



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

*Διερεύνηση της επίδρασης του ανοσολογικού τελεστή IFN γ στη
βιολογία των νευρικών κυττάρων και της αλληλεπίδρασης των
μεταγραφικών παραγόντων CIITA και KLF4 στη ρύθμιση της έκφρασης
των γονιδίων του συμπλέγματος
MHC class II*

ΞΑΓΑΡΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα 28-06-2010

Αριθμ.Πρωτ. 1209

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07 265, 07 277
FAX:(26510) 07 064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ : Άννα Υφαντή

Προς τους κ.κ.:

- 1) Μιχαηλίδη Θεολόγο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών
- 2) Ουφρονίτη Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών
- 3) Παπαματθαϊάκη Σήφη, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Παν/μίου Κρήτης.

Σας πληροφορούμε ότι, μετά από εισήγηση του Επιβλέποντα κ. Θεολόγου Μιχαηλίδη και της Σ.Ε.Μ.Σ. του Τμήματος, η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύγκλησης στη Συνεδρίασή της αριθμ. 158/22-06-2010, σας όρισε μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Αναστασίας Ξαγαρά.

Επίσης, ενέκρινε ως θέμα της διδακτορικής διατριβής το εξής: *«Διερεύνηση του ρόλου μεταγραφικού παράγοντα HKR3 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος MHC class II και της σημασίας του για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος».*

Κοινοποίηση:

- κ. Αναστασία Ξαγαρά

Με εντολή του Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος

ANNA YFANTH



Τμήμα
Βιολογικών
Εφαρμογών
& Τεχνολογιών



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Θεολόγος Μιχαηλίδης
Αν. Καθηγητής
Δ/ση: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
Τηλ: 26510-07101
FAX: 26510-07064
e-mail: imichael@uoi.gr

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
Αριθμ. Πρωτ. 639
Ημερομηνία 31/3/17

Ιωάννινα, 1-03-2017

Προς τη Γραμματεία,
του
Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών &
Τεχνολογιών,
Σχολή Επιστημών Υγείας
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αξιότιμοι κυρίες/κύριοι,

Θα θέλαμε να σας ενημερώσουμε ότι ο τελικός τίτλος της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος Αναστασίας Ξαγαρά είναι ελαφρά τροποποιημένος. Ο προκαταρκτικός αρχικός τίτλος ήταν: «Διερεύνηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα HKR3 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος MHC class II και της σημασίας του για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος» και ο τελικός τίτλος τροποποιήθηκε ως εξής: «Διερεύνηση της επίδρασης του ανοσολογικού τελεστή IFNγ στη βιολογία των νευρικών κυττάρων και της αλληλεπίδρασής των μεταγραφικών παραγόντων C/PTA και KLF4 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος MHC class II.».

Βεβαιώνουμε ότι με την τροποποίηση του τίτλου δεν τροποποιείται το ήδη εγκεκριμένο φυσικό αντικείμενο του έργου.

Με εκτίμηση,

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Γεώργιος Θυφρονίτης, Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωσήφ Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αν. Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336, 7294
FAX: (26510) 07064
ΠΑΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή
e-mail: grambet@cc.uoi.gr

Ιωάννινα, 12 Απριλίου 2017
Αριθμ. Πρωτ.: 701

Προς τους κ.κ. :

1. Θεολόγο Μιχαηλίδη, Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Θυφρονίτη Γεώργιο, Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Παπαματθαϊάκη Ιωσήφ, Καθηγητή Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
4. Κοτσίνη Αθανάσιο, Επίκουρο Καθηγητή Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ
5. Κρετσόβαλη Ανδρονίκη, Κύρια Ερευνήτρια, Διευθύντρια Εφαρμογών Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας
6. Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
7. Σπηλιανάκη Χαράλαμπο, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Θέμα: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κας. Αναστασίας Ξαγαρά»

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύγκλησης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 241/31-03-2016, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε η κα. Αναστασία Ξαγαρά με τίτλο «Διερεύνηση της επίδρασης του ανοσοολογικού τελεστή IFN γ στη βιολογία των νευρικών κυττάρων και της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων C/ITA και KLF4 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος MHC class II».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται ο Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος κος. Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Κοινοποίηση :
κα. Αναστασία Ξαγαρά

Με εντολή Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος
ANNA YFANTH



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα, 18-05-2017

ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ ΘΕΟΛΟΓΟΣ

Αν. Καθηγητής

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110

ΤΗΛ: 26510-07101, FAX: 26510 07061

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μετά από πρόσκληση του Επιβλέποντα Αν. Καθηγητή Μοριακής Γενετικής κ. Θ. Μιχαηλίδη, σήμερα Τετάρτη 18/05/2017 και ώρα 11:00, έλαβε χώρα σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την αξιολόγηση και κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Αναστασίας Ξαγαρά με θέμα: «Διερεύνηση της επίδρασης του ανοσοολογικού τελεστή IFNγ στη βιολογία των νευρικών κυττάρων και της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων CIITA και KLF4 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος MHC class II». Προσήλθε η κ. Ξαγαρά, η οποία ανέπτυξε το θέμα της διατριβής της, της έγιναν ερωτήσεις από τη Επιτροπή και αποχώρησε. Στη συνέχεια, η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια της υποψήφιας στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της.

Ακολούθησε ψηφοφορία, όπου εγκρίθηκε παμψηφεί η διδακτορική διατριβή με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ».

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αν. Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΤΑ ΜΕΛΗ

Παπαματθαίου Ιωσήφ, Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια
Πανεπιστήμιο Πατρών

Κοτσίνης Αθανάσιος, Επ. Καθηγητής

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γεώργιος Θυφρονίτης, Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κρεατσάλη Ανδρονίκη, Κύρια Ερευνήτρια,
Διευθύντρια Εφαρμογών, Ινστιτούτο Μοριακής
Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας-ΙΤΕ

Σπηλιανάκης Χαράλαμπος, Αν. Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στην Αγαπημένη μου

Δέσπω

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, κατά τη χρονική περίοδο 2010-2017. Την επίβλεψη της εργασίας είχε ο Αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Δρ. Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου, **Θεολόγο Μιχαηλίδη**. Ο ρόλος του στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας ήταν τόσο καθοριστικός, όσο το ερευνητικό έργο του Santiago Ramon y Cajal για το νευρικό σύστημα. Με υπομονή και επιμονή προσπάθησε και κατάφερε να μου διδάξει τις αρετές και πάνω απ' όλα την αρτιότητα της επιστήμης μας. Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό που δούλεψα κοντά του όλα αυτά τα χρόνια, καθώς εκτός από πολύ καλός καθηγητής, επιστήμονας και άνθρωπος είναι και άριστος δάσκαλος.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής. Τον Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης, **Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη** για την διαρκή επικοινωνία, την απλόχερη προσφορά των γνώσεών του πάνω στο αντικείμενο της μελέτης μου και την φιλοξενία στο εργαστήριό του. Κάποια από τα πειράματα θα ήταν αδύνατα χωρίς τη βοήθειά του, ενδεικτικά αναφέρω το *in vivo* πείραμα με τα ποντίκια.

Τον Καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, **Γεώργιο Θυφρονίτη** επίσης μέλος της τριμελούς επιτροπής μου. Το ευχαριστώ μου δεν είναι καθόλου τυπικό, καθώς υπήρχε διαρκής και σε πολλές περιπτώσεις καθημερινή επικοινωνία για πολλές πτυχές της παρούσας εργασίας. Τα σχόλιά, οι γνώσεις και οι συμβουλές του, μου προσφέρθηκαν απλόχερα και αποτέλεσαν σταθμό για την παρούσα μελέτη.

Τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής και συγκεκριμένα τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ, **Κοτσίνα Αθανάσιο**, την Κύρια Ερευνήτρια, Διευθύντρια Εφαρμογών, Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, **Κρετσόβαλη Ανδρονίκη**, την Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών, **Μουζάκη Αθανασία** και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας, **Σπηλιανάκη Χαράλαμπο**, για τα

σχόλια, τις επεμβάσεις και την αξιολόγηση της γραπτής και προφορικής μου εργασίας.

Συνεχίζοντας δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους συναδέλφους και μέλη της ερευνητικής μας ομάδας **Παπαγεωργίου Κυριακή, Βασίλη Ευτυχία, Δαρδινού Μαρούσα και Τσίγκα Ιωάννη**, τον «κύριο σκελετό» του εργαστηρίου μας. Όλοι μαζί, σαν μια οικογένεια, διδαχθήκαμε και διδάξαμε, αντιμετωπίσαμε τις χαρές και τις λύπες, τις επιτυχίες και αποτυχίες. Τίποτα δεν θα ήταν ίδιο χωρίς την απλόχερη βοήθειά τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριό μας όλα αυτά τα χρόνια και κυρίως την Σούρδη Θεοδώρα, Τσακανέλη Αλεξία, Παπασταύρου Βανέσα, Μπαλάσκα Αναστάσιο, Σοϊχάν Ντιλάη.

Το ευχαριστώ μου, επίσης οφείλω σε όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών παλιά και νέα, για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας. Ιδιαίτερα την Χαντζαντωνάκη Ελευθερία υποψήφια διδάκτορα, για τις πολύτιμες συμβουλές και βοήθειά της πάνω στα πειράματα των FRAP.

Συνεχίζοντας, τους πολύτιμους φίλους μου, εκτός και εντός του χώρου της βιολογίας, που με στήριξαν κυρίως ψυχολογικά καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, και παρέμειναν στο πλευρό μου αδιαμαρτύρητα.

Πάνω απ'όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τον πατέρα μου Παναγιώτη, τη μητέρα μου Δέσπω και τον αδερφό μου Ντίνο. Από την αρχή της ζωής μου είναι δίπλα μου, στηρίζουν τις αποφάσεις μου και με βοηθούν να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα απ την καρδιά μου, τον συνοδοιπόρο, σύντροφο, φίλο και πλέον σύζυγό μου Αποστόλη. Η υποστήριξή του ήταν απλόχερη, η υπομονή του “γαϊδουρινή” και ήταν πάντα εκεί για μένα ακόμη και όταν εγώ φρόντιζα τα κύτταρά μου πιο πολύ απ' αυτόν.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	17
Abstract	19
1.Εισαγωγή.....	21
<u>Κεφάλαιο A</u>	
1.1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος.....	23
1.1.1. Ρύθμιση της ανοσοποίησης από το νευρικό σύστημα.....	23
1.1.2. Ρύθμιση του νευρικού συστήματος από το ανοσοποιητικό.....	24
1.2. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στις νεοπλασίες του νευρικού συστήματος.....	25
1.2.1. Ετερογένεια - το κύριο χαρακτηριστικό των όγκων	26
1.2.2. Το νευροβλάστωμα	27
1.2.3. Κυτταρική ετερογένεια του νευροβλαστώματος.....	28
1.2.4. Θεραπεία του νευροβλαστώματος με ιντερφερόνη γ.....	30
<u>Κεφάλαιο B</u>	
1.3. Η ιντερφερόνη γ (IFNγ)	32
1.3.1. Το μονοπάτι της Ιντερφερόνης γ.....	32
1.3.2. Ο ρόλος της ιντερφερόνης γ στο κεντρικό νευρικό σύστημα.....	33
1.3.3. Ο ρόλος της ιντερφερόνης γ στο περιφερικό νευρικό σύστημα.....	35
1.3.4. Επίδραση της ιντερφερόνης γ στα νευρικά βλαστικά κύτταρα.....	35
1.4. Το μονοπάτι της IFNγ που οδηγεί στην επαγωγή των MHC τάξης II.....	36
1.4.1 Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II.....	37
1.4.2. Αντιγονική παρουσίαση από τα μόρια MHC	39
1.4.3. Μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή των μορίων MHC τάξης II.....	41
1.4.4. Ο κύριος ρυθμιστής των μορίων MHC τάξης II – CIITA.....	43
1.4.5. Μεταγραφική ενεργοποίηση των μορίων MHC τάξης II.....	44

1.4.6. Ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II μέσω μεγάλου εύρους χρωματινικών αλληλεπιδράσεων	46
1.5. Ρύθμιση και έκφραση του CIITA.....	47
1.5.1. Μεταγραφική ρύθμιση του CIITA.....	47
1.5.2. Ο CIITA και οι στόχοι του εκτός ανοσοποιητικού συστήματος.....	47
<u>Κεφάλαιο Γ</u>	
1.6. Στόχοι της IFNγ ανεξάρτητοι των μορίων MHC τάξης II.....	49
1.7. Ο πολυλειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας KLF4.....	50
1.7.1. Ρόλος του KLF4 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	52
1.7.2. Εμπλοκή του KLF4 στον επαναπρογραμματισμό κυττάρων	52
1.7.3. Σχέση του KLF4 με τις νεοπλασίες	53
2. Σκοπός της διατριβής	55
3.Υλικά και μέθοδοι.....	59
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες	61
3.1.1. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	61
3.1.2. Διαφοροποίηση κυττάρων.....	62
3.1.3. Δημιουργία και καλλιέργεια HCN νευροσφαιρών.....	63
3.1.4. Δημιουργία BE(2)C ογκοσφαιρών.....	63
3.1.5. Διαχωρισμός και καλλιέργεια αμιγών κυτταρικών υποπληθυσμών τύπου N και S από τα κύτταρα SH-SY5Y.....	64
3.1.6. Διαφοροποίηση N και S τύπου κυττάρων.....	65
3.1.7. Δημιουργία σταθερών SH-SY5Y κυτταρικών σειρών.....	65
3.1.8. Διαμόλυνση κυττάρων.....	66
3.2 Μέθοδοι Γενετικής Μηχανικής.....	67
3.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών σε μετασχηματισμό.....	67
3.2.2 Ανάπτυξη βακτηρίων.....	68
3.2.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ	68
3.2.4. Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηρίων σε γλυκερόλη.....	69
3.2.5. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA.....	69
3.2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	70

3.2.7. Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	71
3.2.8. Αντίδραση klenow.....	71
3.2.9. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης.....	71
3.2.10. Αντίδραση σύνδεσης.....	72
3.2.11. Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών	72
3.3. Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας.....	80
3.3.1. Απομόνωση γενωμικού δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος, (DNA)	80
3.3.2. Απομόνωση ολικού ριβονουκλεϊνικού οξέος, (RNA)	80
3.3.3. Καθαρισμός απομονωμένου RNA από DNA.....	81
3.3.4. Αντίστροφη μεταγραφή	82
3.3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR.....	82
3.3.6. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, q RT-PCR.....	84
3.3.7. Εκκινητές PCR	86
3.3.8. Ανοσοκατακρήμνιση, IP.....	88
3.3.9. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, CHIP.....	89
3.4. Βιοχημικές μέθοδοι	92
3.4.1. Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	92
3.4.2. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford ..	92
3.4.3. Απομόνωση κυτταροπλασματικών/πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	93
3.4.4. Διαχωρισμός πυρηνικών εκχυλισμάτων που προσδένονται στη χρωματίνη (CBA)	93
3.4.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	95
3.4.5.1. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμίδιου	95
3.4.5.2. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	96
3.4.5.3. Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα.....	97
3.4.5.4. Ανίχνευση των πρωτεϊνών.....	98
3.4.5.5. Αντίδραση λουσιφεράσης.....	98
3.5. Οπτικές μέθοδοι	100

3.5.1. Χρώση πυρήνα.....	100
3.5.2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	100
3.5.3. Αντίδραση 5'-βρώμο-2' δεοξουριδίνης (BrdU)	101
3.5.4. Κυτταρομετρία ροής (FACS)	102
3.5.5. Επαναφορά φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP).....	104
4. Αποτελέσματα	107
Μέρος Α	
4.1. Μελέτη της επίδρασης της IFNγ στη βιολογία του νευροβλαστώματος.....	109
4.1.1. Τα κύτταρα SH-SY5Y ως κατάλληλο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη του νευροβλαστώματος.....	109
4.1.2. Η IFN γ μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθυστερώντας τη διέλευσή τους από την φάση S του κυτταρικού κύκλου.....	110
4.1.3. Η IFN γ προωθεί την εμφάνιση πρώιμων δεικτών νευρικής διαφοροποίησης	113
4.1.4. Η χρόνια έκθεση σε IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA, αλλάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης.....	116
4.1.5. Η συνεχής έκθεση σε IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA, αλλάζει την απόκριση των κυττάρων στους νευροτροφικούς παράγοντες..	119
4.1.6. Η δράση της IFN γ προκαλεί και την εμφάνιση πρωτεϊνών-δεικτών που δε σχετίζονται με τη νευρική μοίρα.....	121
4.1.7. Η IFN γ επάγει τη δια-διαφοροποίηση των N σε S- τύπου κύτταρα....	126
4.1.8. Η δράση της IFN γ είναι μόνιμη.....	128
4.1.9. Η επαγωγή της δια-διαφοροποίησης από την IFN γ και ο εμπλουτισμός σε κύτταρα τύπου S μειώνει το ογκογονικό δυναμικό του πληθυσμού των νευροβλαστωματικών κυττάρων.....	130
4.1.10. Η δράση της IFN γ πιθανώς ασκείται μέσω της επαγωγής του KLF4.....	132
4.1.11. Τα μόρια MHC τάξης II πιθανώς εκφράζονται στα S- τύπου κύτταρα του νευροβλαστώματος.....	134

Μέρος Β'

4.2. Η IFN γ προωθεί τη νευρική διαφοροποίηση σε νευρικά βλαστικά κύτταρα του υποκάμπου.....137

- 4.2.1. Τα κύτταρα HCN ως κατάλληλο βιολογικό σύστημα..... 137
- 4.2.2. Χαρακτηρισμός του δυναμικού πολυδυναμίας και της επίδρασης που ασκεί η IFN γ στα κύτταρα HCN..... 138
- 4.2.3. Διερεύνηση της επίδρασης της IFN γ στο δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων HCN 139
- 4.2.4. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC τάξης II είναι ενεργό στα νευρικά βλαστικά κύτταρα του υποκάμπου 140
- 4.2.5. Η IFN γ μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων..... 142
- 4.2.6. Η IFN γ επηρεάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων προς τη νευρική μοίρα143
- 4.2.7. Η IFN γ δεν επηρεάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα.....146

Μέρος Γ'

4.3. Ανάλυση μιας νέας αλληλεπίδρασης μεταξύ CIITA και KLF4 στο νευρικό περιβάλλον.....148

- 4.3.1. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC τάξης II είναι ενεργό στο νευροβλάστωμα..... 148
- 4.3.2. Κατασκευή πειραματικών εργαλείων για τη μελέτη της ρύθμισης των μορίων MHC τάξης II στα νευροβλαστωματικά κύτταρα..... 150
- 4.3.3. Η IFN γ και ο CIITA δρούν συνεργατικά 152
- 4.3.4. Εμπλοκή του KLF4 στην μεταγραφική ικανότητα του CIITA.....154
- 4.3.5. Ο KLF4 επηρεάζει την κινητικότητα του CIITA στον πυρήνα..... 156
- 4.3.6. Ο KLF4 επηρεάζει τη σταθερότητα του CIITA μέσω της δράσης του πρωτεασώματος..... 159
- 4.3.7. Ο KLF4 επιδρά στον εντοπισμό του CIITA..... 162

4.3.8. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330 του CIITA είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τον KLF4.....	164
4.3.9. Φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών KLF4 και CIITA.....	168
5. Συζήτηση	169
6. Συντμήσεις.....	179
7. Παράρτημα	185
7.1. Ευρετήριο εικόνων.....	187
7.2. Ευρετήριο πινάκων.....	191
8. Βιβλιογραφία.....	193

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια αναδεικνύεται μια πολυεπίπεδη συνέργεια μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Η συνέργεια αυτή, πραγματοποιείται μέσω μηχανισμών, οι οποίοι δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Είναι γνωστό ότι όλες οι διαδικασίες, οι οποίες αποτελούν αναπόσπαστα στοιχεία της ενήλικης νευρογένεσης (πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, κυτταρική μετανάστευση) επηρεάζονται από ανοσολογικούς τελεστές, όπως για παράδειγμα η ιντερφερόνη-γ (IFN γ). Ωστόσο ο τρόπος με τον οποίο τα δύο αυτά συστήματα αλληλεπιδρούν παραμένει ένα συναρπαστικό αναπάντητο ερώτημα. Στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της IFN γ , μιας πλειοτροπικής κυτταροκίνης του ανοσοποιητικού συστήματος, στη βιολογία νευρικών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υπέδειξαν σαφή εμπλοκή της IFN γ , στις σημαντικές βιολογικές διεργασίες των νευρικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Χρησιμοποιώντας ένα παθοφυσιολογικό νευρικό κυτταρικό μοντέλο, κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος, παρατηρήσαμε ότι η IFN γ επιδρά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθυστερώντας τη διέλευσή τους από τη φάση S του κυτταρικού κύκλου και παράλληλα προωθεί την εμφάνιση πρώιμων δεικτών νευρικής διαφοροποίησης. Η συνεχής παρουσία της, τροποποιεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης που επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ, (RA) και αλλάζει την απόκριση των κυττάρων στους νευροτροφικούς παράγοντες. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύονται από την προοδευτική εμφάνιση, ενός νέου πληθυσμού κυττάρων που διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά του κυτταρικού πληθυσμού S του νευροβλαστώματος. Το νευροβλάστωμα χαρακτηρίζεται από κυτταρική ετερογένεια η οποία χρησιμοποιείται συστηματικά στην κλινική πρακτική για την κατηγοριοποίηση των σταδίων της νόσου. Συναντώνται τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τύποι κυττάρων, ένα από τα χαρακτηριστικά των οποίων είναι η ικανότητά τους να αλληλομετατρέπονται από τον ένα τύπο στον άλλο με μηχανισμούς που δεν είναι γνωστοί (δια-διαφοροποίηση). Βρήκαμε ότι η IFN γ επάγει τη δια-διαφοροποίηση των κυττάρων τύπου N τα οποία συνιστούν τον ογκογόνο πληθυσμό του νευροβλαστώματος, σε

κύτταρα τύπου S. Ο εμπλουτισμός του πληθυσμού με κύτταρα τύπου S, μειώνει την ικανότητά του να σχηματίζει όγκους μετά από ένεση σε ποντίκια, υποδεικνύοντας ότι η IFN γ μπορεί να ενισχύει τη «θεραπευτική» δράση του RA, προωθώντας την διαφοροποίηση προς μια μη-ογκογονική γενεαλογία.

Μελετήσαμε επίσης την επίδραση της IFN γ , στη βιολογία φυσιολογικών νευρικών κυττάρων, απομονωμένων από υπόκαμπο αρουραίου. Παρατηρήσαμε μείωση του δυναμικού πολυδυναμίας και επιτάχυνση του πρόγραμματος διαφοροποίησης προς τη νευρική μοίρα. Αντίθετα η διαφοροποίηση των κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα δεν επηρεάστηκε.

Αναλύοντας τη δράση της IFN γ στα νευροβλαστωματικά κύτταρα, διαπιστώσαμε ότι παράλληλα με την αλλαγή στη σύσταση του κυτταρικού πληθυσμού και την κυτταρική μοίρα, αυτή η κυτταροκίνη επάγει τον CIITA οδηγώντας σε μια δραματική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων MHCII, αλλά και την έκφραση του KLF4, ενός παράγοντα καθοριστικής σημασίας για πολλές κυτταρικές διεργασίες από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση μέχρι την ομοιόσταση των ιστών, τη φλεγμονή και την ογκογένεση. Έτσι, διερευνήσαμε για πρώτη φορά, την αλληλεπίδραση αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται ταυτόχρονα από IFN γ στο νευρικό περιβάλλον. Αναρωτηθήκαμε ειδικότερα, κατά πόσον η επαγωγή του KLF4 από την IFN γ , συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων MHCII. Διαπιστώσαμε ότι ο KLF4 επηρεάζει το μεταγραφικό δυναμικό του CIITA οδηγώντας σε αύξηση της έκφρασης των μορίων του συμπλέγματος MHC II στο νευρικό περιβάλλον. Η δράση αυτή συνοδεύεται από αλλαγές στην κινητικότητα του CIITA στον πυρήνα, όπως είδαμε με πειράματα FRAP, αλλά και στην σταθερότητα της πρωτεΐνης μέσω της δράσης του πρωτεασώματος, και μάλιστα με έναν κυτταρο-ειδικό τρόπο. Βρήκαμε ότι οι μεταβολές αυτές προκαλούνται μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης του KLF4, με τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330 του CIITA. Σε μια αναφορά που συνέπεσε με την ολοκλήρωση της διατριβής δείχθηκε ότι το αμινο-τελικό άκρο του CIITA είναι πολύ σημαντικό για την γρήγορη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης, η οποία συνδέεται άμεσα με το μεταγραφικό του δυναμικό, ευνοώντας την αποτελεσματικότερη αλληλεπίδραση με τη βασική μεταγραφική μηχανή.

Abstract

In recent years, a multifaceted synergy between the nervous and the immune systems has emerged. This synergy is accomplished by mechanisms that have not been fully elucidated. It is well known that all processes that are integral to adult neurogenesis (proliferation, differentiation, cell migration) are influenced by immunological effectors, for example interferon-gamma (IFN γ). However, the way by which these two systems interact remains a fascinating unanswered question. The aim of this dissertation was to investigate the impact of IFN γ , a pleiotropic cytokine of the immune system, in neuronal cell biology.

The results of this study demonstrated an explicit influence of IFN γ in key properties of neural cells, such as proliferation and differentiation. Using as models human neuroblastoma cell lines we observed that IFN γ reduces the proliferation of the cells by delaying their progression through the S phase of the cell cycle, and at the same time it promotes the onset of early neuronal differentiation markers. Its continuous presence alters the program of retinoic acid (RA)-induced neuronal differentiation and modifies the response of the cells to neurotrophic factors. The neuroblastoma is characterized by high cellular heterogeneity that is systematically used in clinical practice to classify the stages of the disease. There are at least three different cell types present, which are characterized by their ability to interconvert from one type to another with mechanisms which are not yet known (trans-differentiation). We found that IFN γ favors the differentiation of N-type cells, which constitute the tumorigenic population of neuroblastoma, into S-type cells. As a result, the enrichment with S-type cells reduces the ability of the treated cells to form tumors after injection in mice, indicating that IFN γ may enhance the therapeutic effects of RA by promoting the trans-differentiation toward a non-tumorigenic lineage. We also studied the influence of IFN γ in the biology of normal neural progenitor cells isolated from rat hippocampus. The presence of IFN γ resulted in decreased multipotency and accelerated differentiation towards the neuronal lineage whereas the differentiation to glial lineages was not affected.

By analyzing the actions of IFN γ in the neuroblastoma cells we found that in addition to altering the cell type composition as well as their cell fate, this cytokine

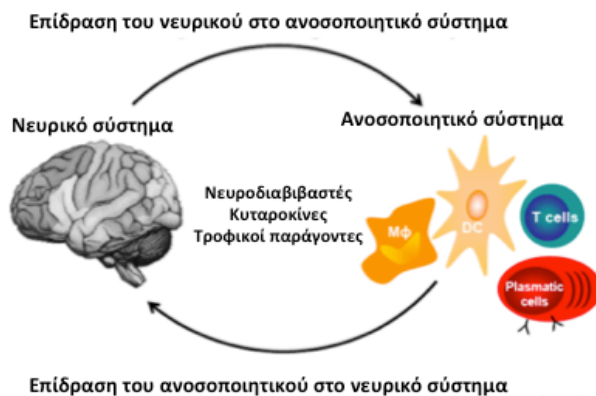
was also capable to induce the expression of CIITA, the master regulator of the MHC class II genes as well as that of KLF4, a factor with a critical role in many cellular processes, from proliferation and differentiation to tissue homeostasis, inflammation and oncogenesis. We therefore explored for the first time, the potential interplay of these two transcription factors that are concomitantly induced by IFN γ in the neuronal milieu. In particular, we questioned whether the increase of KLF4 by IFN γ contributes to the induction of MHC class II gene expression. We discovered that KLF4 indeed affects the transactivation potential of CIITA, thereby increasing the expression of MHC II molecules in the neural cell environment. This effect is accompanied by cell type-specific changes in the mobility of CIITA in the nucleus as revealed by FRAP experiments, as well as in the stability of the protein through the proteasome pathway. We further showed that these alterations are caused by the direct interaction of KLF4 with the CIITA amino acid residues 174-330. Interestingly, in a recent report, that coincided with the completion of this dissertation, it was shown that the N-terminal domain of CIITA plays an important role in the rapid turnover of the protein, which is directly linked to its transactivation properties, by favoring a more efficient interaction with the components of the basal transcription machinery.

1.Εισαγωγή

Κεφάλαιο Α

1.1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος

Για πολλά χρόνια το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα, μελετώνταν και αναλύονταν εντελώς ανεξάρτητα. Κατά την κλασική θεώρηση, οι κυτταροκίνες θεωρούνταν μόρια τα οποία εκκρίνονται αποκλειστικά από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με σκοπό να βοηθούν στην επικοινωνία των κυττάρων του συστήματος αυτού. Από την άλλη πλευρά οι νευροδιαβιβαστές, περιγράφονταν ως τα κλασικά διαλυτά μόρια του νευρικού συστήματος. Σήμερα όμως γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να επικοινωνήσουν μεταξύ τους, μέσω νευροδιαβιβαστών, καθώς επίσης και ότι τα κύτταρα του νευρικού συστήματος, μπορούν να επικοινωνήσουν μέσω κυτταροκινών. Αυτές οι αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο συστημάτων συμβάλουν στην φυσιολογική λειτουργία και ομοιόσταση των οργανισμών [1] [2] [3].



Εικόνα 1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Τα δυο συστήματα ρυθμίζονται αμφίδρομα χρησιμοποιώντας τα ίδια μόρια νευροδιαβιβαστών, κυτταροκινών και τροφικών παραγόντων (Τροποποίηση από [1]).

1.1.1. Ρύθμιση της ανοσοποίησης από το νευρικό σύστημα

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών αποκαλύπτει, ότι κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην πρώτη και τη δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού, είναι ικανά να συνθέσουν και να απελευθερώσουν μια πληθώρα νευροδιαβιβαστών. Τα Τ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν σεροτονίνη, νορεπινεφρίνη, ντοπαμίνη και ακετυλοχολίνη

ενώ τα δενδριτικά κύτταρα γλουταμίνη, ντοπαμίνη και σεροτονίνη [4]. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία της αιμοποίησης. Ως αιμοποίηση ορίζεται η διαδικασία παραγωγής όλων των τύπων κυττάρων του αίματος από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών. Ο μυελός των οστών αποτελεί ένα περιβάλλον στο οποίο είναι έντονη η δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Είναι γνωστό ότι η νορεπινεφρίνη, η οποία εκκρίνεται από κύτταρα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, επιδρά στην κινητοποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων [5]. Επιπροσθέτως, ο καταλυτικός υποδοχέας RET του νευροτροφικού παράγοντα GDNF, εκφράζεται και είναι απαραίτητος για την επιβίωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων [6]. Έτσι λοιπόν, οι νευροτροφικοί παράγοντες αποτελούν συστατικά στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, και τα κύτταρα αυτά ρυθμίζονται με παρόμοια σηματοδοτικά μόρια όπως και οι νευρώνες.

1.1.2. Ρύθμιση του νευρικού συστήματος από το ανοσοποιητικό

Οι κυτταροκίνες αποτελούν τα κύρια διαλυτά μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία είναι ικανά να οργανώνουν μια πληθώρα πολύπλοκων ανοσολογικών αντιδράσεων. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν αναφορές για τη σύνθεση των μορίων αυτών στον εγκέφαλο τόσο από νευρικά όσο και από γλοιακά κύτταρα. Οι υποδοχείς των κυτταροκινών έχουν επίσης βρεθεί να εκφράζονται, σε κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος, σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [7].

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, δεν μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB). Παρόλα αυτά, δείχθηκε πρόσφατα ότι Τ λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να διαπεράσουν το πρώτο τμήμα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και να βρεθούν στην υποαραχνοϊδή περιοχή του εγκεφάλου. Εκεί εκκρίνουν ιντερλευκίνη 4, η οποία προσλαμβάνεται και επηρεάζει τη βιολογία των αστροκυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή BDNF, ο οποίος δρα ευεργετικά στους νευρώνες του ιππόκαμπου, ενισχύοντας την παροδική μνήμη και τη μάθηση [8].

Σε παθολογικές καταστάσεις, μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, επηρεάζοντας αρχικά τα γλοιακά κύτταρα, επάγοντας νευροτοξικότητα και παραγωγή κυτταροκινών από τη μικρογλοία. Στην περίπτωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας, τα δενδριτικά κύτταρα και τα Τ λεμφοκύτταρα που διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, οδηγούν στην είσοδο μορίων της πρώτης γραμμής άμυνας του οργανισμού, τα οποία προκαλούν απομυελίνωση και καταστροφή των αξόνων [9].

1.2. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στις νεοπλασίες του νευρικού συστήματος

Οι νεοπλασίες του νευρικού συστήματος, αποτελούν ένα πεδίο εκτενούς μελέτης και έρευνας λόγω της ανεπαρκούς διάγνωσης σε αρχικά στάδια. Στην κατηγορία αυτή, συγκαταλέγονται τόσο όγκοι του ΚΝΣ, όσο και του ΠΝΣ. Πολλοί καρκίνοι του νευρικού συστήματος είναι πιο συχνοί στα νεογέννητα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Μια σημαντική κατηγορία όγκων του ΚΝΣ που παρατηρείται σε μεγάλα ποσοστά στους ενήλικες είναι το γλοιοβλάστωμα. Το γλοιοβλάστωμα θεωρείται ότι προέρχεται από νευρικά βλαστικά κύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης των πλευρικών κοιλιών (SVZ, Subventricular Zone) τα οποία εξακολουθούν να πολλαπλασιάζονται με αργούς ρυθμούς καθ όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου [10]. Ένας τύπος καρκίνου του ΠΝΣ είναι το νευροβλάστωμα. Σε αντίθεση με το γλοιοβλάστωμα, η κατηγορία αυτή εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά έως 2 ετών και προέρχεται από βλαστικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, τα οποία αδυνατούν να διαφοροποιηθούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (βλ. αναλυτική περιγραφή στην παράγραφο 1.2.2.). Τόσο στις νεοπλασίες του νευρικού συστήματος όσο και των υπόλοιπων συστημάτων, πολύ σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της εμφάνισής τους διαδραματίζει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού.

Το πιο κρίσιμο σημείο στην εξέλιξη των όγκων, συμπεριλαμβανομένου του νευροβλαστώματος, είναι η αλληλεπίδραση των απορρυθμισμένων κυττάρων, με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Στο στάδιο αυτό ενεργοποιείται η πρώτη και δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού με μια πλειάδα ενεργοποιημένων δενδριτικών, Τ και ΝΚΤ κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά παράγουν

κυτταροκίνες όπως IFN γ , IFN $\alpha\beta$, IL2 και TNF. Αποτέλεσμα είναι η καταπολέμηση των απορρυθμισμένων κυττάρων του όγκου σε αρχικά στάδια, πριν αυτά γίνουν κλινικά φανερά. Στο σημείο αυτό κάποια από τα κύτταρα του όγκου είναι δυνατό να μην αντιμετωπιστούν. Παραμένουν έτσι σε μια λανθάνουσα φάση, αναπτύσσοντας μηχανισμούς με τους οποίους αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να είναι: καταστολή της έκφρασης των αντιγόνων που εμφανίζονται σε κύτταρα των όγκων (*Tumor Associated Antigens, TAA*) έτσι ώστε να μην μπορούν να αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα, αδυναμία παρουσίας τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, και ανάπτυξη προστασίας από τους τελεστές του ανοσοποιητικού συστήματος. Μέσω των παραπάνω μηχανισμών τα κύτταρα δημιουργούν το κατάλληλο και ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωσή τους, το λεγόμενο περιβάλλον του όγκου. Σ' αυτές τις «ιδανικές» συνθήκες, κάποια στιγμή πυροδοτείται ο πολλαπλασιασμός, τα κύτταρα αποκτούν νέες ιδιότητες, δημιουργούν ετερογενείς πληθυσμούς όπου οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι αλληλομετατρέπονται, γίνονται επιθετικά και μεταναστεύουν [11].

1.2.1. Κυτταρική ετερογένεια- το κύριο χαρακτηριστικό των όγκων

Ένα από τα πιο βασικά προβλήματα που η επιστημονική κοινότητα καλείται να αντιμετωπίσει σε σχέση με τις νεοπλασίες, είναι η εξαιρετική κυτταρική ετερογένεια. Ετερογένεια απαντάται μεταξύ των κυττάρων του ίδιου όγκου, ή όγκων που βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου οργανισμού, καθώς και όγκων παρόμοιας οντογενετικής προέλευσης σε διαφορετικούς ασθενείς. Η ετερογένεια αναφέρεται στο ότι ένας όγκος αποτελείται από μια μάζα κυττάρων με διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά. Το γεγονός αυτό αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της ίασης των ασθενών καθώς τα κύτταρα έχουν διαφορετικές ικανότητες πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, επιθετικότητας και φυσικά απόκρισης στις θεραπείες [12].

Με βάση την ετερογένεια αυτή, έχουν διατυπωθεί δύο κύριες θεωρίες για την πιθανή προέλευση των όγκων. Σύμφωνα με το παραδοσιακό στοχαστικό μοντέλο (*stochastic model*), τα κύτταρα του όγκου είναι κυρίως ομοιογενή και έχουν την ίδια ικανότητα πολλαπλασιασμού και ογκογονικού δυναμικού. Η έκθεσή τους σε

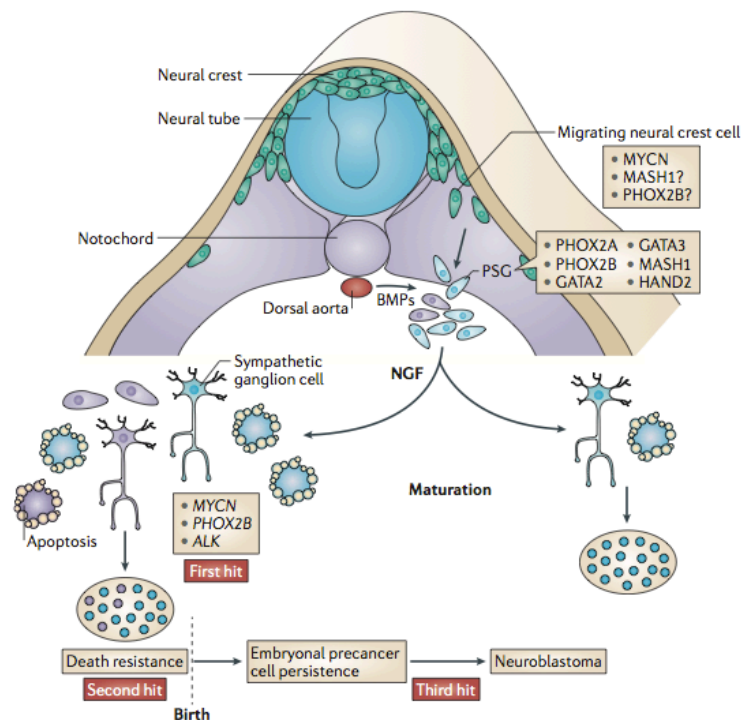
εσωτερικούς ή εξωτερικούς παράγοντες οι οποίοι δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη, οδηγεί κάποια από αυτά να αποκτήσουν διαφορετικές ιδιότητες από τα άλλα, με αποτέλεσμα να γίνονται πιο επιθετικά. Στο συγκεκριμένο μοντέλο στοχεύουν οι περισσότερες θεραπείες, όμως αυτό δεν εξηγεί γιατί κάποιοι ασθενείς μετά τη θεραπεία επανεμφανίζουν όγκους [13] [14].

Το δεύτερο μοντέλο είναι αυτό της κλωνικής εξέλιξης (clonal evolution). Σύμφωνα με αυτό, ο καρκίνος προκύπτει όταν σε κάποιο κύτταρο έχει συσσωρευτεί ένας αρκετός αριθμός μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις προσδίδουν διαρκώς νέες ιδιότητες στα κύτταρα και τους επιτρέπουν να πολλαπλασιάζονται και να επιβιώνουν καλύτερα από τα υπόλοιπα. Με άλλα λόγια οι καρκίνοι εξελίσσονται μέσω μιας επαναλαμβανόμενης διαδικασίας κλωνικής επέκτασης, γενετικής διαφοροποίησης και επιλογής μέσα στο μικροπεριβάλλον των ιστών [15]. Αυτό το μοντέλο εξηγεί πολλές πτυχές της ασθένειας όπως τη φαινοτυπική ετερογένεια, τη γενετική αστάθεια και την αντίσταση στις χημιοθεραπείες. Τέλος το τρίτο μοντέλο που συχνά ενσωματώνεται στο δεύτερο είναι αυτό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Αν και η υπόθεση αυτή πρωτο- εμφανίστηκε το 1985 από τον Cohnhein, δεν είχε λάβει, μέχρι πρόσφατα, την προσοχή που θα έπρεπε. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό ο καρκίνος προκύπτει όταν ένα ή ορισμένα κύτταρα μέσα σε ένα όγκο, έχουν ή αποκτήσουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων. Βλαστικά κύτταρα μπορούν είτε να προϋπάρχουν, αφού σχεδόν κάθε ιστός του οργανισμού έχει ένα τέτοιο πληθυσμό κυττάρων, είτε να προκύπτουν από απο-διαφοροποίηση των είδη υπαρχόντων κυττάρων. Το μοντέλο αυτό εξηγεί όλες τις πτυχές της ασθένειας με βάση το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης και το σημαντικότερο, εξηγεί τη μεταστατικότητα και την πλαστικότητα που διαθέτουν οι περισσότεροι όγκοι [14] [13].

1.2.2. Το νευροβλάστωμα

Το νευροβλάστωμα αποτελεί μια επιθετική και σπάνια μορφή καρκίνου που εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία. Προέρχεται από κύτταρα του περιφερικού νευρικού συστήματος, συγκεκριμένα από πρόδρομα συμπαθητικά νευρικά κύτταρα, τα οποία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αδυνατούν να διαφοροποιηθούν. Κύριο

χαρακτηριστικό της νόσου, είναι ότι η διάγνωση πραγματοποιείται σε προχωρημένα, μεταστατικά στάδια [16] [17] (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του τρέχοντος μοντέλου για την προέλευση του νευροβλαστώματος. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης πρόδρομα νευρικά κύτταρα μεταναστεύουν από τη νευρική ακρολοφία, σε περιοχές κοντά στη νωτοχορδή. Σε εκείνο το σημείο δεσμεύονται προς τη συμπαθητική γενεαλογία. Η πρόσβαση των κυττάρων αυτών στον νευροτροφικό παράγοντα NGF, καθορίζει αν θα διαφοροποιηθούν ή θα υποστούν απόπτωση. Σε παθολογικές καταστάσεις, κάποια κύτταρα, που ονομάζονται προ-καρκινικά, αδυνατούν να λάβουν σήματα από τον NGF ή να ανταποκριθούν σε αυτά, και επιβιώνουν αδιαφοροποίητα μέχρι τη γέννηση. Απο τα κύτταρα αυτά θα προκύψει αργότερα το νευροβλάστωμα [18] .

1.2.3. Κυτταρική ετερογένεια του νευροβλαστώματος

Όπως προαναφέρθηκε το νευροβλάστωμα είναι εξαιρετικά ετερογενές. Σε κάθε νευροβλάστωμα απαντώνται τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τύποι κυττάρων, που προέρχονται όλοι από τη νευρική ακρολοφία. Η ετερογένεια αυτή χρησιμοποιείται συστηματικά στην κλινική πρακτική για την κατηγοριοποίηση των σταδίων της νόσου.

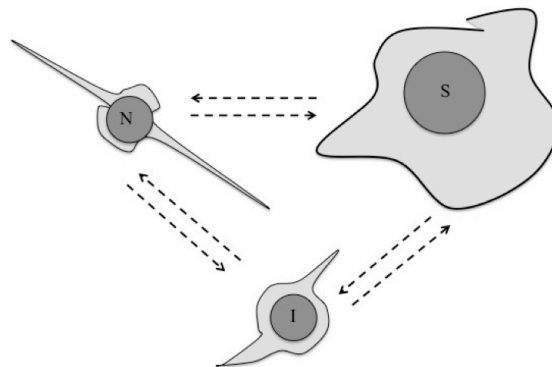
Ο πρώτος τύπος κυττάρων είναι τα κύτταρα τύπου N (*N-type cells*), και έχουν χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων ή νευροβλαστών. Τα κύτταρα αυτά

αναπτύσσονται με τη μορφή συστάδων και μικρή ικανότητα προσκόλλησης στο υπόστρωμα. Διαθέτουν μικρούς στρόγγυλους πυρήνες, με μικρό κυτταρόπλασμα και νευρικές απολήξεις (**Εικόνα 3**). Εκφράζουν μια σειρά πρωτεϊνών που είναι χαρακτηριστικές για τα νευρικά κύτταρα, όπως μόρια των οικογενειών NF και Hu [19], καθώς επίσης και Tuj1 και vimentin με πολωμένη κυτταροπλασματική κατανομή [20]. Τα κύτταρα τύπου N αποτελούν τον ογκογόνο πληθυσμό του νευροβλαστώματος καθώς έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σφαίρες σε δοκιμασίες μαλακού άγαρ (soft agar assays) και να δημιουργούν όγκους όταν ενεθούν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια.

Ο δεύτερος τύπος κυττάρων είναι τα κύτταρα τύπου S (*S-type cells*), με χαρακτηριστικά παρόμοια με τα κύτταρα Schwann ή τα μελανοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν μεγάλους πυρήνες με εκτεταμένο κυτταρόπλασμα, χωρίς νευρίτες και πολλαπλασιάζονται όντας ισχυρά προσκολλημένα στο υπόστρωμα (**Εικόνα 3**). Δεν εκφράζουν νευρικούς δείκτες, χαρακτηρίζονται όμως από την παρουσία πρωτεϊνών που συναντώνται σε γλοιακά κύτταρα, όπως vimentin με έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή [20], CD44 [19], πρωτείνες της οικογένειας S100 [21] και Nestin [22]. Τα κύτταρα αυτά θεωρούνται μη καρκινικά καθώς δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε δοκιμασίες μαλακού άγαρ και δε σχηματίζουν όγκους όταν ενεθούν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων (N και S) είναι τόσο διαφορετικοί, συνυπάρχουν πάντοτε στους πρωτογενείς όγκους και στις καλλιέργειες των νευροβλαστωματικών κυττάρων, διαθέτουν πανομοιότυπες γενετικές ανωμαλίες, και θεωρείται ότι προέρχονται από ένα κοινό προγονικό κύτταρο [21] [23].

Ο τρίτος τύπος κυττάρων του νευροβλαστώματος, που χαρακτηρίζεται και απο την μεγαλύτερη ογκογόνα ικανότητα είναι τα κύτταρα τύπου I (*Intermediate, I-type cells*). Η μορφολογία των κυττάρων αυτών είναι ενδιάμεση των N και S, δηλαδή διαθέτουν ενδιάμεσου μεγέθους πυρήνες και κυτταρόπλασμα με ή χωρίς νευρικές απολήξεις (**Εικόνα 3**), αναπτύσσονται όντας ισχυρά προσκολλημένα στο υπόστρωμα ή σε συσσωματώματα με άλλα κύτταρα και εκφράζουν μοριακούς δείκτες και των δυο τύπων κυττάρων. Επιπλέον είναι θετικά για τις πρωτείνες c-kit [20] και CD133 [24]. Τα κύτταρα τύπου I, θεωρούνται κύτταρα με καρκινικές βλαστικές ικανότητες.

Ένα από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά αυτών των τριών διαφορετικών τύπων κυττάρων, είναι η ικανότητά τους να αλληλομετατρέπονται από τον ένα τύπο στον άλλο με μηχανισμούς που δεν είναι γνωστοί. Η διαδικασία αλληλομετατροπής ονομάζεται δια-διαφοροποίηση (trans- differentiation). *In vitro*, διαφορετικά μορφογόνα ή ορισμένοι χημικοί παράγοντες μπορούν να κατευθύνουν σε ένα μεγάλο ποσοστό την μετατροπή τους ως προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση, για παράδειγμα, η παρουσία ρετινοϊκού οξέως (RA), είναι ικανή να οδηγήσει στον εμπλουτισμό της καλλιέργειας με κύτταρα τύπου N ενώ η επεξεργασία με BrdU εμπλουτίζει την καλλιέργεια σε κύτταρα τύπου S [20].



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της μορφολογίας των τριών τύπων κυττάρων του νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα αυτά είναι δυνατό να αλληλομετατρέπονται από τον ένα τύπο στον άλλο, με μια διαδικασία που ονομάζεται δια-διαφοροποίηση και με μηχανισμούς που δεν είναι διευκρινισμένοι.

1.2.4. Θεραπεία του νευροβλαστώματος με ιντερφερόνη γ

Οι θεραπευτικές στρατηγικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την αντιμετώπιση του νευροβλαστώματος έχουν να κάνουν με το στάδιο της ασθένειας. Για ασθενείς των σταδίων 1 και 2 που χαρακτηρίζονται ως χαμηλού ρίσκου (low-risk) χρησιμοποιείται η χειρουργική προσέγγιση. Αντίθετα, για ασθενείς των σταδίων 3 και 4, ή αλλιώς υψηλού ρίσκου (high-risk), χρησιμοποιούνται χημειοθεραπεία, ακτινοβολία, χειρουργική επέμβαση καθώς και μεταμόσχευση μυελού των οστών και αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (National Cancer Institute 2008). Ωστόσο, οι παραπάνω θεραπείες στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ανεπαρκείς.

Από τα παραπάνω λοιπόν γίνεται αντιληπτή η ανάγκη για τη δημιουργία νέων στρατηγικών αντιμετώπισης της συγκεκριμένης νόσου. Οι στρατηγικές αυτές

στοχεύουν κυρίως σε δύο σημεία. Το πρώτο αφορά την προέλευση του νευροβλαστώματος. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα το νευροβλάστωμα δημιουργείται όταν ανώριμα πολυδύναμα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, κατά την εμβρυογένεση, αδυνατούν να διαφοροποιηθούν. Έτσι η θεραπεία με παράγοντες οι οποίοι προωθούν τη νευρική διαφοροποίηση, έχουν ως σκοπό την αναστολή του πολλαπλασιασμού, τη δημιουργία πιο ομοιογενών πληθυσμών και κατ' επέκταση διαφοροποιημένων, μη καρκινικών νευρικών κυττάρων.

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει την «ευεργετική» δράση της IFN γ , και έχουν προτείνει τη χρήση της ως μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση. Η IFN γ μειώνει τον πολλαπλασιασμό μιας πληθώρας νευροβλαστωματικών κυτταρικών σειρών όταν βρεθεί στο μέσο καλλιέργειας, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως το ρετινοϊκό οξύ (RA), ο TNF και ο NGF [25],[26],[27]. Επακόλουθο της αναστολής του πολλαπλασιασμού αποτελεί η πιο αποτελεσματική διαφοροποίηση των κυττάρων, όπως υποδηλώνεται από την αύξηση του μήκους των νευριτών και την επαγωγή χαρακτηριστικών δεικτών της νευρικής διαφοροποίησης [28], [29].

Η δεύτερη προσέγγιση για τη θεραπεία του νευροβλαστώματος στοχεύει στην ενεργοποίηση κυττάρων και σηματοδοτικών μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος. Λόγω των μηχανισμών αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι γνωστό ότι τα κύτταρα των όγκων δεν εκφράζουν μόρια MHC, με αποτέλεσμα τη χαμηλή ανοσογονικότητα των κυττάρων [30]. Ο πιο σημαντικός επαγωγέας των μορίων αυτών, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.4. είναι η IFN γ . Με τη δημιουργία σταθερών νευροβλαστωματικών σειρών που εκκρίνουν IFN γ και την επακόλουθη εισαγωγή τους σε ποντίκια, διαπιστώθηκε μια σημαντική μείωση της ογκογονικότητας των κυττάρων, με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας ([31][32]). Επομένως, η στόχευση στη δράση του βασικού μεταγραφικού παράγοντα CIITA (Class II Transactivator), ο οποίος ευθύνεται για την επαγωγή των MHC class II από την IFN γ (βλ. Παράγραφο 1.4), ίσως είναι βασικής σημασίας καθώς η ρύθμιση του είναι ιδιαίτερα σύνθετη στα νευροβλαστώματα [33][34].

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφής η ανάγκη κατανόησης σε βάθος, τόσο των μηχανισμών δράσης της IFN γ που ωθούν στην καλύτερη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, όσο και των μηχανισμών που οδηγούν στην επαγωγή των

μορίων MHC στα νευροβλαστώματα. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να δημιουργηθούν νέες, πιο αποτελεσματικές θεραπείες για την αντιμετώπιση της νόσου.

Κεφάλαιο Β

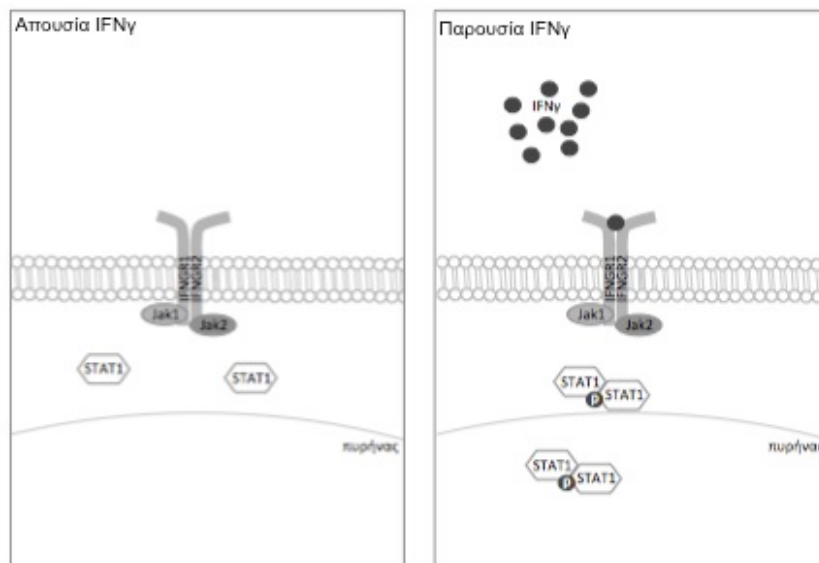
1.3. Η ιντερφερόνη γ (IFNγ)

Η ιντερφερόνη γ (IFNγ), ανακαλύφθηκε το 1957 από τους Isaac and Lindenmann ως ένας παράγοντας που εμποδίζει (*Interfere*) την αντιγραφή των ιών [35]. Αρχικά ονομάστηκε ιντερφερόνη του ανοσοποιητικού και αργότερα ιντερφερόνη τύπου II. Η κύρια πηγή παραγωγής IFNγ είναι τα Τ λεμφοκύτταρα και τα φυσικά κύτταρα φονείς (NK), ενώ αποτελεί το κύριο μόριο, ενεργοποίησης των μακροφάγων, από τα Τ λεμφοκύτταρα. Η IFNγ, όπως και οι υπόλοιπες ιντερφερόνες, είναι διαλυτές πρωτεΐνες (λεμφοκίνες), οι οποίες παράγονται φυσιολογικά από το σώμα σε περίπτωση μολύνσεων. Στην προσπάθειά τους να καταπολεμήσουν τις μολύνσεις ενεργοποιούν και μια σειρά από μη ανοσολογικές γραμμές άμυνας του οργανισμού, όπως είναι ο πυρετός, η ανορεξία και η υπνηλία. Οι συγκεκριμένες γραμμές άμυνας, άμεσα συνδεδεμένες με το κεντρικό νευρικό σύστημα, υποδηλώνουν την εμπλοκή της στο νευρικό σύστημα.

1.3.1. Το μονοπάτι της Ιντερφερόνης γ

Η IFNγ, είναι μια ομοδιμερής διαλυτή κυτταροκίνη. Για να σηματοδοτήσει, θα πρέπει να προσδεθεί στον υψηλής συνάφειας, ετεροδιμερή υποδοχέα της IFNGR1/IFNGR2 [36]. Ο υποδοχέας αυτός, εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Η πρόσδεση της IFNγ στον υποδοχέα της, ενεργοποιεί το μονοπάτι JAK/STAT1(Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)) [37]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού περιλαμβάνει τον ολιγομερισμό των υποδοχέων και την επακόλουθη φωσφορυλίωση των κινάσων Jak1 και Jak2. Οι κινάσες Jak1/2 στη συνέχεια, φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα IFNGR1, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να προσελκύει τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1. Ακολουθεί η φωσφορυλίωση του STAT1, στο κατάλοιπο τυροσίνης 701. Με τον

τρόπο αυτό, ο φωσφορυλιωμένος μεταγραφικός παράγοντας STAT1, ομοδιμερίζεται, εισέρχεται στον πυρήνα και μεταγράφει γονίδια στόχους που διαθέτουν στοιχεία GAS (γ- activated sequences) (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Σηματοδότηση της IFNγ, μέσω του μονοπατιού Jak/STAT1. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων, τελικά οδηγεί στο σχηματισμό ομοδιμερών STAT1 μορίων τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα και μεταγράφουν γονίδια στόχους.

1.3.2. Ο ρόλος της ιντερφερόνης γ στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Η ιντερφερόνη γ, φυσιολογικά δεν εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Κάτω από παθολογικές καταστάσεις όμως, η παρουσία της στον εγκέφαλο γίνεται έντονη. Αυτή οφείλεται στην έκκριση της, από Τ λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και από κύτταρα της μικρογλοίας τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από τη φλεγμονή. Σε συνθήκες φλεγμονής, η έντονη παρουσία και δράση της IFNγ, έχει συσχετιστεί με μια πληθώρα ασθενειών νευρικής προελεύσεως, όπως αυτοάνοσα νοσήματα και νευροεκφυλιστικές διαταραχές [38].

Ένα σοβαρό αυτοάνοσο νόσημα, στο οποίο η IFNγ παίζει σημαντικό ρόλο είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας. Η συγκεκριμένη νόσος λαμβάνει χώρα όταν Τ λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν εαυτά αντιγόνα διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αποτέλεσμα είναι η απομυελίνωση των αξόνων και η καταστροφή των νευρικών κυττάρων. Αν και η παθογένεια της συγκεκριμένης νόσου περιλαμβάνει Τ λεμφοκύτταρα τα οποία εκκρίνουν IFNγ, τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και περισσότερο ξεκάθαρος ο νευροπροστατευτικός ρόλος της. Σε μοντέλα ποντικού της

σκλήρυνσης κατά πλάκας (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), η αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα της IFN γ , IFNGR $^{-/-}$, στο ΚΝΣ, έχει ως αποτέλεσμα σοβαρότερες διαταραχές των νευρώνων στον εγκέφαλο, σε σχέση με την περιφέρεια [39]. Επίσης η πρόκληση EAE, σε ποντίκια των οποίων τα αστροκύτταρα έχουν μεταλλαγμένο τον υποδοχέα της IFN γ , οδηγεί στην εντονότερη απομυελίνωση των αξόνων και στον πιο γρήγορο θάνατο των ποντικών [40]. Από τα παραπάνω, διαφαίνεται ο νευροπροστατευτικός ρόλος της IFN γ στην σκλήρυνση κατά πλάκας. Παρόλα αυτά η θεραπεία της νόσου με IFN γ δεν ενδείκνυται, εξαιτίας των παράπλευρων ανοσολογικών αντιδράσεων που είναι δυνατό να προκληθούν από την παρουσία της, στο ΠΝΣ.

