



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

***Διερεύνηση του ρόλου του Μεταγραφικού Παράγοντα Ets2
Repressor Factor (ERF) κατά την ωρίμανση και ενεργοποίηση των
Τ λεμφοκυττάρων***

ΤΣΙΟΜΗΤΑ ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θυφρονίτης Γεώργιος, Καθηγητής ΤΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αν. Καθηγητής ΤΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θυφρονίτης Γεώργιος, Καθηγητής, ΤΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αν. Καθηγητής, ΤΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαμαλάκη Αυγή, Διευθύντρια Ερευνών, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ξάνθου Γεωργία, Κύρια Ερευνήτρια, ΙΒΕΑΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία, Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Θυφρονίτη Γεωργίου του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών (TBET) και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τη χρονική περίοδο 2012-2018.

Την πιο ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη οφείλω στον επιβλέποντα Καθηγητή Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιο η συνεισφορά και καθοδήγηση του οποίου ήταν καθοριστική καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Η συνεργασία μας μου έχει προσφέρει πολλά στη γενικότερη διαμόρφωση της επιστημονικής-ερευνητικής μου οντότητας.

Ευχαριστώ βαθύτατα τον Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης Δρ. Μαυροθαλασσίτη Γεώργιο για την προσφορά σε γνώση και υλικά χωρίς τα οποία θα ήταν αδύνατη η διεκπεραίωση της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, θερμά τον Αν. Καθηγητή του TBET Δρ. Μιχαηλίδη Θεολόγο για το συμβουλευτικό του ρόλο καθώς και τα μέλη του Εργαστηρίου Νευροβιολογίας του TBET για την πολύτιμη και απλόχερη βοήθεια και προσφορά σε χρόνο και υλικά.

Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής: τη Διευθύντρια Ερευνών του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ Δρ. Μαμαλάκη Αυγή, την Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών Δρ. Μουζάκη Αθανασία, την Κύρια Ερευνήτρια του ΙΒΕΑΑ Δρ. Ξάνθου Γεωργία καθώς και την Αν. Καθηγήτρια του Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ Δρ. Τσιτσιλώνη Ουρανία, για τις επεμβάσεις και την αξιολόγηση της γραπτής και προφορικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τον Δρ. Λέκκα Παναγιώτη, Υπεύθυνο Ευζωίας του Εκτροφείου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμβολή του στη φροντίδα των ζώων εργαστηρίου καθώς και τη Διευθύντρια του Τμήματος Αιμοδοσίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κα. Ελευθερία Ζερβού και τη Δρ. Μπάτση Χριστίνα για την παροχή αίματος για τα πειράματα με τα περιφερικά λεμφοκύτταρα.

Ευχαριστώ πολύ τους πρώην και νυν διπλωματικούς φοιτητές του Τμήματος Βαρδάκα Παναγιώτα, Μουστάκα Άρτεμη και Σκιαδαρέση Αργύρη για την εξαιρετική μας συνεργασία στα πειράματα και για τον ευχάριστο χρόνο που μοιραστήκαμε.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου για την υλική και ηθική στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας όπως και τους στενούς μου φίλους εντός κι εκτός του χώρου για την κατανόηση, συμπαράσταση και ψυχολογική υποστήριξη. Φυσικά, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το σύντροφο της ζωής μου, Βασίλη, που δεν σταμάτησε ποτέ να πιστεύει σε μένα και να μου υπενθυμίζει το δάσος ακόμη και όταν δε μπορούσα να βρω το δέντρο.

«Η έρευνα είναι η ψυχή της προόδου»

Γεώργιος Παπανικολάου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	17
ABSTRACT	19
ΟΡΟΛΟΓΙΑ.....	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	25
1.1 Γενική περιγραφή.....	25
1.2 Όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος	26
1.2.1 Θύμος	26
1.2.2 Σπλήνας	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	29
2.1 Αιμοποίηση	29
2.2 Θυμοποίηση	30
2.2.1 Γενικά	30
2.2.2 Θετική και αρνητική επιλογή	30
2.2.3 Φάσεις ωρίμανσης	31
2.2.3.1 Αναδιάταξη αλυσίδων TCR υποδοχέα	32
2.2.3.2 Απόφαση ζωής: CD4+ ή CD8+;	34
2.2.3.2.1 <i>ThPOK</i> και <i>Runx</i>	34
2.2.3.2.2 <i>Gata3</i> , <i>Myb</i> , <i>MAZR</i> και <i>Socs1</i>	35
2.2.3.2.3 Άλλα μόρια	35
2.3 Διέγερση Τ κυττάρων	36
2.3.1 Τ κυτταρικός υποδοχέας	37
2.3.1.1 Σηματοδότηση μέσω TCR-CD3	39
2.3.1.1.1 MAPK: Μονοπάτι των Ras/Raf/MEK/Erk.....	40
2.3.1.1.1.1 Ρόλος Erk1/2 στη βιολογία των Τ κυττάρων.....	41
2.3.2 Κλωνική ανέργια	43
2.3.3 Διαφοροποίηση-Τ κυτταρικοί υποπληθυσμοί.....	44
2.3.3.1 Δραστικά κύτταρα	44
2.3.3.2 Κύτταρα μνήμης	45
2.3.3.3 Ρυθμιστικά Τ κύτταρα	45

2.3.4 Η μοίρα των Τ λεμφοκυττάρων	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ERF	47
3.1 Οικογένεια <i>Ets</i> γονιδίων	47
3.1.1 Ρόλος των <i>Ets</i> γονιδίων στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων....	47
3.1.2 Συμμετοχή των <i>Ets</i> στις λειτουργίες/διαφοροποίηση των Τ κυττάρων	48
3.1.3 Συμμετοχή των <i>Ets</i> σε ασθένειες τους ανοσοποιητικού	49
3.2 Μεταγραφικός καταστολέας ERF	49
3.2.1 Γονιδιακή οργάνωση και πρωτεΐνη	49
3.2.2 Λειτουργία του ERF: <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> καταστολέας	50
3.2.3 Ρύθμιση του ERF	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	54
4.1 Ιντερλευκίνες.....	54
4.1.1 Ιντερλευκίνη-2.....	55
4.1.1.1 Μεταγραφικός έλεγχος της <i>IL-2</i>	56
4.1.1.2 Υποδοχέας της <i>IL-2</i> και σηματοδότηση	58
4.1.1.3 Βιολογικές λειτουργίες	59
4.1.1.4 <i>IL-2</i> σε ασθένειες και διάγνωση.....	61
4.1.2 Ιντερλευκίνη-10.....	62
4.1.2.1 Η <i>IL-10</i> στο ανοσοποιητικό σύστημα	62
4.1.2.2 Δράση και ρύθμιση <i>IL-10</i>	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	64
5.1 Γενετική μηχανική: Το σύστημα Cre/lox.....	64
5.1.1 Η πρωτεΐνη Cre.....	64
5.1.2 Η κινάση Lck	66
5.1.3 Lck-Cre και "side effects"	66
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	69
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	71
ΜΕΡΟΣ Ι: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΣΤΑ IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	71
1.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	71
1.1.1 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	71
1.1.1.1 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών	71
1.1.1.2 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων	72

1.1.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών	72
1.1.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεγάλης κλίμακας.....	72
1.1.2 ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	72
1.1.2.1 Κυτταρική σειρά Jurkat	72
1.1.2.2 Κυτταρική σειρά HuT78.....	72
1.1.2.3 Συνθήκες καλλιέργειας	73
1.1.2.4 Καταμέτρηση κυττάρων	73
1.1.2.5 Αποθήκευση και απόψυξη κυττάρων	73
1.1.2.6 Διέγερση T λεμφοκυττάρων.....	74
1.1.2.7 Μεταφορά εξωγενούς DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα	74
1.1.2.7.1 Παροδική διαμόλυνση με ηλεκτροδιάτρηση (transient transfection) με πλασμιδιακούς φορείς.....	74
1.1.2.7.2 Δημιουργία κυτταρικών κλώνων σταθερής έκφρασης (stable expression) με ιικούς φορείς.....	75
1.1.2.8 Απομόνωση ολικού RNA	76
1.1.2.9 Σύνθεση cDNA από mRNA	76
1.1.2.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης, RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction).....	77
1.1.2.11 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA	78
1.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	79
1.2.1 Ανοσοδοκιμασία ELISA.....	79
1.2.2 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).....	80
1.2.2.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών	80
1.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου	80
1.2.2.2.1 Παρασκευή 10-12% πηκτώματος SDS-πολυακρυλαμίδιου	80
1.2.2.2.1.1 Πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel).....	81
1.2.2.2.1.2 Πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel)	81
1.2.2.3 Ημι-στεγνή μεταφορά (semi-dry transfer) πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	81
1.2.2.4 Δέσμευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης με ειδικό (πρωτεύον) και μη ειδικό (δευτερεύον) αντίσωμα	82
1.2.2.5 Χρωμογόνο ανίχνευση εξεταζόμενης πρωτεΐνης.....	82
1.2.2.6 Ποσοτικοποίηση.....	83
1.2.3 Δοκιμασία γονιδίου αναφοράς - Αντίδραση Λουσιφεράσης	83

1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	85
1.3.1 Μελέτη κυτταρικού κύκλου	85
1.3.2 Κυτταροδιαχωρισμός (Cell sorting).....	86
1.3.2.1 Βασικές αρχές κυτταροδιαχωρισμού.....	86
1.4 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	89
1.4.1 Παρατήρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο ολικής ανάκλασης (TIRF).....	89
1.4.1.1 Μονιμοποίηση και χρώση κυττάρων.....	89
1.5 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	90
1.5.1 Απομόνωση λεμφοκυττάρων από αίμα	90
1.5.2 Μαγνητικός διαχωρισμός λεμφοκυττάρων	90
ΜΕΡΟΣ II: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΑ	91
2.1 Διαδικασία ηθικής διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου	91
2.2 Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων επιθυμητού γονότυπου	91
2.3 Χειρισμοί πειραματόζωων - Ταυτοποίηση διαγονιδιακών σειρών.....	93
2.3.1 Απομόνωση DNA (hot shot DNA extraction)	93
2.3.2 Απομόνωση κυττάρων από θύμο αδένα και σπλήνα.....	93
2.3.3 Ανάλυση κυτταρικών υποπληθυσμών με Κυτταρομετρία Ροής	93
2.3.4 Ανίχνευση διαγονιδίων (γονοτύπηση) με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	94
2.3.5 Ποσοτική ανάλυση mRNA (Real Time RT-PCR, qRT-PCR)	95
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	97
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
ΜΕΡΟΣ I: <i>IN VIVO</i>	99
1.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΤΟΥ <i>ERF</i>	99
1.1.1 Έλεγχος διαγονιδιακών ποντικών για παρουσία του <i>Lck-Cre</i>	99
1.1.2 Έλεγχος διαγονιδιακών ποντικών για παρουσία <i>floxed Erf</i>	99
1.1.3 Έλεγχος της εξάλειψης του <i>Erf</i>	100
1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΛΕΙΨΗΣ ΤΟΥ <i>ERF</i> ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΣΕ ΘΥΜΟ ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ.....	101
1.2.1 Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων <i>Erf</i> και <i>Lck-Cre</i> στα ζώα μελέτης.....	103
1.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	109
1.2.2.1 Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>ERF</i> ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΑ CD4+ ΚΑΙ TCRβ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΣΤΑ DP ΚΥΤΤΑΡΑ.	109

1.2.2.2 Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ERF ΔΕΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΤΟΥΣ DN ΥΠΟΚΛΗΘΥΣΜΟΥΣ.....	110
1.2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΣΠΛΗΝΙΚΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	116
1.2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ	119
1.2.4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ <i>ETS</i> : Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>ETS1</i> ΑΥΞΑΝΕΤΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΟΝΟ ΣΤΑ ΖΩΑ ΜΕ ΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>ERF</i>	119
1.2.4.2 CD4+ ΔΕΣΜΕΥΣΗ: Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ <i>THPOK</i> , <i>GATA3</i> ΚΑΙ <i>SOCS1</i> ΜΕΙΩΝΕΤΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΣΤΑ ΖΩΑ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>ERF</i>	120
1.2.4.3 CD8+ ΔΕΣΜΕΥΣΗ: Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ <i>RUNX3</i> ΚΑΙ <i>MAZR</i> ΔΕ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΤΑΙ.	121
ΜΕΡΟΣ II: <i>IN VITRO</i>	125
2.1 ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ERF ΣΕ ΑΔΙΕΓΕΡΤΑ ΚΑΙ ΔΙΕΓΕΡΜΕΝΑ HUT78.....	125
2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ERF	126
2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ERF.....	130
2.3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	136
2.3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ IL-2	142
2.3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ IL-10	145
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	147
ΜΕΡΟΣ I	147
ΜΕΡΟΣ II	154
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	175

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF (Ets2 Repressor Factor, ERF), μέλος της οικογένειας των Ets γονιδίων, αποτελεί ένα μεταγραφικό καταστολέα, η ενεργότητα του οποίου ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης από την Erk1/2, γεγονός που τροποποιεί την υποκυτταρική διαμερισματοποίησή του. Μολονότι η Erk1/2 έχει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των T κυττάρων και ο ERF εκφράζεται στα T λεμφοκύτταρα, ο ρόλος του ERF στη βιολογία των T κυττάρων δεν έχει μελετηθεί.

Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε το ρόλο του *Erf* στην ωρίμανση των T κυττάρων σε σύστημα διαγονιδιακών ποντικών μετά από ιστοειδική εξάλειψη του *Erf* στο θύμο, ενώ σε ένα *in vitro* σύστημα χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά HuT78 μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση του ERF καθώς και το λειτουργικό του ρόλο μετά από υπερέκφραση.

Η ωρίμανση των θυμοκυττάρων, των ανώριμων δηλαδή T λεμφοκυττάρων στο θύμο, είναι μια σύνθετη διαδικασία, η επιτυχής ολοκλήρωση της οποίας είναι υψίστης σημασίας για τις ανοσοαποκρίσεις και την ανοσιακή ανοχή. Περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια κατά τα οποία τα θυμοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση ή μη διαφορετικών μορίων επιφανείας και βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός δικτύου μεταγραφικών παραγόντων και εξωκυττάρων μηνυμάτων. Χαρακτηριστικότεροι δείκτες είναι τα μόρια CD4 και CD8 τα οποία με βάση την έκφρασή τους καθορίζουν τα στάδια ωρίμανσης double negative (DN, CD4⁻CD8⁻), double positive (DP, CD4⁺CD8⁺) και single positive (SP, CD4⁺ ή CD8⁺). Μετά την ολοκλήρωση της θυμοποίησης και της δέσμευσης της κυτταρικής σειράς, τα θυμοκύτταρα εξέρχονται από το θύμο ως παρθένα CD4⁺ ή CD8⁺ T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν λειτουργικό T κυτταρικό υποδοχέα και μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα.

Τα αποτελέσματά μας παρέχουν βάσιμες ενδείξεις για τη συμμετοχή του *Erf* στη ρύθμιση της διαδικασίας καθώς διαγονιδιακοί ποντικοί με ιστοειδική εξάλειψη του *Erf* στο θύμο παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα των κυτταρικών υποπληθυσμών CD4⁺ και TCRβ και στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα διπλά θετικών (CD4⁺CD8⁺) κυττάρων. Εν ολίγοις, υποδηλώνουν ότι ο *Erf* ρυθμίζει την ωρίμανση των θυμοκυττάρων κατά το στάδιο CD4⁺CD8⁺, πριν τη δέσμευση της κυτταρικής σειράς. Αναλύοντας το

μοριακό μηχανισμό της δράσης του *Erf*, μελετήσαμε την έκφραση καίριων γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία και βρήκαμε ότι η έκφραση των γονιδίων *Gata3*, *ThPOK* και *Socs1*, γονιδίων δηλαδή που επάγουν τη CD4 κυτταρική δέσμευση, μειώνεται στατιστικώς σημαντικά στα ζώα με εξάλειψη του *Erf*, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της θετικής ρύθμισης του *Erf* στη CD4 δέσμευση των θυμοκυττάρων. Δεδομένης της διαδοχικής και επαγόμενης έκφρασης αυτών των γονιδίων (το *Gata3* επάγει την έκφραση του *ThPOK* ενώ το δεύτερο μπορεί να επάγει την έκφραση του *Socs1*) υποθέτουμε ότι ο *Erf* δρα θετικά, άμεσα ή έμμεσα, και ανοδικά επί του *Gata3*.

Για να ελέγξουμε με ποιο τρόπο ο ERF συμμετέχει στη βιολογία των περιφερικών T κυττάρων, μελετήσαμε την έκφρασή του σε HuT78 T κύτταρα και βρήκαμε ότι η φωσφορυλίωσή του και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του είναι γεγονότα εξαρτώμενα της Erk1/2 ενώ έχουμε ενδείξεις ότι δρα ανασταλτικά στον κυτταρικό κύκλο. Τέλος, βρήκαμε ότι η υπερέκφραση του ERF μειώνει στατιστικώς σημαντικά την παραγωγή της IL-2, γεγονός ιδιαίτερα ενδιαφέρον καθώς η IL-2 είναι κυτταροκίνη με ευρύ φάσμα δράσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Συνολικά, η έρευνά μας αποτελεί την πρώτη ένδειξη ότι ο ERF εμπλέκεται στη βιολογία των T λεμφοκυττάρων αποτελώντας το έναυσμα για τη συνέχιση της μελέτης του ρόλου του ERF στη θυμοποίηση και σε άλλες διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση των T βοηθητικών κυττάρων (T_H).

ABSTRACT

ERF (ETS2 Repressor Factor) is a ubiquitously expressed transcriptional repressor of the ETS family that is regulated by subcellular localization as a result of Erk-dependent phosphorylation. It is well established that Erk1/2 plays an important role in T cell maturation and differentiation, however, its effectors are not well known.

In the present dissertation, we studied the role of *Erf*, *in vivo*, in T cell maturation, using *Erf* floxed mice to produce thymus-specific ERF knockouts, and *in vitro* we studied ERF phosphorylation and function in the T cell line HuT78 over-expressing ERF.

The maturation of thymocytes in the thymus is a complex process of critical importance for the immune response and the immune tolerance. It is regulated by an extensive network of transcriptional factors and thymic signals. Maturation proceeds in successive stages where thymocytes express or not specific surface markers with signature markers the CD4 and CD8 molecules, whose expression classify thymocytes into three stages of maturation double negative (DN, CD4⁻CD8⁻), double positive (DP, CD4⁺CD8⁺) and single positive (SP, CD4⁺ or CD8⁺). Having completed thymopoiesis and cell lineage commitment, thymocytes leave the thymus as naïve CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes expressing functional T cell receptor and migrate to peripheral lymphoid organs.

We observed statistically significant decreased numbers of CD4⁺ and TCRβ subpopulation and statistically significant elevated numbers of DP (CD4⁺CD8⁺) cells in the thymus of *Erf* deficient mice. Thus, our findings suggest that *Erf* is involved in T cell maturation at the DP stage, acting as a positive regulator during CD4 lineage commitment. Investigating the mechanism of *Erf* function, we focused on the expression of critical genes during lineage commitment and found that *Gata3*, *ThPOK* and *Socs1* expression was statistically significant decreased in *Erf* deficient mice. Since those genes induce CD4 commitment, our findings are consistent with the hypothesis that *Erf* is a positive regulator of helper lineage commitment. Taking into consideration that *Gata3* directly induces *ThPOK* expression and *ThPOK* regulates positively *Socs1* expression, we propose that *Erf* acts as an upstream direct or indirect activator of *Gata3*.

In an attempt to explore the possible impact of ERF in the biology of peripheral T lymphocytes, we studied the expression of ERF in the HuT78 cell line. Our results showed that ERF phosphorylation and subcellular localization is an Erk-dependent event. We also have indications that ERF act as a repressor of cell cycle. Finally, cells over-expressing ERF showed statistically significant lower IL-2 production, suggesting that ERF acts as a negative regulator of *IL-2*, something particularly interesting since IL-2 is a cytokine with broad range of immunological functions.

Overall, our results show, for the first time, the possible involvement of ERF in T cell biology and can be the trigger for further research to understand thymocyte maturation and to comprehend the role of ERF in other immunological processes such as the differentiation of T helper cells (T_H).

ΟΡΟΛΟΓΙΑ

Συντμήσεις και ελληνική μετάφραση των συχνότερων ξενόγλωσσων όρων της διατριβής.

A

Ab: antibody – αντίσωμα

anti-: antibody (π.χ. anti-CD3) – αντίσωμα έναντι κάποιου μορίου (π.χ. αντί-CD3)

APC: antigen presenting cell – αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο

B

Biotin-Ab: biotin Antibody – βιοτινυλιωμένο αντίσωμα

C

CD: cluster of differentiation (antigens) – συσσωμάτωμα αντιγόνων διαφοροποίησης

D

DN: double negative – διπλά αρνητικό

DP: double positive – διπλά θετικό

E

ERF: ets2 repressor factor (Στην παρούσα διατριβή στα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ, ως “ERF” συμβολίζεται η πρωτεΐνη στον άνθρωπο ενώ “Erf” στον ποντικό.)

F

Floxed gene: γονίδιο περιβαλλόμενο από LoxP αλληλουχίες

G

H

h: hour – ώρα

I

IL-2: Interleukin-2 – Ιντερλευκίνη-2

IL-10: Interleukin-10 – Ιντερλευκίνη-10

inh: inhibition (ή inhibitor) – αναστολέας (ή αναστολή)

J

K

L

Lck: lymphocyte specific protein tyrosine kinase – ειδική για τα λεμφοκύτταρα πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης

luciferase: λουσιφεράση

M

MAPK: mitogen activated protein kinase – πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

MHC: major histocompatibility complex - μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

N

min: minute – λεπτό

NK cell: natural killer – φυσικό φονικό κύτταρο

O

O/N: overnight – ολονύκτια

P

phospho: phosphorylated – φωσφορυλιωμένη (φωσφο-πρωτεΐνη)

Q

R

S

SP: single positive – μονά θετικό

stim: stimulation - διέγερση

T

T_C ή CTL: T cytotoxic cell ή cytotoxic T lymphocyte - T κυτταροτοξικό κύτταρο

TCR: T cell receptor – υποδοχέας T λεμφοκυττάρων

T_H ή Th: T helper cell - T βοηθητικό κύτταρο

transgene-ic: διαγονίδιο-διαγονιδιακός

T_{reg} ή Treg: T regulatory cell - T ρυθμιστικό κύτταρο

U

V

W

wt: wild type – αγρίου τύπου

X

Y

Z

ΣτΣ: στην παρούσα διατριβή οι εικόνες που χρησιμοποιήθηκαν παρέμειναν στην αυθεντική τους μορφή με τους αναγραφόμενους όρους στα αγγλικά. Ωστόσο, για την καλύτερη κατανόηση της εκάστοτε εικόνας, στις λεζάντες ή στο κείμενα στα αντίστοιχα χωρία υπάρχει η μετάφραση των απαραίτητων όρων στα ελληνικά.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

«Υγεία τίμιον ἄλλ' εὐμετάστατον»

Πλούταρχος

1.1 Γενική περιγραφή

Το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα αντικατοπτρίζει την αέναη πάλη ανάμεσα στους ταχύτατα εξελισσόμενους παθογόνους μικροοργανισμούς και στον βραδύτερα εξελισσόμενο ανθρώπινο οργανισμό. Απαρτίζεται από ένα δίκτυο οργάνων και ιστών που εκτείνεται σ' ολόκληρο το σώμα. Τα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος κινητοποιούνται και συνεργάζονται αρμονικά ώστε να αναχαιτίζουν οποιονδήποτε «ξένο» εισβολέα. Μια τέτοια υγιής απόκριση, που αποκαλείται «ανοσιακή απάντηση», χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση του «εισβολέα», που μπορεί να πρόκειται για παθογόνο μικροοργανισμό. Την αρχική αναγνώριση ακολουθεί η δραστική απόκριση που διακρίνεται σε διάφορες επιμέρους αποκρίσεις ειδικές για το κάθε παθογόνο. Τελικός σκοπός είναι η εξουδετέρωση του εισβολέα.

Βασικό χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η εξασφάλιση της ανοσίας, της προστασίας δηλαδή από μολυσματικές ασθένειες και αποτελείται τόσο από μη ειδικά όσο και ειδικά συστατικά. Τα μη ειδικά στοιχεία, όπως φαγοκύτταρα, μακροφάγα, δερματικοί φραγμοί και βλεννογόνοι, απαρτίζουν την έμφυτη ανοσία, την πρώτη, δηλαδή, γραμμή άμυνας του οργανισμού στη αντιμετώπιση του παθογόνου. Η προσαρμοστική ανοσία, τα ειδικά στοιχεία του συστήματος όπως Β και Τ λεμφοκύτταρα και αντισώματα, ενεργοποιείται μόνο όταν υπάρχει αντιγονική επίθεση που δεν έχει αντιμετωπιστεί από την έμφυτη ανοσία και χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση και μνήμη. Παρότι τα δύο συστήματα της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας είναι διακριτά, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν δρουν ανεξάρτητα μεταξύ τους. Αντίθετα, συνεργάζονται αμφίδρομα αυξάνοντας της αποτελεσματικότητας της ανοσιακής απόκρισης.

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα σύνθετο και δυναμικό σύστημα προστασίας από μολύνσεις, ασθένειες, καρκίνο. Όπως γίνεται αντιληπτό, δυσλειτουργίες αυτής της καλοκουρδισμένης μηχανής, από ανεπαρκή ή λανθασμένη έως υπερβολική απόκριση, μπορούν να οδηγήσουν σε επικίνδυνες για την υγεία καταστάσεις μέχρι και θάνατο. Οι συχνότερες εκδηλώσεις ανοσολογικής δυσλειτουργίας περιλαμβάνουν το άσθμα και την αλλεργία, τα αυτοάνοσα νοσήματα και τις ανοσοανεπάρκειες [1], [2].

1.2 Όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος διακρίνονται σε πρωτογενή (ή κεντρικά) και δευτερογενή (ή περιφερικά) λεμφικά όργανα. Στα πρώτα ανήκουν ο θύμος και ο μυελός των οστών, στα οποία λαμβάνει χώρα η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και διάφοροι λεμφικοί ιστοί σχετιζόμενοι με τους βλεννογόνους απαρτίζουν τα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπου πραγματοποιούνται οι ανοσιακές αποκρίσεις. Τέλος, υπάρχουν και οι τριτογενείς λεμφικοί ιστοί οι οποίοι συμμετέχουν κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους αντίδρασης.

1.2.1 Θύμος

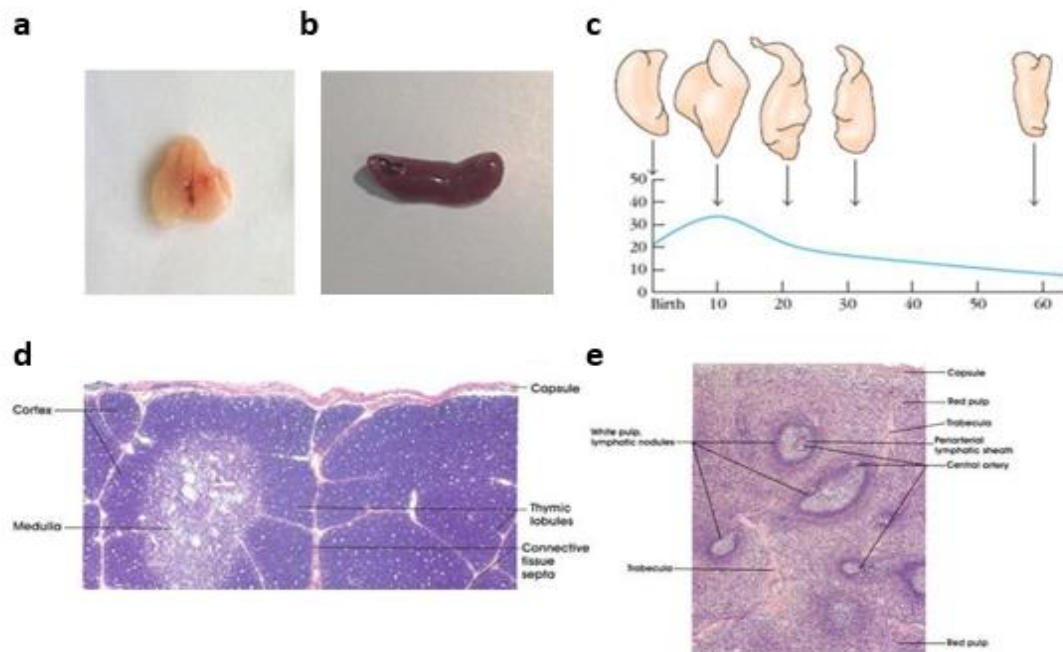
Ο θύμος είναι από τα πρώτα λεμφικά όργανα που σχηματίζονται και αυξάνεται σχετικά άμεσα μετά τη γέννηση ως αποτέλεσμα της ανάγκης παραγωγής μεγάλου αριθμού ώριμων Τ λεμφοκυττάρων. Φτάνει στο ανώτερο μέγεθος κατά την εφηβεία ενώ η ενηλικίωση επιφέρει τη συρρίκνωση του αδένα και την επακόλουθη εξασθένηση της θυμικής λειτουργίας [3] (Εικόνα 1. c).

Όργανο επιθηλιακής προέλευσης, εμφανίζει παρόμοια μορφολογία σε όλο το ζωικό βασίλειο. Εδράζεται πάνω από την καρδιά και αποτελείται από δύο λοβούς. Εξωτερικά, κάθε λοβός περιβάλλεται από κάψα (capsule) ενώ εσωτερικά υποδιαιρείται σε λοβίδια (lobules) που διαχωρίζονται από συνδετικό ιστό (connective tissue septa). Τα λοβίδια απαρτίζονται από δύο τμήματα: τον φλοιό (cortex) όπου εδράζονται τα θυμοκύτταρα (ανώριμα Τ λεμφοκύτταρα) και την μυελική μοίρα ή μυελό (medulla) που περιέχει περισσότερα ώριμα Τ κύτταρα. Και στα δύο τμήματα απαντάται πληθώρα στρωματικών κυττάρων (επιθηλιακά, δενδριτικά και μακροφάγα) που αλληλεπιδρούν με τα θυμοκύτταρα και βοηθούν την ανάπτυξη και ωρίμανσή τους [4] (Εικόνα 1. a, d). Η κύρια

λειτουργία του θύμου συνίσταται στη δημιουργία ενός εκτενούς ρεπερτορίου Τ λεμφοκυττάρων, που προκύπτει μετά από θετική και αρνητική επιλογή (αναλυτική περιγραφή βλ. § 2.2), που συμβάλουν στην ομοιόσταση του οργανισμού. Η σημασία και ο ρόλος του θύμου στο ανοσοποιητικό σύστημα έχει προκύψει από τη μελέτη των σε ανθρώπους με γενετικές ανωμαλίες του θύμου αλλά και πειραματικά, με αθυμικούς ποντικούς ή ποντικούς που έχουν υποστεί θυμεκτομή. Όλες οι περιπτώσεις οδηγούν σε δραματική μείωση ή απουσία Τ λεμφοκυττάρων, ευπάθεια σε μολυσματικές ασθένειες κ.ά. [5].

1.2.2 Σπλήνας

Ο σπλήνας αποτελεί το μεγαλύτερο από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα και βρίσκεται στην αριστερή πλευρά της περιτοναϊκής κοιλότητας. Περιβάλλεται από κάψα (capsule) ενώ εσωτερικά αποτελείται από τον ερυθρό (red pulp) και τον λευκό πολφό (white pulp). Στον ερυθρό πολφό απαντώνται ερυθροκύτταρα και μακροφάγα. Αντίθετα, ο λευκός πολφός βρίθει κυρίως Τ λεμφοκυττάρων [6] (Εικόνα 1. b, e). Ο σπλήνας ειδικεύεται στη διήθηση του αίματος και στον εγκλωβισμό αντιγόνων. Στον λευκό πολφό γίνεται η αντιγονοπαρουσίαση με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση Β και Τ κυττάρων και την μετέπειτα μετανάστευσή τους [7], [8]. Παρότι ο σπλήνας επιτελεί σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, πραγματοποιείται μερική ή ολική σπληνεκτομή για θεραπευτικούς λόγους σε ασθενείς με λεμφώματα ή ρήξη σπλήνα, με συνεπακόλουθη ευαισθησία σε βακτηριακές λοιμώξεις, σήψη κ.ά. [9], [10].



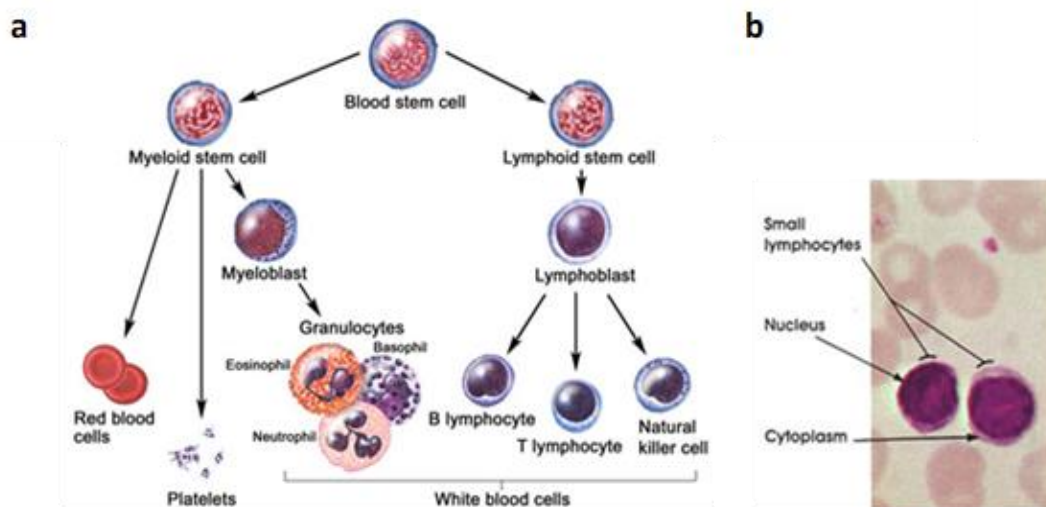
Εικόνα 1. α) Θύμος και β) σπλήνας νεαρού ποντικού | ©Spyridoula Tsiomita. γ) Το μέγεθος του θύμου (άξονας γ, βάρος σε γραμμάρια) είναι εξαρτώμενο από την ηλικία (άξονας χ, ηλικία σε έτη). | *Immunology*, 5th Edition (2002) δ, ε) Ανατομία θύμου και σπλήνα αντίστοιχα. Παρασκευάσματα ανθρώπινου ιστού σε 10% formalin. Σημειώνονται τα βασικά δομικά στοιχεία (βλ. κείμενο για ελληνικούς όρους) | *Atlas of Microscopic Anatomy* (1999)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

2.1 Αιμοποίηση

Όλα τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από ένα κοινό λεμφοειδές προγονικό κύτταρο, κατά τα αρχικά στάδια της διαδικασίας της αιμοποίησης. Το λεμφοειδές προγονικό κύτταρο διαφοροποιείται και μπορεί να δώσει γένεση σε φυσικό φονικό κύτταρο (NK), T ή B προγονικό κύτταρο και σε δενδριτικό κύτταρο (Εικόνα 2. α). Από τα T και B προγονικά κύτταρα προκύπτουν εν συνεχεία οι δύο τύποι T λεμφοκυττάρων, T_H βοηθητικά και τα T_C κυτταροτοξικά, και τα B λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Το ποια πορεία θα ακολουθηθεί κατά την διαδικασία της αιμοποίησης εξαρτάται κυρίως από το μικροπεριβάλλον των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων, τους αυξητικούς παράγοντες και τις κυτταροκίνες που εκκρίνονται/προσλαμβάνονται ενώ η διαφοροποίηση των κυττάρων ρυθμίζεται γενετικά [11], [12].

Τα παρθένα T λεμφοκύτταρα είναι μικρά, κινητικά κύτταρα, διαμέτρου περίπου 6 μm. Εσωτερικά, το μεγαλύτερο χώρο καταλαμβάνει ο πυρήνας, με πυκνά δομημένη χρωματίνη, ενώ το μόλις διακριτό κυτταρόπλασμα (φτωχό σε μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi) τον περιβάλλει σαν στεφάνη (Εικόνα 2. b). Τα λεμφοκύτταρα δεν παρουσιάζουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες, βρίσκονται στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου και χαρακτηρίζονται από έναν μεμβρανικό αντιγονοδεσμευτικό υποδοχέα, τον κυτταρικό υποδοχέα TCR (T cell receptor, TCR), ο οποίος περιγράφεται λεπτομερώς στις ενότητες που ακολουθούν.



Εικόνα 2. Αιμοποίηση. α) Από ένα κοινό πολυδύναμο προγονικό κύτταρο (*blood stem cell*) προέρχονται τα κύτταρα της μυελικής (*myeloid*, αριστερά) και της λεμφοειδούς (*lymphoid*, δεξιά) σειράς. Η μυελική σειρά δίνει γένεση σε ερυθροκύτταρα (*red blood cells*), αιμοπετάλια (*platelets*) καθώς και στους διάφορους τύπους των κοκκιοκυττάρων (*granulocytes*). Από την άλλη, από τον προγονικό λεμφοβλάστη (*lymphoblast*) προκύπτουν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα όπως και τα κύτταρα «φυσικοί φονείς» (NK). Οι διάφοροι τύποι των κοκκιοκυττάρων καθώς και τα κύτταρα της λεμφοειδούς σειράς αποτελούν τα λευκοκύτταρα (*white blood cells*). | ©National Cancer Institute (2008) β) Ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μετά από χρώση Wright. Με σκούρο ιώδες χρωματίζεται ο πυρήνας (*nucleus*) ενώ περιμετρικά του πυρήνα εντοπίζεται το κυτταρόπλασμα (*cytoplasm*). Με ροζ χρώμα φαίνονται τα ερυθροκύτταρα. | *Atlas of Microscopic Anatomy* (1999)

2.2 Θυμοποίηση

2.2.1 Γενικά

Η ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία. Η ίδια η ανατομία του οργάνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων. Το μικροπεριβάλλον του θύμου αποτελείται από στρωματικά κύτταρα, επιθηλιακό ιστό και κυτταροκίνες, παρέχοντας έτσι το ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των θυμοκυττάρων. Ο φλοιός του θύμου είναι η περιοχή όπου συμβαίνουν τα πρώτα γεγονότα στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων, όπου η έκφραση του Τ κυτταρικού υποδοχέα και η θετική επιλογή λαμβάνουν χώρα. Κατά τη διαδικασία της φαινοτυπικής και λειτουργικής ωρίμανσης, τα θυμοκύτταρα μεταβαίνουν από τον εξωτερικό φλοιό, στον εσωτερικό και διαμέσου της φλοιομυελικής σύνδεσης φτάνουν στον μυελό του θύμου όπου παραμένουν για περίπου δύο εβδομάδες για περεταίρω ωρίμανση. Τελικός προορισμός των θυμοκυττάρων είναι το περιφερικό αίμα και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα [13].

2.2.2 Θετική και αρνητική επιλογή

Τα γεγονότα-κλειδιά κατά τη διαδικασία της θυμοποίησης περιλαμβάνουν την είσοδο των αδιαφοροποίητων προγονικών κυττάρων από τον μυελό των οστών στο θύμο και τη διαφοροποίησή τους σε Τ λεμφοκυτταρικούς προγονικούς πληθυσμούς, το σχηματισμό λειτουργικού Τ κυτταρικού υποδοχέα καθώς και τη θετική και αρνητική επιλογή των θυμοκυττάρων που εξασφαλίζουν τη σωστή αναγνώριση των συμπλόκων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (*major histocompatibility complex*, MHC) και

αντιγονικών πεπτιδίων («περιορισμός» MHC) καθώς και την απομάκρυνση των αυτοδραστικών κυττάρων. Η όλη διαδικασία είναι τόσο αυστηρά ρυθμιζόμενη ώστε τελικά μόνο το 1% περίπου των θυμοκυττάρων επιβιώνει και μεταναστεύει στο περιφερικό αίμα [14]. Η θετική επιλογή (positive selection) επιτυγχάνεται όταν ο TCR υποδοχέας του θυμοκυττάρου συνδεθεί με χαμηλή συγγένεια με ένα σύμπλοκο MHC-πεπτιδίου, γεγονός που οδηγεί στην επιβίωση του κυττάρου και στη μετέπειτα διαφοροποίησή του. Στον αντίποδα, κατά την αρνητική επιλογή (negative selection), ισχυρή σύνδεση του TCR με σύμπλοκο MHC-πεπτιδίου που παρουσιάζεται από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (antigen presenting cell, APC), πυροδοτεί την έναρξη κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) και το θυμοκύτταρο αποπίπτει. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η εξασφάλιση του MHC περιορισμού και η δημιουργία ενός ρεπερτορίου παρθένων T κυττάρων αυτοανοχής [15], [16]. Τα θετικά επιλεγμένα θυμοκύτταρα εξελίσσονται προς ανώριμα μονά θετικά CD4+ (single positive CD4+) ή μονά θετικά CD8+ (single positive CD8+) κύτταρα αναλόγως με τη σύνδεση τους με σύμπλοκο MHC II/πεπτιδίου ή MHC I/πεπτιδίου αντιστοίχως.

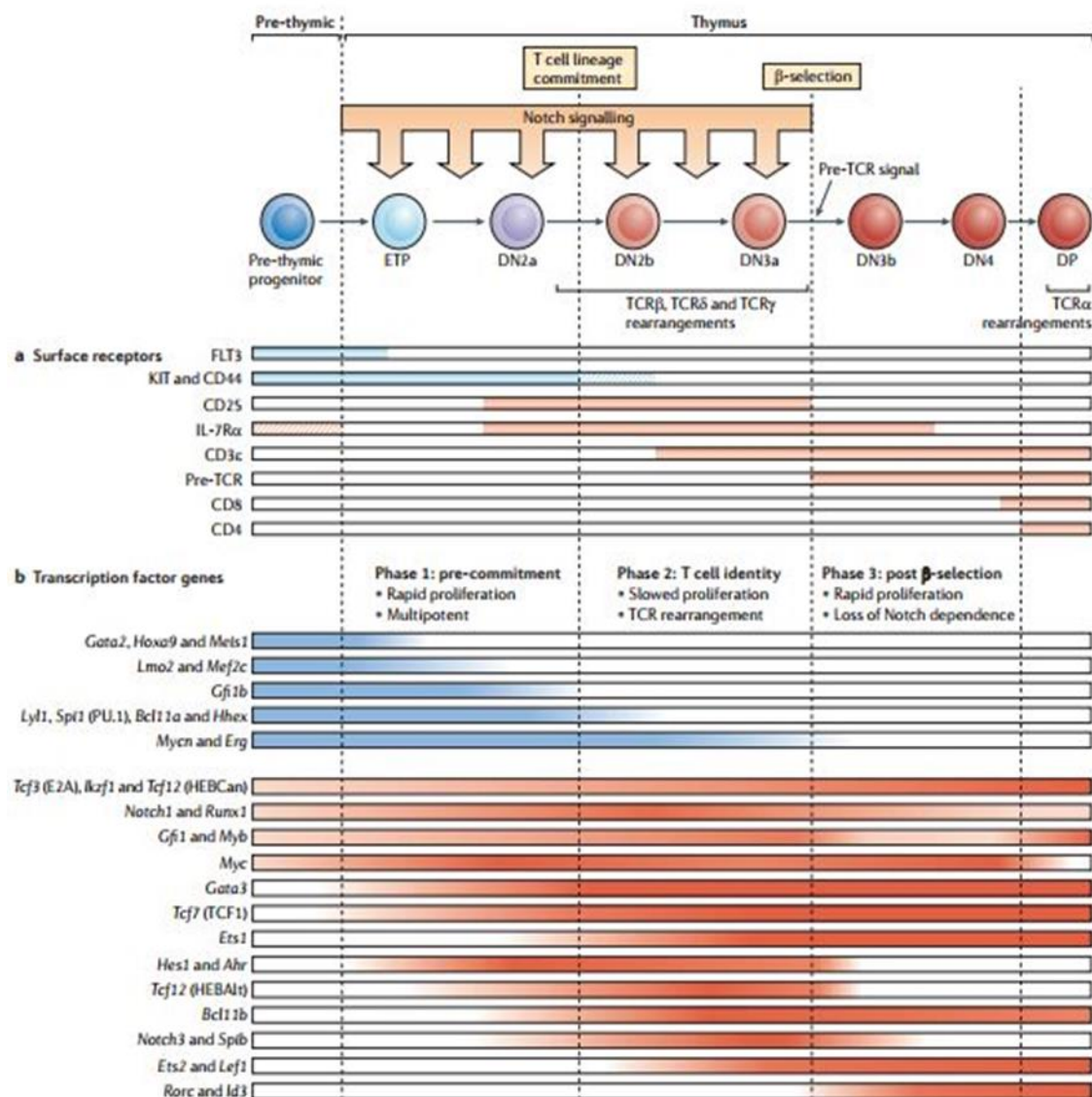
2.2.3 Φάσεις ωρίμανσης

Με βάση την έκφραση των μορίων CD4 και CD8, τα ανώριμα θυμοκύτταρα μπορούν να διακριθούν σε τρία κύρια στάδια: διπλά αρνητικά (double negative, DN), διπλά θετικά (double positive, DP) και μονά θετικά (single positive, SP) κύτταρα. Τα ανώριμα DN θυμοκύτταρα κατηγοριοποιούνται περεταίρω σε τέσσερις φάσεις βάσει δύο μορίων-δεικτών που εκφράζουν στην επιφάνειά τους, τα CD44 και CD25. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε τα CD44+ CD25- (DN1), CD44+ CD25+ (DN2), CD44- CD25+ (DN3) και CD44- CD25- (DN4) θυμοκύτταρα. Η έκφραση των μορίων CD4 και CD8 ξεκινά κατά τη μετάβαση των θυμοκυττάρων από τον εξωτερικό φλοιό του θύμου στον εσωτερικό όπου και τίθενται υπό την επίδραση διάφορων κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες αυτές επάγουν αλληλεπιδράσεις των θυμοκυττάρων με σύμπλοκα MHC-πεπτιδίων ή άλλους παράγοντες που εκκρίνονται από τα στρωματικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη Notch καταλαμβάνει εξέχουσα θέση στη ρύθμιση της ανάπτυξης των θυμοκυττάρων καθώς αποτελεί το βασικό μόριο που καθορίζει τη μοίρα των θυμοκυττάρων με συμμετοχή σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης [17], [18]. Τα τελικά γεγονότα της ωρίμανσης, συμπεριλαμβανομένων της θετικής και

αρνητικής επιλογής που περιγράφηκαν νωρίτερα, λαμβάνουν χώρα στο μυελό του θύμου, όπου τα SP θυμοκύτταρα φαίνεται να παραμένουν εκεί για δύο εβδομάδες κατά τη διάρκεια των οποίων υποβάλλονται σε περεταίρω διαφοροποίηση με την απαραίτητη συμμετοχή διάφορων κυτταροκινών και υποδοχέων [19]–[21].

2.2.3.1 Αναδιάταξη αλυσίδων TCR υποδοχέα

Η αναδιάταξη των αλυσίδων του TCR υποδοχέα αποτελεί γεγονός ουσιαστικής σημασίας για την φυσιολογική ωρίμανση των θυμοκυττάρων. Τα DN3 θυμοκύτταρα ξεκινούν να αναδιατάσσουν τις γονιδιακές περιοχές της β αλυσίδας του T κυτταρικού τους υποδοχέα (για δομή TCR βλ. §2.3.1) για να σχηματίσουν την β αλυσίδα, η οποία επάγει την επιβίωση των κυττάρων επιτρέποντας τους να περάσουν στην επόμενη φάση διαφοροποίησης (DN4). Η β αλυσίδα του TCR συνδέεται με την αμετάβλητη α αλυσίδα υποκατάστασης για να σχηματίσουν τον προ-TCR υποδοχέα, γεγονός κρίσιμο για τον εντατικό πολλαπλασιασμό και την πρόοδο των DN4 θυμοκυττάρων στην DP φάση. Ένα γεγονός που συνδέεται με τη σηματοδότηση του προ-TCR είναι και ο «αποκλεισμός των αλληλίων», η αναστολή, δηλαδή, της αναδιάταξης των γονιδιακών περιοχών της β αλυσίδας στο ένα αλληλίο από την πρωτεΐνη TCR-β που κωδικοποιείται από το άλλο αλληλίο. Διασφαλίζεται έτσι ότι κάθε T κύτταρο εκφράζει μια TCR-β αλυσίδα συγκεκριμένης ειδικότητας. Η πρόοδος από την DN στη DP φάση περιλαμβάνει την πλήρη αναδιάταξη των περιοχών της α αλυσίδας του TCR [22], [23]. Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία και εκφράζουν CD4, CD8 και λειτουργικό α,β-TCR υποδοχέα διαφοροποιούνται σε μονά θετικά θυμοκύτταρα τα οποία εκφράζουν επιλεκτικά είτε CD4 ή CD8 μέσω της θετικής επιλογής. Τα CD4+ κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν περεταίρω, στην περιφέρεια, σε διάφορους T κυτταρικούς τύπους που εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες και εξυπηρετούν συγκεκριμένες ανάγκες του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η άμυνα έναντι παθογόνων εισβολέων ή η λεπτή ρύθμιση των ανοσιακών αποκρίσεων, συμβάλλοντας, έτσι, με διάφορους τρόπους στην εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων ενώ σημειώνονται οι επιφανειακοί δείκτες και μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν καθώς και η έκφραση αυτών.



Εικόνα 3. Η ανάπτυξη των T κυττάρων: στάδια, επιφανειακοί δείκτες και μεταγραφικοί παράγοντες. Η T κυτταρική ανάπτυξη στον ποντικό ξεκινά όταν προγονικά λεμφοειδή κύτταρα μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών στον θύμο αδέν, όπου ξεκινά η διαφοροποίηση στο περιβάλλον του θύμου με τη σηματοδότηση του Notch. Κατά τη θυμοποίηση τα κύτταρα μεταβαίνουν στα στάδια DN1, DN2 (a+b), DN3 (a+b), DN4 και DP [24]. Σημειώνονται τα σημεία αναδιάταξης (rearrangement) λειτουργικών αλυσίδων TCR. Οι μπάρες με διαβαθμιζόμενο χρωματισμό συμβολίζουν τις δυναμικές αλλαγές της έκφρασης των δεικτών επιφάνειας (surface receptors) και των μεταγραφικών παραγόντων (transcription factor genes) στα διάφορα στάδια. Γονίδια που εκφράζονται στα αρχικά στάδια χρωματίζονται με μπλε και γονίδια κρίσιμα για τη διαφοροποίηση και την T κυτταρική δέσμευση (lineage commitment) με κόκκινο. | *Nature Reviews Immunology* (2014)

2.2.3.2 Απόφαση ζωής: CD4+ ή CD8+;

Όλα τα προκύπτοντα Τ λεμφοκύτταρα, είτε CD4+ ή CD8+, προέρχονται από τον ίδιο αρχικά πληθυσμό των διπλά θετικών κυττάρων. Το πώς λαμβάνεται η απόφαση για το ποιο πεπρωμένο θα ακολουθηθεί αποτελούσε για πολλές δεκαετίες βασικό ερώτημα της ωρίμανσης των Τ κυττάρων. Πλέον, έχουν αναγνωρισθεί διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που συνθέτουν ένα δίκτυο ρύθμισης και ελέγχου των γεγονότων που εμπλέκονται στη διαδικασία της δέσμευσης προς την CD4+ ή CD8+ κυτταρική σειρά. Βέβαια, παρά την σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί, κάποια ερωτήματα σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της διαδικασίας εξακολουθούν να παραμένουν αναπάντητα.

2.2.3.2.1 *ThPOK* και *Runx*

Ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK (T-helper inducing POZ-Kruppel factor), γνωστός και ως Zbtb7b ή cKrox, αναγνωρίστηκε ως βασικός παράγοντας στην ωρίμανσης των βοηθητικών Τ κυττάρων. Ο *ThPOK* εκφράζεται μόνο στα θυμοκύτταρα που έχουν περάσει το στάδιο της θετικής επιλογής και η έκφρασή του συνεχίζει να αυτοενισχύεται και να ρυθμίζεται θετικά περεταίρω στα κύτταρα της Τ βοηθητικής σειράς. Αντίθετα, φαίνεται να εξαλείφεται στα ώριμα CD8+ μονά θετικά Τ κύτταρα. Σε πειράματα σε ποντικούς έχειδειχθεί ότι έκτοπη έκφραση του ThPOK οδηγεί σε πλήρη αναστολή παραγωγής CD8+ SP κυττάρων ενώ στοχευμένη εξάλειψη του γονιδίου του προκαλεί έλλειψη CD4+ κυττάρων. Τα πειράματα αυτά αποδεικνύουν ότι ο ThPOK αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για την στροφή των θυμοκυττάρων προς την διαφοροποίηση σε βοηθητικά Τ κύτταρα [25]–[28].

Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς της έκφρασης του *Cd4* γονιδίου και ανήκουν στην οικογένεια των *Runx* γονιδίων (*Runx1*, *Runx2*, *Runx3*). Υπερέκφραση του *Runx3* οδηγεί σε αύξηση των ώριμων CD8+ κυττάρων ενώ παρεμπόδιση στην έκφρασή του επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα στον πληθυσμό των CD8+ κυττάρων [29]. Ένα άλλο σημαντικό εύρημα αφορά στην αλληλεπίδραση ThPOK και *Runx* παραγόντων. Έτσι, οι παράγοντες *Runx* ανταγωνίζονται τη δράση του ThPOK, οδηγώντας προς CD8+ κυτταροτοξική σειρά, με το να προσδένονται άμεσα στο γονίδιο του *ThPOK* παρεμποδίζοντας τη δράση του. Σε άλλα πειράματα έχει βρεθεί ότι ο ThPOK με τη σειρά

του ανταγωνίζεται τον Runx3 καταστέλλοντας την έκφρασή του αποτρέποντας, έτσι, μια δέσμευση προς CD8+ σειρά [26], [30], [31].

2.2.3.2.2 *Gata3, Myb, MAZR και Socs1*

Ρυθμιστικά επί των ThPOK και Runx δρουν άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες οι σημαντικότεροι των οποίων περιγράφονται ακολούθως και απεικονίζονται συνοπτικά στην Εικόνα 4.

