



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΤΩΝ ΤΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΤΩΝ ΤΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Εμμανουηλίδου Αναστασίας: 18-1-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 575^α/28-2-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Παπαμαρκάκη Θωμαΐδα Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-3-2006

«Ο ρόλος των αναδιοργανωτών της χρωματίνης στην αποπτωτική απόκριση των κυττάρων»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 714^α/7-6-2001

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Θυφρονίτης Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαΐς	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 1-7-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ



*«Εμπρός λοιπόν
Από σένα η άνοιξη εξαρτάται. Τάχυνε την αστραπή
Πιάσε το ΠΡΕΠΕΙ από το ιώτα και γδάρε το ίσαμε το πι»*
Οδυσσέας Ελύτης, *Ο Μικρός Ναυτίλος*, 1985

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα 2006-2011 στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στα Εργαστήρια του Τομέα Ρευματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Τομέα Βιολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου του Σικάγο. Πολλές εμπειρίες, πολλές συνεργασίες, πολλές σχέσεις, οπότε και πολλές ευχαριστίες. Θα ξεκινήσω από την αναπληρώτρια καθηγήτρια Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, η οποία επέβλεψε και το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς αυτής με προσοχή, ενδιαφέρον, και υπομονή. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να την ευχαριστήσω που ποτέ δε ξέχασε ότι ο σκοπός της εκπόνησης μιας διατριβής δεν είναι μόνο η παραγωγή αποτελεσμάτων, αλλά και η εκπαίδευση του φοιτητή. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Φωτεινή Γούναρη, η οποία επέβλεψε το μέρος της μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο Σικάγο. Την ευχαριστώ που με φιλοξένησε στο εργαστήριό της και υποστήριξε οικονομικά την παραμονή μου εκεί για 2 χρόνια, δίνοντάς μου τη δυνατότητα να εργαστώ σε ένα διεθνές περιβάλλον, να εξοικιωθώ με νέες τεχνικές και να δουλέψω σε πολλά διαφορετικά προγράμματα ταυτόχρονα, παράλληλα με το δικό μου. Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, την αναπληρώτρια καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου και τον καθηγητή Δημήτρη Γαλάρη, που ήταν πάντα διαθέσιμοι και πρόθυμοι να με βοηθήσουν.

Τη Ζωή Καρέτσου που είχε αναλάβει την τεχνική μου εκπαίδευση στο ξεκίνημα του διδακτορικού και που απαντούσε με υπομονή σε όλες μου τις ερωτήσεις, χωρίς ποτέ να παραπονεθεί όταν την ενοχλούσα, ακόμα και εκτός ώρες εργαστηρίου.... Θερμές ευχαριστίες και στα μέλη του εργαστηρίου του επίκουρου καθηγητή Σάββα Χριστοφορίδη (Αλεξάνδρα, Τάνια, Σοφία), με τα οποία μοιραστήκαμε στην αρχή τον ίδιο χώρο εργασίας. Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους συνεργάτες μου στο Σικάγο, Marei, Kristin, Katy, Mat, Zhenping και Γάσσο. Όλοι μαζί στις εβδομαδιαίες συναντήσεις μας, αλλά και ο καθένας μόνος του σε διάφορα στάδια με βοήθησαν να ξεπεράσω τις όποιες δυσκολίες συνάντησα κατά τη διάρκεια της παραμονή μου στο εργαστήριο. Επίσης, τη Veena, τη Sheila, τη Luciana, τη Sarah, τον Pavel, το Μιχάλη και τη Σάνυ, που σε στιγμές απελπισίας, αν και από άλλα εργαστήρια, με βοήθησαν είτε τεχνικά είτε με συζητήσεις και συμβουλές. Επιπλέον, το προσωπικό του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής του Πανεπιστημίου του Σικάγο (David, Ryan και Mike), για τα πειράματα sorting και τη σωτήρια παρέμβασή τους σε ορισμένες περιπτώσεις.

Ιδιαίτερα, όμως, τη Marei από το εργαστήριο της Φωτεινής που είχε αναλάβει την τεχνική μου εκπαίδευση, στην αρχή, και πάντα είχε χρόνο για troubleshooting. Επίσης, τη Kristin για την προθυμία της και για τις πολλές μεταμεσονύκτιες ώρες που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο. Τις ευχαριστώ, επίσης, και τις δύο για τις πολλές πολλές όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε έξω από το εργαστήριο, εξερευνώντας το Σικάγο.

Τους φίλους μου από το εργαστήριο στα Γιάννενα (ιδιαίτερα τους Μιχάλη, Γιώργο και Βασιλική), που, όταν έφυγε το Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, διατήρησαν το όμορφο κλίμα εργασίας που είχε αναπτυχθεί. Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών ερευνών για την άψογη συνεργασία που είχαμε, αλλά και για τις βόλτες μας στα Γιάννενα.

Τη Σοφία τη Ζωγράφου, επειδή μοιραστήκαμε ατελείωτες ώρες εντός και εκτός εργαστηρίου γεμάτες γέλια, αμπελοφιλοσοφίες και troubleshooting.

Τη Σοφία την Μπέλλου που πάντα έκανε το πρόβλημά μου και δικό της και με υπομονή και προθυμία προσπαθεί να με κάνει καλύτερη στη δουλειά μου και όχι μόνο...

Τις ευχαριστώ, επίσης, και τις δύο για το χρόνο που διάθεσαν και τις συμβουλές τους όσον αφορά τη συγγραφή αυτής της διατριβής.

Τέλος, την οικογένειά μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια, σε κάθε μου κίνηση, ψυχολογικά και οικονομικά. Χωρίς αυτούς ποτέ δε θα είχα πιστέψει στον εαυτό μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης	1
1.1.1	Ο καταρράκτης των κασπασών.	2
1.1.2	Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση.....	3
1.1.3	Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2.....	5
1.2	Επαγωγή της απόπτωσης με χημειοθεραπευτικά φάρμακα	7
1.3	Χρωματίνη	8
1.3.1	Το νουκλεόσωμα.....	10
1.4	Δυναμική φύση της χρωματίνης	12
1.5	Μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης	15
1.6	Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και ο ρόλος τους στην απόπτωση.	18
1.6.1	Η SET/TAF-1β.....	19
1.6.2	Η προθυμοσίνη α (ProT α).....	21
1.7	Δομικά χαρακτηριστικά των SET/TAF-1β και προθυμοσίνη α	26
1.8	Διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων	32
1.8.1	Τα στάδια διαφοροποίησης DN1, DN2, DN3 και DN4.....	34
1.8.2	Τα στάδια διαφοροποίησης DP και SP (CD4, CD8).....	36
1.9	Ο ρόλος της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων	39
1.10	Ο ρόλος της απόπτωσης στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων	41
1.10.1	DN θυμοκύτταρα, IL-7 μεταγωγή σήματος και β επιλογή.....	42
1.10.2	DP θυμοκύτταρα και θετική/αρνητική επιλογή.....	43
	ΣΚΟΠΟΣ	47
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1	Υλικά	49
2.2	Κυτταροκαλλιέργειες	49
2.3	Διαμόλυνση κυττάρων	51
2.4	Κατασκευές DNA	51

2.5	Κατασκευή φορέων-ρετροϊών της αγρίου τύπου προθυμοσίνης α (flag-ProT α WT), της «αποπτωτικής» μορφής της (flag-ProT α TR) και της μορφής που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3 (flag-ProT α MUT).	51
2.6	Αναπαραγωγή ρετροϊών της προθυμοσίνης α και των δύο μεταλλαγμάτων της	54
2.7	Τιτλοποίηση των ρετροϊών.....	55
2.8	Κυτταρομετρία ροής.....	55
2.9	Απομόνωση θύμου αδένος από αγρίου τύπου ποντίκια C57/BL6.....	58
2.10	Απομόνωση αδιαφοροποίητων θυμοκυττάρων	58
2.11	Μόλυνση θυμοκυττάρων με τους ρετροϊούς.....	59
2.12	Το σύστημα συν-καλλιέργειας OP9-DL1	60
2.13	Συν-καλλιέργεια θυμοκυττάρων και κυττάρων OP9-DL1.....	61
2.14	Έλεγχος της διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.....	61
2.15	Έλεγχος των επιπέδων της απόπτωσης σε HeLa κύτταρα με κυτταρομετρία ροής.....	62
2.16	Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	63
2.17	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου	63
2.18	Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	64
2.19	Ανοσοαποτύπωση κατά Western της προθυμοσίνης α	64
2.20	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	65
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
3.1	Μελέτη της αποπτωτικής απόκρισης καρκινικών κυττάρων μετά από την επίδραση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων	67
3.1.1	Επαγωγή της απόπτωσης με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο σισπλατίνη.....	67
3.1.2	Επαγωγή της απόπτωσης με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο ετοποσίδιο.....	70
3.1.3	Επαγωγή της απόπτωσης με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο ταξόλη.....	72
3.2	Διερεύνηση του ρόλου της προθυμοσίνης α (ProT α) και SET/TAF-1 β στην αποπτωτική απόκριση καρκινικών κυττάρων	74
3.2.1	Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης SET/TAF-1 β δεν επηρεάζει τη ρύθμιση της αποπτωτικής απόκρισης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού.....	74
3.2.2	Η αποσιώπηση της SET/TAF-1 β δεν επηρεάζει την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων.....	76

3.2.3	Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης, κατά την επαγωγή αυτής με σισπλατίνη.	79
3.2.4	Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης που επάγεται από ετοποσίδιο.....	81
3.2.5	Η υπερέκφραση της παραθυμοσίνης δεν επηρεάζει την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων HeLa σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.	83
3.2.6	Η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α αυξάνει τα επίπεδα της απόπτωσης.....	84
3.2.7	Μελέτη του κυτταρικού εντοπισμού της προθυμοσίνης α σε αποπτωτικά κύτταρα.....	88
3.3	Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων..	92
3.3.1	Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α δεν επηρεάζει τα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων (DN1, DN2, DN3, DN4).....	95
3.3.2	Η προθυμοσίνη α δεν επηρεάζει τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων (DP, CD4 και CD8)	98
3.3.3	Η προθυμοσίνη α δεν επηρεάζει τα επίπεδα της απόπτωσης κατά τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων.	100
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	115
	SUMMARY	117
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	119

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης

Ο όρος «απόπτωση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 (Kerr et al., 1972) για να περιγράψει ένα είδος κυτταρικού θανάτου, που διέφερε από τη νέκρωση και που απαιτούσε την κατανάλωση ενέργειας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί. Έτσι, ενώ η νέκρωση είναι αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής βλάβης και αποτελεί παθητική διαδικασία, η απόπτωση πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου και είναι ενεργητική διαδικασία. Στην περίπτωση της νέκρωσης, τα κύτταρα διογκώνονται με συνέπεια τη διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και την έκχυση των κυτταρικών συστατικών στο μεσοκυττάριο περιβάλλον. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη στους ιστούς, επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα, κυρίως μέσω της πρόκλησης φλεγμονωδών αντιδράσεων. Σε αντίθεση, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η κυτταρική συρρίκνωση, η δημιουργία εξογκωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια και η μετακίνηση ενός συστατικού της εσωτερικής πλευράς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, της φωσφατίδυλο-σερίνης, προς τον εξωκυττάριο χώρο. Αντίστοιχα, στο εσωτερικό του κυττάρου και συγκεκριμένα στον πυρήνα πραγματοποιείται συμπύκνωση της χρωματίνης και θραυσματοποίηση του DNA σε κλάσματα των 180 ζευγών βάσεων (Wyllie, 1980, Nagata, 2000). Ο κατακερματισμένος πυρήνας και τα κυτταροπλασματικά κατάλοιπα σχηματίζουν κυστιδία που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία καλούνται αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Τα αποπτωτικά αυτά σωματίδια, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, απομακρύνονται από γειτονικά υγιή κύτταρα ή φαγοκύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν την εξωτερίκευση κατάλοιπων της φωσφατίδυλο-σερίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για τους υπόλοιπους υγιείς ιστούς του οργανισμού (Vermes et al., 1995, Martin et al., 1995).

Ο φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης, τόσο κατά την ανάπτυξη του οργανισμού όσο και στην ενήλικη ζωή του, αποτελεί αντικείμενο εντατικής ερευνητικής δραστηριότητας. Η επιλεκτική κυτταρική «αυτοκτονία» είναι ένα γεγονός κεντρικής σημασίας για τη μορφοποίηση του εμβρύου, τον τερματισμό ανοσολογικών αποκρίσεων, τον περιορισμό εξάπλωσης μολύνσεων και γενικά για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας στους ιστούς (Jacobson et al., 1997, Vaux et al., 1999, Meier et al., 2000).

επιβίωση ενός πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από τη διατήρηση και την ανανέωση των κυττάρων διαφορετικών ιστών, μια διεργασία που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απομάκρυνσης των κυττάρων με τη διαδικασία της απόπτωσης. Απορρύθμιση του μηχανισμού της απόπτωσης είναι δυνατό να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απώλεια κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι αυξημένα ή συσσώρευση ανεπιθύμητων κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι ανεπαρκή. Η αυξημένη απόπτωση έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Αλτς/χάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Hass, 2003), ενώ, η παρεμπόδιση της αποπτωτικής διαδικασίας μπορεί να είναι σημαντική για την ανάπτυξη όγκων και την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Thompson, 1995).

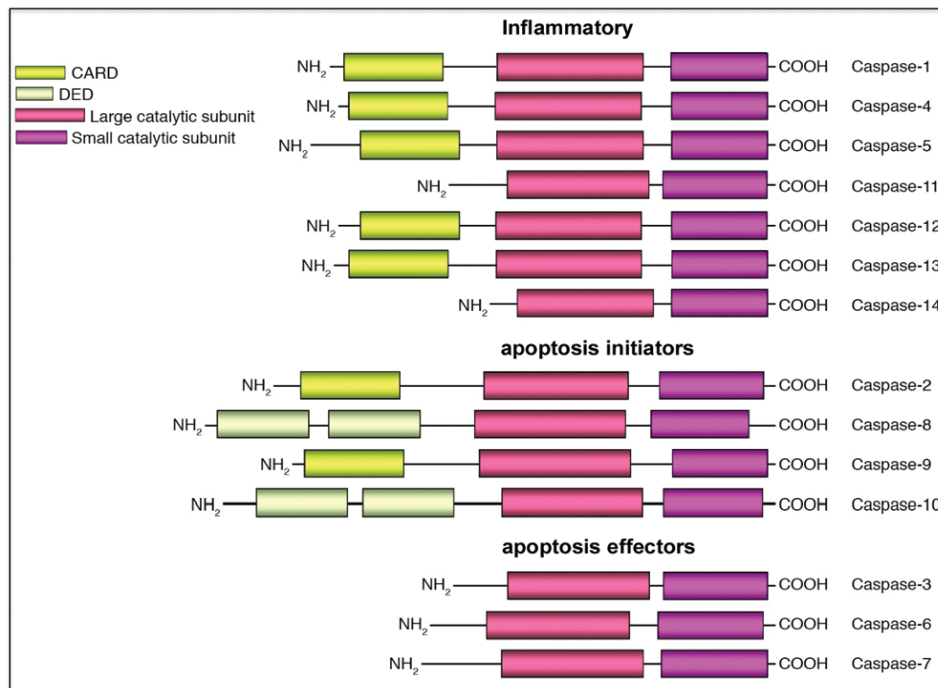
Υπάρχουν δύο μονοπάτια αποπτωτικής απόκρισης. Το εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι. Το πρώτο περιλαμβάνει ερεθίσματα θανάτου, όπως οι παράγοντες Fas και TRAIL. Το δεύτερο μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαταραχές ενδοκυτταρικών οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα λυσοσωμάτια.

1.1.1 Ο καταρράκτης των κασπασών.

Η διαδικασία της απόπτωσης προκαλείται από μια σειρά σημάτων που ενεργοποιούνται ως απόκριση των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα, όπως βλάβες στο DNA, στέρηση αυξητικών παραγόντων ή stress του ενδοπλασματικού δικτύου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα σήματα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, ο οποίος αποτελεί το τελικό στάδιο της αποπτωτικής διαδικασίας. Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών με υψηλή ομολογία και είναι όλες κυστεϊνικές πρωτεάσες εξειδικευμένες να υδρολύουν πεπτίδια σε σημεία που υπάρχουν κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, ενώ περιέχουν μια συντηρημένη ενεργή αλληλουχία πέντε αμινοξέων Gln-Ala-Cys-X-Gly (το X μπορεί να είναι R, Q ή D). Πριν την ενεργοποίησή τους, βρίσκονται με τη μορφή ζυμογόνων, τα οποία ονομάζονται προκασπάσες. Η ενεργοποίηση των προκασπασών πραγματοποιείται μέσω πρωτεολυτικής σχάσης συγκεκριμένων καταλοίπων ασπαρτικού οξέος στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι ενεργές κασπάσες είναι τετραμερή, που αποτελούνται από δύο ταυτόσημα ετεροδιμερή μεγάλης και μικρής υπομονάδας (Liang et al., 1997).

Οι κασπάσες διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη δομική τους ομολογία και τη λειτουργία τους. Στους ενεργοποιητές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -2, -8,

-9 και -10 (εναρκτήριες κασπάσες), στους εκτελεστές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -3, -6 και -7 (εκτελεστικές κασπάσες), και στους μεσολαβητές της φλεγμονής, που είναι οι κασπάσες -1, -4, -5, -11, -12, -13 και -14 (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Η οικογένεια των κασπασών (Lavrik et al., 2005).

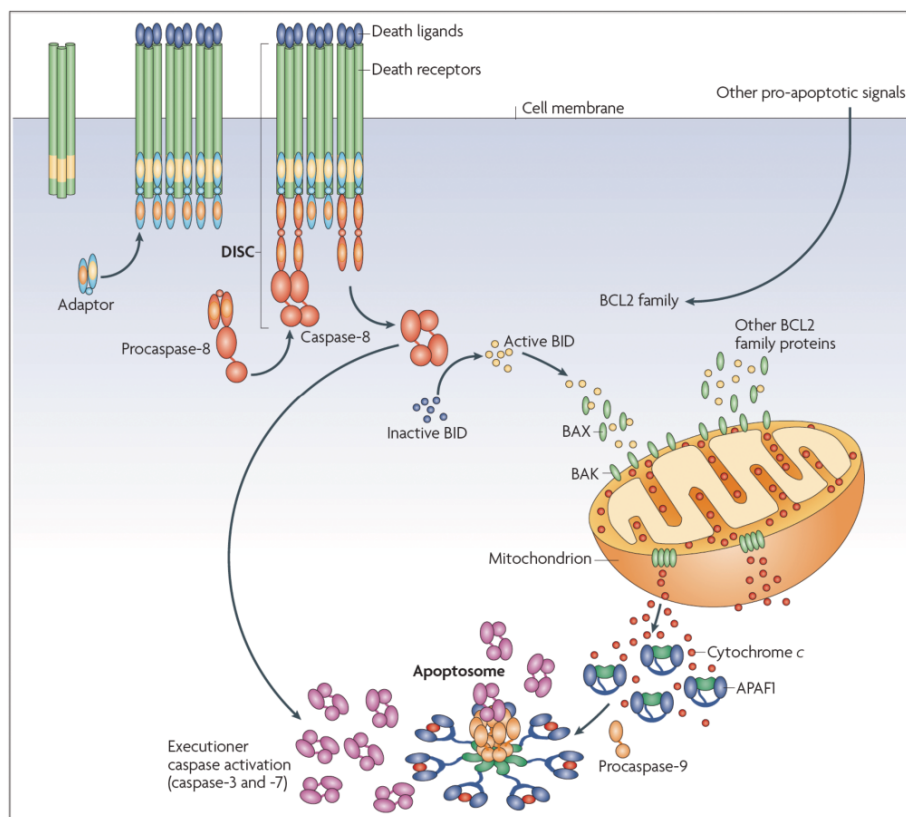
1.1.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση

Το κυτταρικό διαμέρισμα των μιτοχονδρίων αποτελεί το σημείο στο οποίο συγκλίνουν τα περισσότερα ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση, αποτελώντας την κύρια οδό μέσω της οποίας ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών. Όταν υπάρχει κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, προκαλείται διάνοιξη πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Mitochondrion Permeability Transition Pores, MPTPs), με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαπερατότητας της.

Επακόλουθο της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι η απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που, υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι αυστηρά περιορισμένες στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα c (cyt-c). Το κυτόχρωμα c είναι μια πρωτεΐνη 12.5 kDa που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III (UQH₂-αναγωγή του κυτοχρώματος c) και IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Είναι

συνδεδεμένο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και έχει φυσιολογικό ρόλο ανεξάρτητο από την αποπτωτική του δράση.

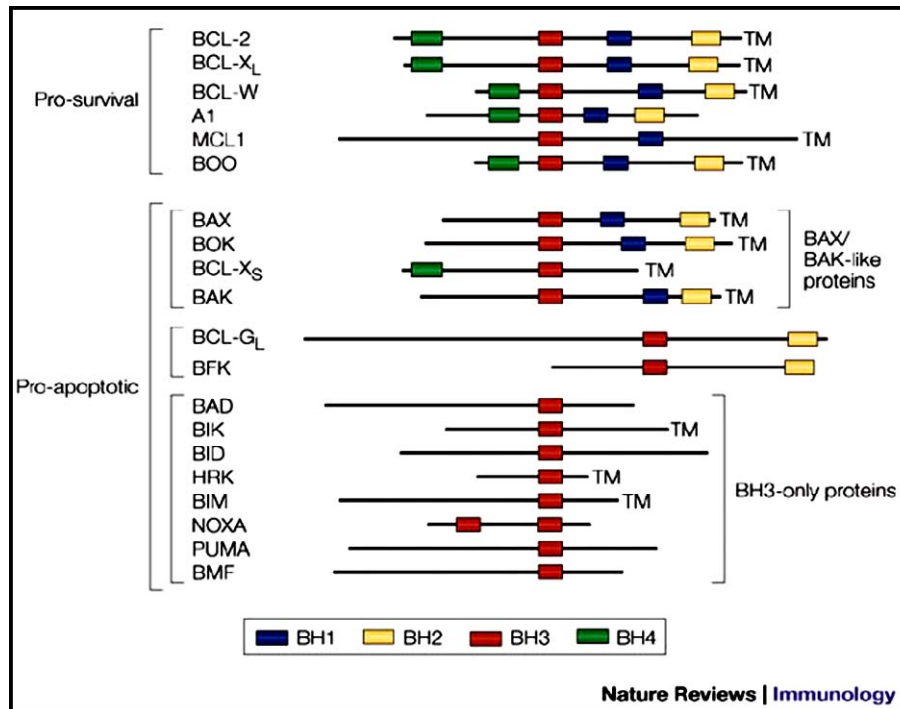
Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c παίρνει μέρος στο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου, που καλείται αποπτώσωμα (Εικόνα 1.2). Το αποπτώσωμα αποτελείται από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα ενεργοποίησης των αποπτωτικών πρωτεασών Araf-1 (apoptotic-protease activating factor), από το κυτόχρωμα c και από την προκασπάση-9, ενώ ο σχηματισμός του εξαρτάται από την παρουσία ATP. Τόσο το αμινοτελικό άκρο του παράγοντα Araf-1 όσο και η προπεριοχή της προκασπάσης-9 περιέχουν τις περιοχές στρατολόγησης των κασπασών, CARDs, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και έχουν σαν αποτέλεσμα την αυτοενεργοποίηση της προκασπάσης-9. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9, με την σειρά της, σχάζει και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές προκασπάσες -3, -6 και -7, ενώ η ενεργή κασπάση-3 μπορεί να λειτουργήσει ενισχυτικά στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9, μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης του φαινομένου (Jiang et al., 2000). Οι εκτελεστικές κασπάσες στη συνέχεια καταλύουν την περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση πρωτεϊνών-κλειδιών για την επιβίωση των κυττάρων. Για παράδειγμα, υποστρώματα των κασπασών αποτελούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σχηματισμό του κυτταροσκελετού και του πυρήνα, στη μεταγωγή σήματος, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, αλλά και στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Fischer et al., 2003).



Εικόνα 1.2: Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης. Απεικονίζονται το ενδογενές και το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης (Ow et al., 2008).

1.1.3 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2

Κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών διαδραματίζουν τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από αντι-αποπτωτικά μέλη που εμποδίζουν την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών, καθώς και από προ-αποπτωτικά μέλη που επάγουν τη διάνοιξη πόρων (Εικόνα 1.3) (Youle et al., 2008). Η δράση αυτών των πρωτεϊνών διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο κατά ποσό το κύτταρο θα επιβιώσει ή θα οδηγηθεί σε αποπτωτικό θάνατο. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 25 συγγενείς πρωτεΐνες, οι οποίες μοιράζονται τουλάχιστον μία συντηρημένη Bcl-2 ομόλογη περιοχή (Bcl-2 homology domain, BH). Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών εμπεριέχουν έως και 4 συντηρημένες ομόλογες περιοχές (BH), οι οποίες χαρακτηρίζονται ως BH1, BH2, BH3 και BH4 (Cory et al., 2002, Youle et al., 2008).



Εικόνα 1.3: Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών (Cory et al., 2002).

Αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι να συντελούν στη σταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά μεμβρανών, όπως η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και η μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου, όπου συνδέονται με τη βοήθεια του υδρόφοβου καρβοξυτελικού τους άκρου. Τα πιο αντιπροσωπευτικά αντι-αποπτωτικά μέλη είναι η Bcl-2 και η Bcl-X_L (Muchmore et al., 1996, Petros et al., 2001) Οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, αναστέλλοντας έτσι τον ολιγομερισμό των τελευταίων και την επακόλουθη διάνοιξη πόρων στα μιτοχόνδρια.

Προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

• BH3- only πρωτεΐνες

Οι BH3-only πρωτεΐνες περιέχουν μόνο την περιοχή BH3 και μπορούν να εκκινήσουν την αποπτωτική διαδικασία ως απόκριση σε κάποιο ενδοκυτταρικό σήμα. Παρά την προ-αποπτωτική τους δράση, οι BH3-only πρωτεΐνες δεν μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, όταν απουσιάζει η Bax ή η Bak (Cheng et al., 2001, Zong et al., 2001).

- *Bax-like* πρωτεΐνες

Από τις πρωτεΐνες αυτής της ομάδας, η Bax και η Bak είναι οι καλύτερα μελετημένες. Τόσο η Bax όσο και η Bak θεωρείται ότι λειτουργούν κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ αρκετό ενδιαφέρον εμφανίζει και η δράση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ειδικότερα για την πρωτεΐνη Bax, είναι γνωστό ότι, ενώ σε ανέπαφα κύτταρα βρίσκεται υπό την μορφή κυτταροπλασματικού μονομερούς, όταν δεχθεί κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα αλλάζει διαμόρφωση, εισέρχεται στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ολιγομερίζεται και, με τον τρόπο αυτό, ενισχύει τη διάνοιξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Hsu et al., 1998, Antonsson et al., 2001, Mikhailov et al., 2001).

1.2 Επαγωγή της απόπτωσης με χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Η ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης πραγματοποιείται μέσω εξωγενών, αλλά και ενδογενών ερεθισμάτων. Εξωγενή ερεθίσματα είναι αυτά που ενεργοποιούν συγκεκριμένους αποπτωτικούς υποδοχείς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα ερεθίσματα αυτά προέρχονται από διπλανά κύτταρα ή κύτταρα της ανοσολογικής απόκρισης με σκοπό την εξάλειψη καρκινικών ή μολυσμένων με ιούς ή βακτήρια κυττάρων. Τα ενδογενή ερεθίσματα προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου και προκύπτουν συνήθως από βλάβες στους μηχανισμούς της αντιγραφής, μεταγραφής, μετάφρασης, αλλά και επιδιόρθωσης του DNA. Το λειτουργικό αποτέλεσμα των βλαβών αυτών είναι, στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρόκληση σχάσεων στη διπλή έλικα του DNA.

Η κλινική εφαρμογή της παρατήρησης αυτής είναι η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, η στοχευμένη χορήγηση των οποίων, οδηγεί στην εμφάνιση βλαβών στο DNA. Τρία από τα πιο διαδεδομένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, που λειτουργούν ως ενδογενή αποπτωτικά ερεθίσματα, είναι η σισπλατίνη, το ετοποσίδιο και η ταξόλη.

Η σισπλατίνη (cis-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος (II)) είναι μία δραστική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως στις αντι-καρκινικές θεραπείες. Η κυτταροτοξική της δράση οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με το DNA και στη δημιουργία διακλωνικών ομοιοπολικών διασυνδέσεων (intrastrand cross link adducts), οι οποίες, αρχικά, ενεργοποιούν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και, στη συνέχεια, το

μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης (Prestayko et al., 1979, Siddik, 2003). Το ετοποσίδιο (etoposide) είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων τύπων ανθρώπινων καρκίνων. Η κυτταροτοξική του δράση οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με το ένζυμο τοποϊσομεράση II. Το ένζυμο αυτό συνδέεται στο DNA κατά την αντιγραφή και προκαλεί σχάσεις της διπλής αλυσίδας. Το ετοποσίδιο σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της τοποϊσομεράσης II με το DNA και δεν επιτρέπει την ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου. Η συσσώρευση διπλών σχάσεων στο DNA σηματοδοτεί την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Εφόσον οι βλάβες του DNA δεν διορθωθούν, ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης (Sehested, 1996, Baldwin et al., 2005). Η ταξόλη (taxol), τέλος, χρησιμοποιείται για την θεραπεία του καρκίνου της μήτρας, του στήθους και του πνεύμονα. Το φάρμακο αυτό προσδένεται στη β-τουμπουλίνη και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (Schiff et al., 1979), με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη μίτωση του κυττάρου (Yvon et al., 1999, Woodward et al., 2010).

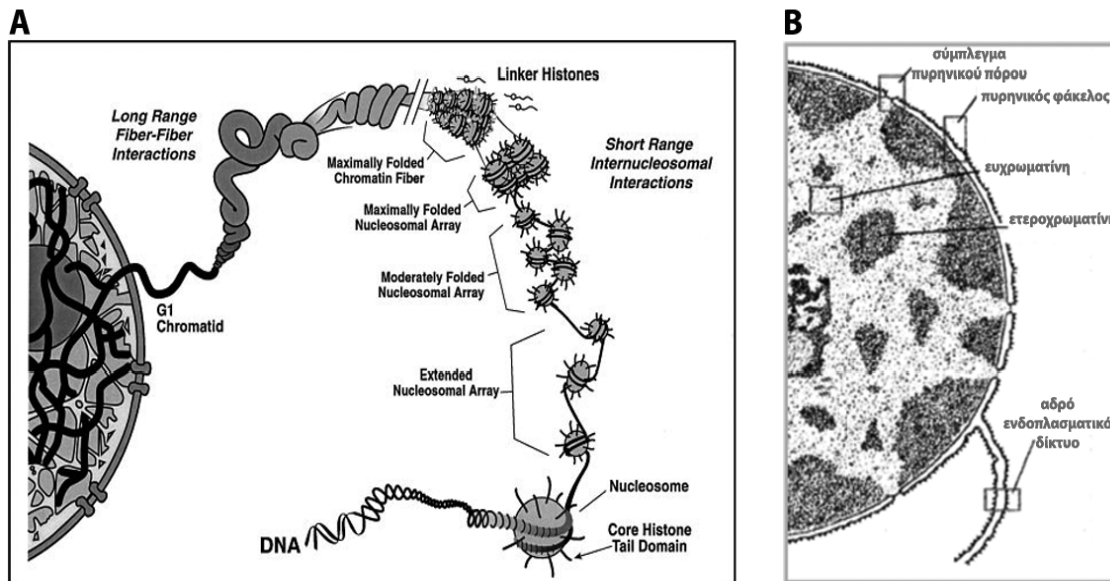
Η ρύθμιση του μηχανισμού της απόπτωσης είναι μία διαδικασία πολύπλοκη που απαιτεί τη συνεργασία και την ταυτόχρονη δράση πολλών παραγόντων. Όπως και για όλους τους κυτταρικούς μηχανισμούς, έτσι και για το μηχανισμό της απόπτωσης και τη ρύθμισή του απαιτείται η πρόσβαση ή η αποτροπή της πρόσβασης διαφόρων παραγόντων στο εκμαγείο του DNA. Η διαδικασία αυτή επηρεάζεται άμεσα από τη δομή της χρωματίνης και την αναδιαμόρφωσή της. Στο επόμενο κεφάλαιο ακολουθεί μία συνοπτική περιγραφή της δομής της χρωματίνης, των παραγόντων που επηρεάζουν τη διαμόρφωσή της, καθώς και των μηχανισμών αναδιοργάνωσής της.

1.3 Χρωματίνη

Στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων το γενωμικό DNA οργανώνεται σε διακριτές χρωμοσωμικές περιοχές (Chuang et al., 2007). Το συμπυκνωμένο σε ιεραρχικά επίπεδα DNA, σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες που είναι προσδεσμένες πάνω του, δημιουργούν μια ινώδη νουκλεοπρωτεϊνική δομή, τη χρωματίνη (Εικόνα 1.4 Α).

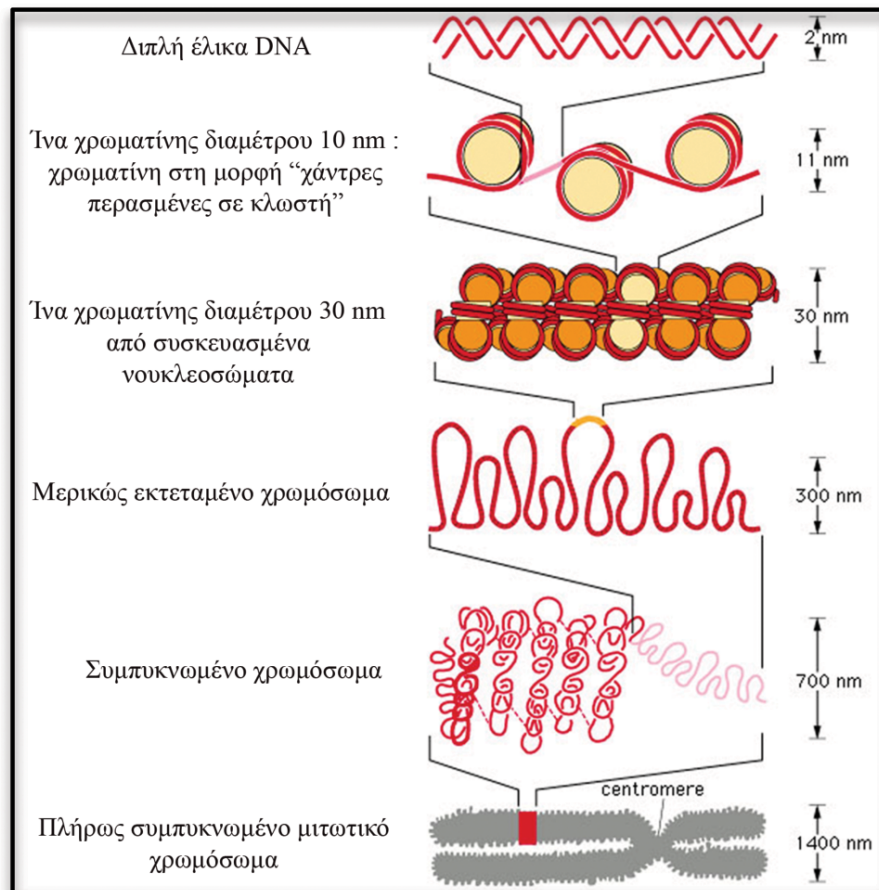
Η χρωματίνη υφίσταται σε δυο δυναμικές “μορφές” συμπύκνωσης που διαφέρουν στην προσβασιμότητα τους σε κυτταρικούς παράγοντες, την “ευχρωματίνη” και την “ετεροχρωματίνη”. Η ευχρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργή και λιγότερο

συμπυκνωμένη, ενώ η ετεροχρωματίνη είναι μεταγραφικά ανενεργή και περισσότερο συμπυκνωμένη (Εικόνα 1.4 Β).



Εικόνα 1.4 Η χρωματινική ίνα και οι μορφές συμπύκνωσής της. (Α) Σχηματική αναπαράσταση της συμπύκνωσης της χρωματινικής ίνας στο μεσοφασικό πυρήνα. Απεικονίζονται τα στάδια συμπύκνωσης των ολιγονουκλεοσωματικών συστοιχιών σε συμπαγείς χρωματινικές ίνες (Hansen, 2002). **(Β)** Φωτογραφία του μεσοφασικού πυρήνα. Υποδεικνύονται οι χρωματινικές περιοχές που είναι ορατές στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη, οι πυρηνικοί πόροι, ο πυρηνικός φάκελος και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα αναπροσαρμοσμένη από IMB databank)

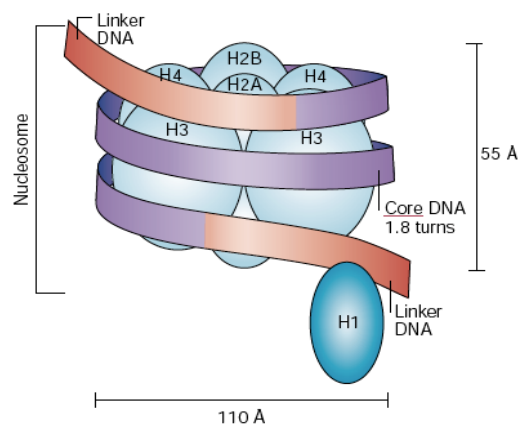
Από εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου προκύπτει ότι, στο πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης, η χρωματίνη οργανώνεται σε δομές που περιγράφονται από τον όρο «χάντρες κομπολογιού» (beads-on-a-string) και αποτελούν την ίνα των 10 nm. Η ίνα των 10 nm συσπειρώνεται ακόμη περισσότερο στην ίνα των 30 nm. Δεν είναι ακόμη σαφές πώς διατάσσονται τα νουκλεοσώματα στην ίνα αυτή. Η ίνα των 30 nm οργανώνεται σε βρόγχους (loops) που προεξέχουν από ένα κεντρικό άξονα και αποτελεί το υπόστρωμα για όλες τις διαδικασίες που σχετίζονται με το DNA. Τελικά, αυτή η αλυσίδα των βρόγχων υπόκειται σε επιπλέον συμπύκνωση για να σχηματίσει το μιτωτικό χρωμόσωμα (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων οργάνωσης και συμπύκνωσης της χρωματίνης ενός μεταφασικού χρωμοσώματος (Molecular Biology of the Cell 4th Edition, Alberts et al, Garland Press).

1.3.1 Το νουκλεόσωμα

Η βασική δομική μονάδα της χρωματίνης είναι το **νουκλεόσωμα**. Η πρώτη κρυσταλλογραφική δομή του περιγράφηκε το 1984 σε ανάλυση 7 Å (Richmond et al., 1984). Έκτοτε, έχουν προσδιοριστεί υψηλότερης ανάλυσης κρυσταλλογραφικές δομές του νουκλεοσώματος διαφόρων οργανισμών (έως και 1,9 Å) (Luger et al., 1997, White et al., 2001, Chantalat et al., 2003, Tsunaka et al., 2005). Αυτές οι δομές αποκαλύπτουν τον νουκλεοσωματικό πυρήνα που αποτελείται από ένα οκταμερές ιστονών, γύρω από το οποίο τυλίγεται μια αριστερόστροφη υπερέλικα DNA 147 βάσεων, σχηματίζοντας 1.8 στροφές (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση της δομής του νουκλεοσώματος (Georgopoulos, 2002).

Το οκταμερές των ιστονών σχηματίζεται από ένα τετραμερές, αποτελούμενο από δύο μόρια της ιστόνης H3 και δύο μόρια της ιστόνης H4, στην περιφέρεια του οποίου συνδέονται δύο διμερή, που το καθένα αποτελείται από ένα μόριο των ιστονών H2A και H2B (H2A/H2B) (Εικόνα 1.6). Μεταξύ δύο διαδοχικών νουκλεοσωμάτων υπάρχει ένα τμήμα DNA που ονομάζεται συνδετικό DNA και έχει κυμαινόμενο μήκος, από 0 έως 80 bp, ανάλογα με τον ιστό και το είδος προέλευσης (Kornberg, 1977, Widom, 1998, Widom, 1992). Η σύνδεση της συνδετικής ιστόνης H1 στο σημείο εισόδου/εξόδου του συνδετικού DNA από το νουκλεόσωμα σταθεροποιεί άλλες 20 βάσεις DNA στο παραπάνω νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (Noll et al., 1977, Allan et al., 1980). Η πλήρης δομή του σωματίου που περιέχει 165 βάσεις DNA (δύο στροφές), το οκταμερές των ιστονών και τη συνδετική ιστόνη H1 είναι γνωστή ως *χρωματόσωμα* (Wolffe, 1998). Η “επαφή” του DNA με το οκταμερές των ιστονών επιτυγχάνεται μέσω ~240 ισχυρών αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες ιόντων και μη πολικές επαφές) σε 14 διαφορετικά σημεία (Luger et al., 1998).

Στην “εξωτερική” πλευρά του νουκλεοσώματος εκτείνονται οι περιοχές των άκρων των ιστονών, γνωστές και ως “ουρές” των ιστονών (histone tails), οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 25% περίπου της ολικής μάζας του οκταμερούς. Οι περιοχές αυτές, οι οποίες αποτελούν συνέχεια των αμινοτελικών περιοχών όλων των νουκλεοσωμικών ιστονών, καθώς και της καρβοξυτελικής περιοχής της H2A, προεξέχουν από την επιφάνεια του νουκλεοσώματος και προβάλλουν πίσω από τις υπερελικοειδείς περιστροφές του DNA (Wolffe et al., 1999). Η πρωτεολυτική απομάκρυνση των περιοχών των άκρων δεν

μεταβάλλει σημαντικά τη διαμόρφωση του νουκλεοσώματος, ενώ βρέθηκε ότι δεν παίζουν ρόλο στη συγκρότηση του νουκλεοσώματος *in vitro*. Μελέτες με ακολουθίες νουκλεοσωμάτων, απουσία της συνδετικής ιστόνης H1, έδειξαν ότι οι περιοχές των άκρων των ιστονών ρυθμίζουν τις επαφές μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων και συμμετέχουν στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των ανώτερων δομών της χρωματίνης. Τέλος, στις περιοχές των άκρων υπάρχουν οι θέσεις όπου συμβαίνουν οι διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργία της χρωματίνης (Wolffe et al., 2000).

1.4 Δυναμική φύση της χρωματίνης

Η χρωματίνη είναι το εκμαγείο όλων των λειτουργιών που σχετίζονται με το DNA και η ρύθμιση της διαμόρφωσής της σχετίζεται άμεσα με την εκτέλεση πολλών βασικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, η επιδιόρθωση και ο ανασυνδυασμός του DNA. Ωστόσο, η οργάνωση της χρωματίνης σε συμπυκνωμένες δομές αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο στην πρόσβαση των παραγόντων ρύθμισης στο γενετικό υλικό. Το φαινόμενο αυτό αντιμετωπίζεται από την εγγενή δυναμική φύση της χρωματίνης και των νουκλεοσωμάτων και από μια σειρά μηχανισμών που έχουν αναπτύξει τα κύτταρα για να ελέγχουν τη δομή της και την προσβασιμότητα του DNA.

Εγγενής δυναμική φύση των νουκλεοσωμάτων

Η χρωματίνη έχει μια εγγενή δυναμική που εξασφαλίζεται χωρίς την βοήθεια άλλων παραγόντων. Πειράματα FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) έδειξαν ότι οι άκρες του νουκλεοσωματικού DNA ξετυλίγονται και ξανατυλίγονται ταχύτατα (μέσα σε 50-250 ms) γύρω από τον νουκλεοσωματικό «πυρήνα» (Li et al., 2005). Ο χρόνος αυτός είναι αρκετός για να επιτραπεί σε έναν μεταγραφικό παράγοντα να προσδεθεί στο νουκλεοσωματικό DNA και στη συνέχεια να προσελκύσει τη μεταγραφική μηχανή. Έχειδειχθεί, επίσης, ότι τα νουκλεοσώματα έχουν τη δυνατότητα να “αναπνέουν”, να εναλλάσσονται, δηλαδή, ταχύτατα μεταξύ διαμορφώσεων, κάποιες από τις οποίες επιτρέπουν την πρόσβαση της μεταγραφικής μηχανής στο DNA, χωρίς τη βοήθεια κάποιου εξωγενούς παράγοντα (Luger et al., 1998, Li et al., 2004).

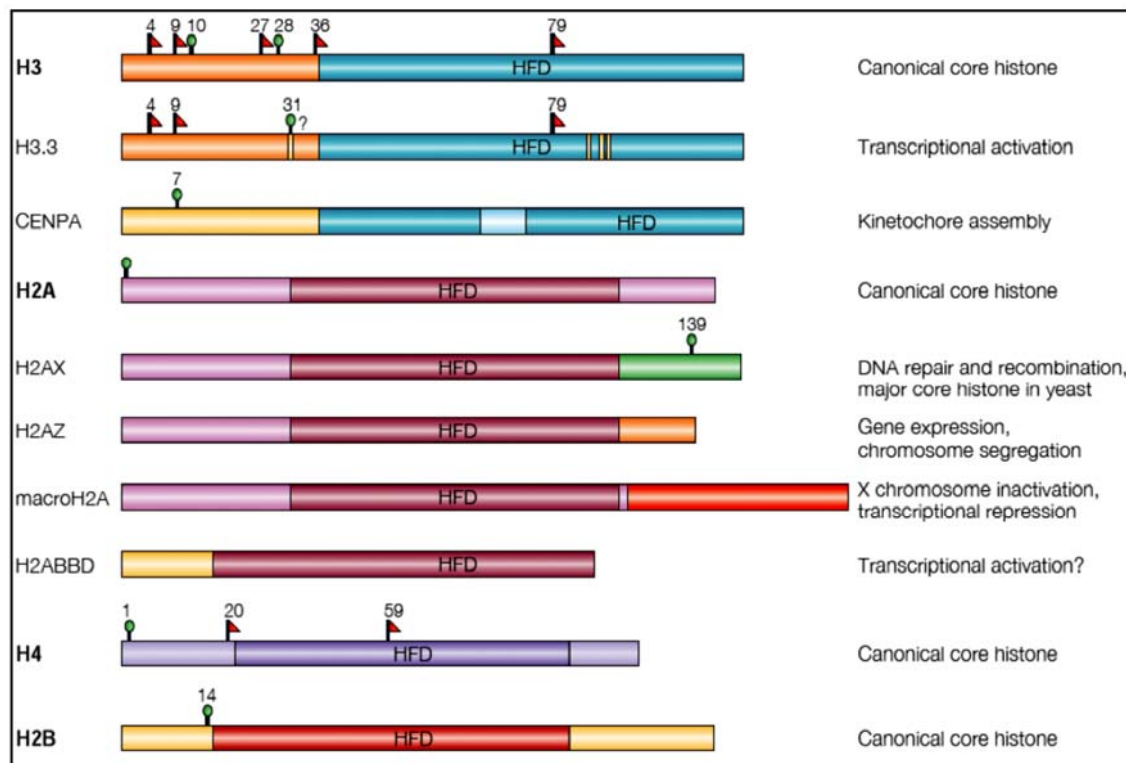
Εναλλαγή ισομορφών των ιστονών (*histone variants*)

Η δυναμική της χρωματίνης εκφράζεται, επίσης, με τη συνεχή αντικατάσταση των ιστονών του νουκλεοσώματος, κυρίως του διμερούς H2A/H2B, από ισομορφές των ιστονών (Chakravarthy et al., 2005). Με εξαίρεση την H4, όλες οι νουκλεοσωμικές ιστόνες διαθέτουν ισομορφές με σημαντική δομική ομολογία. Η έκφραση των «κλασικών» ιστονών ρυθμίζεται αυστηρά, ώστε να είναι συγχρονισμένη με τον διπλασιασμό του DNA. Αντίθετα, οι ισομορφές τους εκφράζονται τόσο κατά την αντιγραφή όσο και σε άλλες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Για κάποιες ισομορφές υπάρχει επίσης ιστοειδική έκφραση. Οι ισομορφές των ιστονών έχουν διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά και, σε κάποιες περιπτώσεις, η εντόπισή τους στις χρωματινικές περιοχές διαφέρει από αυτή των «κλασικών» ιστονών (Εικόνα 1.7) (Old et al., 1984).