Ένα άλλο παράδειγμα νευροεκφυλιστικής διαταραχής στην οποία ενδέχεται να εμπλέκεται η IFN γ , είναι η ασθένεια Αλτσχάιμερ (Alzheimer's Disease, AD). Η νόσος χαρακτηρίζεται από αυξημένη εναπόθεση βΑ4 αμυλοειδούς με τη μορφή πλακών αμυλοειδούς οι οποίες προοδευτικά οδηγούν στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Η συσσώρευση όλων αυτών των δομών οδηγεί τελικά σε μη λειτουργικές συνάψεις και θάνατο των νευρικών κυττάρων. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, σε συνδυασμό με γενετικούς, έχουν αποτέλεσμα την αυξημένη φλεγμονή με την πάροδο της ηλικίας. Κάτω από μηχανισμούς οι οποίοι δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, προκαλείται αύξηση πρωτογενών κυτταροκινών όπως η IFN γ . Αξιοποιώντας ένα μοντέλο ποντικού για τη νόσο AD, πραγματοποιήθηκε χρόνια έκθεση σε IFN γ στην περιοχή του υπόκαμπου. Μετά από δέκα μήνες, στα ποντίκια που είχαν εκτεθεί στην IFN γ , παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, σταθερά επίπεδα κυτταροκινών και χημειοκινών και υψηλά επίπεδα αμυλοειδών πλακών. Παράλληλα με τα παραπάνω ευρήματα, που υποδηλώνουν πιο γρήγορη εξέλιξη της νόσου παρατηρήθηκαν και ευεργετικά γεγονότα. Αυτά ήταν η μείωση της συσσώρευσης της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης tau, καθώς επίσης και αύξηση της νευρογένεσης [41]. Έτσι γίνεται αντιληπτός ο διττός ρόλος που ενδεχομένως έχει η IFN γ στη συγκεκριμένη νόσο. Τέλος η δράση της, έχει χαρακτηριστεί ως νευροπροστατευτική και σε άλλες περιπτώσεις, π.χ. διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποκατάσταση των βλαβών του ΚΝΣ, μετά από τραύμα. Επιπρόσθετα, σε υπόκαμπους αρουραίων η χορήγηση IFN γ , μετά από επιληψία, οδηγεί σε πιο γρήγορη αποκατάσταση της βλάβης [42]. Γίνεται έτσι φανερό, ότι η

βαθύτερη κατανόηση των φαινομενικά διαφορετικών δράσεων της IFN γ μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων αξιοποιώντας τη νευροπροστατευτική της δράση σε εκφυλιστικές διαταραχές του εγκεφάλου.

1.3.3. Ο ρόλος της ιντερφερόνης γ στο περιφερικό νευρικό σύστημα

Ομοίως με το ΚΝΣ, έκκριση IFN γ παρατηρείται και σε περιοχές του ΠΝΣ κάτω από καταστάσεις φλεγμονής. Η δράση της IFN γ , στα κύτταρα του ΠΝΣ μπορεί να χαρακτηριστεί κυρίως ως ευεργετική. Είναι γνωστό ότι αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης των συμπαθητικών νευρικών κυττάρων μετά από απομάκρυνση του NGF, του κύριου νευροτροφικού παράγοντα που ρυθμίζει την επιβίωση των κυττάρων αυτών [43]. Αυξάνει επίσης τη βιωσιμότητα των αισθητικών νευρικών κυττάρων των ραχιαίων γαγγλίων (dorsal root ganglia, DRG) μέσω της επαγωγής της πρωτεΐνης SOCS1, ακόμη και απουσία NGF και LIF [44]. Η έλλειψη IFN γ , μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη, σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του θανάτου των νευρώνων της περιοχής υποδηλώνοντας τον προστατευτικό ρόλο της στην περιφέρεια [45].

1.3.4. Επίδραση της ιντερφερόνης γ στα νευρικά βλαστικά κύτταρα

Τα τελευταία χρόνια, καθώς η τεχνολογία και οι γνώσεις μας σχετικά με τα βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται, καθίσταται όλο και περισσότερο ελκυστική η σκέψη της χρήσης νευρικών βλαστικών κυττάρων, για επιδιορθώσεις βλαβών του ΚΝΣ. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.5.1, αποτελούν τα μόνα πολυδύναμα κύτταρα του ενήλικου νευρικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά, έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται προς όλους τους τύπους νευρικών κυττάρων. Μεταναστεύοντας, αντικαθιστούν τα νευρικά κύτταρα που αποπίπτουν, λόγω φυσικής φθοράς, ασθένειας ή τραύματος. Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.2.2, στις καταστάσεις αυτές, είναι έντονη η παρουσία φλεγμονής και συνεπώς της IFN γ . Θεωρείται λοιπόν ιδιαίτερα σημαντική η κατανόηση της επίδρασης που έχει η IFN γ στη βιολογία των NSCs.

Παρόλα αυτά, οι γνώσεις μας σχετικά με την επίδραση που ασκεί η IFN γ στα κύτταρα αυτά είναι συγκεχυμένες. Αρκετές μελέτες, υποστηρίζουν ότι η παρουσία της IFN γ σε ενήλικα βλαστικά νευρικά κύτταρα της υπο-κοιλιακής ζώνης του

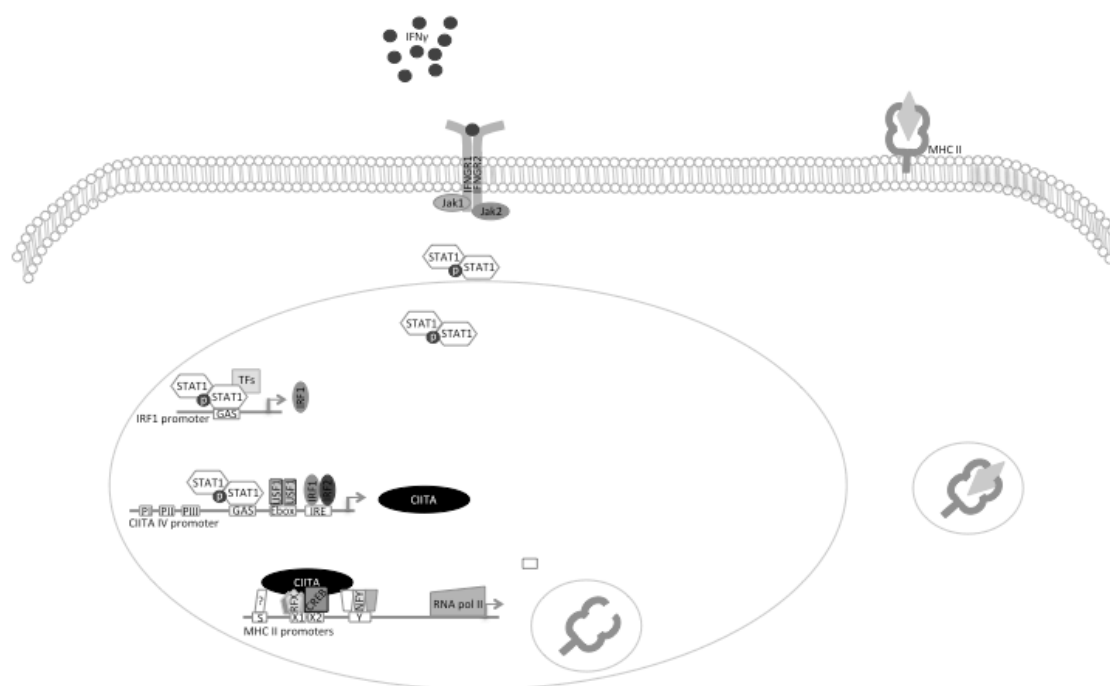
υπόκαμπου (SVZ), είναι ευεργετική καθώς αυξάνει την επιβίωση, προωθεί τη διαφοροποίηση και τη νευριτική αύξηση [46], [47], [48], [49], [50]. Επίσης, η απουσία IFN γ στον ποντικό οδηγεί σε θάνατο των νευρώνων του υπόκαμπου μετά από μόλυνση με ιό [51], υποδηλώνοντας νευροπροστατευτικό ρόλο. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, πρόδρομα νευρικά κύτταρα που απομονώθηκαν από την περιοχή SGZ ποντικών με ομόζυγα αδρανοποιημένο το γονίδιο της IFN γ , έδειξαν αυξημένη ικανότητα αυτοανανέωσης και μεγαλύτερη παραγωγή διαφοροποιημένων νευρώνων [52]. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η δράση της IFN γ , σε ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα είναι πολυσχιδής και ίσως εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το περιβάλλον, το χρόνο έκθεσης, την συγκέντρωση κ.α.

Παρόμοια σύγχυση, επικρατεί και σε ότι αναφορά τη δράση της IFN γ , σε εμβρυονικά νευρικά βλαστικά κύτταρα. Κάποιες μελέτες υποδεικνύουν μια ευεργετική δράση *in vitro*, σε καλλιέργειες νευρικών βλαστικών κυττάρων απομονωμένων από το φλοιό ή τον υπόκαμπο εμβρύων ποντικών και αρουραίων, όπως φαίνεται από την προώθηση της νευριτικής αύξησης και της διαφοροποίησης [53]. Από την άλλη πλευρά έχει αναφερθεί μείωση νευρογένεσης μέσω καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα Neurogenin 2 (Ngn2) [54], και ένας μη φυσιολογικός νευρικός φαινότυπος [55], ο οποίος έχει υποτεθεί ότι μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT1, με το αναπτυξιακό μονοπάτι sonic hedgehog (SHH) [56].

1.4. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επαγωγή των MHC τάξης II

Το πιο γνωστό σηματοδοτικό μονοπάτι, στο οποίο κύριος ενεργοποιητής είναι η IFN γ , είναι αυτό που οδηγεί στη επαγωγή των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC τάξης II). Η σηματοδότηση αυτή περιλαμβάνει την πρόσδεσή της κυτταροκίνης στον ετεροδιμερή υποδοχέα της IFNGR1/IFNGR2, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Jak-STAT1, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.3.1. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία φωσφορυλιωμένων ομοδιμερών μορίων STAT1, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα επάγοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων που διαθέτουν στοιχεία GAS (*γ - activated sequences*) [57]. Το προϊόν ενός από αυτά τα γονίδια, του γονιδίου IRF1,

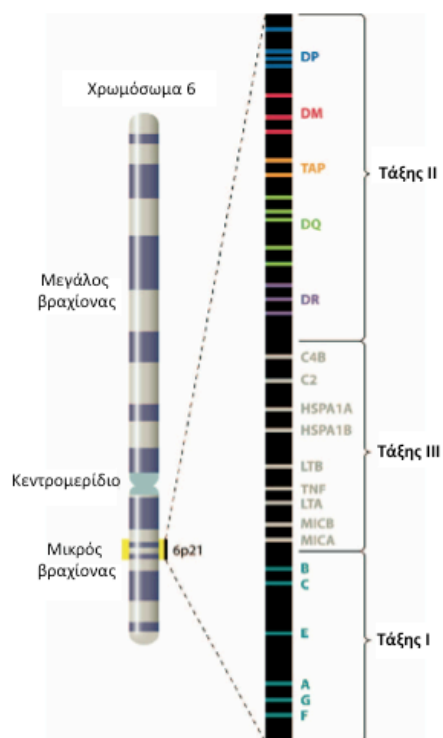
προσδένεται σε συντηρημένες cis- αλληλουχίες (IRE elements) του pIV υποκινητή του CIITA, όπου σε συνεργασία με άλλα μόρια που βρίσκονται προσδεσμένα (συμπεριλαμβανομένου και του pSTAT1), επάγει τη μεταγραφή του [58]. Ο CIITA προσελκύεται στη συνέχεια στο ενισχυόσωμα των μορίων τάξης II, όπως περιγράφεται εκτενώς στις παραγράφους 1.4.4 και 1.4.5, ξεκινώντας τη μεταγραφή τους.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα, από τη δέσμευση της IFN γ στους υποδοχείς της έως την μεταγραφή των μορίων τάξης II.

1.4.1. Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό πολυμορφικών γονιδίων. Τα μόρια αυτά, διαδραματίζουν ρόλο κλειδί, στην ανάπτυξη ειδικών ανοσολογικών αντιδράσεων



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του χρωμοσώματος 6 στον άνθρωπο όπου εδράζεται ο γενετικός τόπος HLA (τροποποίηση απο[180]).

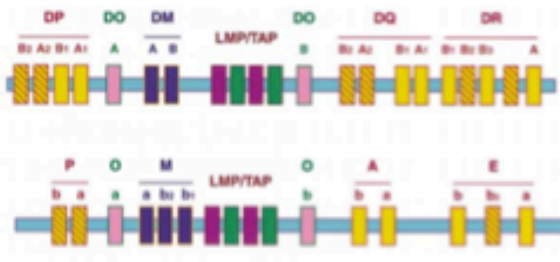
των σπονδυλωτών. Ο γενετικός τόπος που είναι υπεύθυνος για την έκφρασή τους, στον άνθρωπο ονομάζεται *HLA* (Human Leukocyte Antigens) και εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, ενώ στο ποντίκι *H2* και εδράζεται στο χρωμόσωμα 17. Για τον άνθρωπο, είναι πλέον γνωστό ότι ο γενετικός τόπος HLA, καλύπτει μία περιοχή 7,6 Mb, στην οποία εκτός των κλασικών MHC γονιδίων, περιέχονται και αρκετά άλλα που βοηθούν στην αντιγονική παρουσίαση και στη φλεγμονή [59].

Η περιοχή MHC, χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες γονιδίων, βάση της ανοσολογικής τους δράσης (Εικόνα 6). Τα γονίδια τάξης III έχουν διαφορετική φυσιολογική δράση

από αυτήν των άλλων δύο τάξεων. Στα μόρια τάξης III, συμπεριλαμβάνονται εκκρινόμενες πρωτεΐνες με ανοσολογικές ιδιότητες, όπως πρωτεΐνες του συμπληρώματος, κυταροκίνες και πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

Τα μόρια τάξης I και τάξης II διαθέτουν μεγάλη συγγένεια μεταξύ τους και χρησιμοποιούνται για να παρουσιάσουν πεπτίδια παθογόνων, σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Σκοπός της δράσης τους είναι η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και ακολούθως η έναρξη εξειδικευμένων ανοσολογικών αντιδράσεων. Τα μόρια τάξης II αποτελούνται από τα κύρια γονίδια *HLA –DR, –DP, –DQ* στον άνθρωπο, ενώ στο ποντίκι εκφράζονται πρωτεΐνες ορθόλογες των δύο τελευταίων, *A* και *E* αντίστοιχα. Και τα δύο είδη, εκφράζουν τα λεγόμενα μη κύρια γονίδια, *HLA –DM, –DO* στον άνθρωπο και *M* και *O* στο ποντίκι (Εικόνα 7).

Η βασική λειτουργία των κύριων γονιδίων είναι να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα. Ο ρόλος των μη κύριων γονιδίων είναι βοηθητικός και περιορίζεται στην εξασφάλιση της παρουσίας αντιγόνων από τα κύρια μόρια με υψηλή συγγένεια. Επιπλέον, στην περιοχή εκφράζονται συστάδες γονιδίων που



Εικόνα 7. Απεικόνιση όλων των MHC II γονιδίων στον άνθρωπο και στο ποντίκι [60].

εμπλέκονται στη διαδικασία αντιγονικής παρουσίασης και κωδικοποιούν για τις μεταφορικές πρωτεΐνες TAP και συστατικά του πρωτεασώματος που επάγονται από την IFN γ [60]. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ετεροδιμερών μεμβρανικών πρωτεϊνών, που

αποτελούνται από διαφορετικούς συνδυασμούς α και β αλυσίδων. Οι συνδυασμοί αυτοί, είναι σε θέση να παρουσιάζουν με μεγάλη συγγένεια ένα πολύ μεγάλο εύρος διαφορετικών πεπτιδίων. Τα μόρια τάξης II εκφράζονται στην επιφάνεια επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά, μακροφάγα), ενώ είναι δυνατό να επαχθούν σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων, μετά από επίδραση με IFN γ .

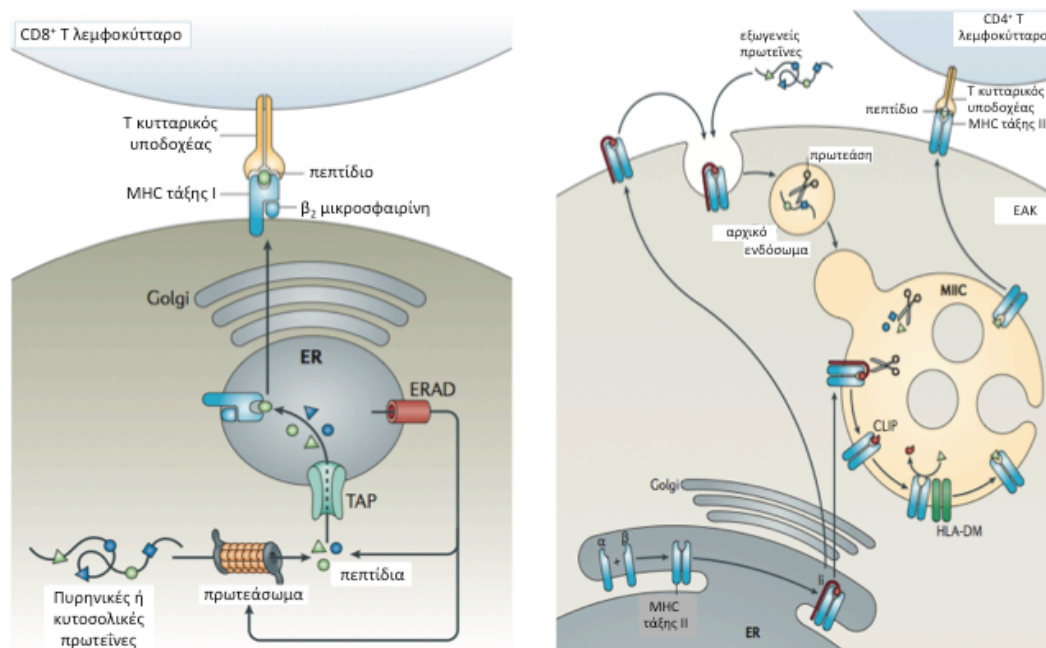
Τα μόρια τάξης I αποτελούνται από τα κλασικά γονίδια Ia (HLA-A, -B, -C) και τα μη κλασικά γονίδια Ib (HLA -D, -E, -F and -G). Ο συνδυασμός τους έχει ως αποτέλεσμα, τη δημιουργία ετεροδιμερών μορίων που αποτελούνται από δύο αλυσίδες, την α και την β 2 ανοσοσφαιρίνη. Τα μόρια αυτά εκφράζονται και συναντώνται σε όλους τους τύπους κυττάρων.

1.4.2. Αντιγονική παρουσίαση από τα μόρια MHC

Η επίκτητη ή προσαρμοστική γραμμή άμυνας του οργανισμού (*adaptive immune response*) περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ειδικού τύπου κυττάρων-λεμφοκυττάρων, με σκοπό να εξαλείψουν ειδικά το παθογόνο. Τα T-λεμφοκύτταρα είναι ικανά να αναγνωρίσουν "προβληματικές" πρωτεΐνες, μόνο στην επιφάνεια των κυττάρων και όχι στο εσωτερικό τους. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν τα συστήματα αντιγονικής παρουσίασης, που απαρτίζονται από τα μόρια MHC [61]. Τμήματα των πρωτεϊνών αυτών, παρουσιάζονται από τα μόρια MHC και λειτουργούν ως «σημαίες» για την εμφάνιση μόλυνσης ή μεταλλαγής των κυττάρων.

Τα μόρια τάξης I και τάξης II, παρουσιάζουν πεπτίδια που προέρχονται από διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Τα μόρια MHC τάξης I είναι ειδικευμένα σε

πεπτίδια πρωτεϊνών που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται στο κύτταρο ή εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 8**). Η αναγνώρισή τους από τους T κυτταρικούς υποδοχείς επιτρέπει στα κυτταροτοξικά CD8⁺ T λεμφοκύτταρα να ενεργοποιηθούν και να εστιάσουν τη δράση τους σε κύτταρα τα οποία έχουν πιθανότητα να βλάψουν το υπόλοιπο σώμα, είτε μέσω απελευθέρωσης μολυσματικών οργανισμών, είτε από ογκογόνα αύξηση [62].



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας αντιγονικής παρουσίασης από τα μόρια MHC τάξης I και τάξης II (Τροποποίηση από [62]).

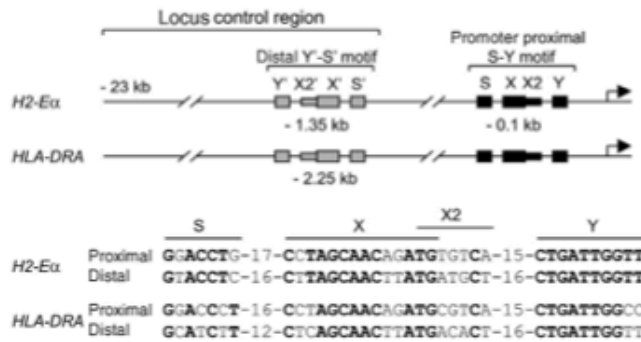
Αντιθέτως, τα μόρια τάξης II συνδέονται και παρουσιάζουν πεπτίδια, τα οποία βρίσκονται στο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης και προέρχονται από εξωγενείς πρωτεϊνικές πηγές (**Εικόνα 8**). Η αναγνώριση των πεπτιδίων από τους κυτταρικούς υποδοχείς των ρυθμιστικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων οδηγεί στην ενεργοποίηση των τελευταίων, χωρίς να απαιτείται η άμεση αλληλεπίδρασή τους με το μολυσματικό κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, το ετεροδιμερές μόριο τάξης II, σχηματίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και εκεί, συνδέεται με την βοηθητική αλυσίδα Ii. Η σύνδεση αυτή, εξασφαλίζει την παρουσίαση αντιγόνων με μεγάλη αχιστεία στα T λεμφοκύτταρα και κατ' επέκταση τη μείωση των πιθανοτήτων παρουσίασης εαυτών αντιγόνων. Το σύμπλοκο MHC-Ii στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω του συμπλέγματος

Golgi στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου ή απευθείας στο όψιμο ενδόσωμα MIIIC (MHC class II Compartment). Από την άλλη πλευρά, εξωκυττάρια παθογόνες πρωτεΐνες, ενδοκυτταρώνονται και υφίστανται πρωτεϊνική αποικοδόμηση από πρωτεάσες στα πρώιμα ενδοσώματα. Από εκεί τα πεπτίδια μεταφέρονται στο όψιμο ενδόσωμα MIIIC. Πρωτεϊνική αποικοδόμηση υφίσταται επίσης και η αλυσίδα Ii, αφήνοντας τελικά προσδεδεμένο στην αύλακα σύνδεσης πεπτιδίου του μορίου MHC II, μόνο ένα μικρό πρωτεϊνικό τμήμα που ονομάζεται CLIP. Τελικά το τμήμα CLIP θα αντικατασταθεί με ένα πεπτίδιο ως προς παρουσίαση με τη συμμετοχή του βοηθητικού τάξης II αλληλομόρφου HLA-DM και θα μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη προκειμένου να ενεργοποιήσει ένα CD4⁺ T λεμφοκύτταρο [62].

1.4.3. Μεταγραφική ρύθμιση των μορίων MHC τάξης II

Τα μόρια MHC II εκφράζονται ιδιοστατικά στην επιφάνεια των επαγγελματιών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (*Professional Antigen Presenting cells, APCs*). Στη συγκεκριμένη κατηγορία κυττάρων εντάσσονται τα δενδριτικά, τα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα. Επίσης είναι δυνατόν να επαχθούν σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων, μετά από επίδραση με IFN γ . Η έκφραση των μορίων αυτών ρυθμίζεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο. Ο υποκινητής των αντίστοιχων γονιδίων αποτελείται από ένα συμπαγές, εξαιρετικά συντηρημένο και πολυπαραγοντικό μοτίβο, το οποίο περιέχει τέσσερις cis-δρώσες περιοχές. Οι περιοχές αυτές εδράζονται 150-300 ζεύγη βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής και ονομάζονται κουτιά (*boxes*) W/Z/S, X1, X2 και Y (**εικόνα 9**). Εκτός από τους υποκινητές των κλασικών τάξης II γονιδίων, το μοτίβο αυτό εντοπίζεται και στους υποκινητές των γονιδίων Ii και HLA-DM, επιτρέποντας έτσι τη συντονισμένη ρύθμιση του συνόλου των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αντιγονική παρουσίαση [63].

Στις ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή, εκτός της προαναφερθείσας πολύ καλά μελετημένης, εγγυς περιοχής (*proximal promoter region*), περίπου 2000 ζεύγη βάσεων ανοδικά υπάρχει και μια απομακρυσμένη περιοχή (*distal promoter region*) (**εικόνα 9**). Η εν λόγω περιοχή είναι συντηρημένη τόσο στο ποντίκι [64] όσο και στον άνθρωπο [65]. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν τα ίδια κουτιά (συμβολίζονται με S',



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση των συντηρημένων αλληλουχιών του υποκινητή των MHC II στο ποντίκι και στον άνθρωπο (τροποποίηση από [181]).

X1', X2' και Y'), με αντίστροφη όμως διαμόρφωση. Η περιοχή αυτή που ονομάζεται και LCR (*Locus Control Region*), είναι δυναμική και λειτουργική καθώς προσελκύονται σε

αυτήν τόσο ο παράγοντας RFX όσο και ο CIITA, ενώ η χρωματίνη

αναδιαμορφώνεται και

ακετυλιώνεται.

Σε όλες τις cis-δρώσες περιοχές προσδένονται σύμπλοκα μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία ανακαλύφθηκαν μελετώντας B λεμφοκύτταρα ασθενών με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (*severe combined immunodeficiency, SCID*). Στο κουτί X1, προσδένεται το ετεροτριμερές σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων RFX (RFXANK, RFX5, RFXAP). Η ανακάλυψη του συμπλόκου αυτού προήλθε από συγκριτική μελέτη φυσιολογικών B λεμφοκυττάρων και των ομάδων B,C και D του συνδρόμου BLS (*bare lymphocyte syndrome*, σύνδρομο γυμνών λεμφοκυττάρων) [66]. Ο πιο σημαντικός παράγοντας του συμπλόκου, είναι μια πρωτεΐνη 75 kDa που ονομάζεται RFX5. Έλλειψη έκφρασης του RFX5 οδηγεί σε σοβαρή ανοσοανεπάρκεια και η εισαγωγή της εξωγενούς, είναι ικανή να επαναφέρει το φυσιολογικό φαινότυπο τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο [67]. Επιπροσθέτως, ο RFX5 αλληλεπιδρά με τον CREB (*Cyclic-AMP Response Element Binding protein*), έναν μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται στο κουτί X2, και η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ενός λειτουργικού ενισχυοσώματος. Ο CREB απομονώθηκε αρχικά από το σπυρτί ποντικού, έχοντας την ικανότητα να ενεργοποιεί το γονίδιο της σωματοστατίνης σε απόκριση στο κυκλικό AMP. Η φωσφορυλίωση του στη σερίνη 119 του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή CBP. Ο CBP αλληλεπιδρά με μόρια της μεταγραφικής μηχανής, και την ενεργοποιεί αναδιαμορφώνοντας τη χρωματίνη. [68].

Στο κουτί Y (μοτίβο CCAAT), προσδένεται το ετεροτριμερές σύμπλοκο των πρωτεϊνών NF-Y (NF-YA, NF-YB και NF-YC). Το μοτίβο CCAAT απαντάται με μεγάλη συχνότητα στους υποκινητές των ευκαρυωτικών οργανισμών και κυρίως συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η πρόσδεσή του NF-Y στην περιοχή αυτή, πρωτο-ανακαλύφθηκε όταν συνθετικά αντισώματα εναντίων διαφόρων επιτόπων του NF-Y, μπλόκαραν την έκφραση των μορίων τάξης II [69]. Το σύμπλοκο NF-Y διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο όχι μόνο στη μεταγραφική δραστηριότητα του γενετικού τύπου MHC, αλλά και στον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων και στην ανάπτυξη [70].

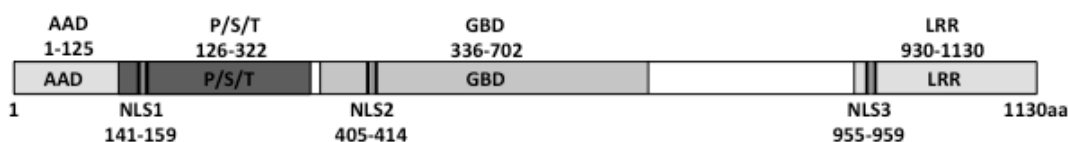
Παρόλη την εκτεταμένη μελέτη από πολλές ερευνητικές ομάδες, τα μόρια που προσδέονται στο κουτί W/Z/S παραμένουν άγνωστα. Μελέτη του 1996 υποστηρίζει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας RFX5 του συμπλόκου RFX προσδένεται πέραν του X1 και στο κουτί S [71]. Παρόλα αυτά τα παραπάνω ευρήματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί. Ωστόσο η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του CIITA στο ενισχυόσωμα και την μεταγραφή των μορίων MHC II. Επίσης η απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών X και W/Z/S είναι κρίσιμη, καθώς αλλαγές έστω και 1-2 ζευγών βάσεων, έχουν ως αποτέλεσμα την μη αποτελεσματική πρόσδεση του CIITA και τη μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα [72].

Η πρόσδεση όλων των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων, στις συντηρημένες cis-δρώσες ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή των μορίων MHC II, σχηματίζουν ένα σταθερό νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται MHCII ενισχυόσωμα. Παρόλο που ο σχηματισμός του MHCII ενισχυοσώματος είναι απαραίτητος δεν είναι ικανός να ξεκινήσει τη μεταγραφή. Η μεταγραφή θα ξεκινήσει μόνο όταν προσελκυθεί ο κύριος συνενεργοποιητής των μορίων MHC II, CIITA.

1.4.4. Ο κύριος ρυθμιστής των μορίων MHC τάξης II - CIITA

Ο παράγοντας CIITA, ανακαλύφθηκε το 1993, στη βάση της ικανότητάς του να επαναφέρει την έκφραση των μορίων MHC II σε B λεμφοκύτταρα (R.2.2.5), τα οποία είχαν απομονωθεί από ασθενείς με το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS) [73]. Είναι μια πρωτεΐνη 1130 αμινοξέων, η οποία διαθέτει τέσσερις κύριες ρυθμιστικές περιοχές και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που [74] **(Εικόνα 10)**.

Η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (AAD-Acidic Activation Domain) εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (N-terminal), και είναι πλούσια σε όξινα αμινοξέα. Είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες, όπως παράγοντες της γενικής μεταγραφικής μηχανής, ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και άλλους ρυθμιστικούς συνενεργοποιητές. Ακολουθεί μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, σερίνης και θρεονίνης (P/S/T domain) η οποία υφίσταται πολλαπλές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλιώσεις, ακετυλιώσεις, μόνο και πολυ-ουβικιτινιλιώσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές ρυθμίζουν την ενεργότητα και σταθερότητα της πρωτεΐνης. Πιο κάτω βρίσκεται η περιοχή GBD (GTP Binding Domain), η οποία προσδένει αλλά δεν υδρολύει GTP *in vitro*, και έχει έναν ιδιαίτερο ρόλο στην ανώτερη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Στο καβροξυτελικό άκρο εντοπίζονται τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις αμινοξέων πλούσιες σε λευκίνη (*Leukine Rich Regions, LRR*). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την σωστή κατανομή της πρωτεΐνης καθώς και για την αλληλεπίδρασή της με τους μεταγραφικούς παράγοντες του ενισχυοσώματος. Η πρωτεΐνη διαθέτει τρεις αλληλουχίες εισόδου στον πυρήνα (NLS- Nuclear Localization Signals) και τρεις αλληλουχίες εξόδου από τον πυρήνα (*Nuclear Export Signals, NES*) [75], [76], [77].



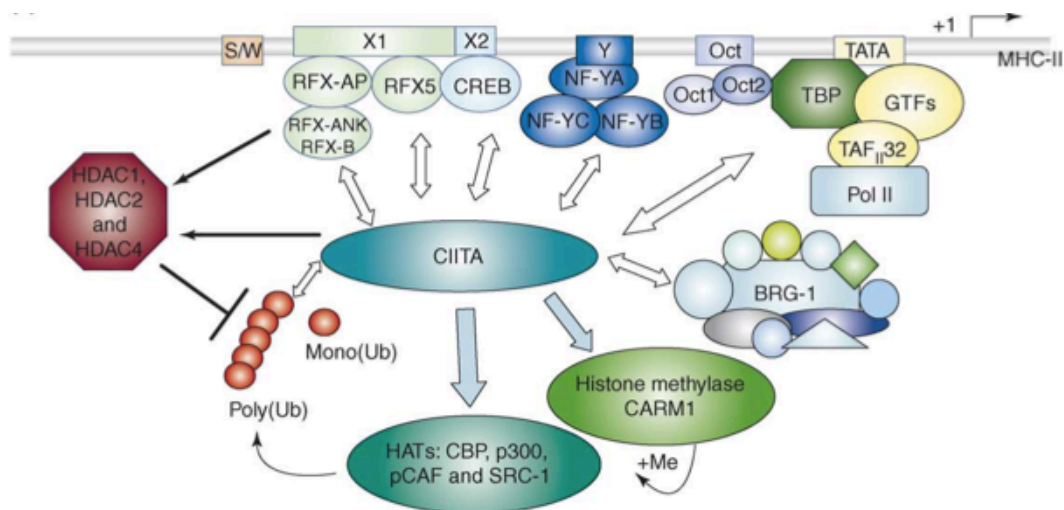
Εικόνα 10. Απεικονίζεται η τρίτη ισομορφή της πρωτεΐνης CIITA, η οποία εκφράζεται στα Β-λεμφοκύτταρα. Η πρωτεΐνη διαθέτει διακριτές ρυθμιστικές περιοχές για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, για την μετα-μεταφραστική τροποποίηση του μορίου, για τη μεταγραφική ενεργότητα, καθώς και την μετακίνησή της εντός και εκτός του πυρήνα (τροποποίηση από[75]).

1.4.5. Μεταγραφική ενεργοποίηση των μορίων MHC τάξης II

Όπως προαναφέρθηκε, η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή των μορίων τάξης II είναι ιδιοστατική σχηματίζοντας το MHCII ενισχυόσωμα. Η μεταγραφή ξεκινά με την στρατολόγηση του CIITA, ο οποίος

αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες του ενισχυοσώματος, αλλά δεν προσδένεται στο DNA. Δρα ως συν-ενεργοποιητής, προσελκύνοντας μόρια, που αλληλεπιδρούν τόσο με τη βασική μεταγραφική μηχανή, όσο και με την αναδιαμόρφωση της χρωματινικής δομής. Τα κύρια γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά την πρόσδεση του CIITA στο ενισχυόσωμα περιγράφονται εν συντομία στην επόμενη παράγραφο.

Ένας από τους μοριακούς μηχανισμούς με τον οποίο ο CIITA ρυθμίζει τη μεταγραφή των μορίων MHC II, είναι μέσω της στρατολόγησης παραγόντων που ακετυλιώνουν τις ιστόνες (*Histone Acetyltransferases, HATs*). Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι CBP, p300, pCAF και SRC-1 [78]. Επίσης η περιοχή ενεργοποίησης AAD του CIITA, είναι απαραίτητη για την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 στον υποκινητή των μορίων MHC II [79]. Ένα ακόμη σημαντικό μόριο που στρατολογείται μέσω του CIITA είναι η μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης PRMT4, η οποία οδηγεί σε μεθυλίωση της ιστόνης 3, στο κατάλοιπο της αργινίνης 17 [80]. Εκτός από πρωτεΐνες που τροποποιούν τις ιστόνες, σύμπλοκα που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη, όπως το BRG-1 (*Brahma related gene*), συμβάλλουν επίσης στη ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC II. Το σύμπλοκο BRG-1 αλληλεπιδρά με τον CIITA και τον RFXAP και η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφής [81]. Ο CIITA αλληλεπιδρά επίσης και με συστατικά της βασικής μεταγραφικής μηχανής όπως TFIID, TFIIB, P-TEFb, TAF32, TAF70 και TBP [82] (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Επιγενετικά γεγονότα που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των μορίων τάξης II.
Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού MHC II υποκινητή στην οποία διακρίνονται όλοι οι

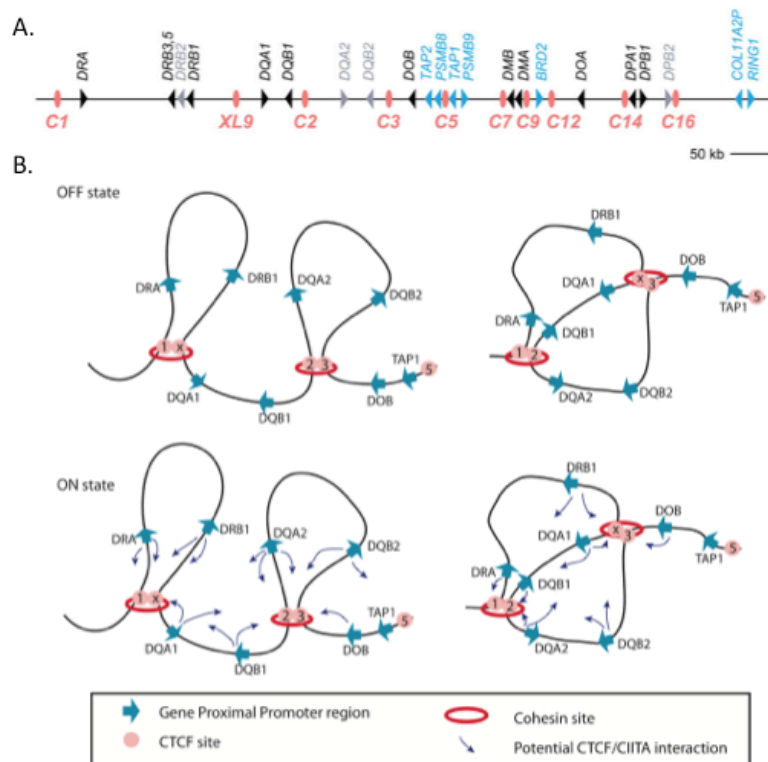
απαραίτητοι μεταγραφικοί παράγοντες. Για την έναρξη της μεταγραφής απαιτούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στο DNA, πρωτεϊνών που τροποποιούν τις ιστόνες, και συμπλόκων της βασικής μεταγραφικής μηχανής (τροποποίηση από [78]).

1.4.6. Ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II μέσω μεγάλου εύρους χρωματινικών αλληλεπιδράσεων

Στις προηγούμενες παραγράφους, έγινε αντιληπτό ότι η ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC II στο επίπεδο του κάθε υποκινητή είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Πρόσφατα στους παραπάνω μηχανισμούς ήρθε να προστεθεί και η εμπλοκή της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης. Ιστορικά, η ιδέα προήλθε από την ανακάλυψη απομακρυσμένων *cis*-δρώντων συντηρημένων περιοχών (όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.4.2.), οι οποίες λειτουργούν ως LCRs και συμβάλλουν στην σωστή μεταγραφική έκφραση. Έτσι, η βιοπληροφορική ανάλυση της ευρύτερης χρωμοσωμικής επικράτειας στην οποία εδράζονται τα μόρια MHC II, αποκάλυψε την ύπαρξη συντηρημένων αλληλουχιών X και Y, και σε περιοχές εκτός των υποκινητών των γονιδίων. Αρχικά το ενδιαφέρον στράφηκε στην αλληλουχία XL9, που εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή μεταξύ των γονιδίων *HLA-DRB1* και *HLA-DQA1*. Χαρακτηριστικό της ήταν ο υψηλός βαθμός ακετυλίωσης των ιστονών, ένα χαρακτηριστικό της προσβάσιμης χρωματίνης, χωρίς όμως να προσελκύεται εκεί ο CIITA [83]. Στη συγκεκριμένη περιοχή βρέθηκε, να προσδένεται ο CTCF, ένας μεταγραφικός μονωτής (*insulator element*). Ο CTCF έχει πάνω από 13.000 θέσεις πρόσδεσης στα ανθρώπινα κύτταρα. Η παρουσία του σταματά την εξάπλωση της ετεροχρωματίνης από μια περιοχή, σε γειτονικές περιοχές όπου υπάρχουν ενεργά γονίδια, γι αυτό και ονομάζεται μονωτής [84]. Η πρόσδεση του CTCF στην αλληλουχία XL9 έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και την αλληλεπίδραση της περιοχής με τους υποκινητές των γονιδίων *HLA-DRB1* και *HLA-DQA1* και τον CIITA, καθώς και το πυρηνικό σώμα (*nuclear matrix*). Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ανεξάρτητη ρύθμιση της έκφρασης αυτών των γονιδίων [85].

Τα χρόνια που ακολούθησαν ανακαλύφθηκαν συνολικά 10 θέσεις πρόσδεσης CTCF στην χρωμοσωμική επικράτεια των μορίων τάξης II (**Εικόνα 12 Α**). Όλες οι περιοχές είναι λειτουργικές και δημιουργούν θηλιές χρωματίνης, φέρνοντας τις

περιοχές πρόσδεσης του CTCF κοντά στους υποκινητές των γονιδίων MHC II πάντα σε συνεργασία με τον CIITA [86] (**Εικόνα 12 B**). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι απαραίτητες για τη μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση των αλληλομόρφων MHC II.



Εικόνα 12. Μονωτές και μεγάλης εύρους χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις εξαρτώμενες από τον CTCF, στην επικράτεια των μορίων MHC II. (A) Σχετική θέση των 10 περιοχών πρόσδεσης του CTCF που διαχωρίζουν τις γενετικές θέσεις των αλληλομόρφων MHC II. [87]. (B) Σχηματική αναπαράσταση των πολλαπλών χρωματινικών αρχιτεκτονικών δομών που μπορούν να σχηματίσει ο CTCF με τους υποκινητές των γονιδίων MHC II. [86].

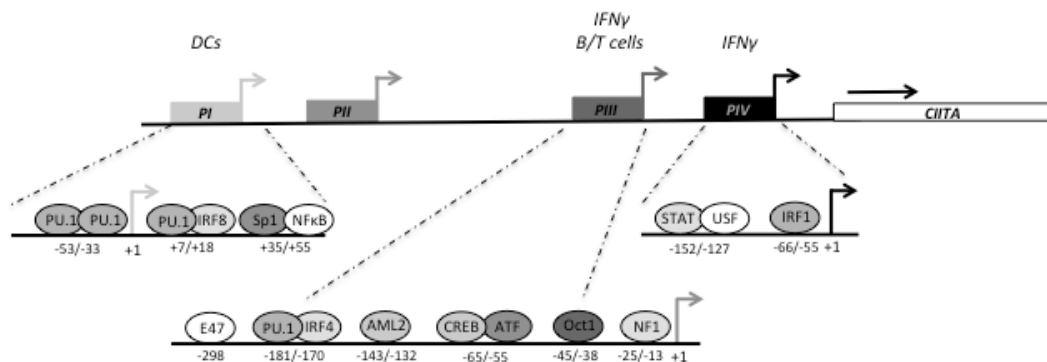
1.5. Ρύθμιση και έκφραση του CIITA

1.5.1. Μεταγραφική ρύθμιση του CIITA

Ο γονιδιακός τόπος που είναι υπεύθυνος για την έκφραση του CIITA ονομάζεται *MHC2TA* στον άνθρωπο και *Mhc2ta* στο ποντίκι και εδράζεται στο χρωμόσωμα 16. Ως κύριος ρυθμιστής της έκφρασης των μορίων MHC II δεν προκαλεί εντύπωση το γεγονός, ότι και ο ίδιος ο CIITA ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα. Για την έκφρασή του είναι υπεύθυνοι τέσσερις κυτταρο- και ιστο-ειδικοί υποκινητές

(**Εικόνα 13**). Ο πρώτος υποκινητής (pI) είναι ενεργός σε δενδριτικά και μακροφάγα κύτταρα, ο τρίτος (pIII) σε B και T λεμφοκύτταρα ενώ μπορεί να επάγεται και από IFN γ , ο τέταρτος (pIV) είναι αποκλειστικά επαγόμενος από IFN γ , ενώ ο δεύτερος (pII) δεν είναι πολύ καλά μελετημένος και απουσιάζει στο ποντίκι [88].

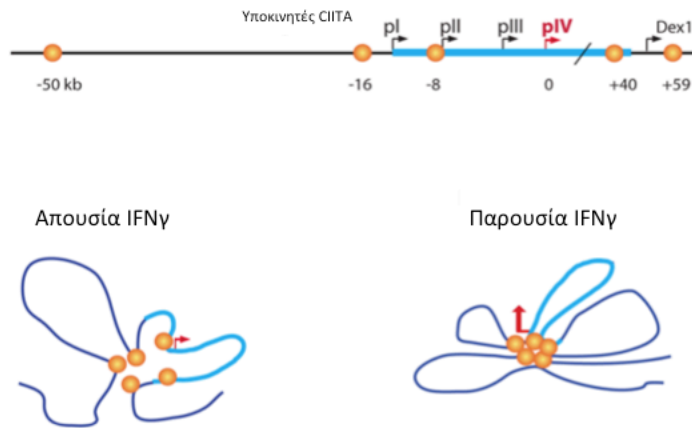
Διαφορετικές οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, προσδένονται σε κάθε υποκινητή με αποτέλεσμα την παραγωγή τεσσάρων CIITA πρωτεϊνών, οι οποίες διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο [89] (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της γενομικής περιοχής στην οποία εδράζονται οι τέσσερις υποκινητές του *MHC2TA*. Στο σχήμα φαίνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται και ρυθμίζουν καθέναν από τους υποκινητές (τροποποίηση από [89]).

Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός του υποκινητή, ο μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης του CIITA από την IFN γ , εμπλέκει τουλάχιστον πέντε απομακρυσμένους ενισχυτές, οι οποίοι προσδένουν BRG1 και συμβάλλουν συνεργατικά, στη δημιουργία μιας περίπλοκης και δυναμικής, τριτοταγούς χρωματινικής δομής [90]. Απουσία IFN γ , οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των ενισχυτών και του pIV είναι ασθενικές ή παροδικές. Η παρουσία της IFN γ σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενισχυτών και του pIV, οδηγώντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή, σε τροποποιήσεις ιστονών, και στη προσβασιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων STAT1, IRF1 και p300, γεγονότα που είναι όλα απαραίτητα για την έκφραση του CIITA και συντονίζονται από τον παράγοντα BRG1 (**Εικόνα 14**) [91].

Γονιδιακή επικράτεια του CIITA



Εικόνα 14. Ο γενετικός τόπος του CIITA στον οποίο συμπεριλαμβάνονται οι τέσσερις υποκινητές του. Με γαλάζιο χρώμα φαίνεται το γονίδιο του CIITA, ενώ με πορτοκαλί οι ενισχυτές οι οποίοι προσδένουν BRG1 (Τροποποίηση απο [91]).

Κεφάλαιο Γ

1.6. Στόχοι της IFNγ ανεξάρτητοι των μορίων MHC τάξης II

Όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, το πιο γνωστό και καλά μελετημένο μονοπάτι στο οποίο σημαντικός τελεστής είναι η IFNγ, είναι αυτό που τελικά οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC II, και στην ενεργοποίηση των T-λεφοκυττάρων. Ωστόσο ολοένα και περισσότερες μελέτες υποδηλώνουν την συμμετοχή αυτής της κυτταροκίνης σε ένα ευρύτερο φάσμα λειτουργιών πολλών συστημάτων του οργανισμού. Οι λειτουργίες αυτές είναι φαινομενικά ανεξάρτητες της ενεργοποίησης των T-λεφοκυττάρων.

Ένα παράδειγμα αποτελεί η δράση της στην παθογένεση συνδρόμων του μυελού των οστών. Είναι γνωστό ότι η IFNγ αποτελεί καταστολέα της φυσιολογικής αιμοποίησης, καθώς επιδρά αρνητικά στα πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Τη δράση της αυτή, την εξασκεί μέσω επαγωγής του μονοπατιού p38/MAPK-2 [92]. Πολύ σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος της IFNγ σε καρδιαγγειακές παθήσεις καθώς μπορεί να οδηγήσει σε υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυικών κυττάρων της περιοχής, μέσω επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων *Nox1* και *Nox4*. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής επιτυγχάνεται μετά απο άμεσης πρόσδεσης του

pSTAT1 στα στοιχεία GAS των αντίστοιχων υποκινητών αυτών των γονιδίων, οδηγώντας έτσι στην δημιουργία οξειδωτικού στρες [93].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 1.1.5), η IFN γ αποτελεί ένα μόριο η έκφραση του οποίου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων, με μηχανισμούς που δεν είναι γνωστοί. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση του CIITA, κύριου στόχου του μονοπατιού της IFN γ , έχει βρεθεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση μορίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην συναπτική λειτουργία και την καθοδήγηση των στόχων των νευρικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα επάγει την έκφραση του γονιδίου της Plexin A1, κύριου υποδοχέα των σεμαφορινών (*semaphorin receptor*) σε δονδινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο ισχυρής ανοσολογικής σύναψης [94].

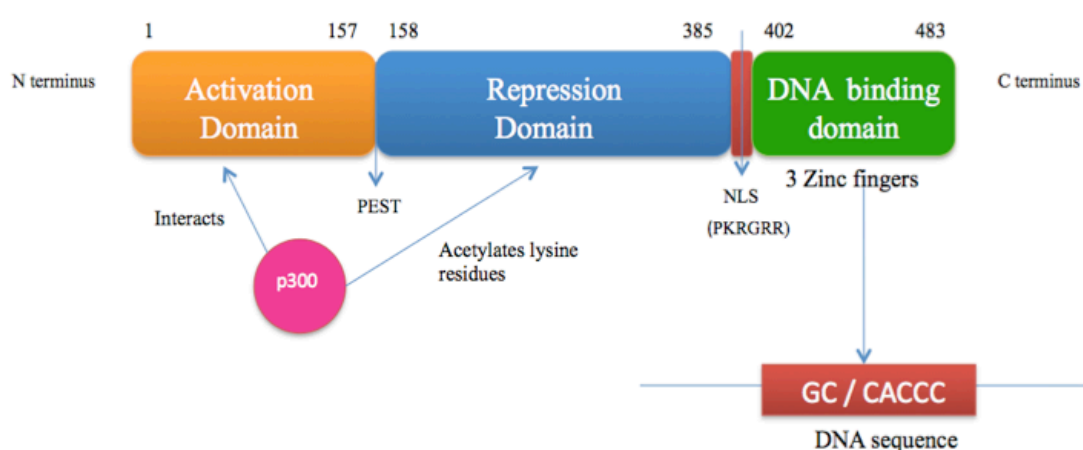
Η ιδιότητά της IFN γ να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε κάποιους τύπους καρκίνων έχει συνδεθεί με την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 [95], μέσω άμεσης πρόσδεσης του μορίου pSTAT1 στο GAS στοιχείο του υποκινητή αυτού του γονιδίου [96]. Ο παράγοντας αυτός συμμετέχει σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών, η φλεγμονή, η ογκογένεση και η απόπτωση. Είναι επίσης, καθοριστικής σημασίας η εμπλοκή του στην επαναπρογραμματισμό (*reprogramming*) των σωματικών κυττάρων και τη διατήρηση της πολυδυναμίας τους. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι παθογόνα μυκοβακτήρια μέσω ενός μηχανισμού που ελέγχεται από το μονοπάτι TLR2 (*Toll-like receptor*)/ iNOS (*inducible nitric-oxide synthase*), μπορούν να επάγουν την πρόσδεση του KLF4 στον υποκινητή του CIITA ο οποίος με τη σειρά του επιφέρει επιγενετικές μεταβολές, στρατολογώντας την πρωτεΐνη EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), μια μεθυλοτρανσφεράση ιστονών. Ο παράγοντας KLF4 ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον για τα ερωτήματα της παρούσας διατριβής, και ερευνήθηκε περαιτέρω.

1.7. Ο πολυλειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας KLF4

Ο KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα με δακτυλίους ψευδαργύρου (*zinc finger*) και εκφράζεται σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών ιστών στα θηλαστικά. Ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη

φορά στο ποντίκι το 1996 από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες. Τότε έλαβε τη διπλή ονομασία GKLF4 (*gut enriched kruppel like factor*), λόγω υψηλής του έκφρασης στο έντερο [97] και EZF (*epithelial zinc finger*), λόγω υψηλής του έκφρασης σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος [98]. Ακολούθησε η ταυτοποίηση του ανθρώπινου KLF4 από μια cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων [99]. Αργότερα μετονομάστηκε σε KLF4 αφού βρέθηκε να εκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς όπως στον πνεύμονα, στους όρχεις, στο θύμο αδένα, σε καρδιακά μονοκύτταρα, σε λεμφοκύτταρα και στον κερατοειδή χιτώνα.

Ο γονιδιακός τόπος που είναι υπεύθυνος για την έκφρασή του εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 για τον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 5 για το ποντίκι. Το γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια και το μέγεθος του μεταγράφου είναι περίπου 3.5 kb. Η μετάφραση του mRNA οδηγεί στη παραγωγή μιας πρωτεΐνης 470 αμινοξέων και μεγέθους περίπου 50 kDa. Οι λειτουργικές περιοχές περιλαμβάνουν μια περιοχή ενεργοποίησης στο αμινοτελικό μεγέθους 157 αμινοξέων η οποία, ακολουθείται από μια κατασταλτική περιοχή που καταλαμβάνει τα αμινοξέα 158-385, και μια αλληλουχία εισόδου στον πυρήνα (NLS), στα αμινοξέα 386-401. Στα τελευταία 402-483 αμινοξικά κατάλοιπα βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA που χαρακτηρίζεται από τρεις δακτυλίους ψευδαργύρου [100] (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15. Η δομή της πρωτεΐνης KLF4. Διακρίνονται η περιοχή ενεργοποίησης (*Activation Domain, AD*), η κατασταλτική περιοχή (*Repression Domain, RD*) στην οποία περιέχονται δύο σημαντικά κατάλοιπα λυσίνης, K225 και K229. Αυτά τα δύο κατάλοιπα ακετυλιώνονται από τον CBP/p300 ο οποίος αλληλεπιδρά με την περιοχή ενεργοποίησης. Μεταξύ των περιοχών

AD και RD βρίσκεται μια αλληλουχία PEST η οποία σχετίζεται με πρωτεΐνες που έχουν μικρό χρόνο ζωής. Στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD) η οποία χαρακτηρίζεται από τρεις δακτυλίους ψευδαργύρου και αναγνωρίζει την αλληλουχία GC/CACCC. Η πρωτεΐνη διαθέτει επίσης ένα σήμα εισόδου στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal, NLS) [100].

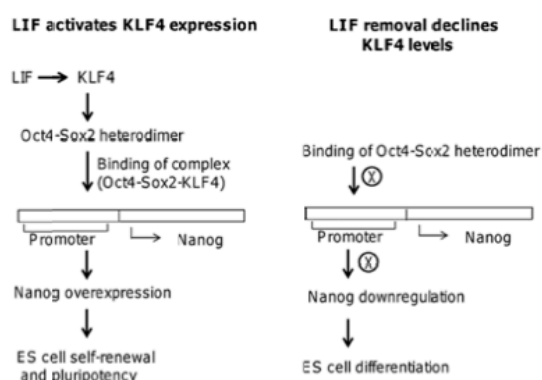
1.7.1. Ο ρόλος του KLF4 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Αρκετές επιστημονικές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η έκφραση του σε πολλές κυτταρικές σειρές σχετίζεται άμεσα με συνθήκες που μειώνουν τον πολλαπλασιασμό, όπως η καταστροφή του DNA (DNA damage), η απομάκρυνση του ορού (serum deprivation) και η αναστολή του πολλαπλασιασμού λόγω επαφής των κυττάρων (contact inhibition). Κατά τη διάρκεια καταστροφής του DNA ο p53 σταθεροποιεί τον KLF4, ο οποίος στη συνέχεια επάγει το p21 μέσω άμεσης πρόσδεσης στον υποκινητή του [101]. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο ο KLF4 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, είναι μέσω καταστολής των κυκλινών D1 και B, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόοδο των φάσεων του κυτταρικού κύκλου G1-S και G2-M, αντιστοίχως. Απο τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι ο KLF4 δρα ως παράγοντας μείωσης του πολλαπλασιασμού σε μία πλειάδα κυτταρικών σειρών, μέσω διαφορετικών μηχανισμών, οι οποίοι έχουν να κάνουν με τον έλεγχο της πορείας των κυττάρων σε διάφορα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου [102].

1.7.2. Εμπλοκή του KLF4 στον επαναπρογραμματισμό κυττάρων

Ένας από τους λόγους για τους οποίους ο KLF4 έγινε ευρέως γνωστός τα τελευταία χρόνια είναι λόγω του ρόλου του στον επαναπρογραμματισμό τελικά διαφοροποιημένων κυττάρων, σε μια κατάσταση πολυδυναμίας που προσομοιάζει με αυτή των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Η υπερέκφραση ενός συνδυασμού μεταγραφικών παραγόντων που αποτελείται από τους Oct4, Sox2, KLF4 και Myc (Yamanaka's cocktail) οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων [103]. Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των

αρχικών σταδίων της εμβρυικής διαφοροποίησης και στη διατήρηση της πολυδυναμίας των κυττάρων, δρώντας συνεργατικά με τον Sox2 για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ένας ακόμη παράγοντας κλειδί για την διατήρηση του δυναμικού της πολυδυναμίας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, και τον επαναπρογραμματισμένων σωματικών κυττάρων είναι το Nanog. Ο KLF4 δρά ανοδικά του Nanog . Δημιουργεί ένα σύμπλοκο με τους παράγοντες Oct4 και Sox2 το οποίο επάγει την έκφραση του Nanog, αποτρέποντας έτσι τη διαφοροποίηση των κυττάρων και διατηρώντας την κατάσταση πολυδυναμίας τους [102] (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16. Ο ρόλος του KLF4 στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων. Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ των KLF4, Sox2 και Oct4 παρουσία LIF, οδηγεί στην επαγωγή του Nanog, με αποτέλεσμα τη διατήρηση του δυναμικού αυτο-ανανέωσης και πολυδυναμίας των

κυττάρων[102].

1.7.3. Η σχέση του KLF4 με τις νεοπλασίες

Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 στην καρκινογένεση είναι διττός και συνδέεται άμεσα με το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο απαντάται. Βάση αυτού μπορεί να δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο ή ως ογκογονίδιο. Από τη μια πλευρά σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος κυττάρων η δράση του είναι ευεργετική καθώς η εξάλειψη της έκφρασής του οδηγεί σε δημιουργία όγκων, όπως του παγκρέατος, του γαστροοισοφαγικού, των πνευμόνων και του μυελού των οστών. Επίσης σε μια μεγάλη κατηγορία καρκινικών τύπων, όπως του παχέος εντέρου, του αίματος, του στομάχου και του προστάτη, η έκφραση του KLF4 βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της επίδρασης του KLF4 στους τύπους των καρκινικών κυττάρων που αναφέρθηκαν είναι η ικανότητά του να καταστέλλει το φαινόμενο της Επιθηλιακής προς Μεσεγχυματική Μετατροπής των κυττάρων (*Epithelial to Mesenchymal Transition ,EMT*).

Από την άλλη πλευρά, ο KLF4 μπορεί να δρα και ως ογκογονίδιο καθώς η έκφρασή του μπορεί να οδηγεί στη δημιουργία όγκων. Οι τύποι των κυττάρων στους οποίους η δράση του KLF4 είναι ογκογόνος, είναι αυτοί του λάρυγγα, του δέρματος, των κερατινοκυττάρων και του καρκίνου του μαστού. Στην τελευταία περίπτωση έχουν γίνει πολλές μελέτες. Τα υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του μαστού οδηγούν σε μαζικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αντίσταση στην απόπτωση [102],[100].



Εικόνα 17. Η υπερέκφραση του KLF4 προκαλεί πλειοτρόπικά αποτελέσματα στη βιολογία των κυττάρων. Οι επιδράσεις του KLF4 είναι άμεσα εξαρτώμενες από τον τύπο και την κατάσταση των κυττάρων [100].

2. Σκοπός της διατριβής

Σκοπό της παρούσας διατριβής αποτελεί η κατανόηση των δράσεων της IFN γ σε νευρικό περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψη τον καθοριστικό ρόλο που αυτή κατέχει στη ρύθμιση της ομοιόστασης των κυττάρων, μέσω συντονισμένης ενεργοποίησης μονοπατιών και μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος, η παρούσα μελέτη προσπαθεί να προσφέρει νέες γνώσεις σε δύο κυρίως άξονες.