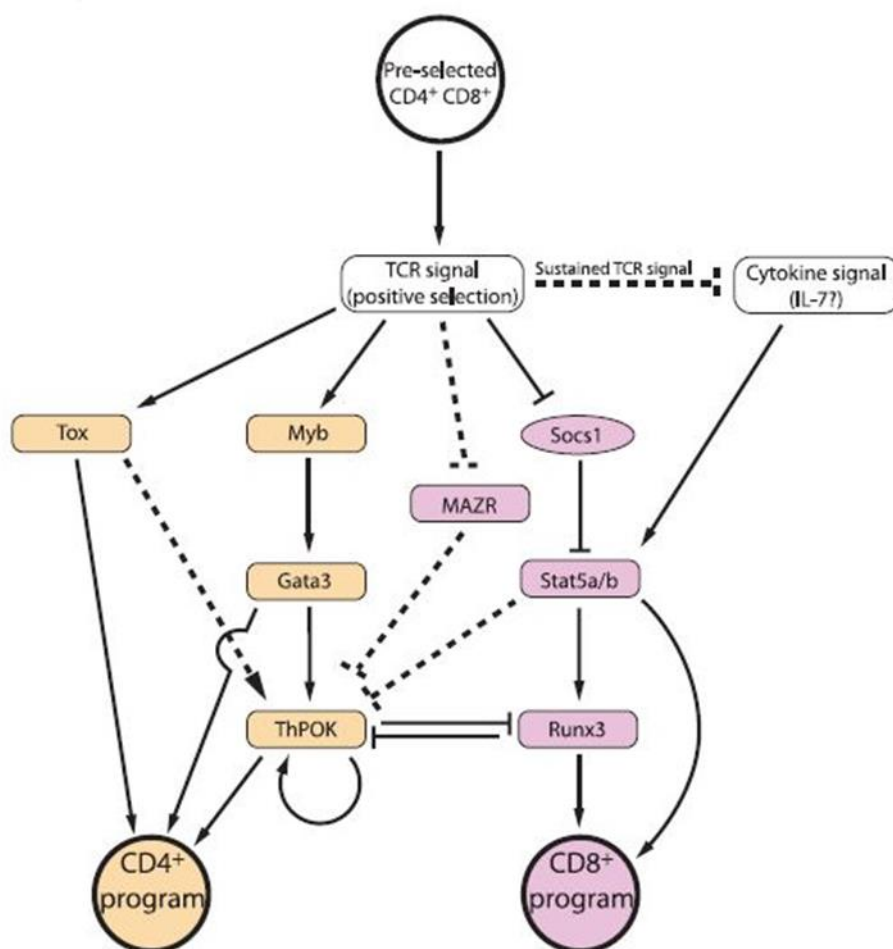
Ο μεταγραφικός παράγοντας *Gata3* εκφράζεται σε όλα τα στάδια της αναπτυξιακής πορείας των T λεμφοκυττάρων. Τα επίπεδα του μειώνονται κατά τη μετάβαση από την DN φάση στην DP ενώ αυξάνονται πάλι μετά την MHC τάξης II θετική επιλογή. Η συμμετοχή του στην διαφοροποίηση των T_H2 κυττάρων είναι τεκμηριωμένη [32]. Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν δείξει ότι συμμετέχει και στα γεγονότα που οδηγούν στη δέσμευση προς CD4+ σειρά καθώς η *in vivo* εξάλειψη του *Gata3* επέφερε σημαντική μείωση στον πληθυσμό των CD4+ T κυττάρων ενώ ρυθμίζει θετικά και την έκφρασή του ThPOK μέσω άμεσης πρόσδεσης στο γονίδιό του [33]–[35]. Επί του *Gata3* δρα ο μεταγραφικός παράγοντας *Myb*, ο οποίος προσδένεται άμεσα σε αυτόν επάγοντας την έκφρασή του. Εκτός από την διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων, η δράση του *Myb* είναι επίσης σημαντική κατά τη μετάβαση στη DN3 φάση και για την επιβίωση των διπλά θετικών θυμοκυττάρων πριν την επιλογή στο θύμο [36]–[38]. Τέλος, και ο μεταγραφικός παράγοντας *Socs1*, μέλος της οικογένειας των *Socs* παραγόντων, συμμετέχει στην ωρίμανση οδηγώντας τα θυμοκύτταρα προς τη CD4+ πορεία αλλά και στα μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης των T_H βοηθητικών κυττάρων [39], [40].

Στον αντίποδα δρουν μόρια που οδηγούν τα θυμοκύτταρα προς την κυτταροτοξική πορεία. Τέτοιος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας *MAZR* ο οποίος είναι αρνητικός ρυθμιστής του ThPOK. Η έκφραση του *MAZR* είναι υψηλή στα DN και DP θυμοκύτταρα ενώ μειώνεται στα SP CD4+ ή CD8+ κύτταρα [41], [42].

2.2.3.2.3 Άλλα μόρια

Άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται με τα γεγονότα της CD4+ ή CD8+ απόφασης και δρουν ενισχυτικά ή ανασταλτικά επί των μορίων που περιγράφηκαν ή συμμετέχουν γενικότερα σε διάφορα στάδια κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων περιλαμβάνουν τους

μεταγραφικούς παράγοντες Notch, Ikaros, Stat και TCF-1, την οικογένεια των *Ets* γονιδίων (αναλυτική περιγραφή βλ. §3.1.1), τις πρωτεΐνες E και Tox, τις MAPK κινάσες (αναλυτική περιγραφή βλ. §2.3.1.1.1) αλλά και διάφορες κυτταροκίνες όπως η Ιντερλευκίνη-7 (IL-7) κ.ά. [43]–[45].



Εικόνα 4. Δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων κατά τη δέσμευση προς την CD4+ ή CD8+ πορεία των θυμοκυττάρων. Οι γραμμές με άκρο βέλος συμβολίζουν τη θετική ρύθμιση ενώ με παύλα την αρνητική. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τις υποθετικές ενισχυτικές ή ανασταλτικές επιδράσεις. | *International Immunology* (2010)

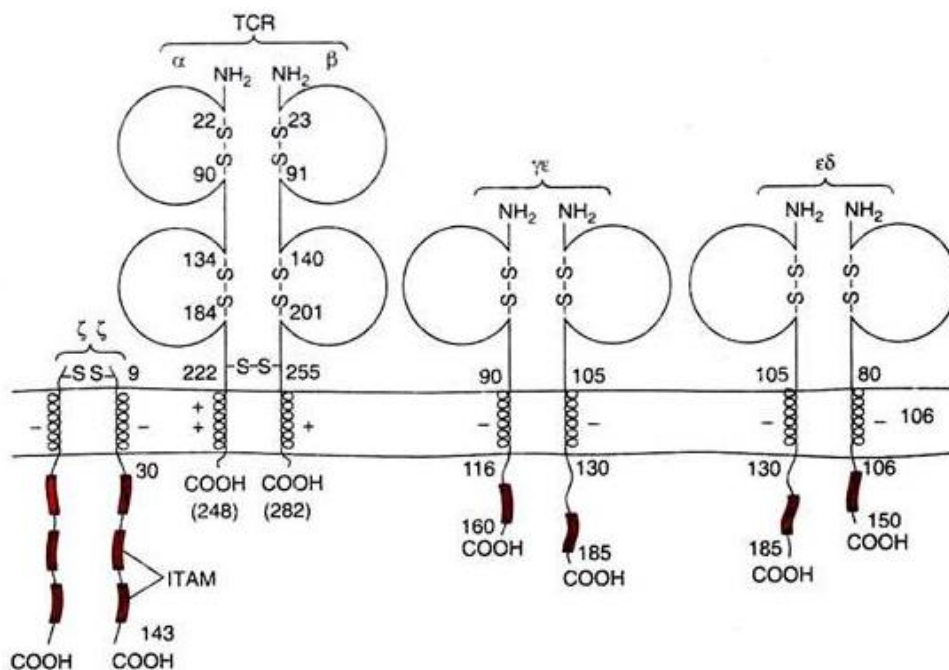
2.3 Διέγερση T κυττάρων

Μετά τη δέσμευση προς τη CD4+ ή τη CD8+ κυτταρική σειρά και την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ωρίμανσης, τα παρθένα T κύτταρα απελευθερώνονται «ετοιμοπόλεμα» στο περιφερικό αίμα. Όπως προαναφέρθηκε, η επίκτητη ανοσιακή απόκριση

διεκπεραιώνεται από λεμφοκύτταρα. Ανάλογα με τα επιμέρους στοιχεία που συμμετέχουν διακρίνεται στη χυμική ανοσία, όπου κύριο ρόλο επιτελούν τα Β λεμφοκύτταρα και τα αντισώματα και την κυτταρική ανοσία όπου πρωταγωνιστές είναι τα Τ λεμφοκύτταρα. Κατά την κυτταρική ανοσία, τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγονικούς επίτοπους οι οποίοι επεξεργάζονται και παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (κυρίως μακροφάγα, δενδριτικά και Β κύτταρα). Τα πεπτίδια αυτά παρουσιάζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων συνδεδεμένα με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και II (MHC I και II). Αποτέλεσμα της αντιγονοπαρουσίωσης είναι η ειδική αναγνώριση του αντιγόνου από το Τ λεμφοκύτταρο μέσω του κυτταρικού τους υποδοχέα και η έναρξη ενός καταρράκτη γεγονότων που περιλαμβάνει τη διέγερση και κλωνική επέκταση του κυττάρου με σκοπό την εξουδετέρωση του παθογόνου.

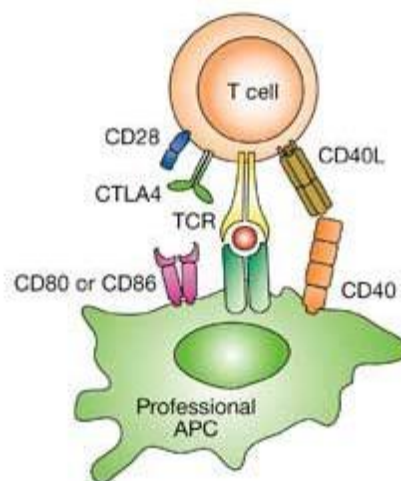
2.3.1 Τ κυτταρικός υποδοχέας

Η απόκριση των Τ κυττάρων χαρακτηρίζεται από αντιγονοειδικότητα. Αυτή η αντιγονοειδική φύση τους αντικατοπτρίζει την ύπαρξη ενός ειδικού υποδοχέα επιφανείας. Ο Τ κυτταρικός υποδοχέας (TCR) εντοπίζεται στη μεμβράνη των κυττάρων και συνίσταται από δύο αλυσίδες (α , β), κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από ένα σταθερό (C_α ή C_β) και ένα μεταβλητό (V_α ή V_β) τμήμα. Ο TCR απαντάται επίσης στην άλλη ετεροδιμερή μορφή του, την γδ. Η τεράστια ποικιλομορφία που παρουσιάζει επιτυγχάνεται με αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων V_β , D_β και J_β και των V_α και J_α που κωδικοποιούν τη μεταβλητή περιοχή της β αλυσίδας και τη μεταβλητή περιοχή της α αλυσίδας του TCR αντίστοιχα [46]. Χαρακτηριστικό του υποδοχέα, πέραν της ποικιλομορφίας του, είναι η ικανότητά του να αναγνωρίζει και να προσδένεται μόνο με αντιγόνο συζευγμένο με MHC τάξης I ή II, περιορίζεται, δηλαδή, από το σύμπλεγμα MHC, ενώ για την ενεργοποίηση των κυττάρων απαραίτητο είναι το επικουρικό μόριο CD3, το οποίο συνδέεται με τον TCR δημιουργώντας το σύμπλοκο TCR-CD3 (Εικόνα 5) και συμμετέχει στη μεταγωγή του μηνύματος [47].



Εικόνα 5. Σχηματικό διάγραμμα του συμπλόκου TCR-CD3. Το σύμπλεγμα CD3 αποτελείται από το ομοδιμερές ζζ και από τα ετεροδιμερή γε και δε. Στις κυτταροπλασματικές ουρές των αλυσίδων του CD3 σημειώνεται η ακολουθία ITAM, απαραίτητη για τη μεταγωγή του μηνύματος. | *Immunology, 5th Edition (2002)*

Άλλα απαραίτητα μόρια που εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη είναι οι συνυποδοχείς CD4 και CD8, οι οποίοι μάλιστα κατηγοριοποιούν τα T κύτταρα σε CD4 θετικά (CD4+) ή CD8 θετικά (CD8+) ανάλογα με τον υποδοχέα που εκφράζουν. Τα CD4+ T κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται από μόρια MHC II και λειτουργούν κυρίως ως βοηθητικά ενώ τα CD8+ T κύτταρα από μόρια MHC I και λειτουργούν κυρίως ως κυτταροτοξικά. Άλλα επικουρικά μόρια κατά την αντιγονοπαρουσίαση και μετάδοση του μηνύματος είναι το CD28, το LFA-1, το CTLA-4 κ.ά. [48]–[50] (Εικόνα 6).

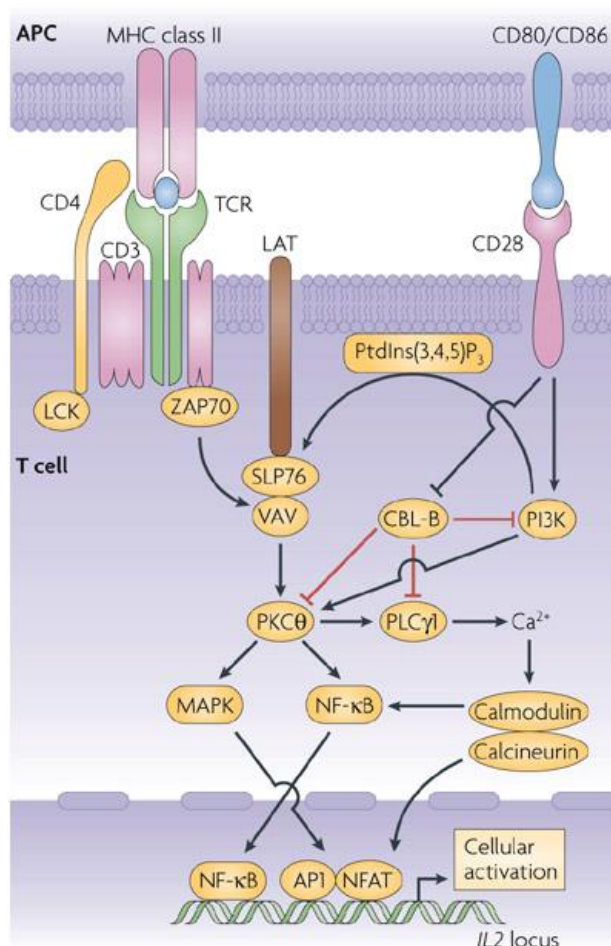


Εικόνα 6. Αντιγονοπαρουσίαση. Απλοποιημένη απεικόνιση της αλληλεπίδρασης "επαγγελματικού" αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (APC) με T λεμφοκύτταρο (T cell) κατά την αντιγονοπαρουσίαση. Με διάφορα χρώματα φαίνονται τα σημαντικότερα επικουρικά μόρια. | *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2 (2006)

2.3.1.1 Σηματοδότηση μέσω TCR-CD3

Μετά την αλληλεπίδραση T κυττάρου με ένα APC κύτταρο και την στρατολόγηση των απαραίτητων συνδιεγερτικών μορίων, η σηματοδότηση ξεκινά με την επιστράτευση και ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (protein tyrosine kinase, PTK) της οικογένειας των Src, Syc και Tec. Τα μοτίβα ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif) των κυτταροπλασματικών ουρών του συμπλόκου TCR-CD3 φωσφορυλιώνονται από PTK Src (συγκεκριμένα από την Lck, μέλος της οικογένειας των Src, ιστοειδική για τα T κύτταρα [51]) και αυτή η φωσφορυλίωση επιτρέπει την πρόσδεση της ZAP70 στα ITAMs. Η ZAP70 είναι μία PTK της οικογένειας των Syc PTK [52]. Η προσδεμένη μέσω των SH2 περιοχών της ZAP70 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται φωσφορυλιώνοντας με τη σειρά της μια σειρά υποστρωμάτων όπως οι πρωτεΐνες-προσαρμογείς LAT (linker of activated T cells) και SLP-76 (SH-2 domain containing lymphocyte protein of 76kD) [53]. Αυτές οι πρωτεΐνες-προσαρμογείς επιτρέπουν τον σχηματισμό δομών για την πρόσδεση και καθοδήγηση μορίων προς συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές περιοχές με τελικό σκοπό την πυροδότηση διάφορων σηματοδοτικών οδών συνδέοντας έτσι τον TCR με το βασικό μονοπάτι των Ras και Rho GTPασών (GTPases), τον μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης (μονοπάτι κινασών

σερίνης/θρεονίνης PKC και PI3K και έλεγχος επιπέδων ασβεστίου) [54], [55]. Η σηματοδότηση μέσω TCR-CD3 κατά την διέγερση ενός T κυττάρου αναπαρίσταται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Σηματοδότηση μέσω TCR-CD3 και καταρράκτες μηνυμάτων κατά τη διέγερση CD4+ T κυττάρου. Στο σχήμα, τελικός αποδέκτης είναι το γονίδιο της IL-2. | Nature Reviews Immunology (2007)

2.3.1.1.1 MAPK: Μονοπάτι των Ras/Raf/MEK/Erk

Η σηματοδοτική οδός των MAP κινασών (mitogen activated protein kinase, MAPK) ανήκει στα πιο αρχέγονα μονοπάτια σηματοδότησης των κυττάρων. Απαντάται σε όλους τους ευκαρυώτες και ρυθμίζει θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση και η απόπτωση. Η οργάνωση του μονοπατιού περιλαμβάνει μια G-πρωτεΐνη που λειτουργεί άνωθεν τριών κινασών: την MAPK κινάση

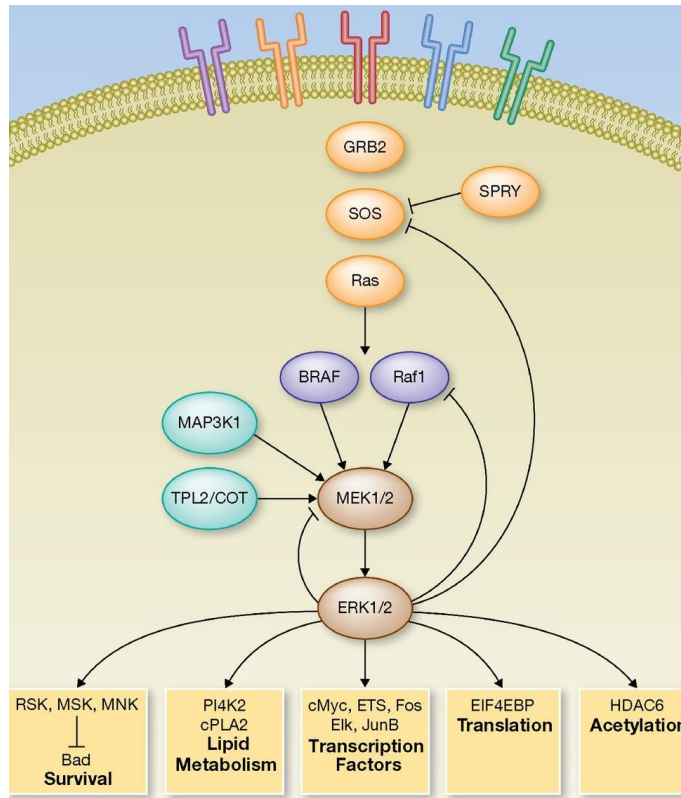
κινάση (MAPKKK) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια MAPK κινάση (MAPKK), η οποία τελικά ενεργοποιεί μια MAP κινάση (MAPK). Αυτή η διάταξη εξασφαλίζει τόσο την ενίσχυση της έντασης του αρχικού σήματος όσο και τον βέλτιστο έλεγχο της σηματοδότησης (κινητική, διάρκεια και έκταση του σήματος) μέσω αλληλεπιδράσεων σε κάθε επίπεδο μετάδοσης [56].

Το μονοπάτι των Ras/Raf/MEK/Erk ξεκινά με τα πρωτο-ογκογονίδια Ras και Raf κι εμπλέκεται σε βασικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική επιβίωση. Τα περισσότερα από αυτά τα σήματα ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες Ras ανταλλάσσοντας GDP με GTP μετατρέποντας τις Ras στην ενεργή τους μορφή. Η ενεργοποίηση των Ras διαμεσολαβείται από παράγοντες GEFs (guanine nucleotide exchange factors, GEFs), όπως ο παράγοντας SOS, που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη κι εντοπίζονται κοντά στις Ras. Ενεργές Ras προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε Raf κινάσες, γεγονός που οδηγεί στη μετατόπισή τους στην κυτταρική μεμβράνη και στη μετέπειτα ενεργοποίησή τους. Οι Raf κινάσες είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και έχουν κάτωθεν στόχο την κινάση MEK. Η MEK ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση σε δύο κατάλοιπα σερίνης ενώ η ίδια ανήκει στη σπάνια κατηγορία των κινασών «διπλής ειδικότητας» καθώς μπορεί να ενεργοποιήσει κινάσες φωσφορυλιώνοντάς τις τόσο σε κατάλοιπα θρεονίνης όσο και τυροσίνης. Υποστρώματα της MEK είναι οι κινάσες Erk1 και 2 (αποκαλούνται επίσης p44 και p42 MAPK αντίστοιχα) τις οποίες φωσφορυλιώνει σε μοτίβο Thr-Glu-Tyr. Περισσότερα από 50 μόρια-στόχοι έχουν περιγραφεί για τις Erk1/2 από πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού έως ένζυμα, άλλες κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες [57]–[59]. Η επιλογή και ο έλεγχος του εκάστοτε υποστρώματος εξαρτάται από πολλές παραμέτρους που περιλαμβάνουν τον τύπο του κυττάρου, την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση που καθιστά κάποιους στόχους μη προσβάσιμους κ.ά. [60] (Εικόνα 8).

2.3.1.1.1.1 Ρόλος Erk1/2 στη βιολογία των T κυττάρων

Η σημασία της σηματοδοτικής οδού των Erk1/2 σε όλα τα στάδια της ζωής των T λεμφοκυττάρων και γενικότερα στην εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έχει αποδειχθεί σε πληθώρα ερευνών. Σε πειράματα όπου έχει ανασταλεί η ενεργοποίηση της Erk1/2 *in vitro* ή έχει εξαλειφθεί *in vivo* η έκφραση του γονιδίου της σε

ποντικούς, έχειδειχθεί ότι η ενεργοποίηση και η κινητική της ενεργότητας της Erk1/2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της θετικής και αρνητικής επιλογής και της δέσμευσης προς CD4+ ή CD8+ κυτταρικής σειράς. Έλλειψη σε Erk1/2 οδηγεί σε μείωση του πληθυσμού των θυμοκυττάρων ικανών για συνέχιση της ωρίμανσης πέρα από το στάδιο των διπλά θετικών κυττάρων, συνοδευόμενη από δραματική μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά από ενεργοποίηση και σηματοδότηση μέσω του TCR. Επιπροσθέτως, η ισορροπία στη δέσμευση της κυτταρικής σειράς αποτελεί γεγονός εξαρτώμενο από την Erk1/2 καθώς παρατηρήθηκε ότι παρατεταμένη ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού οδηγεί τα κύτταρα προς CD4+ δέσμευση έναντι CD8+ [61]–[63]. Από την άλλη, ανεπαρκής ενεργοποίηση των Ras και Erk1/2 οδηγεί τα T κύτταρα σε ανέργια [64], [65] ενώ ενεργοποίηση της Erk1/2 μέσω του TCR απαιτείται και για τη διαφοροποίηση των περιφερειακών παρθένων T κυττάρων [66], [67]. Τέλος, η Erk1/2 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της έκφρασης διάφορων κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IL-4, IL-10 και IL-12 καθώς και του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor alpha, TNF-α) [68]–[70].



Εικόνα 8. Το μονοπάτι των Ras/Raf/MEK/Erk. Στα κίτρινα τετράγωνα φαίνονται ενδεικτικά κάτωθεν στόχοι της Erk1/2 καθώς και κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται (survival: επιβίωση, lipid metabolism: μεταβολισμός λιπιδίων, transcription factors: μεταγραφικοί παράγοντες, translation: μετάφραση, acetylation: ακετυλίωση). | American Association for Cancer Research (2014)

2.3.2 Κλωνική ανέργια

Όπως περιγράφηκε, κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς ειδικούς για εαυτά αντιγόνα εξαλείφονται κατά την διαδικασία την αρνητικής επιλογής στο θύμο. Παρόλα αυτά, για την παρεμπόδιση της αυτοδραστικότητας από κύτταρα που έχουν «διαφύγει» την αρνητική επιλογή αλλά και τη ρύθμιση και τον τερματισμό των ανοσοαποκρίσεων απαραίτητος είναι ένας μηχανισμός που ασκεί περιφερικό έλεγχο. Ο όρος «κλωνική ανέργια» περιγράφει την μη απόκριση των T λεμφοκυττάρων σε κυτταρικό επίπεδο και αποτελεί βασικό μηχανισμό διατήρησης της ανοσολογικής ανοχής, της αποφυγής, δηλαδή, αυτοανοσίας (πρόκληση αυτοάνοσων νοσημάτων) αλλά και ρύθμισης των ανοσοαποκρίσεων. Κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ανέργιας δεν πολλαπλασιάζονται (κλωνική επέκταση) ούτε διαφοροποιούνται και δεν εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως Ιντερλευκίνη 2 (βλ. §4.2.1). Η ανέργια δύναται να προκύψει ως

αποτέλεσμα απουσίας συνδιεγερτικού μηνύματος από κυτταροκίνες ή επικουρικά μόρια κατά την αντιγονοπαρουσίαση [71], [72].

2.3.3 Διαφοροποίηση-T κυτταρικοί υποπληθυσμοί

Τα Τ λεμφοκύτταρα μετά την έξοδο τους από το θύμο, κυκλοφορούν ως παρθένα (naïve) CD4+ ή CD8+ κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας έως ότου έρθουν σε επαφή με κάποιο αντιγόνο σε κάποιον λεμφαδένα. Μετά την αλληλεπίδραση τους με κάποιο σύμπλεγμα αντιγόνου-MHC, εξέρχονται την G_0 φάση του κύκλου και εισέρχονται στη φάση G_1 . Ακολουθεί πολλαπλασιασμός συνοδευόμενος από αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου της IL-2 και του υποδοχέα αυτής. Από τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα παράγονται διάφορα ανοσοδραστικά κύτταρα καθώς και κύτταρα μνήμης. Μια πρόσφατη μελέτη προσπαθεί να εξηγήσει την τεράστια ετερογένεια που παρατηρείται στους υποπληθυσμών των CD4+ και CD8+ Τ κυττάρων μεταξύ των ανθρώπων καθώς οι διάφοροι κυτταρικοί υποπληθυσμοί που θα προκύψουν από τα αρχικά θυμοκύτταρα εξαρτώνται από το στάδιο ζωής κατά οποίο «αποφασίστηκε» ποια εξελικτική πορεία θα ακολουθήσει το κάθε θυμοκύτταρο [73].

2.3.3.1 Δραστικά κύτταρα

Υπάρχουν τέσσερις τύποι δραστικών κυττάρων: τα βοηθητικά (T_H) CD4+ T_H1 , CD4+ T_H2 και τα νεώτερα αναγνωρισμένα T_H17 κύτταρα και τα CD8+ κυτταροτοξικά κύτταρα (T_C ή CTL). Χαρακτηριστικό των δραστικών λεμφοκυττάρων είναι η παραγωγή συγκεκριμένων για τον κάθε υποπληθυσμό (T_H1 , T_H2 , T_H17 , CTL) δραστικών μορίων, διαλυτών ή μεμβρανικών. Καθένα από αυτά τα μόρια επιτελεί ξεχωριστό ρόλο που περιλαμβάνει την καταστροφή του κυττάρου-στόχου, την ενεργοποίηση των μακροφάγων ή των Β λεμφοκυττάρων κ.ά.. Γίνεται αντιληπτό ότι τα μόρια αυτά ορίζουν και τις ξεχωριστές λειτουργίες των Τ υποπληθυσμών. Έτσι, τα CTLs ειδικεύονται στην αναγνώριση και λύση των μεταλλαγμένων κυττάρων του οργανισμού καθώς και στις αντιδράσεις απόρριψης μοσχεύματος [74]–[76]. Από τη άλλη πλευρά, τα CD4+ T_H κύτταρα ασκούν κυρίως βοηθητικές λειτουργίες μέσω έκκρισης κυτταροκινών. Τα T_H1 συμμετέχουν σε αντιδράσεις υπερευαισθησίας και φλεγμονής ενώ τα T_H2 επικουρούν τα Β κύτταρα και υποστηρίζουν αλλεργικές αντιδράσεις [77]–[79]. Τέλος, τα T_H17 μέσω δραστικών κυτταροκινών

συμμετέχουν σε αντιδράσεις έναντι μολυσματικών παραγόντων ενώ εμπλέκονται και στην πυροδότηση διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως και τα T_H1 [80].

2.3.3.2 Κύτταρα μνήμης

Ο υποπληθυσμός των T κυττάρων μνήμης προέρχεται τόσο από παρθένα όσο και από δραστικά T κύτταρα μετά την αναγνώριση του αντιγόνου. Ένα παρθένο κύτταρο δύναται να παράγει διάφορους τύπους T κυττάρων μνήμης που διαφέρουν τόσο φαινοτυπικά όσο και λειτουργικά. Τα κυριότερα επιφανειακά μόρια που εκφράζουν είναι τα CD45RO, CCR7, CD28 και CD95 βάσει των οποίων τα κύτταρα μνήμης κατηγοριοποιούνται σε διάφορους υποπληθυσμούς. Τα κύτταρα μνήμης έχουν μεγάλο χρόνο ζωής ενώ παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση (φάση G_0) μέχρι την επόμενη εισβολή του ίδιου αντιγόνου. Σε μια τέτοια περίπτωση, προκαλούν δευτερογενείς ανοσοαποκρίσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλή ένταση, ταχύτητα και διάρκεια (ανοσολογική μνήμη) [81]–[83].

2.3.3.3 Ρυθμιστικά T κύτταρα

Ένα διακριτός υποπληθυσμός των δραστικών T κυττάρων είναι τα αποκαλούμενα ρυθμιστικά κύτταρα (regulatory T cells, T_{reg}). Όταν περιγράφηκαν για πρώτη φορά, τους δόθηκε η ονομασία «κατασταλτικά» εξαιτίας των κατασταλτικών δράσεων που παρουσιάζουν. Φαινοτυπικά τα κύτταρα αυτά είναι $CD4^+ CD25^+$, η ανάπτυξή τους ρυθμίζεται στενά από τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 ενώ παρατηρήθηκε ότι καταστέλλουν *in vitro* τον πολλαπλασιασμό άλλων T πληθυσμών. Πλέον, έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η προσαρμοστική ανοσία, η ανοσολογική ανοχή και η ομοιόσταση ενώ διατάραξη της φυσιολογικής ανάπτυξης και λειτουργίας των T_{reg} κυττάρων ευθύνεται για πρόκληση αυτοανοσίας και φλεγμονωδών νοσημάτων [84]–[86]. Τέλος, έμφαση έχει δοθεί στη μελλοντική αξιοποίηση των κατασταλτικών δράσεων των ρυθμιστικών T κυττάρων στη θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων, καρκίνων κ.ά. [87]–[89].

2.3.4 Η μοίρα των T λεμφοκυττάρων

Σε αντίθεση με τα T κύτταρα μνήμης, τα δραστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μικρό χρόνο ζωής. Η επανειλημμένη ή η συνεχής αντιγονική διέγερση των περιφερικών T κυττάρων επάγει την έκφραση του μορίου θανάτου Fas καθώς και του προσδέτη του FasL

έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου. Αυτός ο *επαγόμενος από την ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος* που επιτελείται από το σύστημα Fas-FasL είναι ένας βασικός μηχανισμός διατήρησης της ομοιόστασης του οργανισμού. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται το μέγεθος της δεξαμενής των T κυττάρων και εξασφαλίζει την εξάλειψη από την περιφέρεια κυττάρων που επανειλημμένα αναγνωρίζουν εαυτά αντιγόνα.

Ο Fas και ο FasL ανήκουν σε μια οικογένεια συγγενών υποδοχέων/προσδετών μέλη της οποίας είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) και ο προσδέτης του (TNFR). Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τους προσδέτες πυροδοτεί την ενεργοποίηση κάτωθεν μορίων θανάτου (FADD) και εν συνεχεία δραστικών κασπασών οι οποίες διαδοχικά προκαλούν έναν σηματοδοτικό καταρράκτη με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση. Άλλοι οδοί επιτέλεσης κυτταρικού θανάτου στα λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας Bcl-2 (μιτοχονδριακός θάνατος) ή την επιστράτευση του κυτοχρώματος c και του μορίου Araf-1 κ.ά. [90], [91].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ERF

3.1 Οικογένεια *Ets* γονιδίων

Η οικογένεια των *Ets* γονιδίων αποτελείται από 28 μέλη στον άνθρωπο και 27 στον ποντικό. Οι πρωτεΐνες *Ets* χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του DNA DBD (DNA binding domain), η οποία αποτελείται από 85 αμινοξέα και είναι χαρακτηριστική για την οικογένεια. Αναγνωρίζουν το μοτίβο 5'-GGAA/T-3' σε αλληλουχίες υποκινητών ή ενισχυτών και προσδένονται στην περιοχή EBS (ETS binding site) συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Το *Ets1* ήταν το πρώτο γονίδιο της οικογένειας που αναγνωρίστηκε ενώ άλλα μέλη αποτελούν τα γονίδια *Ets2*, *Erg*, *Elk1*, *Sap1*, *PEA3*, *PU.1*, *Fli1*, *Pok/Yan*, *Etv1* κ.ά.. Η έκφρασή τους ποικίλει στους διάφορους ιστούς ενώ οι πρωτεΐνες *Ets1* και *Ets2* παρουσιάζουν την οικουμενικότερη έκφραση σε όλους τους ιστούς (αναφέρονται συχνά και ως κυρίαρχα μέλη της οικογένειας). Τα *Ets* γονίδια αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες και συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης των Ras/Raf/MEK/ERK (βλ. §2.3.1.1.1..) αποτελώντας κυρίως θετικούς ρυθμιστές της μεταγραφής συμβάλλοντας στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά και στην ογκογένεση [92], [93] ενώ ορισμένα μέλη έχουν ταυτοποιηθεί ως αρνητικοί ρυθμιστές της μεταγραφής (μεταγραφικοί καταστολείς) [94].

3.1.1 Ρόλος των *Ets* γονιδίων στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων

Όπως ήδη περιγράφηκε εκτενώς, η ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία των θυμοκυττάρων καθώς και των μετέπειτα CD4+ και CD8+ κυττάρων ελέγχονται από μία πληθώρα ενδοκυττάρων και εκκρινόμενων παραγόντων, σηματοδότηση κυτταροκινών καθώς και από διάφορους μεταγραφικούς και επιγενετικούς παράγοντες. Μεταγραφικοί παράγοντες-μέλη της οικογένειας των *Ets* γονιδίων αποτελούν εν δυνάμει ρυθμιστές αυτών των διαδικασιών [95]. Στα πρώιμα T θυμοκύτταρα, τα *Ets1* και *Ets2* παραμένουν σιωπηλά. Αντίθετα, εκφράζονται άλλα μέλη της οικογένειας των *Ets* γονιδίων, όπως τα *GABPA*, *Fli1*, *Elf1* και άλλα μέλη των υποοικογενειών των *Elf*, *Elk*, και *Etv* ενώ κατά τη DN φάση εκφράζονται τα *Erg*, *Etv6*, *Elk3* και *PU.1*. Κατά το στάδιο, όμως, της CD4+ ή CD8+ δέσμευσης, η έκφραση των *Ets1* και *Ets2* τους αυξάνεται δραματικά με το *Ets2* να φτάνει στα μέγιστα επίπεδα κατά την DP. Στα πιο ώριμα κύτταρα η έκφραση μειώνεται [96]. Η

έκφραση του *Ets1* είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των α, β T κυττάρων και της σωστής λειτουργίας του προ-TCR καθώς ποντικοί με ανενεργό *Ets1* στο θύμο παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα DP θυμοκυττάρων [97]. Η έκφραση του *Ets2* είναι κρίσιμη για τα κύτταρα στη φάση DN2 και DN3 καθώς έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση ανενεργού μεταλλάγματός του οδηγεί σε ατελή ανάπτυξη των θυμοκυττάρων κατά το στάδιο DN2 και DN3 αυξάνοντας το ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων. Διαγονιδιακοί ποντικοί που υπερεκφράζουν μια συνεχώς ανενεργή μορφή του *Ets2* παρουσιάζουν μικρότερο θύμο αδένος σε βάρος και μέγεθος και μικρότερο αριθμό θυμοκυττάρων. Επίσης, ο αριθμός των θυμοκυττάρων της DN1 φάσης εμφανίστηκε διπλάσιος ενώ αντίθετα ο αριθμός των DN2 θυμοκυττάρων μειώθηκε σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ποντικούς. Διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στον αριθμό των DN3 θυμοκυττάρων καθώς βρέθηκε να υποτετραπλασιάζεται ενώ παράλληλα τα DN4 θυμοκύτταρα αυξήθηκαν. Παράλληλα το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων βρέθηκε αυξημένο [98]. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν τη σημασία του *Ets2* κατά την ωρίμανση καθώς επάγει τη μετάβαση των θυμοκυττάρων στις φάσεις DN2 και DN3.

3.1.2 Συμμετοχή των *Ets* στις λειτουργίες/διαφοροποίηση των T κυττάρων

Ο ρόλος των *Ets* γονιδίων δεν περιορίζεται στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων καθώς συνεχίζουν να αποτελούν καίριους ρυθμιστές της λειτουργίας των διαφοροποιημένων T κυττάρων. Ειδικά το *Ets1* τελεί σημαντικό ρόλο τόσο στα βοηθητικά όσο και στα δραστικά T κύτταρα. Αναφορικά με τον υποπληθυσμό των βοηθητικών T_H κυττάρων, το *Ets1* προωθεί τη διαφοροποίηση των T_H1 κυττάρων μέσω θετικής ρύθμισης του παράγοντα p-STAT4 [99]. Επιπροσθέτως, αναστέλλει την έκφραση της IL-10 [100] ενώ επάγει την έκφραση της IFN- γ και της IL-2 μέσω αλληλεπίδρασης με τον NFAT [99], [101]. Αναφορικά με τα T_H2 κύτταρα, πειράματα έχουν δείξει ότι το *Ets1* συμμετέχει στη θετική ρύθμιση διάφορων κυτταροκινών απαραίτητων για την T_H2 διαφοροποίηση όπως οι IL-4, IL-5 και IL-13 [95], [102]. Στον αντίποδα της επαγωγής της διαφοροποίησης των υποπληθυσμών που αναφέρθηκαν βρίσκονται τα T_H17 κύτταρα η διαφοροποίηση των οποίων φαίνεται να προωθείται σε κυτταρικά μοντέλα με έλλειψη σε *Ets1* [103]. Επιπροσθέτως, η έκφραση του *Ets1* αναστέλλει και την παραγωγή κυτταροκινών από τα T_H17 κύτταρα όπως η IL-17 [95]. Τέλος, πειράματα έδειξαν ότι το *Ets1* ρυθμίζει θετικά τη διαφοροποίηση και

λειτουργία των T ρυθμιστικών κυττάρων [95], [104]. Άλλο *Ets* γονίδιο που επάγει τη διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων είναι το *Etv5* ενώ τα *GABRA* και *PU.1* συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των Th2 κυττάρων με το *PU.1* να ρυθμίζει την έκφραση και της IL-10 [95].

Αναφορικά με τα κυτταροτοξικά T κύτταρα, το *Ets1* φαίνεται να επάγει τη διαφοροποίησή τους μέσω θετικής ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *Runx3* αλλά και της επαγωγής της έκφρασης της IL-12 [95], [105] ενώ θετικός ρυθμιστής είναι και το *Fli1* [95]. Στον αντίποδα, το *Elf4* δρα ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό των CD8+ κυττάρων [95].

3.1.3 Συμμετοχή των *Ets* σε ασθένειες τους ανοσοποιητικού

Εξαιτίας της υψηλής έκφρασης των *Ets1* και *Ets2* στα λεμφοκύτταρα, ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία των λεμφοκυττάρων αποτελούν πεδίο έντονης έρευνας τα τελευταία χρόνια. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της *Ets1* σχετίζεται με τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE) και την πολλαπλή σκλήρυνση (MS), δύο κοινά αυτοάνοσα νοσήματα. Επιπροσθέτως, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν τη συμμετοχή του *Ets1* σε διάφορους καρκινικούς όγκους και λεμφώματα μέσω θετικής ρύθμισης της έκφρασής του ή διατηρώντας τα κύτταρα σε μια συνεχή αδιαφοροποίητη κατάσταση, αντίστοιχα [106]. Έως τώρα δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν την άμεση εμπλοκή του *Ets2* σε νοσήματα του ανοσοποιητικού συστήματος. Διάφορα ευρήματα, όμως, προτείνουν τη συμμετοχή του *Ets2* σε άλλες ασθένειες όπως το σύνδρομο Down και ασθένεια Alzheimer's καθώς και σε καρκίνο του προστάτη και του μαστού [107] και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που συνοδεύουν διάφορους καρκίνους [108]–[110]. Τέλος, διάφορα μέλη της οικογένειας των *Ets* γονιδίων εμπλέκονται στον καρκίνο και τη μετάσταση [107].

3.2 Μεταγραφικός καταστολέας ERF

3.2.1 Γονιδιακή οργάνωση και πρωτεΐνη

Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF (*Ets2* repressor factor, ERF), που απομονώθηκε εξαιτίας της πρόσδεσής του με τον υποκινητή του γονιδίου *Ets2*, αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας των *Ets* γονιδίων που ταυτοποιήθηκε με κατασταλτικές ιδιότητες σε θηλαστικά [111]. Το γονίδιο του *ERF* αποτελείται από 4 εξώνια σε μια γονιδιακή περιοχή

εύρους 10 kb. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.1 ενώ στο γονιδίωμα των ποντικών στο χρωμόσωμα 7 με 90% ομολογία ανάμεσα στα δύο είδη σε επίπεδο γονιδίου και πιθανόν με κοινά γονίδια ως μεταγραφικούς στόχους [112]. Η μοναδική ομοιότητα που παρουσιάζει με τα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας *Ets* είναι μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης με το DNA (DNA binding domain) με ποσοστό ομολογίας 50-70%, ενώ παρουσιάζει τη μέγιστη ομολογία με τα μέλη της υποοικογένειας *Erg*. Περιέχει, επίσης, μια διακριτή περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης μέσω της οποίας επιτελεί μεταγραφική καταστολή χωρίς, ωστόσο, κάποιο αναγνωρισμένο μοτίβο που να υποδηλώνει το μηχανισμό λειτουργίας του [94]. Έως σήμερα δεν έχει αναγνωρισθεί κάποια άλλη ομοιότητα μεταξύ της αλληλουχίας του *ERF* και άλλων γονιδίων εκτός της οικογενείας των *Ets*.

Στον άνθρωπο, το mRNA του *ERF*, μεγέθους 2.7 kb, κωδικοποιεί μια σταθερή φωσφοπρωτεΐνη 548 αμινοξέων μεγέθους 75 kDa (έναντι της πρωτεΐνης του ποντικού των 551 αμινοξέων), με χρόνο ημιζωής τουλάχιστον 24 ώρες, που επιδεικνύει δραστικότητα ισχυρής μεταγραφικής καταστολής σε υποκινητές που περιέχουν περιοχή πρόσδεσης *ets* (*ets-binding site*, EBS). Μεταξύ των αμινοξέων 200-400, περιέχει μία κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνες με πολλαπλές πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης τόσο από MAP όσο και Cdc2 κινάσες (εφτά και τρεις θέσεις, αντίστοιχα). Η περιοχή πρόσδεσης με το DNA βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ η περιοχή μεταγραφικής καταστολής στο καρβοξυτελικό άκρο αυτής [111]–[114] (Εικόνα 9. α).

3.2.2 Λειτουργία του *ERF*: *in vitro* και *in vivo* καταστολέας

Η κύρια λειτουργία του *ERF* στον κυτταρικό κύκλο είναι απόρροια της ιδιότητάς του ως μεταγραφικός καταστολέας και η δράση του επεκτείνεται σε διάφορα συστήματα του οργανισμού από τα αρχικά στάδια της ιστικής διαφοροποίησης. Παράλληλα έχει αναφερθεί η συμμετοχή του *ERF* σε διάφορες ασθένειες καθιστώντας τον σημαντικό ενεργό ρυθμιστή της φυσιολογίας των κυττάρων. Η δράση του περιγράφεται λεπτομερώς στις παραγράφους που ακολουθούν.

Ο *ERF* δρα ως άμεσος μεσολαβητής τόσο μιτογόνων όσο και ανασταλτικών σημάτων. Η κύρια λειτουργία του *ERF* συνίσταται στην αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου καθελώνοντας τα κύτταρα στη φάση G_1 μέσω καταστολής του πρωτοογκογονιδίου *c-Myc*.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το *c-Myc* προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική αύξηση. Ο ERF ασκεί έλεγχο στον κυτταρικό κύκλο συνδεδεμένος άμεσα με τον υποκινητή του *c-Myc* καταστέλλοντας την μεταγραφή του με τρόπο εξαρτώμενο των παραγόντων E2F 4 και 5. Μάλιστα, το μόριο αυτό αποτελεί το πρώτο γονίδιο-στόχο του ERF που ταυτοποιήθηκε συνδέοντας για πρώτη φορά το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/MAPK με τη μεταγραφική ρύθμιση του *c-Myc* [115] (Εικόνα 9. b). Η κατασταλτική δράση του ERF περιλαμβάνει, επίσης, την παρεμπόδιση της ογκογένεσης που οφείλεται σε γονίδια *Ets* και *Fos* [111] και τον επαγόμενο μετασχηματισμό ινοβλαστών από το *Ras* σε *in vitro* πειραματικά συστήματα [116], όπως και στο ορμονικό σύστημα της προλακτίνης, όπου δρα ως πιθανός καταστολέας της ενεργότητας του γονιδίου της [113]. Τέλος, ο ERF επιστράτευει αποακετυλάσεις ιστονών, όπως την HDAC1 και αυτή η φυσική αλληλεπίδραση μεσολαβεί στην αναστολή του κύριου IE ιικού υποκινητή (MIEP) του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV) [117].

Σε *in vivo* μελέτες, ο Erf αποτελεί ρυθμιστή της οστεογένεσης μέσω της Ras/MAPK σηματοδότησης καθώς έχει βρεθεί ότι η μειωμένη έκφρασή του δημιουργεί κρανιακές παθήσεις σε ανθρώπους και ποντικούς [118]. Άλλη μελέτη της *in vivo* λειτουργίας του Erf περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων της τροφοβλάστης TCSs (trophoblast stem cells) προς συγκεκριμένη κατεύθυνση υποδηλώνοντας τον ρόλο του Erf στην αναπαραγωγή. Διαγονιδιακοί ποντικοί με ολική γονιδιακή εξάλειψη του Erf ήταν μη βιώσιμοι (θάνατος από τη δέκατη ημέρα της κύησης) λόγω μη διαφοροποίησης των TSCs και σοβαρής ανεπάρκειας στον πλακούντα με το τελικό στάδιο διαφοροποίησης των TCSs στο χόριο να εξαρτάται από τον Erf [119]. Άλλες *in vivo* δράσεις του Erf περιλαμβάνουν τη συμμετοχή του στην αποτελεσματική ωρίμανση των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς σε ώριμα ερυθροκύτταρα [120] αλλά και στη νευρωνική διαφοροποίηση που επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ RA (retinoic acid) δρώντας ως ρυθμιστής της εναλλαγής πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων [121].

Ο Erf επάγει τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω του EGR1 (Ets related gene 1), συνδέοντας έτσι το μονοπάτι Ras/MAPK με τη επιθηλιομεσεγχυματική μετάπτωση (EMT, epithelial-to-mesenchymal transition), μία βασική διεργασία κατά την εμβρυογένεση και τον καρκίνο κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα εκφυλίζονται και

μεταναστεύουν στους γειτονικούς ιστούς [122]. Άλλη έρευνα σε ανθρώπινα κύτταρα μαστικού αδένος έδειξε ότι ο άξονας EGF (epidermal growth factor)-Erk-ERF ελέγχει κατά κάποιο τρόπο τη μετανάστευση καθώς και γονίδια που την αναστέλλουν μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών που ευθύνονται για τη δέσμευση των κυττάρων κατά τη μετανάστευση [123].

Εκτός από την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση ως μηχανισμό ελέγχου του ERF από τις Erk (βλ. παρακάτω), στον καρκίνο του πνεύμονα έχει παρατηρηθεί ότι ο ERF αναστέλλεται από το microRNA, miR-7, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης. Αυτή η αναστολή του ERF που οφείλεται στην έκφραση του miR-7, η οποία επάγεται από τον EGFR και πραγματοποιείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/Erk/Myc [124]. Απώλεια λειτουργίας του Erf είτε λόγω σπάνιων γονιδιακών μεταλλάξεων είτε πιο συχνά λόγω ανταγωνισμού με το προϊόν του ογκογονιδίου TMPRSS2-Erg, οδηγεί σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων των ανδρογόνων και σε καρκίνο του προστάτη. Το ογκογονίδιο TMPRSS2-Erg προκύπτει μετά από σύντηξη του γονιδίου *Erg* (Ets related gene) και του υποκινητή του TMPRSS2, εξαιτίας μιας χρωμοσωμικής μετατόπισης, κοινής σε περισσότερους από το 50% όλων των καρκίνων του προστάτη [125]. Τέλος, σε ασθενείς με σάρκωμα EWING με παρόμοιες συντήξεις του *Erg*, προκαλείται κυτταρικός μετασχηματισμός που μπορεί να κατασταλεί από πρωτεϊνικά υβρίδια των Fli/ERF [126], [127].

3.2.3 Ρύθμιση του ERF

Η υποκυτταρική διαμερισματοποίηση αποτελεί συνηθισμένο τρόπο ελέγχου των κυτταρικών πρωτεϊνών. Τέτοια ιδιότητα παρατηρείται και στον ERF. Πιο συγκριμένα, έχειδειχθεί ότι ο βαθμός φωσφορυλίωσης του ERF συνδέεται στενά με τη θέση του στο κύτταρο. Όταν είναι αποφωσφορυλιωμένος εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ φωσφορυλιωμένος εντοπίζεται εκτός πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα. Ουσιαστικά, αυτό που συμβαίνει είναι μια συνεχής μετατόπιση του ERF μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και ο βαθμός φωσφορυλίωσής του καθορίζει τη θέση και την ενεργότητα αυτού. Η μετακίνηση του ERF στο κυτταρόπλασμα απαιτεί τη φωσφορυλίωση πολλαπλών καταλοίπων σε αντίθεση με την μετακίνηση στον πυρήνα που δεν φαίνεται να εξαρτάται

από την φωσφορυλίωση του, συνδέεται, όμως, με την ενεργότητα της Erk1/2 [114], [115], [128].

Πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων αποτελούν άμεσα ή έμμεσα υποστρώματα της κινάσης Erk1/2 και φωσφορυλιώνονται με χαρακτηριστικά μοτίβα φωσφορυλίωσης [129]. Ο ERF φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις και FXF μοτίβα με μεγάλη ειδικότητα από την Erk1/2 αλληλεπιδρώντας τόσο με την ενεργή όσο και με την ανενεργή τους κατάσταση. Στον ERF υπάρχουν συνολικά τέσσερα FXF μοτίβα, αλλά μόνο τα δύο από αυτά είναι αναγκαία για την Erk-ERF αλληλεπίδραση [128]. Οι κινάσες αυτές συνδέονται απευθείας με τον ERF και τον φωσφορυλιώνουν σε διάφορα κατάλοιπα οδηγώντας τον, έτσι, στο κυτταρόπλασμα. Η έξοδος του ERF από τον πυρήνα συνεπάγεται και την απενεργοποίησή του. Αυτή ακριβώς η φωσφορυλίωση από την Erk1/2 είναι που καθορίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ERF και κατ' επέκταση και την ενεργότητα αυτού ως μεταγραφικού καταστολέα [114].



Εικόνα 9. Δομή και μηχανισμός δράσης του ERF στον κυτταρικό κύκλο. α) Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης του ERF. Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι περιοχές που επιδεικνύουν αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες: ETS domain: κοινή για τα ETS γονίδια περιοχή πρόσδεσης σε υποκινητές άλλων γονιδίων, ERK interaction domain: περιοχή αλληλεπίδρασης με Erk, Repressor domain: περιοχή που προσδίδει στον ERF την ιδιότητα καταστολής. | *Nature genetics* (2013) β) Απλοποιημένο σχήμα που απεικονίζει την αρνητική ρύθμιση του c-Myc από τον Erf και την επακόλουθη αναστολή του κυτταρικού κύκλου (arrest). Απουσία Erk σηματοδότησης, ο Erf με E2Fs και Rb πρωτεΐνες προσδένεται στο c-Myc αναστέλλοντας την έκφρασή του (δεξιά). Ενεργή Erk συνεπάγεται την φωσφορυλίωση του Erf και τη μετατόπισή του στο κυτταρόπλασμα όπου καθίσταται ανενεργός (αριστερά). | *The Journal of Biological Chemistry* (2007)

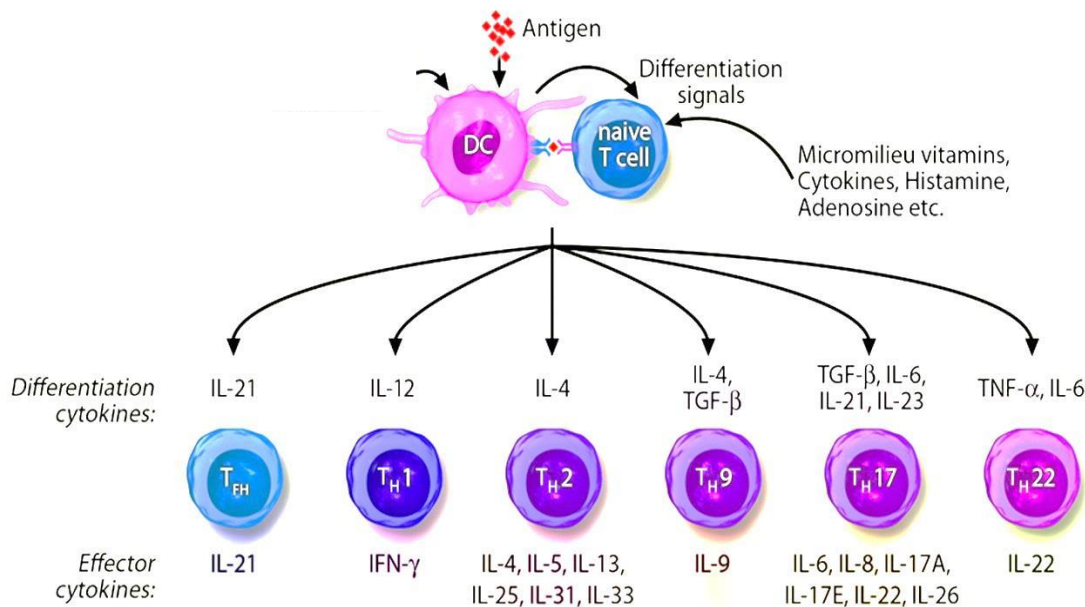
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

4.1 Ιντερλευκίνες

Οι κυτταροκίνες αποτελούν μια οικογένεια γλυκοζυλιωμένων ή όχι πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών, μικρού μοριακού βάρους (10-40 kDa), που εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα ως απάντηση σε μηνύματα κατά τις ανοσοαποκρίσεις και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Χαρακτηριστικό όλων των κυτταροκινών είναι ότι επιτελούν τη λειτουργία τους μέσω πρόσδεσης με υποδοχείς υψηλής συγγένειας και ειδικότητας στα κύτταρα-στόχους, Μπορούν να δράσουν αυτοκρινώς (στο ίδιο το κύτταρο που τις παρήγαγε), παρακρινώς (σε γειτονικά κύτταρα-στόχους) ή, πιο σπάνια, ενδοκρινώς (απομακρυσμένη δράση στο σύστημα). Επειδή συμμετέχουν σε μια πληθώρα λειτουργιών και συστημάτων, η απορρύθμισή της έκφρασής τους οδηγεί στην πυροδότηση διάφορων νοσηρών καταστάσεων γι' αυτό κι έχουν προταθεί ως πολλά υποσχόμενοι στόχοι διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες (κυτταροκίνες που ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση) αποτελούν διαγνωστικά εργαλεία με κλινική εφαρμογή ή συμμετοχή σε θεραπευτικά σχήματα [130].

