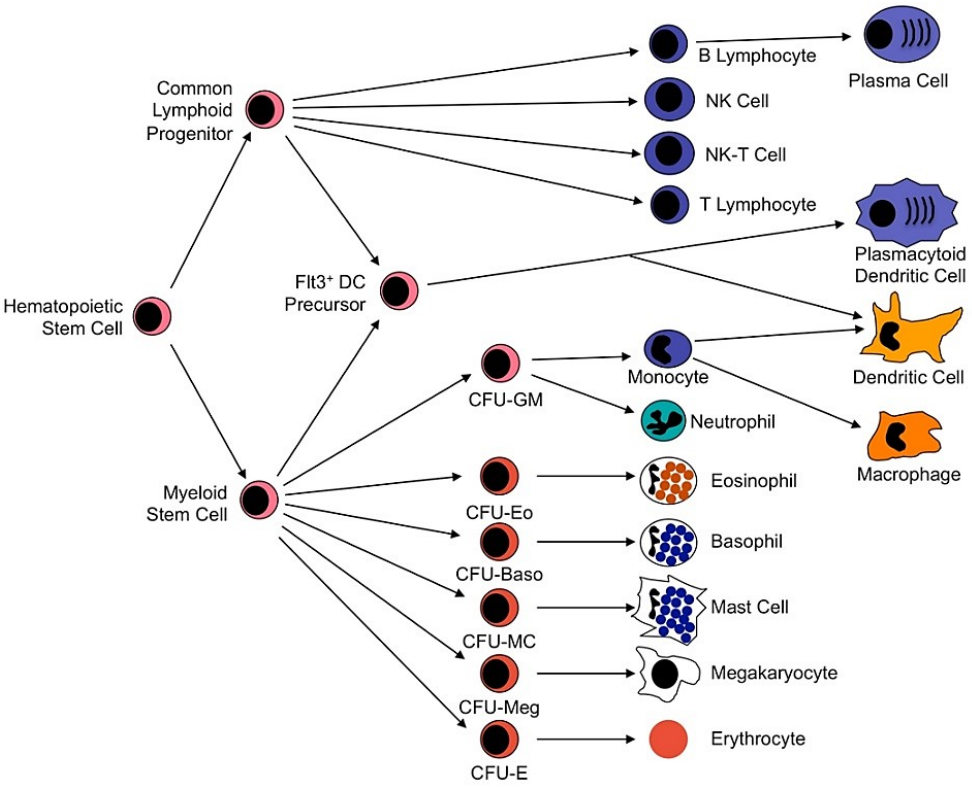


Εικόνα 1.1: Απεικόνιση των κυττάρων που συμμετέχουν στην έμφυτη και στην επίκτητη ανοσία. Η έμφυτη ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στη μόλυνση. Περιλαμβάνει διαλυτούς παράγοντες, όπως οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα κοκκιοκύτταρα (βασεόφιλα, ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα), τα μαστοκύτταρα, και τα NK κύτταρα. Η επίκτητη ανοσία η οποία χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να δράσει περιλαμβάνει τα Β λεμφοκύτταρα καθώς και τα βοηθητικά (CD4+) και κυτταροτοξικά (CD8+) Τ λεμφοκύτταρα. Τα NK κύτταρα καθώς και τα γδ Τ κύτταρα είναι λεμφοκύτταρα που διαμεσολαβούν στην σύνδεση μεταξύ έμφυτης και επίκτητης ανοσίας [3] [4]. (https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/06/Differences-between-Innate-Immunity-and-Adaptive-Immunity.jpeg).

Όλοι οι τύποι των κυττάρων του αίματος προέρχονται από τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (hematopoietic stem cells) τα οποία διαφοροποιούνται στο μυελό των οστών σε δυο κύριους τύπους πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων:

- Στα πολυδύναμα λεμφικά αρχέγονα κύτταρα από τα οποία προέρχονται οι διάφοροι τύποι των λεμφοκυττάρων (Β και Τ λεμφοκύτταρα) και τα ΝΚ κύτταρα (λεμφοειδής σειρά).
- Στα πολυδύναμα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα από τα οποία παράγονται πέντε κατηγορίες προγονικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται ως μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU-colony forming unit) ή ως κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες (CFC colony forming cells), λόγω της δυνατότητάς τους να σχηματίζουν αποικίες σε κυτταροκαλλιέργεια. Επομένως από τα πολυδύναμα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα σχηματίζονται CFU για την παραγωγή 1) των μονοκυττάρων-ουδετερόφιλων (CFU-GM), 2) των ηωσινόφιλων (CFU-Eo), 3) των βασεόφιλων (CFU-Baso), 4) των μαστοκυττάρων (CFU-MC), 5) των μεγαρυοκυττάρων (CFU-Meg), 6) και των ερυθροκυττάρων (CFU-E) (μυελοειδής σειρά) [5] [6].

Τα δενδριτικά κύτταρα στην ανώριμη φάση τους έχουν λειτουργία φαγοκυττάρων τα οποία εισέρχονται σε ιστούς και ωριμάζουν αφού συναντήσουν κάποιο παθογόνο. Παράγονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα διαμέσου διαφορετικών οδών και σε διαφορετικά σημεία. Ειδικότερα μπορεί να προέρχονται είτε από τη λεμφοειδή είτε από τη μυελοειδή σειρά. Στη μυελοειδή σειρά προέρχονται από πρόδρομα μονοκύτταρα πριν αυτά εισέλθουν στους περιφερικούς ιστούς. Όταν μεταναστεύουν και εισέρχονται σε διάφορους ιστούς τα μονοκύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε φαγοκυτταρικά μακροφάγα [5] [7].

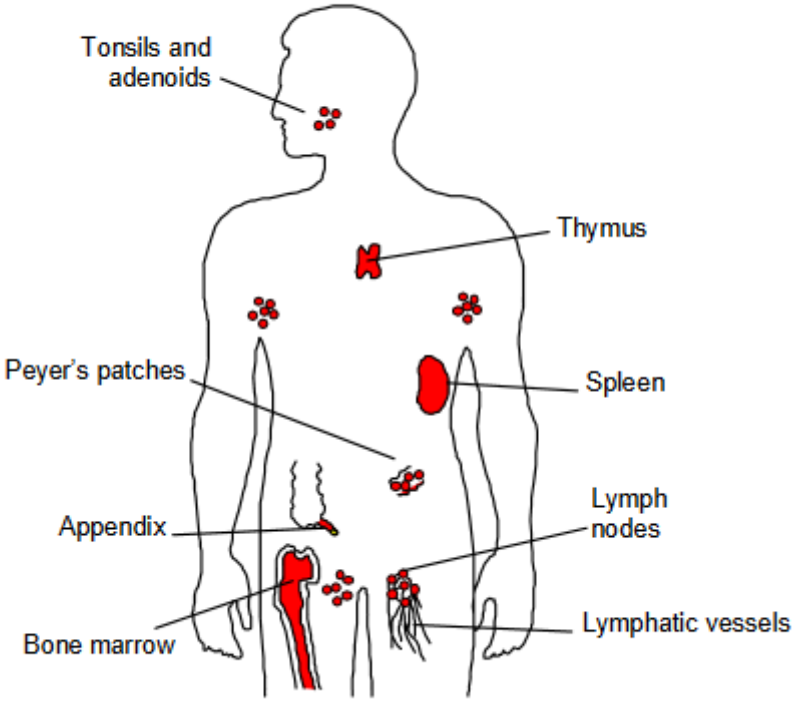


Εικόνα 1.2: Από τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του ανθρώπου προέρχεται η λεμφοειδής σειρά από την οποία προκύπτουν τα Β, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα και η μυελοειδής σειρά από την οποία προκύπτουν τα μονοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα μαστοκύτταρα, τα μεγαρυοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα [5].

Τα κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση προκειμένου να ασκούν πιο αποτελεσματικά τις λειτουργίες τους είναι οργανωμένα σε διάφορους ιστούς και όργανα. Το σύνολο αυτό των ιστών και των οργάνων αποτελούν το λεμφικό σύστημα και διακρίνονται σε πρωτογενή και σε δευτερογενή λεμφικά όργανα [7].

Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, περιλαμβάνεται ο μυελός των οστών από τον οποίο προέρχονται όλα τα λεμφοκύτταρα και ο θύμος αδένας στον οποίο τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε Τ λεμφοκύτταρα. Τα Β λεμφοκύτταρα αντιθέτως διαφοροποιούνται στο μυελό των οστών. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα τόσο τα Τ όσο και τα Β λεμφοκύτταρα εκφράζουν αντιγονικούς υποδοχείς και ωριμάζουν λειτουργικά. Στη συνέχεια μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα που παρέχουν το κατάλληλο

περιβάλλον για την αναγνώριση των αντιγόνων και την ανάπτυξη των κατάλληλων ανοσολογικών αποκρίσεων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι λεμφικοί ιστοί που εντοπίζονται στους βλεννογόνους (MALT-Mucosal-associated Lymphoid tissues) και περιλαμβάνουν: τις αμυγδαλές, τη σκωληκοειδή απόφυση, τις αδενοειδείς εκβλαστήσεις, τις παϋέρειες πλάκες (πλάκες του Peyer) του λεπτού εντέρου και τον ιστό που εντοπίζεται στα βρογχιόλια [5] [8].



Εικόνα 1.3: Η κατανομή των πρωτογενών και δευτερογενών λεμφικών οργάνων στο ανθρώπινο σώμα. Στους πρωτογενείς λεμφικούς ιστούς ανήκουν ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών. Στους δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς ανήκουν μεταξύ άλλων ο σπλήνας, οι αμυγδαλές, οι λεμφαδένες, οι αμυγδαλές και οι πλάκες του Peyer [9].

1.2 Τ λεμφοκύτταρα

Τα Τ λεμφοκύτταρα είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα κυττάρων τα οποία παράγονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο θύμο αδένα όπου ωριμάζουν, γίνεται η διαδικασία επιλογής τους και μεταναστεύουν στην περιφέρεια [10]. Τα Τ λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD3 και χαρακτηρίζονται επίσης από την έκφραση του διαμεμβρανικού υποδοχέα των Τ κυττάρων, TCR (T-cell like receptor) ο οποίος παρουσιάζει εξειδίκευση στην αναγνώριση του κάθε αντιγόνου. Τα Τ λεμφοκύτταρα όμως δεν έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν ελεύθερα διαλυτά αντιγόνα, αλλά αντιγονικά πεπτίδια συνδεδεμένα με μεμβρανικούς υποδοχείς που ονομάζονται αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC-Major histocompatibility complex). Τα αντιγόνα MHC είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC-Antigen presenting cells). Τα αντιγόνα MHC του ανθρώπου έχει επικρατήσει να ονομάζονται HLA (Human Leucocyte antigens) [11].

Ανάλογα με τη λειτουργία τους τα Τ λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται σε τρείς βασικές κατηγορίες: στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (Th-T helper cells), στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (Tc-cytoxic cells), και στα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Tregs-T regulatory cells) .

1.2.1 Τ Βοηθητικά λεμφοκύτταρα

Τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν τη γλυκοπρωτεΐνη CD4 και είναι υπεύθυνα για την κυτταρική ανοσία. Μετά την ενεργοποίησή τους ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης αντιγονικών πεπτιδίων συνδεδεμένων με το MHCII, εκκρίνουν κυτταροκίνες οι οποίες αποτελούν το έναυσμα ανοσολογικών αποκρίσεων. Επάγουν τη διέγερση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των Τ κυττάρων καθώς και των υπόλοιπων κυττάρων που συμμετέχουν στην διαδικασία της

ανοσοαπόκρισης, όπως άλλων λευκοκυττάρων, μακροφάγων αλλά και Β λεμφοκυττάρων [4] [11].

1.2.2 Τ Κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα

Τα Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης CD8. Ακολούθως της ενεργοποίησης των CD8 κυττάρων ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης αντιγονικών πεπτιδίων συνδεδεμένων με το MHCI, ενεργοποιείται η διαδικασία της εξουδετέρωσης των αντιγόνων-στόχων. Η συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δυο μηχανισμών. Αρχικά τα ενεργοποιημένα CD8 κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη FasL (Fas ligand), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων TNF (Tumor necrosis factor), η οποία προσδένεται στον υποδοχέα της Fas. Η πρόσδεση FasL-Fas έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών και την επακόλουθη απόπτωση του κυττάρου-στόχου. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει το μονοπάτι perforin/granzymes. Η περφορίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και σε συνεργασία με ειδικές πρωτεάσες σερίνης τα granzymes επάγουν τον κυτταρικό θάνατό τους [12].

1.2.3 Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα

Τα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα, είναι μια εξειδικευμένη κατηγορία CD4 λεμφοκυττάρων τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα της α αλυσίδας της IL-2, CD25 και είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και για τη διατήρηση της ομοιόσταστης του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα Tregs καταστέλλουν τα αυτοαντιδαστικά Τ κύτταρα ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση και την εξέλιξη της αυτοανοσίας [11]. Κατά τη

διαδικασία διαφοροποίησης των Τ λεμφοκυττάρων σε Tregs στο θύμο αδένα είναι απαραίτητη η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα (forkhead box P3). Ο Foxp3 είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των Tregs και επομένως κατέχει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής [13].

Τα Tregs διακρίνονται στα φυσικά Tregs (nTegs-natural Tregs) που αναπτύσσονται στο θύμο αδένα και στα επαγόμενα Tregs (iTregs- induced Tregs) τα οποία αναπτύσσονται στην περιφέρεια από $CD4^+$ $Foxp3^-$ Τ λεμφοκύτταρα και μπορούν να δημιουργηθούν in vitro. Ο βασικός τους ρόλος είναι να καταστέλλουν τις διαμεσολαβούμενες από τα Τ λεμφοκύτταρα ανοσοαποκρίσεις που επάγονται κατά την αναγνώριση αντιγόνων από τον TCR υποδοχέα [14] [15].

Τα Tregs ασκούν την κατασταλτική τους δράση μέσω διάφορων μηχανισμών συμπεριλαμβανομένων της αναστολής της μεταγραφής της IL-2 από τα Th λεμφοκύτταρα (check effectors) αλλά και της έκκρισης κυτταροκινών οι οποίες αναστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως η IL-10 και ο TGF-β (Transforming growth factor beta). Επίσης καταστέλλουν την δράση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων μέσω έκκρισης του κυτταροτοξικού Τ-λεμφοκυτταρικού αντιγόνου 4, CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) αλλά και του LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) [16] [17]. Δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια των Tregs οδηγεί σε απορρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και στην εμφάνιση αυτοάνοσων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της σκλήρυνσης κατά πλάκας (MS, multiple sclerosis) [18].

1.2.4 Παρθενικά Th λεμφοκύτταρα

Τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα μετά τη διαδικασία της θετικής και αρνητικής επιλογής τους στο θύμο αδένα, εξέρχονται από το θύμο αδένα και μεταναστεύουν στην περιφέρεια. Στο στάδιο αυτό όπου δεν έχουν συναντήσει κάποιο αντιγόνο ονομάζονται παρθενικά Th λεμφοκύτταρα. Όταν συναντήσουν και αλληλεπιδράσουν με κάποιο αντιγόνο στην περιφέρεια τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα

πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε δραστικά και σε μνημονικά Th λεμφοκύτταρα [19]. Η κατηγορία αυτή των Th λεμφοκυττάρων εκφράζουν ειδικούς δείκτες επιφανείας συμπεριλαβανομένων των μορίων της L-σελεκτίνης (CD62L) και του CCR7 (C-C chemokine receptor type 7). Οι συγκεκριμένοι δείκτες ρυθμίζουν την κυκλοφορία των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων ανάμεσα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και τα αιμοποιητικά κύτταρα. Επίσης, τα περισσότερα ανθρώπινα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση μιας ισομορφής ενός επιφανειακού μορίου μεγέθους 200kDa το οποίο ονομάζεται CD45. Το συγκεκριμένο μόριο περιέχει ένα τμήμα το οποίο κωδικοποιείται από ένα εξώνιο που χαρακτηρίζεται με το γράμμα Α. Τα συγκεκριμένα κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν αφού αντιδράσουν με αντισώματα τα οποία είναι ειδικά για αυτό το τμήμα που κωδικοποιείται από το εξώνιο Α. Για αυτό το λόγο τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα καλούνται CD45RA+ Th λεμφοκύτταρα (RA-restricted A) [20] [21].

1.2.5 Μνημονικά Th λεμφοκύτταρα

Τα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα έχουν ενεργοποιηθεί ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης ενός αντιγόνου και παραμένουν στον οργανισμό και μετά το πέρας της μόλυνσης. Κατά την έκθεση του οργανισμού στο ίδιο αντιγόνο, τα μνημονικά κύτταρα θα πολλαπλασιαστούν πιο γρήγορα και θα δράσουν πιο αποτελεσματικά εναντίον του παθογόνου, συγκριτικά με τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα.

Τα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και ταξινομούνται σε δυο ομάδες. Τα δραστικά μνημονικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν υποδοχείς υπεύθυνους για τη διαμεσολάβηση της μετανάστευσής τους σε μη λεμφικά σημεία φλεγμονής. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τα κεντρικά μνημονικά κύτταρα που εκφράζουν τους δείκτες CD62L και CCR7 οι οποίοι βοηθούν στη μετανάστευσή τους στα περιφερικά λεμφικά όργανα [22].

Τα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα, σε αντίθεση με τα παρθενικά, εκφράζουν μία ισομορφή του CD45 μορίου μεγέθους 180kDα, αφού το mRNA του εξωνίου έχει υποστεί διαφορετική ωρίμανση. Τα κύτταρα αυτά καλούνται CD45RO κύτταρα [23].

1.3 Ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων

Για την ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων απαιτείται η αλληλεπίδραση του TCR υποδοχέα και των συνυποδοχέων του με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, αλλά και συνδιεγερτικών μορίων όπως το CD28 με τις πρωτεΐνες CD80 ή CD86 [24].

Ειδικότερα, εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων αποτελεί η αναγνώριση του συμπλόκου πεπτιδικού αντιγόνο-MHC από τον TCR υποδοχέα, αλλά και από τους συνυποδοχείς του CD4 και CD8, οι οποίοι αναγνωρίζουν μόρια της τάξης MHC II και I, αντίστοιχα. Ο TCR υποδοχέας αποτελείται από ετεροδιμερή α και β αλυσίδων και σπανιότερα γ και δ αλυσίδων. Τα αβ και γδ μόρια αναγνωρίζουν το σύμπλοκο αντιγόνο-MCH ωστόσο δεν έχουν τη δυνατότητα να μεταβιβάζουν το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταβίβαση γίνεται μέσω του CD3 συμπλέγματος, ενός συμπλέγματος διαμεμβρανικών πολυπεπτιδίων, τα οποία είναι σταθερά συνδεδεμένα με τα αβ και τα γδ μόρια. Η κάθε αλυσίδα του CD3 συμπλέγματος αποτελείται στο ενδοκυτταροπλασματικό της τμήμα από μια αλυσίδα αμινοξέων οι οποίοι ονομάζονται ανοσουποδοχείς ενεργοποίησης της τυροσίνης (ITAM-immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταβίβαση του μηνύματος στο εσωτερικό του κυττάρου [25].

Ακολούθως της αναγνώρισης του συμπλόκου πεπτιδικό αντιγόνο-MHC, μόρια προσκόλλησης, τα σημαντικότερα εκ των οποίων ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών και βρίσκονται στην επιφάνεια των Τ κυττάρων σταθεροποιούν τη σύνδεσή τους με τα APCs. Η κύρια ιντεγκρίνη η οποία ενισχύει τη σύνδεση με τα APCs είναι η LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) η οποία συνδέεται ισχυρά στον αντίστοιχο προσδέτη της στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ο οποίος ονομάζεται ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1). Ωστόσο, για να επιτευχθεί η πλήρης ενεργοποίηση των Τ κυττάρων απαιτείται ένα δεύτερο σήμα το οποίο μεταφέρεται μέσω της αλληλεπίδρασης συνδιεγερτικών μορίων και κυρίως των CD80 και CD86 που βρίσκονται στην επιφάνεια των αντογονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τον υποδοχέα CD28 των Τ κυττάρων [26].

Η διαδικασία ενεργοποίησης των Τ κυττάρων ελέγχεται μέσω έκφρασης του επιφανειακού μορίου CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte. Antigen 4), το οποίο έχει δομική συγγένεια με το CD28, ωστόσο προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια με τα συνδιεγερτικά μόρια CD80/CD86. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή αρνητικού σήματος στο Τ-λεμφοκύτταρο και αναστέλλει την ενεργοποίησή του [27].

Μετά την ολοκλήρωση των δυο σημάτων ενεργοποίησης και την επακόλουθη ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, ξεκινά ο πολλαπλασιασμός τους με αποτέλεσμα την επέκταση των κλώνων οι οποίοι είναι ειδικοί για το κάθε αντιγόνο. Στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν στα σημεία της λοίμωξης με σκοπό την εξάλειψή της, μέσω διαφορετικών μηχανισμών όπως είναι η παραγωγή κυτταροκινών και η κυτταροδιαμεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα [25].

1.4 Διαφοροποίηση Τ λεμφοκυττάρων

Τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα ως αποτέλεσμα της αντιγονοπαρουσίασης στην περιφέρεια ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε λειτουργικά Th λεμφοκύτταρα (Th0). Στη συνέχεια ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του αντιγόνου, την ισχύ του σήματος TCR, το κυτταροκινικό περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίηση και τη διαφορική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης, διαφοροποιούνται στους παρακάτω λειτουργικούς υποπληθυσμούς: Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22 , Tfh (follicular Th cells) και Tregs [28] [29].

Από τους παραπάνω υποπληθυσμούς Th λεμφοκυττάρων οι πιο ευρέως μελετημένοι είναι οι Th1, Th2, Th17 και τα Tregs.

1.4.1 Th1 λεμφοκύτταρα

Τα Th1 λεμφοκύτταρα εμπλέκονται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων για την εξάλειψη των ενδοκυτταρικών παθογόνων [30]. Χαρακτηρίζονται κυρίως από την έκκριση της IFN-γ, της IL-2 και της Lfa (lymphotoxin *α*). Παράλληλα εκκρίνουν και άλλες κυτταροκίνες όπως τον TNF-α και τον GM-CSF (granulocyte-macrophage stimulating factor) [31]. Συμμετέχουν στις καθυστερημένου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας και προάγουν τις προφλεγμονώδεις αντιδράσεις. Επίσης προσελκύουν λευκοκύτταρα στην περιοχή της φλεγμονής και επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β κύτταρα [32]. Σύμφωνα με μελέτες τα Th1 λεμφοκύτταρα σχετίζονται με την εμφάνιση οργανοειδικής αυτοανοσίας [33].

Οι κυτταροκίνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων στη Th1 γραμμή διαφοροποίησης είναι IL-12 και η IFN-γ. Η IL-12 εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους και επάγει την έκκριση της IFN-γ από τα NK κύτταρα. Ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων είναι ο T-bet (T-box transcription factor 21). Ο T-bet όχι μόνο επάγει την παραγωγή της IFN-γ αλλά καταστέλλει τη διαφοροποίηση των Th2 και Th17 κυττάρων. Η έκφραση του T-bet επάγεται θετικά από το μεταγραφικό παράγοντα STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1) ο οποίος ρυθμίζεται θετικά από την IFN-γ [30] [34].

Ο T-bet δρα κατασταλτικά στην ανάπτυξη των Th2 λεμφοκυττάρων εμποδίζοντας την έκφραση της IL-4 και επηρεάζοντας αρνητικά τη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 (GATA-binding protein 3), ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων. Επίσης, ο T-bet καταστέλλει τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον υποκινητή του γονιδίου RORγ (RAR-related orphan receptor gamma) το οποίο κωδικοποιεί τον RORγt, τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα των Th17 κυττάρων [34] [35].

Ένας ακόμη σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων είναι ο Stat4, η έκφραση του οποίου επάγεται από την IL-12. Ο Stat4 επάγει την έκφραση της IFN-γ, δημιουργώντας με

αυτό τον τρόπο ένα θετικό μηχανισμό ανάδρασης (positive feedpack loop) για την περαιτέρω έκφραση του T-bet. Αν και οι μεταγραφικοί παράγοντες Stat4 και T-bet εμπλέκονται σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, πρέπει να δράσουν συντονισμένα προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων. Εκτός από τους Stat4 και T-bet, αποτελέσματα μελετών έχουν αποδείξει τη συμμετοχή των μεταγραφικών παραγόντων Runx1 (Runt-related transcription factor 1) , Runx3 και Hlx (H2.0-like homeobox transcription factor) στη θετική ρύθμιση των Th1 λεμφοκυττάρων [30] [36].

Ο T-bet εκτός από ενεργοποιητής έχει αποδειχθεί ότι κατέχει και ρόλο καταστολέα. Συγκεκριμένα, επάγει την έκφραση του μεταγραφικού καταστολέα Bcl-6 (B-cell lymphoma 6), καταστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση της IFN-γ σε μεταγενέστερα στάδια της Th1 διαφοροποίησης. Με αυτό τον τρόπο η έκφραση του T-bet λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός για την αποφυγή ανοσοπαθολογικών καταστάσεων [30].

1.4.2 Th2 λεμφοκύτταρα

Καθοριστικής σημασίας κυτταροκίνη για τη διαφοροποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων είναι η IL-4 η οποία λειτουργεί ως σήμα θετικής ανατροφοδότησης για τη διαφοροποίηση των πρόδρομων Th0 λεμφοκυττάρων σε Th2 λεμφοκύτταρα, αλλά και η IL-2 [30] [37]. Επίσης, τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν IL-5, IL-13 και IL-25. Τα Th2 κύτταρα είναι υπεύθυνα για την επαγωγή των αντιφλεγμονωδών αντιδράσεων και την παραγωγή αντισωμάτων, κυρίως των IgE. Επίσης εμπλέκονται στην εξάλειψη των εξωκυτταρικών παθογόνων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του άσθματος καθώς και άλλων αλλεργικών αντιδράσεων [37]. Η έκκριση της IL-4 επάγει την έκφραση του Stat6, βασικού μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκεται στη Th2 διαφοροποίηση. Ο Stat6 αυξάνει την έκφραση του GATA-3, του κύριου ρυθμιστή των Th2 λεμφοκυττάρων, ο οποίος δρα μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών. Ειδικότερα, προωθεί την παραγωγή Th2 κυτταροκινών, επάγει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των Th2 λεμφοκυττάρων μέσω της στρατολόγησης του

μεταγραφικού παράγοντα Gfi1 (Growth factor independence-1) και καταστέλλει τη διαφοροποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων είτε μέσω αλληλεπίδρασης με τον T-bet, είτε μέσω καταστολής του Stat4 [30] [38].

Σημαντικός για τη διαφοροποίηση των Th2 κυττάρων είναι και ο Stat5 ο οποίος ενεργοποιείται από την IL-2. Η συντονισμένη δράση του Stat5 με τον GATA-3 απαιτείται για την πλήρη διαφοροποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων. Ενεργό συμμετοχή στην Th2 διαφοροποίηση έχει και ο μεταγραφικός παράγοντας Stat3 [39] [40].

Επίσης η δράση κάποιων μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των c-Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma), IRF-4 (Interferon regulatory factor 4) και NFATc2 (nuclear factor of activated T cells c2) προάγουν τη διαφοροποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα, ο μεταγραφικός παράγοντας c-Maf ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή της IL-4, προωθώντας την Th2 διαφοροποίηση και οι μεταγραφικοί παράγοντες IRF-4 και NFATc2 δρουν συνεργιστικά για την ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-4 [30] [41] [42].

Τα Th2 λεμφοκύτταρα ανταγωνίζονται τη δράση των Th1 λεμφοκυττάρων καθώς οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της Th2 διαφοροποίησης ανταγωνίζονται και αναστέλλουν τη δράση των Th1 λεμφοκυττάρων και αντιστρόφως. Η διατήρηση της ισορροπίας στην έκκριση κυτταροκινών από τις δυο αυτές κατηγορίες Τ λεμφοκυττάρων είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργεία του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ η διατάραξή της μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως είναι τα αυτονάνοσα νοσήματα [30].

1.4.3 Th17 διαφοροποίηση

Τα Th17 λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την δημιουργία ανοσολογικών αποκρίσεων που στοχεύουν στην αντιμετώπιση εξωκυτταρικών παθογόνων. Επίσης εμπλέκονται στην παθογένεση αυτοάνοσων νοσημάτων συμπεριλαμβανομένης της σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣΚΠ), της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης και

του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου [43]. Χαρακτηρίζονται από την παραγωγή της IL-17, μιας προφλεγμονώδους κυτταροκίνης η οποία επάγει την έκκριση επιπλέον κυτταροκινών, χημειοκινών και προσταγλαδινών [44].

Στη διαφοροποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων ενεργό ρόλο έχουν οι κυτταροκίνες TGF-β , IL-6, IL-21 και IL-23, ενώ ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας είναι ο RORγt [30]. Εκτός από τη συμμετοχή του στη Th17 διαφοροποίηση, ο TGF-β συμμετέχει και στη διαφοροποίηση των iTreg. Όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις επάγει την παραγωγή του Foxp3 προάγοντας την ανάπτυξη των iTreg. Ωστόσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις και υπό την παρουσία της IL-6 επάγει την διαφοροποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων και αυξάνει την έκφραση της IL-21 και του υποδοχέα της IL-23. Επίσης παρουσία της IL-6, το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο εμπλέκεται ο TGF-β, οδηγεί στην ενεργοποίηση του RORγt του κύριο ρυθμιστή της Th17 διαφοροποίησης [45] [46].

Στην Th17 διαφοροποίηση συμμετέχει σύνολο επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των STAT3, Runx1, RORα καθώς και μελών της οικογένειας Smad (Mothers against decapentaplegic) [30]. Ο Stat3, ο οποίος ενεργοποιείται από τη σηματοδότηση μέσω των TGF-β, IL-6, IL-21 και IL-23, επάγει την έκφραση του RORγt και προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων της IL-17A και της IL-17F. Αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει ότι έλλειψη του Stat3 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του T-bet και του Foxp3 που καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων [47]. Ο μεταγραφικός παράγοντας RORα δρά συνεργιστικά με τον RORγt και προωθούν τη Th17 διαφοροποίηση [48]. Ο Runx1 έχει διττό ρόλο στην Th17 διαφοροποίηση. Ειδικότερα, με την επαγωγή του RORγt προωθεί τη διαφοροποίηση, ενώ όταν δρα συνεργιστικά με τον Foxp3 και τον T-bet την καταστέλλει.

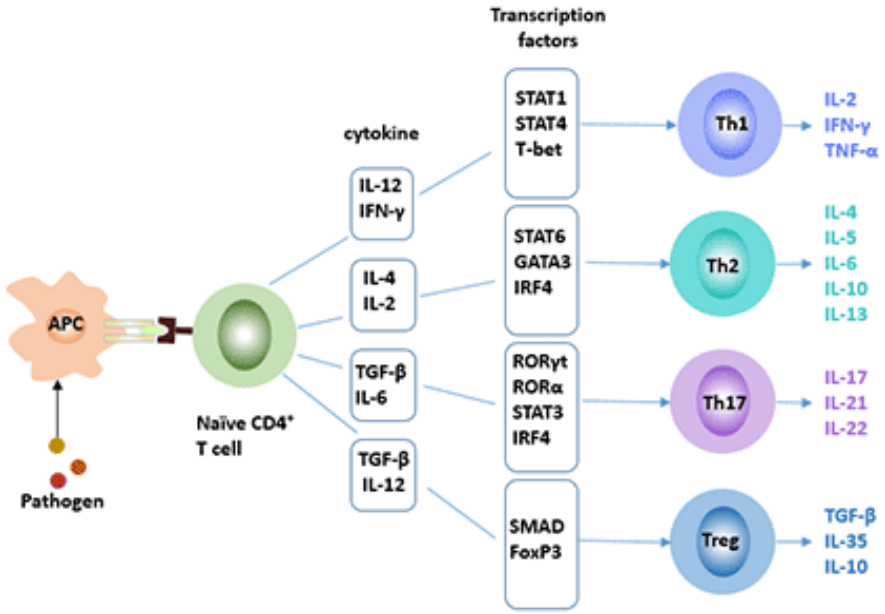
Σε αντίθεση με την Th1 και την Th2 διαφοροποίηση όπου οι χαρακτηριστικές τους κυτταροκίνες IFN-γ και IL-4 επάγουν την διαφοροποίησή τους, αντιστοίχως, η έκκριση της IL-17 δεν προάγει την Th17 διαφοροποίηση. Αντιθέτως, η IL-21 η οποία παράγεται από τα Th17 λεμφοκύτταρα δρα σε συνεργασία με τον TGF-β και προάγει τη διαφοροποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων [30] [49].

1.4.4 Tregs

Τα Tregs είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος. Για τη διαφοροποίησή τους απαραίτητη είναι η δράση του TGF-β. Ακολούθως της διέγερσης του TCR υποδοχέα, ο TGF-β διαδραματίζει καίριο ρόλο στη διαφοροποιήση των παρθενικών CD4+FOXP3- λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα. Καθοριστικής σημασίας για τη διαφοροποίηση των iTregs είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3 ο οποίος εκφράζεται ειδικά στην κατηγορία των Tregs. Η έκφραση του Foxp3 επάγεται από την σηματοδότηση του TGF-β [50].

Η δράση επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων, εκτός του Foxp3, απαιτείται για την διαφοροποίηση των Tregs [51]. Ενεργό συμμετοχή στη διαφοροποίηση των iTregs έχει ο Stat-5. Ο Stat5 ενεργοποιείται από την IL-2, η οποία προωθεί την ανάπτυξη, την επιβίωση και τη λειτουργία των Tregs στο θύμο και στην περιφέρεια. Ακολούθως της επαγωγής του από την σηματοδότηση μέσω IL-2, ο Stat5 προσδένεται στο γονίδιο του Foxp3 και επάγει την έκφρασή του [30] [50].

Η πιο καλά μελετημένη κατηγορία iTregs είναι τα Tr1, η διαφοροποίηση των οποίων επάγεται από την έκκριση της IL-10 και της IL-27. Η IL-27 ενεργοποιεί μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι απαιτούνται για τη Tr1 διαφοροποίηση. Στους μεταγραφικούς αυτούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι: c-Maf, ICOS (Inducible T cell co-stimulator) και AhR (Aryl hydrocarbon receptor) [50].



Εικόνα 1.4: Οι κυτταροκίνες και οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Th κυτταρικών υποπληθυσμών. (https://www.cusabio.com/c-20858.html)

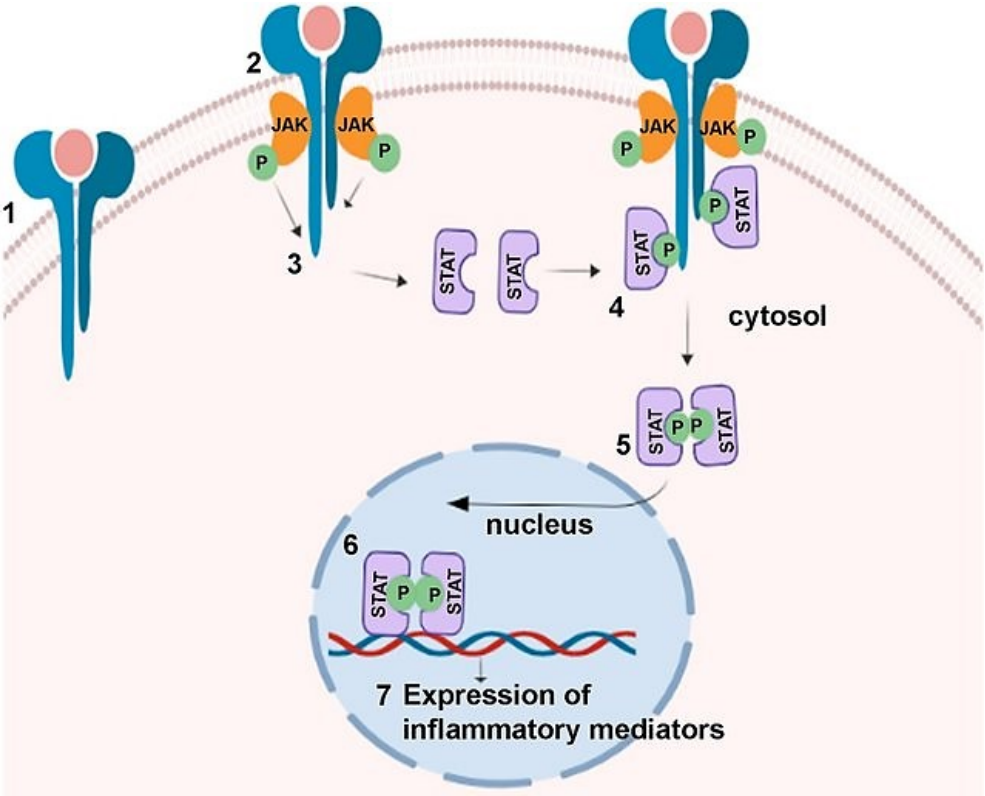
1.5 Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι διαλυτές πρωτεΐνες μικρού μοριακού μεγέθους οι οποίες εκκρίνονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα NK κύτταρα και ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις καθώς και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Διαφορετικοί τύποι κυττάρων μπορεί να εκκρίνουν την ίδια κυτταροκίνη ή μια κυτταροκίνη να δρα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους [52]. Οι κυτταροκίνες ταξινομούνται ανάλογα με το κύτταρο που τις εκκρίνει ή τη λειτουργία τους. Ειδικότερα οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα λευκοκύτταρα και δρούν σε άλλα λευκοκύτταρα χαρακτηρίζονται ως ιντερλευκίνες, αυτές που παράγονται από τα λεμφοκύτταρα ως λεμφοκίνες , ως μονοκίνες χαρακτηρίζονται αυτές που παράγονται από τα μονοκύτταρα και ως χημειοκίνες οι κυτταροκίνες οι οποίες έχουν χημειοτακτικές ιδιότητες [53].