Ο πρώτος άξονας αφορά την επίδρασή του μονοπατιού της IFN γ στη βιολογία του νευροβλαστώματος ενός παθοφυσιολογικού νευρικού συστήματος. Η κατανόηση των δράσεων της στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών θα αποτελέσει σταθμό στην προσπάθεια δημιουργίας νέων θεραπειών μιας νεοπλασματικής παιδικής ασθένειας του νευρικού συστήματος.

Ο δεύτερος άξονας αφορά την παράλληλη μελέτη της δράσης της IFN γ , στη βιολογία φυσιολογικών πολυδύναμων νευρικών κυττάρων. Καθώς η δράση της είναι έντονη σε παθολογικές καταστάσεις στον ενήλικα εγκέφαλο, σκοπός μας είναι η κατανόηση των επιδράσεων που η παρουσία της, θα μπορούσε να επιφέρει τόσο στις νευρογενείς περιοχές, όσο και στις λειτουργικές νευρικές συνάψεις. Τα αποτελέσματα θα βοηθήσουν στην πιο βαθιά κατανόηση της επίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος στην ενήλικη νευρογένεση.

Συμπληρωματικά η μελέτη της ενεργοποίησης των μορίων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξης II και στα δύο νευρικά συστήματα θα προσφέρει νέες γνώσεις σχετικά με τις δράσεις και το ρόλο των μορίων αυτών. Επιπροσθέτως η ανάλυση του ρόλου μιας νέας αλληλεπίδρασης μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων CIITA και KLF4 έχει σκοπό να δώσει νέες συμπληρωματικές πληροφορίες για τη ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC II.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

3.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Ο χειρισμός όλων των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (Telstar, Bio II Advance) σε ειδικό δωμάτιο κυτταροκαλλιιεργειών. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε κλίβανο κυττάρων (FORMA SCIENTIFIC), με σταθερή θερμοκρασία 37°C και 37% διοξείδιο του άνθρακα.

Πρόδρομα νευρικά κύτταρα αρουραίου (HCN)

Τα κύτταρα HCN (παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του Dr. Chichung Lie, Ινστιτούτο Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Erlangen-Nuremberg, Γερμανία) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) με συμπλήρωμα GlutaMAX™ (*ThermoFisher Scientific*, # 10566-016), εμπλουτισμένο με συμπλήρωμα B27 (*ThermoFisher Scientific*, #17504-044) και 1% αντιβιοτικό-αντιμυκοτικό (*ThermoFisher Scientific*, #15240062). Τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (Peprotech, #100-18), σε συγκέντρωση 20ng/ml, σε καλλιεργητικά τρυβλία επιστρωμένα με 50μg/ml poly-L-ornithin (*Sigma-Aldrich*, #P3655). Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS (*Biosera*, #LM-S2041/500) και η αποκόλλησή τους γινόταν με διάλυμα θρυψίνης 0,05% και 0,53mM EDTA σε PBS (*Biosera*, #LM-T1706/500).

Ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα (SH-SY5Y)

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y, αποκτήθηκε από την ATCC (#CRL-2266). Η καλλιέργειά τους πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο DMEM (*ThermoFisher Scientific*, #41966029), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός, (*Fetal Bovine Serum*, *FBS*) (*Biosera*, #FB-1001/500) και 1% αντιβιοτικό-αντιμυκοτικό (*ThermoFisher Scientific*, #15240062). Οι εκπλύσεις των κυττάρων και η αποκόλληση τους πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα (BE(2)C)

Η κυτταρική σειρά BE(2)C, αποκτήθηκε από την ATCC (#CRL-2268). Οι συνθήκες καλλιέργειας και ο χειρισμός τους έγιναν όπως και για τη σειρά SH-SY5Y.

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών (HeLa)

Η κυτταρική σειρά HeLa παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Φώτση Θεόδωρου. Η καλλιέργειά τους πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο όμοιο με αυτό των κυττάρων SH-SY5Y και BE(2)C.

3.1.2 Διαφοροποίηση κυττάρων

Διαφοροποίηση κυττάρων HCN προς τη νευρική γενεαλογία

Για τη διαφοροποίηση των κυττάρων απαιτούνται τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών (τρυβλία διαφοροποίησης), τα οποία έχουν υποστεί την ακόλουθη επεξεργασία:

Ημέρα 1: Κατάλληλη ποσότητα υποστρώματος poly-L-ornithin (*Sigma- Aldrich*, #P3655) διαλύεται σε νερό κυτταροκαλλιιεργειών (*Biosera*, #T1707), σε συγκέντρωση 50μg/ml. Σε καλλιιεργητικό τρυβλίο 60 mm προστίθενται 1.5 ml διαλύματος *poly-L-ornithin* και ακολουθεί επώαση για 12-16 ώρες (*overnight*, O/N), σε θερμοκρασία δωματίου.

Ημέρα 2: Με αντλία κενού αναρροφάται το διάλυμα poly-L-ornithin και το τρυβλίο εκπλένεται 3-5 φορές με νερό. Στη συνέχεια προστίθενται 1.5 ml διαλύματος λαμινίνης (*Sigma-Aldrich*, #L2020), συγκέντρωσης 20 μg/ml σε PBS, και το τρυβλίο επωάζεται O/N στους 37 °C.

Ημέρα 3: Το διάλυμα λαμινίνης αφαιρείται και τα τρυβλία διαφοροποίησης είναι έτοιμα προς χρήση. Εναλλακτικά φυλάσσονται στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία διαφοροποίησης (20.000 κύτταρα/ 60mm τρυβλίο), στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. 24 ώρες αργότερα, το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αφαιρείται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με PBS, 2 φορές. Στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης που περιέχει DMEM GlutaMAX™ εμπλουτισμένο με συμπλήρωμα B27, 1% αντιβιοτικό-αντιμυκοτικό, 1μM ρετινικού οξέος, (*Retinoic Acid*, RA) (*Sigma – Aldrich*, #R2625) και 10 μM *forskolin* (Fsk) (*Cyman*, #11018)). Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ανανεώνεται κάθε 48 ώρες. Μια τυπικά ώριμη

κατάσταση διαφοροποίησης των κυττάρων απαιτεί 7 με 8 ημέρες καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης.

Διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y

Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία (350.000 κύτταρα / 60 mm τρυβλίο), σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. 24 ώρες αργότερα, το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αφαιρείται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με PBS. Στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό μέσο χαμηλού ορού (*Low Medium*, LM) , που αποτελείται από DMEM με 1% FBS, 1% αντιβιοτικό-αντιμυκητικό και RA συγκέντρωσης 10μM. Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ανανεώνεται κάθε 48 ώρες. Και για αυτά τα κύτταρα, μια τυπικά ώριμη κατάσταση διαφοροποίησης των κυττάρων απαιτεί 7 με 8 ημέρες καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης.

3.1.3 Δημιουργία και καλλιέργεια νευροσφαιρών από τα κύτταρα HCN

Για τη δημιουργία νευροσφαιρών, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία βακτηριακού τύπου (που δεν ευνοούν την προσκόλληση στο υπόστρωμα). Η καλλιέργεια των νευροσφαιρών πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με την παρουσία bFGF. Κάθε 48 ώρες ανανεώνεται ο bFGF, και κάθε 96 ώρες ανανεώνεται το μισό θρεπτικό μέσο.

Η θρυψινοποίηση των νευροσφαιρών και η ανακαλλιέργεια τους (*passage*), πραγματοποιείται με τη χρήση acutase (Gibco, #A11105). Οι νευροσφαίρες συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 900 g για 3 λεπτά, και εκπλένονται με 5 ml PBS. Στη συνέχεια προστίθενται 1.2ml acutase και επωάζονται για 5 λεπτά στους 37°C. Ακολουθεί προσθήκη 7 ml θρεπτικού μέσου. Με τη βοήθεια πιπέτας των 5 ml, με προσαρμοσμένο τιτ των 2-20μl, από τις νευροσφαίρες προκύπτουν τα μεμονωμένα κύτταρα και ανακαλλιεργούνται.

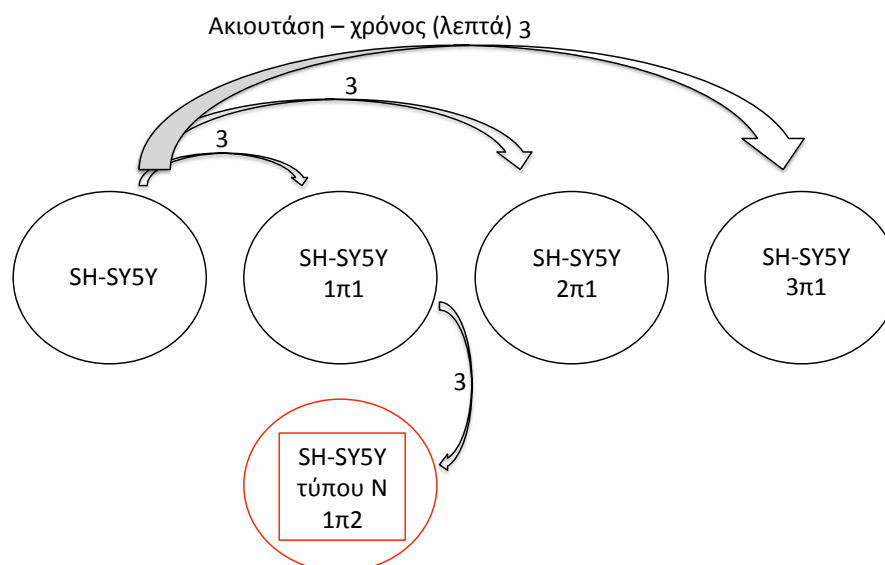
3.1.4 Δημιουργία όγκοσφαιρών από τα κύτταρα BE(2)C

Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία βακτηριακού τύπου. Η καλλιέργεια των όγκοσφαιρών πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας το οποίο ανανεώνεται κάθε 48 ώρες.

3.1.5 Διαχωρισμός και καλλιέργεια αμιγών κυτταρικών υποπληθυσμών τύπου N και S από τα κύτταρα SH-SY5Y

Ο διαχωρισμός των δύο κυτταρικών υποπληθυσμών που αυνυπάρχουν στις καλλιέργειες, των κυττάρων SH-SY5Y, βασίστηκε στην διαφορά τους, ως προς την ικανότητα προσκόλλησης στο υπόστρωμα των τρυβλίων. Αρχικά πραγματοποιείται έκπλυση με PBS, ενός τρυβλίου 10 cm, στο οποίο τα κύτταρα SH-SY5Y έχουν καλύψει το 90% της επιφάνειας (90% confluency). Προστίθεται 1ml acutase και τα κύτταρα επώάζονται στους 37°C για 3 λεπτά. Ακολουθεί ελαφρύ χτύπημα του τρυβλίου με το χέρι (*tapping*) τρεις φορές και συλλογή των κυττάρων με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα κύτταρα που έχουν συλλεχθεί αποτελούν το πρώτο κλάσμα κυττάρων (**1π1**) και τοποθετούνται σε νέο τρυβλίο καλλιέργειας. Στη συνέχεια προστίθεται ξανά acutase στο αρχικό τρυβλίο και ακολούθως συλλέγονται κλάσματα κυττάρων (**2π1**, **3π1**). Στο τέλος της διαδικασίας τα εναπομείναντα κύτταρα στο αρχικό τρυβλίο αποτελούνται αποκλειστικά από κύτταρα τύπου S. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης SH-SY5Y κυττάρων και ανακαλλιεργούνται με τον ίδιο τρόπο.

Τα συλλεγθέντα κλάσματα των κυττάρων είναι εμπλουτισμένα σε κύτταρα τύπου N αλλά όχι αμιγή. Το πρώτο κλάσμα κυττάρων (**1π1**), αφήνεται να αναπτυχθεί έως ότου καλυφθεί το 90% της επιφάνειας του τρυβλίου. Ακολουθεί δεύτερος διαχωρισμός με acutase, με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε ο πρώτος. Το πρώτο κλάσμα κυττάρων του δεύτερου διαχωρισμού (**1π2**) αποτελείται αποκλειστικά από κύτταρα τύπου N. 24 ώρες αργότερα το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται και τα κύτταρα καλλιεργούνται όπως και τα SH-SY5Y .



Εικόνα 18. Αναπαράσταση του πρωτοκόλλου δημιουργίας αμιγών κυτταρικών υποπληθυσμών τύπου N και S από τα κύτταρα SH-SY5Y.

3.1.6. Διαφοροποίηση των κυττάρων τύπου N και S

Η διαφοροποίηση και των δύο κυτταρικών υποπληθυσμών, πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο όπως και τα πατρικά SH-SY5Y κύτταρα.

3.1.7. Δημιουργία σταθερών SH-SY5Y κυτταρικών σειρών

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές SH-SY5Y, που εκφράζουν μόνιμα το πλασμίδιο ClITA-GFP (βλ.σελ.64) και το πλασμίδιο AcGFP (βλ.σελ.71). Η διαδικασία επιλογής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιβιοτικό geneticin (G418, *Invitrogen*, #G8168). Το συγκεκριμένο αντιβιοτικό παρεμποδίζει τη λειτουργία των ριβοσωμάτων μπλοκάροντας έτσι τη σύνθεση πολυπεπτιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο. Το προϊόν του γονιδίου της νεομυκίνης, ή 3' φωσφοτρανσφεράση των αμινογλυκοσιδίων (*aminoglycoside 3'-phosphotransferase*, APH 3'II) παρέχει ανθεκτικότητα στο G418.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καμπύλη δόσης του αντιβιοτικού στα κύτταρα SH-SY5Y. Χρησιμοποιήθηκαν 50, 100 και 200 mM. Η κατάλληλη συγκέντρωση εκτιμήθηκε στα 100 mM, δεδομένου ότι ήταν ικανή να προκαλέσει 50-75% κυτταρικό θάνατο μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας. Στη συνέχεια ένα τρυβλίο των

10 cm με κύτταρα SH-SY5Y διαμολύνθηκε με το κάθε πλασμίδιο (CIITA-GFP ή AcGFP), που φέρει το γονίδιο της νεομυκίνης. 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση προστέθηκαν 100 μ M G418 στο θρεπτικό μέσο. Το θρεπτικό μέσο με το αντιβιοτικό ανανεωνόταν κάθε 2 ημέρες μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Μετά από περίπου 20 ημέρες καλλιέργειας, είχαν σχηματιστεί πράσινες αποικίες κυττάρων με σαφή όρια. Κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε φρεάτιο τρυβλίου 96 θέσεων (96-well) με τη βοήθεια ειδικών δακτυλιδιών και αφηνόταν να αναπτυχθεί. Μετά την κάλυψη της επιφάνειας κάθε φρεατίου, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε τρυβλία με φρεάτια μεγαλύτερης επιφάνειας (κατά σειρά 24 φρεάτια, 12 φρεάτια και 6 φρεάτια). Τελικώς οι αποικίες μεταφέρθηκαν σε τρυβλία των 10 cm, ελέγχθηκαν για την παρουσία του πλασμιδίου και αποθηκεύθηκαν στο υγρό άζωτο.

3.1.8. Διαμόλυνση κυττάρων

Διαμόλυνση SH-SY5Y κυττάρων με το πολυμερές X-fect

Το X-fect (*Clontech*, #631318), είναι ένα συνθετικό βιοδιασπώμενο κατιονικό πολυμερές. Έχει την ικανότητα να συγκεντρώνει το DNA, σε μικρά φορτισμένα σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά συνδέονται με αρνητικά φορτισμένα μόρια της μεμβράνης των κυττάρων και εισέρχονται σ' αυτά με ενδοκύτωση.

Μία ημέρα πριν τη διαμόλυνση, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία έτσι ώστε την επόμενη ημέρα η πυκνότητα των κυττάρων να είναι περίπου 70%. Την ημέρα της διαμόλυνσης, το DNA αραιώνεται σε διάλυμα αλάτων. Στη συνέχεια προστίθενται 0.3 μ l λιπιδίου / μ g DNA (για τρυβλίο 6 φρεατίων 1.5 μ l λιπιδίου σε 5 μ g DNA), το διάλυμα αναδεύεται για 10 δευτ. με τη χρήση αναδευτήρα (vortex) και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα μεταφέρεται στα κύτταρα στάγδην. Για την αποτελεσματικότερη διαμόλυνση των κυττάρων είναι απαραίτητη η ανανέωση του θρεπτικού μέσου τόσο πριν τη διαμόλυνση, όσο και 5 ώρες μετά.

Διαμόλυνση HeLa κυττάρων με χλωριούχο ασβέστιο

Η διαμόλυνση των κυττάρων με τη χρήση CaCl_2 αποτελεί μια από τις πιο κοινές μεθόδους εισαγωγής DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα και στηρίζεται στην παρατήρηση ότι κύτταρα προσλαμβάνουν αποτελεσματικά DNA στη μορφή

ιζήματος με φωσφορικό ασβέστιο. Για τη δημιουργία του ιζήματος αναμιγνύεται ένα διάλυμα το οποίο περιέχει φωσφορικά ιόντα (*Hepes Buffered Saline*, HBS,) με διάλυμα CaCl_2 το οποίο περιέχει το DNA που πρόκειται να μεταφερθεί. Το διάλυμα μεταφέρεται στη συνέχεια στάγδην στα κύτταρα όπου το DNA, με έναν όχι και τόσο καλά χαρακτηρισμένο μηχανισμό, εισέρχεται στο εσωτερικό τους [104].

Μία ημέρα πριν τη διαμόλυνση, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία έτσι ώστε την επόμενη ημέρα η πυκνότητα των κυττάρων να είναι περίπου 80%. Την επόμενη ημέρα, για τρυβλίο 6 φρεατίων, 5 μg DNA αραιώνονται σε νερό κυτταροκαλλιιεργειών, έτσι ώστε ο τελικός τους όγκος να είναι 79 μl . Το διάλυμα αναδεύεται σε αναδευτήρα για 10 δευτερόλεπτα και προστίθενται σε αυτό 90 μl διαλύματος HBS 2X και 11 μl CaCl_2 2M. Ακολουθεί δεύτερη ανάδευση για ίδιο χρόνο. Το διάλυμα μεταφέρεται στάγδην στα κύτταρα. Για την αποτελεσματικότερη διαμόλυνση των κυττάρων είναι απαραίτητη η ανανέωση του θρεπτικού μέσου τόσο πριν τη διαμόλυνση, όσο και 6 ώρες μετά.

3.2 Μέθοδοι Γενετικής Μηχανικής

3.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών σε μετασχηματισμό

Για την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων σε μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a του βακτηρίου *E. Coli*. Η μέθοδος παρασκευής χημικών επιδεκτικών κυττάρων κατά Inoue [105], βασίζεται στην επεξεργασία βακτηριακών κυττάρων με διάλυμα αλάτων, τα οποία ευνοούν την πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA, στις μεμβράνες των κυττάρων. Ακολούθως με θέρμανση, πραγματοποιείται άνοιγμα των πόρων των βακτηριακών κυττάρων, με επακόλουθη είσοδο του πλασμιδιακού DNA. Όλα τα στάδια της διαδικασίας πραγματοποιούνται κάτω από άσηπτες συνθήκες με τη βοήθεια λυχνίας Bunsen.

Τα βακτήρια ανασύρονται από βακτηριακό μητρικό απόθεμα διαλύματος γλυκερόλης (*glycerol stock*) και γίνεται επίστρωση σε τρυβλίο στερεού άγαρ χωρίς αντιβιοτικό. Το τρυβλίο επωάζεται στους 37 °C ολονύκτια (12-16 ώρες). Την επόμενη ημέρα εμβολιάζεται μια αποικία σε 25 ml υγρού βακτηριακού θρεπτικού μέσου και επωάζεται για 6-8 ώρες στους 37 °C υπο ανάδευση στις 250-300 στροφές/ λεπτό. Στη συνέχεια 2,4 και 6ml προκαλλιέργειας, εμβολιάζονται σε 250

ml υγρού θρεπτικού μέσου και αφήνονται να αναπτυχθούν ολονύκτια στους 18 °C, υπο ανάδευση στις 200 στροφές/ λεπτό. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται μέτρηση οπτικής πυκνότητας. Για την παρασκευή των επιδεκτικών κυττάρων, επιλέγεται η καλλιέργεια με την καταλληλότερη οπτική πυκνότητα ($OD_{600}=0.55$), και τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C / 2500 στροφές/λεπτό και απόρριψη του υπερκειμένου. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται με αργές και προσεκτικές κινήσεις σε 80 ml, παγωμένου διαλύματος μετασχηματισμού. Η ανάμιξη γίνεται στροβιλίζοντας, χωρίς τη χρήση πιπέτας ή ηλεκτρικού αναδευτήρα. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση σε 18.6 διαλύματος μετασχηματισμού με 1.4 ml DMSO. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται, επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο και διαμοιράζονται σε επιμέρους όγκους των 50μl σε φιαλίδια του 1.5 ml. Τέλος ακολουθεί άμεση κατάψυξη σε υγρό άζωτο και φύλαξη στους -80 °C.

3.2.2 Ανάπτυξη βακτηρίων

Η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους DH5a – E.Coli γίνεται στους 37 °C. Για τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες, χρησιμοποιείται τροχιακός επωαστήρας (*Heidolph, Unimax-1010*). Το υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (*LuriaBroth, LB*) αποτελείται από 1% τρυπτόνη (*Applichem, #A1553*), 0.5% $NaCl_2$ (*Applichem, #A2942*) και 1% εκχύλισμα ζύμης (*Applichem, #403687.1210*). Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, στο παραπάνω προστίθεται 1.5% Άγαρ (*Applichem, A0949,0500*). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121 °C για 15 λεπτά. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται στους 4 °C. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml (*Sigma-Aldrich, # A9393*) και καναμυκίνη σε συγκέντρωση 30 μg/ml (*Sigma-Aldrich, # K4000*).

3.2.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ

Για το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος του θερμικού σοκ. 50μl βακτηριακών κυττάρων, επιδεκτικών σε μετασχηματισμό αφήνονται να αποψυχθούν σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη πλασμιδιακού DNA και επώαση στον πάγο για 20 λεπτά. Το διάλυμα κυττάρων-DNA,

μεταφέρεται στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα αφήνεται για 2 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια προστίθενται 900 μl υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας. Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπο ανάδευση, πραγματοποιείται επίστρωση σε τρυβλία στερεού θρεπτικού μέσου με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επωάζονται ολονύκτια στους 37 °C.

3.2.4. Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηρίων σε γλυκερόλη

Με σκοπό την αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα, τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το εκάστοτε πλασμιδιακό γενετικό υλικό, αναμιγνύονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες με γλυκερόλη. Πιο αναλυτικά 330 μl υγρής βακτηριακής καλλιέργειας, αναμιγνύονται με 660 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 89% και μεταφέρονται σε κρυοφιαλίδια των 2 ml. Ακολουθεί μεταφορά και αποθήκευση στους -80 °C.

3.2.5. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Για την απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων [106] . Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η χρήση αλκαλικού διαλύματος το οποίο λύει τα κύτταρα, ενώ το υψηλό pH προκαλεί αποικοδόμηση του RNA. Επίσης, οι αλκαλικές συνθήκες επιδρούν και στη δομή του DNA, αποδιατάσσοντάς το. Επειδή το χρωμοσωμικό DNA είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος, όταν λύνονται τα κύτταρα, σπάει, ενώ το μικρού μεγέθους πλασμιδιακό DNA παραμένει ανέπαφο.

Μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες, μεταφέρονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 37°C. Την επόμενη ημέρα 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετείται σε φιαλίδιο του 1.5 ml και φυγοκεντρείται στα 14.000 g για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο αφαιρείται , το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 300 μl Διαλύματος-1 με τη βοήθεια ηλεκτρικού αναδευτήρα. Ακολουθεί προσθήκη 300 μl του αλκαλικού Διαλύματος-2 με ήπια ανάδευση για 5 λεπτά, και στη συνέχεια εξουδετέρωση με 300 μl Διαλύματος-3 και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Έπειτα

ακολουθεί φυγοκέντρωση 14.000 στροφές για 20 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση, 630μl του υπερκειμένου μεταφέρονται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 490 μl ισοπροπανόλης (*2-Propanol*). Τα διαλύματα αναμιγνύονται και φυγοκεντρούνται στις 14.000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικώς το ίζημα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA εκπλένεται σε 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 50 μl H₂O ή διάλυμα TE. Το πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20 °C.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoBond Xtra Midi (*Macherey- Nagel*, #740410) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο στηρίζεται στην μέθοδο της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων.

3.2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο κατά την οποία καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός τμημάτων DNA, με βάση το μέγεθός τους. Η πηκτή αгарόζης, αποτελείται από ένα πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών οι αλυσίδες των οποίων, κατά το σχηματισμό της πηκτής, σχηματίζουν πόρους. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης. Η μεγάλη συγκέντρωση αгарόζης, επιτρέπει την ευκολότερη ροή μικρών νουκλεϊκών οξέων, και το αντίθετο. Για την ανάλυση του DNA είναι απαραίτητη η εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Το DNA σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα είναι φορτισμένο αρνητικά λόγω των φωσφορικών ομάδων. Έτσι καθίσταται δυνατή η μετακίνησή του προς την άνοδο. Επειδή το πήκτωμα, εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους, διαχωρίζονται σε ζώνες και γίνονται ορατά με βρωμιούχο αιθίδιο κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την παρασκευή 1% πηκτής αгарόζης, 1gr αгарόζης (*Thermo Fisher Scientific*, #16500500) διαλύεται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X (για την παρασκευή διαλύματος στοκ, συγκέντρωσης 50X διαλύονται: 242 gr Tris-KCl, 57,1 ml CH₃COOH, 100ml 0.5M EDTA pH:8,0). Ακολουθεί βρασμός στους 100 °C , μέχρι τη δημιουργία ομοιογενούς διαλύματος. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο

συγκέντρωσης 1 µg/ml και αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πήξει. Για να είναι εφικτή η ηλεκτροφόρηση των εκάστοτε δειγμάτων είναι απαραίτητη η ανάμιξη τους με διάλυμα φόρτωσης 4X (40% glycerol, 20mM EDTA pH:8,0), καθώς και η εμφάνιση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X.

3.2.7. Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση τμημάτων DNA, το ως προς διαχωρισμό δείγμα ηλεκτοφορείται σε πηκτή αγαρόζης συνοδευόμενο από μάρτυρα τμημάτων DNA γνωστού μοριακού βάρους (*Nippon Genetics*, #MWD100). Κάτω από το υπεριώδες φώς, με τη βοήθεια νυστεριού αποκόπτεται το τμήμα της πηκτής που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει. Για τον καθαρισμό των τμημάτων DNA, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο PCR Clean-up / Gel extraction (*Macherey Nagel*, #740609) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.2.8. Αντίδραση Klenow

Απο τις περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκύπτουν κολλώδη άκρα. Τα άκρα αυτά ,πολλές φορές δεν είναι συμβατά για τη δημιουργία αντιδράσεων σύνδεσης διαφόρων τμημάτων DNA. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται η μεγάλη υπομονάδα του συμπλόκου της DNA πολυμεράσης I [107], Klenow. Η πρωτεΐνη Klenow, διατηρεί την 5'-3' πολυμεριστική της ενεργότητα, καθώς και την 3'-5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων της είναι ικανή να δημιουργεί τυφλά άκρα σε τμήματα DNA (*blunt ends*).

Για την αντίδραση Klenow (NEB, # M0210S), χρησιμοποιήθηκε 1 unit ενζύμου για κάθε µg DNA και 10nM dNTPs. Η αντίδραση επωάζεται στους 25 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το ένζυμο αδρανοποιείται προσθέτοντας 10mM EDTA και επωάζοντας στους 72 °C για 20 λεπτά.

3.2.9. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των άκρων των διαφόρων τμημάτων DNA πραγματοποιείται από το ένζυμο ανταρτική φωσφατάση. Η χρήση της κρίνεται απαραίτητη κατά τις διαδικασίες δημιουργίας υβριδικών πλασμιδίων. Το ένζυμο

χρησιμοποιείται για να αφαιρέσει τις 5' φωσφορικές ομάδες από τους επεξεργασμένους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες πλασμιδιακούς φορείς. Με τη διαδικασία αυτή, περιορίζεται η επανασύνδεση των φορέων που δεν έχουν λάβει το ένθεμα, στις αντιδράσεις σύνδεσης.

Για την αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των άκρων (*NEB*, #M289S), χρησιμοποιήθηκε 1 unit ενζύμου για κάθε μg DNA σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθησε επώαση της αντίδρασης στους 37 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το ένζυμο αδρανοποιήθηκε επωάζοντας στους 80 °C για 2 λεπτά.

3.2.10. Αντίδραση σύνδεσης

Η αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA πραγματοποιείται με το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Η T4 DNA λιγάση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ATP, καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού, μεταξύ της 3' υδροξυλικής ομάδας ενός άκρου DNA και της 5' φωσφορικής ομάδας ενός άλλου.

Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε 1 μl T4 DNA λιγάσης (*NEB*, #M0202S), για κάθε 100 ng φορέα, μαζί με 500ng ενθέματος και 1X διαλύματος ενζύμου. Για τις αντιδράσεις σύνδεσης με τυφλά άκρα πραγματοποιήθηκε επώαση της αντίδρασης για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 12-16 ώρες στους 16 °C ενώ για τις αντιδράσεις με κολλώδη άκρα, η αντίδραση επώαστηκε στους 16 °C για 2- 16 ώρες.

3.2.11. Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών

Πλασμίδια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης CIITA

Τα πλασμίδια υπερέκφρασης για το 3^ο μετάγραφο του ανθρώπινου CIITA (NCBI-NM_001286403.1) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του Καθηγητή Παπαματθαϊάκη Ιωσήφ.

- Πλασμίδιο pGFP-CIITA [108]

Το πλασμίδιο pGFP-CIITA προήλθε από υποκλωνοποίηση του CIITA-PCDNA3 στον φορέα pEGFP-C1 (clontech). Το GFP βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του CIITA.

- Πλασμίδιο pGFP-CIITA-NLS [109]

Το πλασμίδιο pCIITA-GFP-NLS προήλθε από τη σύζευξη του πλασμιδίου pGFP-CIITA, με ένα επιπλέον σήμα εισόδου στην πυρήνα. Το επιπλέον σήμα εισόδου βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης CIITA και προέρχεται από τον ιό SV40.

- Πλασμίδιο pBXG1-CIITA full length [108]

Το κομμάτι που προήλθε από τις αντιδράσεις περιορισμού του pCDNA3-CIITA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI-XbaI κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδίου pBXG1 [110] . Το πλασμίδιο pBXG1 κωδικοποιεί το γονίδιο της β γαλακτοσιδάσης και είναι κατάλληλος φορέας για αντιδράσεις MAMMALIAN 2 HYBRID.

- Πλασμίδιο pBXG1-CIITA 1-408 [108]

Το κομμάτι προήλθε από τις αντιδράσεις περιορισμού του pCDNA3-CIITA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI-NotI. Η θέση NotI γεμίστηκε με klenow με σκοπό να δημιουργηθούν τυφλά άκρα. Το κομμάτι EcoRI-NotI κλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoRI-SmaI του πλασμιδίου pBXG1.

- Πλασμίδιο pBXG1-CIITA 1-114 [108]

Το κομμάτι προήλθε από τις αντιδράσεις περιορισμού του pCDNA3-CIITA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI-EcoNI. Η θέση EcoNI γεμίστηκε με klenow με σκοπό να δημιουργηθούν τυφλά άκρα. Το κομμάτι EcoRI-EcoNI κλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoRI-SmaI του πλασμιδίου pBXG1.

- Πλασμίδιο pBXG1-CIITA Δ408 [108]

Το κομμάτι που προήλθε από τις αντιδράσεις περιορισμού του pCDNA3-CIITA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NotI-XbaI, κλωνοποιήθηκε στις θέσεις PstI-XbaI του πλασμιδίου pBXG1.

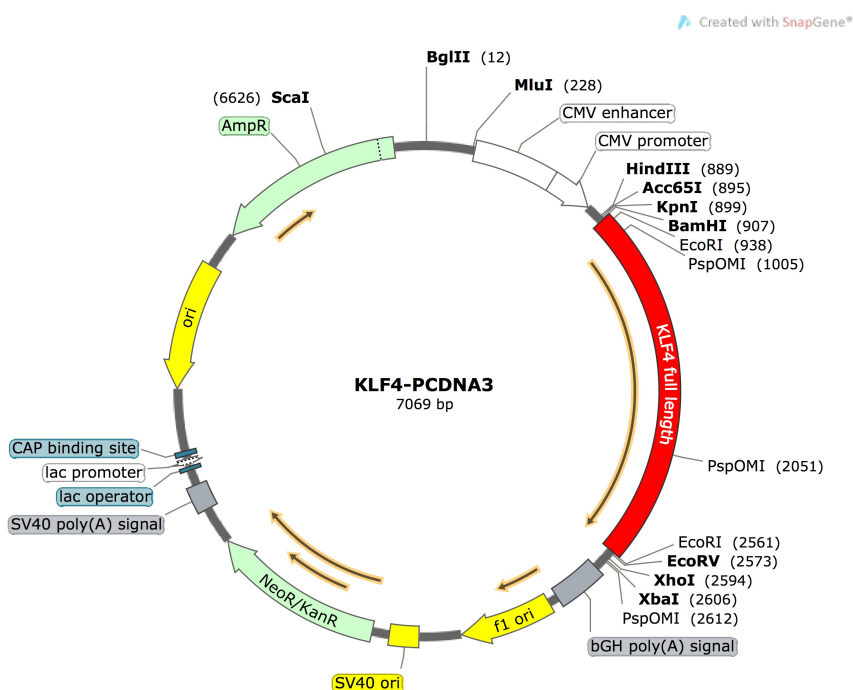
- Πλασμίδιο pBXG1-CIITA Δ114 [108]

Πλασμίδια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης KLF4

Το mRNA της 1^{ης} ισομορφής του ανθρώπινου KLF4 (NCBI- NM_001314052.1) παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Θεόδωρου Φώτη (*Addgene plasmid* #20725). Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, η αλληλουχία του KLF4 υποκλωνοποιήθηκε στους παρακάτω φορείς

- Πλασμίδιο pKLF4-PCDNA3

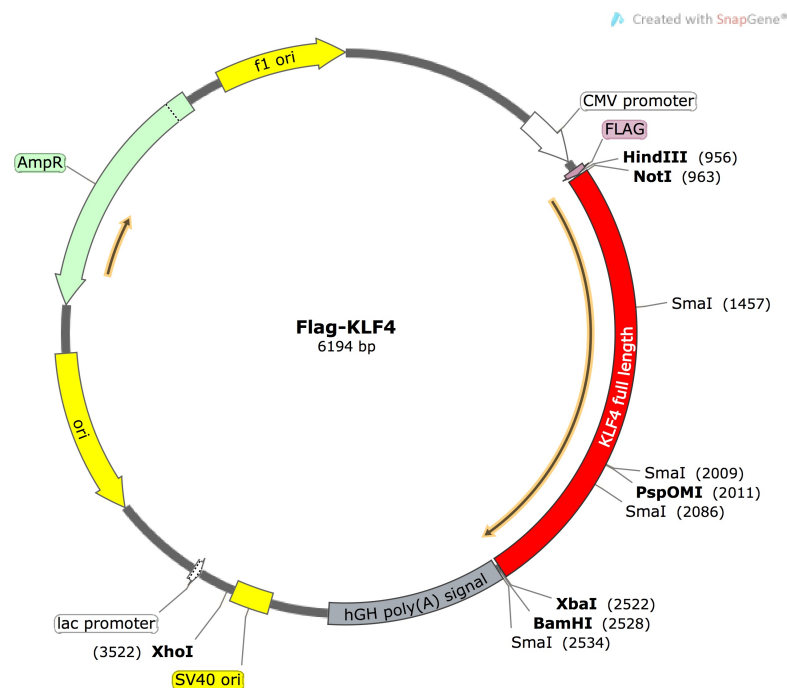
Το ένθεμα του KLF4 προήλθε από αντίδραση περιορισμού του πλασμιδίου 20725 (addgene), με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, μεγέθους 1528 ζευγών βάσεων. Ο πλασμιδιακός φορέας pCDNA3 (Invitrogen, #A150228), γραμμοποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των άκρων του γραμμοποιημένου pCDNA3. Τέλος από τη δεσμοποίηση εθέματος και φορέα, προέκυψε η κατασκευή pKLF4-PCDNA3 συνολικού μεγέθους 7 kb.



Εικόνα 19. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή KLF4-pCDNA 3.

- Πλασμίδιο pFlag-KLF4

Το ένθεμα του KLF4 προήλθε από την πλασμιδιακή κατασκευή pKLF4-PCDNA3. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε περιοριστική πέψη με την ενδονουκλεάση XbaI. Μετά τον καθαρισμό το γραμμικό πλασμίδιο υπέστη μερική αντίδραση περιορισμού με την ενδονουκλεάση PspOMI. Το καθαρό τμήμα PspOMI-XbaI του KLF4, συνδέθηκε με τις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις NotI- XbaI ,του φορέα pFLAG-CMV2 (Sigma-Aldrich, #E7398). Η κατασκευή pFlag-KLF4 που προέκυψε φέρει τον επίτοπο Flag, στο αμινοτελικό άκρο του KLF4 και είναι μεγέθους 6.2 Kb.



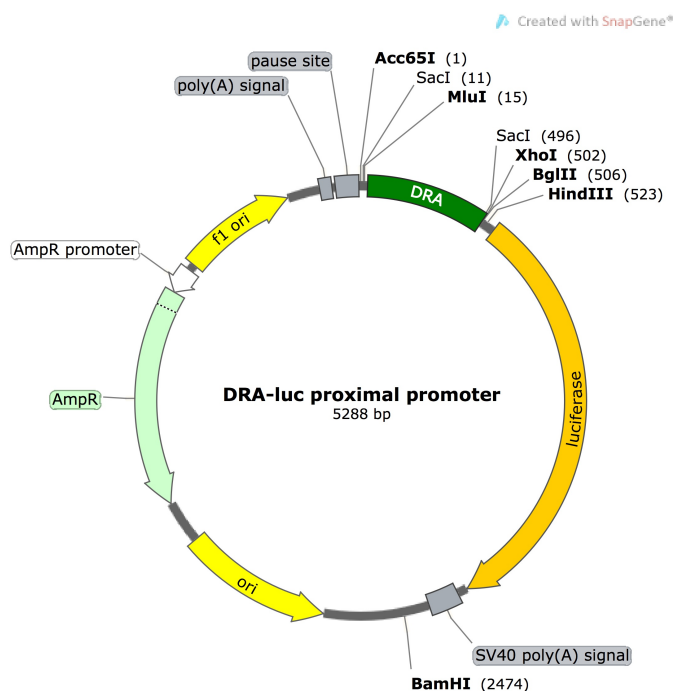
Εικόνα 20. Απεικόνιση στην πλασμιδιακής κατασκευής pFlag-KLF4.

Πλασμίδια υποκινητών του γονιδίου DRA

- Πλασμίδιο pDRA-luc proximal promoter

Η πλασμιδιακή κατασκευή DRA-luc/proximal promoter παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Παπαματθαίακη Ιωσήφ.

Η συγκεκριμένη κατασκευή περιέχει 469 ζεύγη βάσεων του εγγύς υποκινητή του DRA, ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης στον φορέα pGL3-basic (*Promega*, #E1751). Η κατασκευή μεγέθους 5.2 kb, είναι κατάλληλη για αντιδράσεις λουσιφεράσης.

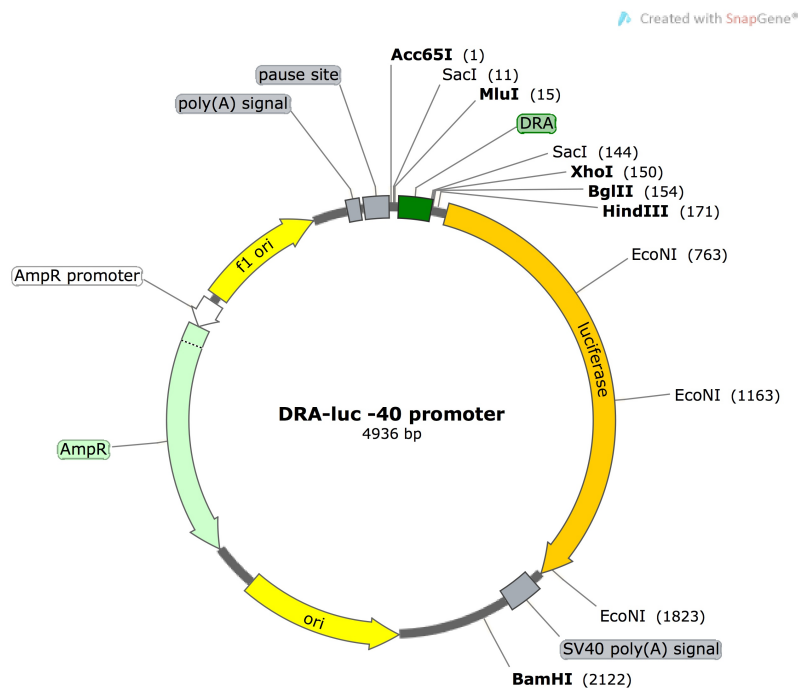


Εικόνα 21. Απεικόνιση στις πλασμιδιακής κατασκευής *pDRA-luc/proximal promoter*.

- Πλασμίδιο DRA-luc -40 promoter

Η πλασμιδιακή κατασκευή DRA-luc -40 promoter παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Παπαματθαϊάκη Ιωσήφ.

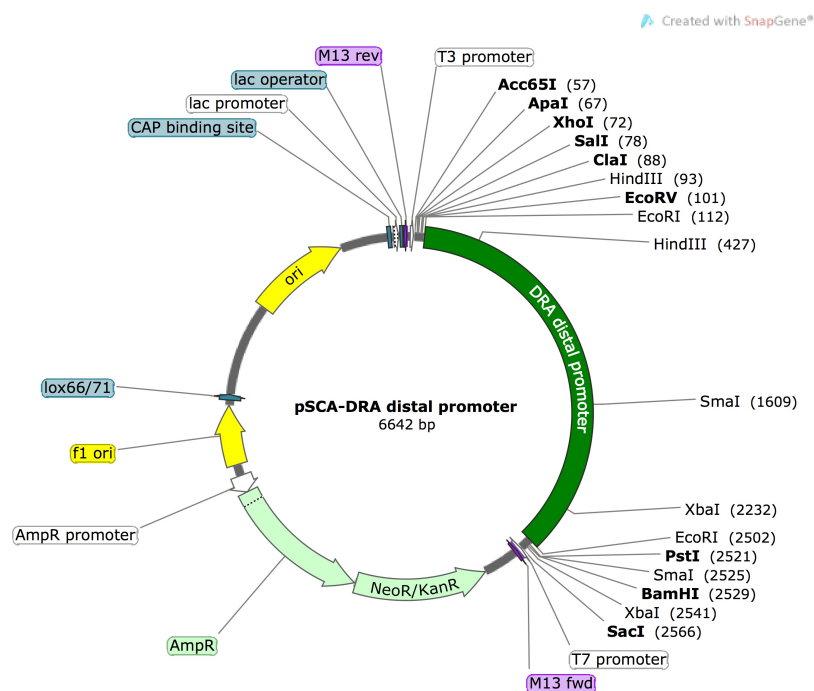
Η συγκεκριμένη κατασκευή περιέχει 120 ζεύγη βάσεων του εγγύς υποκινητή του DRA, ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης στον φορέα pGL3-basic (*Promega*, #E1751). Η κατασκευή μεγέθους 5.2 kb, είναι κατάλληλη ως αρνητικός μάρτυρας σε αντιδράσεις λουσιφεράσης.



Εικόνα 22. Απεικόνιση στην πλασμιδιακής κατασκευής DRA-luc -40 promoter.

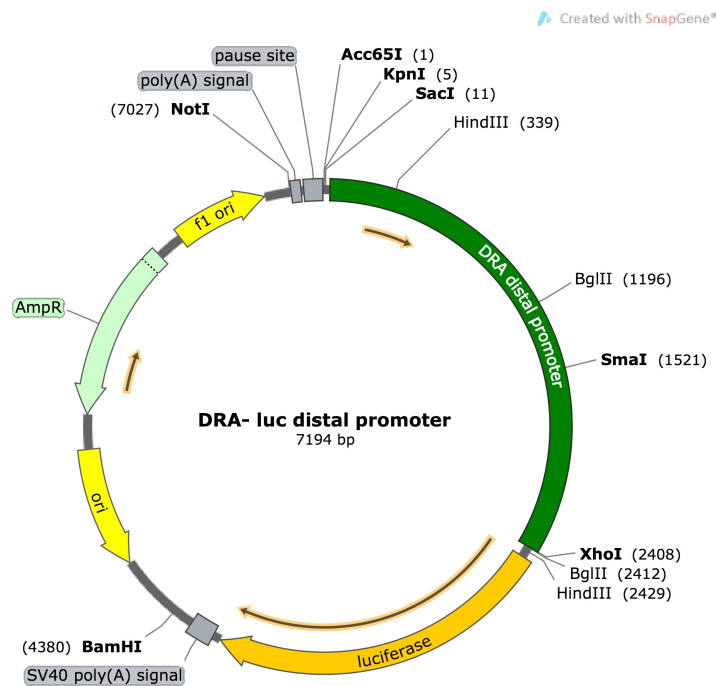
- Πλασμίδιο pDRA-luc distal promoter

Με σκοπό την ενίσχυση της αλληλουχίας του απομακρυσμένου υποκινητή του γονιδίου DRA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι : DRA-distal-f 5'-ACGGAGAACCATGAGCACTGTC-3', DRA-distal-r 5'-CTCTATTACACCCCACATTCTC-3'. Ως μήτρα για την ενίσχυση του υποκινητή χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο γενωμικό DNA, απομονωμένο από την κυτταρική σειρά HeLa. Η υψηλής πιστότητας πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε (HF rhusion DNA polymerase, FINNZYMES, #F-540) διαθέτει και 3'→ 5' εξωνουκλεολυτική ενεργότητα, κι έτσι αφήνει τυφλά άκρα στο προϊόν της. Η ενισχυμένη αλληλουχία (*amplicon*) του απομακρυσμένου υποκινητή, υπέστη επεξεργασία με Taq πολυμεράση, με σκοπό να αποκτήσει στα 3' άκρα, βάσεις αδερίνης (3' A overhangs). Στη συνέχεια το επεξεργασμένο τμήμα του υποκινητή κλωνοποιήθηκε στον ενδιάμεσο φορέα pSCA (*Agilent technologies*, #240205) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 23. Απεικόνιση της πλασμιδιακής κατασκευής *pSCA-DRA/distal promoter* που αποτελεί τον ενδιάμεσο φορέα για την κλωνοποίηση του υποκινητή.

Η αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου DRA που εισήχθη στον φορέα *pSCA* επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *M13 rev* και *M13 fwd*. Στη συνέχεια η περιοχή του υποκινητή αφαιρέθηκε χρησιμοποιώντας την ενδονουκλεάση *EcoRI*, ακολούθησε δημιουργία τυφλών άκρων με *kleow* και κλωνοποιήθηκε στον φορέα *pGL3-basic* (*Promega*, #E1751), ο οποίος είχε προηγουμένως υποστεί επεξεργασία με την ενδονουκλεάση *SmaI*. Έτσι προέκυψε η κατασκευή *pDRA-luc/distal promoter* μεγέθους 7.2 kb, κατάλληλη για αντιδράσεις λουσιφεράσης.



Εικόνα 24. Απεικόνιση της πλασμιδιακής κατασκευής pDRA-luc/distal promoter.

Διάφορα πλασμίδια

- Πλασμίδιο pCDNA3

Το πλασμίδιο pCDNA3 (*Invitrogen*, #A150228) , αποτελεί ένα φορέα υπερέκφρασης με ένα ισχυρό CMV υποκινητή. Χρησιμοποιείται ως ουδέτερος φορέας ενός πειράματος υπερέκφρασης, μιας και δεν φέρει από μόνος του κάποια κωδική αλληλουχία κάτω από τον CMV πέραν των γονιδίων αμικικίνης και νεομυκίνης. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την εξισορρόπηση του γενικού πλασμιδιακού γενετικού υλικού στα πειράματα διαμόλυνσης.

- Πλασμίδιο pRL-Renilla

Το πλασμίδιο pRL-Renilla (*Promega*, #E2241) , περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη Renilla λουσιφεράση. Η συγκεκριμένη αλληλουχία, έχει απομονωθεί από το κοιλεντερωτό-ανθόζωο *Renilla reniformis* (πανσές της θάλασσας). Χρησιμοποιείται ευρέως ως εσωτερικός μάρτυρας, για την κανονικοποίηση της ενεργότητας λουσιφεράσης, σε πειράματα μελέτης της γονιδιακής έκφρασης.

- Πλασμίδιο pAcGFP-N1

Το πλασμίδιο pAcGFP-N1 (*Clontech*, #632469), κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, από τη μέδουσα *Aequorea coerulescens*. Διεγείρεται στα

475 nm και εκπέμπει στο μέγιστο βαθμό στα 505 nm. Η ιδιότητά της αυτή την καθιστά κατάλληλη για σύζευξη με άλλες πρωτεΐνες καθώς και για μάρτυρα στα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων

3.3 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

3.3.1 Απομόνωση γενωμικού δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος, (DNA)

Αρχικά τα κύτταρα εκπλένονται με ισοτονικό διάλυμα (PBS) και προστίθεται 350 μ l διαλύματος λύσης (10 mM Tris pH 7.5, 0.1M EDTA pH8, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml RNase A) για κάθε 10^7 κύτταρα. Με τη βοήθεια κομμένου μπλε τιπ, τα κύτταρα συλλέγονται και επωάζονται για μία ώρα στους 37 °C. Ακολουθεί προσθήκη πρωτεϊνάσης K (15 mg/ml) και επώαση για μία ώρα στους 55 °C. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης (ROTH, #0038,), το σωληνάριο ανακινείται ρυθμικά για 30 sec και φυγοκεντρείται για 3 min στο μέγιστο των στροφών. Η πάνω φάση συλλέγεται προσεκτικά, προστίθεται σ' αυτή ίσος όγκος χλωροφορμίου (Fisher Scientific, C/4960), ανακινείται ρυθμικά και φυγοκεντρείται. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, η πάνω φάση συλλέγεται και προστίθεται 1/10 του όγκου CH_3COONa 3M και 2 όγκοι 100% αιθανόλη. Στο σημείο αυτό είναι δυνατή η παρατήρηση του γενωμικού DNA, με γυμνό μάτι. Το σωληνάριο τοποθετείται για 1 ώρα στους -80 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στο μέγιστο των στροφών και απόχυση του υπερκειμένου. Το ίζημα, που περιέχει το γενωμικό DNA, εκπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλυτοποιείται σε 100 μ l διαλύματος TE. Το καθαρό απομονωμένο γενωμικό DNA, ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 0.6%, ποσοτικοποιείται και φυλάσσεται στους -20 °C.

3.3.2. Απομόνωση ολικού ριβονουκλεϊνικού οξέος, (RNA)

Η διαδικασία απομόνωσης RNA από κύτταρα και ιστούς, απαιτεί εξαιρετικά προσεκτικούς χειρισμούς λόγω της παρουσίας ριβονουκλεασών. Οι ριβονουκλεάσες, είναι ένζυμα, που παράγονται από κύτταρα και ιστούς και κατακερματίζουν το RNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης RNA με TRIzol (Thermo Fisher Scientific, #15596026). Το

αντιδραστήριο TRIZOL, είναι ένα μονοφασικό διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και φαινόλης.

Τα κύτταρα εκπλένονται με ισοτονικό διάλυμα (PBS), προστίθεται 1ml TRIZOL/10⁷ κύτταρα, και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη βοήθεια σπάτουλας, αποξύνονται και συλλέγονται σε φιαλίδιο του 1.5ml. Έπειτα το διάλυμα περνά μέσα από σύριγγα ινσουλίνης (διαμέτρου 0.9 mm), 15 φορές, με σκοπό να κατακερματιστεί το γενωμικό DNA. Στη συνέχεια προστίθεται 1/5 του αρχικού όγκου του TRIZOL, χλωροφόρμιο, το φιαλίδιο ανακινείται ρυθμικά και φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm στους 4°C για 15min. Η επάνω φάση συλλέγεται προσεκτικά, προστίθεται σ αυτή ½ του αρχικού όγκου TRIZOL, 2-προπανόλης, το φιαλίδιο ανακινείται ρυθμικά και επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 14.000 rpm στους 4°C για 10min. Το ίζημα, το οποίο περιέχει το RNA, εκπλένεται με 75% αιθανόλη, επαναδιαλύεται σε 50 μl νερού απαλλαγμένο από νουκλεάσες, ηλεκτροφορείται για ποιοτικό έλεγχο σε 1.2% πηκτή αгарόζης και ποσοτικοποιείται. Το καθαρό RNA φυλάσσεται στους -80 °C και αποψύχεται σε πάγο.

3.3.3. Καθαρισμός απομονωμένου RNA από DNA

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση καθαρού RNA, αποτελεί ο καθαρισμός του από τυχόν υπολείμματα γενωμικού DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση (DNase I), το οποίο κατακερματίζει το DNA καθώς διασπά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο RQ1 RNase-free DNase (*Promega*, #M6101) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα 2 μg RNA υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 1μl RNase, 1μl ρυθμιστικού διαλύματος RNase και H₂O μέχρι τελικό όγκο 9μl, στους 37 °C για 30 min. Ακολουθεί προσθήκη 1μl διαλύματος STOP και επώαση για 10 min στους 65 °C. Το απαλλαγμένο από DNA, RNA που προκύπτει φυλλάσσεται στους -80 °C ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για τη σύνθεση cDNA.

3.3.4. Αντίστροφη μεταγραφά

Ως αντίστροφη μεταγραφά, ορίζεται η διαδικασία παραγωγής μονόκλωνου DNA (συμπληρωματικού DNA, cDNA), χρησιμοποιώντας μονόκλωνο RNA ως μήτρα. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση, ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση και είναι μια RNA κατευθυνόμενη, DNA πολυμεράση. Για την παραγωγή του cDNA είναι απαραίτητη η πρόσδεση της αντίστροφης μεταγραφάσης σε ένα δίκλωνο εκμαγείο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση oligo-dT εκκινήτη ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την πολύ-A αλληλουχία του 3' άκρου των μορίων RNA.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο PrimeScript RT reagent Kit (TAKARA, #RR037A). Πιο συγκεκριμένα, αναμιγνύεται 1 µg RNA απαλλαγμένο από DNA, με 1µl oligo dT, 1µl RTmix και η αντίδραση συμπληρώνεται με H₂O μέχρι τα 10 µl. Ακολουθεί μεταφορά των μικροφιαλιδίων σε θερμοκυκλοποιητή και επώαση στους 37 °C για 15 min και στους 85 °C για 5 sec.

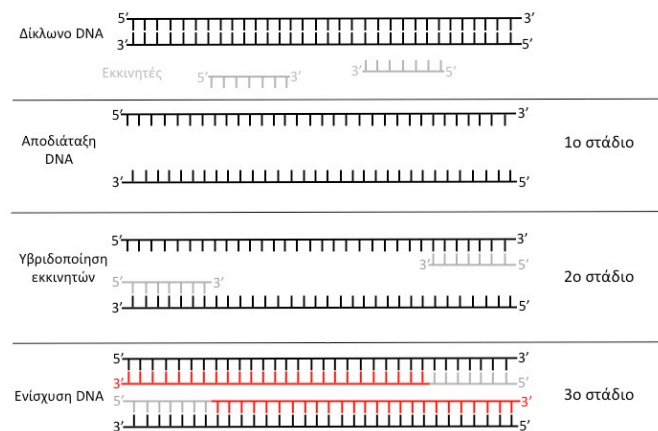
Το προϊόν της αντίδρασης το οποίο περιέχει το cDNA της εκάστοτε συνθήκης, αραιώνεται προσθέτοντας 10 µl νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Για τον έλεγχο της ποιότητας του cDNA, πραγματοποιείται αντίδραση PCR για κάποιο γονίδιο αναφοράς.

3.3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR, ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, ο οποίος 10 χρόνια αργότερα τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας [111].

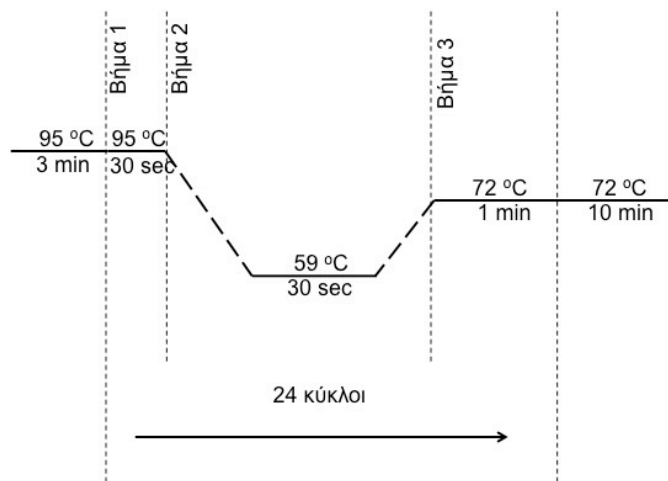
Η PCR, αποτελεί μία δυναμική μέθοδο, εκθετικής ενίσχυσης συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η διαδικασία της ενίσχυσης, επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών κύκλων (*in vitro*) διπλασιασμού του DNA. Η διαδικασία της ενίσχυσης, απαιτεί εκτός των άλλων μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, και ένα ζεύγος εκκινήτων που οριοθετούν την περιοχή του ενδιαφέροντος. Η PCR αποτελείται από διάφορα θερμικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο το προς ενίσχυση DNA μετουσιώνεται, στο δεύτερο στάδιο τα πριμοδοτικά μόρια (εκκινήτες) ενώνονται με τις μονόκλωνες συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και στο τρίτο στάδιο η DNA πολυμεράση

συνθέτει μια καινούργια μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα (**Εικόνα 25**).



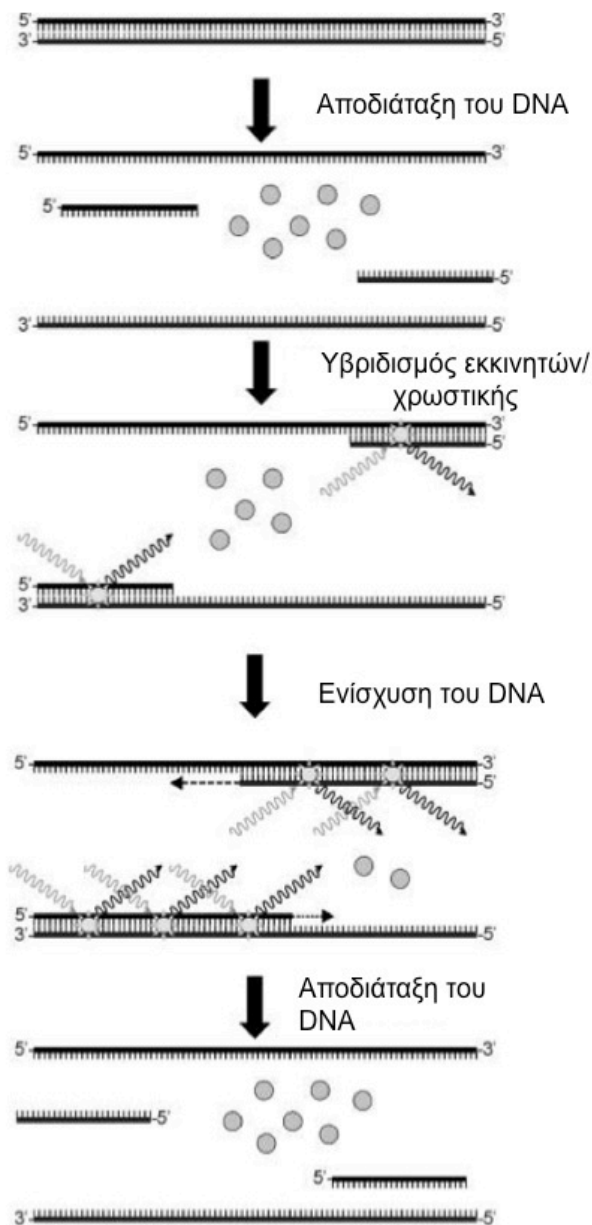
Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR.