Οι ισομορφές της ιστόνης H3 είναι οι H3.1, H3.2, H3.3, H3.4 και CENP-A. Η αντικατάσταση της H3 από την H3.3 έχει ως αποτέλεσμα την «επισήμανση» της περιοχής αυτής ώστε να στρατολογηθούν μεταγραφικοί παράγοντες και να ενισχυθεί η μεταγραφική δραστηριότητα. Η CENP-A αντικαθιστά την H3 στην περιοχή του κεντρομεριδίου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Oegema et al., 2001, Blower et al., 2001).

Εκτός από τη βασική H2A, η οικογένεια των H2A ιστονών περιλαμβάνει τις ισομορφές H2A.X, H2A.Z, MacroH2A και την H2A.Bbd. Η MacroH2A εντοπίζεται στο ανενεργό X χρωμόσωμα (Costanzi et al., 1998) και παίζει ρόλο στη μεταγραφική καταστολή (Lewis et al., 2003). Η H2A-Bbd εντοπίζεται στο ενεργό X χρωμόσωμα και στα αυτοσώματα (Chadwick et al., 2001). Η H2A.Z έχει δειχθεί να συσχετίζεται με λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή καταστολή και ενεργοποίηση, αλλά και την απομόνωση-οριοθέτηση των ετεροχρωματινικών περιοχών (Swaminathan et al., 2005, Meneghini et al., 2003). Σε *in vitro* μελέτες έχει επίσης δειχθεί ότι η H2A.Z ευνοεί τη δημιουργία χρωματινικών ινών (Fan et al., 2002a). Η H2A.X εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, κατανέμεται σε όλο το μήκος των χρωμοσωμάτων και παίζει ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας. Θραύση στους δύο κλώνους του DNA κατά την αντιγραφή ή τον ανασυνδυασμό προκαλεί τη φωσφορυλίωση της H2A.X (γ -H2A.X). Η φωσφορυλίωση αυτή λειτουργεί ως σήμα για τη στρατολόγηση παραγόντων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA (Rogakou et al., 1999), παίζοντας διπλό ρόλο στη επισήμανση του σημείου θράυσης και στην έναρξη της επιδιόρθωσης (Paull et al., 2000, Tsukuda et al., 2005). Επίσης, έχει συσχετιστεί με την

απόπτωση (Rogakou et al., 2000), τη μείωση (Mahadevaiah et al., 2001, Lewis et al., 2003) και την αντιγραφή του DNA (Ward et al., 2003).



Εικόνα 1.7: Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες **H3**, **H2A**, **H4** και **H2B** και οι ισομορφές των **H3** και **H2A**. Από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών υποδεικνύονται μόνο η μεθυλίωση (κόκκινο) και η φωσφορυλίωση (πράσινο). Με κίτρινο υποδεικνύονται τα αμινοξέα ή η περιοχές των **H3.3** και **CENPA** που διαφέρουν από την **H3**. Οι διαφορές της **H2A** από τις ισομορφές της φαίνονται στα καρβοξυτελικά τους άκρα. Στην δεξιά πλευρά του σχήματος υποδεικνύονται οι πιθανές λειτουργίες κάθε ισομορφής νουκλεοσωματικής ιστόνης (Sarma et al., 2005).

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών

Οι ιστόνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (**PTMs**, **Post-Translational Modifications**) όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουιτινυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση και σουμοϋλίωση. Οι παραπάνω τροποποιήσεις ανιχνεύονται κυρίως στην αμινοτελική περιοχή τους, απαντώνται όμως και στην κεντρική περιοχή (van Leeuwen et al., 2002). Τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί από τους παράγοντες που ευθύνονται για την εισαγωγή και την απομάκρυνση των παραπάνω τροποποιήσεων, ενώ έχει δειχθεί ότι συγκεκριμένα δομικά μοτίβα των πρωτεϊνών αναγνωρίζουν ειδικά κάποιες τροποποιήσεις ή συνδυασμούς τροποποιήσεων στην

αμινοτελική περιοχή των ιστονών. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις των ιστονών με άλλες πρωτεΐνες ή ακόμα και με τον εαυτό τους. Με βάση τα έως τώρα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι η θέση των PTMs είναι ένα καθοριστικό στοιχείο για το λειτουργικό ρόλο που διαδραματίζουν. Για παράδειγμα, οι PTMs της εξωτερικής επιφάνειας της κεντρικής περιοχής των ιστονών, προς την πλευρά του διαλύτη (solute accessible face), φαίνεται να επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις των ιστονών με άλλες πρωτεΐνες και τη διαμόρφωση δομών υψηλότερης τάξης, ενώ οι PTMs της πλευρικής επιφάνειας σχετίζονται με DNA-ιστονικές αλληλεπιδράσεις. Κατάλοιπα των περιοχών αυτών εντοπίζονται και στο σημείο εισόδου/εξόδου του DNA και εμπλέκονται στην «αναπνοή» ή διασταλτικότητα των νουκλεοσωμάτων. Τέλος, οι PTMs στον “πυρήνα” του μορίου της ιστόνης σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονικών διεπιφανειών (histone-histone interactions) και επηρεάζουν τη νουκλεοσωματική σταθερότητα (Cosgrove et al., 2004).

Από δομικής άποψης, λοιπόν, οι PTMs, όχι μόνο εμπλέκονται στην ακριβή ρύθμιση αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με τη διαμόρφωση της χρωματίνης, αλλά, για να λάβουν χώρα σε ήδη συγκροτημένα νουκλεοσώματα, προαπαιτούνται δραματικές αλλαγές στη διαμόρφωση του ίδιου του οκταμερούς (Freitas et al., 2004, Cosgrove et al., 2004).

1.5 Μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι ισομορφές των ιστονών και η δυναμική φύση των νουκλεοσωμάτων αποτελούν εγγενή χαρακτηριστικά της χρωματίνης που ρυθμίζουν τη δομή της. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει μια μεγάλη κατηγορία εξωγενών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων και αποτελούν έναν ακόμη τρόπο ρύθμισης της πρόσβασης διαφόρων παραγόντων στη γενετική πληροφορία. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι ATP-εξαρτώμενοι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (ATP-dependent chromatin remodelers) και οι παράγοντες συναρμολόγησης/αποσυναρμολόγησης των νουκλεοσωμάτων, γνωστοί ως συνοδοί ιστονών.

ATP-εξαρτώμενοι παράγοντες διαμόρφωσης της χρωματίνης

Τα μεγάλα μακρομοριακά σύμπλοκα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης χρησιμοποιούν την ενέργεια που εκλύεται από την υδρόλυση του ATP για να

αποσταθεροποιήσουν τους δεσμούς των νουκλεοσωμάτων με το DNA. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των νουκλεοσωμάτων κατά μήκος του DNA, την αποσύνδεση του DNA από τις ιστόνες και την εναλλαγή των νουκλεοσωμάτων. Με τον τρόπο αυτό, διευκολύνεται η πρόσβαση των ρυθμιστικών παραγόντων στην αλληλουχία του DNA και στις ιστόνες, μία διαδικασία απαραίτητη κατά τη διάρκεια όλων των κυτταρικών διεργασιών (Hargreaves et al., 2011).

Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης κατηγοριοποιούνται με βάση την υπομονάδα ATPάσης που περιέχουν, και που ανήκει στα Swi2/Snf2 μέλη της οικογένειας των ATPασών. Με την σειρά τους, οι Swi2/Snf2 ATPάσες κατατάσσονται σε τέσσερις υποοικογένειες: ISWI, SWI/SNF, CHD και INO80 (Εικόνα 1.8) (Hargreaves and Crabtree 2011).

Τα σύμπλοκα **SWI/SNF** εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και αποσιώπηση γονιδίων, ενώ τα σύμπλοκα **ISWI** έχουν, κυρίως, συνδεθεί με την αποσιώπηση γονιδίων (Cairns, 2005, Gangaraju et al., 2007). Η οικογένεια των **CHD** (Chromodomain, Helicase, DNA binding) πρωτεϊνών εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και καταστολή (Tran et al., 2000), στην επιγενετική τροποποίηση του DNA (Wade et al., 1999, Sims et al., 2005) και των ιστονών (Zhang et al., 1998), καθώς και στην επιδιόρθωση του DNA (Schmidt et al., 1999). Τέλος, τα σύμπλοκα **INO80** έχουν συνδεθεί με τη μεταγραφική ενεργοποίηση και την επιδιόρθωση του DNA (Ebbert et al., 1999, Downs et al., 2004, Flaus et al., 2006).

Παράγοντες που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης χωρίς τη δαπάνη ATP

Εκτός από τους ATP-εξαρτώμενους παράγοντες αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες πρωτεϊνών που επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της χρωματίνης, χωρίς τη δαπάνη ATP, όπως α) οι πρωτεΐνες-συνοδοί των ιστονών και β) οι πρωτεΐνες που συνδέονται στο DNA (Πίνακας 1.1). Οι συνοδοί των ιστονών συμμετέχουν στη συναρμολόγηση ή την αποσυναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων, εμποδίζοντας τις μη ειδικές και προωθώντας τις ειδικές αλληλεπιδράσεις των ιστονών με το DNA (Laskey et al., 1978, Laskey et al., 1980). Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες που συνδέονται στο DNA προκαλούν αρχιτεκτονικές αλλαγές στη δομή του διευκολύνοντας ή αποτρέποντας την πρόσβαση παραγόντων.

Συνοδοί των ιστονών	Επιλεκτικότητα δέσμευσης στις ιστόνες	Σχετική βιβλιογραφία
Νουκλεοπλασμίνη	H2A/H2B	Laskey et al., 1977, Frehlick et al., 2007
NAP1	H2A/H2B	Ishimi et al., 1983 Park et al., 2005, Okuwaki et al., 2005, Attia et al., 2011
Νουκλεολίνη	H2A/H2B, H3/H4	Erard et al., 1988, Gaume et al., 2011
Spt6	H3/H4	Bortvin et al., 1996
CAF-1	H3/H4	Smith et al., 1989, Verreault et al., 1996
SET/TAF-1β	H3/H4	Muto et al., 2007, Karetso et al., 2009
Προθυμοσίνη α	H1	Papamarcaki et al., 1994, Karetso et al., 1998, Karetso et al., 2004
Παραθυμοσίνη	H1	Kondili et al., 1996, Martic et al., 2005
Πρωτεΐνες που συνδέονται στο DNA		Σχετική βιβλιογραφία
HMGA		Harrer et al., 2004
HMGB		Bonaldi et al., 2002
HMGN		Rattner et al., 2009
Ίκαρος		Georgopoulos, 2002, Kim et al., 1999, Ng et al., 2007

Πίνακας 1.1: Πρωτεΐνες που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης, χωρίς τη δαπάνη ATP.

Η πρώτη πρωτεΐνη συνοδός των ιστονών που ανακαλύφθηκε είναι η νουκλεοπλασμίνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των νουκλεοπλασμιών/νουκλεοφωσμιών πρωτεϊνών (Nucleoplasmmin/Nucleophosmin, **NPM**) (Laskey et al., 1977, Frehlick et al., 2007). Έκτοτε, έχουν χαρακτηριστεί πολλές άλλες πρωτεΐνες ως συνοδοί των ιστονών, όπως οι N1/N2 (Kleinschmidt et al., 1986), Spt6 (Bortvin et al., 1996), CAF-1 (Smith et al., 1989), νουκλεολίνη (Erard et al., 1988, Gaume et al., 2011), τα μέλη της οικογένειας των NAP1 πρωτεϊνών (Ishimi et al., 1983, Ishimi et al., 1984), η SET/TAF-1β (Muto et al., 2007, Karetso et al., 2009), η προθυμοσίνη α (Papamarcaki et al., 1994, Karetso et al., 1998, Karetso et al., 2004) και η παραθυμοσίνη (Kondili et al., 1996, Martic et al., 2005) Πολλές από αυτές, κατά περίπτωση, συνεργάζονται είτε με ATP-εξαρτώμενους παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είτε με ένζυμα που

καταλύουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών. Κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών είναι η ύπαρξη εκτεταμένων όξινων περιοχών στη δομή τους.

1.6 Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και ο ρόλος τους στην απόπτωση.

Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές σχετικά με τη συμμετοχή πρωτεϊνών που σχετίζονται με την οργάνωση και τη δυναμική δομή της χρωματίνης στη διαδικασία της απόπτωσης.

Η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας box 1 (**High Mobility Group Box 1, HMGB1**) είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύεται στο DNA χωρίς να αναγνωρίζει κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία. Οι αρχιτεκτονικές αλλαγές που προκαλεί στη δομή του DNA θεωρείται ότι διευκολύνουν τη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία συμμετέχουν στη μεταγραφή, την αντιγραφή και τον ανασυνδυασμό του DNA. Επίσης, έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων *in vitro* (Bonaldi et al., 2002). Εκτός, όμως, από το ρόλο της στην αλλαγή της δομής της χρωματίνης, η πρωτεΐνη αυτή έχει εμπλακεί στη μεταγωγή σήματος της φλεγμονής και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη νέκρωση η HMGB1 διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και στο εξωτερικό του κυττάρου (Scaffidi et al., 2002), ενώ επίσης εκκρίνεται από μακροφάγα κύτταρα (Bonaldi et al., 2003). Αντίθετα, κατά την απόπτωση προσδένεται ισχυρά στη συμπυκνωμένη χρωματίνη, εμποδίζοντας πιθανώς τη μεταγωγή σημάτων νέκρωσης στα γειτονικά κύτταρα (Scaffidi et al., 2002).

Μία ακόμη πρωτεΐνη που συνδέεται με τη χρωματίνη και διαδραματίζει ρόλο στην απόπτωση είναι η νουκλεολίνη. Η νουκλεολίνη είναι μία όξινη πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη-συνοδός των ιστονών (Erard et al., 1988, Gaume et al., 2011) και έχει εμπλακεί σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή, η αντιγραφή, ο ανασυνδυασμός του DNA, αλλά και η απόπτωση. Μείωση των επιπέδων έκφρασης της νουκλεολίνης σε HeLa κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού θανάτου (Ugrinova et al., 2007). Επιπλέον, κατά την επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης και του εντοπισμού της νουκλεολίνης. Βρέθηκε ότι στα αρχικά στάδια της απόπτωσης μετακινείται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη, αλλά και προς το εξωτερικό του κυττάρου (Mi et al., 2003).

1.6.1 **H SET/TAF-1β**

Η πρωτεΐνη SET/TAF-1β (Template Activating Factor-1β) είναι ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας των NAP συνοδών ιστονών. Αρχικά, ταυτοποιήθηκε ως προϊόν σύντηξης του γονιδίου *set* (SE translocation) και του γονιδίου *can* σε περιπτώσεις οξείας αδιαφοροποίητης λευχαιμίας (von Lindern et al., 1992). Η πρωτεΐνη αυτή είναι εξελικτικά συντηρημένη στον άνθρωπο, στο βάτραχο, στους μύες και στους επιμύες. Πρωτεΐνες μεγάλης ομολογίας με την SET/TAF-1β έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς, όπως στον *C.elegans* (Wen et al., 2000) και *S.cerevisiae* (Selth et al., 2007).

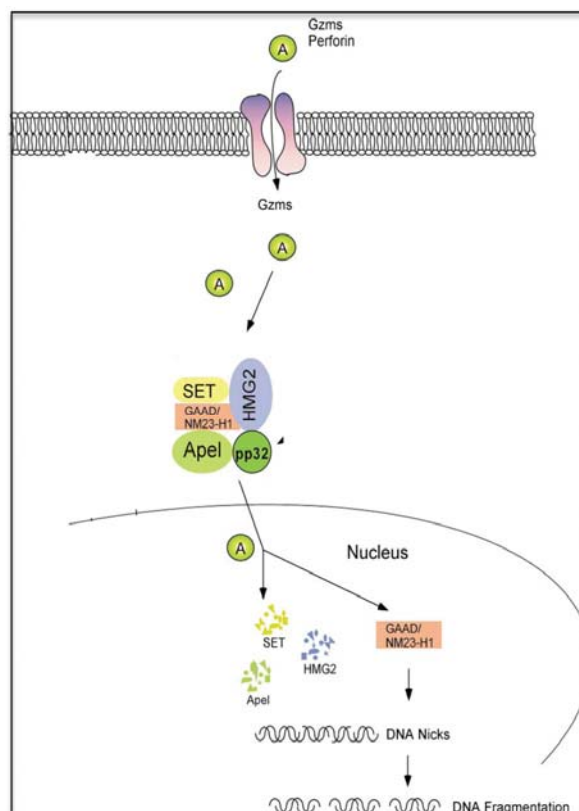
Η αλληλεπίδραση της SET/TAF-1β με ιστόνες έχει επιβεβαιωθεί *in vivo* (Seo et al., 2001) και *in vitro* (Okuwaki et al., 1998, Seo et al., 2002). Έχει δειχθεί ότι προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στις ιστόνες H3 και H4, ωστόσο μπορεί να αλληλεπιδράσει και με τις H2A και H2B. Η SET/TAF-1β έχει, επίσης, απομονωθεί ως υπομονάδα του συμπλόκου INHAT (**I**nhibitor of **H**istone **A**cetyltransferases), ενός μακρομοριακού συμπλόκου πολλών πρωτεϊνών, το οποίο αναστέλει τη δραστηριότητα των ακετυλοτρανσφερασών p300/CBP και PCAF των ιστονών (Seo et al., 2001). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η SET/TAF-1β προσδένεται ειδικά σε μη ακετυλιωμένες ή υπο-ακετυλιωμένες και όχι σε υπερ-ακετυλιωμένες ιστόνες (Kutney et al., 2004, Schneider et al., 2004). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι οι φορτισμένες περιοχές των «ουρών» των ιστονών παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της SET/TAF-1β στη χρωματίνη και επομένως στο λειτουργικό της ρόλο στην τροποποίηση της δομής της χρωματίνης.

Εκτός από τις ιστόνες, η SET/TAF-1β έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη προθυμοσίνη *α* *in vivo* και η αλληλεπίδραση αυτή προωθείται ή/και σταθεροποιείται από την ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών CBP (Karetsou et al., 2004). Έχει προταθεί ότι η στρατολόγηση και η συναρμολόγηση του συμπλόκου της SET/TAF-1β με την προθυμοσίνη *α* σε εκκινητές γονιδίων ρυθμίζεται από την CBP, με σκοπό την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στις περιοχές αυτές και την έναρξη της μεταγραφής (Karetsou et al., 2004).

Η SET/TAF-1β έχει χαρακτηριστεί ως παράγοντας-κλειδί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs, Cytotoxic T Lymphocytes) (Fan et al., 2003a). Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα επάγουν την απόπτωση απελευθερώνοντας κυτταρολυτικά κυστίδια που μεταφέρουν μία πρωτεΐνη που δημιουργεί πόρους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, την περφορίνη

(perforin), μαζί με τις πρωτεάσες σερινών Granzyme A (GzmA) και Granzyme B (GzmB) (Εικόνα 1.10).

Η πρωτεΐνη GzmA έχει ως στόχο ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων, το οποίο είναι γνωστό ως σύμπλοκο SET και αποτελείται από τις πρωτεΐνες pp32, SET/TAF-1β, HMG-2, Apel και την δεοξυριβονουκλεάση NM23-H1 (Beresford et al., 2001, Fan et al., 2002b, Fan et al., 2003b, Fan et al., 2003a). Η SET/TAF-1β λειτουργεί ως αναστολέας της δεοξυριβονουκλεάσης NM23-H1 συγκρατώντας την στο σύμπλοκο. Στην περίπτωση όμως της επαγωγής του κυτταρικού θανάτου από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, η πρωτεάση GzmA που εισέρχεται στο κύτταρο-στόχο προκαλεί τη σχάση της SET/TAF-1β. Με αυτό τον τρόπο, η δεοξυριβονουκλεάση απελευθερώνεται από το σύμπλοκο, μετατοπίζεται στον πυρήνα και προκαλεί θραύσεις στο DNA (Fan et al., 2003a).



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της απόπτωσης που επάγεται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Η πρωτεάση granzyme A απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου στόχου και προκαλεί τη σχάση της πρωτεΐνης SET/TAF-1β και την αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου SET. Η δεοξυριβονουκλεάση NM23-H1 μετατοπίζεται στη συνέχεια στον πυρήνα όπου προκαλεί την θραυσματοποίηση του DNA (Chakravarti et al., 2003)

1.6.2 Η προθυμοσίνη α (ProT α)

Η προθυμοσίνη α (ProT α) είναι μία μικρή (109-113 aa), πολύ όξινη πυρηνική πρωτεΐνη (pI 3.55), συντηρημένη εξελικτικά, της οποίας η έκφραση έχει ανιχνευθεί σε κύτταρα ανθρώπου (Pan et al., 1986, Eschenfeldt et al., 1986, Gómez-Márquez et al., 1989), βοός (Panneerselvam et al., 1988), επιμυός (Frangou-Lazaridis et al., 1988, Haritos et al., 1984a), μυός (Haritos et al., 1984b), βατράχου (*Rana esculenta*) (Aniello et al., 2002) και Zebrafish (*Danio rerio*) (Donizetti et al., 2008). Αρχικά, είχε απομονωθεί από το θύμο επιμυός και είχε χαρακτηριστεί ως το πρόδρομο μόριο της ορμόνης θυμοσίνη α, καθώς ολόκληρη η αλληλουχία του πεπτιδίου αυτού εμπεριέχεται στο αμινοτελικό άκρο της προθυμοσίνης α (Haritos et al., 1984a).

Ο βιολογικός ρόλος της προθυμοσίνης α δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί. Ωστόσο, οι μέχρι τώρα μελέτες υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει δράση τόσο ενδοκυτταρική όσο και εξωκυτταρική. Η ενδοκυτταρική της δράση έχει συσχετιστεί με την αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, ενώ η εξωκυτταρική με την ανοσολογική απόκριση.

Ο ρόλος τη προθυμοσίνης α στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης

Πολλές πρωτεΐνες που περιέχουν όξινες περιοχές στην αμινοξική τους αλληλουχία και εντοπίζονται στον πυρήνα έχουν εμπλακεί στη συναρμολόγηση/αποσυναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων (Stein et al., 1979, Earnshaw, 1987). Οι ανιονικές περιοχές των πυρηνικών αυτών πρωτεϊνών εμπλέκονται στην αποσυμπύκνωση της ίνας των 30 nm, πιθανώς μέσω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασής τους με τις θετικά φορτισμένες ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος και τη συνδετική ιστόνη H1. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν μέχρι σήμερα καταγραφεί αφορούν την πρωτεΐνη νουκλεοπλασμίνη (Laskey et al., 1978, Frehlick et al., 2007) και την πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας-1 (**High Mobility Group-1, HMG-1**) (Bonne-Andrea et al., 1984, Stros, 2007).

Με αφορμή το γεγονός ότι η προθυμοσίνη α περιέχει στη δομή της μία πολύ όξινη περιοχή και ότι η περιοχή αυτή παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τις όξινες περιοχές της νουκλεοπλασμίνης και της HMG-1, διερευνήθηκε ο ρόλος της στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Οι πληροφορίες που είναι διαθέσιμες σήμερα υποδεικνύουν ότι η προθυμοσίνη α εμπλέκεται στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη συνδετική ιστόνη H1 (Papamarcaki et al., 1994). Πιο

συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η προθυμοσίνη α ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη (Karetsou et al., 1998) και ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη συνοδό των ιστονών SET/TAF-1 β (Karetsou et al., 2004). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αυξημένη προσβασιμότητα της νουκλεάσης Micrococcal στη χρωματίνη κυττάρων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη προθυμοσίνη α , το οποίο σημαίνει ότι η χρωματίνη, παρουσία της προθυμοσίνης α , χαρακτηρίζεται από μια δομή που είναι πιο «ανοιχτή» και προσβάσιμη σε κυτταρικούς παράγοντες (Gomez-Marquez et al., 1998, Karetsou et al., 1998). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως επώαση ανθρώπινων μεταφασικών χρωμοσωμάτων με την προθυμοσίνη α επάγει την αποσυμπύκνωσή τους, ενώ προ-επώαση της προθυμοσίνης α με την H1 αντιστρέφει το φαινόμενο αυτό (Boán et al., 2001).

Υπάρχουν πολλά ακόμη πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο της προθυμοσίνης α στην αναδιοργάνωση της χρωματινικής δομής. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της μεταγραφής που επάγεται από την προθυμοσίνη α (Subramanian et al., 2002, Karetsou et al., 2002) θα μπορούσε να εξηγείται από το γεγονός ότι η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης διευκολύνει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II στο DNA.

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες μέχρι σήμερα. Η μεταγραφή του γονιδίου της προθυμοσίνης α έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη *c-myc*, *in vitro* και *in vivo* (Eilers et al., 1991, Gaubatz et al., 1994), όπως επίσης και από την πρωτεΐνη E2F-1 (Vareli et al., 1996). Οι *c-myc* και E2F-1 είναι ευρέως γνωστό ότι ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, η έκφραση της προθυμοσίνης α επάγεται στο τέλος των S και G2/M φάσεων του κυτταρικού κύκλου, σε συγχρονισμό με την έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνης B (cyclin B) (Vareli et al., 2000), ενώ μείωση της έκφρασής της οδηγεί στη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης (Sburlati et al., 1991). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό και καθυστερεί τη διαφοροποίηση των HL-60 κυττάρων (Rodriguez et al., 1998).

Με αφορμή το ρόλο της προθυμοσίνης α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα τελευταία χρόνια έχει διερευνηθεί και ο ρόλος της στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Στην πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν

ολιγουνουκλεοτίδια που ανέστειλαν την έκφραση της προθυμοσίνης α σε κύτταρα HL-60, με αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των κυττάρων αυτών στην απόπτωση (Rodríguez et al., 1999). Μια σειρά από πειραματικά δεδομένα υποστήριξαν, στη συνέχεια, την εμπλοκή της προθυμοσίνης α στην απόπτωση. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

• Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στο μονοπάτι των κασπασών.

Η προθυμοσίνη α έχει βρεθεί ότι αναστέλει την ενεργοποίηση της προκάσπασης-9 και το σχηματισμό του αποπτωσώματος (Jiang et al., 2003). Σε αυτό το μοντέλο δράσης προτείνεται ότι η αναστολή του αποπτωσώματος πραγματοποιείται μέσω της δέσμευσης του κυττοχρώματος c από την προθυμοσίνη α . Η αλληλεπίδραση αυτή έχει επιβεβαιωθεί έμμεσα *in vitro* (Markova et al., 2003), Είναι, επίσης, γνωστό ότι η προθυμοσίνη α αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεάσης κασπάση-3 και ότι η περιορισμένη πρωτεόλυσή της από την πρωτεάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπισή της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Enkemann et al., 2000, Evstafieva et al., 2000, Evstafieva et al., 2003).

• Ο ρόλος της προθυμοσίνης στο αποπτωτικό μονοπάτι NRF2.

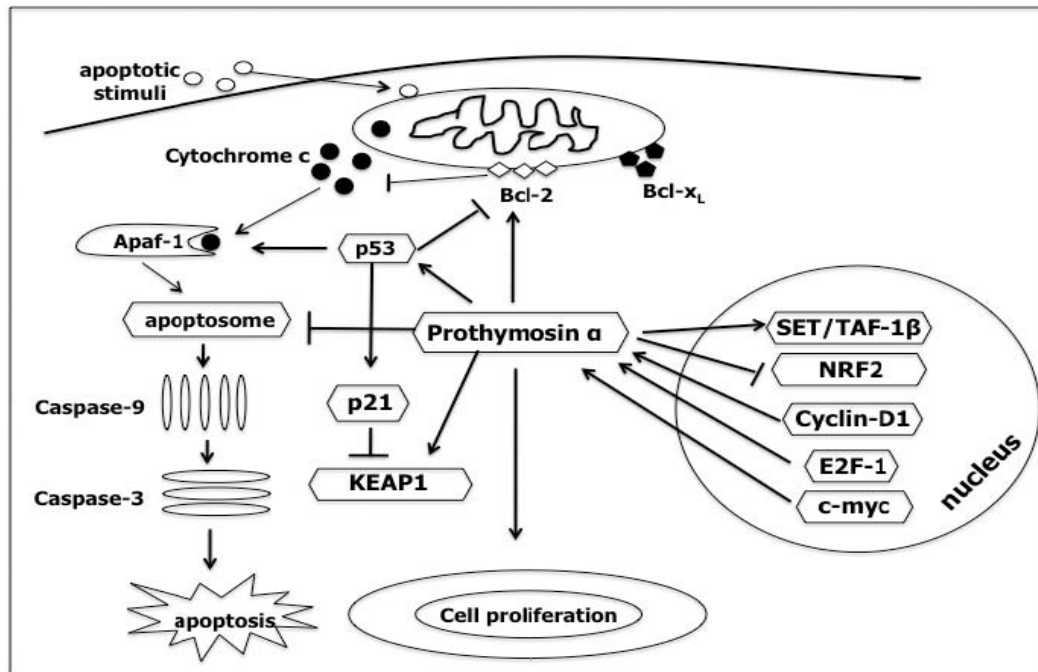
Η πρωτεΐνη NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής περισσότερων από 100 γονιδίων, κυρίως κυτταροπροστατευτικών, τα οποία είναι γνωστά ως «ομάδα NRF2» (Kobayashi et al., 2005, Zhang, 2006, Kensler et al., 2007, Hayes et al., 2009). Σε φυσιολογικές συνθήκες η NRF2 συνεχώς ουβικιτινιλιώνεται από το σύμπλοκο KEAP1 (CUL3/RBX1-dependent E3 ubiquitin ligase complex) και αποδομείται από τα πρωτεασώματα. Το σύμπλοκο KEAP1 είναι ο κύριος ρυθμιστής του μονοπατιού NRF2/KEAP, καθώς καθοδηγεί την αποδόμηση της NRF2 (Itoh et al., 1999, Dhakshinamoorthy et al., 2001, Kobayashi et al., 2004). Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες τα κατάλοιπα κυστεΐνης του παράγοντα KEAP1 οξειδώνονται και η τροποποίηση αυτή αλλάζει τη διαμόρφωση του συμπλόκου, οδηγώντας στην απελευθέρωση της NRF2 (McMahon et al., 2006, Tong et al., 2006).

Η δέσμευση διαφόρων προ-αποπτωτικών ή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη KEAP1 ή άλλους παράγοντες του συμπλόκου KEAP1 ρυθμίζει την αποδόμηση

και μετατόπιση στον πυρήνα της NRF2. Με τον τρόπο αυτό έμμεσα καθορίζεται η απόκριση του NRF2 μονοπατιού σηματοδότησης.

Μία ακόμη πρωτεΐνη με πολύ σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του NRF2/KEAP1 μονοπατιού με την απόπτωση είναι η προθυμοσίνη α . Έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Keap1 στο κυτταρόπλασμα και επάγει τη μετατόπιση του συμπλόκου στον πυρήνα. Ακολουθεί απελευθέρωση της προθυμοσίνης α από το σύμπλοκο, στρατολόγηση του παράγοντα NRF2 και αποδόμηση του τελευταίου (Niture et al., 2009). Ταυτόχρονα, η προθυμοσίνη α είναι γνωστό ότι προκαλεί την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p53 (Kobayashi et al., 2006). Έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης p21 (Stepkowski et al., 2011). Η p21 είναι γνωστό ότι ανταγωνίζεται με την KEAP1 για τη δέσμευση στη NRF2 και επάγει τη σταθεροποίηση της τελευταίας. (Chen et al., 2009). Από τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι η απόκριση του NRF2 μονοπατιού επηρεάζεται άμεσα από την προθυμοσίνη α . Όταν ενεργοποιείται ο p53 μηχανισμός, η προθυμοσίνη α ενισχύει την αντι-αποπτωτική λειτουργία του, αυξάνοντας τη μεταγραφή της p21, η οποία στη συνέχεια εμποδίζει την αποικοδόμηση της NRF2. Ωστόσο, η προθυμοσίνη α , όταν εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, διαμεσολαβεί τη μετατόπιση του συμπλόκου KEAP1 στον πυρήνα και, με τον τρόπο αυτό, ρυθμίζει την αποδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 (Niture et al., 2009). Συμπερασματικά, προτείνεται ότι η αλλαγή του εντοπισμού της προθυμοσίνης α από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ή και αντίστροφα επηρεάζει το αποτέλεσμα της NRF2 σηματοδότησης (Stepkowski et al., 2011).

Από τα παραπάνω δεδομένα, καθίσταται σαφές ότι η προθυμοσίνη α είναι μία πρωτεΐνη-κλειδί για την επιβίωση των κυττάρων. Στην Εικόνα 1.11 παρουσιάζονται μερικοί από τους προτεινόμενους μηχανισμούς δράσης της πρωτεΐνης αυτής κατά την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών δράσης της προθυμοσίνης α στην απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ο ρόλος της προθυμοσίνης στην ανοσολογική απόκριση

Υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα που συνδέουν την προθυμοσίνη α με την ανοσολογική απόκριση. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η προθυμοσίνη α επάγει τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των T κυττάρων μετά από έκθεσή τους σε αντιγόνα. Επίσης, ρυθμίζει την έκκριση της ιντερλευκίνης -2 και της ιντερφερόνης- γ από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα και ενισχύει την έκφραση του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (Baxevanis et al., 1990a, Garbin et al., 1997). Επιπλέον, η προθυμοσίνη α ρυθμίζει θετικά την έκφραση των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) στα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-Presenting Cells, APCs) (Baxevanis et al., 1992). Ακόμη, ενισχύει την κυτταροτοξική δραστηριότητα των T κυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killer, NK) ενάντια σε καρκινικά κύτταρα, επάγοντας την παραγωγή της πρωτεΐνης περφορίνη (Baxevanis et al., 1990b, Garbin et al., 1997, Voutsas et al., 2000, Skopeliti et al., 2006).

Εκτός, όμως, από τις παραπάνω *in vitro* μελέτες, η δραστηριότητα της πρωτεΐνης αυτής έχει μελετηθεί και σε *in vivo* συστήματα. Έχει βρεθεί ότι η προθυμοσίνη α έχει αντικαρκινική δραστηριότητα *in vivo* όταν χορηγείται σε ποντίκια, στα οποία έχει προηγηθεί

ένεση με λευχαιμικά κύτταρα της ίδιας ορομικτικής σειράς (γενετικά όμοιου στελέχους). Επιμηκύνει το χρόνο ζωής αυτών των καρκινικών μοντέλων προκαλώντας αύξηση της δραστηριότητας των T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και των κυτάρων φυσικών φονέων, αλλά και αυξάνοντας την έκκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (Tumor Necrosis Factor α , TNF α) και της ιντερλευκίνης-2 (IL-2) (Papanastasiou et al., 1992, Baxevanis et al., 1995). Επιπλέον, τρεις πολύ πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η προθυμοσίνη α εκκρίνεται από τα CD8+ T λεμφοκύτταρα ανθρώπου και ποντικίου, τα οποία έχουν μολυνθεί με τον ανθρώπινο ιό της ανοσοεπάρκειας 1 (Human Immunodeficiency Virus-1, HIV-1). Στη συνέχεια, μέσω του υποδοχέα TLR4 των μακροφάγων επάγει την έκφραση της ιντερφερόνης- α (IFN- α) και του TNF α στα κύτταρα αυτά, με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων (Mosoian et al., 2006, Mosoian et al., 2007, Mosoian et al., 2010).

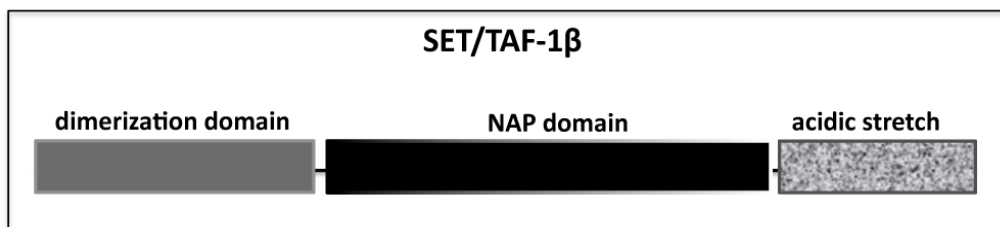
Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα, η προθυμοσίνη α παρουσιάζει σημαντική εξωκυτταρική δράση κατά την έμφυτη ανοσολογική απόκριση (μακροφάγα), αλλά και κατά την προσαρμοζόμενη (T λεμφοκύτταρα). Ωστόσο, δεν έχει εξακριβωθεί ο τρόπος με τον οποίο η πρωτεΐνη εκκρίνεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον, υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα όσον αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων που εμπλέκεται στην ανοσολογική της δράση. Έχει προταθεί ότι το τμήμα της προθυμοσίνης α που είναι υπεύθυνο για την αύξηση της δραστηριότητας των T κυτταροτοξικών κυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονιάδων, αλλά και την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Skopeliti et al., 2009). Ωστόσο, σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, η δραστηριότητά της έναντι του HIV-1, παραμένει υψηλή ακόμη και μετά την απαλοιφή του καρβοξυτελικού της άκρου (Mosoian et al., 2007).

1.7 Δομικά χαρακτηριστικά των SET/TAF-1 β και προθυμοσίνη α

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η προθυμοσίνη α και η SET/TAF-1 β συμμετέχουν στη ρύθμιση της αναδιοργάνωσης της δομής της χρωματίνης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, η προθυμοσίνη α συμμετέχει, επίσης, στην ανοσολογική απόκριση. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί, εν μέρει, από τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αυτών.

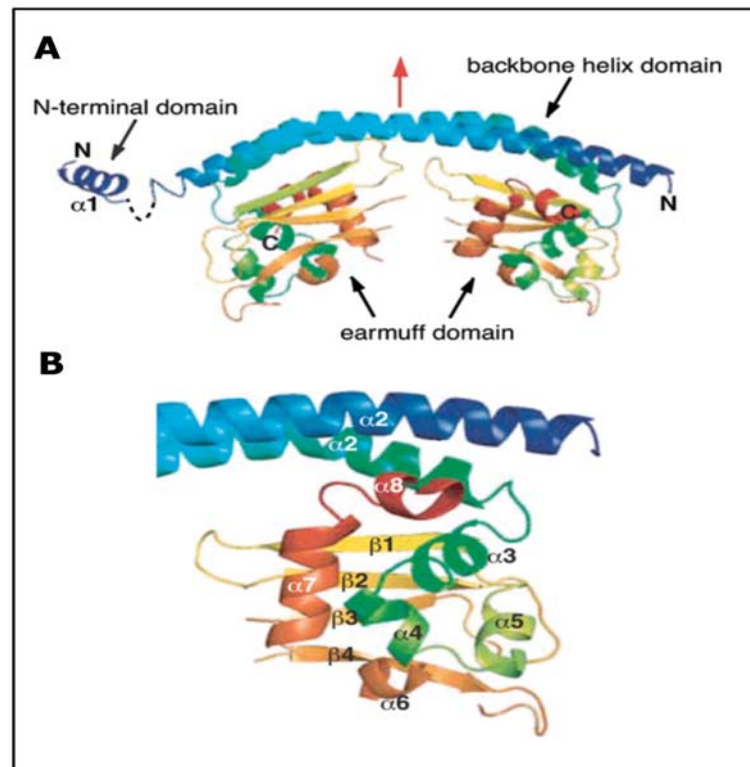
Η αμινοξική αλληλουχία της SET/TAF-1 β υποδεικνύει την ύπαρξη τριών δομικών περιοχών (Εικόνα 1.12). Αρχικά, ένα μοτίβο στην αμινοτελική της περιοχή (1-76 aa), το

οποίο σχηματίζει μια coiled coil δομή και θεωρείται υπεύθυνο για το διμερισμό της πρωτεΐνης (Miyaji-Yamaguchi et al., 1999, Muto et al., 2007). Η κεντρική περιοχή της εμπεριέχει το NAP δομικό τομέα (80-225aa), ο οποίος είναι εξελικτικά συντηρημένος σε όλα τα μέλη της οικογένειας NAP1 και θεωρείται υπεύθυνος για τη δέσμευση με τις ιστόνες (Park et al., 2006a, Park et al., 2006b). Τέλος, στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχει μία πολύ όξινη περιοχή (226-277aa), η οποία αποτελείται από 42 κατάλοιπα γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέους ανάμεσα στα οποία υπάρχουν και κάποια κατάλοιπα γλυκίνης. Η καρβοξυτελική αυτή περιοχή επιδεικνύει μία εγγενή δομική ποικιλομορφία, η οποία προσδίδει πλαστικότητα στη διαμόρφωση της δομής της, όπως προκύπτει από μελέτες στην NAP1 πρωτεΐνη της ζύμης (McBryant et al., 2003, Park et al., 2006a).



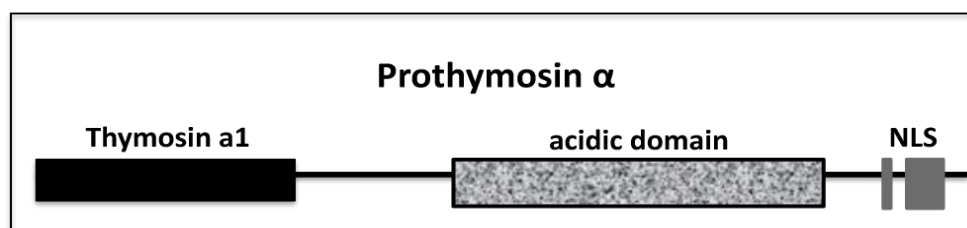
Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών της SET/TAF-1β

Η μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής της πρωτεΐνης αυτής (1-225aa) αποκάλυψε πως σχηματίζει ένα διμερές, το οποίο έχει το σχήμα ενός ζεύγους ακουστικών (headphone shape) (Muto et al). Το μονομερές αποτελείται από μια ασταθή α-έλικα υψηλής κινητικότητας, μία μακριά backbone έλικα και μία α+β δομική περιοχή που μοιάζει με ακουστικό (earmuff domain). Η δομή αυτή (earmuff domain) αποτελείται από έξι α έλικες τοποθετημένες πάνω σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων κλώνων (Muto et al., 2007) (Εικόνα 1.13).



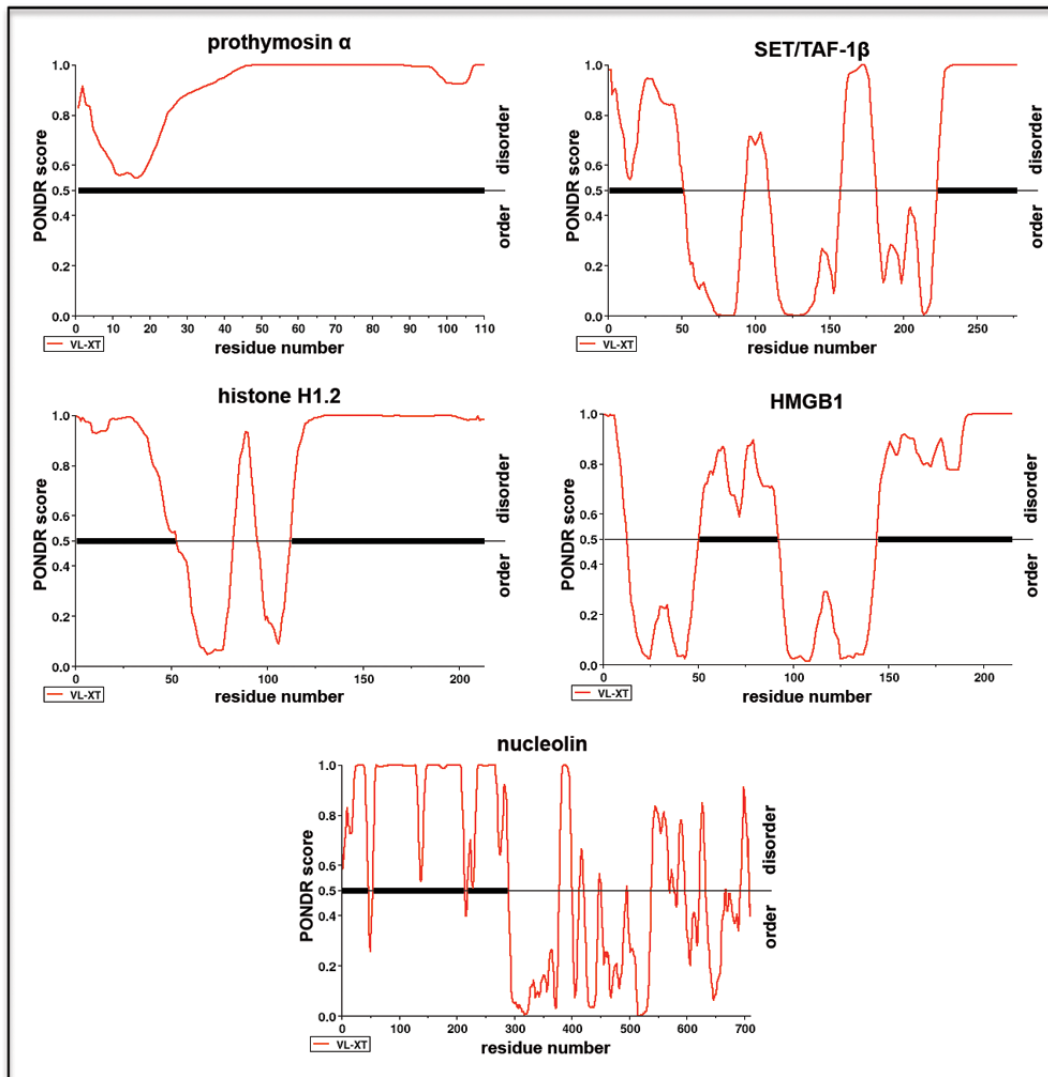
Εικόνα 1.13. Η κρυσταλλογραφική δομή της SET/TAF-1β. (Α) Η δομή της διμερούς μορφής της SET/TAF-1β. Με το κόκκινο βέλος υποδεικνύεται ο «άξονας συμμετρίας» (Β) Η δομή του earmuff τομέα. Εικόνα από (Muto et al. 2007)

Η δομή της προθυμοσίνης α έχει, επίσης, ασυνήθιστα χαρακτηριστικά (Hannappel et al., 2003): (α) δεν περιέχει υδροφοβικές περιοχές, (β) δεν περιέχει αρωματικά αμινοξέα, (γ) ~ 50% των αμινοξέων της είναι όξινα κατάλοιπα ασπαρτικού και γλουταμινικού, τα οποία βρίσκονται συγκεντρωμένα στην κεντρική περιοχή του μορίου (Εικόνα 1.14) και (δ) δεν εμφανίζει κάποια τριτοταγή δομή. Η εγγενώς εύκαμπτη διαμόρφωσή της στο χώρο ευνοεί την αλληλεπίδρασή της με πολλούς κυτταρικούς παράγοντες (Watts et al., 1990, Gast et al., 1995).