Ο τρόπος δράσης των κυτταροκινών διακρίνεται σε αυτοκρινή (autocrine) στον οποίο οι κυτταροκίνες προσδένονται σε υποδοχείς του ίδιου του κυττάρου το οποίο τις εκκρίνει, σε παρακρινή (paracrine) κατά τον οποίο προσδένονται σε υποδοχείς κυττάρων-στόχων οι οποίοι βρίσκονται κοντά στο κύτταρο που τις εκκρίνει και τέλος σε ενδοκρινή (endocrine) όπου οι κυτταροκίνες προσδένονται σε υποδοχείς κυττάρων που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από το κύτταρο που τις εκκρίνει [54] [55].

Οι κυτταροκίνες ασκούν τη βιολογική τους δράση αφού προσδεθούν στον κατάλληλο υποδοχέα ο οποίος βρίσκεται στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, εκκινώντας έτσι την κυτταρική σηματοδότηση. Ειδικότερα όταν η κυτταροκίνη προσδεθεί στον υποδοχέα της, προκαλεί τον ομοδιμερισμό του. Ακολούθως οι κυτταροπλασματικές περιοχές των υπομονάδων του υποδοχέα αλληλεπιδρούν με μια ομάδα μορίων, τις Jak κινάσες. Ειδικότερα ο ενεργοποιημένος υποδοχέας φωσφορυλιώνει την Jak κινάση η οποία ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει μια σειρά πρωτεϊνών, μεταβιβάζοντας με αυτό τον τρόπο το μήνυμα που φέρει η κυτταροκίνη στο εσωτερικό του κυττάρου [56].

Ανάλογα με το ρόλο τους οι κυτταροκίνες ταξινομούνται σε προφλεγμονώδεις και σε αντιφλεγμονώδεις. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι IL-1 , IL-6, IL-12, TNF-α και IFN-γ (Interferon gamma), είναι απαραίτητες για την έναρξη της φλεγμονής και εισέρχονται στην κυκλοφορία για να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντιθέτως οι αντιφλεμονώδεις κυτταροκίνες όπως οι IL-4, IL10, IL-13 και ο TGF-β (Transforming Growth Factor-β) αναστέλλουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και κατ’ επέκταση τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις [57]. Αν και η κάθε κυτταροκίνη έχει συγκεκριμένο ρόλο δεν μπορεί να γίνει απόλυτος διαχωρισμός της λειτουργίας της από τις υπόλοιπες κυτταροκίνες. Συγκεκριμένα, το τελικό αποτέλεσμα δράσης της καθορίζεται από τις υπόλοιπες κυτταροκίνες, από την έκφραση και τη συγγένεια των υποδοχέων των κυττάρων στόχων οι οποίοι είναι ειδικοί για κάθε κυτταροκίνη, καθώς και από την συνολική κατάσταση ενεργοποίησης του κυττάρου-στόχου [58].



Εικόνα 1.5: Ενεργοποίηση του Jak-STAT μονοπατιού η οποία επάγεται από την πρόσδεση μιας κυτταροκίνης στον υποδοχέα της στο κύτταρο. Η πρόσδεση της κυτταροκίνης προκαλεί τον διμερισμό των πολυπεπτιδίων του υποδοχέα, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και τη φωσφορυλίωση της Jak κινάσης, ακολούθως της πρωτεΐνης STAT και την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης [59].

1. Εισαγωγή

Μέρος 2

2.1 Ets-2

Η πρωτεΐνη Ets-2 αποτελεί μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS, (E26 transformation-specific family) η οποία αριθμεί 28 μέλη αναγνωρισμένα μέχρι στιγμής στο ανθρώπινο γονιδίωμα [60]. Τα μέλη της Ets οικογένειας ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων μέσω μιας εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής σύνδεσης στο DNA, την περιοχή ets (ETS domain) [61]. Επίσης φέρουν μια ακόμη συντηρημένη δομή, την pointed περιοχή (pointed domain, PNT), η οποία συμμετέχει στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η ets περιοχή αποτελείται από τρεις α-έλικες και τέσσερις β-θηλιές οι οποίες έχουν τέτοια διάταξη ώστε να σχηματίζουν μορφή έλικας-θηλιάς-έλικας. Μέσω της τρίτης α-έλικας οι πρωτεΐνες της συγκεκριμένης οικογένειας προσδένονται στο DNA. Συγκεκριμένα, δια μέσω της ets περιοχής, οι Ets πρωτεΐνες αναγνωρίζουν αλληλουχίες υποκινητών διάφορων γονιδίων οι οποίοι φέρουν την αλληλουχία GGAA/T και προσδένονται σε αυτούς [62] [63]. Η ets περιοχή και οι αμινοξικές ακολουθίες που την περιβάλλουν επηρεάζουν την συγγένεια πρόσδεσης των πρωτεϊνών. Ο βαθμός πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA μπορεί να μεταβληθεί από την αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος στη περιοχή ets, η οποία μπορεί επίσης να επηρεάσει και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [63].

Το πρώτο μέλος της οικογένειας γονιδίων Ets (E26 transformation-specific) ήταν το γονίδιο v-ets2 , το οποίο αναγνωρίστηκε ως ογκογονίδιο στο ρετροϊό (E26) που προσβάλλει τα πτηνά. Ο συγκεκρικένος ρετροϊός είναι υπεύθυνος για την πρόκληση ερυθροβλαστικής και μυελοβλαστικής λευχαιμίας στα κοτόπουλα [64]. Ακολούθως της ανακάλυψης του v-ets2, αναγνωρίστηκαν, χαρακτηρίστηκαν και απομονώθηκαν ομόλογα γονίδια της οικογένειας από είδη φυλογενετικά απομακρυσμένα μεταξύ τους και ειδικότερα από το Caenorhabditis elegans και τη Drosophila melanogaster μέχρι τον άνθρωπο [65].

Τα μέλη της οικογένειας Ets λειτουργούν σαν μεταγραφικοί παράγοντες και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων στόχων που εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της μίτωσης, της διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, της απόπτωσης και της ρύθμισης της ανοσίας.

Ανάλογα με τα πρότυπα πρόσδεσής τους στο DNA, οι μεταγραφικοί παράγοντες Ets ταξινομούνται σε 4 κύριες κατηγορίες. Η πλειονότητά τους έχει την Ets περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ υπάρχουν και κάποια μέλη της οικογένειας Ets στα οποία η Ets περιοχή βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο [66]. Ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2 ανήκει στην πρώτη από τις τέσσερις κατηγορίες της οικογένειας Ets, όπως και ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-1, με τον οποίο παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία [60].

Η Ets-2 πρωτεΐνη αποτελείται από 469 αμινοξέα και το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Ets-2 βρίσκεται στη θέση q22.3 του χρωμοσώματος 21 και αποτελείται από 10 εξώνια. Ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος του ets-2 γονιδίου μπορούν να προκύψουν τρία διαφορετικά μετάγραφα RNA, τα οποία διαφέρουν στο μήκος του 3’ άκρου τους [67]. Ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά σε όλα τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αποτελέσματα πειραμάτων έδειξαν πως τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Ets-2 μεταβάλλονται αναλόγως της φάσης του κυτταρικού κύκλου, καθώς και μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων με την προσθήκη μιτογόνων. Έτσι πρότειναν ένα μοντέλο το οποίο υποστηρίζει ότι η μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που ενεργοποιούνται στην έναρξη της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται με τη ρύθμιση της ενεργότητας της πρωτεΐνης Ets-2 [68]. Η δραστικότητα της πρωτεΐνης πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσής της σε κατάλοιπα θρεονίνης μέσω του Ras/MAPK μονοπατιού ή μέσω του μονοπατιού φωσφατιδιλοϊνοσιτόλης 3-κινάσης/Akt [69].

Ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2 αρχικά εκφράζεται κατά της διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης όπου κατέχει αναπόσπαστο ρόλο καθώς ρυθμίζει την σωστή ανάπτυξη της τροφοβλάστης [70] [71]. Υπερέκφρασή του σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση κρανιοπροσωπικών και σκελετικών δυσμορφιών, ενώ μετάλλαξη του γονιδίου στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA οδηγεί σε πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα η οποία οφείλεται κυρίως σε μη σωστή ανάπτυξη της τροφοβλάστης [70]. Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος του Ets-2 στη διαφοροποίηση των μακροφάγων. Ειδικότερα, η έκφρασή του επάγεται από την έκκριση του παράγοντα M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) και υπερέκφραση του σε

ανώριμες μυελοειδείς κυτταρικές σειρές μπορεί να οδηγήσει στη διαφοροποίηση των κυττάρων σε μακροφάγα [72].

Μελέτες υποδεικνύουν την συμμετοχή του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων μέσω της ρύθμισης γονιδίων, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου συμπεριλαμβανομένων αυξητικών παραγόντων, μορίων προσκόλλησης, εξωκυτταρικών πρωτεασών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων [73] [74]. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ets-2 στην κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου BRCA1 (Breast cancer type 1), στον υποκινητή του οποίου έχει αναγνωριστεί περιοχή πρόσδεσης του Ets-2 [75]. Ωστόσο ο Ets-2 μπορεί να δρα και ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Ειδικότερα, σε περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη και καρκίνου του πνεύμονα ο Ets-2 αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη των όγκων αλλά και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [76] [77].

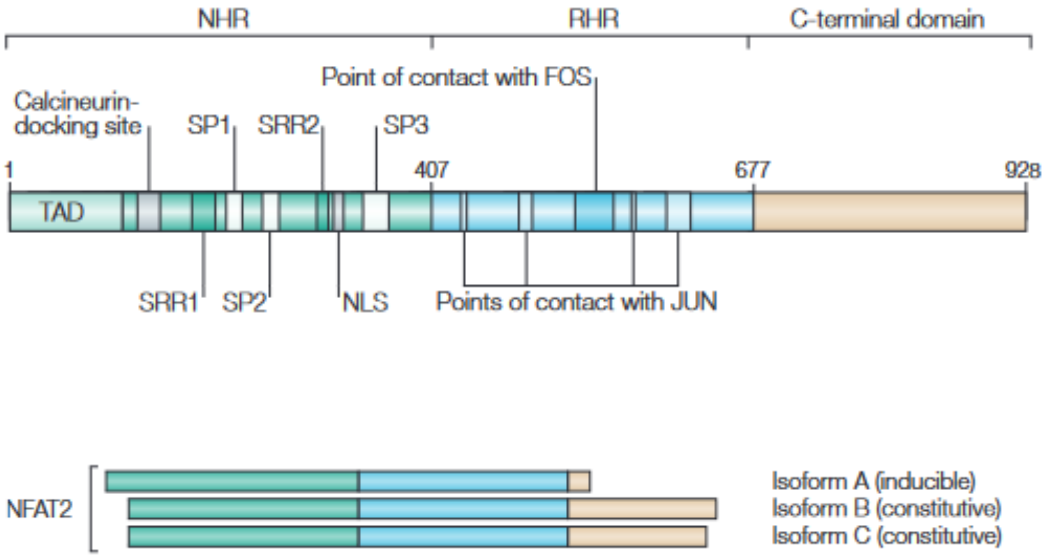
Ο Ets-2 κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων των κυτταροκινών στα Τ λεμφοκύτταρα. Αποτελέσματα μελέτης του εργαστηρίου μας δείχνουν πως ο παράγοντας Ets-2 λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής του γονιδίου της IL-2 στα παρθενικά Th κύτταρα, μέσω της πρόσδεσής του στην περιοχή ARRE-2 (antigen response element 2) η οποία εκτείνεται από τις θέσεις -292 έως -273 του υποκινητή της IL-2. Ο Ets-2 παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα και προσδένεται στην ARRE-2 αλληλουχία, καταστέλλοντας την έκφραση της IL-2. Ωστόσο κατά την ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων, ο Ets-2 μετακινείται στην ARRE-1 αλληλουχία, χάνει την κατασταλτική του δράση ενώ παράλληλα μειώνονται τα επίπεδα έκφρασής του και αυξάνεται η έκφραση της IL-2 [78]. Ο Ets-2 ρυθμίζει την έκφραση επιπλέον κυτταροκινών οι οποίες έχουν θέσεις πρόσδεσης του Ets-2 στον υποκινητή τους και συγκεκριμένα της IL-4 και της IFN-α [79] [80]. Αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έχουν δείξει επίσης ότι ο Ets-2 συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής του HIV-1 (Human immunodeficiency virus type-1). Ειδικότερα, η έκφραση του HIV-1, καταστέλλεται στα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα, μέσω της πρόσδεσης του Ets-2 στην RATS (Repressor Activator Target Sequence) αλληλουχία του HIV-1-LTR [79].

2.2 NFAT (Nuclear factor of activated T cells)

Ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT2 ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NFAT η οποία αποτελείται από πέντε μέλη: NFAT1 (NFATc2; NFATp), NFAT2 (NFATc1; NFATc), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3; NFATx) και NFAT5 (TonEBP; OREBP). Τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας είχαν μελετηθεί αρχικά στα Τ λεμφοκύτταρα λόγω της ικανότητας πρόσδεσης στην ARRE-2 περιοχή του υποκινητή της IL-2, όπου έχει αποδειχθεί ότι δρουν επαγωγικά στη ρύθμιση της μεταγραφής της. Σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών η καταστολή της έκφρασης είτε του NFAT1 είτε του NFAT2 δεν επηρεάζει την έκφραση της IL-2, ωστόσο η αποσιώπηση και των δύο ισομορφών οδηγεί σε καταστολή της έκφρασής της. Σε επόμενες μελέτες αποδείχθηκε η εμπλοκή των NFAT πρωτεϊνών στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της ενεργοποίησης και της διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων [81] [82]. Ο NFAT2 εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα περιφερικά Τ λεμφοκύτταρα και ρυθμίζει την έκφραση των κυτταροκινών IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, και IFN-γ. Επίσης προσδένεται στους υποκινητές των CD40L και CD95L και ρυθμίζει την έκφρασή τους, υποδηλώνοντας την συμμετοχή του στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση των Τ λεμφοκυττάρων [83].

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας NFAT αποτελούνται από δυο περιοχές οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (TAD-transcriptional activation domain), εκ των οποίων η μια περιοχή βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και η άλλη περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο. Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA, DBD (DNA-binding domain), η οποία λόγω συγγένειας με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας REL, ονομάζεται και RHR (Rel-homology region). Τα μέλη NFAT1-4 τα οποία ρυθμίζονται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού ασβεστίου/καλσινευρίνης, αποτελούνται επίσης από τη ρυθμιστική περιοχή NHR (NFAT-homology region) στην οποία βρίσκονται οι περιοχές πρόσδεσης της καλσινευρίνης, μια αλληλουχία σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS-nuclear localization sequence), καθώς και ένα σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES-nuclear export

signal) [84]. Ακόμη περιλαμβάνονται και κατάλοιπα σερίνης τα οποία είναι φωσφορυλιωμένα στα εν ηρεμία κύτταρα [85].



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής δομής του μεταγραφικού παράγοντα NFAT, καθώς και των ισομορφών του NFAT2 που προκύπτουν λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Οι NFAT παράγοντες αποτελούνται μια αμινοτελική και μια καρβοξυτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, τις TAD-N και TAD-C, αντίστοιχα και την υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA, RHR. Οι πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζονται μέσω του μονοπατιού ασβεστίου/καλσινευρίνης αποτελούνται από την περιοχή ενεργοποίησης NHR, η οποία περιλαμβάνει τα σήματα NLS και NES. Τα κατάλοιπα σερίνης τα οποία αποφωσφορυλιώνονται μετά την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης εντοπίζονται στις παρακάτω περιοχές: SRR1, SRR2, SP1, SP2 και SP3. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον NFAT παρατίθενται πάνω από κάθε σχετική περιοχή [84].

Ο NFAT2 ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι ασβεστίου/καλσινευρίνης το οποίο είναι καθοριστικής σημασίας για τη μετάδοση σήματος από την επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, στα εν ηρεμία κύτταρα, κατάλοιπα σερίνης της NHR περιοχής είναι φωσφορυλιωμένα, με αποτέλεσμα ο NFAT2 να βρίσκεται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα [86]. Σύνολο κινασών συμπεριλαμβανομένων των JNK (c-Jun N-terminal kinases), GSK3 (glycogen-synthase kinase 3) και της CK1 (casein kinase 1), ελέγχουν την παραμονή του NFAT2 στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία κάποιου αντιγόνου επάγει την έναρξη σηματοδότησης μέσω του TCR υποδοχέα. Ως αποτέλεσμα ενεργοποιούνται οι PTKs (Protein tyrosine kinases) που

οδηγούν στην ενδοκυτταρική αύξηση των ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}) και στην επακόλουθη ενεργοποίηση μέσω της φωσφατάσης καλσινευρίνης μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου του NFAT2, ο οποίος ενεργοποιείται μεταφέρεται στον πυρήνα όπου εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων στόχων [84] [86].

Εκτός από το σηματοδοτικό μονοπάτι της καλσινευρίνης, επιπλέον μηχανισμοί ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NFAT. Στους μηχανισμούς αυτούς συμπεριλαμβάνεται η ρύθμιση από τις πρωτεΐνες HOMER 2 (Homer protein homolog 2) και HOMER 3 (Homer protein homolog 3) που ενεργοποιούν τον NFAT, ανταγωνιζόμενοι την δράση της καλσινευρίνης και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [87] [88]. Επίσης η μια από τις δυο ισομορφές του NFAT2, ο NFATc1/A υπόκεινται σε έναν επιπλέον μηχανισμό αυτορρύθμισης σε μεταγραφικό επίπεδο. Ειδικότερα η ρύθμιση της έκφρασης του NFATc1/A πραγματοποιείται μέσω του υποκινητή P1, του οποίου η δραστηριότητα ρυθμίζεται από τον ίδιο τον NFAT ο οποίος προσδένεται στο P1 και επάγει την έκφρασή του NFATc1/A. Ο μηχανισμός της θετικής αυτορρύθμισης επεξηγεί το λόγο που ο NFAT2 είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας της NFAT οικογένειας ο οποίος βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και συμμετέχει στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων [83] [89].

2.3 NF-κB (Nuclear factor-kappa B)

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB p65 ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Rel/NF-κB, τα μέλη της οποίας εκτελούν τη λειτουργία τους σχηματίζοντας είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή. Τα μέλη της οικογένειας NF-κB χωρίζονται σε δυο υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες NF-κB1 (p50; p105) και NF-κB2 (p52; p100). Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες NF-κβ1/p105 και NF-κB2/p100 είναι οι ανενεργές πρόδρομες μορφές των πρωτεϊνών p50 και p52 αντίστοιχα, οι οποίες υφίστανται πρωτεόλυση με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή των ώριμων πρωτεϊνών p50 και p52. Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες RelA (p65), RelB, c-Rel. Το ετεροδιμερές το οποίο αποτελείται από την

υπομονάδα p65 συνδεδεμένη με την υπομονάδα p50 ή την p52 αποτελεί την επικρατέστερη ενεργοποιημένη μορφή του NF-κB. Αναλόγως του σχηματισμού ομοδιμερών ή ετεροδιμερών, οι NF-κB πρωτεΐνες εκτελούν διαφορετικές βιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα τα διμερή τα οποία αποτελούνται από τις υπομονάδες p65 ή c-Rel έχουν επαγωγικές ιδιότητες, σε αντίθεση με τα ομοδιμερή των υπομονάδων p50 και p52 τα οποία καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων [90].

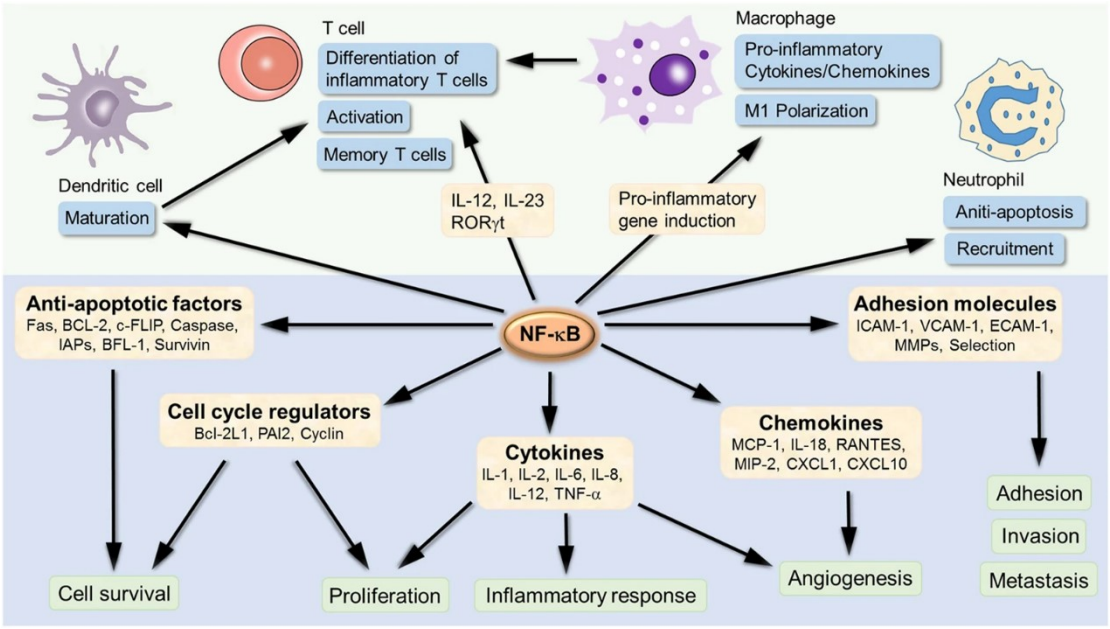
Οι NF-κB πρωτεΐνες κατέχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας, της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων. Η δράση του NF-κB p65 ενέχει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων, επάγοντας την έκφραση της IL-12, η οποία προάγει την Th1 διαφοροποίηση [91]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας NF-κB συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση της λειτουργίας των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων, των θυμοκυττάρων, και των ινοβλαστών. Ακόμη, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων τα οποία ελέγχουν τις διεργασίες της κυτταρικής ανάπτυξης και αύξησης καθώς και την έκφραση γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν ανοσολογικές και φλεγμονώδεις κυτταρικές διεργασίες που επιτελούνται ως απάντηση στη μόλυνση και στον τραυματισμό. Τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας ενεργοποιούνται ως αποτέλεσμα της δράσης κυτταροκινών, παθογόνων μορίων καθώς και άλλων στρεσογόνων καταστάσεων [92]. Μη σωστή ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών του NF-κB καθώς και συνεχής ενεργοποίησή του συνδέεται με την εμφάνιση φλεγμονωδών αντιδράσεων, διαφόρων τύπων καρκίνου, καθώς και αυτοάνοσων νοσημάτων συμπεριλαμβανομένων της ΣΚΠ και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [92] [93].

Κοινό γνώρισμα των μελών της NF-κB οικογένειας είναι η περιοχή RHR η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για τον διμερισμό των πρωτεϊνών όσο και για την πρόσδεση στο DNA. Ειδικότερα οι NF-κB παράγοντες αναγνωρίζουν και προσδένονται στην αλληλουχία GGGRNNYYCC(R: purine, Y: pyrimidine, N: any base), η οποία ονομάζεται θέση σύνδεσης κB. Αναλόγως της τελικής μορφής της αλληλουχίας κB, καθορίζονται οι υπομονάδες που θα σχηματίσουν τον NF-κB [94]. Στην RHR περιοχή περιλαμβάνεται επίσης το NLS σήμα. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB p65 καθώς

και τα υπόλοιπα μέλη της δεύτερης υποομάδας αποτελούνται από μια TAD περιοχή στο καρβοξυτελικό τους άκρο μέσω της οποίας ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ο NF-κB p65 αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών CBEP (cytoplasmic polyadenylation element binding protein) και p300 για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων. Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν στην πρώτη υποομάδα αντί της περιοχής TAD, διαθέτουν την περιοχή ARD (ankyrin repeat–containing domain) η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα επαναλήψεων αγκυρίνης [92].

Σε συνθήκες ηρεμίας ο NF-κB παραμένει σε ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα λόγω της πρόσδεσής του με τον αναστολέα του IκB (inhibitors of kB), χαρακτηριστικό του οποίου είναι η δομή επαναλήψεων «αγκυρίνης» [93]. Η δράση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs-Pathogen Associated Molecular Patterns) ενεργοποιεί το κλασσικό σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν κυρίως τα διμερή p50/p65 και p50/c-Rel. Το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποιείται επίσης από μόρια συνδέτες τα οποία προσδένονται στους TCR, καθώς και στους BCR (B-cell receptor) όπως και στους IL-1R, στους TNFR 1/2 και στους TLR (Toll- like receptor). Η ενεργοποίηση του κλασσικού σηματοδοτικού μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κινασών IKK (IκB kinase) οι οποίες φωσφορυλιώνουν τους αναστολείς IκB οι οποίοι υφίστανται ουβικουιτίνωση και αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα και την επακόλουθη μετανάστευση των διμερών p50/p65 και p50/c-Rel στον πυρήνα όπου ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, χημειοκίνες καθώς και αντιαποπτωτικά γονίδια [90] [95]. Το κλασσικό μονοπάτι σηματοδότησης κατέχει σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση και η επακόλουθη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων είναι απαραίτητη ώστε τα φλεγμονώδη κύτταρα και τα φαγοκύτταρα να μεταναστεύσουν στους ιστούς όπου εισβάλλοντες μικροοργανισμοί έχουν οδηγήσει στην ενεργοποίηση του NF-κB [96].

Εκτός από το κλασσικό σηματοδοτικό μονοπάτι, συνδέτες που προσδένονται στους TNFR ενεργοποιούν το εναλλακτικό μονοπάτι σηματοδότησης, το οποίο δεν έχει σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των ΙκΒα αλλά του NF-κB2/p100. Αποτέλεσμα δράσης του εναλλακτικού μονοπατιού είναι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών ΙΚΚα οι οποίες επάγουν τη φωσφορυλίωση την πρωτεΐνης NF-κB2/p100 την επακόλουθη ουβικουιτίνωση και πρωετασωμική αποικοδόμηση του C-τελικού αναστολέα, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή της υπομονάδας p52, η οποία μετατοπίζεται στον πυρήνα συνδεδεμένη συνήθως με την υπομονάδα RelB [90]. Ενώ το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι εμπλέκεται σε όλες τις ανοσολογικές αποκρίσες, το εναλλακτικό μονοπάτι σηματοδότησης φαίνεται να λειτουργεί συμπληρωματικά και να συνεργάζεται με το κανονικό μονοπάτι στη ρύθμιση συγκεκριμένων λειτουργιών της επίκτητης ανοσίας [91].



Εικόνα 1.7: Τα γονίδια-στόχοι του NF-κB τα οποία εμπλέκονται στην εξέλιξη και στην ανάπτυξη της φλεγμονής. Μετά την ενεργοποίησή του ο NF-κB ρυθμίζει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις όχι μόνο άμεσα μέσω αύξησης της παραγωγής φλεγμονωδών κυταροκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης, αλλά και μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μορφογένεση και τη διαφοροποίηση [91].

2.4 AP-1 (Activator protein 1)

Ο AP-1 είναι ένας από τους πρώτους μεταγραφικούς παράγοντες που ανακαλύφτηκαν στα θηλαστικά. Οι πρωτεΐνες που αποτελούν τον AP-1 χαρακτηρίζονται ως bZIP πρωτεΐνες (basic leucine-ZIpper proteins), επειδή διμερίζονται μέσω ενός μοτίβου-φερμουάρ λευκίνης και ταξινομούνται σε τέσσερις βασικές οικογένειες: την οικογένεια Jun (c-Jun, JunB, JunD), την οικογένεια Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 και Fra-2), την οικογένεια ATF (activating transcription factor, ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) και την οικογένεια Maf (c-Maf, MafA, MafB, MafG/F/K και Nrl-neural retina leucine zipper) [97]. Βασικό χαρακτηριστικό των AP-1 συμπλόκων είναι η ετερογένεια που παρουσιάζουν στο σχηματισμό διμερών. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες Jun μπορούν να σχηματίζουν τόσο ομοδιμερή όσο και ετεροδιμερή με μέλη των οικογενειών Fos και ATF, ενώ οι πρότεινες Fos σχηματίζουν μόνο ετεροδιμερή. Οι πρωτεΐνες Nrl και c-Maf έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη c-Jun η οποία είναι προϊόν του ογκογονιδίου c-Jun και έχει χαρακτηριστεί ως το πιο δραστικό μέλος και ο πιο ισχυρός μεταγραφικός ενεργοποιητής του συμπλόκου, καθώς και με την πρωτεΐνη c-Fos, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Maf τα οποία σχηματίζουν διμερή μόνο με το c-Fos [98] .

Μέσω του διμερισμού τους, οι AP-1 πρωτεΐνες προσδένονται στο DNA και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ειδικότερα, αναλόγως των πρωτεϊνών που απαρτίζουν το κάθε διμερές η AP-1 πρωτεΐνη αναγνωρίζει και προσδένεται με διαφορετική συγγένεια στο ρυθμιστικό στοιχείο TRE (TPA response element: 5’-TGAG/CTCA-3’) ή στο ρυθμιστικό στοιχείο CRE (cAMP response element 5’-TGACGTCA-3’). Αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει ότι το διμερές Jun/Fos προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην αλληλουχία TPA, ενώ το διμερές Jum/ATF στην αλληλουχία CRE [99].

Ο c-Jun, ο c-Fos, όπως και τα υπόλοιπα μέλη που απαρτίζουν τον AP-1 συμμετέχουν στη ρύθμιση ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων καθώς και στην ογκογένεση. Επίσης εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλαπλών κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της

διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της επιβίωσης των κυττάρων [97]. Η δράση τους επάγεται από τη δράση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, νευροδιαβιβαστών και πολυπεπτιδικών ορμονών, καθώς και από περιπτώσεις φυσικού και χημικού στρες όπως από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και από βακτηριακές και ιικές μολύνσεις [100].

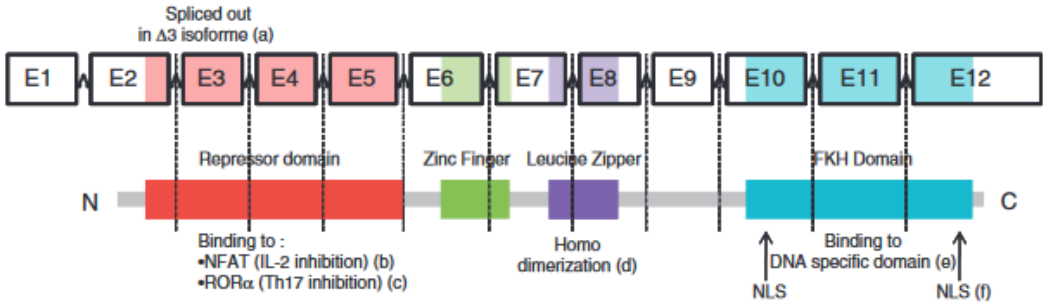
Η δραστικότητα του AP-1 ρυθμίζεται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, με βασικότερο μηχανισμό το μονοπάτι των JNK κινασών, μέσω ελέγχου της σύνθεσης και της σταθερότητας του mRNA, μέσω αλλαγών στη μεταγραφή των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν τις υπομονάδες του, καθώς και μέσω της αλληλεπίδρασής του με σύνολο μεταγραφικών παραγόντων. Το μονοπάτι των JNK κινασών είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της πρωτεΐνης c-Jun. Ειδικότερα, οι JNK κινάσες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των MAP κινασών (Mitogen-activated protein kinase), αφού ενεργοποιηθούν από τις MAP κινάσες, μεταναστεύουν στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη c-Jun στο αμινοτελικό της άκρο και συγκεκριμένα φωσφορυλιώνουν αμινοξέα σερίνης, θρεονίνης στις θέσεις 63, 73 και 91, 93 αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Όμως για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης c-Jun είναι απαραίτητη και η αποφωσφορυλίωση τουλάχιστον μιας εκ των δυο θέσεων που υπάρχουν στο καρβοξυτελικό άκρο [100]. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του c-Jun έχει συσχετισθεί με σύνολο παθολογικών καταστάσεων. Σε πολλούς τύπους καρκίνου έχει βρεθεί αυξημένη ενεργότητα των JNK κινασών και υψηλά ποσοστά φωσφορυλιωμένου c-Jun [101].

Οι JNK κινάσες εκτός από τη φωσφορυλίωση των Jun πρωτεϊνών, φωσφορυλίωνουν και πρωτεΐνες της οικογένειας ATF οι οποίες σχηματίζουν διμερή με το c-Jun. Εκτός από το μονοπάτι των JNK κινασών, στη ρύθμιση του AP-1 συμμετέχει το μονοπάτι των ERK κινασών το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Fos. Σύμφωνα με μελέτες, οι κινάσες FRK (Fos-related kinase), RSK (ribosomal S6 kinase), καθώς και η p38 εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της δραστικότητας του AP-1 [100].

2.5 Foxp3 (Forkhead box P3)

Ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3 ο οποίος ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Fox, είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη και λειτουργία των Τ ρυθμιστικών κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας και της κατασταλτικής λειτουργίας τους [13]. Η έκφραση του Foxp3 είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά κύτταρα στο θύμο. Εκτός από το ρόλο τους στη διαφοροποίηση των Tregs, η συνεχής έκφραση του Foxp3 σε ώριμα Tregs είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ανοσοκατασταλτικής λετουργίας τους, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης ειδικών δεικτών των Tregs συμπεριλαμβανομένων των CD25 και CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) και της καταστολής της έκφρασης της IL-2 και της IFN-a [102] [103]. Η απορρύθμιση της έκφρασης του Foxp3 μπορεί να διαταράξει την ομαλή λειτουργία των Tregs και να επηρεάσει αρνητικά την ικανότητά τους να καταστέλλουν αποτελεσματικά τις ανοσολογικές αποκρίσεις οδηγώντας στην ανάπτυξη αυτοάνοσων ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του διαβήτη τύπου-1, της αυτοάνοσης ηπατίτιδας και της ΣΚΠ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του Foxp3 στον άνθρωπο, μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση του συνδρόμου IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome), μιας σοβαρής αυτοάνοσης διαταραχής [18].

Το γονίδιο Foxp3 βρίσκεται στο βραχύ άκρο του Χ χρωμοσώματος, αποτελείται από 11 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 431 αμινοξέων [104]. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από μια περιοχή πλούσια σε προλίνες η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική καταστολή γονιδίων στόχων, ένα δάκτυλο ψευδαργύρου, ένα δομικό μοτίβο φερμουάρ λευκίνης το οποίο δίνει τη δυνατότητα ομοδιμερισμού ή ετεροδιμερισμού, και την συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA, FKH (forkhead domain), μέσω της οποίας γίνεται η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων στόχων και η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο [104] [105].



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση της δομής καθώς και των περιοχών που απαρτίζουν το γονίδιο και την πρωτεΐνη Foxp3 και περιγραφή των κύριων λειτουργιών που επιτελούν [104].

Ο Foxp3 είναι μέρος ενός μοριακού συμπλόκου μεγέθους περίπου 600 kDa, το οποίο αποτελείται από μεταγραφικούς παράγοντες σημαντικούς για τη λειτουργία των Τ λεμφοκυττάρων, ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs-histone acetyl transferases) και αποακετυλάσες ιστονών (HDACs-histone deacetylase) [104]. Σύμφωνα με μελέτες η αλληλεπίδραση του Foxp3 με μέλη της οικογένειας HAT έχει κυρίως επαγωγική δράση στη ρύθμιση γονιδίων στόχων, ενώ η αλληλεπίδρασή του με μέλη της οικογένειας HDAC έχει κατασταλτική δράση [106]. Παραδείγματα επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στο σύμπλοκο είναι ο NFAT, ο NF-κB και ο Runx1 [13] [14].