Στη συγκεκριμένη μελέτη για τις αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιήθηκε η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση Kapa Taq Hotstart (Kapa Biosystems, #KK1510). Για τη δημιουργία μιας αντίδρασης PCR, αναμιγνύονται 0.2 μl Taq (5 units/μl), 10 μl Taq buffer (5X), 3 μl $MgCl_2$ 25 mM), 0.4 μl dNTPs (25mM each), συμπληρωμένο με H_2O μέχρι τα 49 μl. Το μίγμα αυτό προστίθεται σε μικροφιαλίδιο των 200 μl μαζί με 1 μl από το ως προς εξέταση cDNA (template). Στη συνέχεια το μικροφιαλίδιο τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή σε πρόγραμμα συμβατό με τους εκκινητές (**Εικόνα 26**). Τελικά το προϊόν της PCR ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.6%.



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση του προγράμματος της PCR.

3.3.6. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, q RT-PCR

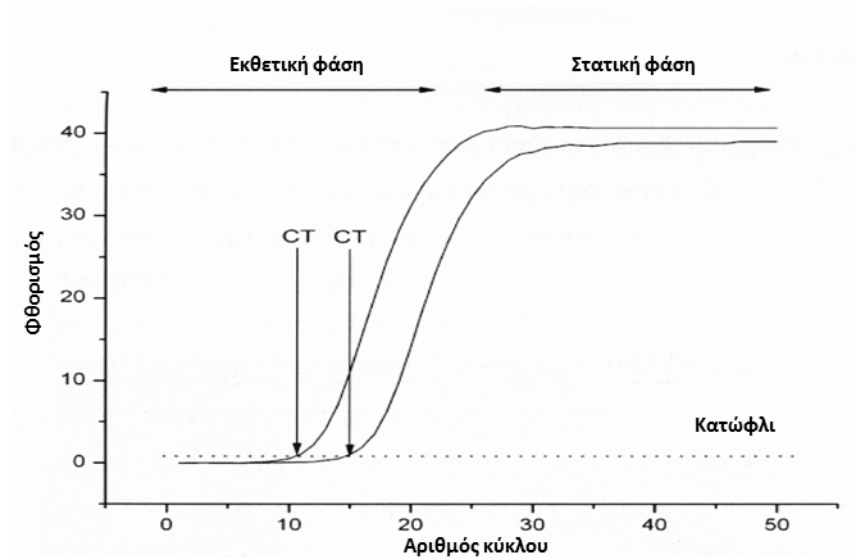


Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης qPCR [112].

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποτελεί την εξέλιξη της συμβατικής PCR. Με τη χρήση της q-PCR, καταγράφεται και παρακολουθείται η εξέλιξη της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιώντας πολύ μικρές ποσότητες αρχικού DNA ή cDNA. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η χρήση ειδικού θερμοκυκλοποιητή, που ανιχνεύει σε πραγματικό χρόνο μια φθορίζουσα χρωστική (SYBR Green) [112]. Η χρωστική έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλιωνα μόρια DNA. Όταν είναι ελεύθερη φθορίζει σε πολύ μικρό βαθμό ενώ καθώς τα δίκλιωνα μόρια διπλασιάζονται στο τέλος κάθε κύκλου, ο φθορισμός αυξάνεται και είναι ανάλογος με το προϊόν της αντίδρασης.

Στα αρχικά στάδια των κύκλων το σήμα είναι ασθενές και δεν μπορεί να καταγραφεί. Καθώς η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται, η ανίχνευση του σήματος

εξελίσσεται εκθετικά, μέχρι να επέλθει κορεσμός της αντίδρασης (**Εικόνα 27**). Ωστόσο, οι καμπύλες των αντιστοιχών δειγμάτων διαχωρίζονται στη φάση ανάπτυξης της αντίδρασης, γεγονός που αντανακλά τις διαφορετικές αρχικές ποσότητες (Kubista et al., 2006). Το σημείο του χρόνου ή ο κύκλος όπου ανιχνεύεται για πρώτη φορά το τμήμα που ενισχύεται, ονομάζεται τιμή Ct (threshold cycle). Συνεπώς, όσο περισσότερη είναι η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό υλικό, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί μια σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, που σημαίνει ένα χαμηλό Ct (**Εικόνα 28**) [113].



Εικόνα 28. Γραφικές παραστάσεις στις οποίες φαίνεται το κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct) στην αρχή της εκθετικής φάσης.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής *Biorad CFX 96*, σε συνδυασμό με το πακέτο *Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix* (*Biorad*, #172-5270). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα cDNA template η οποία αντιστοιχεί περίπου σε 10 ng RNA, σε συνδυασμό με 200nM του κάθε εκκινητή και 5 μ l απο το ειδικό διάλυμα *Sso Advanced Universal SYBR Green Supermin* (2X). Το συγκεκριμένο μίγμα ήταν ικανό να δώσει τιμές Ct για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH) 17-19.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή είναι το εξής : 1) 95 °C για 3 min, 2) 95 °C για 3 sec, 3) 60 °C για 1 min, 4) ανάγνωση πλακέτας, 5) επανάληψη των σταδίων 2 έως 4 για 40 κύκλους, 6) δημιουργία καμπύλης τήξης από 50°C έως 90°C με ανάγνωση 0,5°C κάθε 5sec.

3.3.7. Εκκινητές PCR

Όπως περιγράφηκε παραπάνω απαραίτητη προϋπόθεση για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής ενός γονιδίου με PCR, αποτελεί ο σχεδιασμός των εκκινητών. Οι εκκινητές σχεδιάζονται σε διαφορετικά εξόνια του εκάστοτε γονιδίου, όταν αυτό είναι εφικτό. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 18-22 νουκλεοτίδια και το ποσοστό νουκλεοτιδίων G/C είναι περίπου 50%. Η αλληλουχία του forward (ανοδικού) εκκινητή είναι συμπληρωματική με τη μία νοηματική αλυσίδα του DNA, ενώ του reverse (καθοδικού) με την άλλη.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ως γονίδια αναφοράς, (δηλαδή γονίδια που η έκφρασή τους δε μεταβάλλεται στις διάφορες συνθήκες), χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια *SRP14* και *GAPDH*. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών καθώς και το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύουν φαίνονται στον πίνακα 1.

Όνομα Γονιδίου	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητών 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (ζεύγη βάσεων)
Doublecortin	DCX-f	ACCCCCAAGTCTAAGCAGTCTC	136
	DCX-r	CTCCCCCTCCTTTACATGGAATC	
β III tubulin	Tuj1-f	GGACATCTCTTCAGGCCTGACA	147
	Tuj1-r	CAGGCAGTCGCAGTTTTTCACAC	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH-f	GTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	134
	GAPDH-r	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC	
Trompomyosin receptor kinase A	TrkA-f	CTGTGTTCAACCACATCAAGCGC	133
	TrkA-r	CTTGACAGCCACCAGCATCTTG	
Trompomyosin receptor kinase B	TrkB-f	AGCCCTGGTACCAGCTGTCAAA	184
	TrkB-r	GCCTTGGCCAAGTTCTGAAGGA	
Trompomyosin receptor kinase C	TrkC-f	CCTGAAAGCATCATGTACCGGA	149
	TrkC-r	ACACGACCTTGGGTAATGCA	
Low affinity Nerve growth factor receptor	p75-f	CATCCCTGTCTATTGCTCCATC	192
	p75-r	TGCAGGCTCTGGCTGTCCAC	
Microtubule associated protein 2	MAP2-f	TGTAGGTGAAGGCCAAGACTCT	148
	MAP2-r	AACCTCGGAATCCCAGCATACA	
Vimentin	Vim-f	GAACGCCAGATGCGTGAAATG	280
	Vim-r	CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA	
Nestin	Nestin-f	CCAAGACTTCCCTCAGCTTT	147
	Nestin-r	GCACAGGTGTCTCAAGGGTA	
KLF4 all isoforms	KLF4-f	CCAGAGGAGCCCAAGCCAAA	189

	KLF4-r	GGCGAATTTCCATCCACAGCC	
KLF4 isoform specific	KLF4- iso-f	GGGTCTTGAGGAAGTGCTGAG	188
	KLF4-iso-r	TTGGCTTGGGCTCCTCTGGC	
CIITA all transcripts	CIITA 4f	AAACCGACCAGATTCCCATGCC	150
	CIITA 3r	ATATACTGGAGACCCCTGTTCC	
CIITA transcript I	CIITA HI-f	CCAGGAAGATCTCTTTGACCCT	192
	CIITA/H-r1	CGCTGTTAAGAAGCTCCAGGTAG	
CIITA transcript II	CIITA HII-f	AAGCCCAACGTGCATGGTGGAA	260
	CIITA/H-r2	TCGCAGTTGATGGTGTCTGTGT	
CIITA transcript III	CIITA HIII-f	AGTGATGAGGCTAGTGATGAGG	250
	CIITA/H-r1	CGCTGTTAAGAAGCTCCAGGTAG	
CIITA transcript IV	CIITA HIV-f	GGAGAGGCCACCAGCAGC	223
	CIITA/H-r3	ACTGGTCGCAGTTGATGGTGTC	
Major Histocompatibility complex class II	DRA-f2	GAAGACCACCTTTTCCGCAAGT	163
	DRA-r	ACACCACGTTCTCTGTAGTCTC	
	DRB-f	AGCACGGTCTGAATCTGCACAG	188
	DRB-r	CGGGGCAGAAAGTTCTTCCTTG	
	DPA-f	AAGAGCCAATCCAGATGCCTGA	197
	DPA-r	TCTCCTAAGTCCTCTTCTGTTC	
	DPB-f	GAGATGTCTACACCTGCCAAGT	168
	DPB-r	TGCTCCTCCTGTGCATGAAGAT	
	DQA-f	CTGAGATTCCAGCCCCTATGTC	202
	DQA-r	ATTCTTCTGCTCCTGTAGATGG	
	DQB-f	AAATGACTCCCCAGCGTGGAGA	184
	DQB-r	CTCCTTTGACGGATGATAAGGC	
Plexin A1	Plexin A1-f	GGAGAAGATTAAGGAGCGCATC	123
	Plexin A1-r	CAGAAGTCGTCATCGATCTGCA	
Interferon Responce factor 1	IRF1-f	ACAACCTCCAGGTGTCACCCAT	194
	IRF1-r	CAGCTAAAAGTCTCCATAGACAG	
Interferon Responce factor 4	IRF4-f	GATTCCAGGTGACTCTATGCTT	141
	IRF4-r	CCCTCAGGAAATGTCCACTGTT	
Interferon Responce factor 8	IRF8-f	CTGTGCTTTGGGGAAGAGTTTC	
	IRF8-r	CCAGATATTTGTGCCTCACACC	
IFN γ receptor 1	IFNGR1/H-f	GTCAGAGTTAAAGCCAGGGTG	178
	IFNGR1/H-r	CTTCCTGCTCGTCTCCATTTAC	
IFN γ receptor 2	IFNGR2/H-f	CACAGATCACAGCAACAGAGTG	189
	IFNGR2/H-r	GGGTCACCTCAATGTTTTCTGG	
IFN γ receptor 1	IFNGR1/M/R-f	ATGATTCTGCTGGTGGTCCTGA	229
	IFNGR1/M/R-r	TGTTGGTGCAGGAATCAGTCCA	
IFN γ receptor 2	IFNGR2/M/R-f	GATGAGCAGATTCTAACTTGGG	195
	IFNGR2/M/R-r	GACTGTGAATGGGTGTGGGAAA	
SRP14	Srp14/H-f	GATGGTGTTGTTGGAGAGCGAG	209
	Srp14/H-r	CAGTGCTGATCTTCTTCTTCCC	
Interferon Factor 1	IRF1-f	ACAACCTCCAGGTGTCACCCAT	193
	IRF1-r	CAGCTAAAGTCTCCATAGACAG	

S100A10	S100A10-f	GCTACTTAACAAAGGAGGACCTG	183
	S100A10-r	CATTGCATGCAATGGTGAGGC	
S100A11	S100A11-f	AGTCCCTGATTGCTGTCTTCCA	179
	S100A11-r	CTGACCATCACTGTTGGTGTCC	
Myocyte Enhancer Factor 2A	MEF2A-f	ACTCAGCAATGCCGACTGCCTA	184
	MEF2A-r	GAACCCTGAGATAACTGCCCTC	
GDNF receptor	Ret-f	CAGCAAAGACCTGGAGAAGATG	175
	Ret-r	GTTTTCAATCCATGTGGAAGGG	
CNTF receptor	IL6ST-f	TGGTACACAGTGGCTACAGACA	144
	IL6ST-r	GCAAAATACCATCACCGCCATCT	
MYC-N	MYCN-s	AATGGTGCTTAAGTTCCAGCA	154
	MYCN-a	GAACCTCCAGTCTAATACTGGC	

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν

3.3.8. Ανοσοκατακρήμνιση

Η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιείται για την απομόνωση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης από ένα μίγμα εκατοντάδων διαφορετικών πρωτεϊνών. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα, ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει σε συνδυασμό με ειδικά σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης. Αρχικά γίνεται σύζευξη του αντισώματος με τα σφαιρίδια. Στη συνέχεια το σύμπλοκο αντισώματος-σφαιριδίων επωάζεται με το προς μελέτη πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Λόγω ειδικότητας θα σχηματιστεί σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος-σφαιριδίων το οποίο στη συνέχεια μπορεί να διαχωριστεί με ευκολία και να απομονωθεί.

Με παρόμοιο τρόπο η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικού συμπλόκου (Co-IP). Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος-σφαιριδίων λόγω της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, συνήθως φέρει επάνω του και πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται άμεσα στην κατακρημνισμένη πρωτεΐνη. Με τον τρόπο αυτό όταν το κατακρημνισμένο σύμπλοκο ηλεκτροφορηθεί σε πηκτή πολυακρυλαμίδου και πραγματοποιηθεί ανοσοαποτύπωση κατά western, είναι δυνατό να προσδιοριστούν νέες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, για κάθε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιήθηκαν 300μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, με 10μl καθαρού όγκου σφαιριδίων αγαρόζης και 5 μg αντισώματος. Αρχικά τα σφαιρίδια εκπλένονται με

200μl PBS φυγοκεντρώντας για 1 λεπτό στις 2000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στα σφαιρίδια προστίθενται 5 μg αντισώματος σε PBS, σε τελικό όγκο 200 μl. Ακολουθεί επώαση σφαιριδίων-αντισώματος στον ψυχρό θάλαμο (4 °C), υπό κυκλική ανάδευση για περίπου 4 ώρες. Έπειτα πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των σφαιριδίων με διάλυμα RIPA 1X και προστίθεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με διάλυμα RIPA έως τα 200 μl. Το διάλυμα επωάζεται στον ψυχρό θάλαμο, υπο κυκλική ανάδευση για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια η αντίδραση φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο συλλέγεται. Το υπερκείμενο (Supernatant-Sup), ουσιαστικά περιέχει όλες τις πρωτεΐνες του αρχικού εκχυλίσματος χωρίς όμως την πρωτεΐνη για την οποία πραγματοποιήθηκε η ανοσοκατακρήμνιση. Στα σφαιρίδια τοποθετούνται 200 μl διαλύματος RIPA και ακολουθεί φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο συλλέγεται (Wash), και τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 30 μl διαλύματος Laemmli 2X. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου του μισού κατακρημνισμένου εκχυλίσματος (15 μl), καθώς και 1/20 από τα Sup και Wash και ανοσοαποτύπωση κατά western.

3.3.9. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, CHIP

Η μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με το DNA. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστούν νέοι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες υποκινητών γονιδίων ή εναλλακτικά, οι θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών στο γονιδίωμα. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η χρησιμοποίηση ειδικών αντισωμάτων για την ως προς μελέτη πρωτεΐνη τα οποία συζευγνυνται με ειδικά σφαιρίδια αγαρόζης/σεφαρόζης. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια αναμειγνύεται με τη συνολική χρωματίνη των κυττάρων, με αποτέλεσμα να προσδένεται ειδικά στην ως προς μελέτη πρωτεΐνη, η οποία είναι προσδεδεμένη στη χρωματίνη. Τέλος το σύμπλοκο κατακρημνίζεται και οι περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης στη χρωματίνη, προσδιορίζονται με PCR.

Αρχικά τα κύτταρα ($\sim 7 \times 10^6$) εκπλένονται με PBS και η χρωματίνη μονιμοποιείται με την προσθήκη διαλύματος 1% φορμαλδεϋδης σε PBS, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (10ml Formaldehyde /10cm dish) για την

δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών (*cross-linking*) μεταξύ των πρωτεϊνών και του DNA.. Η αντίδραση μονιμοποίησης σταματά με την προσθήκη 0.125 M διαλύματος γλυκίνης για 5 λεπτά. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα εκπλένονται με PBS 2 φορές και προστίθεται σ αυτά 5ml/10cm dish, κρύου διαλύματος λύσης των κυττάρων (*lysis buffer*: 50mM Hepes pH7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA pH8, 10% glycerol, 0.5% NP40, 0.25% triton X, συμπληρωμένο με 1mM PMSF και 1/100 αναστολείς πρωτεασών). Τα κύτταρα επώάζονται στο διάλυμα λύσης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αποξύνονται με τη βοήθεια σπάτουλας, συλλέγονται σε σωληνάρια των 50 ml και φυγοκεντρούνται στις 5.000 rpm, για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα υπερήχων (*sonication buffer* : 0.05M Tris-HCl pH8, 0.3% SDS, 0.01M EDTA συμπληρωμένο με 1mM PMSF και 1/100 αναστολείς πρωτεασών) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 2×10^6 κύτταρα / ml. Στη συνέχεια στο διάλυμα των κυττάρων εφαρμόζονται υπερήχοι στο 30% της έντασης για 3 λεπτά με παλμό 30sec ON/ 30 sec OFF. Σκοπός των υπερήχων είναι να σπάσει η χρωματίνη σε κομμάτια που κυμαίνονται από 300 έως 700 ζεύγη βάσεων. Για τον έλεγχο της χρωματίνης ακολουθεί αντίστροφη μονιμοποίηση (*reverse cross-linking*) μέρους της χρωματίνης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Για την αντίστροφη μονομοποίηση, 20μl κυττάρων (~ 40.000), αναμειγνύονται με 250 μl διαλύματος έκλουσης (*elution buffer*: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 1% SDS σε διάλυμα TE) και επώάζονται ολονύκτια στους 65 °C. Την επόμενη ημέρα προστίθενται 25 μl RNase I συγκέντρωσης 10 mg/ml και επώάζονται στους 37 °C για 1,5 ώρα. Ακολουθεί προσθήκη πρωτεΐνης K και επώαση για 2 ώρες στους 55 °C. Τέλος πραγματοποιείται καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και ηλεκτροφόρηση.

Έπειτα 10^6 κύτταρα ανά αντίδραση IP, δηλαδή 500μl κατακερματισμένης χρωματίνης αναμειγνύονται με 1 ml διαλύματος διάλυσης (*dilution buffer*: 10mM Tris-HCl pH 8, 0.01M EDTA pH 8, 100mM NaCl, 1 % triton X συμπληρωμένο με 1mM PMSF και 1/100 αναστολείς πρωτεασών), 5μl αντισώματος και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 4 °C σε κινούμενη ρόδα. Στο στάδιο αυτό δημιουργείται το σύμπλοκο αντισώματος- πρωτεΐνης-χρωματίνης.

Την επόμενη ημέρα 25μl σφαιριδίων σεφαρόζης πλένονται με PBS 3 φορές (διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 2.500 rpm για 3 λεπτά) και μπλοκάρονται για 1 ώρα στους 4 °C σε κινούμενη ρόδα με διάλυμα 1% BSA σε PBS. Ακολουθεί μια πλύση των σφαιριδίων με PBS, προσθήκη στο σύμπλοκο αντισώματος- πρωτεΐνης- χρωματίνης και επώαση για 4 ώρες στους 4 °C σε κινούμενη ρόδα. Στη συνέχεια το σύμπλοκο εκπλένεται 3 φορές με διάλυμα πλύσης I (Chip wash buffer I: 50mM Hepes pH7.5, 500 mM LiCl₂, 1mM EDTA, 1% NP40, 0.7% sodium deoxycholate) και 1 φορά με διάλυμα πλύσης II (Chip wash buffer II: 20mM Tris-HCl pH 7.6, 50mM NaCl, σε TBS 1X). Τελικά μετά τη φυγοκέντρηση ως ίζημα εμφανίζεται το σύμπλοκο σφαιριδίων- αντισώματος- πρωτεΐνης- χρωματίνης στο οποίο πραγματοποιείται αντίστροφη μονιμοποίηση. Τελικώς επαναδιαλύεται σε 50 μl διαλύματος TE και ακολουθεί PCR πραγματικού χρόνου με 2-5 μl ως μήτρα αντιγραφής και ο εμπλουτισμός της χρωματίνης υπολογίζεται [114](**Εικόνα 29**).

$$\% \text{ [ChIP/ Total input]} = 2^{[(\text{Ct}(\text{x}\% \text{input}) - \log(\text{x}\%)/\log 2) - \text{Ct}(\text{ChIP})]} \times 100\%$$

Εικόνα 29. Εξίσωση υπολογισμού του εμπλουτισμού της χρωματίνης [114].

Όνομα Γονιδίου	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητών 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (ζεύγη βάσεων)
GAPDH promoter	GAPDH-prom-f		
	GAPDH-prom-r		
DRA proximal promoter	ChipDRA-f	GTGTGCTCCTGTTTGTTTAAGAAC	243
	ChipDRA-r	GCTCTGTTGGGAGTCAGT	
DRA inner promoter	DRA-inner-f1	TAGGTCTCTTTCTAGCGATCTA	200
	DRA-inner-r1	AGTCCATTGTTCAACATCAGTC	
	DRA-inner-f2	TCAAAACCATCCTGGTTAACAT	236
	DRA-inner-r2	TTTTCGAGACGGAAGTCTTGCT	
	DRA-inner-f3	AGCAAGACTTCCGTCTCGAAAA	219
	DRA-inner-r3	TGATGTTCAACATAGACAGTCC	
	DRA-inner-f4	CCCCGTCTCTACTAAAAATACA	220
	DRA-inner-r4	TATAGTGGGCAAAGCCTATTCT	

Πίνακας 2. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.

3.4. Βιοχημικές μέθοδοι

3.4.1. Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα RIPA με την εξής σύσταση : 50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate συμπληρωμένο με 1mM PMSF και 1/100 αναστολείς πρωτεασών.

Τα κύτταρα εκπλένονται μια φορά με διάλυμα PBS, τοποθετούνται σε πάγο και προστίθεται το διάλυμα RIPA (300μl για κάθε 3×10^6 κύτταρα). Μετά από επώαση 5 λεπτών ακολουθεί απόξεση των κυττάρων με ειδική σπάτουλα και τοποθέτηση τους σε μικροφιαλίδια του 1.5 ml. Στη συνέχεια, ακολουθεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση των νουκλεϊκών οξέων με την εφαρμογή υπερήχων για 4sec στο 30% της έντασης, με εναλλάξ 0,5sec θραύση και 0,5sec παγόλουτρο. Τελικά τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 14000g για 10min, στους 4°C. Το υπερκείμενο, αποτελεί το καθαρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα και φυλλάσσεται στους -80 °C.

3.4.2. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford

Για την ποσοτικοποίηση του απομονωμένου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, χρησιμοποιείται διάλυμα Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate), αραιωμένο 1/3 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Η οπτική πυκνότητα του εκάστοτε δείγματος ανάγεται σε ποσότητα πρωτεΐνης (μg), σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από την οπτική πυκνότητα γνωστής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης BSA. Στη συγκεκριμένη μελέτη η εξίσωση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη είναι : $OD = 0.0211x$.

Πιο συγκεκριμένα 10μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμιγνύονται με 2.5 ml αραιωμένου διαλύματος Bradford και μεταφέρονται σε ειδικές κυψελίδες. Μετά την πάροδο 10 δευτερολέπτων λαμβάνεται η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο φωτόμετρο.

3.4.3. Απομόνωση κυτταροπλασματικών/πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (REAP protocol)

Για το διαχωρισμό πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος REAP (Rapid, Efficient And Practical method) [115]. Πρίν τη διαδικασία απομόνωσης, όλα τα διαλύματα ψύχονται στον πάγο. Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλένονται με κρύο διάλυμα PBS. Ακολουθεί προσθήκη 660μl PBS, για κάθε 3×10^6 κύτταρα, απόξυση των κυττάρων με την βοήθεια σπάτουλας και συλλογή σε φιαλίδιο του 1.5 ml. Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρείται στο μέγιστο των στροφών για αυστηρά 10 sec. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η πελέτα επαναδιαλύεται 5 φορές με τη βοήθεια κομμένου μπλέ τίπ σε 600 μl διαλύματος 0.1% NP40 σε PBS. 200 μl των επαναδιαλυμένων κυττάρων συλλέγονται και το κλάσμα αυτό αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Σ αυτό προστίθενται 100 μl Laemmli 3x.

Το υπόλοιπο εκχύλισμα κυττάρων φυγοκεντρείται στο μέγιστο των στροφών για 10 sec και το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα συλλέγεται. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 1.9 ml κρύου διαλύματος 0.1% NP40 σε PBS, φυγοκεντρείται στο μέγιστο των στροφών για 10 sec, το υπερκείμενο απομακρύνεται και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 200 μl Laemmli 1x.

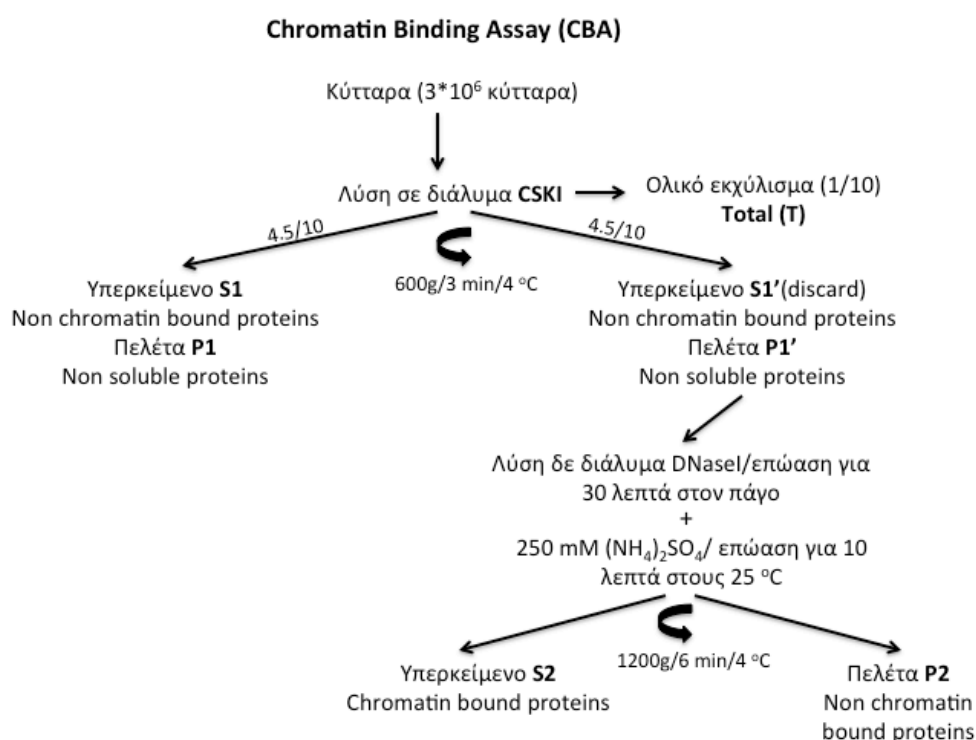
Ακολουθεί εφαρμογή υπερήχων στο ολικό και πυρηνικό πρωτεϊνικό κλάσμα στο 20% της έντασης για 5 sec- 2 φορές, βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 95 °C και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

3.4.4. Διαχωρισμός πυρηνικών πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη

(Chromatin Binding Assay, CBA)

Για τον διαχωρισμό των πυρηνικών εκχυλισμάτων που προσδένονται στη χρωματίνη, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία [116]. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται και ψύχονται στον πάγο. Αρχικά τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθενται σ'αυτά, 1.5 ml διάλυμα λύσης κυττάρων CSK1 (10mM Pipes pH6.8, 100mM NaCl, 300mM sucrose, 3mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail και 0.5% v/v Triton X-100) για 15 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί απόξυση των κυττάρων με τη βοήθεια σπάτουλας και μεταφορά σε φιαλίδιο του 1,5 ml. Απο αυτό 150μl (1/10),

φυλάσσεται καθώς αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (Total fraction, T). Το υπόλοιπο χωρίζεται ισόποσα σε 2 φιαλίδια, τα οποία φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στα 600 g, στους 4 °C. Με τη φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και του πυρήνα (P1 και P1') ενώ παραμένουν στο εναίωρημα οι διαλυτές πρωτεΐνες (S1). Το ίζημα P1 διαλύεται σε διάλυμα RIPA και φυλάσσεται. Το ίζημα P2 διαλύεται σε διάλυμα CSKII (10mM Pipes pH6.8, 50mM NaCl, 300mM sucrose, 6mM MgCl₂ και 1mM DTT) στο οποίο προστίθεται DNase I και επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστίθενται 250mM (NH₄)₂SO₄ και το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 25 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1200 g για 6 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο που προκύπτει S2, περιέχει τις πρωτεΐνες που προσδένονται στην χρωματίνη, καθώς αυτές απελευθερώθηκαν μετά απο την επεξεργασία με DNaseI. Το ίζημα P2 περιέχει τις αδιάλυτες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και αυτές της πυρηνικής μήτρας και επαναδιαλύεται σε διάλυμα RIPA.



Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας διαχωρισμού των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη (τροποποίηση απο [116]).

3.4.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά western είναι μια μέθοδος η οποία επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται σε ένα σύνθετο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την εξειδίκευση των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυμικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου
- Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα
- Ανίχνευση των πρωτεϊνών

3.4.5.1. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει τον μη-σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη. Το κάτω μέρος της πηκτής είναι υπεύθυνο για το σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος και ονομάζεται πηκτή διαχωρισμού. Το επάνω μέρος της πηκτής ονομάζεται πηκτή επιστοίβαξης και είναι υπεύθυνο για την επιστοίβαξη των πρωτεϊνών με σκοπό να σχηματίσουν ένα κοινό μέτωπο και με αυτό τον τρόπο

να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού με πυκνότητα 8,10,12 και 15%, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.4.5.1.

Πηκτή διαχωρισμού (separating)	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%
Acryl:bis (29:1)	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml	0.67ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	
1M Tris pH 6.8					0,5ml
H ₂ O	4.6ml	4ml	3.3ml	2.3ml	2.7ml
10 % SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
10 % APS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
TEMED	6μl	4μl	4μl	4μl	4 μl
Τελικός όγκος	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

Πίνακας 3. Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, αναμιγνύεται η κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης (40μg), με διάλυμα Laemmli 4X (1M Tris-HCl pH6.8, 3.6% glycerol, 3.6% SDS, 1% bromophenol blue, 4.2% β-mercaptoethanol). Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους 95°C για 5 λεπτά και φόρτωση στα φρεάτια της πηκτής . Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τάση 100 V μέχρι το μέτωπο να φτάσει στο τέλος της πηκτής και στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

3.4.5.2. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με βάση το μοριακό τους βάρος, μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρου 0.45mm. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών.

Πιο συγκεκριμένα, στη συσκευή υγρής μεταφοράς πρωτεϊνών τοποθετούνται με σειρά αρνητικός προς θετικός πόλος : 1 σφουγγαράκι

εμποτισμένο με διάλυμα μεταφοράς, 2 διηθητικά χαρτιά Whatman εμποτισμένα με διάλυμα μεταφοράς, πηκτή εμποτισμένη με διάλυμα μεταφοράς, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμποτισμένη σε υπερκάθαρο νερό, 2 διηθητικά χαρτιά Whatman εμποτισμένα με διάλυμα μεταφοράς και τέλος 1 σφουγγαράκι εμποτισμένο με διάλυμα μεταφοράς. Η συσκευή συναρμολογείται, τοποθετείται στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης και γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (για 1L διαλύματος 2.43 gr Tris και 11.16 gr γλυκίνης, συμπληρωμένο με 200 ml MeOH). Η μεταφορά πραγματοποιείται σε ψυχρό δωμάτιο (*coldroom*) στα 220 mA για περίπου 4 ώρες.

3.4.5.3. Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα

Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, που περιέχει διαχωρισμένες τις πρωτεΐνες του εκάστοτε δείγματος, μπλοκάρεται με τη βοήθεια διαλύματος άπαχου γάλακτος 5% και Tween 20 5% σε διάλυμα TBS για 1 ώρα υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο αυτό κρίνεται απαραίτητο για τη μείωση των μη ειδικών θέσεων αναγνώρισης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης προς μελέτη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπο ανάδευση. Η αραίωση καθώς και το μέσο αραίωσης του εκάστοτε αντισώματος πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα ακολουθούν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με TBS-T και η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα. Τέλος η μεμβράνη πλένεται με TBS-T, 4 φορές και πραγματοποιείται εμφάνιση για την ανίχνευση των πρωτεϊνών.

	Εταιρία	Κωδικός	Είδος	Αραίωση
<i>b- actin</i>	Millipore	MAB1501	Ποντίκι	1:10000
HuD	SantaCruz	Sc-28299	Ποντίκι	1:1000
Tuj1	Millipore	MAB1637	Ποντίκι	1:500
Nestin	Sigma	N5413	Κουνέλι	1:500
p27	Cell signaling	3686	Κουνέλι	1:500
CIITA	Αντι-ορός	-	Κουνέλι	1:500
pSTAT1	BD	612132	Ποντίκι	1:2000
HLA-DRA	Thermo	PA5-27553	Κουνέλι	1:500

a-tubulin	Sigma	T5168	Ποντίκι	1:1000
pH3	abcam	Ab14955	Ποντίκι	1:300
Lamin A	Αντι-ορός	-	Κουνέλι	1:1000
DCX	abcam	Ab18723	Κουνέλι	1:500
KLF4	abcam		Κουνέλι	1:500
GFP	Αντι-ορός	-	Κουνέλι	1:1000
Vimentin	Cell signaling	5741	Κουνέλι	1:1000

Πίνακας 4. Πρωτογενή αντισώματα.

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με HRP (*goat anti-rabbit, Thermo Scientific, #31460*), αραίωση 1:2500 – 1:5000
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με HRP (*goat anti-mouse, Jackson immunoresearch, #115-035-146*), αραίωση 1:5000

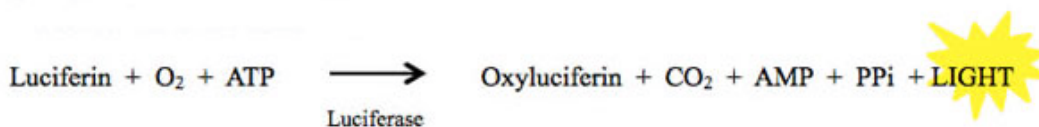
3.4.5.4. Ανίχνευση των πρωτεϊνών

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών, πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το πακέτο Lumilight western blotting Substrate, της εταιρίας Roche (ECL). Τα δύο διαλύματα ECL, αναμειγνύονται με αναλογία 1/1 και τοποθετούνται επάνω στη μεμβράνη. Η μεμβράνη καλύπτεται από το φως και επωάζεται για 2 λεπτά. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε ειδική κασέτα. Στον σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης η μεμβράνη έρχεται σε επαφή με φωτοευαίσθητο φιλμ αυτοραδιογραφίας το οποίο «προβάλλεται» από το φως που εκλύεται λόγω της χημειοφωταύγειας, δημιουργώντας ένα σήμα (σκουρόχρωμες ζωνώσεις) που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που αντέδρασε με το αντίσωμα.

3.4.5.5. Αντίδραση λουσιφεράσης

Η αντίδραση λουσιφεράσης είναι μια βιοχημική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως, για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεταγραφής. Η λουσιφεράση είναι ένα οξειδωτικό ένζυμο, το οποίο φυσιολογικά απαντάται σε αρκετούς βιολογικούς οργανισμούς. Το πιο ευρέως διαδεδομένο είναι η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας. Οι πυγολαμπίδες, είναι ικανές να εκπέμπουν φως, μέσω μιας χημικής αντίδρασης, κατά την οποία η λουσιφερίνη μετατρέπεται

σε όξυ-λουσιφερίνη με το ένζυμο της λουσιφεράσης. Κάποια απο την ενέργεια που απελευθερώνεται από αυτή την αντίδραση, βρίσκεται σε μορφή φωτός (**Εικόνα 30**). Το φώς που εκπέμπεται ανιχνεύεται από ειδική διάταξη που ονομάζεται λουμινόμετρο δίνοντας ποσοτικά αποτελέσματα.



Εικόνα 30. Χημική αντίδραση λουσιφεράσης.

Στα πειράματα λουσιφεράσης για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης ο υποκινητής του προς μελέτη γονιδίου βρίσκεται κλωνοποιημένος σε ειδικό φορέα, ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Με τον τρόπο αυτό, όσο πιο ενεργός είναι ένας υποκινητής, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το ποσοστό του φωτός που εκπέμπεται.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega, #E1910). Με το συγκεκριμένο πακέτο εκτός τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας, ανιχνεύεται και το φώς από τη Renilla λουσιφεράση, το οποίο προέρχεται από τη συν-διαμόλυνση των κυττάρων με ένα φορέα υπερέκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου (pRL-Renilla). Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η κανονικοποίηση των δειγμάτων.

Για τη μέτρηση της λουσιφεράσης, κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον προς μελέτη υποκινητή και το γονίδιο της Renilla, εκπλένονται με PBS. Σ αυτά προστίθενται 100 μl διαλύματος λύσης (*Passive Lysis Buffer*, PLB) και επώάζονται υπο ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό απελευθερώνεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, το οποίο στη συνέχεια συλλέγεται και φυγοκεντρείται. 1/5 του υπερκειμένου τοποθετείται σε ειδικά σωληνάρια του λουμινομέτρου. Ακολουθεί προσθήκη 50μl διαλύματος LARII (*Luciferase Assay Buffer II*) και μέτρηση λουσιφεράσης. Στη συνέχεια στο ίδιο σωληνάριο προστίθενται 50 μl διαλύματος STOP and Glo και γίνεται η μέτρηση της Renilla.

Τα τελικά αποτελέσματα της μέτρησης προκύπτουν από την παρακάτω μαθηματική εξίσωση: κανονικοποιημένη λουσιφεράση = (μικρότερη Renilla / Renilla δείγματος) X λουσιφεράση δείγματος.

3.5. Οπτικές μέθοδοι

3.5.1. Χρώση πυρήνα

Η χρώση του γενετικού υλικού του πυρήνα πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική DRAQ5 (*eBioscience*, #65088092) σε αραίωση 1/2000 σε PBS. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ικανότητα να διαπερνά τις μεμβράνες των κυττάρων και να προδένεται σε δίκλωνο DNA. Διεγείρεται στα 633 nm και εκπέμπει μπλέ χρώμα.

3.5.2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Τα φθοριοχρώματα, ή φθορίζουσες χρωστικές, εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από φως υψηλότερης ενέργειας. Οι φθορίζουσες χρωστικές είναι συνδεδεμένες με την περιοχή Fc των αντισωμάτων, ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Μερικές από τις πιο γνωστές φθορίζουσες χρωστικές είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC) που εκπέμπει πράσινο χρώμα, η ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (*Tetramethyl-rhodamine isothiocyanate*, TMRITC) που εκπέμπει κόκκινο χρώμα και η φυκοερυθρίνη (*R-phycoerythrin*, R-PE) που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ανιχνεύεται με ένα δεύτερο αντί-ισοτοπικό αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική.

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα κύτταρα επιστρώνονται σε γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 11mm στον πυθμένα φρεατίου 24 θέσεων και αφήνονται να αναπτυχθούν στις προς μελέτη συνθήκες. Ακολουθεί έκπλυση με PBS και προσθήκη παραφορμαλδεΐδης (*paraformaldehyde*, PFA) 4% για 10 λεπτά με σκοπό τη μονιμοποίησή τους. Στη συνέχεια εκπλένονται 3 φορές με PBS και προστίθεται διάλυμα ανοσοφθορισμού (TBS με 5% ορό γαϊδουριού και 5% triton X-100) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων και τη διευκόλυνση της εισόδου των αντισωμάτων. Ακολουθεί προσθήκη

των κατάλληλων πρωτογενών αντισωμάτων σε κατάλληλη αραίωση (πίνακας 5) σε διάλυμα ανοσοφθορισμού για 12-16 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια, τα δείγματα εκπλένονται 3 φορές με PBS και προστίθενται τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα κύτταρα εκπλένονται με PBS, γίνεται χρώση του πυρήνα όταν αυτό είναι απαραίτητο με DAPI ή DRAQ5 και μονιμοποιούνται σε αντικειμενοφόρους με τη χρήση ειδικού μέσου επικάλυψης (mounting medium).

	Εταιρία	Κωδικός	Είδος	Αραίωση
a-tubulin	Cell signaling	2144	Ποντίκι	1:1000
HuD	SantaCruz	Sc-28299	Ποντίκι	1:500
Tuj1	Millipore	MAB1637	Ποντίκι	1:500
Nestin	Sigma	N5413	Κουνέλι	1:500
Ki67	abcam	Ab15580	Κουνέλι	1:500
BrdU	Αντι-ορός	-	Κουνέλι	1:50
Flag	Sigma	F 1804	Ποντίκι	1:2000
CIITA	Αντι-ορός		Κουνέλι	1:500
Vimentin	Cell signaling	5741	Κουνέλι	1:500

Εικόνα 5. Πρωτογενή αντισώματα για ανοσοϊστοχημεία.

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής :

- Αντίσωμα κασίκας έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (*CF555 goat anti-rabbit , Biotium, # 20033*), αραίωση 1:1000
- Αντίσωμα κασίκας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική Alexa fluor που εκπέμπει στα 488nm, δίνοντας πράσινο χρώμα (*Alexa fluor 488 goat anti-mouse, Invitrogen, #A-11001*), αραίωση 1:1000

3.5.3. Αντίδραση 5'-βρώμο-2' δεοξουριδίνης (BrdU)

Η 5'-βρώμο-2' δεοξουριδίνη (*Bromodeoxyuridine, BrdU*), αποτελεί ένα συνθετικό χημικό ανάλογο της βάσης θυμιδίνης. Όταν βρεθεί στο περιβάλλον των κυττάρων, έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο DNA κατά τη διάρκεια της

αντιγραφής του (φάση S του κυτταρικού κύκλου) [117]. Μια σημαντική ιδιότητά της, είναι το γεγονός ότι κληροδοτείται στους απογόνους. Η ενσωμάτωση της BrdU μπορεί να ανιχνευτεί με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον του συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα που έχουν αναπαραγάγει ενεργά το DNA τους (BrdU⁺ κύτταρα).

Πρακτικά το συγκεκριμένο χημικό ανάλογο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δύο τρόπους. Κατά τον πρώτο τρόπο, τα κύτταρα εκτίθενται στο BrdU για ένα μικρό χρονικό διάστημα (pulse) και στη συνέχεια αφήνονται να πολλαπλασιαστούν (chase). Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση των ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Κατά τον δεύτερο τρόπο, τα κύτταρα αφήνονται να πολλαπλασιαστούν και το BrdU προστίθεται για ένα μικρό χρονικό διάστημα στο τέλος του πειράματος. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου.

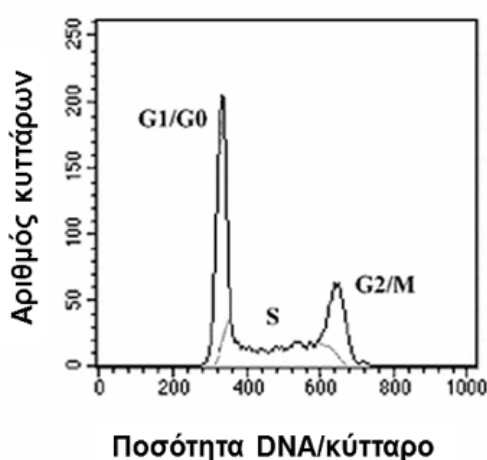
Στο τέλος του πειράματος, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με τη χρήση παράφορμαλδεΐδης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 4 εκπλύσεις με PBS και προσθήκη 2N HCL για 10 λεπτά. Η επεξεργασία με HCl, καθίσταται απαραίτητη καθώς το DNA μετουσιώνεται, έτσι ώστε το αντίσωμα να μπορέσει να προσεγγίσει και να προσδεθεί στην ουριδίνη. Στη συνέχεια ακολουθούν εκπλύσεις με PBS, προσθήκη διαλύματος ανοσοφθορισμού και έμμεσος ανοσοφθορισμός (βλ παράγραφος 3.5.2).

3.5.4. Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η ανάλυση FACS (Fluorescence-activated cell sorting) αποτελεί μια εξειδικευμένη μορφή κυτταρομετρίας ροής. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη μελέτη ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών όπου η ανάλυση γίνεται κύτταρο προς κύτταρο, με βάση κάποια χαρακτηριστικά του κάθε κυττάρου, όπως είναι η σκέδαση και ο φθορισμός. Παρέχει μια γρήγορη, αντικειμενική και ποσοτική καταγραφή των σημάτων φθορισμού από μεμονωμένα κύτταρα, καθώς και τη δυνατότητα φυσικού διαχωρισμού και απομόνωσης των κυττάρων [118].

Στην παρούσα μελέτη, η μεθοδολογία FACS χρησιμοποιήθηκε για τη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων στις διάφορες συνθήκες των πειραμάτων. Ο κυτταρικός κύκλος των ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων μιας

καλλιέργειας παρουσιάζει 2 κορυφές. Η κορυφή που βρίσκεται αριστερά, αντιστοιχεί στις φάσεις G0/G1 και εκείνη που βρίσκεται δεξιά, αντιστοιχεί στις φάσεις G2/M. Η περιοχή που βρίσκεται ενδιάμεσα απ' τις δυο κορυφές αντιπροσωπεύει τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, όπου αντιγράφεται το γενετικό υλικό (Hang et al., 2004) (**Εικόνα 31**). Η ανίχνευση της ποσότητας του DNA των κυττάρων και ο διαχωρισμός στις επιμέρους φάσεις γίνεται με τη χρήση της χρωστικής ιωδιούχου προπιδίου η οποία είναι ένα φθορίζον μόριο που συνδέεται στις βάσεις του DNA (ή RNA).



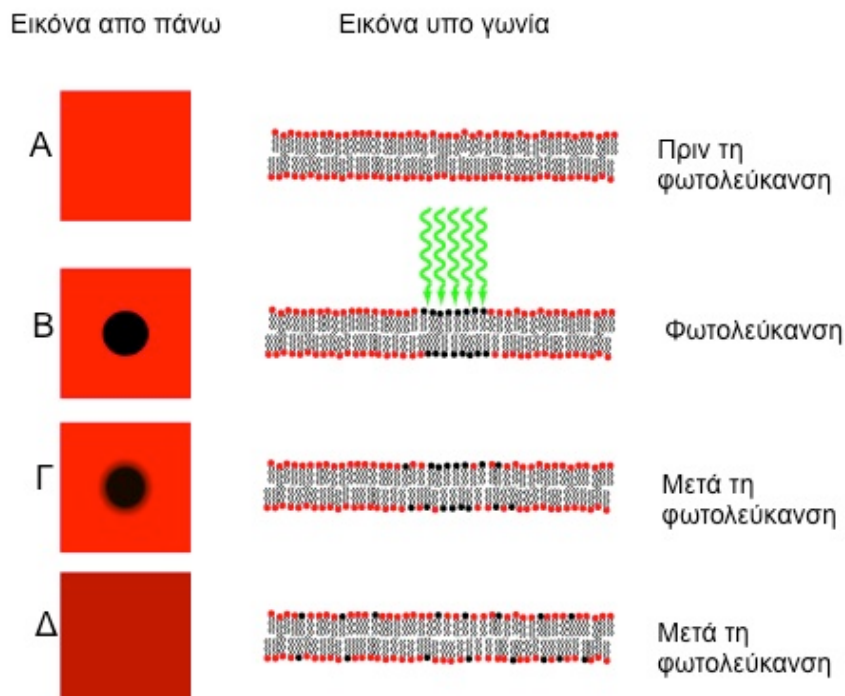
Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής (Τροποποίηση από: Hang et al., 2004).

Με σκοπό την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, τα κύτταρα υποβάλλονται σε επεξεργασία με τους κατάλληλους παράγοντες και φυγοκεντρώνονται στα 900rpm για 5 min. Εκπλένονται με 5 ml PBS, επαναιωρούνται σε 500μl διαλύματος PBS με 0,1% γλυκόζη και μονιμοποιούνται με 5ml παγωμένης 70% EtOH στάγδην, με ήπια ανάδευση σε αναδευτήρα vortex. Στο στάδιο αυτό είναι δυνατή η φύλαξή τους, στους 4 °C έως μια εβδομάδα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 900rpm για 5min και έκπλυση με PBS. Τελικά επαναδιαλύονται σε 300 μl διαλύματος ιωδιούχου προπιδίου με RNase, επωάζονται στους 37°C για 30 – 45min και αναλύονται στο κυτταρόμετρο.

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε Κυτταρομετρητή ροής BD Biosciences FACSCalibur Flow Cytometer.

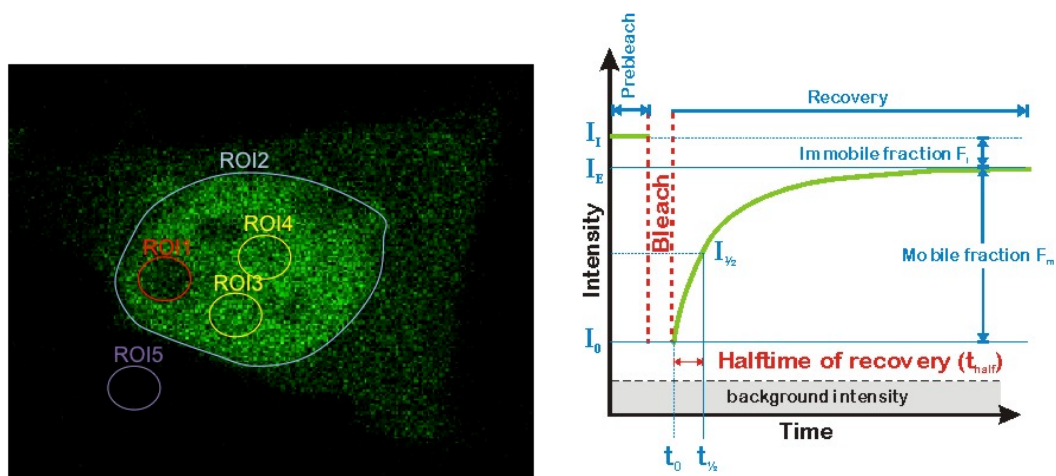
3.5.5. Επαναφορά φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP)

Η τεχνική λειτουργικής μικροσκοπίας FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κινητικής των πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα. Από τα δεδομένα των πειραμάτων, εξάγονται συμπεράσματα για τον τρόπο διάχυσης μιας πρωτεΐνης και την πιθανή δέσμευσή της σε κάποιο σύμπλοκο ή υποκυτταρική δομή. Κατά την τεχνική FRAP, σε κύτταρα διαμολυσμένα με την προς μελέτη πρωτεΐνη συζευγμένη με φθορίζουσα πρωτεΐνη, προκαλείται φωτολεύκανση με τη σύντομη εφαρμογή ισχυρής έντασης laser στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η φωτολεύκανση πραγματοποιείται σε μια συγκεκριμένου εμβαδού μικρή περιοχή του φθορίζοντος ζωντανού κύτταρου (ROI, Region Of Interest). Στη συνέχεια, με συνεχείς απεικονιστικές καταγραφές παρακολουθείται η επαναφορά του φθορισμού στην περιοχή αυτή σε σχέση με το χρόνο (**Εικόνα 32**). Η επαναφορά του φθορισμού στη συγκεκριμένη περιοχή ενδιαφέροντος, προκύπτει από τη μετακίνηση γειτονικών, μη φωτολευκασμένων, μορίων πρωτεΐνης.



Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας FRAP σε μια μεμβρανική φθορίζουσα πρωτεΐνη (τροποποίηση από Wikipedia).

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος FRAP, λαμβάνονται απεικονίσεις πριν τη φωτολεύκανση (pre-bleach images), κατά τη φωτολεύκανση (bleaching) καθώς και μετά από αυτή (post-bleach/recovery images). Η περιοχή της φωτολεύκανσης, αποτελεί την περιοχή του ενδιαφέροντος **ROI1** (Region Of Interest 1). Στις απεικονίσεις, ορίζονται τέσσερις ακόμη περιοχές ενδιαφέροντος : το σύνολο της περιοχής που κατανέμεται η προς μελέτη πρωτεΐνη **ROI2**, δύο περιοχές εντός κυττάρου που δεν έχει γίνει φωτολεύκανση **ROI3** και **ROI4** (*Unfrap*) και μια περιοχή εκτός κυττάρου που δεν υπάρχει πρωτεΐνη **ROI5** (*Background*) (Εικόνα 33 Α).



Εικόνα 33. (Α) Απεικόνιση ενός κυττάρου HeLa διαμολυσμένου με τη πρωτεΐνη CIITA-GFP. Στην εικόνα διαγράφονται οι περιοχές ενδιαφέροντος (ROIs) , που χρησιμοποιούνται σε ένα τυπικό πείραμα FRAP. **(Β)** Σχηματική αναπαράσταση μιας τυπικής κανονικοποιημένης καμπύλης FRAP, στην οποία διαφαίνονται οι βασικές παράμετροι του πειράματος.

Οι πιο βασικοί παράμετροι που προκύπτουν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι το κλάσμα της πρωτεΐνης που δεν κινείται (immobile fraction), το κλάσμα της πρωτεΐνης που κινείται (mobile fraction) και ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης $t_{1/2}$ (Εικόνα 33 Β). Το $t_{1/2}$ ουσιαστικά αποτελεί το χρόνο που χρειάζεται η πρωτεΐνη, για να επαναφθορίσει, στην περιοχή φωτολεύκανσης , στο μισό της αρχικής έντασης φθορισμού.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η διάμετρος των περιοχών ενδιαφέροντος που χρησιμοποιούνται είναι 1.5mm. Κατά τη διάρκεια του πειράματος λαμβάνονται 50 απεικονίσεις πριν τη φωτολεύκανση, πραγματοποιούνται 3 φωτολευκάνσεις και

λαμβάνονται 350 απεικονίσεις κατά τη διάρκεια της επαναφοράς. Ο χρόνος που μεσολαβεί των απεικονίσεων ανέρχεται σε 0.015 sec. Έπειτα οι τιμές φθορισμού που προκύπτουν από τις απεικονίσεις όλων των περιοχών ενδιαφέροντος σε όλους τους χρόνους του πειράματος κανονικοποιούνται με βάση τις παρακάτω μαθηματικές εξισώσεις:

$$\text{Intensity σε κάθε } t = \frac{\text{FRAP}_t - \text{background}_t}{\text{UNFRAP}_t - \text{background}_t}$$

$$I/I_0 = \frac{\text{Intensity στο συγκεκριμένο } t - \text{intensity } 1^{\text{st}} \text{ post bleach}}{\text{Prebleach average intensity} - \text{intensity } 1^{\text{st}} \text{ post blech}}$$

Εικόνα 34. Μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων FRAP.

Τα πειράματα FRAP, πραγματοποιήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (*Leica SP5-TCSII*), χρησιμοποιώντας το λογισμικό *FRAP Wizard* του *Leica LAS AF Lite*.

4. Αποτελέσματα

Μέρος Α

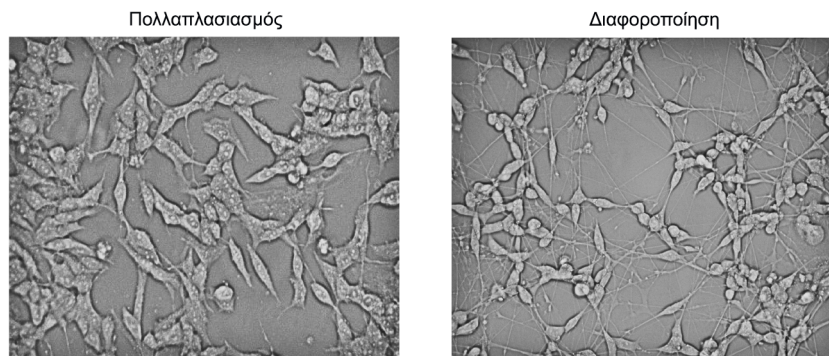
4.1. Μελέτη της επίδρασης της IFN γ στη βιολογία του νευροβλαστώματος

4.1.1. Τα κύτταρα SH-SY5Y ως κατάλληλο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη του νευροβλαστώματος

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι τα ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν υποκλώνο των κυττάρων SK-N-SH τα οποία απομονώθηκαν απο βιοψία μυελού των οστών ενός θηλυκού ασθενή νευροβλαστώματος τεσσάρων ετών (Ross et al 1983). Χαρακτηρίζεται ως N-τύπου κυτταρική σειρά, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων, περίπου 80% είναι τύπου N. Ως κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος διατηρεί την κυτταρική ετερογένεια που παρατηρείται στους όγκους και εκτός απο τα κύτταρα τύπου N περιέχει σε ποσοστό περίπου 20% κύτταρα τύπου S. Επίσης είναι γνωστό ότι υπάρχει δια-διαφοροποίηση μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων, με μηχανισμούς που δεν είναι γνωστοί (βλ. Παράγραφο 1.2.3.) [119].

Επιπρόσθετα, το συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα χρησιμοποιείται κατα κόρον για μελέτες που προσομοιάζουν το νευρικό σύστημα, λόγω της νευρικής γενεαλογίας των κυττάρων. Είναι πολύ γνωστό σύστημα για τη μελέτη ασθενειών του νευρικού συστήματος όπως της νόσου του Παρκινσον, καθώς εκφράζουν υψηλά επίπεδα υδροξυλάσης της τυροσίνης (*tyrosine hydroxylase*, TH) και β -υδροξυλάσης της ντοπαμίνης [120].

Το πιο διαδεδομένο πειραματικό πρωτόκολλο διαφοροποίησης προς τη νευρική γενεαλογία για τα κύτταρα αυτά είναι η αφαίρεση των μιτογόνων απο το μέσο καλλιέργειας, με την ταυτόχρονη προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (*Retinoic Acid*, RA). Η καλλιέργεια των κυττάρων στο παραπάνω μέσο για 7 με 8 ημέρες, θεωρείται ότι οδηγεί τα κύτταρα σε μια ώριμη κατάσταση νευρικής διαφοροποίησης, καθώς επάγεται μια πλειάδα πρωτεϊνών- δεικτών της νευρικής διαφοροποίησης [121] [122] [123].

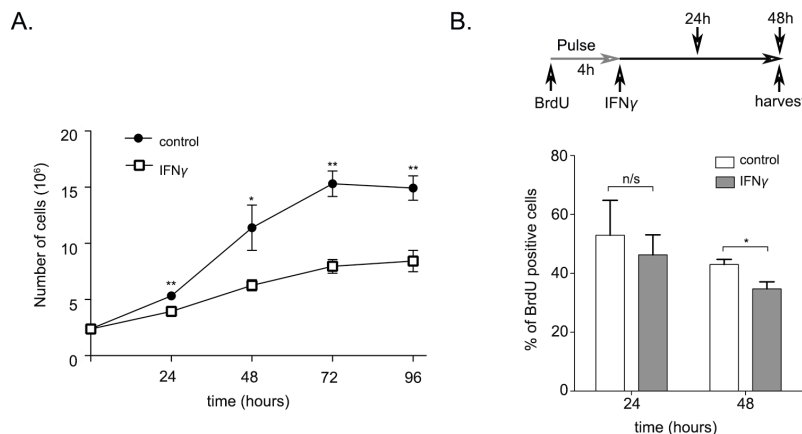


Εικόνα 35. Μορφολογία SH-SY5Y κυττάρων κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού (αριστερά) ή της νευρικής διαφοροποίησης (δεξιά) για 7 ημέρες με RA.