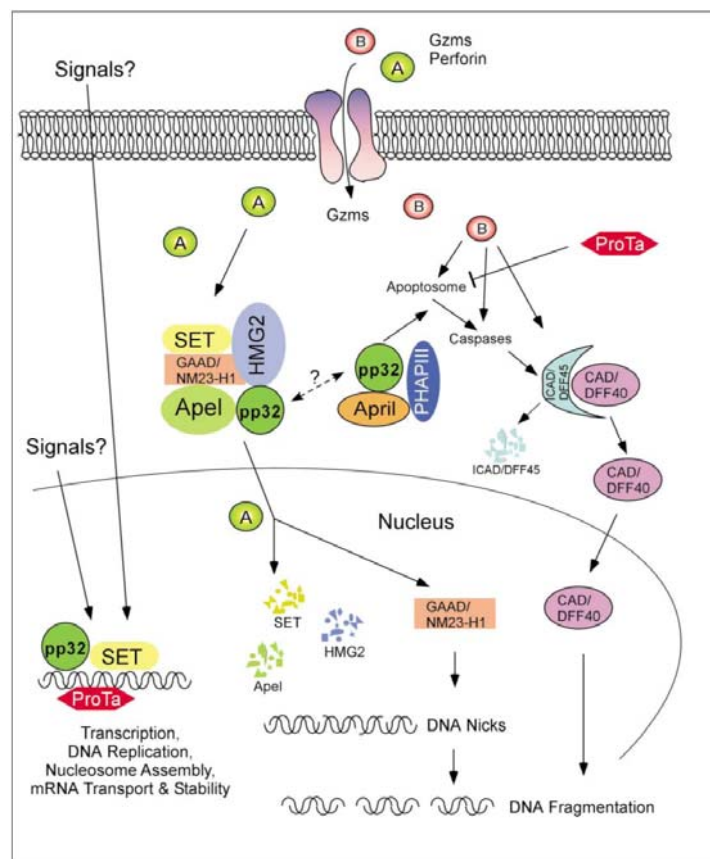
Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της προθυμοσίνης α

Μία προσεκτική παρατήρηση της αμινοξικής αλληλουχίας της προθυμοσίνης α και της SET/TAF-1 β , αλλά και άλλων πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε διαφορετικούς κυτταρικούς μηχανισμούς, όπως η νουκλεολίνη, η HMGB1 και η συνδετική ιστόνη H1, δείχνει ότι περιέχουν περιοχές οι οποίες δεν σχηματίζουν μία συγκεκριμένη δομή στο χώρο (Εικόνα 1.15). Τα τελευταία χρόνια, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν στρέψει την προσοχή τους στη μελέτη των εγγενώς εύκαμπτων πρωτεϊνών. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πρωτεΐνες οι οποίες δεν εμφανίζουν κάποια σαφώς καθορισμένη τρισδιάστατη δομή στη φυσική τους κατάσταση (Dunker et al., 1998, Iakoucheva et al., 2003), αλλά σχηματίζουν κάποια τεταρτοταγή δομή μετά την αλληλεπίδρασή τους με κάποια άλλη πρωτεΐνη (Wright et al., 1999, Uversky, 2002). Αποτελούν το 36-63% των πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων και το 33% των βακτηριακών (Romero et al., 2001). Οι εγγενώς εύκαμπτες πρωτεΐνες μπορεί να είναι είτε πλήρως είτε μερικώς μη διαμορφωμένες, καθώς μπορεί να περιέχουν μόνο συγκεκριμένες περιοχές χωρίς τρισδιάστατη δομή (Radivojac et al., 2004). Η ιδιότητά τους αυτή θεωρείται ότι προσφέρει μία δυναμική πλαστικότητα, η οποία τους επιτρέπει να αναγνωρίζουν πολλά διαφορετικά μόρια με υψηλή εξειδίκευση και χαμηλή συγγένεια (Dunker et al., 1998, Radivojac et al., 2004). Οι λειτουργίες πολλών εγγενώς εύκαμπτων μορίων έχουν ήδη μελετηθεί και περιλαμβάνουν τη δέσμευση στο DNA, τη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης και την αποδόμηση πρωτεϊνών (Dyson et al., 2005, Liu et al., 2006), αλλά, όπως περιγράφηκε και παραπάνω, και τη συμμετοχή στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και την απόπτωση.



Εικόνα 1.15: Γραφική απεικόνιση της διαμόρφωσης των δομών της προθυμοσίνης α, της SET/TAF-1β, της ιστόνης H1.2, της HMGB1 και της νουκλεολίνης, όπως προβλέπεται από την αμινοξική τους αλληλουχία. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PONDNR VL-XT.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.16 για την προθυμοσίνη α και την SET/TAF-1β, η πλαστικότητα στη δομή, λόγω της πλήρους ή της μερικής ευελιξίας τους στο χώρο, αλλά και η εναλλαγή του εντοπισμού τους στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα δίνει τη δυνατότητα σε αυτές τις πρωτεΐνες να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, αλλά και στη ρύθμιση της απόπτωσης.



Εικόνα 1.16: Οι λειτουργίες των SET/TAF-1β και προθυμοσίνη α στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η SET/TAF-1β στο κυτταρόπλασμα λειτουργεί ως υπομονάδα του συμπλόκου SET κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των T κυτταροτοξικών κυτταρών, ενώ στον πυρήνα συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η μεταγραφή, η αντιγραφή του DNA και η συναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων. Αντίστοιχα, η προθυμοσίνη α στο κυτταρόπλασμα εμποδίζει τη συναρμολόγηση του αποπτωσώματος, ενώ στον πυρήνα σχηματίζει σύμπλοκο με την SET/TAF-1β και ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης (Chakravarti et al., 2003).

Συνολικά, η αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, καθώς και η τροποποίηση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή είναι γεγονότα απαραίτητα για τη ρύθμιση και την εκτέλεση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Αντίστοιχα, ο μηχανισμός της απόπτωσης προκαλεί ο ίδιος την αλλαγή της δομής της χρωματίνης, καθώς και την απομάκρυνση ή στρατολόγηση χρωματινικών πρωτεϊνών. Επομένως, οι δύο αυτοί πολύ σημαντικοί κυτταρικοί μηχανισμοί είναι στενά συνδεδεμένοι και η αλληλεπίδρασή τους είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την ομοιόσταση των κυττάρων.

1.8 Διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων

Η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων είναι μία σταδιακή διαδικασία, κατά την οποία απαιτείται η ενεργοποίηση, αλλά και η αναστολή προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης, έτσι ώστε τα κύτταρα που προκύπτουν να έχουν τη δική τους λειτουργική ταυτότητα. Η συνεχής αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης ρυθμίζει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο εκμαγείο του DNA, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό καθοριστικά στην έκβαση της ωρίμανσης των βλαστικών κυττάρων (Ho et al., 2010). Ένας ακόμη μηχανισμός που ρυθμίζει τη μετάβαση των διαφοροποιούμενων βλαστικών κυττάρων από ένα προγονικό στάδιο στο επόμενο, είναι ο μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Zhang et al., 2005). Με το μηχανισμό αυτό ελέγχεται και εξασφαλίζεται η λειτουργικότητα των κυττάρων που προκύπτουν.

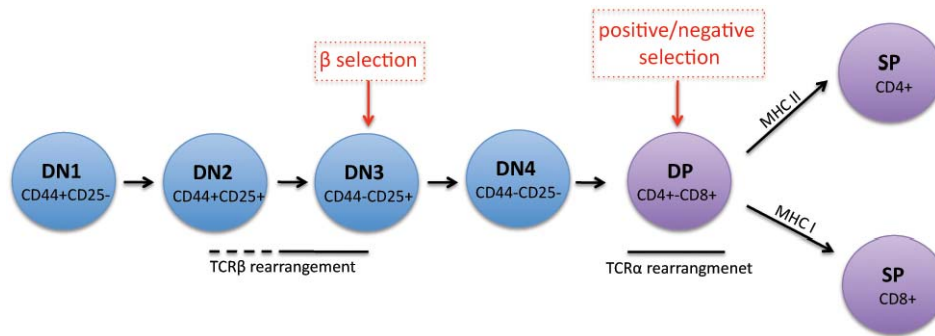
Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την αλληλεπίδραση των μηχανισμών αυτών και για το σκοπό αυτό επιλέξαμε το σύστημα διαφοροποίησης των Τ λεμφοκυττάρων, το οποίο είναι και το καλύτερα μελετημένο. Ακολουθεί μία συνοπτική παρουσίαση των σημαντικότερων σταδίων της ωρίμανσης των Τ λεμφοκυττάρων.

Η ωρίμανση των πρώιμων προγονικών Τ κυττάρων σε Τ λεμφοκύτταρα πραγματοποιείται στο θύμο αδένα. Ο θύμος αδένας στα θηλαστικά είναι ένα δίλοβο όργανο που εντοπίζεται στο θώρακα. Κάθε λοβός διαιρείται σε λοβία που διαχωρίζονται από συνδετικό ιστό. Μέσα σε κάθε λοβίο τα κύτταρα (θυμοκύτταρα) διατάσσονται σε έναν εξωτερικό φλοιό και έναν εσωτερικό μυελό. Ο πλούσιος σε κύτταρα εξωτερικός φλοιός περιέχει την πλειονότητα των σχετικά ανώριμων θυμοκυττάρων που πολλαπλασιάζονται, ενώ ο μυελός περιέχει πιο ώριμα κύτταρα, γεγονός που συνεπάγεται την ύπαρξη διαβάθμισης της διαφοροποίησης από το φλοιό προς το μυελό. Διάχυτο μέσα στα λοβία υπάρχει ένα δίκτυο επιθηλιακών κυττάρων, το οποίο διαδραματίζει ρόλο στη διαδικασία διαφοροποίησης των ώριμων Τ λεμφοκυττάρων. Τα ανώριμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μεταφέρονται συνεχώς με την κυκλοφορία του αίματος από το μυελό των οστών στο θύμο αδένα και, καθώς μετακινούνται στα διαμερίσματα του οργάνου, αλληλεπιδρούν με τα στρωματικά κύτταρα του επιθηλίου. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της σηματοδότησης για τη διαφοροποίηση. Στην πραγματικότητα, η σηματοδότηση αυτή είναι διπλής κατεύθυνσης, καθώς έχει βρεθεί πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφοροποιούμενων θυμοκυττάρων και των στρωματικών κυττάρων είναι απαραίτητη και για τη διατήρηση της διαμερισματοποίησης μέσα στο θύμο αδένα (Anderson et al., 2001, Misslitz et al., 2006).

Τα ανώριμα θυμοκύτταρα αφού ολοκληρώσουν το «ταξίδι» τους από τον εξωτερικό φλοιό του θύμου προς τον εσωτερικό μυελό θα εκφράζουν τον υποδοχέα των T κυττάρων (**T Cell Receptor, TCR**) στην επιφάνειά τους. Ωστόσο, πριν την απελευθέρωσή τους στην περιφερική κυκλοφορία του αίματος υπόκεινται σε θετική και αρνητική επιλογή. Αυτές οι δύο διαδικασίες επιτρέπουν την επιβίωση μόνο εκείνων των T κυττάρων που αναγνωρίζουν τα εαυτά αντιγόνα που εκτίθενται από τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (**Major Histocompatibility Complex, MHC**), αλλά ταυτόχρονα δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με αυτά. Ο στόχος του μηχανισμού αυτού είναι η μείωση του κινδύνου ανάπτυξης αυτοάνοσων αποκρίσεων.

Τα ανώριμα λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σταδιακά (DN1, DN2, DN3, DN4, DP στάδια) μέχρι να καταλήξουν στην τελική τους μορφή (SP) (Εικόνα 1.17). Ο διαχωρισμός των σταδίων αυτών πραγματοποιείται με βάση την έκφραση τεσσάρων επιφανειακών πρωτεϊνών: CD4, CD8, CD44 και CD25. Η έκφραση των CD4 και CD8 επιφανειακών πρωτεϊνών διαχωρίζει τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων σε **DN (Double Negative, CD4-CD8-)**, **DP (Double Positive, CD4+CD8+)** και **SP (Single Positive, CD4+ ή CD8+)**. Ο DN πληθυσμός διαχωρίζεται περαιτέρω σύμφωνα με την έκφραση των CD44 και CD25 υποδοχέων σε **DN1 (CD44+CD25-)**, **DN2 (CD44+CD25+)**, **DN3 (CD44-CD25+)** και **DN4 (CD44-CD25-)** (Εικόνα 1.17).

Η πολύπλοκη διαδικασία της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων ελέγχεται σε δύο, κυρίως, στάδια από το μηχανισμό της απόπτωσης. Τα στάδια αυτά είναι το στάδιο DN3 (**β επιλογή**) και το στάδιο DP (**θετική και αρνητική επιλογή**) (Εικόνα 1.17). Στη διαδικασία της **β επιλογής** απομακρύνονται με απόπτωση τα κύτταρα που δεν εκφράζουν έναν λειτουργικό pre-TCR (**T Cell Receptor**). Αντίστοιχα, στη **θετική και αρνητική επιλογή** απομακρύνονται με απόπτωση τα κύτταρα των οποίων οι TCRs δεσμεύουν τα αντιγόνα είτε με πολύ υψηλή είτε με πολύ χαμηλή συγγένεια.



Εικόνα 1.17: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων στο θύμο. Υποδεικνύονται τα στάδια όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της διαφοροποίησης με τις διαδικασίες της επιλογής.

1.8.1 Τα στάδια διαφοροποίησης DN1, DN2, DN3 και DN4

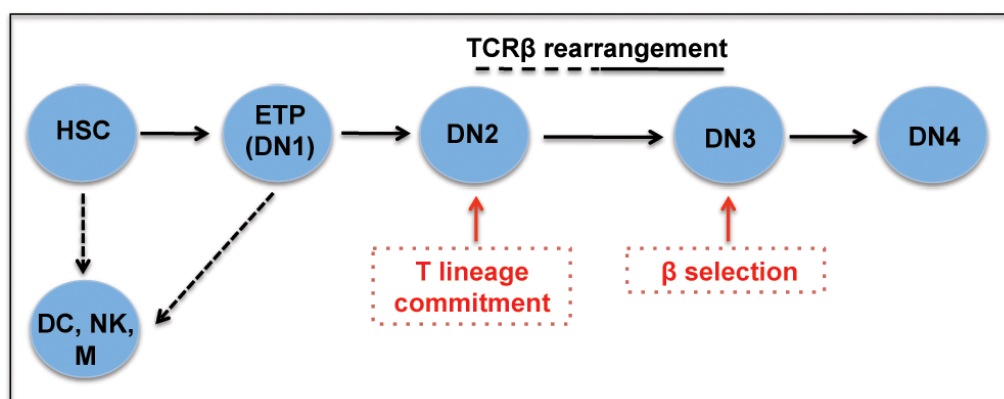
Οι υποπληθυσμοί των ανώριμων θυμοκυττάρων χαρακτηρίζονται από την έλλειψη της έκφρασης των CD4 και CD8 συν-υποδοχέων και γι' αυτό το λόγο έχουν ονομαστεί «διπλά αρνητικοί» (Double Negative, DN) πληθυσμοί (Romero et al. 2001). Τα DN θυμοκύτταρα διαχωρίζονται επιπλέον σε τέσσερα στάδια ανάπτυξης, σύμφωνα με την επιφανειακή έκφραση του μορίου προσκόλλησης CD44 και της α αλυσίδας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2, CD25. Ο πληθυσμός που είναι θετικός ως προς την έκφραση του CD44 και αρνητικός ως προς την έκφραση του CD25 (CD44⁺CD25⁻) αποτελεί τον DN1 πληθυσμό, ο οποίος βρίσκεται στο πρώτο στάδιο ωρίμανσης. Τα DN1 κύτταρα σταδιακά διαφοροποιούνται σε DN2 κύτταρα (CD44⁺CD25⁺) και στη συνέχεια σε DN3 (CD44⁻CD25⁺) και DN4 (CD44⁻CD25⁻) (Εικόνα 1.18).

Το τμήμα του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) που αναγνωρίζει τα αντιγόνα κωδικοποιείται από τέσσερα διαφορετικά γονίδια, τα οποία προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό των αντίστοιχων γενετικών τους τόπων. Δημιουργούνται με αυτό τον τρόπο δύο μορφές του υποδοχέα. Η πρώτη μορφή αποτελείται από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες α και β και η δεύτερη μορφή από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες γ και δ. Ο αβTCR εκφράζεται στην πλειονότητα των περιφερικών T λεμφοκυττάρων, ενώ ο γδTCR σε έναν υποπληθυσμό θυμικών T λεμφοκυττάρων, καθώς και σε ένα μικρό πληθυσμό περιφερικών T λεμφοκυττάρων.

Στο στάδιο των DN2 και DN3 κυττάρων πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων RAG1 και RAG2, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αναδιάταξη του γονιδιακού τόπου της β αλυσίδας του TCR (Εικόνα 1.18). Η αναδιαταγμένη β αλυσίδα

σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την αλυσίδα υποκατάστασης α του TCR και τον συνυποδοχέα CD3. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί την πρόιμη μορφή του TCR (preTCR), ο οποίος θεωρείται ότι σηματοδοτεί χρησιμοποιώντας τους ίδιους παράγοντες και ενεργοποιώντας παρόμοια μονοπάτια με τον TCR των ώριμων T κυττάρων (von Boehmer, 2005, Yamasaki et al., 2006).

Εξαιτίας του φαινομένου της διαγραφής ή και προσθήκης νουκλεοτιδίων κατά τον ανασυνδυασμό της β αλυσίδας του TCR, τα περισσότερα από τα προϊόντα του ανασυνδυασμού είναι εκτός πλαισίου ανάγνωσης και τα γονίδια που προκύπτουν δεν κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες. Επομένως, το πρώτο σημείο ελέγχου της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο (DN3) και ονομάζεται **β επιλογή** (Εικόνα 1.18). Τα κύτταρα που αποτυγχάνουν να συναρμολογήσουν το σύμπλοκο του preTCR ή να σηματοδοτήσουν μέσω αυτού εξαλείφονται με τη διαδικασία της απόπτωσης. Αντίθετα, τα κύτταρα που ανταποκρίνονται επιτυχώς στη διαδικασία της β επιλογής πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε DN4 (CD44⁻CD25⁻) (Carpenter et al., 2010).



Εικόνα 1.18: Σχηματική αναπαράσταση των αρχικών σταδίων της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων. Η έκφραση των επιφανειακών μορίων CD44 και CD25 διαχωρίζει τα προγονικά θυμοκύτταρα στους τέσσερις DN πληθυσμούς: **DN1** (CD44⁺CD25⁻), **DN2** (CD44⁺CD25⁺), **DN3** (CD44⁻CD25⁺) και **DN4** (CD44⁻CD25⁻). Οι πρόιμοι πρόγονοι των T κυττάρων (**Early T cell Progenitors, ETPs**) που εισέρχονται στο θύμο, προέρχονται από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (**Hematopoietic Stem Cells, HSCs**) του μυελού των οστών. Αποτελούν έναν ετερογενή DN1 υποπληθυσμό, ο οποίος περιλαμβάνει τους προγόνους των T κυττάρων, αλλά και κύτταρα που θα αναπτυχθούν στις γενεαλογικές σειρές των δενδριτικών κυττάρων (**DC**), των κυττάρων φυσικών φονέων (**NK**) ή στη μυελοειδή γενεαλογική σειρά (**M**) (π.χ. μακροφάγα) (Porritt et al., 2004).

Στα πρώτα αυτά στάδια της διαφοροποίησης, DN1 ως DN4, πραγματοποιείται η

ανάπτυξη της ταυτότητας της T γενεαλογικής σειράς. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την **εξειδίκευση**, δηλαδή την απόκτηση ειδικών λειτουργιών των T κυττάρων, αλλά και τη **δέσμευση**, ή αλλιώς την απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης σε κάποια εναλλακτική γενεαλογική σειρά. Τα γονίδια της T κυτταρικής **εξειδίκευσης**, καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν τη μεταγραφή τους, ενεργοποιούνται με πολύ αυστηρά ρυθμιζόμενη σειρά. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον ανασυνδυασμό του TCR (όπως τις RAG1 και RAG2), πρωτεΐνες του συμπλόκου του TCR (όπως η CD3), αλλά και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται κινάσες, φωσφατάσες και πρωτεΐνες προσαρμογείς (όπως η LCK, η ZAP70 και η LAT). Η έκφραση αυτών των γονιδίων αυξάνεται στο DN2 στάδιο, ενώ στο στάδιο DN3 η διαδικασία της εξειδίκευσης των θυμοκυττάρων σε κύτταρα της T γενεαλογικής σειράς έχει ολοκληρωθεί (Rothenberg et al., 2008).

Η απώλεια του αναπτυξιακού δυναμικού των προγονικών βλαστικών κυττάρων και η **δέσμευση** της γενεαλογικής σειράς των T κυττάρων είναι μία σταδιακή διαδικασία, η οποία ολοκληρώνεται στο DN2 στάδιο (Εικόνα 1.18). Η δέσμευση της γενεαλογικής σειράς των T κυττάρων είναι αποτέλεσμα της αναστολής εναλλακτικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης, που είναι χαρακτηριστικά για άλλες γενεαλογικές σειρές. Τα προγονικά θυμοκύτταρα του ενήλικου, αλλά και του εμβρύου του ποντικού, διατηρούν τη δυνατότητα ανάπτυξής τους σε δενδριτικά κύτταρα (**Dendritic Cells, DCs**) ή κύτταρα φυσικούς φονείς (**Natural Killer cells, NKs**) (Wu et al., 1996, Shen et al., 2003, Schmitt et al., 2004a, Lu et al., 2005, Balciunaite et al., 2005). Επίσης, κάποια από αυτά έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης σε μακροφάγα και/ή μαστοκύτταρα (Balciunaite et al., 2005, Taghon et al., 2007). Τα προγονικά αυτά κύτταρα, δηλαδή, αν αφαιρεθούν από το θύμο αδένα και καλλιεργηθούν στις επιτρεπόμενες συνθήκες θα διαφοροποιηθούν σε DCs, NKs, μακροφάγα ή μαστοκύτταρα. Παρόλα αυτά, τη στιγμή που θα φτάσουν στο στάδιο DN3 της διαφοροποίησης θα έχουν χάσει αυτή τους τη δυναμικότητα και θα διαφοροποιηθούν αποκλειστικά σε T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1.18) (Rothenberg, 2007).

1.8.2 Τα στάδια διαφοροποίησης DP και SP (CD4, CD8).

Τα θυμοκύτταρα που επιβιώνουν από τη διαδικασία της β επιλογής πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να εκφράζουν τους συν-υποδοχείς CD4 και CD8. Σε αυτό το στάδιο ονομάζονται διπλά θετικά θυμοκύτταρα (**Double Positive, DP**) και στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν σε **SP (Single Positive)** CD4 ή CD8 T λεμφοκύτταρα

(Εικόνα 1.19). Επίσης, στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου της α αλυσίδας του TCR (TCR α rearrangement). Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του συμπλέγματος του ώριμου $\alpha\beta$ TCR στην επιφάνεια των κυττάρων. Επιπλέον, στα κύτταρα αυτά ενεργοποιείται η έκφραση υποδοχέων χαρακτηριστικών των αιμοποιητικών κυττάρων, οι οποίοι τους δίνουν τη δυνατότητα να λειτουργούν σαν κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος.

Η διαφοροποίηση των DP κυττάρων σε SP (CD4 ή CD8) T κύτταρα πραγματοποιείται σταδιακά μέσω τριών διαδικασιών (Starr et al., 2003):

(α) της **θετικής επιλογής**, από την οποία επιβιώνουν μόνο τα DP θυμοκύτταρα, των οποίων ο $\alpha\beta$ TCR αλληλεπιδρά με συγκεκριμένη συγγένεια με τα συμπλέγματα των εαυτών πεπτιδίων-MHC (pMHC). Τα pMHCs εκφράζονται στο στάδιο αυτό από τα κύτταρα του επιθηλίου του θύμου, τα οποία, στη συγκεκριμένη περίπτωση, λειτουργούν ως αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (**Antigen Presenting Cells, APCs**).

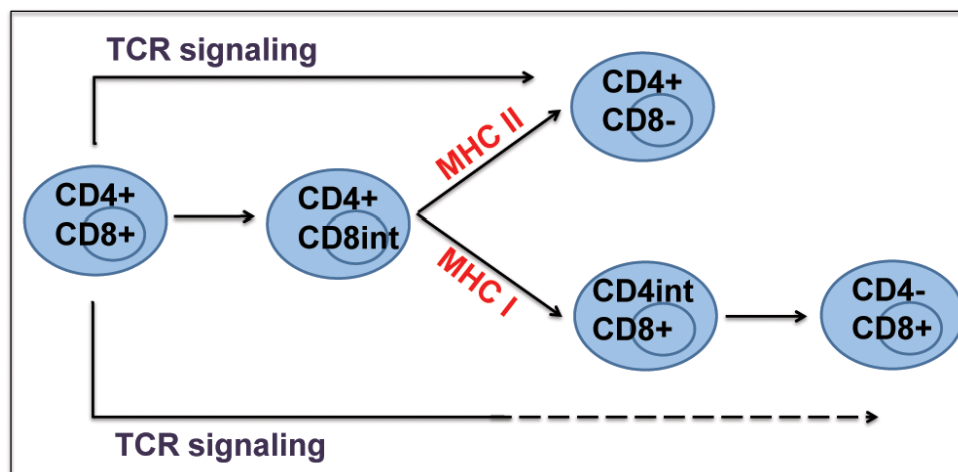
(β) της **αρνητικής επιλογής**, κατά την οποία απομακρύνονται τα εαυτο-αντιδρώντα (self-reactive) κύτταρα, αυτά δηλαδή που αναγνωρίζουν τα εαυτά αντιγόνα με πολύ υψηλή συγγένεια (γ) της απόκτησης **λειτουργικής αρμοδιότητας**, η οποία πραγματοποιείται με τον τερματισμό της έκφρασης είτε του CD4 είτε του CD8 υποδοχέα, ανάλογα με την εξειδίκευση του κυττάρου στην αναγνώριση είτε της τάξης I MHC μορίων (CD8 κύτταρα) είτε της τάξης II (CD4 κύτταρα).

Η ανάγκη της **θετικής επιλογής** είναι άμεση συνέπεια της τυχαίας φύσης των γεγονότων ανασυνδυασμού των αλυσίδων του TCR και της μεγάλης ετερογένειας των MHC αλληλομόρφων. Αν και η εξελικτική πίεση είχε ως αποτέλεσμα τη γονιδιακή κωδικοποίηση της συγγένειας των μεταβλητών περιοχών του TCR για τα μόρια MHC, ευνοώντας τη θετική επιλογή (Feng et al., 2007, Marrack et al., 2008), τα περισσότερα DP θυμοκύτταρα (> 95%) αδυνατούν να αλληλεπιδράσουν με τα pMHC και απομακρύνονται μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης μέσα σε λίγες μέρες.

Ωστόσο, η συγγένεια του TCR για τα MHC-συνδεδεμένα ατομικά πεπτίδια (pMHC), η οποία στηρίζει τη θετική επιλογή, αποτελεί έναν κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσων αντιδράσεων. Για το λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί ο μηχανισμός της **αρνητικής επιλογής**, ο οποίος εμποδίζει την ανάπτυξη T κυττάρων που «υπερ-αντιδρούν» σε pMHCs. Θυμοκύτταρα, τα οποία φέρουν υποδοχείς με πολύ υψηλή συγγένεια για pMHC, απομακρύνονται με το μηχανισμό της απόπτωσης, ο οποίος επάγεται από τον ίδιο τον TCR (Starr et al., 2003, von Boehmer et al., 2010). Η διαδικασία της αρνητικής επιλογής

περιλαμβάνει την έκθεση των θυμοκυττάρων σε ιστο-ειδικά αντιγόνα, τα οποία εκφράζονται εκτοπικά από επιθηλιακά κύτταρα του μυελού του θύμου (Mathis et al., 2009).

Το τελευταίο βήμα της ωρίμανσης των T κυττάρων είναι η **λειτουργική διαφοροποίησή** τους σε CD4 ή CD8 κύτταρα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τον τερματισμό της έκφρασης ενός από τους δύο συν-υποδοχείς και την έναρξη προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης χαρακτηριστικών είτε των βοηθητικών T κυττάρων (CD4) είτε των κυτταροτοξικών T κυττάρων (CD8). Τα δύο αυτά γεγονότα είναι συνδεδεμένα μηχανιστικά (Corbella et al., 1994, Matechak et al., 1996). Η δημιουργία ενός λειτουργικού ανοσολογικού συστήματος προϋποθέτει την αντιστοιχία μεταξύ της εξειδίκευσης ως προς την αναγνώριση των MHC μορίων και τη διαφοροποίηση σε CD4 ή CD8 κύτταρα, με αποτέλεσμα τα θυμοκύτταρα που αναγνωρίζουν MHC μόρια τάξης I να γίνονται CD8 κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, ενώ αυτά που αναγνωρίζουν MHC μόρια τάξης II να γίνονται CD4 βοηθητικά T κύτταρα (Εικόνα 1.19).



Εικόνα 1.19: Διαφοροποίηση των DP T κυττάρων σε CD4 και CD8 T λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με το μοντέλο «κινητικής σηματοδότησης» (*kinetic signaling*) η σηματοδότηση του TCR καταστέλλει την έκφραση του CD8, με αποτέλεσμα την υιοθέτηση ενός ενδιάμεσου CD4+CD8int φαινοτύπου. Στα θυμοκύτταρα που αναγνωρίζουν MHC τάξης II μόρια η σηματοδότηση του TCR δεν επηρεάζεται από την μείωση της έκφρασης του CD8 και η οδηγεί τελικώς στη δέσμευση της CD4 γενεαλογικής σειράς. Αντίθετα, η σηματοδότηση του TCR στα θυμοκύτταρα που αναγνωρίζουν MHC τάξης I μόρια επηρεάζεται από τη μείωση της έκφρασης του CD8 και προκαλείται έτσι το φαινόμενο της «αντιστροφής του συν-υποδοχέα», το οποίο είναι η καταστολή της έκφρασης του CD4 και η αύξηση ξανά της έκφρασης του CD8 συν-υποδοχέα.

1.9 Ο ρόλος της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων

Η ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων είναι μία διαδικασία κατά την οποία αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται και σταδιακά μετατρέπονται σε ένα φάσμα κυττάρων της ανοσολογικής απόκρισης. Κάθε βήμα της διαδικασίας αυτής απαιτεί την ενεργοποίηση ή την αποσιώπηση ομάδων γονιδίων ειδικών για το εκάστοτε αναπτυξιακό στάδιο. Η αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και οι επιγενετικές τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται και διατηρούνται σε κάθε κυτταρικό κύκλο ρυθμίζουν την έκβαση της διαφοροποίησης και προσδίδουν στο κάθε κύτταρο τη λειτουργική του ταυτότητα. Πολλές *in vivo* και *in vitro* μελέτες μέχρι σήμερα έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στη διαλεύκανση των μηχανισμών ρύθμισης της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης και των προγραμματών γονιδιακής έκφρασης κατά τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών δείχνουν ότι πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν α) τα ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης και β) οι μηχανισμοί αποσιώπησης γονιδίων.

Ειδικότερα, ο ρόλος του συμπλόκου SWI/SNF στην ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων μελετήθηκε από δύο ερευνητικές ομάδες, οι οποίες χρησιμοποίησαν ποντίκια με ιστο-ειδική γονιδιακή απαλοιφή της υπομονάδας Brg1 του συμπλόκου SWI/SNF. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Brg1, η οποία έχει ενεργότητα ελικάσης και ATPάσης, είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της έκφρασης των συν-υποδοχέων CD4 και CD8. Η απενεργοποίησή της επηρεάζει αρνητικά και την αποσιώπηση του CD4 και την ενεργοποίηση του CD8, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός των θυμοκυττάρων να μη περιέχει DP ή CD8+ κύτταρα. Επίσης, παρατηρείται διακοπή της πορείας της διαφοροποίησης κατά τη μετάβαση από το DN στο DP στάδιο, πιθανώς λόγω της ανικανότητας που επιδεικνύουν τα Brg1-/- θυμοκύτταρα να ανταποκριθούν στη μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα pre-TCR (Chi et al., 2003). Η στρατολόγηση του συμπλόκου SWI/SNF στο εκμαγείο του DNA έχει συσχετισθεί με αλλαγές στο βαθμό ακετυλίωσης της ιστόνης H3. Πιο συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί αυτοί έχουν εμπλακεί στα γεγονότα ανασυνδυασμού των πεπτιδικών αλυσίδων του υποδοχέα των T κυττάρων. Μία σειρά μελετών από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι υπερ-ακετυλίωση της ιστόνης H3 επιτρέπει την πρόσβαση των παραγόντων ανασυνδυασμού στους γενετικούς τόπους των α , β , γ και δ αλυσίδων του TCR (Kwon et al., 2000, Mathieu et al., 2000, McBlane et al., 2000, McMurry et al., 2000).

Μία ακόμη πρωτεΐνη με πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης κατά τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι η πρωτεΐνη Ίκαρος. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας παράγοντας που προσδένεται στο DNA σε ειδικές αλληλουχίες και συνήθως απαντάται σε πολυμερή σε μεγάλα μακρομοριακά σύμπλοκα (Molnar et al., 1996). Η Ίκαρος έχει ανιχνευθεί ως υπομονάδα του συμπλόκου SWI-SNF (Kim et al., 1999). Επίσης, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τους καταστολείς της μεταγραφής Sin3 και CtBP (Koirally et al., 1999, Koirally et al., 2000). Ως υπομονάδα των συμπλόκων αυτών θεωρείται ότι στρατολογεί αναδιοργανωτές της χρωματίνης σε αλληλουχίες γονιδίων ειδικών για τη διαφοροποίηση των γενεαλογικών σειρών των T κυττάρων (Georgopoulos, 2002). Εκτός, όμως, από υπομονάδα του συμπλόκου SWI/SNF η Ίκαρος στα T κύτταρα συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την ATPάση Mi-2b και τις απο-ακετυλάσες των ιστονών HDAC1 και HDAC2, οι οποίες είναι υπομονάδες του συμπλόκου NURD αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Το σύμπλοκο Ίκαρος-NURD έχει δραστηριότητα απο-ακετυλάσης των ιστονών *in vitro* και αναδιοργανώνει τη δομή της χρωματίνης (Kim et al., 1999).

Ο ρόλος της ATPάσης Mi-2b, υπομονάδας του NuRD συμπλόκου αναδιοργάνωσης της χρωματίνης έχει, επίσης, μελετηθεί εκτενώς, στο σύστημα της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων, με τη χρήση ιστο-ειδικής απαλοιφής του γονιδίου της σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι η πρωτεΐνη Mi-2b εμπλέκεται στη θετική ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα CD4. Η δράση της οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με την ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών (**H**istone **A**cetyltransferase, **HAT**) p300 και την πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA, HEB. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ακετυλίωσης της ιστόνης H3, ένα φαινόμενο που έχει συσχετισθεί με ενεργοποίηση γονιδίων, στην περιοχή της χρωματίνης όπου βρίσκεται ο υποκινητής του γονιδίου του CD4 (Williams et al., 2004).

Η διατήρηση των προγραμμάτων αποσιώπησης γονιδίων που χαρακτηρίζουν κάθε στάδιο της διαφοροποίησης ή, με άλλα λόγια, η διατήρηση της δομής της χρωματίνης που έχει διαμορφωθεί, είναι μία διαδικασία εξίσου σημαντική για τη δέσμευση των γενεαλογικών σειρών και την εξειδικευμένη λειτουργία των T λεμφοκυττάρων. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διαδικασία αυτοί είναι α) η στρατολόγηση γονιδίων στις περιοχές ετεροχρωματίνης και β) η αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδιακών τόπων. Έχει προταθεί ότι οι ετεροχρωματινικές περιοχές αποτελούν «αποθήκες» γονιδίων, των οποίων η αποσιώπηση κληρονομείται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Η

στρατολόγηση των γονιδίων στις κεντρομεριδιακές και περικεντρομεριδιακές περιοχές της ετεροχρωματίνης πιθανολογείται ότι πραγματοποιείται με τη βοήθεια παραγόντων που προσδένονται στο DNA. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Ίκαρος στην περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη και, πιο συγκεκριμένα, ο συν-εντοπισμός της με κληρονομικώς αποσιωπημένα γονίδια υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο της στη δέσμευση αλληλουχιών γονιδίων που πρέπει να αποσιωπηθούν και στη στρατολόγησή τους στις κεντρομεριδιακές περιοχές (Brown et al., 1997, Klug et al., 1998). Επιπλέον, γονίδια των οποίων η έκφραση είναι απαραίτητη σε κάποια στάδια της διαφοροποίησης, αλλά πρέπει να κατασταλεί σε κάποια άλλα, όπως τα γονίδια των RAG1 και RAG2 πρωτεϊνών, έχει βρεθεί ότι μετατοπίζονται στις περιοχές της ετεροχρωματίνης (Brown et al., 1999). Όσον αφορά το μηχανισμό της αποσιώπησης συγκεκριμένων γονιδίων είναι γνωστό ότι μέλη της οικογένειας των Polycomb-group γονιδίων (PcG) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία αυτή, καθώς έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη διατήρηση της αποσιώπησης γονιδίων μεταξύ διαδοχικών γενεών των T κυττάρων (Raaphorst et al., 2001). Γονιδιακή απαλοιφή μελών της οικογένειας αυτής έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή απώλεια ώριμων T κυττάρων, εξαιτίας προβλημάτων στον πολλαπλασιασμό (van der Lugt et al., 1994).

Από όλα τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι η διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι μία διαδικασία κατά την οποία παρατηρούνται συνεχείς αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Η επιτυχής μετάβαση μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων, η δέσμευση της γενεαλογικής σειράς, η απόκτηση λειτουργικής ταυτότητας και εξειδίκευση είναι μερικές μόνο από τις διαδικασίες που ρυθμίζονται από το βαθμό συμπύκνωσης του DNA. Επομένως, οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαμόρφωση της χρωματίνης και την προσβασιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων στο εκμαγείο του DNA καθορίζουν την πορεία της ωρίμανσης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε λειτουργικά T λεμφοκύτταρα.

1.10 Ο ρόλος της απόπτωσης στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων

Η διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι μία αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία μέσα από την οποία διασφαλίζεται η δημιουργία ενός λειτουργικού TCR ρεπερτορίου. Όπως έχει προαναφερθεί, ο πληθυσμός των διαφοροποιούμενων θυμοκυττάρων διαχωρίζεται σε τρία αναπτυξιακά στάδια: το στάδιο των DN κυττάρων (CD4-CD8-), το στάδιο των DP κυττάρων (CD4+CD8+) και το στάδιο των SP κυττάρων (CD4+CD8- ή

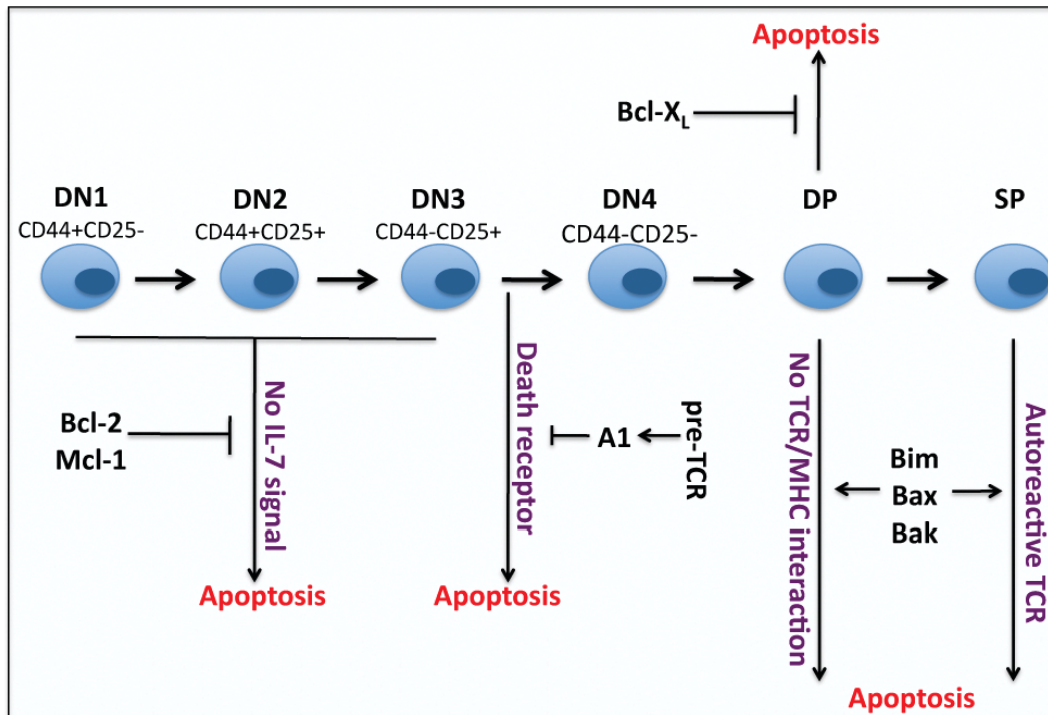
CD4-CD8). Σε κάθε ένα από τα τρία στάδια (DN, DP και SP) υπάρχουν σημεία ελέγχου της διαφοροποίησης, στα οποία απομακρύνονται τα κύτταρα που δεν πληρούν τις κατάλληλες για το κάθε στάδιο προϋποθέσεις, μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης (Εικόνα 1.20).

1.10.1 DN θυμοκύτταρα, IL-7 μεταγωγή σήματος και β επιλογή

Ένας από τους πολύ σημαντικούς παράγοντες για την επιβίωση των DN κυττάρων είναι η ιντερλευκίνη-7 (IL-7), καθώς έχει βρεθεί ότι διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου της ή του υποδοχέα της (IL7^{-/-} ή IL-7R^{-/-}) έχουν λιγότερα DN κύτταρα (Peschon et al., 1994, von Freeden-Jeffry et al., 1995). Τα κυριότερα μόρια-τελεστές του μονοπατιού σηματοδότησης της IL-7 είναι τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2 (Εικόνα 1.20). Η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο στάδιο των DN κυττάρων και η υπερέκφρασή της έχει δείχθει ότι διασώζει την ανάπτυξη των T κυττάρων, όταν αναστέλλεται η σηματοδότηση της IL-7 (Akashi et al., 1997, Maraskovsky et al., 1997). Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ένα ακόμη μέλος της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, η πρωτεΐνη Mcl-1, είναι ένας απαραίτητος παράγοντας για την επιβίωση των θυμοκυττάρων, ο οποίος επίσης ρυθμίζεται από τη σηματοδότηση της IL-7. Απώλεια της έκφρασης της Mcl-1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα απόπτωσης και διακοπή της αναπτυξιακής πορείας των T κυττάρων. Επιπλέον, η IL-7 σηματοδότηση επάγει την έκφραση της Mcl-1 (Opferman et al., 2003). Συμπερασματικά, οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Mcl-1 δρουν καθοδικά της IL-7 και προωθούν την επιβίωση των DN κυττάρων (Εικόνα 1.20).

Στα στάδια DN2 και DN3, όπως έχει προαναφερθεί, πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός του γενετικού τύπου της β αλυσίδας του TCR και η συναρμολόγηση ενός πρόδρομου υποδοχέα, του pre-TCR. Τα θυμοκύτταρα μετά τη συναρμολόγηση του pre-TCR, στο DN3 στάδιο, υπόκεινται στη διαδικασία της **β επιλογής**, η οποία εξασφαλίζει ότι μόνο τα κύτταρα στα οποία έχει ανασυνδυαστεί επιτυχώς η β αλυσίδα του TCR θα επιβιώσουν. Τα κύτταρα αυτά λαμβάνουν θετική σηματοδότηση από τον pre-TCR, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε DN4 και στη συνέχεια σε DP. Αντίθετα, τα κύτταρα που δε λαμβάνουν το κατάλληλο σήμα από τον pre-TCR απομακρύνονται με τη διαδικασία της απόπτωσης, η οποία μεσολαβείται είτε μέσω του ενδογενούς είτε μέσω του εξωγενούς μονοπατιού. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη A1/Bfl-1 ανήκει στην οικογένεια

των Bcl-2 πρωτεϊνών και δρα καθοδικά του pre-TCR, προστατεύοντας τα DN θυμοκύτταρα από την απόπτωση ως απόκριση της μεταγωγής σήματος από τον υποδοχέα (Mandal et al., 2005) (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20: Ο ρόλος της απόπτωσης στην διαφοροποίηση και τη λειτουργία των T λεμφοκυττάρων. Υποδεικνύονται τα στάδια της διαφοροποίησης στα οποία πραγματοποιείται ο λειτουργικός έλεγχος της διαφοροποίησης, καθώς και οι κυριότεροι αντι-αποπτωτικοί και προ-αποπτωτικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην επαγωγή ή αναστολή του αποπτωτικού μηχανισμού.

1.10.2 DP θυμοκύτταρα και θετική/αρνητική επιλογή.

Στο στάδιο των DP θυμοκυττάρων πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου της α αλυσίδας του TCR και η συναρμολόγηση του ώριμου υποδοχέα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά υποβάλλονται στη διαδικασία αναγνώρισης των συμπλόκων MHC μορίων-ατομικών πεπτιδίων (pMHC), τα οποία παρουσιάζονται στο θύμο από τα αντιγονο-εκθέτονα κύτταρα (APCs). Τα DP θυμοκύτταρα των οποίων οι TCRs αναγνωρίζουν τα pMHCs με έναν ενδιάμεσο βαθμό συγγένειας επιλέγονται θετικά και επιβιώνουν. Τα κύτταρα των οποίων οι TCRs δεν αναγνωρίζουν τα pMHCs ή τα αναγνωρίζουν με πολύ χαμηλό βαθμό συγγένειας απομακρύνονται με το μηχανισμό της απόπτωσης. Επίσης, τα κύτταρα των οποίων οι TCRs αναγνωρίζουν τα pMHCs με υψηλό

βαθμό συγγένειας υποβάλλονται σε αρνητική επιλογή, με σκοπό την απαλειφή των T κυττάρων που θα αναγνώριζαν συστατικά του ίδιου του οργανισμού (Goldrath et al., 1999, Starr et al., 2003).