Διαχωρίζονται σε οικογένειες ανάλογα με το βαθμό ομολογίας των αλληλουχιών τους και των αλυσίδων των υποδοχέων τους ή το είδος των λειτουργιών που εξυπηρετούν [131]. Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα των διαφορετικών ρόλων των ιντερλευκινών κατά την αντιγονοπαρουσίαση από δενδριτικό κύτταρο (DC) και διέγερση των Τ παρθένων κυττάρων: οι κυτταροκίνες διαφοροποίησης μαζί με άλλα σήματα διαφοροποίησης (differentiation signals) ή και άλλες κυτταροκίνες επιδρούν στο κύτταρο και το «οδηγούν» προς ξεχωριστές πορείες εξέλιξης. Οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων που προκύπτουν παράγουν και διαφορετικές κυτταροκίνες-τελεστές, ανάλογα με το στόχο του κάθε κυττάρου.



Εικόνα 10. Κυτταροκίνες κατά τη διαφοροποίηση των βοηθητικών T κυττάρων. Διαφοροποίηση διεγερμένου βοηθητικού T κυττάρου μετά από αντιγονοπαρουσίαση και επίδραση συγκεκριμένων κυτταροκινών διαφοροποίησης (differentiation cytokines) και μετέπειτα παραγωγή κυτταροκινών-τελεστών (effector cytokines) για συμμετοχή σε διαφορετικές λειτουργίες π.χ. σύνθεση αντισωμάτων, εξάλειψη ενδογενών παθογόνων, αλλεργική αντίδραση (βλ. κείμενο για λεπτομέρειες). | Τροποποιημένη από *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2011)

4.1.1 Ιντερλευκίνη-2

Η Ιντερλευκίνη-2 (Interleukin-2, IL-2) ή αυξητικός παράγοντας των T κυττάρων (T cell growth factor, TCGF) είναι μία από τις πρώτες ανθρώπινες κυτταροκίνες που αναγνωρίστηκαν πριν από περισσότερα από 35 χρόνια. Είναι μία από τις πιο εκτενώς μελετημένες κυτταροκίνες με ένα ευρύ φάσμα δράσεων που εκτείνεται σε όλες τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, από τη συμμετοχή στις ανοσοαποκρίσεις μέχρι τη ρύθμιση της ομοιόστασης.

Η IL-2 είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, σφαιρικής δομής, μοριακού βάρους 15.5 kDa. Τέσσερις αντιπαράλληλες α έλικες σχηματίζουν μια δομή απαραίτητη για τη λειτουργία της. Τέσσερα εξώνια που διαχωρίζονται από τρία εσώνια συνθέτουν το γονίδιο της IL-2, ενώ στο ανθρώπινο γονιδίωμα εδράζεται στο χρωμόσωμα 4. Τα ώριμα μετάγγραφα αποτελούνται από 1033 bp, ενώ η τελική πρωτεΐνη από 153 αμινοξικά κατάλοιπα [132].

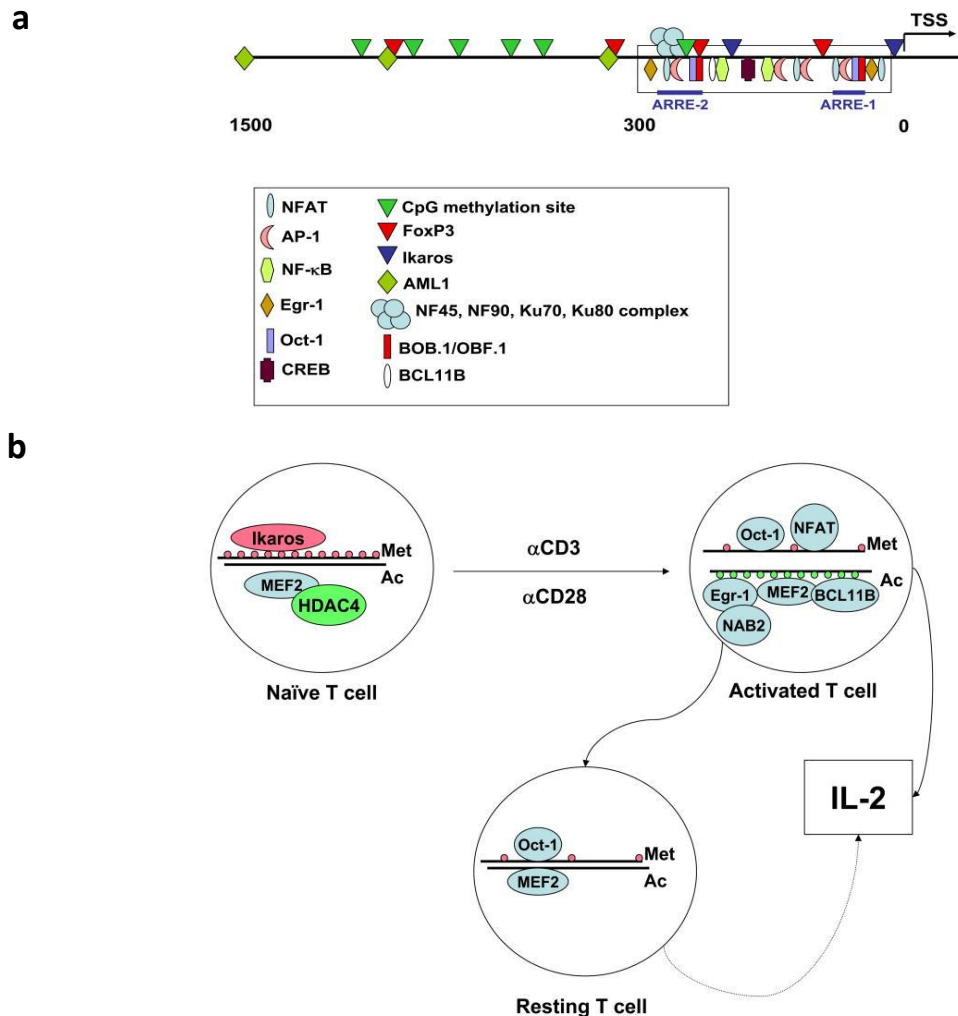
Παράγεται κυρίως από CD4+ και CD8+ κύτταρα ενώ σε μικρότερο βαθμό από NK κύτταρα και διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα [131], [133].

4.1.1.1 Μεταγραφικός έλεγχος της *IL-2*

Δύο είναι τα βασικά χαρακτηριστικά στην έκφραση της *IL-2*. Πρώτον, περιορίζεται στα Τ λεμφοκύτταρα, με λίγες εξαιρέσεις τα NK και τα δενδριτικά. Δεύτερον, απαραίτητη προϋπόθεση για την έκφρασή της είναι η διέγερση των Τ κυττάρων μέσω του υποδοχέα τους ή άλλων διεγερτικών σημάτων. Κύτταρα σε ηρεμία δεν παράγουν *IL-2*. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά υποδηλώνουν ότι το γονίδιο της *IL-2* υπόκειται σε έλεγχο κατά την διαφοροποίηση των Τ κυττάρων στο θύμο επιτρέποντας την παραγωγή κυττάρων με αποκλειστική ικανότητα απόκρισης της *IL-2* του σε διεγερτικά σήματα. Κατά τα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, πριν την αναδιοργάνωση των αλυσίδων του TCR, τα θυμοκύτταρα αποκτούν την ικανότητα έκφρασης *IL-2*, την οποία χάνουν αργότερα κατά την θετική και αρνητική επιλογή αλλά την επανακτούν ως ώριμα παρθένα κύτταρα [134].

Η έκφραση του γονιδίου της *IL-2* ρυθμίζεται πολύ αυστηρά. Εκτεταμένες μελέτες έχουν περιγράψει λεπτομερώς τον μεταγραφικό έλεγχο του γονιδίου που εντοπίζεται σε μια περιοχή του υποκινητή, 10 kb, όπου εντοπίζονται θέσεις υπερευαισθησίας σε DNase. Εκτός από την περιοχή του υποκινητή κι άλλες θέσεις ανοδικά κρίνονται απαραίτητες για την σωστή ανάπτυξη και επαγόμενη ιστοειδική έκφραση της *IL-2* (Εικόνα 11. α). Ένα σύνολο μεταγραφικών παραγόντων (όπως Oct, NF-κB, NFAT και AP-1) είναι παρόντες στα ανώριμα θυμοκύτταρα στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης. Καθώς τα θυμοκύτταρα μεταβαίνουν διαδοχικά στα επόμενα στάδια διαφοροποίησης αλλά και αργότερα κατά την ενεργοποίησή τους ως ώριμα κύτταρα, οι μεταγραφικοί παράγοντες εναλλάσσονται με αποτέλεσμα πληθώρα στοιχείων να εντοπίζονται στα διάφορα στάδια ζωής των κυττάρων αλλά και στις επιμέρους καταστάσεις (ηρεμία, ενεργοποίηση) στις οποίες αυτά απαντώνται [135], [136] (Εικόνα 11. b). Εκτός από τους μεταγραφικούς παράγοντες, και η δομή του γονιδίου ασκεί έλεγχο στην έκφραση της *IL-2*, με διαφορετική αρχιτεκτονική χρωματίνης (οργάνωση ιστονών) αλλά και DNA μεθυλίωσης ανάλογα με τα στάδια ανάπτυξης των κυττάρων επιτρέποντας, επάγοντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή του γονιδίου. Για παράδειγμα, καταστολή του γονιδίου παρατηρείται κατά την κλωνική ανέργια όπου καταστολείς όπως οι ZEB, CREM και ICER προσδένονται άμεσα στο *IL-2*

παρεμποδίζοντας την έκφρασή του. Η αδιατάραχτη ισορροπία μεταξύ ενεργοποιητών και καταστολέων του γονιδίου της IL-2 είναι υψίστης σημασίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης και των ειδικών T κυτταρικών ανοσοαποκρίσεων [134], [137].

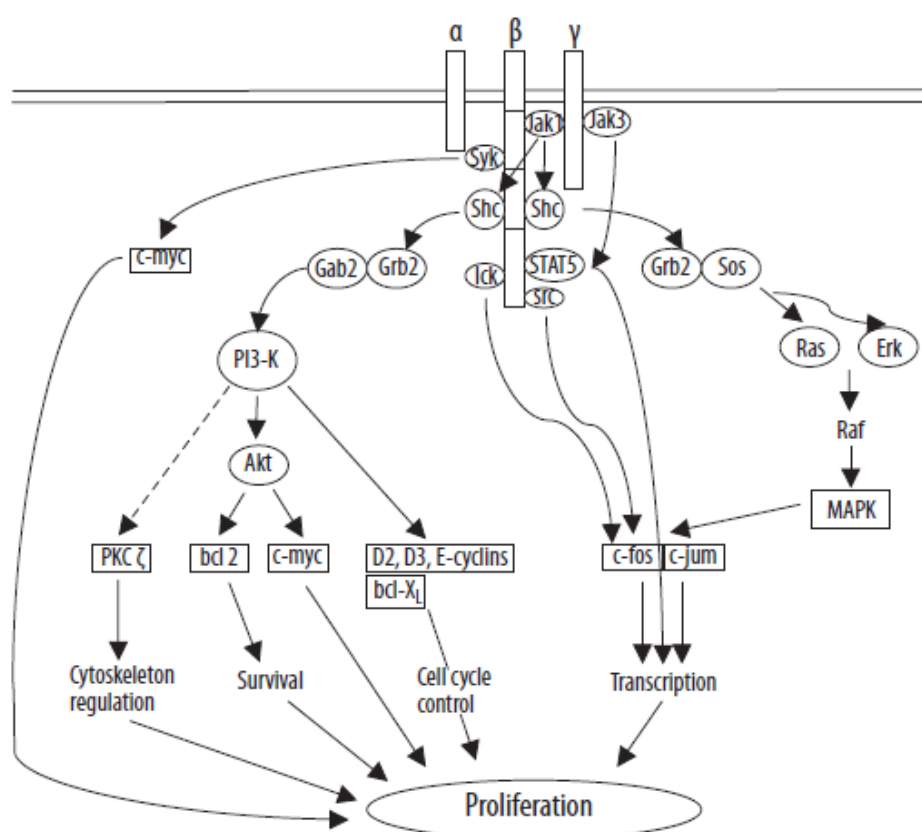


Εικόνα 11. Μεταγραφικός και επιγενετικός έλεγχος της έκφρασης της IL-2. α) Έλεγχος του γονιδίου IL-2 από πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων (ΜΠ). Οι περισσότεροι είναι προσδεδεμένοι στην περιοχή των 10 kb άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής (TSS) αλλά υπάρχουν σημαντικές ρυθμιστικές θέσεις πρόσδεσης ΜΠ ανοδικότερα. β) Διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της IL-2 στις διάφορες φάσεις ζωής του κυττάρου. Στα παρθένα T κύτταρα (resting T cell, κάτω στο σχήμα) οι παράγοντες Oct-1 και MEF2 επιτρέπουν την έκφραση της IL-2 η οποία επάγεται μόνο κατόπιν διέγερσης με αντί-CD3/28 και επακόλουθης δέσμησης παραγόντων όπως οι Egr-1, NAB2, NFAT και BCL11B (activated T cell, δεξιά). Αριστερά, τα παρθένα κύτταρα (naïve T cell) έχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο υποακετυλίωσης (πράσινο) και μεθυλίωσης (ροζ) στο οποίο συμμετέχει ο παράγοντας Ikaros. | Autoimmunity reports (2009)

4.1.1.2 Υποδοχέας της IL-2 και σηματοδότηση

Ο υποδοχέας της IL-2 (IL-2R) αποτελείται από 3 αλυσίδες: την ειδική για τον υποδοχέα αλυσίδα α IL-2R α (CD25, Tac, p55), την αλυσίδα β IL-2R β (CD122, p70) η οποία συμμετέχει επίσης στο σύμπλοκο του υποδοχέα της IL-15 (IL-15R) και την κοινή (παρούσα και σε άλλους υποδοχείς) αλυσίδα γ IL-2R γ (CD132). Ο συνδυασμός και των τριών υπομονάδων είναι απαραίτητος για να επιτευχθεί η υψηλής συγγένειας πρόσδεση ($K_d=10^{-11}$ M). Διαφορετικοί συνδυασμοί των επιμέρους υπομονάδων ($\beta+\gamma$, α) οδηγούν σε άλλες δύο μορφές του υποδοχέα χαμηλότερης, όμως, συγγένειας πρόσδεσης. Αξιοσημείωτα, η αλυσίδα α απαντάται και σε διαλυτή μορφή (sIL-2R α), χωρίς μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές, που παρόλα αυτά διατηρεί την ικανότητα να προσδένει IL-2 [138], [139]. Τα NK κύτταρα εκφράζουν τις υπομονάδες β και γ , ιδιότητα που τα καθιστά ικανά να δεσμεύουν την IL-2 με μέση συγγένεια και να ενεργοποιούνται από αυτήν.

Οι υπομονάδες IL-2R β/γ είναι υπεύθυνες για τη μετάδοση του σήματος καθώς περιέχουν τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης καθώς και το μοτίβο WSXSW. Η πρόσδεση της IL-2 στον υποδοχέα προκαλεί τον ετεροδιμερισμό των κυτταροπλασματικών περιοχών του υποδοχέα ενεργοποιώντας τις κινάσες τυροσίνης Jak1 και 2, μέλη της οικογένειας των Janus κινασών. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης του υποδοχέα μετατρέποντάς τα, έτσι, σε στόχους (σημεία πρόσδεσης) μορίων και συμπλόκων βασικών σηματοδοτικών οδών του κυττάρου όπως τα μονοπάτια των MAPK, STAT και PI3K [132], [139]. Ανεξάρτητα απ' το ποιο μονοπάτι ενεργοποιείται, τελικοί στόχοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σηματοδότηση μέσω IL-2R. Τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η ρύθμιση του κυτταροσκελετού (cytoskeleton regulation), και η επιβίωση (survival), ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου (cell cycle control) και η μεταγραφή (transcription). Κοινό τελικό αποτέλεσμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (proliferation). Σε κυκλικά πλαίσια φαίνονται οι κινάσες, ενώ σε ορθογώνια οι μεταγραφικοί παράγοντες και τα γονίδια που συμμετέχουν. | *Medical Science Monitor* (2008)

4.1.1.3 Βιολογικές λειτουργίες

Η πρώτη ιδιότητα που αποδόθηκε στην IL-2 ήταν η επαγωγή του *in vitro* πολλαπλασιασμού των T κυττάρων επάγοντας τη μετάβαση από τη φάση G₁ στη φάση S του κύκλου. Σε συμφωνία με την *in vitro* λειτουργία της, προτάθηκε ότι η IL-2 είναι πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και *in vivo* στην κυτταρική επέκταση που προκαλείται από την παρουσία ενός αντιγόνου. Καθώς η IL-2 παράγεται κυρίως από διεγερμένα T λεμφοκύτταρα και πιο συγκεκριμένα, από διεγερμένα CD4⁺ βοηθητικά T κύτταρα, τουλάχιστον ένα μέρος αυτής της «βοηθητικής» προς τα CD8⁺ T κύτταρα δράσης, αποδόθηκε στην IL-2. Έκτοτε, πολλές έρευνες πάνω στη λειτουργία της IL-2 έχουν

πραγματοποιηθεί. Αναφορικά με την θετική της δράση στον ανοσοποιητικό σύστημα, η IL-2 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λεμφοκυττάρων ενώ επάγει τη διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων σε δραστικά και κύτταρα μνήμης. Άλλα πειράματα έδειξαν ότι η IL-2 αποτελεί σημαντικό παράγοντα ο οποίος επιτρέπει την παραγωγή T κυττάρων μνήμης, τα οποία είναι ικανά να υποβληθούν σε δευτερογενή πολλαπλασιασμό. Επιπροσθέτως, συμμετέχει στη διαφοροποίηση των CD4⁺ κυττάρων προς τους διάφορους υποπληθυσμούς των βοηθητικών κυττάρων (T_H1, T_H2, T_H17) [140], ενώ επάγει την έκκριση άλλων κυτταροκινών όπως η IL-4 και η Ιντερφερόνη-γ (IFN-γ). Τέλος, *in vitro* και σε ορισμένες περιπτώσεις και *in vivo*, η IL-2 έχει την ικανότητα να υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που βρίσκονται σε ανέργια, υπερνικώντας το εμπόδιο που τον καθιστά αδύνατο [132], [139]–[141].

Ποικίλες λειτουργίες της IL-2 βρίσκονται στον αντίποδα αυτών που περιγράφηκαν. Έτσι, παρά την υποστηρικτική της δράση στην κυτταρική επιβίωση, η IL-2 μπορεί, επίσης, να προωθήσει τον επαγόμενο από ενεργοποίηση T κυτταρικό θάνατο (activation-induced cell death, AICD). Πιο συγκεκριμένα, η IL-2 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση ενός πληθυσμού αντιγονο-ειδικών T κυττάρων, δηλαδή στην απόπτωσή τους, μετά το πέρας της ανοσιακής απόκρισης [132], [139], [141].

Άλλες λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στην IL-2 σχετίζονται με την φλεγμονή. Πιο συγκεκριμένα, η IL-2 αναστέλλει την παραγωγή της IL-17 και ασκεί την ανοσοκατασταλτική της δράση διεγείροντας την παραγωγή και ομοιόσταση των T ρυθμιστικών κυττάρων, κάτι που καταδεικνύει τη σημασία αυτής κατά την ανοσολογική ανοχή και τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος [133], [139], [140]. Τέλος, εκτός από τα T κύτταρα ως αποδέκτες της δράσης της, η IL-2 επενεργεί στα B κύτταρα ως αυξητικός παράγοντας [142] ενώ αυξάνει την κυτταρολυτική ικανότητα των NK κυττάρων [143], [144]. Οι βασικές *in vitro* και *in vivo* ανοσορρυθμιστικές και ανοσοδιεγερτικές λειτουργίες της IL-2 παρουσιάζονται στην Εικόνα 13.

Τέλος, η IL-2 επιτελεί σημαντικό ρόλο στην βιολογία των T ρυθμιστικών κυττάρων. Τα T_{reg} βρίθουν υποδοχέων IL-2 στην επιφάνειά τους και εξαρτώνται από την παραγωγή IL-2 των ενεργοποιημένων T κυττάρων καθώς τα ίδια δεν παράγουν [145]. Η IL-2 είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τις κατασταλτικές ιδιότητες των T_{reg} [146],

[147]. Τέλος, ο λειτουργικός ρόλος της IL-2 κατά την ανοχή φαίνεται να διαμεσολαβείται μέσω αλληλεπιδράσεων με T_{reg} [85], [148].

4.1.1.4 IL-2 σε ασθένειες και διάγνωση

Απορρυθμισμένη έκφραση της IL-2 και/ή του υποδοχέα της επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στις ανοσοαποκρίσεις και οδηγεί στη διαταραχή της ομοιόστασης και της περιφερικής ανοχής. Στην κλινική πράξη αυτή η απορρύθμιση αποτελεί τον βασικό ύποπτο για πυροδότηση φλεγμονωδών αντιδράσεων, ασθενειών και αυτοάνοσων νοσημάτων όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, διαβήτης τύπου 1 και συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE). Σε άλλες περιπτώσεις δύναται να οδηγήσει σε διάφορους τύπους καρκίνων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως την T κυτταρική λευχαιμία ενηλίκων. Σε άλλες περιπτώσεις, όπως κατά τη μόλυνση με τον ιό του AIDS, η καταστολή της παραγωγής της IL-2 συμβάλλει στην παθογένεια της ασθένειας με το να βλάπτει την T_H1 διαμεσολαβούμενη ανοσία και την εξάλειψη του ιού [134], [140], [149].

Ο καίριος ρόλος της IL-2 στο ανοσοποιητικό σύστημα την καθιστά πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για διάφορες ασθένειες. Ανασυνδυασμένη IL-2 (recombinant, rIL-2) φάνηκε να έχει πιθανές αντι-καρκινικές ιδιότητες σε μοντέλα ποντικών με όγκους. Στον άνθρωπο, υψηλές δόσεις IL-2 χορηγούνται σε καρκίνους του νεφρού και μελανώματα με σημαντικά αποτελέσματα αλλά σε μικρό ποσοστό των ασθενών και με εμφάνιση παρενεργειών. Άλλα σύμπλοκα IL-2 έχουν δοκιμαστεί σε πειραματικά μοντέλα ποντικών για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου I, την πειραματική μυασθένεια gravis, την αρτηριοσκλήρυνση, για την αποφυγή απόρριψης δερματικών μοσχευμάτων, κατά τη λοίμωξη με διάφορους ιούς κ.ά. [150]–[153].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η IL-2 δεν ανιχνεύεται στο ανθρώπινο αίμα. Σε διάφορες περιπτώσεις όγκων έχει ανιχνευθεί αύξηση των επιπέδων της IL-2 σε συνδυασμό με τον υποδοχέα της. Έτσι, πολλές προσπάθειες στράφηκαν στην αξιοποίηση της έκφρασης του συμπλόκου IL-2/IL-2R ή της διαλυτής μορφής sIL-2Rα ως διαγνωστικό εργαλείο σε περιπτώσεις αιμοποιητικών (λευχαιμίες και λεμφώματα) και μη καρκίνων [132].



Εικόνα 13. Λειτουργίες της IL-2. In vitro και in vivo ρυθμιστικές και διεγερτικές λειτουργίες της IL-2 στο ανοσοποιητικό σύστημα. | Τροποποιημένη από EMBO reports (2007)

4.1.2 Ιντερλευκίνη-10

4.1.2.1 Η IL-10 στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η Ιντερλευκίνη-10 (Interleukin-10, IL-10) είναι μια πλειοτροπική, ανοσορρυθμιστική, αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη που πρωτοπεριγράφηκε ως προϊόν των T_H2 κυττάρων ικανό να αναστείλει τη σύνθεση άλλων κυτταροκινών στα T_H1 κύτταρα [154]. Η IL-10 παράγεται από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, B λεμφοκύτταρα καθώς και από διάφορους υποπληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων. Αποτελεί καίριο ρυθμιστή της ανοσιακής απόκρισης σε περιπτώσεις μολύνσεων από ιούς και άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, μύκητες, πρωτόζωα και έλμινθες, καθώς συμβάλλει στην αποτελεσματική καταστροφή του παθογόνου, ενώ παράλληλα εξασφαλίζει την έγκαιρη καταστολή αυτών των μηχανισμών [155]. Αξιοσημείωτα, έχει παρατηρηθεί αύξηση στα επίπεδα της IL-10 σε περιπτώσεις χρόνιας μόλυνσης όπως από τους ιούς HIV (human

immunodeficiency virus), HCV (hepatitis C virus) και έρπητοϊούς (herpes viruses) [156]–[158]. Δρα προστατευτικά σε διάφορες ασθένειες όπως το αλλεργικό άσθμα, αλλά και σε εντερικές και ηπατικές νόσους. Απορρυθμισμένη IL-10 σχετίζεται στενά με αυξημένη παθολογία του ανοσοποιητικού καθώς και με υψηλό κίνδυνο πρόκλησης αυτοάνοσων νοσημάτων [159]. Γίνεται, έτσι, εύκολα αντιληπτή η σημασία της τόσο στις ανοσοαποκρίσεις όσο και στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού [160].

4.1.2.2 Δράση και ρύθμιση IL-10

Η ανοσοκατασταλτική λειτουργία της IL-10 διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα της, ένα ετεροδιμερές μόριο (IL-10R1, IL-10R2) που εκφράζεται σε διαφορετικό βαθμό σε μία πληθώρα κυττάρων. Ωστόσο, απαντάται σε μεγαλύτερο βαθμό στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η πρόσδεση στον IL-10R ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι των JAK/STAT οδηγώντας σε σημαντικές αλλαγές στην έκφραση ανοσορρυθμιστικών γονιδίων, τα οποία με τη σειρά τους αναστέλλουν την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μορίων και μειώνουν την αντιγονοπαρουσίαση και την φαγοκυττάρωση. Παράλληλα, ενισχύει την έκφραση αντι-φλεγμονωδών μορίων όπως Ιντερλευκίνη-27 (IL-27), ο διαλυτός υποδοχέας του TNF-α (soluble TNF-α receptor) και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (IL-1RA) αλλά και τη δράση των T ρυθμιστικών κυττάρων καθώς και άλλων κυτταρικών πληθυσμών (π.χ. NK, B κύτταρα). Σε γονιδιακό επίπεδο, η IL-10 ελέγχεται από ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων όπως οι nuclear factor-kappa B (NF-κB), BLIMP1 και GATA3, η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HOX αλλά και επιγενετικών παραγόντων σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους [159], [161]. Η έκφραση της IL-10 ελέγχεται, όμως, και μετα-μεταγραφικά. Το mRNA της αποσυντίθεται γρήγορα ενώ τόσο η έναρξη όσο και ο τερματισμός της έκφρασής της ρυθμίζεται κυρίως μέσω του μονοπατιού των MAPK αλλά και μέσω microRNAs [161], [162].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

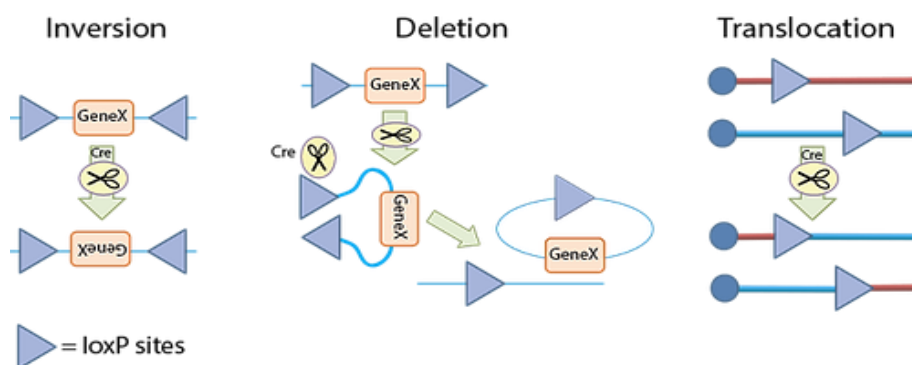
5.1 Γενετική μηχανική: Το σύστημα Cre/lox

Τα συστήματα τοποειδικού ανασυνδυασμού του DNA αποτελούν σημαντικά εργαλεία στην τεχνολογία των διαγονιδιακών ζώων. Χρησιμοποιούνται ευρέως και βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης *in vivo* και στη δημιουργία ζωικών πειραματικών μοντέλων ασθενειών του ανθρώπου. Ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα συστήματα τοποειδικού ανασυνδυασμού αποτελεί το σύστημα Cre/lox. Η καινοτομία αυτής της τεχνικής είναι ότι η έκφραση του γονιδίου της ρεκομπινάσης Cre μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση ενός ιστοειδικού υποκινητή. Επιτυγχάνεται, έτσι, ιστοειδική έκφραση της ρεκομπινάσης Cre με αποτέλεσμα την εξάλειψη του στοχευμένου γονιδίου (DNA που περικλείεται από *loxP*, συχνά αποκαλείται «floxed») στο συγκεκριμένο ιστό. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι σημαντικό ιδιαίτερα στη μελέτη γονιδίων των οποίων μια ενδεχόμενη γενική εξάλειψη θα είχε θανατηφόρο αποτέλεσμα στον οργανισμό ενώ παράλληλα εξασφαλίζει τη διερεύνηση των επιπτώσεων της απάλειψης του στοχευμένου γονιδίου ειδικά, στον υπό εξέταση ιστό. Τέλος, το σύστημα Cre/lox βρίσκει εφαρμογές και για την ιστοειδική ενεργοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου, του οποίου η γενικευμένη έκφραση μπορεί να είναι δυνητικά τοξική. Στην περίπτωση αυτή, εισάγεται μια μεταφραστική αλληλουχία λήξης της μετάφρασης περικλειόμενη από *loxP* σε ένα εσώνιο στην αρχή του γονιδίου. Αυτή η αλληλουχία λήξης αφαιρείται στον ιστό ενδιαφέροντος μετά από καθοδηγούμενη ιστοειδική έκφραση της Cre, ώστε να επιτραπεί η έκφραση του «τοξικού» γονιδίου μόνο στον συγκεκριμένο ιστό [163].

5.1.1 Η πρωτεΐνη Cre

Η οικογένεια των ιντεγκρασών (integrase family) αποτελείται από περισσότερα από 100 μέλη ρεκομπινασών και απαντάται σε Αρχαία, Ευβακτήρια, μιτοχόνδρια και ζύμες. Μέλος αυτής οικογένειας αποτελεί και η ρεκομπινάση Cre (οφείλει το όνομα της στο causes recombination ή cyclization recombination) οποία ανήκει στον βακτηριοφάγο P1 και έχει μοριακό βάρος 38 kDa [163]. Η πρωτεΐνη Cre έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να καταλύει από μόνη της τον ανασυνδυασμό μεταξύ δύο ειδικών θέσεων του DNA μήκους

34 bp στο γονιδίωμα του βακτηριοφάγου, των αποκαλούμενων θέσεων loxP (γονιδιακός τόπος "locus X-over" του P1). Η αλληλουχία loxP αποτελείται από δύο αντίστροφες επαναλήψεις, 13 bp η κάθε μία και ανάμεσά τους εντοπίζεται μία ασύμμετρη κεντρική περιοχή 8 bp. Η τυχαία ενσωμάτωση μίας περιοχής 34 bp στο γονιδίωμα αποτρέπει λόγω του μεγάλου μεγέθους της ενώ ταυτόχρονα θεωρείται αρκετά μικρή ώστε να ενσωματωθεί στο χρωμοσωμικό DNA με γενετικούς χειρισμούς. Αναλόγως του προσανατολισμού και τοποθεσίας των loxP θέσεων, ο ανασυνδυασμός που πραγματοποιείται καταλήγει σε αναστροφή, ενσωμάτωση ή αποκοπή τμημάτων DNA κάτι που προσφέρει μεγάλη ευελιξία στις στρατηγικές που επιλέγονται στην τεχνολογία της γενετικής μηχανικής των διαγονιδιακών ζώων (Εικόνα 14). Αποκοπή τμημάτων DNA συνδεδεμένων με loxP αλληλουχίες χρησιμοποιούνται για την *in vivo* τροποποίηση του γονιδιώματος. Η βασική στρατηγική για στοχευμένη τροποποίηση του γονιδιώματος με χρήση του συστήματος Cre/lox περιλαμβάνει την εισαγωγή θέσεων loxP σε χρωμοσώματα με ομόλογο ανασυνδυασμό αρχέγονων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων ή γονιμοποιημένων ωαρίων. Τα ζώα που προκύπτουν φέρουν στο γονιδίωμά τους το «floxed» γονίδιο [164], [165].



Εικόνα 14. Μηχανισμοί δράσης της Cre. Ανάλογα με τον προσανατολισμό και την τοποθεσία των loxP θέσεων, η Cre τροποποιεί το γονιδίωμα με αναστροφή (*inversion*, αντίθετη κατεύθυνση), αποκοπή (*deletion*, ίδια κατεύθυνση) και απομάκρυνση ως κυκλικό μόριο ή μετατόπιση (*translocation*, σε διαφορετικό μόριο DNA) με ενσωμάτωση στο γονιδίωμα. Η αντίδραση Cre με αποκοπή είναι αναστρέψιμη γιατί παραμένει μία ακέραιη θέση loxP στο γονιδίωμα [166]. | ©Addgene

5.1.2 Η κινάση Lck

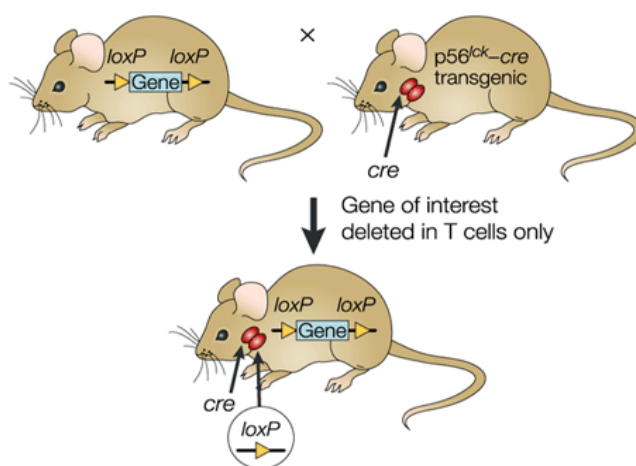
Η τυροσινική κινάση Lck ή p56 (lymphocyte specific protein tyrosine kinase) είναι μια φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 56 kDa και αποτελεί μέλος της οικογένειας των Src κινασών [51]. Παρότι εκφράζεται σε πληθώρα λεμφοειδών κυτταρικών σειρών, είναι ειδική για τα T λεμφοκύτταρα στα οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Βρίσκεται υπό τον έλεγχο δύο ανεξάρτητων υποκινητών, του «σύνεγγυς» (proximal), ο οποίος είναι ενεργός στα θυμοκύτταρα, και του «απομακρυσμένου» (distal), ο οποίος κυριαρχεί στα ώριμα T κύτταρα. Η Lck είναι σημαντική για την φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανση των T κυττάρων καθώς εκφράζεται στα προγονικά κύτταρα των θυμοκυττάρων κατά τη μετανάστευσή τους στο θύμο. Η έκφρασή της εντοπίζεται σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων και εν συνεχεία σε όλους τους T κυτταρικούς υποπληθυσμούς που θα προκύψουν όπου είναι απαραίτητη στην σηματοδότηση μέσω TCR [167], [168]. Τα συμπεράσματα αυτά προέκυψαν μετά από πειράματα σε ποντικούς με μη φυσιολογική έκφραση της Lck που οδήγησε τόσο σε προβληματική ωρίμανση των θυμοκυττάρων όσο και σε TCR σηματοδότηση στα ελάχιστα ώριμα T κύτταρα [169]–[171].

5.1.3 Lck-Cre και "side effects"

Η ελεγχόμενη έκφραση της Cre υπό τον υποκινητή της Lck αποτελεί αναμφίβολα την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την υπό όρους εξάλειψη γονιδίων στη μελέτη της διαφοροποίησης και λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων. Διαγονιδιακοί ποντικοί στους οποίους η έκφραση της πρωτεΐνης Cre ελέγχεται από τον υποκινητή της Lck διασταυρώνεται με ποντικούς που φέρουν τα επιθυμητά «floxed» αλληλόμορφα (γενιά F₀ ή P) δίνουν απογόνους (γενιά F₁) με ιστοειδική ετερόζυγη εξάλειψη, ενώ για πλήρη εξάλειψη απαιτείται ομοζυγωτία, δηλαδή διασταύρωση μεταξύ των μελών της F₁ (γενιά F₂) (Εικόνα 15).

Η επικρατούσα αντίληψη υποστήριζε ότι επειδή οι αλληλουχίες loxP δεν απαντώνται φυσιολογικά στο γονιδίωμα των θηλαστικών, η έκφραση της Cre απουσία γενετικά τροποποιημένων loxP θέσεων είναι άνευ σημασίας. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν πιθανή εμπλοκή της Cre σε «off-target» αποτελέσματα (αποτελέσματα, δηλαδή, που δεν σχετίζονται με τον υπό μελέτη στόχο) καθώς έχει παρατηρηθεί μη αναμενόμενη έκφρασή της σε διάφορους ιστούς. Διαφοροποιήσεις από τον φυσιολογικό φαινότυπο έχουν

αναφερθεί και στο θύμο όπου βρέθηκε ότι η έκφραση της Cre οδηγεί σε μείωση του αριθμού των θυμοκυττάρων στο στάδιο των διπλά θετικών (DP) και αύξηση του κυτταρικού θανάτου, φαινόμενο μάλιστα δοσοεξαρτώμενο από τα επίπεδα έκφρασής της [172]. Επιπροσθέτως, πειράματα με διαγονιδιακούς ποντικούς άλλης έρευνας έδειξαν ότι η έκφραση της Cre που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της Lck προκαλεί διαφοροποιήσεις στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων και επιφέρει σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στους υποπληθυσμούς των T κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Μεταξύ άλλων, παρατηρήθηκε μείωση των θυμοκυττάρων στη DP φάση ενώ στο σπλήνα τροποποιήθηκε η αναλογία των CD4+/CD8+ κυττάρων [173]. Επειδή ακριβώς μπορεί να αναγνωρισθούν ψευδείς loxP αλληλουχίες ως «floxed» περιοχές στο γονιδίωμα των ποντικών αλλά και η εν δυνάμει μη αποτελεσματικότητα της Cre κατά την διαδικασία της αποκοπής της «floxed» περιοχής-στόχου [174], είναι απαραίτητη η προσεκτική επιλογή ζώων ελέγχου για το σύστημα Lck-Cre κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, ενώ μεταξύ των πιθανών υποκινητών υπό τον έλεγχο των οποίων βρίσκεται η Cre για ιστοειδική εξάλειψη στο θύμο, καταλληλότερος είναι ο υποκινητής της Lck [172] .



Εικόνα 15. Το σύστημα Cre/lox σε ποντικό. Ζώο με "floxed" γονίδιο (γαλάζιο) διασταυρώνεται με διαγονιδιακό ζώο που φέρει την Cre υπό τον έλεγχο του υποκινητή της Lck (p56^{lck}-cre transgenic mice). Ο απόγονος θα φέρει ιστοειδική εξάλειψη του στοχευμένου γονιδίου (με κόκκινο συμβολίζεται ο θύμος). | *Nature Reviews Immunology* (2001)

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Erk έχει αποδεδειγμένα κεντρικό ρόλο στη βιολογία των T κυττάρων, κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων στο στάδιο της θετικής/αρνητικής επιλογής, στην επαγωγή της ανέργειας στα ώριμα T κύτταρα και στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-2 στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η Erk ασκεί τις παραπάνω λειτουργίες έχουν μελετηθεί μόνο εν μέρει. Κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής έρευνας είναι η διερεύνηση του ρόλου του ρυθμιζόμενου από την Erk μεταγραφικού παράγοντα ERF στη βιολογία των T λεμφοκυττάρων και η συσχέτιση της δράσης του με τις διεργασίες α) της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων και β) της ενεργοποίησης των T κυττάρων, με κύριο βάρος στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ρύθμισης της IL-2.

Έτσι, επιμέρους στόχοι είναι:

- 1) *In vivo*, η κατανόηση της λειτουργίας του Erf κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων. Η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών συμμετοχής του Erf στη δέσμευση κυτταρικής σειράς.
- 2) *In vitro*,
 - a) η λειτουργική μελέτη του ERF στα ώριμα T κύτταρα. Η λειτουργική μελέτη περιλαμβάνει τη μελέτη της ενδογενούς έκφρασης του ERF και το ρόλο του στον πολλαπλασιασμό των ώριμων T κυττάρων συναρτήσει της ενεργότητας της Erk και συνθηκών διέγερσης των κυττάρων μέσω του συμπλόκου TCR-CD3 και του συνδιεγερτικού μορίου CD28.
 - b) Η μελέτη της ρύθμισης έκφρασης της IL-2 συναρτήσει της ενεργότητας του ERF και συσχέτιση με την ενεργότητα της Erk.

Οι μελέτες αυτές θα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη βιολογία των T λεμφοκυττάρων σε διάφορα επίπεδα.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν της εταιρίας Greiner Bio-One, ενώ τα χημικά αναλώσιμα της εταιρίας Sigma-Aldrich, εκτός και αν σημειώνεται κάτι διαφορετικό.

Ειδικά, τα πλαστικά και χημικά αναλώσιμα της Κυτταρομετρίας Ροής ήταν της εταιρίας BD Biosciences.

ΜΕΡΟΣ Ι: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΣΤΑ *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

1.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Ο όρος «κυτταροκαλλιέργεια» αναφέρεται στην *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο, όπου περιέχονται όλα τα απαραίτητα για την θρέψη των κυττάρων συστατικά (ορός, αυξητικοί παράγοντες) καθώς και αντιβιοτικά. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ένα απομονωμένο, από τις αλληλεπιδράσεις με άλλα κύτταρα και εύκολα ελεγχόμενο σύστημα μελέτης. Ο συνεχής πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η συντήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας εξασφαλίζεται με τη διαδικασία της επανακαλλιέργειας. Η συχνότητα επανακαλλιέργειας εξαρτάται από την κυτταρική σειρά. Μπορεί να είναι είτε βακτηριακές ή καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών (συνήθως) κυτταρικών σειρών.

1.1.1 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

1.1.1.1 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα DH5a της E.Coli. Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών έγινε σε υγρή και στερεή φάση: σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB) που περιέχει 1% (w/v) Θρυπτόνη (Tryptone), 0.5% (w/v) NaCl και 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) με την προσθήκη 1.5% (w/v) άγαρ για την καλλιέργεια σε στερεή φάση.

1.1.1.2 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων

Η παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων-ξενιστών ώστε να εισαχθεί εξωγενές πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου. (6% CaCl_2 1M, 17% Γλυκερόλη, 1% PIPES 1M).

1.1.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων με τους επιθυμητούς φορείς πραγματοποιήθηκε με τη θερμικό σοκ στους 42°C με 50-100 ng DNA.

Η επιλογή και ανακαλλιέργεια των μετασχηματισμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό με προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού για τον κάθε φορέα.

1.1.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεγάλης κλίμακας

Η απομόνωση του DNA των φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (βλ. §1.2.7) πραγματοποιήθηκε με τα NucleoBond Xtra (midi prep) και NucleoSpin Plasmid (mini prep) της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι φορείς ταυτοποιήθηκαν μετά από περιοριστικές πέψεις με τα κατάλληλα για κάθε φορέα ένζυμα.

1.1.2 ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

1.1.2.1 Κυτταρική σειρά Jurkat

Τα κύτταρα Jurkat είναι μια αθανатоποιημένη σειρά ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων λευχαιμίας (αρχικά ως «JM» κύτταρα και εν συνεχεία παρήχθη ο κλώνος E6-1) και χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της λευχαιμίας, της κυτταρικής σηματοδότησης και της έκφρασης υποδοχέων χυμοκινών. Βασικά χαρακτηριστικά των κυττάρων Jurkat είναι η παραγωγή IL-2 σε υψηλά επίπεδα κατόπιν ενεργοποίησης, η γρήγορη ανάπτυξη σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθός τους καθώς και το γεγονός ότι δεν προσκολλώνται στην καλλιεργητική επιφάνεια αλλά «αιωρούνται» στο μέσο καλλιέργειας σχηματίζοντας εμφανή συσσωματώματα [175], [176].

1.1.2.2 Κυτταρική σειρά HuT78

Τα κύτταρα HuT78 απομονώθηκαν από αίμα ασθενή με σύνδρομο Sezary. Αποτελούν πληθυσμό CD4+ T λεμφοκυττάρων, παράγουν σε χαμηλά επίπεδα IL-2 (εκφράζουν και τον

υποδοχέα αυτής), IL-10 και TNF- α , κάτι που τα καθιστά ιδανικά μοντέλα για μελέτη της σηματοδοτικής οδού των MAP κινασών. Όπως και τα κύτταρα Jurkat, αναπτύσσονται «αιωρούμενα» στο καλλιεργητικό μέσο. Πρόκειται για τη μοναδική καρκινική σειρά λεμφοκυττάρων που παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό της παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων αντιγόνου CAMPTH-1 (CD52), κάτι που κάνει τα HuT78 κατάλληλο εργαλείο για πειράματα θεραπείας με αντισώματα αντι-CD52 [177].

1.1.2.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο. Οι πειραματικές διαδικασίες εκτελέστηκαν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής, με σκοπό την αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα συντηρούνταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με CO₂ 5% (v/v). Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας (25 και 75 cm²) εντός επωαστικού κλίβανου και η παρατήρηση τους πραγματοποιήθηκε σε αναστροφο οπτικό μικροσκόπιο.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν RPMI 1640 (με L-glutamine, Biosera) εμπλουτισμένο με 10% θερμικά απενεργοποιημένο εμβρυικό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Biosera) και 1.000 U/ml διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (Biosera). Οι εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν με στείρο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7.2 (phosphate buffer saline, PBS, Biosera). Το θρεπτικό μέσο και διάλυμα έκπλυσης πριν χρησιμοποιηθούν, προθερμαίνονταν σε υδατόλουτρο στους 37°C.

1.1.2.4 Καταμέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε κάτω από το μικροσκόπιο με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer μετά από χρώση με τη χρωστική Trypan Blue (διάλυμα 0.5%, Biosera) σε αναλογία όγκων χρωστικής-κυτταρικού εναιωρήματος 1:1. Η εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων επιτυγχάνεται καθώς η χρωστική Trypan Blue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα.

1.1.2.5 Αποθήκευση και απόψυξη κυττάρων

Για την αποθήκευση των κυττάρων, είναι σημαντικό τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων ψύχεται σε υγρό άζωτο σε

διάλυμα που περιέχει FBS με 10% DMSO (αντιψυκτικός παράγοντας). Κατά την διαδικασία απόψυξης, τα σωληνάκια ψύξης μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C. Αφού αποψυχθούν, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και κατόπιν καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό μέσο.

1.1.2.6 Διέγερση T λεμφοκυττάρων

Επιθυμητός αριθμός κυττάρων διεγέρθηκε με: α) αντι-CD3 και/ή αντι-CD28 (2 µg/ml και 1 µg/ml αντίστοιχα) (Κλώνος CD28.2, BD Biosciences), β) PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) και/ή Ιονομυκίνη (2 ng/ml και 200 ng/ml αντίστοιχα) παρουσία ή όχι του ειδικού για την Erk1/2 αναστολέα UO126 (1 µM) (Cell Signaling) [178] ή/και του αναστολέα της p38 BIRB796 (5 µM) (Axon MEDCHEM) [179] για διάφορα χρονικά διαστήματα ανάλογα με το πρωτόκολλο. Οι συνθήκες επαναλήφθηκαν σε διπλές ή τριπλές ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειραματικού πρωτοκόλλου.

1.1.2.7 Μεταφορά εξωγενούς DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα

Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

A) Οι πλασμιδιακοί: pEGFP-C1 (φορέας ελέγχου) και pGFP-ERF (φορέας έκφρασης χιμαϊρικής πρωτεΐνης GFP-ERF) [116] (Εικόνα 16. a).

B) Οι ιικοί (lentiviral): WPI (φορέας ελέγχου), WPI-ERF (φορέας έκφρασης του ERF) και WPI-M₁₋₇ (φορέας έκφρασης του συνεχούς ενεργού μεταλλάγματος του ERF) [111], [116] (Εικόνα 16. b). Ο αρχικός φορέας WPI είναι του Trono Lab.

Όλοι οι φορείς αποτελούν ευγενή προσφορά του Δρ. Γ. Μαυροθαλασσίτη.

1.1.2.7.1 Παροδική διαμόλυνση με ηλεκτροδιάτρηση (transient transfection) με πλασμιδιακούς φορείς

Βασική αρχή της μεθόδου είναι η εφαρμογή ισχυρού σε ένταση αλλά σύντομου σε διάρκεια ηλεκτρικού παλμού σε κυτταρικό εναιώρημα κατά τη διάρκεια της οποίας λαμβάνουν χώρα αλλαγές στο δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης μέσω διάνοιξης πόρων σε αυτή που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόσληψη του εξωγενούς DNA, δηλαδή του

πλασμιδίου, από τα κύτταρα. Η συσκευή ηλεκτροδιάτρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο electroporator BTX ECM 830 και το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης RPMI 1640 με 2% HEPES.

1.1.2.7.2 Δημιουργία κυτταρικών κλώνων σταθερής έκφρασης (stable expression) με ιικούς φορείς

Για τη μελέτη του φυσιολογικού ρόλου του ERF στα T λεμφοκύτταρα, δημιουργήθηκαν κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης του ERF. Αυτό επιτεύχθηκε μετά από εισαγωγή ιικού φορέα που φέρει το γονίδιο του *ERF* σε κύτταρα HuT78 ή Jurkat. Επειδή ο ιικός φορέας ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή τα κύτταρα διαμολύνονται μόνιμα και η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος υπερεκφράζεται σταθερά. Όλοι οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν συνεκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP ώστε τα θετικά διαμολυσμένα κύτταρα να είναι ορατά σε μικροσκόπιο φθορισμού και σε κυτταρομετρητή ροής. Οι ιικοί φορείς διαμόλυναν τα κύτταρα με τη βοήθεια ιικών πλασμιδίων πακεταρίσματος (pCMV-R8.74 και pMD2.G, Trono Lab) μετά από φυγοκέντρηση με το πολυμέρες polybrene σε τριβλίο των 6 θέσεων (το «ιικό κοκτέιλ» είχε παραχθεί και φιλτραριστεί μετά από διαμόλυνση κυττάρων 293T). Μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα αφέθηκαν να ανανήψουν, ενώ μετά την 5η ημέρα έγιναν ορατά τα θετικώς διαμολυσμένα κύτταρα. Ακολούθησε κυτταροδιαχωρισμός (βλ. §1.3.2) στον κυτταροδιαχωριστή BD FACSAria III βάσει της φθορίζουσας GFP πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε τριβλία των 96 θέσεων και δημιουργήθηκαν κυτταρικοί κλώνοι ξεκινώντας με 1-10 αρχικά κύτταρα σε κάθε «πηγάδι» για κάθε φορέα. Η πιστοποίηση των θετικώς διαμολυσμένων κυττάρων ελεγχόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με κυτταρομετρία ροής βάσει του φθορισμού σε GFP (>90% του συνόλου της κυτταρικού κλώνου), ενώ η υπερέκφραση του ERF πιστοποιήθηκε με RT-PCR (βλ. 1.1.2.10) και Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (βλ. 1.1.2).

1.1.2.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης, RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

Τα βασικά στάδια μίας συμβατικής τεχνικής PCR περιλαμβάνουν την αποδιάταξη (denaturation) του αρχικού DNA δείγματος, τον υβριδισμό του DNA εκμαγείου (annealing) με κατάλληλους εκκινητές και την επιμήκυνση (elongation/extension) του τμήματος που θα ενισχυθεί. Ο κύκλος «αποδιάταξη-υβριδισμός-επιμήκυνση» πραγματοποιείται για συγκεκριμένο αριθμό επαναλήψεων ανάλογα με την περίπτωση. Καταλυτικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία τελεί η Taq DNA πολυμεράση η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας μίας μονόκλωνης αλυσίδας DNA. Οι δυο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση, εφόσον υπάρχει ένας εκκινητής για κάθε μία αλυσίδα. Έτσι, το ένζυμο χρησιμοποιεί ως μήτρα τις αρχικές αποδιατεταγμένες αλυσίδες συνθέτοντας δύο καινούριες ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος DNA αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός του τμήματος-στόχου να πραγματοποιείται με εκθετικό τρόπο. Η ιδιαιτερότητα της RT-PCR είναι η χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο χρησιμοποιεί ως εκμαγείο RNA και συνθέτει το συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο χρησιμοποιείται τελικά στην αντίδραση PCR. Αντίθετα, κατά την συμβατική PCR, ενισχύονται επιλεγμένες αλληλουχίες DNA καθώς ως εκμαγείο χρησιμοποιείται απευθείας DNA και όχι cDNA. Οι εκκινητές για τον εντοπισμό της υπερέκφρασης του ανθρώπινου ERF στους κλώνους σταθερής υπερέκφρασης φαίνονται στον Πίνακα 1.