4.1.2. Η IFN γ μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθυστερώντας τη διέλευση τους από την φάση S του κυτταρικού κύκλου

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου είναι η ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού. Αρκετές μελέτες του παρελθόντος έχουν συσχετίσει την παρουσία IFN γ με τη μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού νευροβλαστωματικών κυτταρικών σειρών χωρίς ωστόσο να διασαφινίζουν τον μηχανισμό με τον οποίο αυτό πραγματοποιείται [27] [29] [124]. Έτσι αρχικό μας στόχο αποτέλεσε η περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της IFN γ στην ικανότητα πολλαπλασιασμού του βιολογικού μας συστήματος. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 1 έως 4 ημέρες σε πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης απουσίας ή παρουσίας 200 u/ml ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IFN γ . Σε κάθε χρονικό σημείο ο αριθμός των κυττάρων προσδιοριζόταν με αιμοκυτταρόμετρο. Σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκε σταθερή και στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων παρουσία IFN γ από την πρώτη κιάλας ημέρα καλλιέργειας (**Εικόνα 36 A**). Η μείωση του πολλαπλασιασμού επιβεβαιώθηκε με δοκιμασίες ενσωμάτωσης του χημικού αναλόγου BrdU. Το BrdU έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό μόνο κατά την αντιγραφή του και φυσικά κληροδοτείται στους απογόνους των κυττάρων. Έτσι καλλιεργήσαμε τα κύτταρα παρουσία BrdU για 4 ώρες, στη συνέχεια το BrdU αφαιρέθηκε και τα κύτταρα αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν για 24 ή 48 ώρες απουσία ή παρουσία IFN γ . Εφαρμόστηκε το

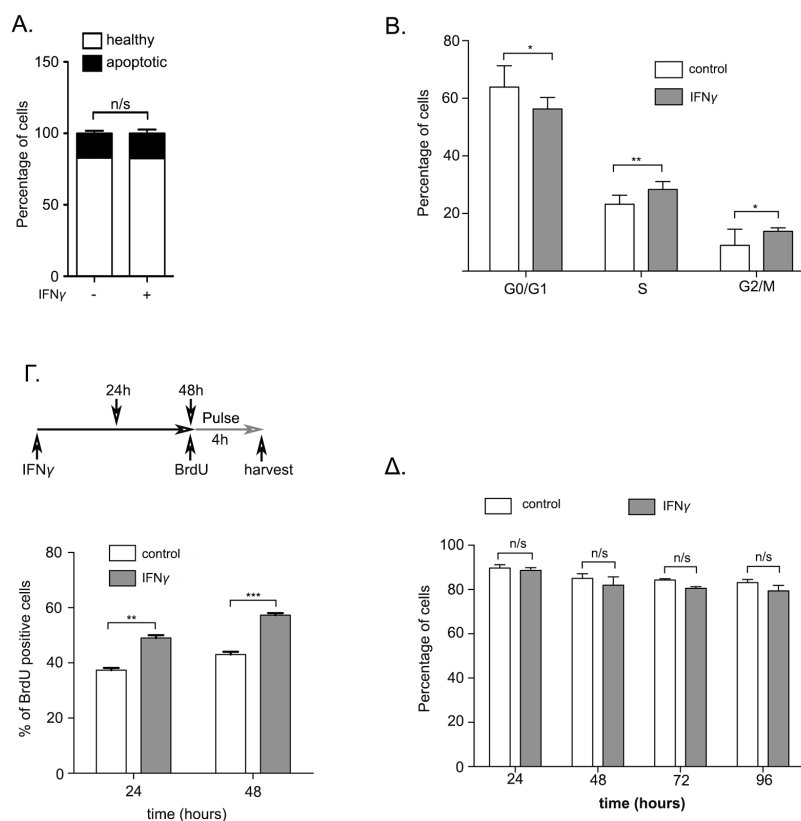
πρωτόκολλο χρώσης με αντί-BrdU, και το αποτέλεσμα (**Εικόνα 36 B**) επιβεβαίωσε εκείνο της καμπύλης πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 36 A**) καθώς η παρουσία IFN γ οδήγησε σε μειωμένο αριθμό BrdU+ κυττάρων, αποτέλεσμα που υποδηλώνει συνδυαστικά μειωμένο πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 36. Η IFN γ μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (A) Αριθμός των κυττάρων απουσία (control) ή παρουσία IFN γ στις 1 έως 4 ημέρες καλλιέργειας. (B) Δοκιμασία ενσωμάτωσης BrdU. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων για BrdU, μετρήθηκε μετά από 24 ή 48 ώρες καλλιέργειας. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ μέση διακύμανση ($\pm$ SEM), $n=3$.

Η μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που παρατηρήσαμε, θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε κυτταρικό θάνατο είτε σε έξοδο-καθυστέρηση της μετάβασης των κυττάρων σε κάποιο σημείο του κυτταρικού κύκλου. Έτσι αρχικά ελέγξαμε αν η IFN γ προκαλεί κυτταρικό θάνατο, με δοκιμασία ανεξίνης (*annexin-V/7-AAD assay*) σε κυτταρόμετρο ροής. Παρατηρήσαμε ότι το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων δε μεταβάλλεται (**Εικόνα 37 A**) άρα η μείωση του πολλαπλασιασμού δεν οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο. Το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκεται σε κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου ελέγχθηκε με χρώση PI και κυτταρόμετρο ροής. Παρατηρήσαμε ότι η IFN γ αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου (**Εικόνα 37 B**). Η αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στην S φάση, επιβεβαιώθηκε με δοκιμασίες ενσωμάτωσης BrdU. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ή 48 ώρες παρουσία ή απουσία IFN γ και στο τέλος προστέθηκε σε αυτά BrdU για μόνο 4 ώρες. Η χρώση με anti-BrdU υπέδειξε ότι το ποσοστό των BrdU+ κυττάρων είναι

μεγαλύτερο όταν τα κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί με IFN γ (**Εικόνα 37 Γ**). Τέλος με σκοπό να διαπιστώσουμε αν η αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση, οφείλεται σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο ή σε καθυστέρηση της διέλευσης από αυτή τη φάση, προχωρήσαμε σε χρώση των κυττάρων έναντι της πρωτεΐνης ki-67. Η πρωτεΐνη ki-67 εκφράζεται στα κύτταρα που βρίσκονται εντός του κυτταρικού κύκλου, ενώ καταστέλλεται όταν εξέρχονται απ αυτόν [125]. Παρατηρήσαμε ότι η IFN γ δεν επηρεάζει το ποσοστό των θετικών για ki-67+ κυττάρων (**Εικόνα 37 Δ**) γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρουσία της IFN γ επιβραδύνει τη διέλευση των κυττάρων από τη φάση S του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 37. Η IFN γ καθυστερεί τη διέλευση των κυττάρων από την S φάση του κυτταρικού κύκλου. (Α) Δοκιμασία annexin-V / 7AAD σε κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί για 48 ώρες. (Β) Ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου στις 48 ώρες. (Γ) Ποσοστά θετικών για BrdU (BrdU+) κύτταρα. Το BrdU προστέθηκε στο τέλος με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται ή πέρασαν από την S φάση. (Δ) Ποσοστά θετικών για ki-67 κυττάρων (ki-67+). Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους +/- μέση διακύμανση (+/- SEM), n=3.

Συνοπτικά λοιπόν τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία IFN γ σε ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y, μειώνει τον πολλαπλασιασμό, καθυστερώντας τη διέλευση τους από την S φάση του κυτταρικού κύκλου. Κάτι παρόμοιο δεν έχει περιγραφεί στο παρελθόν. Αντιθέτως μια προηγούμενη μελέτη της επίδρασης της IFN γ στον κυτταρικό κύκλο κυττάρων Raju (φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα απομονωμένα από τη νευρική ακρολοφία), έδειξε αύξηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στη G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου [25]. Αυτή η διαφορά μπορεί να συνδέεται με τον καρκινικό φαινότυπο των κυττάρων SH-SY5Y. Η καθυστέρηση στη φάση S που παρατηρήσαμε στη συγκεκριμένη μελέτη, θα μπορούσε να υποδηλώνει αυξημένη ανάγκη των κυττάρων να επιδιορθώσουν βλάβες στο γενετικό τους υλικό, που πιθανώς έχουν προκύψει, έτσι ώστε να διασφαλίσουν την πιστότητα μεταβίβασης γενετικού υλικού στους απογόνους. Παρόμοια αύξηση παραμονής των κυττάρων στην φάση S, προκειμένου να ελέγχουν την ποιότητα του διπλασιαζόμενου DNA έχει παρατηρηθεί σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα που δεν έχουν «δεσμευθεί» να διαφοροποιηθούν [126].

4.1.3. Η IFN γ προωθεί την εμφάνιση πρώιμων δεικτών νευρικής διαφοροποίησης

Το νευροβλάστωμα προέρχεται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας τα οποία αδυνατούν να διαφοροποιηθούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Έτσι οι περισσότερες στρατηγικές θεραπείας μέχρι σήμερα έχουν ως στόχο τη διαφοροποίηση των κυττάρων με σκοπό να μειώσουν τις καρκινικές τους ιδιότητες. Η θεραπεία του νευροβλαστώματος με IFN γ έχει περιγραφεί στο παρελθόν ως ευεργετική καθώς αυξάνει πρώιμα χαρακτηριστικά της νευρικής διαφοροποίησης, όπως η επαγωγή της νευριτικής αύξησης, χωρίς ωστόσο να έχει περιγραφεί με λεπτομέρεια το αποτέλεσμα αυτής [25] [26] [28] [29] [124] [127]. Λαμβάνοντας υπόψη τη μείωση του πολλαπλασιασμού που παρατηρήσαμε επόμενος στόχος ήταν η λεπτομερής μελέτη της επίδρασης της IFN γ στη νευρική διαφοροποίηση.

Αρχικά επιλέξαμε να μελετήσουμε αρχικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης. Καλλιεργήσαμε κύτταρα σε χαμηλό ορό (1% FBS) για 2 ημέρες με IFN γ , RA ή συνδυασμό των δύο παραγόντων (RA+ IFN γ) (**Εικόνα 38 Α**). Το πρώτο μορφολογικό χαρακτηριστικό που μελετήθηκε, ήταν η νευριτική αύξηση.

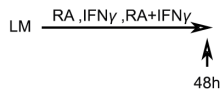
Μετρήθηκαν τα κύτταρα που είχαν μήκος νευριτών μεγαλύτερο κατά 1.5 φορές τη διάμετρο του σώματος. Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ότι η καλλιέργεια των κυττάρων με IFN γ επάγει παρόμοια ποσοστά νευριτικής αύξησης με εκείνα του RA, γνωστό παράγοντα διαφοροποίησης προς τη νευρική μοίρα (**Εικόνα 38 Β**).

Στα πλαίσια των ευρημάτων για τη νευριτική αύξηση, ακολούθησε έλεγχος των κυττάρων για κυτταροσκελετικές αλλαγές. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη β -τουμπουλίνη, μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Παρατηρήθηκε ότι η IFN γ προκαλεί έντονες κυτταροσκελετικές αλλαγές στα κύτταρα, τόσο μόνη της όσο και σε συνδυασμό με το RA (**Εικόνα 38 Γ**, επάνω πλαίσιο). Επιπροσθέτως ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης HuD η οποία εκφράζεται αποκλειστικά σε νευρικά κύτταρα, επάγεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης και έχει την ικανότητα να προσδένει RNA. Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιεί και αυξάνει τον χρόνο ημιζωής μορίων mRNA [128]. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της τόσο απο IFN γ όσο και απο RA, ενώ όπως και στην περίπτωση της β -tubulin, η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο παραγόντων προκάλεσε περαιτέρω επαγωγή (**Εικόνα 38 Γ**, κάτω πλαίσιο). Η συνεργατικότητα αυτή ίσως υποδηλώνει αποτελεσματικότερη ή ταχύτερη νευρική διαφοροποίηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη HuD, ελέγχει μεταξύ άλλων και την σταθερότητα του mRNA του γονιδίου GAP-43, και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της HuD αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης GAP43, και επιταχύνει τη νευριτική αύξηση που επάγεται από το RA [129].

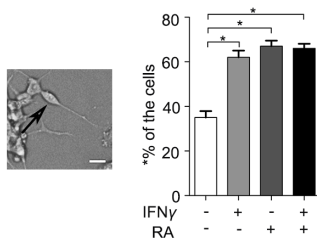
Ένα άλλο σημαντικό μορφολογικό χαρακτηριστικό της νευρικής διαφοροποίησης αποτελεί η δημιουργία συναπτικών κυστιδίων. Τα συναπτικά κυστίδια είναι δομές επάνω στους νευρίτες που συγκεντρώνουν πρωτεΐνες οι οποίες βοηθούν στη δημιουργία της σύναψης και στην έκκριση νευροδιαβιβαστών. Τα συναπτικά αυτά κυστίδια μπορούν να είναι ενεργά, να βοηθούν δηλαδή στη δημιουργία της σύναψης, είτε ανενεργά [130]. Με οπτική μικροσκοπία μετρήθηκε ο αριθμός και το μέγεθος των συναπτικών κυστιδίων, επάνω στους νευρίτες. Παρατηρήθηκε ότι η IFN γ αυξάνει περίπου 3 φορές τον αριθμό των κυττάρων με συναπτικά κυστίδια επάνω στους νευρίτες. Παρόμοια ποσοστά παρατηρήθηκαν και

στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν είτε με RA είτε με συνδυασμό των δύο παραγόντων (Εικόνα 38 Δ). Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε αύξηση και στο μέγεθος των συναπτικών κυστιδίων στους νευρίτες των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν είτε με IFN γ , είτε με ρετινοϊκό οξύ, το οποίο ξεπερνούσε τις 2 φορές το μέγεθος των φυσιολογικών συναπτικών κυστιδίων. Περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη αύξηση, παρατηρήθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν ταυτόχρονα και με τους δύο παράγοντες (Εικόνα 38 Ε).

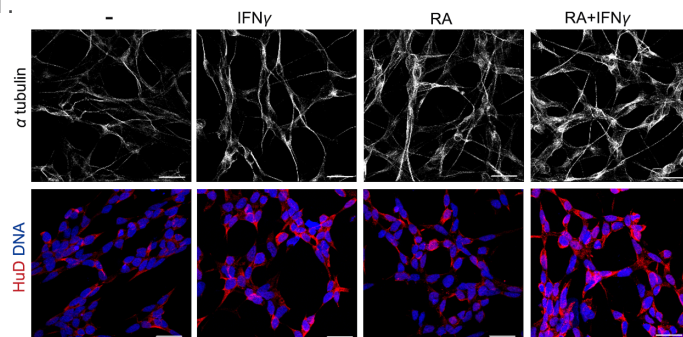
A.



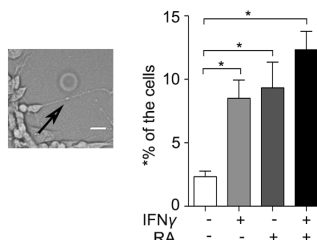
B.



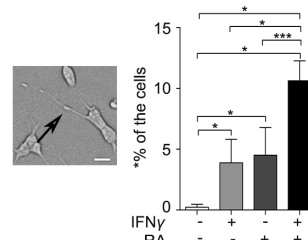
Γ.



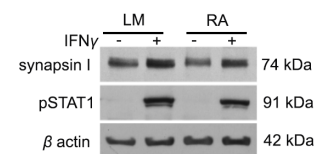
Δ.



Ε.



ΣΤ.



Εικόνα 38. Η παρουσία IFN γ προκαλεί επαγωγή μορφολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών της νευρικής διαφοροποίησης, στις 2 ημέρες θεραπείας, σε παρόμοιο βαθμό με αυτόν του RA. (A) Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε. (B) Αριστερά, αντιπροσωπευτική εικόνα οπτικού μικροσκοπίου όπου εντοπίζεται ένα κύτταρο με νευρίτη μεγαλύτερο της διαμέτρου του σώματος και δεξιά, γράφημα στο οποίο φαίνονται τα ποσοστά των κυττάρων με μεγάλους νευρίτες. (Γ) Εικόνες απο συνεστιακής μικροσκοπίας που απεικονίζουν τον εντοπισμό της β τουμπουλίνης (επάνω πλαίσιο) και της πρωτεΐνης HuD (κάτω πλαίσιο). (Δ) Αριστερά, αντιπροσωπευτική εικόνα οπτικού μικροσκοπίου όπου φαίνεται ένα συναπτικό κυστίδιο και δεξιά, γράφημα στο οποίο συγκρίνονται τα ποσοστά των κυττάρων με συναπτικά κυστίδια στους νευρίτες. (Ε) Όπως το (Δ) αλλά για τα μεγάλης διαμέτρου συναπτικά κυστίδια στους νευρίτες. (ΣΤ)

Πρωτεϊνικά επίπεδα της συναπτικής πρωτεΐνης Synapsin I. Τα επίπεδα της β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ μέση διακύμανση ($\pm$ SEM), $n=3$, scale bar 20 μ m.

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Synapsin I. Η πρωτεΐνη αυτή, βρίσκεται συνδεδεμένη στην κυτταροπλασματική πλευρά των συναπτικών κυστιδίων και αποτελεί περίπου το 6% των συνολικών πρωτεϊνών των συναπτικών κυστιδίων. Ο ρόλος της είναι πολύ σημαντικός στη δημιουργία νέων αξόνων και συνάψεων, καθώς και στη ρύθμιση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών [131]. Ενώ τα επίπεδά της δε μεταβάλλονται παρουσία RA, η IFN γ προκάλεσε σημαντική αύξηση (**Εικόνα 38 ΣΤ**).

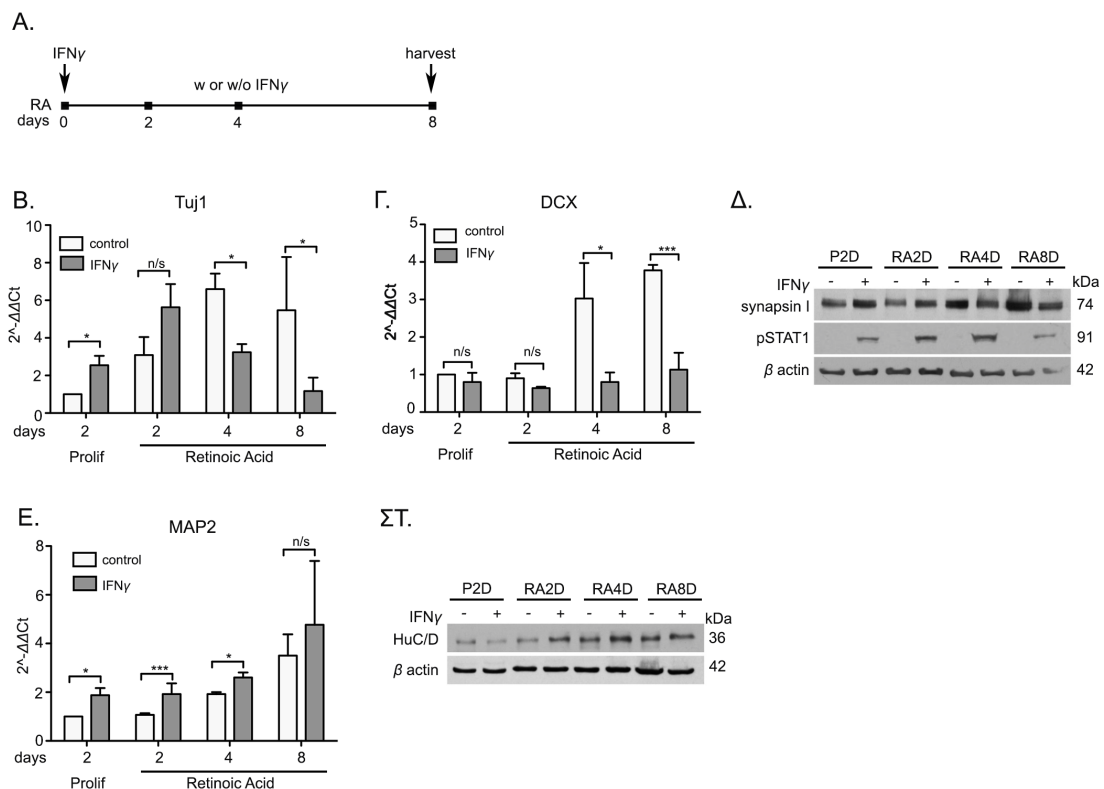
Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ένα σαφή, και ιδιαίτερο ρόλο της IFN γ στη διαφοροποίηση των νευροβλαστωμάτων, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια αυτής της διαδικασίας. Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε λεπτομερής περιγραφή μορφολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών, τα οποία επάγονται από IFN γ και προάγουν τη νευρική διαφοροποίηση. Επίσης παρατηρήθηκε μια συνέργεια μεταξύ της IFN γ και του αναπτυξιακού παράγοντα διαφοροποίησης RA. Η συνέργεια αυτή θα μπορούσε να οδηγεί τα κύτταρα σε μια αποτελεσματικότερη ή ταχύτερη διαφοροποίηση προς τη νευρική μοίρα. Αυτά τα *in vitro* αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο συνδυασμός IFN γ και RA ίσως είναι ικανός, προοθώντας την καλύτερη διαφοροποίηση των κυττάρων εάν εφαρμοστεί έγκαιρα, να έχει ευεγερτικότερα θεραπευτικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του νευροβλαστώματος.

4.1.4. Η χρόνια έκθεση σε IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA, αλλάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης

Η καλλιέργεια των SH-SY5Y κυττάρων σε χαμηλό ορό με ταυτόχρονη παρουσία IFN γ και RA, όπως περιγράφηκε νωρίτερα, οδηγεί σε δραστικότερη διαφοροποίηση. Ωστόσο η διαδικασία της νευρικής διαφοροποίησης περνά από διάφορα στάδια, έως ότου τα κύτταρα φτάσουν σε μια τελική ώριμη κατάσταση στην οποία έχουν πια καθορίσει τη μοίρα τους. Έτσι στη συνέχεια αποφασίσαμε να

ελέγχουμε την επίδραση της IFN γ σε πιο όψιμα στάδια της νευρικής διαφοροποίησης.

Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν με ταυτόχρονη παρουσία IFN γ και RA για διάφορες χρονικές περιόδους, μέχρι την 8η ημέρα, στην οποία θεωρείται ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν φτάσει σε μια τελική κατάσταση διαφοροποίησης (**Εικόνα 39 Α**). Αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA, των γονιδίων *Tuj1* και *DCX*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν δείκτες της νευρικής διαφοροποίησης και φυσιολογικά η έκφρασή τους επάγεται καθώς η νευρική διαφοροποίηση προχωρά [132] [133]. Όπως και αναμενόταν, τα επίπεδα και των δύο γονιδίων αυξάνονται καθώς εξελίσσεται η διαφοροποίηση παρουσία RA (**Εικόνα 39 Β,Γ/ λευκές μπάρες**). Με μεγάλη μας έκπληξη όμως, παρατηρήσαμε ότι η παρουσία IFN γ , μετά την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης, οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων και των δύο γονιδίων (**Εικόνα 39 Β,Γ/ γκρι μπάρες**). Παρόμοια συμπεριφορά έδειξαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της synapsin I. Πιο συγκεκριμένα, ενώ στην αρχή της διαφοροποίησης (2^η ημέρα) τα επίπεδά της αυξάνονται παρουσία IFN γ , μετά την τέταρτη ημέρα τα επίπεδά της παραμένουν σταθερά και σαφώς μειωμένα συγκρινόμενα με εκείνα του RA (**Εικόνα 39 Δ**).



Εικόνα 39. Η συνεχής παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης ασκεί διττή επίδραση στην πορεία εμφάνισης νευρικών, με κρίσιμο σημείο την τέταρτη ημέρα. (Α) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε. (Β) Επίπεδα mRNA του γονιδίου *Tuj1*. (Γ) Επίπεδα mRNA του γονιδίου *DCX*. (Δ) Πρωτεϊνικά επίπεδα *synapsin I* και *pSTAT1*. Τα επίπεδα της β -ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης. (Ε) Επίπεδα mRNA του γονιδίου *MAP2*. (ΣΤ) Πρωτεϊνικά επίπεδα *HuC/D*. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ μέση διακύμανση ($\pm$ SEM), $n=3$, scale bar 20 μm .

Τα παραπάνω ευρήματα, δεν αποτέλεσαν κανόνα. Άλλοι νευρικοί δείκτες έδειξαν την ίδια τάση απόκρισης στην IFN γ σε όλη την περίοδο της διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, τόσο τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *MAP2*, όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του *HuD*, βρέθηκαν να επάγονται συνεχόμενα και σημαντικά από την IFN γ από την ημέρα 1 έως την ημέρα 8 (**Εικόνα 39 Ε, ΣΤ**).

Ανακεφαλαιώνοντας παρατηρήθηκε ότι η παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης που προκαλείται από το RA έχει μια διττή επίδραση στην έκφραση ορισμένων νευρικών γονιδίων. Από τη μια πλευρά κάποια γονίδια επάγονται συνεχόμενα μέχρι το τελικό σημείο διαφοροποίησης υποδηλώνοντας ότι η παρουσία IFN γ οδηγεί σε πιο ώριμα νευρικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση κάποιων άλλων γονιδίων αρχικά επάγεται αλλά στη συνέχεια μειώνεται με κρίσιμο χρονικό σημείο καμπής, την τέταρτη ημέρα. Τα παραπάνω ευρήματα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη μελέτη, και δείχνουν μια σύνθετη επίδραση της IFN γ στην πορεία διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη την ετερογένεια των νευροβλαστωματικών σειρών (βλ. και παράγραφο 1.2.3.), η IFN γ ίσως επηρεάζει έναν υποπληθυσμό μόνο κυττάρων του νευροβλαστώματος ή το πιθανότερο, σηματοδοτεί με διαφορετικό τρόπο στις διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων.

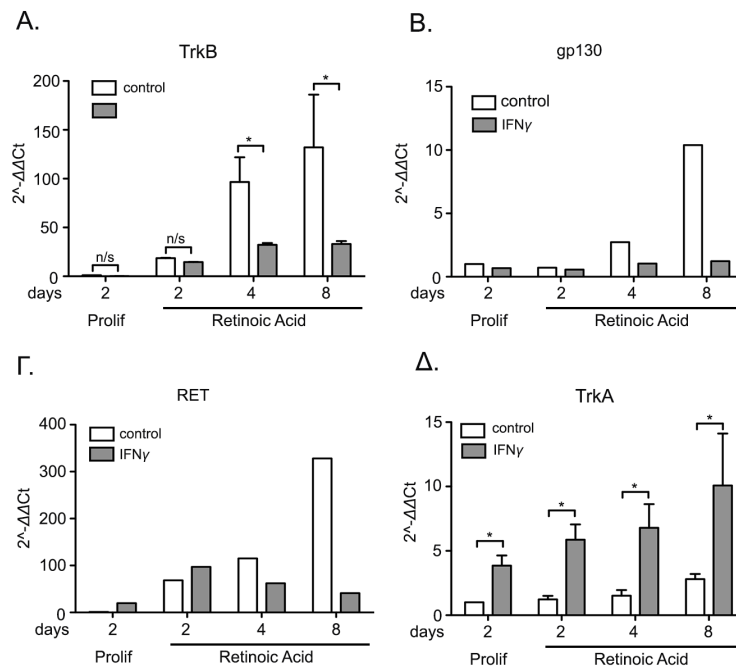
4.1.5. Η συνεχής έκθεση σε IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA, αλλάζει την απόκριση των κυττάρων στους νευροτροφικούς παράγοντες

Μια από τις πιο σημαντικές οικογένειες μορίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων είναι οι νευροτροφικοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί είναι εκκρινόμενοι, συναντώνται τόσο στο ΠΝΣ όσο και στο ΚΝΣ και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της μοίρας των κυττάρων ή του νευροδιαβιβαστή που θα εκκρίνουν. Μια ιδιαίτερη, και πολύ εξειδικευμένη κατηγορία τέτοιων παραγόντων είναι οι νευροτροφίνες, συγκεκριμένα ο NGF (*Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (*Neurotrophin-3*) και ο NT-4 (*Neurotrophin-4*). Οι παράγοντες αυτοί σηματοδοτούν μέσω των υποδοχέων υψηλής συγγένειας που διαθέτουν, TrkA, TrkB και TrkC αντίστοιχα. Επίσης όλοι οι νευροτροφικοί παράγοντες είναι δυνατό να σηματοδοτήσουν μέσω του κοινού υποδοχέα χαμηλής συγγένειας p75 [134] [135]. Εκτός από τις νευροτροφίνες, υπάρχουν και άλλοι νευροτροφικοί παράγοντες που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες αλλά οι δράσεις τους σχετίζονται άμεσα με την επιβίωση και τη μοίρα των νευρικών κυττάρων. Ένας από αυτούς είναι ο CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), ο οποίος εκφράζεται σε νευρικά κύτταρα, καθώς και κύτταρα γλοίας τόσο στο ΠΝΣ όσο και στο ΚΝΣ. Ο CNTF σηματοδοτεί μέσω πρόσδεσής του στον υποδοχέα gp130 [136]. Τέλος ο τροφικός παράγοντας GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*) σηματοδοτεί μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα του RET και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ντοπαμινεργικών και χολινεργικών νευρώνων [137].

Όπως προαναφέρθηκε, από τα προηγούμενα αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA, αλλάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων. Αυτό διότι η συμπεριφορά τους διαφέρει αρκετά από αυτή που επάγεται από το RA. Μιας και η πιο σημαντική κατηγορία εξωγενών μορίων που μπορούν να αλλάξουν τη μοίρα των νευρικών κυττάρων είναι οι νευροτροφικοί παράγοντες, αποφασίσαμε να ελέγξουμε τυχόν μεταβολές στα επίπεδα των υποδοχέων τους.

Με PCR πραγματικού χρόνου, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των υποδοχέων TrkB, gp130 και RET. Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, παρατηρήθηκε αύξηση των

επιπέδων τους κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA [138] [139] [140] (**Εικόνα 40 Α-Γ**, λευκές μπάρες). Η παρουσία IFN γ όμως, οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων και των τριών υποδοχέων καθ' όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης (**Εικόνα 40 Α-Γ**, γκρί μπάρες). Από την άλλη πλευρά τα επίπεδα του TrkA, ενώ ήταν σε σταθερά χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης απο RA, παρουσία IFN γ αυξήθηκαν δραματικά (**Εικόνα 40 Δ**).

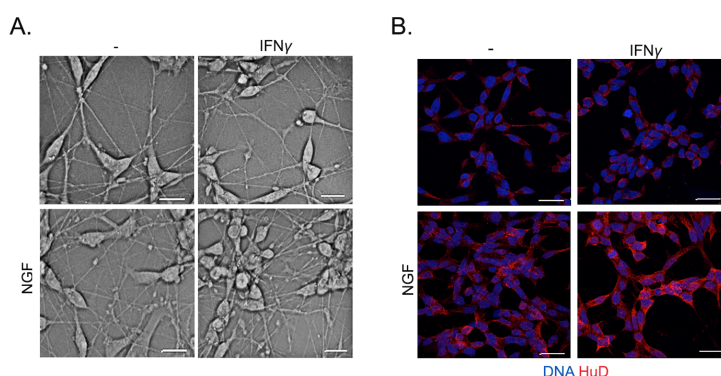


Εικόνα 40. . Η IFN γ προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων των νευροτροφικών παραγόντων. Ανάλυση με RT-qPCR των επιπέδων mRNA των γονιδίων (Α) TrkB, (Β) gp130, (Γ) RET και (Δ) TrkA. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους +/- μέση διακύμανση (+/- SEM).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται ένας νέος ρόλος της IFN γ στην απόκριση των νευροβλαστωματικών κυττάρων στους νευροτροφικούς παράγοντες. Είναι γνωστό ότι η διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων με RA κάνει τα κύτταρα να αποκτούν κατεχολαμινεργικά χαρακτηριστικά [141]. Η παρουσία του BDNF ευνοεί τον ντοπαμινεργικό φαινότυπο ενώ η παρούσα NGF το νοραδρενεργικό [142] [143]. Η αύξηση των επιπέδων του υποδοχέα υψηλής συγγένειας του NGF, TrkA, και η ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των υποδοχέων

των άλλων παραγόντων, θα μπορούσε να υποδεικνύει αλλαγή στην μοίρα των κυττάρων, και πιο συγκεκριμένα στο νευροδιαβιβαστικό τους φαινότυπο.

Έτσι με σκοπό να αποδείξουμε ότι τα υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου *TrkA* που παρατηρούνται παρουσία IFN γ μεταφράζονται σε πρωτεΐνη και οδηγούν σε αυξημένη απόκριση στον NGF, χρησιμοποιήσαμε ανασυνδυασμένο ανθρώπινο NGF. Κύτταρα αφέθηκαν να διαφοροποιηθούν με RA χωρίς ή με IFN γ για 2 ημέρες. Στη συνέχεια NGF σε συγκέντρωση 20 ng/ml προστέθηκε για μια επιπλέον μέρα και μετρήθηκε η νευριτική αύξηση των κυττάρων. Η προσθήκη NGF στα κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία με IFN γ , προκάλεσε εκτεταμένη νευριτική αύξηση (**Εικόνα 41 A**). Επίσης αύξηση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα της νευρικής πρωτεΐνης HuD (**Εικόνα 41 B**), αποδεικνύοντας τη λειτουργικότητα του *TrkA* που επάγεται από την IFN γ .



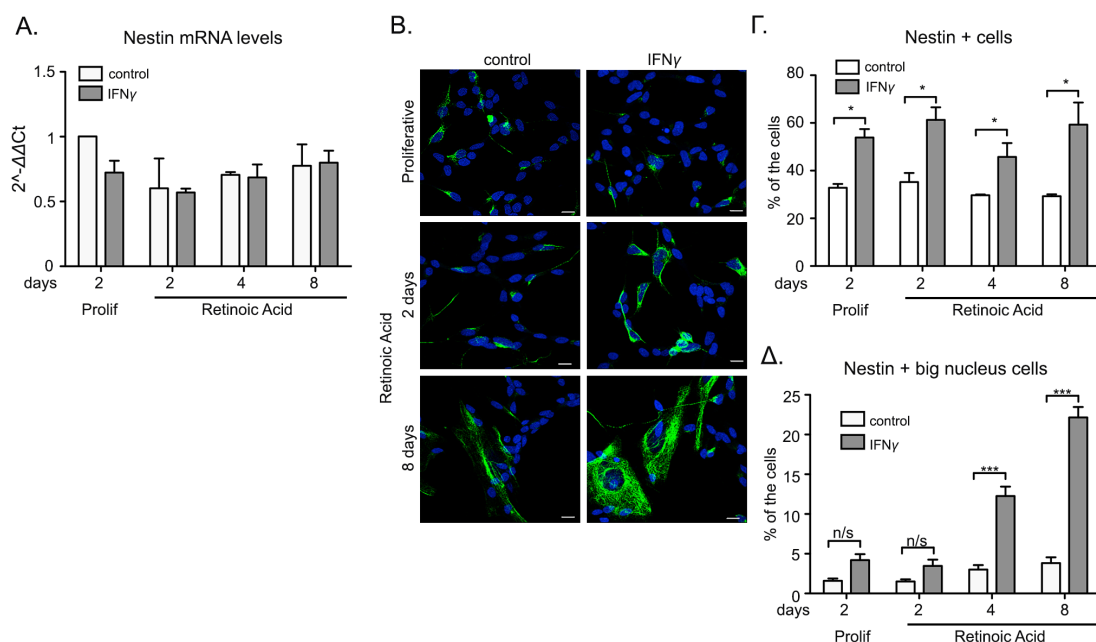
Εικόνα 41. *Ο εξωγενής NGF σηματοδοτεί αποτελεσματικότερα στα κύτταρα μετά την επίδραση της IFN γ . (A) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου. (B) Ανοσοϊστοχημεία για την νευρική πρωτεΐνη HuD που δείχνει την αποτελεσματικότερη σηματοδότηση του NGF. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DRAQ5. n=3, scale bar 20 μ m.*

4.1.6. Η δράση της IFN γ προκαλεί και την εμφάνιση πρωτεϊνών-δεικτών που δε σχετίζονται με τη νευρική μοίρα

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y χαρακτηρίζεται ως τύπου N, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων περίπου 80% αποτελείται από κύτταρα τύπου N, ενώ το υπόλοιπο 20% από κύτταρα τύπου S (βλ. παράγραφο 4.1.1). Οι δύο αυτοί τύποι έχουν διαφορετικά κυτταρικά χαρακτηριστικά και ανταποκρίνονται διαφορετικά στους παράγοντες διαφοροποίησης, καθώς μόνο τα κύτταρα τύπου N

κατευθύνονται προς τη νευρική μοίρα από το RA. Έχοντας ως γνώμονα τη διττή επίδραση της IFN γ στους δείκτες διαφοροποίησης που ελέγξαμε, την ετερογένεια και την πλαστικότητα των κυττάρων SH-SY5Y, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε μελέτη δεικτών που δεν σχετίζονται με τη νευρική μοίρα.

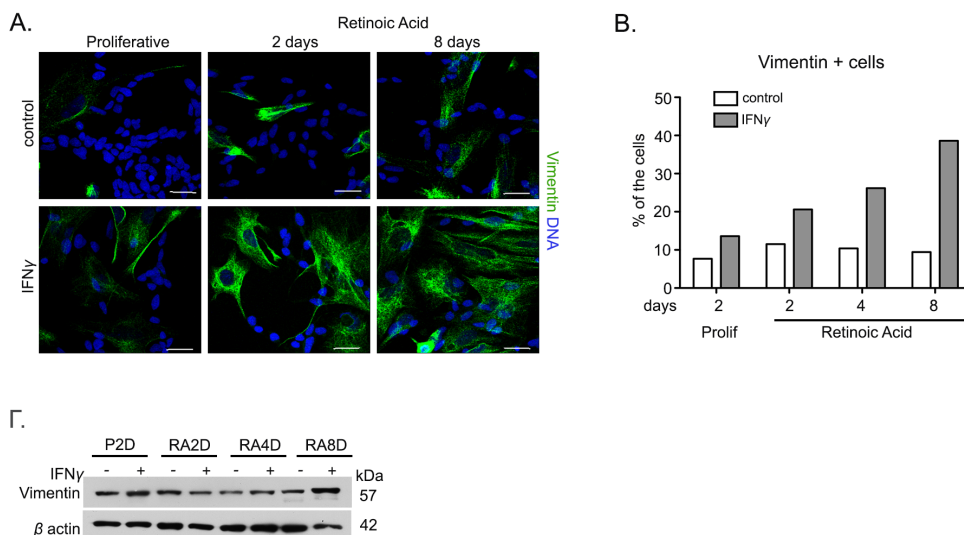
Άρχικός στόχος ήταν η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης νεστίνης (*Nestin*). Η νεστίνη θεωρείται δίκτης πρόδρομων κυττάρων της νευρικής γενεαλογίας καθώς εκφράζεται σε νευρικά βλαστικά κύτταρα [144]. Επίσης έχει μια ιδιαίτερη σημασία, που δεν είναι πλήρως ταυτοποιημένη, καθώς είναι γνωστό ότι μπορεί να επαχθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασιών [145]. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *nestin* ελέγχθηκαν με RT-qPCR και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζονται από τη διαφοροποίηση των κυττάρων ούτε από την IFN γ (**Εικόνα 42 Α**). Ωστόσο, πειράματα ανοσοϊστοχημείας έδειξαν αύξηση των nestin+ κυττάρων σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης (**Εικόνα 42 Β,Γ**). Πιο σημαντικά, παρατηρήθηκε μια δραματική αλλαγή στην κατανομή της πρωτεΐνης από την IFN γ , μετά την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης, καθώς εντοπίστηκαν κύτταρα με μεγάλους πυρήνες και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα έντονα θετικό για νεστίνη. Το ποσοστό αυτών των κυττάρων αυξήθηκε από 5% σε 25% παρουσία IFN γ στο τελευταίο στάδιο της νευρικής διαφοροποίησης των κυττάρων (**Εικόνα 42 Δ**).



Εικόνα 42. Η IFN γ προκαλεί την εμφάνιση κυττάρων με μεγάλο πυρήνα και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα το οποίο είναι θετικό για νεστίνη, μετά την τέταρτη ημέρα της διαφοροποίησης. (Α) Επίπεδα mRNA (RT-qPCR) της νεστίνης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων. (Β) Ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη νεστίνη. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DRAQ5. (Γ) Ποσοτικοποίηση κυττάρων θετικών για νεστίνη. (Δ) Ποσοτικοποίηση των κυττάρων με μεγάλους πυρήνες και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα που είναι θετικά για νεστίνη. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ μέση διακύμανση ($\pm$ SEM), $n=3$, scale bar 20 μ m.

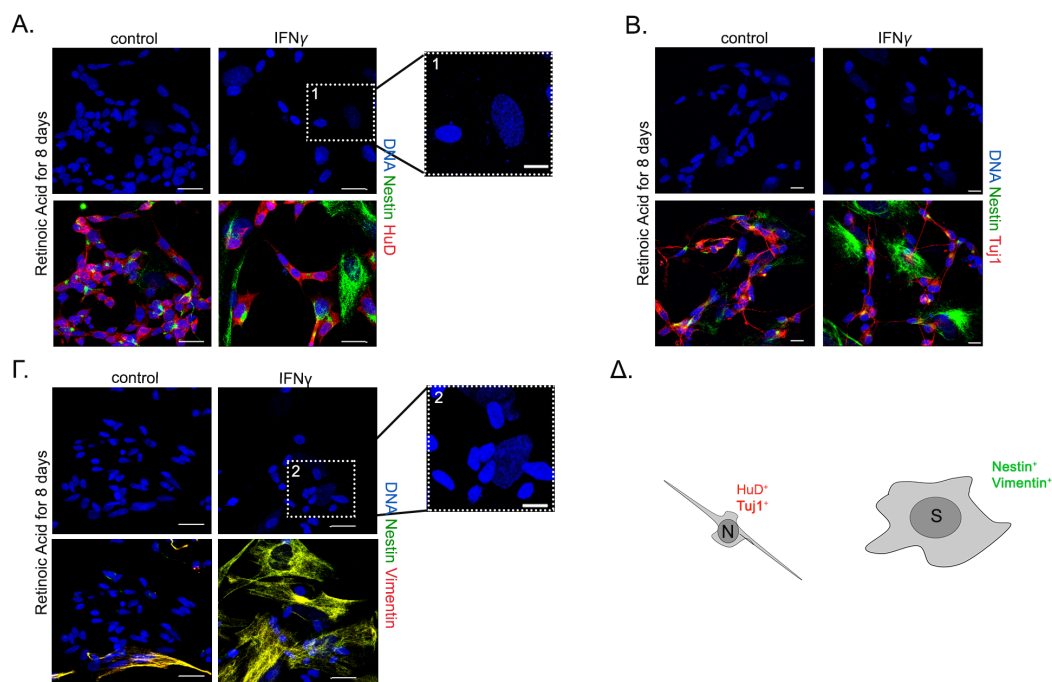
Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης βιμεντίνης (*vimentin*). Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στη οικογένεια ΙΙΙ των ενδιάμεσων ινιδίων (*Intermediate Filament proteins, IF*) και θεωρείται βασική κυτταροσκελετική πρωτεΐνη των μεσεγχυματικών κυττάρων. Επίσης, χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για τη μελέτη της μετάβασης των κυττάρων από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (*Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT*) τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, όσο και σε νεοπλασίες. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα η πρωτεΐνη *vimentin* αποτελεί και δείκτη των κυττάρων τύπου S του νευροβλαστώματος.

Πειράματα ανοσοϊστοχημείας έδειξαν μια παρόμοια κατανομή αυτής της πρωτεΐνης με τη νεστίνη. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με RA παρατηρούνται κάποια *vimentin*⁺ κύτταρα με μικρούς πυρήνες και νευριτικές απολήξεις με πολωμένη κυτταροπλασματική κατανομή (**Εικόνα 43Α**, επάνω). Η παρουσία IFN γ οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των μεγαλοπύρηνων, *vimentin*⁺ κυττάρων, ήδη από τη δεύτερη μέρα της διαφοροποίησης (**Εικόνα 43 Β**). Το ποσοστό αυτό αυξάνεται καθώς προχωράει η διαφοροποίηση φτάνοντας την όγδοη ημέρα στο 40% παρουσία IFN γ . Παρόλα αυτά, πειράματα ανοσοαποτύπωσης στις ίδιες συνθήκες, έδειξαν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της *vimentin* μόνο την όγδοη ημέρα (**Εικόνα 43 Γ**). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι στα αρχικά στάδια η IFN γ προκαλεί μια έντονη αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού, μεταβάλλοντας την κατανομή της *vimentin*, ενώ αργότερα αυξάνει και τα επίπεδα της πρωτεΐνης



Εικόνα 43. Η IFNγ οδηγεί στην αύξηση των vimentin+ κυττάρων. (Α) Ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη vimentin κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης απουσία και παρουσία IFNγ. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DRAQ5. (Β) Ποσοτικοποίηση των μεγαλοπύρηνων, vimentin+ κυττάρων. (Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η μεταβολή στα επίπεδα της πρωτεΐνης vimentin παρουσία IFNγ. Τα επίπεδα της β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης ισοφόρτωσης. n=2, scale bar 20μm.

Με σκοπό να διευκρινιστούν τα χαρακτηριστικά αυτών των μεγαλοπύρηνων nestin+/vimentin+, κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα διπλής ανοσοϊστοχημείας την όγδοη ημέρα της διαφοροποίησης. Το συγκεκριμένο χρονικό σημείο επιλέχθηκε καθώς εκεί παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά των εν λόγω κυττάρων. Έτσι, η πρωτεΐνη nestin μελετήθηκε σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες Tuj1, HuD και Vimentin. Οι πρωτεΐνες Tuj1 και HuD, όπως προαναφέρθηκε, εκτός από δείκτες της νευρικής διαφοροποίησης αποτελούν και δείκτες των κυττάρων τύπου N, του νευροβλαστώματος. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι τα nestin+, είναι αρνητικά για Tuj1 (**Εικόνα 44 Α**), αρνητικά για HuD (**Εικόνα 44 Β**) και θετικά για Vimentin (**Εικόνα 44 Γ**). Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών, αποτελεί η δυσκολία διάκρισης του μεγάλου πυρήνα, καθώς η χρωματίνη των κυττάρων φαίνεται να έχει αποκτήσει μια πιο χαλαρή δομή (**Εικόνα 44**, πλαίσια 1 και 2).



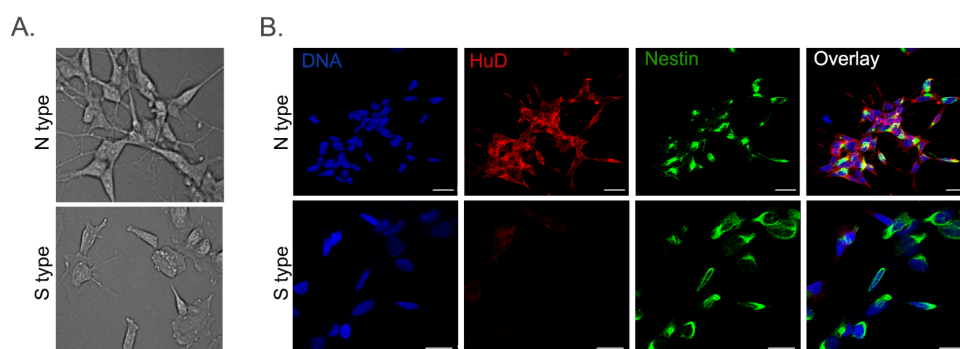
Εικόνα 44. Τα μεγαλοπύρρηνα *nestin*⁺ κύτταρα εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά των κυττάρων τύπου *S* του νευροβλαστώματος. Διπλή ανοσοϊστοχημεία στην όγδοη ημέρα της διαφοροποίησης με *nestin* και (Α) *HuD* (Β) *Tuj1* (Γ) *vimentin*. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική *DRAQ5*. *n*=3, scale bar 20 μ m. (Δ) Σχηματική αναπαράσταση της γνωστής από τη βιβλιογραφία μορφολογίας των κυττάρων τύπου *N* και *S* του νευροβλαστώματος καθώς και των πιο αντιπροσωπευτικών μοριακών δεικτών κάθε τύπου κυττάρων.

Απο τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτεται ένας ρόλος της IFN γ και στον δεύτερο, μη νευρικό πληθυσμό του νευροβλαστώματος, τα S- τύπου κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη παρατηρούμε για πρώτη φορά ότι μετά την τέταρτη ημέρα της νευρικής διαφοροποίησης η IFN γ προκαλεί την προοδευτική εμφάνιση ενός νέου πληθυσμού κυττάρων με μεγάλο πυρήνα και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν όλα τα μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του S- τύπου πληθυσμού κυττάρων του νευροβλαστώματος. Εκτός από μεγάλο πυρήνα και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα, προσκολλώνται έντονα στο υπόστρωμα, είναι αρνητικά δείκτες των κυττάρων τύπου N, και θετικά για δείκτες των κυττάρων τύπου S-(βλ. Παράγραφο 1.2.3.) (Εικόνα 44 Δ).

4.1.7. Η IFN γ επάγει τη δια-διαφοροποίηση των N σε S- τύπου κύτταρα

Ένα απο τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του νευροβλαστώματος, το οποίο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μη αποτελεσματική διάγνωση και την επιθετικότητά του είναι η δια-διαφοροποίηση. Το φαινόμενο αυτό διεξάγεται κάτω απο μηχανισμούς που δεν έχουν διευκρινιστεί. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ένα N-τύπου κύτταρο μπορεί να μετατραπεί σε S-τύπου και το αντίθετο.

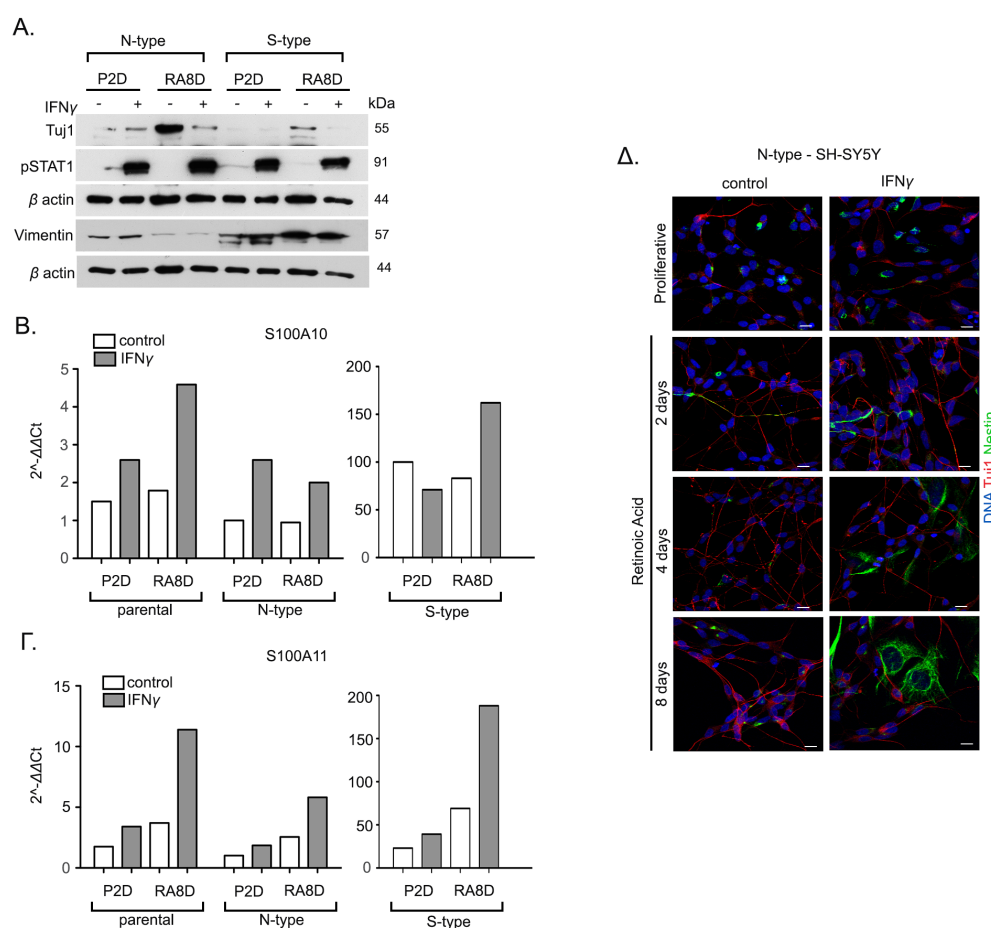
Η αύξηση του αριθμού των S-τύπου κυττάρων που παρατηρήσαμε παρουσία IFN γ μετά την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης, συνοδευόταν απο μείωση δεικτών της νευρικής μοίρας. Αυτό μας έκανε να αναρωτηθούμε εάν η IFN γ προκαλεί δια-διαφοροποίηση των N-τύπου κυττάρων σε S. Για το σκοπό αυτό δημιουργήσαμε αμιγείς κλώνους κυττάρων τύπου N και S απο τα πατρικά SH-SY5Y κύτταρα, εκμεταλλευόμενοι τη διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων στο υπόστρωμα (**Εικόνα 45**).



Εικόνα 45. Δημιουργία αμιγών υποπληθυσμών κυττάρων τύπου N και S απο τα πατρικά SH-SY5Y. (Α) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου που δείχνουν τη διαφορετική μορφολογία των κυττάρων. (Β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία στις οποίες φαίνεται η εξειδικευμένη έκφραση πρωτεϊνών-δεικτών του κάθε τύπου κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών HuD (κόκκινο) και Nestin (πράσινο). Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DRAQ5. N=3 , scale bar 20 μ m.

Έπειτα, οι αμιγείς καλλιέργειες διαφοροποιήθηκαν εως την όγδοη ημέρα με RA και IFN γ , όπως ακριβώς και τα πατρικά κύτταρα, προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο συμβαίνει το φαινόμενο της δια-διαφοροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, δόθηκε βάση στο εάν τα αμιγή N-τύπου κύτταρα μετα απο διαφοροποίηση οχτώ ημερών παρουσία IFN γ , είναι ικανά να δώσουν κύτταρα τύπου S. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του χαρακτηριστικού για τα τύπου N κύτταρα δείκτη TuJ1 βρέθηκε να

επάγονται από το RA όπως και αναμενόταν, ενώ η παρουσία IFN γ , οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων του (Εικόνα 46 Α). Τα γονίδια *S100A10* και *S100A11*, εκφράζονται εξειδικευμένα στα S τύπου κύτταρα, και πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 46 (Β και Γ), πειράματα RT-qPCR, είδαμε ότι τα αμιγή S-τύπου κύτταρα που απομονώσαμε εκφράζουν περίπου εκατό φορές περισσότερο τα γονίδια αυτά. Η παρουσία IFN γ οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης και των δύο γονιδίων τόσο στα πατρικά όσο και στα αμιγή N-τύπου κύτταρα (Εικόνα 46 Β, Γ). Τέλος με πειράματα ανοσοϊστοχημείας παρατηρήθηκε ότι και σε αμιγή N-τύπου κύτταρα η παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης οδηγεί στην προοδευτική εμφάνιση κυττάρων με μεγάλους πυρήνες, και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα έντονα θετικό για nestin, μια πρωτεΐνη δείκτη των κυττάρων τύπου S (Εικόνα 46 Δ).



Εικόνα 46. Η IFN γ προάγει την δια-διαφοροποίηση των N-τύπου κυττάρων σε S. (Α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western στην οποία φαίνεται η δραματική μείωση του νευρικού δείκτη *Tuj1* στα κύτταρα τύπου N από την IFN γ , περίπου στα επίπεδα των κυττάρων τύπου

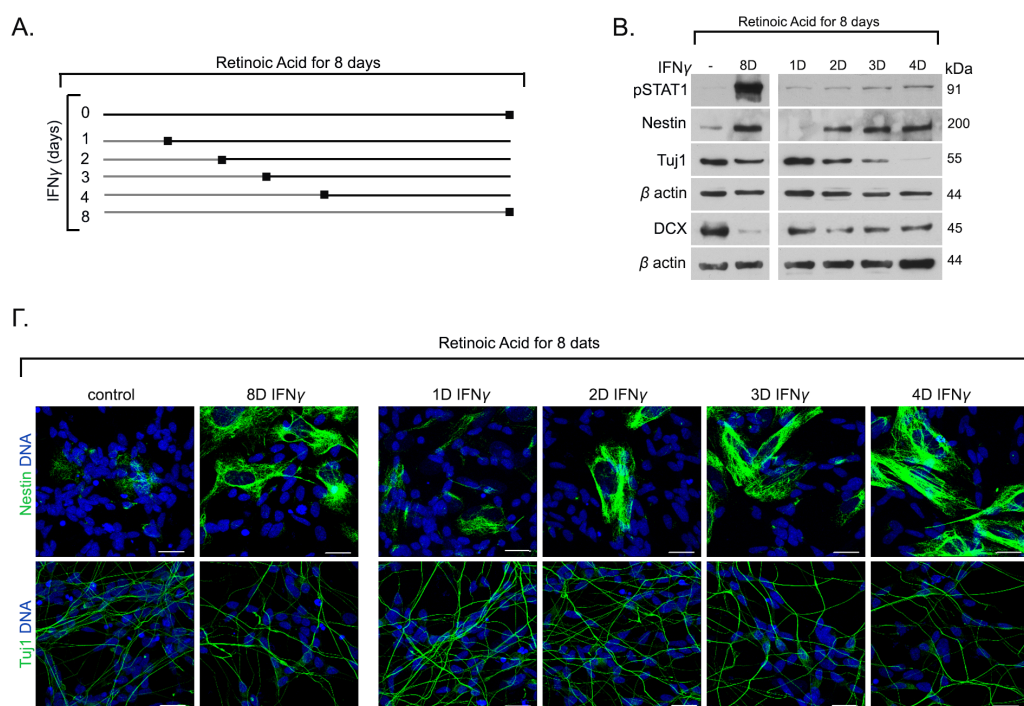
S. Τα επίπεδα της vimentin δεν επηρεάζονται. Με το αντίσωμα για την P-STAT1 επιβεβαιώνεται η ενεργότητα του μονοπατιού της IFN γ . Τα επίπεδα της β -ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης ισοφόρτωσης. P2D: κύτταρα που πολλαπλασιάζονται; RA8D: κύτταρα που διαφοροποιούνται για 8 ημέρες. (B), (Γ) Έλεγχος των επιπέδων mRNA για τα γονίδια S100A10 και S100A11, αντίστοιχα σε αμιγείς καλλιέργειες N και S τύπου κυττάρων με RT-qPCR. (Δ) Ανοσοϊστοχημεία/συνεστιακή μικροσκοπία για την πρωτεΐνη nestin (πράσινο) και τον νευρικό δείκτη TuJ1 (κόκκινο) σε αμιγή N-τύπου κύτταρα που δείχνει την προοδευτική εμφάνιση nestin+/TuJ1- κυττάρων παρουσία IFN γ . Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Scale bar 20 μ m.

Συμπερασματικά λοιπόν, παρατηρήσαμε για πρώτη φορά ότι η παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων αλλάζει το πρόγραμμα που επάγεται από το RA, και οδηγεί στον εμπλουτισμό της καλλιέργειας με κύτταρα τύπου S. Τα κύτταρα που προκύπτουν συγκεντρώνουν όλα τα μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά που κατά τη βιβλιογραφία εμφανίζουν τα κύτταρα αυτά. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η IFN γ σηματοδοτεί και στους δύο τύπους κυττάρων, καθώς επάγει στον ίδιο βαθμό τη φωσφορυλίωση του παράγοντα STAT1. Η σηματοδότηση αυτή πιθανώς πραγματοποιείται με διαφορετικούς μηχανισμούς οι οποίοι απομένει να ανεβρεθούν. Απομένει να ελεγχθεί αν και κατά πόσο, η IFN γ έχει επιδράσει έτσι ώστε τα κύτταρα αυτά να έχουν χάσει το καρκινικό τους δυναμικό και αδυνατούν πλέον να σχηματίσουν όγκους. Μια τέτοια δράση θα μπορούσε να δώσει νέα θεώρηση για τον τρόπο αντιμετώπισης της ασθένειας.