Πριν την έναρξη της μεταγραφής του Foxp3, τα πρόδρομα Tregs λαμβάνουν σήματα μέσω του TCR, του CD28 και μέσω μελών της υπεροικογένειας TNFR τα οποία επάγουν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των NFAT c-Rel και AP-1 οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την έναρξη της μεταγραφής του Foxp3. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες προσδένονται στον υποκινητή του Foxp3 και επάγουν την μεταγραφή του. Η ρύθμιση της έκφρασης του Foxp3 πραγματοποιείται επίσης μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της IL-2/ STAT5 αλλά και του TGF-β [14]. Ωστόσο η δράση κάποιων προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως των IL-4,IL-6, IL-27, TNF-α και της IFN-γ εμποδίζουν την επαγόμενη μέσω TGF-β αύξηση της έκφρασης του Foxp3 [107]. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η ρύθμιση της έκφρασης του Foxp3 μπορεί να γίνει μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι η φωσφορυλίωση, η μεθυλίωση, η ουβικουιτίνωση και η ακετυλίωση [14] [108].

Εκτός από τα ρυθμιστικά κύτταρα, στα οποία παρατηρείται η μεγαλύτερη έκφραση του Foxp3, μικρότερη έκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε $CD8^+$ Τ κύτταρα, σε διπλά θετικά αλλά και σε διπλά αρνητικά θυμοκύτταρα. Τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν Foxp3 και χαρακτηρίζονται είτε από υψηλή είτε από χαμηλή έκφραση CD25 ή ακόμη και από έλλειψη έκφρασης CD25 εμφανίζουν κοινό μεταγραφικό μοτίβο και ισχυρή κατασταλτική δράση [109].

2.6 GATA-3 (GATA-binding protein 3)

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-3 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA, οι οποίοι προσδένονται στην αλληλουχία WGATAR (όπου W = A/T και R = A/G) μέσω δυο επικρατειών με χαρακτηριστική δομή δακτύλου ψευδαργύρου. Η οικογένεια GATA αποτελείται από έξι συντηρημένα μέλη τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο ομάδες. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες: GATA-1, GATA-2, GATA-3 οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των αιμοποιητικών παραγόντων και τους GATA-4, GATA-5 και GATA-6 οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των ενδοδερμικών παραγόντων [110].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα GATA-3 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 443 αμινοξέων. Ο GATA-3 αποτελείται από δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής TA1 και TA2 (Transactivation domain 1,2) , οι οποίες εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο και τις δυο δομές δακτύλου ψευδαργύρου ZF1 και ZF2 (Zinc-finger motif 1,2) που ακολουθούνται από μια υψηλά συντηρημένη βασική περιοχή που συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας του GATA-3. Η δομή δακτύλου ψευδαργύρου που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο ενέχει πιο σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση στο DNA, ενώ η δομή η οποία εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει την πρόσδεση στο DNA καθώς και τις αλληλεπιδράσεις με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [111].

Ο GATA-3 είναι το κυρίαρχο μέλος της οικογένειας GATA και εκφράζεται κυρίως στα θυμοκύτταρα και στα Τ λεμφοκύτταρα. Είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων και ανταγωνίζεται τη δράση του T-bet, του κύριου μεταγραφικού παράγοντα της Th1 διαφοροποίησης, καταστέλλοντας την έκφραση της IFN-γ. Επίσης εμπλέκεται σε αλλεργικές αντιδράσεις, καθώς και στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι παρασιτικών λοιμώξεων και η έκφρασή του αυξάνεται μέσω της Stat6 εξαρτώμενης έκκρισης της IL-4 [111]. Ο GATA-3 κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων και στην εμβρυική ανάπτυξη όπου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας μιας ποικιλίας ιστών [110]. Επίσης είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστικού αδένα και συγκεκριμένα για τη διαφοροποίηση και τη δέσμευση των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού. Σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα της κλινικής έκβασης της νόσου, καθώς παρατηρείται προοδευτική απώλεια της έκφρασής του κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της.

Η ρύθμιση του GATA-3 πραγματοποιείται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης και της ουβικουιτίνωσης. Το μονοπάτι των RAS-ERK (Extracellular signal-regulated kinase) - MAPK κινασών ρυθμίζει τη σταθερότητα του GATA-3 στα Τ λεμφοκύτταρα μέσω αναστολής της δράσης της Mdm2 E3 λιγάσης και της ουβικουιτίνωσης και επακόλουθης αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα. Για να ρυθμίσει ο GATA-3 την έκφραση γονιδίων στόχων θα πρέπει να μεταναστεύσει από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αυτό επιτυγχάνεται μέσω του σήματος NLS που διαθέτει και της πρόσδεσης της ιμπορτίνης α στον GATA-3 που έχει καταλυτικό ρόλο για τη μετατόπισή του στον πυρήνα. Η συγγένεια του GATA-3 για την ιμπορτίνη-α ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση p38. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κορτικοστεροειδή τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των αλλεργικών ασθενειών αναστέλλουν τη δράση του GATA-3 στα Τ λεμφοκύτταρα ανταγωνιζόμενα την πρόσδεση στην ιμπορτίνη α και επάγοντας την έκφραση του αναστολέα του p38. Σημαντική επίσης είναι η αλληλεπίδραση του GATA-3 με σύνολο μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι διευκολύνουν την λειτουργία του και την πρόσδεσή του στα

γονίδια-στόχους με σκοπό τη ρύθμιση της έκφρασής τους. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί ο Smad3, ο οποίος έχει καταλυτικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των Th2 τύπου κυτταροκινών μέσω του GATA-3 [112].

2.7 T-bet (T-box transcription factor, TBX21)

Ο μεταγραφικός παράγοντας T-bet, ο οποίος ονομάζεται επίσης και TBX21, κωδικοποιείται από το TBX21 γονίδιο. Ο T-bet είναι μέλος μιας φυλογενετικά συντηρημένης οικογένειας γονιδίων που διαθέτουν μια κοινή περιοχή πρόσδεσης στο DNA, το T-box. Μέσω του T-box ο T-bet προσδένεται στην αλληλουχία TCACACCT ως διμερές και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του.

Ο T-bet μέσω των διάφορων λειτουργιών που επιτελεί κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διαφοροποίησης των Τ λεμφοκυττάρων. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του έχουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με κύριο αυτόν της φωσφορυλίωσης. Η βασική λειτουργία του είναι η επαγωγή της Th1 διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, ο T-bet, η έκφραση του οποίου αυξάνεται ουσιαστικά με την διέγερση του TCR, προσδένεται στον υποκινητή της IFN-γ και ενεργοποιεί τη μεταγραφή της [113]. Τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν T-bet. Η IFN-γ επάγει την έκφραση του T-bet δημιουργώντας ένα θετικό μηχανισμό ανάδρασης κατά την Th1 διαφοροποίηση. Ειδικότερα, η IFN-γ προσδένεται στον υποδοχέα της και επάγει την ενεργοποίηση του Stat1 και του T-bet ο οποίος διεγείρει άμεσα τη μεταγραφή της IFN-γ καθώς και την υπομονάδα β2 του υποδοχέα της IL-12 που επάγει την περεταίρω παραγωγή της IL-12 μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της IL-12 και του STAT4. Εκτός της ρύθμισης της έκφρασης της IFN-γ, ο T-bet ρυθμίζει την έκφραση της IL-2. Ειδικότερα κατά την ανάπτυξη των Th1 λεμφοκυττάρων ο T-bet λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής της IL-2, καθώς αλληλεπιδρά με την υπομονάδα RelA του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και εμποδίζει την πρόσδεσή της στον υποκινητή της IL-2 και την επακόλουθη ενεργοποίηση της [114]. Κατασταλτικός είναι ο ρόλος του T-bet στην έκφραση Th2 τύπου κυτταροκινών.

Αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει ότι η εξωγενής προσθήκη του T-bet σε Th λεμφοκύτταρα καταστέλλει την παραγωγή των IL-4,IL-5 και IL-23 μέσω καταστολής του GATA-3 [34].

Ο μεταγραφικός παράγοντας T-bet ενέχει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας αλλά και στη ρύθμιση χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών όπως είναι το άσθμα, καθώς απώλεια έκφρασης του T-bet οδηγεί στην εμφάνιση συμπτωμάτων άσθματος. Ωστόσο, η έκφραση του T-bet μπορεί να επιδεινώσει την ανάπτυξη φλεγμονωδών διαταραχών και αυτοάνοσων ασθενειών όπως είναι η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και ο διαβήτης τύπου 1. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι αυτοάνοσες αυτές διαταραχές παρουσιάζουν βελτιωμένη κλινική εικόνα απουσία έκφρασης του T-bet. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο συντονισμός των ανοσολογικών αποκρίσεων μέσω ρύθμισης της έκφρασης του T-bet θα μπορούσε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα για ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα ή από άσθμα [113] .

2.8 RORγt (RAR-related orphan receptor γt)

Ο μεταγραφικός παράγοντας RORγt ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών ROR και κωδικοποιείται από το εξελικτικά συντηρημένο γονίδιο RORc. Το γονίδιο RORc αποτελείται από 11 εξώνια και κωδικοποιεί δυο ισομορφές του μεταγραφικού παράγοντα RORγ, τον RORγ που αποτελεί τη μεγαλύτερη ισομορφή και παρουσιάζει ευρεία κατανομή και τον RORγt ο οποίος αποτελεί τη μικρότερη ισομορφή εκφράζεται κυρίως στα Th17 κύτταρα και στα θυμοκύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι απαλοιφή του γονιδίου RORc ή φαρμακευτική αναστολή της έκφρασής του, προστατεύει από την εμφάνιση αυτοάνοσων διαταραχών [115].

Ο RORγt αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή, μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), μια περιοχή άρθρωσης (hinge region) η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της Th17 διαφοροποίησης, την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (LBD-Ligand binding domain) και μια καρβοξυτελική περιοχή. Σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των

λειτουργιών του RORγt στο ανοσοποιητικό σύστημα έχουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Για παράδειγμα η ακετυλίωση της λυσίνης στην περιοχή DBD ρυθμίζει την πρόσδεση του RORγt στο DNA, ενώ η φωσφορυλίωση των αμινοξέων σερίνης στην LBD περιοχή συντονίζει τις αλληλεπιδράσεις του με τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στον RORγt [115].

Ο RORγt έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των Τ βοηθητικών κυττάρων αλλά και στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων. Ο βασικός ρόλος του όμως είναι η συμμετοχή του στην Th17 διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, ο RORγt είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων. Η IL-6 δρα σε συνεργασία με τον TGF-β για να προωθήσουν την Th17 διαφοροποίηση, επάγοντας την έκφραση του RORγt. Ο RORγt προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων της IL-17a, IL-17f και IL-23 και δρώντας συνεργιστικά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως με τον RORa και τον RUNX1, επάγει τη μεταγραφή τους [115] [116]. Η συνεχής έκφραση του RORγt απαιτείται για τη διατήρηση των λειτουργιών των Th17 κυττάρων in vivo. Λόγω του ρόλου του RORγt στην Th17 διαφοροποίηση και στην ρύθμιση της έκκρισης της IL-17, ο RORγt αποτελεί στόχο για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών ασθενειών καθώς νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις βασίζονται σε αναστολείς του RORγt για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων διαταραχών συμπεριλαμβανομένων της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, της ψωρίασης και της ΣΚΠ [117].

Εκτός από τα Th17 κύτταρα, μελέτες έχουν δείξει ότι στο έντερο ο RORγt εκφράζεται από περιφερικά επαγόμενα Tregs (pTregs-peripheral Tregs) τα οποία παρουσιάζουν ενισχυμένη ανοσοκατασταλτική λειτουργία συγκριτικά με τα Tregs τα οποία δεν εκφράζουν RORγt και συνεργάζεται με τον Foxp3 για την εύρυθμη λειτουργία της συγκεκριμένης ομάδας κυττάρων. Η παρουσία του RORγt στα pTregs υποδεικνύει μια επιπλέον λειτουργία του εκτός της συμμετοχής του στην Th17 διαφοροποίηση, και συγκεκριμένα τη δυνατότητά του να ελέγχει τη λειτουργία ενός υποσυνόλου Τ βοηθητικών κυττάρων [118]. Ένα ερώτημα που δημιουργείται όμως είναι πώς ο RORγt ρυθμίζει τόσο τις λειτουργίες των Th17 κυττάρων όσο και την κατασταλτική λειτουργία των Tregs. Αποτελέσματα μιας μελέτης έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω της IL-1β επάγει τη φωσφορυλίωση των αμινοξέων σερίνης από

τις ERK κινάσες στην περιοχή άρθρωσης η οποία περιορίζει την λειτουργία των Th17 κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει τη δράση των Tregs που εκφράζουν RORγt, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο την ισορροπία ανάμεσα στη λειτουργία των Th17 κυττάρων και των Tregs. Επομένως, μέσω της συγκεκριμένης σηματοδότησης περιορίζεται η Th17 διαμεσολαβούμενη φλεγμονή ενώ παρέχονται πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για την καταπολέμηση αυτοάνοσων διαταραχών όπως είναι η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου [115].

1. Εισαγωγή

Μέρος 3

3.1 Ανοσολογική ανοχή και αυτοανοσία

Ανοσολογική ανοχή είναι η απουσία ειδικής απόκρισης για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο [119]. Επάγεται από προηγούμενη έκθεση στο συγκεκριμένο αντιγόνο και αναλόγως με το που επάγεται η διαδικασία ταξινομείται στην κεντρική και στην περιφερική ανοχή. Ειδικότερα, όταν η διαδικασία επάγεται στο θύμο αδένα και στο μυελό των οστών χαρακτηρίζεται ως κεντρική ανοχή, ενώ όταν επάγεται στους άλλους ιστούς και στους λεμφαδένες περιφερική ανοχή. Μέσω της κεντρικής ανοχής, το ανοσοποιητικό σύστημα διακρίνει το εαυτό από το μη-εαυτό [120].

Το σύνολο των λεμφοκυτταρικών κλώνων οι οποίοι στα στάδια της ωρίμανσής τους μπορεί να αναγνωρίζουν και να αντιδρούν με αντιγόνα του εαυτού εξαλείφονται μέσω της κεντρικής ανοχής. Ειδικότερα, τα Τ λεμφοκύτταρα στο θύμο αδένα και τα Β λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών υποβάλλονται σε αρνητική επιλογή, στο τέλος της οποίας, τα κύτταρα που φέρουν δυνητικά αυτοαντιδραστικούς υποδοχείς των Τ κυττάρων ή Ig υποδοχείς οδηγούνται σε απόπτωση.

Τα ώριμα λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν εξέλθει από το πρωτογενή λεμφικά όργανα και αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα εξαλείφονται μέσω της περιφερικής ανοχής και συγκεκριμένα μέσω σημάτων που λαμβάνουν μετά την πρόσδεση των αυτοαντιγόνων στους κατάλληλους υποδοχείς των κυττάρων. Η λειτουργική απενεργοποίηση των αυτοαντιδραστικών Τ και Β λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια (ανεργία), αποτελεί το δεύτερο μηχανισμό της περιφερικής ανοχής.

Η λειτουργία των Tregs τα οποία αναγνωρίζουν κάποιο αντιγόνο και παράλληλα καταστέλλουν τη δράση των κυττάρων που αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο αποτελούν επίσης μέρος του μηχανισμού της ανοχής. Αποτυχία στην εφαρμογή της ανοσολογικής ανοχής οδηγεί στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι αντιγόνων του εαυτού και στην πρόκληση αυτοανοσίας [120] [121].

Η αυτοανοσία διακρίνεται σε οργανονοειδική και σε συστηματική. Στην οργανοειδική αυτοανοσία στόχος της ανοσολογικής απόκρισης είναι ένα συγκεκριμένο αντιγόνο το οποίο βρίσκεται σε ένα όργανο ή αδένα, ενώ στη

συστηματική αυτοανοσία στόχο αποτελούν μεγαλύτερο εύρος αντιγόνων σε μεγαλύτερο αριθμό ιστών και οργάνων.

3.2 Σκλήρυνση κατά πλάκας

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (Multiple Sclerosis – ΣΚΠ) είναι ένα χρόνιο αυτοάνοσο φλεγμονώδες νόσημα, στο οποίο τα Τ λεμφοκύτταρα επιτίθενται στη μυελίνη και προκαλούν απομυελίνωση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ΣΚΠ χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα επεισόδια απομυελίνωσης και αξονικών αλλοιώσεων. Τα βασικά παθολογικά γνωρίσματα της νόσου περιλαμβάνουν τη διαρροή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τον τραυματισμό και την απώλεια των νευρικών αξόνων, την καταστροφή των ελύτρων μυελίνης, τη βλάβη και τον κυτταρικό θάνατο των ολιγοδενδροκυττάρων και την παρουσία φλεγμονωδών διηθήσεων [122]. Οι μηχανισμοί παθογένειας της ΣΚΠ, όπως και πολλών άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως. Ωστόσο, η θεωρία υποστηρίζει ότι η αρχή και η εξάπλωση της νόσου οφείλεται σε γενετικούς, μολυσματικούς, ανοσολογικούς ή και περιβαλλοντικούς παράγοντες [123] [124].

Η πορεία και η εξέλιξη της ΣΚΠ μπορεί να ακολουθήσει τέσσερα διακριτά κλινικά μοτίβα:

- Το πρώτο είναι η υποτροπιάζουσα διαλείπουσα ΣΚΠ (Relapsing Remitting MS/ RRMS) η οποία αποτελεί το 80-90% των αρχικών περιστατικών της νόσου. Η συγκεκριμένη μορφή χαρακτηρίζεται από οξείες επιθέσεις νευρολογικών βλαβών, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθούνται από σχεδόν ολική ανάκτηση λειτουργίας του οργανισμού.
- Το δεύτερο είναι η δευτεροπαθής προϊούσα μορφή (Secondary Progressive MS / SPMS). Ξεκινάει με παρόμοιο μοτίβο όπως η RRMS, αλλά από ένα σημείο και μετά χαρακτηρίζεται από σταθερή επιδείνωση της λειτουργίας και όχι από οξείες επιθέσεις νευρολογικών βλαβών. Περίπου το 80% των ασθενών με υποτροπιάζουσα διαλείπουσα ΣΚΠ ακολουθούν αυτή τη κλινική πορεία, ενώ

αποτελεί τον τύπο του νοσήματος με το μεγαλύτερο ποσοστό νευρολογικών βλαβών.

- Το τρίτο είναι πρωτοπαθής προϊούσα σκλήρυνση κατά πλάκας (Primary Progressive MS / PPMS). Αποτελεί το 10% των αρχικών περιστατικών και χαρακτηρίζεται από σταδιακή επιδείνωση των συμπτωμάτων και όχι από διακριτές υποτροπές ή υφέσεις.
- Το τέταρτο είναι η προοδευτική υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας (Progressive Relapsing MS / PRMS), η οποία ξεκινάει σταδιακά, ενώ οι ασθενείς υπόκεινται σε σποραδικές οξείες επιθέσεις.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παθογένεια της ΣΚΠ δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως. Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς παθογένειας του συγκεκριμένου νοσήματος φαίνεται να είναι και η μη φυσιολογική λειτουργία των ανοσορυθμιστικών μηχανισμών του οργανισμού, κυρίαρχο ρόλο στους οποίους παίζουν τα Th λεμφοκύτταρα και η έκφραση της IL-2 [125].

2. Σκοπός

Τα Th λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Δυσλειτουργία των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων και άλλων παθολογικών καταστάσεων [126]. Μετά την ενεργοποίησή τους ως αποτέλεσμα της αντιγονοπαρουσίασης τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε λειτουργικά Th λεμφοκύτταρα. Ακολούθως ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του αντιγόνου, το κυτταροκινικό περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίηση και τη διαφορική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, διαφοροποιούνται στις διαφορετικές γραμμές δραστικών κυττάρων τα οποία ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις [28] [29].

Η IL-2 είναι η πρώτη κυτταροκίνη που εκκρίνεται όταν τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε επαγώγιμα Th0 λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δημοσίευσης του εργαστηρίου μας ο Ets-2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-2. Συγκεκριμένα, στα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα ο Ets-2 καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της IL-2 μέσω της πρόσδεσής του στην ARRE-2 περιοχή του υποκινητή της. Κατά την ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων ο Ets-2 μετακινείται στην ARRE-1 περιοχή της IL-2, ενώ παράλληλα τα επίπεδα έκφρασής του είναι μειωμένα συγκριτικά με τα επίπεδα στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα [78].

Τα αποτελέσματα σχετικά με τη δράση του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-2 αποδεικνύουν τον ενεργό ρόλο του Ets-2 στη διαδικασία της ενεργοποίησης των Th λεμφοκυττάρων. Για το λόγο αυτό αρχικός στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη του ρόλου του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης λεμφοτροπικών παραγόντων που ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι ενεργοποίησης των Th λεμφοκυττάρων. Ακολούθως στο πλαίσιο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης του Ets-2 και διερεύνησης των μηχανισμών που ρυθμίζουν την μεταγραφική του δραστηριότητα, θα προχωρήσουμε στη μελέτη της έκφρασής του σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα καθώς και της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GATA-3, RORγt και Foxp3 στους συγκεκριμένους υποπληθυσμούς Th λεμφοκυττάρων. Επόμενο ερώτημα που θα κληθούμε να απαντήσουμε αφορά τη μελέτη του ρόλου του Ets-2 στην έκφραση των

ανωτέρω μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι είναι καθοριστικής σημασίας για τη διαφοροποίηση στις διαφορετικές γραμμές δραστικών κυττάρων, καθώς και την δράση των παραγόντων αυτών στην έκφραση του Ets-2, ώστε να αποσαφηνίσουμε το ρόλο του Ets-2 στη διαδικασία διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι δυσλειτουργία των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία παθολογικών Th κλώνων και την επακόλουθη εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων. Επομένως τίθεται το ερώτημα της πιθανής εμπλοκής του Ets-2 στην παθογένεια παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκονται τα Th λεμφοκύτταρα, καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση τους. Στην παρούσα διατριβή θα εξετάσουμε την πιθανή εμπλοκή του Ets-2 στο αυτοάνοσο νόσημα της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

Συνοψίζοντας, τα βασικά ερευνητικά ερωτήματα που καλούμαστε να απαντήσουμε στην παρούσα διατριβή είναι τα παρακάτω:

- Ρόλος του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης των λεμφοτροπικών παραγόντων NFAT2, NF-κB p65,c-Jun, c-Fos.
- Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων GATA-3, RORγt και Foxp3 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα.
- Διερεύνηση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων GATA-3, RORγt και Foxp3.
- Ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων GATA-3, RORγt και Foxp3 στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2.
- Μελέτη της έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Jurkat (Τ κυτταρική σειρά προερχόμενη από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία).

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό (culture medium, CM) το οποίο αποτελείται από το θρεπτικό μέσο RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και 100 U/ml πενικιλίνη, σε επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες υγρασίας, σταθερής θερμοκρασίας στους 37^{o}C και 5% CO2.

3.1.1 Ψύξη κυττάρων

Για την αποθήκευση των κυτταρικών σειρών και τη διατήρηση τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα, πραγματοποιείται η κατάψυξή τους και η ακόλουθη αποθήκευσή τους σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο (-196^{o}C). Η διαδικασία που ακολουθείται αναγράφεται παρακάτω:

- Κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους συλλέγονται και φυγοκεντρούνται στις 1800 rpm, για 10min, σε RT.
- Προσθήκη RPMI 1640 για την πραγματοποίηση πλύσης των κυττάρων στις 1800rpm, για 10min, σε RT.
- Ακολουθεί άλλη μια πλύση στις ίδιες συνθήκες.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml του ειδικού διαλύματος κατάψυξης το οποίο αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide).
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε cryovial (ειδικό σωληνάριο κατάψυξης), το οποίο τοποθετείται σε θερμοκρασία -80^{o}C για 8 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται στο δοχείο με το υγρό άζωτο.

3.1.2 Απόψυξη κυττάρων

Για την απόψυξη των κυτταρικών σειρών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Κάθε cryovial μεταφέρεται από το υγρό άζωτο άμεσα σε υδατόλουτρο το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 37^{o}C.
- Το εναιώρημα των κυττάρων το οποίο περιέχεται στο cryovial μεταφέρεται σε falcon στο οποίο έχουμε προσθέσει RPMI-1640 (προθερμασμένο στους 37^{o}C).
- Ακολούθως πραγματοποιούνται 2 πλύσεις των κυττάρων με RPMI-1640 στις 1800rpm, για 10min, σε RT.
- Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 5ml προθερμασμένου θρεπτικού υλικού (37^{o}C) και τα κύτταρα καλλιεργούνται στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας.

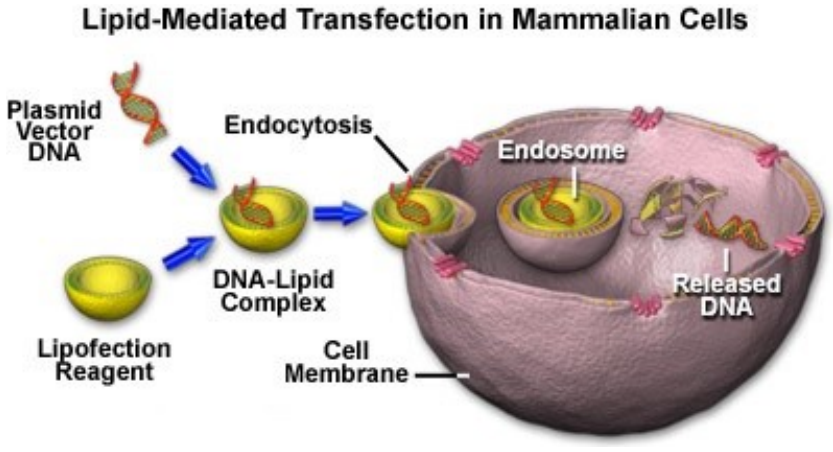
3.1.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωστική trypan blue, η οποία έχει την ιδιότητα να εισέρχεται στα νεκρά κύτταρα και να τα χρωματίζει με μπλε χρώμα. Τα ζωντανά κύτταρα είναι φωτεινά και διάφανα. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστίθεται ένα μέρος του διαλύματος της χρωστικής σε αναλογία 1:1. 10μl από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρονται σε αιμοτοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και το παρασκεύασμα παρατηρείται στο μικροσκόπιο.

3.2 Παροδική διαμόλυνση (transfection) κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Η διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς Jurkat πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamin 2000 (Lipofectamine® 2000- Invitrogen). Αναλυτικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με πλασμιδιακό DNA πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης.
- Τα κύτταρα μετρούνται ώστε να υπολογισθεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων που χρειάζονται για τη διαμόλυνση. Χρησιμοποιούνται $2x10^6$ κύτταρα /well σε 2ml θρεπτικού υλικού CM.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων και επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό CM.
- Σε eppendorf τοποθετείται η προβλεπόμενη ποσότητα Optim-MEM (Life Technologies) και η ανάλογη ποσότητα πλασμιδιακού DNA και πραγματοποιείται ανάδευση.
- Στη συνέχεια προστίθεται το Plus Reagent(Lipofectamine® 2000-Invitrogen)σε αναλογία 1 μλ plus reagent/1μg DNA και ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε RT για 5 min.
- Στη συνέχεια προστίθενται 5μl Lipofectamin και πραγματοποιείται καλή ανάδευση και ακόλουθη επώαση σε RT για 30 min.
- Το παραπάνω mix προστίθεται στα κύτταρα τα οποία είναι τοποθετημένα σε 6-well plates, τα οποία θα παραμείνουν στον κλίβανο για 40 h.



3.1 : Απεικόνιση της μεθόδου διαμόλυνσης των κυττάρων με τη χρήση λιποσωμάτων (https://aneesha2015.weebly.com/transfection.html).

3.3 Ενεργοποίηση των κυττάρων

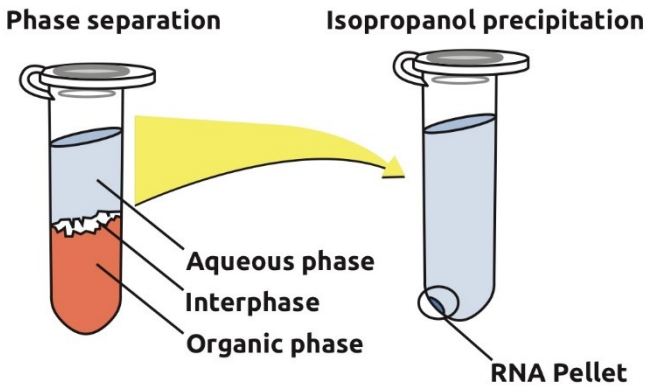
- Αρχικά μετρούνται τα κύτταρα που είναι τοποθετημένα στα 6-well plates. Για να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση πρέπει να βρίσκονται σε συγκέντρωση 10^6/ml.
- Για την ενεργοποίηση προστίθεται στα well plates το διάλυμα εστέρα φορβόλης (PMA, Phorbol Myristate Acetate) και ιονομυκίνης. (αρχική συγκέντρωση PMA 1mg/ml σε τελική συγκέντρωση 10ng/ml, αρχική συγκέντρωση ιονομυκίνης 1mg/ml σε τελική συγκέντρωση 1-2μM).
- Τα κύτταρα επωάζονται για 6h.
- Μετά το πέρας της ενεργοποίησης τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρούνται στις 1800rpm για 10min στους 4^{o}C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα επαναδιαλύεται σε RPMI-1640.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 10min στους 4^{o}C.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα τοποθετούνται στην κατάψυξη.

3.4 Απομόνωση RNA από τα κύτταρα

Για την απομόνωση RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιείται το διάλυμα τριζόλης (Trizole, Gibco). Η τριζόλη έχει την ιδιότητα να διαρρηγνύει τις μεμβράνες των κυττάρων με αποτέλεσμα την εκχύλιση των κυτταροπλασματικών υλικών στα οποία περιέχεται το RNA. Η ποσότητα της τριζόλης που χρησιμοποιείται είναι 1ml /5-10x10^6 κύτταρα. Αναλυτικά ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα τριζόλης στην πελέτα των κυττάρων, ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση για 5min σε RT.
- Ακολούθως προστίθεται στα κύτταρα η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (49:1) (200λ/1ml τριζόλης), η οποία οδηγεί στο διαχωρισμό του RNA από τα υπόλοιπα κυτταροπλασματικά υλικά.
- Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση των δειγμάτων για 5min σε RT.

- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 12.000rpm, για 15min, στους 4^{o}C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης έχουν σχηματισθεί τρεις στοιβάδες. Η υδάτινη φάση στην οποία βρίσκεται διαλυμένο το RNA, η ενδιάμεση φάση στην οποία βρίσκεται το DNA και η υποκείμενη οργανική φάση στην οποία βρίσκονται οι πρωτεΐνες .
- Η υδάτινη φάση απομονώνεται και μεταφέρεται σε νέο eppendorf.
- Ακολούθως προστίθεται στην υδάτινη φάση ισοπροπανόλη (500λ/ml τριζόλης) και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση.
- Τα δείγματα επωάζονται στους -20^{o}C overnight ή στους -80^{o}C για 20min, για να επιτευχθεί κατακρήμνιση του RNA.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000rpm, για 30min, στους 4^{o}C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεχτικά και ακολουθεί πλύση του RNA το οποίο βρίσκεται στο ίζημα με 75% EtOH(100λ).
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 10000rpm για 20min στους 4^{o}C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται με προσοχή και το ίζημα στεγνώνει σε συσκευή κενού.
- Το RNA αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα dEPC H_2O, φωτομετρείται σε A260/280 με τη χρήση Nanodrop UV-spectrophotometer (Quawell) και αποθηκεύεται στους -80^{o}C.



Εικόνα 3.2: Οι φάσεις που προκύπτουν μετά τη φυγοκέντρηση που ακολουθεί της προσθήκης του διαλύματος χλωροφορμίου- ισοαμυλικής αλκοόλης στο εναιώρημα κυττάρων/τριζόλης. Η υδάτινη φάση περιέχει το RNA, η ενδιάμεση φάση το DNA και η οργανική φάση περιέχει τις πρωτεΐνες και τα συστατικά του κυττάρου. Με την ακόλουθη προσθήκη ισοπροπανόλης,

πραγματοποιείται η κατακρήμνιση του RNA. (https://www.bio-sell.de/en/rna-isolation/rna-extraction-one-step-liquid-phase-separation.html).

3.5 Κατασκευή cDNA, RT-PCR

Για τη δημιουργία του cDNA απαιτείται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase) το οποίο μετατρέπει το ολικό RNA σε DNA. Η RT-PCR πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο το οποίο παρέχεται από το kit (MML V Reverse Transcriptase, SIGMA).

Αναλυτικά τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα 3.1.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (μl)
Random primers	50μM	1-5μM	1
dNTPs	10mM each	0,5mM	1
RNA	-	1-5μg	-
WFI	-	-	Μέχρι τελικό όγκο 20μλ

Πίνακας 3.1: Αντιδραστήρια RT-PCR

- Ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων και επώασή τους στους 70°C για 10min.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 1min.
- Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθεται 10μl από το mix των αντιδραστηρίων που αναγράφεται στον πίνακα 3.2.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (μl)
RT buffer	10x	1x	2
M-MLV RT	200u/μl	10u/μl	1
RNase OUT	40u/μl	1u/μl	0,5
WFI	-	-	6,5

Πίνακας 3.2: Αντιδραστήρια RT-PCR

- Ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων και επώασή τους στους 25^{o}C για 10min.
- Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους 37^{o}C για 50min.
- Ακολούθως επωάζονται στους 90^{o}C για 10min.
- Το cDNA αποθηκεύεται στους -20 ^{o}C.

3.6 Quantitive Real Time polymerase chain reaction (qPCR)

Η Real-time PCR (πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) πραγματοποιήθηκε με την χρήση του μηχανήματος Mx3000P Quantitative PCR System thermal cycler (Stratagene, LA Jolla, CA) με την τεχνολογία SYBR Green (KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, Kapa Biosystems). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MxProTM (Stratagene Corp, La Jolla, CA). Το γονίδιο της β2-μικρογλοβουλίνης (β2-m) χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας κανονικοποίησης.

Για την πραγματοποίηση της Real-time PCR αρχικά προετοιμάζεται το master mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Το mix αποτελείται από τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον πίνακα 3.3.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μλ)
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	2x	1x	10
Primer Forward	10μM	200nM	0,4
Primer Reverse	10μM	200nM	0,4
ROX	50x	1x	0,4
cDNA	-	45ng	-
WFI	-	-	Μέχρι τελικό όγκο 20μl

Πίνακας 3.3: Αντιδραστήρια qPCR

Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4.

Γονίδιο	Εκκινητές 5'→3' αλληλουχία
Ets-2_Fw	AGTGAGCAACAGGTATGCCAG
Ets-2_Rev	AGGAACGGAGGTGAGGTGTG
NFAT2_Fw	GGTGCATGAGGACGG TAG
NFAT2_Rv	GGTTCTGAGTGGTACCAGG
Nf-κB p65_Fw	GCAAGCTGATGTGCACCG
Nf-κB p65_Rv	GAAGGCACAGCAATGCGTC
c-Jun_Fw	GCATGAGGAACCGCATC
c-Jun_Rv	GCGTTAGCATGAGTTGGC
c-Fos_-Fw	CACGATGATGTTCTCGGGCT
c-Fos_Rv	GGCCTCCTGTCATGGTCTTC
GATA-3_Fw	GGGCTCTATCACAAAATGAACG
GATA-3_Rv	TTGTGGTGGTCTGACAGTTCGC
Rorγt_Fw	CTGCTGAGAAGGACAGGGAG
Rorγt_Rv	AGTTCTGCTGACGGGTGC

Foxp3_Fw	CGGACCATCTTCTGGATGAG
Foxp3_Rv	TTGTCGGATGATGCCACAG
B2-m_Fw	TCGCGCTACTCTCTCTTTCT
B2-m_Rv	TTTCCATTCTCTGCTGGATGAC

Πίνακας 3.4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95^{o}C για 3min και ακολουθούν 40 κύκλοι με 95 ^{o}C για 25 sec για την αποδιάταξη του cDNA, 60 ^{o}C για 25sec για την επανασύνδεση με τους ειδικούς κάθε φορά εκκινητές και 72^{o}C για 25sec για την σύνθεση των μεταγράφων.

3.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα αποτελέσματα της Real-time PCR αξιολογήθηκαν συμπληρωματικά και μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση επιτρέπει το διαχωρισμό του DNA βάσει του μοριακού του βάρους υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Σύμφωνα με τη βασική αρχή της μεθόδου, όταν στα μόρια DNA εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο του πεδίου, λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, με ταχύτητες διαφορετικές και αντιστρόφως ανάλογες του μεγέθους τους.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Η αγαρόζη διαλύεται σε διάλυμα 0.5x Tris/Borate/EDTA (TBE) με βρασμό. Ανάλογα με τον όγκο TBE που θα προστεθεί χρησιμοποιείται και η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης
- Το διάλυμα θερμαίνεται και ακολούθως προστίθεται Ethidium bromide (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0,25 μg\ml για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

- Ακολούθως το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι, στο οποίο με ειδικά «δοντάκια» σχηματίζονται τα πηγαδάκια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα.
- Όταν στερεοποιηθεί το πήκτωμα, προστίθεται διάλυμα 0,5x TBE στο καλούπι και αφαιρούνται προσεχτικά τα «δοντάκια» της συσκευής.
- Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J. Με τη χρήση του συγκεκριμένου προγράμματος αξιολογήθηκε η ποσοτική μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των ζωνών της ηλεκτροφόρησης. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της β2-m χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.7.1 Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση

Πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) τελικού όγκου 100 ml: 1,5gr αγαρόζης (Nippon Genetics, AG 02) διαλύονται σε διάλυμα TBE 0.5x με θέρμανση στα μικροκύματα.