Το 90% των DP θυμοκυττάρων απομακρύνεται με τη διαδικασία της απόπτωσης κατά τη διάρκεια της θετικής και της αρνητικής επιλογής. Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού αυτού θανάτου δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Ωστόσο, τα αποτελέσματα πολλών ερευνητικών μελετών υποδεικνύουν ότι τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι οι κύριοι τελεστές της απόπτωσης κατά τη διαφοροποίηση των DP θυμοκυττάρων (Εικόνα 1.20). Πολλά πειραματικά δεδομένα έχουν προκύψει από μελέτες της αυθόρμητης απόπτωσης των θυμοκυττάρων (Spontaneous Thymocyte Apoptosis, STA), ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε *in vitro* καλλιέργειες και θεωρείται ότι προσομοιάζει την απόπτωση των θυμοκυττάρων που συμβαίνει *in vivo*. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η απόπτωση των DP κυττάρων μεσολαβείται κυρίως από το ενδογενές μονοπάτι των μιτοχονδρίων, καθώς έχει παρατηρηθεί η αποδόμηση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-x_L, καθώς και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα κατά τα πρώιμα στάδια της STA (Zhang et al., 2000).

Η πρωτεΐνη Bcl-x_L εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και επιμηκύνει το χρόνο ζωής των DP θυμοκυττάρων. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από μία μελέτη στην οποία παρατηρήθηκε ότι κύτταρα που απομονώθηκαν από Bcl-x_L^{-/-} Rag^{-/-} ποντίκια και καλλιεργήθηκαν *in vitro* είχαν μειωμένο χρόνο ζωής (Motoyama et al., 1995). Επιπλέον, RORγ^{-/-} ποντίκια, τα οποία έχουν μειωμένη έκφραση της Bcl-x_L στα DP κύτταρα, επιδεικνύουν επίσης μειωμένη διάρκεια ζωής, καθώς και μικρή ποικιλομορφία στα προϊόντα ανασυνδυασμού της α αλυσίδας του TCR. Τα δύο αυτά φαινόμενα αντιστρέφονται σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν συνεχώς την πρωτεΐνη Bcl-x_L (Sun et al., 2000, Guo et al., 2002).

Η BH3-only προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bim έχει επίσης εμπλακεί στην αυθόρμητη απόπτωση των λεμφοκυττάρων (Bouillet et al., 1999). Σε *in vitro* καλλιέργεια τριών ημερών, DP θυμοκύτταρα απομονωμένα από Bim^{-/-} ποντίκια επιβιώνουν 10-30 φορές καλύτερα από ότι wt DP κύτταρα. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι και οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak συμμετέχουν ενεργά στην TSA, καθώς Bax^{-/-}Bak^{-/-} θυμοκύτταρα εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα αυθόρμητης απόπτωσης *in vitro*. (Rathmell et al., 2002).

Συνοπτικά, η διαδικασία της διαφοροποίησης των προγονικών θυμοκυττάρων σε λειτουργικά T λεμφοκύτταρα ελέγχεται αυστηρά σε διάφορα στάδια. Εκτιμάται ότι

περίπου το 95% των προγονικών T λεμφοκυττάρων απομακρύνεται με το μηχανισμό της απόπτωσης (Chao et al., 1998). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολλοί παράγοντες που συμμετέχουν και ρυθμίζουν τη διαδικασία της απόπτωσης, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης των T λεμφοκυττάρων. Επομένως, η απόπτωση θεωρείται ένας από τους πιο βασικούς μηχανισμούς ελέγχου της διαφοροποίησης και εξασφαλίζει τη δημιουργία ενός λειτουργικού ρεπερτορίου T κυττάρων. Παρομοίως, η αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης κατά τη διαφοροποίηση είναι μία διαδικασία που καθορίζει την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης ομάδων γονιδίων και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η δέσμευση της γενεαλογικής σειράς και η απόκτηση λειτουργικής ταυτότητας των T λεμφοκυττάρων. Συνεπώς, οι μηχανισμοί της διαφοροποίησης των T κυττάρων, της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης και της απόπτωσης είναι στενά συνδεδεμένοι λειτουργικά και από την αλληλεπίδρασή τους εξαρτάται η δημιουργία ενός λειτουργικού ρεπερτορίου κυττάρων της προσαρμοζόμενης (δευτερογενούς) ανοσολογικής απόκρισης.

ΣΚΟΠΟΣ

Η τοπική διαμόρφωση και δυναμική της χρωματίνης καθορίζεται από τη συστράτευση μηχανών ανασυγκρότησης της χρωματινικής δομής σε γονιδιακές περιοχές μέσω μεταγραφικών και ρυθμιστικών παραγόντων. Οι δυναμικές αναδιατάξεις καθώς και το άνοιγμα της χρωματίνης στις ενεργές μεταγραφικά περιοχές ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η αντιγραφή, μεταγραφή, επιδόρθωση του DNA και απόπτωση. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και συγκεκριμένα των T λεμφοκυττάρων, επιτυγχάνεται μέσω συνεχούς αναδιατάξης της δομής της χρωματίνης και ελέγχεται αυστηρά από το μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι αρκετές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη χρωματινική αναδιοργάνωση ρυθμίζουν την απόπτωση και τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.

Ως κεντρικοί στόχοι της παρούσας διατριβής ορίστηκαν:

- **Η διερεύνηση του ρόλου των αναδιοργανωτών χρωματίνης SET/TAF-1β και προθυμοσίνης α στην αποπτωτική απόκριση καρκινικών κυττάρων.** Στο τμήμα αυτό της εργασίας μας ο στόχος ήταν να μελετηθεί η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων α) μετά από αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών, και β) μετά από γονιδιακή αποσιώπησή τους με πλασμιδιακούς φορείς ειδικών shRNAs.

Η μελέτη του ρόλου των SET/TAF-1β και προθυμοσίνης α σε ένα σύστημα που ελέγχεται από την απόπτωση, σε φυσιολογικές συνθήκες, τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων. Το σύστημα που επιλέξαμε ήταν αυτό της συνκαλλιέργειας αδιαφοροποίητων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων από το θύμο αδένου ποντικού με την κυτταρική σειρά στρώματος OP9-DL1

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Τα φάρμακα σισπλατίνη και ετοποσίδιο ήταν από την εταιρία Sigma και η ταξόλη από την Bristol-Myers Squibb. Οι κυτοκίνες που χρησιμοποιήθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των θυμοκυττάρων και των OP9-DL1 κυττάρων, IL-3, IL-6, IL-7, SCF, Flt3L, ήταν από την εταιρία Peprotech. Τα αντισώματα anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD19, anti-Gr-1, anti-NK1.1, anti-Ter 119 και anti-TCR $\gamma\delta$ σημασμένα με βιοτίνη ήταν από την εταιρία eBiosciences. Τα μαγνητικά σφαιρίδια αβιδίνης, καθώς και τα σφαιρίδια σημασμένα με APC, ήταν από την εταιρία Miltenyi Biotech. Τα αντισώματα anti-CD44-PECy7, anti-CD25-APC, anti-CD4-APCCy7, anti-CD8-PB ήταν από την εταιρία eBiosciences. Η εμπορική συσκευασία Annexin V-PE/7AAD, αλλά και Annexin V-FITC/PI ήταν από την εταιρία BD Biosciences. Τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-Caspase-3 και anti-Parp ήταν από την εταιρία Santa Cruz. Το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Flag ήταν από την εταιρία Sigma. Όλα τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των φορέων-ρετροϊών της προθυμοσίνης α ήταν από την εταιρία New England Biolabs

2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (**HeLa**) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Invitrogen), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS), 100units/ml πενικιλίνη, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στρεπτομυκίνη (PAA), 1% L-γλουταμίνη, και 0.3% γλυκόζη (Sigma). Μόλις τα κύτταρα κάλυπταν την επιφάνεια του τριβλύου σε πυκνότητα περίπου 70% γινόταν διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 4.

Η κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού, (mouse embryonic fibroblasts, **NIH 3T3**), καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM-GlutaMAX-high glucose (Invitrogen), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS) (Applied Biosystems), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στρεπτομυκίνη (Invitrogen), 50ng/ml Gentamicin (Invitrogen). Μόλις τα κύτταρα κάλυπταν την επιφάνεια του τριβλύου σε πυκνότητα 70% γινόταν διασπορά σε αραιώση 1 προς 4. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2 έως 10.

Τα συσκευαστικά κύτταρα **PlatE**, καλλιεργούνται υπό συνθήκες επιλογής με τα αντιβιοτικά πουρομυκίνη και βλαστισιδίνη. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν DMEM-GlutaMAX-high glucose (Invitrogen), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS) (Applied Biosystems), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen), 50ng/ml Gentamicin (Invitrogen), 1 mM Sodium Pyruvate (Invitrogen), 1 µg/ml πουρομυκίνη (Sigma) και 10 µg/ml βλαστισιδίνη (Sigma). Μόλις τα κύτταρα κάλυπταν την επιφάνεια του τριβλίου σε πυκνότητα 70% γινόταν διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 4. Μία μέρα πριν τη χρήση των κυττάρων για παρασκευή ρετροϊών, γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο χωρίς τα αντιβιοτικά επιλογής (πουρομυκίνη, βλαστισιδίνη). Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2 έως 10.

Τα κύτταρα στρώματος μυελού των οστών ποντικού, **OP9-DL1**, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM-a-GlutaMAX (Invitrogen), εμπλουτισμένο με 20% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS) (Applied Biosystems), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen), 50 ng/ml Gentamicin (Invitrogen), 2.2 g/L sodium bicarbonate (Invitrogen) και 10 mM HEPES. Κατά τη διάρκεια της συν-καλλιέργειας, το θρεπτικό υλικό περιείχε επίσης 5 ng/ml FLT3L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand) και 5 ng/ml IL-7 και 5 ng/ml SCF (Stem Cell Factor). Μόλις τα κύτταρα κάλυπταν την επιφάνεια του τριβλίου σε πυκνότητα 70% γινόταν διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 4. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2 έως 10.

Τα αδιαφοροποίητα θυμοκύτταρα ποντικού καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό IMDM-GlutaMAX-high Glucose (Invitrogen), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS) (Applied Biosystems), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen), 50 ng/ml Gentamicin (Invitrogen), 50 nM β-Mercaptoethanol (Invitrogen), 10 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6, 25 ng/ml IL-7 και 50 ng/ml SCF.

Όλα τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας, πριν τη χρήση τους, διαπεράστηκαν, υπό κενό, από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.22 µm (Vacuum filter, Corning).

Ο χειρισμός όλων των κυτταρικών σειρών γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37°C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

2.3 Διαμόλυνση κυττάρων

Για τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HeLa, χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμοι παράγοντες διαμόλυνσης Fugene 6 (Roche) και JetPEI (Polyplus Transfection), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. 2-3 μg DNA χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση $1-1.5 \times 10^6$ κυττάρων. Σε όλα τα πειράματα τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

2.4 Κατασκευές DNA

Η κατασκευή pCMV-ProTα, περιγράφεται στην αναφορά Karetsoy et al. 2002. Η κατασκευή pFlag-SET/TAF-1β, είναι ευγενική χορηγία του Dr. D.C. Tkachuk. Οι κατασκευές ShRNA-ProTα, που εκφράζουν τα shRNA έναντι της Προθυμοσίνης α, είναι χορηγία του Dr. Takahiko Kobayashi. Ο πλασμιδιακός φορέας είναι ο pcPURU6β (Takara, Ltd.) και οι αλληλουχίες-στόχοι της προθυμοσίνης α που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 1) ATCTAAACGTGGTCACCTT, 2) ATGACGATGTCGATACCAA, 3) GCAGGAGGCTGACAATGAG και 4) AGCAGAAGACCGACGAGGA. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των φορέων που έφεραν την 1η και την 4η αλληλουχία. Η κατασκευή SiRNA-SET/Taf-1β, χορηγήθηκε από τον Dr. Perroti. Ο πλασμιδιακός φορέας είναι ο pSUPER.retro.neo.+GFP και η αλληλουχία-στόχος της SET: 5-TGAAATAGACAGACTTAAT-3. Όλες οι παραπάνω κατασκευές αναπαρήχθησαν χρησιμοποιώντας εμπορικές συσκευασίες των εταιριών Qiagen, Sigma ή Invitrogen.

2.5 Κατασκευή φορέων-ρετροϊών της αγρίου τύπου προθυμοσίνης α (flag-ProTα WT), της «αποπτωτικής» μορφής της (flag-ProTα TR) και της μορφής που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3 (flag-ProTα MUT).

Αρχικά, απομονώθηκε ολικό RNA από 10^6 θυμοκυττάρα στο DP (Double positive) στάδιο της διαφοροποίησης, χρησιμοποιώντας πακέτο εμπορικής συσκευασίας (RNAeasy Micro kit, Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, αυτό το δείγμα RNA μετατράπηκε σε cDNA, με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (Superscript III First-strand synthesis kit, Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1) Flag-ProTα WT : Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο cDNA που είχε απομονωθεί, με τους παρακάτω εκκινητές:

Flag-ProTα WT Forward: 5'-A TAT AGA TCT ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG TCA GAC GCG GCA GTG-3'

Flag-ProTa WT Reverse: 5'-A TAT GAA TTC CTA GTC ATC CTC CTC GGT
CTT CTG

Στον εκκινητή Flag-ProTa WT Forward έχει προστεθεί η αλληλουχία του flag πεπτιδίου καθώς και η περιοριστική θέση του ενζύμου BglIII. Αναλόγως, στον εκκινητή Flag-ProTa WT Reverse, έχει προστεθεί η περιοριστική θέση του ενζύμου EcoRI. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης και εντέθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pcr 2.1-Toro, χρησιμοποιώντας την εμπορική συσκευασία Toro-TA Cloning system (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το σύστημα κλωνοποίησης Toro-TA επιτρέπει την απευθείας εισαγωγή των προϊόντων αλυσιδωτής πολυμεράσης στον πλασμιδιακό φορέα pcr 2.1-Toro, χωρίς να χρειάζεται να προηγηθεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα είτε του φορέα είτε του ενθέματος. Βασίζεται στο γεγονός ότι η RedTaq DNA Πολυμεράση (Sigma) που χρησιμοποιήθηκε, προσθέτει στο -3' άκρο της αλληλουχίας του προϊόντος ένα νουκλεοτίδιο Αδενίνης (A). Αντίστοιχα, ο πλασμιδιακός φορέας pcr 2.1-Toro παρέχεται στη μορφή ευθυγραμμισμένου DNA, το οποίο στα 5' άκρα της θέσης ένθεσης του προϊόντος έχει ένα νουκλεοτίδιο Θυμίνης (T), το οποίο "κρέμεται" (overhanging). Έτσι, με τη βοήθεια του ενζύμου Τοποϊσομεράση I, που παρέχεται δεσμευμένη στον πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιείται η σύνδεση του ενθέματος με τον πλασμιδιακό φορέα.

Ακολούθησε μετασχηματισμός του πλασμιδιακού φορέα σε βακτηριακά στελέχη DH10b (ONE SHOT TOP10 competent cells, Invitrogen), καλλιέργεια σε μικρή κλίμακα των βακτηρίων, απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και EcoRI, για την επιλογή των επιθυμητών αποικιών και αλληλούχιση του ενθέματος. Στη συνέχεια, το ένθεμα απομονώθηκε με περιοριστικές πέψεις, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα BglIII και EcoRI, ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, και τοποθετήθηκε στον φορέα ρετροϊού MSCV MIGR1, στις αντίστοιχες θέσεις. Ο φορέας αυτός, ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, εκφράζει και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, καθώς ανάμεσα στο γονίδιο της GFP και στη θέση κλωνοποίησης, έχει εισαχθεί η αλληλουχία IRES (Internal Ribosome Entry Site). Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης και διαλογής των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από τον ρετροϊό. Ακολούθησε μετασχηματισμός του φορέα-ρετροϊού με το ένθεμα σε βακτηριακά στελέχη E.coli τροποποιημένα ειδικά για το μετασχηματισμό φορέων-ρετροϊών, τα οποία δεν επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό (SURE 2 Supercompetent Cells, Stratagene), καλλιέργεια μικρής κλίμακας, έλεγχος με περιοριστικές πέψεις για την

επιλογή των επιθυμητών αποικιών, καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας και απομόνωση του DNA με τη μέθοδο του Χλωριούχου Κέσιου (CsCl). Τέλος, έγινε αλληλούχιση του ενθέματος.

2) Flag-ProTa TR: Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την δεύτερη κατασκευή, η οποία εκφράζει τα αμινοξέα 1-99 της προθυμοσίνης α. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

Flag-ProTa TR forward: 5'- A TAT AGA TCT ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG TCA GAC GCG GCA GTG-3'

Flag-ProTa TR Reverse: 5'-A TAT GAA TTC TCA GTC CAC ATC GTC ATC CTC ATC-3'

Στον Forward εκκινητή έχει προστεθεί η αλληλουχία του flag πεπτιδίου καθώς και η περιοριστική θέση του ενζύμου BglII. Αναλόγως, στον Reverse εκκινητή, έχει προστεθεί η περιοριστική θέση του ενζύμου EcoRI.

3) Flag-ProTa MUT: Για την κατασκευή αυτή, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δύο βημάτων, κατά την οποία προκλήθηκε σημειακή μεταλλαξιγένεση, που είχε ως αποτέλεσμα την μετατροπή του αμινοξέος Ασπαρτικό οξύ (Asp, D) στη θέση 99 σε Αλανίνη (Ala, A). Η μετάλλαξη αυτή εμποδίζει την αναγνώριση της αλληλουχίας αυτής από την κασπάση-3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Για το 1ο βήμα:

Flag-ProTa MUT Forward 1: 5'-A TAT AGA TCT ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG TCA GAC GCG GCA GTG-3'

Flag-ProTa MUT Reverse 1: 5'-GTC ATC CTC CTC GGT CTT CTG CTT CTT GGT GGC CAC ATC GTC ATC CTC ATC ATC CTC AGC TAC-3'

Flag-ProTa MUT Forward 2: 5'-GTA GCT GAG GAT GAT GAG GAT GAC GAT GTG GCC ACC AAG AAG CAG AAG ACC GAG GAG GAT GAC-3'

Flag-ProTa MUT Reverse 2: 5'-A TAT GAA TTC TTCCTTTTGCTGT CTA GTC ATC CTC CTC GGT CTT CTG CTT CTT GGT -3'

Για το 2ο βήμα:

Flag-ProTa MUT Forward 1: 5'-A TAT AGA TCT ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG TCA GAC GCG GCA GTG-3'

Flag-ProTa MUT Reverse 2: 5'-A TAT GAA TTC TTCCTTTTGCTGT CTA GTC ATC CTC CTC GGT CTT CTG CTT CTT GGT -3'

Το τελικό προϊόν απομονώθηκε απο πηκτική αгарόζης και εντέθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pcr2.1. Η απομόνωση του ενθέματος και η κλωνοποίησή του στον ρετροϊκό φορέα MSCV MIGR1 πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε για τις δύο προηγούμενες κατασκευές.

Όλες οι αντιδράσεις αλληλούχισης πραγματοποιήθηκαν στο DNA sequencing facility, Cancer Research Center, University of Chicago. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αλλά και στην αλληλούχιση των κατασκευών ήταν από την εταιρία Illumina-Invitrogen.

2.6 Αναπαραγωγή ρετροϊών της προθυμοσίνης α και των δύο μεταλλαγμάτων της.

Για την παρασκευή των ρετροϊών χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα συσκευασίας Platinum-E (PlatE). Η κυτταρική σειρά αυτή είναι μια σειρά 293T τροποποιημένων κυττάρων, που επιδεικνύουν μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής ρετροϊών από τις υπόλοιπες εμπορικά διαθέσιμες. Εκφράζουν, ήδη, σταθερά τα δομικά γονίδια του ιού gag, pol, ενν υπό τον υποκινητή EF1a και, για να εξασφαλιστεί η παραγωγή υψηλών τίτλων του ρετροϊού, υπό συνθήκες επιλογής με αντιβιοτικά, έχει εισαχθεί η αλληλουχία IRES (Internal Ribosome Entry Site) μεταξύ των δομικών γονιδίων του ιού και του γονιδίου που κωδικοποιεί τον δείκτη επιλογής (Morita et al. 2000).

Η διαμόλυνση των PlatE συσκευαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε είτε με το λιπίδιο Fugene 6 (Roche), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, είτε με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου, η οποία, συνοπτικά, έχει ως εξής:

Μία μέρα πριν τη διαμόλυνση, $4.5-5 \times 10^6$ κύτταρα PlatE, διασπείρονται σε τριβλία 10 cm², σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει τα αντιβιοτικά επιλογής (βλ. Ενότητα 2.2). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα αυτά είναι σε πυκνότητα διασποράς 60-70%. Πριν τη διαμόλυνση πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια, προετοιμάζεται το μείγμα DNA/CaCl₂/HBS ως εξής: 30 μg DNA επαναιωρείται σε νερό κυτταροκαλλιέργειας μαζί με 186 μl 2 M CaCl₂, σε τελικό όγκο 1.5 ml. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται 1.5 ml 2X HBS (Hepes Buffered Saline) pH 6.95-7.05 σε μορφή σταγόνων, ενώ πραγματοποιείται συνεχής ανάδευση. Αμέσως μετά, το μείγμα προστίθεται σε μορφή σταγόνων στο τριβλίο των κυττάρων PlatE.

Ακολούθησε αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας μετά από 12 ώρες και συλλογή του υπερκείμενου της καλλιέργειας μετά από 48 ώρες. Το υπερκείμενο αυτό, για

να συμπυκνωθεί, επώαστηκε με το αντιδραστήριο Lenti-X-Concentrator (Clontech), σε αναλογία 1 προς 4, για 4 ώρες στους 4⁰C. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε σε 1200 rpm για 45 λεπτά, επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό μέσο T λεμφοκυττάρων, (IMDM, 10% FCS, P/s, β-Me) και χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοποίηση των ιών.

2.7 Τιτλοποίηση των ρετροϊών

Κύτταρα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού, NIH 3T3, επιμολύνθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ρετροϊών, υπό την παρουσία της ουσίας **Polybrene** (hexadimethrine bromide) (Davis et al., 2004). Μετά από 24 ώρες ελέγχθηκε η επιτυχία της επιμόλυνσης με κυτταρομετρία ροής. Ο ρετροϊός MSCV MIGR1 εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, GFP. Υποθέτοντας πως κάθε GFP+ κύτταρο περιέχει τουλάχιστον ένα αντίγραφο του ρετροϊού, υπολογίζεται ο τίτλος του ιού. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ρετροϊών συγκέντρωσης 5-10x10³ ιϊκών σωματιδίων/μλ.

2.8 Κυτταρομετρία ροής.

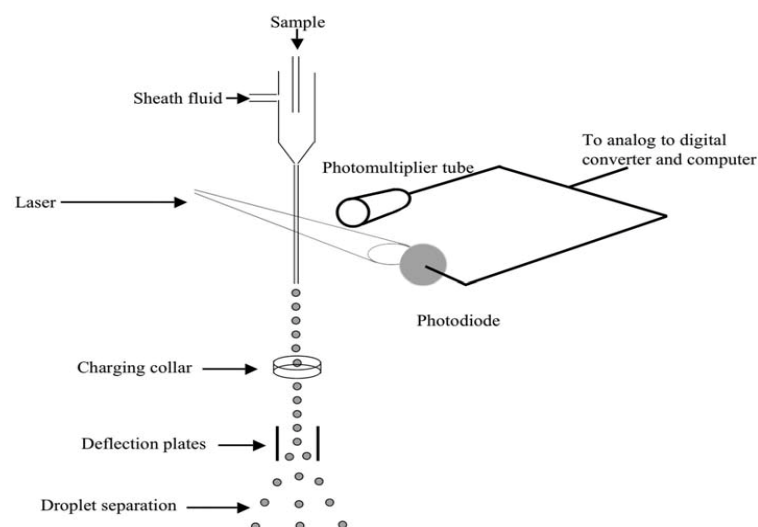
Η κυτταρομετρία ροής είναι ένα δυναμικό εργαλείο πολυπαραμετρικής ανάλυσης του φαινοτύπου και των χαρακτηριστικών του κυττάρου. Βασίζεται στις ιδιότητες σκεδασμού του φωτός και της εκπομπής φθορισμού των κυττάρων που αναλύονται. Ο φθορισμός αυτός οφείλεται σε φθορίζουσες ουσίες που είτε συνδέονται απευθείας στα συστατικά του κυττάρου (DNA, RNA, μεμβράνες, κλπ), είτε σε αντισώματα έναντι μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στο εσωτερικό του. Αρχικά, αναπτύχθηκε από ανοσολόγους, για τον διαχωρισμό διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών του ανοσολογικού συστήματος. Οι πρώτοι κυτταρομετρητές ροής που κατασκευάστηκαν είχαν αναλυτική ικανότητα ενός ή δύο παραμέτρων φθορισμού. Σήμερα, είναι εμπορικά διαθέσιμα συστήματα που επιτρέπουν την ανάλυση έως και 16 παραμέτρων ταυτόχρονα (Macey et al., 2007).

Όλες οι μορφές κυτταρομετρίας ροής βασίζονται σε νόμους της φυσικής, και πιο συγκεκριμένα αυτών της υδροδυναμικής ροής, της οπτικής και της ηλεκτρονικής (Watson, 1999). Το σύστημα ανιχνεύει κύτταρα ή σωματίδια καθώς αυτά διέρχονται σε μορφή εναιωρήματος από μία κυψελίδα ροής. Χαρακτηριστικό του συστήματος είναι η εφαρμογή της υδροδυναμικής εστίασης που επιτυγχάνει τη ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη. Καθώς μετακινούνται τα κύτταρα διαμέσου της κυψελίδας ροής μία δεσμίδα φωτός/laser προσπίπτει πάνω τους και ο σχετικός σκεδασμός του φωτός και η εκπομπή

φθορισμού τους καταγράφεται. Η ανάλυση και η διαφοροποίηση των κυττάρων βασίζεται στο μέγεθός τους, στην κοκκίωσή τους και στα φθορίζοντα μόρια που ίσως φέρουν. Καθώς, λοιπόν, η ακτίνα laser διαπερνά τα κύτταρα, το φως σκεδάζεται σε όλες τις κατευθύνσεις και ο σκεδασμός στην πρόσθια κατεύθυνση του άξονα του κυττάρου θεωρείται ανάλογος του μεγέθους του (Forward Scatter) (Brunsting et al., 1974). Ο σκεδασμός 90° του άξονα του κυττάρου (Side Scatter) θεωρείται ανάλογος της κοκκίωσης καθώς προκύπτει από την αντανάκλαση ή αλλαγή της πορείας της ακτίνας λόγω πρόσκρουσής της στα διάφορα συστατικά του κυττάρου (π.χ. πυρήνας, μιτοχόνδρια). Εάν τα κύτταρα είναι σημασμένα με φθορίζοντα αντισώματα ή χρωστικές, τότε μπορεί να επιτευχθεί και ανίχνευση μεμβρανικών υποδοχέων, ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, περιεχομένου DNA, ενζυμικής δραστηριότητας, αντιγόνων κ.ά. Όλες αυτές οι μετρήσεις των διαφόρων παραμέτρων πραγματοποιούνται ταυτόχρονα για κάθε κύτταρο, καθιστώντας έτσι δυνατή την ανίχνευση ενός ομογενούς πληθυσμού κυττάρων, μέσα σε έναν ετερογενή (Macey et al., 2007)

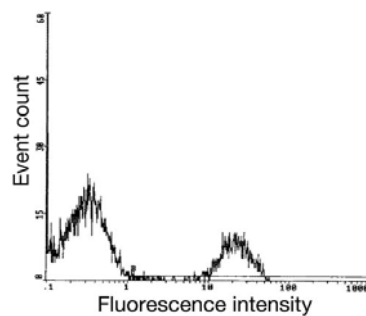
Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρεις λειτουργικές μονάδες (Σχήμα 2.1):

1. μία ή περισσότερες πηγές laser και ένα ανιχνευτικό σύστημα που αποτελείται από την κυψελίδα ροής και το οπτικό σύστημα,
2. ένα υδραυλικό σύστημα που ελέγχει τη διαδρομή του δείγματος μέσα στο ανιχνευτικό σύστημα και
3. έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που συλλέγει όλα τα δεδομένα και πραγματοποιεί τις αναλύσεις των ηλεκτρικών σημάτων που προκύπτουν από το ανιχνευτικό σύστημα.

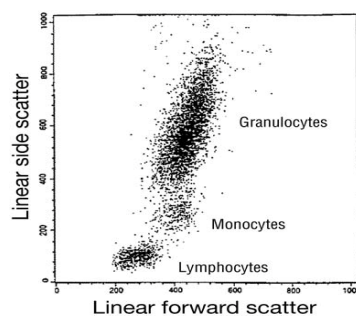


Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων ενός κυτταρομετρητή ροής

Η διέγερση και ο φθορισμός των κυττάρων πραγματοποιείται καθώς αυτά διαπερνούνται από την ακτίνα laser και καταγράφεται από το οπτικό σύστημα ανίχνευσης. Στη συνέχεια, το σήμα αυτό μετατρέπεται σε ηλεκτρικό παλμό, ο οποίος με τη σειρά του μετατρέπεται σε ένα αριθμητικό σήμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Επομένως, η ποσότητα και η ένταση του φθορισμού καταγράφεται από το σύστημα του ηλεκτρονικού υπολογιστή και παρουσιάζεται ως κατανομή της συχνότητας, που μπορεί να είναι μίας παραμέτρου (Σχήμα 2.2), δύο παραμέτρων (Σχήμα 2.3) αλλά και περισσότερων. Τα ιστογράμματα μίας παραμέτρου, παρέχουν πληροφορίες για το διαχωρισμό των κυττάρων ενός πληθυσμού σύμφωνα με την ένταση του φθορισμού τους (Σχήμα 2.2). Τα ιστογράμματα δύο παραμέτρων, για παράδειγμα της παραμέτρου πρόσθιου σκεδασμού και της παραμέτρου πλαγίου σκεδασμού, επιτρέπουν την ταυτοποίηση των διαφόρων κυτταρικών τύπων μέσα σε ένα ετερογενές μείγμα (Σχήμα 2.3) (Macey et al., 2007).



Σχήμα 2.2: Ιστόγραμμα μίας παραμέτρου, του φθορισμού και του αριθμού των κυττάρων, στο οποίο διακρίνεται η κατανομή των κυττάρων ανάλογα με την ένταση του φθορισμού τους.



Σχήμα 2.3: Ιστόγραμμα- δύο παραμέτρων- του πρόσθιου και πλαγίου σκεδασμού. Παρατηρείται η χαρακτηριστική κατανομή τριών υποπληθυσμών λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος, σύμφωνα με το μέγεθος και την κοκκίωσή τους.

2.9 Απομόνωση θύμου αδένος από αγρίου τύπου ποντίκια C57/BL6.

Ένα αγρίου τύπου ποντίκι C57/BL6 ηλικίας 1-2 μηνών, ανά πείραμα, θυσιάστηκε και αφαιρέθηκε από αυτό ο θύμος αδένος. Στη συνέχεια το όργανο πολτοποιήθηκε μέσα σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων και 2% εμβρυικού ορού βοός και προκλήθηκε διαπέρασή του από φίλτρο 40 μ M (cell strainer, BD Biosciences) για να απομακρυνθούν τα συσσωματώματα κυττάρων και τυχόν υπολείματα από παρακείμενους ιστούς. Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν, διατηρούνταν σε ελεύθερες παθογόνων συνθήκες στο Κέντρο Έρευνας Πειραματοζώων (Animal Research Center) του Πανεπιστημίου του Σικάγο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο #71880 της Επιτροπής φροντίδας και χρήσης πειραματοζώων του Ινστιτούτου (Institutional Animal Care and Use Committee). Η χρήση και η θυσία των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους κανονισμούς που προαναφέρθηκαν.

2.10 Απομόνωση αδιαφοροποίητων θυμοκυττάρων

Το ολικό εκχύλισμα των θυμοκυττάρων που είχε απομονωθεί, επαναιωρήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, Phosphate Buffered Saline) με 2% εμβρυικό ορό βοός (FCS) και σε αυτό προστέθηκε, σε αραιώση 1:20, διάλυμα αντισώματος έναντι των Fcγ υποδοχέων που καλύπτουν την επιφάνεια αυτών των κυττάρων (Fc blocking buffer). Τα κύτταρα επώαστηκαν με το αντίσωμα 15 λεπτά στους 0 °C, έτσι ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης. Στη συνέχεια, εκπλύθηκαν και επώαστηκαν με τα παρακάτω αντισώματα, για 15 λεπτά στους 0 °C: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD19, anti-Gr-1, anti-NK1.1, anti-Ter 119 και anti-TCR $\gamma\delta$. Τα αντισώματα αυτά ήταν σημασμένα με βιοτίνη. Ακολούθησε έκπλυση και επώαση με μαγνητικά σφαιρίδια αβιδίνης για 15 λεπτά στους 0 °C. Τέλος, ακολούθησε διαχωρισμός των κυττάρων που είχαν δεσμεύσει τα σφαιρίδια αβιδίνης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαχωρισμού κυττάρων AutoMACS της εταιρίας Miltenyi Biotech. Πολύ συνοπτικά, το διάλυμα των κυττάρων διαπερνά στήλες στις οποίες επιβάλλεται μαγνητικό πεδίο. Έτσι, τα κύτταρα που έχουν δεσμεύσει τα μαγνητικά σφαιρίδια αβιδίνης κατακρατούνται στην κολώνα και εκλούνται αρχικά αυτά που δεν έχουν δεσμεύσει τα σφαιρίδια. Στη συνέχεια, σε διαφορετική έξοδο του οργάνου, εκλούνται και τα κύτταρα που είχαν κατακρατηθεί στις κολόνες. Με τον τρόπο αυτό, στην συγκεκριμένη περίπτωση, διαχωρίζονται όλα τα διαφοροποιημένα κύτταρα, αυτά δηλαδή που έχουν δεσμεύσει τα παραπάνω αντισώματα,

από τα αδιαφοροποίητα (Lineage negative) κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του διαχωρισμού. Δείγμα των κυττάρων πριν το διαχωρισμό, αλλά και δείγμα των αδιαφοροποίητων κυττάρων (Lin negative), που συλλέχθηκαν μετά το διαχωρισμό, επώαστηκαν με το ίδιο μείγμα αντισωμάτων σημασμένων με βιοτίνη (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD19, anti-Gr-1, anti-NK1.1, anti-Ter 119 και anti-TCR $\gamma\delta$), για 15 λεπτά στους 0 °C. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων και επώαση με σφαιρίδια αβιδίνης σημασμένα με τη φθορίζουσα ουσία APC (Allophycocyanin), σε συνθήκες σκότους. Τέλος, τα κύτταρα εκλούστηκαν δύο φορές με διάλυμα φωσφορικών και 2% εμβρυικού ορού βοός και, αφού επαναιωρήθηκαν σε 300 μ l του ίδιου διαλύματος, υποβλήθηκαν σε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Η ανάλυση αυτή, σε όλες τις περιπτώσεις, έδειξε πως τα περισσότερα από τα κύτταρα, μετά το διαχωρισμό, ήταν αρνητικά όσον αφορά το φθορισμό της ουσίας APC. Επομένως το τελικό δείγμα περιείχε ως επί το πλείστον αδιαφοροποίητα κύτταρα. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα κύτταρα ήταν επαναιωρημένα σε διάλυμα PBS, 2% FCS.

Τα συγκεκριμένα πειράματα κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας ροής του Πανεπιστημίου του Σικάγο (Flow Cytometry Facility, University of Chicago), χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή ροής FACSCanto, της εταιρίας BD Biosciences. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή είναι το FlowJo Ver 9.2.

2.11 Μόλυνση θυμοκυττάρων με τους ρετροϊούς.

10^5 αδιαφοροποίητα θυμοκύτταρα αμέσως μετά το διαχωρισμό φυγοκεντρήθηκαν και, αφού επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό, τοποθετήθηκαν σε τριβλία καλλιέργειας επιφάνειας 2 cm^2 . Σε τελικό όγκο θρεπτικού υλικού 0.5 ml προστέθηκε το διάλυμα του ρετροϊού (η αναλογία κυττάρων : ιϊκών σωματιδίων ήταν 1 : 20-30) και 8 $\mu\text{g/ml}$ από το κατιονικό πολυμέρες Polybrene (Sigma). Το πολυμέρες αυτό αυξάνει την ικανότητα μόλυνσης του ρετροϊού, καθώς εξουδετερώνει την άπωση λόγω φορτίου, μεταξύ της κάψουλας του ιού και του σιαλικού οξέος στην επιφάνεια του κυττάρου (Davis et al., 2004). Τα τριβλία, στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν για 1.5 ώρες σε 2200 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο για 8 ώρες, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37°C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας

και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των τριβλίων και αλλαγή του θρεπτικού υλικού σε θρεπτικό υλικό συν-καλλιέργειας (Υλικά και Μέθοδοι 2.2, κύτταρα PlatE) Τέλος, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε διασπορά τους σε τριβλία όπου προυπήρχε καλλιέργεια των κυττάρων στρώματος OP9-DL1.

2.12 Το σύστημα συν-καλλιέργειας OP9-DL1

Τα T λεμφοκύτταρα, όπως όλα τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs), προέρχονται από το μυελό των οστών. Ωστόσο, χρειάζονται το εξειδικευμένο μικρο-περιβάλλον του θύμου αδένου για να αναπτυχθούν. Σήματα που προέρχονται από τα κύτταρα στρώματος του θύμου οδηγούν τη διαφοροποίηση των πρόγονικών κυττάρων σε T λεμφοκύτταρα (de Rooij et al., 2007). Μέχρι πρόσφατα η επιστημονική κοινότητα θεωρούσε απαραίτητη την τρισδιάστατη δομή του θύμου για τη διαφοροποίηση των HSCs σε T λεμφοκύτταρα (Hare et al., 1999). Έτσι, για τη μελέτη της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων αναπτύχθηκαν οι καλλιέργειες εμβρυικών θύμων αδένων (Fetal Thymus Organ Cultures, FTOCs) (Jenkinson et al., 1982). Το 2002, όμως, μία ερευνητική ομάδα ανέπτυξε ένα άλλο σύστημα καλλιέργειας και απέδειξε ότι η διαφοροποίηση των T θυμοκυττάρων δεν προ-απαιτεί ένα τρισδιάστατο περιβάλλον (Schmitt et al., 2002). Αυτή η καινούργια ανακάλυψη οφείλεται σε δύο προηγούμενα ευρήματα: α) ότι η κυτταρική σειρά στρώματος OP9 υποστήριζε τη διαφοροποίηση όλων των αιματοποιητικών γενεαλογικών σειρών, εκτός των T κυττάρων (Nakano et al., 1994, Cho et al., 1999) και β) ότι η σηματοδότηση μέσω του Notch υποδοχέα, του οποίου οι συνδέτες εκφράζονται στον θύμο (Felli et al., 1999, Kaneta et al., 2000), απαιτούνταν για την επαγωγή της διαφοροποίησης των HSCs αποκλειστικά σε T κύτταρα, εις βάρος άλλων γενεαλογικών σειρών (π.χ. B κύτταρα) (Radtke et al., 2004). Η κυτταρική σειρά στρώματος OP9-DL1 κατασκευάστηκε από κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών (OP9), τα οποία τροποποιήθηκαν γενετικά ώστε να εκφράζουν εκτοπικά το συνδέτη του υποδοχέα Notch, Delta-like-1 (DL1). Τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την διαφοροποίηση σε T λεμφοκύτταρα των HSCs του μυελού των οστών ποντικών, των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικών (Schmitt et al., 2004b, Schmitt et al., 2002, Radtke et al., 2004), αλλά και των ανθρώπινων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών (De Smedt et al., 2004, La Motte-Mohs et al., 2005).

2.13 Συν-καλλιέργεια θυμοκυττάρων και κυττάρων OP9-DL1.

Μία μέρα πριν την έναρξη της συν-καλλιέργειας 2×10^4 OP9-DL1 κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία επιφάνειας 3.8 cm^2 , στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό (Υλικά και μέθοδοι 2.2 κύτταρα OP9-DL1). Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε διασπορά των μολυσμένων με τους ρετροϊούς αδιαφοροποίητων θυμοκυττάρων στο τριβλίο της καλλιέργειας OP9-DL1 κυττάρων. Στο θρεπτικό υλικό της συν-καλλιέργειας προστέθηκαν 5 ng/ml FLt3L και 5 ng/ml IL-7 και 5 ng/ml SCF. Η συν-καλλιέργεια των θυμοκυττάρων με τα κύτταρα στρώματος μυελού των οστών ποντικού, OP9-DL1, διατηρήθηκε σε επωαστικό κλίβανο για 5 ημέρες.

2.14 Έλεγχος της διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Μετά από 24 ώρες συν-καλλιέργειας των θυμοκυττάρων με τα κύτταρα στρώματος μυελού των οστών ποντικού, OP9-DL1, συλλέχθηκε δείγμα θυμοκυττάρων (το 1/10 του συνολικού πληθυσμού). Το δείγμα αυτό αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής ως προς τους δείκτες της διαφοροποίησης CD44, CD25, CD4, CD8, αλλά και ως προς τα επίπεδα της απόπτωσής τους. Συνοπτικά, η διαδικασία είχε ως εξής: Το κυτταρικό εναιώρημα διαπεράστηκε από φίλτρο διαμέτρου πόρου $40 \mu\text{M}$ (cell strainer, BD Biosciences), για να διαχωριστεί από τα OP9-DL1 κύτταρα που πιθανώς συλλέχθηκαν ταυτόχρονα από την συν-καλλιέργεια. Στη συνέχεια, εκλούστηκαν δύο φορές με διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και 2% εμβρυικό ορό βοός (FCS), και επαναιωρήθηκαν σε $100 \mu\text{l}$ του ίδιου διαλύματος. Ακολούθως, στο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκαν τα εξής αντισώματα σημασμένα με τις αντίστοιχες φθορίζουσες ουσίες: anti-CD44-PECy7, anti-CD25-APC, anti-CD4-APCCy7 και anti-CD8-PB. Πραγματοποιήθηκε επώαση των αντισωμάτων με τα κύτταρα για 20 λεπτά στους 4°C , σε συνθήκες σκότους, και στη συνέχεια έκλουσή τους δύο φορές με διάλυμα φωσφορικών με 2% FCS.

Μετά την τελευταία έκλυση, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα δέσμευσης ανεξίνης V (Annexin V Binding Buffer), στο οποίο προστέθηκαν τα αντιδραστήρια ανεξίνη V σημασμένη με φυκοερυθρίνη (Annexin V-PE), αλλά και 7-αμινοακτινομυκίνης (Aminoactinomycin D, 7AAD). Η ανεξίνη V χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων, επειδή συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη που έχει μετατοπιστεί στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας. Η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης προηγείται του

κατακερματισμού του DNA και, συνεπώς, επιτρέπει την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της απόπτωσης. Η 7- αμινοακτινομυκίνη είναι μία φθορίζουσα χημική ουσία, η οποία δεν διαπερνά την ανέπαφη κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο, όταν αποκτήσει πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου, δεσμεύεται σε περιοχές του DNA πλούσιες σε νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης. Τα κύτταρα, μετά την επώασή τους με τα δύο αυτά αντιδραστήρια επί 15 λεπτά στους 4°C, σε συνθήκες σκότους, εκπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 300 μl διαλύματος φωσφορικών και 2% εμβρυικού ορού βοός. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλήφθηκε και την 5^η ημέρα μετά την έναρξη της συν-καλλιέργειας, με τη μόνη διαφορά ότι συλλέχθηκε ολόκληρος ο πληθυσμός των θυμοκυττάρων που είχαν αναπτυχθεί και όχι μέρος αυτών, όπως την 1^η ημέρα της συν-καλλιέργειας.

Τα συγκεκριμένα πειράματα κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής του Πανεπιστημίου του Σικάγο (Flow Cytometry Facility, University of Chicago), χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή ροής LSR II, της εταιρίας BD Biosciences. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή είναι το FlowJo Ver 9.2.

2.15 Έλεγχος των επιπέδων της απόπτωσης σε HeLa κύτταρα με κυτταρομετρία ροής.

10⁵ καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa), συλλέχθηκαν από κάθε δείγμα και εκπλύθηκαν με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS. Στη συνέχεια, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα δέσμευσης ανεξίνης V (Annexin V Binding Buffer), στο οποίο προστέθηκαν τα αντιδραστήρια ανεξίνης V συζευγμένης με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (Annexin V-FITC), αλλά και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI). Το ιωδιούχο προπίδιο είναι μία φθορίζουσα χημική ουσία, η οποία δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, αλλά όταν αποκτήσει πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου δεσμεύεται μη ειδικά στο DNA αλλά και στο RNA. Τα κύτταρα μετά την επώασή τους με τα δύο αυτά αντιδραστήρια επί 20 λεπτά, σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου, εκπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 1 ml διαλύματος φωσφορικών. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Τα πειράματα αυτά της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,

χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή ροής CyFlow-ML της εταιρίας Partec. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή είναι το FlowJo Ver 9.2.

2.16 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Για τη μέτρηση συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι BCA (BCATM Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce) και Bradford (αντιδραστήριο Bradford της εταιρίας Biorad).

Ο χημικός μηχανισμός της πρώτης μεθόδου στηρίζεται στην αντίδραση Biuret, σύμφωνα με την οποία ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, που περιέχουν δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς, σε αλκαλικές συνθήκες δημιουργούν σύμπλοκα με ιόντα Cu^{+2} . Στο αλκαλικό αυτό περιβάλλον τα ιόντα Cu^{+2} ανάγονται σε Cu^{+1} . Τα ανηγμένα κατιόντα χαλκού αντιδρούν με το βικινχρωμικό οξύ, παράγοντας ένα έντονο μπλε-πράσινο χρώμα, το οποίο απορροφά στα 540nm.

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 έχει κόκκινο χρώμα, ως ελεύθερη, ενώ ως συνδεδεμένη με πρωτεΐνες έχει μπλε χρώμα, που απορροφά στα 595nm. Δεν επηρεάζεται από τις περισσότερες ενώσεις που δημιουργούν πρόβλημα στη μέθοδο BCA (ουρία, μερκαπτάνες, αντιδραστήρια θειολών, EDTA κ.άλ.), αλλά επηρεάζεται από υψηλές συγκεντρώσεις (1%) απορρυπαντικών, όπως τα Triton X-100 και SDS. Συνοπτικά, κυτταρικό εκχύλισμα αραιώθηκε σε διάλυμα 20% αντιδραστηρίου Bradford σε νερό και φωτομετρήθηκε. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

2.17 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Κυτταρικά εκχυλίσματα ελήφθησαν με διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS) και στη συνέχεια επώστηκαν σε διάλυμα λύσης κυττάρων που περιείχε 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 0.1% Triton-X-100 και 0.1% Sodium deoxycholate. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.200 x g για 30 λεπτά απ' όπου συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Οι πρωτεΐνες κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, υπό αναγωγικές συνθήκες. Αρχικά, στα κυτταρικά εκχυλίσματα προστέθηκε 1xLaemli sample buffer, σε τελική συγκέντρωση 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2,3% SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, παρουσία 100 mM DTT, για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, και τα δείγματα υπέστησαν βρασμό για 5 λεπτά στους 100°C. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες

των πρωτεϊνών, με λόγο ένα περίπου μόριο SDS για κάθε δύο αμινοξέα. Το γεγονός αυτό δίνει στο σύμπλοκο πρωτεΐνης/SDS ένα μεγάλο αρνητικό καθαρό φορτίο που είναι σχεδόν ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης και πολύ μεγαλύτερο από το φυσικό φορτίο της, το οποίο έτσι θεωρείται ασήμαντο. Έτσι, στους πόρους του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, που λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, οι πρωτεΐνες κινούνται προς το θετικό πόλο και διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους.