4.1.8. Η δράση της IFN γ είναι μόνιμη

Ένα επιπρόσθετο ερώτημα που προέκυψε κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης, ήταν εάν και κατά πόσο η αλλαγή στην μοίρα των κυττάρων που παρατηρούμε παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης, χρειάζεται τη συνεχόμενη παρουσία της. Για το λόγο αυτό οργανώσαμε μια σειρά πειραμάτων, όπου η IFN γ ερχόταν σε επαφή με τα κύτταρα μόνο για ένα μικρό χρονικό διάστημα στην αρχή της διαφοροποίησης.

Κύτταρα διαφοροποιήθηκαν μέχρι το τελικό στάδιο (8 ημέρες) με RA και η IFN γ προστέθηκε μόνο για 1,2,3 ή 4 ημέρες στην αρχή της διαφοροποίησης. Στη συνέχεια IFN γ απομακρυνόταν από το μέσο, και η διαφοροποίηση συνεχιζόταν κανονικά μόνο με την παρουσία RA (**Εικόνα 47 Α**). Στις συνθήκες αυτές ελέγχθηκαν τα επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν τόσο τον N όσο και τον S πληθυσμό του νευροβλαστώματος. Παρατηρήθηκε ότι 2 μόνο ημέρες παρουσίας IFN γ στην αρχή της διαφοροποίησης, ήταν ικανές να προκαλέσουν αύξηση των επιπέδων της νεστίνης και μείωση των επιπέδων των Tuj1 και DCX στο τέλος της διαφοροποίησης (**Εικόνα 47 Β**), περίπου στον ίδιο βαθμό με εκείνον που προκαλεί η IFN γ όταν βρίσκεται συνεχόμενα στο μέσο καθόλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Μετά την απομάκρυνση της IFN γ δεν υπάρχει πλέον αυτή η σηματοδότηση αφού τα επίπεδα του pSTAT1, κύριου σηματοδοτικού μορίου του μονοπατιού της IFN γ , είναι μηδαμινά. Ομοίως με πειράματα ανοσοϊστοχημείας, επιβεβαιώθηκαν και τα άλλα χαρακτηριστικά της δια-διαφοροποίησης που επάγει η IFN γ στα κύτταρα αυτά, όπως η αύξηση των μεγαλοπύρηνων nestin+ μετά από δύο ημέρες παρουσίας IFN γ , και η μείωση των Tuj+ νευριτών μετά από τρεις μέρες παρουσίας IFN γ (**Εικόνα 47 Γ**).



Εικόνα 47. Μόλις 2 ημέρες παρουσίας IFN γ στην αρχή της διαφοροποίησης είναι ικανές να αλλάξουν την μοίρα των κυττάρων. (Α) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής

διαδικασίας που ακολουθήθηκε. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τα επίπεδα των πρωτεϊνών *pSTAT1*, *Nestin*, *Tuj1* και *DCX*. Τα επίπεδα της β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης ισοφόρτωσης. (Γ) Ανοσοιστοχημεία για τις πρωτεΐνες *Nestin* και *Tuj1*. $N=3$, scale bar 20 μm .

Τα παράπανω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ένα εξαιρετικό δυναμικό της IFN γ , στο να προκαλεί μόνιμες αλλαγές στη μοίρα των κυττάρων, ακόμη και όταν έρχεται σε επαφή με αυτά για ένα μικρό χρονικό διάστημα. Το παραπάνω αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα σημαντικά, αν αναλογιστεί κανείς, την παράπλευρη απώλεια που θα μπορούσε να έχει μια θεραπεία με ένα τόσο σημαντικό παράγοντα της ανοσοποίησης, αν αυτός έπρεπε να βρίσκεται συνεχόμενα στην περιοχή. Η συνεχόμενη ενεργοποίηση, για παράδειγμα, των T-λεμφοκυττάρων θα μπορούσε από τη μία πλευρά να δρά ευεργετικά προσπαθώντας να εξαλείψει τα καρκινικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά όμως, η συνεχόμενη φλεγμονή θα μπορούσε να δημιουργεί άλλου είδους προβλήματα, όπως η καταστροφή των νευρικών συνάψεων και η ενεργοποίηση αυτοάνοσων διεργασιών.

4.1.9. Η επαγωγή της δια-διαφοροποίησης από την IFN γ και ο εμπλουτισμός σε κύτταρα τύπου S μειώνει το ογκογονικό δυναμικό του πληθυσμού των νευροβλαστωματικών κυττάρων

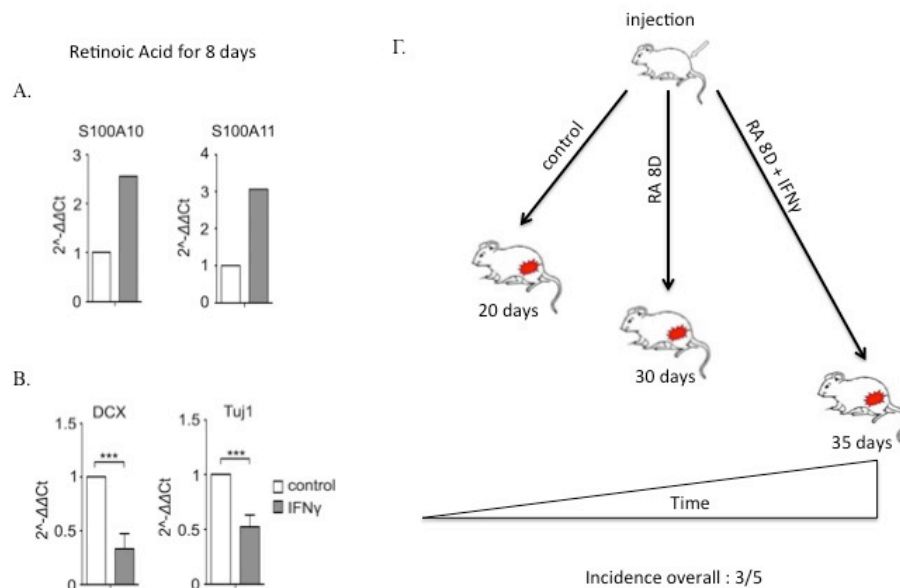
Σε παιδιά με νευροβλάστωμα υψηλού κινδύνου, η θεραπεία με RA (13-*cis*-ρετινοϊκό οξύ, ισοτρετινοΐνη) μειώνει τον κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου μετά την ολοκλήρωση της κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας. Παρότι αυτή η τακτική βελτιώνει το ποσοστό επιβίωσης, κατά 35%, στα παιδιά με μεταστατικό νευροβλάστωμα [146], το 5ετές ποσοστό επιβίωσης χωρίς συμβάν παραμένει κάτω από το 50%. Ως εκ τούτου, είναι επιτακτική ανάγκη να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα του RA στη αντιμετώπιση ασθενών με ελάχιστη υπολειμματική νόσο και να αναπτυχθούν συνεργατικές θεραπείες που να ενισχύουν τη δράση του RA. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των κυττάρων τύπου S, είναι η αδυναμία τους να σχηματίζουν όγκους σε ποντίκια λόγω του μειωμένου τους ογκογονικού δυναμικού, συγκρινόμενα με τους άλλους τύπους κυττάρων του νευροβλαστώματος. Εκμεταλλευόμενοι αυτή την ιδιότητα, και με

βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, υποθέσαμε ότι αν ενέσουμε νευροβλαστωματικά κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με RA για οχτώ ημέρες παρουσία IFN γ σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, θα περιορισθεί η ικανότητα σχηματισμού όγκων. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, είναι εμφανής ο εμπλουτισμός του πληθυσμού με κύτταρα τύπου S, όπως δείχνεται από την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *S100A10* και *S100A11* (**Εικόνα 48 Α**), και την ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης γονιδίων που είναι χαρακτηριστικά των κυττάρων τύπου N (**Εικόνα 48 Β**) από την IFN γ , συγκριτικά με κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί μόνο με RA.

Για το *in vivo* πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν ανοσοκατεσταλμένοι ποντικοί (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) που είναι γνωστοί και ως ποντικοί NSG (*NOD scid gamma*). Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν με RA ή RA+IFN γ για 8 ημέρες, και στη συνέχεια, 10⁶ κύτταρα / συνθήκη ενέθηκαν υποδόρια σε 5 ποντικούς. Ως μάρτυρες ελέγχου (*control*) χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί στους οποίους ενέθηκαν κύτταρα σε φάση πολλαπλασιασμού, χωρίς προηγούμενη επεξεργασία. Ακολούθησε ένα χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι ποντικοί ελέγχονταν με ψηλάφηση για την εμφάνιση όγκων. 20 ημέρες αργότερα, 3 από τους 5 ποντικούς της συνθήκης «control» εμφάνισαν όγκους. 30 ημέρες αργότερα 3 από τους 5 ποντικούς της συνθήκης «RA» και 35 ημέρες αργότερα 3 από τους 5 ποντικούς της συνθήκης «RA+IFN γ » (**Εικόνα 48 Γ**).

Απο τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται η σαφής καθυστέρηση των διαφοροποιημένων με RA νευροβλαστωματικών κυττάρων να σχηματίζουν όγκους *in vivo*, συγκριτικά με τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, μια παρατήρηση που είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Το ενδιαφέρον ήταν ότι τα κύτταρα που διαφοροποιήθηκαν με RA, με την ταυτόχρονη παρουσία IFN γ , παρουσίασαν επιπλέον καθυστέρηση σχηματισμού όγκων συγκρινόμενα με τις υπόλοιπες συνθήκες. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεσή μας ότι ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας με κύτταρα τύπου S, παρουσία IFN γ , μειώνει το ογκογονικό δυναμικό των κυττάρων. Η διαφοροποίηση των κυττάρων παρουσία IFN γ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερο εμπλουτισμό της καλλιέργειας με κύτταρα τύπου S και να αυξήσει ακόμη περισσότερο την αποτελεσματικότητα του RA καθώς το περιβάλλον *in vivo*, ίσως ευνοεί την

ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων με ογκογόνο δυναμικό (*tumor-initiating cells*) τα οποία βρίσκονται μέσα στον νευροβλαστικό πληθυσμό των κυττάρων τύπου N και θεωρούνται υπεύθυνα για την επανεμφάνιση των όγκων [147] [148].



Εικόνα 48. Ανάπτυξη υποδόριων όγκων σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς μετά από ενέσεις κυττάρων SH-SY5Y που έχουν διαφοροποιηθεί με RA, απουσία ή παρουσία IFN γ . (Α) Σχετικά επίπεδα mRNA των ειδικών για τα κύτταρα τύπου S γονιδίων S100A10 και S100A11 και (Β) των ειδικών για τα κύτταρα τύπου N γονιδίων Tuj1 και DCX, μετά την επεξεργασία με RA και IFN γ των SH-SY5Y κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τις ενέσεις των ξενομοσχευμάτων στους ποντικούς NSG. (Γ) Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στην οποία φαίνεται η αύξηση από την IFN γ , της ικανότητας του RA να επιβραδύνει τον σχηματισμό όγκων που δημιουργούν τα νευροβλαστωματικά κύτταρα στους ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς.

4.1.10. Η δράση της IFN γ πιθανώς ασκείται μέσω της επαγωγής του KLF4

Ένα πολύ σημαντικό ερώτημα το οποίο απομένει να απαντηθεί αφορά το μηχανισμό μέσω του οποίου η IFN γ προωθεί την δια-διαφοροποίηση των κυττάρων τύπου N σε κύτταρα τύπου S. Η εύρεση των ενδιάμεσων μορίων θα μπορούσε να ανοίξει νέους δρόμους για την αντιμετώπιση του νευροβλαστώματος. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στον μεταγραφικό παράγοντα KLF4 για τους παραπάνω λόγους. Ο παράγοντας αυτός, όπως προαναφέρθηκε (βλ.παράγραφο 1.7.), έχει έναν αποδεδειγμένο, αλλά και σύνθετο ρόλο στις

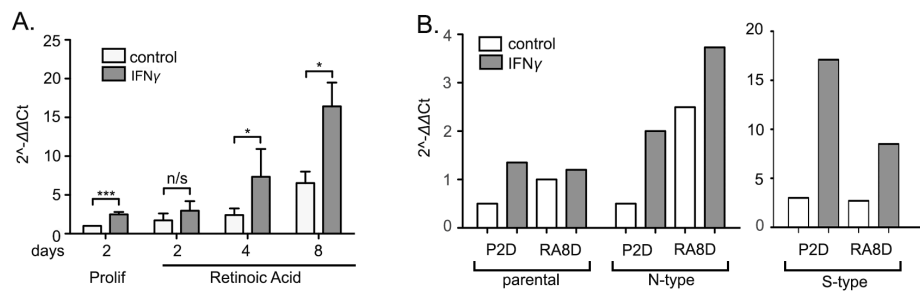
νεοπλασίες. Επίσης, είναι ένας παράγοντας σημαντικός για τη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων ενώ έχει συσχετιστεί και με τον επαναπρογραμματισμό, δηλαδή την αλλαγή της μοίρας των σωματικών κυττάρων. Ένα τρίτο σημαντικό στοιχείο είναι ότι αποτελεί ένα γονίδιο στόχο της IFN γ , καθώς έχει αποδειχθεί η άμεση πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT1 στον υποκινητή του KLF4 [149] σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.

Μια πρόσφατη μελέτη συνέδεσε την έκφραση του KLF4 με τα S-τύπου κύτταρα του νευροβλαστώματος. Πιο συγκεκριμένα η υπερέκφραση του, σε κύτταρα SH-SY5Y και άλλα νευροβλαστώματα, είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια των νευροβλαστικών τους φαινοτύπων, και την δια-διαφοροποίηση με τελικό εμπλουτισμό της καλλιέργειας σε κύτταρα τύπου S. Τα κύτταρα αυτά μάλιστα αδυνατούν να αναπτυχθούν σε δοκιμασίες μαλακού άγαρ και να σχηματίσουν όγκους όταν ενεθούν σε ποντίκια [150].

Έτσι, αρχικά, αποφασίσαμε να προσδιορίσουμε τα επίπεδα mRNA του γονιδίου KLF4 στο σύστημά μας και να δούμε αν και κατά πόσο επάγεται από IFN γ . Πειράματα RT-qPCR έδειξαν επαγωγή του KLF4 κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης από RA. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία όπου το RA έχει βρεθεί να επάγει τον KLF4 σε κύτταρα μυϊκού ιστού [151]. Όπως αναμενόταν, ο KLF4 βρέθηκε να επάγεται από IFN γ σε όλα τα σημεία ελέγχου, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη επαγωγιμότητα του γονιδίου μετά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης (**Εικόνα 49 A**). Το εύρημα αυτό ήταν πολύ ενδιαφέρον, καθώς η IFN γ προκαλεί αύξηση της δια-διαφοροποίησης από N σε S τύπου κύτταρα, επίσης μετά την τέταρτη ημέρα, υποδηλώνοντας έτσι μια πιθανή συσχέτιση των δύο φαινομένων.

Συμπληρωματικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA του KLF4, κατά τη διαφοροποίηση των αμιγών υποπληθυσμών τύπου N και S απουσία και παρουσία IFN γ . Βρέθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του KLF4 από το RA στα κύτταρα τύπου N (περίπου 6 φορές), ενώ τα κύτταρα τύπου S δεν ανταποκρίνονται καθόλου (**Εικόνα 49 B**, άσπρες μπάρες). Ωστόσο, IFN γ αύξησε τα επίπεδα του KLF4 mRNA πολύ περισσότερο στα S τύπου κύτταρα (**Εικόνα 49 B**, γκρί μπάρες), τόσο στην αδιαφοροποίητη όσο και στη διαφοροποιημένη κατάσταση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα κύτταρα τύπου S ανταποκρίνονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό

από τα τύπου N στην επαγωγή του KLF4 από την IFN γ , και είναι σύμφωνα με την παρατήρηση-υπόθεση των Shum et al. 2013 ([150]) ότι ο KLF4 καταστέλλει την εξέλιξη των νευροβλαστωματικών κυττάρων, και καθορίζει την διαφοροποίηση προς μια μη-ογκογονική γενεαλογία.



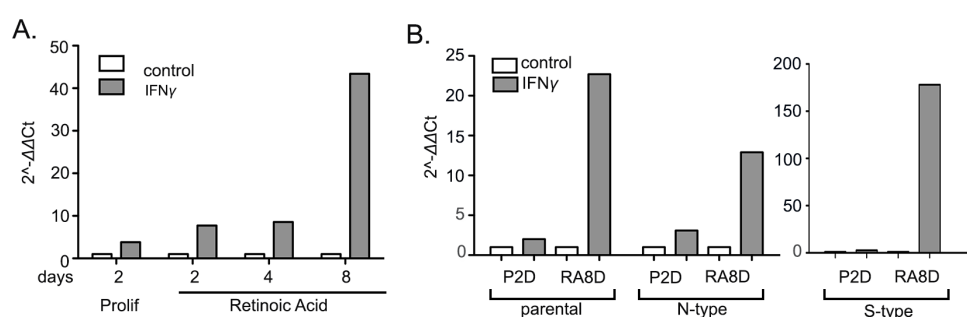
Εικόνα 49. Επίδραση της IFN γ στα επίπεδα έκφρασης του KLF4 κατά τη διαφοροποίηση στην πατρική και στις αμιγείς καλλιέργειες των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Προσδιορισμός (με RT-qPCR) των επιπέδων mRNA του KLF4 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης απουσία ή παρουσία IFN γ της πατρικής κυτταρικής σειράς SH-SY5Y (A), και (B) των αμιγών N- και S-τύπου κυττάρων. Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$ για το (A) και $n=2$ για το (B).

4.1.11. Τα μόρια MHC τάξης II πιθανώς εκφράζονται στα S- τύπου κύτταρα του νευροβλαστώματος

Ο κύριος και πιο γνωστός στόχος της IFN γ είναι η επαγωγή των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC class II). Όπως περιγράφηκε νωρίτερα τα μόρια αυτά φυσιολογικά εκφράζονται σε επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ενώ μπορούν να επαχθούν στους περισσότερους τύπους κυττάρων απο IFN γ . Στο νευρικό σύστημα είναι γνωστό ότι το ρόλο αυτό παίζουν κυρίως τα κύτταρα της γλοίας. Μια τέτοια κατηγορία κυττάρων είναι και τα κύτταρα schwann. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τα κύρια γλοιακά κύτταρα του περιφερικού νευρικού συστήματος. Επιπροσθέτως τα S-τύπου κύτταρα του νευροβλαστώματος θεωρούνται κύτταρα με ιδιότητες μελανοκυττάρων ή κυττάρων schwann.

Για τον λόγο αυτό αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την την έκφραση των μορίων MHC τάξης II στο σύστημά μας. Με τη μεθοδολογία RT-qPCR αναλύθηκαν τα

επίπεδα του κυρίου αλληλομόρφου *DRA*. Βρέθηκε ότι η επαγωγικότητά του από την IFN γ αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή της την όγδοη ημέρα (**Εικόνα 50 A**). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο ίδιος έλεγχος σε αμιγείς καλλιέργειες κυττάρων τύπου N και S. Με μεγάλη μας έκπληξη παρατηρήσαμε ότι το mRNA του γονιδίου *DRA* επάγεται πάνω από 180 φορές (180X) στα κύτταρα τύπου S, την όγδοη ημέρα της διαφοροποίησης. Αντίθετα, στα κύτταρα τύπου N το γονίδιο επάγεται περίπου 12X (**Εικόνα 50 B**). Η επαγωγή αυτήθα μπορούσε να οφείλεται στην δια-διαφοροποίηση των N-τύπου κυττάρων σε S από την IFN γ .



Εικόνα 50. Σύγκριση της απόκρισης του μορίου MHC II *DRA* στην IFN γ σε διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης της πατρικής σειράς SH-SY5Y και των αμιγών N- και S-τύπου νευροβλαστωματικών κυττάρων. (A) Προσδιορισμός (με RT-qPCR) της αύξησης των επιπέδων mRNA του γονιδίου *DRA* από την IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων, και (B) των αμιγών καλλιιεργειών κυττάρων τύπου N και S. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους και έχουν κανονικοποιηθεί με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε για πρώτη φορά την ικανότητα της IFN γ να προσδίδει μια διαφορετική μοίρα στα νευροβλαστωματικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά εμπλουτίζονται με ένα πληθυσμό κυττάρων που αδυνατεί να σχηματίσει όγκους, και εκφράζει υψηλά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα KLF4, καθώς και των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας MHC II. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα προτείνουμε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα μπορεί να δρουν και συλλογικά, βοηθώντας να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα. Δηλαδή, μέσω της έκφρασης μορίων MHC τάξης II στην επιφάνειά τους, και κατ' επέκταση της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων να ενισχύουν την προσπάθεια του

οργανισμού να καταπολεμήσει τα διπλανά, εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα, αλλάζοντας με αυτό τον τρόπο το μικροπεριβάλλον του όγκου που περιγράφηκε νωρίτερα, με ευνοϊκό τρόπο προς τον ασθενή. Στα πλαίσια αυτά γεννήθηκε το ερώτημα, κατά πόσον η επαγωγή του KLF4 από την IFN γ κάτω από αυτές τις συνθήκες, συμβάλλει και στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων MHCII. Το ερώτημα αυτό διερευνήθηκε και περιγράφεται στο τρίτο μέρος της διατριβής.

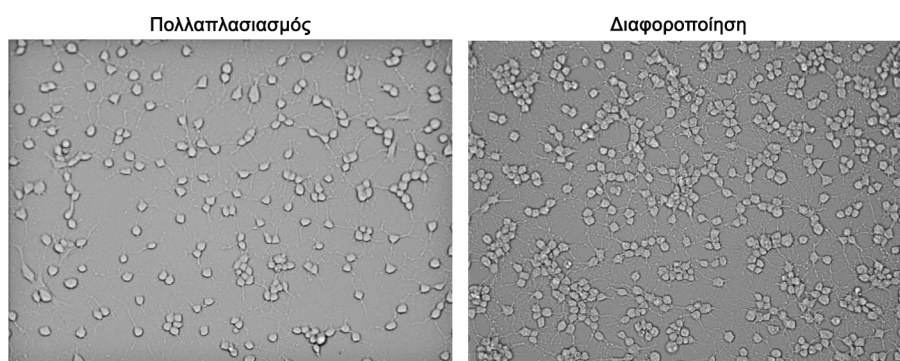
Μέρος Β'

4.2. Η IFN γ προωθεί τη νευρική διαφοροποίηση σε νευρικά βλαστικά κύτταρα του ιπποκάμπου

Όπως προαναφέρθηκε, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της IFN γ στη βιολογία των νευρικών κυττάρων. Παράλληλα με τη μελέτη στο νευροβλάστωμα, που αποτελεί ένα παθοφυσιολογικό νευρικό μοντέλο, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα, ένα φυσιολογικό νευρικό σύστημα.

4.2.1. Τα κύτταρα HCN ως κατάλληλο βιολογικό σύστημα

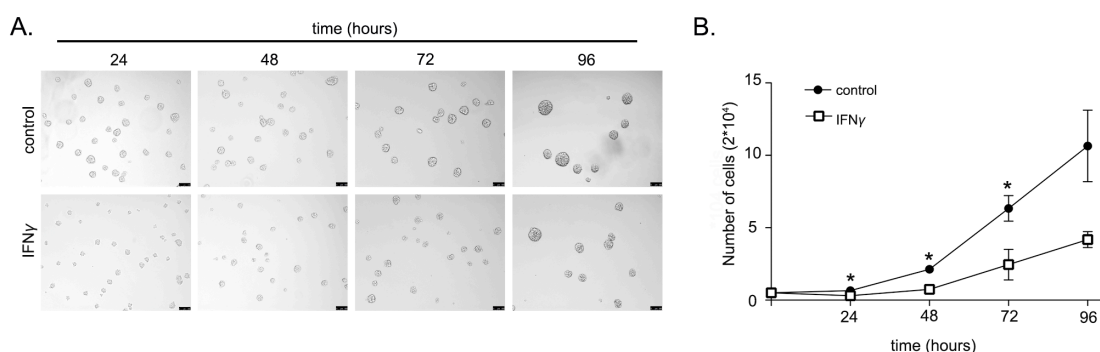
Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να δίνουν γένεση σε νέα κύτταρα του νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων, των αστροκυττάρων και των ολιγοδενδροκυττάρων. Οι κύριες νευρογενικές περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου, που απαντώνται τα εν λόγω κύτταρα είναι ο ιππόκαμπος [152] και ο οσφρητικός βολβός [153]. Τα κύτταρα HCN που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι πρόδρομα νευρικά κύτταρα από ιππόκαμπο ενήλικου αρουραίου, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν παρουσία φορσκολίνης (Fsk) και ρετινοϊκού οξέος (RA)[154]. Μια ώριμη κατάσταση διαφοροποίησης για τα συγκεκριμένα κύτταρα θεωρείται η καλλιέργειά τους με τους παραπάνω παράγοντες για οχτώ ημέρες.



Εικόνα 51. Μορφολογία των κυττάρων HCN σε συνθήκες πολλαπλασιασμού ή νευρικής διαφοροποίησης για 7 ημέρες παρουσία RA και Fsk.

4.2.2. Χαρακτηρισμός του δυναμικού της πολυδυναμίας και της επίδρασης που ασκεί η IFN γ στα κύτταρα HCN

Ένα από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων είναι ότι αποτελούν πολυδύναμους πληθυσμούς. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται πραγματοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό συμμετρικών διαιρέσεων, δίνοντας συνεχώς πολυδύναμους απογόνους. Το δυναμικό πολυδυναμίας των HCN κυττάρων, ελέγχθηκε από την ικανότητά τους να σχηματίζουν νευροσφαίρες σε μέσο καλλιέργειας με αυξητικούς παράγοντες, που δεν ευνοεί την προσκόλληση. Πράγματι, βεβαιώθηκε ότι τα κύτταρα είχαν την ικανότητα να σχηματίζουν νευροσφαίρες οι οποίες διατηρούνταν από γενιά σε γενιά. Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση που ασκεί η IFN γ στην πολυδυναμία των κυττάρων, 200 u/ml ανασυνδυασμένης IFN γ ποντικού, προστέθηκαν στο μέσο κυττάρων που ευνοεί τη δημιουργία νευροσφαιρών και αφέθηκαν για τέσσερις ημέρες. Η ικανότητα σχηματισμού νευροσφαιρών ελέγχθηκε με οπτική μικροσκοπία και παρατηρήθηκε το σαφώς μικρότερο μέγεθος τους (**Εικόνα 52 A**). Η μείωση του μεγέθους των νευροσφαιρών ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων που τις απαρτίζουν σε κάθε χρονικό σημείο. Βρέθηκε ότι η παρουσία IFN γ μειώνει τον αριθμό των κυττάρων σημαντικά από την πρώτη κιόλας ημέρα καλλιέργειας (**Εικόνα 52 B**).



Εικόνα 52. Η IFN γ μειώνει την ικανότητα σχηματισμού νευροσφαιρών των πρόδρομων νευρικών κυττάρων HCN. (A) Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο που απεικονίζουν την σταδιακή αύξηση του μεγέθους των νευροσφαιρών κατά τη διάρκεια 4 ημερών καλλιέργειας απουσία (control) ή παρουσίας IFN γ (200u/ml). (B) Διάγραμμα που δείχνει τον ρυθμό αύξησης του αριθμού των κυττάρων που απαρτίζουν τις νευροσφαίρες ως

συνάρτηση του χρόνου στις ίδιες συνθήκες. Το διάγραμμα αποτελεί μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (SEM), $n=3$.

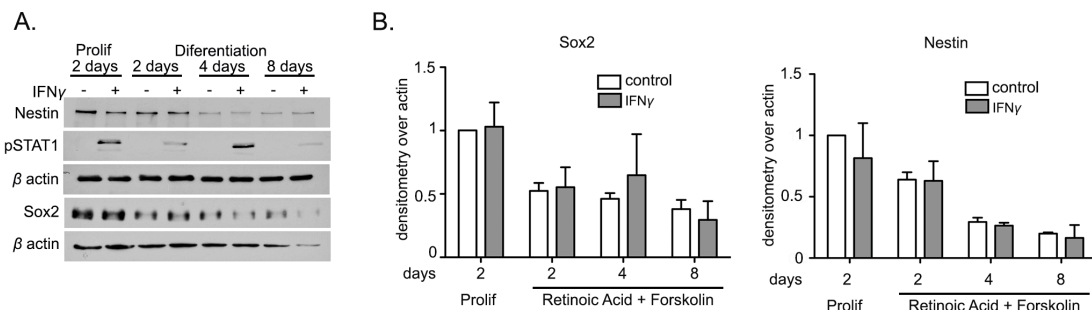
Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό, ενδεικτικό της πολυδυναμίας των νευρικών βλαστικών κυττάρων αποτελεί η έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-δεικτών. Η πρωτεΐνη του κυτταρικού σκελετού nestin και ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2, αποτελούν δύο τέτοιους δείκτες οι οποίοι εκφράζονται στα κύτταρα αυτά μόνο στην κατάσταση πολλαπλασιασμού. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western έδειξαν ότι τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών είναι υψηλά και ότι στην κατάσταση πολλαπλασιασμού στο υπόστρωμα, η έκφρασή τους δεν επηρεάζεται από την παρουσία IFN γ (**Εικόνα 53, *prolif.***)

Συμπερασματικά παρατηρήσαμε ότι το βιολογικό μας σύστημα είναι πολυδύναμο έχοντας την ικανότητα να σχηματίζει νευροσφαίρες. Οι νευροσφαίρες απαρτίζουν ένα πληθυσμό κυττάρων που αυτοανανεώνονται, έτσι ώστε μετά από το κατάλληλο ερέθισμα να δώσουν γένεση και στους τρεις διαφοροποιημένους τύπους των νευρικών κυττάρων. Η παρουσία IFN γ , οδήγησε στη μείωση του αριθμού και του μεγέθους των νευροσφαιρών, μειώνοντας τον αριθμό των κυττάρων που τις απαρτίζουν. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι ωθεί τα κύτταρα σε μια λιγότερο πολυδύναμη κατάσταση ή με άλλα λόγια ότι δημιουργεί ένα περιβάλλον ευνοϊκό προς τη διαφοροποίηση.

4.2.3. Διερεύνηση της επίδρασης της IFN γ στο δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων HCN

Επόμενο στόχο αποτέλεσε η μελέτη του δυναμικού διαφοροποίησης των κυττάρων και κατ'επέκταση πως αυτό επηρεάζεται από την IFN γ . Για το σκοπό αυτό κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία ρετινοϊκού οξέος (RA) και φορσκολίνης (Fsk), για διάφορα χρονικά σημεία, μέχρι την όγδοη ημέρα, που όπως αναφέρθηκε αποτελεί ένα όψιμο σημείο νευρικής διαφοροποίησης. Στη συνέχεια απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Nestin και Sox2. Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, παρατηρήθηκε η σταδιακή μείωση και των δύο πρωτεϊνών καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται (**Εικόνα 53**). Η μείωση αυτή, δεν επηρεάστηκε επιπλέον από την παρουσία IFN γ , η

σηματοδότηση της οποίας όπως υποδεικνύεται από τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής του ενδιάμεσου μορίου STAT1, είναι ενεργή σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησης .



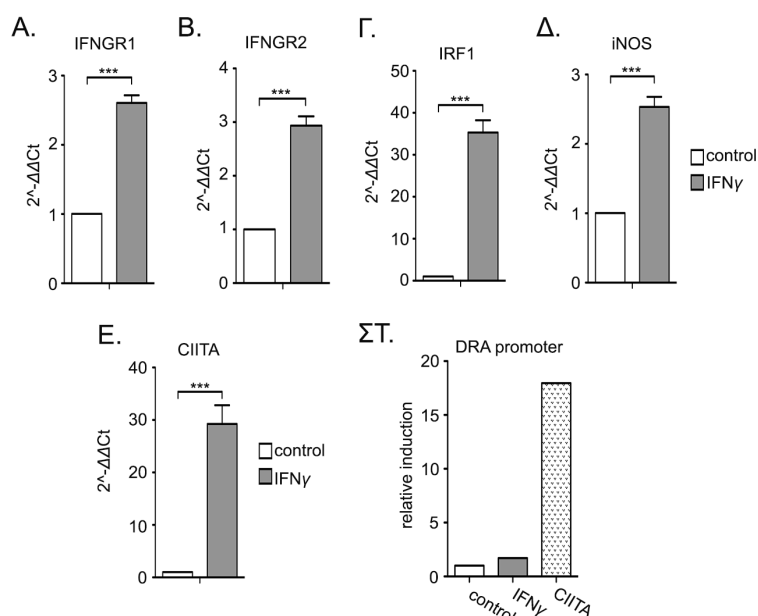
Εικόνα 53. Προοδευτική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών Nestin και Sox2 κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης. (Α) Αντιπροσωπευτικό blot που απεικονίζει την έκφραση των πρωτεϊνών Nestin, Sox2 και pSTAT1. (Β) Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image j. Τα επίπεδα της β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης ισοφόρτωσης, και ως σημείο αναφοράς για την κανονικοποίηση. Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$.

4.2.4. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC τάξης II είναι ενεργό στα νευρικά βλαστικά κύτταρα του ιπποκάμπου

Το μονοπάτι που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC II , θα μπορούσε να κατέχει ιδιαίτερη θέση τόσο στην φυσιολογία όσο και στην παθοφυσιολογία του νευρικού συστήματος. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα η αύξηση της παρουσίας κυτταροκινών και IFN γ σε περιοχές του ΚΝΣ συμμετέχει στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αποτέλεσμα, είναι η ενεργοποίηση μιας σειράς διαδικασιών κατά τις οποίες ο οργανισμός προσπαθεί να καταπολεμήσει την αιτία που προκάλεσε την φλεγμονή. Η IFN γ είναι μια κυτταροκίνη που απελευθερώνεται κυρίως από ενεργοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας [155],[156],[157], και μπορεί να επηρεάσει τη νευρογένεση [158]. Ωστόσο, το mRNA για το γονίδιο της IFN γ αλλά και τους υποδοχείς της ανιχνεύονται σε φυσιολογικές συνθήκες στις νευρογενικές περιοχές του εγκεφάλου κατά την ανάπτυξη και στην ενήλικη ζωή [52]. Υπάρχουν επίσης πρόσφατες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η IFN γ μπορεί να ασκεί

ευεγερτική νευρογενική δράση στο ΚΝΣ, ανεξάρτητα από τα κύτταρα της μικρογλοίας [159], [160], [161]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τοπικές δράσεις της IFN γ θα μπορούσαν να δρουν ως αισθητήρας της φυσιολογίας του σώματος παρέχοντας σήματα στα πρόδρομα nestin+ νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου προκειμένου να ρυθμίσουν τη νευρογένεση [49]. Βασικής σημασίας ερώτημα ωστόσο παραμένει το εάν, κάτω από ποιές συνθήκες, και σε ποιούς κυτταρικούς πληθυσμούς του ΚΝΣ, επάγονται τα μόρια MHCII.

Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε αναλυτικά το μονοπάτι της IFN γ , που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC II, στα πρόδρομα πολυδύναμα νευρικά κύτταρα HCN. Η παρουσία ανασυνδυασμένης IFN γ για 24 ώρες σε κύτταρα HCN, παρουσία αυξητικών παραγόντων, έδειξε σημαντική επαγωγή του mRNA των υποδοχέων της IFNGR1 και IFNGR2 (**Εικόνα 54 Α,Β**). Διαπιστώθηκε η ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται στην IFN γ , καθώς η παρουσία της οδήγησε σε μεγάλη αύξηση του mRNA του γονιδίου *IRF1* καθώς και στην ενεργοποίηση βασικών μορίων-στόχων του μονοπατιού όπως το iNOS (**Εικόνα 54 Γ,Δ**). Πιο σημαντικά βρέθηκε πολύ μεγάλη επαγωγή του CIITA, κύριου συνενεργοποιητή της μεταγραφής των μορίων MHC II (**Εικόνα 54 Ε**). Δοκιμασίες λουσιφεράσης έδειξαν την επαγωγή του υποκινητή γονιδίου DRA τόσο από την IFN γ , όσο και μετά από διαμόλυνση με εξωγενή CIITA (**Εικόνα 54 ΣΤ**).

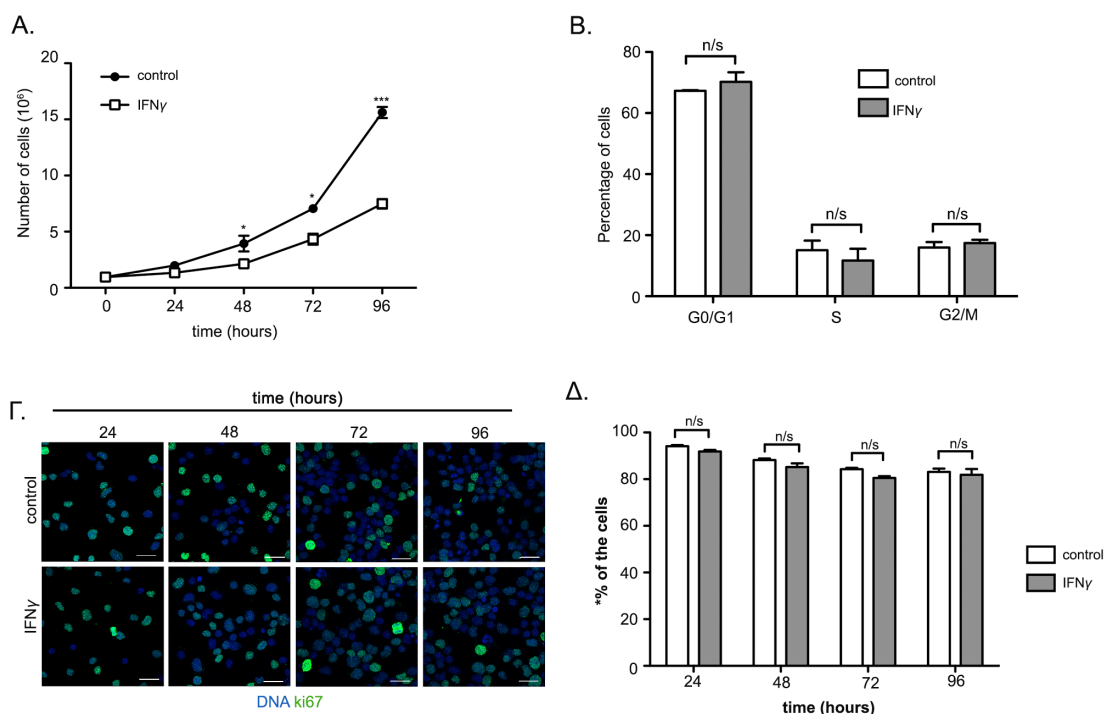


Εικόνα 54. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στη επαγωγή των μορίων MHC class II, είναι ενεργό στα νευρικά βλαστικά κύτταρα του υποκάμπου. Επίπεδα mRNA (RT-qPCR) των γονιδίων (Α) IFNGR1 (Β) IFNGR2 (Γ) IRF1 (Δ) iNOS (Ε) CIITA, μετά απο επίδραση 200 u/ml IFN γ για 24 ώρες . Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους και έχουν κανονικοποιηθεί με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH. (ΣΤ) Δοκιμασία λουσιφεράσης του υποκινητή του γονιδίου DRA παρουσία IFN γ ή εξωγενούς CIITA.

4.2.5. Η IFN γ μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Είδαμε παραπάνω ότι η IFN γ μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των νευροβλαστωματικών κυττάρων, καθυστερώντας τη διέλευσή τους απο τη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Θέλοντας να συγκρίνουμε τη δράση της σε φυσιολογικά νευρικά κύτταρα, προχωρήσαμε στη μελέτη του δυναμικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα HCN. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο πολλαπλασιασμού, παρουσία αυξητικών παραγόντων για διάφορα χρονικά σημεία, απουσία και παρουσία IFN γ .

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία και παρουσία IFN γ για μία έως τέσσερις ημέρες. Σε κάθε χρονικό σημείο, ο αριθμός των κυττάρων προσδιοριζόταν με αιμοκυτταρόμετρο. Βρέθηκε ότι η IFN γ , μειώνει σημαντικά των αριθμό των κυττάρων απο τις δύο ημέρες καλλιέργειας και έπειτα (**Εικόνα 55 Α**). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής. Βρέθηκε ότι η IFN γ , δεν επηρεάζει κάποια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου (**Εικόνα 55 Β**). Τέλος πειράματα ανοσοϊστοχημείας για τον δείκτη πολλαπλασιασμού ki67, δεν επέδειξαν κάποια διαφορά απουσία ή παρουσία IFN γ (**Εικόνα 55 Γ,Δ**).



Εικόνα 55. Η IFN γ επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HCN. (Α) Καμπύλη πολλαπλασιασμού των κυττάρων για 1 έως 4 ημέρες απουσία (control) και παρουσία IFN γ . (Β) Ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου στις 48 ώρες. (Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη ki67. (Δ) Ποσοτικοποίηση των Ki67+ κυττάρων από το (Γ). Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους +/- τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (+/- SEM), n=3.

4.2.6. Η IFN γ επηρεάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων προς τη νευρική μοίρα

Ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης πρόδρομων πολυδύναμων νευρικών κυττάρων είναι η πλαστικότητα τους. Τα κύτταρα αυτά φυσιολογικά δέχονται διάφορα ερεθίσματα από το περιβάλλον τους. Τα ερεθίσματα αυτά, καθορίζουν εάν και πότε θα σταματήσουν να αυτοανανεώνονται και θα διαιρεθούν ασύμμετρα. Οι ασύμμετρες αυτές διαιρέσεις θα δώσουν απογόνους που καθορισμένα θα ακολουθήσουν το μονοπάτι της διαφοροποίησης, έτσι ώστε να δώσουν γένεση σε έναν ή κάποιους από τους τύπους των νευρικών κυττάρων.

Επόμενο στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της ενεργοποίησης του μονοπατιού της IFN γ στην ενεργοποίηση των διαφορετικών προγραμμάτων διαφοροποίησης των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν

παρουσία RA και Fsk, για διάφορα χρονικά σημεία, έως της όγδοη ημέρα, τελικό σημείο διαφοροποίησης. Παράλληλα ελέγχθηκαν δείγματα που είχαν συνεχώς την επίδραση της IFN γ (**Εικόνα 56 A**). Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης διάφορων πρωτεϊνών δεικτών της νευρικής διαφοροποίησης, δηλαδή της διαφοροποίησης των κυττάρων ως προς νευρώνες.

Αρχικά με ανοσοαποτύπωση κατά western, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών Tuj1, DCX και HuD (**Εικόνα 56 B**). Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη DCX, αρχίζει να εκφράζεται από τη δεύτερη ημέρα της διαφοροποίησης και τα επίπεδά της παραμένουν υψηλά μέχρι και την τέταρτη ημέρα. Την όγδοη ημέρα δεν είναι πλέον δυνατή η ανίχνευσή της καθώς τα επίπεδά της έχουν μειωθεί, προκειμένου όπως είναι γνωστό να δώσει τη θέση της σε άλλες πρωτεΐνες που επηρεάζουν τον κυτταρικό σκελετό. Το αποτέλεσμα αυτό, έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία καθώς η πρωτεΐνη DCX εκφράζεται στα αρχικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης [133]. Ο έλεγχος των επιπέδων του DCX παρουσία IFN γ , δεν έδειξε κάποια μεταβολή.

Η πρωτεΐνη Tuj1 θεωρείται ένας πιο όψιμος μάρτυρας της νευρικής διαφοροποίησης από το DCX. Εκφράζεται τόσο στα αρχικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης όσο και σε πιο όψιμα μετα-μιτωτικά στάδια, όπου έχει διαπιστωθεί η συν-έκφρασή της με άλλους όψιμους μάρτυρες όπως το NeuN [162]. Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, παρατηρήσαμε ότι λαμβάνει τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης, την όγδοη ημέρα της διαφοροποίησης, δηλαδή αργότερα από το DCX. Με μεγάλη μας έκπληξη διαπιστώσαμε ότι η IFN γ , επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης Tuj1, η οποία είναι πλέον δυνατό να ανιχνευθεί από τη δεύτερη κιόλας ημέρα διαφοροποίησης παρουσία IFN γ (**Εικόνα 56 B,Γ**).

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα επίπεδα ενός άλλου δείκτη νευρικής διαφοροποίησης, της πρωτεΐνης HuD. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να προσδένεται και να σταθεροποιεί μόρια RNA στα νευρικά κύτταρα. Επίσης μελέτες έχουν συνδέσει την έκφρασή της με τα αρχικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης [163]. Όπως αναμενόταν βρέθηκε να εκφράζεται από τη δεύτερη μέχρι την τέταρτη ημέρα παράλληλα με το DCX. Η παρουσία IFN γ , δεν επέφερε κάποια μεταβολή στα επίπεδά της.

4.2.7. Η IFN γ δεν επηρεάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα

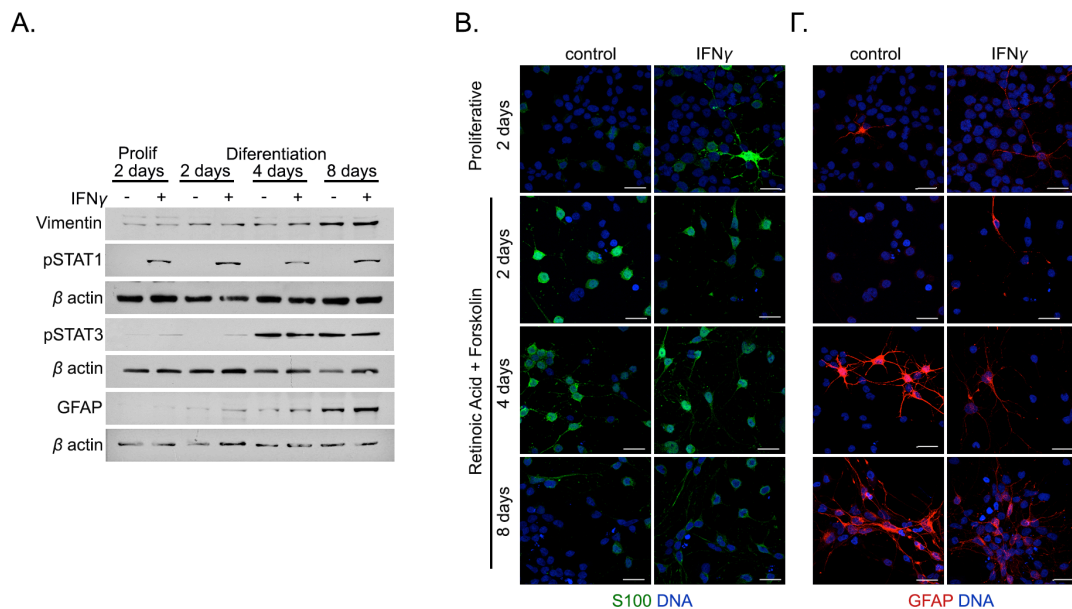
Στα πλαίσια της διερεύνησης της επίδρασης της ενεργοποίησης του μονοπατιού της IFN γ στην ενεργοποίηση των διαφορετικών προγραμμάτων διαφοροποίησης των κυττάρων ελέγχθηκε η δεύτερη πιθανή μοίρα διαφοροποίησης, η γλοιακή. Για το σκοπό αυτό, ομοίως με την παράγραφο 4.2.6., κύτταρα διαφοροποιήθηκαν και ελέγχθηκαν πρωτείνες-δείκτες της γλοιακής μοίρας. Μια από τις πρωτείνες που ελέγχθηκε είναι το GFAP. Η πρωτεΐνη GFAP κατέχει διττό ρόλο στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα. Από τη μία πλευρά αποτελεί μάρτυρα των ώριμων αστροκυττάρων του ενήλικα εγκεφάλου. Από την άλλη είναι γνωστό ότι τα νέα κύτταρα της οδοντωτής έλικας του υποκάμπου είναι θετικά για GFAP [164]. Παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό GFAP+ κυττάρων, στην κατάσταση πολλαπλασιασμού. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, παρατηρήσαμε σταδιακή αύξηση GFAP+ κυττάρων η οποία συνοδευόταν από αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα, όπως είδαμε με ανοσοαποτύπωση western (**Εικόνα 58 Α, Γ**). Η διαφοροποίηση των κυττάρων με συνεχή παρουσία IFN γ , δεν επέφερε κάποια αλλαγή στην έκφραση του GFAP.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης vimentin. Η vimentin, αποτελεί δείκτη ανώριμων αστροκυττάρων, η οποία στη συνέχεια θα δώσει τη θέση της στην έκφραση της πρωτεΐνης GFAP [165]. Τα επίπεδά της βρέθηκαν να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, αποκτώντας τα μέγιστα επίπεδα στις οχτώ ημέρες. Ομοίως με το GFAP, η IFN γ δεν βρέθηκε να επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης vimentin (**Εικόνα 57 Α**).

Τέλος ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης S100 β . Η πρωτεΐνη S100 β έχει την ικανότητα να προσδένει ασβέστιο και εκφράζεται κυρίως στα κύτταρα της αστρογλοίας [166]. Παρατηρήθηκε αύξηση των θετικών κυττάρων για S100 β κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης έως την τέταρτη ημέρα, ενώ την όγδοη ημέρα τα επίπεδά της βρέθηκαν να μειώνονται σημαντικά (**Εικόνα 57 Β**). Η παρουσία IFN γ δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση αυτής της πρωτεΐνης.

Συμπερασματικά παρατηρήσαμε ότι κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων HCN με RA και Fsk πέραν από δείκτες της νευρικής διαφοροποίησης αυξάνονται και δείκτες της γλοιακής μοίρας. Η αύξηση αυτή δεν επηρεάζεται από

την χρόνια παρουσία της IFN γ , γεγονός που ίσως υποδηλώνει τη σηματοδότησή της μόνο σε συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος έχει δεσμευθεί (*committed*) προς τη νευρική γενεαλογία.



Εικόνα 57. Η διαφοροποίηση των HCN κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα, δεν επηρεάζεται από την IFN γ . (Α) Ανοσοαποτύπωση κατά western για τις πρωτείνες vimentin και GFAP. Τα επίπεδα της β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο ισοφόρτωσης και κανονικοποίηση. (Β) Ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη S100 β και (Γ) GFAP κατά τη διάρκεια της οχταήμερης διαφοροποίησης με RA και Fsk. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DRAQ5. Scale bar 20 μ M.

Μέρος Γ'

4.3. Ανάλυση μιας νέας αλληλεπίδρασης μεταξύ CIITA και KLF4 στο νευρικό περιβάλλον

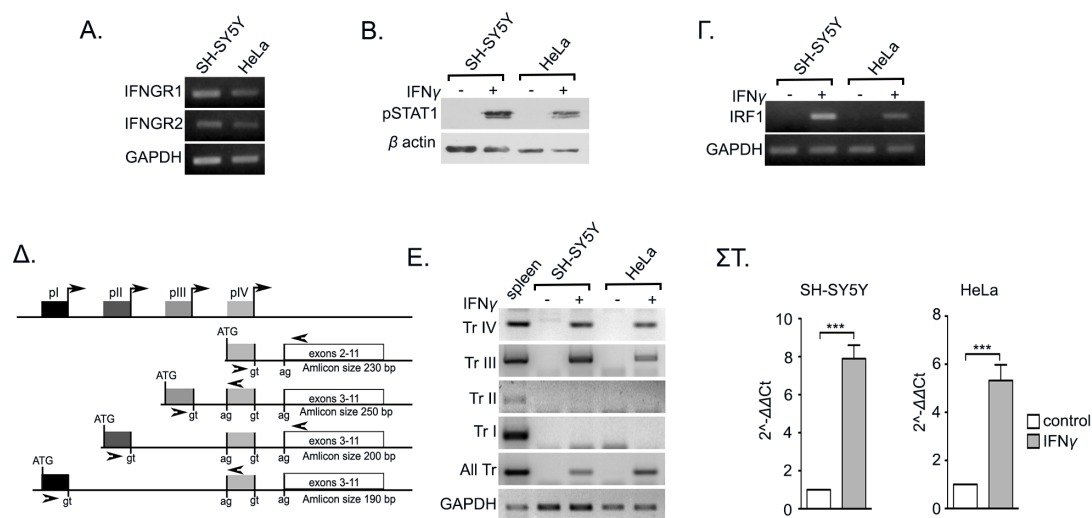
4.3.1. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC τάξης II είναι ενεργό στο νευροβλάστωμα

Έναν από τους πρωταρχικούς στόχους της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, τα μόρια αυτά είναι εξέχουσας σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα, ωστόσο λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη ρύθμιση και τη σημασία τους στο νευρικό σύστημα. Μια πρόσφατη μελέτη συνδέει την έκφραση των μορίων MHC class I, με τη ρύθμιση της συναπτικής λειτουργίας των νευρώνων του υποκάμπου [167]. Για τους παραπάνω λόγους και λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη συγγένεια των δύο μορίων του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στη μελέτη της έκφρασης και του μηχανισμού ρύθμισης των μορίων MHC class II στο νευρικό περιβάλλον.

Πρώτο μας στόχο αποτέλεσε ο έλεγχος των ενδιάμεσων μορίων και στόχων που επιβεβαιώνουν τη λειτουργικότητα του μονοπατιού IFN γ -MHC class II, στην νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα στην μη νευρικής οντογεωετικής προέλευσης κυτταρική σειρά HeLa, ως ένα σύστημα όπου η ρύθμιση των μορίων MHC II έχει μελετηθεί εκτενώς. Χρησιμοποιήθηκαν 200u/ml ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ιντερφερόνης γ για είκοσι τέσσερις ώρες, εκτός από κάποιες πιο ειδικές περιπτώσεις, όπου αναφέρεται. Με RT-qPCR ανιχνεύσαμε μετάγραφα των υποδοχέων της IFN γ , IFNGR1 και IFNGR2 (**Εικόνα 58 A**). Έπειτα επιβεβαιώσαμε την ικανότητα των κυττάρων να αποκρίνονται στην IFN γ , ανιχνεύοντας την αύξηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης pSTAT1 (**Εικόνα 58 B**), καθώς και την πολύ μεγάλη επαγωγή του γονιδίου *IRF1* (**Εικόνα 58 Γ**).

Επόμενος στόχος ήταν η ανίχνευση μεταγράφων CIITA, του κύριου συνενεργοποιητή του MHC II ενισχυοσώματος. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 1.5.1, η ρύθμιση της έκφρασης του CIITA είναι σύνθετη και στηρίζεται

στην ύπαρξη τεσσάρων κύτταρο- και ίστο- ειδικών υποκινητών. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή τεσσάρων διαφορετικών μεταγράφων, τα οποία διαθέτουν διαφορετικά πρώτα εξόνια. Σχεδιάζοντας εκκινητές ειδικούς για κάθε μετάγραφο και χρησιμοποιώντας ως θετικό control RNA απο ανθρώπινη σπλήνα, καταφέραμε να αποδείξουμε ότι τόσο στα HeLa όσο και στα SH-SY5Y κύτταρα, η IFN γ προκαλεί παραγωγή μεταγράφων που προέρχονται από τους υποκινητές III και IV (**Εικόνα 58 Δ,Ε**). Τέλος με RT-qPCR διαπιστώσαμε σημαντική επαγωγή του mRNA του αλληλομόρφου DRA από την IFN γ και στις δύο κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 58 ΣΤ**).



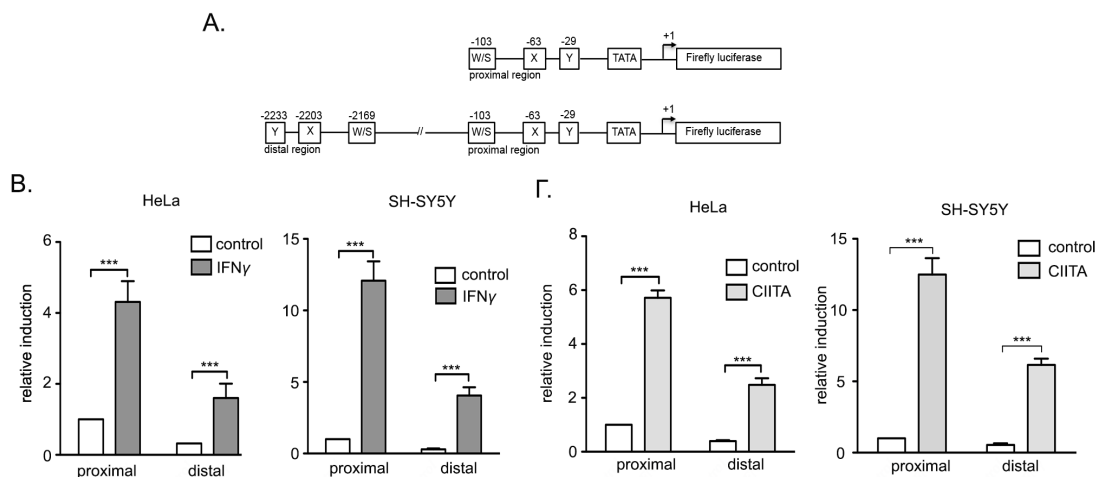
Εικόνα 58. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επάγωση των MHC II είναι ενεργό στα κύτταρα SH-SY5Y. (A) Ημιοσοτική RT-PCR για την ανίχνευση των υποδοχέων της ιντερφερόνης IGFR1 και IGFR2. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. **(B)** Αντιπροσωπευτικό blot στο οποίο φαίνεται η επαγωγή της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης STAT1 από την IFN γ . Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β -actin. **(Γ)** Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου IRF1 από την IFN γ . Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. **(Δ)** Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιακού τόπου όπου εδράζονται οι υποκινητές του CIITA. Με μαύρα βέλη φαίνονται οι περιοχές των εκκινητών. **(Ε)** Επαγωγή των μεταγράφων III και IV CIITA. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. **(ΣΤ)** Επαγωγή του mRNA του γονιδίου DRA από την IFN γ (RT-qPCR). Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους και έχουν κανονικοποιηθεί με βάση τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH.

Συμπερασματικά, παραπάνω περιγράφεται αναλυτικά η ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού της IFN γ που οδηγεί τελικά σε παραγωγή μεταγράφων των

μορίων MHC II στα νευροβλαστωματικά κύτταρα. Οι αναφορές για την επαγωγή των μορίων MHC τάξης II στα νευροβλαστώματα είναι περιορισμένες και συγκεκριμένες. Οι περισσότερες υποστηρίζουν ότι η IFN γ δεν είναι ικανή να επάγει MHC II σε αυτούς τους όγκους είτε λόγω αδυναμίας μεταγραφής του CIITA, είτε γιατί ο CIITA δεν μπορεί να εντοπιστεί στον πυρήνα, [34] είτε λόγω επαγωγής μορίων ανεξάρτητων του CIITA [33]. Τα αποτελέσματά μας (τα οποία έχουμε επιβεβαιώσει και σε άλλες νευροβλαστωματικές σειρές), έρχονται να ξεκαθαρίσουν το τοπίο και πιθανόν να ανοίξουν νέους δρόμους για την εγκαθίδρυση ανοσοθεραπειών στο νευροβλάστωμα.

4.3.2. Κατασκευή πειραματικών εργαλείων για τη μελέτη της ρύθμισης των μορίων MHC τάξης II στα νευροβλαστωματικά κύτταρα

Για τη λεπτομερή μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν περιοχές του υποκινητή του γονιδίου DRA, ανωδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης (**Εικόνα 59 A**). Με πειράματα διαμόλυνσης και δοκιμασίες λουσιφεράσης βεβαιώθηκε η λειτουργικότητα των κατασκευών στα κύτταρα HeLa, αφού σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε η επαγωγή και των δύο υποκινητών απο ιντερφερόνη γ . Πιο συγκεκριμένα ο εγγύς υποκινητής (*proximal promoter*), βρέθηκε να επάγεται περίπου 4 φορές, ενώ ο μεγαλύτερος υποκινητής ο οποίος περιλαμβάνει και την περιοχή με τα μακρινά ρυθμιστικά στοιχεία (*distal elements*) (*distal promoter*), 2 φορές (**Εικόνα 59 B**). Ένα παρόμοιο πρότυπο επαγωγής, αλλά σε αρκετά υψηλότερα επίπεδα, παρατηρήθηκε και στα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y, 12 φορές ο εγγύς και 5 φορές ο μεγαλύτερος υποκινητής (**Εικόνα 59 B**). Επίσης, και οι δύο υποκινητές βρέθηκαν να επάγονται και στις δύο κυτταρικές σειρές από τον εξωγενή CIITA, σε παρόμοια επίπεδα με εκείνα της IFN γ (**Εικόνα 59 Γ**).