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): 3μl βρωμιούχου αιθιδίου (Serva, 21251.01) το οποίο έχει αρχική συγκέντρωση 10 mg/ml, προστίθενται στα 100 ml διαλύματος αγαρόζης 1.5%.

Διάλυμα TBE 10x: 1M Tris base, 0.02 M EDTA 1M Boric acid, διαλύονται σε dH_2O μέχρι τον τελικό όγκο.

TBE 0.5x τελικού όγκου 1L: 50ml TBE 10x σε 950ml dH_2O

3.8 Ανάλυση πρωτεϊνών

3.8.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από τα κύτταρα

Πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων Western Blot είναι η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Διάλυμα λύσης (Ripa buffer) προστίθεται στην πελέτα των κυττάρων (αναλογία 1ml Ripa buffer-10^7 κύτταρα).
- Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 15 min και ανά 5min πραγματοποιείται ανάδευση με vortex.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000rpm, για 15min στους 4^{o}C και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Eppendorf.
- Στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστίθεται διάλυμα 2x Sample buffer και μερκαπταιθανόλης (1ml Sample buffer - 50λ μερκαπταιθανόλη, αναλογία Ripa-protein / Sample buffer-μερκαπταιθανόλη:1-1).
- Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους 95^{o}C για 5 min και απευθείας τοποθέτησή τους στον πάγο.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 10.000rpm για 30sec και φυλάσσονται στους -20^{o}C.

3.8.2 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

- Παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών (separating gel), το οποίο φορτώνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και καλύπτει περίπου τα 3:4 αυτής.
- Στη συνέχεια παρασκευάζεται το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel), το οποίο φορτώνεται πάνω στο separating gel και τοποθετείται άμεσα το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων

- Τα δείγματα που θα αναλυθούν βράζονται στους 95^{o}C, για 5min και ακολούθως φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 5min.
- Όταν το πήκτωμα έχει πήξει και είναι έτοιμο για χρήση η συσκευή τοποθετείται μέσα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης στο οποίο έχει προστεθεί το διάλυμα Laemmli (1x) και αφαιρείται το χτενάκι.
- Τα δείγματα φορτώνονται στις θέσεις που έχουν σχηματιστεί στο stacking gel και η συσκευή ηλετροφόρησης ρυθμίζεται αρχικά στα 100V μέχρι η χρωστική να εισέλθει στο separating gel και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 140V.

3.8.3 Ανοσοαποτύπωμα Western

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης γίνεται μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσα σε ειδική συσκευή η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (transfer buffer), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου 300mA, για 2h.

- Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του transfer, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer, 5% γάλα σε 1x PBS (phosphate-buffered saline, Gibco), 0,1% Tween (PBS- Tween)) για 1h, σε RT, προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης.
- Ακολούθως η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι αναδιαλυμένο σε blocking buffer, σε περιστρεφόμενη ρόδα για 2h σε RT ή στους 4^{o}C O/N.
- Η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με 1x PBS, 0,1% Tween (PBS-Tween). Η πρώτη πλύση διαρκεί 15min και οι δυο διαδοχικές 5 min.
- Η μεμβράνη επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα σε περιστρεφόμενη ρόδα για 1h και 30min σε RT.
- Ακολουθούν οι ίδιες πλύσεις όπως προηγουμένως
- Το σήμα ανιχνεύεται με τη χρήση του αντιδραστηρίου ECL και ακολούθως αποτυπώνεται σε x-ray φιλμ, σε σκοτεινό θάλαμο.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που αναγράφονται στον πίνακα 3.5:

Πρωτογενή Αντισώματα	**Αραίωση**	**Εταιρεία**
Ets-2	1:500	F-4, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology
NFAT2	1:500	7A6, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology
NF-κB p65	1:500	A, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotecnhology
c-Jun	1:500	D, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotecnhology
c-Fos	1:500	E-8, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotecnhology
GATA-3	1:500	B-10, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology
RORγt	1:500	27.92, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology
Foxp3	1:500	F-9, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology
β-tubulin	1:1000	Mouse monoclonal, Upstate Biotechnology
Δευτερογενή αντισώματα	**Αραίωση**	**Εταιρεία**
Anti-mouse-HRP	1:1500	Cell Signaling Technology
Anti-rabbit HRP	1:1500	Cell Signaling Technology

Πίνακας 3.5: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

3.8.4 Διαλύματα για Western blot

RIPA Buffer: 50 μm Tris-HCL PH: 7.4, 0.1% SDS, 1% Sodium Deoxycholic Acid, 1mM EDTA, 150mM NaCL, 1% Triton X-100 supplemented with protease inhibitors (Sigma-Aldrich).

10% APS (Ammonium persulfate): 0,1 gr APS σε τελικό όγκο 1ml ddH_2O.

10% separating gel: 2.5ml 1.5M Tris-HCL pH 8.8, 3.3ml Acrilamide/Bis-acrilamide (30%/0.8% w/v), 0.05ml 20% (w/v) SDS, 0.08ml 10% (w/v) APS, 0.008ml TEMED, 4ml ddH_2O σε τελικό όγκο 10ml.

Stacking gel για 5ml: 1.25ml 0.5M Tris-HCL pH 6.8, 0.67ml Acrilamide/Bis-acrilamide (30%/0.8% w/v), 0.025ml 20% (w/v) SDS, 0.050 ml 10% (w/v) APS, 0.005ml TEMED, 3.075ml ddH_2O σε τελικό όγκο 5ml.

Sample buffer: 100mM Tris-Cl (pH 6.8), 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue. Πριν την χρήση προστίθεται 200mM β-mercaptoethanol.

Laemmli Buffer (10x - συγκέντρωση stock διαλύματος): 144.2gr γλυκίνης, 30.3gr Tris-base, 10gr SDS σε τελικό όγκο 1L ddH_2O.

Transfer buffer: 192mM glycine, 25mM Tris, 10% methanol σε ddH_2O.

Blocking buffer: Σε 1x PBS - 5% (w/v) Non-fat dry milk, 0.1% Tween.

PBS (1x) - 0.1%Tween (PBS-Tween): 1ml 100% Tween-20 σε τελικό όγκο 1000 ml (1x) PBS

3.9 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP, Chromatin immunoprecipitation) είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται με σκοπό την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών με ειδικές γενωμικές αλληλουχίες in vivo. Πρώτο βήμα της μεθόδου είναι η κατεργασία ζωντανών κυττάρων με φορμαλδεΰδη για να δημιουργηθούν σταυροσυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και DNA-πρωτεϊνών που βρίσκονται σε εγγύτητα με τη χρωματίνη in vivo . Ακολούθως τα πυρηνικά εκχυλίσματα που προκύπτουν από την κατεργασία των κυττάρων με φορμαλδεΰδη κατεργάζονται με υπερήχους για να επιτευχθεί διαχωρισμός της χρωματίνης σε θραύσματα μεγέθους ~500 βάσεων. Στη συνέχεια ακολουθεί ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με αντίσωμα ειδικό κάθε φορά για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Με

αυτό τον τρόπο, οι DNA αλληλουχίες που σταυροσυνδέονται άμεσα ή έμμεσα με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη βρίσκονται στο ανοσοκατακρημνισμένο δείγμα. Με τη μέθοδο της real-time PCR προσδιορίζεται η ποσότητα των ειδικών DNA αλληλουχιών στο δείγμα μάρτυρα και στο ανοσοκατακρημνισμένο δείγμα.

- Για τη δημιουργία των σταυροσυνδέσεων (crosslinking) μεταξύ των πρωτεϊνών και του DNA προστίθεται φορμαλδεΰδη σε τελικό όγκο στην καλλιέργεια 1,1% για 10min.
- Για την αναστολή της δράσης της φορμαλδεΰδης προστίθεται γλυκίνη στην καλλιέργεια σε τελική συγκέντρωση 0,125mM υπό ελαφριά ανάδευση σε RT για 10min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 2500rpm για 10min στους 40^0C και δυο πλύσεις με κρύο 1XPBS σε falcon των 50ml.
- Επόμενο βήμα είναι η θραύση της μεμβράνης των κυττάρων, η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη του Lysis Buffer, η δράση του οποίου στηρίζεται στη χρήση απορρυπαντικών (NP-40) που υπάρχουν στο διάλυμα, καθώς και αναστολέων πρωτεασών για να αποφευχθεί η διάσπαση των πρωτεϊνών.
- Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10min και φυγοκέντρηση στις 3500rpm σε παγωμένη φυγόκεντρο.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στο ίζημα βρίσκονται οι πυρήνες των κυττάρων οι οποίοι με την χρήση του Nuclei Lysis buffer , το οποίο προκαλεί αύξηση της ωσμωτικής πίεσης στο εσωτερικό τους, διαρρηγνύονται.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται και απομονώνεται η χρωματίνη η οποία εμπεριέχεται στο υπερκείμενο.
- Ακολουθεί θραύση της χρωματίνης με την χρήση υπερήχων (Sonicator-Bioblock Scientific) σε μικρότερα κομμάτια (~500bp), στο διάλυμα Nuclei Lysis buffer. Τα δείγματα σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας βρίσκονται σε πάγο. Πραγματοποιούνται 10 κύκλοι ανά δείγμα (amplitude 30%) και κάθε κύκλος διαρκεί 45sec-1min ανά δείγμα (15sec off/15sec on).
- Για να ελεγχθεί η θραύση της χρωματίνης σε κομμάτια επιθυμητού μεγέθους, ποσότητα χρωματίνης στην οποία προστίθεται 400mM NaCl, θερμαίνεται σε eppedorf 1,5ml στους 90^oC για 10min.

- Ακολουθεί επώαση στους 37^{o}C σε υδατόλουτρο με RNase A για 45min και καθαρισμός με phenol:clorophorm:isoamilyc alcohol σε αναλογία 25:24:1.
- Στη συνέχεια το δείγμα ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.
- Μετά τη θραύση της χρωματίνης τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 14000rpm για 10min στους 40^{o}C και το υπερκείμενο συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -80^{o}C.

Για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 25μg χρωματίνης για κάθε συνθήκη. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα anti-Ets-2 (F-4) και anti-polII, ενώ η κατακρήμνιση έγινε με μαγνητικά σφαιρίδια (magnetic beads A/ 3beads/μl αντισώματος).

Το σύμπλοκο μαγνητικά σφαιρίδια/αντίσωμα/DNA/πρωτεΐνη επωάζεται ON στους 4^{o}C υπό ανακίνηση . Την επόμενη μέρα ακολουθούν πλύσεις του συμπλόκου με τα παρακάτω διαλύματα:

• 2 πλύσεις με Low salt buffer.

• 2 πλύσεις με high salt buffer.

• 2 πλύσεις με LiCl buffer.

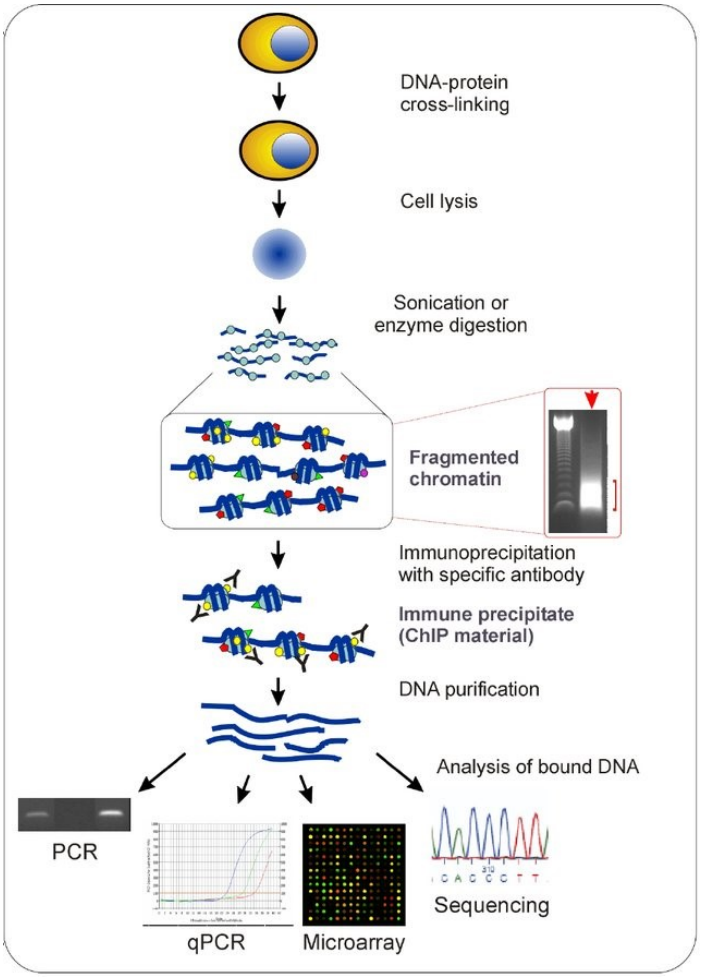
• 2 πλύσεις με TE buffer

- Για την πραγματοποίηση των πλύσεων χρησιμοποιείται μαγνητικό στατό.
- Ακολούθως με την προσθήκη IP elution buffer επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του συμπλόκου από τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex για 15min.
- Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων με RNase A για 45min στους 37^{o}C και έπειτα με πρωτεϊνάση Α στους 55^{o}C (για αναστροφή του crosslinking)
- Πραγματοποιείται καθαρισμός των δειγμάτων με phenol: clorophorm: isoamilyc alcohol σε αναλογία 25:24:1.
- Ακολουθεί real-time PCR .

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα 3.6.

Γονίδιο	Εκκινητές 5'→3' αλληλουχία
Ets-2 binding site_Fw	CCAGAGACCCTCAAATATCC
Ets-2 binding site_Rv	ATGATTTCTTCCCCTCACC
b2m promoter_Fw	CGCCGATGTACAGACAGCAAA
b2m promoter_Rv	TGCTGTCAGCTTCAGGAATG

Πίνακας 3.6: Εκκινητές οι οποίοι χρισημοποιήθηκαν κατά την qPCR για τα πειράματα chIP



Εικόνα 3.3: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης [127]

3.9.1 Διαλύματα για την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης

Lysis Buffer: 5mM HEPES pH 8, 85mM KCl, 0,5% NP-40.

Nuclei Lysis buffer: 10m EDTA, 1% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8,1.

Low salt buffer: 0,1% SDS, 2mM EDTA pH 8, 20mM Tris-HCl PH 8,1, 1,1% Triton X-100, 150mM NaCl.

High salt buffer: 0,1% SDS, 2mM EDTA PH 8, 20mM Tris-HCl pH 8,1, 1% Triton X-100, 500mM NaCl.

LiCl buffer: 10mM Tris-HCl pH 8, 1% NP-40, 250mM LiCl

TE buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA

IP elution buffer: 1% SDS, 50 mM NaHCO3

3.10 Ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού δίνει τη δυνατότητα τόσο της ανίχνευσης όσο και του εντοπισμού της θέσης πρωτεϊνών, είτε είναι πυρηνικές είτε κυτταροπλασματικές. Η συγκεκριμένη τεχνική πραγματοποιείται σε κύτταρα τα οποία τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες που είναι επιστρωμένες με poly-L-λυσίνη. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- 10^5 κύτταρα τοποθετούνται στις αντικειμενοφόρους και επωάζονται στους 37^oC για 40min.
- Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό των κυττάρων απορρίπτεται και ακολουθεί γρήγορη πλύση με διάλυμα 1x PBS (παγωμένο).
- Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με την προσθήκη παραφορμαλδεΰδης (PFA) 4% για 10min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Ακολουθούν 2 πλύσεις, διάρκειας 5min, με διάλυμα 1x PBS.

- Τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα 0,3% Triton σε 1x PBS για 4min σε RT, για να γίνουν διαπερατά.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις, διάρκειας 5min, με διάλυμα 1x PBS.
- Για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα blocking buffer (3% BSA, 10% FBS σε 1x PBS) για 1h σε RT.
- Ακολουθεί επώαση για 1h σε RT με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο είναι διαλυμένο σε διάλυμα blocking buffer.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις, διάρκειας 5min, με διάλυμα 1x PBS, 0,1% Tween (PBS-Tween)
- Τα κύτταρα επωάζονται για 1h σε RT σε σκοτεινό μέρος με το δευτερογενές φθορίζων αντίσωμα το οποίο είναι διαλυμένο σε διάλυμα blocking buffer.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις, διάρκειας 5min, με διάλυμα 1x PBS, 0,1% Tween (PBS-Tween).
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε RT με τη χρωστικη DAPI (1μg/ml) σε διάλυμα 1x PBS, για την χρώση των πυρήνων.
- Απομακρύνεται η περίσσεια της χρωστικής με πλύση με 1x PBS για 3min.
- Ακολουθεί πλύσιμο των αντικειμενοφόρων με dH_20.
- Προστίθεται στερεοποιητικό διάλυμα MOWIOL 4-88 (Calbiochem) στις αντικειμενοφόρους πλάκες και στη συνέχεια γίνεται προσεχτική τοποθέτηση των καλυπτρίδων.
- Με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Leica TCSSP5 confocal microscope) πραγματοποιείται η παρατήρηση των κυττάρων.

Για την παρούσα μελέτη στα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα τα οποία αναγράφονται στον πίνακα 3.7 :

Πρωτογενές αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρεία
Ets-2	1:100	F-4, monoclonal mouse, Santa Cruz
Foxp3	1:100	F-9, monoclonal mouse Santa Cruz
Δευτερογενές αντίσωμα	**Αραίωση**	**Εταιρεία**
Alexa Fluor anti-mouse 488	1:500	Molecular Probes

Πίνακας 3.7: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοφθορισμό

3.10.1 Διαλύματα για τον ανοσοφθορισμό

Διάλυμα επικάλυψης καλυπτρίδων poly-L-lysine (stock 50 mg/ml , 500x): 100mg λυσίνης (Sigma) διαλύονται σε τελικό όγκο 2ml ddH_2O. Φύλαξη του διαλύματος στους -20^oC.

Διάλυμα επικάλυψης καλυπτρίδων poly-L-lysine (τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, 1x): Αραίωση της 500x poly-D-lysine σε 1x PBS (αποστειρωμένο). Αναλογία αρχικού:τελικού όγκου 1:500.

Διάλυμα παραφολμαδεΰδης 4% (PFA): 20gr PFA (MERCK) διαλύονται σε τελικό όγκο 500ml 1xPBS. Για να διαλυθεί πλήρως η ουσία πραγματοποιείται ανάδευση υπο θέρμανση (65^oC).

Διάλυμα 0,3% Triton X-100: Προσθήκη 150μl από το διάλυμα 100% Triton X-100 σε τελικό όγκο 50ml 1x PBS.

Blocking buffer: FBS σε τελική συγκέντρωση 10% και BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) σε τελική συγκέντρωση 3% σε διάλυμα 1x PBS.

Διάλυμα DAPI: DAPI (Sigma, D9542) σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml σε WFI.

Διάλυμα MOWIOL: Διαλύονται 4,8g MOWIOL 4-88 Reagent (Calbiochem 475904) σε 12g γλυκερόλης. Το μείγμα αναδεύεται μέχρι να γίνει ομοιογενές. Ακολουθεί προσθήκη 12ml H20 και ανάδευση overnight σε RT. Την επόμενη μέρα στο μείγμα προστίθενται 24ml από διάλυμα 0.2M Tris-Cl με pH 8.5 και για να διαλυθεί τελείως το MOWIOL το διάλυμα θερμαίνεται στους 50°C και αναδεύεται για όσο χρειαστεί. Ακολούθως πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 5.000rpm για 15min και αποθήκευση σε aliquots στους -20°C.

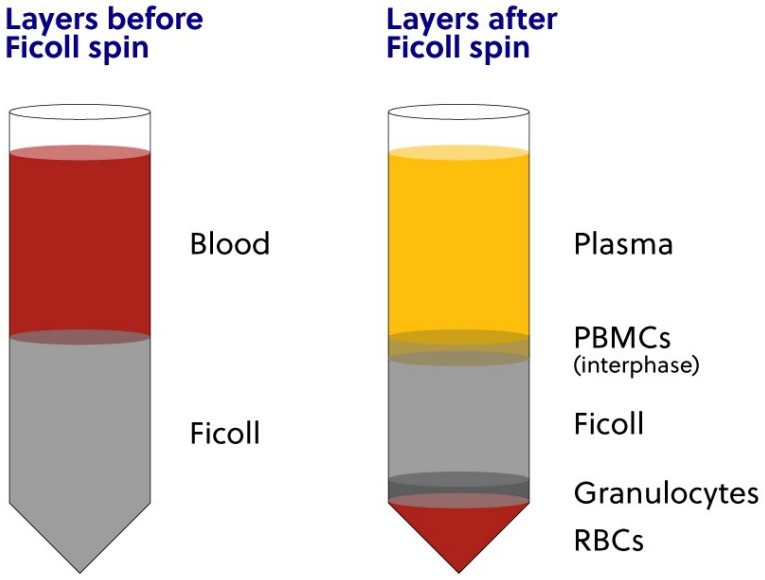
3.11 Συλλογή δειγμάτων ολικού αίματος υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ηπαρινισμένου ολικού αίματος τα οποία συλλέχθηκαν από υγιείς εθελοντές αιμοδότες από το Κέντρο Αιμοδοσίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών. Επίσης έγινε χρήση δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών από ασθενείς που πάσχουν από Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Τόσο ο σχεδιασμός όσο και η υλοποίηση της μελέτης πραγματοποιήθηκαν με άξονα τις αρχές Βιοϊατρικής Δεοντολογίας, καθώς και τα δικαιώματα των ασθενών όπως αυτά περιγράφονται στη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Το πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας. Κάθε ασθενής πριν τη λήψη του δείγματός του είχε συναινέσει γραπτώς για τη συμμετοχή του στην μελέτη.

3.11.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) από ολικό αίμα

Η μέθοδος φυγοκέντρησης βαθμίδωσης φικόλης (LSM-Lymphocyte separation medium) επιτρέπει την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).

- Πρώτο βήμα είναι η αραίωση του αίματος 1:1 με RPMI-1640 ή 1x PBS, τα οποία βρίσκονται σε RT.
- Η φικόλη (Biochrom) προστίθεται σε falcon σε όγκο ίσο με το 1/3 του συνολικού όγκου και ακολούθως προστίθεται το αίμα προσεκτικά ώστε να μην αναμειχθεί με τη φικόλη.
- Το διάλυμα φικόλης-αίματος φυγοκεντρείται στις 2500 rpm για 35min χωρίς φρένο, σε RT.
- Μετά το πέρας τη φυγοκέντρησης προκύπτουν τρεις στοιβάδες (Εικόνα3.4). Στην πάνω στοιβάδα βρίσκεται το πλάσμα του αίματος, στην ενδιάμεση το buffy coat των PBMCs συμπεριλαμβανομένου των T, B, NK λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων και στην κάτω στοιβάδα λαμβάνεται η φικόλη με τα κοκκιοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα.
- Η ενδιάμεση στοιβάδα με τα PBMCs μεταφέρεται σε falcon που έχει προστεθεί RPMI-1640 ή 1x PBS και φυγοκεντρείται στις 1800rpm, για 10min, σε RT.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε RPMI-1640 ή 1x PBS.
- Με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου ή κυτταρομετρητή υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800rpm, για 10min, σε RT, απόρριψη του υπερκείμενου και φύλαξη του ιζήματος στους -20^{o}C.



Εικόνα 3.4: Απεικόνιση του αίματος πάνω στη στοιβάδα της φικόλης πριν από τη φυγοκέντρηση καθώς και οι στοιβάδες που προκύπτουν μετά το πέρας της φυγοκέντρησης. (https://irepertoire.com/blood-collection-and-sample-considerations/)

3.12 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική μέσω της οποίας δίνεται η δυνατότητα να μετρηθούν ταυτόχρονα διάφορα φυσικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων σωματιδίων, συνήθως κυττάρων. Τα κύτταρα ενός δείγματος διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο στο οποίο προσπίπτει μια ακτίνα φωτός. Τα χαρακτηριστικά τα οποίο μετρούνται περιλαμβάνουν το σχετικό μέγεθος των σωματιδίων, τη σχετική ένταση φθορισμού και τη σχετική κοκκίωση ή εσωτερική πολυπλοκότητα. Ο τρόπος με τον οποίο το κάθε κύτταρο ή σωματίδιο σκεδάζει το προσπίπτων φως και εκπέμπει φθορισμό καταγράφεται από ένα σύστημα το οποίο συνδέει το οπτικό με το ηλεκτρικό σήμα. Μέσω αυτού του συστήματος γίνονται οι μετρήσεις. Ειδικοί φακοί συλλέγουν το σκεδαζόμενο και το φθορίζων φως τα οποία κατευθύνονται σε ειδικούς ανιχνευτές που ανάλογα με το

οπτικό σήμα που λαμβάνουν παράγουν ηλεκτρικά σήματα. Τα ηλεκτρικά αυτά σήματα αναλύονται από ειδικά λογισμικά και αντικατοπτρίζουν τα χαρακτηριστικά των κυττάρων του δείγματος.

Αναλόγως της διάταξης των ειδικών ανιχνευτών, η σκέδαση του φωτός από ένα κύτταρο μπορεί να ανιχνευτεί υπό διάφορες γωνίες. Στην περίπτωση στην οποία ο ανιχνευτής βρίσκεται μπροστά από το κύτταρο, μετράει το οριζόντιο σκεδαζόμενο φως (Forward-scattered Light – FSC), το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος ή την επιφάνεια του κυττάρου. Στην περίπτωση όμως που ο ανιχνευτής είναι κάθετος προς το προσπίπτων φως, μετράει την κάθετη σκέδαση του φωτός (Side- scattered Light – SSC), η οποία αντικατοπτρίζει την κοκκίωση του κυττάρου ή την εσωτερική πολυπλοκότητά του.

Για την φαινοτυπική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής BD FACS ARIA II. Το συγκεκριμένο μηχάνημα εκτός της μέτρησης των χαρακτηριστικών των κυτταρικών πληθυσμών, παρέχει τη δυνατότητα του διαχωρισμού και της συλλογής των κυττάρων, έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες λειτουργικές, μικροσκοπικές ή βιοχημικές αναλύσεις.

Με βάση το φθορισμό συγκεκριμένων φθοροχρωμάτων αναγνωρίζονται οι επιθυμητοί πληθυσμοί και στη συνέχεια τα κύτταρα των συγκεκριμένων πληθυσμών φορτίζονται. Επόμενο βήμα είναι ο διαχωρισμός των κυττάρων με βάση το φορτίο τους και η συλλογή τους.

Η διαδικασία μέσω της οποίας γίνεται η χρώση των επιφανειακών δεικτών για την φαινοτύπηση ή ο διαχωρισμός κυτταρικών υποπληθυσμών με κυτταρομετρία ροής, έχει ως εξής:

- Τα απομονωμένα PBMCs τοποθετούνται σε σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής σε συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/100μl.
- Ακολούθως προστίθεται ο κατάλληλος κάθε φορά συνδυασμός μονοκλωνικών αντισωμάτων σε κάθε δείγμα, γίνεται ανάδευση με vortex και ακολουθεί επώαση για 30min σε RT στο σκοτάδι.
- Μετά το πέρας της επώασης, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 1x PBS και επαναιώρηση

των κυττάρων σε όγκο κατάλληλο για κάθε χρήση (300μl 1x PBS για φαινοτύπηση ή 1ml FACS buffer για διαχωρισμό).

- Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του sorting ακολουθεί καταγραφή και υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων τα οποία συλλέχθηκαν.
- Ακολουθεί πλύση των κυττάρων με διάλυμα 1x PBS και φυγοκέντρησή τους στις 2500rpm για 7min**.**
- Για να εξεταστεί η καθαρότητα των υποπληθυσμών χρησιμοποιούνται 10.000 κύτταρα από κάθε κατηγορία απομονωμένων κυττάρων. Η καθαρότητα σε όλα τα δείγματα ήταν >90%.
- Με την χρήση του προγράμματος BD FACSDiva 8.0.1 πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στον πίνακα 3.8 παρουσιάζονται τα αντισώματα/φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για τον οριστεί ο αρνητικός πληθυσμός του κάθε φθοριοχρώματος χρησιμοποιήθηκαν οι ισοτυπικοί μάρτυρες IgG-1-APC, IgG-1- PE, IgG-1-PE-Cy5, IgG-1-FITC και IgG-1- APC-H7 (BD Biosciences).

Κυτταρικός πληθυσμός	**Φθοριοχρώματα**
$CD3^+$ (Τ κύτταρα)	CD3-APC-H7 (BD Biosciences)
$CD3^+CD4^+$ (Th κύτταρα)	CD3-APC-H7 (BD Biosciences)
	CD4-FITC (BD Biosciences)
$CD25^+$ (ενεργοποιημένα κύτταρα)	CD25-PE (BD Biosciences)
$CD3^+CD4^+CD25^-$ (T effectors)	CD3-APC-H7 (BD Biosciences)
	CD4-FITC (BD Biosciences)
	CD25-PE (BD Biosciences)
$CD3^+CD4^+CD25^+$ (Tregs)	CD3-APC-H7 (BD Biosciences)
	CD4-FITC (BD Biosciences)

	CD25-PE (BD Biosciences)
$CD3^+CD4^+CD45RA^+CD25^-$ (παρθενικά Th κύτταρα)	CD3-APC-H7 (BD Biosciences)
	CD4-FITC (BD Biosciences)
	CD45RA-APC-H7 (BD Biosciences)
	CD25-PE (BD Biosciences)
$CD3^+CD4^+CD45RO^+CD25^-$ (μνημονικά Th κύτταρα)	CD3-APC-H7 (BD Biosciences)
	CD4-FITC (BD Biosciences)
	CD45RO-PE-Cy7 (BD Biosciences)
	CD25-PE (BD Biosciences)

Πίνακας 3.8: Κατάλογος των υποπληθυσμών των Th κυττάρων που εξετάσαμε καθώς και τα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε για την φαινοτύπηση ή τον κυτταρικό διαχωρισμό (sorting).

4. Αποτελέσματα

Μέρος 1

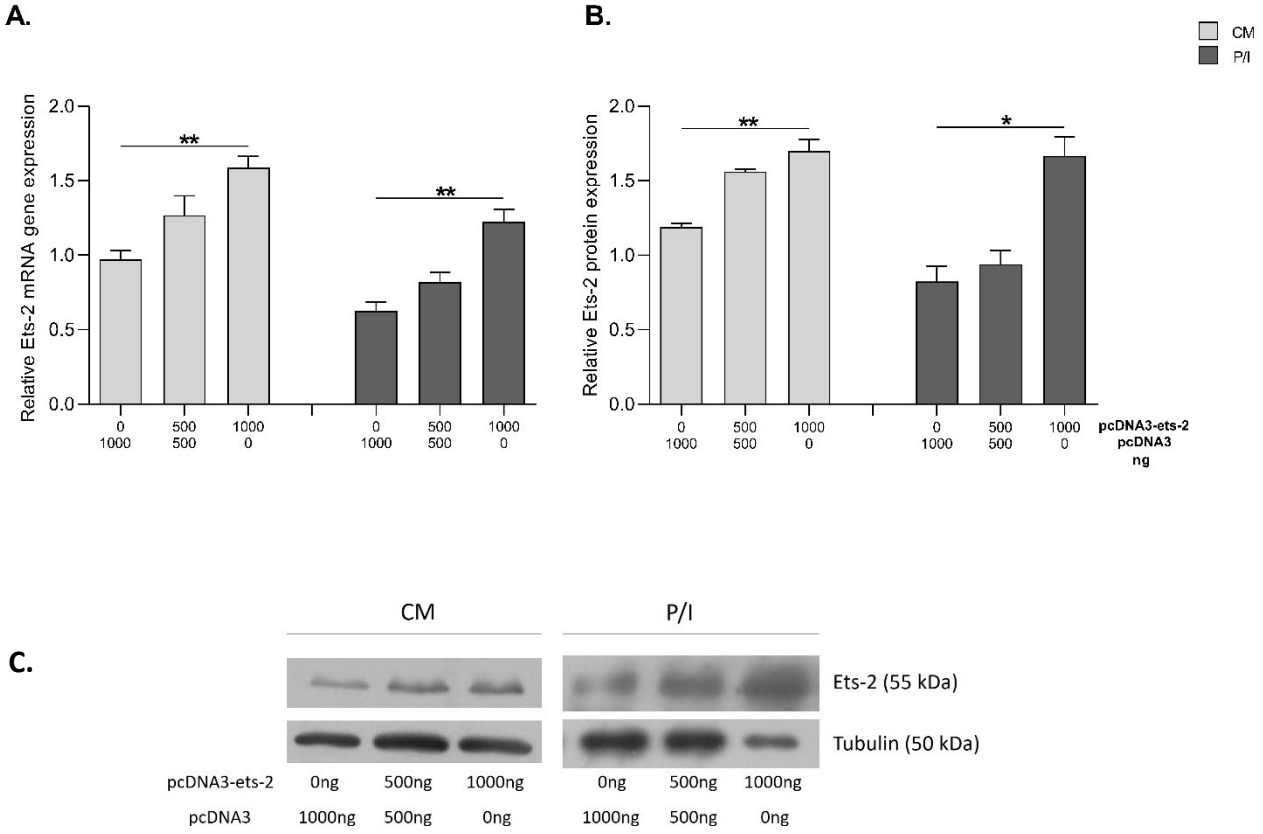
4.1 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του λεμφοτροπικού παράγοντα NFAT2

Υπάρχουν μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση του Ets-2 με τους λεμφοτροπικούς παράγοντες c-Jun και c-Fos, οι οποίοι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των Th λεμφοκυττάρων μέσω επαγωγής της IL-2 [128]. Ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την αλληλεπίδραση του Ets-2 με άλλους λεμφοτροπικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια για την ενεργοποίηση και λειτουργία των Th λεμφοκυττάρων. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το ρόλο του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης σημαντικών λεμφοτροπικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν με τη σειρά τους την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στα μονοπάτια ενεργοποίησης και διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής επιλέξαμε την λευχαιμική κυτταρική σειρά Jurkat. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί ένα σύστημα κυττάρων τα οποία συμπεριφέρονται όπως τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα, έχουν τη δυνατότητα να εκφράζουν IL-2 μετά την ενεργοποίησή τους με μιτογόνα και μπορούν να απομονωθούν εύκολα σε μεγάλη ποσότητα [129]. Για τους λόγους αυτούς επιλέξαμε την κυτταρική σειρά Jurkat για τη διεξαγωγή της μελέτης μας.

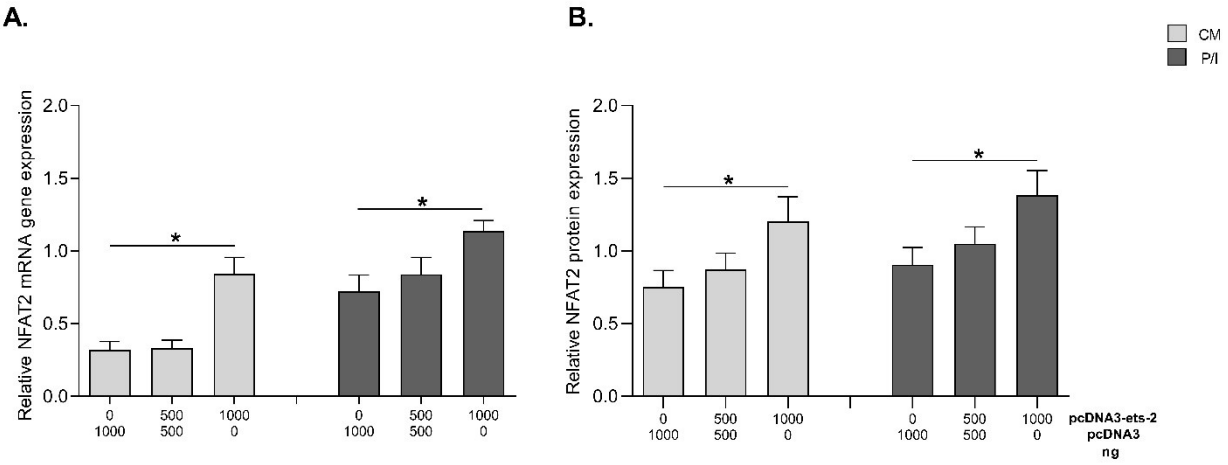
Πρώτο βήμα ήταν η μελέτη της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης μελών της οικογένειας NFAT και συγκεκριμένα του NFAT2. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης της κυτταρικής σειράς Jurkat. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον φορέα pcDNA3 καθώς και με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης του Ets-2 pcDNA3-ets-2. Ακολούθως, τα κύτταρα είτε παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό (CM), είτε ενεργοποιήθηκαν με τα μιτογόνα PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Στην εικόνα 4.1 επιβεβαιώνεται η υπερέκφραση του Ets-2 τόσο σε μεταγραφικό (A) όσο και σε πρωτεϊνικό (B), (C) επίπεδο, η οποία εξετάστηκε μέσω πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR και Western blot αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.1.A η ενεργοποίηση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ενδογενών επιπέδων του Ets-2, καθώς τα ενεργοποιημένα κύτταρα στα οποία δεν έχει προστεθεί

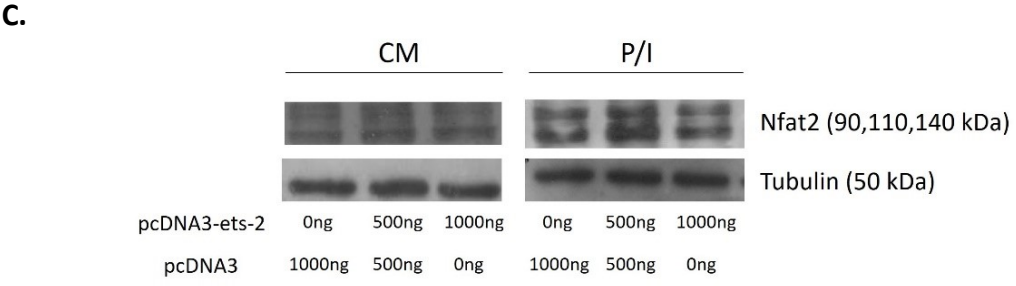
το πλασμίδιο υπερέκφρασης του Ets-2 παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα που παρέμειναν σε συνθήκες CM. Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και από την εικόνα 4.1.B, C καθώς τα ενεργοποιημένα κύτταρα τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με το pcDNA3-ets-2, παρουσιάζουν χαμηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα του Ets-2 συγκριτικά με τα μη ενεργοποιημένα κύτταρα.