Η παρασκευή των πηκτών (πηκτή επιστοιβαξης, πηκτή διαχωρισμού), η σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και οι συνθήκες αυτής, έγιναν σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*.

2.18 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Maniatis *et.al.*, 1989). Το ρυθμιστικό διάλυμα, μέσα στο οποίο έγινε η μεταφορά, περιείχε 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-base και 20% μεθανόλη. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (0,1% σε οξικό οξύ 1%) για 1 λεπτό και ξεβάφτηκαν με νερό. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western (1 M Tris pH 7,2, 0,1% Tween 20, και 150 mM NaCl) είτε σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα, για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Ακολούθησε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα είτε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 4°C ολονυχτίως σε διάλυμα Western–2% ζελατίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα Western και οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα, συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη, σε διάλυμα Western. Τέλος, ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως αναφέρεται παραπάνω και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

2.19 Ανοσοαποτύπωση κατά Western της προθυμοσίνης α

Το πήγμα μετά την ηλεκτροφόρηση και πριν από τη διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς εκπλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 20 mM pH 4.5.

(διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς) τρεις φορές, επί 5 λεπτά. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran, Whatman), πριν χρησιμοποιηθούν, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 0.25 M ανθρακικού νατρίου, 0.25 M διττανθρακικού νατρίου, 7.5% κ.ό. βινυλο-σουλφόνης και 12% κ.ό. διμεθυλοφορμαμίδιου pH 10 για μία ώρα. Έπειτα πλύθηκαν με νερό 3x5min και μετά ακολουθούσε επώαση τους σε διάλυμα αιθυλοδιαμίνης 1% κ.ό. για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες αφού πλύθηκαν και πάλι με νερό, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 0.25 M ανθρακικού νατρίου, 0.25 M διττανθρακικού νατρίου, 1% γλουτεραλδεΐδης, για 15 λεπτά και ακολούθησε έκπλυσή τους με νερό (τρεις φορές επί 10 λεπτά).

Μετά από την προετοιμασία του πηγματος και της μεμβράνης ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά της ProTa από το πηγμα στη μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου για 3.5 ώρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 20mM pH 4.5, με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος 90mA.

2.20 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

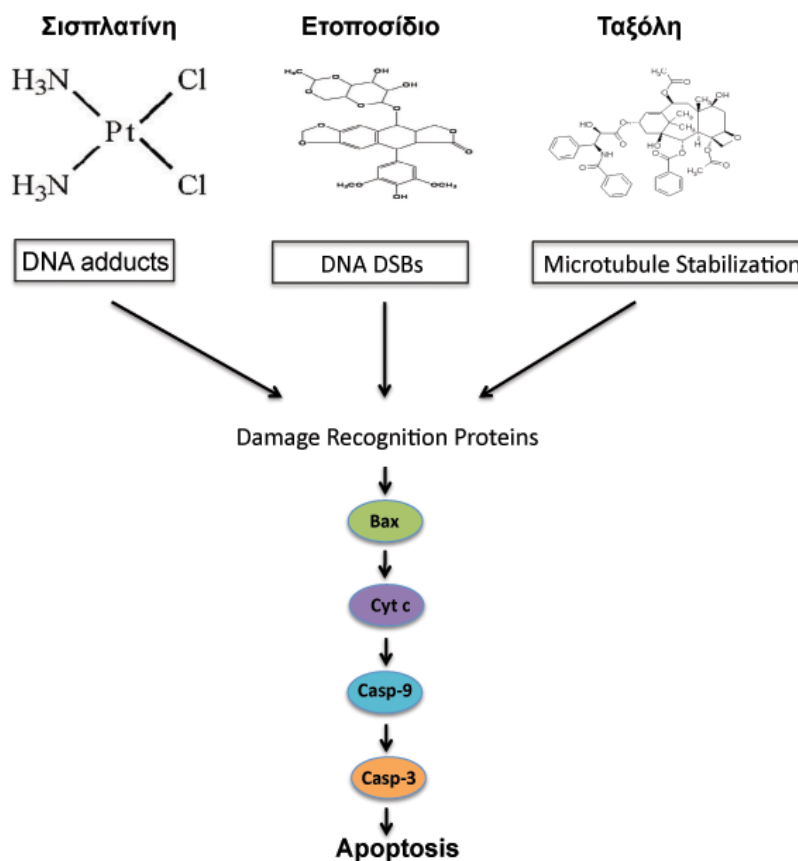
Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες διαμέτρου 1 cm και στη συνέχεια επώαστηκαν στις διάφορες συνθήκες ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Με το πέρας της επώασης έγινε πλύση των κυττάρων μια φορά με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3.7 % για 20 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με 50 mM NH₄Cl (σε PBS) για 15 λεπτά για τη δέσμευση των ελεύθερων ομάδων αλδεΐδης, που υπάρχουν στο διάλυμα μονιμοποίησης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση με Triton 0.1 % (σε PBS) για 2 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με 10 % FCS (που είχε πριν υπερφυγοκεντρηθεί) για 1 ώρα προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, εφόσον έγινε πλύση των κυττάρων τέσσερις φορές με PBS, γινόταν επώαση με το διάλυμα του 2ου αντισώματος. Τα δευτερογενή αντισώματα κόνικλου ή ποντικού χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 10 % (10% FCS). Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή

εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561 και λογισμικό Leica TCS.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη της αποπτωτικής απόκρισης καρκινικών κυττάρων μετά από την επίδραση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Για τη μελέτη της απόπτωσης χρησιμοποιήσαμε καρκινικά κύτταρα του επιθηλίου της μήτρας (HeLa) και τρία διαφορετικά φάρμακα: τη σισπλατίνη, το ετοποσίδιο και την ταξόλη. Τα φάρμακα αυτά επάγουν την έναρξη της απόπτωσης με διαφορετικούς μηχανισμούς (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής των φαρμάκων σισπλατίνη, ετοποσίδιο και ταξόλη. Οι μηχανισμοί δράσης των τριών φαρμάκων συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης.

3.1.1 Επαγωγή της απόπτωσης με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο σισπλατίνη.

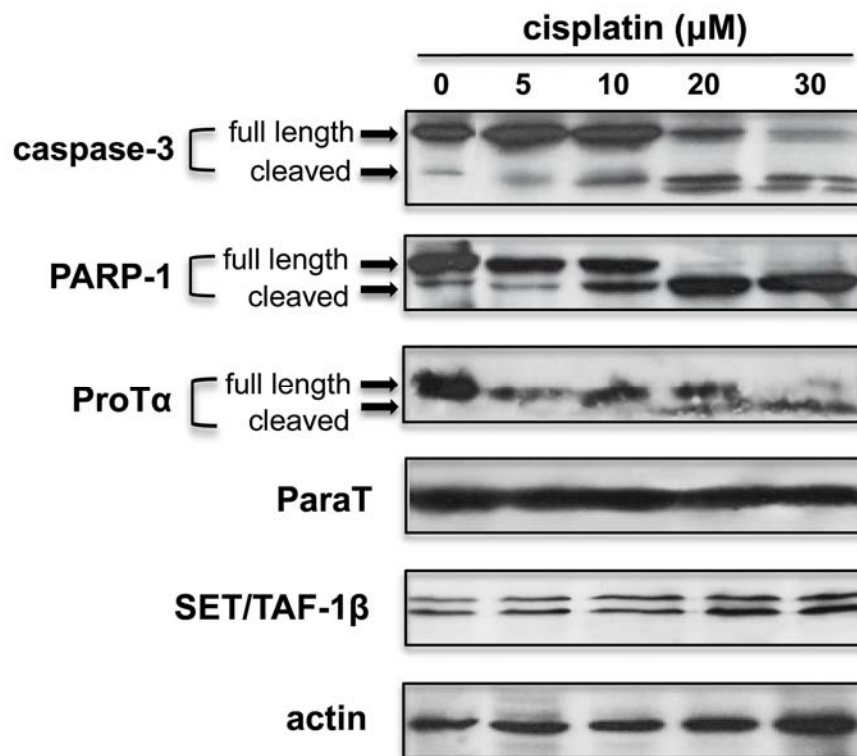
Η μελέτη της αποπτωτικής διαδικασίας που επάγει η σισπλατίνη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας καρκινικά κύτταρα (HeLa) που επώαστηκαν με αυξανόμενες ποσότητες

του φαρμάκου. Ακολούθησε (ανοσοαποτύπωση) έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών-αναδιοργανωτών της χρωματίνης SET/TAF-1β, προθυμοσίνη α (ProTα), παραθυμοσίνη (ParaT), καθώς επίσης και πρωτεϊνών-δεικτών της αποπτωτικής διαδικασίας.

Η παραθυμοσίνη είναι μία πρωτεΐνη που επίσης ανήκει στην κατηγορία των όξινων πυρηνικών πρωτεϊνών με ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Απομονώθηκε, αρχικά, από το θύμο αδένος και, εξαιτίας της δομικής της ομολογίας με την προθυμοσίνη α, ονομάστηκε παραθυμοσίνη (Haritos et al., 1985). Η παραθυμοσίνη δεσμεύεται με τη συνδετική ιστόνη H1 *in vitro* και μεταβάλλει το βαθμό αλληλεπίδρασης της ιστόνης με τα νουκλεοσώματα (Martic et al., 2005). Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την πρωτεΐνη αυτή ως μάρτυρα στο σύστημά μας, με σκοπό να αξιολογήσουμε την εξειδίκευση της δράσης της προθυμοσίνης α.

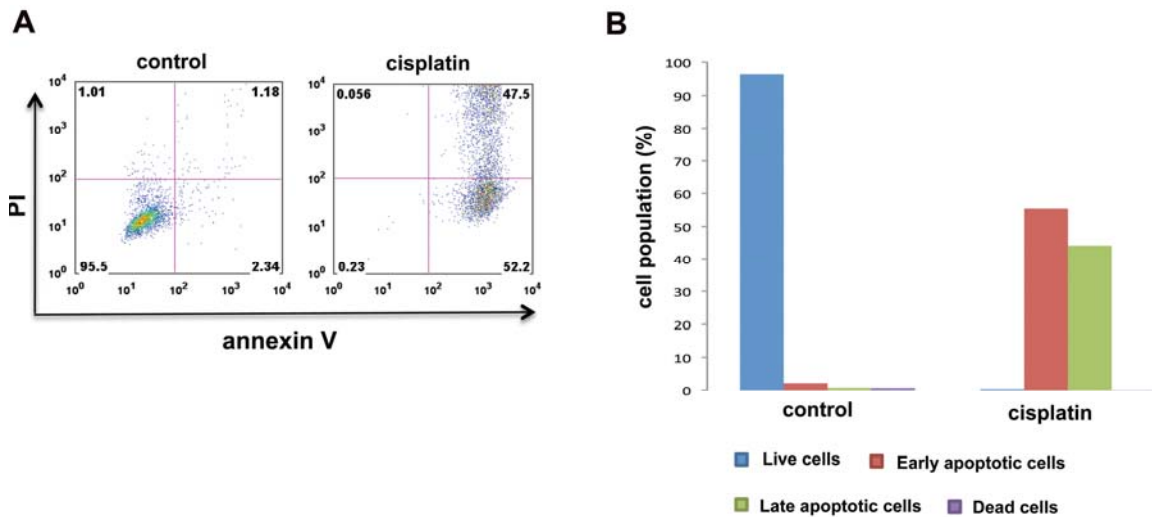
Οι πρωτεΐνες-δείκτες της αποπτωτικής διαδικασίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι η κασπάση-3 (Caspase-3) και η PARP-1 (Poly-ADP-Ribose Polymerase-1). Η μετατροπή της προκασπάσης-3 σε ενεργό ένζυμο, μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσής της από την κασπάση-9, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα για την έναρξη της απόπτωσης. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη κασπάση-3 καταλύει την περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση πολλών πρωτεϊνών-υποστρωμάτων της, οι οποίες φέρουν την ειδική αλληλουχία αναγνώρισης από την πρωτεάση αυτή. Η PARP-1 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που συμμετέχει σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και αποτελεί χαρακτηριστικό υπόστρωμα της κασπάσης-3.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2, η επώαση των κυττάρων με σισπλατίνη οδήγησε στη σχάση της κασπάσης-3 και της PARP με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, παρατηρήθηκε η σχάση της προθυμοσίνης α σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (10 μM) σισπλατίνης και η εμφάνιση μιας «αποπτωτικής» μορφής της. Η μορφή αυτή έχει προταθεί ότι προκύπτει από την περιορισμένη πρωτεόλυσή της, από την κασπάση-3 (Enkemann et al., 2000). Αντίθετα, τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών SET/TAF-1β και ParaT δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την επαγωγή της απόπτωσης (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Επαγωγή της απόπτωσης με σισπλατίνη. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 18 h με 5, 10, 20 και 30 μM σισπλατίνης και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της κασπάσης-3, PARP-1, ProTa, ParaT και SET/TAF-1 β . Η ProTa ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα anti- $\alpha 1$.

Για το χαρακτηρισμό των αποπτωτικών πληθυσμών που δημιουργούνται μετά την επίδραση της σισπλατίνης στα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση των κυττάρων με ανεξίνη V (Annexin V) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η επώαση με 30 μM σισπλατίνη έχει ως αποτέλεσμα το 47.5% των κυττάρων να βρίσκεται στην όψιμη αποπτωτική φάση (late apoptotic) και το 52.2 % στην πρώιμη αποπτωτική φάση (early apoptotic) (Εικόνα 3.3 A και B). Ολόκληρος, δηλαδή, ο πληθυσμός αποτελείται από αποπτωτικά κύτταρα, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα επίπεδα ενεργοποίησης της κασπάσης-3 σε αυτή τη συγκέντρωση του φαρμάκου (Εικόνα 3.2).

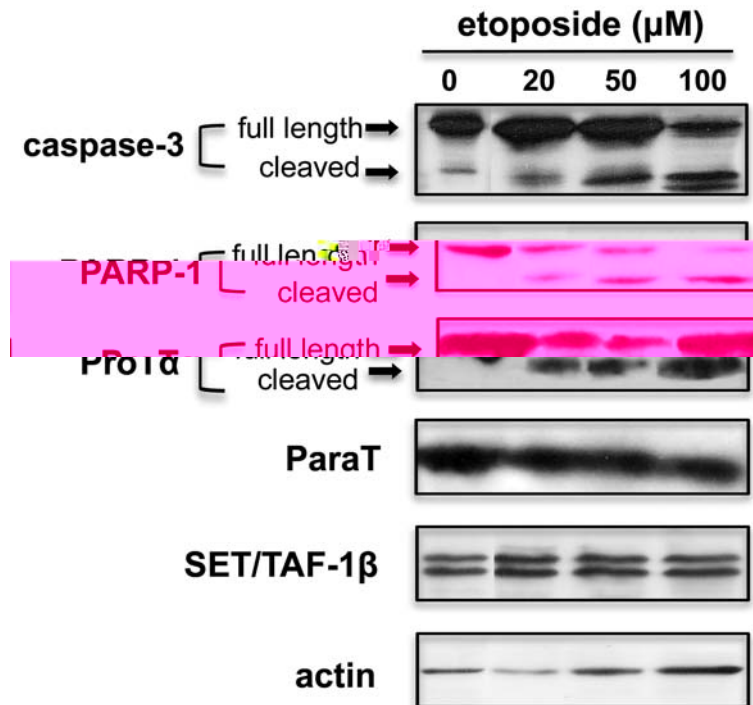


Εικόνα 3.3 Ποσοτικός έλεγχος της επαγωγής της απόπτωσης με σισπλατίνη: (A) Κύτταρα HeLa επώαστηκαν με 30 μM σισπλατίνης για 18 ώρες, ακολούθησε χρώση με Annexin V και PI και χαρακτηρισμός των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής. (B) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

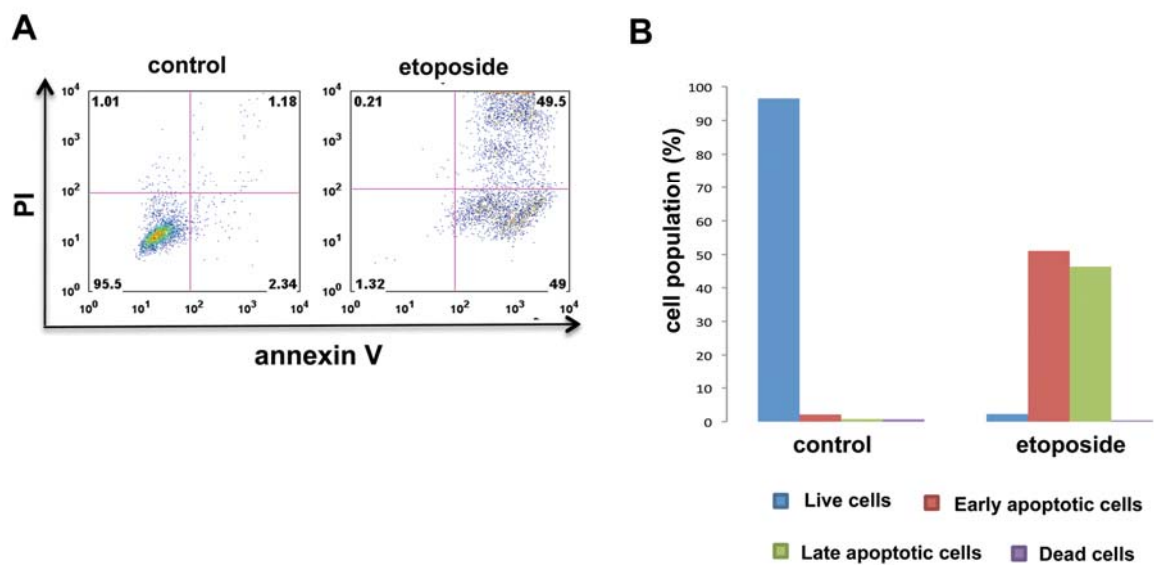
3.1.2 Επαγωγή της απόπτωσης με το γημειοθεραπευτικό φάρμακο ετοποσίδιο.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η απόπτωση κυττάρων HeLa που επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ετοποσίδιου. Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών κασπάση-3 και PARP-1, ενώ παράλληλα ελέγχθηκαν τα πρότυπα έκφρασης της προθυμοσίνης α , της παραθυμοσίνης και της SET/TAF-1 β (Εικόνα 3.4). Για τον προσδιορισμό των αποπτωτικών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση των κυττάρων με ανεξίνη V (Annexin V) και ιωδιούχο προπίδιο (PI) (Εικόνα 3.5 A, B). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δείχνουν ότι η επώαση των κυττάρων με ετοποσίδιο οδήγησε στη σχάση της κασπάσης-3 και της PARP-1, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.4). Επίσης, παρατηρήσαμε ότι το πρότυπο έκφρασης της προθυμοσίνης α αλλάζει στην απόπτωση που προκαλείται από το ετοποσίδιο, καθώς εμφανίζεται και η «αποπτωτική» της μορφή. Αντίθετα, η παραθυμοσίνη και η SET/TAF-1 β φαίνεται ότι δεν αποτελούν υποστρώματα των κασπασών στο σύστημά μας. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι, σε συγκέντρωση 100 μM ετοποσίδιου, το 49.5% του πληθυσμού των κυττάρων βρίσκεται στην όψιμη αποπτωτική φάση και το 49% στην πρώιμη αποπτωτική φάση (Εικόνα 3.5 A και B). Παρατηρήσαμε επίσης ότι η πρωτεολυτική σχάση της κασπάσης-3 και της PARP-1, σε αυτή τη συγκέντρωση

ετοποσιδίου (100 μM), είναι αρκετά έντονη (Εικόνα 3.4), ώστε να δικαιολογεί την κατανομή των αποπτωτικών πληθυσμών (Εικόνα 3.5 Α).



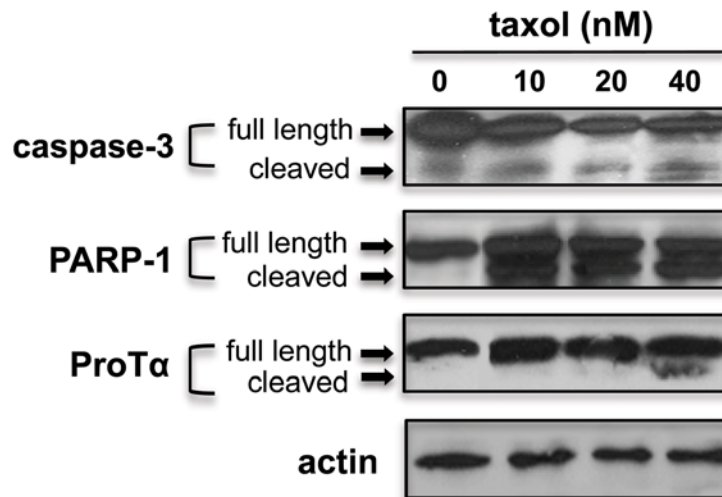
Εικόνα 3.4. Επαγωγή της απόπτωσης με ετοποσίδιο. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 18 h με 0, 20, 50, και 100 μM ετοποσίδιο. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της κασπάσης-3, PARP-1, ProTa, SET/TAF-1 β και ParaT. Η ProTa ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα anti- $\alpha 1$.



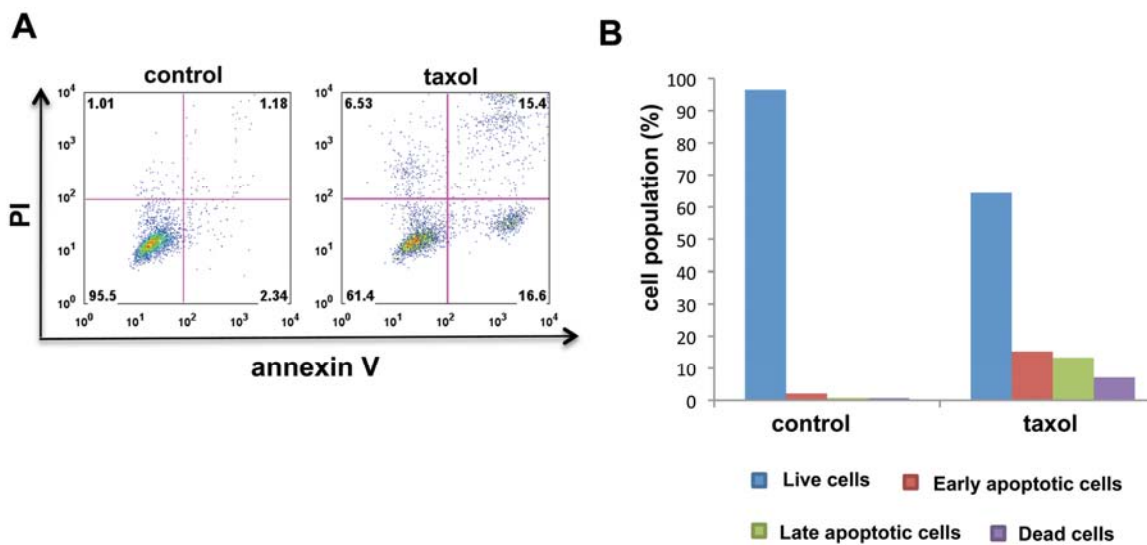
Εικόνα 3.5 Ποσοτικός έλεγχος της επαγωγής της απόπτωσης με ετοποσίδιο: (A) Κύτταρα HeLa επώαστηκαν με 100 μM ετοποσίδιο για 18 ώρες, ακολούθησε χρώση με Annexin V και PI και προσδιορισμός των αποπτωτικών κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής. (B) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

3.1.3 Επαγωγή της απόπτωσης με το γημειοθεραπευτικό φάρμακο ταξόλη.

Ακολουθώντας την παραπάνω πειραματική διαδικασία, μελετήσαμε την επίδραση του φαρμάκου ταξόλη στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων HeLa. Η επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου προκάλεσε τη σχάση των δύο πρωτεϊνών-δεικτών της απόπτωσης, κασπάση-3 και PARP-1, καθώς και της προθυμοσίνης α (στη συγκέντρωση των 40 nM) (Εικόνα 3.6). Η κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι, επώαζοντας τα κύτταρα με 50 nM ταξόλης, το 21.2% του πληθυσμού των κυττάρων βρίσκεται στην όψιμη αποπτωτική φάση, το 8.05% στην πρώιμη αποπτωτική φάση, το 9.52% στη φάση των νεκρωτικών κυττάρων και το υπόλοιπο 61.3% εντοπίζεται στη φάση των ζωντανών κυττάρων (Εικόνα 3.7 A και B). Σε αυτή την περίπτωση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και η περιορισμένη πρωτεόλυση της PARP-1, στη συγκέντρωση των 40 nM, δεν ήταν τόσο έντονη ώστε να οδηγήσει ολόκληρο τον πληθυσμό των κυττάρων στην απόπτωση (Εικόνα 3.7 A). Λόγω της διαφορετικής κατανομής των αποπτωτικών πληθυσμών μετά από επώαση με ταξόλη, σε σχέση με αυτή των κυττάρων που είχαν επωαστεί με ετοποσίδιο ή σισπλατίνη, αποφασίσαμε να συνεχίσουμε τα πειράματά μας χρησιμοποιώντας μόνο τα δύο τελευταία φάρμακα.



Εικόνα 3.6: Επαγωγή της απόπτωσης με ταξόλη. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 18 h με 10, 20 και 40 nM ταξόλης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της κασπάσης-3, PARP-1 και ProTa. Η ProTa ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti- $\alpha 1$



Εικόνα 3.7: Ποσοτικός έλεγχος της επαγωγής της απόπτωσης με ετοποσίδιο: (A) Προσδιορισμός των κυτταρικών πληθυσμών μετά από επώαση των κυττάρων με 50 nM ταξόλης για 18 ώρες, ακολούθησε χρώση με Annexin V και PI και κυτταρομετρία ροής. (B) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής

Συμπερασματικά, τα πειράματα αυτής της ενότητας δείχνουν ότι, ανεξάρτητα από το αποπτωτικό ερέθισμα, η απόπτωση καρκινικών κυττάρων, μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, έχει ως αποτέλεσμα τη σχάση της προθυμοσίνης α και τη δημιουργία μιας «αποπτωτικής» μορφής της. Είναι σημαντικό, επίσης, το γεγονός ότι, παρά τις σημαντικές

δομικές και λειτουργικές ομοιότητες της παραθυμοσίνης με την προθυμοσίνη α , τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η παραθυμοσίνη δεν αποτελεί υπόστρωμα των αποπτωτικών κασπασών στο σύστημα αυτό. Τέλος, όσον αφορά την SET/TAF-1 β , τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι δεν τροποποιείται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού.

3.2 Διερεύνηση του ρόλου της προθυμοσίνης α (ProT α) και SET/TAF-1 β στην αποπτωτική απόκριση καρκινικών κυττάρων

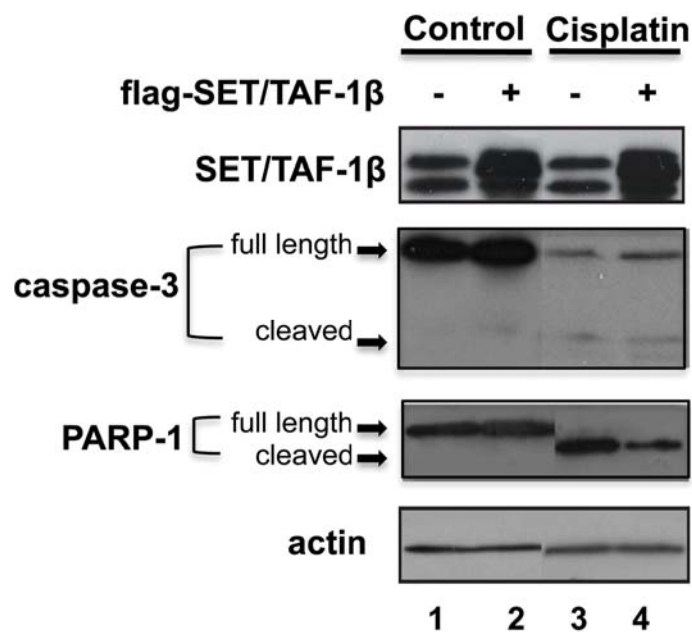
Τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας προτείνουν ότι η προθυμοσίνη α συμμετέχει στο μηχανισμό της απόπτωσης μέσω των μιτοχονδρίων. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι η προθυμοσίνη α είναι υπόστρωμα της κασπάσης-3 (Enkemann et al., 2000, Evstafieva et al., 2000) και εμποδίζει το σχηματισμό του αποπτοσώματος (Jiang et al., 2003). Αποφασίσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω το ρόλο της πρωτεΐνης αυτής, αλλά και της παραθυμοσίνης και της SET/TAF-1 β , στο μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήσαμε ήταν η μελέτη της αποπτωτικής απόκρισης των κυττάρων, μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση των παραπάνω πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα.

3.2.1 Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης SET/TAF-1 β δεν επηρεάζει τη ρύθμιση της αποπτωτικής απόκρισης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού

Η πρωτεΐνη της μυελογενούς λευχαιμίας SET/TAF-1 β ανήκει στην οικογένεια των ιστονικών συνοδών πρωτεϊνών NAP1. Επιπλέον, έχει χαρακτηριστεί ως ένας παράγοντας-κλειδί στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Εισαγωγή 1.6.1) (Fan et al., 2003a). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, αλλά και το γεγονός ότι η SET/TAF-1 β αλληλεπιδρά με την προθυμοσίνη α (Karetsou et al., 2004) και προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, μελετήσαμε τον πιθανό ρόλο της στη ρύθμιση της απόπτωσης.

Η στρατηγική που επιλέχθηκε για τη μελέτη του ρόλου της SET/TAF-1 β στην απόπτωση ήταν α) η υπερέκφρασή της και β) η αποσιώπησης της σε καρκινικά κύτταρα και η παρακολούθηση της απόκρισης των κυττάρων μετά από την έναρξη του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης, με χορήγηση φαρμάκων.

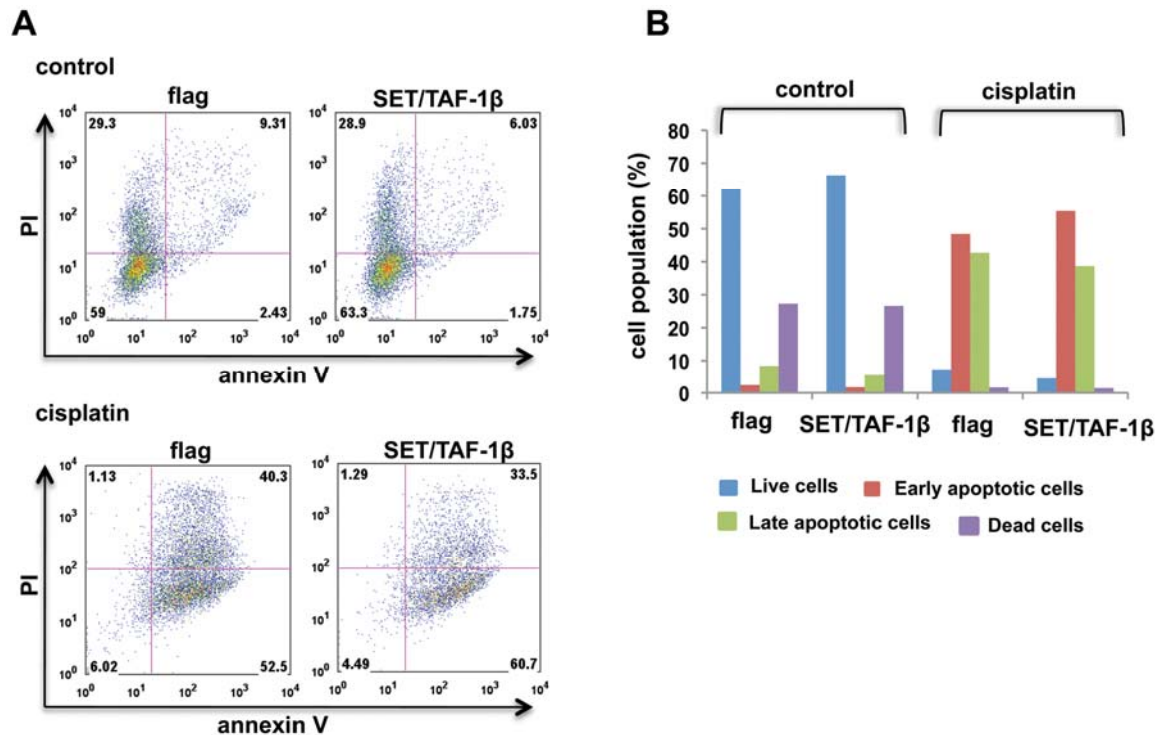
Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει την SET/TAF-1β και στη συνέχεια επώαστηκαν με σισπλατίνη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8, απουσία φαρμάκου δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα πρότυπα σχάσης των πρωτεϊνών κασπάση-3 και PARP-1, ανάμεσα στα κύτταρα μάρτυρες και σε αυτά που υπερέκφραζαν την SET/TAF-1β (διαδρομές 1 και 2). Ωστόσο, μετά από επώαση με 30 μM σισπλατίνη παρατηρήσαμε ότι στα κύτταρα με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της SET/TAF-1β (διαδρομή 4) η περιορισμένη πρωτεόλυση της PARP-1 ήταν λιγότερο έντονη σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 3).



Εικόνα 3.8: Η υπερέκφραση της SET/TAF-1β δεν επηρεάζει τα επίπεδα της απόπτωσης. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pFlag ή pFlag-SET/TAF-1β για 48 ώρες και στη συνέχεια επώαστηκαν με 30 μM σισπλατίνης για 18 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών κασπάση-3, PARP-1 και SET/TAF-1β.

Ωστόσο, η ανάλυση των αποτελεσμάτων του ποσοτικού ελέγχου της αποπτωτικής απόκρισης με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.9 A και B) δεν έδειξε κάποια σημαντική αλλαγή στην κατανομή των κυτταρικών πληθυσμών στα διάφορα στάδια της απόπτωσης μετά από υπερέκφραση της SET/TAF-1β. Με σκοπό να αποκλείσουμε έναν πιθανό ρόλο της SET/TAF-1β σε μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκου, η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε μετά από επώαση των κυττάρων με 10 μM σισπλατίνης. Τα αποτελέσματα

των πειραμάτων αυτών επιβεβαίωσαν τις προηγούμενες μας παρατηρήσεις. Δεν ανιχνεύθηκε, δηλαδή, κάποια αλλαγή στο πρότυπο κατανομής των αποπτωτικών πληθυσμών μετά από υπερέκφραση της SET/TAF-1β.



Εικόνα 3.9: Η υπερέκφραση της SET/TAF-1β δεν επηρεάζει την κατανομή των αποπτωτικών πληθυσμών. (A) Δείγματα 10^5 κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με φορείς pFlag ή pFlag-SET/TAF-1β για 48 h και είχαν επωαστεί με 30 μ M σισπλατίνης για 18h αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (B) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

3.2.2 Η αποσιώπηση της SET/TAF-1β δεν επηρεάζει την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων.

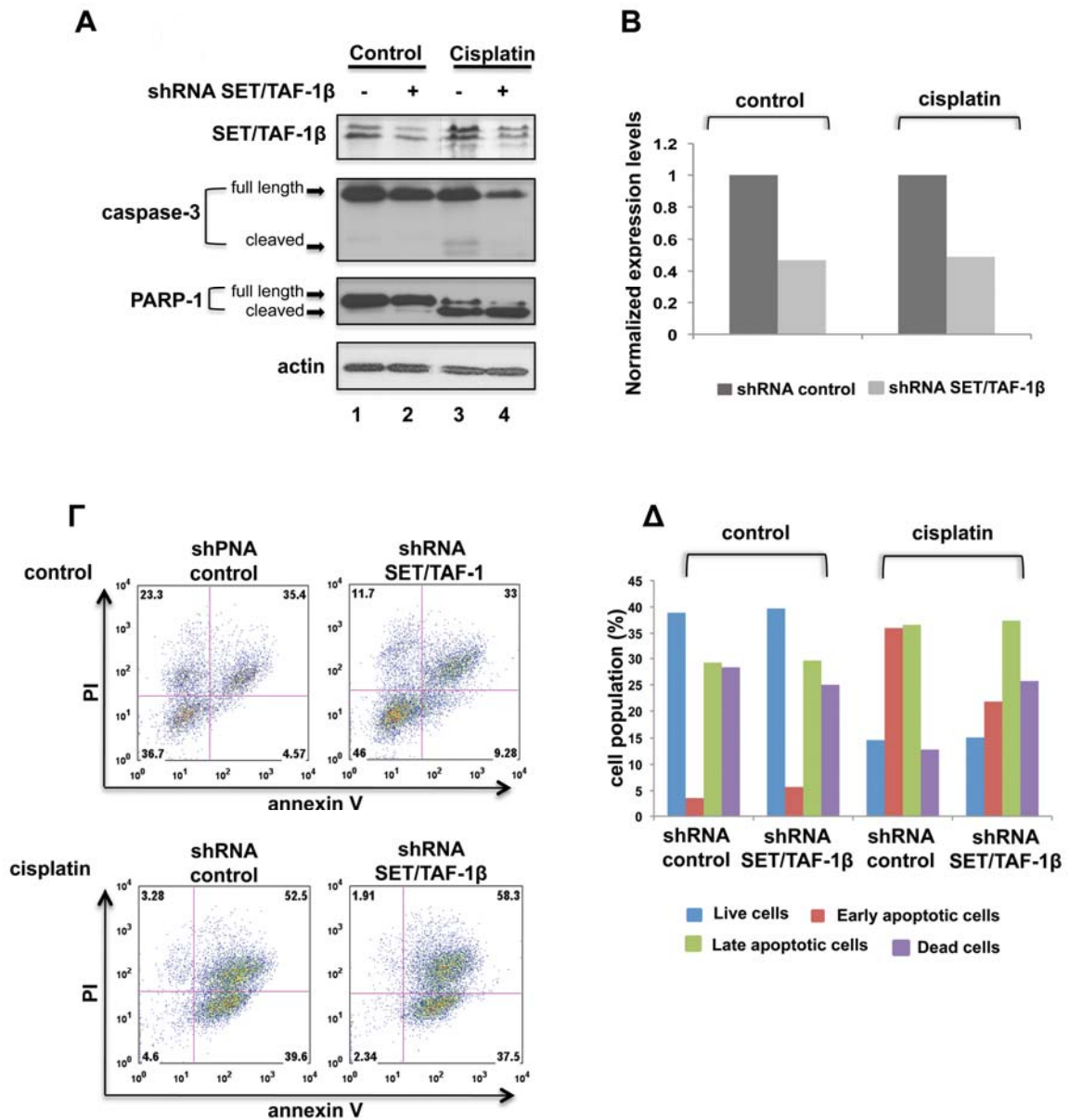
Στη συνέχεια, μελετήσαμε εάν η αποσιώπηση της πρωτεΐνης SET/TAF-1β μπορεί να επηρεάσει την πορεία της αποπτωτικής απόκρισης του κυτταρικού μας συστήματος. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει shRNA ειδικό έναντι της πρωτεΐνης SET/TAF-1β και στη συνέχεια επώαστηκαν με 10 μ M σισπλατίνης. Ο έλεγχος της αποσιώπησης της SET/TAF-1β (Εικόνα 3.10 A και B) έδειξε ότι στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με το shRNA (διαδρομές 2 και 4) τα επίπεδα της έκφρασής είχαν μειωθεί στο μισό σε σχέση με αυτά των κυττάρων μάρτυρες (διαδρομές 1 και 3).

Απουσία φαρμάκου (Εικόνα 3.10 Α, διαδρομές 1 και 2) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση της κασπάσης-3 και της PARP-1 ανάμεσα στα κύτταρα με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της SET/TAF-1β (διαδρομή 2) και στα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 1).

Αντίθετα, μετά τη χορήγηση σισπλατίνης είδαμε ότι η αποσιώπηση της SET/TAF-1β είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3, καθώς η ολόκληρου μήκους μορφή της ανιχνεύτηκε σε μικρότερη ποσότητα (διαδρομή 4) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 3). Επίσης, η περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση της PARP-1 ήταν πιο έντονη στα κύτταρα με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της SET (διαδρομή 4).

Ωστόσο, η διαφορά που παρατηρήθηκε στη σχάση και ενεργοποίηση της κασπάσης-3 με την αποσιώπηση της SET/TAF-1β, δεν ήταν ικανή να αλλάξει σημαντικά την κατανομή των πληθυσμών των κυττάρων στα διάφορα στάδια της απόπτωσης, όταν αυτή ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.10 Γ και Δ).

Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης του ρόλου της SET/TAF-1β στην απόπτωση των κυττάρων HeLa υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν επηρεάζει την απόκριση, μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού.



Εικόνα 3.10: Η αποσιώπηση της SET/TAF-1β δεν αλλάζει τα επίπεδα της απόπτωσης. (A) Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με shRNA έναντι της SET/TAF-1β για 48 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με 30 μM σισπλατίνης επί 18 ώρες. Προσδιορίστηκε η έκφραση της SET/TAF-1β, της κασπάσης-3 και της PARP-1 στα κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Ποσοτικοποίηση της αποσιώπησης της SET/TAF-1β. (Γ) Δείγματα 10⁵ κττάρων που είχαν διαμολυνθεί με τα shRNAs (control και SET/TAF-1β) και είχαν επωαστεί με 30 μM σιαπλτίνη για 18 ώρες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (Δ) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

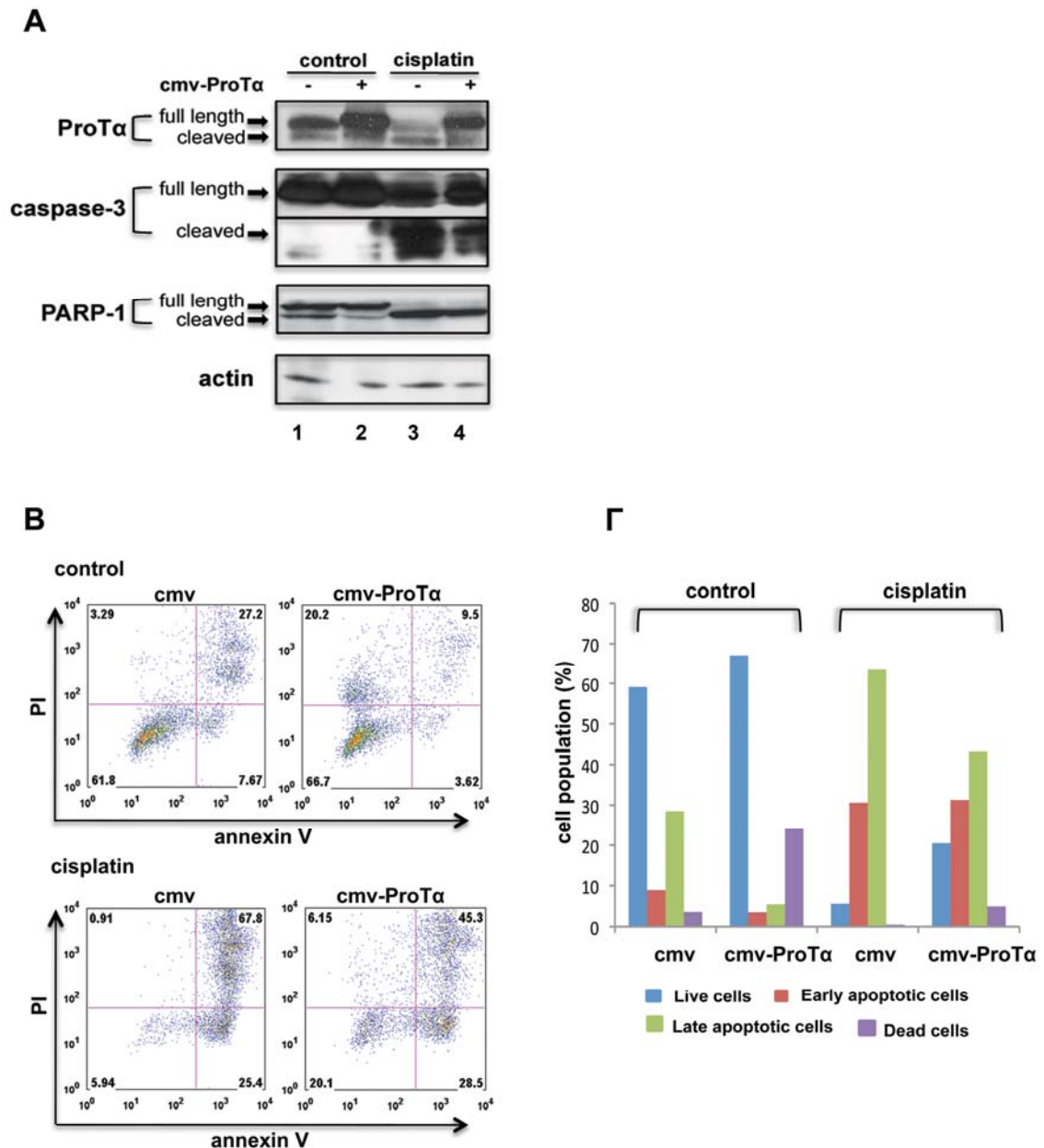
3.2.3 Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης, κατά την επαγωγή αυτής με σισπλατίνη.

Για να διερευνήσουμε το ρόλο της προθυμοσίνης α στην αποπτωτική απόκριση καρκινικών κυττάρων, υπερεκφράσαμε την πρωτεΐνη αυτή σε κύτταρα HeLa και στη συνέχεια προκαλέσαμε απόπτωση με το φάρμακο σισπλατίνη. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής ελέγχθηκαν α) ποιοτικά, με την έκφραση των πρωτεϊνών κασπάση-3 και PARP-1 και β) ποσοτικά με κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση των κυττάρων με Annexin V και PI.

Σε φυσιολογικές συνθήκες (απουσία σισπλατίνης) (Εικόνα 3.11 Α, διαδρομές 1 και 2) παρατηρήσαμε ότι η κασπάση-3 είχε ενεργοποιηθεί σε πολύ μικρό βαθμό και είχε προκαλέσει την περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση της PARP-1. Ακόμη, είδαμε ότι είχε προκληθεί και η σχάση της προθυμοσίνης α. Ωστόσο, στα κύτταρα που υπερέκφραζαν την προθυμοσίνη α (διαδρομή 2) παρατηρήθηκε μειωμένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 αλλά και σχάση της PARP-1 σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 1).