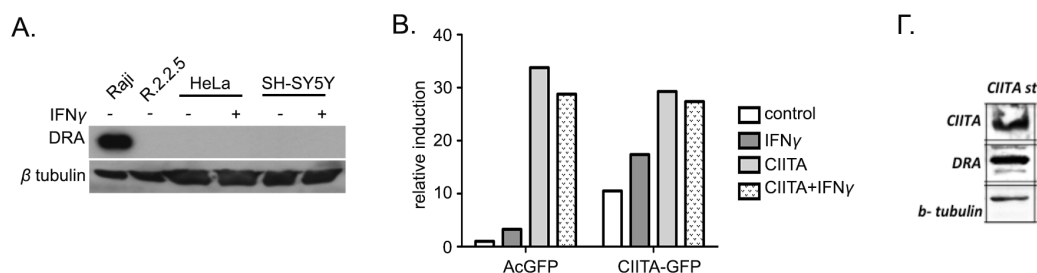


Εικόνα 59. Η IFN γ και ο εξωγενής CIITA επάγουν και τους δύο υποκινητές του DR α στα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. (Α) Σχηματική απεικόνιση των κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν. (Β) Επαγωγή και των δύο υποκινητών σε κύτταρα HeLa και SH-SY5Y μετά από 24 ώρες επώαση με 200 u/ml IFN γ ή (Γ) μετά από υπερέκφραση εξωγενούς CIITA για 24 ώρες. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$.

Επόμενο στόχο αποτέλεσε η ανίχνευση πρωτεϊνών CIITA και MHC class II στα κύτταρα SH-SY5Y. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης (western blots) δοκιμάζοντας διαφορετικά αντισώματα του εμπορίου έναντι των προς μελέτη πρωτεϊνών. Σε καμία από τις συνθήκες που ελέγχθηκαν δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση πρωτεΐνης CIITA και DR α με εξαίρεση τα κύτταρα Raji (**Εικόνα 60 Α**).

Δεδομένης της γνωστής από τη βιβλιογραφία δυσκολίας ανίχνευσης των πρωτεϊνών DR α και CIITA με αντισώματα του εμπορίου και έχοντας υπόψη τις πολύ μικρές ποσότητες πρωτεΐνης που ενδεχομένως παράγουν τα κύτταρα, επιχειρήσαμε τη δημιουργία σταθερής (stable) κυτταρικής σειράς SH-SY5Y για την έκφραση της πρωτεΐνης CIITA. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με φορέα που εκφράζει το cDNA που αντιστοιχεί στο το mRNA του 3^{ου} μεταγράφου του CIITA συζευγμένο με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP. Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία του αντιβιοτικού G418 για περίπου 3 εβδομάδες, συλλέχθηκαν αποικίες και ελέγχθηκαν για την θετικότητά τους. Ο έλεγχος των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης για CIITA και DR α , και δοκιμασίες λουσιφεράσης για τον DR α . Βρέθηκε μια θετική αποικία κυττάρων

(SHSY5Y/CIIITA), στην οποία η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του DRA ήταν περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της control σειράς (SHSY5Y/GFP), ενώ ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά η πρωτεΐνη DRA (Εικόνα 60 Β,Γ).

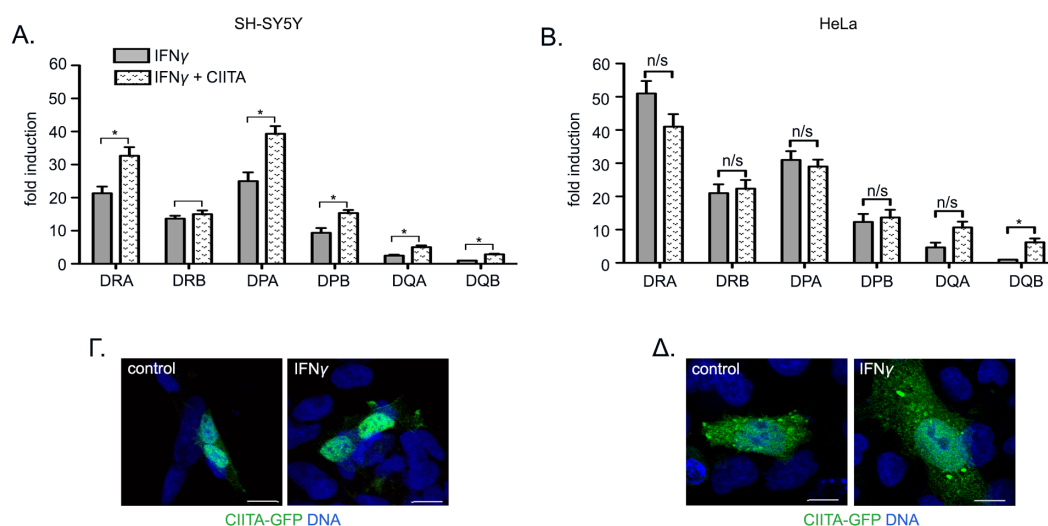


Εικόνα 60. Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς συνεχούς έκφρασης του CIITA (SHSY5Y/CIIITA) (Α) Τα αντισώματα του εμπορίου δεν ήταν δυνατό να ανιχνεύσουν πρωτεΐνη DRA μετά από επαγωγή με IFN γ . Αντιπροσωπευτικό blot στο οποίο αναλύονται δείγματα κυττάρων SH-SY5Y και HeLa τα οποία επωάστηκαν με 200 units/ml IFN γ για 24 ώρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πρωτεΐνης από κύτταρα Raji (ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα). (Β) Δοκιμασία λουσιφεράσης χρησιμοποιώντας τον εγγύ υποκινητή του DRA (ρ DRA-luc). 16 ώρες μετά τη διαμόλυνση η IFN γ αφέθηκε στα κύτταρα για 24 ώρες. (Γ) Βασικά επίπεδα των πρωτεϊνών DRA και CIITA στην σταθερή κυτταρική σειρά SHSY5Y/CIIITA.

4.3.3. Η IFN γ και ο CIITA δρούν συνεργατικά

Πλέον είναι γνωστό ότι η IFN γ , επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνών και μονοπατιών τα οποία είναι ανεξάρτητα της επαγωγής των μορίων MHC τάξης II. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής (βλ.παράγραφο 4.1) αποδείξαμε ότι αυτή η κυτταροκίνη είναι επίσης ικανή να επηρεάσει τα νευροβλαστωματικά κύτταρα μεταβάλλοντας τη σύσταση του πληθυσμού και την κυτταρική μοίρα ενώ παράλληλα αυξάνει δραματικά την έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας MHC II. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίσαμε να διερευνήσουμε αρχικά το ενδεχόμενο μιας πιθανής συνέργειας της IFN γ με τον εξωγενή CIITA στην επαγωγή των μορίων MHC τάξης II. Με άλλα λόγια, στόχος μας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης ανεξάρτητων από τον CIITA, μονοπατιών τα οποία επάγονται από την IFN γ , και θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II.

Ξεκινήσαμε διαμολύνοντας παροδικά, κύτταρα SH-SY5Y ή HeLa με μια κατασκευή η οποία εκφράζει την ισομορφή III του CIITA, παράλληλα με την παρουσία IFN γ , και στη συνέχεια ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης όλων των κύριων αλληλομόρφων των μορίων MHC τάξης II. Στα SH-SY5Y παρατηρήσαμε ότι η ταυτόχρονη παρουσία της IFN γ στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον CIITA, οδήγησε σε μια υπέρ επαγωγή όλων των κυρίων αλληλομόρφων, με εξαίρεση το γονίδιο *DRB* (Εικόνα 61 Α). Αντίθετα, στην κυτταρική σειρά HeLa, η ταυτόχρονη παρουσία των δύο παραγόντων δεν επέφερε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που ελέγχθηκαν (Εικόνα 61 Β). Η παρουσία της IFN γ δεν επηρέασε την κατανομή της πρωτεΐνης CIITA, σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 61 Γ, Δ).



Εικόνα 61. Ο συνδυασμός IFN γ και εξωγενούς CIITA ασκεί προσθετική επίδραση στην επαγωγή των MHCII στα νευρικά κύτταρα. Επίπεδα mRNA (RT-qPCR) όλων των κύριων αλληλομόρφων MHCII σε κύτταρα (Α) SH-SY5Y και (Β) HeLa. (Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που απεικονίζουν την κατανομή του εξωγενούς CIITA, απουσία (control) και παρουσία IFN γ σε κύτταρα SH-SY5Y (Δ) και HeLa. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR κανονικοποιήθηκαν με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ χρησιμοποιώντας το *GAPDH* ως γονίδιο αναφοράς και παρουσιάζονται ως fold induction έναντι του αλληλομόρφου με τη μικρότερη έκφραση σε κάθε κυτταρική σειρά. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$, scale bar 20 μ m.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν μια συνεργατική δράση μεταξύ του εξωγενούς CIITA και της σηματοδότησης από την IFN γ (συμπεριλαμβανομένου και του ενδογενούς CIITA), ως προς την επαγωγή των μορίων MHC τάξης II. Το ερώτημα

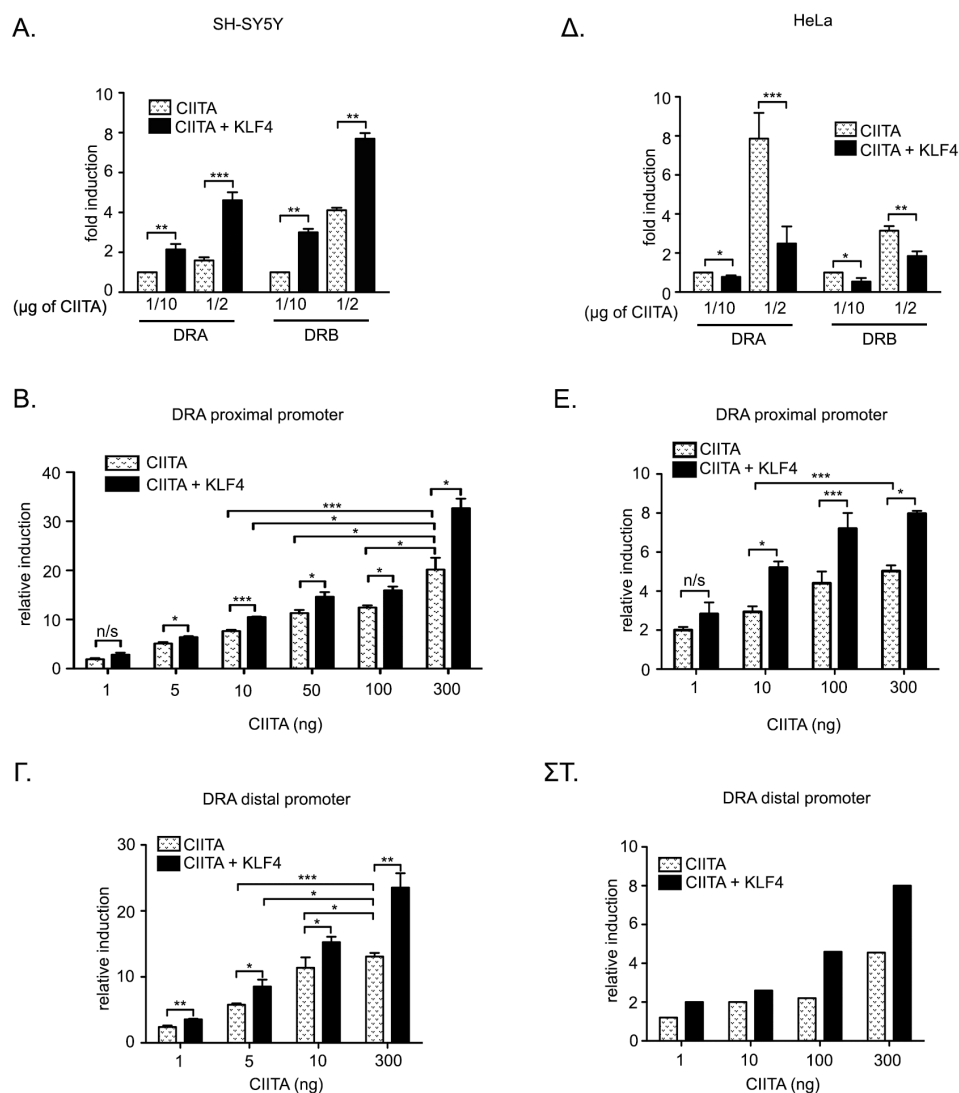
επομένως ήταν ποια είναι τα μόρια στόχοι της IFN γ , που θα μπορούσαν σε συνδυασμό με τον CIITA να επηρεάζουν τη μεταγραφή των μορίων MHC II , στο νευροβλάστωμα. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 4.1.10, στα νευροβλαστωματικά κύτταρα, η IFN γ παράλληλα με την επαγωγή του CIITA και τη δραματική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων MHCI, επάγει επίσης και την έκφραση του KLF4. Έτσι, ο επόμενος στόχος της προσπάθειάς μας ήταν να διερευνηθεί κατά πόσον η επαγωγή του KLF4 από την IFN γ , συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων MHCI.

4.3.4. Εμπλοκή του KLF4 στην μεταγραφική ικανότητα του CIITA

Το πλήρες cDNA για την ανθρώπινη πρωτεΐνη KLF4, κλωνοποιήθηκε σε ένα πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Η κατασκευή έφερε επίσης το πεπτίδιο Flag στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ακολούθησαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης του KLF4 σε συνδυασμό με τον CIITA. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του πλασμιδίου pCIITA-EGFP, (1/10 και 1/2 του συνολικού DNA), ενώ η συγκέντρωση του pKLF4-Flag παρέμεινε σταθερή. Πειράματα RT-qPCR αποκάλυψαν ότι η παρουσία του KLF4 προκαλεί μια σημαντική αύξηση της ικανότητας του CIITA να επάγει τα ενδογενή επίπεδα mRNA των αλληλομόρφων DRA και DRB, στα κύτταρα SH-SY5Y (**Εικόνα 62 A**). Με σκοπό να προσδιορισθεί η περιοχή του υποκινητή των MHCI που επηρεάζεται από τον KLF4 πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης τόσο με τον εγγύς υποκινητή του DRA (pDRAprox-Luc) όσο και με τον μεγαλύτερο υποκινητή που περιλαμβάνει και τα μακρινά ρυθμιστικά στοιχεία (pDRAdistal-Luc). Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν καμπύλες δόσης-απόκρισης (*dose-response curves*) του CIITA κρατώντας τη συγκέντρωση του KLF4 σταθερή. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του KLF4 ενισχύει την μεταγραφική ενεργότητα του CIITA και στους δυο υποκινητές του DRA (**Εικόνα 62 B, Γ**). Πιο συγκεκριμένα 50 ng CIITA παρουσία KLF4 επάγουν τον εγγύς υποκινητή του DRA, όσο 300 ng CIITA. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο KLF4 μόνος του, δεν ήταν ικανός να επάγει τον υποκινητή του DRA σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν.

Τα παραπάνω πειράματα έγιναν και σε κύτταρα HeLa. Προς μεγάλη μας έκπληξη, διαπιστώσαμε ότι στα κύτταρα αυτά, η παρουσία του KLF4, μειώνει την

ικανότητα του εξωγενούς CIITA να επάγει τα ενδογενή επίπεδα mRNA των μορίων MHC τάξης II. Τα πειράματα RT-qPCR έδειξαν μείωση της επαγωγιμότητας των γονιδίων *DRA* και *DRB*, από τον CIITA έως και 2 φορές, παρουσία του KLF4 (**Εικόνα 62 Δ**). Ωστόσο, οι δοκιμασίες λουσιφεράσης στα κύτταρα HeLa έδειξαν ότι όχι μόνο δεν καταστέλλεται η ενεργότητα του CIITA στους υποκινητές του *DRA* από τον KLF4, αλλά αντίθετα, παρατηρείται μια συνεργατική δράση, παρόμοια με αυτή που βλέπουμε στα κύτταρα SH-SY5Y (**Εικόνα 62 Ε, ΣΤ**). Δηλαδή 10ng CIITA παρουσία KLF4, είναι ικανά να επάγουν τον εγγύς υποκινητή του *DRA* στα κύτταρα HeLa, όσο 300 ng CIITA.



Εικόνα 62. Ο KLF4 επηρεάζει το μεταγραφικό δυναμικό του CIITA τόσο στα SH-SY5Y όσο και HeLa κύτταρα. Έλεγχος της επαγωγής των mRNA των γονιδίων *DRA* και *DRB* με RT-qPCR στα κύτταρα (Α) SH-SY5Y και (Δ) HeLa, μετά από διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς

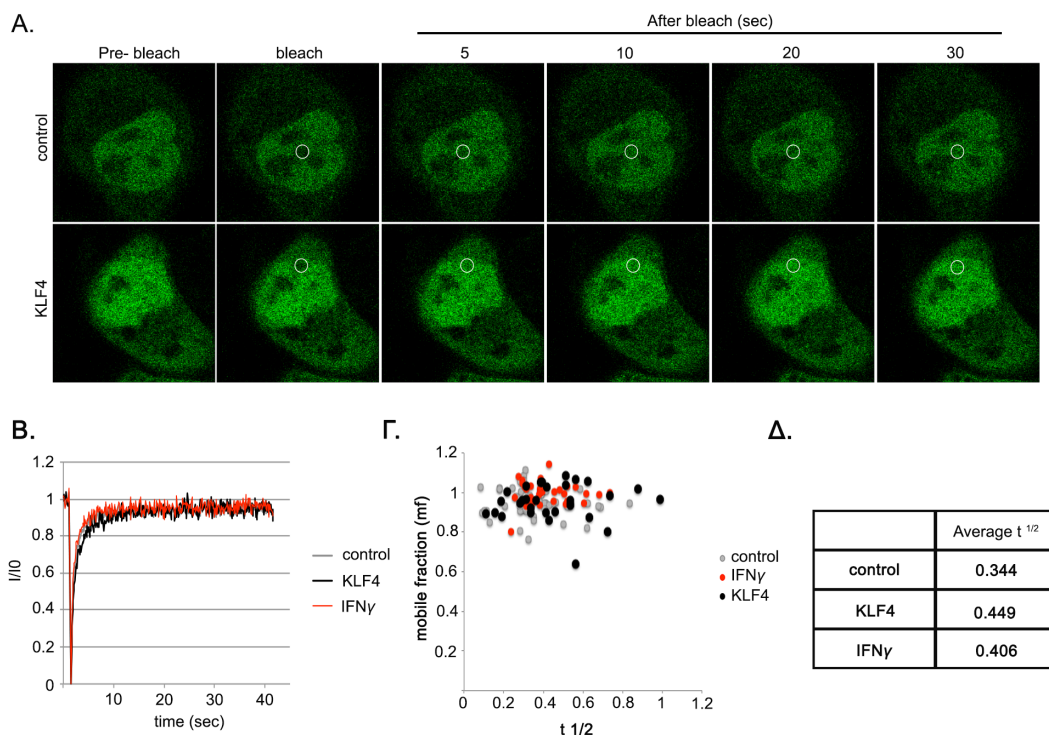
έκφρασης για τον CIITA και τον KLF4. Δοκιμασίες λουσιφεράσης στα κύτταρα (B, Γ) SH-SY5Y και (E, ΣΤ) HeLa με τον εγγύς (*pDRApprox-Luc*, B, E) ή τον μεγαλύτερο υποκινητή (*pDRAdistal-Luc*, Γ, ΣΤ) Τα αποτελέσματα της RT-qPCR κανονικοποιήθηκαν με τη μέθοδο ΔΔCt, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 61. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$. Στις δοκιμασίες λουσιφεράσης τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την ενεργότητα του πλασμιδίου *renilla*.

Απο τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας KLF4, εμπλέκεται στη ρυθμιστική και μεταγραφική ικανότητα του CIITA. Τα αντίθετα αποτελέσματα που παρατηρούνται στα HeLa κύτταρα, σε ότι αφορά τα ενδογενή γονίδια του γενετικού τόπου MHCII είναι πιθανό να υποδηλώνουν εμπλοκή της χρωματινικής δομής, με τρόπο τέτοιο, που να μην μπορεί να εκδηλωθεί στα πλασμίδια που φέρουν τις περιοχές των υποκινητών του DRA που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Και αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε εξαιτίας του τρόπου με τον οποίο το πλασμιδιακό DNA συνδέεται με τις ιστόνες και αποκτά την ιδιαίτερη νουκλεοπρωτεϊνική του δομή [168], είτε εξαιτίας της περιορισμένης έκτασης των ρυθμιστικών περιοχών που περιλαμβάνονται στις κατασκευές [85], [86].

4.3.5. Ο KLF4 επηρεάζει την κινητικότητα του CIITA στον πυρήνα

Δεδομένης της εμπλοκής του KLF4 στη μεταγραφική ικανότητα του CIITA, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό να διευκρινιστεί το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο παραγόντων. Αρχικά αποφασίσαμε να μελετήσουμε την κινητικότητα του CIITA στον πυρήνα, παρουσία και απουσία KLF4. Για το σκοπό αυτό, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) και στις δύο κυτταρικές σειρές. Οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πολύ κινητικοί μέσα στον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη (προσδένονται/αποσυνδέονται) με ένα γρήγορο τρόπο, ο οποίος εξαρτάται από τον μηχανισμό δράσης του καθενός. Η τάση αυτή αντικατοπτρίζει τη γενική δραστηριότητα του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα, η οποία είναι σημαντική για τη λειτουργία του. Κύτταρα HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον φορέα pCIITA-

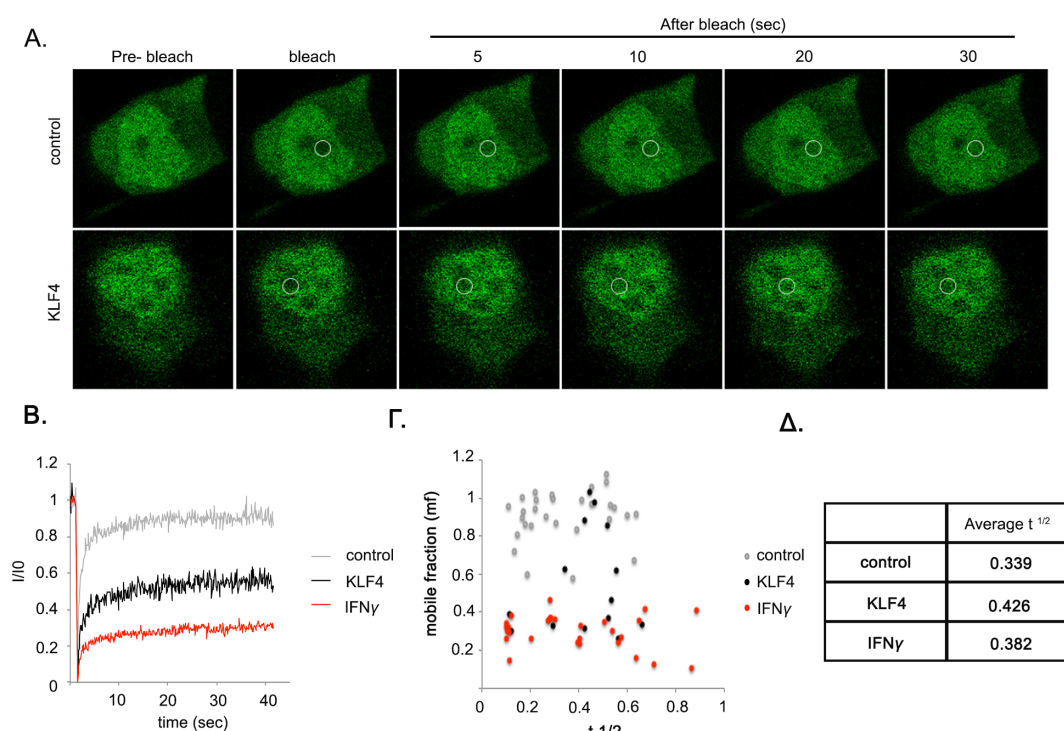
EGFP, με ή χωρίς τον KLF4 και απουσία ή παρουσία IFN γ . Μία μέρα μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα φωτοσκιάστηκαν σε μια μικρή περιοχή του πυρήνα και η επαναφορά του φθορισμού μετρήθηκε σε βάθος χρόνου 40 δευτερολέτων. Κύτταρα διαμολυσμένα μόνο με CIITA χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο ελέγχου. Ο φθορισμός του CIITA, επανήλθε πολύ γρήγορα στα αρχικά επίπεδα μετά τη φωτολεύκανση. Παρουσία KLF4, ο φθορισμός του CIITA, επανήλθε πλήρως μετά από περίπου 9 δευτερόλεπτα, ενώ με την παρουσία IFN γ , περίπου μετά από 8 δευτερόλεπτα (**Εικόνα 63 B, Δ**). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο φθορισμός σε όλα τα δείγματα επανήλθε πλήρως, στο 100% του αρχικού υποδηλώνοντας την πλήρη κινητικότητα της πρωτεΐνης CIITA στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδηλώνουν ότι η παρουσία IFN γ ή εξωγενούς KLF4 οδηγεί σε αύξηση της «απασχόλησης» του CIITA σε περιοχές της χρωματίνης.



Εικόνα 63. Η κινητικότητα (χρόνος ημίσειας ανάκαμψης, $t_{1/2}$) του CIITA στον πυρήνα αυξάνεται στα κύτταρα HeLa παρουσία εξωγενούς KLF4 ή IFN γ . (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν τον πυρηνικό εντοπισμό του CIITA, την περιοχή της φωτολεύκανσης, καθώς και της πορείας ανάκαμψης του φθορισμού κατά τη διάρκεια του πειράματος. (B) Επίπεδα επαναφθορισμού του CIITA παρουσία KLF4 και IFN γ ως συνάρτηση του χρόνου. (Γ) Σημεία του κάθε πειράματος που δείχνουν το κινητό κλάσμα ως συνάρτηση του $t_{1/2}$. (Δ)

Πίνακας στον οποίο δείχνονται οι μέσοι όροι των χρόνων ημίσειας ανάκαμψης, $t_{1/2}$. $n>30$ για κάθε συνθήκη απο τουλάχιστον τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Ακολούθησε η ίδια σειρά πειραμάτων σε κύτταρα SH-SY5Y. Ομοίως με τα κύτταρα HeLa, ο φθορισμός του CIITA επανήλθε πολύ γρήγορα στο 100% του αρχικού. Προς μεγάλη μας έκπληξη, η παρουσία KLF4, οδήγησε σε σημαντική μείωση της επαναφοράς του φθορισμού του CIITA, περίπου στο 50% του αρχικού, ακόμη και σε βάθος χρόνου 40 δευτερολέπτων. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και με την παρουσία IFN γ , όπου η επαναφορά φθορισμού του CIITA ήταν περίπου στο 30 % του αρχικού. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η παρουσία IFN γ ή εξωγενούς KLF4 οδηγεί σε δραματική μείωση του ελεύθερα διαχεόμενου CIITA στον πυρήνα των κυττάρων SH-SY5Y. Το γεγονός αυτό, θα μπορούσε να υποδηλώνει ισχυρή πρόσδεση της πρωτεΐνης CIITA σε χρωματινικές δομές ή περιοχές του πυρηνικού σκελετού.



Εικόνα 64. Το $t_{1/2}$ και το μη κινητικό κλάσμα του CIITA αυξάνεται στα κύτταρα SH-SY5Y παρουσία εξωγενούς KLF4 ή IFN γ . (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες που απεικονίζουν την περιοχή της φωτολεύκανσης και την πορεία ανάκαμψης του φθορισμού κατά τη διάρκεια του πειράματος. (B) Επίπεδα επαναφθορισμού του CIITA παρουσία KLF4 και IFN γ ως συνάρτηση του χρόνου. (Γ) Σημεία του κάθε πειράματος που δείχνουν το κινητό κλάσμα

ως συνάρτηση του $t_{1/2}$. (Γ) Πίνακας στον οποίο δείχνονται οι μέσοι όροι των χρόνων ημίσειας ανάκαμψης, $t_{1/2}$ $n > 30$ για κάθε συνθήκη από τουλάχιστον τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Συμπερασματικά, η παρουσία KLF4 και στα δύο κυτταρικά συστήματα, οδηγεί σε αύξηση του χρόνου επαναφοράς του φθορισμού του κινητού κλάσματος της πρωτεΐνης CIITA στον πυρήνα. Η αύξηση αυτή, επιβεβαιώνει την υπόθεση εμπλοκής του KLF4 στη μεταγραφική δραστηριότητα του CIITA η οποία φαίνεται να έχει έναν κυτταρο-ειδικό χαρακτήρα, αφού εκδηλώνεται με διαφορετικό τρόπο στα δύο κυτταρικά συστήματα. Επιπροσθέτως, στα SH-SY5Y παρατηρήσαμε δραματική μείωση του κινητικού κλάσματος της πρωτεΐνης. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να υποδηλώνει τη συμμετοχή του CIITA σε πολύ σημαντικές και άγνωστες μέχρι τώρα χρωματινικές διεργασίες. Είναι αξιοσημείωτο ότι και στα δύο συστήματα παρουσία IFN γ παρατηρήθηκε η ίδια τάση, με αυτή που παρατηρούμε παρουσία KLF4. Το γεγονός αυτό, ενισχύει την υπόθεση να είναι ο KLF4, ο ενδιάμεσος παράγοντας που επάγεται από IFN γ και επηρεάζει τη δραστηριότητα του CIITA, όχι μόνο ως προς τη μεταγραφή των μορίων MHC τάξης II, αλλά και ως προς την πιθανή ρύθμιση από τον CIITA μεγάλου εύρους χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στον πυρήνα.

4.3.6. Ο KLF4 επηρεάζει τη σταθερότητα του CIITA μέσω της δράσης του πρωτεασώματος.

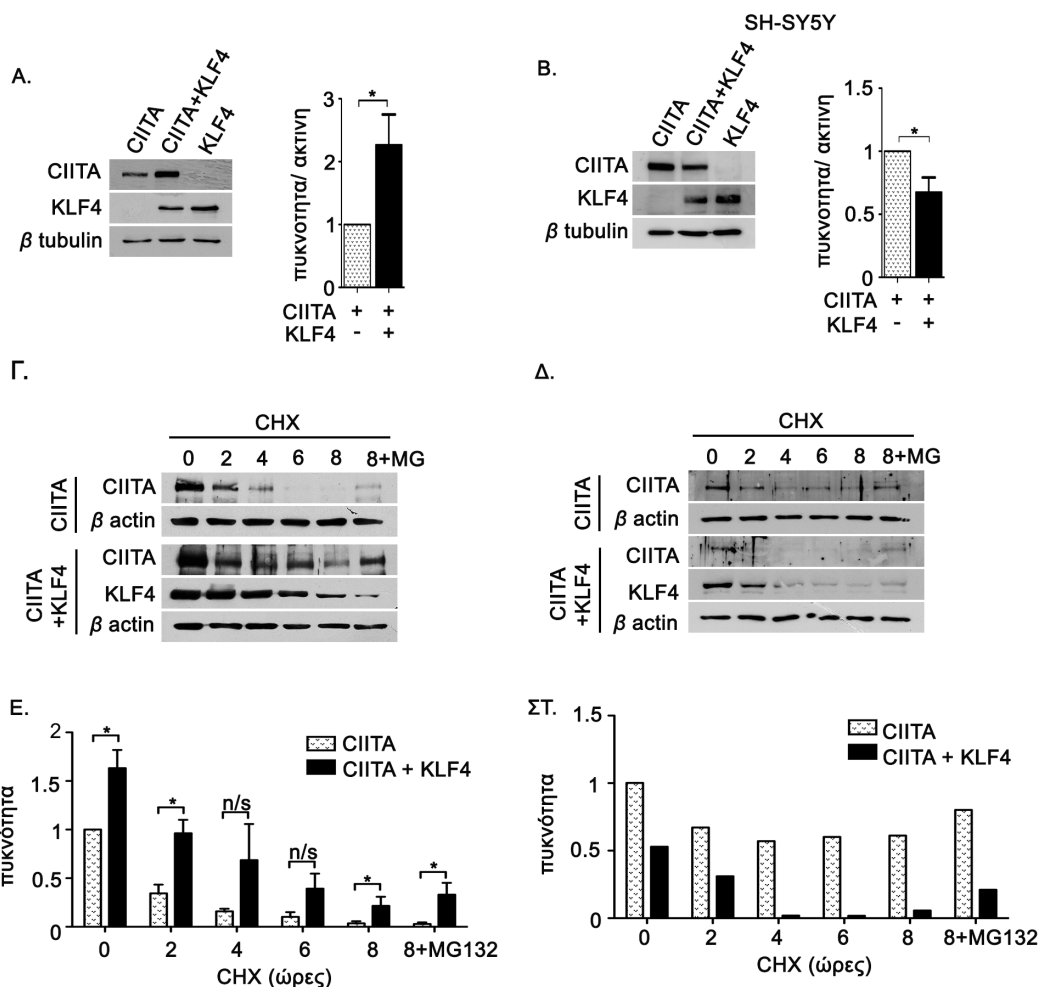
Ο CIITA έχει μικρό χρόνο ημιζωής και αποικοδομείται από το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος [169],[170]. Έτσι, ο δεύτερος παράγοντας που ελέγξαμε προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα τον μηχανισμό της επίδρασης του KLF4 στη μεταγραφική ικανότητα του CIITA, ήταν η πιθανή του δράση στη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa και SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με τον pCIITA-EGFP, pFlag-KLF4, ή συνδυασμό των δύο πλασμιδίων, και 36 ώρες αργότερα απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Στα HeLa η παρουσία του εξωγενούς CIITA οδήγησε σε μια σαφή, και στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης CIITA (κατά δύο φορές περίπου) (**Εικόνα 65 A**). Προς μεγάλη μας έκπληξη, παρατηρήσαμε ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα

στα κύτταρα SH-SY5Y. Σε αυτό το κυτταρικό περιβάλλον, τα επίπεδα του CIITA μειώθηκαν παρουσία του εξωγενούς KLF4 (**Εικόνα 65 Β**).

Αρχικά τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκαν αντικρουόμενα καθώς στα HeLa, τα επίπεδα του CIITA αυξάνονται παρουσία KLF4, όμως η αύξηση αυτή, συνοδεύεται από μειωμένη μεταγραφή των μορίων MHC τάξης II, ενώ στα κύτταρα SH-SY5Y συμβαίνει το αντίθετο. Ερευνώντας τη βιβλιογραφία διαπιστώσαμε ότι η μεταγραφική ενεργότητα του CIITA στα HeLa κύτταρα συνδέεται άμεσα με τη λειτουργία του πρωτεοσώματος. Μάλιστα, αν αφαιρεθούν τα αμινοξέα του CIITA, που είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη Sug1 της υπομονάδας 19 S του πρωτεασώματος, τότε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του CIITA αυξάνονται σημαντικά αλλά μειώνεται η ικανότητά του να μεταγράφει τα μόρια τάξης II [75]. Έτσι, στη συνέχεια επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε αν η διαφορική επίδραση του KLF4 στην πρωτεϊνικά επίπεδα του CIITA στα δύο διαφορετικά κυτταρικά περιβάλλοντα συνδέεται με τη δράση του πρωτεασώματος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της πρωτεϊνολύσεως, το κυκλοεξιμίδιο (*cycloheximide*, CHX). Ο αναστολέας αυτός αλληλεπιδρά και σταματά την πρωτεϊνολύση στο βήμα της επιμήκυνσης της μετάφρασης.

Κύτταρα HeLa και SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με pCIITA-EGFP ή pCIITA-EGFP και pFlag-KLF4, και 24 ώρες αργότερα προστέθηκε CHX για 2,4,6 και 8 ώρες. Ακολούθησε απομόνωση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά western. Όπως αναμενόταν απουσία εξωγενούς KLF4 παρατηρήθηκε μια προοδευτική μείωση των επιπέδων CIITA, αυξανόμενης της χρονικής διάρκειας επώασης με CHX και στις δύο κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 65 Γ/Ε, Δ/ΣΤ**). Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης CIITA, βρέθηκε να είναι περίπου 3 ώρες. Η παρουσία του εξωγενούς KLF4 όμως, οδήγησε σε μια σημαντική αύξηση, περίπου τρεις φορές, των επιπέδων της πρωτεΐνης CIITA καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στα κύτταρα HeLa. Ήταν δυνατό να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη CIITA στα κύτταρα αυτά, ακόμη και μετά από 8 ώρες συνεχούς παρουσίας CHX. Η αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος από τον παράγοντα MG132 σε αυτό το χρονικό σημείο σταθεροποίησε τον CIITA επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή του συστήματος ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος (**Εικόνα 65 Γ/Ε**). Από την άλλη πλευρά, στα κύτταρα

SH-SY5Y η παρουσία του KLF4 μείωσε τη σταθερότητα του CIITA σε όλα τα χρονικά σημεία που ελέγχθηκαν (Εικόνα 65 Δ/ΣΤ).



Εικόνα 65. Ο μεταγραφικός παράγοντας KLF4 επηρεάζει τη σταθερότητα του CIITA, εμπλέκοντας τη λειτουργία του πρωτεασώματος. (Α) Ολικά επίπεδα CIITA απουσία και παρουσία KLF4 σε κύτταρα HeLa και (Β) SH-SY5Y, 36 ώρες μετά τη διαμόλυνση με τους αντίστοιχους φορείς έκφρασης (Γ) Ολικά επίπεδα CIITA απουσία και παρουσία εξωγενούς KLF4 μετά απο επεξεργασία με CHX για 2,4,6 και 8 ώρες σε κύτταρα HeLa και (Δ) SH-SY5Y. (Ε), (ΣΤ) Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στα (Α), (Β), (Ε) και (ΣΤ) έγινε με το πρόγραμμα ImageJ. Ως δείκτες ισοφόρτωσης και σημείο αναφοράς για την κανονικοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-τουμπουλίνης ή της β-ακτίνης. Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$.

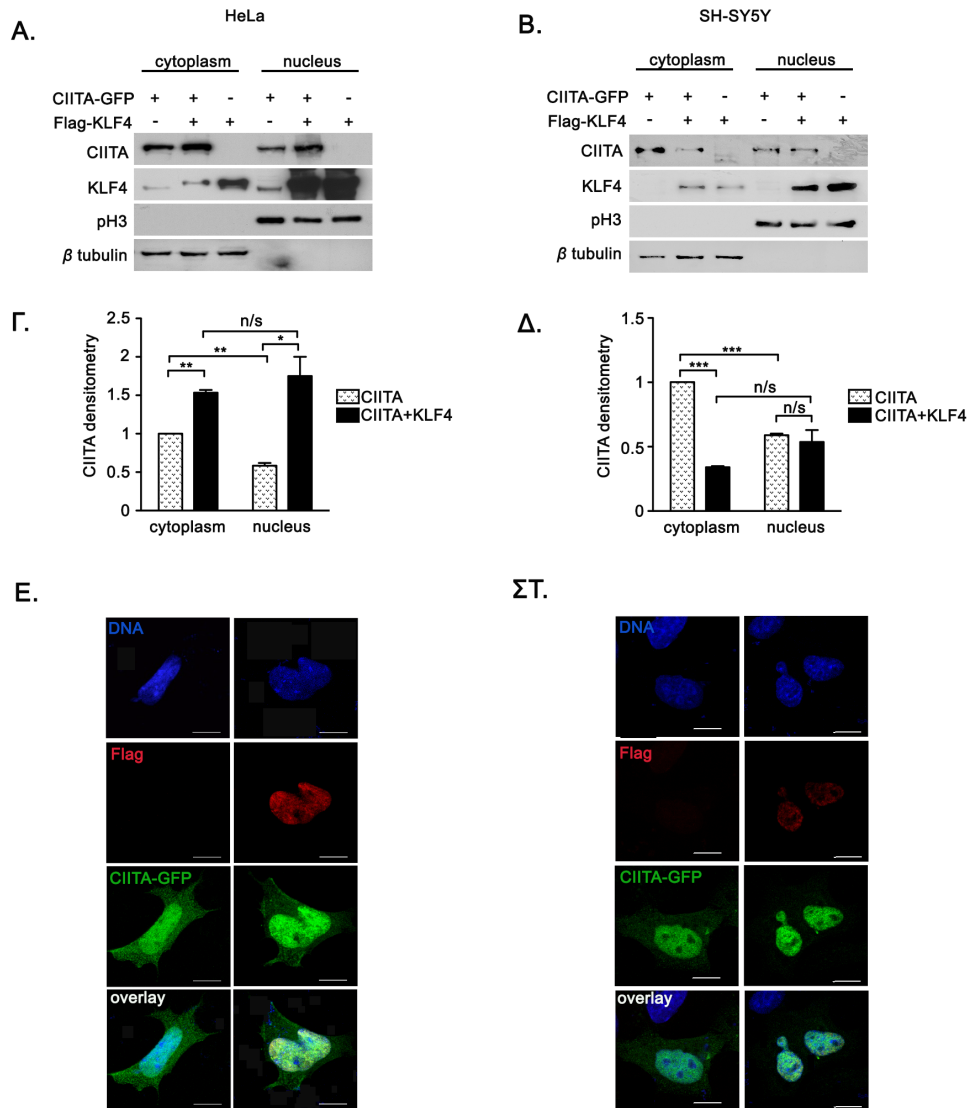
Απο τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο KLF4 επηρεάζει τη μεταγραφική ικανότητα του CIITA, με μηχανισμό τέτοιο, που να απαιτεί την εμπλοκή του πρωτεασώματος, και μάλιστα με έναν κυτταρο-ειδικό

τρόπο. Η υπόθεσή αυτή είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Bhat και συνεργατών, οι οποίοι έδειξαν ότι η έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς κάτω από τον υποκινητή του DRA μειωνόταν όταν κύτταρα HeLa διαμολυσμένα με CIITA ή επωασμένα με IFN γ όταν αυτά επώαστηκαν με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 [171].

4.3.7. Ο KLF4 επιδρά στον εντοπισμό του CIITA

Σήμερα είναι πλέον σαφές ότι το πρωτεάσωμα εμπλέκεται στον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων των μεταγραφικών παραγόντων, της αφθονίας τους, καθώς και του υποκυτταρικού εντοπισμού τους [172], [173], [174]. Επιπλέον, τα πρωτεάσωμα εντοπίζονται και στον πυρήνα, όπου μπορούν να συνδέονται με διάφορες περιοχές του πυρήνα όπως για παράδειγμα τα διαχρωματινικά πυρηνικά στίγματα (*interchromatin nuclear speckles*) [175] ή τα πυρηνικά σωμάτια που σχετίζονται με τον πυρηνικό σκελετό (*matrix-associated nuclear bodies*) [176]. Έτσι, επόμενο βήμα αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του KLF4 στον του υποκυτταρικό εντοπισμό του CIITA. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαχωρισμού κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων. Κύτταρα HeLa και SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pCIITA-EGFP, pCIITA-EGFP και τον συνδυασμό τους, και 24 ώρες αργότερα απομονώθηκαν τα εκχυλίσματα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western.

Στα HeLa κύτταρα, παρατηρήθηκε γενική σταθεροποίηση της πρωτεΐνης CIITA τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, παρουσία KLF4 (**Εικόνα 66 Α, Γ**). Η σταθεροποίηση αυτή συνοδευόταν και από μια αλλαγή στο πρότυπο της κατανομής της πρωτεΐνης εντός του πυρήνα όπως φάνηκε από την ανάλυση των εικόνων της συνεστιακής μικροσκοπίας. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία KLF4, ώθησε τον CIITA, να λάβει μια πιο στικτή και συγκεντρωμένη οργάνωση στον πυρήνα (**Εικόνα 66 Ε**). Από την άλλη πλευρά, στα κύτταρα SH-SY5Y η παρουσία KLF4 είχε ως αποτέλεσμα την συγκέντρωση του μεγαλύτερου μέρους της πρωτεΐνης CIITA στον πυρήνα, με ταυτόχρονη μείωση του κυτταροπλασματικού κλάσματος (**Εικόνα 66 Β, Δ**). Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε μια αλλαγή στην κατανομή του CIITA στον πυρήνα από διάχυτη σε στικτή, παρουσία του KLF4, ομοίως με τα κύτταρα HeLa (**Εικόνα 67 ΣΤ**).



Εικόνα 66. Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης *CIITA* εντοπίζεται στον πυρήνα, λαμβάνοντας μια πιο σιτική κατανομή, παρουσία του *KLF4*. Διαχωρισμός κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά western σε κύτταρα (Α) *HeLa* και (Β) *SH-SY5Y*. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του *CIITA* που εντοπίζεται σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα στα κύτταρα (Γ) *HeLa* και (Δ) *SH-SY5Y* έγινε με το πρόγραμμα *ImageJ*. Η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με αντισώματα έναντι της β-τουμπουλίνης και της φωσφορυλιωμένης ιστόνης 3 (*Phospho-Histone, P-H3*) Ως δείκτες ισοφόρτωσης και σημείο αναφοράς για την κανονικοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-τουμπουλίνης. Όλα τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$ (Ε) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που δείχνουν την κατανομή του *CIITA* απουσία και παρουσία *KLF4* στα κύτταρα (Ε) *HeLa* και (ΣΤ) *SH-SY5Y*. Scale bar 5μM.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν μια σαφή τάση του CIITA να βρίσκεται στον πυρήνα όταν συνεκφράζεται με τον KLF4. Αυτό συνοδεύεται, και στα δύο βιολογικά συστήματα από αλλαγή στην κατανομή της πρωτεΐνης. Οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να οφείλονται είτε σε αυξημένη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, είτε σε αδυναμία εξόδου από τον πυρήνα, παρουσία KLF4. Από την άλλη πλευρά η αλλαγή στην κατανομή που παρατηρήσαμε, θα μπορούσε να οφείλεται στη συγκέντρωση του CIITA σε διάφορες δομές του πυρήνα, όπως PML bodies ή σε συγκεκριμένες περιοχές της χρωματίνης για λόγους που αξίζει να ερευνηθούν.

4.3.8. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330 του CIITA είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τον KLF4

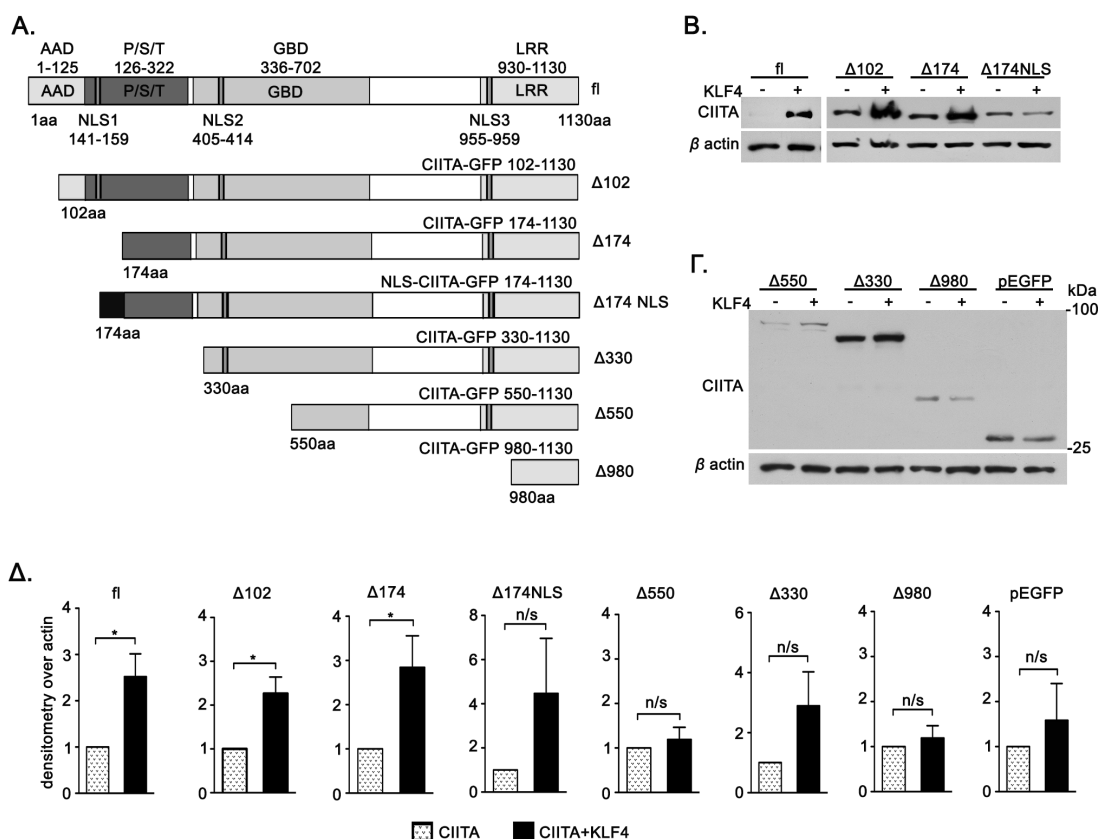
Η πρωτεΐνη CIITA που παράγεται από τον τρίτο υποκινητή, όπως προαναφέρθηκε, είναι επαγόμενη από IFN γ και αποτελείται από 1130 αμινοξικά κατάλοιπα με διάφορες ρυθμιστικές και τροποποιητικές περιοχές. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρήσαμε ότι ο KLF4 επηρεάζει την κινητικότητα, τη σταθερότητα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του CIITA. Επόμενο στόχο, αποτέλεσε ο προσδιορισμός της περιοχής της πρωτεΐνης CIITA, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον KLF4.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές του CIITA με διαδοχικές ελλείψεις αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Οι κατασκευές αυτές ήταν όλες συζευγμένες με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (**Εικόνα 67 A**). Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με αυτές τις κατασκευές με ή χωρίς το πλασμίδιο pFlag-KLF4. Ακολούθησε απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά western. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν η κατασκευή αγρίου τύπου του CIITA καθώς και ο φορέας pEGFP.

Η αφαίρεση των πρώτων 102 αμινοξέων του CIITA δεν επηρέασε τη σταθεροποίησή του από τον KLF4. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη διαγραφή των πρώτων 174 αμινοξέων (**Εικόνα 67 B**). Ωστόσο είναι γνωστό ότι μεταξύ των αμινοξέων 141-159 εντοπίζεται το πρώτο σήμα εισόδου της πρωτεΐνης στον πυρήνα NLS1, και αν αυτό διαγραφεί η πρωτεΐνη αδυνατεί πλέον να εισέλθει στον πυρήνα [109]. Σκεπτόμενοι ότι η σταθεροποίηση του CIITA θα μπορούσε να

σχετίζεται με το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο αυτός εντοπίζεται, χρησιμοποιήσαμε μια πλασμιδιακή κατασκευή, απο την οποία απουσίαζαν τα πρώτα 174 αμινοξέα, αλλά στο αμινοτελικό άκρο είχε εισαχθεί ένα σήμα εισόδου στον πυρήνα προερχόμενο απο τον ιό SV40, την κατασκευή rCIITA Δ 174-NLS. Με μεγάλη μας έκπληξη, παρατηρήσαμε ότι η κατασκευή αυτή, ενώ πλέον εντοπιζόταν στον πυρήνα (**Εικόνα 67**), δεν μπορούσε να σταθεροποιηθεί από τον KLF4. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι ο εντοπισμός της πρωτεΐνης CIITA παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, για την αλληλεπίδραση με τον KLF4.

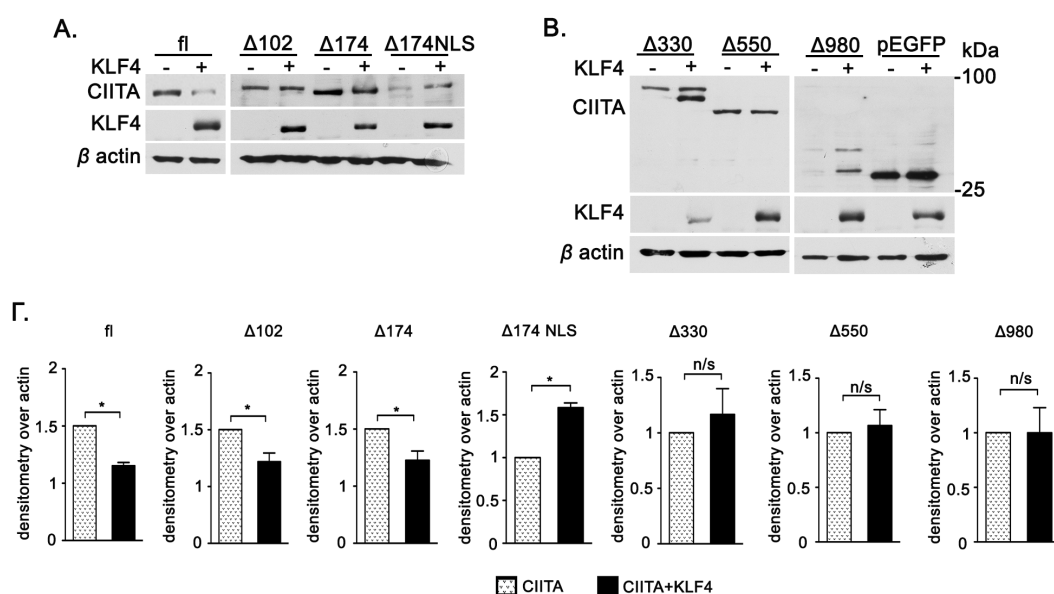
Ακολούθως διαγράφοντας τα πρώτα 330 αμινοξέα του CIITA παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν πλέον δυνατή η σταθεροποίησή του απο τον KLF4. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τις κατασκευές rCIITA Δ 550 και rCIITA Δ 980 (**Εικόνα 67 Γ**). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330 του CIITA, είναι υπεύθυνα για την σταθεροποίηση απο τον KLF4 στην κυτταρική σειρά HeLa.



Εικόνα 67. Ο KLF4 σταθεροποιεί τον CIITA στα κύτταρα HeLa αλληλεπιδρώντας με τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330. (Α) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδιακών κατασκευών του CIITA που χρησιμοποιήθηκαν (τροποποίηση απο [76]). (Β), (Γ) Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα

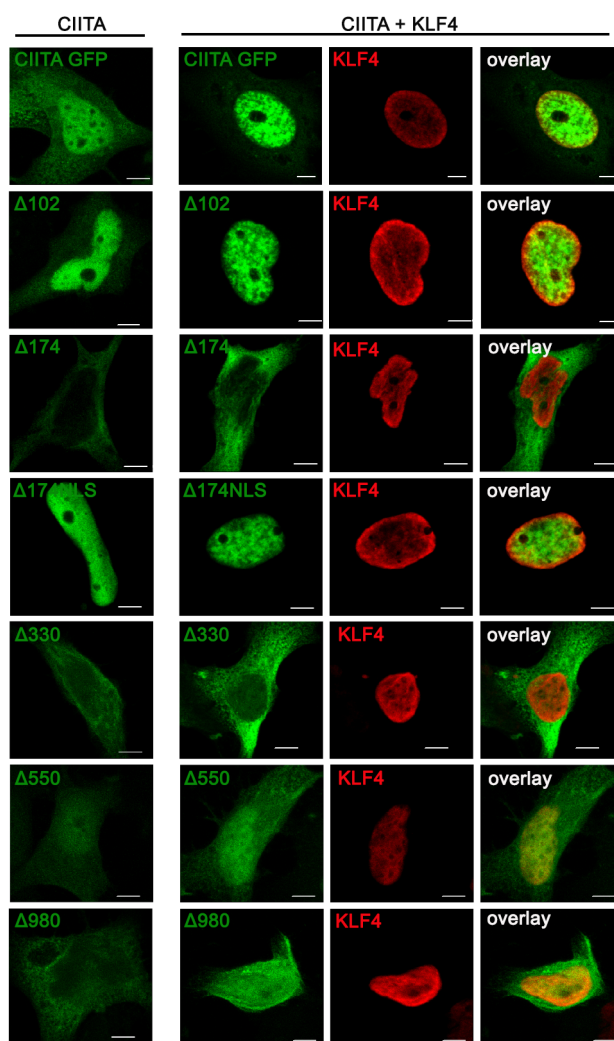
μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με τις κατασκευές του CIITA απουσία και παρουσία KLF4. (Δ) Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ. Ως δείκτες ισοφόρτωσης και σημείο αναφοράς για την κανονικοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων στα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Παρατηρήσαμε ότι η αφαίρεση των πρώτων αμινοξέων της πρωτεΐνης CIITA μέχρι και το κατάλοιπο 174 δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον KLF4, καθώς η πρωτεΐνη εξακολουθεί και αποστεθαρεποιείτε (Εικόνα 68 Α, Γ). Η αφαίρεση των πρώτων 330 αμινοξέων δεν επέφερε κάποια μεταβολή στη σταθεροποίησή του από τον KLF4 (Εικόνα 68 Β,Γ) , γεγονός που υποδηλώνει ότι ομοίως με τα κύτταρα HeLa, στο νευρικό περιβάλλον ο KLF4 αλληλεπιδρά με τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-300 του CIITA.



Εικόνα 68. Ο KLF4 σταθεροποιεί τον CIITA στα κύτταρα SH-SY5Y αλληλεπιδρώντας με τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330. (Α), (Β) Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με τις κατασκευές του CIITA απουσία και παρουσία KLF4. (Γ) Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ. Ως δείκτες ισοφόρτωσης και σημείο αναφοράς για την κανονικοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα διαγράμματα αποτελούν μέσους όρους $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($\pm$ SEM), $n=3$.

Στη συνέχεια οι παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας προκειμένου να ελεγχθεί το πρότυπο της κατανομής της πρωτεΐνης CIITA παρουσία KLF4. Διαμολύνοντας HeLa κύτταρα παρατηρήσαμε ότι η στική κατανομή του CIITA στον πυρήνα παρουσία KLF4, λαμβάνει χώρα τόσο στην κατασκευή pCIITAΔ102 όσο και με στην κατασκευή pCIITAΔ174NLS (**Εικόνα 69**). Το αποτέλεσμα αυτό έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς η συγκεκριμένη κατασκευή δεν μπορεί να σταθεροποιηθεί από τον KLF4. Με άλλα λόγια φαίνεται ότι για την σταθεροποίηση του CIITA από τον KLF4 απαιτείται η σωστή έξοδος του μορίου από τον πυρήνα. Παρατηρήσαμε επίσης ότι, σε όλες τις περιπτώσεις που ο CIITA λαμβάνει στική κατανομή στον πυρήνα, η κατανομή του KLF4 μεταβάλλεται και γίνεται περι-πυρηνική. Δεν παρατηρήθηκε, καμία μεταβολή τόσο στον εντοπισμό όσο και στην κατανομή των ελλειματικών πρωτεϊνών από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί τα αμινοξέα 174-330 του CIITA (**Εικόνα 69**).

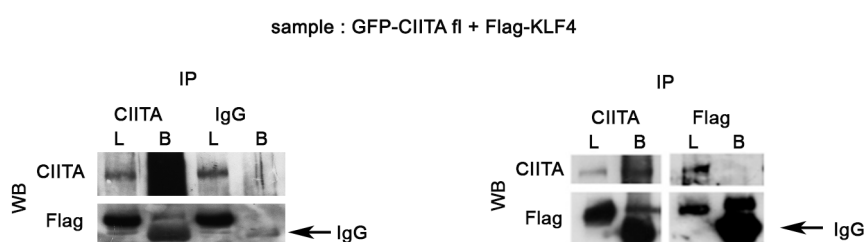


Εικόνα 69. Τα αμινοξέα 174-330 του CIITA είναι απαραίτητα για την στική πυρηνική κατανομή που προκαλείται από τον KLF4. Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για όλες τις πλασμιδιακές κατασκευές του CIITA, απουσία και παρουσία KLF4. Scale bar 5μM.

4.3.9. Φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών KLF4 και CIITA

Η εμπλοκή του μεταγραφικού παράγοντα KLF4, στην ενεργότητα, κινητικότητα, σταθερότητα και υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης CIITA, καθώς και η εύρεση της υπεύθυνης περιοχής που παρατηρήσαμε στη συγκεκριμένη μελέτη, μας οδήγησε στο να αναρωτηθούμε αν η αλληλεπίδραση αυτή είναι άμεση. Εναλλακτικά, ο KLF4, θα μπορούσε να οδηγεί σε τροποποίηση των ιδιοτήτων του CIITA έμμεσα, μέσω επαγωγής άλλων παραγόντων ή μηχανισμών.