5' -> 3' DNA Αλληλουχία	Γονίδιο-στόχος	Είδος PCR
CAAGCGCATTCTGCACAAGA	ERF	RT-PCR
GTTCTCCAGCTCTGACGTG		
TTGCTGACAGGATGCAGAAG	β/γ ακτίνη	RT-PCR
ACATCTGCTGGAAGGTGGAC		

Πίνακας 1. Ζεύγη εκκινητών ανθρώπινων κυττάρων. Το ζεύγος εκκινητών για την υπερέκφραση του ανθρώπινου ERF σε RT-PCR και της β/γ ακτίνης για την κανονικοποίηση της έκφρασης.

1.1.2.11 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μίας αντίδρασης PCR πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (γέλη) αγαρόζης (agarose gel). Η συγκέντρωση της αγαρόζης στη γέλη εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι 1x TBE (Tris borate EDTA buffer, 89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3). Για την ταυτοποίηση των ζωνών του DNA ανά δείγμα πραγματοποιείται χρώση της γέλης με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), ενώ χρησιμοποιείται κατάλληλος μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών καθώς και θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου (positive και negative control).

1.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

1.2.1 Ανοσοδοκιμασία ELISA

Η ανίχνευση των επιπέδων παραγωγής της IL-2 και IL-10 υπό διάφορες συνθήκες διέγερσης κυττάρων HuT78 πραγματοποιήθηκε με Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (ELISA). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό εξέταση πρωτεΐνης και στηρίζεται στην εκλεκτική πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Επιτρέπει, επίσης, τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών και ορμονών σε βιολογικά υγρά, με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τέσσερα είναι τα κύρια στάδια της μεθόδου, η πρόσδεση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια, η χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος, η χρήση χρωμογόνου υποστρώματος και τέλος, η ανίχνευση έγχρωμου προϊόντος. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της ίδιας τεχνικής, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich και η ανταγωνιστική ELISA. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία η ELISA που πραγματοποιήθηκε ήταν τύπου Sandwich.

Τα βήματα για τη διαδικασία της Δοκιμασίας ELISA για την μέτρηση της IL-2 παρατίθενται ακολούθως:

Πλακίδια ELISA (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific) επιστρώθηκαν με αντι-IL-2 μονοκλωνικό αντίσωμα (κλώνος 5344.111, BD Biosciences) (1 $\mu\text{g/ml}$ σε διάλυμα 0.1 M NaHCO_3 pH 9.5). Οι εκπλύσεις έγιναν σε διάλυμα έκπλυσης (PBS με 0.1% Tween20) ενώ όλες οι αραιώσεις σε διάλυμα εργασίας (PBS με 0.1% Tween20 και 1% BSA). Για θετικούς μάρτυρας χρησιμοποιείται διάλυμα αναφοράς IL-2 (BD Biosciences) σε 8 διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από 1000 pg. Το βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-biotinIL-2 (κλώνος B33-2, BD Biosciences) προστέθηκε σε αραιώση 1:1500 σε διάλυμα εργασίας ενώ η στρεπταβιδίνη σε αραιώση 1:1500. Τέλος, προστέθηκε χρωμογόνο υπόστρωμα TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (TMB Microwell Peroxidase Substrate System 2-C, KPL) και διάλυμα τερματισμού ($\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία όγκων 1:1). Τα πλακίδια φωτομετρήθηκαν στα 450 nm (Infinite F50 Microplate reader, TECAN) ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της IL-2 ανά συνθήκη με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης

αναφοράς στο λογισμικό Magellan™ Data Analysis System (TECAN). Ομοίως μετρήθηκε η συγκέντρωση της IL-10 (πρωτεύον αντίσωμα: κλώνος JES5-2A5, βιοτινυλιωμένο: κλώνος SXC-1, και τα δύο BD Biosciences).

1.2.2 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Η Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μιας συγκεκριμένης ενδοκυττάριας πρωτεΐνης σε ένα μείγμα πρωτεϊνών. Αποτελεί μία μέθοδο υψηλής ανάλυσης και ευαισθησίας παρέχοντας πληροφορίες για το μοριακό μέγεθος της προς μελέτη πρωτεΐνης ενώ στηρίζεται στην ικανότητα ειδικευμένης αναγνώρισης αντιγόνου-αντισώματος. Τα κύρια στάδια περιλαμβάνουν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, τη μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τη δέσμευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης με ειδικό αντίσωμα και τέλος, τη χρωμογόνο ανίχνευση αυτής.

1.2.2.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιείται με ταυτόχρονες αναδεύσεις σε αναδευτήρα τύπου Vortex ώστε να απελευθερωθούν οι ολικές πρωτεΐνες σε διάλυμα RIPA (250 mM Tris-HCl, pH 7.6, 750 mM χλωριούχο νάτριο, 5% NP-40, 2.5% δεοξυχολικό νάτριο και 0.5% SDS, Cayman) παρουσία μείγματος αναστολέων φωσφατασών (80 μM απροτινίνη, 4 mM ομπεστατίνη, 1.4 mM E-64, 2 mM λευπεπτίνη και 1.5 mM πεπστατίνη A) και νιτρικού ορθο-βαναδίου (αναστολέας φωσφατασών).

1.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου

Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους μεγέθους καθώς μετακινούνται σε πήκτωμα με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και ο διαχωρισμός τους εξαρτάται από το μέγεθος, το φορτίο και την τριτοταγή τους δομή. Οι μεγάλες πρωτεΐνες μένουν κοντά στο σημείο εκκίνησης, ενώ οι μικρές μετακινούνται πιο μακριά στο πήκτωμα.

1.2.2.2.1 Παρασκευή 10-12% πηκτώματος SDS-πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα: το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) και το πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel).

1.2.2.2.1.1 Πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel)

Για την παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού, σε σωλήνα τύπου falcon προστίθενται διαδοχικά κατάλληλες ποσότητες από H₂O, 1.5 M Tris (pH 8.8), 10% SDS, 10% υπερθειικό αμμώνιο, 30% ακρυλαμίδιο mix και TEMED.

1.2.2.2.1.2 Πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel)

Για την Παρασκευή πηκτώματος επιστοίβασης, σε σωλήνα τύπου falcon προστίθενται διαδοχικά κατάλληλες ποσότητες από H₂O, 1.5 M Tris (pH 6.8), 10% SDS, 10% υπερθειικό αμμώνιο, 30% ακρυλαμίδιο mix και TEMED. Το μείγμα φορτώνεται στη συσκευή πάνω από το πολυμερισμένο πήκτωμα διαχωρισμού. Όταν πολυμεριστεί, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συναρμολογείται και πληρούται με ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (TGS).

Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα προς διαχωρισμό των πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται με θερμική επεξεργασία δειγμάτων στους 100°C παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη, περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης Laemmli). Έτσι, καταστρέφεται η τριτοταγής δομή τους ενώ, παράλληλα, αποκτούν φορτίο ανάλογο του μεγέθους τους ώστε να διαχωριστούν σύμφωνα με αυτό. Έχει προηγηθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford) με διάλυμα Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) και χρήσης πρότυπης καμπύλης αναφοράς πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης (BSA) ώστε να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των απομονωμένων πρωτεϊνών και να επιτευχθεί ισοφόρτωση μεταξύ των δειγμάτων.

1.2.2.3 Ημι-στεγνή μεταφορά (semi-dry transfer) πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Επόμενο στάδιο είναι η μεταφορά των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham). Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται μη αντιστρεπτά και μη ειδικά στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε διάλυμα μεταφοράς pH 7.5 (25 mM Tris-HCl, 192 mM Γλυκίνη, 20% Μεθανόλη) στη συσκευή Trans-Blot Turbo Tranfer System (Bio-Rad) με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που φέρει πλέον τις πρωτεΐνες (ελέγχεται με χρώση Ponceau S) επωάζεται σε διάλυμα αποκλεισμού (PBS με 5% άπαχο γάλα) ολονύκτια στους 4°C, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.

1.2.2.4 Δέσμευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης με ειδικό (πρωτεύον) και μη ειδικό (δευτερεύον) αντίσωμα

Η ταυτοποίηση των εξεταζόμενων πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με δέσμευση του ειδικού αντισώματος (πρωτεύον) στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Το δευτερεύον μη ειδικό αντίσωμα είναι αντι-ισοτυπικό και διασφαλίζει την ειδική πρόσδεση στο πρωτεύον ενώ είναι συζευγμένο με ένζυμο, κάτι που καθιστά εφικτή την χρωμογόνο ανίχνευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης όταν προστεθεί κατάλληλο υπόστρωμα κατά το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας.

Οι εκπλύσεις της μεμβράνης πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα έκπλυσης PBS-T (PBS με 0.1% Tween20) και οι επώσεις σε διάλυμα PBS με 5% άπαχο γάλα ή 5% BSA με το αντίστοιχο αντίσωμα για ERF, Erk1/2, α -τουμπουλίνη ανά περίπτωση. Το αντίσωμα για τον ERF είναι ευγενή προσφορά του Δρ. Γ. Μαυροθαλασσίτη ενώ τα αντισώματα για phospho-p44/42 (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) και α -τουμπουλίνη (κλώνος DM1A) της Cell Signalling. Τα δευτερεύοντα αντισώματα (συζευγμένα με HRP) είναι το goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) και το goat anti-rabbit (Thermo Scientific).

1.2.2.5 Χρωμογόνος ανίχνευση εξεταζόμενης πρωτεΐνης

Με προσθήκη ειδικού για το δευτερεύον αντίσωμα υποστρώματος ECL (Bio-Rad) πραγματοποιείται ενζυμική χρωμογόνο αντίδραση. Το καθαζάνον προϊόν που παράγεται δεσμεύεται στη μεμβράνη και η εξεταζόμενη πρωτεΐνη ανιχνεύεται μέσω εκπομπής φθορισμού ή χημειοφωταύγειας. Αυτό αποτυπώνεται σε ακτινογραφικό φιλμ (Fujifilm) το οποίο είναι ευαίσθητο σε β -ακτινοβολία σε σκοτεινό θάλαμο. Τέλος, το αποτέλεσμα εμφανίζεται με χρήση ειδικού μηχανήματος εμφάνισης. Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε, επίσης, και με το σύστημα εμφάνισης ChemiDocTM XRS (Bio-Rad), χωρίς χρήση φιλμ, και η εικόνα αναλύεται στο λογισμικό Image LabTM Software.

1.2.2.6 Ποσοτικοποίηση

Η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης της εξεταζόμενης πρωτεΐνης κάθε δείγματος πραγματοποιείται μετά από κανονικοποίηση με την έκφραση μιας πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η α-τουμπουλίνη είναι μια δομική κυτταρική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και ισόποσα σε όλα τα κύτταρα ανεξαρτήτως συνθηκών και γι' αυτό επιλέγεται ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

1.2.3 Δοκιμασία γονιδίου αναφοράς - Αντίδραση Λουσιφεράσης

Μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεταγραφής αποτελεί η δοκιμασία γονιδίου αναφοράς. Χρησιμοποιείται πλασμιδιακός φορέας ο οποίος φέρει τον υπό μελέτη υποκινητή ο οποίος ελέγχει την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς είναι μη ομόλογο γονίδιο που προέρχεται από φυλογενετικά απομακρυσμένο οργανισμό και παράγει προϊόν εύκολα μετρήσιμο όπως η λουσιφεράση (luciferase). Η λουσιφεράση είναι ένα ένζυμο που απαντάται σε φωτογόνους οργανισμούς όπως η πυγολαμπίδα (firefly) και καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης με αποτέλεσμα την εκπομπή χημειοφωταύγειας.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιούνται φορείς όπου ο υποκινητής του υπό μελέτη γονιδίου βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης με αποτέλεσμα η ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου ενδιαφέροντος να συνοδεύεται από εκπομπή φωτός. Μάλιστα, η ένταση της εκπομπής είναι ανάλογη της ενεργότητας του υποκινητή [180].

Στα πειράματα λουσιφεράσης, κύτταρα Jurkat συνδιαμολύνθηκαν με φορέα όπου ο υποκινητής του γονιδίου της *IL-2* βρίσκεται ανοδικά στο γονίδιο της λουσιφεράσης firefly και με φορέα έκφρασης της Renilla λουσιφεράσης (pRL-Renilla). Η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τη Renilla λουσιφεράση χρησιμεύει για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Η συνδιαμολύνηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε είτε με ηλεκτροδιάτρηση (βλ. §1.1.2.7.1) ή με χρήση λιποφεκταμίνης (LTX Lipofectamine with Plus Reagent, Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την πραγματοποίηση των δύο αντιδράσεων λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Dual Luciferase Reporter Assay System της Promega και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η ανίχνευση

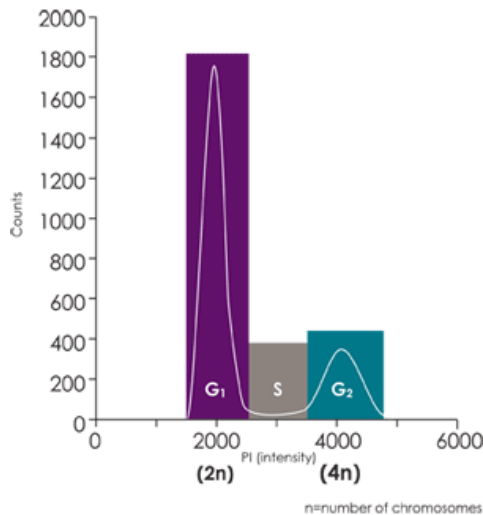
της εκπομπής της χημειοφωταύγειας πραγματοποιήθηκε με λουμινόμετρο. Για κάθε δείγμα προκύπτουν δύο τιμές (μία για κάθε λουσιφεράση) και το τελικό αποτέλεσμα εξάγεται από την εξίσωση: κανονικοποιημένη λουσιφεράση=(μικρότερη μέτρηση Renilla/μέτρηση Renilla δείγματος) x μέτρηση λουσιφεράσης δείγματος.

1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) είναι μια πολυπαραμετρική και αυτοποιημένη μέθοδος μέτρησης πολλαπλών φυσικοχημικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης και μελέτης σύνθετων κυτταρικών πληθυσμών και την ανίχνευση υποπληθυσμών τους, τον καθορισμό των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, την μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών και τον έλεγχο της ακεραιότητας κυτταρικών οργανιδίων. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιείται με τη χρήση σύνθετων συσκευών, των κυτταρομετρητών ροής, που μέσω πολύπλοκων συστημάτων μετατρέπουν τα συλλεχθέντα από τις μετρήσεις στοιχεία σε τριών ειδών δεδομένα: την πρόσθια σκέδαση (FSC), που καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων, την πλευρική σκέδαση (SSC), που καθορίζει την κοκκίωση των κυττάρων και την εκπομπή φθορισμού (FL), που καθορίζει την ένταση φθορισμού των κυττάρων. Δύο είναι οι βασικές προϋποθέσεις κατά την προετοιμασία των δειγμάτων: ο υπό μελέτη κυτταρικός πληθυσμός να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος και τα κύτταρα να έχουν σημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές συζευγμένες με αντισώματα.

1.3.1 Μελέτη κυτταρικού κύκλου

Για να προσδιοριστεί σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται τα κύτταρα πραγματοποιείται μελέτη κυτταρικού κύκλου σε μονιμοποιημένα με 70% αιθανόλη και συγχρονισμένα κύτταρα μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Το PI είναι ένα φθορίζον μόριο που συνδέεται στις βάσεις του DNA (ή του RNA). Τα κύτταρα είχαν συγχρονιστεί στη φάση G0/G1 με ολονύκτια καλλιέργεια σε μέσο χωρίς FBS [181]. Η μονιμοποίηση των κυττάρων εξασφαλίζει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης από το PI ώστε να προσδεθεί στο δίκλωνο DNA. Η χρώση των κυττάρων πραγματοποιείται με επώαση σε διάλυμα χρώσης [1 mg/ml PI (Biotium), 10 mg/ml RNase A (Novagen, Merck) σε NaCitrate 38mM pH 7.4]. Ακολουθεί η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στον κυτταρομετρητή ροής BD FACSAria III. Μεγαλύτερη ένταση φθορισμού σε PI συνεπάγεται μεγαλύτερη ποσότητα σε γενετικό υλικό. Συνεπώς, κύτταρα που βρίσκονται στη G0/G1 εντοπίζονται πιο αριστερά στον άξονα των x της έντασης του φθορισμού, ακολουθούν τα κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση ενώ πιο δεξιά τα κύτταρα που έχουν διπλασιάσει το DNA του (G2/M φάση) και ετοιμάζονται να διπλασιαστούν (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου με Κυτταρομετρία Ροής. Με διαφορετικά χρώματα συμβολίζονται οι διαφορετικές φάσεις του κύκλου. Στον άξονα των x η ένταση του φθορισμού του PI (PI intensity) ενώ στον άξονα των y ο αριθμός των κυττάρων (count). Όπου n ο αριθμός των χρωμοσωμάτων | ©Nexcelom Bioscience

1.3.2 Κυτταροδιαχωρισμός (Cell sorting)

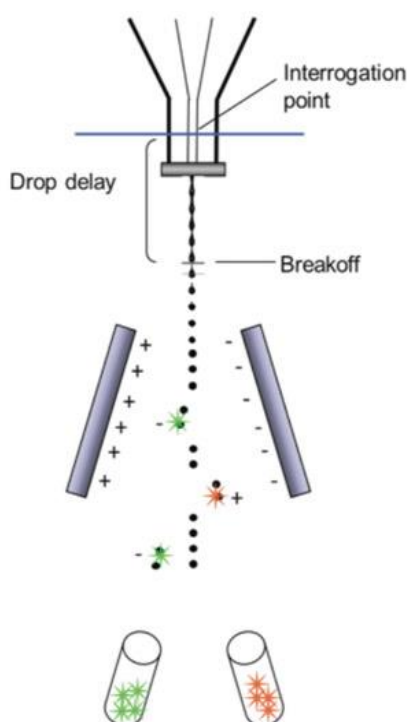
Κατά τον κυτταροδιαχωρισμό (Fluorescence activated cell sorting, FACS), ο κυτταρικός πληθυσμός ενδιαφέροντος επιλέγεται και διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα κύτταρα. Ο πληθυσμός των διαχωρισμένων κυττάρων χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα (purity), βιωσιμότητα (viability) και τα κύτταρα μπορούν να επανακαλλιεργηθούν υπό στείρες συνθήκες με υψηλά ποσοστά ανάκαμψης (recovery) ή να χρησιμοποιηθούν σε άλλα πρωτόκολλα (π.χ. απομόνωση RNA, εκχύλιση πρωτεϊνών κ.ά.). Με τον κατάλληλο εξοπλισμό είναι δυνατό να διαχωριστεί μέχρι και ένα κύτταρο (single cell) σε πιάτο 96 θέσεων, όπως συνέβη στην παρούσα διατριβή. Ο διαχωρισμός των κυττάρων, όπως και η απλή ανάλυση, στηρίζεται στα επιμέρους χαρακτηριστικά τους που τα διαφοροποιεί από τον υπόλοιπο πληθυσμό. Μπορεί να είναι επιφανειακοί δείκτες, φθορισμός προερχόμενος από κάποια φθορίζουσα πρωτεΐνη όπως GFP (τα κύτταρα θα πρέπει να είναι διαμολυσμένα με κατάλληλο φορέα) κ.ά..

1.3.2.1 Βασικές αρχές κυτταροδιαχωρισμού

Οι σύγχρονοι κυτταροδιαχωριστές στηρίζονται στον αποκαλούμενο «διαχωρισμό βάσει ηλεκτροστατικής σταγόνας». Σύμφωνα με αυτό, τα κύτταρα περιβάλλονται από ένα αδρανές υγρό (sheath) σε συνεχή ροή (stream) και διέρχονται από μια οπή (nozzle) διαμέτρου συνήθως 70, 85 ή 100 μm . Η διάμετρος επιλέγεται βάσει του μεγέθους των κυττάρων ενδιαφέροντος. Η συνεχής ροή «σπάει» σε διαδοχικές σταγόνες μετά από εφαρμογή ακουστικής κυμάτων (δύναμη), κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα κύτταρο.

Η πίεση υπό την οποία βρίσκεται η συνεχής ροή, η διάμετρος της οπής, η συχνότητα και το πλάτος του κύματος για τον βέλτιστο σχηματισμό των σταγόνων αλλά και η σταθερότητα του όλου συστήματος αποτελούν κρίσιμα σημεία της διαδικασίας για έναν επιτυχημένο και αδιατάραχτο διαχωρισμό υψηλής ταχύτητας και η καθαρότητας.

Η αρχή του διαχωρισμού στηρίζεται στην εφαρμογή κατάλληλης τάσης ώστε η κάθε σταγόνα που φέρει κύτταρο να φορτιστεί θετικά ή αρνητικά. Η φόρτιση συμβαίνει τη στιγμή που η ροή «σπάει» σε σταγόνες (breakoff point). Εν συνεχεία, η φορτισμένη σταγόνα μεταβαίνει σε ηλεκτρικό πεδίο καθώς διέρχεται ανάμεσα από δύο κατάλληλα φορτισμένες πλάκες παρεκτροπής (deflection plates) όπου και καθοδηγείται βάσει του φορτίου της στον επιθυμητό σωλήνα συλλογής.



Εικόνα 18. Κυτταροδιαχωρισμός. Η διάταξη του κυτταροδιαχωριστή κατά τον διαχωρισμό δύο πληθυσμών ενδιαφέροντος (πράσινο και κόκκινο). Αναγράφονται τα σημαντικότερα σημεία που αναφέρονται στο κείμενο. Η δέσμη λέιζερ απεικονίζεται με μπλε ενώ οι πλάκες εκτροπής με γκρι (φορτισμένες θετικά και αρνητικά). | ©BD Biosciences

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18, η ακτίνα λέιζερ «ανακρίνει» (interrogation point) το εξεταζόμενο κύτταρο ώστε να καθοριστεί πού ανήκει ενώ το σημείο στο οποίο η ροή «σπάει» σε σταγόνες λαμβάνει χώρα σε διαφορετικό σημείο κάτωθεν (breakoff). Αυτό το χρονικό διάστημα που χρειάζεται το κύτταρο για να μεταβεί από το σημείο «ανάκρισης» στο σημείο που ξεκινά ο σχηματισμός σταγόνας ονομάζεται «καθυστέρηση σταγόνας» (drop delay) και είναι υψίστης σημασίας για έναν επιτυχή διαχωρισμό, καθορίζεται από τον χρήστη και πρέπει να παραμείνει σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια τη διαδικασίας [182].

1.4 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

1.4.1 Παρατήρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο ολικής ανάκλασης (TIRF)

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε το φαινόμενο της μετακίνησης του ERF από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, διεγερμένων και μη κυττάρων HuT78, που έχουν διαμολυνθεί παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς (βλ. §1.1.2.7). Χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία ευρέος πεδίου (wide field microscopy) ολικής ανάκλασης TIRF (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) κατά την οποία απαιτείται ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας διέγερσης. Η τεχνική αυτή επιτρέπει εξαιρετικά λεπτές οπτικές τομές στην επιφάνεια επαφής των κυττάρων με το γυάλινο υπόστρωμα πάνω στο οποίο μεγαλώνουν ή είναι μονιμοποιημένα και οι προς παρατήρηση πρωτεΐνες είναι υβριδικές (fused) με παράγωγα της GFP ώστε μέσω φθορισμού να είναι ορατές.

1.4.1.1 Μονιμοποίηση και χρώση κυττάρων

Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο τύπου TIRF της Leica (DMI6000B) σε κύτταρα κατόπιν μονιμοποίησης σε ειδικές καλυπτρίδες. Ο πυρήνας των κυττάρων χρωματίστηκε με χρωστική DAPI η οποία συνδέεται στο DNA και φθορίζει δίνοντας μπλε χρώμα ενώ ο ERF είναι συνδεδεμένος με τη φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη που φθορίζει δίνοντας πράσινο χρώμα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε φακό μεγέθυνσης 63X. Για τη μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Alciant Blue (0.01%), παραφορμαλδεΰδη και διάλυμα με DAPI (σε αραίωση 1/1000).

1.5 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για τη μελέτη της έκφρασης του ενδογενούς ERF σε ολικά Τ λεμφοκύτταρα καθώς και στους υποπληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των λεμφοκυττάρων από ολικό αίμα υγιούς δότη και κατόπιν μαγνητικός διαχωρισμός των επιμέρους υποπληθυσμών.

1.5.1 Απομόνωση λεμφοκυττάρων από αίμα

Τα λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από ολικό αίμα μετά από προσθήκη διαλύματος Ficoll (Biocoll separating buffer, Biochrom), διάλυμα λύσης ερυθρών κυττάρων (ACK lysis buffer, 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2-7.4) και διαδοχικές εκπλύσεις. Ακολούθησαν εκπλύσεις με διάλυμα φωσφορικών αλάτων και τελική καταμέτρηση των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

1.5.2 Μαγνητικός διαχωρισμός λεμφοκυττάρων

Ολικά Τ λεμφοκύτταρα ή υποπληθυσμοί CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων διαχωρίστηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό μετά από επώαση με μεταλλικές μπίλιες με αντισώματα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (iMag, Human T Lymphocyte Enrichment Set-DM, Human CD4 T Lymphocyte Enrichment Set-DM, Human CD8 T Lymphocyte Enrichment Set-DM, BD Biosciences). Η τελική καθαρότητα των απομονωμένων κυτταρικών πληθυσμών εξακριβώθηκε με Κυτταρομετρία Ροής, μετά από χρώση με τα αντισώματα αντι-CD3 (κλώνος UCHT1), -CD4 (κλώνος L200), -CD8 (κλώνος RPA-T8) και -CD19 (κλώνος HIB19), όλα της εταιρίας BD Biosciences.

ΜΕΡΟΣ II: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΑ

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί του είδους *Mus musculus*. Πιο συγκεκριμένα δύο κατηγορίες διαγονιδιακών ποντικών:

A. Διαγονιδιακοί ποντικοί στελέχους B6.Cg-Tg(Lck-cre)I540Jxm/J [αλλιώς γνωστό ως Lck-Cre (Tg540-I), Jackson Laboratory [183]] γονοτύπου $Erf^{f/+};Lck^{cre}$ που φέρουν το γονίδιο *Cre* υπό τον έλεγχο του υποκινητή της *Lck* για ιστοειδική εξάλειψη του γονιδίου-στόχου στο θύμο αδένα. Οι ποντικοί προμηθεύτηκαν από το Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» της Αθήνας.

B. Διαγονιδιακοί ποντικοί στελέχους C57BL/6 γονοτύπου $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{+}$ που φέρουν το γονίδιο του *Erf* συνδεδεμένο στις P περιοχές του γονιδίου *LoxP* [118]. Οι ποντικοί παραχωρήθηκαν από το Δρ. Γ. Μαυροθαλασσίτη μέσω του IMBB-ITE Κρήτης.

2.1 Διαδικασία ηθικής διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου

Τα στελέχη διατηρούνται σε προστατευμένες συνθήκες αερισμού στις εγκαταστάσεις του εκτροφείου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι κλωβοί διαμονής των ζώων με σύστημα φιλτραρισμένου αυτόνομου αερισμού προμηθεύτηκαν από την Tecniplast. Όλες οι διαδικασίες μεταχείρισης των ζώων πραγματοποιήθηκαν σε σταθμό κάθετης νηματικής ροής CS5 EVO GP της Tecniplast. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σεβόμενα της αρχής των “The Three Rs”: Replacement, Reduction, Refinement.

2.2 Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων επιθυμητού γονότυπου

Για τη δημιουργία ποντικών γονότυπου $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}$ αλλά και διατήρηση της αποικίας των αρχικών γονοτύπων, πραγματοποιήθηκαν οι εξής διασταυρώσεις (Εικόνα 19):

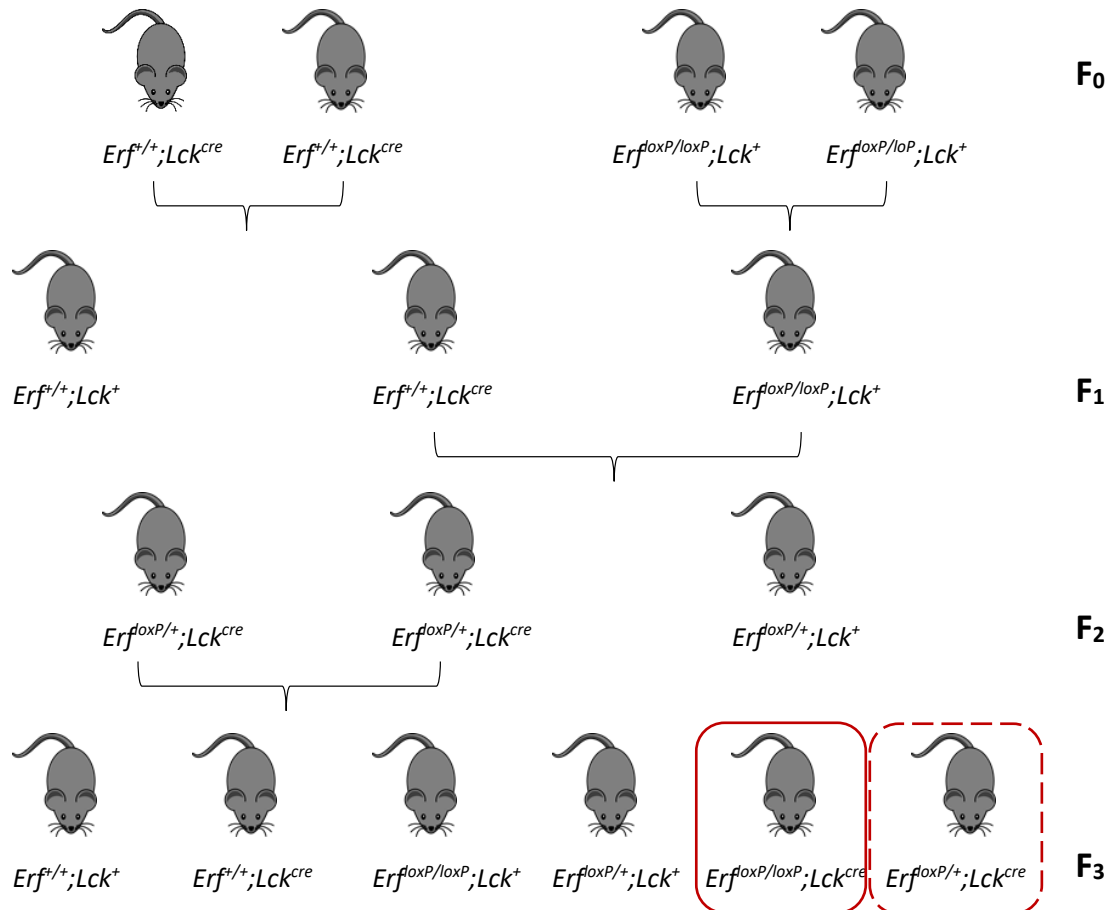
A. Διασταυρώσεις ποντικών γονοτύπου $Erf^{f/+};Lck^{cre}$ για διατήρηση αποικίας.

B. Διασταυρώσεις ποντικών γονοτύπου $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{+}$ για διατήρηση αποικίας.

Γ. Διασταυρώσεις ποντικών γονοτύπου $Erf^{f/+};Lck^{cre}$ με ποντικούς γονοτύπου $Erf^{LoxP/LoxP}/Lck^{+}$ για δημιουργία ποντικών με ενδιάμεσους γονότυπους.

Δ. Επιλεκτικές διασταυρώσεις ποντικών μεταξύ τους με γονότυπο $Erf^{loxP/+};Lck^{cre}$ για δημιουργία ζώων με όλους τους ενδιαμέσους γονότυπους έως και τον επιθυμητό $Erf^{loxP/loxP};Lck^{cre}$ της εξάλειψης του Erf .

[όπου «+» ορίζεται γονίδιο αγρίου τύπου]



Εικόνα 19. Σχεδιάγραμμα διασταυρώσεων. Στην πρώτη σειρά εμφανίζονται διασταυρώσεις τύπου Α και Β. Ακολουθούν διασταυρώσεις τύπου Γ και τελικά Δ όπου προκύπτουν όλοι οι πιθανοί γονότυποι. Σημειώνεται ότι για το γονίδιο Cre προτιμήθηκαν ποντικοί σε ημίζυγη κατάσταση εξαιτίας των πιθανών παρενεργειών του Cre. Παρόλ' αυτά, η έκφρασή του παρουσιάζει διαβαθμίσεις μεταξύ των ημίζυγων ποντικών (βλ. κείμενο). Γι' αυτό η ύπαρξη του γονιδίου συμβολίζεται με «Cre» χωρίς να αποκλείει, όμως, ότι οι ποντικοί που το φέρουν δε μπορούν να δώσουν απογόνους με γονίδιο αγρίου τύπου. Οι δύο γονότυποι ενδιαφέροντος σημειώνονται με κόκκινο πλαίσιο.

2.3 Χειρισμοί πειραματόζωων - Ταυτοποίηση διαγονιδιακών σειρών

Για την ταυτοποίηση των διαγονιδιακών σειρών, τα ζώα σημαίνονται σε ηλικία 12 ημερών με αποκοπή της κατώτατης φάλαγγας του δακτύλου τους (ή τμήματος του αυτιού τους) και συλλέγεται βιοψία ουράς (~0.5 εκ).

2.3.1 Απομόνωση DNA (hot shot DNA extraction)

Το τμήμα του ιστού που αποκόπηκε από το ζώο επωάζεται σε 300 μl διαλύματος 1 (25 mM NaOH and 0.2 mM EDTA pH12) για 15 λεπτά στους 94° C. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 2 (40 mM Tris-HCl, pH 4.5-3.5 πλήρως εξουδετερωμένου). Το υπερκείμενο συλλέγεται κατόπιν φυγοκέντρησης και η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται με φωτομέτρηση σε σπεκτροφωτόμετρο (Q5000, Quawell).

2.3.2 Απομόνωση κυττάρων από θύμο αδένες και σπλήνα

Τα ζώα θυσιάζονται κατόπιν αυχενικής εξάρθρωσης (cervical dislocation) και ζυγίζονται σε αναλογικό ζυγό. Τα όργανα θύμος και σπλήνας συλλέγονται σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και συνθλίβονται ώστε να απελευθερωθούν τα κύτταρα ως εναιώρημα. Το κυτταρικό εναιώρημα που περιέχει θυμοκύτταρα ή σπληνοκύτταρα ανά περίπτωση εκπλένεται με διάλυμα PBS) και τελικά το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε συγκεκριμένο όγκο ίδιου διαλύματος. Ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer στο μικροσκόπιο. Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε τμήματα για τρεις διακριτές διαδικασίες: ανάλυση των κυτταρικών υποπληθυσμών με κυτταρομετρία ροής, για απομόνωση DNA (βλ. §2.3.1) και RNA (βλ. §1.1.2.8).

2.3.3 Ανάλυση κυτταρικών υποπληθυσμών με Κυτταρομετρία Ροής

Φρέσκα θυμοκύτταρα ή σπληνοκύτταρα επωάζονται με αντισώματα έναντι επιφανειακών δεικτών σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθεί ανάλυση των κυτταρικών υποπληθυσμών σε κυτταρομετρητή ροής BD FACSAria III. Η ανάλυση πραγματοποιείται με το λογισμικό BD FACSDIVA Software v8. Τα αντισώματα και οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων φαίνονται στον Πίνακα 2 και προέκυψαν μετά από διεξαγωγή δοκιμαστικών πειραμάτων για εύρεση των βέλτιστων συγκεντρώσεων λειτουργίας τους. Για τις βασικές αρχές της Κυτταρομετρίας Ροής βλ. § 1.3.

Αντίσωμα	Αρχική [C] (mg/ml)	Βέλτιστη [C] (μg/ml)
CD4 PE-CF594 (RM4-5)	0.2	0.2
CD8 APC-H7 (53-6.7)	0.2	1.3
CD25 BB515 (PC61)	0.2	2.5
CD44 PE-Cy7 (IM7)	0.2	0.5
TCR β APC (H57-597)	0.2	1.0

Πίνακας 2. Τα αντισώματα, οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν μετά από πειράματα βελτιστοποίησης της μεθόδου. Σε παρένθεση κάτω από κάθε αντίσωμα αναγράφεται ο κλώνος παραγωγής του. Όλα τα αντισώματα είναι της BD Biosciences.

2.3.4 Ανίχνευση διαγονιδίων (γονοτύπηση) με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Βασική αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι η ανίχνευση και ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών και υπό συγκεκριμένες συνθήκες διαδοχικής μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας. Η τεχνική PCR χρησιμοποιείται ευρέως για την γονοτύπηση διαγονιδιακών ζώων καθώς αποτελεί μια ταχεία διαδικασία που επιτρέπει την ανίχνευση της επιθυμητής DNA αλληλουχίας σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων DNA. Για τις βασικές αρχές της τεχνικής βλ. §1.1.2.10.

Για να γίνει η γονοτύπηση των ποντικών στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τα διαγονίδια *Cre* και *Erf^{LoxP}*, για το γονίδιο της *β/γ* ακτίνης (χρησιμοποιείται ως “housekeeping” γονίδιο ελέγχου) αλλά και για να εξακριβωθεί κατά πόσο επιτεύχθηκε εξάλειψη του *Erf* και το *18S rRNA* ως γονίδιο αναφοράς. Οι αλληλουχίες των εκκινητών

που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε PCR φαίνονται στον Πίνακα 2. Για την ηλεκτροφόρηση του DNA βλ. §1.1.2.11.

2.3.5 Ποσοτική ανάλυση mRNA (Real Time RT-PCR, qRT-PCR)

Για την ποσοτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των παραγόμενων mRNA ενός γονιδίου ενδιαφέροντος χρησιμοποιείται ποσοτική (quantitative) PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Ο προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος στηρίζεται στην εκπομπή φθορισμού μίας φθορίζουσας ουσίας η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο DNA και μετράται σε κάθε κύκλο ενίσχυσης της PCR. Τελικά, προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης και τίθεται ένα κατώφλι ώστε να διαχωρίζεται το ειδικό από το μη ειδικό σήμα («θόρυβος»). Σημαντικός παράγοντας για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή C_q ή C_t (quantification cycle ή threshold cycle) που προκύπτει από την καμπύλη ενίσχυσης και αποτελεί τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται ώστε ο παρατηρούμενος φθορισμός να προσεγγίζει την τιμή του ορίου που τέθηκε. Χαρακτηριστικό της τιμής C_q είναι ότι είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος (cDNA) που χρησιμοποιήθηκε [184].

Για να μελετηθεί το επίπεδο της έκφρασης του *Erf* συναρτήσει της ιστοειδικής εξάλειψής του, πραγματοποιήθηκε qRT-PCR με κατάλληλους εκκινητές που ενισχύουν το cDNA του γονιδίου του *Erf* (Πίνακας 3). Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν cDNAs προερχόμενα από mRNAs από θυμοκύτταρα που απομονώθηκαν από κάθε ζώο ενδιαφέροντος (για διαδικασίες βλ. §1.1.2.8-9). Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε είναι η SYBR Green I (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad), μια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική που διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Η ποσοτικοποίηση της σχετικής έκφρασης του *Erf* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της $2^{-\Delta\Delta CT}$ μετά από κανονικοποίηση των τιμών C_q για κάθε δείγμα με την αντίστοιχη τιμή C_q ενός γονιδίου αναφοράς (reference gene). Στην συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *18s rRNA*. Ομοίως προσδιορίστηκε, όπου κρίθηκε απαραίτητο, και η σχετική έκφραση του γονιδίου *cre*. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τη μελέτη της έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή CFX 96 της Bio-Rad. Στην περίπτωση όπου το απομονωμένο RNA ήταν

πολύ χαμηλής συγκέντρωσης εξαιτίας του μικρού αριθμού των αρχικών κυττάρων (<50.000), πραγματοποιήθηκε one-step qPCR με το μείγμα FAST One-Step Universal της KAPA.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν καθώς και το είδος της PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

5' -> 3' DNA Αλληλουχία	Γονίδιο-στόχος	Είδος PCR
GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	<i>Cre</i>	Regular PCR/qRT-PCR
TTGCTGACAGGATGCAGAAG ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	<i>β/γ ακτίνη</i>	Regular PCR
CAGCAAAAGCTCAGGGAGTG ACGCCACAGCCCAATCTCC	<i>Erf^{LoxP}</i>	Regular PCR
GCACTGCTAGCTCTGAATGG CAGCAAAAGCTCAGGGAGTG	εξάλειψη του <i>Erf</i>	Regular PCR
TGTGGCACTTTATCCTGGAG CTTGTAAGGTGAACCGTTTCC	<i>Erf</i>	qRT-PCR
GCTGCTGGACCAGACTT CGGCTACCACATCCAAGG	<i>18S rRNA</i>	qRT-PCR
CCCGAGGATGACCTGATTGG CCTGCGTCCTGATGGTGAG	<i>ThPOK</i>	qRT-PCR
CTCGGCCATTCGTACATGGAA GGATACCTCTGCACCGTAGC	<i>Gata3</i>	qRT-PCR
CCCTGGGTAAAGAATGCTTCC GCTGATGAAGTAATCCGAGGTG	<i>Ets1</i>	qRT-PCR
CCTGTCGCCAACAGTTTTCG TGGAGTGTCTGATCTTCACTGA	<i>Ets2</i>	qRT-PCR

CAGGTTCAACGACCTTCGATT	<i>Runx3</i>	qRT-PCR
GTGGTAGGTAGCCACTTGGG		
ATGGTGGTCCTGCTGATGTG	<i>MAZR</i>	qRT-PCR
GGAAGTATGGTGTGCATCTC		
AGACCCCGACACAGCATCTA	<i>Myb</i>	qRT-PCR
TAGTTTTCCCAAGTGACGCT		
CTGCGGCTTCTATTGGGGAC	<i>Socs1</i>	qRT-PCR
AAAAGGCAGTCGAAGGTCTCG		
Hs_CCND1_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen)	<i>CCND1</i>	qRT-PCR

Πίνακας 3. Εκκινητές για διάφορα γονίδια στον ποντικό. Οι εκκινητές (ανά 2 αποτελούν ζεύγη “sense-antisense εκκινητών” και διαχωρίζονται με γραμμή) που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο στο αντίστοιχο είδος της PCR.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα υπολογιστικών φύλλων Excel 2010 του Microsoft Office της Microsoft με τη χρήση του πρόσθετου στατιστικού πακέτου. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό τεστ (unpaired) two-tailed Student’s T-Test και με Ανάλυση Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (One-way Analysis of Variance, ANOVA). Στατιστικώς σημαντικές θεωρήθηκαν οι μεταβολές με $P < 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Ι: *IN VIVO*

1.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΤΟΥ *ERF*

Για τη μελέτη της επίδρασης του *Erf* στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων δημιουργήθηκαν διαγονιδιακοί ποντικοί με εξάλειψη του *Erf* στο θύμο με το σύστημα *Cre/lox* [163], [164]. Για τις διασταυρώσεις χρησιμοποιήθηκαν στελέχη B6.Cg-Tg(Lck-cre)I540Jx^m/J γονοτύπου *Erf^{f/+};Lck^{cre}* [185] και C57BL/6 γονοτύπου *Erf^{loxP/loxP};Lck⁺* [118]. Για τη γονοτύπηση, τόσο των ενήλικων ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στις αρχικές διασταυρώσεις όσο και των νεαρών κάθε γέννας που προορίζονταν για περεταίρω διασταυρώσεις ή θυσία, πραγματοποιήθηκαν PCR για την ανίχνευση των διαγονιδίων *Cre* και *loxP* αλλά και την επαλήθευση της εξάλειψης του *Erf* στον γονότυπο ενδιαφέροντος.

1.1.1 Έλεγχος διαγονιδιακών ποντικών για παρουσία του *Lck-Cre*

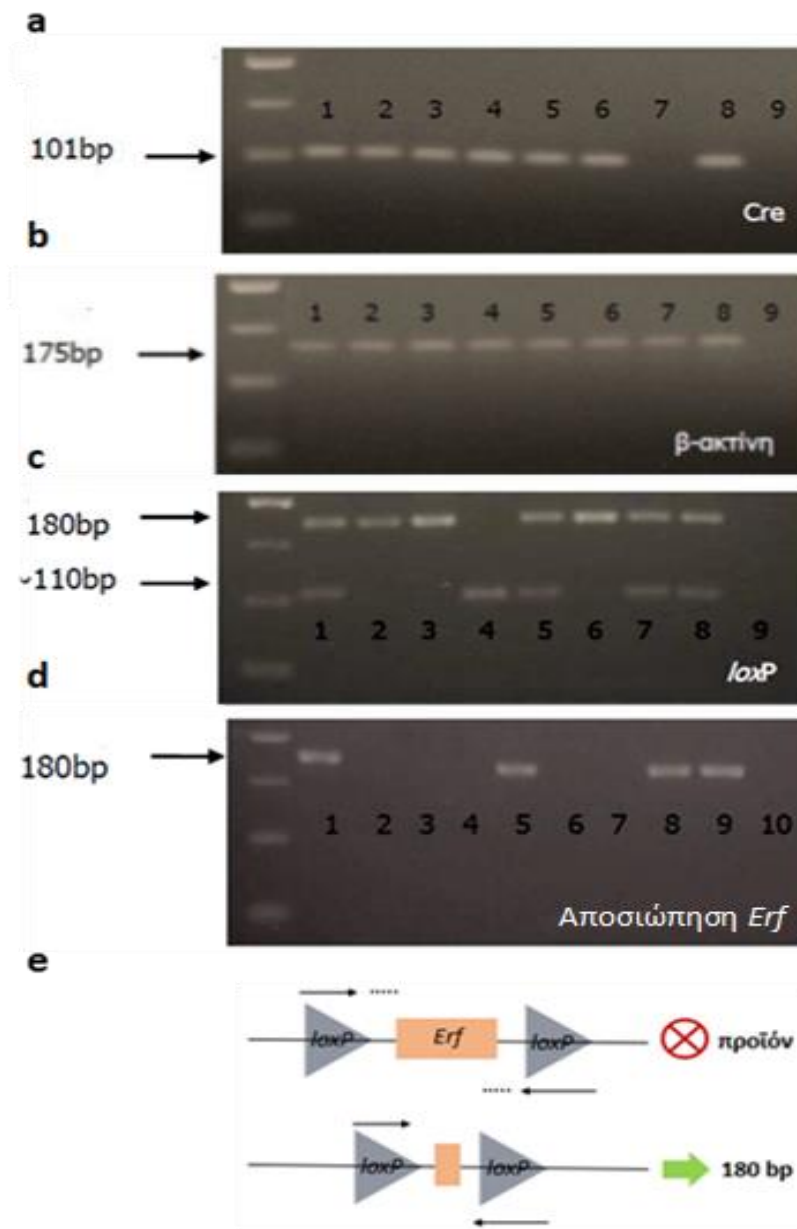
Η συγκεκριμένη PCR ταυτοποιεί μόνο την ύπαρξη του γονιδίου *Cre* χωρίς την ταυτόχρονη ταυτοποίηση της ημιζυγωτίας ή της ομοζυγωτίας. Παρουσία προϊόντος 101bp στο πήκτωμα δηλώνει την ύπαρξη του γονιδίου *Cre* ενώ η απουσία προϊόντος δηλώνει την απουσία του *Cre* (αγρίου τύπου). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιείται η β-ακτίνη επιβεβαιώνοντας τη λειτουργικότητα των εκμαγείων (παρουσία προϊόντος 175bp) (Εικόνα 20. a, b αντίστοιχα).

1.1.2 Έλεγχος διαγονιδιακών ποντικών για παρουσία *floxed Erf*

Για την πιστοποίηση ύπαρξης “floxed” *Erf* κατά την PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές σχεδιασμένοι με τέτοιον τρόπο ώστε η παρουσία προϊόντος διπλής ζώνης να δηλώνει ετερόζυγο διαγονιδιακό άτομο (ζώνη 180bp για το διαγονίδιο και 110bp για το αγρίου τύπου) ενώ η παρουσία προϊόντος μονής ζώνης των 180bp, να δηλώνει ομόζυγο διαγονιδιακό άτομο. Ύπαρξη προϊόντος μονής ζώνης 110bp δηλώνει ζώο αγρίου τύπου (Εικόνα 20. c).

1.1.3 Έλεγχος της εξάλειψης του *Erf*

Η επαλήθευση της ιστοειδικής εξάλειψης του *Erf* πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από τα θυμοκύτταρα των ποντικών της γενιάς ενδιαφέροντος μετά από θυσία. Η ύπαρξη προϊόντος στη συγκεκριμένη PCR δηλώνει επιτυχή εξάλειψη του *Erf*. Πιο αναλυτικά, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιον τρόπο ώστε να αναγνωρίζουν ειδικές «floxed» αλληλουχίες του *Erf*, οι οποίες απέχουν αρκετές βάσεις μεταξύ τους. Λόγω της μεγάλης απόστασης οι εκκινητές δεν είναι ικανοί να παράγουν προϊόν παρουσία του γονιδίου. Αντιθέτως, με την εξάλειψη του γονιδίου η απόσταση μειώνεται με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντος 180bp (Εικόνα 20. d, e). Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη PCR δεν έχει ποσοτικά χαρακτηριστικά, δηλαδή, δείχνει μόνο την πραγματοποίηση της εξάλειψης του “floxed” *Erf* χωρίς, όμως, να παρέχει κάποια πληροφορία για το ποσοστό των κυττάρων στα οποία συνέβη εξάλειψη του *Erf*. Συνεπώς, ο έλεγχος της ποσοτικής έκφρασης του *Erf* πραγματοποιείται εν συνεχεία σε επίπεδο RNA με χρήση RT-qPCR.

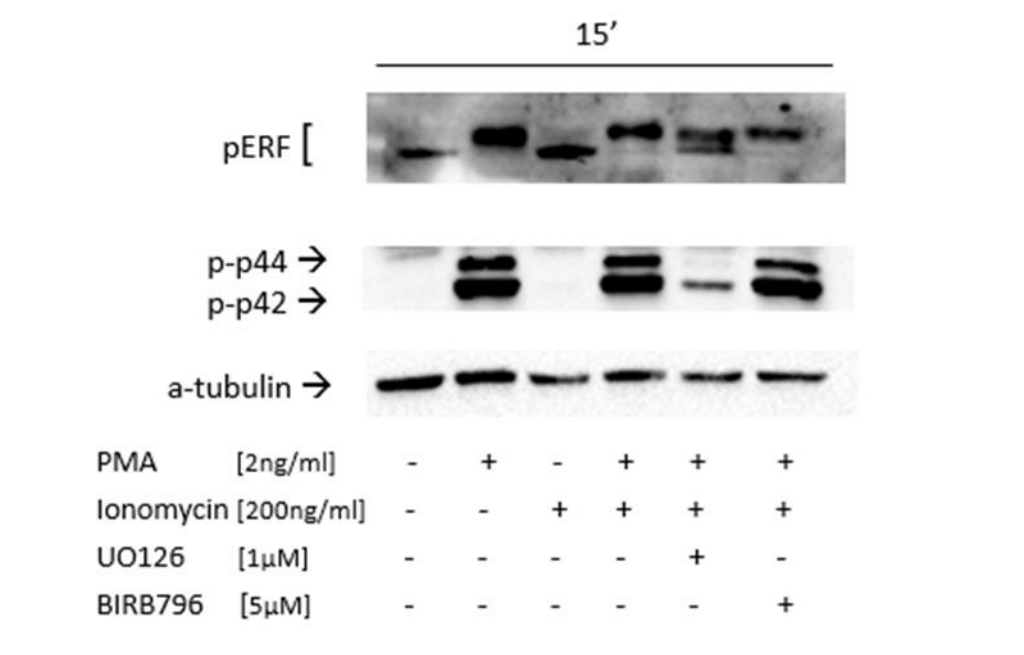


Εικόνα 20. Ταυτοποίηση ύπαρξης διαγονιδίων. α) Cre, β) β-ακτίνης, γ) loxP και δ) επαλήθευση εξάλειψης του Erf. α) Η ύπαρξη προϊόντος υποδηλώνει παρουσία του διαγονιδίου Lck-cre. Έτσι, τα νούμερα 1-6,8 αντιστοιχούν σε ποντικούς που φέρουν το Lck-Cre ενώ το 7 σε ποντικό αγρίου τύπου. β) Όλα τα ζώα φέρουν το γονίδιο της β-ακτίνης που χρησιμοποιείται ως γονιδίου ελέγχου. γ) Η ύπαρξη ζώνης 180bp αντιστοιχεί στο διαγονίδιο Erf-loxP ενώ 110bp σε γονίδιο Erf αγρίου τύπου. Έτσι, τα δείγματα 2, 3 και 6 αντιστοιχούν σε ομόζυγα ζώα, τα δείγματα 1, 5, 7, 8 σε ετερόζυγα ζώα καθώς εμφανίζουν και τις δύο ζώνες ενώ το 4 σε ζώο αγρίου τύπου. δ) Η ύπαρξη προϊόντος υποδηλώνει εξάλειψη του Erf. Τα δείγματα 1, 5, 8 και 9 αντιστοιχούν σε ζώα με επιτυχή εξάλειψη του Erf. Οι θέσεις 9 (α, β, γ) και 10 (δ) αντιστοιχούν στη συνθήκη ελέγχου καθαρότητας και επιμολύνσεων της PCR (H₂O). ε) Σχηματική παράσταση του μηχανισμού λειτουργίας των εκκινητών για τον έλεγχο της εξάλειψης του Erf. Μεταξύ των loxP περιοχών παρεμβάλλονται πολλές βάσεις και είναι αδύνατη η παραγωγή προϊόντος. Ελλείψει Erf, οι εκκινητές παράγουν προϊόν 180bp.

1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΛΕΙΨΗΣ ΤΟΥ *ERF* ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΣΕ ΘΥΜΟ ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ.