Εικόνα 4.1: Υπερέκφραση του γονιδίου Ets-2 στην κυτταρική σειρά Jurkat. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με το φορέα pCDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A**. Τα επίπεδα σύνθεσης του Ets-2 mRNA προσδιορίστηκαν μέσω ποσοτικής real-time PCR. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης της β2-m. **B. C.** Η υπερέκφραση του Ets-2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο εξακριβώθηκε μέσω Western blot με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Ets-2. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του NFAT2 τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Αρχικά διερευνήθηκαν τα επίπεδα του NFAT2 mRNA. Όπως παρατηρείται στην εικόνα 4.2.Α η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων του πλασμιδίου υπερέκφρασης του Ets-2 οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του NFAT2 mRNA, τόσο στα κύτταρα που παρέμειναν στο καλλιεργητικό υλικό, όσο και στα κύτταρα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα. Από την εικόνα 4.2.Α προκύπτει επίσης ότι τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του NFAT2 συγκριτικά με τα ενεργοποιημένα κύτταρα. Ακολούθως, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του NFAT2. Σύμφωνα με την εικόνα 4.2.Β, C η υπερέκφραση του Ets-2 επέφερε στατιστικώς σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του NFAT2. Από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα προκύπτει επίσης ότι τα κύτταρα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης NFAT2 συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM.



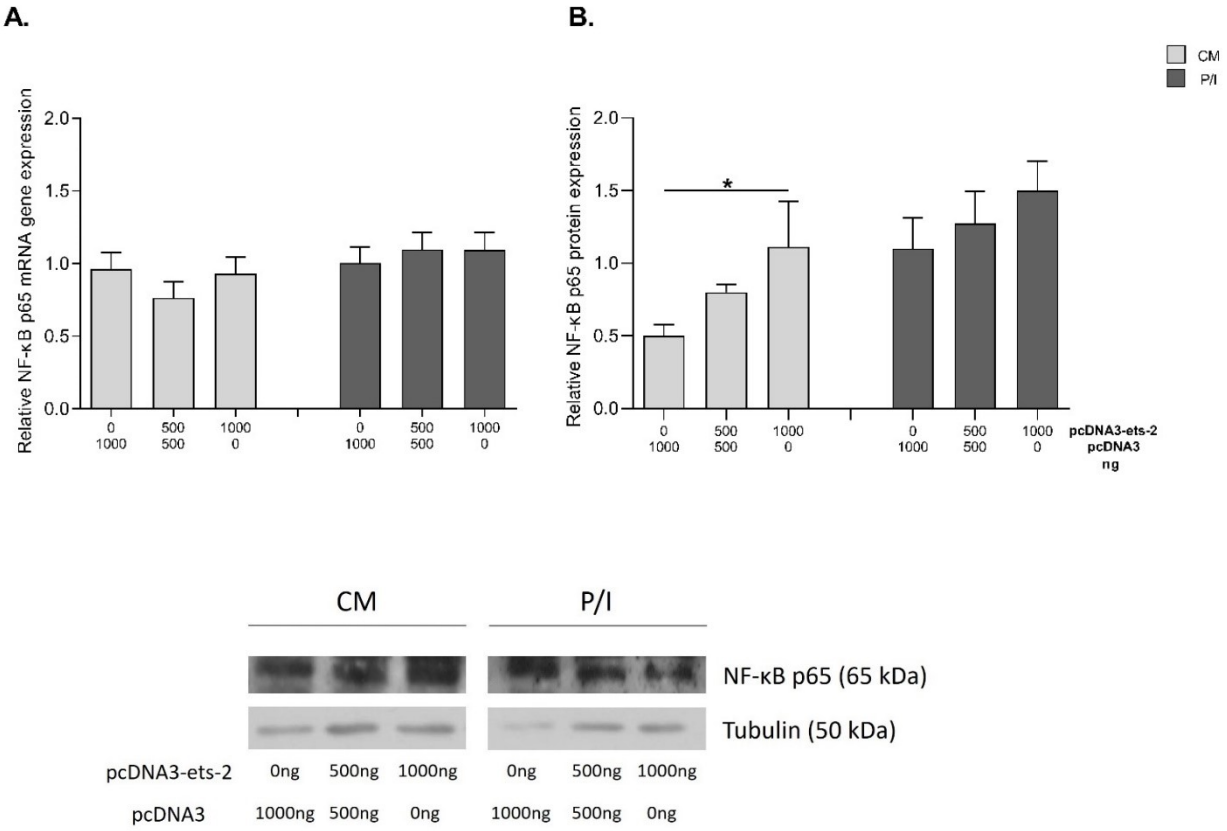


Εικόνα 4.2 : Επίδραση της υπερέκφρασης του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του NFAT2. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με το φορέα pCDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A**. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του NFAT2 προσδιορίστηκαν μέσω ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου **B. C.** Western blot ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του NFAT2 σε κύτταρα Jurkat με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης NFAT2. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.2 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του λεμφοτροπικού παράγοντα NF-κB p65

Μεταξύ των λεμφοτροπικών παραγόντων οι οποίοι αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής είναι και ο NF-κB p65. Για τη διερεύνηση του ρόλου του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του NF-κB p65 εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασής του, ως αποτέλεσμα των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2. Αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα του NF-κB p65 mRNA. Σύμφωνα με την εικόνα 4.3.A, η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων του πλασμιδίου υπερέκφρασης του Ets-2 τόσο στα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM, όσο και στα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα, δεν επέφερε κάποια αλλαγή στα επίπεδα του NF-κB p65 mRNA. Ωστόσο, διαφορετικά αποτελέσματα προκύπτουν από τη διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του NF-κB p65. Ειδικότερα, από την εικόνα 4.3.B, C φαίνεται ότι η υπερέκφραση του Ets-2 έχει ως αποτέλεσμα στατιστικώς σημαντική αύξηση έκφρασης της πρωτεΐνης NF-κB p65 στα κύτταρα που παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό. Τάση αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του NF-κB p65 παρατηρείται και στα ενεργοποιημένα κύτταρα, στα οποία όμως δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς

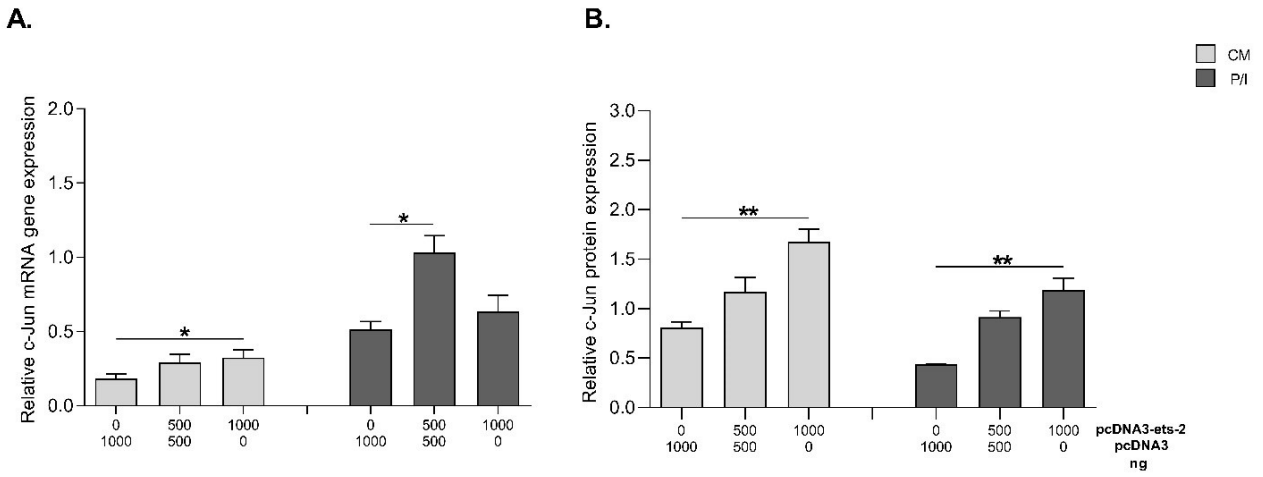
σημαντική διαφορά. Επίσης τα ενεργοποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης NF-κB p65 συγκριτικά με τα μη ενεργοποιημένα κύτταρα.

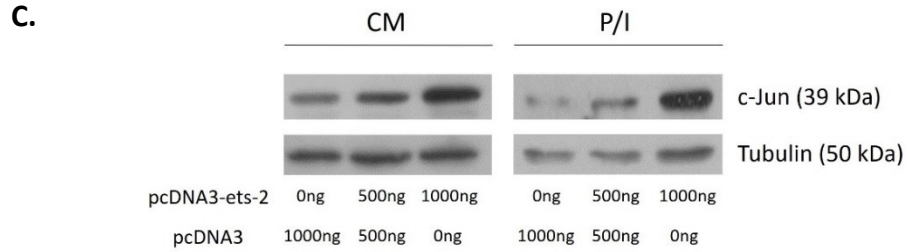


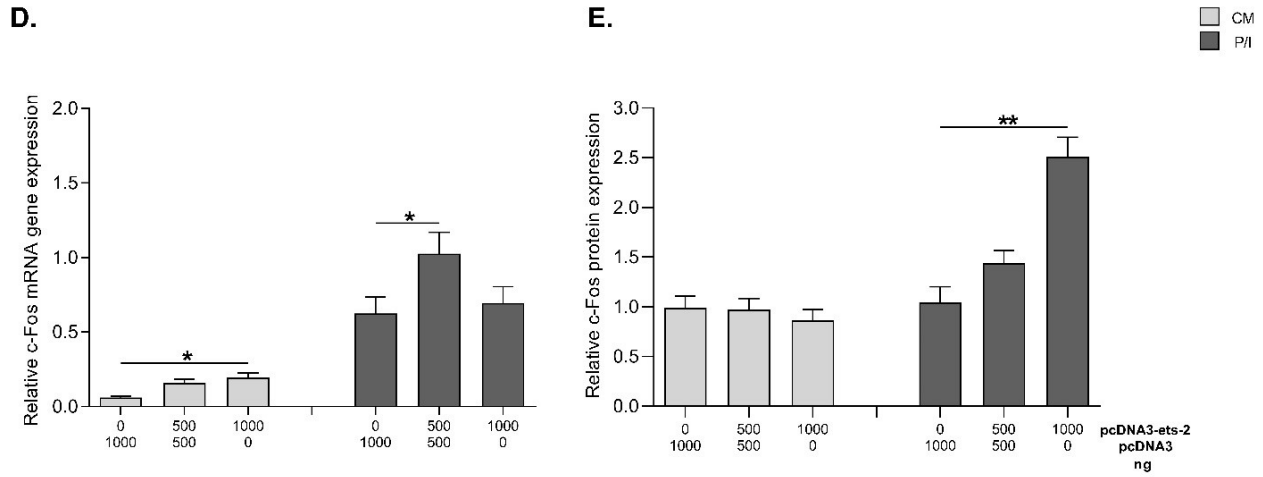
Εικόνα 4.3: Επίδραση της υπερέκφρασης του Ets-2 στην έκφραση του NF-κB p65. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με το φορέα pcDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό (CM) ή ενεργοποιήθηκαν με τη χρήση των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A.** Με ποσοτική real-time PCR διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του NF-κB p65 mRNA. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου **B. C.** Western blot ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του NF-κB p65 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης NF-κB p65. Για την ισοφόρτωση των δειγμάτων ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

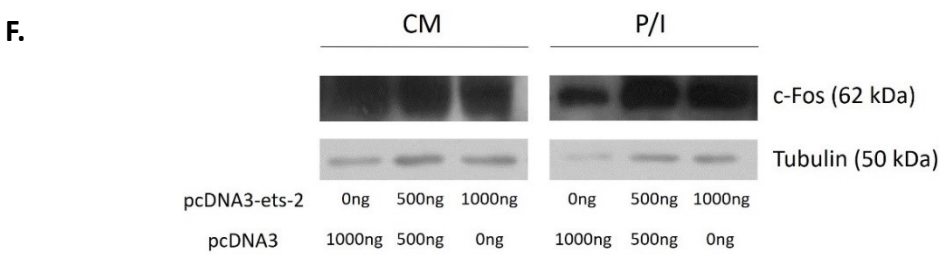
4.3 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης των λεμφοτροπικών παραγόντων c-Jun και c-Fos

Επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση του ρόλου του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης μελών της οικογένειας AP-1 και συγκεκριμένα των παραγόντων c-Jun και c-Fos. Αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα σύνθεσης του c-Jun και c-Fos mRNA, ως αποτέλεσμα των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2. Από το γράφημα 4.4.A και 4.4.D προκύπτει ότι η υπερέκφραση του Ets-2 έχει ως αποτέλεσμα στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του c-Jun και του c-Fos mRNA στα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 500 ng του πλασμιδίου υπερέκφρασης του Ets-2 παρουσιάζουν μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα του c-Fos και του c-Jun mRNA συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο. Επίσης από την εικόνα 4.4.A και 4.4.D παρατηρείται ότι τα επίπεδα του c-Jun και c-Fos mRNA των ενεργοποιημένων κυττάρων είναι υψηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα των κυττάρων που δεν ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα. Στη συνέχεια με την πραγματοποίηση πειραμάτων Western blot και τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων διερευνήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των παραγόντων c- Jun και c-Fos. Σύμφωνα με το γράφημα 4.4.B, C προκύπτει ότι η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων pcDNA3-ets-2 συνοδεύεται από στατιστικώς σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του c-Jun τόσο στις συνθήκες CM όσο και στις συνθήκες P/I. Από το γράφημα 4.4.E, F προκύπτει ότι η υπερέκφραση του Ets-2 οδήγησε σε στατιστικώςσημαντική αύξηση της πρωτεΐνης c-Fos μόνο στα ενεργοποιημένα κύτταρα, ενώ στα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή.


A.
B.
CM
P/I
Relative c-Jun mRNA gene expression
Relative c-Jun protein expression
pcDNA3-ets-2 ng
pcDNA3 ng


C.
CM
P/I
c-Jun (39 kDa)
Tubulin (50 kDa)
pcDNA3-ets-2 0ng 500ng 1000ng 0ng 500ng 1000ng
pcDNA3 1000ng 500ng 0ng 1000ng 500ng 0ng


D.
E.
CM
P/I
Relative c-Fos mRNA gene expression
Relative c-Fos protein expression
pcDNA3-ets-2 ng
pcDNA3 ng


F.
CM
P/I
c-Fos (62 kDa)
Tubulin (50 kDa)
pcDNA3-ets-2 0ng 500ng 1000ng 0ng 500ng 1000ng
pcDNA3 1000ng 500ng 0ng 1000ng 500ng 0ng

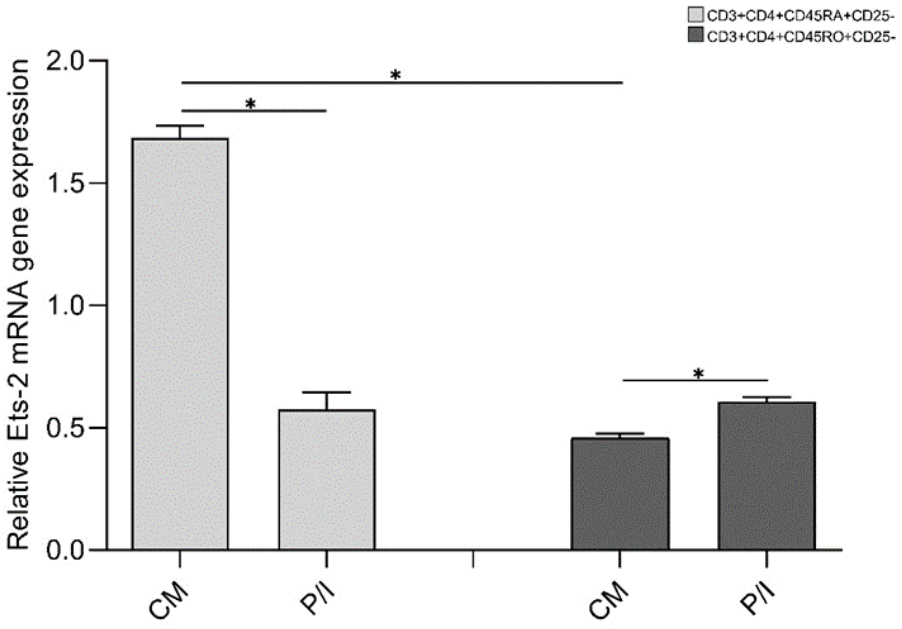
Εικόνα 4.4: Επίδραση της υπερέκφρασης του Ets-2 στην έκφραση του c-Jun και του c-Fos. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με το φορέα pCDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Μέσω ποσοτικής real-time PCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα σύνθεσης του **A.** c-Jun mRNA και του **D.** c-Fos mRNA. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Western blot ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του c-Jun σε κύτταρα Jurkat με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης c-Jun. **E. F.** Western blot ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του c-Fos με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης c-Fos. Για την ισοφόρτωση των δειγμάτων ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD)

4. Αποτελέσματα

Μέρος 2

4.4. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα

Στο πλαίσιο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης του Ets-2 και της διερεύνησης των μηχανισμών που ρυθμίζουν την μεταγραφική του δραστηριότητα, εξετάσαμε την έκφρασή του σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα. Από περιφερικό αίμα υγιών δοτών έγινε απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων μέσω φυγοκέντρησης βαθμίδωσης φικόλης και στη συνέχεια με τη χρήση FACS sorter απομονώθηκαν οι υποπληθυσμοί των παρθενικών (CD3+CD4+CD45RA+CD25-) και μνημονικών (CD3+CD4+CD45RO+CD25-) Th λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια τα απομονωμένα παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία μιτογόνων για 6h και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του Ets-2 mRNA με ποσοτική real-time PCR. Απο το γράφημα 4.5 παρατηρείται ότι στις συνθήκες CM τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα του Ets-2 mRNA τα οποία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των μνημονικών Th λεμφοκυττάρων στις ίδιες συνθήκες. Η ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων του Ets-2 mRNA. Τα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν ωστόσο ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Ειδικότερα η ενεργοποίηση των μνημονικών Th λεμφοκυττάρων με μιτογόνα είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του Ets-2 mRNA.

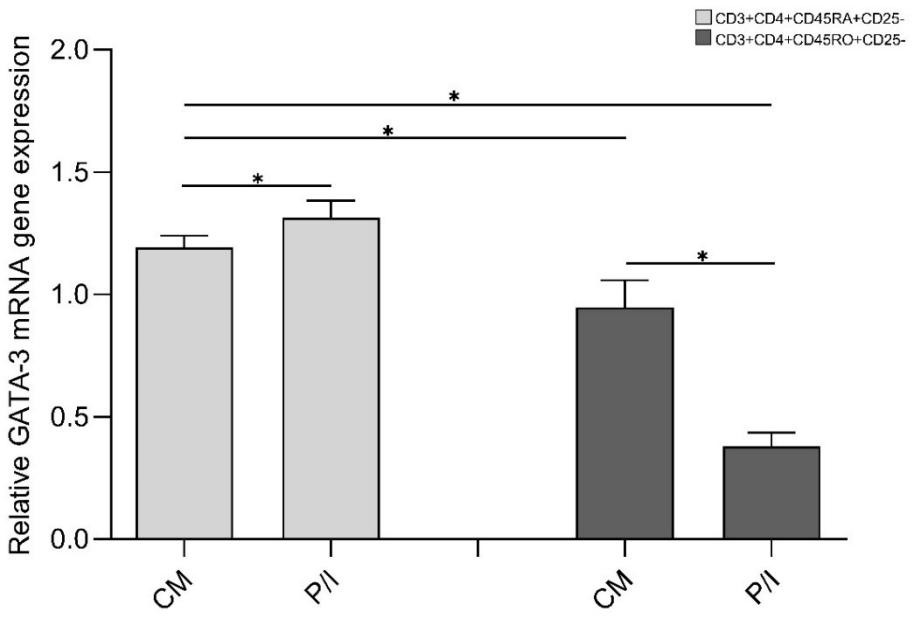


Εικόνα 4.5: Έκφραση του Ets-2 σε επίπεδο mRNA σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα σε διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μελέτη της έκφρασης του mRNA του γονιδίου του Ets-2 σε παρθενικά (CD3+CD4+CD45RA+CD25-) και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα (CD3+CD4+CD45RO+CD25-) υγιών μαρτύρων μέσω ποσοτικής real-time PCR. Οι απομονωμένοι υποπληθυσμοί καλλιεργήθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό απουσία (CM) αλλά και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, κατασκευή του cDNA και πραγματοποίηση των πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.5. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα

Επόμενος στόχος ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων, στα παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα. Αρχικά εξετάσαμε την έκφραση του GATA-3.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 4.6 η έκφραση του GATA-3 mRNA τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα είναι υψηλότερη, και παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά, από την έκφραση των μνημονικών Th λεμφοκυττάρων στις αντίστοιχες συνθήκες. Τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα GATA-3 mRNA τα οποία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων τα οποία ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα. Από το συγκεκριμένο γράφημα προκύπτει επίσης ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων με μιτογόνα έχει ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων του GATA-3 mRNA στα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα. Συγκεκριμένα τα ενεργοποιημένα κύτταρα των μνημονικών Th λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα GATA-3 mRNA τα οποία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των κυττάρων τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM.

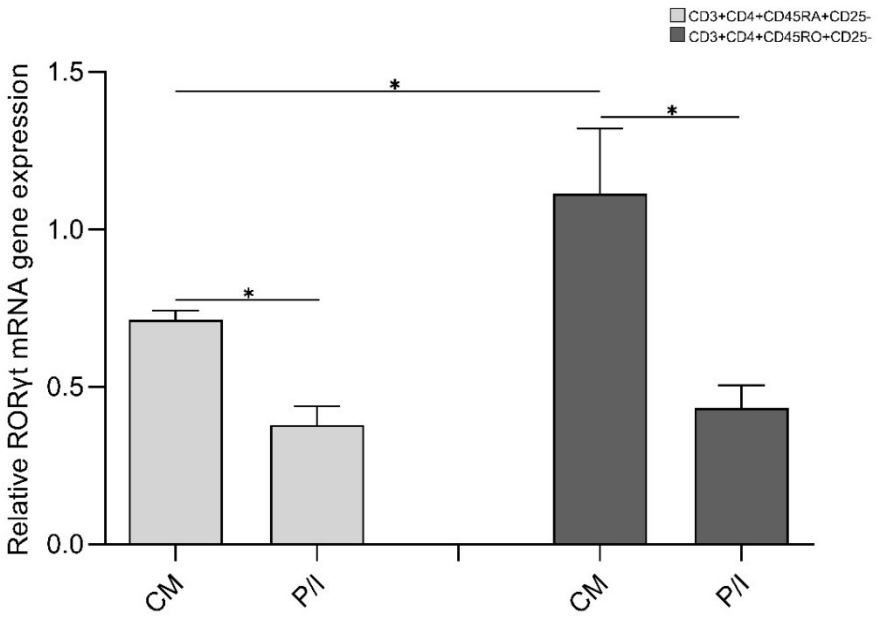


Εικόνα 4.6: Έκφραση του GATA-3 σε επίπεδο mRNA σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα σε διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μελέτη της έκφρασης του mRNA του γονιδίου του GATA-3 σε παρθενικά (CD3+CD4+CD45RA+CD25-) και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα (CD3+CD4+CD45RO+CD25-) υγιών μαρτύρων μέσω ποσοτικής real-time PCR. Οι ανωτέρω υποπληθυσμοί καλλιεργήθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό απουσία (CM) αλλά και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Αφού έγινε απομόνωση ολικού RNA και κατασκευή του cDNA πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ποσοτικής real-time PCR. Με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου έγινε η κανονικοποίηση των τιμών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.6 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα RORγt σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα

Στη συνέχεια μέσω πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR μελετήθηκε η έκφραση του RORγt σε απομονωμένα παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με το γράφημα 4.7 προκύπτει ότι στις συνθήκες CM τα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του RORγt mRNA, τα οποία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων τα οποία επίσης παρέμειναν σε συνθήκες CM. Η ενεργοποίηση των

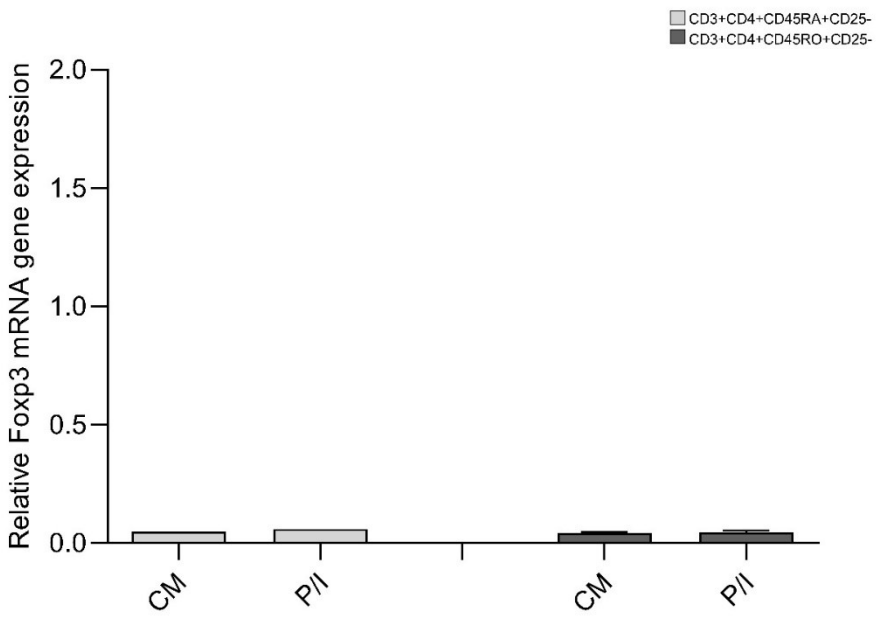
κυττάρων με μιτογόνα επέφερε στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση του RORγt mRNA στα παρθενικά αλλά και στα μνημονικά Th λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 4.7: Έκφραση του RORγt σε επίπεδο mRNA σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα σε διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μελέτη της έκφρασης του mRNA του γονιδίου του RORγt σε παρθενικά (CD3+CD4+CD45RA+CD25-) και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα (CD3+CD4+CD45RO+CD25-) υγιών μαρτύρων μέσω ποσοτικής real-time PCR. Οι απομονωμένοι υποπληθυσμοί καλλιεργήθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό απουσία (CM) αλλά και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Ακολούθως έγινε απομόνωση ολικού RNA, κατασκευή cDNA και πραγματοποίηση των πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.7. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα

Ακολούθως εξετάστηκε η έκφραση του Foxp3 mRNA σε απομονωμένα παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.8 δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του Foxp3 mRNA στους εξεταζόμενους απομονωμένους υποπληθυσμούς.



Εικόνα 4.8: Έκφραση του Foxp3 σε επίπεδο mRNA σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα σε διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μελέτη της έκφρασης του mRNA του γονιδίου του Foxp3 σε παρθενικά (CD3+CD4+CD45RA+CD25-) και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα (CD3+CD4+CD45RO+CD25-) υγιών μαρτύρων μέσω ποσοτικής real-time PCR. Τα παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό απουσία (CM) αλλά και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Ακολούθως έγινε απομόνωση ολικού RNA, κατασκευή cDNA και πραγματοποίηση των πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

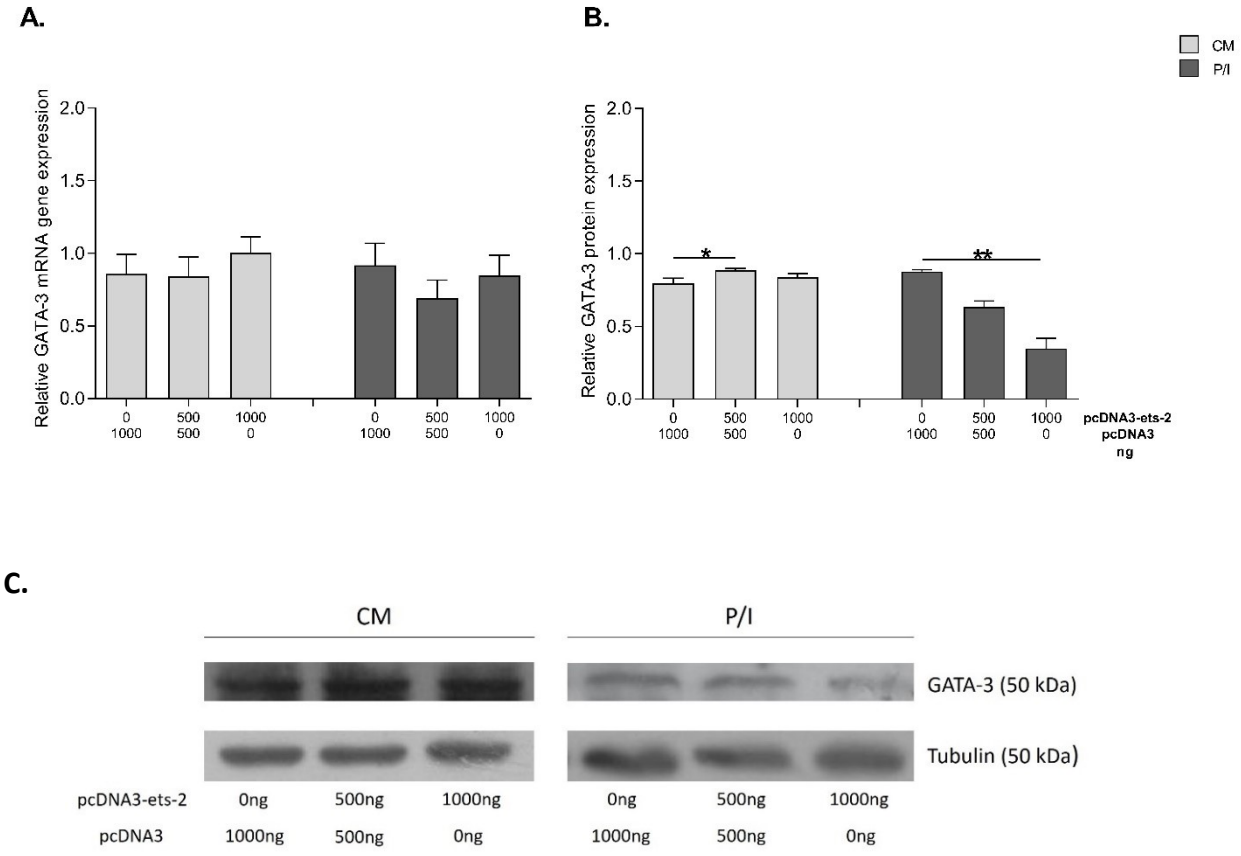
4. Αποτελέσματα

Μέρος 3

4.8 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3

Ένας από τους βασικούς στόχους της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται σε σημαντικές ανοσολογικές διεργασίες όπως είναι η διαδικασία διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων. Για αυτό το λόγο εξετάστηκε η δράση του Ets-2 στην έκφραση των παραγόντων GATA-3, RORγt και Foxp3, οι οποίοι επάγουν τη διαφοροποίηση των Th2, Th17 και Tregs, αντίστοιχα. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και τα αντίστροφα πειράματα δηλαδή η διερεύνηση του ρόλου των ανωτέρω μεταγραφικών παραγόντων στην έκφραση του Ets-2. Η διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων θα αποσαφηνίσει τη δράση του Ets-2 στη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων, καθώς και τους μοριακούς μηχανισμούς που είναι πιθανό να οδηγήσουν στην δημιουργία παθολογικών Th κλώνων οι οποίοι μπορεί να συμμετέχουν στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων όπως και άλλως παθολογικών καταστάσεων

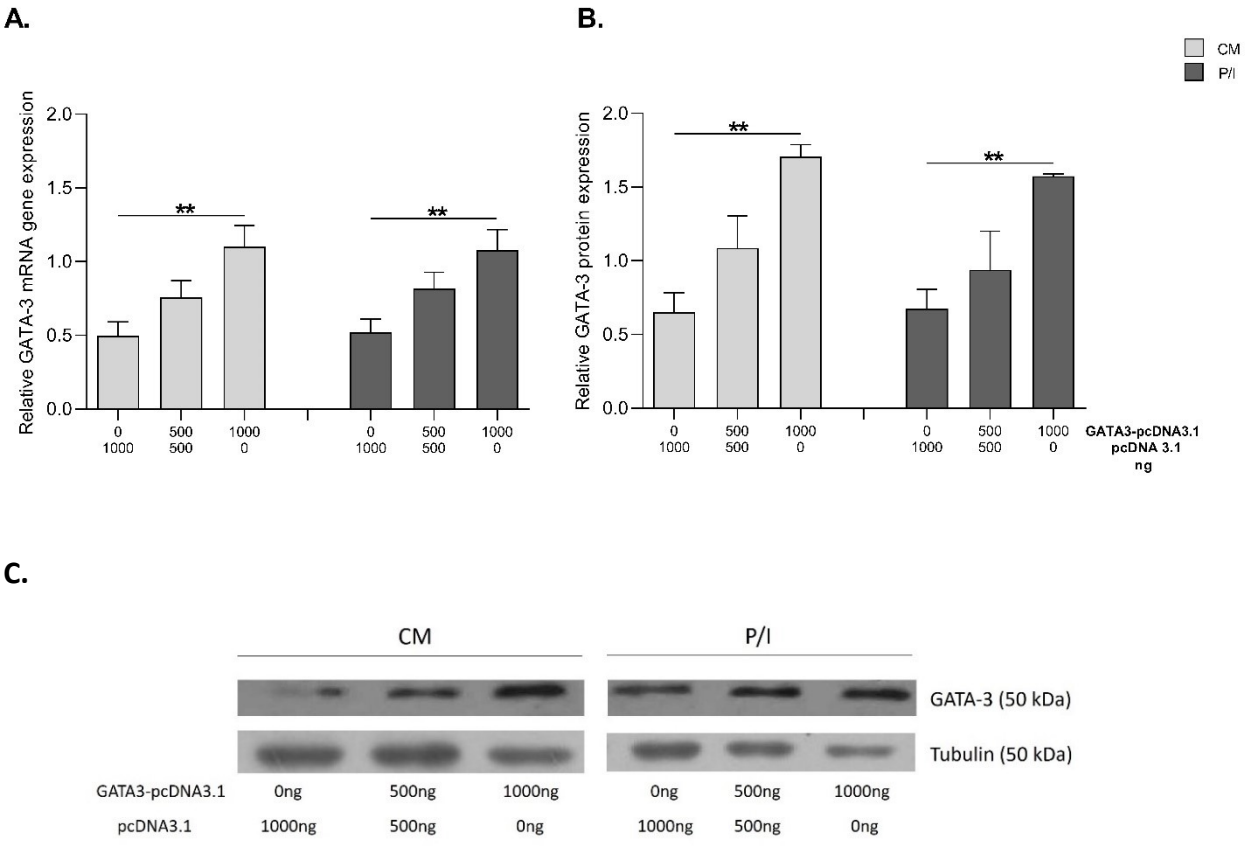
Αρχικά, ως συνέχεια των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2, τα οποία παρουσιάστηκαν στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων, διερευνήθηκε ο ρόλος του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του GATA-3. Αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα του GATA-3 mRNA. Από την εικόνα 4.9.Α προκύπτει ότι η υπερέκφραση του Ets-2 δεν επέφερε κάποια αλλαγή στα επίπεδα του GATA-3 mRNA. Ωστόσο, στην εικόνα 4.9.Β, C παρατηρείται ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GATA-3 των κυττάρων που παρέμειναν σε συνθήκες CM και διαμολύνθηκαν με 500 ng του pcDNA3-ets-2 παρουσιάζουν μια στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με τα επίπεδα των κυττάρων τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο υπερέκφρασης, αλλά διαμολύνθηκαν μόνο με το φορέα pcDNA3. Αντιθέτως, μετά την ενεργοποίηση τους με μιτογόνα, τα κύτταρα που δεν διαμολύνθηκαν με το pcDNA3-ets-2 παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης GATA-3 από τα επίπεδα των κυττάρων τα οποία διαμολύνθηκαν με 1000 ng του πλασμιδίου υπερέκφρασης. Επομένως, στα ενεργοποιημένα κύτταρα η υπερέκφραση του Ets-2 επέφερε σταδιακή μείωση των πρωτεινικών επιπέδων του GATA-3.