Μετά τη χορήγηση της σισπλατίνης (Εικόνα 3.11 Α, διαδρομές 3 και 4), όπως ήταν αναμενόμενο, η πρωτεόλυση της κασπάσης-3 και της PARP-1 ήταν εντονότερη. Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α στα κύτταρα αυτά (διαδρομή 4) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και, σε μικρότερο βαθμό, τη μείωση της σχάσης της PARP-1 σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 3).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με το φορέα μάρτυρα και είχε χορηγηθεί σισπλατίνη υπήρχαν τρεις κυτταρικοί υποπληθυσμοί (Εικόνα 3.11 Β). Κύτταρα που βρίσκονταν στην όψιμη αποπτωτική φάση (67.8%), κύτταρα που βρίσκονταν στην πρόιμη αποπτωτική φάση (25.4%) και φυσιολογικά κύτταρα (5.94%). Ωστόσο, μετά από υπερέκφραση της προθυμοσίνης α στα κύτταρα αυτά, ο πληθυσμός των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων μειώθηκε σε 45.3% (μείωση κατά 33%) και αυξήθηκε ο πληθυσμός των φυσιολογικών κυττάρων σε 20.1% (αύξηση κατά 70%). Συμπερασματικά, στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την προθυμοσίνη α παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα απόπτωσης (Εικόνα 3.11 Γ). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της προθυμοσίνης α επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα της απόπτωσης των κυττάρων, υπό αποπτωτικές συνθήκες.



Εικόνα 3.11. Η υπερέκφραση της προθρομωσίνης *a* μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης που επάγεται από σισπλατίνη. (A) Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς *pCMV* ή *pCMV-ProTα* για 48 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με 30 μ M σισπλατίνης για 18 ώρες. Προσδιορίστηκε η έκφραση της *ProTα*, της κασπάσης-3, και της *PARP-1*. Η *ProTα* ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-*a1*. (B) 10^5 κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με φορείς *pCMV* ή *pCMV-ProTα* και είχαν επωαστεί απουσία ή παρουσία 30 μ M σισπλατίνης για 18 ώρες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (Γ) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

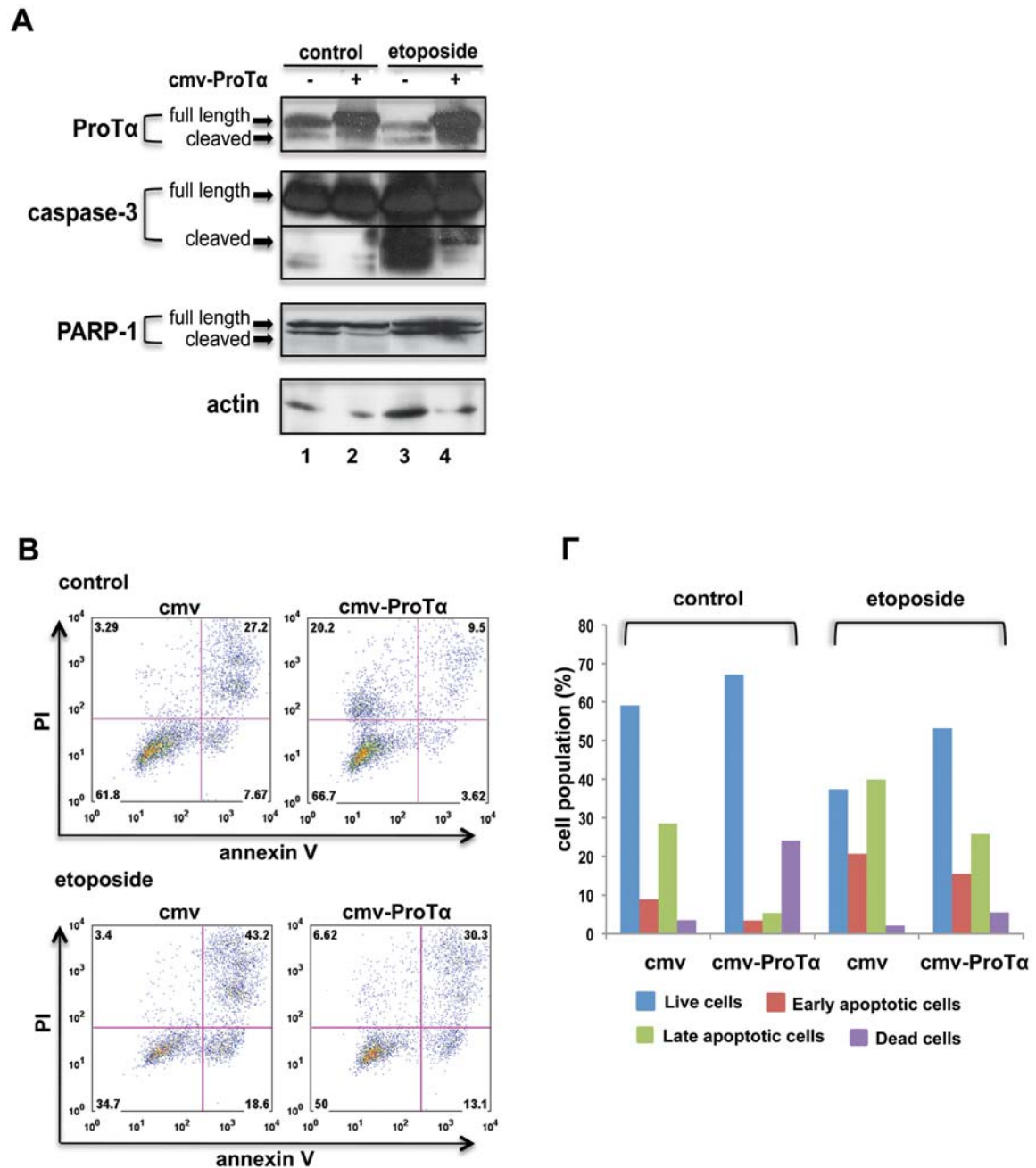
3.2.4 Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης που επάγεται από ετοποσίδιο.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το ρόλο της προθυμοσίνης α στην αποπτωτική απόκριση των κυττάρων μετά από χορήγηση ετοποσίδιου. Υπερεκφράσαμε την πρωτεΐνη σε καρκινικά κύτταρα και, αρχικά, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών κασπάση-3 και PARP-1 (Εικόνα 3.12 Α).

Παρατηρήσαμε ότι, ακόμη και απουσία ετοποσίδιου (Εικόνα 3.12 Α, διαδρομές 1 και 2), υπήρχαν χαμηλά επίπεδα απόπτωσης, λόγω της πειραματικής διαδικασίας. Ανιχνεύθηκε η πρωτεολυτική σχάση της κασπάσης-3, PARP-1, αλλά και της προθυμοσίνης α. Ωστόσο, η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α στα κύτταρα αυτά (διαδρομή 2) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και της σχάσης της PARP-1, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 1).

Μετά την επώαση των κυττάρων με ετοποσίδιο (Εικόνα 3.12 Α, διαδρομές 3 και 4) η σχάση της κασπάσης-3 και της PARP-1 αυξήθηκε. Όμως, στα κύτταρα που υπερέκφραζαν την προθυμοσίνη α (διαδρομή 4) τα επίπεδα της περιορισμένης πρωτεολυτικής σχάσης και ενεργοποίησης της κασπάσης 3 ήταν μειωμένα σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με το φορέα μάρτυρα (διαδρομή 3). Επίσης, ανιχνεύθηκαν και οι δύο μορφές της προθυμοσίνης α, η αγρίου τύπου και η μικρότερου μήκους που προκύπτει μετά τη σχάση από την κασπάση-3 (Εικόνα 3.12 Α).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του ποσοτικού προσδιορισμού της αποπτωτικής απόκρισης με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι τα κύτταρα, στα οποία υπερεκφράστηκε η προθυμοσίνη α, εμφάνιζαν διαφορετικό πρότυπο κατανομής του αποπτωτικού και του φυσιολογικού πληθυσμού σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία φαρμάκου η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των κυττάρων της όψιμης αποπτωτικής φάσης κατά 30%, ενώ αυξήθηκε αντίστοιχα ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων (Εικόνα 3.12 Β και Γ).



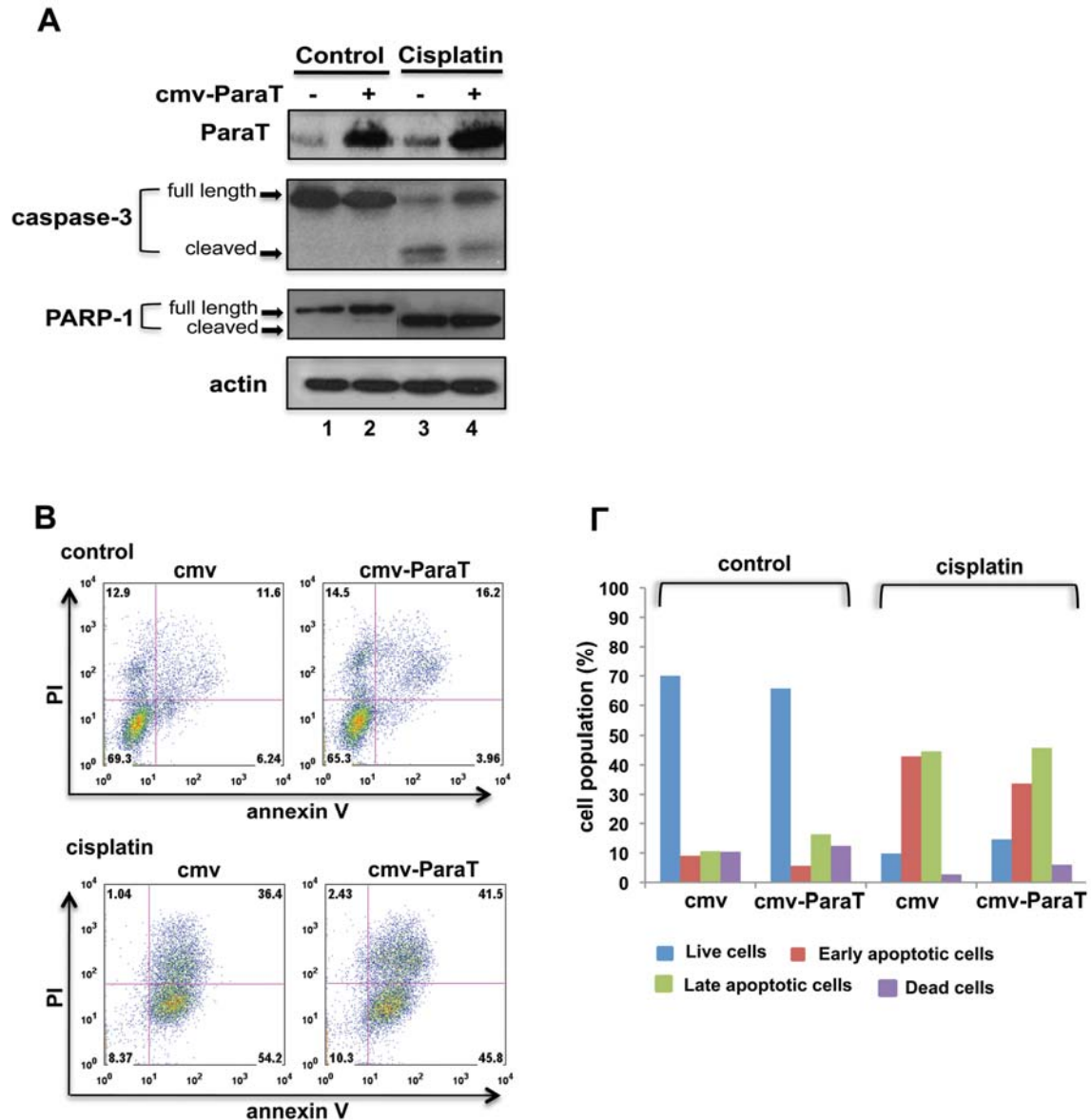
Εικόνα 3.12. Η υπερέκφραση της προθουμωσίνης *a* μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης που επάγεται από ετοποσίδιο. (A) Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς *pCMV* ή *pCMV-ProTa* για 48 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με 200 μM ετοποσίδιο για 18 ώρες. Προσδιορίστηκε η έκφραση της *ProTa*, της κασπάσης-3, και της *PARP-1* στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η *ProTa* ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας το αντίσωμα *anti-a1*. (B) Δείγματα 10^5 κήτταρων που είχαν διαμολυνθεί με τους πλασμιδιακούς φορείς *pCMV* ή *pCMV-ProTa* και επωάστηκαν με 200 μM ετοποσίδιο αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (Γ) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

3.2.5 Η υπερέκφραση της παραθυμοσίνης δεν επηρεάζει την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων HeLa σε γημειοθεραπευτικά φάρμακα.

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε την εξειδίκευση της δράσης της προθυμοσίνης α στην απόπτωση και αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο της παραθυμοσίνης στο σύστημα αυτό, καθώς η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη δομική και λειτουργική ομολογία με την προθυμοσίνη α (Martic et. al., 2005). Οι ιδιότητές της αυτές την καθιστούν ως έναν ιδανικό αρνητικό μάρτυρα της εξειδικευμένης δράσης της προθυμοσίνης α. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει την παραθυμοσίνη και στη συνέχεια επωάστηκαν με σισπλατίνη.

Σε φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 3.15 Α, διαδρομές 1 και 2) δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά στη σχάση της κασπάσης-3 και της PARP-1, ανάμεσα στα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 1) και στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την παραθυμοσίνη (διαδρομή 2). Αντίθετα, σε αποπτωτικές συνθήκες, στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την παραθυμοσίνη (διαδρομή 4) ανιχνεύτηκαν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης της προκασπάσης-3 (ανενεργός μορφή) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 3), γεγονός που υποδεικνύει τη μείωση της ενεργοποίησής της. Ωστόσο, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 3.15 Β και Γ) έδειξε ότι η κατανομή των αποπτωτικών πληθυσμών δεν αλλάζει μετά από υπερέκφραση της παραθυμοσίνης.

Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων υποδεικνύουν ότι η δράση της προθυμοσίνης α στην απόπτωση είναι ειδική, καθώς η παραθυμοσίνη παρά τις δομικές και λειτουργικές ομοιότητές της με την προθυμοσίνη α, δεν επιδεικνύει αντίστοιχη λειτουργία στη ρύθμιση αυτού του μηχανισμού.



Εικόνα 3.15: Η υπερέκφραση της παραθυμοσίνης δεν επηρεάζει τα επίπεδα της απόπτωσης, κατά την επαγωγή αυτής με σισπλατίνη. (Α) Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pCMV ή pCMV-ParaT και μετά από 48 ώρες, επώαστηκαν με 30 μ M σισπλατίνης για 18 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών κασπάση-3, PARP-1 και ParaT. (Β) Δείγματα 10^5 κύτταρων που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς pCMV ή pCMV-ParaT για 48 ώρες και στη συνέχεια είχαν επωαστεί με 30 μ M σισπλατίνη για 18 ώρες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (Γ) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

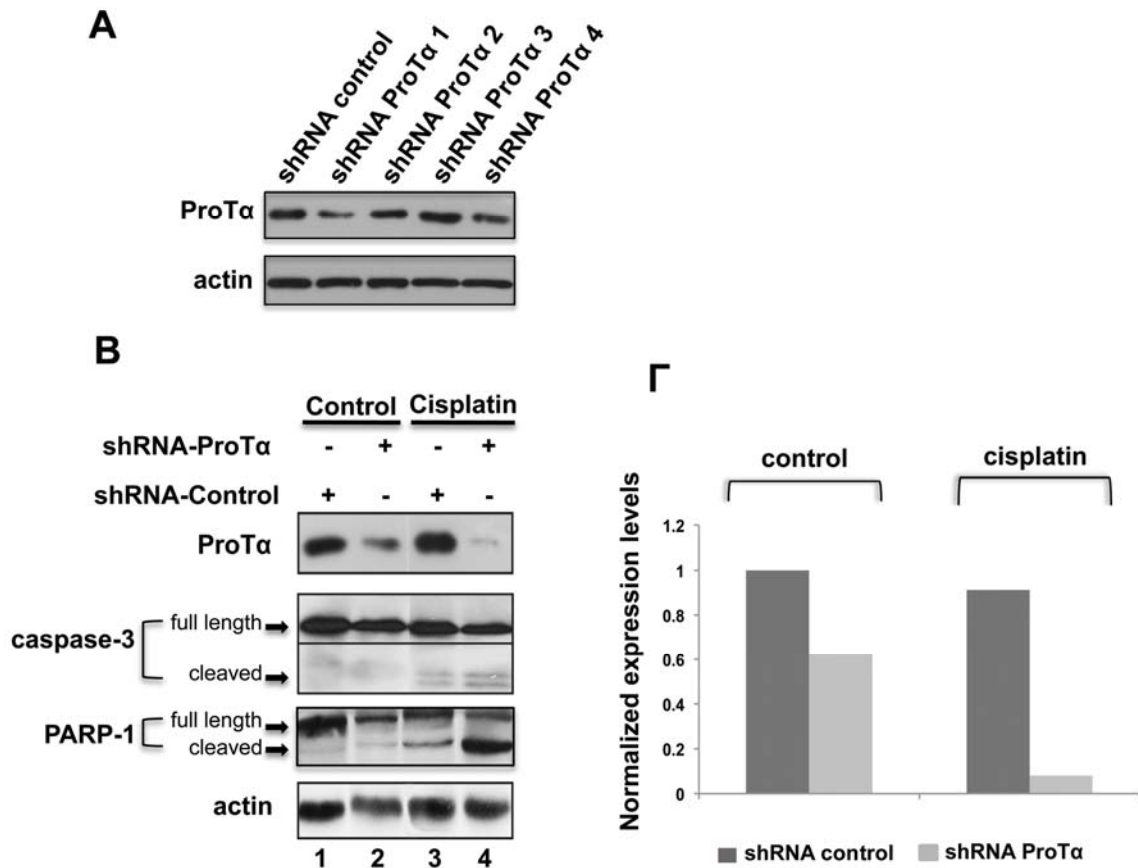
3.2.6 Η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α αυξάνει τα επίπεδα της απόπτωσης.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το ρόλο της αποσιώπησης της προθυμοσίνης α στην αποπτωτική απόκριση των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν

με τέσσερις διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούσαν τέσσερα ειδικά shRNAs έναντι της προθυμοσίνης α . Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης σε πρωτεϊνικό επίπεδο με ανοσοποτύπωση κατά western και επιλέχθηκε ως ο πιο αποτελεσματικός ο συνδυασμός των shRNAs 1 και 4 (Εικόνα 3.13 A). Ο συνδυασμός αυτός χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια επώαστηκαν με σισπλατίνη για την επαγωγή της απόπτωσης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13 B και Γ, μετά τη διαμόλυνση με τα shRNAs έναντι της προθυμοσίνης και απουσία φαρμάκου (διαδρομή 2) τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης μειώθηκαν σε ποσοστό 40% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, που είχαν διαμολυνθεί με το shRNA μάρτυρα (διαδρομή 1). Μετά την επώαση με το φάρμακο παρατηρήσαμε ακόμη μεγαλύτερη αποσιώπηση της προθυμοσίνης, σε ποσοστό 90%, (διαδρομή 4). Η επιπλέον μείωση της έκφρασης της προθυμοσίνης α που παρατηρείται στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με φάρμακο (Εικόνα 3.13 B) οφείλεται στην περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση της στις αποπτωτικές συνθήκες. Στα πειράματα αυτά ανιχνεύθηκε η έκφραση μόνο της ολόκληρου μήκους μορφής της προθυμοσίνης α .

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, απουσία φαρμάκου, η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της ολόκληρου μήκους μορφής της κασπάσης-3 (Εικόνα 3.13 B, διαδρομή 2), σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες που εκφράζουν την προθυμοσίνη α σε φυσιολογικά επίπεδα (διαδρομή 1). Αυτό σημαίνει ότι αυξήθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 μέσω της σχάσης της. Παρομοίως, ο έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης PARP-1, απουσία φαρμάκου, έδειξε ότι η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α αλλάζει το πρότυπο σχάσης της. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης της ολόκληρου μήκους μορφής της πρωτεΐνης, δηλαδή αύξηση της περιορισμένης πρωτεόλυσής της από την κασπάση-3 (Εικόνα 3.13 B, διαδρομές 1 και 2).

Μετά τη χορήγηση φαρμάκου, παρατηρήσαμε ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και η σχάση της PARP-1 ήταν εντονότερη (Εικόνα 3.13 B, διαδρομές 3 και 4). Ωστόσο, στα κύτταρα όπου η έκφραση της προθυμοσίνης α είχε μειωθεί (διαδρομή 4), παρατηρήσαμε ότι η περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση και των δύο πρωτεϊνών-δεικτών της απόπτωσης, κασπάσης-3 και PARP-1, είχε αυξηθεί σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (διαδρομή 3).

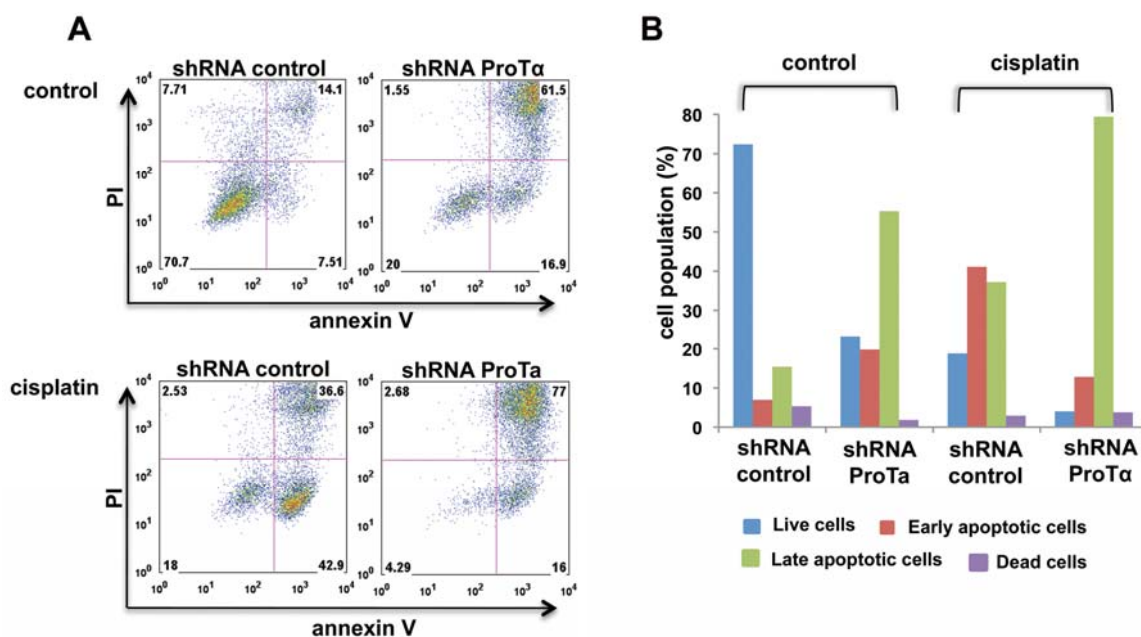


Εικόνα 3.13: Η αποσιώπιση της προθυμοσίνης *α* αυξάνει τα επίπεδα της απόπτωσης. (A) Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης τεσσάρων shRNAs έναντι της ProTa για τον έλεγχο της αποσιώπισης. (B) Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με συνδυασμό των shRNA 1 και 4 έναντι της προθυμοσίνης *α* για 48 ώρες και στη συνέχεια επώαστηκαν με 10 μ M σισπλατίνης επί 18 ώρες. Προσδιορίστηκε η έκφραση της ProTa, της κασπάσης-3, και της PARP-1 στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η ProTa ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-ct. (Γ) Ποσοτικοποίηση της αποσιώπισης της προθυμοσίνης *α*.

Από την ανάλυση της κατανομής των αποπτωτικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής, συμπεραίνουμε ότι η αποσιώπιση της προθυμοσίνης είχε ως αποτέλεσμα αλλαγή του προτύπου κατανομής τους.

Πιο συγκεκριμένα, απουσία φαρμάκου, η αποσιώπιση της προθυμοσίνης *α* είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων κατά 72% (από 70.7% σε 20%) Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 55% του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονταν στην πρώιμη αποπτωτική φάση (από 7.51% σε 16.9%) και κατά 77% του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονταν στην όψιμη αποπτωτική φάση (από 14.1% σε 61.5%) (Εικόνα 3.14 A και B).

Μετά από χορήγηση σισπλατίνης, τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα βρίσκονταν ήδη σε ποσοστό 42.9% στην πρόωμη αποπτωτική φάση, σε ποσοστό 36.6% στην όψιμη και μόλις 18% αυτών δεν είχαν μπει στη διαδικασία της απόπτωσης. Όμως, η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων σε 4.29% (μείωση 78%) και των κυττάρων της πρόωμης αποπτωτικής φάσης σε 16% (μείωση 70%). Παράλληλα, ο πληθυσμός των κυττάρων της όψιμης φάσης αυξήθηκε κατά 53% (Εικόνα 3.14 Α και Β).



Εικόνα 3.14: Η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α προκαλεί την αύξηση των αποπτωτικών πληθυσμών. (Α) Δείγμα 10^5 κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με τα shRNAs (control και ProTa) για 48 ώρες και είχαν επωαστεί με $10 \mu\text{M}$ σισπλατίνης για 18 ώρες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (Β) Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

Συνολικά, από τη μελέτη της αποπτωτικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων HeLa, παρουσία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, κατά την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της προθυμοσίνης α , συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει έναν σημαντικό προστατευτικό ρόλο.

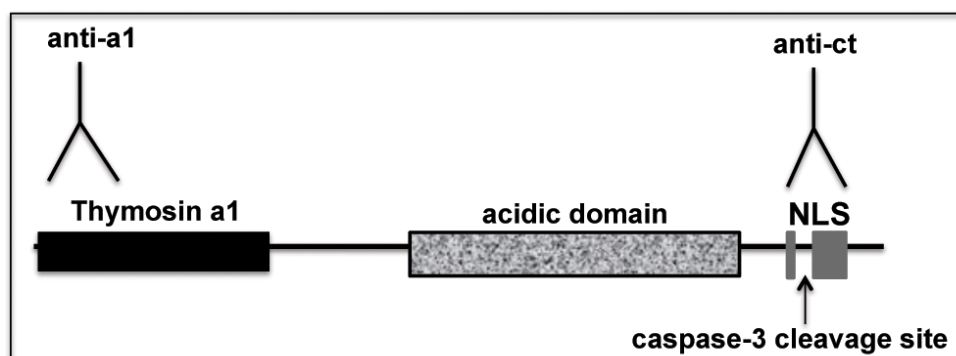
Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συστηματικής μελέτης του ρόλου των τριών πρωτεϊνών προθυμοσίνη α , SET/TAF-1 β και παραθυμοσίνη στην αποπτωτική απόκριση καρκινικών κυττάρων δείχνουν ότι η δράση τους διαφέρει σημαντικά. Η SET/TAF-1 β και η παραθυμοσίνη φαίνεται ότι δε διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποπτωτική

απόκριση των κυττάρων μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού. Αντίθετα, η προθυμοσίνη α επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα της απόπτωσης και η δράση της είναι εξειδικευμένη.

3.2.7 Μελέτη του κυτταρικού εντοπισμού της προθυμοσίνης α σε αποπτωτικά κύτταρα

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο εντοπισμός της προθυμοσίνης α στα περισσότερα είδη κυττάρων είναι αποκλειστικά πυρηνικός (Manrow et al., 1991, Vareli et al., 2000). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, έχει παρατηρηθεί η περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση της από την κασπάση-3 στη θέση 99 (Evstafieva et al., 2003). Η θέση αυτή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της προθυμοσίνης α που είναι υπεύθυνο για την πυρηνική της εντόπιση.

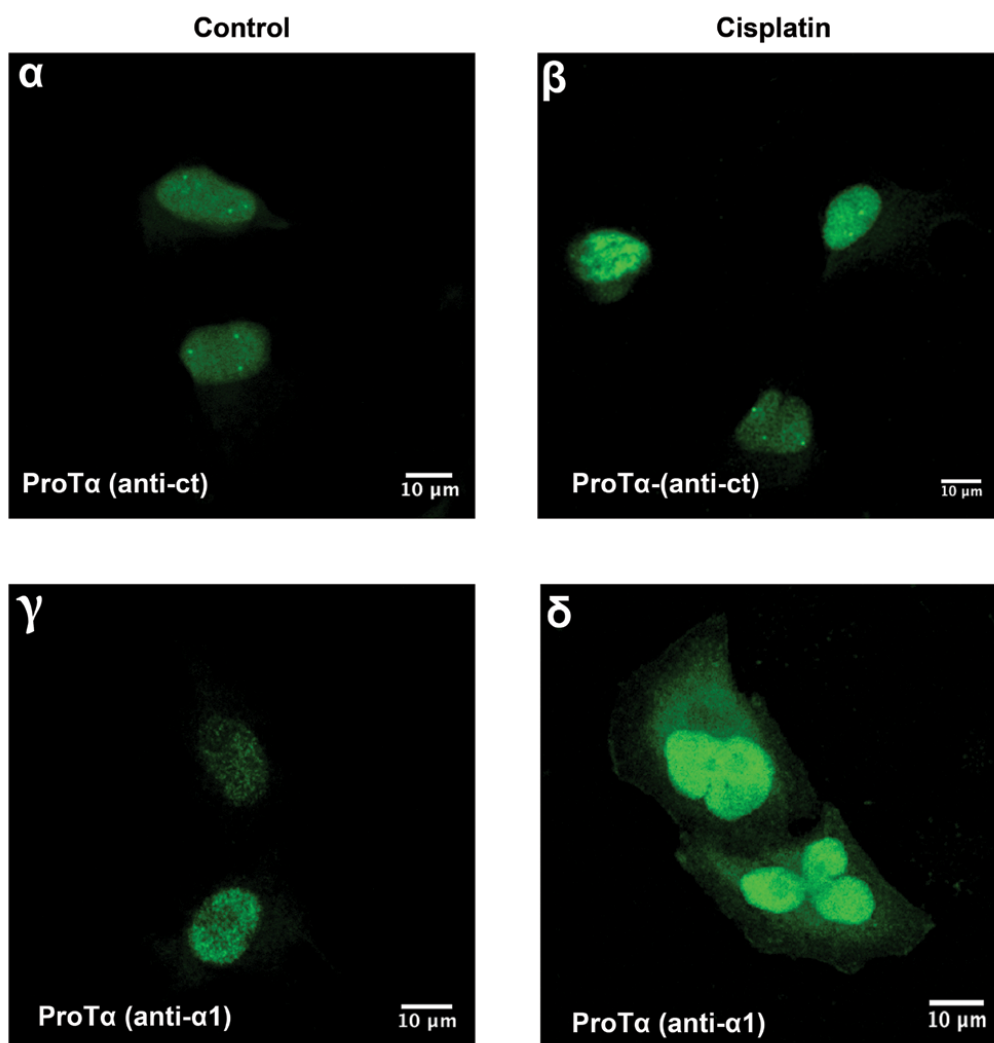
Μελετήσαμε συστηματικά την κατανομή της πρωτεΐνης προθυμοσίνη α σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας δύο αντισώματα έναντι διαφορετικών επιτόπων της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.16). Με τον τρόπο αυτό, μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε τον εντοπισμό της ολόκληρου μήκους μορφής της πρωτεΐνης, καθώς και της «αποπτωτικής» της μορφής που προκύπτει μετά την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης. Το αντίσωμα έναντι του αμινοτελικού άκρου της προθυμοσίνης α, anti-a1, αναγνωρίζει και την ολόκληρου μήκους πρωτεΐνη, αλλά και την «αποπτωτική» μορφή. Αντίθετα, το αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της, anti-ct, αναγνωρίζει μόνο την αγρίου τύπου προθυμοσίνη α.



Εικόνα 3.16: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της προθυμοσίνης α. Φαίνονται οι επίτοποι των δύο αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.17 α και β, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α, παρατηρήσαμε ότι ο εντοπισμός της δεν

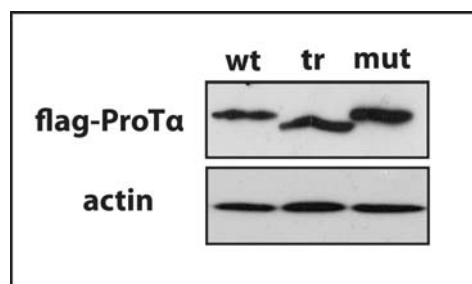
αλλάζει κατά την επαγωγή της απόπτωσης με σισπλατίνη. Η πρωτεΐνη, δηλαδή, παραμένει στον πυρήνα. Αντίθετα, όταν η προθυμοσίνη α ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα έναντι του αμινοτελικού άκρου της, το οποίο, εκτός από την ολόκληρου μήκους μορφή της πρωτεΐνης, αναγνωρίζει και την «αποπτωτική» μορφή, παρατηρήσαμε ότι η κατανομή της στα αποπτωτικά κύτταρα διαφέρει σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 17 γ και δ). Στα αποπτωτικά κύτταρα, εκτός από τον πυρήνα, η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα 3.17 δ). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι είναι η «αποπτωτική» μορφή που διαφεύγει προς το κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη και όχι η ολόκληρου μήκους πρωτεΐνη.



Εικόνα 3.17: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της προθυμοσίνης α σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα. Η προθυμοσίνη α ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικά κύτταρα (α , γ) και σε αποπτωτικά (β , δ) με τη χρήση των αντισωμάτων *anti-ct* (α , β) και *anti- α 1* (γ , δ) με συνεστιακή μικροσκοπία.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω τον εντοπισμό των δύο μορφών της πρωτεΐνης κατασκευάσαμε τρεις φορείς-ρετροϊών (Υλικά και Μέθοδοι, 2.5) που εκφράζουν: α) την αγρίου τύπου προθυμοσίνη α (**flag-ProTa WT**), β) την «αποπτωτική» μορφή της (αμινοξέα 1-99) (**flag-ProTa TR**) και γ) ένα μετάλλαγμα (**flag-ProTa MUT**), το οποίο δεν αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3, καθώς έχει μία σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση αυτή. Η πρωτεΐνη δηλαδή που εκφράζεται από τον φορέα αυτόν είναι ένας αρνητικός μάρτυρας της αγρίου τύπου προθυμοσίνης α, όσον αφορά το ρόλο της στην απόπτωση.

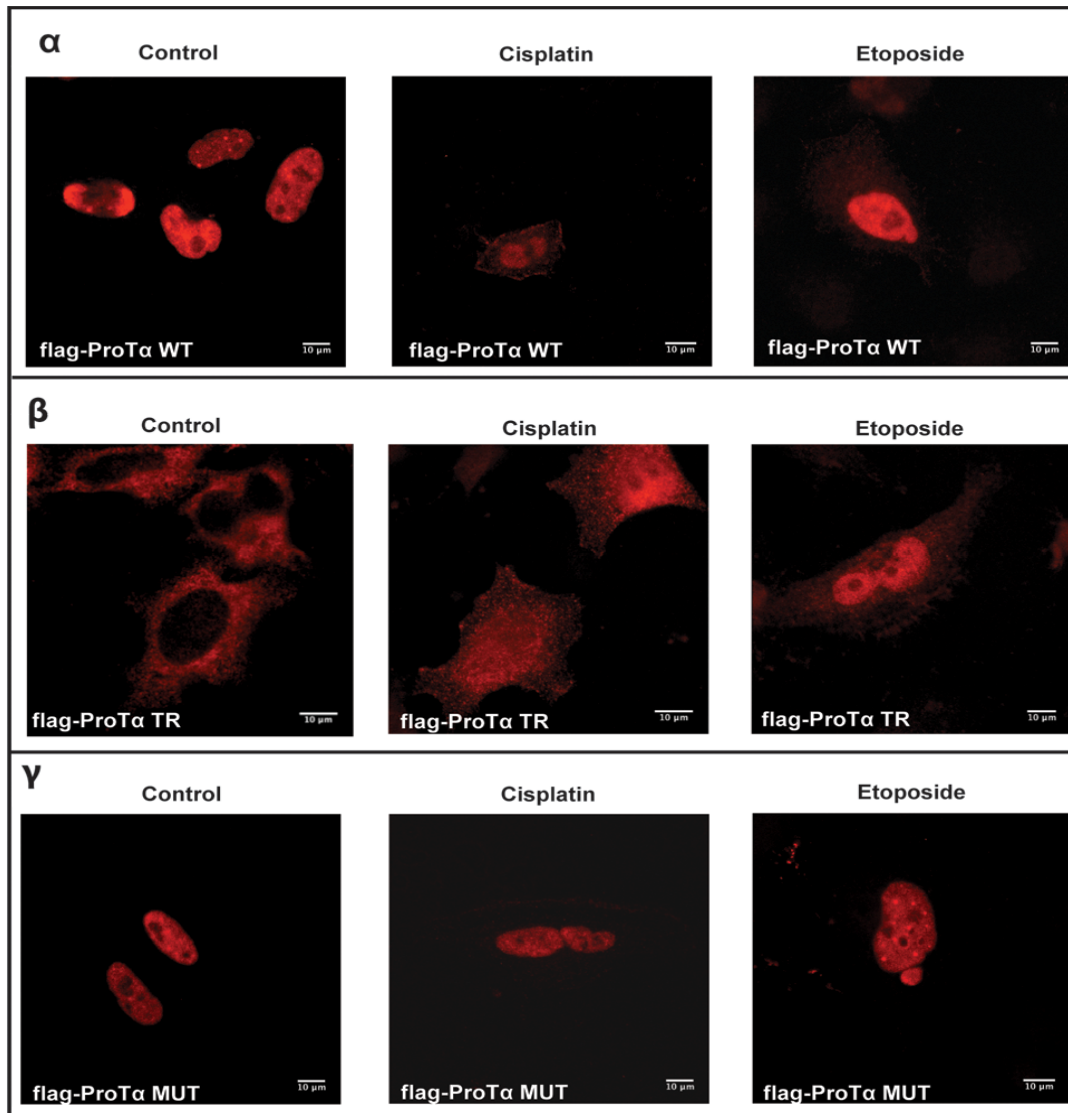
Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές και στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση και ο εντοπισμός των διαφόρων μορφών. Στην Εικόνα 3.18 φαίνεται η έκφραση της αγρίου τύπου προθυμοσίνης α, της «αποπτωτικής» μορφής της και του μεταλλάγματος που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3.



Εικόνα 3.18: Έκφραση των *flag-ProTa WT*, *flag-ProTa TR* και *flag-ProTa MUT* σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους φορείς-ρετροϊών *flag-ProTa WT*, *flag-ProTa TR* και *flag-ProTa MUT* για 48 ώρες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western, με αντίσωμα έναντι του flag επιτόπου.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τον εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών σε φυσιολογικά, αλλά και αποπτωτικά κύτταρα με αντίσωμα έναντι του flag επιτόπου, ο οποίος έχει εισαχθεί στο αμινοτελικό τους άκρο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19 α, η αγρίου τύπου προθυμοσίνη α (*flag-ProTa WT*) στα φυσιολογικά κύτταρα εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Μετά από επώαση όμως των κυττάρων με σισπλατίνη ή ετοποσίδιο, παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στην περιφέρεια του κυττάρου. Η «αποπτωτική» μορφή, η οποία προκύπτει από τησχάση της αγρίου τύπου μορφής από την κασπάση-3 (*flag-ProTa TR*), στα φυσιολογικά κύτταρα εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και την περιφέρεια του κυττάρου. Στα αποπτωτικά κύτταρα όμως, σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίζεται και στον πυρήνα (Εικόνα 3.19 β). Η μορφή της

προθυμοσίνης α που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3 (*flag-ProT α MUT*), εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, παρουσία ή απουσία αποπτωτικού ερεθίσματος (Εικόνα 3.19 γ).



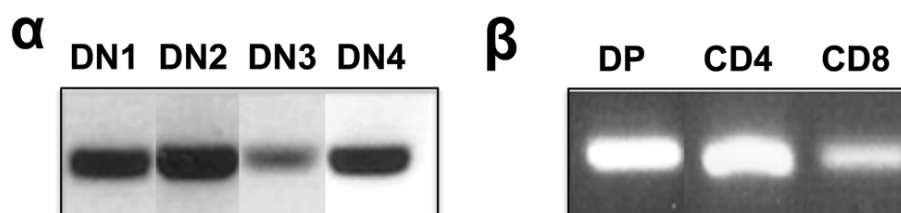
Εικόνα 3.19: Εντοπισμός της αγρίου τύπου προθυμοσίνης α (*flag-ProT α WT*), της «αποπτωτικής» μορφής, (*flag-ProT α TR*) και της μορφής που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3 (*flag-ProT α MUT*). Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους φορείς *flag-ProT α WT* (α), *flag-ProT α TR* (β) και *flag-ProT α MUT* (γ) για 48 ώρες. Στη συνέχεια επωάστηκαν με 15 μM σισπλατίνης, 100 (α) ή 150 μM (β , γ) ετοποσίδιου και μελετήθηκε ο εντοπισμός της προθυμοσίνης α με τη χρήση αντισώματος έναντι του *flag* επιτόπου και συνεστική μικροσκοπία.

Όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη του εντοπισμού της προθυμοσίνης α σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα, η ολόκληρου μήκους μορφή της εντοπίζεται

αποκλειστικά στον πυρήνα. Αντίθετα, η «αποπτωτική» μορφή της εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα και στην περιφέρεια του κυττάρου. Η μορφή που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3, ο αρνητικός μάρτυρας δηλαδή, παραμένει στον πυρήνα μετά την επαγωγή της απόπτωσης. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας ότι μόνο η «αποπτωτική» μορφή της πρωτεΐνης μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Με βάση τα αποτελέσματά μας, αλλά και τα βιβλιογραφικά δεδομένα, ένας προτεινόμενος λειτουργικός ρόλος της «αποπτωτικής» μορφής της προθυμοσίνης α στο κυτταρόπλασμα είναι η παρεμπόδιση του σχηματισμού του αποπτωσώματος και η αναστολή της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών.

3.3 Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων.

Υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα που συνδέουν την προθυμοσίνη α με την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων (Baxevanis et al., 1990b, Baxevanis et al., 1992, Papanastasiou et al., 1992, Eckert et al., 1997, Garbin et al., 1997, Voutsas et al., 2000, Skopeliti et al., 2009, Skopeliti et al., 2006). Προηγούμενα πειράματα RT-PCR στο εργαστήριό μας από τον Dr. Goran Martic, έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α εκφράζεται σε όλα τα στάδια ωρίμανσης των T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 3.20). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας για το ρόλο της προθυμοσίνης στην απόπτωση, ελέγξαμε το ρόλο της σε ένα σύστημα διαφοροποίησης κυττάρων, η εξέλιξη του οποίου καθορίζεται κυρίως από την απόπτωση.

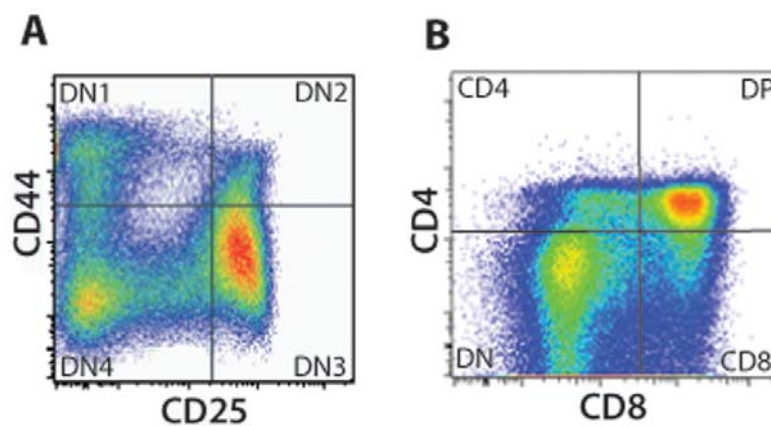


Εικόνα 3.20: Έλεγχος της έκφρασης της προθυμοσίνης α με *real time PCR* (α) στα πρῶιμα και (β) στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων.

Το σύστημα διαφοροποίησης των βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα των T λεμφοκυττάρων είναι ένα πολύ καλά μελετημένο σύστημα διαφοροποίησης. Τα πρῶιμα προγονικά T κύτταρα καθώς διαφοροποιούνται στο

θύμο υποβάλλονται σε διαδικασίες επιλογής με σκοπό την απομάκρυνση των κυττάρων που δεν ολοκληρώνουν επιτυχώς το κάθε στάδιο της διαφοροποίησης. Επομένως, η ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων είναι μία διαδικασία που ρυθμίζεται αυστηρά από το μηχανισμό της απόπτωσης (Εισαγωγή 1.10). Διαταραχές στην ισορροπία της απόπτωσης κατά τη διαφοροποίηση οδηγούν στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων, ανοσοανεπάρκειας ή καρκίνου.

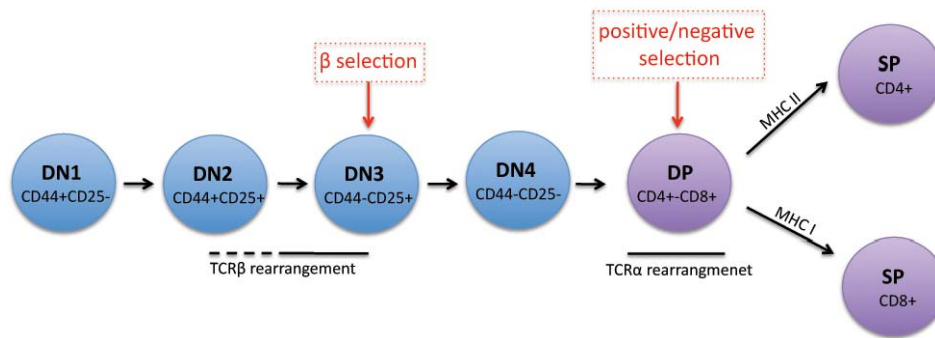
Τα ανώριμα λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σταδιακά (DN1, DN2, DN3, DN4, DP στάδια) μέχρι να καταλήξουν στην τελική τους μορφή (SP). Ο διαχωρισμός των σταδίων αυτών πραγματοποιείται με βάση την έκφραση τεσσάρων επιφανειακών πρωτεϊνών: CD4, CD8, CD44 και CD25. Η έκφραση των CD4 και CD8 επιφανειακών πρωτεϊνών διαχωρίζει τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων σε **DN** (Double Negative, CD4-CD8-), **DP** (Double Positive, CD4+CD8+) και **SP** (Single Positive CD4+ ή CD8+) (Εικόνα 21 B). Ο DN πληθυσμός διαχωρίζεται περαιτέρω σύμφωνα με την έκφραση των CD44 και CD25 υποδοχέων σε **DN1** (CD44+CD25-), **DN2** (CD44+CD25+), **DN3** (CD44-CD25+) και **DN4** (CD44-CD25-) (Εικόνα 3.22 A).



Εικόνα 3.21: Διαχωρισμός των T λεμφοκυττάρων με βάση την έκφραση (A) των CD44, CD25 και (B) των CD4, CD8.

Όπως προαναφέρθηκε (Εισαγωγή 1.10.1 και 1.10.2), τα στάδια στα οποία πραγματοποιείται ο έλεγχος της διαφοροποίησης με τη διαδικασία της επιλογής είναι το στάδιο DN3 (**β επιλογή**) και το στάδιο DP (**θετική και αρνητική επιλογή**) (Εικόνα 3.22). Στη διαδικασία της **β επιλογής** απομακρύνονται με απόπτωση τα κύτταρα που δεν εκφράζουν έναν λειτουργικό pre-TCR (T Cell Receptor). Αντίστοιχα, στη **θετική και αρνητική επιλογή** απομακρύνονται με απόπτωση τα κύτταρα των οποίων οι TCRs

δεσμεύουν τα αντιγόνα είτε με πολύ υψηλή είτε με πολύ χαμηλή συγγένεια.