Πρωτεϊνικά επίπεδα του Erf σε ζώα αγρίου τύπου

Αρχικός στόχος ήταν η επιβεβαίωση της έκφρασης του *Erf* σε θυμοκύτταρα ζώων αγρίου τύπου. Έτσι, ολικά θυμοκύτταρα απομονωθήκαν από ζώο αγρίου τύπου και επωάστηκαν για 15 λεπτά υπό διαφορετικές συνθήκες διέγερσης με PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), το οποίο επάγει τις PKC (πρωτεϊνική κινάση C) και Erk, και Ιονομυκίνη, η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι του ασβεστίου (Ca^{++}), παρουσία ή όχι των αναστολέων UO126 ή BIRB796 έναντι των φωσφο-κινασών Erk και p38 αντίστοιχα. Εν συνεχεία ακολούθησε λύση των κυττάρων προς συλλογή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και η έκφραση του ERF μελετήθηκε με Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 21). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ERF εκφράζεται σε αδιέγερτα και διεγερμένα θυμοκύτταρα, ενώ μετά από διέγερση είτε με PMA ή με PMA και Ιονομυκίνη ο ERF απαντάται στη φωσφορυλιωμένη κατάσταση.



Εικόνα 21. Πρωτεϊνικά επίπεδα *Erf* σε θυμοκύτταρα ζώου αγρίου τύπου. Ο *Erf* εκφράζεται σε αδιέγερτα και σε διεγερμένα θυμοκύτταρα ενώ η φωσφορυλίωσή του εξαρτάται από την *Erk*, όχι, όμως από την *p38* ή το μονοπάτι του Ca^{++} .

Παρουσία του αναστολέα της Erk, ο ERF απαντάται φωσφορυλιωμένος και αποφωσφορυλιωμένος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωσή του είναι εξαρτώμενη της Erk. Τέλος, παρουσία του αναστολέα της p38 ή μετά από διέγερση μόνο με Ιονομυκίνη, η φωσφορυλίωση του ERF δε φαίνεται να επηρεάζεται, κάτι που υποδηλώνει ότι η p38 και το σηματοδοτικό μονοπάτι του ασβεστίου (Ca^{++}) δε ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση του ERF. Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, προκαταρκτικά πειράματα για τη μελέτη της έκφρασης του *Erf* στους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων και των σπληνικών T κυττάρων ζώου αγρίου τύπου σε επίπεδο RNA. Έτσι, θυμοκύτταρα και σπληνοκύτταρα απομονώθηκαν και επωάστηκαν με τα αντισώματα αντι-CD4,-8 και -TCR β . Οι CD4+, CD8+, DP και TCR β υποπληθυσμοί του θύμου συλλέχθηκαν μετά από κυτταροδιαχωρισμό (10.000 κύτταρα ανά υποπληθυσμό) ενώ το ποσοστό του υποπληθυσμού DN ήταν πολύ χαμηλό γι' αυτό και δε συλλέχθηκαν κύτταρα. Αναφορικά με τα σπληνοκύτταρα, συλλέχθηκαν 10.000 κύτταρα από τους υποπληθυσμούς CD4+ και CD8+. Η έκφραση του *Erf* μελετήθηκε με RT-qPCR και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο *Erf* φαίνεται να εκφράζεται ισόποσα στους διάφορους υποπληθυσμούς που μελετήθηκαν (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Συμπερασματικά, ο ERF εκφράζεται σε αδιέγερτα και διεγερμένα θυμοκύτταρα, ενώ η φωσφορυλίωσή του φαίνεται να είναι εξαρτώμενη της Erk, όχι, όμως, της p38 ή του σηματοδοτικού μονοπατιού του Ca^{++} . Επιπλέον, η μεταγραφική έκφραση του *Erf* δε φαίνεται να διαφοροποιείται ανάμεσα στους διάφορους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων και στους υποπληθυσμούς των CD4+ και CD8+ σπληνικών T κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Erf* είναι απαραίτητος αφενός σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων αφετέρου η έκφρασή του δεν περιορίζεται στον υποπληθυσμό των βοηθητικών ή των κυτταροτοξικών κυττάρων του σπλήνα, αλλά απαντάται ισόποσα και στους δύο, εύρημα που είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία περί της οικουμενικότητας της έκφρασης του *Erf* στους ιστούς του οργανισμού [111].

1.2.1 Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Erf* και *Lck-Cre* στα ζώα μελέτης

Πριν προβούμε στη μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *Erf* και *Lck-Cre* αλλά και γενικότερα στη συνέχεια της έρευνάς μας, κληθήκαμε να επιλέξουμε τα ζώα που θα συμπεριλαμβάναμε στη μελέτη από το συνολικό αριθμό των θυσιασθέντων ζώων με κύριο

άξονα κριτηρίων α) το βαθμό εξάλειψης του *Erf* στους ποντικούς όπου αναμένουμε να έχει συμβεί η εξάλειψη και β) την ισόποση έκφραση του *Lck-Cre* μεταξύ των ζώων.

Επιλογή ζώων μελέτης

Αρχικά, αντιμετωπίσαμε το εξής ερώτημα: «ποιος γονότυπος αποτελεί το αντικειμενικό γονότυπο ελέγχου;». Εξαιτίας των «εκτός στόχου» επιπτώσεων που προκαλεί η έκφραση του διαγονιδίου *Lck-Cre*, ανεξαρτήτως της ύπαρξης floxed γονιδίου (βλ. §5.1.3) και σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία [172]–[174], ως κύριος γονότυπος ελέγχου επιλέχθηκε ο *Erf^{f+/+};Lck^{cre}*. Έτσι, η στατιστική μελέτη των επιπτώσεων της εξάλειψης του *Erf* έγιναν ανάμεσα σε ζώα γονότυπου *Erf^{f+/+};Lck^{cre}* και σε ζώα με εξάλειψη του *Erf*, ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι «παράπλευρες» επιπτώσεις του *Lck-Cre* και κατά συνέπεια, τα εξαγόμενα συμπεράσματα να συνιστούν αληθείς παρατηρήσεις που οφείλονται στην εξάλειψη του *Erf*. Συμπληρωματικοί γονότυποι ελέγχου ήταν οι *Erf^{f+/+};Lck⁺* και *Erf^{loxP/+};Lck⁺* και *Erf^{loxP/loxP};Lck⁺*. Οι δύο τελευταίοι γονότυποι συνενώθηκαν και αντιμετωπίστηκαν ως ένας καθώς ο ομόζυγος ως προς το floxed γονίδιο γονότυπος «συμπεριλαμβάνει» και τις τυχούσες επιδράσεις που προέρχονται από τον ετερόζυγο ως προς το floxed γονίδιο γονότυπο, χωρίς να έχουν παρατηρηθεί «εκτός στόχου» επιπτώσεις αυτού του γονότυπου. Επιπροσθέτως, σε όλους τους γονότυπους ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν γενικώς στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους που μελετήσαμε. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την καταλληλότητα των επιλεγμένων ποντικών ελέγχου.

Οι ποντικοί ενδιαφέροντος όπου αναμένεται εξάλειψη του *Erf* διακρίθηκαν σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με το βαθμό εξάλειψης του *Erf*: i) με ομόζυγη εξάλειψη και συνεπώς μη ανιχνεύσιμη έως ελάχιστη έκφραση του *Erf* με ανώτατο όριο σχετικών μεταγραφικών επιπέδων την τιμή 0.6 και ii) με ετερόζυγη εξάλειψη και συνεπώς με μικρή έκφραση του *Erf* και εύρος τιμών σχετικών μεταγραφικών επιπέδων 0.3-1. Όπως είδαμε, οι δύο αυτοί πληθυσμοί διέφεραν στατικά σημαντικά μεταξύ τους ως προς τα μεταγραφικά επίπεδα του *Erf*.

Μεταξύ των διαγονιδιακών ζώων που εκφράζουν το διαγονίδιο *Lck-Cre* για τους τρεις γονότυπους, επιλέχθηκαν αυτά με χαμηλά έως μέτρια επίπεδα έκφρασης του *Lck-Cre* που δε διαφέρουν, όμως, ως σύνολο στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των γονοτύπων (βλ.

παρακάτω). Έτσι, τα σχετικά μεταγραφικά επίπεδα βρίσκονται μεταξύ των ορίων 0.3 (κατώτατο) και 2 (ανώτατο), καθώς είδαμε ότι ποντικοί με σχετικά μεταγραφικά επίπεδα άνω του ανώτατου ορίου 2, παρουσίαζαν σημαντικά αλλοιωμένους υποπληθυσμούς θυμοκυττάρων και σπληνικών κυττάρων. Από την άλλη, μεταγραφική έκφραση κάτω του κατωτάτου ορίου 0.3 δεν επέφερε ικανοποιητική εξάλειψη του *Erf*. Με τον τρόπο αυτό αφενός εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων αφετέρου αποκλείονται όσο δυνατόν περισσότερες παρενέργειες που οφείλονται στην έκφραση του *Lck-Cre*, όπως προαναφέρθηκε (βλ. §5.1.3).

Από τα 70 ζώα ηλικίας 4-12 εβδομάδων που θυσιάστηκαν συνολικά μόνο τα 41 πληρούσαν τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τελικά στην παρούσα μελέτη. Τα υπόλοιπα ζώα κρίθηκαν ακατάλληλα κυρίως επειδή παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση του *Lck-Cre* (πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή έκφραση) όπως προαναφέρθηκε. Πράγματι, ζώα με στατιστικώς σημαντικά αυξημένη έκφραση του *Lck-Cre* παρουσίασαν αλλοιωμένους φαινοτύπους σε θύμο και σπλήνα, καθώς τα ποσοστά των επιμέρους υποπληθυσμών διαφοροποιούνταν σημαντικά συγκριτικά με τα υπόλοιπα ζώα με μέση έκφραση σε *Lck-Cre*, κάτι που συμφωνεί με πρόσφατες έρευνες που αναφέρουν ότι το διαγονίδιο *Lck-Cre* είναι υπεύθυνο για πρόκληση φαινοτύπων σε θύμο και σπλήνα που αποκλίνουν σημαντικά από τα ζώα αγρίου τύπου [172], [173], γι' αυτό και τέθηκαν εξαρχής εκτός μελέτης. Επιπροσθέτως, σε κάποια ζώα δεν πραγματοποιήθηκε επιτυχής εξάλειψη του *Erf* καθώς ανιχνεύτηκε μεταγραφική έκφραση του *Erf* άνω του ανώτατου ορίου που θέσαμε, παρότι ανήκαν γονοτυπικά στους γονότυπους *Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}* και *Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}*. Έτσι, 18 ζώα αποκλείστηκαν από την έρευνα λόγω υψηλής έκφρασης *Lck-Cre*, άνω του ορίου που θέσαμε, ενώ τα υπόλοιπα 11 ζώα λόγω μη εξάλειψης του *Erf*.

Τέλος, θυσιάστηκαν 30 περίπου ζώα ηλικίας 10-15 ημερών και πραγματοποιήθηκε η ίδια μελέτη της εξάλειψης του *Erf* στους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων και των σπληνοκυττάρων. Τα συγκεχυμένα αποτελέσματα και ο μικρός αριθμός των ζώων που θυσιάστηκαν δεν μας επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος σχετικά με την επίδραση του *Erf* στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων και στους υποπληθυσμούς των

σπληνοκυττάρων των ζώων αυτής της ηλικίας. Συνεπώς τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζονται. Ο τελικός απολογισμός των θυσιασθέντων ζώων ανέρχεται στα 100.

Μεταγραφικά επίπεδα *Erf* και *Lck-Cre*

Η μελέτη της έκφρασης του *Erf* και, εν συνεχεία, της επίδρασης της εξάλειψης του *Erf* στους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων και των σπληνοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε «αδελφά» ζώα (littermates) γεννημένα στην ίδια γέννα. Βασικό κριτήριο ήταν στην κάθε γέννα να απαντώνται όλοι οι γονότυποι, δηλαδή, οι γονότυποι ελέγχου *Erf^{+/+};Lck⁺*, *Erf^{+/+};Lck^{cre}*, *Erf^{loxP/loxP}*; ή *Erf^{loxP/+};Lck⁺* και οι γονότυποι *Erf^{loxP/loxP};Lck^{cre}* και *Erf^{loxP/+};Lck^{cre}* όπου αναμένεται εξάλειψη του *Erf*. Ομομικτικές διασταυρώσεις και διαδοχικές γέννες οδήγησαν στον συνολικό αριθμό των εβδομήντα ζώων που θυσιάστηκαν στην παρούσα έρευνα (βλ. Εικόνα 19, σχεδιάγραμμα διασταυρώσεων, σελ.84). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται το πλήθος των ζώων ανά γονότυπο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί ηλικίας 4-12 εβδομάδων και θυσιάστηκαν με σκοπό τη συλλογή θύμου και σπλήνα ενώ μετά από μηχανική σύνθλιψη των οργάνων, απομονωθήκαν ολικά θυμοκύτταρα και σπληνοκύτταρα. Αρχικά, ελέγχθηκε η μεταγραφική έκφραση του *Erf* και του *Lck-Cre* με RT-qPCR σε cDNA από mRNA των θυμοκυττάρων που απομονώθηκαν από τα ζώα αφού εξασφαλίστηκε η πέψη του γονιδιακού DNA με χρήση του ενζύμου DNAση (Εικόνα 22). Στη συνέχεια, οι υποπληθυσμοί των θυμοκυττάρων και των σπληνικών Τ κυττάρων μελετήθηκαν με Κυτταρομετρία Ροής μετά από επώαση με αντισώματα έναντι των χαρακτηριστικών μορίων-δεικτών για τις διάφορες φάσεις ωρίμανσης των θυμοκυττάρων όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

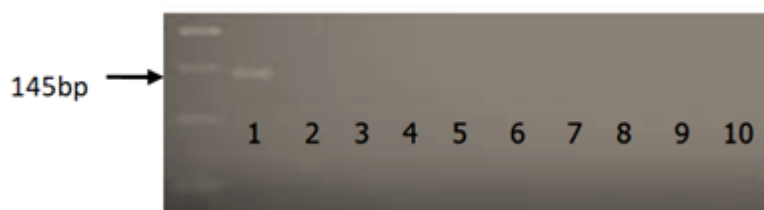
Στην Εικόνα 23 παρουσιάζονται τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *Erf* και του *Lck-Cre* στο θύμο στο σύνολο των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν ανά γονότυπο. Αναφορικά με τα μεταγραφικά επίπεδα του *Erf*, παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές με σαφώς χαμηλότερα επίπεδα στους γονότυπους ενδιαφέροντος *Erf^{loxP/loxP};Lck^{cre}* και *Erf^{loxP/+};Lck^{cre}*, όπου έχει εξαλειφθεί ο *Erf*, συγκριτικά με τον κύριο γονότυπο ελέγχου *Erf^{+/+};Lck^{cre}*, κάτι που ήταν αναμενόμενο, με $P < 0.0015$ και 0.0056 αντίστοιχα, ενώ και

μεταξύ των γονοτύπων όπου έχει συμβεί εξάλειψη του *Erf* υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.02$). Αντίθετα, η έκφραση του *Erf* για όλους τους γονότυπους ελέγχου δεν μεταβάλλεται στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.096$). Αξιοσημείωτα, παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στην έκφραση του *Erf* μεταξύ των ζώων φαινοτύπου *Erf^{f/+}* ίσως εξαιτίας του εύρους των ηλικιών των ζώων καθώς ζώα ηλικίας 4-5 εβδομάδων φαίνεται να έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *Erf* συγκριτικά με ζώα ηλικίας 10-12 εβδομάδων.

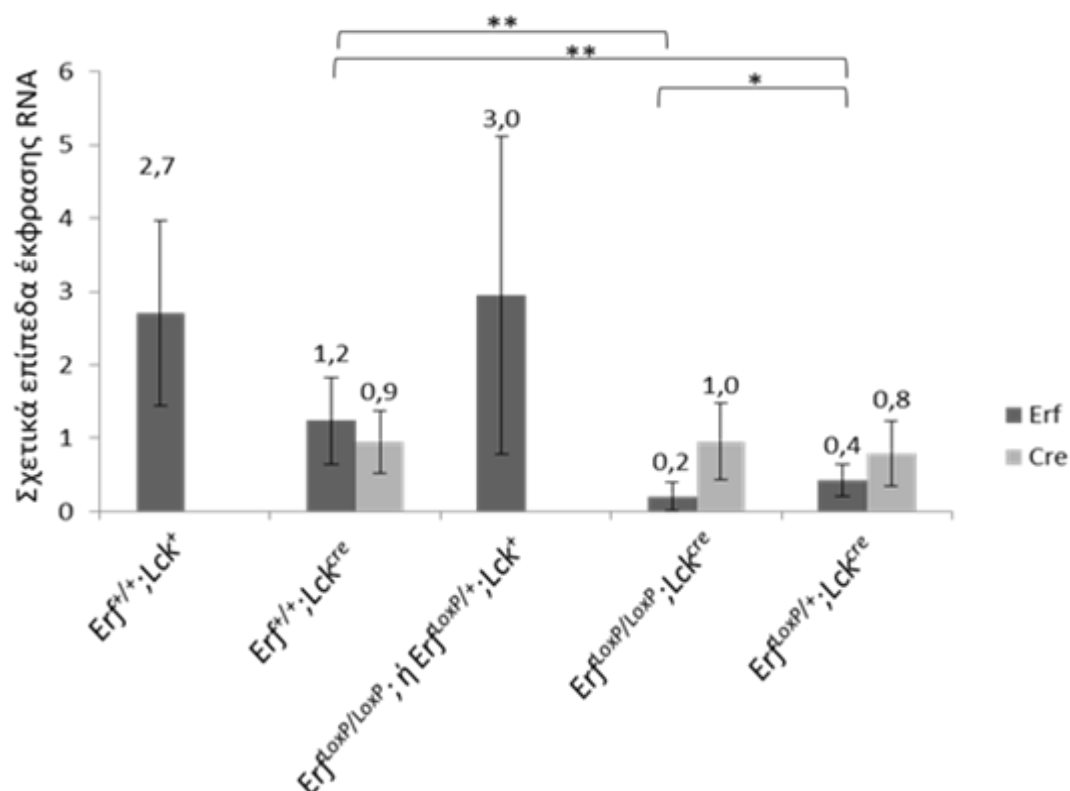
Αναφορικά με τα ζώα της μελέτης όπου αναμένεται έκφραση του διαγονιδίου *Lck-Cre* δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων *Erf^{f/+};Lck^{cre}*, *Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}* και *Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}* ($P < 0.7268$), γεγονός που σημαίνει ότι τα ζώα που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη δεν διαφοροποιούνται ως προς την έκφραση του *Lck-Cre*, συνεπώς, το *in vivo* σύστημα που δημιουργήσαμε αποτελεί ένα αντικειμενικό εργαλείο για τη συνέχιση της έρευνάς μας.

Γονότυπος	Μέγεθος δείγματος
<i>Erf^{f/+};Lck⁺</i>	6
<i>Erf^{f/+};Lck^{cre}</i>	9
<i>Erf^{LoxP/LoxP}; ή Erf^{LoxP/+};Lck⁺</i>	7
<i>Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}</i>	9
<i>Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}</i>	10

Πίνακας 4. Στοιχεία των ζώων που συμπεριλήφθηκαν τελικά στη μελέτη.



Εικόνα 22. Έλεγχος δειγμάτων RNA για επιμόλυνση από γενωμικό DNA πριν τη χρήση τους σε RT-qPCR. Πλήρης πέψη γενωμικού DNA. Οι θέσεις 2-9 αντιστοιχούν σε δείγματα χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση ενώ το 1 συμβολίζει τον θετικό μάρτυρα με ύπαρξη ζώνης γενωμικού DNA. Η θέση 10 αντιστοιχεί σε δείγμα ελέγχου καθαρότητας και επιμολύνσεων της PCR (H_2O).



Εικόνα 23. Μεταγραφική έκφραση *Erf* και *Cre* στο θύμο μεταξύ των γονοτύπων στο σύνολο των ζώων που επιλέχθηκαν στη μελέτη. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μόνο ως προς την έκφραση του *Erf* με σαφώς χαμηλότερα επίπεδα στους γονότυπους ενδιαφέροντος συγκριτικά με τους γονότυπους ελέγχου, κάτι που ήταν αναμενόμενο ενώ διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους και οι γονότυποι ενδιαφέροντος ($P < 0.026$). Με σκούρο γκρι συμβολίζεται η έκφραση του *Cre* και με πιο ανοιχτό του *Erf*. Παντού αναγράφονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης όπως προέκυψαν μετά από κανονικοποίηση με γονίδιο αναφοράς. Η στατιστική σημαντικότητα σημειώνεται με μονό αστερίσκο, *, όπου $P < 0.05$, με διπλό αστερίσκο, **, όπου $P < 0.01$ και με τριπλό αστερίσκο, ***, όπου $P < 0.001$.

1.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο συνολικός αριθμός των θυμοκυττάρων που απομονώνονταν από κάθε ποντικό ανεξαρτήτως γονότυπου κυμαινόταν στα 60-80 εκ. κύτταρα ενώ σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνταν στον αριθμό των νεκρών κυττάρων εκτός από μεμονωμένες περιπτώσεις ζώων με χαρακτηριστικά μικρούς θύμους (κυρίως γονότυπου $Erf^{floxP/LoxP};Lck^{cre}$) χωρίς να αποτελεί κανόνα και χωρίς να είναι στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των διάφορων γονότυπων. Για τη μελέτη των φάσεων ωρίμανσης, τα θυμοκύτταρα επώαστηκαν με τα αντισώματα αντι-CD4, -CD8, -CD25, -CD44 και αντι-TCRβ και αναλύθηκαν με Κυτταρομετρία Ροής (Εικόνα 24). Όπως προαναφέρθηκε, η έκφραση των μορίων CD4 και CD8 διακρίνει τα θυμοκύτταρα σε τρία κύρια στάδια: διπλά αρνητικά (DN), διπλά θετικά (DP) και μονά θετικά (SP) κύτταρα (Εικόνα 24. b). Τα DN θυμοκύτταρα κατηγοριοποιούνται περεταίρω βάσει της έκφρασης των μορίων επιφανείας CD44 και CD25: CD44⁺ CD25⁻ (DN1), CD44⁺ CD25⁺ (DN2), CD44⁻ CD25⁺ (DN3) και CD44⁻ CD25⁻ (DN4) θυμοκύτταρα (Εικόνα 24. c). Τέλος, η β αλυσίδα του TCR αρχίζει να εκφράζεται μετά την DN3 φάση [17], [18], [23].

1.2.2.1 Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ERF ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΑ CD4⁺ ΚΑΙ TCRβ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΣΤΑ DP ΚΥΤΤΑΡΑ.

Για τη διερεύνηση των υποπληθυσμών των θυμοκυττάρων κατά τις SP CD4⁺, SP CD8⁺, DN και DP φάσεις ωρίμανσης, θυμοκύτταρα επώαστηκαν με αντισώματα έναντι των μορίων CD4, CD8 και της β αλυσίδας του TCR (TCRβ) και αναλύθηκαν ως προς την έκφραση αυτών με Κυτταρομετρία Ροής (Εικόνα 24. a, b). Ποντικοί γονότυπου $Erf^{floxP/LoxP};Lck^{cre}$ παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα CD4⁺ κυττάρων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (8.41% και 12.58% αντίστοιχα με $P<0.0002$) και μειωμένα ποσοστά CD8⁺ κυττάρων όχι, όμως, στατιστικώς σημαντικά (3.06% και 4.07% αντίστοιχα με $P<0.054$) ενώ παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα DP κυττάρων ($P<0.03$). Ποντικοί γονότυπου $Erf^{floxP/+};Lck^{cre}$ παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα ποσοστά CD4⁺ συγκριτικά με τους ποντικούς ελέγχου (9.53% και 12.58% αντίστοιχα με $P<0.005$). Η σημαντική μείωση των CD4⁺ κυττάρων και στους δυο γονότυπους (και του υποπληθυσμού των CD8⁺ κυττάρων σε μικρότερο βαθμό) αποτυπώνεται και στο στατιστικώς σημαντικά μειωμένο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τη β αλυσίδα

του TCR (η μέση ένταση του φθορισμού, ωστόσο, παραμένει αμετάβλητη με $P < 0.89$) στα ζώα με εξάλειψη του *Erf*. Καθώς δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση των θυμοκυττάρων πριν τη DN3 φάση (βλ. § 1.2.2.2), εικάζουμε ότι τα θυμοκύτταρα αναδιατάσσουν κανονικά τη β αλυσίδα του TCR και περνούν στην DP φάση, συνεπώς, η εξάλειψη του *Erf* δε φαίνεται να επιδρά στη διαδικασία της αναδιάταξης της β αλυσίδας.

Οι παραπάνω στατιστικώς σημαντικές παρατηρήσεις, δηλαδή τα μειωμένα ποσοστά CD4+ και TCRβ υποπληθυσμών και παράλληλα τα αυξημένα ποσοστά DP κυττάρων στα ζώα με εξάλειψη *Erf* υποδηλώνει ότι ο *Erf* επάγει των ωρίμανση των θυμοκυττάρων προς τις SP φάσεις. Μάλιστα, το γεγονός ότι ο CD4+ υποπληθυσμούς εμφανίζεται σημαντικά μειωμένος και στα ζώα με ετερόζυγη εξάλειψη του *Erf* υποδηλώνει ότι η επίδραση του *Erf* εξαρτάται από την ποσοτική έκφρασή του. Συνεπώς, ο *Erf* πιθανόν να δρα ως θετικός ρυθμιστής της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων και η δράση του φαίνεται να ασκείται στο στάδιο των DP κυττάρων και κατά τη δέσμευση της κυτταρικής σειράς, επηρεάζοντας ιδιαίτερα τη CD4+ δέσμευση.

Τα ποσοστά όλων των υποπληθυσμών των θυμοκυττάρων φαίνονται στην Εικόνα 25. a-f ενώ τα αντίστοιχα P στον Πίνακα 5. a. Τα ποσοστά των υποπληθυσμών σε όλα τα ζώα γονοτύπων ελέγχου δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 5. b).

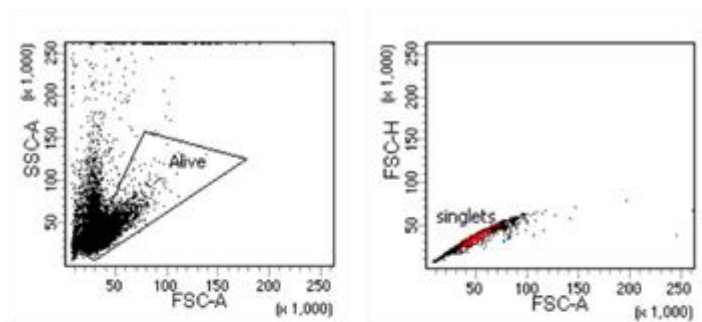
1.2.2.2 Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ERF ΔΕΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΤΟΥΣ DN ΥΠΟΚΛΗΘΥΣΜΟΥΣ.

Για τη μελέτη των φάσεων ωρίμανσης DN των θυμοκυττάρων, κύτταρα επωάστηκαν με αντισώματα έναντι των μορίων CD25 και CD44 και οι υποπληθυσμοί των θυμοκυττάρων αναλύθηκαν με Κυτταρομετρία Ροής ως προς την έκφραση αυτών των μορίων (Εικόνα 24. c). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25. g, δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ των γονοτύπων στους υποπληθυσμούς DN1 ($P < 0.371$), DN2 ($P < 0.422$) και DN3 ($P < 0.583$). Εξαίρεση αποτελεί η φάση DN4, όπου παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση των κυττάρων στη φάση αυτή στους γονότυπους *Erf^{+/+};Lck^{cre}*, *Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}* και *Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}* συγκριτικά με τους άλλους δύο γονότυπους ελέγχου ($P < 0.0003$) αλλά τα ποσοστά δεν παρουσιάζουν σημαντική μείωση συγκρινόμενα μεταξύ τους ($P < 0.468$). Το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στα ζώα με

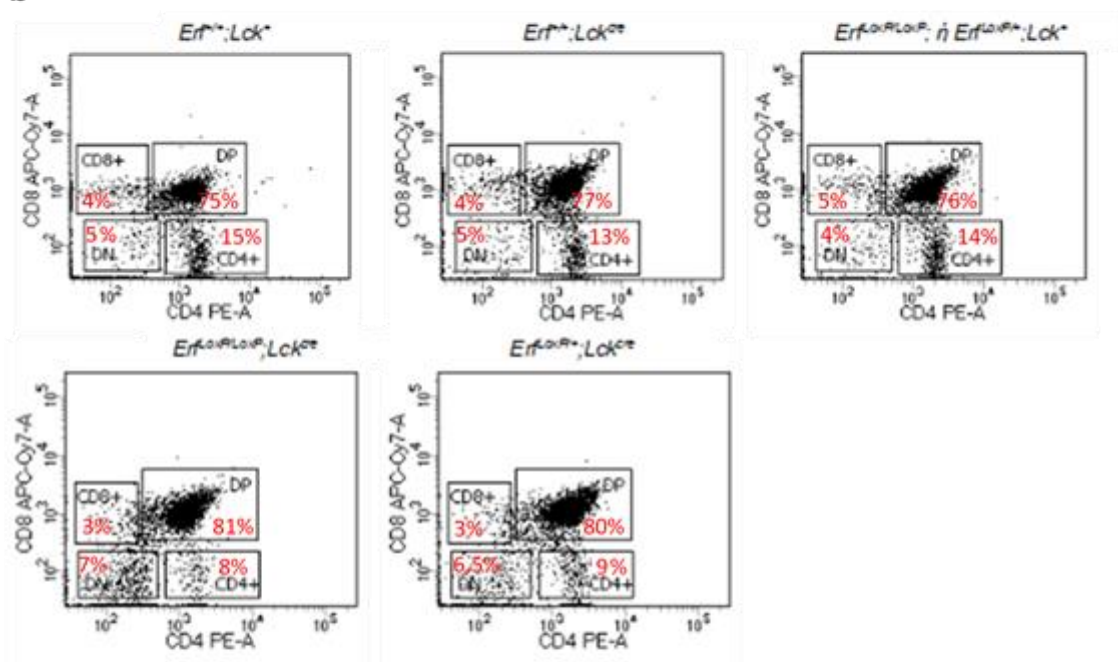
εξάλειψη του *Erf* στις επιμέρους DN1-DN4 φάσεις υποδηλώνει ότι η έκφραση του *Erf* πιθανόν να μην είναι κρίσιμη για τη διαδοχική μετάβαση των κυττάρων στις DN φάσεις. Από την άλλη μεριά, φαίνεται ότι η έκφραση του διαγονιδίου *Lck-Cre* επιφέρει στατιστικώς σημαντική μείωση στα κύτταρα της DN4 φάση, κάτι που συμφωνεί με άλλη έρευνα όπου η έκφραση του *Lck-Cre* αναστέλλει την είσοδο των θυμοκυττάρων στη DP φάση [173] και γενικότερα με τη βιβλιογραφία όπου έρευνες έχουν δείξει ότι η έκφραση του *Lck-Cre* ανεξαρτήτως floxed γονιδίων, προκαλεί ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων [172]–[174].

Συνολικά, τα αποτελέσματα μας παρέχουν βάσιμες ενδείξεις ότι ο *Erf* συμμετέχει στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων κατά το στάδιο DP επάγοντας τη δέσμευση προς CD4+ κυτταρική σειρά. Αντίθετα, δεν έχουμε ευρήματα που να υποστηρίζουν τη συμμετοχή του *Erf* στην αναδιάταξη της β αλυσίδας του T κυτταρικού υποδοχέα των θυμοκυττάρων καθώς τα θυμοκύτταρα περνούν επιτυχώς στη DP φάση όπου και συσσωρεύονται αλλά ούτε και κατά τη μετάβαση των θυμοκυττάρων στις επιμέρους DN φάσεις ωρίμανσης. Ειδικά στη DN4 φάση, παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντικά μειωμένα θυμοκύτταρα, μια «εκτός στόχου» επίπτωση που προκλήθηκε από την έκφραση του διαγονιδίου *Lck-Cre*. Με εξαίρεση αυτήν την παρατήρηση, που συμφωνεί, βέβαια, με βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αποτελέσματα των γονοτύπων ελέγχου και ειδικότερα του γονότυπου *Erf^{f/+};Lck^{cre}* ως προς τους άλλους δύο γονοτύπους ελέγχου, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους, κάτι που ενισχύει την καταλληλότητα και αντικειμενικότητα του συστήματος των διαγονιδιακών ζώων που δημιουργήσαμε για τη μελέτη μας.

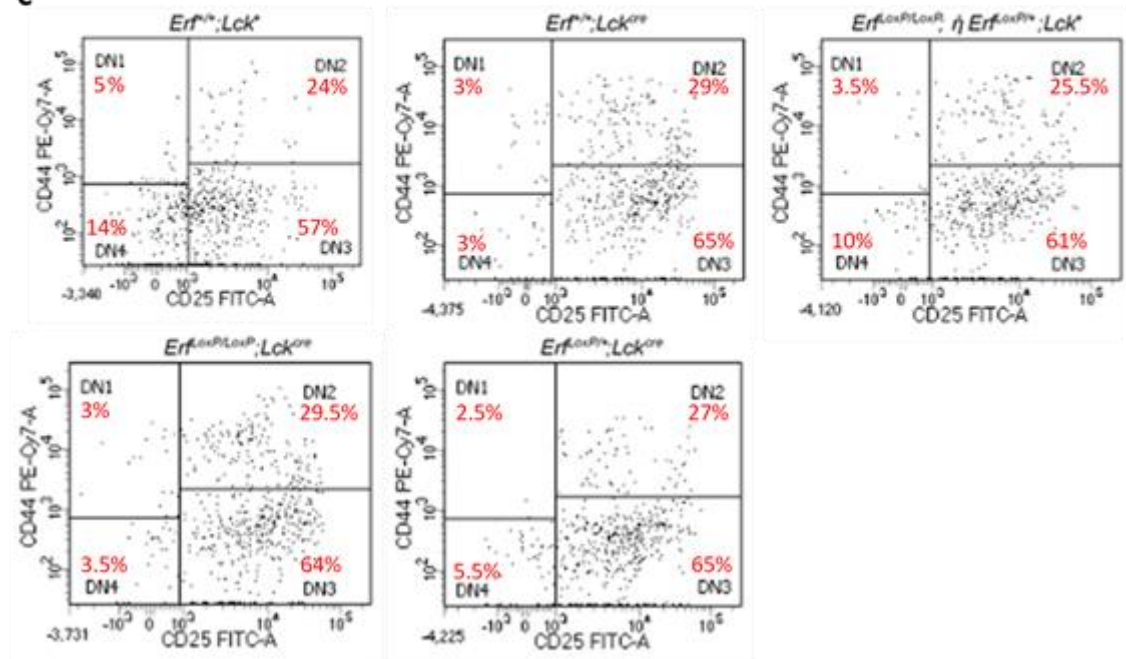
a



b



c

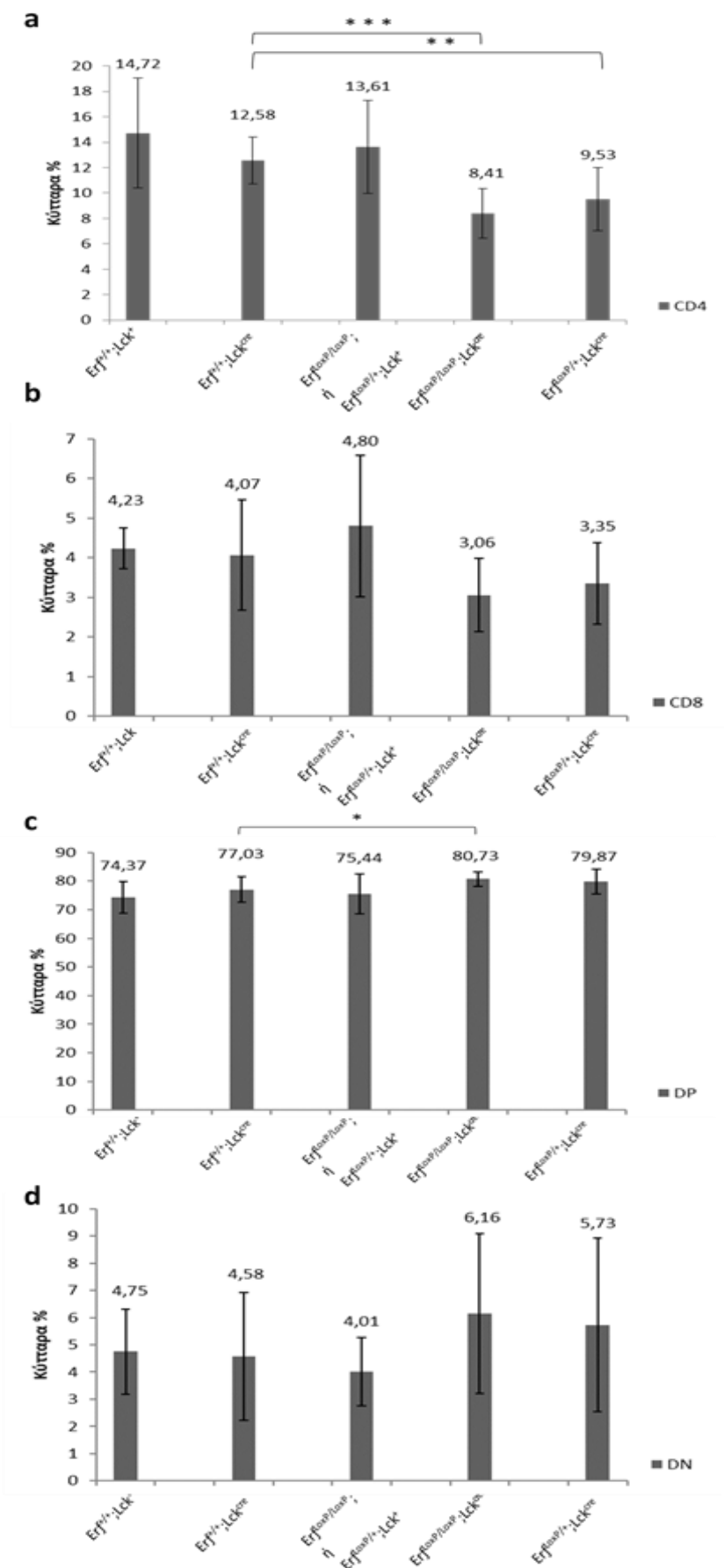


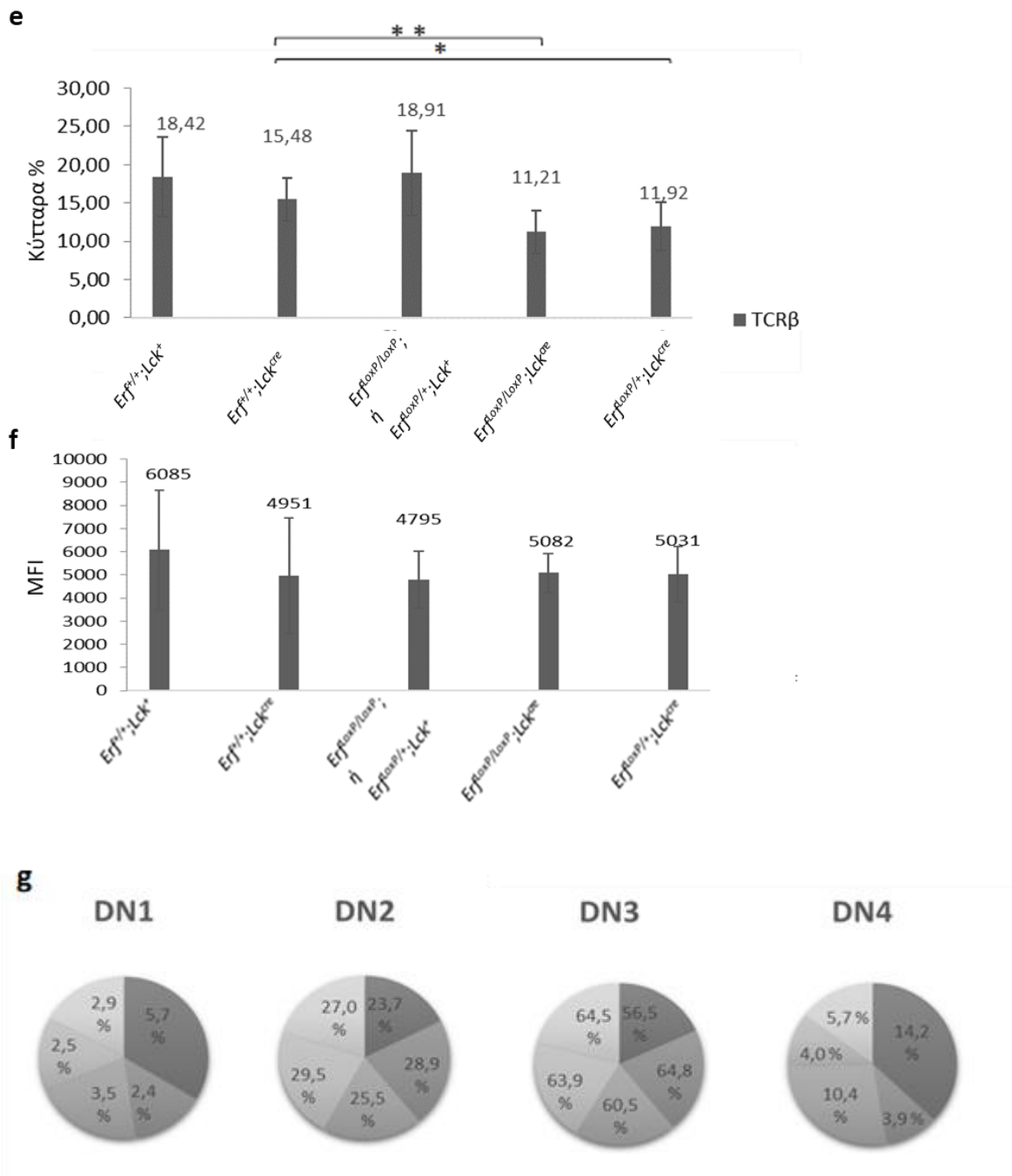
Εικόνα 24. Στικτογράμματα Κυτταρομετρίας Ροής υποπληθυσμών θυμοκυττάρων στις φάσεις ωρίμανσής τους. α) Αρχικά ορίζεται ο πληθυσμός των ζωντανών (*alive*) κυττάρων και από αυτόν μελετώνται μόνο τα μονήρη κύτταρα (*singlets*) για κάθε ζώο. β) Στικτογράμματα κατανομής υποπληθυσμών θυμοκυττάρων SP (CD4+ και CD8+), DP και DN, μετά από επώαση με τα αντίστοιχα αντισώματα, για κάθε γονότυπο. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός αντιπροσωπευτικού για κάθε γονότυπο ζώου. Αναγράφονται τα % ποσοστά των κυτταρικών υποπληθυσμών που στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν αθροίζουν στο 100% εξαιτίας ελάχιστων κυττάρων που είναι εκτός «παραθύρων». γ) Στικτογράμματα κατανομής υποπληθυσμών θυμοκυττάρων στις DN φάσεις ωρίμανσης, μετά από επώαση με τα αντισώματα CD25 και CD44. Αναγράφονται τα % ποσοστά των κυτταρικών υποπληθυσμών. DN1:CD25⁻ CD44⁺ DN2: CD25⁺ CD44⁺ DN3: CD25⁺ CD44⁻ DN4: CD25⁻ CD44⁻

a	Θύμος					Σπλήνας	
	CD4+	CD8+	DP	DN	TCRβ	CD4+	CD8+
<i>Erf^{loxP/LoxP};Lck^{cre}</i>	0.0002	0.054	0.030	0.126	0.003	0.289	0.269
<i>Erf^{loxP/+};Lck^{cre}</i>	0.005	0.125	0.099	0.202	0.012	0.035	0.063
<i>Erf^{+/+};Lck^{cre}</i>							

b	Θύμος					Σπλήνας	
	CD4+	CD8+	DP	DN	TCRβ	CD4+	CD8+
Γονότυποι ελέγχου	0.524	0.087	0.699	0.777	0.327	0.113	0.137

Πίνακας 5. Γονότυποι και ποσοστά κυτταρικών υποπληθυσμών σε θύμο και σπλήνα. α) Γονότυποι ενδιαφέροντος. Στο θύμο, παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα ποσοστά των CD4+, DP και TCRβ θετικών κυττάρων. Στον σπλήνα, οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές περιορίζονται στα CD4+. Τα $P < 0.05$ σημειώνονται με κόκκινο. β) Γονότυποι ελέγχου. Δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων καθώς όλα τα P είναι > 0.05 .





Εικόνα 25. Κυτταρικοί υποπληθυσμοί θυμοκυττάρων στις διάφορες φάσεις ωρίμανσης. a-d) Στους γονότυπους ενδιαφέροντος παρατηρούνται μειωμένα ποσοστά $CD4^{+}$ ενώ παράλληλα αυξημένα ποσοστά DP κυττάρων συγκριτικά με τα ποσοστά του κύριου γονότυπου ελέγχου *Ertf^{+/+};Lck^{cre}* και κατ' επέκταση με τους υπόλοιπους γονότυπους ελέγχου). Τα αναγραφόμενα ποσοστά αποτελούν τους μέσους όρους των ποσοστών των κυττάρων που προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. **e, f)** Μέσοι όροι ποσοστών κυττάρων που εκφράζουν TCRβ και η αντίστοιχη μέση τιμή της έντασης του φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI). Παρατηρούνται μειωμένα ποσοστά κυττάρων που εκφράζουν TCRβ στους γονότυπους ενδιαφέροντος (**e**) ενώ η MFI παραμένει γενικά αμετάβλητη (**f**).

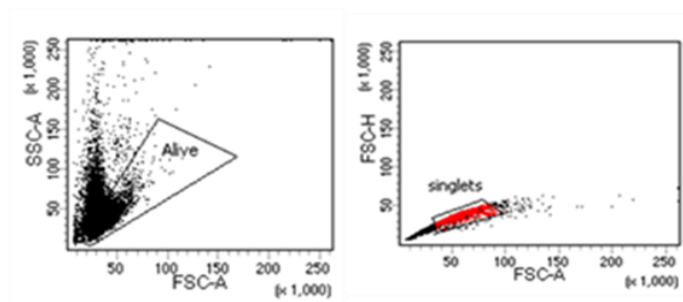
g) Τα ποσοστά των υποπληθυσμών των θυμοκυττάρων στις DN φάσεις ωρίμανσης. Δεν παρατηρούνται στατιστικές σημαντικές μεταβολές μεταξύ των γονοτύπων ενδιαφέροντος και των γονοτύπων ελέγχου. Εξαίρεση αποτελεί η DN4: το ποσοστό των κυττάρων των γονοτύπων $Erf^{+/+};Lck^{cre}$, $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}$ και $Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}$ μειώνεται στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με αυτό των άλλων δύο γονοτύπων ελέγχου χωρίς ωστόσο να σημειώνονται μεταξύ τους σημαντικές διαφορές. Με τη φορά του ρολογιού με διαβαθμίσεις του γκρι οι γονότυποι $Erf^{+/+};Lck^{+}$, $Erf^{+/+};Lck^{cre}$, $Erf^{LoxP/LoxP};$ ή $Erf^{LoxP/+};Lck^{+}$, $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}$ και $Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}$. Η στατιστική σημαντικότητα σημειώνεται με μονό αστερίσκο, *, όπου $P<0.05$, με διπλό αστερίσκο, **, όπου $P<0.01$ και με τριπλό αστερίσκο, ***, όπου $P<0.001$.

1.2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΣΠΛΗΝΙΚΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

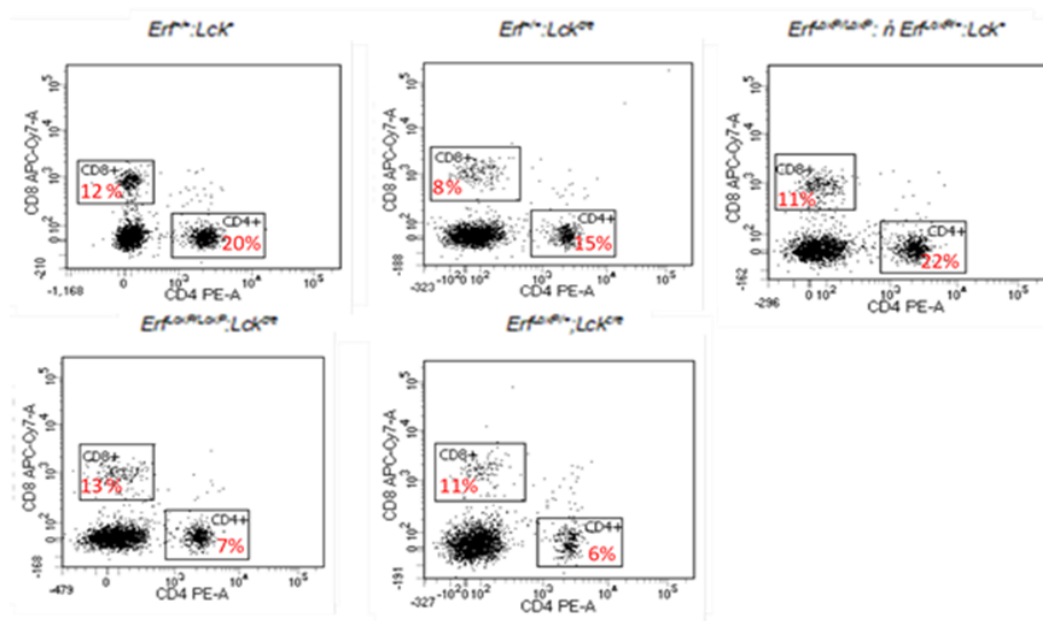
Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μια πρώτη μελέτη της επίδρασης της εξάλειψης του *Erf* σε T κύτταρα σπλήνα. Ο συνολικός αριθμός των σπληνοκυττάρων που απομονώνονταν από κάθε ποντικό ανεξαρτήτως γονότυπου κυμαινόταν στα 80-100 εκ. κύτταρα, ενώ σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνταν στον αριθμό των νεκρών κυττάρων. Μεμονωμένες περιπτώσεις ζώων έφεραν χαρακτηριστικά μικρούς σπλήνες (κυρίως γονότυπου $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}$) χωρίς να αποτελεί κανόνα και χωρίς να είναι στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των διάφορων γονότυπων. Τα ολικά σπληνοκύτταρα επώαστηκαν με αντι-CD4 και -CD8 ώστε να προσδιοριστούν τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα (Εικόνα 26). Το αντίσωμα έναντι του CD25 χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τον εντοπισμό των CD4+ CD25+ T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) χωρίς όμως επιτυχία.

Αναφορικά με τους υποπληθυσμούς των σπληνοκυττάρων, παρότι παρατηρούνται μειωμένα ποσοστά CD4+ και CD8+ κυττάρων στους γονότυπους $Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}$ και $Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}$, στατιστικώς σημαντική κρίνεται η μείωση μόνο των CD4+ κυττάρων στο γονότυπο $Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}$ (Εικόνα 27. a, b και Πίνακας 5. a). Τα ποσοστά των CD4+ και CD8+ υποπληθυσμών όλων των ζώων γονοτύπων ελέγχου δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 5. b). Ωστόσο, με το υπάρχον σύστημα των ζώων, δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε την έκφραση του *Erf* στα T λεμφοκύτταρα του σπλήνα, δηλαδή, πόσα θυμοκύτταρα από αυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί εξάλειψη του *Erf*, επιβίωσαν και μετανάστευσαν στο σπλήνα. Συνεπώς, δε μπορούμε να εξαγάγουμε με ασφάλεια κάποιο συμπέρασμα. Βέβαια, η επέκταση της έρευνας σε μεγαλύτερο αριθμό ζώων θα ήταν χρήσιμη. Σε κάθε περίπτωση, παραμένει ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα για περαιτέρω διερεύνηση.

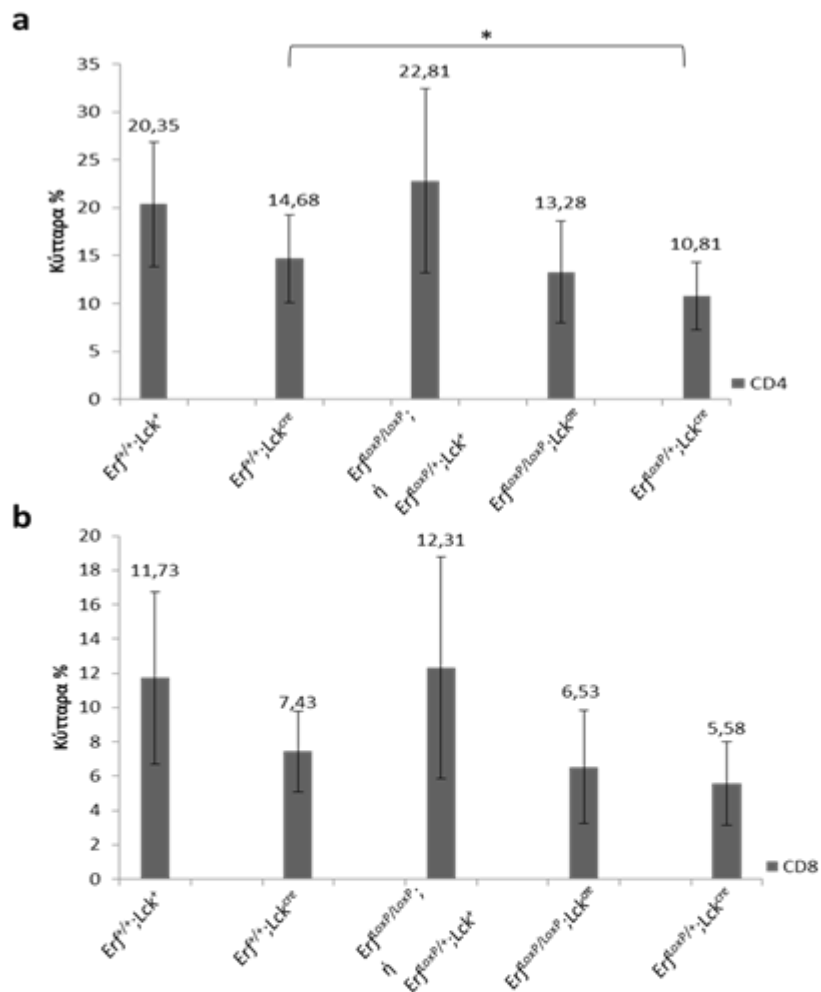
a



b



Εικόνα 26. Στικτογράμματα Κυτταρομετρίας Ροής υποπληθυσμών σπληνοκυττάρων. α) Αρχικά ορίζεται ο πληθυσμός των ζωντανών (alive) κυττάρων και από αυτόν μελετώνται μόνο τα μονήρη κύτταρα (singlets) για κάθε ζώο. **β)** Στικτογράμματα κατανομής υποπληθυσμών σπληνοκυττάρων SP (CD4+ και CD8+), μετά από επώαση με τα αντίστοιχα αντισώματα, για κάθε γονότυπο. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός αντιπροσωπευτικού για κάθε γονότυπο ζώου. Αναγράφονται τα % ποσοστά κάθε υποπληθυσμού.