Εικόνα 4.9: Επίδραση της υπερέκφρασης του Ets-2 στην έκφρασης του GATA-3. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με τον φορέα pcDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) αλλά και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A.** Τα επίπεδα έκφρασης του GATA-3 mRNA εξετάστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου έγινε η κανονικοποίηση των τιμών. **B. C.** Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του GATA-3 διερευνήθηκαν με Western blot με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης GATA-3. Για την ισοφόρτωση των δειγμάτων ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.9 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 στην ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2

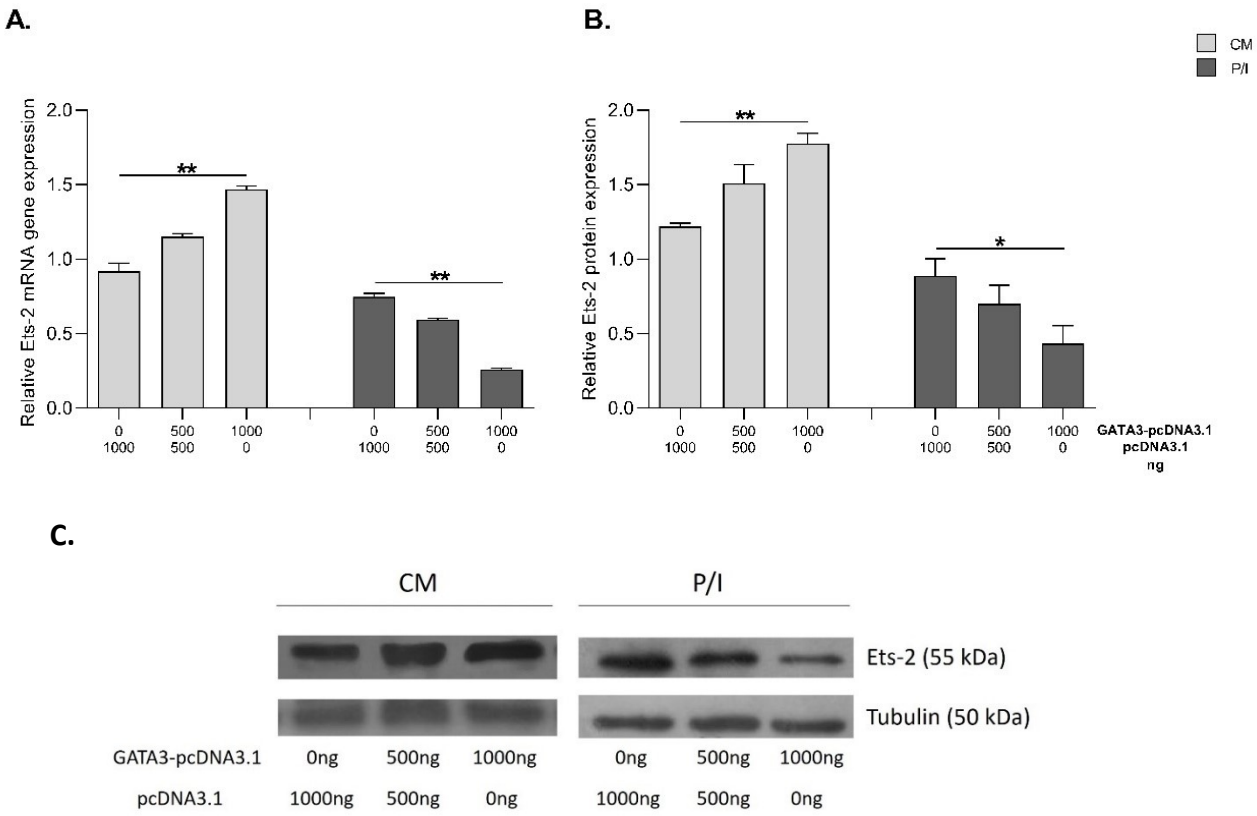
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τα αντίστροφα πειράματα με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 στην έκφραση του Ets-2. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης της κυτταρικής σειράς Jurkat με το φορέα pcDNA3.1 καθώς και με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης του GATA-3, GATA3-pcDNA3.1. Τα κύτταρα παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό (CM) ή ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα για 6h. Στην εικόνα 4.10 επιβεβαιώνεται η επιτυχία των πειραμάτων υπερέκφρασης του GATA-3 τόσο σε επίπεδο mRNA (A), όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (B, C).



Εικόνα 4.10: Υπερέκφραση του γονιδίου GATA-3 στην κυτταρική σειρά Jurkat. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης GATA3-pcDNA3.1 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του GATA-3, καθώς και με τον φορέα pcDNA3.1 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng.Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM)

και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A**. Μέσω ποσοτικής real-time προσδιορίστηκαν τα επίπεδα σύνθεσης του GATA-3 mRNA. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της β2-m. **B. C.** Μέσω πειραμάτων Western blot και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης GATA-3 πραγματοποιήθηκε έλεγχος της υπερέκφρασης του GATA-3 σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ως μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης. Το πρόγραμμα Graphpad Prism χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

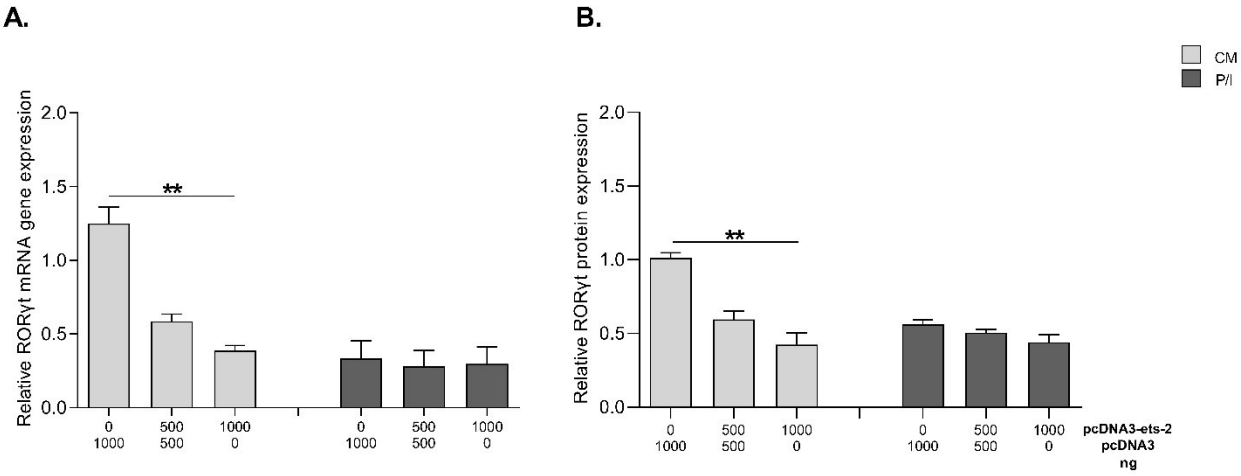
Αφού εξακριβώσαμε ότι επιτεύχθηκε η υπερέκφραση του GATA-3 τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο προχωρήσαμε στη διερεύνηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 στη ρύθμιση της έκφρασης του Ets-2. Σύμφωνα με την εικόνα 4.11.Α προκύπτει ότι η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων του GATA-3-pcDNA3.1 επέφερε σταδιακή αύξηση των επιπέδων του Ets-2 mRNA στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Ωστόσο στα ενεργοποιημένα κύτταρα παρατηρείται η αντίθετη εικόνα, καθώς η υπερέκφραση του GATA-3 είχε ως αποτέλεσμα στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων του Ets-2 mRNA. Η πραγματοποίηση των πειραμάτων Western blot με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του GATA-3 στην ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του Ets-2 οδήγησε σε αντίστοιχα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, παρατηρώντας την εικόνα 4.11.Β, C προκύπτει ότι στις συνθήκες CM, η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων εξωγενώς GATA-3 προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Ets-2 πρωτεΐνης, ενώ στις συνθήκες P/I οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Ets-2.



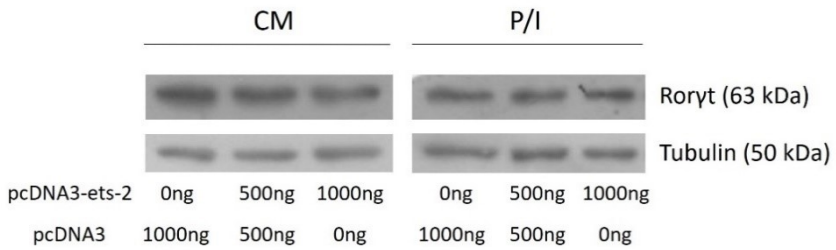
Εικόνα 4.11: Επίδραση της υπερέκφρασης του GATA-3 στην έκφρασης του Ets-2. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης GATA3-pcDNA3.1 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του GATA-3, καθώς και με τον φορέα pcDNA3.1 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A.** Τα επίπεδα έκφρασης του Ets-2 mRNA προσδιορίστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C**. Western blot ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Ets-2 τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Ets-2. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της τουμπουλίνης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.10 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα RORγt

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της επίδρασης που έχει η υπερέκφραση του Ets-2 στα επίπεδα έκφρασης του RORγt. Όπως παρατηρείται στο γράφημα 4.12.Α η προσθήκη εξωγενώς Ets-2 οδήγησε σε σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του RORγt mRNA στα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM. Συγκεκριμένα Jurkat κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 1000ng του pcDNA3-ets-2 παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του RORγt mRNA τα οποία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των κυττάρων τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο υπερέκφρασης του Ets-2. Ωστόσο, στα ενεργοποιημένα κύτταρα η υπερέκφραση του Ets-2 δεν επέφερε κάποια αλλαγή. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζουν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του RORγt στις συνθήκες CM (εικόνα 4.12.Β, C), καθώς η υπερέκφραση του Ets-2 είχε ως αποτέλεσμα στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης, ενώ επέφερε μια τάση μείωσης στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Επίσης από το γράφημα 4.12.Α και 4.12.Β, C προκύπτει ότι τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM και δεν διαμολύνθηκαν με το pcDNA3-ets-2 παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του RORγt τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο συγκριτικά με την αντίστοιχη κατηγορία των ενεργοποιημένων κυττάρων.



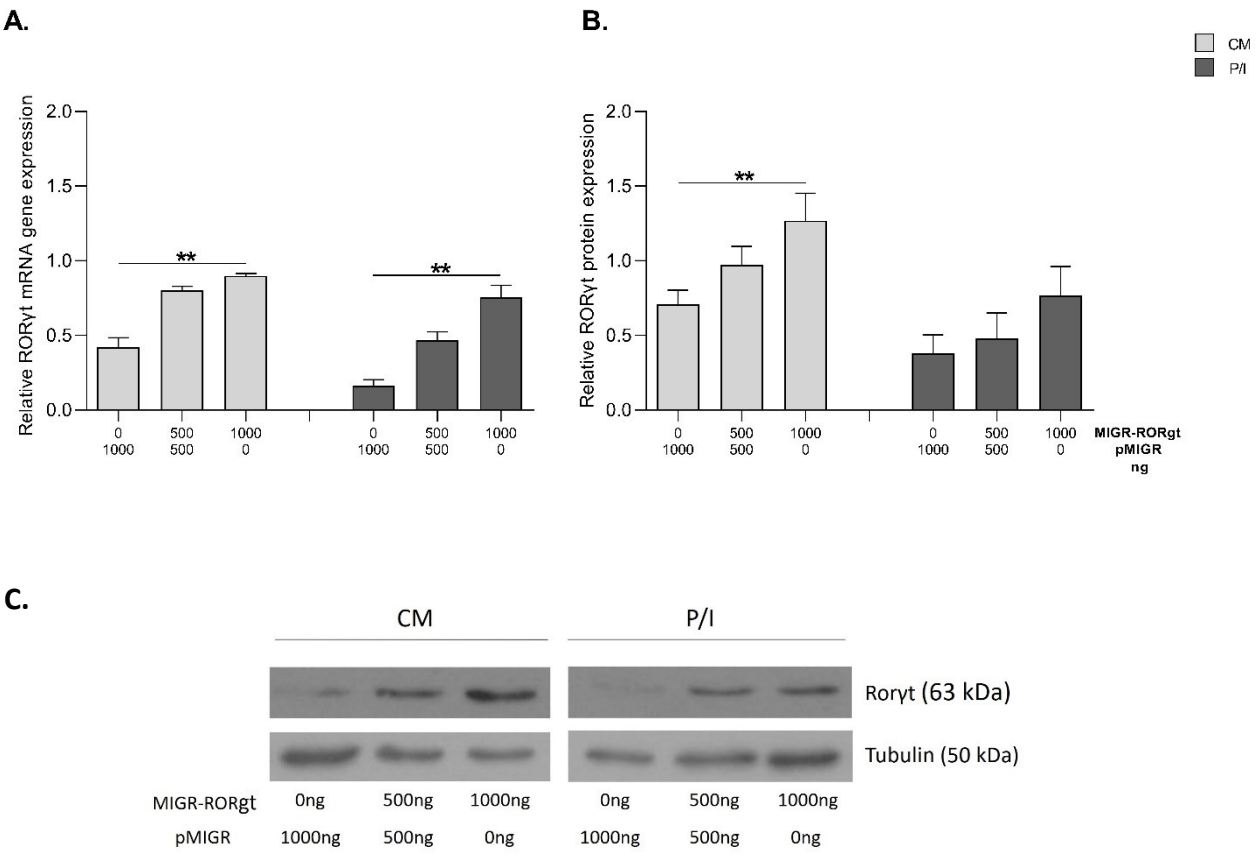
C.



Εικόνα 4.12: **Επίδραση της υπερέκφρασης του Ets-2 στην έκφραση του RORγt.** Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με τον φορέα pcDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A.** Τα επίπεδα σύνθεσης του RORγt mRNA προσδιορίστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου **B. C.** Western blot ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του RORtγ με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης RORγt. Για την ισοφόρτωση των δειγμάτων ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.11 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα RORγt στην ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2

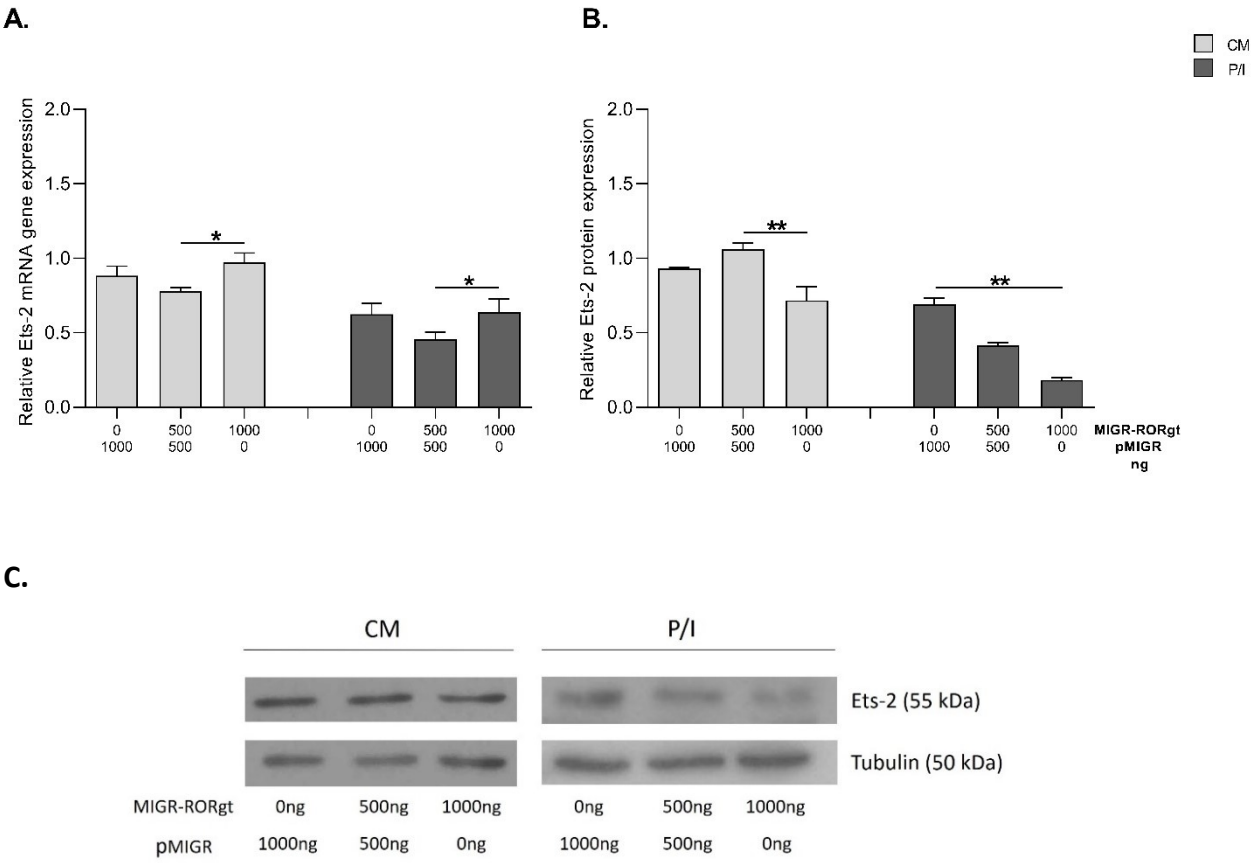
Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης της κυτταρικής σειράς Jurkat τα οποία αποσκοπούσαν στη μελέτη της δράσης του RORγt στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2. Ειδικότερα κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με το φορέα pMIGR καθώς και με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης του RORγt, MIGR-RORgt. Ακολούθως τα κύτταρα παρέμειναν σε συνθήκες CM ή ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα για 6h. Στην εικόνα 4.13 διαβεβαιώνεται η επιτυχία των πειραμάτων υπερέκφρασης του RORγt τόσο σε επίπεδο mRNA (A), όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (B, C). Επίσης σύμφωνα με την εικόνα 4.13.B, C παρατηρείται ότι τα κύτταρα τα οποία δεν ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης RORγt σε σχέση με τα ενεργοποιημένα κύτταρα.



Εικόνα 4.13: Υπερέκφραση του γονιδίου RORγt στην κυτταρική σειρά Jurkat. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης MIGR-RORgt (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του RORγt, καθώς και με τον φορέα pMIGR (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Ακολούθως τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A**. Τα επίπεδα έκφρασης του RORγt mRNA διερευνήθηκαν μέσω ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του RORγt μέσω πειραμάτων Western blot και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης RORγt. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της τουμπουλίνης. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Graphpad Prism των και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Σε συνέχεια των πειραμάτων υπερέκφρασης του RORγt, διερευνήσαμε το ρόλο του RORγt στη ρύθμιση της έκφρασης του Ets-2 σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Από την εικόνα 4.14.A προκύπτει ότι ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του RORγt τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 1000 ng του MIGR-RORgt παρουσιάζουν μια στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του Ets-2 mRNA συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 500 ng του MIGR-RORgt.

Η παρατήρηση αυτή ισχύει τόσο για τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM όσο και για τα κύτταρα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα. Αντιθέτως, σύμφωνα με την εικόνα 4.14.B, C παρατηρείται ότι στις συνθήκες CM, η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων εξωγενώς RORγt έχει ως αποτέλεσμα μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του Ets-2 στα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 1000 ng του MIGR-RORgt, καθώς τα επίπεδα τους είναι μειωμένα και παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τα επίπεδα των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με 500 ng του πλασμιδίου. Επίσης, η υπερέκφραση του RORγt στα κύτταρα τα οποία ενεργοιήθηκαν με μιτογόνα επέφερε στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση της Ets-2 πρωτεΐνης.

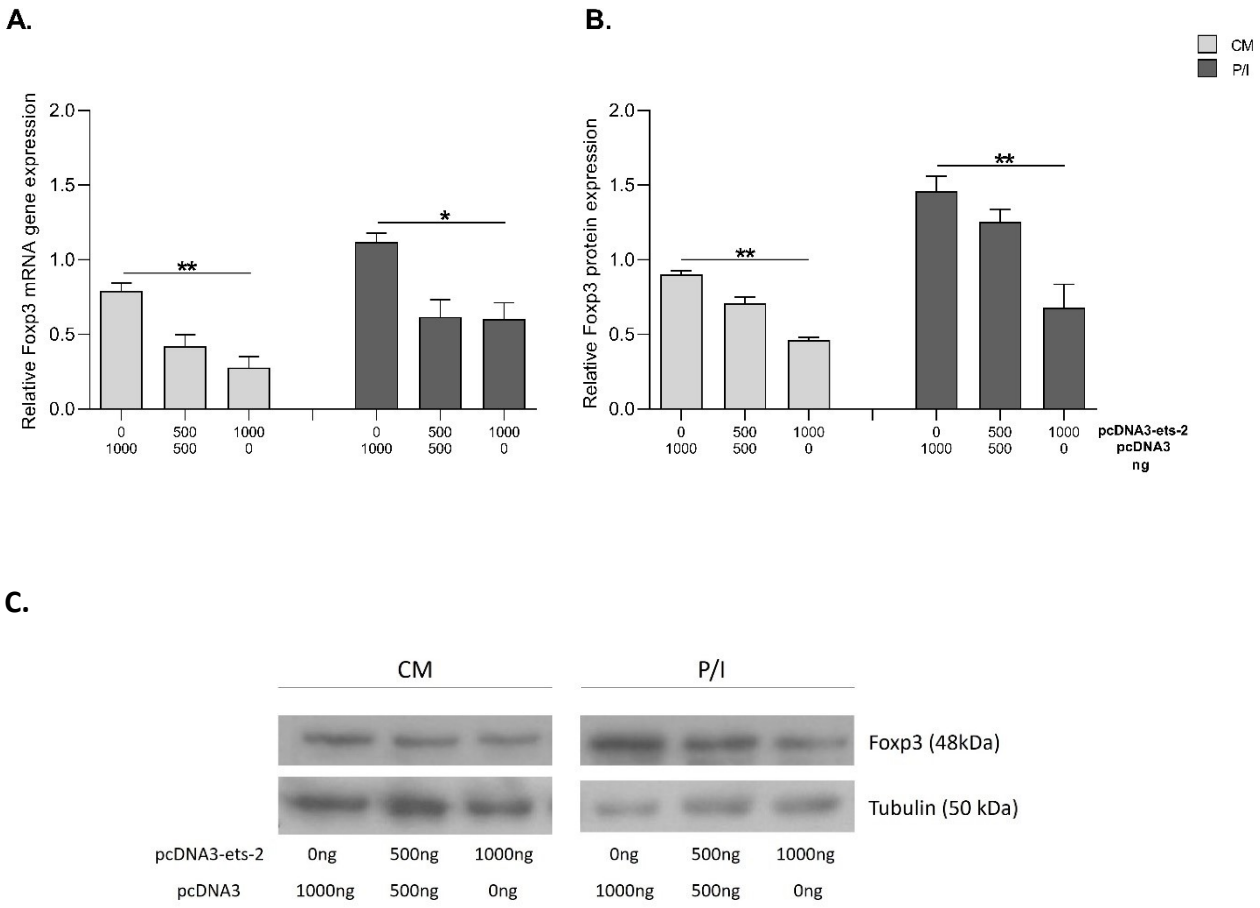


Εικόνα 4.14: Επίδραση της υπερέκφρασης του RORγt στην έκφραση του Ets-2. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης MIGR-RORgt (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του RORγt, καθώς και με τον φορέα pMIGR (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000ng. Τα κύτταρα είτε παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό (CM) είτε ενεργοποιήθηκαν με τη χρήση των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h.

A. Τα επίπεδα έκφρασης του Ets-2 mRNA εξετάστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου έγινε η κανονικοποίηση των τιμών **B. C.** Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του Ets-2 προσδιορίστηκαν με Western blot με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Ets-2. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.12. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3

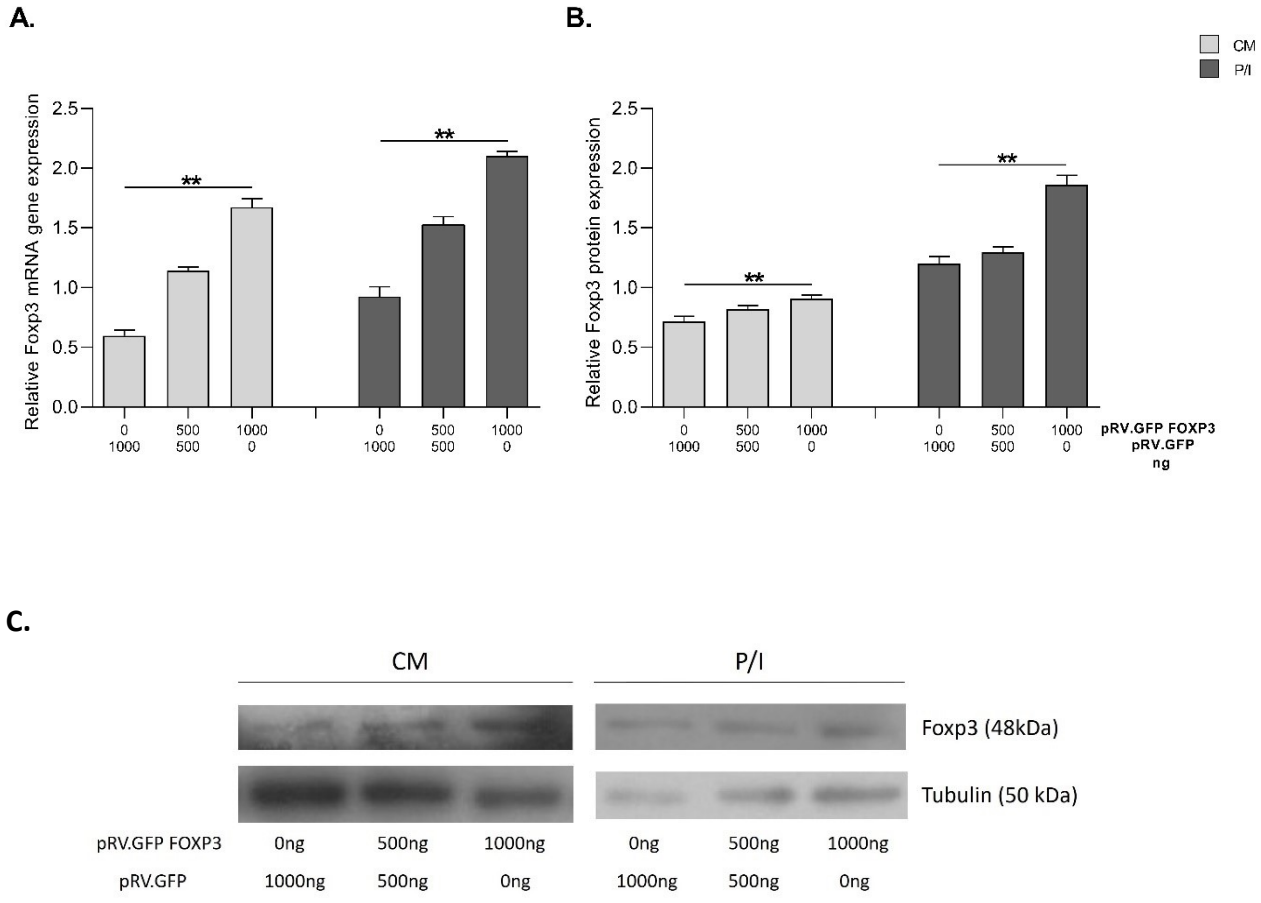
Ακολούθως, εξετάσαμε την έκφραση ενός ακόμη μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος συμμετέχει στη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων, του Foxp3. Ως συνέχεια των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2 αρχικά διερευνήσαμε το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην έκφραση του Foxp3 mRNA. Από την εικόνα 4.15.Α προκύπτει ότι η υπερέκφραση του Ets-2 επέφερε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του Foxp3 mRNA τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Επίσης τα ενεργοποιημένα κύτταρα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Foxp3 mRNA συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM. Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Foxp3. Συγκεκριμένα σύμφωνα με την εικόνα 4.15.Β, C η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων pcDNA3-ets-2 είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικώς σημαντική μείωση στην πρωτεϊνική έκφραση του Foxp3. Από την εικόνα 4.15.Β, C προκύπτει επίσης ότι τα ενεργοποιημένα κύτταρα έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Foxp3, συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες CM.



Εικόνα 4.15: Επίδραση της υπερέκφρασης του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με τον φορέα pcDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A.** Τα επίπεδα έκφρασης του Foxp3 mRNA εξετάστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του Foxp3 διερευνήθηκαν με Western blot με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Foxp3. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.13. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 στην ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2

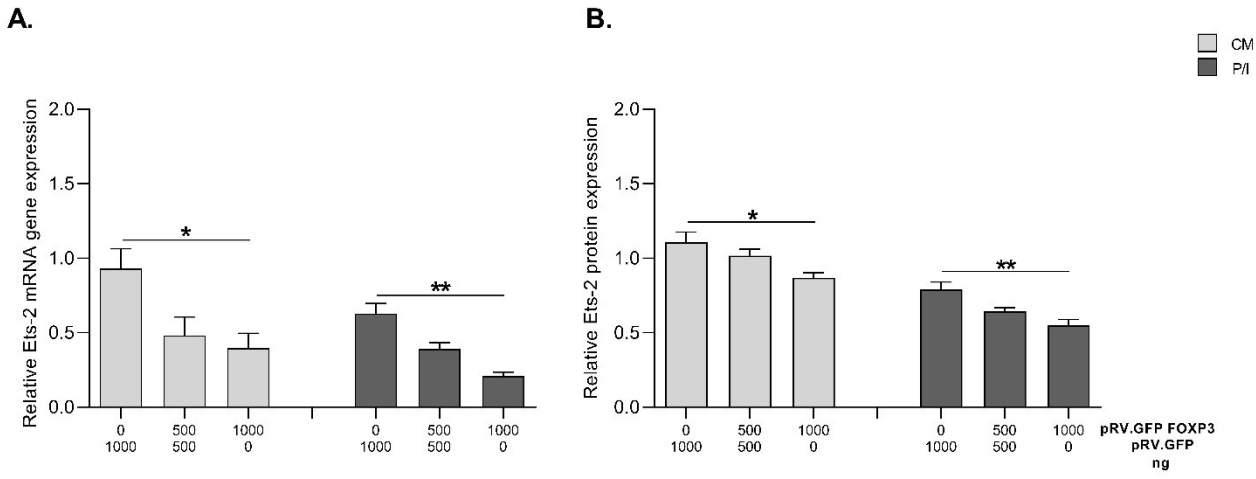
Στη συνέχεια με την πραγματοποίηση πειραμάτων υπερέκφρασης του Foxp3 στην κυτταρική σειρά Jurkat, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του ρόλου του Foxp3 στη ρύθμιση της έκφρασης του Ets-2. Συγκεκριμένα, κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με το φορέα pRV.GFP καθώς και με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης του FOXP3, pRV.GFP FOXP3. Τα κύτταρα είτε παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό είτε ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα για 6h. Στην εικόνα 4.16 επιβεβαιώνεται η επιτυχία των πειραμάτων υπερέκφρασης του Foxp3 σε επίπεδο mRNA (A) και σε επίπεδο πρωτεΐνης (B, C). Επίσης παρατηρείται ότι η προσθήκη μιτογόνων οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του Foxp3 τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο.



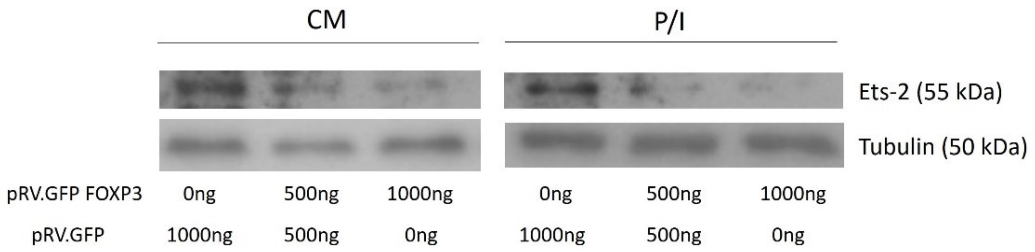
Εικόνα 4.16: Υπερέκφραση του γονιδίου Foxp3 στην κυτταρική σειρά Jurkat. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pRV.GFP FOXP3

(0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Foxp3, καθώς και με τον φορέα pRV.GFP (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A**. Μέσω ποσοτικής real-time PCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα σύνθεσης του Foxp3 mRNA. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Μέσω πειραμάτων Western blot και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Foxp3 πραγματοποιήθηκε έλεγχος της υπερέκφρασης του Foxp3 σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της τουμπουλίνης. Το πρόγραμμα Graphpad Prism χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση του Foxp3 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2. Όπως παρατηρείται στην εικόνα 4.17.A, η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων του pRV.GFP FOXP3 οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων του Ets-2 mRNA στις συνθήκες CM και στις συνθήκες P/I. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Ets-2. Ειδικότερα σύμφωνα με την εικόνα 4.17.B, C η υπερέκφραση του Foxp3 είχε ως αποτέλεσμα τόσο τα μη ενεργοποιημένα όσο και τα ενεργοποιημένα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 1000 ng του pRV.GFP FOXP3, να παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα της Ets-2 πρωτεΐνης τα οποία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των κυττάρων που δεν διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο υπερέκφρασης του Foxp3.



C.