Εικόνα 3.22: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων στο θύμο. Υποδεικνύονται τα στάδια όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της διαφοροποίησης με τις διαδικασίες της επιλογής.

Η μελέτη του ρόλου της προθυμοσίνης α στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Δρ. Φωτεινής Γούναρη, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας της Ιατρικής Σχολής, του Τομέα Βιολογικών Επιστημών στο Πανεπιστήμιο του Σικάγο.

Το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

- Παραγωγή ρετροϊών που εκφράζουν την αγρίου τύπου προθυμοσίνη α (flag-ProT α WT), την «αποπτωτική» μορφή ProT α (1-99) (flag-ProT α TR) και τη μεταλλαγμένη μορφή που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3 (flag-ProT α MUT).
- Απομόνωση αδιαφοροποίητων T λεμφοκυττάρων από θύμο αδένα αγρίου τύπου ποντικών C57/BL6 ηλικίας 1-2 μηνών.
- Επιμόλυνση των παραπάνω κυττάρων με τους ρετροϊούς.
- Συν-καλλιέργεια των επιμολυνθέντων T λεμφοκυττάρων με κύτταρα στρώματος OP9-DL1.
- Έλεγχος της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων και των επιπέδων της απόπτωσης, την 1η και 5η μέρα της συν-καλλιέργειας.

Η παραγωγή των ρετροϊών έγινε με το σύστημα των κυττάρων συσκευασίας PlatE (Υλικά και Μέθοδοι, 2.6). Συνοπτικά, τα κύτταρα συσκευασίας PlatE διαμολύνθηκαν με τους φορείς ρετροϊών flag-ProT α WT, flag-ProT α TR, flag-ProT α MUT και τον άδειο φορέα MIGR1 για 48 ώρες. Οι φορείς ρετροϊών που χρησιμοποιήθηκαν, ταυτόχρονα με τις μορφές της προθυμοσίνης α , εκφράζουν και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP,

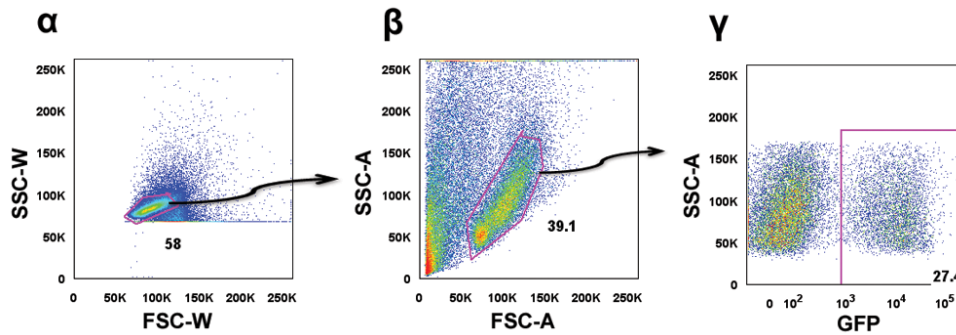
καθώς ανάμεσα στο γονίδιο της GFP και στη θέση κλωνοποίησης, έχει εισαχθεί η αλληλουχία IRES (Internal Ribosome Entry Site). Με τον τρόπο αυτό, παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης και διαλογής των κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί με το ρετροϊό. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση αδιαφοροποίητων (Lin negative) βλαστικών κυττάρων από θύμο αδένος ποντικού ηλικίας 1-2 μηνών. Για την επαγωγή της διαφοροποίησης τα βλαστικά κύτταρα συν-καλλιιεργήθηκαν με τα κύτταρα στρώματος OP9-DL1.

Τα κύτταρα OP9-DL1 είναι μία κυτταρική σειρά στρώματος, η οποία έχει απομονωθεί από μυελό των οστών ποντικού και έχει τροποποιηθεί γενετικά ώστε να εκφράζει εκτοπικά το συνδέτη του Notch υποδοχέα, Delta-like 1 (DL1). Η κυτταρική αυτή σειρά χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τη μελέτη της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων, καθώς δημιουργεί το κατάλληλο μικροπεριβάλλον, μέσα στο οποίο τα προγονικά βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα, μπορούν να πολλαπλασιαστούν, να διαφοροποιηθούν και να εξελιχθούν **μόνο** σε T λεμφοκύτταρα.

Η συν-καλλιέργεια των OP9-DL1 και των Lin- θυμοκυττάρων διατηρήθηκε για πέντε ημέρες, καθώς είναι γνωστό ότι το διάστημα αυτό είναι αρκετό για τη διαφοροποίηση των Lin negative θυμοκυττάρων σε DP. Στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας είχαν προστεθεί και οι απαραίτητες ποσότητες ιντερλευκίνης 7 (IL-7), του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF), αλλά και του FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand (Flt3L).

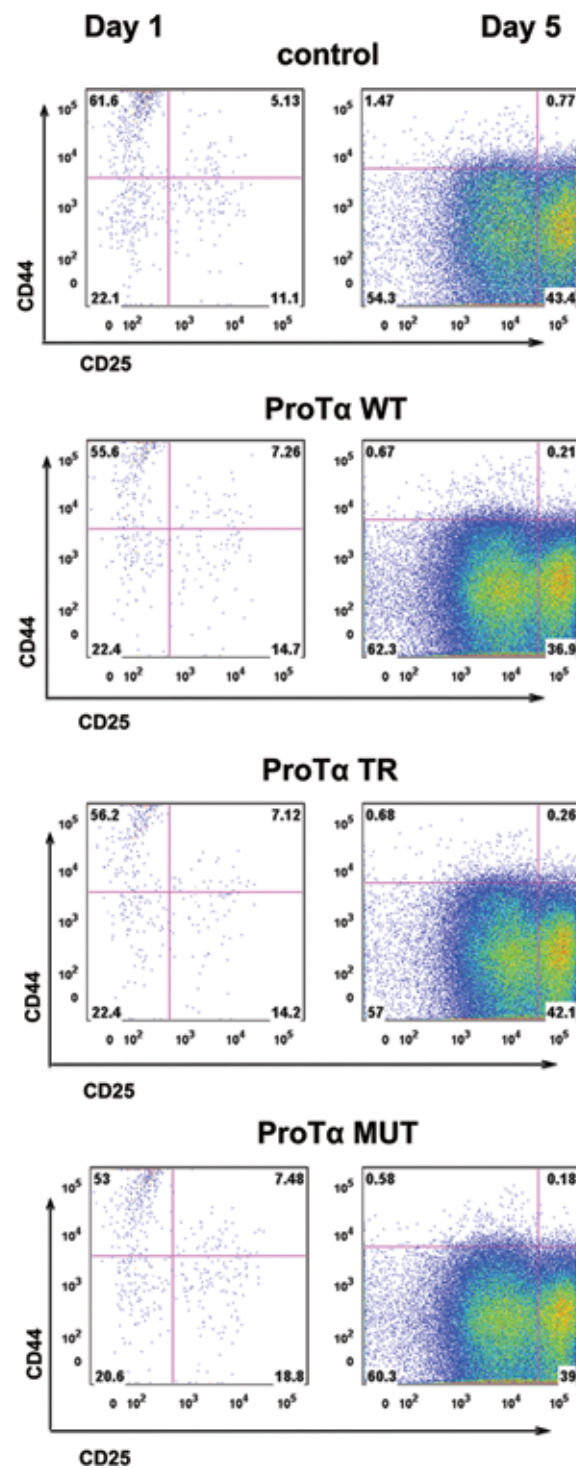
3.3.1 Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α δεν επηρεάζει τα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων (DN1, DN2, DN3, DN4)

Για τη μελέτη του ρόλου της προθυμοσίνης α στα στάδια διαφοροποίησης DN1, DN2, DN3 και DN4, τα επιμολυσμένα με τους ρετροϊούς θυμοκύτταρα αρχικά διαχωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής. Η στρατηγική οριοθέτησης των πληθυσμών έχει ως εξής: σύμφωνα με το μέγεθος και την κοκκίωση οριοθετείται πρώτα ο πληθυσμός των μονήρων κυττάρων (Εικόνα 3.23 α). Στη συνέχεια, διαχωρίζεται ο πληθυσμός των θυμοκυττάρων από τον πληθυσμό των OP9-DL1 κυττάρων (Εικόνα 3.23 β). Τέλος, η έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) από τους ρετροϊούς (bicistronic expression) επιτρέπει την οριοθέτηση του υποπληθυσμού των μολυσμένων με τους ρετροϊούς θυμοκυττάρων (Εικόνα 3.23 γ).



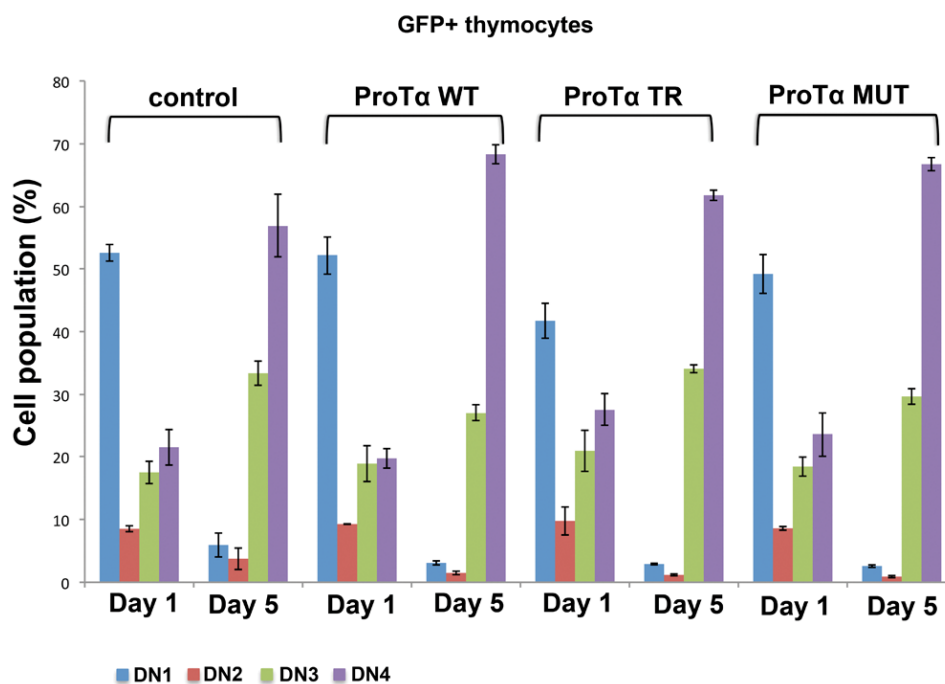
Εικόνα 3.23: Στρατηγική διαχωρισμού του πληθυσμού των μολυσμένων θυμοκυττάρων. (α) Διαχωρισμός των μονήρων κυττάρων από τα συσσωματώματα. (β) Διαχωρισμός των θυμοκυττάρων από τα κύτταρα στρώματος OP9-DL1. (γ) Διαχωρισμός των GFP+ μολυνθέντων θυμοκυττάρων.

Στη συνέχεια, στον πληθυσμό των GFP+ θυμοκυττάρων μελετήθηκε η έκφραση των επιφανειακών πρωτεϊνών CD44 και CD25 ύστερα από χρώση των κυττάρων με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.24, η κατανομή των πληθυσμών ανάλογα με την έκφραση των CD44 και CD25 (δεικτών των αρχικών σταδίων διαφοροποίησης) δείχνει ότι η πλειοψηφία των κυττάρων την 1^η ημέρα της καλλιέργειας βρίσκεται στο στάδιο DN1 (CD44+CD25-). Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στο πρώτο στάδιο της διαφοροποίησης που συμβαίνει στο θύμο. Την 5^η ημέρα της καλλιέργειας παρατηρούμε ότι όλα τα κύτταρα ανεξαρτήτως του αν εκφράζουν ή όχι οποιαδήποτε μορφή της προθυμοσίνης α, έχουν προχωρήσει με τον ίδιο ρυθμό στα επόμενα στάδια διαφοροποίησής τους, DN3 και DN4.



Εικόνα 3.24: Κατανομή των GFP⁺ θυμοκυττάρων, ανάλογα με την έκφραση των πρωτεϊνών-δεικτών της διαφοροποίησης CD44, CD25. Θυμοκύτταρα επιμολύνθηκαν με τους ρετροϊούς flag-ProTa WT, flag-ProTa TR και flag-ProTa MUT και συνκαλλιεργήθηκαν με κύτταρα στρώματος OP9-DL1. Απομονώθηκαν από τη συνκαλλιέργεια την 1^η και 5^η ημέρα και επωάστηκαν με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των επιφανειακών μορίων CD44 και CD25. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

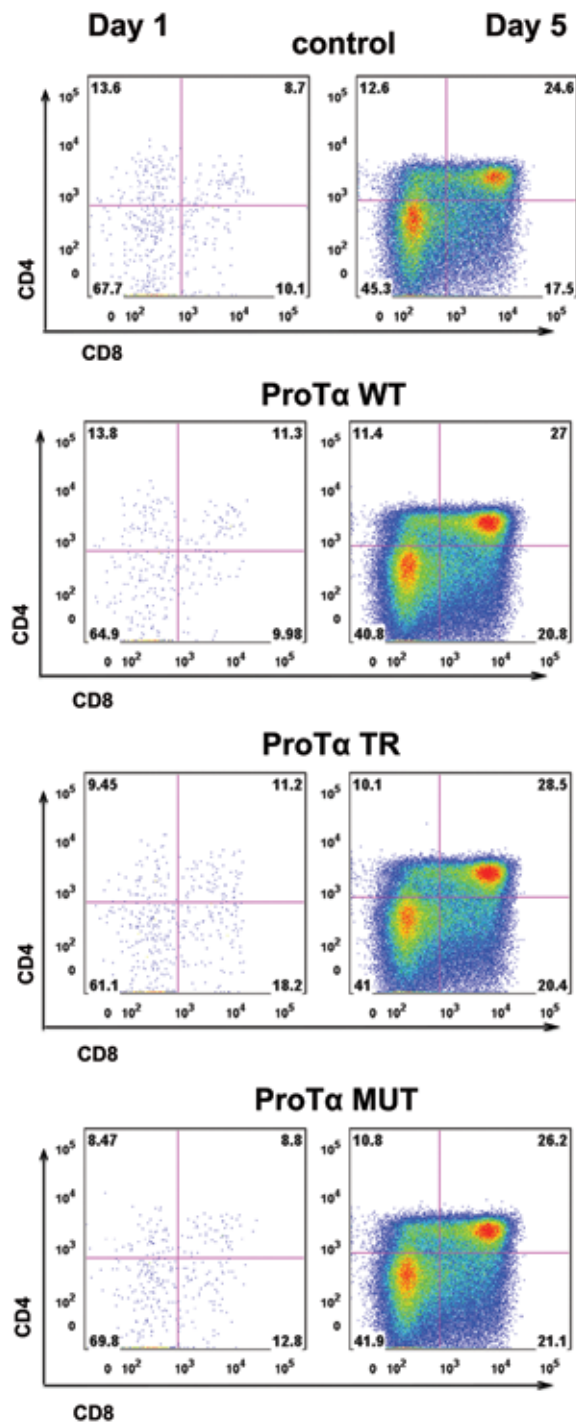
Συνολικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.25 επιβεβαιώνουν ότι η μετάβαση των κυττάρων από το στάδιο DN1 στο στάδιο DN4 της διαφοροποίησης, κατά τη διάρκεια των 5 ημερών, πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο και ρυθμό σε όλα τα δείγματα. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 3.25: Γραφική απεικόνιση της κατανομής των υποπληθυσμών DN1, DN2, DN3 και DN4 των GFP+ θυμοκυττάρων. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από τρεις επαναλήψεις κάθε δείγματος.

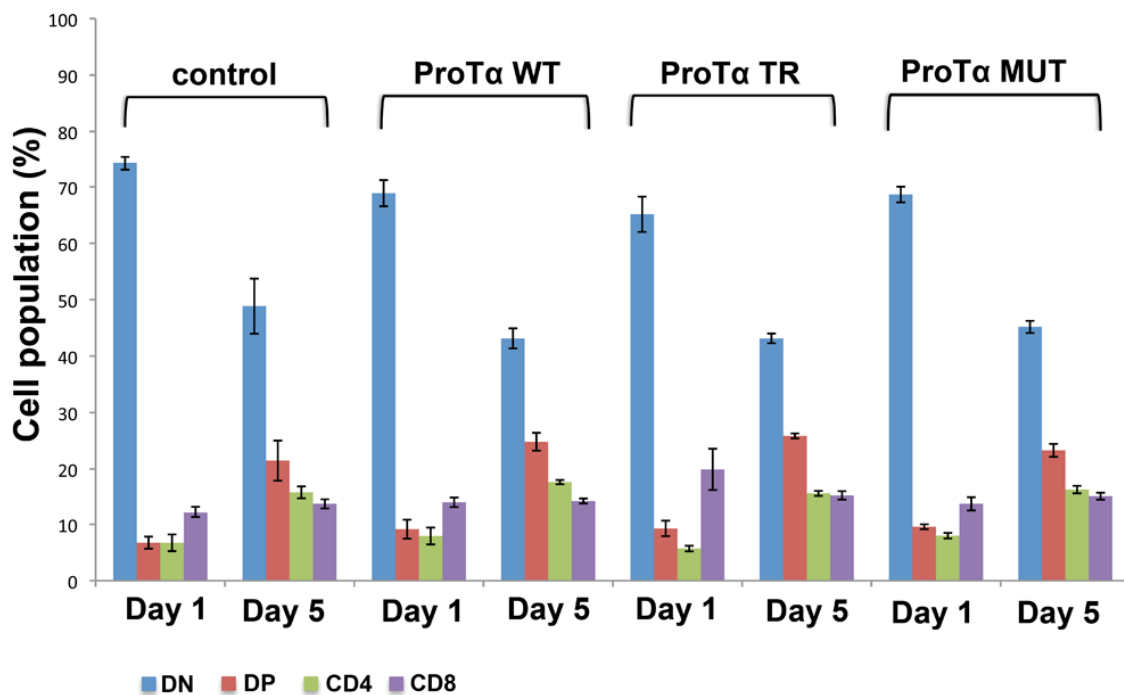
3.3.2 Η προθυμοσίνη α δεν επηρεάζει τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων (DP, CD4 και CD8)

Η ανάλυση των GFP+ θυμοκυττάρων, όσον αφορά τα μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης, DP και SP (CD4+ ή CD8+), με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι τα κύτταρα έχουν μεταβεί επιτυχώς από το στάδιο των DN κυττάρων (CD4-CD8-) στα τελικά στάδια των SP κυττάρων, CD4 και CD8 (Εικόνα 3.26).



Εικόνα 3.26: Κατανομή των GFP⁺ θυμοκυττάρων, ανάλογα με την έκφραση των πρωτεϊνών-δεικτών της διαφοροποίησης CD4, CD8. Θυμοκύτταρα επιμολύνθηκαν με τους ρετροϊούς flag-ProTa WT, flag-ProTa TR και flag-ProTa MUT και συνκαλλιεργήθηκαν με κύτταρα στρώματος OP9-DL1. Απομονώθηκαν από τη συνκαλλιέργεια την 1^η και 5^η ημέρα και επωάστηκαν με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των επιφανειακών μορίων CD4 και CD8. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Η διαφοροποίηση των κυττάρων προχώρησε με τον ίδιο ρυθμό σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Τα θυμοκύτταρα, δηλαδή, που είχαν επιμολυνθεί με τους ρετροϊούς που εκφράζουν την αγρίου τύπου προθυμοσίνη α, την «αποπτωτική» της μορφή και τη μορφή που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3, παρουσίασαν τον ίδιο φαινότυπο με τα κύτταρα μάρτυρες, που είχαν επιμολυνθεί με ρετροϊό μάρτυρα (Εικόνα 3.27). Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α δε διαδραματίζει κάποιο ρόλο στα στάδια αυτά της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 3.27: Γραφική απεικόνιση της κατανομής των υποπληθυσμών DN, DP, CD4+ και CD8+ των GFP+ θυμοκυττάρων. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από τρεις επαναλήψεις κάθε δείγματος.

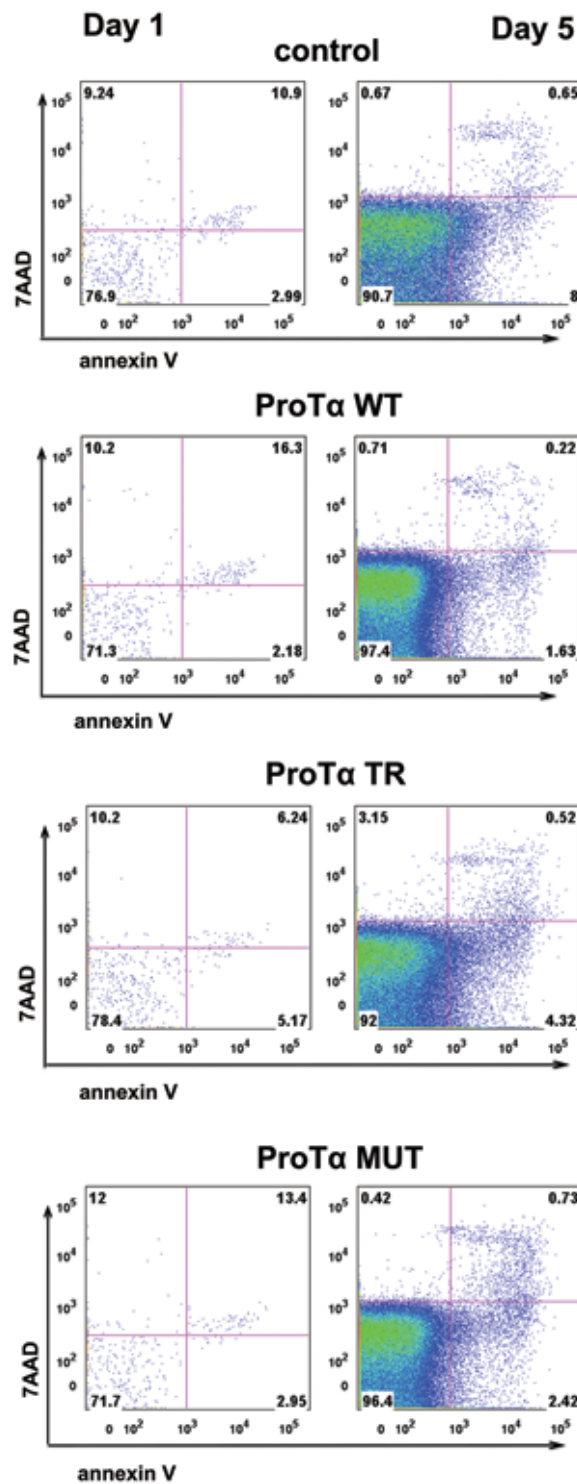
3.3.3 Η προθυμοσίνη α δεν επηρεάζει τα επίπεδα της απόπτωσης κατά τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων.

Η μελέτη των επιπέδων της απόπτωσης στα GFP+ θυμοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με χρώση των κυττάρων με φθορίζουσα Ανεξίνη V και 7AAD, η οποία είναι μία χρωστική που προσδέεται στο DNA, χωρίς όμως να έχει την ικανότητα να διαπερνάει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Παρατηρήσαμε ότι την 1^η αλλά και την 5^η ημέρα της συν-καλλιέργειας τα επίπεδα της απόπτωσης ήταν εξαιρετικά χαμηλά, μιας και το μεγαλύτερο

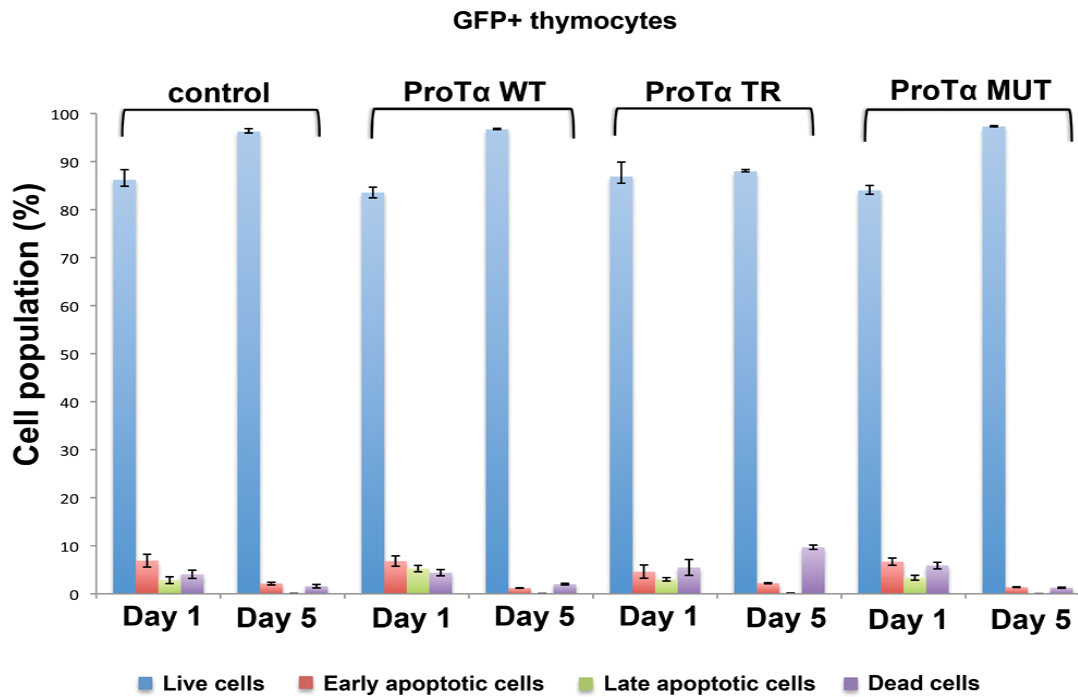
ποσοστό του πληθυσμού (>70% την 1^η μέρα και >95% την 5^η ημέρα) βρισκόταν στο στάδιο των μη αποπτωτικών κυττάρων (Annexin V- 7AAD-) (Εικόνα 3.28).

Ο συνδυασμός των τριών επαναλήψεων κάθε δείγματος (Εικόνα 3.29) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της απόπτωσης των GFP+ θυμοκυττάρων δεν έχουν επηρεαστεί από την υπερέκφραση της αγρίου τύπου προθυμοσίνη α, όπως επίσης δεν έχουν επηρεαστεί από την έκφραση της «αποπτωτικής» μορφής της ή του αρνητικού μάρτυρα που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α στο σύστημα διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων δεν επηρεάζει την ωρίμανση των πρόγονικών θυμοκυττάρων σε T κύτταρα της ανοσολογικής απόκρισης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων που εξέφραζαν είτε την «αποπτωτική» μορφή της είτε τη μορφή της προθυμοσίνης α που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3.



Εικόνα 3.28: Κατανομή των *GFP*⁺ θυμοκυττάρων, ανάλογα με το στάδιο της απόπτωσης στο οποίο βρίσκονται. Θυμοκύτταρα μολύνθηκαν με τους ρετροϊικούς φορείς έκφρασης *flag-ProTa WT*, *flag-ProTa TR* και *flag-ProTa MUT* συν-καλλιεργήθηκαν με κύτταρα στρώματος *OP9-DL1*. Απομονώθηκαν από τη συν-καλλιέργεια την 1^η και 5^η ημέρα και επώαστηκαν με φθορίζουσα *Annexin V* και *7AAD*. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 3.29: Γραφική απεικόνιση της κατανομής των αποπτωτικών πληθυσμών. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από τρεις επαναλήψεις κάθε δείγματος.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης είναι μια βασική και απαραίτητη διαδικασία για την εκτέλεση πολλών κυτταρικών λειτουργιών. Οι πρωτεΐνες-αναδιοργανωτές της χρωματίνης, επιτρέποντας ή αποτρέποντας την πρόσβαση των παραγόντων τροποποίησης στο γενετικό υλικό, ρυθμίζουν τους μηχανισμούς της αντιγραφής (Ding et al., 2011), της μεταγραφής (Bonifer et al., 2011), της επιδιόρθωσης του DNA (Sinha et al., 2009), αλλά και της απόπτωσης (Jazirehi, 2010). Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές σχετικά με πρωτεΐνες που επηρεάζουν τη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και, επίσης, συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης, γεγονός που υποστηρίζει την άμεση αλληλεπίδραση των δύο αυτών κυτταρικών μηχανισμών (Scaffidi et al., 2002, Ugrinova et al., 2007, Konishi et al., 2003, Okamura et al., 2008). Μία ακόμη κυτταρική λειτουργία που είναι στενά συνδεδεμένη με την αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης και την απόπτωση είναι η διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε λειτουργικά T κύτταρα της ανοσολογικής απόκρισης είναι μία διαδικασία που επιτυγχάνεται μέσω συνεχούς αναδιάταξης της δομής της χρωματίνης (Ho et al., 2010, Georgopoulos, 2002) και ελέγχεται αυστηρά από το μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Starr et al., 2003, Hernandez et al., 2010).

Η προθυμοσίνη α και η SET/TAF-1 β είναι δύο πρωτεΐνες-αναδιοργανωτές της χρωματινικής δομής, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Karetsova et al., 2004). Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν σε δύο διαφορετικά μονοπάτια της απόπτωσης. Η προθυμοσίνη α εμπλέκεται στο μιτοχονδριακό αποπτωτικό μηχανισμό και ειδικότερα στην αναστολή του σχηματισμού του αποπτωσώματος (Jiang et al., 2003). Η SET/TAF-1 β συμμετέχει στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Fan et al., 2003a). Επιπλέον, η προθυμοσίνη α εκφράζεται σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων και συμμετέχει τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοζόμενη ανοσολογική απόκριση (Papanastasiou et al., 1992, Voutsas et al., 2000, Skopeliti et al., 2009, Mosoian et al., 2010).

Στην παρούσα εργασία, αρχικά, διερευνήσαμε διεξοδικά το ρόλο της προθυμοσίνης α και της SET/TAF-1 β στο μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου,

μέσω του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Στη συνέχεια, μελετήσαμε το ρόλο της προθυμοσίνης α στο σύστημα της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων *in vivo*.

4.1. Μελέτη της αποπτωτικής απόκρισης των κυττάρων μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση της προθυμοσίνης α και της SET/TAF-1.

Αρχικά, αναπτύχθηκε ένα πειραματικό σύστημα μελέτης της απόπτωσης, χρησιμοποιώντας τα καρκινικά κυττάρων HeLa και τρία χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης.

Τα πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι το πρότυπο έκφρασης της προθυμοσίνης α διαφοροποιείται κατά την απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζεται μία μικρότερου μεγέθους μορφή της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι η κασπάση-3 καταλύει την περιορισμένη πρωτεολυτική σχάση της προθυμοσίνης α στη θέση 99 σε αποπτωτικά κύτταρα (Evstafieva et al., 2000, Enkemann et al., 2000). Σύμφωνα με τα πειράματά μας, τα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής της «αποπτωτικής» μορφής της προθυμοσίνης α συσχετίζονται με το βαθμό ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τη δράση της προθυμοσίνης α στην απόπτωση, χρησιμοποιήσαμε σαν αρνητικό μάρτυρα την παραθυμοσίνη, μια πρωτεΐνη με υψηλή ομολογία με την προθυμοσίνη α (Haritos et al., 1985). Τα αποτελέσματα της μελέτης της αυτής έδειξαν ότι η παραθυμοσίνη, παρά τη μεγάλη δομική ομολογία της με την προθυμοσίνη α , δεν αποτελεί υπόστρωμα των κασπασών. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της SET/TAF-1 β μεταξύ φυσιολογικών και αποπτωτικών κυττάρων.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της προθυμοσίνης α και της SET/TAF-1 β στο μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μελετήθηκε η αποπτωτική απόκριση καρκινικών κυττάρων μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση των πρωτεϊνών αυτών. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση ή η αποσιώπηση της SET/TAF-1 β δεν επηρεάζει τα επίπεδα της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων HeLa. Ο έλεγχος των προτύπων έκφρασης της κασπάσης-3 και της PARP-1 έδειξε ότι υπάρχει μια μικρή διαφοροποίηση, στα αποπτωτικά κύτταρα, μεταξύ αυτών που εκφράζουν την SET/TAF-1 β σε φυσιολογικά επίπεδα και αυτών με αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα

έκφρασης της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και της σχάσης της PARP-1, μετά από υπερέκφραση, και αύξηση, μετά από αποσιώπηση της SET/TAF-1β. Ωστόσο, ο έλεγχος των αποπτωτικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι οι αλλαγές αυτές δεν ήταν ικανές να αλλάξουν τον αποπτωτικό φαινότυπο των κυττάρων.

Τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης της αποπτωτικής απόκρισης των κυττάρων, μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση της προθυμοσίνης α, υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει προστατευτικό ρόλο. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α, σε φυσιολογικά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και κατά συνέπεια τη μείωση της σχάσης της PARP-1, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3. Παρομοίως, σε αποπτωτικά κύτταρα, μετά από υπερέκφραση της προθυμοσίνης α, ανιχνεύθηκαν μειωμένα επίπεδα της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και, σε μικρότερο βαθμό, μειωμένα επίπεδα της πρωτεολυμένης PARP-1. Η διαφορά στη μείωση της σχάσης της PARP-1, ανάμεσα στα φυσιολογικά και στα αποπτωτικά κύτταρα, πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι, στις αποπτωτικές συνθήκες, η πρωτεόλυση της PARP-1 ήταν σχεδόν πλήρης και συνεπώς μη αναστρέψιμη. Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης, η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3, αλλά και της σχάσης της PARP-1 τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα αποπτωτικά κύτταρα.

Ο ποσοτικός έλεγχος, με κυτταρομετρία ροής, έδειξε ότι η υπερέκφραση ή η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α, στο σύστημα αυτό, επηρεάζει την κατανομή των αποπτωτικών πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α, σε αποπτωτικά κύτταρα, οδήγησε στη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων της όψιμης αποπτωτικής φάσης (κατά 30-35%) και στην αύξηση του πληθυσμού των φυσιολογικών κυττάρων. Η αύξηση αυτή του αριθμού των φυσιολογικών κυττάρων διέφερε ανάλογα με το είδος του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της απόπτωσης. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 30% μετά από επώαση με ετοποσίδιο και αύξηση κατά 70% μετά από επώαση με σισπλατίνη. Αντίθετα, η αποσιώπηση της προθυμοσίνης α, σε φυσιολογικά κύτταρα, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων κατά 77%, την αύξηση του πληθυσμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων κατά 72% και τη μείωση του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων κατά 55%. Στις συνθήκες επαγωγής της απόπτωσης παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση των αποπτωτικών πληθυσμών και μείωση του αριθμού των φυσιολογικών κυττάρων. Είναι

σημαντικό το γεγονός ότι η υπερέκφραση της προθυμοσίνης στα καρκινικά κύτταρα δεν επηρέασε την αποπτωτική απόκριση τους, επιβεβαιώνοντας με τον τρόπο αυτό την εξειδικευμένη δράση της προθυμοσίνης α στην απόπτωση.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας, όσον αφορά τη συμμετοχή των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και SET/TAF-1 β στο μηχανισμό της απόπτωσης υποδεικνύουν ότι ο ρόλος τους διαφέρει σημαντικά. Η πρωτεΐνη-συνοδός των ιστονών SET/TAF-1 β , ενώ έχει ήδη εμπλακεί στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, δε φαίνεται να επηρεάζει την έκβαση του αποπτωτικού μηχανισμού μέσω των μιτοχονδρίων. Αντίθετα, η αλλαγή των επιπέδων της προθυμοσίνης α , σε φυσιολογικά, αλλά και αποπτωτικά κύτταρα, επηρεάζει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας. Τέλος, η προθυμοσίνη, αν και έχει σημαντική δομική ομολογία με την προθυμοσίνη α , δεν αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3 και δεν επηρεάζει τον αποπτωτικό φαινότυπο των κυττάρων στο σύστημά μας. Το γεγονός αυτό, υποστηρίζει την εξειδίκευση της δράσης της προθυμοσίνης α στην απόπτωση.

4.3 Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της προθυμοσίνης α σε αποπτωτικά κύτταρα.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η προθυμοσίνη α είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων (Manrow et al., 1991, Vareli et al., 2000). Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι κατά την απόπτωση παρατηρείται η περιορισμένη πρωτεόλυσή της. Η θέση πρωτεόλυσής της έχει χαρτογραφηθεί (θέση 99 της αμινοξικής της αλληλουχίας) (Evstafieva et al., 2003) και αποτελεί μέρος της αλληλουχίας του διμερούς σήματος πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης. Λαμβάνοντας υπόψη τις πληροφορίες αυτές μελετήθηκε ο εντοπισμός της προθυμοσίνης α σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα. Χρησιμοποιώντας το αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της, η πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στον πυρήνα σε φυσιολογικά, αλλά και αποπτωτικά κύτταρα. Αντίθετα, όταν η προθυμοσίνη α ανιχνευτηκε με αντίσωμα έναντι του αμινοτελικού της άκρου, εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα και στην περιφέρεια των αποπτωτικών κυττάρων.

Η πειραματική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε και τα δεδομένα που προέκυψαν οδηγούν στην υπόθεση ότι η «αποπτωτική» μορφή της προθυμοσίνης α μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή, κατασκευάστηκαν

τρεις φορείς-ρετροϊών, οι οποίοι εκφράζουν την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, την «αποπτωτική» μορφή ProTa (1-99), αλλά και ένα μετάλλαγμα της προθυμοσίνης α , το οποίο δεν αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3. Στα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας που πραγματοποιήθηκαν, η αγρίου τύπου μορφή της προθυμοσίνης α ανιχνεύθηκε στον πυρήνα των φυσιολογικών κυττάρων, όπως αναμενόταν. Αντίθετα, στα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύθηκε, επίσης, στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, το μετάλλαγμα της προθυμοσίνης α που δεν αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3, ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στον πυρήνα, ακόμα και μετά από επαγωγή της απόπτωσης. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την αρχική μας υπόθεση ότι είναι η «αποπτωτική» μορφή, η οποία προκύπτει από την περιορισμένη πρωτεόλυση της προθυμοσίνης α από την κασπάση-3, που μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα των αποπτωτικών κυττάρων.

Μία πολύ ενδιαφέρουσα υπόθεση για το λειτουργικό ρόλο της προθυμοσίνης α στο κυτταρόπλασμα των αποπτωτικών κυττάρων είναι ότι αναστέλει το σχηματισμό του αποπτωσώματος και της έναρξης του καταρράκτη των αποπτωτικών κασπασών, μέσω της αλληλεπίδρασής της με το κυτόχρωμα c (Markova et al., 2003).

Τα δομικά χαρακτηριστικά της προθυμοσίνης α , που την κατατάσσουν στην κατηγορία των εγγενώς εύκαμπτων πρωτεϊνών (Watts et al., 1990, Gast et al., 1995), προσφέρουν στην πρωτεΐνη αυτή μία δυναμική πλαστικότητα, η οποία της επιτρέπει να αναγνωρίζει πολλά διαφορετικά μόρια με υψηλή εξειδίκευση και χαμηλή συγγένεια (Dunker et al., 1998, Radivojac et al., 2004). Επομένως, η δράση της προθυμοσίνης α εξαρτάται άμεσα από το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται και από τους παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί για πολλές ακόμη πυρηνικές πρωτεΐνες, όπως η HMGB1, η νουκλεολίνη και η συνδετική ιστόνη H1.2, η αλλαγή του εντοπισμού τους, που προκαλείται από διαφορετικά ερεθίσματα, συνεπάγεται την αλλαγή του ρόλου τους και τη συμμετοχή τους σε νέα μονοάτια σηματοδότησης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην αλλαγή των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, είτε στο ότι η διαφορετική τους εντόπιση, από μόνη της, αποτελεί ένα σήμα το οποίο ανιχνεύεται από τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, η ισομορφή της συνδετικής ιστόνης H1.2 στον πυρήνα προκαλεί τη συμπύκνωση της χρωματίνης σε ανώτερες δομές, ενώ στο κυτταρόπλασμα προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, πιθανώς μέσω της αλληλεπίδρασής της με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bak (Konishi et al., 2003, Okamura et al., 2008). Επίσης, η HMGB1

στον πυρήνα δεσμεύεται στο εκμαγείο του DNA και έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων *in vitro* (Bonaldi et al., 2002). Αντίθετα, κατά την απόπτωση προσδένεται ισχυρά στη συμπυκνωμένη χρωματίνη εμποδίζοντας, πιθανώς, τη μεταγωγή σημάτων νέκρωσης στα γειτονικά κύτταρα (Bianchi et al., 2004). Η πρωτεΐνη συνοδός των ιστονών νουκλεολίνη στον πυρήνα συμμετέχει στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης (Laskey et al., 1978, Gaume et al., 2011), ενώ στα αρχικά στάδια της απόπτωσης μετακινείται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη, αλλά και προς το εξωτερικό του κυττάρου, καθώς ανιχνεύθηκε στα αποπτωτικά σωματίδια (Mi et al., 2003, Hirano et al., 2005, Ugrinova et al., 2007). Αντίστοιχα, η προθυμοσίνη α στον πυρήνα αλληλεπιδρά με τη συνδετική ιστόνη H1 και προκαλεί την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, ενώ η μετατόπισή της στο κυτταρόπλασμα των αποπτωτικών κυττάρων της δίνει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με παράγοντες του μηχανισμού της απόπτωσης και επομένως να συμμετάχει στη ρύθμισή του.

Η SET/TAF-1 β και η παραθυμοσίνη επίσης περιέχουν στη δομή της εγγενώς εύκαμπτες περιοχές. Ωστόσο, πειράματα εντοπισμού των δύο αυτών πρωτεϊνών σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική εντόπιση τους δε μεταβάλλεται κατά την απόπτωση (τα πειράματα αυτά δεν παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή). Η SET/TAF-1 β , αλλά και η παραθυμοσίνη παραμένουν, δηλαδή, αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων HeLa, ακόμη και μετά από επαγωγή της απόπτωσης. Επομένως, δεν θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με παράγοντες του μηχανισμού της απόπτωσης που εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό αποτελεί μία πιθανή εξήγηση των αρνητικών αποτελεσμάτων μας, όσον αφορά τη συμμετοχή τους στο αποπτωτικό μονοπάτι των μιτοχονδρίων.

4.4 Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων.

Αποφασίσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω το ρόλο της προθυμοσίνης α , ως αντι-αποπτωτικού μορίου, στο σύστημα της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων, το οποίο είναι γνωστό ότι επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την απόπτωση και, πιο συγκεκριμένα, από την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μορίων (Starr et al., 2003, Hernandez et al., 2010).

Η πειραματική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε την επιμόλυνση αδιαφοροποίητων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων με ρετροϊούς που εκφράζουν την

αγρίου τύπου προθυμοσίνη α, την «αποπτωτική» μορφή ProTa (1-99) ή το μετάλλαγμα της που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3. Η «αποπτωτική» μορφή ProTa (1-99) χρησιμοποιήθηκε ως μία συνεχώς ενεργή μορφή της πρωτεΐνης, όσον αφορά το ρόλο της στην απόπτωση, ενώ, αντίθετα, το μετάλλαγμα που δεν αναγνωρίζεται από την κασπάση-3, ως μία επικρατής αρνητική μορφή. Η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη μελέτη του ρόλου της προθυμοσίνης α στην ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων, είχε ως στόχο την τροποποίηση της έκφρασης αποκλειστικά των αποπτωτικών μορφών της πρωτεΐνης αυτής. Όπως είναι γνωστό, η προθυμοσίνη α συμμετέχει επίσης στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης, επομένως μία προσέγγιση αποσιώπησης ή γονιδιακής απαλοιφής θα επηρέαζε, πιθανώς, εκτός από την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων, και τη δομή της χρωματίνης. Αντίθετα, χρησιμοποιήθηκαν μεταλλάγματα, τα οποία εκφράζουν μορφές της πρωτεΐνης που διαδραματίζουν ρόλο αποκλειστικά στην απόπτωση και δεν επηρεάζουν το ρόλο της στην αποσυμπύκνωση της χρωματινικής δομής.

Τα επιμολυσμένα θυμοκύτταρα συν-καλλιεργήθηκαν με την κυτταρική σειρά στρώματος OP9-DL1 για την επαγωγή της διαφοροποίησης. Η κυτταρική σειρά στρώματος OP9-DL1 κατασκευάστηκε από κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών (OP9), τα οποία τροποποιήθηκαν γενετικά ώστε να εκφράζουν εκτοπικά το συνδέτη του υποδοχέα Notch, Delta-like-1 (DL1), η ενεργοποίηση του οποίου είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων (Radtke et al., 2010). Τα OP9-DL1 κύτταρα υποστηρίζουν την διαφοροποίηση αποκλειστικά σε T λεμφοκύτταρα των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών ενήλικων ποντικών, των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικών (Schmitt et al., 2004b, Schmitt et al., 2002, Radtke et al., 2004), αλλά και των ανθρώπινων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών (De Smedt et al., 2004, La Motte-Mohs et al., 2005). Μέχρι πρόσφατα, η επιστημονική κοινότητα θεωρούσε απαραίτητη την τρισδιάστατη δομή του θύμου για τη διαφοροποίηση των HSCs σε T λεμφοκύτταρα (Hare et al., 1999). Το 2002, ωστόσο, αναπτύχθηκε το σύστημα συν-καλλιέργειας των HSCs με τα κύτταρα OP9-DL1, με το οποίο αποδείχθηκε ότι η διαφοροποίηση των T θυμοκυττάρων δεν προ-απαιτεί ένα τρισδιάστατο περιβάλλον (Schmitt et al., 2002). Το σύστημα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη του μηχανισμού της ωρίμανσης των T λεμφοκυττάρων (Schmitt et al., 2004b, Taghon et al., 2005) και έχει αναδείξει το ρόλο πολλών πρωτεϊνών στη ρύθμιση του μηχανισμού αυτού (Lai et al., 2010, Teague et al.,

2010, Hu et al., 2009, Iacovelli et al., 2009). Έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ώριμων ανθρώπινων CD4 και CD8 T κυττάρων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε θεραπευτικές αγωγές κατά της ανοσοανεπάρκειας (Van Coppenolle et al., 2009, Awong et al., 2011).

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης των ανώριμων θυμοκυττάρων σε T κύτταρα πραγματοποιήθηκε μετά από 5 ημέρες συν-καλλιέργειας με τα κύτταρα στρώματος OP9-DL1. Το χρονικό διάστημα αυτό επιλέχθηκε με σκοπό να συμπεριληφθούν στο τελικό δείγμα, και να μελετηθούν, κύτταρα που βρίσκονταν σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια της διαφοροποίησης και όχι μόνο κύτταρα που θα έχουν φτάσει στο τελευταίο στάδιο.