Εικόνα 27. Ποσοστά κυτταρικών υποπληθυσμών στο σπλήνα. α) Στην ετερόζυγη αποσιώπηση του *Erf* παρατηρούνται μειωμένα ποσοστά CD4+ κυττάρων συγκριτικά με τα ποσοστά του κύριου γονότυπου ελέγχου $ERF^{+/+};Lck^{cre}$ και κατ' επέκταση με τους υπόλοιπους γονότυπους ελέγχου. β) Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στον υποπληθυσμό των CD8+ κυττάρων. Τα αναγραφόμενα ποσοστά αποτελούν τους μέσους όρους των ποσοστών που προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Η στατιστική σημαντικότητα σημειώνεται με μονό αστερίσκο, *, όπου $P<0.05$, με διπλό αστερίσκο, **, όπου $P<0.01$ και με τριπλό αστερίσκο, ***, όπου $P<0.001$.

1.2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την Κυτταρομετρία Ροής έδειξαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα ποσοστά CD4+ και TCRβ θυμοκυττάρων ενώ στατιστικώς σημαντικά αυξημένα ποσοστά DP θυμοκυττάρων στα ζώα με εξάλειψη του *Erf*. Παρατηρήσαμε, δηλαδή, συσσώρευση των κυττάρων κατά το στάδιο των διπλά θετικών κυττάρων. Όπως περιγράφηκε, το στάδιο των DP κυττάρων αποτελεί το κρίσιμο σημείο κατά τη δέσμευση της κυτταρικής σειράς όπου τα θυμοκύτταρα «καλούνται να αποφασίσουν» για την εξέλιξή τους. Το «δίλημμα» της CD4+ ή CD8+ πορείας μεταφράζεται σε ένα περίπλοκο δίκτυο όπου συμμετέχει ένα πλήθων μεταγραφικών παραγόντων. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί οι *ThPOK*, *Gata3*, *Socs1* και *Myb* που επάγουν τη CD4 δέσμευση ενώ οι *Runx3* και *MAZR* επάγουν τη CD8 δέσμευση [25]. Επιπροσθέτως, τα *Ets1* και *Ets2* εμπλέκονται γενικά στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων ειδικότερα κατά το στάδιο της κυτταρικής δέσμευσης [95].

Επόμενο βήμα στη μελέτη της επίδρασης της εξάλειψης του *Erf* κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων αποτέλεσε η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της δράσης της εξάλειψης του *Erf* κατά το στάδιο των DP κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, σε cDNA των θυμοκυττάρων που απομονώθηκαν από τα ζώα πραγματοποιήθηκε RT-qPCR για την έκφραση των γονιδίων *ThPOK*, *Gata3*, *Socs1*, *Runx3*, *MAZR*, *Myb*, *Ets1* και *Ets2*. Η ποσοτικοποίηση της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της $2^{-\Delta\Delta CT}$ μετά από κανονικοποίηση των τιμών Cq για κάθε δείγμα με την αντίστοιχη τιμή Cq του γονιδίου αναφοράς *18s rRNA*.

Η έκφραση όλων των γονιδίων απεικονίζεται στα επιμέρους στοιχεία της Εικόνας 28. Οι τιμές σημαντικότητας για τους γονότυπους φαίνονται στον Πίνακα 6, ενώ στην Εικόνα 29 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης του μοριακού μηχανισμού της πιθανής δράσης του *Erf* κατά τη δέσμευση της κυτταρικής σειράς.

1.2.4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ *ETS*: Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ *ETS1* ΑΥΞΑΝΕΤΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΟΝΟ ΣΤΑ ΖΩΑ ΜΕ ΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ *ERF*.

Αναφορικά με τα μέλη της οικογένειας των *Ets* γονιδίων, επιλέξαμε να μελετήσουμε τα μεταγραφικά επίπεδα των *Ets1* και *Ets2*, καθώς αυτά τα δύο μέλη της οικογένειας

συμμετέχουν στο στάδιο της κυτταρικής δέσμευσης [95]. Για τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *Ets1* και *Ets2* πραγματοποιήθηκε RT-qPCR σε cDNA θυμοκυττάρων ζώων ενδιαφέροντος. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η έκφραση του *Ets1* αυξάνεται στο γονότυπο $Erf^{floxP/LoxP};Lck^{cre}$ συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου ενώ όταν λαμβάνονται υπ' όψιν μόνο τα ζώα με μη ανιχνεύσιμη έκφραση του *Erf*, τότε η αύξηση είναι και στατιστικώς σημαντική με $P < 0.0002$, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Erf* δρα ανασταλτικά στην έκφραση του *Ets1* κατά τρόπο εξαρτώμενο της ποσοτικής έκφρασής του (Πίνακας 6, Εικόνα 28).

Σημειώνεται ότι η έκφραση του *Ets1* μεταβάλλεται στατιστικώς σημαντικά στον γονότυπο $Erf^{f+/+};Lck^{cre}$ σε σύγκριση με τον $Erf^{f+/+};Lck^{+}$ και όχι με τον $Erf^{floxP/LoxP};$ ή $Erf^{floxP/+};Lck^{+}$ ενώ μεταξύ των γονοτύπων $Erf^{f+/+};Lck^{+}$ και $Erf^{floxP/LoxP};$ ή $Erf^{floxP/+};Lck^{+}$ δε μεταβάλλεται. Ίσως το *Lck-Cre* να επηρεάζει την έκφραση του *Ets1* ως μία ακόμη εκτός στόχου επίπτωση.

Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην έκφραση του *Ets2* μεταξύ όλων των γονοτύπων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Erf* δεν επηρεάζει τη μεταγραφική έκφραση του *Ets2* (Πίνακας 6, Εικόνα 28).

1.2.4.2 CD4+ ΔΕΣΜΕΥΣΗ: Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ *THPOK*, *GATA3* ΚΑΙ *SOCs1* ΜΕΙΩΝΕΤΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΣΤΑ ΖΩΑ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ *ERF*.

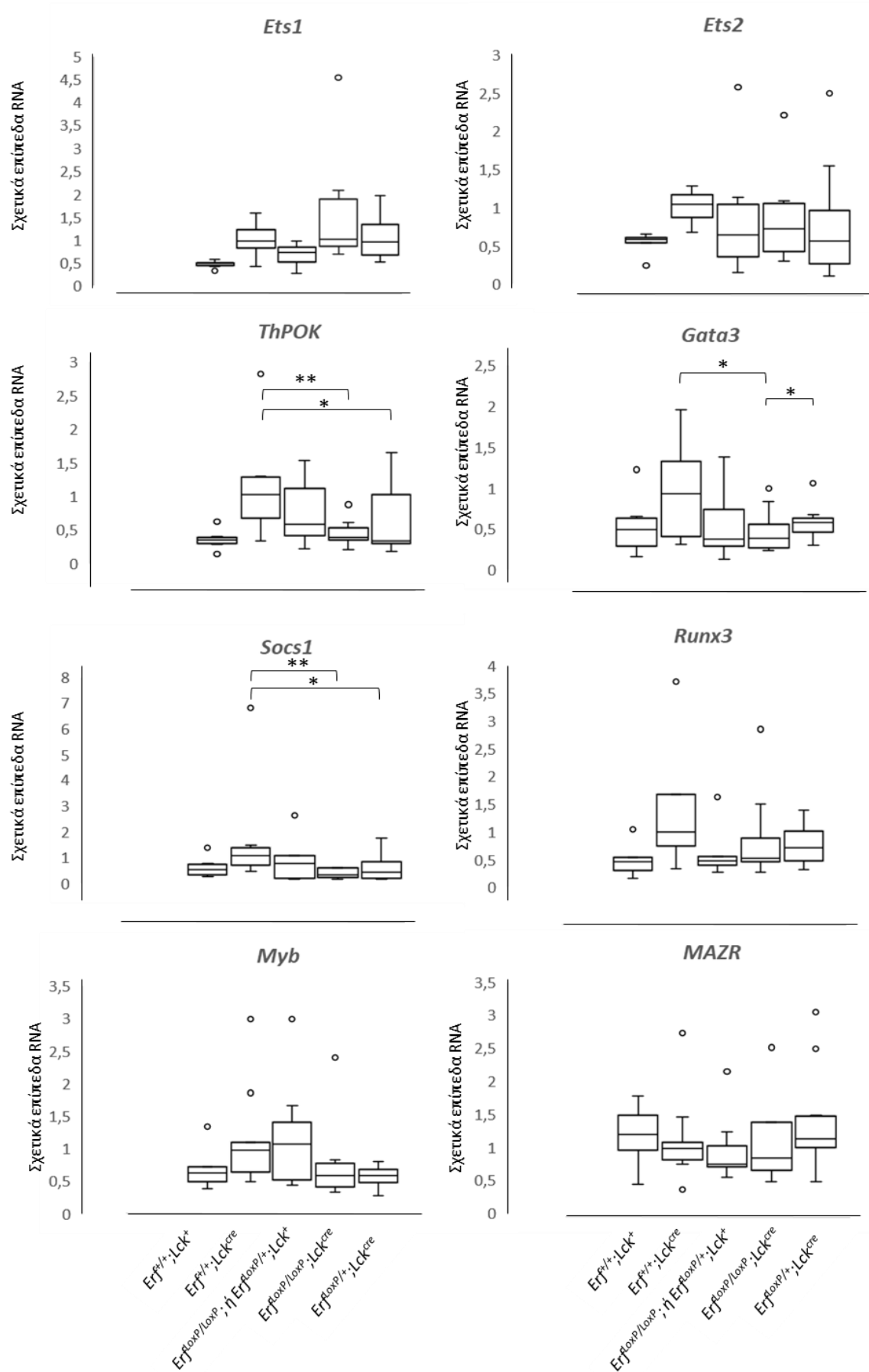
Αναφορικά με τη μεταγραφική έκφραση των γονιδίων που ευνοούν την CD4+ δέσμηση επιλέχθηκαν τα γονίδια *ThPOK*, *Gata3*, *Socs1* και *Myb*, καθώς είναι καίριοι θετικοί ρυθμιστές της CD4+ δέσμησης, και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της RT-qPCR έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση στα ζώα με εξάλειψη του *Erf* συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου γονοτύπου $Erf^{f+/+};Lck^{cre}$ για τα γονίδια *ThPOK* και *Socs1* ενώ για το *Gata3* παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση μόνο στο γονότυπο $Erf^{floxP/LoxP};Lck^{cre}$, δηλαδή στην ομόζυγη εξάλειψη του *Erf*, αλλά και μεταξύ των δύο γονοτύπων ενδιαφέροντος ($Erf^{floxP/LoxP};Lck^{cre}/Erf^{floxP/+};Lck^{cre}$). Παρατηρήθηκε, δηλαδή, μειωμένη έκφραση και στα τρία βασικά γονίδια που επάγουν τη CD4+ δέσμηση, γεγονός που συμφωνεί με το σημαντικά μειωμένο ποσοστό του CD4+ υποπληθυσμού των θυμοκυττάρων. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι ο *Erf* είναι θετικός ρυθμιστής των *Gata3*, *ThPOK* και *Socs1* και συνεπώς της CD4+ δέσμησης μέσω της

ρύθμισης της έκφρασης αυτών των γονιδίων. Ειδικά για το *Gata3*, απαιτείται ομόζυγη εξάλειψη του *Erf* για να παρατηρηθεί μείωση στη μεταγραφική έκφραση του γονιδίου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Erf* ρυθμίζει ισχυρά το *Gata3* πιθανόν_κατά τρόπο εξαρτώμενο της ποσοτικής του έκφρασης (Πίνακας 6, Εικόνα 28).

Τέλος, δεν υπάρχει διαφοροποίηση στην έκφραση του κάθε γονιδίου μεταξύ των 3 γονοτύπων ελέγχου όταν συγκρίνονται μεταξύ τους, ούτε σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου *Myb*, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Erf* δεν επηρεάζει τη μεταγραφική έκφραση του *Myb* (Πίνακας 6, Εικόνα 28).

1.2.4.3 CD8+ ΔΕΣΜΕΥΣΗ: Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ *RUNX3* ΚΑΙ *MAZR* ΔΕ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΤΑΙ.

Αναφορικά με τη CD8+ δέσμευση, μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Runx3* και *MAZR*. Ο μεταγραφικός παράγοντας *Runx3* αποτελεί τον κυριότερο θετικό ρυθμιστή της CD8+ δέσμευσης ενώ το γονίδιο *MAZR* συμβάλλει έμμεσα στη δέσμευση προς κυτταροτοξική σειρά [25]. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων *Runx3* και *MAZR*, εύρημα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα από τη ανάλυση της Κυτταρομετρίας Ροής, όπου η μείωση του υποπληθυσμού των CD8+ κυττάρων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Συνεπώς, η εξάλειψη του *Erf* δε φαίνεται να επηρεάζει τη CD8+ κυτταρική δέσμευση. Για τους γονότυπους ελέγχου, η έκφραση του *Runx3* διαφοροποιείται μόνο στο γονότυπο *Erf^{+/+};Lck^{cre}* όταν συγκρίνεται με τους άλλους δύο, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ίδιο το διαγονίδιο *Lck-Cre* ίσως να έχει επίπτωση στην έκφραση του *Runx3* (Πίνακας 6, Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Έκφραση γονιδίων *Ets* και γονιδίων που σχετίζονται με τη *CD4+* ή *CD8+* δέσμευση. Οι τιμές έκφρασης για κάθε γονίδιο προέκυψαν με qPCR και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο ΔΔCt. Αναπαρίστανται ως γραφήματα με πλαίσια και απολήξεις (box and whisker plot). Η γραμμή εντός του πλαισίου συμβολίζει τον μέσο (median) με τα ανώτερα και κατώτερα τεταρτημόρια. Οι απολήξεις παρουσιάζουν την ανώτερη και κατώτερη τιμή ενώ οι ακραίες τιμές σημειώνονται με μικρούς κύκλους. Η στατιστική σημαντικότητα σημειώνεται με μονό αστερίσκο, *, όπου $P < 0.05$, με διπλό αστερίσκο, **, όπου $P < 0.01$ και με τριπλό αστερίσκο, ***, όπου $P < 0.001$.

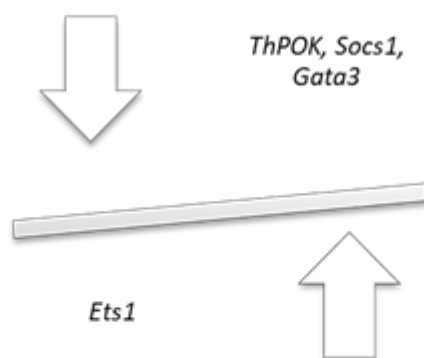
a

	<i>Ets1</i>	<i>Ets2</i>	<i>ThPOK</i>	<i>Gata3</i>	<i>Socs1</i>	<i>Runx3</i>	<i>Myb</i>	<i>MAZR</i>
<i>Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}</i>			0.006	0.010	0.008			
<i>Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}</i>	0.634*	0.411	0.027	0.088	0.023	0.467	0.073	0.555
<i>Erf^{+/+};Lck^{cre}</i>								

b

Γον. ελέγχου	0.022**	0.392	0.135	0.161	0.266	0.041***	0.272	0.286
--------------	---------	-------	-------	-------	-------	----------	-------	-------

Πίνακας 6. Έκφραση των γονιδίων *Ets1*, *Ets2*, *ThPOK*, *Gata3*, *Socs1*, *Runx3*, *Myb* και *MAZR* α) των γονοτύπων ενδιαφέροντος συγκριτικά με το γονότυπο ελέγχου *Erf^{+/+};Lck^{cre}* και β) των γονοτύπων ελέγχου μεταξύ τους. Τα $P < 0.05$ σημειώνονται με κόκκινο (Γον.=γονότυποι). * Όταν λαμβάνονται υπ' όψιν τα ζώα μόνο με ανιχνεύσιμη έκφραση του *Erf*, τότε $P < 0.0002$. ** Οι γονότυποι *Erf^{+/+};Lck⁺* και *Erf^{+/+};Lck^{cre}* διαφοροποιούνται στατιστικώς σημαντικά, ωστόσο οι *Erf^{+/+};Lck⁺* και *Erf^{LoxP/LoxP}*; ή *Erf^{LoxP/+};Lck⁺* όχι ($P < 0.0613$) ενώ οι *Erf^{+/+};Lck^{cre}* και *Erf^{LoxP/LoxP}*; ή *Erf^{LoxP/+};Lck⁺* οριακά όχι ($P < 0.0543$). *** Ο γονότυπος *Erf^{+/+};Lck^{cre}* διαφοροποιείται στατιστικώς σημαντικά από του άλλους δύο γονοτύπους ελέγχου, ωστόσο οι *Erf^{+/+};Lck⁺* και *Erf^{LoxP/LoxP}*; ή *Erf^{LoxP/+};Lck⁺* όχι ($P < 0.2195$).



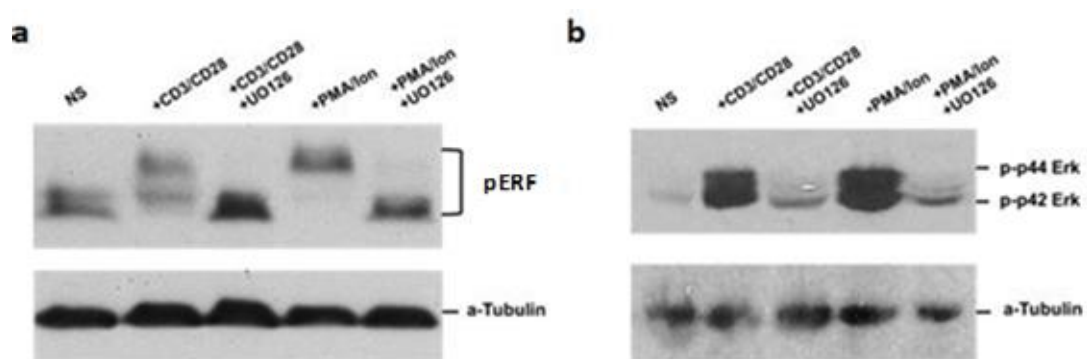
Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του μοριακού μηχανισμού δράσης του *Erf*. Στους ποντικούς όπου πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του *Erf*, η έκφραση των *ThPOK*, *Gata3* και *Socs1* βρέθηκαν σημαντικά μειωμένες. Αντίθετα, η έκφραση του *Ets1* αυξήθηκε με τρόπο σχετιζόμενο με την έκφραση του *Erf*.

ΜΕΡΟΣ II: *IN VITRO*

Πρώτος στόχος της *in vitro* μελέτης του ERF ήταν να ερευνηθεί κατά πόσο ο ERF εκφράζεται σε T λεμφοκύτταρα και αν απαντάται σε φωσφορυλιωμένη μορφή και εν συνεχεία κατά πόσο αυτή η φωσφορυλίωση εξαρτάται από την Erk1/2, όπως έχει δειχθεί σε άλλα κύτταρα [116]. Για να εξετασθεί η ενδογενής έκφραση του ERF σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HuT78. Τα HuT78 κύτταρα είναι αθανатоποιημένα ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν καθώς παρέχουν το πλεονέκτημα της ευκολότερης διαχείρισης και πειραματικής μεταχείρισης έναντι των φρέσκων λεμφοκυττάρων.

2.1 ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ERF ΣΕ ΑΔΙΕΓΕΡΤΑ ΚΑΙ ΔΙΕΓΕΡΜΕΝΑ HUT78

Για να εξετασθεί κατά πόσον ο ERF εκφράζεται στα HuT78 κύτταρα πραγματοποιήθηκε Ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισώματος ειδικού για τον ERF. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30. α, ο ERF εκφράζεται τόσο σε διεγερμένα όσο και σε αδιέγερτα κύτταρα. Σε συνθήκες διέγερσης είτε με αντί-CD3/28 ή με PMA και Ιονομυκίνη, όπου και στις δύο περιπτώσεις ενεργοποιείται η Erk, αυξάνεται η έκφραση της φωσφορυλιωμένης (ανενεργής) του μορφής (επάνω ζώνη) ενώ παρουσία του αναστολέα της Erk UO126 μειώνεται η έκφραση του φωσφο-ERF και εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά η ενεργή του μορφή (κάτω ζώνη) κάτι που δείχνει ότι η φωσφορυλίωση του ERF είναι εξαρτώμενη από



Εικόνα 30. Πρωτεϊνική έκφραση του ERF. α) Έκφραση του ERF σε αδιέγερτα HuT78 κύτταρα ή μετά από διέγερση με anti-CD3/CD28 αντισώματα (2 $\mu\text{g/ml}$ + 1 $\mu\text{g/ml}$ αντιστοίχως) ή PMA και Ιονομυκίνη (2 ng/ml + 200 ng/ml αντιστοίχως) για 15 λεπτά παρουσία ή όχι του ειδικού για την Erk1/2 αναστολέα UO126 (1 μM). b) Η έκφραση της φωσφο-Erk στις ίδιες συνθήκες. Η α -Τουμπουλίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

την Erk. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από ισχυρή διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη απαντάται μόνο η φωσφορυλιωμένη μορφή του ERF ενώ παρουσία και πάλι του αναστολέα, όπου αίρεται η αναστολή από την Erk, εμφανίζεται μόνο η ενεργή μορφή του ERF, ευρήματα που υπογραμμίζουν ότι η φωσφορυλίωση του ERF είναι εξαρτώμενη της Erk.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ERF

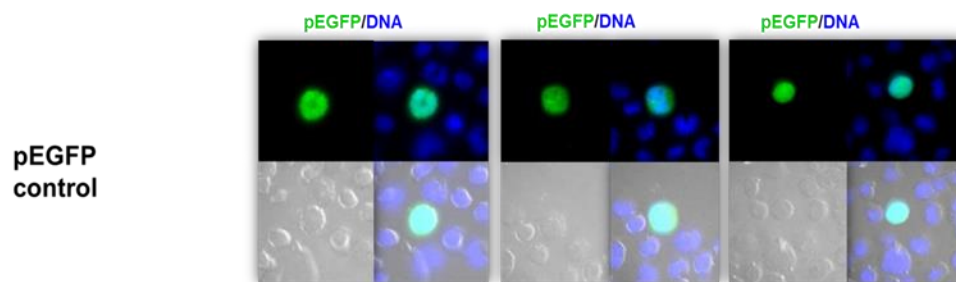
Όπως περιγράφηκε στην Εισαγωγή, ο ERF μετακινείται συνεχώς από τον πυρήνα, όπου είναι ενεργός, στο κυτταρόπλασμα κατά τρόπο εξαρτώμενο από την Erk [114]. Για να διερευνηθεί κατά πόσο το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα και στα T κύτταρα, HuT78 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-ERF (GFP-ERF fusion protein, Εικόνα 31. α) [116] ή με τον αντίστοιχο φορέα ελέγχου pEGFP-C1 και τα κύτταρα διεγέρθηκαν με τα αντι-CD3 και -CD28 παρουσία ή όχι του αναστολέα UO126 για διάφορους χρόνους. Σε κατάσταση ηρεμίας ο ERF εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Μετά από διέγερση 5 λεπτών, παρατηρήθηκε μία τάση του ERF να μετακινηθεί προς το κυτταρόπλασμα που εντάθηκε μετά από 15λεπτη διέγερση ενώ μετά από 30 λεπτά διέγερσης, ο ERF εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Παρουσία του αναστολέα UO126 το φαινόμενο αντιστρέφεται με τον ERF να μετακινείται στον πυρήνα (Εικόνα 31. b. i-v). Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι το φαινόμενο της μετακίνησης του ERF αφενός απαντάται και στα T κύτταρα αφετέρου είναι εξαρτώμενο από την Erk, γεγονός που συνδέει τη φωσφορυλίωση του ERF με τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Θα ήταν χρήσιμο τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιωθούν και με συνεστιακή μικροσκοπία.

a

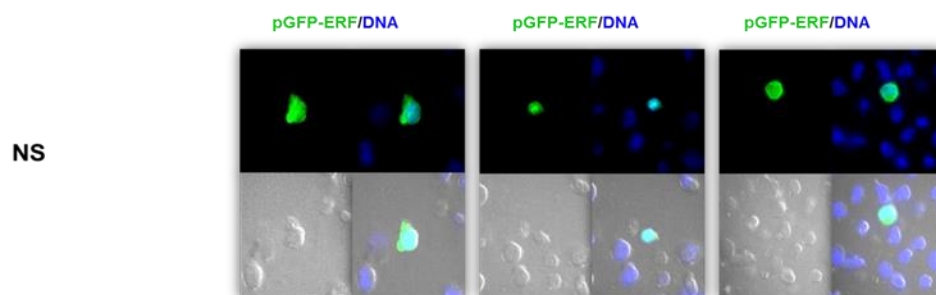


b

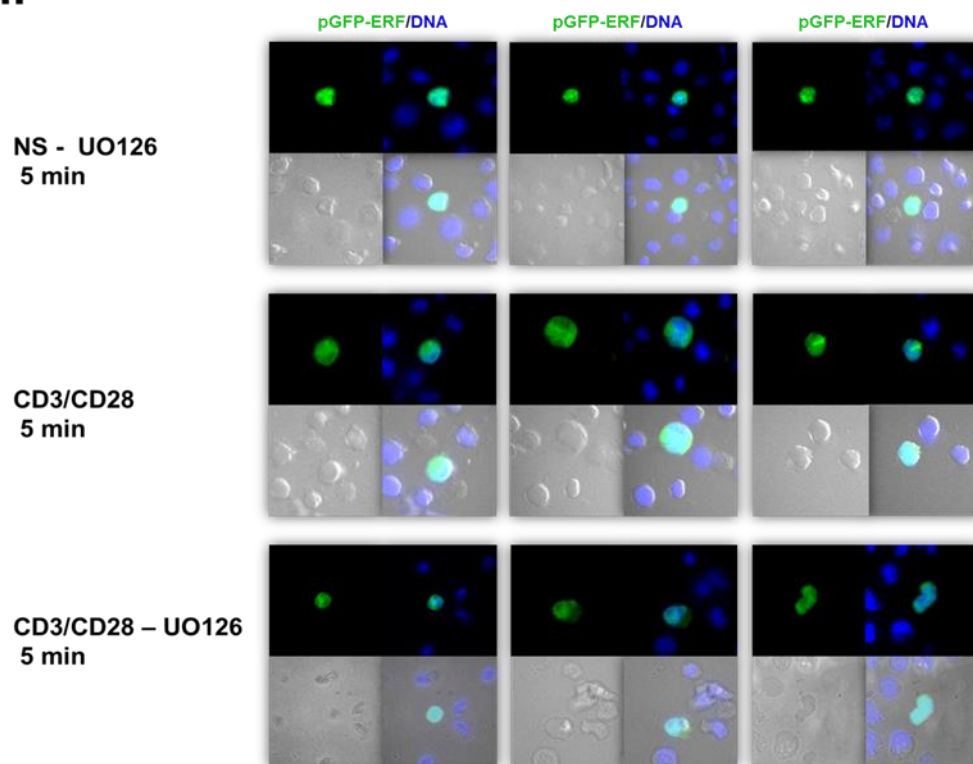
i



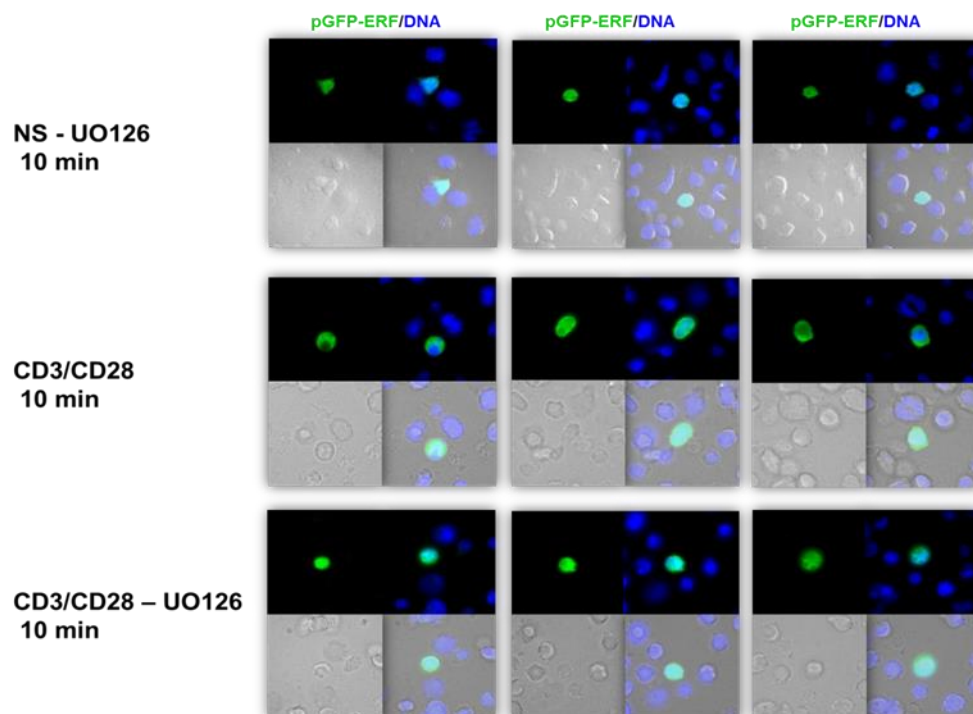
ii



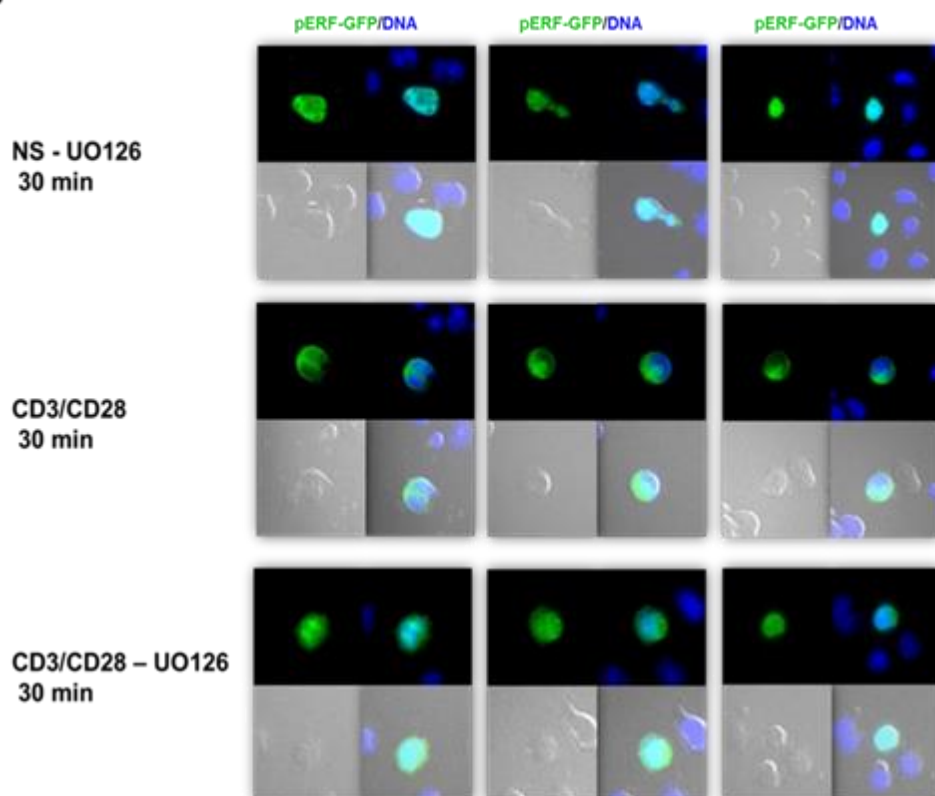
iii



iv



V



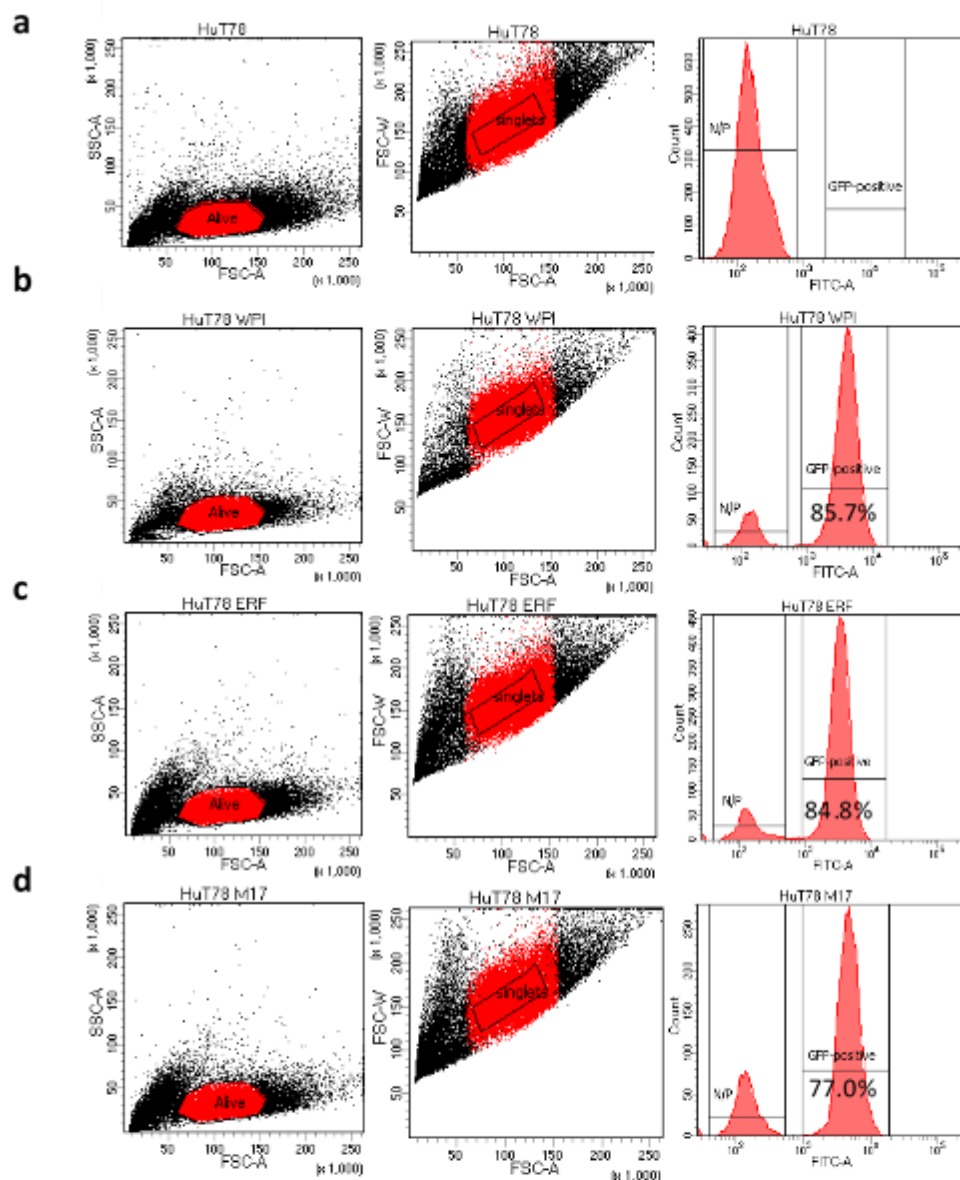
Εικόνα 31. Υποκυτταρική διαμερισματοποίηση του ERF. α) Σχηματική παράσταση του φορέα έκφρασης της χημειρικής πρωτεΐνης GFP-ERF). β) Ο ERF μετακινείται διαρκώς από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κύτταρα HuT78 διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEGFP (i) ή pGFP-ERF (ii-v) και διεγέρθηκαν με anti-CD3/CD28 αντισώματα (2 µg/ml + 1 µg/ml αντίστοιχα) για 5 (iii), 10 (iv) και 30 (v) λεπτά παρουσία ή όχι του ειδικού για την Erk αναστολέα UO126 (1µM). Ο πυρήνας των κυττάρων έγινε ορατός μετά από χρώση με DAPI (μπλε). Ο ERF φαίνεται με πράσινο χρώμα ενώ ο εντοπισμός του ERF στον πυρήνα αποδίδει κυανό χρώμα. Η παρατήρηση της διαμερισματοποίησης του ERF πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο τύπου TIRF.

2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ERF

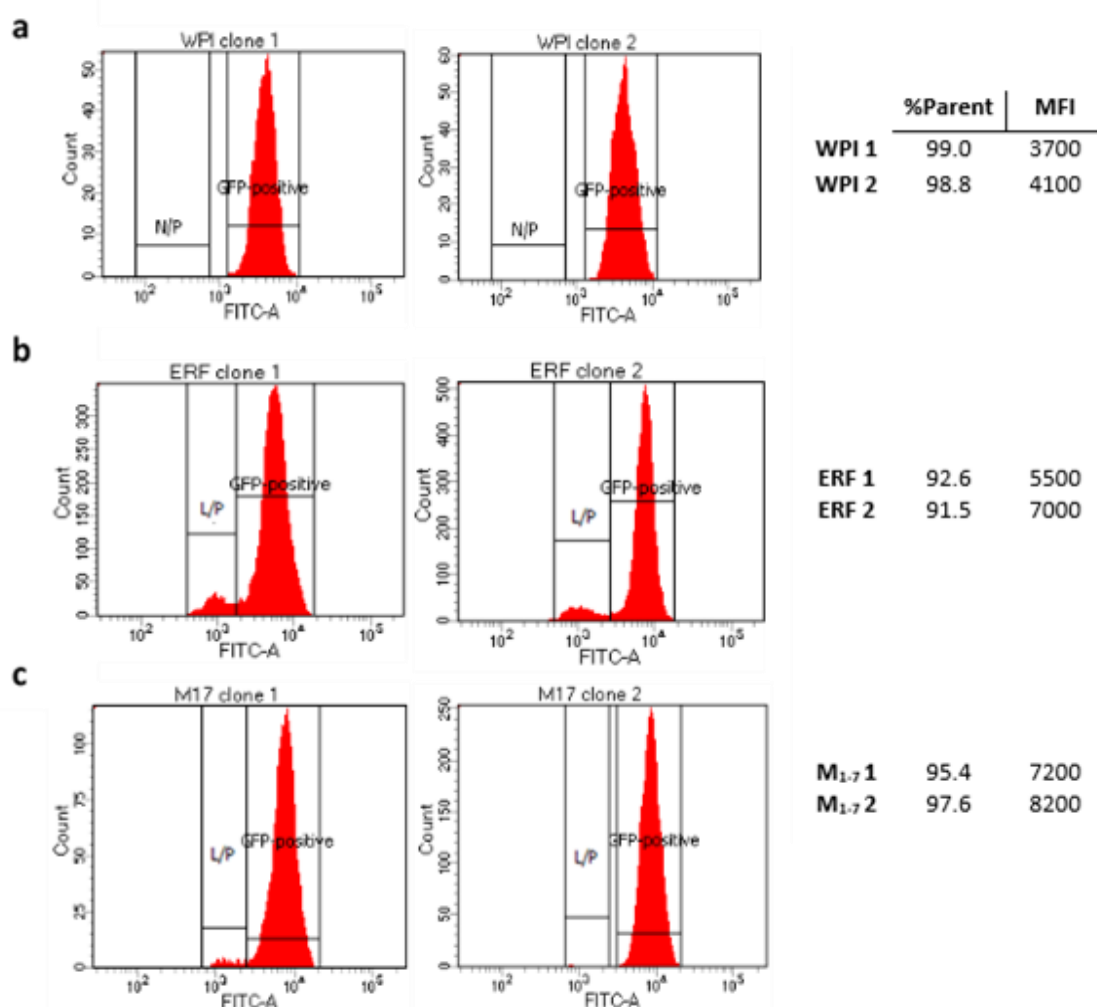
Η διερεύνηση της λειτουργία του ERF περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης του ERF στον κυτταρικό κύκλο T κυττάρων και στην ρύθμιση της παραγωγής πρωτίστως της IL-2 ενώ δευτερευόντως της IL-10. Η λειτουργική μελέτη πραγματοποιήθηκε αρχικά σε μαζική καλλιέργεια κυττάρων σταθερής υπερέκφρασης του ERF (stable cell pool). Εξαιτίας της ανομοιογένειας αυτών των κυτταρικών καλλιεργειών ως προς την έκφραση του ERF και της αστάθειας στην επαναληψιμότητα των πειραματικών παρατηρήσεων, τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε μονοκλωνικές καλλιεργειες σταθερής υπερέκφρασης του ERF.

Δημιουργία κλώνων σταθερής υπερέκφρασης ERF

Για τη δημιουργία κυττάρων HuT78 σταθερής υπερέκφρασης του ERF, κύτταρα διαμολύνθηκαν είτε με τον ιικό φορέα έκφρασης του ERF (WPI-ERF), είτε με τον φορέα έκφρασης του συνεχώς ενεργού μεταλλαγμένου ERF (WPI-M₁₋₇) ή με τον άδειο φορέα ελέγχου (WPI) [111], [116]. Όλοι οι φορείς χαρακτηρίζονται από την παραγωγή του γονιδίου για τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Τα φθορίζοντα κύτταρα επιλέχθηκαν μετά από κυτταροδιαχωρισμό και αποτέλεσαν τις αρχικές μαζικές καλλιεργειες κυττάρων σταθερής έκφρασης (Εικόνα 32). Για τη δημιουργία των μονοκλωνικών καλλιεργειών, φθορίζοντα κύτταρα επιλέχθηκαν με κυτταροδιαχωρισμό σε πιάτο 96 πηγαδιών και αφού πολλαπλασιάστηκαν επαρκώς, επαναεπιλέχθηκαν ώστε το τελικό ποσοστό θετικότητας σε GFP φθορισμό να είναι 100% (Εικόνα 33). Η υπερέκφραση του ERF στους κυτταρικούς κλώνους που φέρουν τους φορείς WPI-ERF και M₁₋₇ επιβεβαιώθηκε με Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα ειδικό για τον ERF και με RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον ERF. Ενδεικτικά αποτελέσματα για έναν κλώνο υπερέκφρασης του ERF και του M₁₋₇ παρουσιάζονται στην Εικόνα 34. Στους κλώνους υπερέκφρασης η ζώνη του ERF εμφανίζεται πολύ έντονη σε όλες τις συνθήκες συγκριτικά με τον κλώνο ελέγχου, για ίδια ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, κάτι που δείχνει ότι ο ERF ή το αντίστοιχο μετάλλαγμα του υπερεκφράζεται στα κύτταρα αυτά.

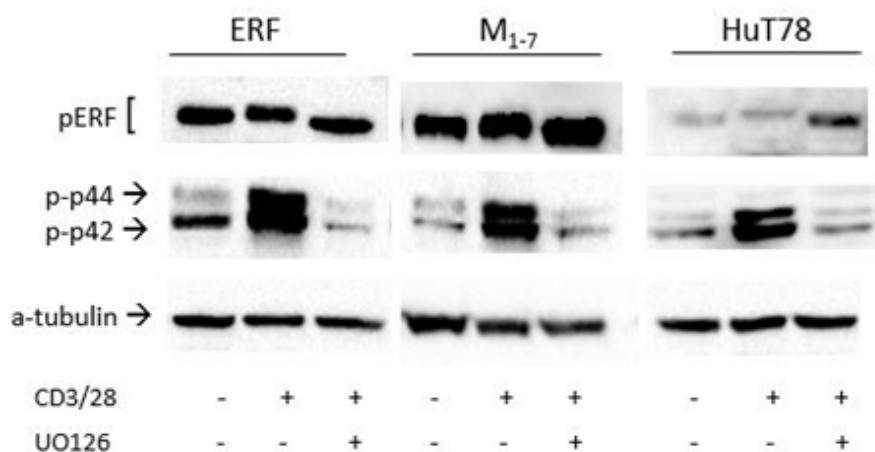


Εικόνα 32. Έκφραση του ERF σε HuT78 κύτταρα μετά από διαμόλυνση με ιικό φορέα και κυτταροδιαχωρισμό. α) Κύτταρα ελέγχου HuT78, β) κύτταρα διαμολυσμένα με το φορέα ελέγχου WPI, γ) με το φορέα WPI-ERF και δ) με τον φορέα WPI-M17. Στην πρώτη στήλη των στικτογραμμάτων (FCS-SSC) παρουσιάζεται το παράθυρο (gate) των ζωντανών κυττάρων (alive) ενώ στη δεύτερη στήλη η επόμενη επιλογή (παράθυρο) μόνο των κυττάρων που είναι μονήρη (singlets) για αποφυγή διπλετών και συσσωματωμάτων. Στην στήλη των ιστογραμμάτων απεικονίζονται οι καμπύλες και τα αντίστοιχα ποσοστά των φθορίζοντων κυττάρων (όπου N/P η καμπύλη για τα αρνητικά κύτταρα και GFP-positive για τα θετικά κύτταρα). Σημειώνεται στον άξονα x η ένταση του φθορισμού (FITC) ενώ στον άξονα y ο αριθμός των κυττάρων (count).

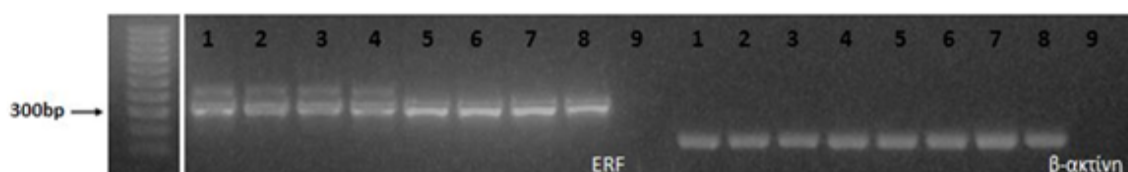


Εικόνα 33. Ιστογράμματα θετικότητας σε GFP φθορισμό μονοκλωνικών καλλιιεργειών κυττάρων σταθερής υπερέκφρασης του ERF μετά από κυτταροδιαχωρισμό. α) Κύτταρα διαμολυσμένα με το φορέα ελέγχου WPI, β) με το φορέα WPI-ERF και γ) με το φορέα WPI-M₁₋₇. Απεικονίζονται οι καμπύλες και τα αντίστοιχα ποσοστά των έντονα φθορίζοντων κυττάρων (όπου N/P η καμπύλη για τα αρνητικά κύτταρα, L/P για τα ασθενώς φθορίζοντα θετικά κύτταρα και GFP-positive για τα ισχυρώς φθορίζοντα θετικά κύτταρα). Τα ποσοστά των έντονα φθορίζοντων κυττάρων στην περίπτωση του φορέα WPI αγγίζουν το 100% ενώ στην περίπτωση των φορέων έκφρασης του ERF και του M₁₋₇ κυμαίνονται άνω του 90% ενώ συνολικά το ποσοστό των φθορίζοντων κυττάρων φτάνει στο 100%. Τα ποσοστά παραμένουν γενικά σταθερά μετά από επαναλαμβανόμενα κυτταρικά «περάσματα» πολλαπλασιασμού (passages) και κύκλους ψύξης-απόψυξης. Σημειώνεται στον άξονα x η ένταση του φθορισμού (FITC), ενώ στον άξονα y ο αριθμός των κυττάρων (count). Στο συνοδευτικό πίνακα δεξιά των ιστογραμμάτων παρουσιάζονται τα ποσοστά των φθορίζοντων κυττάρων ως προς τον αρχικό πληθυσμό (%Parent) καθώς και η μέση τιμή της έντασης του φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI).

a



b



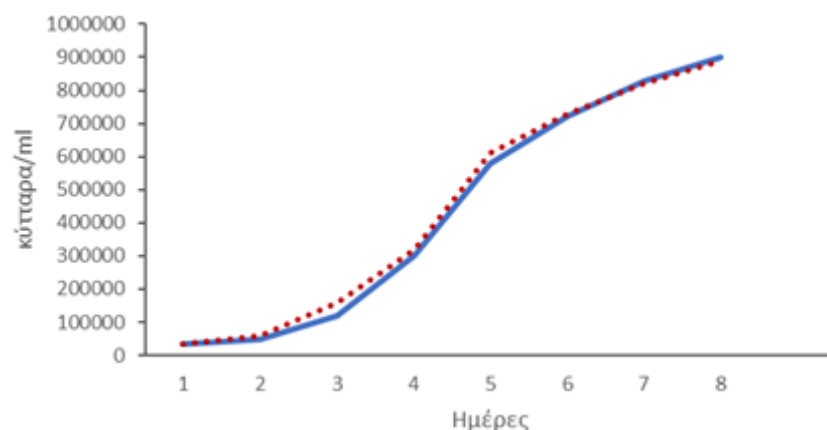
Εικόνα 34. Υπερέκφραση του ERF. α) Επιβεβαίωση υπερέκφρασης του ERF σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ενδεικτικά αποτελέσματα για έναν κλώνο υπερέκφρασης του ERF και M₁₋₇. Παρουσιάζεται για κάθε συνθήκη η αντίστοιχη έκφραση σε φωσφο-Erk και α-τουμπουλίνη. Στον κλώνο υπερέκφρασης του ERF, η φωσφορυλίωση του ERF είναι εξαρτώμενη της Erk, όπως είδαμε και στα HuT78 (Εικόνα 24), ενώ για τον κλώνο υπερέκφρασης του M₁₋₇ ο ERF βρίσκεται συνεχώς στην ενεργή μη φωσφορυλιωμένη κατάσταση ανεξαρτήτως της ενεργότητας της Erk. Δεξιά, η αντίστοιχη ενδογενής έκφραση του ERF σε HuT78 μετά από εμφάνιση την ίδια χρονική στιγμή στο σύστημα εμφάνισης ChemiDocTM XRS (Bio-Rad). β) Έκφραση του RNA του ERF στους κλώνους σταθερής υπερέκφρασης του ERF. Ενδεικτικά αποτελέσματα δύο κλώνων για κάθε φορέα. Αριστερά: θέσεις 1 και 2 αντιστοιχούν σε κλώνους HuT78, 3 και 4 σε WPI, 5 και 6 σε WPI-ERF, 7 και 8 σε WPI-M1-7. Θέσεις 1-8 (δεξιά) τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την έκφραση της β-ακτίνης. Στη θέση 9 αντιστοιχεί σε κάθε περίπτωση το δείγμα ελέγχου καθαρότητας και επιμολύνσεων της PCR (H₂O).

Χαμηλή βιωσιμότητα των κλώνων υπερέκφρασης του ERF

Κατά τη δημιουργία των μονοκλωνικών καλλιεργειών παρατηρήθηκε δυσκολία στην επιβίωση των κλώνων με υπερέκφραση του ERF και του M₁₋₇ συγκριτικά με τους κλώνους ελέγχου. Παρότι τα κύτταρα επιβίωναν μετά τον κυτταροδιαχωρισμό, αποτύγχαναν να πολλαπλασιαστούν ή απέπιπταν μετά από λίγους κύκλους πολλαπλασιασμού (Πίνακας 7).

	Σύνολο	Επιβίωσαν	<i>Πίνακας 7. Δημιουργία κλώνων υπερέκφρασης του ERF. Στη μεσαία στήλη παρουσιάζεται το σύνολο των πηγαδιών του τριβλίου των 96 θέσεων όπου τοποθετήθηκαν κύτταρα για τη δημιουργία μονοκλωνικών καλλιεργειών κατά το κυτταροδιαχωρισμό ενώ στην τρίτη στήλη σε πόσα πηγάδια τελικά επιβίωσαν τα κύτταρα και εξελίχθηκαν σε μονοκλωνικές καλλιέργειες (ποσοστό βιωσιμότητας ~20%) ανά φορέα.</i>
HuT78	56	52	
WPI	56	50	
ERF	56	12	
M ₁₋₇	56	12	

Για να ενεγχθεί κατά πόσον η δυσκολία στην επιβίωση των κλώνων προέρχεται από κάποιον ανασταλτικό παράγοντα που εκκρίνουν τα κύτταρα λόγω της υπερέκφρασης του ERF, υπερκείμενα καλλιεργητικού μέσου συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια αυτών των κυττάρων και χρησιμοποιήθηκαν αντί θρεπτικού μέσου σε καλλιέργειες κυττάρων ελέγχου. Τα αποτελέσματα της καμπύλης ανάπτυξης (growth curve) και της μέτρησης του κυτταρικού θανάτου (trypan blue exclusion assay) δεν έδειξαν καθυστέρηση στον πολλαπλασιασμό των κλώνων ελέγχου ούτε επίδραση στη βιωσιμότητά τους (Εικόνα 35) αποκλείοντας την πιθανότητα ο παράγοντας που επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων να προέρχεται από το περιβάλλον τους. Είναι πιθανό ότι υψηλή έκφραση του ERF παρεμποδίζει την ομαλή αλληλουχία των διαφόρων σταδίων του κυτταρικού κύκλου και έτσι τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται ομαλά.



Εικόνα 35. Καμπύλη βιωσιμότητας κυττάρων μετά από καλλιέργεια σε υπερκείμενο που έχει συλλεχθεί από καλλιέργεια κλώνων σταθερής υπερέκφρασης του *ERF*. Τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού μεταξύ της 2ης και 5ης ημέρας ενώ ο πολλαπλασιασμός τους δεν επηρεάζεται. Με διακεκομμένη κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχου που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό μέσο. Όπως γίνεται αντιληπτό, οι καμπύλες σχεδόν ταυτίζονται ενώ δεν υπήρχαν διαφοροποιήσεις ούτε στο ποσοστό των νεκρών κυττάρων που μετρούνταν καθημερινά.

2.3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, έχει βρεθεί σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους ότι ο ERF προκαλεί «στάση» των κυττάρων στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Για να μελετήσουμε τη δράση του ERF στον κύκλο των T λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε κυτταρικός κύκλος μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Κυτταρομετρία Ροής. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο σε μαζικές καλλιέργειες κυττάρων HuT78 σταθερής υπερέκφρασης του ERF όσο και στους κλώνους σταθερής υπερέκφρασης του ERF.