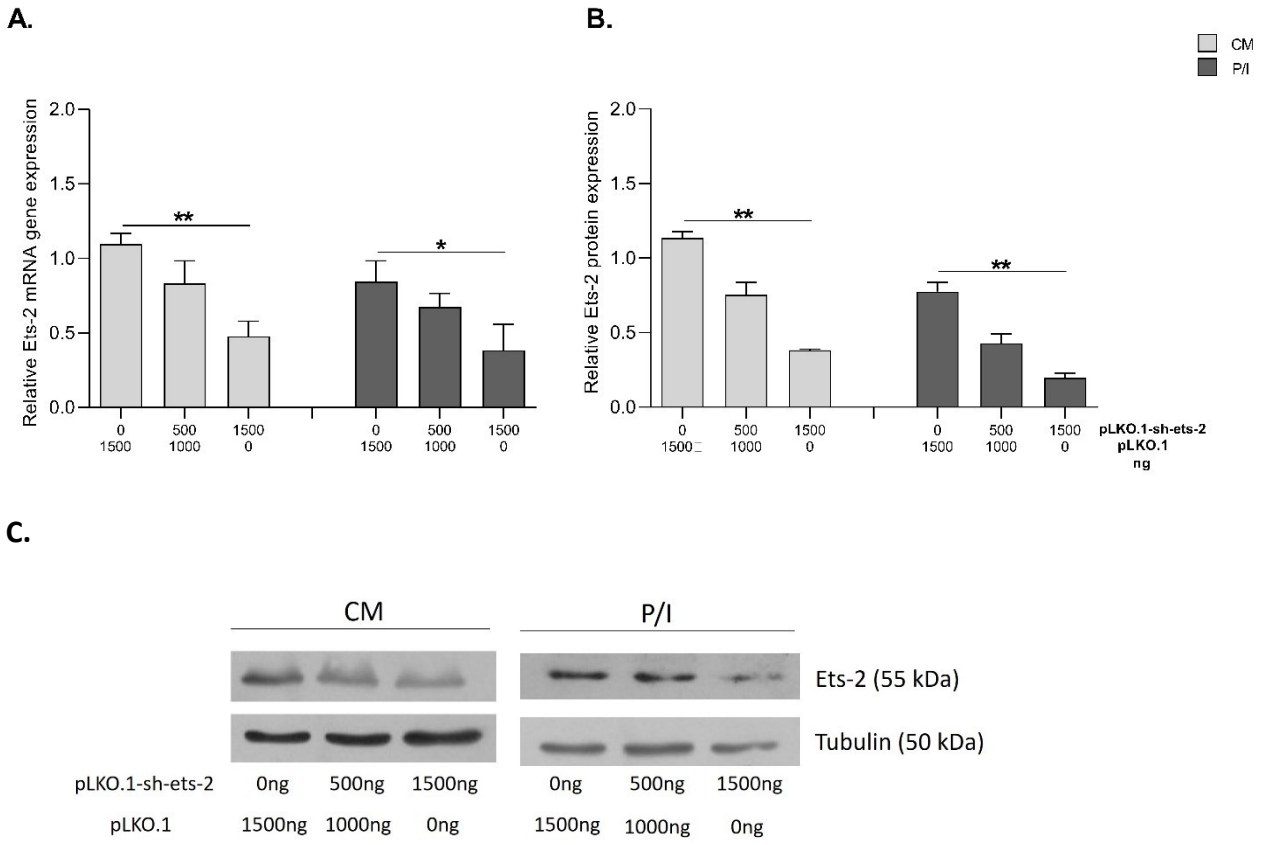


Εικόνα 4.17: Ο ρόλος του Foxp3 στη ρύθμιση της έκφρασης του Ets-2. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pRV.GFP FOXP3 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Foxp3, καθώς και με τον φορέα pRV.GFP (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό (CM) ή ενεργοποιήθηκαν με τα μιτογόνα PMA και ionomycin (P/I) για 6h. **A**. Μέσω πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του Ets-2 mRNA. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Μέσω πειραμάτων Western blot και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Ets-2 εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του Ets-2. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της τουμπουλίνης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

4.14 Αποσιώπηση του Ets-2 προκαλεί αύξηση της έκφρασης του Foxp3

Ιδιαίτερο ενδιαφέρουν παρουσιάζουν τα παραπάνω πειράματα τα οποία αποσκοπούν στη διερεύνηση του ρόλου του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3 καθώς και τα πειράματα που εξετάζουν τη δράση του Foxp3 στην έκφραση του Ets-2. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών υποδηλώνουν ότι η έκφραση του Foxp3 υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση από τον Ets-2, αλλά και ότι η έκφραση του Ets-2 καταστέλλεται από τον Foxp3. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του Foxp3 υφίστανται στατιστικώς σημαντική μείωση μετά από την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων εξωγενώς του Ets-2, αλλά και η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων εξωγενώς του Foxp3 οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων του Ets-2. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω και να επιβεβαιώσουμε την αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 προχωρήσαμε σε πειράματα αποσιώπησης του

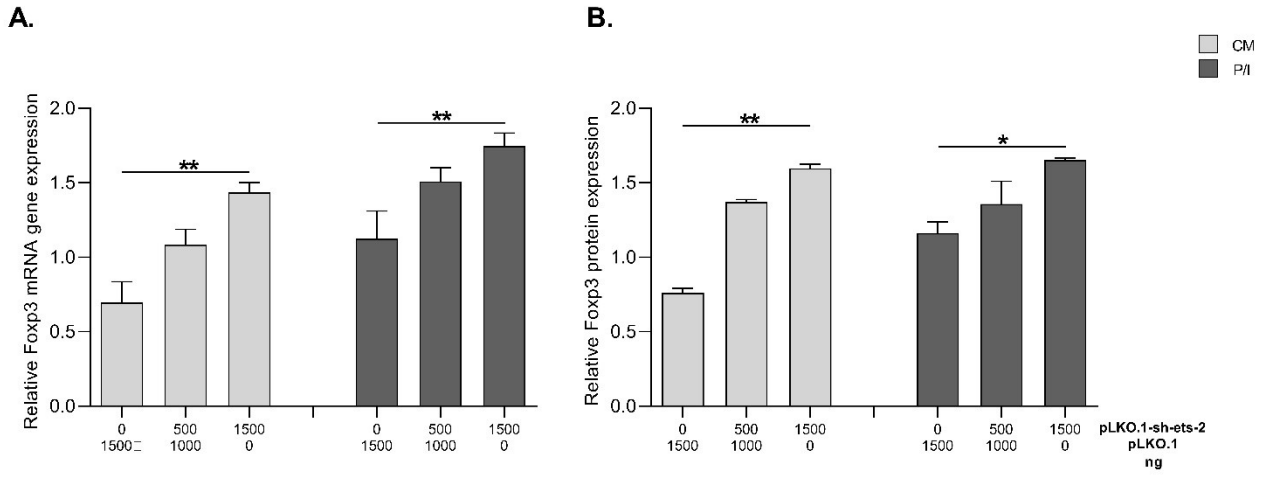
Ets-2 και σε έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του Foxp3. Αναλυτικότερα, για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αποσιώπησης πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς Jurkat με τον φορέα pLKO.1, καθώς και με αυξανόμενες ποσότητες μείγματος 5 κλώνων, ets-2 shRNA, pLKO.1-sh-ets-2. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία μιτογόνων για 6h. Μέσω πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR και Western blot εξακριβώθηκε η αποσιώπηση του Ets-2 σε μεταγραφικό (εικόνα 4.18.A) και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 4.18.B, C) αντίστοιχα.



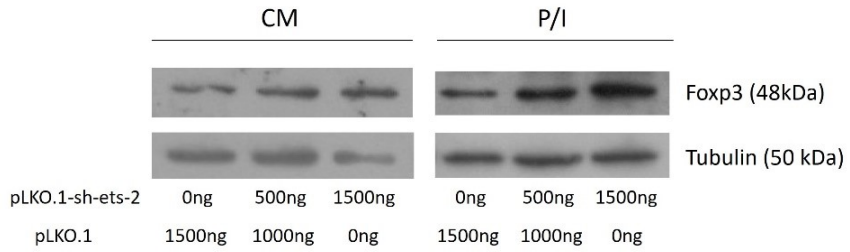
Εικόνα 4.18: Αποσώπηση του παράγοντα Ets-2 στην κυτταρική σειρά Jurkat. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες μείγματος το οποίο το αποτελούσαν 5 κλώνοι shRNA-ets-2, pLKO.1-sh-ets-2 (0, 500, 1500 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αποσιώπηση του Ets-2, καθώς και με τον φορέα pLKO.1 (1500, 1000, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1500 ng. Στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h.

A. Τα επίπεδα του Ets-2 mRNA προσδιορίστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Μέσω πειραμάτων Western blot και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Ets-2 πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης του Ets-2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της τουμπουλίνης. Το πρόγραμμα Graphpad Prism χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα δεδομενα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του Foxp3 ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης του Ets-2. Όπως παρατηρείται από την εικόνα 4.19.Α, η αποσιώπηση της έκφρασης του Ets-2 οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του Foxp3 mRNA τόσο στις συνθήκες CM όσο και στις συνθήκες P/I, όπως θα υποθέταμε με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα. Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν από την εικόνα 4.19.Β, C καθώς η προσθήκη των shRNA-ets-2 κλώνων επέφερε σταδιακή αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Foxp3. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2 και αποδεικνύουν τον κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του Foxp3.



C.



Εικόνα 4.19 : Η αποσιώπηση του παράγοντα Ets-2 στην κυτταρική σειρά Jurkat επιφέρει αύξηση των επιπέδων του Foxp3. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες μείγματος το οποίο το αποτελούσαν 5 κλώνοι shRNA-ets-2, pLKO.1-sh-ets-2 (0, 500, 1500 ng) μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η αποσιώπηση του Ets-2, καθώς και με τον φορέα pLKO.1 (1500, 1000, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1500 ng. Τα κύτταρα παρέμειναν σε καλλιεργητικό υλικό (CM) ή ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα (P/I). **A.** Τα επίπεδα του Foxp3 mRNA προσδιορίστηκαν με ποσοτική real-time PCR Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. **B. C.** Μέσω πειραμάτων Western blot και τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Foxp3 διερευνήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Foxp3. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της τουμπουλίνης. Το πρόγραμμα Graphpad Prism χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα δεδομενα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Επίσης μια σημαντική παρατήρηση η οποία προκύπτει από τα παραπάνω πειράματα καθώς και από τα πειράματα μελέτης της γονιδιακής έκφρασης του Ets-2 αλλά και των μεταγραφικών παραγόντων GATA-3, RORγt σε παρθενικά και μνημονικά Th λεμφοκύτταρα, είναι ότι τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων μεταγραφικών παραγόντων στα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα στις συνθήκες CM και P/I ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τα αντίστοιχα των Jurkat κυττάρων . Η παρατήρηση αυτή μας επιβεβαιώνει ότι τα Jurkat κύτταρα προσομοιάζουν τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα.

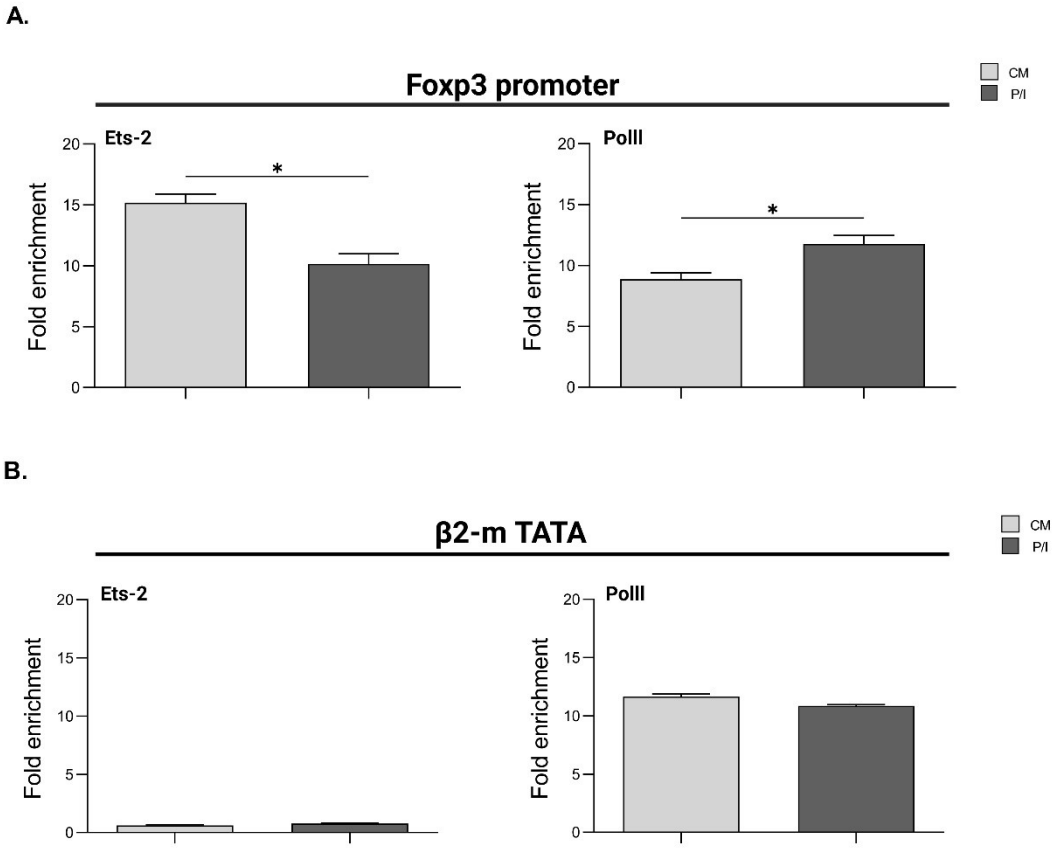
4.15 Ο μεταγραφικός παράγοντα Ets-2 καταστέλλει την έκφραση του Foxp3 μέσω της πρόσδεσης του στον υποκινητή του Foxp3

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2 διαθέτει πιθανές θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή του Foxp3, ενώ το αντίστροφο δεν ισχύει, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν πιθανές θέσεις πρόσδεσης του Foxp3 στον υποκινητή του Ets-2. Για να εξετάσουμε την πιθανότητα ο Ets-2 να καταστέλλει την έκφραση του Foxp3 μέσω της πρόσδεσής του στον υποκινητή του Foxp3 πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP). Για τον σκοπό αυτό απομονώθηκε χρωματίνη από κύτταρα Jurkat τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία αλλά και απουσία μιτογόνων για 6h. Το σύμπλοκο χρωματίνης/πρωτεϊνών κατακρημνίστηκε με την χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Ets-2 και PolII και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα real-time PCR, με τη χρήση ειδικών εκκινητών για να εξεταστεί η ικανότητα πρόσδεσης του Ets-2 στον υποκινητή του Foxp3. Σαν μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε την περιοχή του υποκινητή της β2-m (β2-m TATA box).

Όπως παρατηρούμε στο γράφημα 4.20 Α ο Ets-2 προσδένεται στον υποκινητή του Foxp3 τόσο στις συνθήκες CM, όσο και στις συνθήκες P/I. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπερέκφρασης και αποσιώπησης του Ets-2 που υποδηλώνουν τον κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3 και τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμινησης χρωματίνης, συμπεραίνουμε ότι ο Ets-2 προσδένεται στον υποκινητή του Foxp3 και καταστέλλει την έκφρασή του. Σύμφωνα με την εικόνα 4.20 Α παρατηρούμε επίσης οτι η πρόσδεση του Ets-2 στον υποκινητή του Foxp3 είναι αυξημένη στις συνθήκες CM συγκριτικά με τις συνθήκες P/I. Παρατηρώντας τα γραφήματα που προκύπτουν από την υπερέκφραση και την αποσιώπηση του Ets-2 (Εικόνα 4.1, 4.15, 4.18, 4.19), η έκφραση του Ets-2 είναι υψηλότερη από την έκφραση του Foxp3 στα κύτταρα που παρέμειναν σε συνθήκες CM και δεν διαμολύνθηκαν με το pcDNA3-ets-2 ή με του κλώνους του shRNA-ets-2. Αντιθέτως τα αντίστοιχα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση του Foxp3 συγκριτικά με την έκφραση του Ets-2. Η διαφορά αυτή μπορεί να αιτιολογείται από την αυξημένη πρόσδεση του Ets-2 στον υποκινητή

του Foxp3 στις συνθήκες CM και ως εκ τούτου από την αυξημένη κατασταλτική του δράση.

Επίσης στο σύμπλοκο χρωματίνης/πρωτεΐνης, χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης πολυμεράσης II (PolII). Σύμφωνα με την εικόνα 4.20 Α η PolII προσδένεται στον υποκινητή του Foxp3 στα μη ενεργοποιημένα και στα ενεργοποιημένα κύτταρα, με μεγαλύτερη πρόσδεση να παρατηρείται στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Για την επιβεβαίωση την ειδικότητας πρόσδεσης του Ets-2 στην περιοχή του υποκινητή του Foxp3, χρησιμοποιήσαμε ως control την περιοχή του υποκινητή της β2-m. Σύμφωνα με την εικόνα 4.20 Β η κατακρήμνιση της χρωματίνης με τη χρήση Ets-2 αντισώματος δεν ανέδειξε ικανότητα πρόσδεσης του Ets-2 στην περιοχή του υποκινητή της β2-m σε καμία από τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Αντιθέτως με τη χρήση του PolII αντισώματος η περιοχή του υποκινητή της β2-m που περιλαμβάνει το TATA box κατακρημνίστηκε στις συνθήκες CM και P/I σε σχεδόν ίσες ποσότητες.



Εικόνα 4.20: Έλεγχος πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στον υποκινητή του Foxp3 μέσω ανάλυσης chIP. Απεικόνιση σε γραφήματα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης chIP**.** Κύτταρα Jurkat καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) αλλά και παρουσία των μιτογόνων PMA και Ionomycin (P/I) για 6h. Το σύμπλοκο χρωματίνης/πρωτεϊνών κατακρημνίστηκε με την χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Ets-2 και PolII. Η crosslinked χρωματίνη από κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες CM πριν από τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας σε κάθε αντίδραση πολλαπλασιασμού των περιοχών με PCR για να επαληθεύσουμε ότι όλες οι αντιδράσεις εμπεριέχουν την ίδια συγκέντρωση χρωματίνης για την ανοσοκατακρήμνιση (INPUT). Ως αρνητικό μάρτυρα πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις χωρίς την προσθήκη χρωματίνης. Σαν εσωτερικό μάρτυρα προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ακρίβεια της chIP ανάλυσης (πολλαπλασιασμένες περιοχές και αντισώματα), πραγματοποιήσαμε PCR με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών για την ανίχνευση της TATA box περιοχής του του υποκινητή της β2-m (β2-m TATA). **A.** Έλεγχος της ικανότητας πρόσδεσης του Ets-2 και της PolII στον υποκινητή του Foxp3. **B.** Έλεγχος της ικανότητας πρόσδεσης του Ets-2 και της PolII στην TATA box περιοχή του υποκινητή της β2-m (β2-m TATA). Το πρόγραμμα Graphpad Prism χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα δεδομενα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

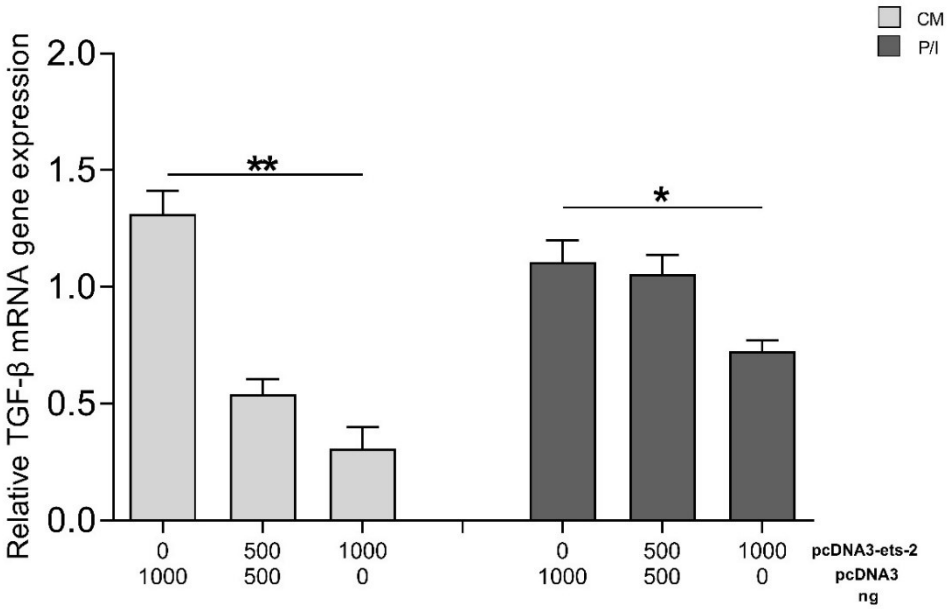
4.16. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στην ρύθμιση της έκφρασης του TGF-β

Δευτερέυον στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κυτταροκινών που φέρουν στον υποκινητή τους περιοχές πρόσδεσης του Ets-2. Στόχος των πειραμάτων μας αποτέλεσε ο TGF-β, καθώς αποτελεί βασικό ρυθμιστή της έκφρασης του Foxp3 και προωθεί τη διαφοροποίηση των T ρυθμιστικών κυττάρων. Ειδικότερα, το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β μαζί με το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-2 επάγουν την έκφραση του Foxp3. Ο TGF-β ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες της οικογένειας Smad οι οποίες προσδένονται στην περιοχή του ενισχυτή του Foxp3 και επάγουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής του [14].

Εκτός της συμμετοχής του στη διαφοροποίηση των T ρυθμιστικών κυττάρων, ο TGF-β εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των Th17 λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, παρουσία της IL-6 το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο εμπλέκεται ο TGF-β, οδηγεί

στην ενεργοποίηση του RORγt του κύριο ρυθμιστή της Th17 διαφοροποίησης [45] [46].

Ως συνέχεια των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2, εξετάστηκε η δράση του στην έκφραση του TGF-β mRNA. Όπως παρατηρείται στην εικόνα 4.21. η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων του pcDNA3-ets-2 οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων του TGF-β τόσο στις συνθήκες CM όσο και στις συνθήκες P/I. Τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με 1000 ng του πλασμιδίου υπερέκφρασης του Ets-2 παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα του TGF-β mRNA τα οποία δαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα των κυττάρων τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο.



Εικόνα 4.21: Ο ρόλος του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του TGF-β mRNA. Κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου υπερέκφρασης pcDNA3-ets-2 (0, 500, 1000 ng) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η υπερέκφραση του Ets-2, καθώς και με τον φορέα pcDNA3 (1000, 500, 0 ng) ώστε η ποσότητα του συνολικού DNA ανά δείγμα να παραμένει σταθερή στα 1000 ng. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (CM) και παρουσία των μιτογόνων PMA και ionomycin (P/I) για 6h. Τα επίπεδα έκφρασης του TGF-β mRNA εξετάστηκαν με ποσοτική real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Η μείωση των επιπέδων του TGF-β ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του Ets-2 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν συνδυαστεί με τα αποτελέσματα που υποδεικνύουν τον Ets-2 ως πιθανό καταστολέα της έκφρασης του Foxp3. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο TGF-β μέσω του Smad3 επάγει την έκφραση του Foxp3 η οποία ενισχύεται μέσω της επαγόμενης από την IL-2 ενεργοποίησης του Stat5, προωθώντας με αυτό τον τρόπο τη διαφοροποίηση των iTreg [130]. Επομένως μια υπόθεση που προκύπτει είναι ότι ο Ets-2 καταστέλλει την έκφραση του Foxp3, μέσω αρνητικής ρύθμισης του TGF-β.

4. Αποτελέσματα

Μέρος 4

4.17. Μελέτη της έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας

Σύμφωνα με μελέτες του εργαστηρίου μας, ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2 καταστέλλει προεπαγωγικά την έκφραση της IL-2, σε παρθενικά Th λεμφοκύτταρα μέσως πρόσδεσης στην αλληλουχία ARRE-2 του υποκινητή της IL-2. Η κατασταλτική αυτή δράση του Ets-2 αναστέλλεται με την ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων και συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων έκφρασης του Ets-2 τόσο σε ενεργοποιημένα παρθενικά όσο και σε μνημονικά Th λεμφοκύτταρα [78].

Επίσης, ο Ets-2 ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση και άλλων σημαντικών κυτταροκινών που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της IL-4 [80]. Εκτός από τη ρύθμιση των ανωτέρω κυτταροκινών, αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ένα πιθανό κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3, καθώς η υπερέκφραση του Ets-2 επέφερε σταδιακή μείωση των επιπέδων του Foxp3. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από τα πειράματα αποσιώπησης του Ets-2 που είχαν ως αποτέλεσμα σταδιακή αύξηση της έκφρασης του Foxp3. Επίσης σύμφωνα με τα πειράματα υπερέκφρασης του Foxp3 τα οποία πραγματοποιήθηκαν, ο Foxp3 λειτουργεί επίσης κατασταλτικά στη ρύθμιση της έκφρασης του Ets-2.

Στην παρούσα έρευνα στόχος ήταν η αποσαφήνιση του μηχανισμού ρύθμισης και δράσης του Ets-2. Παράλληλα τέθηκε το ερώτημα της πιθανής εμπλοκής του στην παθογένεια παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκονται τα Th λεμφοκύτταρα καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση τους. Ειδικότερα, στην παρούσα διατριβή διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση του Ets-2 με το αυτοάνοσο νόσημα της ΣΚΠ.

Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 10 ασθενείς με κλινικά διαγνωσμένη ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας διαλείπουσας μορφής (RR-MS) σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια McDonald's του 2005 [131]. Για την εκτίμηση της πορείας

της νόσου, της διάρκειας της νόσου, της τρέχουσας κατάστασης καθώς και του επιπέδου της αναπηρίας χρησιμοποιήθηκαν τα ιστορικά δεδομένα σε συνδυασμό με την νευρολογική εξέταση σύμφωνα με την κλίμακα expanded disability status scale -EDSS [132]. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα αντιστοιχισμένης ηλικίας και φύλου χωρίς ιστορικό νευρολογικής ή αυτοάνοσης νόσου και χωρίς συνοδά συμπτώματα φλεγμονής ή λοίμωξης. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα δημογραφικά στοιχεία των υγιών μαρτύρων και των ασθενών. Όταν λήφθηκαν τα δείγματα αίματος, οι ασθενείς βρίσκονταν σε ύφεση χωρίς θεραπεία (-Rx) ή σε ύφεση υπό θεραπεία με ιντερφερόνη β (+IFN). Ο σχεδιασμός αλλά και η υλοποίηση της έρευνας έγινε με άξονα τις αρχές Βιοϊατρικής Δεοντολογίας και τα δικαιώματα των ασθενών όπως περιγράφονται στη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Το πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας.

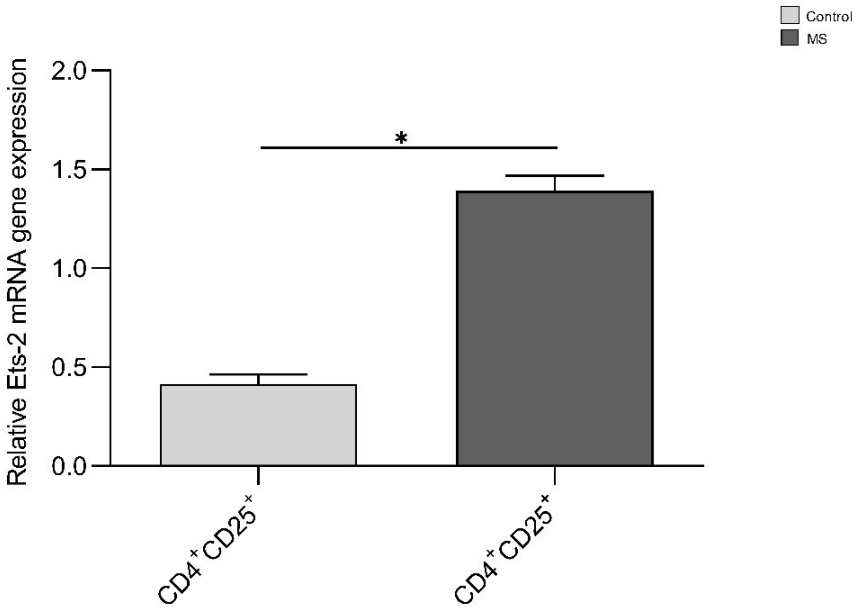
Ομάδα	Αριθμός	Φύλο (Α/Θ)	Ηλικία (έτη)	Διάρκεια νόσου (έτη)	Κλίμακα EDSS	Αριθμός ασθενών υπο θεραπεία με IFN
Υγιείς μάρτυρες	10	5/5	24-38	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
Ασθενείς με ΣΚΠ	10	4/6	24-38	2-7	1-2.5	6

Πίνακας 4.1. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με ΣΚΠ και υγιών μαρτύρων

Συντομογραφίες: Α, άρρεν, Θ, θήλυ, EDSS, expanded disability status scale, IFN, ιντερφερόνη, ΔΕ, δεν εφαρμόζεται

4.17.1. Έκφραση και κυτταρικός εντοπισμός του Ets-2 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ

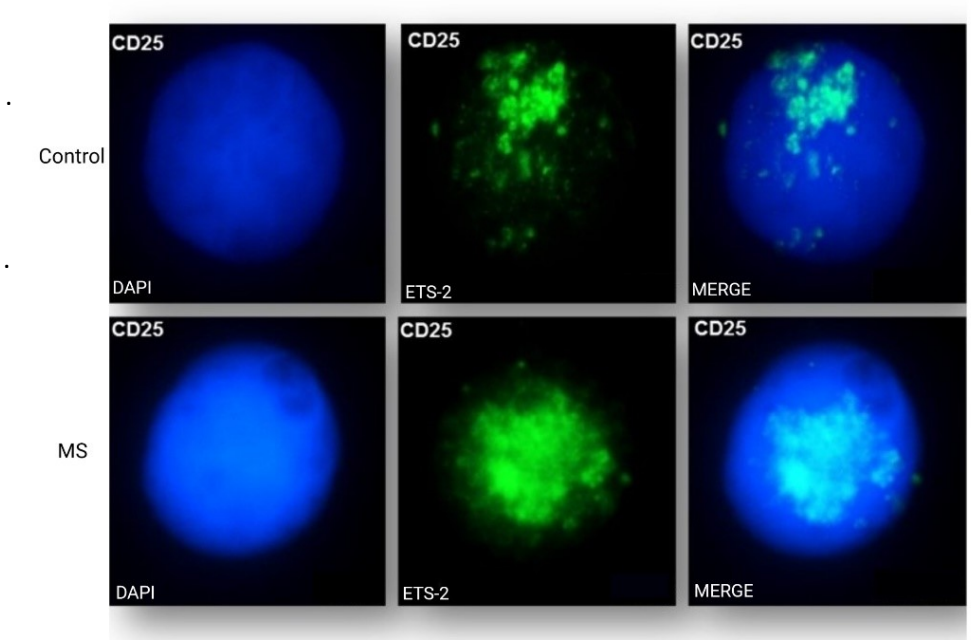
Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση του Ets-2 mRNA σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ. Από περιφερικό αίμα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ έγινε απομόνωση μέσω φυγοκέντρησης βαθμίδωσης φικόλης των μονοπύρηνων κυττάρων και στη συνέχεια με τη χρήση FACS sorter απομονώθηκε ο υποπληθυσμός των Τ ρυθμιστικών κυττάρων (CD4+CD25+). Με ποσοτική real-time PCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του Ets-2 mRNA. Όπως παρατηρείται στο γράφημα 4.22 τα Tregs των υγιών δοτών παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα Ets-2 mRNA τα οποία παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά από αυτά των ασθενών.



Εικόνα 4.22: Έκφραση του Ets-2 mRNA σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκυτταρα υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ. Μελέτη της έκφρασης του Ets-2 mRNA σε ρυθμιστικά (CD4+CD25+) Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ μέσω ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με σκοπό να προσδιοριστεί και “οπτικά” το μοτίβο έκφρασης του Ets-2 στα Tregs υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ, αλλά και να εξεταστεί σε ποιά σημεία του κυττάρου εντοπίζεται η πρωτεΐνη Ets-2. Για αυτό το λόγο μετά τη διαδικασία απομόνωσής τους, ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών προσκολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι Ets-2 και ακολούθως με το δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor 488. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού LEICA TCSSP5.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.23 ο Ets-2 τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους ασθενείς εντοπίζεται πυρηνικά. Σχετικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Ets-2 στις δυο εξεταζόμενες ομάδες, τα αποτελέσματα που προκύπτουν έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων της ποσοτικής real-time PCR, καθώς παρατηρείται σημαντική αύξηση της πρωτεΐνης Ets-2 στα κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ συγκριτικά με τα μειωμένα επίπεδα τα οποία παρατηρούνται στα κύτταρα των υγιών δοτών.

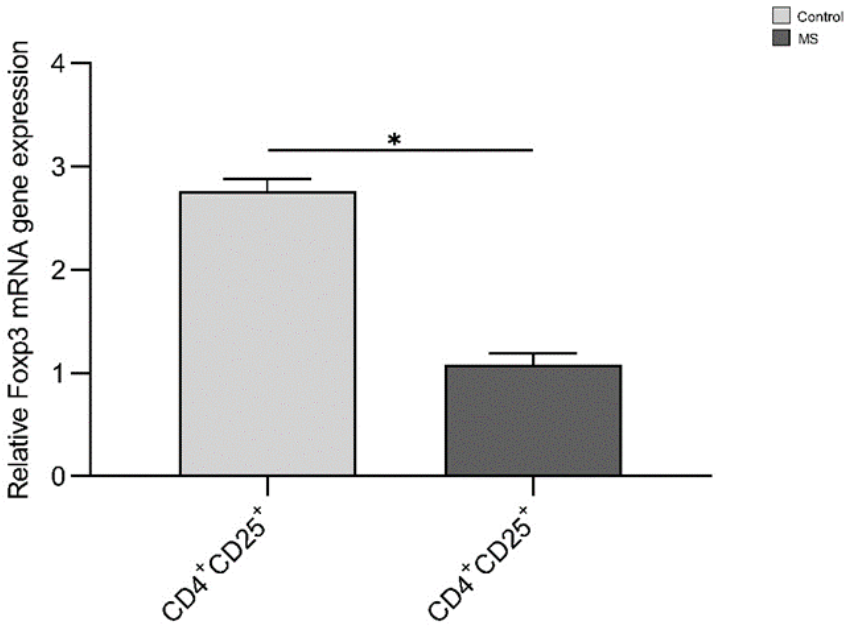


Εικόνα 4.23: Εντοπισμός της πρωτεΐνης Ets-2 σε Τ ρυθμιστικά κύτταρα (CD4+CD25+) υγιών δοτών (Control) και ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (MS). Πειράματα ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε απομονωμένα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ. Χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Ets-2 και δευτερογενές αντίσωμα Alexa 488 (πράσινο). Με τη χρωστική DAPI (μπλε) έγινε η

χρώση των πυρήνων. Η ανάλυση και παρατήρηση των εικόνων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Leica TCSSP5 confocal microscope).

4.17.2. Έκφραση και κυτταρικός εντοπισμός του Foxp3 σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ

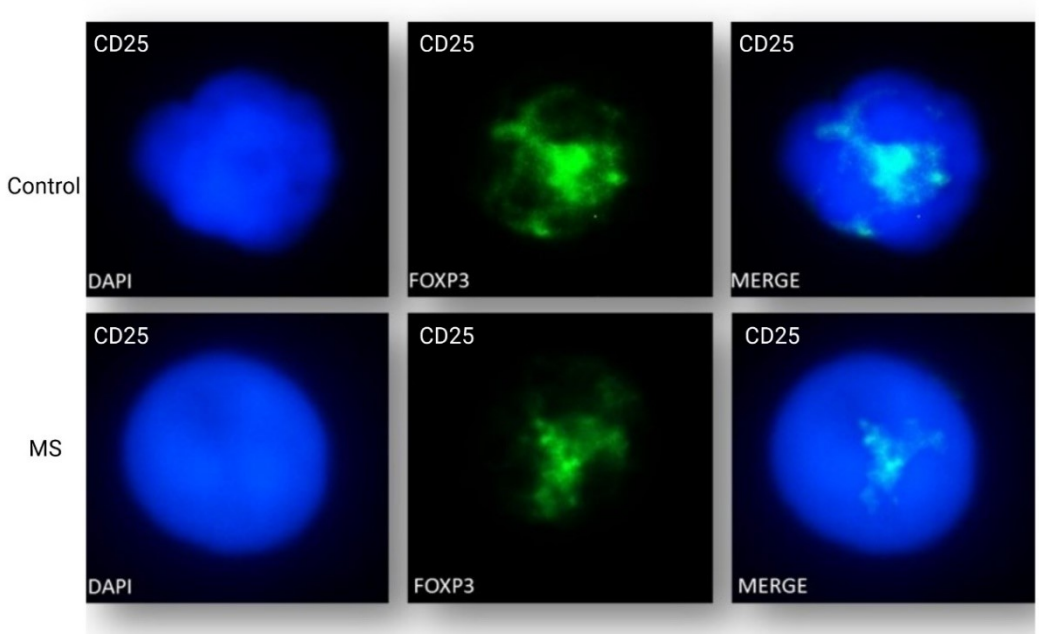
Επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση των επιπέδων του Foxp3 mRNA σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών αλλά και ασθενών με ΣΚΠ. Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.24. η έκφραση του Foxp3 mRNA ακολουθεί το αντίστροφο μοτίβο από την έκφραση του Ets-2 mRNA στους υγιείς δότες και στους ασθενείς με ΣΚΠ. Συγκεκριμένα, οι υγιείς δότες παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του Foxp3 mRNA τα οποία έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά από τα χαμηλότερα επίπεδα των ασθενών.



Εικόνα 4.24: Έκφραση του Foxp3 mRNA σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκυτταρα υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ. Μελέτη της έκφρασης του mRNA του γονιδίου του Foxp3 σε ρυθμιστικά (CD4+CD25+) Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ μέσω ποσοτικής real-time PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης του β2-m γονιδίου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism. Τα δεδομένα εξήλθαν από 3 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα (mean ±SD).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού προκειμένου να αξιολογηθεί ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Foxp3 αλλά και πιθανές διαφορές στην έκφρασή του ανάμεσα στους υγιείς δότες και στους ασθενείς με ΣΚΠ. Στην περίπτωση αυτή τα Tregs των εξεταζόμενων ομάδων επωάστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του Foxp3 και δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor 488.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 4.25, στις δυο εξεταζόμενες ομάδες η πρωτεΐνη Foxp3 εντοπίζεται πυρηνικά. Παράλληλα, η πρωτεϊνική έκφραση του Foxp3, ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με την έκφραση του Foxp3 mRNA και ειδικότερα είναι αρκετά μειωμένη στα Tregs των ασθενών συγκριτικά με τα Tregs των υγιών δοτών. Η διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων υποδεικνύει ένα αντίστροφο μοτίβο έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 ανάμεσα στους υγιείς δότες και τους ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν μια πιθανή εμπλοκή του Ets-2 στην παθογένεια της σκλήρυνσης κατά πλάκας, καθώς σύμφωνα με τα πειράματα ποσοτικής real-time PCR και ανοσοφθορισμού, τα επίπεδα του Ets-2 παρουσιάζονται ιδιαίτερα αυξημένα στους ασθενείς με ΣΚΠ συγκριτικά με τους υγιείς δότες, οι οποίοι εν αντιθέσει παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα του Foxp3 συγκριτικά με τους ασθενείς. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του τρίτου μέρους της διατριβής, τα οποία παρουσιάζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Ets-2 ως πιθανό καταστολέα της έκφρασης του Foxp3, υποδηλώνουν την πιθανή κατασταλτική δράση του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του Foxp3 στα Τ ρυθμιστικά κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ.