Η μελέτη της κατανομής του πληθυσμού των κυττάρων στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης έδειξε ότι, μετά από 5 ημέρες συν-καλλιέργειας με τα OP9-DL1 κύτταρα, τα ανώριμα βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα του θύμου είχαν προχωρήσει στα επόμενα στάδια της διαφοροποίησης. Ωστόσο, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου προθυμοσίνης α , η έκφραση της συνεχώς ενεργούς «αποπτωτικής» μορφής της ή η έκφραση της επικρατούς αρνητικής μορφής της δεν επηρέασαν τη διαδικασία αυτή. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης, παρατηρήθηκε ότι η μετάβαση από το στάδιο DN1 στο στάδιο DN4, του πληθυσμού των επιμολυσμένων με τους ρετροϊούς θυμοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο ρυθμό σε όλα τα δείγματα. Δηλαδή, τα θυμοκύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με τους ρετροϊούς έκφρασης των τριών μορφών της προθυμοσίνης α είχαν τον ίδιο φαινότυπο μεταξύ τους, αλλά και με το ρετροϊό μάρτυρα. Παρόμοια αποτελέσματα ανακτήθηκαν και όσον αφορά τα επόμενα στάδια της διαφοροποίησης, δηλαδή, τη μετάβαση από το στάδιο DN στο στάδιο των SP κυττάρων (είτε CD4 είτε CD8). Όταν ελέγχθηκαν τα επίπεδα της απόπτωσης των επιμολυσμένων με τους ρετροϊούς θυμοκυττάρων την 5^η ημέρα της συν-καλλιέργειας βρέθηκε ότι σχεδόν ολόκληρος ο πληθυσμός (>95%) απαρτιζόταν από φυσιολογικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό, όπως και τα αμέσως προηγούμενα, υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός της απόπτωσης και η εύρυθμη λειτουργία του δε διαταράχθηκαν από την υπερέκφραση της προθυμοσίνης α , όπως δε διαταράχθηκαν από την έκφραση είτε της συνεχώς ενεργούς μορφής της είτε της επικρατούς αρνητικής μορφής της.

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης είναι μία διαδικασία που ρυθμίζεται αυστηρά από πολλούς κυτταρικούς παράγοντες και εξαρτάται άμεσα από την αλληλεπίδραση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το πολύπλοκο αυτό σύστημα ελέγχου της

διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων από το μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είναι ανεπτυγμένο έτσι ώστε να μπορεί να ανταπεξέλθει στη μερική διατάραξη της ισορροπίας του. Είναι, δηλαδή, ένα σύστημα ευέλικτο που έχει την ικανότητα να προσαρμοστεί, ως ένα βαθμό, σε συνθήκες μειωμένης ή αυξημένης έκφρασης παραγόντων που συμμετέχουν στη ρύθμισή του, όπως η προθυμοσίνη α.

Σύμφωνα με τα πειράματά μας, η αποσιώπηση ή η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α σε καρκινικά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της αποπτωτικής απόκρισης τους μετά από χορήγηση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σισπλατίνη και ετοποσίδιο. Η χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι μία θεραπευτική προσέγγιση που χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες για την καταπολέμηση διαφόρων μορφών καρκίνου. Ωστόσο, η θεραπευτική τους δράση περιορίζεται από το φαινόμενο της αντίστασης που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα σε αυτούς τους χημικούς παράγοντες. Για το σκοπό αυτό, τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες προσδιορισμού άλλων παραγόντων που επηρεάζουν το μηχανισμό της απόπτωσης και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την χημειοθεραπευτική αγωγή. Για παράδειγμα, η τροποποίηση της έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν είτε θετικά είτε αρνητικά την διαδικασία της απόπτωσης θα μπορούσε να αποτελεί μία προσέγγιση που, σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπευτική αγωγή, θα ενίσχυε το μηχανισμό καταπολέμησης των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, μία κλινική εφαρμογή των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας θα μπορούσε να είναι η τροποποίηση της έκφρασης της προθυμοσίνης α, δηλαδή η μείωση της, σε καρκινικά κύτταρα σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπευτική αγωγή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, καθώς και η τροποποίηση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή είναι γεγονότα απαραίτητα για τη ρύθμιση και την εκτέλεση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν αναδείξει πυρηνικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μηχανισμούς αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης σε νέους ρυθμιστές της αποπτωτικής διαδικασίας.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος δύο πρωτεϊνών-αναδιοργανωτών της χρωματίνης, της προθυμοσίνης α και της SET/TAF-1 β , στην αποπτωτική απόκριση των κυττάρων, μέσω του ενδογενούς μονοπατιού των μιτοχονδρίων. Η πειραματική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν α) η μελέτη των προτύπων έκφρασης της προθυμοσίνης α και της SET/TAF-1 β σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα και β) ο έλεγχος της αποπτωτικής απόκρισης των κυττάρων μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπησή τους.

Σε αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύθηκε η «αποπτωτική» μορφή της προθυμοσίνης α , η οποία προκύπτει μετά από την πρωτεόλυσή της προθυμοσίνης α από την κασπάση-3. Η μορφή αυτή ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα και στην περιφέρεια των αποπτωτικών κυττάρων, σε αντίθεση με την ολόκληρου μήκους μορφή της πρωτεΐνης, που εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α σε φυσιολογικά και αποπτωτικά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της απόπτωσης, ενώ η αποσιώπησή της οδήγησε σε αύξηση των αποπτωτικών πληθυσμών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας προθυμοσίνη α επιδεικνύει έναν σαφή προστατευτικό ρόλο έναντι της απόπτωσης που επάγεται μετά από χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η SET/TAF-1 β πιθανώς δεν αποτελεί υπόστρωμα των αποπτωτικών κασπασών και δε συμμετέχει στη ρύθμιση του μονοπατιού αυτού.

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α , ως αντι-αποπτωτικού μορίου, μελετήθηκε *in vitro*, στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από συνεχείς αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και ρυθμίζεται σημαντικά από την απόπτωση. Για το σκοπό της μελέτης αυτής, αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα από το θύμο ποντικών επιμολύνθηκαν με ρετροϊκούς φορείς έκφρασης τριών μορφών της

προθυμοσίνης α : την αγρίου τύπου μορφή, την «αποπτωτική» μορφή ProT(1-99) και την επικρατή αρνητική της μορφή, η οποία δεν πρωτεολύεται από την κασπάση-3. Μελετήθηκε αναλυτικά η πορεία της διαφοροποίησης των επιμολυσμένων θυμοκυττάρων από το στάδιο DN1 στο στάδιο SP. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του ελέγχου της πορείας της διαφοροποίησης έδειξε ότι η μετάβαση των ανώριμων θυμοκυττάρων από τα αρχικά στα τελικά στάδια της διαδικασίας αυτής δεν επηρεάζεται από αλλαγές των επιπέδων της προθυμοσίνης α ή των μεταλλαγμάτων της.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι αλλαγές των επιπέδων της προθυμοσίνης α δεν επηρεάζουν το σύστημα ελέγχου της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων, το οποίο είναι αρκετά ευέλικτο, ώστε να μπορεί να ανταποκριθεί σε αλλαγές των επιπέδων μορίων που συμμετέχουν στη ρύθμισή του. Αντίθετα, η εργασία αυτή υποστηρίζει το σημαντικό ρόλο της προθυμοσίνης α στην απόπτωση καρκινικών κυττάρων που επάγεται από χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αναδεικνύοντας ένα νέο μόριο-στόχο για τη μελέτη της ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπευτική αγωγή.

SUMMARY

Multiple cellular processes, including gene silencing, cell growth, DNA repair and apoptosis are regulated by the dynamic structure of chromatin. In this study we investigated the role of two histone chaperones, prothymosin α and SET/TAF-I β , which have been implicated in diverse processes, such as chromatin remodeling and cell death, in the regulation of the mitochondrial apoptotic pathway. Our data showed that the expression pattern of prothymosin α is altered during apoptosis induced upon treatment of cancer cells with chemotherapeutic drugs and an apoptotic form of ProT α is generated by proteolytic cleavage by caspase-3. Confocal microscopy experiments showed that the apoptotic ProT α is translocated from the nucleus to the cytoplasm and the cell periphery upon induction of apoptosis. Overexpression of prothymosin α in HeLa cells confers resistance towards apoptosis induced upon cisplatin and etoposide treatment. In accordance to these findings, silencing of prothymosin α sensitizes cells to apoptosis. Our data support the notion that prothymosin α exerts an anti-apoptotic role in cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. On the contrary, changes of SET/TAF-1 β expression levels do not affect the apoptotic response of the cells.

Chromatin remodeling complexes have essential roles in many aspects of T-cell development. Furthermore, the generation of a functional T cell's repertoire is tightly regulated by the apoptotic machinery at different stages and levels. To investigate the role of prothymosin α , through its anti-apoptotic function, in T-cell development, we cultured mouse hematopoietic stem cells (HSCs) *in vitro* on OP9 mouse stromal cells expressing the Notch-1 ligand Delta-like-1 (OP9-DL1). These HSCs were infected with retroviruses expressing wild type prothymosin α , the constitutively active apoptotic mutant of prothymosin α and a dominant negative prothymosin α mutant, which bears a disrupted caspase-3 recognition site. The differentiation process of the infected T cell precursors through DN, DP and SP developmental stages was followed by multiparameter flow cytometry. Our data showed that T cell maturation was not affected by alterations on the expression levels of the wild type or the mutant forms of prothymosin α . However, our work designates prothymosin α as a putative target

molecule for the elaboration of strategies to modulate apoptosis, linked to this protein (inactivation, mutation), that may lead to the conception of new chemotherapeutic approaches.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akashi, K., Kondo, M., Von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I. L. 1997. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell*, 89, 1033-41.
- Allan, J., Hartman, P. G., Crane-Robinson, C. & Aviles, F. X. 1980. The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, 288, 675-9.
- Anderson, G. & Jenkinson, E. J. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature reviews. Immunology*, 1, 31-40.
- Aniello, F., Branno, M., De Rienzo, G., Ferrara, D., Palmiero, C. & Minucci, S. 2002. First evidence of prothymosin alpha in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. *Mechanisms of development*, 110, 213-7.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. & Martinou, J. C. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 276, 11615-23.
- Attia, M., Forster, A., Rachez, C., Freemont, P., Avner, P. & Rogner, U. C. 2011. Interaction between nucleosome assembly protein 1-like family members. *J Mol Biol*, 407, 647-60.
- Awong, G., Herer, E., La Motte-Mohs, R. N. & Zuniga-Pflucker, J. C. 2011. Human CD8 T cells generated in vitro from hematopoietic stem cells are functionally mature. *BMC Immunol*, 12, 22.
- Balciunaite, G., Ceredig, R. & Rolink, A. G. 2005. The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood*, 105, 1930-6.
- Baldwin, E. L. & Osheroff, N. 2005. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 5, 363-72.
- Baxevanis, C. N., Frilingos, S., Seferiadis, K., Reclus, G. J., Arsenis, P., Katsiyiannis, A., Anastasopoulos, E., Tsolas, O. & Papamichail, M. 1990a. Enhancement of human T lymphocyte function by prothymosin alpha: increased production of interleukin-2 and expression of interleukin-2 receptors in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 12, 595-617.
- Baxevanis, C. N., Reclus, G. J., Panneerselvam, C. & Papamichail, M. 1990b. Enhancement of human T lymphocyte functions by prothymosin alpha. I. Augmentation of mixed lymphocyte culture reactions and soluble protein-induced proliferative responses. *Immunopharmacology*, 15, 73-84.
- Baxevanis, C. N., Thanos, D., Reclus, G. J., Anastasopoulos, E., Tsokos, G. C., Papamatheakis, J. & Papamichail, M. 1992. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148, 1979-84.
- Baxevanis, C. N., Gritzapis, A. D., Spanakos, G., Tsitsilonis, O. E. & Papamichail, M. 1995. Induction of tumor-specific T lymphocyte responses in vivo by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother*, 40, 410-8.
- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M. & Lieberman, J. 2001. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*, 276, 43285-93.

- Bianchi, M. E. & Manfredi, A. 2004. Chromatin and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1677, 181-6.
- Blower, M. D. & Karpen, G. H. 2001. The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nature cell biology*, 3, 730-9.
- Boán, F., Viñas, A., Buceta, M., Domínguez, F., Sánchez, L. & Gómez-Márquez, J. 2001. Prothymosin alpha, a mammalian c-myc-regulated acidic nuclear protein, provokes the decondensation of human chromosomes in vitro. *Cytogenetics and cell genetics*, 93, 171-4.
- Bonaldi, T., Längst, G., Strohner, R., Becker, P. B. & Bianchi, M. E. 2002. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *The EMBO journal*, 21, 6865-73.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A. & Bianchi, M. E. 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *The EMBO journal*, 22, 5551-60.
- Bonifer, C. & Cockerill, P. N. 2011. Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease. *Adv Exp Med Biol*, 711, 12-25.
- Bonne-Andrea, C., Harper, F., Sobczak, J. & De Recondo, A. M. 1984. The role of HMG1 protein in nucleosome assembly and in chromatin replication. *Advances in experimental medicine and biology*, 179, 479-88.
- Bortvin, A. & Winston, F. 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science (New York, N.Y.)*, 272, 1473-6.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Köntgen, F., Adams, J. M. & Strasser, A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, 286, 1735-8.
- Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahm, K., Merkenschlager, M. & Fisher, A. G. 1997. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, 91, 845-54.
- Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merkenschlager, M. & Fisher, A. G. 1999. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Molecular cell*, 3, 207-17.
- Brunsting, A. & Mullaney, P. F. 1974. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophysical journal*, 14, 439-53.
- Cairns, B. R. 2005. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Current opinion in genetics & development*, 15, 185-90.
- Carpenter, A. C. & Bosselut, R. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nature immunology*, 11, 666-73.
- Chadwick, B. P. & Willard, H. F. 2001. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *The Journal of cell biology*, 152, 375-84.
- Chakravarthy, S., Park, Y.-J., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R. S. & Luger, K. 2005. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS letters*, 579, 895-8.
- Chakravarti, D. & Hong, R. 2003. SET-ting the stage for life and death. *Cell*, 112, 589-91.
- Chantalat, L., Nicholson, J. M., Lambert, S. J., Reid, A. J., Donovan, M. J., Reynolds, C. D., Wood, C. M. & Baldwin, J. P. 2003. Structure of the histone-core octamer in KCl/phosphate crystals at 2.15 Å resolution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 59, 1395-407.

- Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, 16, 395-419.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.-J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D. & Zhang, D. D. 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular cell*, 34, 663-73.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S. J. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 8, 705-11.
- Chi, T. H., Wan, M., Lee, P. P., Akashi, K., Metzger, D., Chambon, P., Wilson, C. B. & Crabtree, G. R. 2003. Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity*, 19, 169-82.
- Cho, S. K., Webber, T. D., Carlyle, J. R., Nakano, T., Lewis, S. M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. 1999. Functional characterization of B lymphocytes generated in vitro from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9797-802.
- Chuang, C.-H. & Belmont, A. S. 2007. Moving chromatin within the interphase nucleus-controlled transitions? *Seminars in cell & developmental biology*, 18, 698-706.
- Corbella, P., Moskophidis, D., Spanopoulou, E., Mamalaki, C., Tolaini, M., Itano, A., Lans, D., Baltimore, D., Robey, E. & Kioussis, D. 1994. Functional commitment to helper T cell lineage precedes positive selection and is independent of T cell receptor MHC specificity. *Immunity*, 1, 269-76.
- Cory, S. & Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 647-56.
- Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. & Wolberger, C. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature structural & molecular biology*, 11, 1037-43.
- Costanzi, C. & Pehrson, J. R. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393, 599-601.
- Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R. & Yarmush, M. L. 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal*, 86, 1234-42.
- De Pooter, R. & Zúñiga-Pflücker, J. C. 2007. T-cell potential and development in vitro: the OP9-DL1 approach. *Current opinion in immunology*, 19, 163-8.
- De Smedt, M., Hoebeke, I. & Plum, J. 2004. Human bone marrow CD34+ progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. *Blood Cells Mol Dis*, 33, 227-32.
- Dhakshinamoorthy, S. & Jaiswal, A. K. 2001. Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene*, 20, 3906-17.
- Ding, Q. & Macalpine, D. M. 2011. Defining the replication program through the chromatin landscape. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46, 165-79.
- Donizetti, A., Liccardo, D., Esposito, D., Del Gaudio, R., Locascio, A., Ferrara, D., Minucci, S. & Aniello, F. 2008. Differential expression of duplicated genes for prothymosin alpha during zebrafish development. *Dev Dyn*, 237, 1112-8.
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P. & Côté, J. 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular cell*, 16, 979-90.

- Dunker, A. K., Garner, E., Guilliot, S., Romero, P., Albrecht, K., Hart, J., Obradovic, Z., Kissinger, C. & Villafranca, J. E. 1998. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 473-84.
- Dyson, H. J. & Wright, P. E. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6, 197-208.
- Earnshaw, W. C. 1987. Anionic Regions in Nuclear Proteins. *October*, 105, 1479-1482.
- Ebbert, R., Birkmann, A. & Schüller, H. J. 1999. The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Molecular microbiology*, 32, 741-51.
- Eckert, K., Grünberg, E., Immenschuh, P., Garbin, F., Kreuser, E. D. & Maurer, H. R. 1997. Interleukin-2-activated killer cell activity in colorectal tumor patients: evaluation of in vitro effects by prothymosin alpha1. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 123, 420-8.
- Eilers, M., Schirm, S. & Bishop, J. M. 1991. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J*, 10, 133-41.
- Enkemann, S. A., Wang, R. H., Trumbore, M. W. & Berger, S. L. 2000. Functional discontinuities in prothymosin alpha caused by caspase cleavage in apoptotic cells. *Journal of cellular physiology*, 182, 256-68.
- Erard, M. S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. & Amalric, F. 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem*, 175, 525-30.
- Eschenfeldt, W. H. & Berger, S. L. 1986. The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 9403-7.
- Evstafieva, A. G., Belov, G. A., Kalkum, M., Chichkova, N. V., Bogdanov, A. A., Agol, V. I. & Vartapetian, A. B. 2000. Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett*, 467, 150-4.
- Evstafieva, A. G., Belov, G. A., Rubtsov, Y. P., Kalkum, M., Joseph, B., Chichkova, N. V., Sukhacheva, E. A., Bogdanov, A. A., Pettersson, R. F., Agol, V. I. & Vartapetian, A. B. 2003. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res*, 284, 211-23.
- Fan, J. Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J. C. & Tremethick, D. J. 2002a. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nature structural biology*, 9, 172-6.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D. & Lieberman, J. 2002b. HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Molecular and cellular biology*, 22, 2810-20.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. & Lieberman, J. 2003a. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 112, 659-72.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C. D., Yoshida, A., Pommier, Y. & Lieberman, J. 2003b. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature immunology*, 4, 145-53.
- Felli, M. P., Maroder, M., Mitsiadis, T. A., Campese, A. F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R. S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A. & Screpanti, I. 1999. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components:

- distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *International immunology*, 11, 1017-25.
- Feng, D., Bond, C. J., Ely, L. K., Maynard, J. & Garcia, K. C. 2007. Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor-major histocompatibility complex interaction 'codon'. *Nature immunology*, 8, 975-83.
- Fischer, U., Janicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.
- Flaus, A., Martin, D. M. A., Barton, G. J. & Owen-Hughes, T. 2006. Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic acids research*, 34, 2887-905.
- Frangou-Lazaridis, M., Clinton, M., Goodall, G. J. & Horecker, B. L. 1988. Prothymosin alpha and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs. *Archives of biochemistry and biophysics*, 263, 305-10.
- Frehlick, L. J., Eirín-López, J. M. & Ausió, J. 2007. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 29, 49-59.
- Freitas, M. A., Sklenar, A. R. & Parthun, M. R. 2004. Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *Journal of cellular biochemistry*, 92, 691-700.
- Gangaraju, V. K. & Bartholomew, B. 2007. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation research*, 618, 3-17.
- Garbin, F., Eckert, K., Immenschuh, P., Kreuser, E. D. & Maurer, H. R. 1997. Prothymosin alpha 1 effects, in vitro, on the antitumor activity and cytokine production of blood monocytes from colorectal tumor patients. *International journal of immunopharmacology*, 19, 323-32.
- Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H. R., Müller-Frohne, M., Zirwer, D. & Czarnecki, J. 1995. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry*, 34, 13211-8.
- Gaubatz, S., Meichle, A. & Eilers, M. 1994. An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Mol Cell Biol*, 14, 3853-62.
- Gaume, X., Monier, K., Argoul, F., Mongelard, F. & Bouvet, P. 2011. In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP. *Biochem Res Int*, 2011, 187624.
- Georgopoulos, K. 2002. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nature reviews. Immunology*, 2, 162-74.
- Goldrath, A. W. & Bevan, M. J. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402, 255-62.
- Gomez-Marquez, J. & Rodriguez, P. 1998. Prothymosin alpha is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells. *Biochem J*, 333 (Pt 1), 1-3.
- Gómez-Márquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J. G., Bustelo, X. R. & Freire, M. 1989. The expression of prothymosin alpha gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. *The Journal of biological chemistry*, 264, 8451-4.
- Guo, J., Hawwari, A., Li, H., Sun, Z., Mahanta, S. K., Littman, D. R., Krangel, M. S. & He, Y. W. 2002. Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nature immunology*, 3, 469-76.
- Hannappel, E. & Huff, T. 2003. The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: structure and function. *Vitamins and hormones*, 66, 257-96.

- Hansen, J. C. 2002. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 31, 361-92.
- Hare, K. J., Jenkinson, E. J. & Anderson, G. 1999. In vitro models of T cell development. *Seminars in immunology*, 11, 3-12.
- Hargreaves, D. C. & Crabtree, G. R. 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell research*, 21, 396-420.
- Haritos, Salvin, S. B., Blacher, R., Stein, S. & Horecker, B. L. 1985. Parathymosin alpha: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 1050-3.
- Haritos, A. A., Goodall, G. J. & Horecker, B. L. 1984a. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1008-11.
- Haritos, A. A., Tsolas, O. & Horecker, B. L. 1984b. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1391-3.
- Harrer, M., Luhrs, H., Bustin, M., Scheer, U. & Hock, R. 2004. Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci*, 117, 3459-71.
- Hass, U. 2003. Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett*, 140-141, 155-9.
- Hayes, J. D. & McMahon, M. 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 34, 176-88.
- Hernandez, J. B., Newton, R. H. & Walsh, C. M. 2010. Life and death in the thymus—cell death signaling during T cell development. *Current Opinion in Cell Biology*, 22, 865-871.
- Hirano, K., Miki, Y., Hirai, Y., Sato, R., Itoh, T., Hayashi, A., Yamanaka, M., Eda, S. & Beppu, M. 2005. A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J Biol Chem*, 280, 39284-93.
- Ho, L. & Crabtree, G. R. 2010. Chromatin remodelling during development. *Nature*, 463, 474-84.
- Hsu, Y. T. & Youle, R. J. 1998. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem*, 273, 10777-83.
- Hu, M. G., Deshpande, A., Enos, M., Mao, D., Hinds, E. A., Hu, G. F., Chang, R., Guo, Z., Dose, M., Mao, C., Tschlis, P. N., Gounari, F. & Hinds, P. W. 2009. A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis. *Cancer Res*, 69, 810-8.
- Iacovelli, S., Iosue, I., Di Cesare, S. & Guttinger, M. 2009. Lymphoid EVA1 expression is required for DN1-DN3 thymocytes transition. *PloS one*, 4, e7586.
- Iakoucheva, L. M. & Dunker, A. K. 2003. Order, disorder, and flexibility: prediction from protein sequence. *Structure (London, England : 1993)*, 11, 1316-7.
- Ishimi, Y., Yasuda, H., Hirosumi, J., Hanaoka, F. & Yamada, M. 1983. A protein which facilitates assembly of nucleosome-like structures in vitro in mammalian cells. *Journal of biochemistry*, 94, 735-44.
- Ishimi, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugawara, K., Yokota, S., Hanaoka, F. & Yamada, M. 1984. Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *European journal of biochemistry / FEBS*, 142, 431-9.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. & Yamamoto, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by

- Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development*, 13, 76-86.
- Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-54.
- Jazirehi, A. R. 2010. Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy. *Anti-cancer drugs*, 21, 805-13.
- Jenkinson, E. J., Franchi, L. L., Kingston, R. & Owen, J. J. 1982. Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment in vitro: application in the production of chimeric thymus rudiments. *European journal of immunology*, 12, 583-7.
- Jiang, X. & Wang, X. 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, 275, 31199-203.
- Jiang, X., Kim, H.-E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S.-C., Rosenberg, S. & Wang, X. 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 299, 223-6.
- Kaneta, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A. G. & Takahama, Y. 2000. A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164, 256-64.
- Karetsov, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C. Y., Tsolas, O., Becker, P. B. & Papamarcaki, T. 1998. Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic acids research*, 26, 3111-8.
- Karetsov, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O. & Papamarcaki, T. 2002. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep*, 3, 361-6.
- Karetsov, Z., Martic, G., Tavoulari, S., Christoforidis, S., Wilm, M., Gruss, C. & Papamarcaki, T. 2004. Prothymosin alpha associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation. *FEBS letters*, 577, 496-500.
- Karetsov, Z., Emmanouilidou, A., Sanidas, I., Liokatis, S., Nikolakaki, E., Politou, A. S. & Papamarcaki, T. 2009. Identification of distinct SET/TAF-Ibeta domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction. *BMC Biochem*, 10, 10.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N. & Biswal, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, 89-116.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. & Georgopoulos, K. 1999. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, 10, 345-55.
- Kleinschmidt, J. A., Dingwall, C., Maier, G. & Franke, W. W. 1986. Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *The EMBO journal*, 5, 3547-52.
- Klug, C. A., Morrison, S. J., Masek, M., Hahm, K., Smale, S. T. & Weissman, I. L. 1998. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 657-62.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. & Yamamoto, M. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology*, 24, 7130-9.
- Kobayashi, M. & Yamamoto, M. 2005. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 7, 385-94.
- Kobayashi, T., Wang, T., Maezawa, M., Kobayashi, M., Ohnishi, S., Hatanaka, K., Hige, S., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., Tanaka, J., Imamura, M., Hasegawa, K., Tanaka, Y. & Brachmann, R. K. 2006. Overexpression of the oncoprotein prothymosin alpha triggers a p53 response that involves p53 acetylation. *Cancer research*, 66, 3137-44.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J. & Georgopoulos, K. 1999. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *The EMBO journal*, 18, 3090-100.
- Koipally, J. & Georgopoulos, K. 2000. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *The Journal of biological chemistry*, 275, 19594-602.
- Kondili, K., Tsolas, O. & Papamarcaki, T. 1996. Selective interaction between parathymosin and histone H1. *European journal of biochemistry / FEBS*, 242, 67-74.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultschi, A. I. & Tsujimoto, Y. 2003. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*, 114, 673-88.
- Kornberg, R. D. 1977. Structure of chromatin. *Annual review of biochemistry*, 46, 931-54.
- Kutney, S. N., Hong, R., Macfarlan, T. & Chakravarti, D. 2004. A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *The Journal of biological chemistry*, 279, 30850-5.
- Kwon, J., Morshead, K. B., Guyon, J. R., Kingston, R. E. & Oettinger, M. A. 2000. Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA. *Molecular cell*, 6, 1037-48.
- La Motte-Mohs, R. N., Herer, E. & Zúñiga-Pflücker, J. C. 2005. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood*, 105, 1431-9.
- Lai, J. C., Wlodarska, M., Liu, D. J., Abraham, N. & Johnson, P. 2010. CD45 regulates migration, proliferation, and progression of double negative 1 thymocytes. *J Immunol*, 185, 2059-70.
- Laskey, R. A., Mills, A. D. & Morris, N. R. 1977. Assembly of SV40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs. *Cell*, 10, 237-43.
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. & Finch, J. T. 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275, 416-20.
- Laskey, R. A. & Earnshaw, W. C. 1980. Nucleosome assembly. *Nature*, 286, 763-7.
- Lavrik, I. N., Golks, A. & Krammer, P. H. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 115, 2665-72.

- Letsas, K. P., Frangou-Lazaridis, M., Skyrilas, A., Tsatsoulis, A. & Malamou-Mitsi, V. 2005. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Int*, 55, 694-702.
- Lewis, J. D., Abbott, D. W. & Ausió, J. 2003. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 81, 131-40.
- Li, G. & Widom, J. 2004. Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 763-9.
- Li, G., Levitus, M., Bustamante, C. & Widom, J. 2005. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature structural & molecular biology*, 12, 46-53.
- Liang, H. & Fesik, S. W. 1997. Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol*, 274, 291-302.
- Liu, J., Perumal, N. B., Oldfield, C. J., Su, E. W., Uversky, V. N. & Dunker, A. K. 2006. Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry*, 45, 6873-88.
- Lu, M., Tayu, R., Ikawa, T., Masuda, K., Matsumoto, I., Mugishima, H., Kawamoto, H. & Katsura, Y. 2005. The earliest thymic progenitors in adults are restricted to T, NK, and dendritic cell lineage and have a potential to form more diverse TCRbeta chains than fetal progenitors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175, 5848-56.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-60.
- Luger, K. & Richmond, T. J. 1998. DNA binding within the nucleosome core. *Current opinion in structural biology*, 8, 33-40.
- Macey, M. G. & Springerlink 2007. *Flow Cytometry Principles and Applications*, Totowa, NJ, Humana Press Inc.
- Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M., Baudat, F., Rogakou, E. P., De Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W. M. & Burgoyne, P. S. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature genetics*, 27, 271-6.
- Mandal, M., Borowski, C., Palomero, T., Ferrando, A. A., Oberdoerffer, P., Meng, F., Ruiz-Vela, A., Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J.-C., Screpanti, I., Look, A. T., Korsmeyer, S. J., Rajewsky, K., Von Boehmer, H. & Aifantis, I. 2005. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *The Journal of experimental medicine*, 201, 603-14.
- Manrow, R. E., Sburlati, A. R., Hanover, J. A. & Berger, S. L. 1991. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem*, 266, 3916-24.
- Maraskovsky, E., O'reilly, L. A., Teepe, M., Corcoran, L. M., Peschon, J. J. & Strasser, A. 1997. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell*, 89, 1011-9.
- Markova, O. V., Evstafieva, A. G., Mansurova, S. E., Moussine, S. S., Palamarchuk, L. A., Pereverzev, M. O., Vartapetian, A. B. & Skulachev, V. P. 2003. Cytochrome c is transformed from anti- to pro-oxidant when interacting with truncated oncoprotein prothymosin alpha. *Biochim Biophys Acta*, 1557, 109-17.
- Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L. & Kappler, J. W. 2008. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annual review of immunology*, 26, 171-203.
- Martic, G., Karetsov, Z., Kefala, K., Politou, A. S., Clapier, C. R., Straub, T. & Papamarcaki, T. 2005. Parathymosin affects the binding of linker histone H1 to

- nucleosomes and remodels chromatin structure. *The Journal of biological chemistry*, 280, 16143-50.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., Laface, D. M. & Green, D. R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*, 182, 1545-56.
- Matechak, E. O., Killeen, N., Hedrick, S. M. & Fowlkes, B. J. 1996. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity*, 4, 337-47.
- Mathieu, N., Hempel, W. M., Spicuglia, S., Verthuy, C. & Ferrier, P. 2000. Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *The Journal of experimental medicine*, 192, 625-36.
- Mathis, D. & Benoist, C. 2009. Aire. *Annual review of immunology*, 27, 287-312.
- Mcblane, F. & Boyes, J. 2000. Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation. *Current biology : CB*, 10, 483-6.
- Mcbryant, S. J., Park, Y.-J., Abernathy, S. M., Laybourn, P. J., Nyborg, J. K. & Luger, K. 2003. Preferential binding of the histone (H3-H4)₂ tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails. *The Journal of biological chemistry*, 278, 44574-83.
- Mcmahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *The Journal of biological chemistry*, 281, 24756-68.
- Mcmurry, M. T. & Krangel, M. S. 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science (New York, N.Y.)*, 287, 495-8.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. 2000. Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- Meneghini, M. D., Wu, M. & Madhani, H. D. 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, 112, 725-36.
- Mi, Y., Thomas, S. D., Xu, X., Casson, L. K., Miller, D. M. & Bates, P. J. 2003. Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J Biol Chem*, 278, 8572-9.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A. & Saikumar, P. 2001. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, 276, 18361-74.
- Misslitz, A., Bernhardt, G. & Förster, R. 2006. Trafficking on serpentines: molecular insight on how maturing T cells find their winding paths in the thymus. *Immunological reviews*, 209, 115-28.
- Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M. & Nagata, K. 1999. Coiled-coil structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity. *Journal of molecular biology*, 290, 547-57.
- Molnar, A., Wu, P., Largespada, D. A., Vortkamp, A., Scherer, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Bruns, G. & Georgopoulos, K. 1996. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol*, 156, 585-92.
- Mosoian, A., Teixeira, A., High, A. A., Christian, R. E., Hunt, D. F., Shabanowitz, J., Liu, X. & Klotman, M. 2006. Novel function of prothymosin alpha as a potent inhibitor

- of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary macrophages. *J Virol*, 80, 9200-6.
- Mosoian, A., Teixeira, A., Burns, C. S., Khitrov, G., Zhang, W., Gusella, L., Klotman, P. & Klotman, M. 2007. Influence of prothymosin-alpha on HIV-1 target cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1112, 269-85.
- Mosoian, A., Teixeira, A., Burns, C. S., Sander, L. E., Gusella, G. L., He, C., Blander, J. M., Klotman, P. & Klotman, M. E. 2010. Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 10178-83.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q. & Fujii, S. 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, 267, 1506-10.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettekheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. & Fesik, S. W. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381, 335-41.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T. & Horikoshi, M. 2007. Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 4285-90.
- Nagata, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256, 12-8.
- Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. 1994. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science (New York, N.Y.)*, 265, 1098-101.
- Ng, S. Y., Yoshida, T. & Georgopoulos, K. 2007. Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol*, 19, 116-22.
- Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. 2009. Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem*, 284, 13856-68.
- Noll, M. & Kornberg, R. D. 1977. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *Journal of molecular biology*, 109, 393-404.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M. & Hyman, A. A. 2001. Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*, 153, 1209-26.
- Okamura, H., Yoshida, K., Amorim, B. R. & Haneji, T. 2008. Histone H1.2 is translocated to mitochondria and associates with Bak in bleomycin-induced apoptotic cells. *J Cell Biochem*, 103, 1488-96.
- Okuwaki, M. & Nagata, K. 1998. Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *The Journal of biological chemistry*, 273, 34511-8.
- Okuwaki, M., Kato, K., Shimahara, H., Tate, S. & Nagata, K. 2005. Assembly and disassembly of nucleosome core particles containing histone variants by human nucleosome assembly protein I. *Mol Cell Biol*, 25, 10639-51.
- Old, R. W. & Woodland, H. R. 1984. Histone genes: not so simple after all. *Cell*, 38, 624-6.
- Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C. & Korsmeyer, S. J. 2003. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 426, 671-6.
- Ow, Y. P., Green, D. R., Hao, Z. & Mak, T. W. 2008. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 532-42.

- Pan, L. X., Haritos, A. A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., Salvin, S. B. & Horecker, B. L. 1986. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys*, 250, 197-201.
- Panneerselvam, C., Wellner, D. & Horecker, B. L. 1988. The amino acid sequence of bovine thymus prothymosin alpha. *Archives of biochemistry and biophysics*, 265, 454-7.
- Papamarcaki, T. & Tsolas, O. 1994. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett*, 345, 71-5.
- Papanastasiou, M., Baxevas, C. N. & Papamichail, M. 1992. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment: I. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor alpha. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 35, 145-50.
- Park, Y.-J. & Luger, K. 2006a. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1248-53.
- Park, Y.-J. & Luger, K. 2006b. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 84, 549-58.
- Park, Y. J., Chodaparambil, J. V., Bao, Y., McBryant, S. J. & Luger, K. 2005. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem*, 280, 1817-25.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. & Bonner, W. M. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 10, 886-95.
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D. & Davison, B. L. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 180, 1955-60.
- Petros, A. M., Medek, A., Nettesheim, D. G., Kim, D. H., Yoon, H. S., Swift, K., Matayoshi, E. D., Oltersdorf, T. & Fesik, S. W. 2001. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3012-7.
- Porritt, H. E., Rumpf, L. L., Tabrizifard, S., Schmitt, T. M., Zúñiga-Pflücker, J. C. & Petrie, H. T. 2004. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*, 20, 735-45.
- Prestayko, A. W., D'aoust, J. C., Issell, B. F. & Crooke, S. T. 1979. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer treatment reviews*, 6, 17-39.
- Raaphorst, F. M., Otte, A. P. & Meijer, C. J. 2001. Polycomb-group genes as regulators of mammalian lymphopoiesis. *Trends in immunology*, 22, 682-90.
- Radivojac, P., Obradovic, Z., Smith, D. K., Zhu, G., Vucetic, S., Brown, C. J., Lawson, J. D. & Dunker, A. K. 2004. Protein flexibility and intrinsic disorder. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 13, 71-80.
- Radtke, F., Wilson, A. & Macdonald, H. R. 2004. Notch signaling in T- and B-cell development. *Current opinion in immunology*, 16, 174-9.
- Radtke, F., Fasnacht, N. & Macdonald, H. R. 2010. Notch signaling in the immune system. *Immunity*, 32, 14-27.
- Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W.-X., Cinalli, R. M. & Thompson, C. B. 2002. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nature immunology*, 3, 932-9.

- Rattner, B. P., Yusufzai, T. & Kadonaga, J. T. 2009. HMGN proteins act in opposition to ATP-dependent chromatin remodeling factors to restrict nucleosome mobility. *Mol Cell*, 34, 620-6.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, 311, 532-7.
- Rodriguez, P., Vinuela, J. E., Alvarez-Fernandez, L., Buceta, M., Vidal, A., Dominguez, F. & Gomez-Marquez, J. 1998. Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells. *Biochem J*, 331 (Pt 3), 753-61.
- Rodríguez, P., Viñuela, J. E., Alvarez-Fernández, L. & Gómez-Márquez, J. 1999. Prothymosin alpha antisense oligonucleotides induce apoptosis in HL-60 cells. *Cell death and differentiation*, 6, 3-5.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*, 146, 905-16.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. & Bonner, W. M. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 275, 9390-5.
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J. & Dunker, A. K. 2001. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*, 42, 38-48.
- Rothenberg, E. V. 2007. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity*, 26, 690-702.
- Rothenberg, E. V., Moore, J. E. & Yui, M. A. 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol*, 8, 9-21.
- Sarma, K. & Reinberg, D. 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 139-49.
- Sburlati, A. R., Manrow, R. E. & Berger, S. L. 1991. Prothymosin alpha antisense oligomers inhibit myeloma cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 253-7.
- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418, 191-5.
- Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxo... [Nature. 1979] - PubMed result. *Nature*, 277, 665-7.
- Schmidt, D. R. & Schreiber, S. L. 1999. Molecular association between ATR and two components of the nucleosome remodeling and deacetylating complex, HDAC2 and CHD4. *Biochemistry*, 38, 14711-7.
- Schmitt, T. M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*, 17, 749-56.
- Schmitt, T. M., Ciofani, M., Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. 2004a. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine*, 200, 469-79.
- Schmitt, T. M., De Pooter, R. F., Gronski, M. A., Cho, S. K., Ohashi, P. S. & Zúñiga-Pflücker, J. C. 2004b. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nature immunology*, 5, 410-7.
- Schneider, R., Bannister, A. J., Weise, C. & Kouzarides, T. 2004. Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *The Journal of biological chemistry*, 279, 23859-62.

- Sehested, M. 1996. Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochemical Pharmacology*, 51, 879-886.
- Selth, L. & Svejstrup, J. Q. 2007. Vps75, a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *The Journal of biological chemistry*, 282, 12358-62.
- Seo, S.-B., Macfarlan, T., Mcnamara, P., Hong, R., Mukai, Y., Heo, S. & Chakravarti, D. 2002. Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *The Journal of biological chemistry*, 277, 14005-10.
- Seo, S. B., Mcnamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S. & Chakravarti, D. 2001. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell*, 104, 119-30.
- Shen, H. Q., Lu, M., Ikawa, T., Masuda, K., Ohmura, K., Minato, N., Katsura, Y. & Kawamoto, H. 2003. T/NK bipotent progenitors in the thymus retain the potential to generate dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171, 3401-6.
- Siddik, Z. H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-79.
- Sims, R. J., Chen, C.-F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S. S. & Reinberg, D. 2005. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *The Journal of biological chemistry*, 280, 41789-92.
- Sinha, M. & Peterson, C. L. 2009. Chromatin dynamics during repair of chromosomal DNA double-strand breaks. *Epigenomics*, 1, 371-385.
- Skopeliti, M., Voutsas, I. F., Klimentzou, P., Tsiatas, M. L., Beck, A., Bamias, A., Moraki, M., Livaniou, E., Neagu, M., Voelter, W. & Tsitsilonis, O. E. 2006. The immunologically active site of prothymosin alpha is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 55, 1247-57.
- Skopeliti, M., Iconomidou, V. A., Derhovanessian, E., Pawelec, G., Voelter, W., Kalbacher, H., Hamodrakas, S. J. & Tsitsilonis, O. E. 2009. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TTKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol*, 46, 784-92.
- Smith, S. & Stillman, B. 1989. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell*, 58, 15-25.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*, 21, 139-76.
- Stein, Whitlock & Bina 1979. Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin in vitro at physiological ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5000-4.
- Stępkowski, T. M. & Kruszewski, M. K. 2011. Molecular crosstalk between NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy and apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 1-10.
- Stros, M. 2007. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et biophysica acta*, 1799, 101-13.
- Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. & Robertson, E. S. 2002. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300

- transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol*, 76, 4699-708.
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y. R., Sunshine, M. J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R. E. & Littman, D. R. 2000. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science (New York, N.Y.)*, 288, 2369-73.
- Swaminathan, J., Baxter, E. M. & Corces, V. G. 2005. The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of Drosophila heterochromatin. *Genes & development*, 19, 65-76.
- Taghon, T., Yui, M. A. & Rothenberg, E. V. 2007. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3. *Nature immunology*, 8, 845-55.
- Taghon, T. N., David, E. S., Zuniga-Pflucker, J. C. & Rothenberg, E. V. 2005. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev*, 19, 965-78.
- Teague, T. K., Tan, C., Marino, J. H., Davis, B. K., Taylor, A. A., Huey, R. W. & Van De Wiele, C. J. 2010. CD28 expression redefines thymocyte development during the pre-T to DP transition. *Int Immunol*, 22, 387-97.
- Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.
- Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T. & Yamamoto, M. 2006. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and cellular biology*, 26, 2887-900.
- Tran, H. G., Steger, D. J., Iyer, V. R. & Johnson, A. D. 2000. The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *The EMBO journal*, 19, 2323-31.
- Tsukuda, T., Fleming, A. B., Nickoloff, J. A. & Osley, M. A. 2005. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 438, 379-83.
- Tsunaka, Y., Kajimura, N., Tate, S.-I. & Morikawa, K. 2005. Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. *Nucleic acids research*, 33, 3424-34.
- Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F. & Bouvet, P. 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC molecular biology*, 8, 66.
- Uversky, V. N. 2002. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*, 11, 739-56.
- Van Coppennolle, S., Verstichel, G., Timmermans, F., Velghe, I., Vermijlen, D., De Smedt, M., Leclercq, G., Plum, J., Taghon, T., Vandekerckhove, B. & Kerre, T. 2009. Functionally mature CD4 and CD8 TCRalpha beta cells are generated in OP9-DL1 cultures from human CD34+ hematopoietic cells. *J Immunol*, 183, 4859-70.
- Van Der Lugt, N. M., Domen, J., Linders, K., Van Roon, M., Robanus-Maandag, E., Te Riele, H., Van Der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M. & Van Lohuizen, M. 1994. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes & development*, 8, 757-69.
- Van Leeuwen, F. & Gottschling, D. E. 2002. Genome-wide histone modifications: gaining specificity by preventing promiscuity. *Current opinion in cell biology*, 14, 756-62.

- Vareli, K., Tsolas, O. & Frangou-Lazaridis, M. 1996. Regulation of prothymosin alpha during the cell cycle. *European journal of biochemistry / FEBS*, 238, 799-806.
- Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M., Van Der Kraan, I., Tsolas, O. & Van Driel, R. 2000. Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Experimental cell research*, 257, 152-61.
- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96, 245-54.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184, 39-51.
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. & Stillman, B. 1996. Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell*, 87, 95-104.
- Von Boehmer, H. 2005. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nature reviews. Immunology*, 5, 571-7.
- Von Boehmer, H. & Melchers, F. 2010. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature immunology*, 11, 14-20.
- Von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., Mcneil, T., Burdach, S. E. & Murray, R. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *The Journal of experimental medicine*, 181, 1519-26.
- Von Lindern, M., Van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A. & Grosveld, G. 1992. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Molecular and cellular biology*, 12, 3346-55.
- Voutsas, I. F., Baxevanis, C. N., Gritzapis, A. D., Missitzis, I., Stathopoulos, G. P., Archodakis, G., Banis, C., Voelter, W. & Papamichail, M. 2000. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 49, 449-58.
- Wade, P. A., Geggion, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F. & Wolffe, A. P. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature genetics*, 23, 62-6.
- Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G. & Chen, J. 2003. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *The Journal of biological chemistry*, 278, 19579-82.
- Watson, J. V. 1999. The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry*, 38, 2-14; discussion 1.
- Watts, J. D., Cary, P. D., Sautiere, P. & Crane-Robinson, C. 1990. Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 192, 643-51.
- Wen, C., Levitan, D., Li, X. & Greenwald, I. 2000. spr-2, a suppressor of the egg-laying defect caused by loss of sel-12 presenilin in *Caenorhabditis elegans*, is a member of the SET protein subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 14524-9.
- White, C. L., Suto, R. K. & Luger, K. 2001. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *The EMBO journal*, 20, 5207-18.

- Widom, J. 1992. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1095-9.
- Widom, J. 1998. Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27, 285-327.
- Williams, C. J., Naito, T., Arco, P. G.-D., Seavitt, J. R., Cashman, S. M., De Souza, B., Qi, X., Keables, P., Von Andrian, U. H. & Georgopoulos, K. 2004. The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity*, 20, 719-33.
- Wolffe, A. P. 1998. Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *The Journal of experimental zoology*, 282, 239-44.
- Wolffe, A. P. & Hayes, J. J. 1999. Chromatin disruption and modification. *Nucleic acids research*, 27, 711-20.
- Wolffe, A. P. & Guschin, D. 2000. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *Journal of structural biology*, 129, 102-22.
- Woodward, E. J. & Twelves, C. 2010. Scheduling of taxanes: a review. *Current clinical pharmacology*, 5, 226-31.
- Wright, P. E. & Dyson, H. J. 1999. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol*, 293, 321-31.
- Wu, L., Li, C. L. & Shortman, K. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *The Journal of experimental medicine*, 184, 903-11.
- Wyllie, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-6.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Ogata, K., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Wiest, D. L., Tokunaga, M. & Saito, T. 2006. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nature immunology*, 7, 67-75.
- Youle, R. J. & Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47-59.
- Yvon, A. M., Wadsworth, P. & Jordan, M. A. 1999. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular biology of the cell*, 10, 947-59.
- Zhang, D. D. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev*, 38, 769-89.
- Zhang, J., Mikecz, K., Finnegan, A. & Glant, T. T. 2000. Spontaneous thymocyte apoptosis is regulated by a mitochondrion-mediated signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165, 2970-4.
- Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D. & He, Y. W. 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell research*, 15, 749-69.
- Zhang, Y., Leroy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S. & Reinberg, D. 1998. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, 95, 279-89.
- Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., Macgregor, G. R. & Thompson, C. B. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development*, 15, 1481-6.