Κυτταρικός κύκλος κυττάρων μαζικής καλλιέργειας

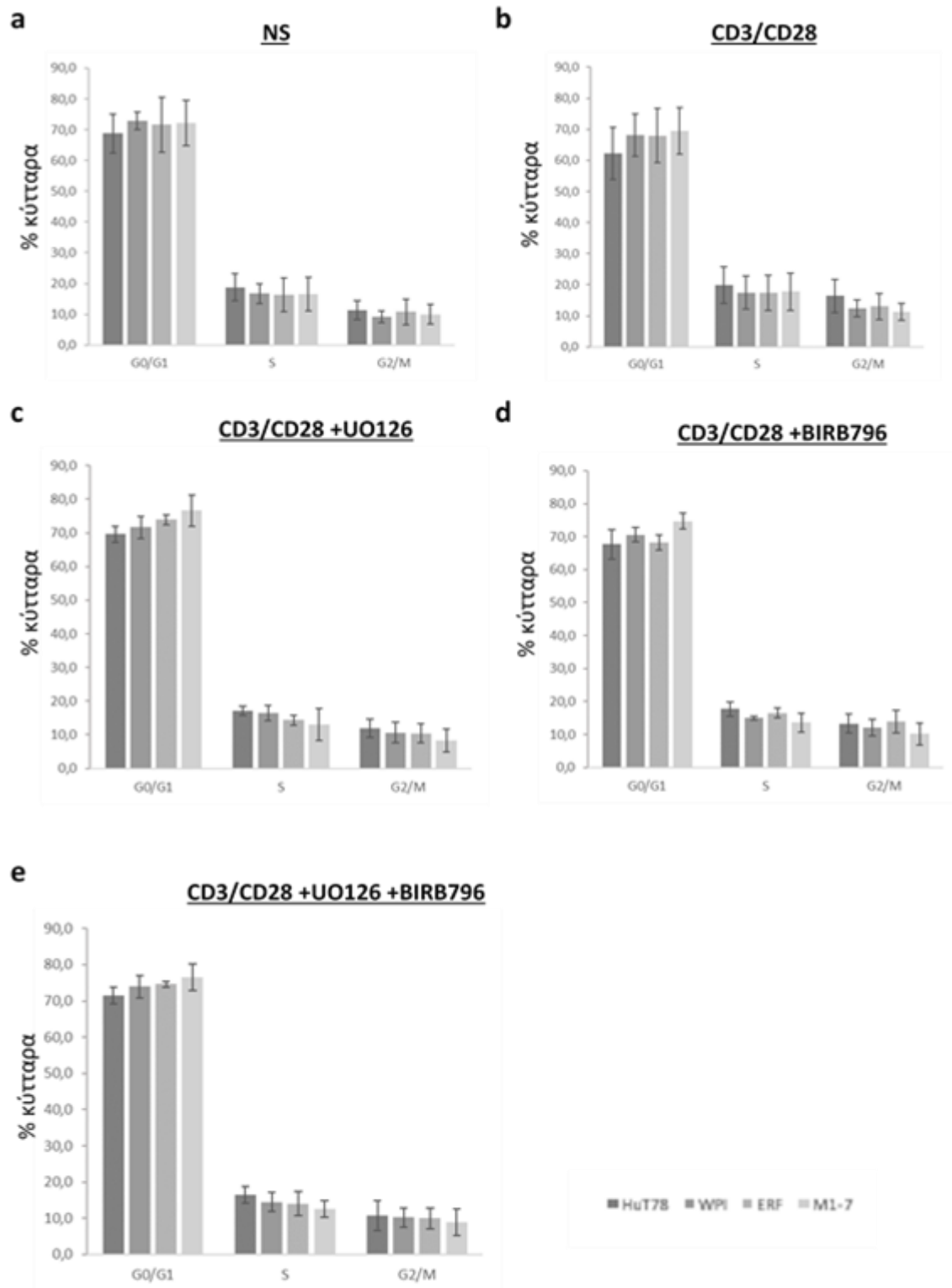
Ο κύκλος των κυττάρων μελετήθηκε σε διεγερμένα και αδιέγερτα (24h) κύτταρα HuT78 και κύτταρα διαμολυσμένα με τους φορείς WPI, WPI-ERF και WPI-M₁₋₇. παρουσία ή όχι του ειδικού για την Erk αναστολέα UO126 ή/και του αναστολέα της κινάσης p38 BIRB796. Υπό συνθήκες ηρεμίας τα ποσοστά των κυττάρων στις φάσεις του κύκλου δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 καλλιιεργειών και κυμάνθηκαν στο 70-72% (G0/G1), 16-19% (S) και 10-11.5% (G2/M) (Εικόνα 36. a). Μετά από διέγερση, όπως ήταν αναμενόμενο, το ποσοστό των κυττάρων που εισήλθε στη φάση G2/M αυξήθηκε για όλα τα κύτταρα (13-16%) με τα κύτταρα που φέρουν το M₁₋₇ να παρουσιάζουν τη μικρότερη αύξηση (Εικόνα 36. b). Ενδιαφέρον παρουσίασε η επόμενη συνθήκη όπου μετά από διέγερση και παρουσία του UO126 στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF και το M₁₋₇ παρατηρήθηκε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1 (περίπου 74% και 77% αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου WPI (71.6%). Παράλληλα, τα ποσοστά των κυττάρων της G2/M φάσης μειώθηκαν με τα κύτταρα με το M₁₋₇ να παρουσιάζουν τη μέγιστη μείωση (8.3% έναντι 10.5% που αντιστοιχεί σε κύτταρα με το WPI ή ERF) (Εικόνα 36. c). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι ο ERF αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο προκαλώντας αφενός συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1 αφετέρου μείωση των κυττάρων στη φάση G2/M κατά τρόπο εξαρτώμενο της ενεργότητας της Erk, αφού το φαινόμενο παρατηρείται αφενός όταν η Erk είναι ανενεργή και συνεπώς ο ERF «δρα ελεύθερος» αφετέρου είναι πιο έντονο στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον συνεχώς ενεργό ERF.

Μετά από διέγερση και παρουσία του αναστολέα BIRB796, η εικόνα ομοιάζει αυτής μετά από διέγερση με τα κύτταρα να έχουν παρόμοια ποσοστά στις δύο συνθήκες. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το M₁₋₇ τα ποσοστά των οποίων ομοίασαν αυτά των κυττάρων που βρίσκονται σε ηρεμία και έδειξαν και πάλι τάση συσσώρευσης στη φάση G0/G1 (75% έναντι του 70% των κυττάρων ελέγχου) (Εικόνα 36. d). Τέλος, μετά από διέγερση και παρουσία και των δύο αναστολέων τα ποσοστά όλων των κυττάρων επανέρχονται σε αυτά που παρατηρήθηκαν μετά από διέγερση και παρουσία μόνο του UO126 υποδηλώνοντας ότι οι δύο αναστολείς δε δρουν συνεργιστικά και ότι ο UO126 αρκεί για να παρατηρηθεί αναστολή του κύκλου λόγω της ανενεργούς Erk (Εικόνα 36. e). Όλα τα ποσοστά παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 8.

Τα αποτελέσματα των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον ERF ή το M₁₋₇ παρουσίασαν μη ικανοποιητική επαναληψιμότητα, ειδικά στην περίπτωση των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον ERF, γι' αυτό και κρίθηκε αναγκαίο να συνεχιστεί η μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε μονοκλωνικές καλλιέργειες σταθερής υπερέκφρασης.

	G0/G1	S	G2/M	
HuT78	68.8	18.8	11.4	NS
WPI	72.8	16.7	9.3	
ERF	71.6	16.3	10.8	
M ₁₋₇	72.2	16.5	10.0	
HuT78	62.2	19.8	16.4	CD3/28
WPI	68.2	17.4	12.4	
ERF	68.0	17.5	13.0	
M ₁₋₇	69.4	17.8	11.3	
HuT78	69.7	17.2	11.9	CD3/28 +UO126
WPI	71.6	16.4	10.6	
ERF	73.9	14.3	10.4	
M ₁₋₇	76.7	13.0	8.3	
HuT78	67.7	17.7	13.3	CD3/28 +BIRB796
WPI	70.6	14.9	12.0	
ERF	68.1	16.5	14.0	
M ₁₋₇	74.7	13.6	10.1	
HuT78	71.5	16.4	10.7	CD3/28 +UO126 +BIRB796
WPI	73.9	14.5	10.2	
ERF	74.6	14.1	10.0	
M ₁₋₇	76.5	12.6	9.0	

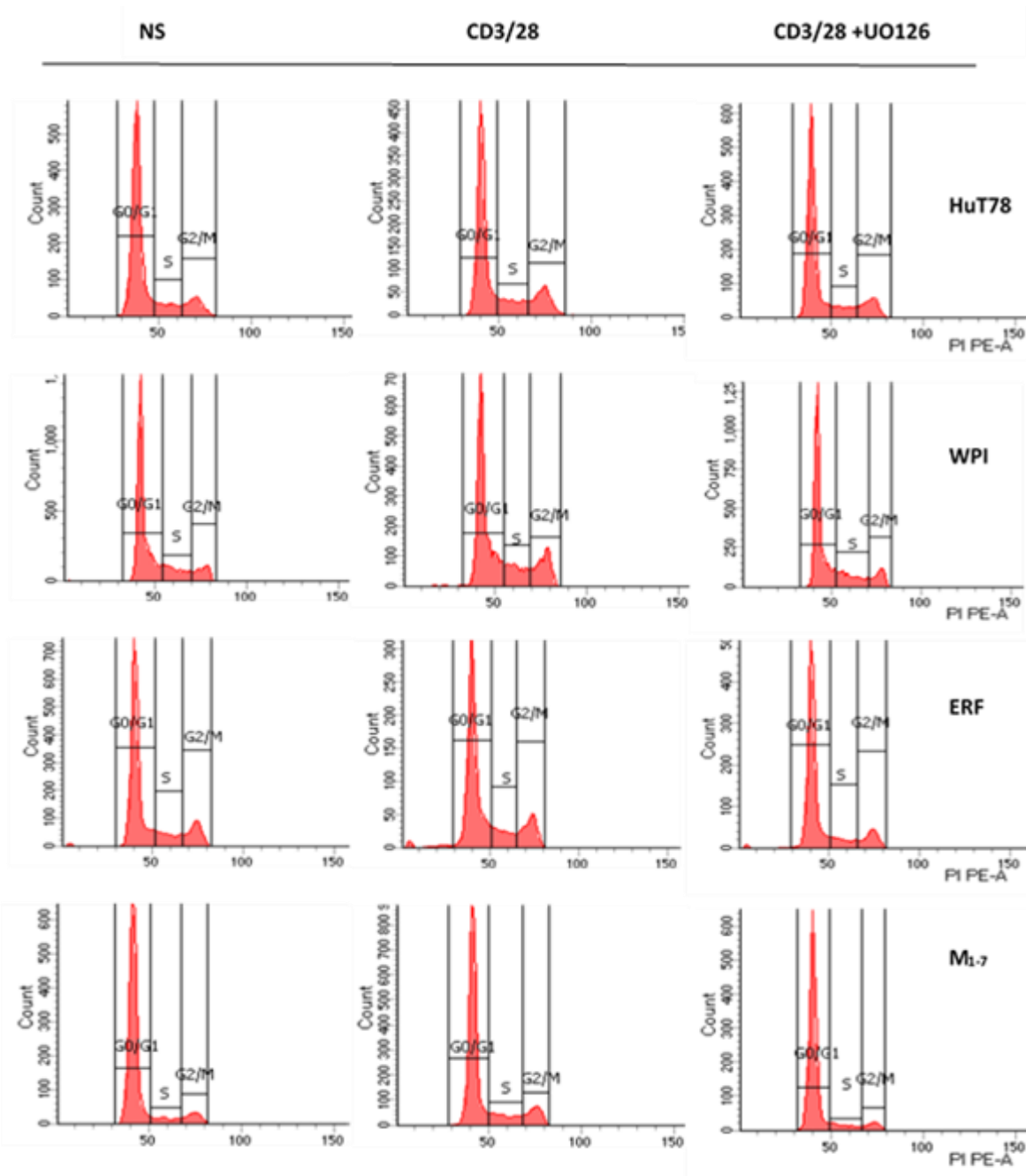
Πίνακας 8. Κατανομή κυττάρων ανά φορέα στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα αναγραφόμενα νούμερα αντιστοιχούν στα ποσοστά (μέσοι όροι του συνόλου των μετρήσεων) των κυττάρων που κατανέμονται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου για κάθε κυτταρική σειρά. Δεξιά σημειώνονται οι συνθήκες ενώ με κόκκινο χρώμα δίνεται έμφαση στα ποσοστά που δηλώνουν συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1 και μείωση στη φάση G2/M στην περίπτωση των κυττάρων με υπερέκφραση του M₁₋₇.



Εικόνα 36. Κυτταρικός κύκλος κυττάρων HuT78 α) σε ηρεμία, β) μετά από διέγερση με αντι-CD3/28, γ) μετά από διέγερση με αντι-CD3/28 παρουσία του αναστολέα UO126, δ) μετά από διέγερση με αντι-CD3/28 παρουσία του αναστολέα BIRB796 και ε) μετά από διέγερση με αντι-CD3/28 παρουσία και των δύο αναστολέων UO126 και BIRB796. Στο υπόμνημα φαίνεται η χρωματική αντιστοιχία διαβαθμίσεων του γκρι των κυτταρικών καλλιιεργειών HuT78 σταθερής υπερέκφρασης WPI, ERF και M1-7.

Κυτταρικός κύκλος μονοκλωνικών καλλιιεργειών

Για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιηθήκαν μονοκλωνικές καλλιέργειες κυττάρων HuT78 σταθερής υπερέκφρασης του WPI, ERF ή του M₁₋₇. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με αντι-CD3/28 παρουσία ή όχι του αναστολέα U0126 και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δύο κλώνους ανά περίπτωση. Ο κυτταρικός κύκλος μελετήθηκε μετά από χρώση με PI και αναλύθηκε με Κυτταρομετρία Ροής. Τα αποτελέσματα επέδειξαν και πάλι μη σταθερή επαναληψιμότητα για τους κλώνους που υπερεκφράζουν κατά κύριο λόγο τον ERF και δευτερευόντως το M₁₋₇. Ο κυτταρικός κύκλος των κλώνων HuT78 και των κλώνων που φέρουν το WPI δεν διαφοροποιήθηκε από τους αντίστοιχους των μαζικών καλλιιεργειών για τις ίδιες συνθήκες. Αντίθετα, τα αποτελέσματα για τους κλώνους υπερέκφρασης του ERF ποικίλουν παρουσιάζοντας ενδιαφέρον. Ο κύκλος των κλώνων ακολουθούσε άλλοτε το μοτίβο των κλώνων ελέγχου, όπου τα κύτταρα εισέρχονται κανονικά στη φάση G2/M μετά από διέγερση, κι άλλοτε παρουσίαζε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1 με μειωμένο ποσοστό κυττάρων στη φάση G2/M κάτι που γινόταν πιο έντονο μετά από διέγερση και παρουσία του U0126. Ειδικά στους κλώνους υπερέκφρασης του M₁₋₇ παρατηρήθηκε πιο έντονα και πιο συχνά αυτή η «αδυναμία» των κυττάρων να εισέλθουν στην G2/M φάση μετά από διέγερση ενώ το φαινόμενο εντεινόταν παρουσία του U0126. Οι παρατηρήσεις αυτές, παρότι δεν παρουσίασαν και πάλι ικανοποιητική επαναληψιμότητα, συμφωνούν με τα αποτελέσματα από τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου κυττάρων μαζικής καλλιιεργείας και υποδηλώνουν ότι ο ERF έχει ανασταλτικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο των T κυττάρων κατά τρόπο εξαρτώμενο της ενεργότητας της Erk. Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα για κάθε κλώνο διαφορετικού φορέα για τις επιμέρους συνθήκες που ελέγχθηκαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 37.

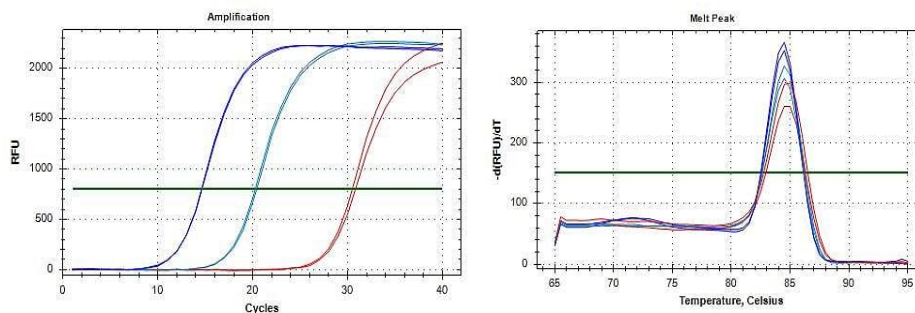


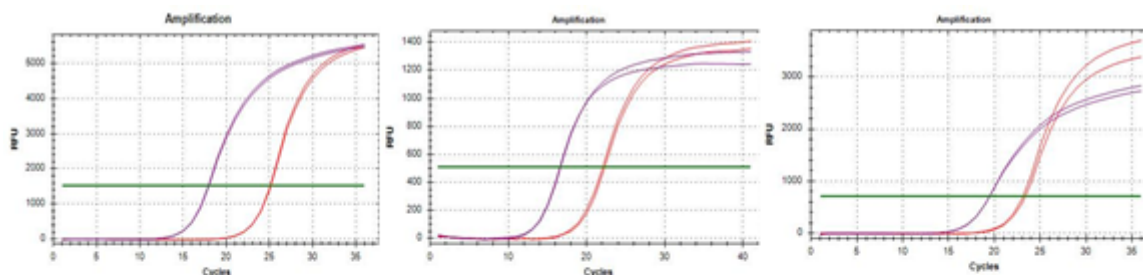
Εικόνα 37. Επίδραση της υπερέκφρασης του ERF στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε HuT78 κύτταρα. Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κατανομών του κυτταρικού κύκλου για κάθε κυτταρικό κλώνο μετά από χρώση με PI και ανάλυση με Κυταρομετρία Ροής. Οι συνθήκες που ελέγχθηκαν σημειώνονται ανά στήλη ενώ ανά γραμμή παρουσιάζεται από ένας κλώνος για HuT78, WPI, ERF και M_{1.7}. Στον άξονα των x σημειώνεται το PI (PE-A) ενώ στον άξονα των y ο αριθμός των κυττάρων (Count).

Μελέτης της έκφρασης της κυκλίνης D1

Για την περαιτέρω διερεύνηση του κυτταρικού κύκλου, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η έκφραση της κυκλίνης D1. Η κυκλίνη D1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *CCND1* και αποτελεί βασικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S. Κύτταρα της G1 φάσης που είναι έτοιμα να περάσουν στην S παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της D1 καθώς υψηλά επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης κυκλίνης σχετίζονται με προώθηση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1. Κατά τη φάση S τα επίπεδα έκφρασης της D1 μειώνονται ώστε να επιτραπεί σωστή σύνθεση του DNA και η έκφρασή της επάγεται πάλι στη φάση G2/M. Έτσι, κύτταρα σταματημένα στη φάση G1 ή G2/M (G1 ή G2/M arrest) παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης D1 [186], [187].

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της D1 πραγματοποιήθηκε τόσο σε μαζική καλλιέργεια όσο και σε κυτταρικούς κλώνους HuT78. Κλώνοι ελέγχου έδειξαν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη έκφραση της D1 καθώς το προϊόν παράχθηκε σε πολύ υψηλό Cq (30), όπως φαίνεται στην Εικόνα 38. Στα ίδια κύτταρα, το γονίδιο αναφοράς εντοπίζεται σε Cq=14 ενώ το c-myc σε Cq=20. Σε άλλες κυτταρικές σειρές, το ίδιο ζεύγος εκκινήτων της D1 φαίνεται να παράγει κανονικά προϊόν, σε Cq μικρότερα των 25. Συνεπώς, οι συγκεκριμένες καλλιέργειες HuT78, τόσο η μαζικές όσο και οι μονοκλωνικές, φαίνεται να μην αποτελούν κατάλληλο εργαλείο για πραγματοποίηση μελέτης κυτταρικού κύκλου, γεγονός που να εξηγεί εν μέρει και την αστάθεια των αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων τόσο σε μαζικές καλλιέργειες όσο και σε κυτταρικούς κλώνους.





Εικόνα 38. Μεταγραφική έκφραση της κυκλίνης D1 στα HuT78 κύτταρα. (Πάνω, αριστερά) Ενδεικτικές καμπύλες Cq για τους εκκινητές διάφορων γονιδίων στα κύτταρα HuT78: 18s rRNA (μπλε), c-myc (γαλάζιο) και CCND1 (κόκκινο). Δεξιά παρουσιάζεται η καμπύλη τήξης ή αποδιάταξης (melt curve) του DNA για κάθε γονίδιο πιστοποιώντας την ύπαρξη μόνο ειδικής ενίσχυσης από τους εκκινητές (με μπλε χρώμα: 18s rRNA, γαλάζιο: c-myc, κόκκινο: D1). Κάτω, το ζεύγος των ίδιων εκκινητών για το γονίδιο CCND1 (κόκκινο) στις κυτταρικές σειρές HEK 293, MCF-7 και MDA ενώ με μωβ χρώμα το γονίδιο αναφοράς GABDH (©Chrysoula Komini). Σημειώνεται cycles=κύκλοι της PCR, RFU=relative fluorescence units (μονάδα σχετικού φθορισμού), temperature=η θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου.

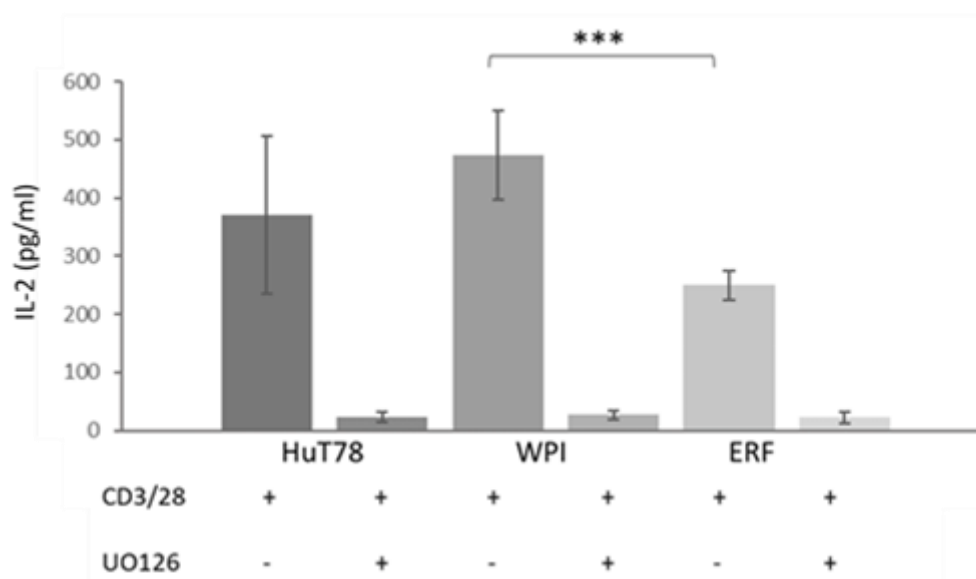
2.3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ IL-2

Τα έως τώρα αποτελέσματά μας παρέχουν βάσιμες ενδείξεις ότι ο ERF ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από την Erk και στα T κύτταρα. Δεδομένης της ρύθμισης της IL-2 από την Erk, επόμενος στόχος ήταν να εξεταστεί κατά πόσο ο ERF εμπλέκεται στη ρύθμιση της IL-2. Η διερεύνηση της ενδεχόμενης ρύθμισης της IL-2 από τον ERF πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο παραγωγής με Ανοσοδοκιμασία ELISA.

Για τη μελέτη της ρύθμισης της IL-2 από τον ERF σε επίπεδο παραγωγής, μαζικές καλλιέργειες κυττάρων HuT78 σταθερής υπερέκφρασης των WPI, ERF και M₁₋₇ διεγέρθηκαν με αντι-CD3 και -CD28 παρουσία του αναστολέα της Erk UO126. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν 24 και 48 ώρες μετά τη διέγερση και το επίπεδο παραγωγής της IL-2 εξετάστηκε με Ανοσοδοκιμασία ELISA. Τα αποτελέσματα παρότι έδειξαν μείωση της παραγωγής της IL-2 στους κλώνους υπερέκφρασης του ERF και του M₁₋₇ μετά από διέγερση, δεν παρουσίασαν σταθερότητα γι' αυτό και δεν παρουσιάζονται. Πάντως, οι συνθήκες διέγερσης CD3 και CD3 σε συνδυασμό με CD28 δεν έδειξαν διαφοροποίηση ως προς την παραγωγή της IL-2 ούτε στους κλώνους ελέγχου κι έτσι η συνδυασμένη διέγερση έναντι της μονής διέγερσης προτιμήθηκε στα επόμενα πειράματα.

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε μονοκλωνικές καλλιέργειες σταθερής υπερέκφρασης κυττάρων HuT78 ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκε σε ισάριθμους κυτταρικούς κλώνους για κάθε φορέα (έξι) ενώ στην Εικόνα 39 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου των κλώνων των HuT78 και υπερέκφρασης των WPI και ERF.

Όπως ήταν αναμενόμενο, σε συνθήκες ηρεμίας δεν ανιχνεύτηκε IL-2. Μετά από διέγερση, στους κλώνους υπερέκφρασης του ERF παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα παραγωγής IL-2 ($P < 0.0003$) σε σύγκριση με του κλώνους ελέγχου. Η παραγωγή της IL-2 έχει σχεδόν υποδιπλασιαστεί. Παρουσία του αναστολέα, όπως ήταν αναμενόμενο, τα επίπεδα παραγωγής IL-2 είναι οριακά ανιχνεύσιμα. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι μεταξύ των κλώνων υπερέκφρασης του ERF, ο κλώνος με την χαρακτηριστικά χαμηλότερη παραγωγή IL-2 ήταν και αυτός με τον υψηλότερο φθορισμό.



Εικόνα 39. Ρύθμιση της παραγωγής της IL-2 από τον ERF. Μονοκλωνικές καλλιέργειες κυττάρων σταθερής υπερέκφρασης WPI, ERF και $M_{3.7}$ διεγέρθηκαν με αντι-CD3 και -CD28 (2 $\mu\text{g/ml}$ + 1 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα) για 24 και 48 ώρες παρουσία ή όχι του ειδικού για την Erk αναστολέα UO126 (1 μM). Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν 24 και 48 ώρες μετά τη διέγερση και η παραγωγή της IL-2 ελέγχθηκε με ELISA. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μέσων όρων παραγωγής IL-2 για κάθε φορέα μετά από 48ωρη διέγερση παρουσία ή όχι του UO126. Στο υπόμνημα σημειώνεται με σταυρό η παρουσία διέγερσης και/ή αναστολής ενώ μ παύλα η απουσία ανά συνθήκη. Η συνθήκη ηρεμίας δεν παρουσιάζεται καθώς τα επίπεδα παραγωγής IL-2 ήταν μη ανιχνεύσιμα. Η στατιστική σημαντικότητα σημειώνεται με μονό αστερίσκο, *, όπου $P < 0.05$, με διπλό αστερίσκο, **, όπου $P < 0.01$ και με τριπλό αστερίσκο, ***, όπου $P < 0.001$.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο ERF είναι αρνητικός ρυθμιστής της παραγωγής της IL-2 και πιθανόν κατά τρόπο εξαρτώμενο της έντασης της έκφρασής του.

Αναφορικά με τους κλώνους υπερέκφρασης του M₁₋₇, σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από διέγερση παρουσία του αναστολέα δεν ανιχνεύονται ή ανιχνεύονται οριακά επίπεδα IL-2 αντίστοιχα, ότι, δηλαδή, συμβαίνει και με τους κλώνους ελέγχου. Μετά από διέγερση, όμως, τα αποτελέσματα ποικίλουν. Από τους έξι κλώνους που μετρήθηκαν, οι τέσσερις με την υψηλότερη ένταση φθορισμού ακολουθούν το μοτίβο των κλώνων υπερέκφρασης του ERF, παρουσιάζουν, δηλαδή, σημαντικά μειωμένη παραγωγή IL-2, ενώ δύο κλώνοι με μικρότερη ένταση φθορισμού παράγουν χαρακτηριστικά υψηλά επίπεδα IL-2. Τα αποτελέσματα των κλώνων υπερέκφρασης του M₁₋₇ παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

M ₁₋₇						
	κλ. 1	κλ. 2	κλ. 3	κλ. 4	κλ. 5	κλ. 6
IL-2 (pg/ml)	1028	1158	271	507	153	140
MFI	7.2	6.7	8.2	9.6	9.2	8.8
% GFP.	96	87	98	97	98	94

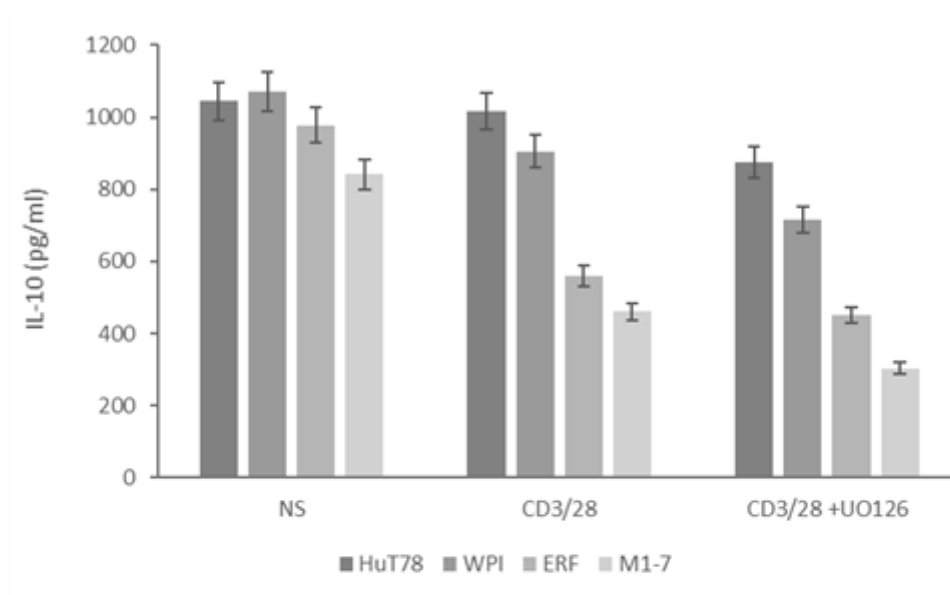
WPI						
	κλ. 1	κλ. 2	κλ. 3	κλ. 4	κλ. 5	κλ. 6
IL-2 (pg/ml)	479	456	120	522	553	353

Πίνακας 9. 48ωρη παραγωγή IL-2 μετά από διέγερση με αντι-CD3 και -CD28 συναρτήσει της έντασης φθορισμού (MFI) του M₁₋₇. Οι κλώνοι χαμηλότερης MFI (1 και 2) παρουσιάζουν υψηλή παραγωγή IL-2 σε αντίθεση με τους κλώνους υψηλής MFI (3-6) που παρουσιάζουν επίπεδα παραγωγής IL-2 της τάξης των κλώνων υπερέκφρασης του ERF. Στην τελευταία σειρά παρουσιάζεται το ποσοστό των φθορίζοντων σε GFP κυττάρων σε σχέση με το συνολικό τους αριθμό. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η παραγωγή της IL-2 για κάθε κλώνου ελέγχου στην ίδια συνθήκη.

2.3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ IL-10

Γνωρίζοντας ότι η έκφραση της IL-10 ελέγχεται και από το μονοπάτι των MAPK [161], πραγματοποιήθηκε μια πρώτη μελέτη της επίδρασης του ERF στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10. Η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για τη μελέτη της ρύθμισης της παραγωγής της IL-2, ακολουθήθηκε και για την IL-10. Έτσι, η 48ωρη παραγωγή IL-10 μετρήθηκε με Ανοσοδοκιμασία ELISA. Τα αποτελέσματα ενός αντιπροσωπευτικού κλώνου για κάθε φορέα παρουσιάζονται στην Εικόνα 40.

Όπως ήταν αναμενόμενο, σε συνθήκες ηρεμίας όλοι οι κλώνοι παρήγαγαν IL-10 καθώς τα κύτταρα HuT78 παράγουν αυθόρμητα υψηλά επίπεδα IL-10. Μετά από διέγερση, στους κλώνους ελέγχου δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή συγκριτικά με τη συνθήκη ηρεμίας. Μετά από διέγερση, όμως, στους κλώνους υπερέκφρασης του ERF ή του M₁₋₇ ανιχνεύθηκαν χαμηλότερα επίπεδα IL-10 σε σύγκριση με τα επίπεδα που παρήγαγαν υπό συνθήκες ηρεμίας.



Εικόνα 40. Ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 από τον ERF. Μονοκλωνικές καλλιέργειες κυττάρων σταθερής υπερέκφρασης WPI, ERF και M₁₋₇ διεγέρθηκαν με αντι-CD3 και -CD28 (2 µg/ml + 1 µg/ml αντίστοιχα) για 24 και 48 ώρες παρουσία ή όχι του ειδικού για την Erk αναστολέα UO126 (1µM). Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν 24 και 48 ώρες μετά τη διέγερση και η παραγωγή της IL-10 ελέγχθηκε με ELISA. Παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα ενός αντιπροσωπευτικού για κάθε φορέα κλώνου της παραγωγής της IL-10 μετά από 48ωρη διέγερση. Στο υπόμνημα σημειώνεται η χρωματική αντιστοιχία των κλώνων ανά φορέα.

Μάλιστα, στους κλώνους υπερέκφρασης M₁₋₇, όπου και το φαινόμενο παρατηρείται εντονότερα, τα επίπεδα παραγωγής της κυτταροκίνης υποδιπλασιάζονται. Φαίνεται δηλαδή, ότι ο ERF επιδρά αρνητικά και στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-10 κατά τρόπο εξαρτώμενο της κυτταρικής διέγερσης.

Συνολικά, τα αποτελέσματα από τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του ERF στη ρύθμιση της IL-2 και της IL-10 υποδηλώνουν ότι ο ERF είναι αρνητικός ρυθμιστής της παραγωγής αυτών των δύο κυτταροκινών. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν, ίσως, μια ένδειξη για έναν γενικότερο ανασταλτικό ρόλο του ERF στην παραγωγή κυτταροκινών του ανοσοποιητικού συστήματος και θέτουν ερωτήματα προς μελλοντική διερεύνηση σχετικά με το ρόλο του ERF στη ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η Erk έχει αποδεδειγμένα κεντρικό ρόλο στη βιολογία των T κυττάρων, κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων στο στάδιο της θετικής/αρνητικής επιλογής, στην επαγωγή της ανέργειας στα ώριμα T κύτταρα και στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-2 στα ενεργοποιημένα T κύτταρα [62], [68], [188]. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η Erk ασκεί τις παραπάνω λειτουργίες έχουν μελετηθεί μόνο εν μέρει ενώ ερωτήματα παραμένουν ως προς την ένταση και τη διάρκεια του σήματος της Erk αλλά και των κάτωθεν στόχων αυτής [188]. Κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής έρευνας είναι η διερεύνηση του ρόλου του ρυθμιζόμενου από την Erk μεταγραφικού καταστολέα ERF στη βιολογία των T λεμφοκυττάρων και η συσχέτιση της δράσης του με τις διεργασίες α) της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων και β) της ενεργοποίησης των T κυττάρων, με κύριο βάρος στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ρύθμισης της έκφρασης της IL-2. Οι μελέτες αυτές θα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη βιολογία των T κυττάρων σε διάφορα επίπεδα.

ΜΕΡΟΣ Ι

Κατά το πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η ωρίμανση και διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων *in vivo* σε διαγονιδιακά ζώα μετά από εξάλειψη του *Erf*. Όπως περιγράφηκε στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», μετά από διασταυρώσεις μεταξύ ζώων που έφεραν τα διαγονίδια *Lck^{cre}* και *Erf^{LoxP/LoxP}*, προέκυψαν δύο γονότυποι ενδιαφέροντος με διαβαθμίσεις στην έκφραση του *Erf*: ζώα με μη ανιχνεύσιμη έως ελάχιστη έκφραση του *Erf* (γονότυπος *Erf^{LoxP/LoxP};Lck^{cre}*) και με μερική έκφραση του *Erf* (γονότυπος *Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}*). Το γεγονός που χαρακτηρίζει τα αποτελέσματά μας ως προς την έκφραση του *Erf* και παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ότι ακόμη και στο γονότυπο *Erf^{LoxP/+};Lck^{cre}*, όπου δηλαδή έχει πραγματοποιηθεί μερικώς μόνο εξάλειψη του *Erf*, παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο στους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων όσο και στην έκφραση των γονιδίων της CD4+ κυτταρικής δέσμευσης. Αρκεί, δηλαδή, μείωση στην έκφραση του *Erf* για να παρουσιαστούν επιπτώσεις στην

ωρίμανση των θυμοκυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα της εξάλειψης του *Erf* δεν οφείλονται στην «όλα ή τίποτα» έκφραση του *Erf* αλλά είναι εξαρτώμενα της ποσοτικής έκφρασής του. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με άλλη έρευνα όπου η μειωμένη κατά 30% έκφραση του *Erf* προκαλεί ελαττωματική οστεογένεση στο κρανίο [118].

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν στατιστικώς σημαντική μείωση των υποπληθυσμών CD4+ και TCRβ και αύξηση του υποπληθυσμού DP των θυμοκυττάρων που απομονώθηκαν από ζώα στα οποία είχε επιτευχθεί εξάλειψη του *Erf*. Σημαντικές μεταβολές δεν παρατηρήθηκαν κατά τις DN φάσης της ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια συσσώρευση των θυμοκυττάρων κατά το στάδιο των διπλά θετικών κυττάρων, πριν τη δέσμευση κυτταρικής σειράς και υποδηλώνουν ότι ο *Erf* είναι παράγοντας ρύθμισης της T κυτταρικής ωρίμανσης στο θύμο κατά το στάδιο δέσμευσης κυτταρικής σειράς. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί ότι αυτός ο «φαινότυπος» των μειωμένων υποπληθυσμών του θύμου διατηρείται μερικώς και στον σπλήνα όπου παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα ποσοστά CD4+ σπληνοκυττάρων στα ζώα με μερική εξάλειψη του *Erf*. Βέβαια, με τα στοιχεία που διαθέτουμε θα ήταν παρακινδυνευμένη οποιαδήποτε εξηγηματική υπόθεση καθώς δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε πόσα κύτταρα με εξάλειψη του *Erf* επιβίωσαν και μετανάστευσαν στο σπλήνα και τελικά σε πόσα κύτταρα από τα ολικά σπληνοκύτταρα που μελετήθηκαν έχει εξαλειφθεί ο *Erf*. Σε αυτήν την περίπτωση, διαφωτιστική θα ήταν η χρήση ζώων ROSA26 που μας επιτρέπει μέσω εκπομπής διαφορετικού χρώματος φθορισμού τον εντοπισμό τόσο των κυττάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί η εξάλειψη του *Erf* όσο και των φυσιολογικών κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει στο σπλήνα [189], [190] γι' αυτό και έχουμε ήδη ξεκινήσει πειράματα προς αυτήν την κατεύθυνση. Τέλος, η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού ζώων θα παρείχε πιο ασφαλή στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Σε κάθε περίπτωση, κατά πόσον ο σημαντικά μειωμένος υποπληθυσμός των CD4+ (και των CD8+) με εξάλειψη του *Erf* είναι λειτουργικός και πώς συμπεριφέρεται στις ανοσοαποκρίσεις αποτελούν κύρια ερωτήματα για μελλοντική διερεύνηση.

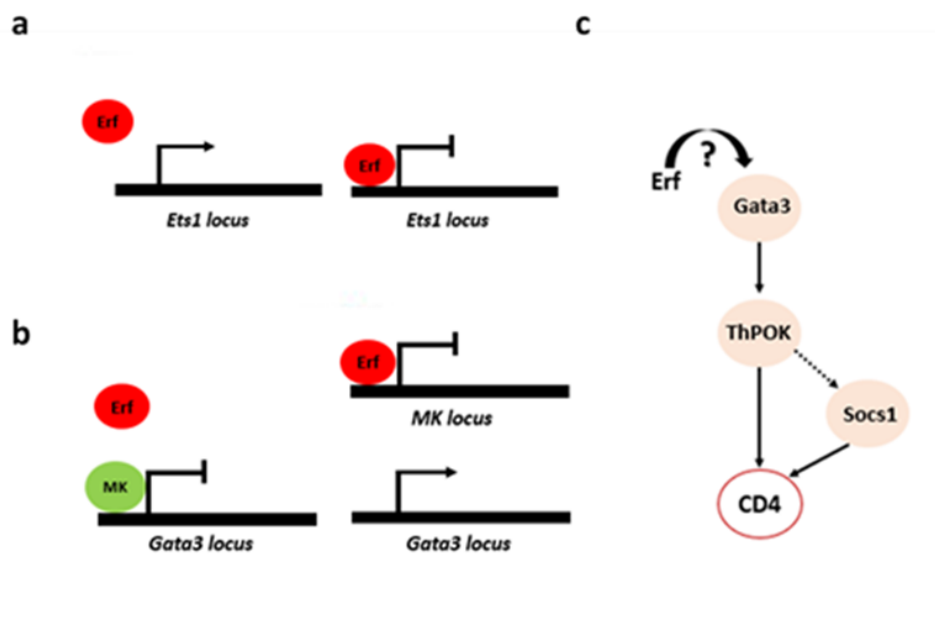
Για τη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού των προαναφερθέντων ευρημάτων, μελετήθηκε η έκφραση καίριων γονιδίων-ρυθμιστών της CD4+ ή CD8+ κυτταρικής

δέσμευσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη έκφραση των γονιδίων *ThPOK*, *Gata3* και *Socs1*, γονιδίων, δηλαδή, που σχετίζονται άμεσα με την επαγωγή της CD4+ δέσμευσης, κάτι που συνάδει με τον μειωμένο αριθμό CD4+ θυμοκυττάρων και συνηγορεί υπέρ της υπόθεσής μας για τη θετική ρύθμιση του *Erf* στη CD4+ δέσμευση. Επίσης, τα στατιστικώς σημαντικά υψηλά ποσοστά DP θυμοκυττάρων σε συνδυασμό με την αύξηση της έκφρασης του *Ets1* συμφωνεί με το αποτέλεσμα άλλης έρευνας στην οποία ανενεργό *Ets1* στο θύμο προκαλεί μειωμένα επίπεδα DP θυμοκυττάρων [97]. Ο *Erf* θα μπορούσε να δρα ισχυρά κατασταλτικά επί του *Ets1* στα θυμοκύτταρα. Το γεγονός ότι η αύξηση της έκφρασης του *Ets1* εντείνεται στα ζώα με μη ανιχνεύσιμη έκφραση *Erf*, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η καταστολή του *Ets1* είναι εξαρτώμενη της ποσοτικής έκφρασης του *Erf*, κάτι που είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ζώων (Εικόνα 41. α). Αντίθετα, η εξάλειψη του *Erf* δε μετέβαλε την έκφραση των *Runx3* και *MAZR*, γονιδίων που επάγουν τη CD8+ δέσμευση, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Erf* δεν επηρεάζει τη δέσμευση προς κυτταροτοξική σειρά και συμφωνεί με το εύρημά μας από την Κυτταρομετρία Ροής σχετικά με τον μη στατιστικώς σημαντικά μειωμένο υποπληθυσμό των CD8+ θυμοκυττάρων.

Κατά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από της RT-qPCR, διαπιστώσαμε ότι στατιστικές διαφορές παρατηρούνται μόνο μεταξύ των ζώων με εξάλειψη του *Erf* και των ζώων που φέρουν το διαγονίδιο *Lck-cre* και όχι μεταξύ των ζώων με εξάλειψη του *Erf* και αυτών με αγρίου τύπου *Lck*. Εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο *Ets1*, όπου παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές μεταβολές και μεταξύ των ζώων με εξάλειψη του *Erf* και των ζώων αγρίου τύπου ως προς το γονίδιο *Lck*. Σημειώνεται ότι οι τρεις γονότυποι ελέγχου συγκρινόμενοι μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ως προς την έκφραση των γονιδίων που εξετάζονται. Λαμβάνοντας υπόψιν τις «εκτός στόχου» επιδράσεις που έχουν καταγραφεί για το *Lck-cre*, διερωτηθήκαμε κατά πόσον το *Lck-cre* επηρεάζει το σύστημα των ζώων και σε μοριακό επίπεδο καθώς η εξάλειψη του *Erf* δείχνει να επαναφέρει την έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων στα επίπεδα έκφρασης των ζώων αγρίου τύπου. Συνεπώς, το ερώτημα αυτό αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω διερεύνησης ώστε να εξακριβωθεί κατά πόσο η ίδια η εξάλειψη του *Erf* επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων *ThPOK*, *Gata3* και *Socs1*, αλλά και

σε δεύτερο βαθμό και την έκφραση των *Myb*, *Runx3* και *MAZR*, αλλά και κατά πόσον οι παρατηρήσεις μας σχετίζονται με τη φυσιολογία των θυμοκυττάρων.

Όπως προαναφέρθηκε, το *Gata3* δρα ρυθμιστικά πάνω στο *ThPOK* καθώς προσδένεται άμεσα στον υποκινητή του επάγοντας την έκφρασή του. Συνεπώς, μειωμένη έκφραση του *Gata3* θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα και *ThPOK*. Επίσης, σύμφωνα με τους Luckey et al., το *ThPOK* με τη σειρά του επάγει την έκφραση του *Socs1* [191] άρα μειωμένη έκφραση του *ThPOK* θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση και *Socs1*. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων ευνοεί την CD4+ κυτταρική δέσμευση έναντι της CD8+ ενώ η μειωμένη έκφρασή τους επιφέρει μείωση στον πληθυσμό των CD4+ SP θυμοκυττάρων. Πώς θα μπορούσε ο *Erf* να εμπλέκεται στην όλη εικόνα; Μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο *Erf* ως μεταγραφικός καταστολέας ρυθμίζει θετικά την έκφραση του *Gata3* ασκώντας κατασταλτική δράση σε γονίδιο αναστολέα της μεταγραφής του *Gata3*. Κατά συνέπεια, το *Gata3* θα ήταν ελεύθερο να μεταγραφεί. Ελλείψει *Erf*, ο παράγοντας μεταγράφεται αναστέλλοντας την έκφραση του *Gata3* (Εικόνα 41. b). Σημειώνεται ότι μέχρι σήμερα μόνο το *Myb* έχει αναγνωρισθεί ως παράγοντας άμεσης πρόσδεσης στο *Gata3* κατά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων δρώντας μάλιστα θετικά στην έκφρασή του [192]. Ολοκληρώνοντας την εικόνα, η θετική ρύθμιση του *Erf* στο *Gata3* επάγει την έκφραση του *ThPOK*, το οποίο σε συνεργασία με το *Socs1* ευνοούν τη CD4+ δέσμευση (Εικόνα 41. c). Παρότι δεν έχουν αποδοθεί έως σήμερα στον *Erf* ιδιότητες μεταγραφικού ενεργοποιητή, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ο *Erf* να δρα ως άμεσος ή έμμεσος ενεργοποιητής του *Gata3* ενώ το ότι η μείωση της έκφρασης του *Gata3* παρατηρείται μόνο στα ζώα με εξάλειψη του *Erf* υποδηλώνει ότι ο *Erf* είναι ισχυρός ρυθμιστής του *Gata3* πιθανόν κατά τρόπο εξαρτώμενο της ποσοτικής έκφρασής του.



Εικόνα 41. Προτεινόμενοι μηχανισμοί ρύθμισης γονιδίων από τον Erf. α) Ρύθμιση *Ets1*: ο Erf (κόκκινο) προσδένεται άμεσα στον υποκινητή του *Ets1* και αναστέλλει την έκφρασή του ενώ απουσία Erf, το γονίδιο μεταγράφεται κανονικά. β) Ρύθμιση *Gata3*: απουσία Erf, ο «άγνωστος» Μεταγραφικός Καταστολέας (πράσινο) προσδένεται στον υποκινητή του *Gata3* αναστέλλοντας την έκφρασή του. Παρουσία Erf, ο Erf προσδένεται στον υποκινητή του MK καταστέλλοντας της μεταγραφή του και το *Gata3* είναι «ελεύθερο» να μεταγραφεί. γ) Ο Erf επάγει την έκφραση του *Gata3* και αυτό εν συνεχεία του ThPOK ευνοώντας την CD4+ κυτταρική δέσμευση. Το ThPOK μπορεί να επάγει και την έκφραση του *Socs1* με τελικό αποτέλεσμα την CD4+ δέσμευση.

Η ενδεχόμενη άμεση ή έμμεση ρύθμιση των *Gata3*, *ThPOK* και *Socs1* από τον Erf κατά την επαγωγή της CD4+ κυτταρικής δέσμευσης θα ήταν ενδιαφέρουσα να μελετηθεί σε μεταγραφικό επίπεδο. Η μείωση της έκφρασης των *ThPOK* και *Socs1* θα μπορούσε εν μέρει μόνο να οφείλεται στη μείωση των CD4+ θυμοκυττάρων καθώς η έκφραση αυτών των γονιδίων επάγεται μεν κατά τη δέσμευση κυτταρικής σειράς, τα γονίδια όμως ξεκινούν να εκφράζονται νωρίτερα [31], [39], ενώ ειδικά η έκφραση του *Gata3* επάγεται σε πιο πρώιμα στάδια, μετά την έκφραση του Notch, πριν το στάδιο των DP κυττάρων [193]. Συνεπώς, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του *Gata3* πιθανόν να οφείλονται όντως στην εξάλειψη του Erf. Σε κάθε περίπτωση, διαφωτιστική θα ήταν η μελέτη της έκφρασης αυτών των γονιδίων στους επιμέρους υποπληθυσμούς των θυμοκυττάρων στις φάσεις ωρίμανσης, μετά από κυτταροδιαχωρισμό.

Όπως περιγράφηκε, το *Gata3* παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων τόσο στο στάδιο της ωρίμανσης όσο και στη μετέπειτα διαφοροποίηση

των βοηθητικών κυττάρων [193], [194]. Το *Gata3* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα T_H2 κύτταρα [195], [196] ενώ η *in vitro* και η *in vivo* έκτοπη έκφρασή του οδηγεί σε T_H2 διαφοροποίηση με παράλληλη αναστολή της T_H1 [197]–[199] ενώ η αναστολή ή εξάλειψη του περιορίζει σημαντικά την T_H2 διαφοροποίηση [200]–[202]. Τα παραπάνω ευρήματα καταδεικνύουν τη σημασία του *Gata3* και το καθιστούν κύριο ρυθμιστή της T_H2 διαφοροποίησης.

Το γονίδιο *ThPOK*, που είναι απαραίτητο για την $CD4+$ κυτταρική δέσμευση όπως περιγράφηκε στην Εισαγωγή, συνεχίζει να εκφράζεται στα περιφερικά βοηθητικά T κύτταρα αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται στα $CD8+$ κύτταρα [203] και επάγοντας την T_H διαφοροποίηση μέσω αναστολής της έκφρασης του *Runx3* και άλλων παραγόντων [204], [205]. Αξιοσημείωτα, παρότι το *ThPOK* δεν εκφράζεται στα περιφερικά $CD8+$ κύτταρα, η εξάλειψή του είναι αναστρέψιμη υπό συνθήκες οξείας ιικής μόλυνσης καθώς η έκφρασή του βοηθά στην $CD8+$ κλωνική επέκταση κατά τις $CD8+$ ανοσοαποκρίσεις [206].

Αναφορικά με το γονίδιο *Socs1* έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του στα βοηθητικά T κύτταρα ρυθμίζει μαζί με άλλα μέλη της οικογένειας των *Socs* γονιδίων την T_H διαφοροποίηση [39] ευνοώντας την T_H2 δέσμευση και περιορίζοντας την T_H1 [207] ενώ επάγει και τη διαφοροποίηση προς T_H17 κύτταρα και την έκφραση T_H17 κυτταροκινών [208]–[210].

Συγκεντρώνοντας τα παραπάνω στοιχεία, αξίζει να τονιστεί ότι κύρια μόρια-ρυθμιστές της $CD4+$ ή $CD8+$ κυτταρικής δέσμευσης η έκφραση των οποίων (*ThPOK*, *Gata3* και *Socs1*) βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στην παρούσα διατριβή, συνεχίζουν να εκφράζονται στους διάφορους υποπληθυσμούς των περιφερικών T κυττάρων συμμετέχοντας στη διατήρηση του $CD4+$ ή $CD8+$ φαινοτύπου ή/και επάγουν την T_H1 ή T_H2 διαφοροποίηση των T βοηθητικών κυττάρων.

Δεδομένου του ρόλου του *Gata3* που μαζί με παράγοντες *Stat* συναποτελούν αδιαμφισβήτητους ρυθμιστές της T_H2 διαφοροποίησης [211] αλλά και των άλλων πιο πρόσφατων προαναφερθέντων ευρημάτων που συνθέτουν μια ευρύτερη εικόνα, ο *Erf* θα μπορούσε να επιδρά μέσω ρύθμισης του *Gata3* και άλλων παραγόντων στη T_H2 διαφοροποίηση. Κρίνεται μεγάλου ενδιαφέροντος η συνέχιση της παρούσας έρευνας

στους επιμέρους υποπληθυσμούς των Τ βοηθητικών κυττάρων (T_H διαφοροποίηση) σε ποντικούς με εξάλειψη του *Erf* και ειδικά στην αναλογία T_H1 προς T_H2 κύτταρα καθώς αλλοιώσεις σε αυτήν την ισορροπία ευθύνονται για πρόκληση αυτοάνοσων νοσημάτων, αλλεργιών, άσθματος κ.ά..

Τέλος, στην παρούσα διατριβή δεν ήταν εφικτή για τεχνικούς λόγους η μελέτη του υποπληθυσμού των Τ ρυθμιστικών κυττάρων. Δεδομένου του ενδιαφέροντος ευρήματος του σημαντικά μειωμένου αριθμού CD4⁺ κυττάρων σε συνδυασμό με τη σημαντικά μειωμένη έκφραση των *ThPOK* και *Sox1*, τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και λειτουργίας των T_{regs} και των οποίων η μειωμένη έκφραση/εξάλειψη έχει βρεθεί ότι συμβάλλει αρνητικά στη φυσιολογία των T_{regs} [212], [213], η έρευνα θα μπορούσε να στραφεί και στη μελέτη των T_{regs} σε Τ λεμφοκύτταρα ζώων με εξάλειψη του *Erf* σε συνδυασμό με την έκφραση των προαναφερθέντων παραγόντων.

Συνολικά, η γνώση που θα αποκομίσουμε σχετικά με το ρόλο του *Erf* στα περιφερικά Τ βοηθητικά κύτταρα θα συμβάλλει στην βαθύτερη κατανόηση της λειτουργικότητας ή μη λειτουργικότητας αυτών των CD4⁺ κυττάρων με εξάλειψη του *Erf* ώστε, τελικά, να είμαστε σε θέση να εκμεταλλευτούμε μελλοντικά τις ιδιότητες αυτών των κυττάρων.