Εικόνα 4.25: Εντοπισμός της πρωτεΐνης Foxp3 σε Τ ρυθμιστικά κύτταρα (CD4+CD25+) υγιών δοτών (control) και ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (MS). Πειράματα ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε απομονωμένα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα υγιών δοτών και ασθενών με ΣΚΠ. Χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Foxp3 και δευτερογενές αντίσωμα Alexa 488 (πράσινο). Η χρώση των πυρήνων έγινε με τη χρωστική DAPI (μπλε). Η ανάλυση και παρατήρηση των εικόνων έγινε σε μικροσκόπιο σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Leica TCSSP5 confocal microscope).

5. Συζήτηση

Τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα όταν συναντήσουν κάποιο αντιγόνο ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε διαφορετικές γραμμές δραστικών κυττάρων τα οποία ρυθμίζουν τις ανοσοαποκρίσεις [19]. Εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίησή τους αποτελεί η αναγνώριση και η αλληλεπίδραση του TCR υποδοχέα αλλά και των συνυποδοχέων του CD4 και CD8 με το σύμπλοκο πεπτιδικό αντιγόνο-MHC [24] [25]. Ωστόσο για να επιτευχθεί πλήρης ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, απαιτείται ένα δεύτερο σήμα το οποίο μεταφέρεται μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CD28 των Τ κυττάρων με ειδικά συνδιεγερτικά μόρια και κυρίως με τα CD80 και CD86 τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων [26]. Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση σημαντικών λεμφοτροπικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων του NFAT, του NF-κB και του AP-1. Ο NFAT ενεργοποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με τον AP-1 και ειδικότερα με το σύμπλοκο Fos/Jun με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής της IL-2 [133]. Η αλληλεπίδραση του NFAT με τον AP-1 ρυθμίζει την έκφραση επιπλέον κυταροκινών συμπεριλαμβανομένης της IFN-γ, αλλά και γονιδίων στόχων τα οποία οδηγούν στην πρόκληση δομικών αλλαγών που χαρακτηρίζουν τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα [86] [133].

Η δέσμευση του TCR υποδοχέα με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC, χωρίς τη δράση των συνδιεγερτικών μορίων, δεν αρκεί για την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων και μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε μακροπρόθεσμη αδυναμία απάντησης (ανεργία). Στην περίπτωση αυτή "μπλοκάρεται" η δράση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία ρυθμίζονται μέσω των RAS/ MAPK κινασών και μέσω των IKK κινασών, με τελικό αποτέλεσμα να μην ενεργοποιείται και να μην μεταφέρεται το σύμπλοκο Fos/Jun αλλά ούτε και ο παράγοντας NF-κB στον πυρήνα. Συνεπώς ο NFAT δεν σχηματίζει σύμπλοκο με τον AP-1 και αυτό συνεπάγεται αδυναμία έκφρασης της IL-2. Ωστόσο επάγει την έκφραση γονιδίων που χαρακτηρίζουν τα Τ κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε ανεργία [84]. Η απώλεια λειτουργίας των IKK κινασών και ειδικότερα των IKKα και IKKβ εμποδίζει τη μεταφορά του NF-κB στον πυρήνα και την επακόλουθη ενεργοποίησή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα δυσλειτουργία των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, καθώς ο NF-κB

εμπλέκεται στην ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα και στη διαφοροποίηση των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα, η συνεργιστική δράση του NF-κΒ με τον NFAT επάγει την παραγωγή της IFN-γ προάγοντας την ανάπτυξη και λειτουργία των Th1 κυττάρων. Παράλληλα ο NF-κΒ συμμετέχει στη διαφοροποίηση των Th2 κυττάρων, καθώς το σύμπλοκο p65/p50 προσδένεται στον υποκινητή της IL-4, και ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή της προωθώντας την Th2 διαφοροποίηση. Επίσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών οι πρωτεΐνες c-Rel και p65 προσδένονται στον υποκινητή του μεταγραφικού παράγοντα RORγt ο οποίος είναι καθοριστικής σημασίας για τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων [86] [134] [113].

Η πρώτη κυτταροκίνη που παράγεται όταν ενεργοποιούνται τα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα και διαφοροποιούνται σε επαγώγιμα Th0 λεμφοκύτταρα είναι η IL-2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δημοσίευσης του εργαστηρίου μας ο Ets-2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-2. Συγκεκριμένα, στα παρθενικά Th λεμφοκύτταρα ο Ets-2 καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της IL-2 μέσω της πρόσδεσής του στην ARRE-2 περιοχή του υποκινητή της IL-2 [79]. Η αλληλουχία αυτή αποτελεί παράλληλα και περιοχή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NFAT στα ενεργοποιημένα Th λεμφοκύτταρα και του Foxp3 στα ρυθμιστικά Th λεμφοκύτταρα [135] [136]. Κατά την ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων ο Ets-2 μετακινείται στην ARRE-1 περιοχή της IL-2, ενώ παράλληλα τα επίπεδα έκφρασής του είναι μειωμένα συγκριτικά με τα επίπεδά του στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του Ets-2 και των λεμφοτροπικών παραγόντων c-Fos και c-Jun, οι οποίοι όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των Th λεμφοκυττάρων, μέσω επαγωγής της έκφρασης της IL-2 [128]. Ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την αλληλεπίδραση του Ets-2 με λεμφοτροπικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια σημαντικά για την ενεργοποίηση και λειτουργία των Th λεμφοκυττάρων. Για αυτό το λόγο στην παρούσα μελέτη ένας από τους στόχους μας ήταν να διερευνήσαμε το ρόλο του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης λεμφοτροπικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν με τη σειρά τους την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι ενεργοποίησης και διαφοροποίησης των Τ

λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε ο ρόλος του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης των: NFAT2, NF-κB p65, c-Jun και c-Fos.

Πρώτο βήμα ήταν η διερεύνηση της δράσης τους Ets-2 στην έκφραση του παράγοντα NFAT2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν προκύπτει ότι ο Ets-2 έχει επαγωγικό ρόλο στην έκφραση του NFAT2. Όμως ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται η θετική αυτή ρύθμιση δεν είναι γνωστός. Δημοσίευση του εργαστηρίου μας παρουσιάζει μια σειρά πειραμάτων τα οποία διεξήχθησαν με σκοπό να εξεταστεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Ets-2 και NFAT. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η αλληλουχία ARRE-2 αποτελεί θέση πρόσδεσης και των δυο παραγόντων. Ο Ets-2 κατά την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μετακινείται από την ARRE-2 αλληλουχία στην ARRE-1, “επιτρέποντας” την πρόσδεση του NFAT στην ARRE-2, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της IL-2. Η αποδέσμευση του Ets-2 και η επακόλουθη “αντικατάστασή” του από τον NFAT δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συν-ανοσοκατακρήμνισης δεν ανίχνευσαν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του Ets-2 και του NFAT [79]. Επομένως φαίνεται ότι ο Ets-2 ρυθμίζει την έκφραση του NFAT2 με έμμεσο τρόπο, πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασής του με μεταγραφικούς παράγοντες που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τον Ets-2, όπως με το σύμπλοκο Fos/Jun.

Αντικείμενο μελέτης της έρευνάς μας αποτέλεσε και ο λεμφοτροπικός παράγοντας NF-κB p65. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων εξωγενώς Ets-2 οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του NF-κB p65, ωστόσο δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στα επίπεδα του NF-κB p65 mRNA. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο Ets-2 ρυθμίζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του NF-κB p65 επάγοντας την έκφραση ή την λειτουργία κινασών, η δράση των οποίων είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση της δομής του NF-κB p65, καθώς η φωσφορυλίωση του p65 προκαλεί αλλαγές στη δομή του p65 επηρεάζοντας τη σταθερότητά του. Εναλλακτικά, ο Ets-2 μπορεί να ασκεί θετική ρύθμιση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του NF-κB p65 καταστέλλοντας τη λειτουργία του συστήματος

ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση του NF-κB p65 [137] [138].

Επαγωγικός αποδείχθηκε επίσης ο ρόλος του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του c-Jun και c-Fos. Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι η υπερέκφραση του Ets-2 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του c-Jun τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπως και των επιπέδων του c-Fos mRNA. Επίσης επιφέρει αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του c-Fos στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Αντιθέτως, στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα η έκφραση της πρωτεΐνης c-Fos παρέμεινε σταθερή. Η διαφορά αυτή που παρατηρείται ανάμεσα στα μη ενεργοποιημένα και στα ενεργοποιημένα κύτταρα πιθανόν να οφείλεται και σε αυτή την περίπτωση σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζονται μέσω της δράσης κινασών. Για παράδειγμα, η κινάση c-Raf, η οποία αποτελεί μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK 1/2 κινασών και ρυθμίζεται θετικά από τον Ets-2, μπορεί να ευθύνεται για την αύξηση των επιπέδων της c-Fos πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του Ets-2 [139]. Υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η χρήση της in vitro μεθόδου GST pull down assay έχει αποδείξει την ασθενή αλληλεπίδραση του Ets-2 τόσο με την τη πρωτεΐνη c-Jun, όσο και με την πρωτεΐνη c-Fos. Ωστόσο μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής έχει αποδειχθεί ότι ο Ets-2 αλληλεπιδρά ισχυρά με το ετεροδιμερές σύμπλοκο c-Jun/c-Fos, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με τον NFAT για την ενεργοποίηση της μεταγραφής της IL-2 κατά την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Η αλληλεπίδραση Ets-2-c-Jun έχει επαληθευτεί και in vivo μέσω της μεθόδου yeast two hybrid [128]. Επομένως από τα αποτελέσματα των ανωτέρω πειραμάτων προκύπτει ότι ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο παράγοντας Ets-2 επάγει την έκφραση του c-Jun και του c-Fos φαίνεται να έγκειται στην άμεση αλληλεπίδραση των μεταγραφικών αυτών παραγόντων.

Η διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο Ets-2 έχει ενεργό ρόλο στη διαδικασία ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων καθώς επάγει την έκφραση λεμφοτροπικών παραγόντων οι οποίοι ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που έχουν απαραίτητο ρόλο στο μονοπάτι ενεργοποίησης. Η θετική αυτή ρύθμιση πραγματοποιείται είτε μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης του Ets-2 με τους λεμφοτροπικούς παράγοντες είτε μέσω της συμμετοχής του σε

σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν έμμεσα την έκφρασή των λεμφοτροπικών παραγόντων.

Μετά την ενεργοποίηση των παρθενικών Th λεμφοκυττάρων ακολουθεί η διαφοροποίησή τους σε λειτουργικά Th λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του αντιγόνου, την ισχύ του σήματος TCR, το κυτταροκινικό περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίηση και τη διαφορική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης, διαφοροποιούνται στις διαφορετικές γραμμές δραστικών κυττάρων τα οποία ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις [28] [29].

Ένας από τους βασικούς στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στη διαδικασία διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων, ώστε να αποσαφηνισθεί η εμπλοκή του Ets-2 στη διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που εξέτασαν τη δράση του Ets-2 στην έκφραση του Foxp3, ο οποίος αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την ανάπτυξη και λειτουργία των T ρυθμιστικών κυττάρων, καθώς και τα πειράματα διερεύνησης του ρόλου του Foxp3 στην έκφραση του Ets-2. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση του Foxp3 υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση από τον Ets-2, αλλά και οτι η έκφραση του Ets-2 καταστέλλεται από τον Foxp3. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του Foxp3 υφίστανται στατιστικώς σημαντική μείωση μετά από την προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων του πλασμιδίου υπερέκφρασης του Ets-2, αλλά και η προσθήκη αυξανομένων ποσοτήτων εξωγενώς του Foxp3 οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων του Ets-2. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω και να επιβεβαιώσουμε την αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 προχωρήσαμε σε πειράματα αποσιώπησης του Ets-2 τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων έκφρασης του Foxp3. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπερέκφρασης του Ets-2 και αποδεικνύουν τον κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του Foxp3.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης ο υποκινητής του γονιδίου του Foxp3 περίεχει αλληλουχίες πρόσδεσης του Ets-2, ενώ ο Foxp3 δε

διαθέτει θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή του Ets-2. Για να εξετάσουμε την παρουσία του Ets-2 στον υποκινητή του Foxp3 πραγματοποιήσαμε πειράματα chIP, σύμφωνα με τα οποία αποδείξαμε ότι ο Ets-2 προσδένεται στον υποκινητή του Foxp3. Επομένως, ο Ets-2 ασκεί αρνητική ρύθμιση στην έκφραση του κύριου ρυθμιστή των Tregs μέσω της άμεσης πρόσδεσής του στον υποκινητή του, παρεμποδίζοντας πιθανον την πρόσδεση επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων που θα λειτουργούσαν επαγωγικά στην έκφραση του Foxp3.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν επίσης τα πειράματα τα οποία εξέτασαν το ρόλο του Ets-2 στην έκφραση του TGF-β, ο οποίος έχει απαραίτητο ρόλο στη διαφοροποίηση των Tregs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν ο Ets-2 καταστέλλει την έκφραση του TGF-β mRNA. Όπως είναι γνωστό η έκφραση του Foxp3 επάγεται από τη σηματοδότηση μέσω του TGF-β. Συγκεκριμένα, ο TGF-β μέσω του Smad3 επάγει την έκφραση του Foxp3 η οποία ενισχύεται μέσω της επαγόμενης από την IL-2 ενεργοποίησης του Stat5, προωθώντας με αυτό τον τρόπο τη διαφοροποίηση των iTreg [130]. Επομένως μια υπόθεση που προκύπτει είναι ότι ο Ets-2 εκτός από την άμεση πρόσδεσή του στον υποκινητή του Foxp3, μπορεί να καταστέλλει την έκφρασή του και με έμμεσο τρόπο και ειδικότερα μέσω αρνητικής ρύθμισης του TGF-β.

Αξιολογώντας τα παραπάνω δεδομένα αποφασίσαμε να επικεντρωθούμε στην παρούσα μελέτη στην διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο Ets-2 ρυθμίζει την έκφραση του Foxp3, καθώς και την πιθανή εμπλοκή του Ets-2 στη δημιουργία παθολογικών κλώνων που συμμετέχουν στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων και συγκεκριμένα διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτισή του με τη ΣΚΠ.

Στο αυτοάνοσο νόσημα της ΣΚΠ, τα Th1 και Th17 κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα μυελίνης και συμμετέχουν στη βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος, αποτέλεσμα της οποίας είναι η εμφάνιση των νευρολογικών συμπτωμάτων που αντιμετωπίζουν οι ασθενείς. Στο αυτοάνοσο αυτό νόσημα παρατηρείται δυσλειτουργία των Τ ρυθμιστικών κυττάρων η οποία οδηγεί σε απορρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και σε διαταραχή των μηχανισμών ανοσολογικής ανοχής [18]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μελέτης, ασθενείς στην οξεία φάση της νόσου πριν λάβουν θεραπεία ή κατά τη διάρκεια θεραπείας με μεθυλπρεδνιζολόνη

εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα nTregs τα οποία αποκαταστάθηκαν μετά τη θεραπεία με IFN-β [140].

Για να διερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση του Ets-2 με τη ΣΚΠ προχωρήσαμε στη μελέτη των επιπέδων έκφρασής του σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΚΠ και στη σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα των υγιών δοτών. Παράλληλα εξετάσαμε και την έκφραση του Foxp3, καθώς είναι γνωστό ότι διαταραχές στην έκφραση και τη λειτουργία του οδηγούν σε απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, απώλεια ανοσολογικής ανοχής και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσων νοσημάτων [13]. Μέσα από την πραγματοποίηση πειραμάτων ποσοτικής real-time PCR παρατηρήσαμε ένα αντίστροφο μοτίβο έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3 ανάμεσα στους υγιείς δότες και στους ασθενείς. Συγκεκριμένα οι ασθενείς με ΣΚΠ παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του Ets-2 mRNA και χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Foxp3 mRNA, ενώ στους υγιείς δότες παρατηρείται το αντίστροφο, καθώς παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Ets-2 mRNA και υψηλά επίπεδα έκφρασης του Foxp3 mRNA. Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν από τα πειράματα ανοσοφθορισμού τα οποία προσδιόρισαν και “οπτικά” το μοτίβο έκφρασης του Ets-2 και του Foxp3, καθώς στα Tregs των ασθενών παρατηρείται σημαντική αύξηση της πρωτεΐνης Ets-2 στους ασθενείς με ΣΚΠ συγκριτικά με τη μειωμένη έκφρασή της η οποία παρατηρείται στα κύτταρα των υγιών δοτών, ενώ η πρωτεϊνική έκφραση του Foxp3 είναι αρκετά μειωμένη στα κύτταρα των ασθενών συγκριτικά με τα κύτταρα των υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με αυτά των προηγούμενων πειραμάτων υποδηλώνουν την πιθανή κατασταλτική δράση του Ets-2 στη ρύθμιση της έκφρασης του Foxp3 στα Τ ρυθμιστικά κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή του Ets-2 στην παθογένεια της ΣΚΠ.

Προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας διερεύνησαν την έκφραση του Ets-2 σε παρθενικά Τ λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΚΠ και προχώρησαν στη σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα των υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα Ets-2 συγκριτικά με τους υγιείς δότες. Αντιθέτως, στα ρυθμιστικά Τ κύτταρα όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως παρατηρήσαμε το αντίστροφο. Μια πιθανή εξήγηση που θα μπορούσε να

αιτιολογήσει την αντίστροφη αυτή εικόνα είναι ότι η αύξηση της έκφρασης του Ets-2 στα Tregs ασθενών με ΣΚΠ μπορεί να είναι μια προσαρμοστική απόκριση που έχει ως στόχο τη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και τον έλεγχο της φλεγμονής στους ασθενείς.

Τα χαμηλότερα επίπεδα Foxp3 που εντοπίστηκαν στα Tregs των ασθενών με ΣΚΠ πιθανόν να υποδηλώνουν διαταραχές στη λειτουργία των Tregs, οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου. Στα Τ ρυθμιστικά κύτταρα κύριος καταστολέας της έκφρασης της IL-2 είναι ο Foxp3. Η περιοχή πρόσδεσης του Foxp3 στον υποκινητή της IL-2 βρίσκεται αρκετά κοντά με την αντίστοιχη περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα NFAT και έχει αποδειχθεί ότι οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες δρουν ανταγωνιστικά ως προς τη πρόσδεση τους στον υποκινητή του γονιδίου της IL-2 και της επακόλουθης ρύθμισης της έκφρασής του [136]. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των Τ ρυθμιστικών κυττάρων ο NFAT σχηματίζει σύμπλοκο με τον AP-1 το οποίο προσδένεται στον υποκινητή της IL-2 ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του. Ο Foxp3 εμποδίζει τη δράση του παραπάνω συμπλόκου, καθώς προσδένεται στον NFAT, αντικαθιστώντας τις πρωτεΐνες Jun και Fos και καταστέλλει την έκφραση της IL-2 [14]. Σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, τα επίπεδα της IL-2 στα Tregs ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας είναι ιδιαίτερα αυξημένα συγκριτικά με τα επίπεδα των υγιών δοτών. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός μέσω του οποίου καταστέλλεται η έκφραση της IL-2 στου ασθενείς με ΣΚΠ είναι δυσλειτουργικός. Γνωρίζοντας ότι στα Tregs κύριος καταστολέας της έκφρασης της IL-2 είναι ο Foxp3, μια υπόθεση είναι ότι η δυσλειτουργία του μηχανισμού καταστολής της οφείλεται σε διαταραχές στην έκφραση ή στη λειτουργία του Foxp3 κάτι που επιβεβαιώνεται από τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασής του στους ασθενείς με ΣΚΠ, συγκριτικά με αυτά των υγιών δοτών. Η παρατεταμένη σηματοδότηση μέσω της IL-2 προωθεί τη διαφοροποίηση των CD8 δραστικών κυττάρων και επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που ενισχύουν τη δράση των δραστικών κυττάρων, όπως της LFA-1 και της περφορίνης [141]. Είναι γνωστό από άλλες μελέτες ότι η IL-2 εμπλέκεται στην παθογένεια της ΣΚΠ και τα υψηλά επίπεδα της σχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου. Αυξημένη έκφραση της IL-2 στα Th17

λεμφοκύτταρα σε συνδυασμό με τη δράση επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων επάγουν τη φλεγμονή και προάγουν τις αποκρίσεις των δραστικών Τ κυττάρων [142].

Συμπερασματικά, ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-2 υπερεκφράζεται στα Τ ρυθμιστικά κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ και καταστέλλει την έκφραση του Foxp3. Διαταραχές στην έκφραση και στη λειτουργία του Foxp3 μπορεί να διαταράξουν την λειτουργία και την ικανότητα των Τ ρυθμιστικών κυττάρων να καταστέλλουν αποτελεσματικά τις ανοσολογικές αποκρίσεις, οδηγώντας σε απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και απώλεια ανοσολογικής ανοχής. Τα χαμηλά επίπεδα του Foxp3 τα οποία εντοπίστηκαν στους ασθενείς με ΣΚΠ εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, καθώς ευθύνονται για τον δυσλειτουργικό μηχανισμό καταστολής της έκφρασης της IL-2 και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της, τα οποία προκαλούν έντονη ανοσοαπόκριση και αύξηση των παθολογικών Th1 και Th17 κλώνων στους ασθενείς με ΣΚΠ. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ένα κατασταλτικό ρόλο του Ets-2 στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των Tregs και την επακόλουθη εμπλοκή του στην παθογένεια της ΣΚΠ.

6. Βιβλιογραφία

1. Gu, C., L. Wu, and X. Li, *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling.* Cytokine, 2013. **64**(2): p. 477-85.
2. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system.* Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
3. Justiz Vaillant, A.A., S. Sabir, and A. Jan, *Physiology, Immune Response*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL) with ineligible companies. Disclosure: Sarah Sabir declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Arif Jan declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
4. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. 564 pages.
5. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
6. Lee, J.Y. and S.H. Hong, *Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration.* Int J Stem Cells, 2020. **13**(1): p. 1-12.
7. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. 2001, Philadelphia: W.B. Saunders. viii, 309 pages.
8. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 2008, Garland Science,: New York.
9. De Castro, L.N. and F.J.J.U.E.d.C. Von Zuben, Dezembro de, Tech. Rep, *Artificial immune systems: Part I–basic theory and applications.* 1999. **210**(1).
10. Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber, *Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life.* Immunity, 2018. **48**(2): p. 202-213.
11. Sauls, R.S., C. McCausland, and B.N. Taylor, *Histology, T-Cell Lymphocyte*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Cassidy McCausland declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Bryce Taylor declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
12. Nakiboneka, R., et al., *Interferon gamma (IFN-gamma) negative CD4+ and CD8+ T-cells can produce immune mediators in response to viral antigens.* Vaccine, 2019. **37**(1): p. 113-122.
13. Li, J., et al., *DNA-binding properties of FOXP3 transcription factor.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017. **49**(9): p. 792-799.
14. Ono, M., *Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes.* Immunology, 2020. **160**(1): p. 24-37.
15. Schmitt, E.G. and C.B. Williams, *Generation and function of induced regulatory T cells.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 152.
16. Goodman, W.A., K.D. Cooper, and T.S. McCormick, *Regulation generation: the suppressive functions of human regulatory T cells.* Crit Rev Immunol, 2012. **32**(1): p. 65-79.
17. Schmidt, A., N. Oberle, and P.H. Krammer, *Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 51.
18. Zhang, W., et al., *Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis.* Hepatology, 2009. **49**(2): p. 545-52.
19. van den Broek, T., J.A.M. Borghans, and F. van Wijk, *The full spectrum of human naive T cells.* Nat Rev Immunol, 2018. **18**(6): p. 363-373.
20. Takada, K. and S.C. Jameson, *Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 823-32.
21. De Rosa, S.C., et al., *11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity.* Nat Med, 2001. **7**(2): p. 245-8.

22. Okada, R., et al., *Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation.* Int Immunol, 2008. **20**(9): p. 1189-99.
23. Sallusto, F., et al., *Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression.* Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **251**: p. 167-71.
24. Martinez-Mendez, D., et al., *Continuous Modeling of T CD4 Lymphocyte Activation and Function.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 743559.
25. Hwang, J.R., et al., *Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development.* Exp Mol Med, 2020. **52**(5): p. 750-761.
26. Tai, Y., et al., *Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases.* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 642.
27. Rowshanravan, B., N. Halliday, and D.M. Sansom, *CTLA-4: a moving target in immunotherapy.* Blood, 2018. **131**(1): p. 58-67.
28. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
29. Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata, *Epigenetic control of T-helper-cell differentiation.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 91-105.
30. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions.* Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
31. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases.* Cytokine, 2015. **74**(1): p. 5-17.
32. Shinomiya, N., T. Kuratsuji, and J. Yata, *The role of T cells in immunoglobulin class switching of specific antibody production system in vitro in humans.* Cell Immunol, 1989. **118**(2): p. 239-49.
33. Del Prete, G., *Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy.* Allergy, 1992. **47**(5): p. 450-5.
34. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.* Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
35. Lazarevic, V., et al., *T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat.* Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 96-104.
36. Thieu, V.T., et al., *Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination.* Immunity, 2008. **29**(5): p. 679-90.
37. Walker, J.A. and A.N.J. McKenzie, *T(H)2 cell development and function.* Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 121-133.
38. Zhu, J., et al., *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors.* Cell Res, 2006. **16**(1): p. 3-10.
39. Zhu, J., et al., *Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation.* Immunity, 2003. **19**(5): p. 739-48.
40. Stritesky, G.L., et al., *The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development.* Immunity, 2011. **34**(1): p. 39-49.
41. Ho, I.C., D. Lo, and L.H. Glimcher, *c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms.* J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1859-66.
42. Rengarajan, J., et al., *Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression.* J Exp Med, 2002. **195**(8): p. 1003-12.
43. Lee, Y. and V. Kuchroo, *Defining the functional states of Th17 cells.* F1000Res, 2015. **4**(F1000 Faculty Rev): p. 132.
44. Singh, R.P., et al., *Th17 cells in inflammation and autoimmunity.* Autoimmun Rev, 2014. **13**(12): p. 1174-81.

45. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.* J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
46. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function.* Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
47. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-9363.
48. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.* Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.
49. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-487.
50. Attias, M., T. Al-Aubodah, and C.A. Piccirillo, *Mechanisms of human FoxP3(+) T(reg) cell development and function in health and disease.* Clin Exp Immunol, 2019. **197**(1): p. 36-51.
51. Takimoto, T., et al., *Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development.* J Immunol, 2010. **185**(2): p. 842-55.
52. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain.* Int Anesthesiol Clin, 2007. **45**(2): p. 27-37.
53. Chauhan, P., et al., *A primer on cytokines.* Cytokine, 2021. **145**: p. 155458.
54. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines.* Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**(Suppl 1): p. S34-45.
55. Stanley, A.C. and P. Lacy, *Pathways for cytokine secretion.* Physiology (Bethesda), 2010. **25**(4): p. 218-29.
56. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-11.
57. Liu, C., et al., *Cytokines: From Clinical Significance to Quantification.* Adv Sci (Weinh), 2021. **8**(15): p. e2004433.
58. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines.* Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
59. George, G., G.L. Shyni, and K.G. Raghu, *Current and novel therapeutic targets in the treatment of rheumatoid arthritis.* Inflammopharmacology, 2020. **28**(6): p. 1457-1476.
60. Newman, J.A., et al., *Structural insights into the autoregulation and cooperativity of the human transcription factor Ets-2.* J Biol Chem, 2015. **290**(13): p. 8539-49.
61. Oikawa, T., *ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy.* Cancer Sci, 2004. **95**(8): p. 626-33.
62. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.
63. Mo, Y., et al., *Structure of the elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA.* Nat Struct Biol, 2000. **7**(4): p. 292-7.
64. Leprince, D., et al., *A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26.* Nature, 1983. **306**(5941): p. 395-7.
65. Hsu, T., M. Trojanowska, and D.K. Watson, *Ets proteins in biological control and cancer.* J Cell Biochem, 2004. **91**(5): p. 896-903.
66. Wei, G.H., et al., *Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo.* EMBO J, 2010. **29**(13): p. 2147-60.
67. Watson, D.K., et al., *Molecular organization and differential polyadenylation sites of the human ETS2 gene.* Oncogene, 1990. **5**(10): p. 1521-7.
68. Sgouras, D.N., et al., *ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation.* EMBO J, 1995. **14**(19): p. 4781-93.

69. Fowles, L.F., et al., *Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and ets-2 phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1/c-fms signaling.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5148-56.
70. Ristevski, S., et al., *Ets2 is expressed during morphogenesis of the somite and limb in the mouse embryo.* Mech Dev, 2002. **116**(1-2): p. 165-8.
71. Yamamoto, H., et al., *Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2.* Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1315-26.
72. Yordy, J.S. and R.C. Muise-Helmericks, *Signal transduction and the Ets family of transcription factors.* Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6503-13.
73. Fry, E.A. and K. Inoue, *Aberrant expression of ETS1 and ETS2 proteins in cancer.* Cancer Rep Rev, 2018. **2**(3).
74. Wallace, J.A., et al., *Ets2 in tumor fibroblasts promotes angiogenesis in breast cancer.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71533.
75. Baker, K.M., et al., *Ets-2 and components of mammalian SWI/SNF form a repressor complex that negatively regulates the BRCA1 promoter.* J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 17876-84.
76. Martinez, L.A., *Mutant p53 and ETS2, a Tale of Reciprocity.* Front Oncol, 2016. **6**: p. 35.
77. Kabbout, M., et al., *ETS2 mediated tumor suppressive function and MET oncogene inhibition in human non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(13): p. 3383-95.
78. Panagoulias, I., et al., *Transcription Factor Ets-2 Acts as a Preinduction Repressor of Interleukin-2 (IL-2) Transcription in Naive T Helper Lymphocytes.* J Biol Chem, 2016. **291**(52): p. 26707-26721.
79. Panagoulias, I., et al., *Ets-2 Acts As a Transcriptional Repressor of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 through Binding to a Repressor-Activator Target Sequence of 5'-LTR.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1924.
80. Toumpeki, C., et al., *Construction of an M1GS Ribozyme for Targeted and Rapid mRNA Cleavage; Application on the Ets-2 Oncogene.* Med Chem, 2018. **14**(6): p. 604-616.
81. Hermann-Kleiter, N. and G. Baier, *NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions.* Blood, 2010. **115**(15): p. 2989-97.
82. Mognol, G.P., et al., *Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player.* Cell Death Dis, 2016. **7**(4): p. e2199.
83. Chuvpilo, S., et al., *Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis.* Immunity, 2002. **16**(6): p. 881-95.
84. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
85. Shou, J., et al., *Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment.* Cancer Lett, 2015. **361**(2): p. 174-84.
86. Baine, I., B.T. Abe, and F. Macian, *Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling.* Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 225-40.
87. Huang, G.N., et al., *NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins.* Science, 2008. **319**(5862): p. 476-81.
88. Gabriel, C.H., et al., *Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-associated Proteins in T Cells.* J Biol Chem, 2016. **291**(46): p. 24172-24187.
89. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.* Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
90. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.* Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
91. Liu, T., et al., *NF-kappaB signaling in inflammation.* Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**: p. 17023-.

92. Napetschnig, J. and H. Wu, *Molecular basis of NF-kappaB signaling.* Annu Rev Biophys, 2013. **42**: p. 443-68.
93. Verma, I.M., *Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets.* Ann Rheum Dis, 2004. **63 Suppl 2**(Suppl 2): p. ii57-ii61.
94. Kunsch, C., S.M. Ruben, and C.A. Rosen, *Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4412-21.
95. Silverman, N. and T. Maniatis, *NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity.* Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2321-42.
96. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
97. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.
98. Meng, Q. and Y. Xia, *c-Jun, at the crossroad of the signaling network.* Protein Cell, 2011. **2**(11): p. 889-98.
99. Behre, G., et al., *c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor.* J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4939-46.
100. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
101. Hettinger, K., et al., *c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN.* Cell Death Differ, 2007. **14**(2): p. 218-29.
102. Li, J., et al., *Control of Foxp3 induction and maintenance by sequential histone acetylation and DNA demethylation.* Cell Rep, 2021. **37**(11): p. 110124.
103. Ono, M., et al., *Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1.* Nature, 2007. **446**(7136): p. 685-9.
104. Martin, F., et al., *Human FOXP3 and cancer.* Oncogene, 2010. **29**(29): p. 4121-9.
105. Sadlon, T.J., et al., *Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells.* J Immunol, 2010. **185**(2): p. 1071-81.
106. Rudra, D., et al., *Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network.* Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 1010-9.
107. Dardalhon, V., et al., *IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1347-55.
108. Colamatteo, A., et al., *Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 3136.
109. Rudensky, A.Y., *Regulatory T cells and Foxp3.* Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 260-8.
110. Ho, I.C., T.S. Tai, and S.Y. Pai, *GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 125-35.
111. Ranganath, S. and K.M. Murphy, *Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2716-25.
112. Chou, J., S. Provot, and Z. Werb, *GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it!* J Cell Physiol, 2010. **222**(1): p. 42-9.
113. Oh, S. and E.S. Hwang, *The role of protein modifications of T-bet in cytokine production and differentiation of T helper cells.* J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 589672.
114. Hwang, E.S., J.H. Hong, and L.H. Glimcher, *IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508.* J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1289-300.
115. Ma, S., et al., *RORgammat phosphorylation protects against T cell-mediated inflammation.* Cell Rep, 2022. **38**(11): p. 110520.

116. Kumar, R., A.L. Theiss, and K. Venuprasad, *RORgammat protein modifications and IL-17-mediated inflammation.* Trends Immunol, 2021. **42**(11): p. 1037-1050.
117. Sun, N., H. Guo, and Y. Wang, *Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t (RORgammat) inhibitors in clinical development for the treatment of autoimmune diseases: a patent review (2016-present).* Expert Opin Ther Pat, 2019. **29**(9): p. 663-674.
118. Mickael, M.E., S. Bhaumik, and R. Basu, *Retinoid-Related Orphan Receptor RORgammat in CD4(+) T-Cell-Mediated Intestinal Homeostasis and Inflammation.* Am J Pathol, 2020. **190**(10): p. 1984-1999.
119. Rosenblum, M.D., et al., *Treating human autoimmunity: current practice and future prospects.* Sci Transl Med, 2012. **4**(125): p. 125sr1.
120. Waldmann, H., *Mechanisms of immunological tolerance.* Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 324-8.
121. Theofilopoulos, A.N., D.H. Kono, and R. Baccala, *The multiple pathways to autoimmunity.* Nat Immunol, 2017. **18**(7): p. 716-724.
122. Hernandez-Pedro, N.Y., et al., *Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response.* Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 413465.
123. Baranzini, S.E. and J.R. Oksenberg, *The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years.* Trends Genet, 2017. **33**(12): p. 960-970.
124. Iwanowski, P. and J. Losy, *Immunological differences between classical phenothypes of multiple sclerosis.* J Neurol Sci, 2015. **349**(1-2): p. 10-4.
125. Katz Sand, I., *Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis.* Curr Opin Neurol, 2015. **28**(3): p. 193-205.
126. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 591-619.
127. Collas, P. and J.A. Dahl, *Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 929-43.
128. Basuyaux, J.P., et al., *The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner.* J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26188-95.
129. Clark, S.C., et al., *Human T-cell growth factor: partial amino acid sequence, cDNA cloning, and organization and expression in normal and leukemic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(8): p. 2543-7.
130. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades.* Cell, 2008. **134**(3): p. 392-404.
131. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria".* Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 840-6.
132. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS).* Neurology, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
133. Macian, F., et al., *Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance.* Cell, 2002. **109**(6): p. 719-31.
134. Gerondakis, S., et al., *NF-kappaB control of T cell development.* Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 15-25.
135. Mouzaki, A. and D. Rungger, *Properties of transcription factors regulating interleukin-2 gene transcription through the NFAT binding site in untreated or drug-treated naive and memory T-helper cells.* Blood, 1994. **84**(8): p. 2612-21.
136. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT.* Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
137. Milanovic, M., M. Kracht, and M.L. Schmitz, *The cytokine-induced conformational switch of nuclear factor kappaB p65 is mediated by p65 phosphorylation.* Biochem J, 2014. **457**(3): p. 401-13.

138. Christian, F., E.L. Smith, and R.J. Carmody, *The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation.* Cells, 2016. **5**(1).
139. Iorns, E., et al., *Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer.* Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 91-104.
140. Rodi, M., et al., *Regulatory Cell Populations in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) Patients: Effect of Disease Activity and Treatment Regimens.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
141. Buhelt, S., et al., *IL2RA Methylation and Gene Expression in Relation to the Multiple Sclerosis-Associated Gene Variant rs2104286 and Soluble IL-2Ralpha in CD8(+) T Cells.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 676141.
142. Bo, M., et al., *IL-2 and Mycobacterial Lipoarabinomannan as Targets of Immune Responses in Multiple Sclerosis Patients.* Microorganisms, 2020. **8**(4).