ΜΕΡΟΣ II

Στόχος του δεύτερου μέρους της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της λειτουργίας του μεταγραφικού καταστολέα ERF *in vitro* σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα. Πειράματα έκφρασης του ERF σε HuT78 κύτταρα έδειξαν ότι ο ERF εκφράζεται τόσο σε διεγερμένα όσο και σε αδιέγερτα HuT78 κύτταρα. Μετά από διέγερση με αντισώματα αντι-CD3 και αντι-CD28 ή με τους παράγοντες PMA και Ιονομυκίνη, αυξάνεται η έκφραση της φωσφορυλιωμένης μη ενεργής μορφής του ενώ παρουσία του ειδικού για την Erk αναστολέα UO126 μειώνεται η έκφραση του φωσφο-ERF και παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά στην ενεργή του κατάσταση κάτι που υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση του ERF είναι εξαρτώμενη από την Erk. Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, σε κύτταρα Ref ο ERF μετακινείται συνεχώς από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με τρόπο εξαρτώμενο της φωσφορυλίωσής του από την Erk. Αυτή η ιδιότητα του ERF φαίνεται να απαντάται και στα T λεμφοκύτταρα. Σε κατάσταση ηρεμίας ο ERF εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Μετά από διέγερση 5 λεπτών, παρατηρήθηκε μία τάση του ERF να μετακινηθεί προς το κυτταρόπλασμα που εντάθηκε μετά από 15λεπτη διέγερση ενώ μετά από 30 λεπτά διέγερσης, ο ERF εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Παρουσία του αναστολέα UO126 και συνεπώς ανενεργή Erk, το φαινόμενο αντιστρέφεται με τον ERF να μετακινείται στον πυρήνα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις μπορούν να τεκμηριωθούν καλύτερα με χρήσης συνεστιακής μικροσκοπίας.

Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι η Erk ρυθμίζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERF στα T κύτταρα και ενδεχόμενα τη δράση του αφού επιδρά στον πυρηνικό του εντοπισμό.

Για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, αρχικά χρησιμοποιήθηκε μαζική καλλιέργεια κυττάρων HuT78 σταθερής υπερέκφρασης του *ERF* (stable cell pool) και τα κύτταρα διεγέρθηκαν με αντι-CD3 και αντι-CD28 παρουσία ή όχι του αναστολέα UO126 ή/και του BIRB796. Παρατηρήθηκε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου μετά από διέγερση και παρουσία του UO126 στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον *ERF* και ειδικά το M₁₋₇ και παράλληλα μειωμένα ποσοστά κυττάρων στη φάση G2/M στην ίδια συνθήκη, γεγονός που υποδηλώνει τον ανασταλτικό χαρακτήρα του ERF στον κυτταρικό κύκλο κατά τρόπο εξαρτώμενο της ενεργότητας της Erk. Τα αποτελέσματα δεν

παρουσιάζουν σταθερή επαναληψιμότητα πιθανών εξαιτίας της ανομοιογένειας των κυττάρων ως προς την έκφραση του *ERF*. Κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία μονοκλωνικών καλλιεργειών σταθερής υπερέκφρασης του *ERF* και επανάληψη των πειραμάτων σε επιλεγμένους κλώνους διαφορετικών επιπέδων έκφρασης του *ERF*. Το κύριο πλεονεκτήματα στη χρήση τέτοιων καλλιεργειών συνίσταται στο ότι η όποια επίδραση που οφείλεται την υπερέκφραση του υπό μελέτη γονιδίου είναι πιο εμφανής καθώς προέρχεται από ομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό. Επιπροσθέτως, μπορεί να συγκριθεί με την επίδραση που παρατηρείται στους υπόλοιπους κλώνους και να εξαχθεί ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα ενώ μπορεί να συσχετιστεί και με την ένταση της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε δυσκολία στη δημιουργία τέτοιων μονοκλωνικών καλλιεργειών υπερέκφρασης του *ERF* κάτι που πιθανόν να υποδηλώνει και τον ανασταλτικό χαρακτήρα του γονιδίου ως προς την προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα η δυσκολία αυτή δεν παρατηρήθηκε κατά τη δημιουργία των κλώνων ελέγχου. Αυτή η παρατήρηση «αποτυπώθηκε» εν μέρει κατά τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, όπου μετά από διέγερση και παρουσία του UO126, οι κλώνοι υπερέκφρασης του *ERF* και του M₁₋₇ έδειξαν «αδυναμία» να περάσουν στην G2/M φάση σταματώντας στη φάση G0/G1 και πάλι, όμως, τα αποτελέσματα ήταν ασταθή ως προς την επαναληψιμότητα τους. Παρόλ' αυτά, τα ευρήματα που προέκυψαν συνολικά από τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου φαίνεται να συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που θέλουν τον *ERF* να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο καθελώνοντας τα κύτταρα στη φάση G0/G1 μέσω άμεσης πρόσδεσης στο γονίδιο *c-myc* αναστέλλοντας την έκφρασή του [115]. Η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από τον *ERF* (και κατά πόσον επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της έκφρασης του ογκογονιδίου *c-myc* και στα T κύτταρα) αποτελεί αντικείμενο μελλοντικής έρευνας. Εμείς εξετάσαμε επιπλέον την πιθανότητα ότι η δυσκολία στην επιβίωση των κλώνων προέρχεται από κάποιον ανασταλτικό παράγοντα που εκκρίνουν τα κύτταρα λόγω της υπερέκφρασης του *ERF*. Για το λόγο αυτό υπερκείμενα καλλιεργητικού μέσου συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια αυτών των κυττάρων και κλώνοι κυττάρων ελέγχου καλλιεργήθηκαν σε αυτά. Τα αποτελέσματα της καμπύλης ανάπτυξης και της μέτρησης των νεκρών κυττάρων δεν έδειξαν καθυστέρηση στον πολλαπλασιασμό

των κλώνων ελέγχου ούτε επίδραση στη βιωσιμότητά τους αποκλείοντας την άνωθεν υπόθεση.

Η Erk ρυθμίζει έμμεσα την έκφραση της IL-2 καθώς σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού της Erk είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή και τη μετέπειτα παραγωγή της IL-2 [134]. Έτσι, ως στόχος της *in vitro* μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής συμμετοχή του ERF στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-2. Ομοίως με τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν αρχικά σε μαζική καλλιέργεια κυττάρων σταθερής έκφρασης του ERF αλλά τα αποτελέσματα ήταν συγκεχυμένα. Και σε αυτήν την περίπτωση, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση μονοκλωνικών καλλιιεργειών υπερέκφρασης του ERF. Η έκφραση της κυτταροκίνης μελετήθηκε σε επίπεδο παραγωγής σε HuT78 κλώνους με υπερέκφραση του ERF, όπου μετά από διέγερση με CD3/28 παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα IL-2. Μάλιστα, ο κλώνος με την υψηλότερη έκφραση σε ERF παράγαγε τα χαμηλότερα επίπεδα IL-2 γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ERF δρα ανασταλτικά στην παραγωγή της κυτταροκίνης πιθανόν κατά τρόπο εξαρτώμενο από το επίπεδο έκφρασής του. Σε μία μελέτη των Panagoulas et al. [214] βρέθηκε ότι το γονίδιο *Ets2* δρα ανασταλτικά στην έκφραση της IL-2 σε παρθένα T βοηθητικά κύτταρα. Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι τα *Ets1* και *2* σχηματίζουν σύμπλοκα μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα Stat5 ως απάντηση σε μιτογόνα μηνύματα IL-2 ευνοώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [215] ενώ το *Ets1* διευκολύνει την είσοδο του NFAT στον πυρήνα επάγοντας τα έκφραση του γονιδίου της IL-2 [101]. Έως τώρα γνωρίζουμε ότι ο ERF έχει μόνο κατασταλτικές ιδιότητες και προσδένεται μέσω της DBD περιοχής του σε cis στοιχεία στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων μέσω του μοτίβου 5'-GGA(A/T)-3' το οποίο είναι κοινό για τα *Ets* γονίδια [118], ενώ αποκοπή της περιοχής αυτής από την αλληλουχία του ERF επιφέρει την αδρανοποίησή [111]. Έχοντας υπ' όψιν τα παραπάνω ευρήματα που υποδηλώνουν ρύθμιση του γονιδίου της IL-2 από τα *Ets1* και *Ets2*, και σε συνδυασμό με το εύρημα μας για τη μείωση της παραγωγής της IL-2 στους κλώνους με υπερέκφραση σε ERF, θα ήταν ενδιαφέρον να εξετασθεί ενδεχόμενη άμεση ή έμμεση μεταγραφική ρύθμιση του ίδιου του ERF στο γονίδιο της IL-2. Ο ERF θα μπορούσε να δρα κατασταλτικά προσδεόμενος άμεσα στο γονίδιο της IL-2 μέσω της DBD περιοχής του ή να δρα κατασταλτικά σε πιθανούς

μεταγραφικούς ενεργοποιητές του γονιδίου της IL-2 ασκώντας έμμεσο ανασταλτικό έλεγχο επί της IL-2. Δε μπορεί να αποκλειστεί, βέβαια, το γεγονός ο ERF να δρα ενεργοποιητικά σε ανασταλτικούς ρυθμιστές του γονιδίου της IL-2. Η διερεύνηση των παραπάνω υποθέσεων θα αποκάλυπταν νέα στοιχεία για τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της IL-2 και αξίζουν μελλοντική μελέτη.

Παράλληλα με την IL-2, πραγματοποιήθηκε μια πρώτη μελέτη της παραγωγής και της IL-10. Σε συνθήκες ηρεμίας τόσο οι κλώνοι με υπερέκφραση του *ERF* όσο και οι κλώνοι ελέγχου παρουσίασαν υψηλά επίπεδα παραγωγής IL-10, όπως ήταν αναμενόμενο καθώς τα HuT78 κύτταρα παράγουν αυθόρμητα υψηλά ποσοστά IL-10 [216], [217]. Μετά από συνθήκες διέγερσης, όμως, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στους κλώνους ελέγχου, οι κλώνοι που υπερεκφράζουν τον *ERF* παράγαν χαμηλότερη IL-10 συγκριτικά με τα αδιέγερτα κύτταρα. Αυτό το ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί μια ένδειξη πιθανής εμπλοκής του ERF στην έκφραση της IL-10 και χρίζει μελλοντικής έρευνας.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια να μελετηθεί η ενδογενής έκφραση του ERF στους υποπληθυσμούς CD4⁺ και CD8⁺ ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων από ολικό αίμα υγιούς δότη. Παρόλ' αυτά για τεχνικούς λόγους δεν επετεύχθη ικανοποιητικός διαχωρισμός των λεμφοκυττάρων μετά από εφαρμογή μαγνητικού διαχωρισμού με μεταλλικές μπίλιες και επακόλουθη Ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικό για τον ERF αντίσωμα, γι' αυτό και τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματά μας συνιστούν βάσιμες ενδείξεις ότι ο ERF εμπλέκεται στην ωρίμανση των θυμοκυττάρων επάγοντας τη CD4 κυτταρική δέσμευση και πιθανώς μέσω της ρύθμισης της IL-2 συμμετέχει στη βιολογία και των περιφερικών T κυττάρων και αποτελούν έναυσμα για τη μελέτη της T_H διαφοροποίησης συναρτήσει της έκφρασης του ERF.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] D. D. Chaplin, "Overview of the Immune Response," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 Suppl 2, pp. S3-23, Feb. 2010.
- [2] C. Symowski and D. Voehringer, "Interactions between Innate Lymphoid Cells and Cells of the Innate and Adaptive Immune System," *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1422, Oct. 2017.
- [3] J. Gui, L. M. Mustachio, D.-M. Su, and R. W. Craig, "Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma," *Aging Dis.*, vol. 3, no. 3, pp. 280–290, Jun. 2012.
- [4] G. Pearse, "Toxicologic Pathology - normal structure, function and histology of the thymus," *Sage Journals*, vol. 34, no. 504, pp. 504–514, 2006.
- [5] Z. Zdrojewicz, E. Pachura, and P. Pachura, "The thymus: A forgotten, but very important organ," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 25, no. 2, pp. 369–375, 2016.
- [6] R. E. Mebius and G. Kraal, "Structure and function of the spleen," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, p. 606, Aug. 2005.
- [7] S. A. Elmore, "Enhanced histopathology of the thymus," *Toxicol. Pathol.*, vol. 34, no. 5, pp. 656–665, 2006.
- [8] V. Bronte and M. J. Pittet, "The spleen in local and systemic regulation of immunity," *Immunity*, vol. 39, no. 5, pp. 806–818, Nov. 2013.
- [9] M. Altamura, L. Caradonna, L. Amati, N. M. Pellegrino, G. Urgesi, and S. Miniello, "Splenectomy and sepsis: The role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance," *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 23, no. 2, pp. 153–161, 2001.
- [10] A. Cadili and C. de Gara, "Complications of Splenectomy," *American Journal of Medicine*, vol. 121, no. 5, pp. 371–375, 2008.
- [11] M. Jagannathan-Bogdan and L. I. Zon, "Hematopoiesis," *Development*, vol. 140, no. 12, pp. 2463–2467, Jun. 2013.
- [12] R. Pelayo *et al.*, "Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 17, no. 2, pp. 100–107, 2005.
- [13] H. T. Petrie and J. C. Zúñiga-Pflücker, "Zoned Out: Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the Thymus," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 649–679, Mar. 2007.
- [14] X. Xu, S. Zhang, P. Li, J. Lu, Q. Xuan, and Q. Ge, "Maturation and emigration of single-positive thymocytes," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, 2013.
- [15] A. D. Griesemer, E. C. Sorenson, and M. a Hardy, "The role of the thymus in

tolerance.," *Transplantation*, vol. 90, no. 5, pp. 465–74, 2010.

- [16] L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist, "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, p. 377, May 2014.
- [17] R. N. Germain, "T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, pp. 309–322, May 2002.
- [18] D. K. Shah and J. C. Zúñiga-Pflücker, "An Overview of the Intrathymic Intricacies of T Cell Development," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 9, p. 4017 LP-4023, May 2014.
- [19] R. Wang *et al.*, "Transcription factor network regulating CD(+)CD8(+) thymocyte survival.," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 31, no. 6, pp. 447–458, 2011.
- [20] R. Ceredig and T. Rolink, "A positive look at double-negative thymocytes," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, p. 888, Nov. 2002.
- [21] W. Fu and W. Chen, "Roles of chemokines in thymopoiesis: redundancy and regulation.," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 1, no. 4, pp. 266–73, 2004.
- [22] K. Masuda, K. Kakugawa, T. Nakayama, N. Minato, Y. Katsura, and H. Kawamoto, "T Cell Lineage Determination Precedes the Initiation of TCR β Gene Rearrangement," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 6, p. 3699 LP-3706, Sep. 2007.
- [23] A. M. Michie and J. C. Zúñiga-Pflücker, "Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and β -selection," *Semin. Immunol.*, vol. 14, no. 5, pp. 311–323, 2002.
- [24] M. A. Yui and E. V Rothenberg, "Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, pp. 529–545, Jul. 2014.
- [25] T. Naito and I. Taniuchi, "The network of transcription factors that underlie the CD4 versus CD8 lineage decision," *Int. Immunol.*, vol. 22, no. 10, pp. 791–796, Oct. 2010.
- [26] W. F. Wong, K. Kohu, T. Chiba, T. Sato, and M. Satake, "Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx," *Immunology*, vol. 132, no. 2, pp. 157–164, Feb. 2011.
- [27] L. Wang and R. Bosselut, "CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 5, pp. 2903–2910, 2009.
- [28] X. He *et al.*, "CD4-CD8 Lineage Commitment Is Regulated by a Silencer Element at the ThPOK Transcription-Factor Locus," *Immunity*, vol. 28, no. 3, pp. 346–358, 2008.
- [29] A. Collins, D. R. Littman, and I. Taniuchi, "RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, p. 106, Feb. 2009.
- [30] Y. Xiong *et al.*, "Thpok-independent repression of Runx3 by Gata3 during CD4+T-

- cell differentiation in the thymus," *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 4, pp. 918–928, Apr. 2013.
- [31] T. Egawa and D. R. Littman, "ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage," *Nat. Immunol.*, vol. 9, p. 1131, Sep. 2008.
 - [32] M. Zhou and W. Ouyang, "The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation," *Immunologic Research*, vol. 28, no. 1, pp. 25–37, 2003.
 - [33] S.-Y. Pai, M. L. Truitt, C.-N. Ting, J. M. Leiden, L. H. Glimcher, and I.-C. Ho, "Critical Roles for Transcription Factor GATA-3 in Thymocyte Development," *Immunity*, vol. 19, no. 6, pp. 863–875, 2003.
 - [34] G. Hernández-Hoyos, M. K. Anderson, C. Wang, E. V Rothenberg, and J. Alberola-Ila, "GATA-3 Expression Is Controlled by TCR Signals and Regulates CD4/CD8 Differentiation," *Immunity*, vol. 19, no. 1, pp. 83–94, 2003.
 - [35] L. Wang *et al.*, "Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4+ T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 9, p. 1122, Sep. 2008.
 - [36] J. Yuan, R. B. Crittenden, and T. P. Bender, "c-Myb promotes the survival of CD4+CD8+ double positive thymocytes through up-regulation of Bcl-xL," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 6, pp. 2793–2804, Mar. 2010.
 - [37] D. Maurice, J. Hooper, G. Lang, and K. Weston, "c-Myb regulates lineage choice in developing thymocytes via its target gene Gata3," *EMBO J.*, vol. 26, no. 15, pp. 3629–3640, Aug. 2007.
 - [38] T. P. Bender, C. S. Kremer, M. Kraus, T. Buch, and K. Rajewsky, "Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development," *Nat. Immunol.*, vol. 5, p. 721, Jun. 2004.
 - [39] D. C. Palmer and N. P. Restifo, "Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function," *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 12, pp. 592–602, 2009.
 - [40] J. Elliott and J. A. Johnston, "SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 8, pp. 434–440, 2004.
 - [41] S. Sakaguchi *et al.*, "MAZR and Runx Factors Synergistically Repress ThPOK during CD8+ T Cell Lineage Development," *J. Immunol.*, vol. 195, no. 6, p. 2879 LP-2887, Sep. 2015.
 - [42] S. Sakaguchi *et al.*, "The zinc finger protein MAZR is part of the transcription factor network controlling CD4/CD8 cell fate decision of DP thymocytes," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 5, pp. 442–448, May 2010.
 - [43] A. Singer, S. Adoro, and J.-H. Park, "Lineage fate and intense debate: myths, models

- and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, p. 788, Oct. 2008.
- [44] C. López-Rodríguez, J. Aramburu, and R. Berga-Bolaños, "Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 12, pp. 2305–2321, 2015.
 - [45] E. V Rothenberg and T. Taghon, "Molecular Genetics of T Cell Development," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 601–649, Sep. 2004.
 - [46] R. Vanhanen *et al.*, "T cell receptor diversity in the human thymus," *Mol. Immunol.*, vol. 76, pp. 116–122, 2016.
 - [47] M. E. Birnbaum *et al.*, "Molecular architecture of the $\alpha\beta$ T cell receptor–CD3 complex," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 49, pp. 17576–17581, Dec. 2014.
 - [48] M. Krogsgaard, J. Juang, and M. M. Davis, "A role for 'self' in T-cell activation," *Semin. Immunol.*, vol. 19, no. 4, p. 236, 2007.
 - [49] T. Thaventhiran, "T Cell Co-inhibitory Receptors-Functions and Signalling Mechanisms," *J. Clin. Cell. Immunol.*, vol. 01, no. S12, 2013.
 - [50] B. K. Gorentla and X.-P. Zhong, "T cell Receptor Signal Transduction in T lymphocytes," *J. Clin. Cell. Immunol.*, vol. 2012, no. Suppl 12, p. 5, Oct. 2012.
 - [51] E. H. Palacios and A. Weiss, "Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation," *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7990–8000, 2004.
 - [52] N. Osman, S. Lucas, and D. Cantrell, "The role of tyrosine phosphorylation in the interaction of cellular tyrosine kinases with the T cell receptor ζ chain tyrosine-based activation motif," *Eur. J. Immunol.*, vol. 25, no. 10, pp. 2863–2869, Oct. 1995.
 - [53] H. Wang *et al.*, "ZAP-70: An Essential Kinase in T-cell Signaling," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 5, p. a002279, May 2010.
 - [54] D. A. Cantrell, "T-cell antigen receptor signal transduction," *Immunology*, vol. 105, no. 4, pp. 369–374, Apr. 2002.
 - [55] L. P. Kane, J. Lin, and A. Weiss, "Signal transduction by the TCR for antigen," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 242–249, Jun. 2000.
 - [56] W. Zhang and H. T. Liu, "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells," *Cell Res.*, vol. 12, pp. 9–18, Mar. 2002.
 - [57] W. Kolch, "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions," *Biochem. J.*, vol. 351, no. Pt 2, pp. 289–305, Oct. 2000.
 - [58] W. Kolch, "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 11, pp. 827–837, 2005.

- [59] G. Pearson *et al.*, "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions," *Endocr. Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 153–183, Apr. 2001.
- [60] Y. Mebratu and Y. Tesfagzi, "How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer?," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 8, pp. 1168–1175, Apr. 2009.
- [61] A. M. Fischer, C. D. Katayama, G. Pagès, J. Pouyssegur, and S. M. Hedrick, "The Role of Erk1 and Erk2 in Multiple Stages of T Cell Development," *Immunity*, vol. 23, no. 4, pp. 431–443, 2005.
- [62] M. Rincón, R. A. Flavell, and R. J. Davis, "Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes," *Oncogene*, vol. 20, pp. 2490–2497, May 2001.
- [63] B. Wilkinson and J. Kaye, "Requirement for Sustained MAPK Signaling in Both CD4 and CD8 Lineage Commitment: A Threshold Model," *Cell. Immunol.*, vol. 211, no. 2, pp. 86–95, 2001.
- [64] Y. Zheng, Y. Zha, and T. F. Gajewski, "Molecular regulation of T-cell anergy," *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 50–55, Jan. 2008.
- [65] W. Li, C. D. Whaley, A. Mondino, and D. L. Mueller, "Blocked Signal Transduction to the ERK and JNK Protein Kinases in Anergic CD4⁺ T Cells," *Science (80-.)*, vol. 271, no. 5253, p. 1272 LP-1276, Mar. 1996.
- [66] C.-F. Chang, W. N. D'Souza, I. L. Ch'en, G. Pages, J. Pouyssegur, and S. M. Hedrick, "Polar opposites: Erk direction of CD4 T cell subsets," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 2, pp. 721–731, Jul. 2012.
- [67] W. N. D'Souza, C.-F. Chang, A. M. Fischer, M. Li, and S. M. Hedrick, "The Erk2 MAPK Regulates CD8 T Cell Proliferation and Survival," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 11, pp. 7617–7629, Dec. 2008.
- [68] Y. L. Zhang and C. Dong, "MAP kinases in the Immune Responses," *Cell Mol Immunol*, vol. 2, no. 1, pp. 20–27, 2005.
- [69] T. Koike *et al.*, "A Novel ERK-dependent Signaling Process That Regulates Interleukin-2 Expression in a Late Phase of T Cell Activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 18, pp. 15685–15692, May 2003.
- [70] C. Qian *et al.*, "TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation," *Blood*, vol. 108, no. 7, pp. 2307–2315, Oct. 2006.
- [71] L. J. Appleman and V. A. Boussiotis, "T cell anergy and costimulation," *Immunol. Rev.*, vol. 192, no. 1, pp. 161–180, Apr. 2003.
- [72] R. H. Schwartz, "T Cell Anergy," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 1, pp. 305–334, Apr. 2003.

- [73] N. L. Smith *et al.*, “Developmental Origin Governs CD8+ T Cell Fate Decisions during Infection,” *Cell*, vol. 174, no. 1, p. 117–130.e14, 2018.
- [74] N. Zhang and M. J. Bevan, “CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System,” *Immunity*, vol. 35, no. 2, pp. 161–168, 2011.
- [75] M. H. Andersen, D. Schrama, P. thor Straten, and J. C. Becker, “Cytotoxic T Cells,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, no. 1, pp. 32–41, 2006.
- [76] D. E. Sanin and E. J. Pearce, “The cell identity of cytotoxic T lymphocytes,” *Nat. Immunol.*, vol. 17, p. 45, Dec. 2015.
- [77] C. Wang, M. Collins, and V. K. Kuchroo, “Effector T cell differentiation: are master regulators of effector T cells still the masters?,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 37, pp. 6–10, 2015.
- [78] J. Zhu and W. E. Paul, “Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors,” *Immunol. Rev.*, vol. 238, no. 1, pp. 247–262, Nov. 2010.
- [79] G. R. Lee, S. T. Kim, C. G. Spilianakis, P. E. Fields, and R. A. Flavell, “T Helper Cell Differentiation: Regulation by cis Elements and Epigenetics,” *Immunity*, vol. 24, no. 4, pp. 369–379, 2006.
- [80] W. Ouyang, J. K. Kolls, and Y. Zheng, “The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation,” *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 454–467, Apr. 2008.
- [81] Y. D. Mahnke, T. M. Brodie, F. Sallusto, M. Roederer, and E. Lugli, “The who’s who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 11, pp. 2797–2809, Nov. 2013.
- [82] R. S. Akondy *et al.*, “Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination,” *Nature*, vol. 552, p. 362, Dec. 2017.
- [83] P. R. Burkett, R. Koka, M. Chien, D. L. Boone, and A. B. T.-A. in I. Ma, “Generation, Maintenance, and Function of Memory T Cells,” in *T Cell Subsets: Cellular Selection, Commitment and Identity*, vol. 83, Academic Press, 2004, pp. 191–231.
- [84] N. Askenasy, A. Kaminitz, and S. Yarkoni, “Mechanisms of T regulatory cell function,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 7, no. 5, pp. 370–375, 2008.
- [85] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono, “Regulatory T Cells and Immune Tolerance,” *Cell*, vol. 133, no. 5, pp. 775–787, 2008.
- [86] N. Ohkura, Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi, “Development and Maintenance of Regulatory T cells,” *Immunity*, vol. 38, no. 3, pp. 414–423, 2013.
- [87] B. Arellano, D. J. Graber, and C. L. Sentman, “Regulatory T Cell-based Therapies for Autoimmunity,” *Discov. Med.*, vol. 22, no. 119, pp. 73–80, Aug. 2016.

- [88] J. Fessler, A. Felber, C. Duftner, and C. Dejaco, "Therapeutic Potential of Regulatory T cells in Autoimmune Disorders," *BioDrugs*, vol. 27, no. 4, pp. 281–291, 2013.
- [89] X. Zhou, J. Tang, H. Cao, H. Fan, and B. Li, "Tissue resident regulatory T cells: novel therapeutic targets for human disease," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 12, p. 543, Apr. 2015.
- [90] D. Brenner, P. H. Krammer, and R. Arnold, "Concepts of activated T cell death," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 66, no. 1, pp. 52–64, 2008.
- [91] D. R. Green, N. Droin, and M. Pinkoski, "Activation-induced cell death in T cells," *Immunol. Rev.*, vol. 193, no. 1, pp. 70–81, Jun. 2003.
- [92] T. Oikawa and T. Yamada, "Molecular biology of the Ets family of transcription factors," *Gene*, vol. 303, pp. 11–34, 2003.
- [93] V. J. Findlay, A. C. LaRue, D. P. Turner, P. M. Watson, and D. K. Watson, "Understanding the Role of ETS-Mediated Gene Regulation in Complex Biological Processes," in *Advances in Cancer Research*, vol. 119, K. D. Tew and P. B. B. T.-A. in C. R. Fisher, Eds. Academic Press, 2013, pp. 1–61.
- [94] G. Mavrothalassitis and J. Ghysdael, "Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity," *Oncogene*, vol. 19, pp. 6524–6532, 2000.
- [95] M. Liu, W. Gao, J. C. van Velkinburgh, Y. Wu, B. Ni, and Y. Tian, "Role of Ets Proteins in Development, Differentiation, and Function of T-Cell Subsets," *Med. Res. Rev.*, vol. 36, no. 2, pp. 193–220, 2016.
- [96] E. V Rothenberg, J. Ungerback, and A. Champhekar, "Forging T-Lymphocyte Identity: Intersecting Networks of Transcriptional Control," in *Advances in Immunology*, vol. 129, 2016, pp. 109–174.
- [97] S. Eyquem, K. Chemin, M. Fasseu, and J.-C. Bories, "The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor β locus," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 44, p. 15712 LP-15717, Nov. 2004.
- [98] I. B. Fisher, M. Ostrowski, and N. Muthusamy, "Role for Ets-2^{Thr-72} Transcription Factor in Stage-specific Thymocyte Development and Survival," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 8, pp. 5199–5210, 2012.
- [99] R. Grenningloh, B. Y. Kang, and I.-C. Ho, "Ets-1, a functional cofactor of T-bet, is essential for Th1 inflammatory responses," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 4, p. 615 LP-626, Feb. 2005.
- [100] C.-G. Lee *et al.*, "Interaction of Ets-1 with HDAC1 Represses IL-10 Expression in Th1 Cells," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 12, p. 5996 LP-5996, Dec. 2012.
- [101] H.-W. Tsao *et al.*, "Ets-1 facilitates nuclear entry of NFAT proteins and their recruitment to the IL-2 promoter," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 39, p. 15776

LP-15781, Sep. 2013.

- [102] J. M. Strempel, R. Grenningloh, I.-C. Ho, and D. Vercelli, "Phylogenetic and Functional Analysis Identifies Ets-1 as a Novel Regulator of the Th2 Cytokine Gene Locus," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 3, pp. 1309–1316, Feb. 2010.
- [103] J. Moisan, R. Grenningloh, E. Bettelli, M. Oukka, and I.-C. Ho, "Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 12, pp. 2825–2835, Nov. 2007.
- [104] E. Mouly *et al.*, "The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 10, p. 2113 LP-2125, Sep. 2010.
- [105] M. Zamisch *et al.*, "The transcription factor Ets1 is important for CD4 repression and Runx3 up-regulation during CD8 T cell differentiation in the thymus," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 12, p. 2685 LP-2699, Nov. 2009.
- [106] L. A. Garrett-Sinha, "Review of Ets1 structure, function, and roles in immunity," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, no. 18, pp. 3375–3390, Sep. 2013.
- [107] T. Hsu, M. Trojanowska, and D. K. Watson, "Ets Proteins in Biological Control and Cancer," *J. Cell. Biochem.*, vol. 91, no. 5, pp. 896–903, Apr. 2004.
- [108] E. J. Wolvetang *et al.*, "ETS2 overexpression in transgenic models and in Down syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12, no. 3, pp. 247–255, 2003.
- [109] P. Mehdipour *et al.*, "Protein Expression of ETS2 in Alzheimer ' s Disease and Down ' s syndrome as a Personalized Insight : One Gene , One Feature in Common , Diverse-Function-and Diseases -," *Sci. J. Neurol. Neurosurg.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2017.
- [110] J. R. Pitarresi *et al.*, "Stromal ETS2 Regulates Chemokine Production and Immune Cell Recruitment during Acinar-to-Ductal Metaplasia," *Neoplasia*, vol. 18, no. 9, pp. 541–552, Jan. 2018.
- [111] D. N. Sgouras, M. a Athanasiou, G. J. Beal, R. J. Fisher, D. G. Blair, and G. J. Mavrothalassitis, "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.*, vol. 14, no. 19, pp. 4781–93, 1995.
- [112] D. Liu, E. Pavlopoulos, W. Modi, N. Moschonas, and G. Mavrothalassitis, "ERF: genomic organization, chromosomal localization and promoter analysis of the human and mouse genes.," *Oncogene*, vol. 14, no. 12, pp. 1445–1451, 1997.
- [113] R. N. Day, J. Liu, V. Sundmark, M. Kawecki, D. Berry, and H. P. Elsholtz, "Selective Inhibition of Prolactin Gene Transcription by the ETS-2 Repressor Factor," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 48, pp. 31909–31915, Nov. 1998.

- [114] L. Le Gallic, L. Virgilio, P. Cohen, B. Biteau, and G. Mavrothalassitis, "ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of Erk activity that links it to cell cycle progression.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 3, pp. 1206–1218, 2004.
- [115] M. Verykokakis, C. Papadaki, E. Vorgia, L. Le Gallic, and G. Mavrothalassitis, "The RAS-dependent ERF control of cell proliferation and differentiation is mediated by c-Myc repression," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 41, pp. 30285–30294, 2007.
- [116] L. Le Gallic, D. Sgouras, G. Beal, and G. Mavrothalassitis, "Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 6, pp. 4121–33, 1999.
- [117] E. Wright, M. Bain, L. Teague, J. Murphy, and J. Sinclair, "Ets-2 repressor factor recruits histone deacetylase to silence human cytomegalovirus immediate-early gene expression in non-permissive cells," *J. Gen. Virol.*, vol. 86, no. 3, pp. 535–544, 2005.
- [118] S. R. F. Twigg *et al.*, "Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 3, pp. 308–313, 2013.
- [119] C. Papadaki *et al.*, "Transcriptional Repressor Erf Determines Extraembryonic Ectoderm Differentiation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 14, pp. 5201–5213, 2007.
- [120] I. Peraki, J. Palis, and G. Mavrothalassitis, "The Ets2 Repressor Factor (Erf) Is Required for Effective Primitive and Definitive Hematopoiesis," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 37, no. 19, pp. e00183-17, 2017.
- [121] A. Janesick, R. Abbey, C. Chung, S. Liu, M. Taketani, and B. Blumberg, "ERF and ETV3L are retinoic acid-inducible repressors required for primary neurogenesis," *Development*, 2013.
- [122] M. Allegra *et al.*, "Semaphorin-7a reverses the ERF-induced inhibition of EMT in Ras-dependent mouse mammary epithelial cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, pp. 3873–3881, 2012.
- [123] G. Tarcic *et al.*, "EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF," *Faseb J*, vol. 26, no. 4, pp. 1582–1592, 2012.
- [124] Y. T. Chou *et al.*, "EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 21, pp. 8822–8831, 2010.
- [125] R. Bose *et al.*, "ERF mutations reveal a balance of ETS factors controlling prostate oncogenesis," *Nature*, vol. 546, no. 7660, pp. 671–675, 2017.
- [126] M. C. Regan, P. S. Horanyi, E. E. Pryor, J. L. Sarver, D. S. Cafiso, and J. H. Bushweller, "Structural and dynamic studies of the transcription factor ERG reveal DNA binding is allosterically autoinhibited," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013.

- [127] M. Athanasiou, L. LeGallic, D. K. Watson, D. G. Blair, and G. Mavrothalassitis, "Suppression of the Ewing's sarcoma phenotype by FLI1/ERF repressor hybrids.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 7, no. 8, pp. 1188–95, 2000.
- [128] S. Polychronopoulos, M. Verykokakis, M. N. Yazicioglu, M. Sakarellos-Daitsiotis, M. H. Cobb, and G. Mavrothalassitis, "The transcriptional ETS2 repressor factor associates with active and inactive Erks through distinct FFX motifs," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 35, pp. 25601–25611, 2006.
- [129] Ü. E. B., U. Florian, and B. Nils, "A compendium of ERK targets," *FEBS Lett.*, vol. 591, no. 17, pp. 2607–2615, Jul. 2017.
- [130] N. Ikram, K. Hassan, and S. Tufail, "Cytokines," *Int. J. Pathol.*, vol. 2, no. 1, pp. 47–58, 2004.
- [131] M. Akdis *et al.*, "Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 127, no. 3, p. 701–721.e70, Jan. 2018.
- [132] K. Olejniczak and A. Kasprzak, "Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review.," *Med. Sci. Monit.*, vol. 14, no. 10, pp. RA179-A189, 2008.
- [133] N. Arenas-Ramirez, J. Woytschak, and O. Boyman, "Interleukin-2: Biology, Design and Application," *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 12, pp. 763–777, Dec. 2015.
- [134] K. Bunting, J. Wang, and M. F. Shannon, "Control of Interleukin-2 Gene Transcription: A Paradigm for Inducible, Tissue-Specific Gene Expression," *Vitam. Horm.*, vol. 74, no. 06, pp. 105–145, 2006.
- [135] J. C. Crispín and G. C. Tsokos, "Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity," *Autoimmun. Rev.*, vol. 8, no. 3, pp. 190–195, 2009.
- [136] A. Granelli-Piperno and P. Nolan, "Nuclear transcription factors that bind to elements of the IL-2 promoter. Induction requirements in primary human T cells.," *J. Immunol.*, vol. 147, no. 8, p. 2734 LP-2739, Oct. 1991.
- [137] A. Murayama *et al.*, "A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory," *EMBO J.*, vol. 25, no. 5, pp. 1081–1092, Mar. 2006.
- [138] Y. Minami, T. Kono, T. Miyazaki, and T. Taniguchi, "The IL-2 Receptor Complex: Its Structure, Function, and Target Genes," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 245–268, Apr. 1993.
- [139] M. F. Bachmann and A. Oxenius, "Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again.," *EMBO Rep.*, vol. 8, no. 12, pp. 1142–1148, 2007.
- [140] W. Liao, J.-X. Lin, and W. J. Leonard, "Interleukin-2 at the Crossroads of Effector

- Responses, Tolerance, and Immunotherapy," *Immunity*, vol. 38, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2013.
- [141] S. L. Gaffen and K. D. Liu, "Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications," *Cytokine*, vol. 28, no. 3, pp. 109–123, 2004.
 - [142] A. Lagoo, C. K. Tseng, and S. Sell, "Interleukin 2 produced by activated B lymphocytes acts as an autocrine proliferation-inducing lymphokine," *Cytokine*, vol. 2, no. 4, pp. 272–279, Jul. 1990.
 - [143] C. Lehmann, M. Zeis, and L. Uharek, "Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells," *Br. J. Haematol.*, vol. 114, no. 3, pp. 660–665, Sep. 2001.
 - [144] D. Cho and D. Campana, "Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy," *Korean J. Lab. Med.*, vol. 29, no. 2, pp. 89–96, Apr. 2009.
 - [145] T. Chinen *et al.*, "An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function," *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 11, pp. 1322–1333, Nov. 2016.
 - [146] B.-I. Moon, T. H. Kim, and J.-Y. Seoh, "Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2," *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0141864, Nov. 2015.
 - [147] S. Sakaguchi, K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi, "Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?," *Int. Immunol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1105–1111, Oct. 2009.
 - [148] B. H. Nelson, "IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 7, p. 3983 LP-3988, Apr. 2004.
 - [149] R. T. Mitsuyasu, "The potential role of interleukin-2 in HIV," *AIDS*, vol. 15, pp. 22–27, 2001.
 - [150] S. A. Rosenberg, "IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 12, p. 5451 LP-5458, Jun. 2014.
 - [151] G. K. A. and A. Z. Dudek, "Interleukin 2 in Cancer Therapy," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 29, pp. 3297–3302, 2010.
 - [152] D. Klatzmann and A. K. Abbas, "The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 283–294, Apr. 2015.
 - [153] E. M. Shevach, "Application of IL-2 therapy to target T regulatory cell function," *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 12, pp. 626–632, Dec. 2012.
 - [154] D. F. Fiorentino, M. W. Bond, and T. R. Mosmann, "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones," *J. Exp. Med.*, vol. 170, no. 6, pp. 2081–2095, Dec. 1989.
 - [155] K. N. Couper, D. G. Blount, and E. M. Riley, "IL-10: The Master Regulator of

Immunity to Infection," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 9, pp. 5771–5777, May 2008.

- [156] M. Clerici *et al.*, "Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus.," *J. Clin. Invest.*, vol. 93, no. 2, pp. 768–775, Feb. 1994.
- [157] D. Accapezzato *et al.*, "Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 7, pp. 963–972, Apr. 2004.
- [158] S. Swaminathan, "Molecular biology of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus," *Semin. Hematol.*, vol. 40, no. 2, pp. 107–115, Apr. 2003.
- [159] S. S. Iyer and G. Cheng, "Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 32, no. 1, pp. 23–63, 2012.
- [160] T. H. S. Ng, G. J. Britton, E. V Hill, J. Verhagen, B. R. Burton, and D. C. Wraith, "Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10," *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 129, May 2013.
- [161] L. Gabryšová, A. Howes, M. Saraiva, and A. O'Garra, "The Regulation of IL-10 Expression," in *Interleukin-10 in Health and Disease. Current Topics in Microbiology and Immunology*, S. Fillatreau and A. O'Garra, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, pp. 157–190.
- [162] P. Anderson, "Post-transcriptional control of cytokine production," *Nat. Immunol.*, vol. 9, pp. 353–359, Mar. 2008.
- [163] F. Tronche, E. Casanova, M. Turiault, I. Sahly, and C. Kellendonk, "When reverse genetics meets physiology: The use of site-specific recombinases in mice," *FEBS Lett.*, vol. 529, no. 1, pp. 116–121, 2002.
- [164] D. Metzger and R. Feil, "Engineering the mouse genome by site-specific recombination," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 10, no. 5, pp. 470–476, 1999.
- [165] R. Kühn and R. M. Torres, "Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting," in *Transgenesis Techniques*, 2002, pp. 175–204.
- [166] Y. Wang, Y.-Y. Yau, D. Perkins-Balding, and J. G. Thomson, "Recombinase technology: applications and possibilities," *Plant Cell Rep.*, vol. 30, no. 3, pp. 267–285, Mar. 2011.
- [167] B. Sauer, "Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system.," *Methods*, vol. 14, no. 4, pp. 381–92, 1998.
- [168] N. Isakov and B. Biesinger, "Lck protein tyrosine kinase is a key regulator of T-cell activation and a target for signal intervention by Herpesvirus saimiri and other viral gene products," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 12, pp. 3413–3421, Jun. 2000.

- [169] T. J. Molina *et al.*, "Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck," *Nature*, vol. 357, pp. 161–164, May 1992.
- [170] S. D. Levin, S. J. Anderson, K. A. Forbush, and R. M. Perlmutter, "A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis," *EMBO J.*, vol. 12, no. 4, pp. 1671–1680, Apr. 1993.
- [171] J. de Boer *et al.*, "Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 2, pp. 314–325, Feb. 2003.
- [172] J. Shi and H. T. Petrie, "Activation Kinetics and Off-Target Effects of Thymus-Initiated Cre Transgenes," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012.
- [173] B. Carow, Y. Gao, J. Coquet, M. Reilly, and M. E. Rottenberg, "lck-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets.," *J. Immunol.*, vol. 197, no. 6, pp. 2261–8, 2016.
- [174] M. A. McLellan, N. A. Rosenthal, and A. R. Pinto, "Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations," *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [175] U. Schneider, H.-U. Schwenk, and G. Bornkamm, "Characterization of EBV-genome negative 'null' and 'T' cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma," *Int. J. Cancer*, vol. 19, no. 5, pp. 621–626, May 1977.
- [176] R. T. Abraham and A. Weiss, "Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, pp. 301–308, Apr. 2004.
- [177] P. A. Bunn and F. M. Foss, "T-Cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: History and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL)," *J. Cell. Biochem.*, vol. 63, no. S24, pp. 12–23, Jan. 1996.
- [178] M. F. Favata *et al.*, "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 29, pp. 18623–32, Jul. 1998.
- [179] X. Jin *et al.*, "The p38 MAPK inhibitor BIRB796 enhances the antitumor effects of VX680 in cervical cancer," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 17, no. 5, pp. 566–576, May 2016.
- [180] O. Benzakour *et al.*, "Evaluation of the use of the luciferase-reporter-gene system for gene-regulation studies involving cyclic AMP-elevating agents.," *Biochem. J.*, vol. 309, no. Pt 2, pp. 385–387, Jul. 1995.
- [181] T. J. Langan and R. C. Chou, "Synchronization of Mammalian Cell Cultures by Serum Deprivation," in *Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols*, G. Banfalvi, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 75–83.

- [182] A. Cossarizza *et al.*, "Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies," *Eur. J. Immunol.*, vol. 47, no. 10, pp. 1584–1797, Oct. 2017.
- [183] T. Hennet, F. K. Hagen, L. A. Tabak, and J. D. Marth, "T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. 26, p. 12070 LP-12074, Dec. 1995.
- [184] S. A. Bustin, "Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, 2000.
- [185] T. Hennet, F. K. Hagen, L. A. Tabak, and J. D. Marth, "T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. 26, p. 12070 LP-12074, Dec. 1995.
- [186] K. Yang, M. Hitomi, and D. W. Stacey, "Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell," *Cell Div.*, vol. 1, p. 32, Dec. 2006.
- [187] D. W. Stacey, "Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 158–163, 2003.
- [188] T. Yasuda and T. Kurosaki, "Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 23, pp. 3634–3640, 2008.
- [189] M. M. Deepak, T. Bosiljka, M. Kazunari, L. Ling, and L. Liqun, "A global double-fluorescent Cre reporter mouse," *genesis*, vol. 45, no. 9, pp. 593–605, Sep. 2007.
- [190] Y. Hasegawa *et al.*, "Novel ROSA26 Cre-reporter Knock-in C57BL/6N Mice Exhibiting Green Emission before and Red Emission after Cre-mediated Recombination," *Exp. Anim.*, vol. 62, no. 4, pp. 295–304, Oct. 2013.
- [191] M. A. Luckey, M. Y. Kimura, A. T. Waickman, L. Feigenbaum, A. Singer, and J.-H. Park, "The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4⁺ lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling," *Nat. Immunol.*, vol. 15, pp. 638–645, Jun. 2014.
- [192] I. Gimferrer *et al.*, "Regulation of GATA-3 expression during CD4 lineage differentiation," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 3892–3898, Apr. 2011.
- [193] Y. Y. Wan, "GATA3: a master of many trades in immune regulation," *Trends Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 233–242, Jun. 2014.
- [194] I.-C. Ho, 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.*, vol. 9, pp. 125–135, Feb. 2009.
- [195] W. Zheng and R. A. Flavell, "The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells," *Cell*, vol. 89, no. 4, pp.

587–596, May 1997.

- [196] D.-H. Zhang, L. Cohn, P. Ray, K. Bottomly, and A. Ray, "Transcription Factor GATA-3 Is Differentially Expressed in Murine Th1 and Th2 Cells and Controls Th2-specific Expression of the Interleukin-5 Gene," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 34, pp. 21597–21603, Aug. 1997.
- [197] M. C. Nawijn *et al.*, "Enforced Expression of GATA-3 in Transgenic Mice Inhibits Th1 Differentiation and Induces the Formation of a T1/ST2-Expressing Th2-Committed T Cell Compartment In Vivo," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 2, p. 724 LP-732, Jul. 2001.
- [198] J. D. Farrar *et al.*, "An Instructive Component in T Helper Cell Type 2 (Th2) Development Mediated by Gata-3," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 5, p. 643 LP-650, Mar. 2001.
- [199] W. Ouyang *et al.*, "Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism," *Immunity*, vol. 9, no. 5, pp. 745–755, Nov. 1998.
- [200] J. Zhu *et al.*, "Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses," *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 11, pp. 1157–1165, Oct. 2004.
- [201] A. Skapenko *et al.*, "GATA-3 in Human T Cell Helper Type 2 Development," *J. Exp. Med.*, vol. 199, no. 3, p. 423 LP-428, Feb. 2004.
- [202] S.-Y. Pai, M. L. Truitt, and I.-C. Ho, "GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 7, p. 1993 LP-1998, Feb. 2004.
- [203] D. Mucida *et al.*, "Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II–restricted cytotoxic T lymphocytes," *Nat. Immunol.*, vol. 14, pp. 281–289, Jan. 2013.
- [204] M. S. Vacchio *et al.*, "A ThPOK-LRF transcriptional node maintains the integrity and effector potential of post-thymic CD4⁺ T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 15, pp. 947–956, Aug. 2014.
- [205] M. S. Vacchio and R. Bosselut, "What Happens in the Thymus Does Not Stay in the Thymus: How T Cells Recycle the CD4⁺–CD8⁺ Lineage Commitment Transcriptional Circuitry To Control Their Function," *J. Immunol.*, vol. 196, no. 12, p. 4848 LP-4856, Jun. 2016.
- [206] R. Setoguchi, I. Taniuchi, and M. J. Bevan, "ThPOK Derepression Is Required for Robust CD8 T cell Responses to Viral Infection," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 7, p. 4467 LP-4474, Oct. 2009.
- [207] C. A. Knosp and J. A. Johnston, "Regulation of CD4(+) T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins," *Immunology*, vol. 135, no. 2, pp. 101–111, Feb. 2012.
- [208] K. Tanaka *et al.*, "Loss of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Helper T Cells Leads

- to Defective Th17 Differentiation by Enhancing Antagonistic Effects of IFN- γ on STAT3 and Smads," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 6, p. 3746 LP-3756, Mar. 2008.
- [209] S. Ehrentraut *et al.*, "Th17 cytokine differentiation and loss of plasticity after SOCS1 inactivation in a cutaneous T-cell lymphoma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 23, pp. 34201–34216, Jun. 2016.
- [210] C. A. Knosp and J. A. Johnston, "Regulation of CD4(+) T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins," *Immunology*, vol. 135, no. 2, pp. 101–111, Feb. 2012.
- [211] W. E. Paul, "What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo?," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 88, pp. 236–239, Feb. 2010.
- [212] A. C. Carpenter *et al.*, "Control of Regulatory T Cell Differentiation by the Transcription Factors Thpok and LRF," *J. Immunol.*, vol. 199, no. 5, p. 1716 LP-1728, Sep. 2017.
- [213] R. Takahashi *et al.*, "SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production," *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 10, p. 2055 LP-2067, Sep. 2011.
- [214] I. Panagoulas, T. Georgakopoulos, I. Aggeletopoulou, M. Agelopoulos, D. Thanos, and A. Mouzaki, "Transcription Factor Ets-2 Acts as a Preinduction Repressor of Interleukin-2 (IL-2) Transcription in Naive T Helper Lymphocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 52, pp. 26707–26721, Dec. 2016.
- [215] P. Rameil, P. Lécine, J. Ghysdael, F. Gouilleux, B. Kahn-Perlès, and J. Imbert, "IL-2 and long-term T cell activation induce physical and functional interaction between STAT5 and ETS transcription factors in human T cells," *Oncogene*, vol. 19, pp. 2086–2097, May 2000.
- [216] C. Veiopoulou *et al.*, "IL-2 and IL-10 Production by Human CD4+T Cells Is Differentially Regulated by p38: Mode of Stimulation-Dependent Regulation of IL-2," *Neuroimmunomodulation*, vol. 11, no. 4, pp. 199–208, 2004.
- [217] M. Naoki and P. Diane, "Activation of the interleukin-10 gene in the human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF- κ B binding sites in the regulatory region of the interleukin-10 gene," *Eur. J. Haematol.*, vol. 59, no. 3, pp. 162–170, Apr. 2009.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ανακοινώσεις σε συνέδρια (ενδεικτικά)

i. 65^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 2014, Θεσσαλονίκη.

ERF phosphorylation and subcellular localization is associated with cell activation in an Erk-dependent manner in human T lymphocytes.

Spyridoula Tsiomita¹, George Mavrothalassitis², George Thyfronitis¹

¹ *Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece,* ² *IMBB, FORTH, Heraklion, Crete 711 10 and Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete 710 03*

ERF (ETS2 Repressor Factor) is a ubiquitously expressed transcriptional factor of the ETS family. ERF is a transcriptional repressor regulated by subcellular localization as a result of Erk-dependent phosphorylation. In vitro, ERF suppresses cell proliferation, EMT and ras-induced tumorigenicity, while in vivo, ERF is required for extraembryonic ectoderm differentiation and is a regulator of osteogenic stimulation. ERF is expressed in human T lymphocytes, however, its role in T cell biology remains unexplored. To examine how ERF responds to T cell activation signals, HuT78 cells were stimulated either through their TCR-CD3 complex or with PMA and Ionomycin in the presence or absence of the Erk specific inhibitor UO126. ERF was expressed in both unstimulated and stimulated Hut78 cells, while the levels of phosphorylated ERF were increased after stimulation with anti-CD3/CD28 Abs or PMA/Ionomycin. Phosphorylation of ERF is Erk-dependent, since was reversed in UO126 treated cultures. In order to investigate the subcellular localization of ERF, HuT78 cells were transiently transfected with a plasmid expressing GFP-ERF fusion protein and were stimulated with anti-CD3/CD28 Abs in the presence or absence of UO126 inhibitor. In resting T cells ERF was located both in the cytoplasm and in the nucleus. Under CD3/CD28 stimulation, ERF showed a tendency to translocate to the cytoplasm, while in the presence of the Erk inhibitor, ERF translocated back to the nucleus. Our findings indicate that TCR/CD28 associated signals induce Erk-dependent phosphorylation of ERF. Also, our data suggest that in T cells, also, the nuclear-cytoplasmic shuttling of ERF is associated with Erk activity.

ii. 67^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 2016, Ιωάννινα.

ERF over-expression inhibits IL-2 and IL-10 production following TCR/CD28 stimulation of Hut-78 T lymphocytes.

Spyridoula Tsiomita¹, George Mavrothalassitis^{2,3}, George Thyphronitis¹

¹ Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, Ioannina, Greece, ²IMBB, FORTH, Heraklion, Crete, Greece and ³Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

ERF (ETS2 Repressor Factor) is a ubiquitously expressed transcriptional repressor of the ETS family and is regulated by subcellular localization as a result of Erk-dependent phosphorylation. In vitro, ERF suppresses cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition and ras-induced tumorigenicity, while in vivo ERF is required for extraembryonic ectoderm differentiation and is a regulator of osteogenesis. We have previously found that ERF was expressed in both unstimulated and stimulated human T lymphocytes, while its phosphorylation increases after TCR stimulation and is dependent on Erk activation. In addition, it is well established that Erk is activated following TCR stimulation and is required for IL-2 and IL-10 production. To determine whether ERF is a downstream target of ERK that is involved in IL-2 and IL-10 expression, HuT78 cells were stably transfected with a lentiviral vector expressing ERF protein or a constant active mutant of ERF (M1-7), or the control vector WPI. Cell clones were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs for 48 hours in the presence or absence of an Erk specific inhibitor (UO126) and supernatants were tested by ELISA for the presence of IL-2 and IL-10. In non-stimulated Hut-78 cells there were no traceable levels of IL-2. Under CD3/CD28 stimulation, ERF clones produced lower levels of IL-2 in comparison to control clones, while in M1-7 clones results varied. As expected with Hut-78 cells, all clones produced IL-10 even without stimulation. When control WPI transfected cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs, no differences in IL-10 production was observed, in comparison to non-stimulated cells. However, IL-10 production showed a noticeable diminution in stimulated ERF and M1-7 clones, in comparison to non-stimulated ones. Altogether, our findings suggest that ERF negatively regulates IL-2 and IL-10 production by Hut-78 T cells, a finding that needs further investigation with primary T cells.