Έτσι λοιπόν, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Κύτταρα HeLa, διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές pCIITA-EGFP και pFlag-KLF4. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση και ανοσοαποτύπωση κατά western. Παρατηρήθηκε ότι ο CIITA συν-κατακρημνίζεται με τον KLF4, και η αλληλεπίδραση είναι ειδική καθώς χρησιμοποιώντας αντίσωμα IgG ως αρνητικό μάρτυρα, ο KLF4 δεν βρέθηκε να συν-κατακρημνίζεται. Η αντίθετη αλληλεπίδραση δεν ανιχνεύτηκε, πιθανώς λόγω αδυναμίας των αντισωμάτων ή του πρωτοκόλου ανοσοκατακρήμνισης (**Εικόνα 70**).



Εικόνα 70. Οι πρωτεΐνες CIITA και KLF4 αλληλεπιδρούν άμεσα. Ανοσοκατακρήμνιση στα κύτταρα HeLa μετά από με τις κατασκευές pCIITA-EGFP και pFlag-KLF4. Για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του CIITA και του επιτόπου Flag, ενώ αντίσωμα έναντι της IgG χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

5. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια αναδεικνύεται μία πολυεπίπεδη συνέργεια μεταξύ ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος. Η συνέργεια αυτή μπορεί να καθορίζεται σε δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη αφορά στο αποτέλεσμα που αυτή μπορεί να έχει στα νευρικά βλαστικά κύτταρα, τόσο για τη λειτουργική αποκατάσταση νευρωνικών δικτύων όσο και για τη φυσιολογική διατήρηση της νευρογένεσης στα βλαστικά κέντρα του ενήλικου ΚΝΣ σε κανονικές (μη παθολογικές) συνθήκες. Έχει διαπιστωθεί σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ παραγόντων που καθορίζουν την νευροανοσολογική απόκριση και σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν το πεπρωμένο των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Όλες οι διαδικασίες, οι οποίες αποτελούν αναπόσπαστα στοιχεία της ενήλικης νευρογένεσης (πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, κυτταρική μετανάστευση) επηρεάζονται από ανοσολογικούς τελεστές, όπως για παράδειγμα η ιντερφερόνη-γ (IFN γ) [1]. Σήμερα ένα συναρπαστικό ερώτημα, είναι πώς τέτοια, «μη νευρικά» σηματοδοτικά μονοπάτια εναρμονίζονται με τη διαδικασία της νευρογένεσης και πώς διαμορφώνουν τα γενετικά προγράμματα που καθορίζουν τις αναπτυξιακές αποφάσεις των ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων.

Η δεύτερη αφορά στο αποτέλεσμα που η παραπάνω συνέργεια μπορεί να έχει σε παθολογικές καταστάσεις. Αυτή μπορεί να σχετίζεται τόσο με ευεργετικά αποτελέσματα, όσο και με επιπτώσεις που επιβαρύνουν περαιτέρω τον οργανισμό. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήσαμε μια συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ανοσολογικού τελεστή IFN γ στη βιολογία παθο-φυσιολογικών και φυσιολογικών νευρικών κυττάρων.

Το νευροβλάστωμα αποτελεί τη συχνότερη νεοπλασία του νευρικού συστήματος στην παιδική ηλικία. Εμφανίζεται όταν νευροβλάστες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αδυνατούν να διαφοροποιηθούν [18]. Για το λόγο αυτό μια απο τις πιο υποσχόμενες στρατηγικές θεραπείας του αποτελεί η πλήρης διαφοροποίηση των κυττάρων. Η παρουσία IFN γ έχει αναφερθεί ότι ίσως έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη διαφοροποίηση των κυττάρων του νευροβλαστώματος [26] [177]. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίσαμε να μελετήσουμε με λεπτομέρεια τα αποτελέσματα της παρουσίας της, στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση του νευροβλαστώματος.

Βρέθηκε για πρώτη φορά, ότι η παρουσία IFN γ σε ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y, μειώνει τον πολλαπλασιασμό, καθυστερώντας τη διέλευσή τους από την S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η καθυστέρηση στη φάση S θα μπορούσε να υποδηλώνει αυξημένη ανάγκη των κυττάρων να επιδιορθώσουν βλάβες στο γενετικό τους υλικό, που πιθανώς έχουν προκύψει, έτσι ώστε να διασφαλίσουν την πιστότητα μεταβίβασης γενετικού υλικού στους απογόνους. Παρόμοια αύξηση παραμονής των κυττάρων στην φάση S, έχει παρατηρηθεί σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα που δεν έχουν ακόμη αποφασίσει να διαφοροποιηθούν [126]. Αναλύοντας την επίδραση της IFN γ στα αρχικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης, παρατηρήσαμε, σε απόλυτη συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, την προώθηση νευρικών χαρακτηριστικών [25] [26] [28] [29] [124] [127]. Ο συνδυασμός της IFN γ με ρετινοϊκό οξύ (RA) υπέδειξε επιπρόσθετα αποτελέσματα γεγονός που υποδεικνύει την ταχύτερη ή καλύτερη διαφοροποίηση των κυττάρων στο στάδιο αυτό.

Δεδομένων των επιπρόσθετων αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν με τον συνδυασμό των δύο παραγόντων, αναλύθηκε η επίδραση της συνεχόμενης έκθεσης των κυττάρων σε IFN γ κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης με RA. Τα αποτελέσματα έδειξαν διτή συμπεριφορά στους μάρτυρες νευρικής διαφοροποίησης. Από τη μια πλευρά κάποια γονίδια επάγονται συνεχόμενα μέχρι το τελικό σημείο διαφοροποίησης υποδηλώνοντας πιο ώριμα νευρικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά κάποια άλλα γονίδια μειώνονται συστηματικά με κρίσιμο χρονικό σημείο την τέταρτη ημέρα. Τα παραπάνω ευρήματα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη μελέτη, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η IFN γ ίσως σηματοδοτεί μόνο σε κάποια μερίδα κυττάρων του νευροβλαστώματος ή σηματοδοτεί με διαφορετικό τρόπο στους διαφορετικούς υποτύπους κυττάρων. Παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του υποδοχέα υψηλής συγγένειας του NGF με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των υποδοχέων των άλλων παραγόντων, παρουσία IFN γ , που θα μπορούσε να υποδεικνύει αλλαγή στην μοίρα των κυττάρων. Είναι γνωστό ότι η σηματοδότηση του NGF είναι ικανή να κάνει τα κύτταρα να αποκτήσουν νοραδρενεργικά χαρακτηριστικά [142] [143].

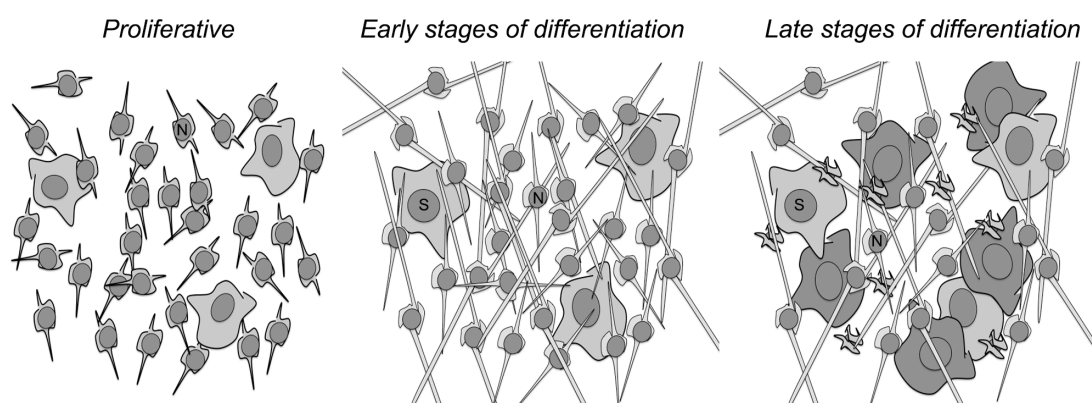
Ακολούθως μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μη νευρικών πρωτεϊνών, χαρακτηριστικών μαρτύρων του πληθυσμού S του νευροβλαστώματος.

Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι μετά την τέταρτη ημέρα της νευρικής διαφοροποίησης η IFN γ προκαλεί αύξηση ενός νέου πληθυσμού κυττάρων με μεγάλο πυρήνα και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν όλα τα μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του S- τύπου πληθυσμού κυττάρων του νευροβλαστώματος. Εκτός από μεγάλο πυρήνα και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα, προσκολλώνται έντονα στο υπόστρωμα, είναι αρνητικά για μάρτυρες του N-τύπου κυττάρων και θετικά για μάρτυρες του S- τύπου κυττάρων. Επιπλέον απομονώνοντας αμιγείς καλλιέργειες τύπου N και S κυττάρων αποδείχθηκε ότι η αύξηση αυτή που προκαλείται από IFN γ είναι λόγω διαφοροποίησης των κυττάρων τύπου N σε κύτταρα τύπου S. Τα κύτταρα τύπου S που προκύπτουν από IFN γ , την όγδοη ημέρα της νευρικής διαφοροποίησης από RA, έχουν πλέον χάσει την καρκινική τους φύση. Ένωση των κυττάρων αυτών σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς αδυνατεί να σχηματίσει όγκους συγκρινόμενα τόσο με τα πατρικά SH-SY5Y κύτταρα, όσο και με κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί για 8 ημέρες μόνο παρουσία RA.

Ενδιαφέρον, όσο αναφορά τα νευροβλαστωματικά νευρικά κύτταρα, είναι το εύρημα που παρατηρήθηκε ότι στο στάδιο της τελικής διαφοροποίησης παρουσία IFN γ , επάγονται πολύ σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα KLF4. Ο παράγοντας αυτός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων [103]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η υπερέκφρασή του σε κύτταρα νευροβλαστώματος προωθεί την διαφοροποίηση προς κύτταρα τύπου S [150]. Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός αποτελεί άμεσο στόχο του μονοπατιού της IFN γ [149]. Με πειράματα υπερέκφρασης του KLF4 παρουσία IFN γ , παρατηρήσαμε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων τύπου S. Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδηλώνει την εμπλοκή του ως ενδιάμεσο σηματοδοτικό μόριο στην ικανότητα της IFN γ , να προωθεί την διαφοροποίηση των κυττάρων τύπου N σε μη καρκινικά κύτταρα τύπου S.

Τέλος στο στάδιο της τελικής διαφοροποίησης παρουσία IFN γ παρατηρήθηκε πολύ σημαντική αύξηση των επιπέδων των μορίων MHC II. Η αύξηση αυτή έχει να κάνει με τα κύτταρα τύπου S, καθώς αμιγείς καλλιέργειες έδειξαν επαγωγή έως και 200 φορές, συγκρινόμενα τόσο με τα πατρικά SH-SY5Y, όσο και με αμιγή κύτταρα τύπου N. Τα συγκεκριμένα κύτταρα θα μπορούσαν να

δρούν και συλλογικά, έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα. Δηλαδή μέσω της έκφρασης μορίων MHC τάξης II στην επιφάνειά τους και κατ' επέκταση της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων να ωθούν τον οργανισμό να καταπολεμήσει τα υπόλοιπα, διπλανά, εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα, αλλάζοντας με αυτό τον τρόπο το λεγόμενο μικροπεριβάλλον του όγκου.



Εικόνα 70. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της επίδρασης της IFN γ στη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Στην κατάσταση πολλαπλασιασμού τα κύτταρα αποτελούν μια μικτή καλλιέργεια καθώς απαρτίζονται από τύπου N και S. Στα αρχικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης με RA παρουσία IFN γ , επάγονται νευριτικά χαρακτηριστικά και μάρτυρες διαφοροποίησης. Στα τελικά στάδια όμως, η IFN γ προκαλεί τον εμπλουτισμό του πληθυσμού σε κύτταρα τύπου S, λόγω επαγωγής της δια-διαφοροποίησης.

Συγκριτικά με το νευροβλάστωμα πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του ανοσολογικού τελεστή IFN γ στη βιολογία φυσιολογικών νευρικών κυττάρων απομονωμένων από τον υπόκαμπο αρουραίου. Η παρουσία IFN γ , βρέθηκε να μειώνει τον αριθμό των κυττάρων χωρίς ωστόσο να επηρεάζει το ποσοστό που βρίσκεται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι επηρεάζεται η πολυδυναμία των κυττάρων, καθώς η παρουσία IFN γ μειώνει σημαντικά τον αριθμό και το μέγεθος των νευροσφαιρών. Η συγκεκριμένη παρατήρηση, θα μπορούσε να σημαίνει ότι ωθεί τα κύτταρα σε μια λιγότερο πολυδύναμη κατάσταση ή με άλλα λόγια τα ωθεί προς τη διαφοροποίηση.

Ένα από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων είναι ότι αποτελούν πολυδύναμους πληθυσμούς. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να

αυτοανανεώνονται πραγματοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό συμμετρικών διαιρέσεων, δίνοντας συνεχώς πολυδύναμους απογόνους. Επίσης ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης του, είναι η πλαστικότητα τους. Τα κύτταρα αυτά φυσιολογικά δέχονται διάφορα ερεθίσματα από το περιβάλλον τους. Τα ερεθίσματα αυτά, καθορίζουν εάν και πότε θα σταματήσουν να αυτοανανεώνονται και θα διαιρεθούν ασύμμετρα. Οι ασύμμετρες αυτές διαιρέσεις θα δώσουν απογόνους που καθορισμένα θα ακολουθήσουν το μονοπάτι της διαφοροποίησης, έτσι ώστε να δώσουν γένεση σε έναν ή κάποιους από τους τύπους των νευρικών κυττάρων.

Προχωρώντας στη μελέτη της επίδρασης που η IFN γ ασκεί κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων βρέθηκε να προωθεί ή επιταχύνει το πρόγραμμα διαφοροποίησης προς τη νευρική μοίρα. Η διαπίστωση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι επάγει την πιο γρήγορη χρονικά εμφάνιση δεικτών της όψιμης νευρικής διαφοροποίησης ενώ δεν ασκεί κάποια εμφανή επίδραση στους πρώιμους δείκτες. Συμπληρωματικά δεν επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα, καθώς κανείς από τους μάρτυρες που ελέγχθηκαν δεν επηρεάστηκε. Το συγκεκριμένο γεγονός ίσως υποδηλώνει τη σηματοδότησή της μόνο σε συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά έχουν να κάνουν μόνο με τη νευρική μοίρα και όχι με τη γλοιακή.

Τέλος μελετήθηκε η ικανότητα ενεργοποίησης του μονοπατιού της IFN γ που οδηγεί στην επαγωγή των μορίων MHC II. Το μονοπάτι αυτό θα μπορούσε να κατέχει ιδιαίτερη θέση στην παθογένεια του νευρικού συστήματος. Είναι γνωστό ότι η αύξηση της παρουσίας κυτταροκινών και IFN γ σε περιοχές του ΚΝΣ συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αποτέλεσμα, είναι η ενεργοποίηση μιας σειράς διαδικασιών κατά τις οποίες ο οργανισμός προσπαθεί να καταπολεμήσει την αιτία που προκάλεσε την φλεγμονή. Βασικής σημασίας ερώτημα παραμένει το εάν, κάτω από ποιές συνθήκες και σε ποιούς κυτταρικούς πληθυσμούς, στο ΚΝΣ, επάγονται τα μόρια MHC II. Βρέθηκε ότι το μονοπάτι αυτό είναι ενεργό στα κύτταρα HCN, καθώς παρατηρήθηκε επαγωγή όλων των ενδιαμέσων μορίων από IFN γ , με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής του κύριου συνενεργοποιητή CIITA. Η επαγωγή αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC II.

Τα παραπάνω αποτελέσματα στα νευρικά βλαστικά κύτταρα HCN, αποτελούν το έναυσμα για την αρχή μελετών του καθορισμού βασικών αναπτυξιακών μονοπατιών και την επίδραση που έχει σ' αυτά η IFN γ . Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα θα ανοίξει νέους δρόμους της πιθανής εξωγενούς επεμβατικότητας στις νευρογενείς περιοχές του ΚΝΣ, με σκοπό την επιδιόρθωση βλαβών ή την καλύτερη λειτουργία της νευρικής δραστηριότητας.

Ένα επίσης σημαντικό ερώτημα που προσπαθήσαμε να απαντήσουμε στη συγκεκριμένη μελέτη αποτέλεσε η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II στα παθοφυσιολογικά νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, τα μόρια αυτά είναι εξέχουσας σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα, ωστόσο λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη ρύθμιση και τη σημασία τους στο νευρικό σύστημα. Μια πρόσφατη μελέτη συνδέει την έκφραση των μορίων MHC class I, με τη ρύθμιση της συναπτικής λειτουργίας των νευρώνων του ιπποκάμπου [167]. Για τους παραπάνω λόγους και λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη συγγένεια των δύο μορίων του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στη μελέτη της έκφρασης και ρύθμισης των μορίων MHC class II στο νευροβλάστωμα.

Αρχικά περιγράψαμε αναλυτικά την ενεργοποίηση του γνωστού μονοπατιού της IFN γ που οδηγεί τελικά σε παραγωγή μεταγραφών των μορίων MHC II. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται να ξεκαθαρίσουν το τοπίο καθώς οι αναφορές για την επαγωγή των μορίων τάξης II στα νευροβλαστώματα είναι περιορισμένες. Οι περισσότερες υποστηρίζουν ότι η IFN γ δεν είναι ικανή να επάγει MHC II σε πολλές νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές είτε λόγω αδυναμίας μεταγραφής του CIITA είτε γιατί ο CIITA δεν μπορεί να εντοπιστεί στον πυρήνα [34], είτε λόγω επαγωγής μορίων ανεξαρτήτων του CIITA [33]. Η ανίχνευση του παραπάνω μονοπατιού ανοίγει νέους δρόμους και θα μπορούσε να είναι πολύ σημαντική για την εγκαθίδρυση ανοσοθεραπειών στο νευροβλάστωμα. Δεδομένων των προηγούμενων αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης στο νευροβλάστωμα ότι η IFN γ , επηρεάζει την έκφραση παραγόντων και μονοπατιών τα οποία είναι ανεξάρτητα της επαγωγής των μορίων τάξης II, διερευνήθηκε και βρέθηκε για πρώτη φορά συνέργεια μεταξύ IFN γ και CIITA. Η συνέργεια αυτή είχε σαν αποτέλεσμα την υπερ-επαγωγή της μεταγραφής των μορίων MHC II μόνο στο

νευροβλάστωμα και όχι στα HeLa κύτταρα. Ερευνώντας τη βιβλιογραφία για πιθανά μόρια που θα μπορούσαν να επάγονται από IFN γ και να εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση των μορίων τάξης II, ελέγχθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας KLF4. Ο παράγοντας αυτός εμπλέκεται με τον CIITA με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασης των μορίων τάξης II, μετά από μόλυνση με ένα μυκοβακτήριο [178]. Όντως η συνέκφραση των παραγόντων CIITA και KLF4 είχε ως αποτέλεσμα την υπερ-επαγωγή της μεταγραφής των μορίων MHC II στο νευροβλάστωμα ενώ έδειξε το αντίθετο αποτέλεσμα στα κύτταρα HeLa. Τα αντιφατικά αποτελέσματα, που παρατηρούνται στα HeLa κύτταρα, είναι πιθανό να υποδηλώνουν εμπλοκή της χρωματινικής δομής, με τρόπο τέτοιο, που να μην μπορεί να εκδηλωθεί στα πλασμίδια των υποκινητών του DRA, τα οποία όπως είναι γνωστό διαθέτουν υποτυπώδη χρωματινική δομή.

Η εμπλοκή του μεταγραφικού παράγοντα KLF4, στη μεταγραφική ικανότητα του CIITA που παρατηρήθηκε, οδήγησε σε έλεγχο του είδους της αλληλεπίδρασης. Πειράματα ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση, υπέδειξαν σαφή μείωση της κινητικότητας του CIITA, παρουσία KLF4 και στα δύο βιολογικά συστήματα. Πιο σημαντικά, στα SH-SY5Y κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό της πρωτεΐνης που δεν κινείται. Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να υποδηλώνει τη συμμετοχή του CIITA σε πολύ σημαντικές και άγνωστες μέχρι σήμερα χρωματινικές διεργασίες παρουσία του KLF4. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε αλλαγή στη σταθερότητα της πρωτεΐνης με διαφορετικό τρόπο στα δύο κυτταρικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα στα SH-SY5Y κύτταρα τα επίπεδα του CIITA μειώνονται παρουσία KLF4 και η μείωση αυτή οδηγεί σε υπερ-επαγωγή της μεταγραφής των μορίων τάξης II. Στα HeLa κύτταρα, παρατηρείται το αντίθετο. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε κύτταρα HeLa και συνδέουν άμεσα τα επίπεδα του CIITA με τη λειτουργία του πρωτεασώματος [75]. Σταματώντας την πρωτεϊνολύση παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ημιζωής του CIITA, αυξάνεται παρουσία KLF4. Άρα οι δύο πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με τέτοιο τρόπο ώστε να εμπλέκουν άμεσα τη λειτουργία του πρωτεασώματος. Παρατηρήθηκε επίσης αλλαγή στην πυρηνική κατανομή της πρωτεΐνης CIITA παρουσία KLF4, από διάχυτη σε στικτή. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση

πιθανής εμπλοκής των δυο παραγόντων σε άγνωστες χρωματινικές αλληλεπιδράσεις.

Τέλος διερευνήθηκε η περιοχή της πρωτεΐνης CIITA που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον KLF4. Χρησιμοποιώντας διαδοχικές ελλείψεις στο αμινοτελικό άκρο του CIITA, βρέθηκε ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα 174 έως 330 είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση. Πιο σημαντικά απο τον εντοπισμό της πρωτεΐνης προκύπτει το συμπέρασμα ότι για την αλληλεπίδραση απαιτείται η σωστή έξοδος της πρωτεΐνης CIITA απο τον πυρήνα. Επισπροσθέτως η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι άμεση, καθώς ο CIITA βρέθηκε να κατακρημνίζει τον KLF4.

Εν κατακλείδι, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν για πρώτη φορά την εμπλοκή μιας νέας πρωτεΐνης στη μεταγραφική και ρυθμιστική ικανότητα του CIITA. Η εν λόγω εμπλοκή θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα κάτω απο συγκεκριμένες καταστάσεις που απαιτείται μια πιο λεπτή και ειδική ρύθμιση της έκφρασης των μορίων MHC II ή άλλων στόχων του CIITA. Ο μεταγραφικός παράγοντας KLF4 έχει βρεθεί να αναδιοργανώνει τη χρωματίνη και να συμβάλλει σε αλληλεπιδράσεις απομακρυσμένων περιοχών κατά τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων [179]. Τέτοια φαινόμενα είναι γνωστό ότι λαμβάνουν χώρα στους υποκινητές των μορίων τάξης II [87] και εμπλέκουν άμεσα την πρόσδεση του CIITA. Εξαιρετικής σημασίας θα αποτελούσε η διερεύνηση πιθανής εμπλοκής των δύο μορίων σε καταστάσεις αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν και να συμβάλλουν σε μια πιο εκλεπτυσμένη έκφραση μορίων όπως αυτά των MHC II. Την υπόθεση αυτή ενισχύει η εύρεση επτά πιθανών θέσεων πρόσδεσης του KLF4 στην αλληλουχία του υποκινητή του DRA, που βρίσκεται ενδιάμεσα του όψιμου και απομακρυσμένου υποκινητή.

6. Συντμήσεις

A

APC: Κύτταρο που παρουσιάζει αντιγόνα (Antigen Presenting Cell)
AAD: Περιοχή που ενεργοποιείται απο οξύ (Acidic Activation Domain)

B

BBB: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Blod Brain Barier)
BDNF: Νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται απο τον εγκέφαλο (Brain Derived Neurotrophic Factor)
BrdU: Βρώμο-δεοξυ-ουριδίνη (bromodeoxuouridine)
BLS: Σύνδρομο γυμνών λεμφοκυττάρων (Bare Lymphocyte Syndrome)

C

CREB: Πρωτεΐνη που προσδένεται σε κυκλικό ΑΜΠ (cAMP Response Element Binding Protein)
CIITA: Συνενεργοποιητής των μορίων MHC II (Class II Transactivator)
CTCF: Παράγοντας που προσδένεται στην αλληλουχία CCCTC (CCCTC binding Factor)

D

DRG: Νωτιαία γάγγλια (Dorsal Root Ganglia)
DCX: (Doublecortin)

E

EAE: Πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)
ER: Ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum)
EMT: Μετάπτωση απο επιθήλιο σε μεσένχυμα (Epithelial Mesenchymal Transition)
EDTA: (Ethylenediaminetetraacetic acid)

F

FRAP: Επαναφθορισμός μετά απο φωτοσκίαση (Fluoresence Recovery After Photobleatcing)
FBS: Ορός βοός (Fatal Bovine Serum)
FACS: (Fluorescence Activated Cell Sorting)

G

GDNF: Νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται απο γλοία (Glial Derived Neurotrophic Factor)
GAS: Περιοχή ενεργοποίησης απο ιντερφερόνη γ (Gamma interferon Activation Site)
GFAP: (Glial Fibrillary Acidic Protein)
GTP: (Guanosine-5'-triphosphate)
GFP: Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fuoresence Protein)

H

HLA: Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο (Human Leukosite Antigen)
HAT: Ακετυλοτρανσφεράση των ιστόνων (Histone Acetyltransferase)

I

IFNγ: Ιντερφερόνη γ (Interferon gamma)
IFNα: Ιντερφερόνη α (Interferon alpha)
IFNβ: Ιντερφερόνη β (Interferon beta)
IL2: Ιντερλευκίνη 2 (Interleukin 2)
IFNGR1: Υποδοχέας 1 της ιντερφερόνης γ (Interferon Gamma Receptor 1)
IFNGR2: Υποδοχέας 2 της ιντερφερόνης γ (Interferon Gamma Receptor 2)

IRF: Παράγοντας απάντησης στην ιντερφερόνη 1 (Interferon Response Factor 1)

INOS: Nitric Oxide Synthase

IRE: Στοιχείο απάντησης στην ιντερφερόνη (Interferon Response Element)

J

JAK: (Janus Kinase)

K

KLF4: (Kruppel Like Factor 4)

L

LIF: Ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor)

LCR: Περιοχή ελέγχου (Locus Control Region)

M

MHC II: Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major Histocompatibility complex class II)

MAP2: πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated Protein 2)

N

NK: Φυσιικοί φωνείς (Natural Killer)

NGF: Νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve Growth Factor)

NF160: (Neurofilament 160)

NSC: Νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cells)

NLS: Σήμα εισόδου στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal)

NES: Αλληλουχία εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal)

O

P

pH3: Φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 (phosphorylated histon 3)

p53: Πρωτεΐνη 53 (protein 53)

p21: Πρωτεΐνη 21 (protein 21)

PBS: Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline)

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

PFA: (Para-Formaldehyde)

Q

R

RET: Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης , (Receptor Tyrosine Kinase)

RA: Ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid)

ROI: Περιοχή ενδιαφέροντος (Region Of Interest)

RFX : Ρυθμιστικός παράγοντας X (Regulatory Factor X)

S

SVZ: Υποκοιλιακή ζώνη (Sub Ventricular Zone)

STAT1: Μεταφορέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 1 (Signal Transducer and Activation of Transcription 1)

SOCS1: Καταστολέας σήματος κυτταροκίνης (Suppressor of cytokine signaling 1)

SV40: Ιός πιθήκου (Simian Virus)

SCID: Σοβαρή ανασυνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined Immunodeficiency)

SRC-1: Συνενεργοποιητής υποδοχέων στεροειδών (Steroid Receptor Coactivator-1)

T

TNF: Παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor)

TAA: Αντιγόνα που σχετίζονται με τους όγκους (Tumor Associated Antigens)

TrkA: Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης A (Tyrosine Kinase receptor A)

TrkB: Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης B (Tyrosine Kinase receptor B)

TrkC: Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης C (Tyrosine Kinase receptor C)

TFIID: Μεταγραφικός παράγοντας II D (Transcription Factor II D)

TFIIB: Μεταγραφικός παράγοντας II B (Transcription Factor II B)

TBP: πρωτεΐνη που προσδένεται στην αλληλουχία TATA (TATA Box binding Protein)

U

V

W

WB: Ανοσοαποτύπωση κατά western (Western Blot)

X

Y

Z

7. Παράρτημα

7.1. Ευρετήριο εικόνων

Εισαγωγή

Εικόνα 1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος.

Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του τρέχοντος μοντέλου για την προέλευση του νευροβλαστώματος.

Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της μορφολογίας των τριών τύπων κυττάρων του νευροβλαστώματος.

Εικόνα 4. Σηματοδότηση της IFN γ , μέσω του μονοπατιού Jak/STAT1.

Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα, από τη δέσμευση της IFN γ στους υποδοχείς της έως την μεταγραφή των μορίων τάξης II.

Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του χρωμοσώματος 6 στον άνθρωπο όπου εδράζεται ο γενετικός τόπος HLA.

Εικόνα 7. Απεικόνιση όλων των MHC II γονιδίων στον άνθρωπο και στο ποντίκι

Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας αντιγονικής παρουσίασης από τα μόρια MHC τάξης I και τάξης II.

Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση των συντηρημένων αλληλουχιών του υποκινητή των MHC II στο ποντίκι και στον άνθρωπο.

Εικόνα 10. Απεικονίζεται η τρίτη ισομορφή της πρωτεΐνης CIITA, η οποία εκφράζεται στα Β-λεμφοκύτταρα.

Εικόνα 11. Επιγενετικά γεγονότα που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των μορίων τάξης II.

Εικόνα 12. Μονωτές και μεγάλου εύρους χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις εξαρτώμενες από τον CTCF, στην επικράτεια των μορίων MHC II.

Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της γενομικής περιοχής στην οποία εδράζονται οι τέσσερις υποκινητές του MHC2TA.

Εικόνα 14. Ο γενετικός τόπος του CIITA στον οποίο συμπεριλαμβάνονται οι τέσσερις υποκινητές του.

Εικόνα 15. Η δομή της πρωτεΐνης KLF4

Εικόνα 16. Ο ρόλος του KLF4 στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων.

Εικόνα 17. Η υπερέκφραση του KLF4 προκαλεί πλειοτρόπικά αποτελέσματα στη βιολογία των κυττάρων.

Υλικά και Μέθοδοι

Εικόνα 18. Αναπαράσταση του πρωτοκόλλου δημιουργίας αμιγών κυτταρικών υποπληθυσμών τύπου N και S απο τα κύτταρα SH-SY5Y.

Εικόνα 19. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή KLF4-pCDNA 3.

Εικόνα 20. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή pFlag-KLF4.

Εικόνα 21. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή pDRA-luc/proximal promoter

Εικόνα 22. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή pDRA-luc -40 promoter.

Εικόνα 23. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή pSCA-DRA/distal promoter που αποτελεί τον ενδιάμεσο φορέα για την κλωνοποίηση του υποκινητή.

Εικόνα 24. Απεικόνιση στην πλασμιδιακή κατασκευή pDRA-luc/distal promoter.

Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR .

Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση του προγράμματος της PCR.

Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης qPCR.

Εικόνα 28. Γραφικές παραστάσεις στις οποίες φαίνεται το κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct) στην αρχή της εκθετικής φάσης.

Εικόνα 29. Σχηματική αποϊκόνιση της πειραματικής διαδικασίας διαχωρισμού των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη .

Εικόνα 30. Χημική αντίδραση λουσιφεράσης.

Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής .

Εικόνα 32. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Εικόνα 33. Στην εικόνα διαγράφονται οι περιοχές ενδιαφέροντος (ROIs) , που χρησιμοποιούνται σε ένα τυπικό πείραμα FRAP.

Εικόνα 34. Μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων FRAP.

Αποτελέσματα

Εικόνα 35. Μορφολογία SH-SY5Y κυττάρων κατα τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού (αριστερά) ή της νευρικής διαφοροποίησης (δεξιά) για 7 ημέρες με RA.

Εικόνα 36. Η IFN γ μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Εικόνα 37. Η IFN γ καθυστερεί τη διέλευση των κυττάρων από την S φάση του κυτταρικού κύκλου.

Εικόνα 38. Η παρουσία IFN γ προκαλεί επαγωγή μορφολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών της νευρικής διαφοροποίησης, στις 2 ημέρες θεραπείας, σε παρόμοιο βαθμό με αυτόν του RA.

Εικόνα 39. Η συνεχής παρουσία IFN γ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης ασκεί διττή επίδραση στην πορεία εμφάνισης νευρικών, με κρίσιμο σημείο την τέταρτη ημέρα.

Εικόνα 40. Η IFN γ προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων των νευροτροφικών παραγόντων.

Εικόνα 41. Ο εξωγενής NGF σηματοδοτεί αποτελεσματικότερα στα κύτταρα μετά την επίδραση της IFN γ .

Εικόνα 42. Η IFN γ προκαλεί την εμφάνιση κυττάρων με μεγάλο πυρήνα και εκτεταμένο κυτταρόπλασμα το οποίο είναι θετικό για νεστίνη, μετά την τέταρτη ημέρα της διαφοροποίησης.

Εικόνα 43. Η IFN γ οδηγεί στην αύξηση των vimentin+ κυττάρων.

Εικόνα 44. Τα μεγαλοπύρρηνα nestin+ κύτταρα εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά των κυττάρων τύπου S του νευροβλαστώματος.

Εικόνα 45. Δημιουργία αμιγών υποπληθυσμών κυττάρων τύπου N και S από τα πατρικά SH-SY5Y.

Εικόνα 46. Η IFN γ προάγει την δια-διαφοροποίηση των N-τύπου κυττάρων σε S.

Εικόνα 47. Μόλις 2 ημέρες παρουσίας IFN γ στην αρχή της διαφοροποίησης είναι ικανές να αλλάξουν την μοίρα των κυττάρων.

Εικόνα 48. Ανάπτυξη υποδόριων όγκων σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς μετά από ενέσεις κυττάρων SH-SY5Y που έχουν διαφοροποιηθεί με RA, απουσία ή παρουσία IFN γ .

Εικόνα 49. Επίδραση της IFN γ στα επίπεδα έκφρασης του KLF4 κατά τη διαφοροποίηση στην πατρική και στις αμιγείς καλλιέργειες των νευροβλαστωματικών κυττάρων.

Εικόνα 50. Σύγκριση της απόκρισης του μορίου MHC II DRA στην IFN γ σε διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης της πατρικής σειράς SH-SY5Y και των αμιγών N- και S-τύπου νευροβλαστωματικών κυττάρων.

Εικόνα 51. Μορφολογία των κυττάρων HCN σε συνθήκες πολλαπλασιασμού ή νευρικής διαφοροποίησης για 7 ημέρες παρουσία RA και Fsk.

Εικόνα 52. Η IFN γ μειώνει την ικανότητα σχηματισμού νευροσφαιρών των πρόδρομων νευρικών κυττάρων HCN.

Εικόνα 53. Προοδευτική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών Nestin και Sox2 κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης.

Εικόνα 54. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στη επαγωγή των μορίων MHC class II, είναι ενεργό στα νευρικά βλαστικά κύτταρα του ιπποκάμπου.

Εικόνα 55. Η IFN γ επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HCN.

Εικόνα 56. Η IFN γ προωθεί τη διαφοροποίηση προς τη νευρική μοίρα.

Εικόνα 57. Η διαφοροποίηση των HCN κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα, δεν επηρεάζεται από την IFN γ .

Εικόνα 58. Το μονοπάτι της IFN γ που οδηγεί στην επάγωγή των MHC II είναι ενεργό στα κύτταρα SH-SY5Y.

Εικόνα 59. Η IFN γ και ο εξωγενής CIITA επάγουν και τους δύο υποκινητές του DRA στα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y.

Εικόνα 60. Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς συνεχούς έκφρασης του CIITA (SHSY5Y/CIITA).

Εικόνα 61. Ο συνδυασμός IFN γ και εξωγενούς CIITA ασκεί προσθετική επίδραση στην επαγωγή των MHCII στα νευρικά κύτταρα.

Εικόνα 62. Ο KLF4 επηρεάζει το μεταγραφικό δυναμικό του CIITA τόσο στα SH-SY5Y όσο και HeLa κύτταρα.

Εικόνα 63. Η κινητικότητα (χρόνος ημίσειας ανάκαμψης, $t_{1/2}$) του CIITA στον πυρήνα αυξάνεται στα κύτταρα HeLa παρουσία εξωγενούς KLF4 ή IFN γ .

Εικόνα 64. Το $t_{1/2}$ και το μη κινητικό κλάσμα του CIITA αυξάνεται στα κύτταρα SH-SY5Y παρουσία εξωγενούς KLF4 ή IFN γ .

Εικόνα 65. Ο μεταγραφικός παράγοντας KLF4 επηρεάζει τη σταθερότητα του CIITA, εμπλέκοντας τη λειτουργία του πρωτεασώματος.

Εικόνα 66. Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης CIITA εντοπίζεται στον πυρήνα, λαμβάνοντας μια πιο στικτή κατανομή, παρουσία του KLF4.

Εικόνα 67. Ο KLF4 σταθεροποιεί τον CIITA στα κύτταρα HeLa αλληλεπιδρώντας με τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330.

Εικόνα 68. Ο KLF4 σταθεροποιεί τον CIITA στα κύτταρα SH-SY5Y αλληλεπιδρώντας με τα αμινοξικά κατάλοιπα 174-330.

Εικόνα 69. Τα αμινοξέα 174-330 του CIITA είναι απαραίτητα για την στικτή πυρηνική κατανομή που προκαλείται από τον KLF4.

Εικόνα 70. Οι πρωτεΐνες CIITA και KLF4 αλληλεπιδρούν άμεσα.

Εικόνα 71. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της επίδρασης της IFN γ στη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

7.2. Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.

Πίνακας 3. Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 4. Πρωτογενή αντισώματα.

Εικόνα 5. Πρωτόγενη αντισώματα για ανοσοϊστοχημεία.

8. Βιβλιογραφία

- [1] R. Pacheco, F. Contreras, and C. Prado, "Cells, molecules and mechanisms involved in the neuro-immune interaction," *Cell Interact.*, 2012.
- [2] H. Veiga-Fernandes and D. Mucida, "Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces," *Cell*, vol. 165, no. 4, pp. 801–811, 2016.
- [3] "Focus on neuro-immune interactions," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 8, pp. 1055–1055, 2012.
- [4] R. Franco, R. Pacheco, C. Lluís, G. P. Ahern, and P. J. O'Connell, "The emergence of neurotransmitters as immune modulators.," *Trends Immunol.*, vol. 28, no. 9, pp. 400–7, Sep. 2007.
- [5] Y. Katayama, M. Battista, W.-M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas, and P. S. Frenette, "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow.," *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 407–21, Jan. 2006.
- [6] D. Fonseca-Pereira, S. Arroz-Madeira, M. Rodrigues-Campos, I. A. M. Barbosa, R. G. Domingues, T. Bento, A. R. M. Almeida, H. Ribeiro, A. J. Potocnik, H. Enomoto, and H. Veiga-Fernandes, "The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function.," *Nature*, vol. 514, no. 7520, pp. 98–101, 2014.
- [7] T. Mizuno, G. Zhang, H. Takeuchi, J. Kawanokuchi, J. Wang, Y. Sonobe, S. Jin, N. Takada, Y. Komatsu, and A. Suzumura, "Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor.," *FASEB J.*, vol. 22, no. 6, pp. 1797–1806, 2008.
- [8] N. C. Derecki, A. N. Cardani, C. H. Yang, K. M. Quinlins, A. Cihfield, K. R. Lynch, and J. Kipnis, "Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4.," *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 5, pp. 1067–80, May 2010.
- [9] J. Goverman, "Autoimmune T cell responses in the central nervous system.," *Immunology*, vol. 9, no. 6, pp. 393–407, 2009.
- [10] J. de Wille, "On the Genesis of Neuroblastoma and Glioma," *Int. J. Brain Sci.*, vol. 2014, pp. 1–14, 2014.
- [11] R. D. Schreiber, L. J. Old, and M. J. Smyth, "Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion," *Science (80-.)*, vol. 331, no. 6024, pp. 1565–1570, 2011.
- [12] C. Zhang, Y. Guan, Y. Sun, D. Ai, and Q. Guo, "Tumor heterogeneity and circulating tumor cells," *Cancer Lett.*, vol. 374, no. 2, pp. 216–223, 2016.
- [13] A. Pietras, "Cancer Stem Cells in Tumor Heterogeneity," *Adv. Cancer Res.*, vol. 112, pp. 255–281, 2011.
- [14] J. E. Dick, "ASH 50th anniversary review Stem cell concepts renew cancer research," *Stem Cells*, vol. 112, no. 13, pp. 4793–4807, 2008.
- [15] P. C. Nowell and P. C. Nowell, "The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1742535> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to log i," vol. 194, no. 4260, pp. 23–28, 2016.
- [16] "NEURO Blastoma : BIOLOGICAL INSIGHTS INTO a CLINICAL ENIGMA," 2003.

- [17] V. Pistoia, F. Morandi, G. Bianchi, A. Pezzolo, I. Prigione, and L. Raffaghello, "Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma.," *Front. Oncol.*, vol. 3, no. June, p. 167, 2013.
- [18] G. M. Marshall, D. R. Carter, B. B. Cheung, T. Liu, M. K. Mateos, J. G. Meyerowitz, and W. A. Weiss, "The prenatal origins of cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 4, pp. 277–289, 2014.
- [19] J. D. Walton, D. R. Kattan, S. K. Thomas, B. A. Spengler, H.-F. Guo, J. L. Biedler, N.-K. V Cheung, and R. A. Ross, "Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors.," *Neoplasia*, vol. 6, no. 6, pp. 838–45, 2004.
- [20] S. Acosta, C. Lavarino, R. Paris, I. Garcia, C. de Torres, E. Rodríguez, H. Beleta, and J. Mora, "Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells," *BMC Dev. Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 12, 2009.
- [21] J. Mora, N. K. V Cheung, G. Juan, P. Illei, I. Cheung, M. Akram, S. Chi, M. Ladanyi, C. Cordon-Cardo, and W. L. Gerald, "Neuroblastic and Schwannian stromal cells of neuroblastoma are derived from a tumoral progenitor cell," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 18, pp. 6892–6898, 2001.
- [22] T. Biagiotti, M. D'Amico, I. Marzi, P. Di Gennaro, A. Arcangeli, E. Wanke, and M. Olivetto, "Cell renewing in neuroblastoma: electrophysiological and immunocytochemical characterization of stem cells and derivatives.," *Stem Cells*, vol. 24, no. 2, pp. 443–53, 2006.
- [23] A. Valent, J. Benard, A. M. Venuat, J. Silva, A. Duverger, N. Duarte, O. Hartmann, B. A. Spengler, and A. Bernheim, "Phenotypic and genotypic diversity of human neuroblastoma studied in three IGR cell line models derived from bone marrow metastases," *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 112, pp. 124–129, 1999.
- [24] T. Kamijo, "Role of stemness-related molecules in neuroblastoma," *Pediatr Res*, vol. 71, no. 4 Pt 2, pp. 511–515, 2012.
- [25] J. H. Song, X. W. Chen, D. K. Song, P. Wang, A. Shuaib, and C. Hao, "Interferon ?? induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 13, pp. 12896–12901, 2005.
- [26] M. P. M. Lanciotti, and P. G. Montaldo, "7-Interferon , Retinoic Acid , and Cytosine Arabinoside Induce Neuroblastoma Differentiation by Different Mechanisms," vol. 11, no. 4, pp. 397–413, 1991.
- [27] S. Leitner, G. Golderer, C. Winkler, D. Fuchs, G. Werner-Felmayer, and E. R. Werner, "Interferon-g-Induced Growth Inhibition of Neuroblastoma Cells is Independent\rof Induction of Nitric Oxide Synthase and Indoleamine 2,3-dioxygenase," *Pteridines*r, vol. Vol. 15, pp. 91–96, 2004.
- [28] M. Ponzoni, A. Casalaro, M. Lanciotti, P. G. Montaldo, and P. Cornaglia Ferraris, "The combination of gamma-interferon and tumor necrosis factor causes a rapid and extensive differentiation of human neuroblastoma cells," *Cancer-Res*, vol. 52, no. 4, pp. 931–5472, 1992.
- [29] J. Ridge, D. A. Terle, E. Dragunsky, and I. Levenbook, "Effects of γ -IFN and NGF on Subpopulations in a Human Neuroblastoma Cell Line: Flow Cytometric and Morphological Analysis," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 32, no. 4, pp. 238–

- 248, 1996.
- [30] M. Wolfl, A. A. Jungbluth, F. Garrido, T. Cabrera, S. Meyen-Southard, R. Spitz, K. Ernestus, and F. Berthold, "Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 54, no. 4, pp. 400–406, 2005.
 - [31] Y. Watanabe, "Exogenous Expression of Mouse Interferon gamma cDNA in Mouse Neuroblastoma C1300 Cells Results in Reduced Tumorigenicity by Augmented Anti-Tumor Immunity," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, no. 23, pp. 9456–9460, 1989.
 - [32] I. Airoidi, R. Meazza, M. Croce, E. Di Carlo, T. Piazza, C. Cocco, T. D'Antuono, V. Pistoia, S. Ferrini, and M. V Corrias, "Low-dose interferon-gamma-producing human neuroblastoma cells show reduced proliferation and delayed tumorigenicity.," *Br. J. Cancer*, vol. 90, no. 11, pp. 2210–8, 2004.
 - [33] T. Yazawa, T. Ito, H. Kamma, T. Suzuki, K. Okudela, H. Hayashi, H. Horiguchi, T. Ogata, H. Mitsui, M. Ikeda, and H. Kitamura, "Complicated mechanisms of class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma.," *Am. J. Pathol.*, vol. 161, no. 1, pp. 291–300, 2002.
 - [34] M. Croce, A. De Ambrosis, M. V Corrias, V. Pistoia, M. Occhino, R. Meazza, J. Giron-Michel, B. Azzarone, R. S. Accolla, and S. Ferrini, "Different levels of control prevent interferon-gamma-inducible HLA-class II expression in human neuroblastoma cells.," *Oncogene*, vol. 22, no. 49, pp. 7848–57, 2003.
 - [35] a Isaacs and J. Lindenmann, "Virus interference. I. The interferon.," *Proc. R. Soc. London*, vol. 7, no. 5, pp. 429–438, 1957.
 - [36] R. Sadir, E. Forest, and H. Lortat-Jacob, "The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 18, pp. 10919–10925, 1998.
 - [37] J. E. Darnell, I. M. Kerr, and G. R. Stark, "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.," *Science*, vol. 264, no. 5164, pp. 1415–1421, 1994.
 - [38] F.-C. Lin and H. A. Young, "The talented interferon-gamma," *Adv. Biosci. Biotechnol.*, vol. 04, no. 07, pp. 6–13, 2013.
 - [39] E. Lee, S. Chanamara, D. Pleasure, and A. M. Soulika, "IFN-gamma signaling in the central nervous system controls the course of experimental autoimmune encephalomyelitis independently of the localization and composition of inflammatory foci," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, no. 1, p. 7, 2012.
 - [40] C. Hindinger, C. C. Bergmann, D. R. Hinton, T. W. Phares, G. I. Parra, S. Hussain, C. Savarin, R. D. Atkinson, and S. A. Stohlman, "IFN-?? signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, pp. 1–12, 2012.
 - [41] M. A. Mastrangelo, K. L. Sudol, W. C. Narrow, and W. J. Bowers, "Interferon- γ differentially affects Alzheimer's disease pathologies and induces neurogenesis in triple transgenic-AD mice.," *Am. J. Pathol.*, vol. 175, no. 5, pp. 2076–2088, 2009.
 - [42] H. J. Ryu, J. E. Kim, M. J. Kim, H. J. Kwon, S. W. Suh, H. K. Song, and T. C. Kang, "The protective effects of interleukin-18 and interferon-?? on neuronal damages in the rat hippocampus following status epilepticus," *Neuroscience*,

- vol. 170, no. 3, pp. 711–721, 2010.
- [43] J. Y. Chang, D. P. Martin, and E. M. Johnson, “Interferon Suppresses Sympathetic Neuronal Cell Death Caused by Nerve Growth Factor Deprivation,” *J. Neurochem.*, vol. 55, no. 2, pp. 436–445, 1990.
 - [44] A. M. Turnley, R. Starr, and P. F. Bartlett, “SOCS1 regulates interferon-gamma mediated sensory neuron survival,” *Neuroreport*, vol. 12, no. 16, pp. 3443–3445, 2001.
 - [45] S. C. S. Victorio, L. A. Havton, and A. L. R. Oliveira, “Absence of IFN gamma expression induces neuronal degeneration in the spinal cord of adult mice,” *J. Neuroinflammation*, vol. 7, pp. 1–14, 2010.
 - [46] T. Zahir, Y. F. Chen, J. F. MacDonald, N. Leipzig, C. H. Tator, and M. S. Shoichet, “Neural stem/progenitor cells differentiate in vitro to neurons by the combined action of dibutyryl cAMP and interferon-gamma,” *Stem Cells Dev.*, vol. 18, no. 10, pp. 1423–1432, 2009.
 - [47] A. Turbic, S. Y. Leong, and A. M. Turnley, “Chemokines and inflammatory mediators interact to regulate adult murine neural precursor cell proliferation, survival and differentiation,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.
 - [48] S. J. Kim, T. G. Son, K. Kim, H. R. Park, M. P. Mattson, and J. Lee, “Interferon-?? promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway,” *Neurochem. Res.*, vol. 32, no. 8, pp. 1399–1406, 2007.
 - [49] L. Pereira, R. Medina, M. Baena, A. M. Planas, and E. Pozas, “IFN gamma regulates proliferation and neuronal differentiation by STAT1 in adult SVZ niche,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. July, p. 270, 2015.
 - [50] G. Wong, Y. Goldshmit, and A. M. Turnley, “Interferon-?? but not TNF?? promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells,” *Exp. Neurol.*, vol. 187, no. 1, pp. 171–177, 2004.
 - [51] K. Richter, J. Hausmann, and P. Staeheli, “Interferon-gamma prevents death of bystander neurons during CD8 T cell responses in the brain,” *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 5, pp. 1799–1807, 2009.
 - [52] L. Li, T. L. Walker, Y. Zhang, E. W. Mackay, and P. F. Bartlett, “Endogenous Interferon Directly Regulates Neural Precursors in the Non-Inflammatory Brain,” *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 27, pp. 9038–9050, 2010.
 - [53] M. E. Barish, N. B. Mansdorf, and S. S. Raissdana, “Gamma-interferon promotes differentiation of cultured cortical and hippocampal neurons,” *Dev. Biol.*, vol. 144, no. 2, pp. 412–23, 1991.
 - [54] J. Ahn, J. Lee, and S. Kim, “Biochemical and Biophysical Research Communications Interferon-gamma inhibits the neuronal differentiation of neural progenitor cells by inhibiting the expression of Neurogenin2 via the JAK / STAT1 pathway,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 2, 2015.
 - [55] J. Walter, S. D. Honsek, S. Illes, J. M. Wellen, H.-P. Hartung, C. R. Rose, and M. Dihné, “A new role for interferon gamma in neural stem/precursor cell dysregulation,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 6, no. 1, p. 18, 2011.
 - [56] J. Walter, H. P. Hartung, and M. Dihné, “Interferon Gamma and Sonic Hedgehog Signaling Are Required to Dysregulate Murine Neural Stem/Precursor Cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, pp. 1–7, 2012.
 - [57] M. Ar and C. Biology, “STATS : TRANSCRIPTIONAL CONTROL AND BIOLOGICAL IMPACT,” 2002.

- [58] A. Muhlethaler-Mottet, W. Di Berardino, L. A. Otten, and B. Mach, "Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon- γ requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1," *Immunity*, vol. 8, no. 2, pp. 157–166, 1998.
- [59] R. Horton, L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. a Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, M. W. Wright, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck, "Gene map of the extended human MHC.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 5, no. 12, pp. 889–899, 2004.
- [60] J. P.-Y. Ting and J. Trowsdale, "Genetic control of MHC class II expression.," *Cell*, vol. 109 Suppl, pp. S21–S33, 2002.
- [61] K. L. Rock, E. Reits, J. Neefjes, M. F. Flajnik, M. Kasahara, J. and E. Al., "Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules," *Trends Immunol.*, vol. 37, no. 11, pp. 724–737, 2016.
- [62] G. N. Ronald, "The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation."
- [63] J. M. Boss, "Regulation of transcription of MHC class II genes.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 9, pp. 107–113, 1997.
- [64] A. Dorn, H. J. Fehling, W. Koch, M. Le Meur, P. Gerlinger, C. Benoist, and D. Mathis, "B-cell control region at the 5' end of a major histocompatibility complex class II gene: sequences and factors," *Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 10, pp. 3975–3987, 1988.
- [65] G. Feriotto, C. Mischiati, N. Bianchi, C. Rutigliano, R. Gambarili, I. Biotechnologie, and I. R. Elena, "Nucleotide S," vol. 23, no. 10, pp. 1671–1678, 1995.
- [66] W. Reith, S. Satola, C. H. Sanchez, I. Amaldi, B. Lisowska-Grospierre, C. Griscelli, M. R. Hadam, and B. Mach, "Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific HLA-DR promoter binding protein, RF-X," *Cell*, vol. 53, no. 6, pp. 897–906, 1988.
- [67] V. Steimle, B. Durand, E. Barras, M. Zufferey, M. R. Hadam, B. Mach, and W. Reith, "A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome)," *Genes Dev.*, vol. 9, no. 9, pp. 1021–1032, 1995.
- [68] C. S. Moreno, G. W. Beresford, P. Louis-Plence, A. C. Morris, and J. M. Boss, "CREB Regulates MHC Class II Expression in a CIITA-Dependent Manner," *Immunity*, vol. 10, no. 2, pp. 143–151, 1999.
- [69] R. Mantovani, U. Pessara, F. Tronche, X. Y. Li, A. M. Knapp, J. L. Pasquali, C. Benoist, and D. Mathis, "Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription.," *EMBO J.*, vol. 11, no. 9, pp. 3315–22, 1992.
- [70] N. Sachini and J. Papamatheakis, "Biochimica et Biophysica Acta NF-Y and the immune response : Dissecting the complex regulation of MHC genes," 2016.
- [71] N. Jabrane-Ferrat, J. D. Fontes, J. M. Boss, and B. M. Peterlin, "Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interactions.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 4683–4690, 1996.
- [72] A. Muhlethaler-Mottet, M. Krawczyk, K. Masternak, C. Spilianakis, A. Kretsovali, J. Papamatheakis, and W. Reith, "The S box of major

- histocompatibility complex class II promoters is a key determinant for recruitment of the transcriptional co-activator CIITA," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 39, pp. 40529–40535, 2004.
- [73] V. Steimle, L. A. Otten, M. Zufferey, and B. Mach, "Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)," *Cell*, vol. 75, no. 1, pp. 135–146, 1993.
 - [74] J. P.-Y. Ting and B. K. Davis, "CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 387–414, 2005.
 - [75] K. P. Bhat, A. D. Truax, J. K. Brooks, and S. F. Greer, "Association of the 19S proteasomal ATPases with the ATPase-binding domain of CIITA is essential for CIITA stability and MHC class II expression," *Immunol Cell Biol*, vol. 88, no. 8, pp. 807–816, 2010.
 - [76] K. P. Bhat, A. D. Truax, and S. F. Greer, "Phosphorylation and ubiquitination of degron proximal residues are essential for class II transactivator (CIITA) transactivation and major histocompatibility class II expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 34, pp. 25893–25903, 2010.
 - [77] J. M. Boss and P. E. Jensen, "Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 15, no. 1, pp. 105–111, 2003.
 - [78] K. L. Wright and J. P. Y. Ting, "Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes," *Trends Immunol.*, vol. 27, no. 9, pp. 405–412, 2006.
 - [79] G. W. Beresford and J. M. Boss, "CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter.," *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 7, pp. 652–657, 2001.
 - [80] E. Zika, L. Fauquier, L. Vandell, and J. P.-Y. Ting, "Interplay among coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CBP, and CIITA in IFN-gamma-inducible MHC-II gene expression.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 45, pp. 16321–6, 2005.
 - [81] R. Mudhasani and J. D. Fontes, "The class II transactivator requires brahma-related gene 1 to activate transcription of major histocompatibility complex class II genes.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 14, pp. 5019–26, 2002.
 - [82] W. Reith, S. LeibundGut-Landmann, and J.-M. Waldburger, "Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, pp. 793–806, 2005.
 - [83] P. Majumder, J. A. Gomez, and J. M. Boss, "The human major histocompatibility complex class II HLA-DRB1 and HLA-DQA1 genes are separated by a CTCF-binding enhancer-blocking element," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 27, pp. 18435–18443, 2006.
 - [84] B. Burgess-Beusse, C. Farrell, M. Gaszner, M. Litt, V. Mutskov, F. Recillas-Targa, M. Simpson, A. West, and G. Felsenfeld, "The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99 Suppl 4, pp. 16433–16437, 2002.
 - [85] P. Majumder, J. a Gomez, B. P. Chadwick, and J. M. Boss, "The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 785–98, 2008.

- [86] P. Majumder and J. M. Boss, "CTCF controls expression and chromatin architecture of the human major histocompatibility complex class II locus.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 17, pp. 4211–23, 2010.
- [87] N. Choi, P. Majumder, and J. Boss, "Regulation of major histocompatibility complex class II genes," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 81–87, 2011.
- [88] A. Muhlethaler-Mottet, L. A. Otten, V. Steimle, and B. Mach, "Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA," *EMBO J.*, vol. 16, no. 10, pp. 2851–2860, 1997.
- [89] P. J. van den Elsen, "Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes," *Front. Immunol.*, vol. 2, no. OCT, pp. 1–9, 2011.
- [90] Z. Ni, M. Abou El Hassan, Z. Xu, T. Yu, and R. Bremner, "The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers.," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 7, pp. 785–793, 2008.
- [91] W. Reith and J. M. Boss, "New dimensions of CIITA," *Microbiology*, vol. 9, no. 7, pp. 713–714, 2009.
- [92] A. Verma, D. K. Deb, A. Sassano, S. Kambhampati, A. Wickrema, S. Uddin, M. Mohindru, K. Van Besien, and L. C. Platanias, "Cutting Edge: Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway Mediates Cytokine-Induced Hemopoietic Suppression in Aplastic Anemia," *J. Immunol.*, vol. 168, pp. 5984–5988, 2002.
- [93] A. Manea, L. I. Tanase, M. Raicu, and M. Simionescu, "JAK/STAT signaling pathway regulates Nox1 and Nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 105–112, 2010.
- [94] A. W. Wong, W. J. Brickey, D. J. Taxman, H. W. van Deventer, W. Reed, J. X. Gao, P. Zheng, Y. Liu, P. Li, J. S. Blum, K. P. McKinnon, and J. P.-Y. Ting, "CIITA-regulated plexin-A1 affects T-cell–dendritic cell interactions," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 9, pp. 891–898, 2003.
- [95] Z. Y. Chen, J. Shie, and C. Tseng, "Up-regulation of gut-enriched krüppel-like factor by interferon-gamma in human colon carcinoma cells.," *FEBS Lett.*, vol. 477, no. 1–2, pp. 67–72, 2000.
- [96] Z. Chen, "STAT1 Is Required for IFN- γ -Mediated Gut-Enriched Krüppel-like Factor Expression," *Exp. Cell Res.*, vol. 281, no. 1, pp. 19–27, 2002.
- [97] C. and T. Shields, "Identification and Characterization of a Gene Encoding a Gut-enriched Kruppel-like Factor Expressed during Growth Arrest," *Computer (Long. Beach. Calif.)*, vol. 144, no. 5, 2016.
- [98] L. A. Garrett-Sinha, H. Eberspaecher, M. F. Seldin, and B. de Crombrughe, "A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated cells and transiently in certain mesenchymal cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 49, pp. 31384–31390, 1996.
- [99] S. Yet, M. M. M. Nulty, S. C. Folta, H. Yen, M. Yoshizumi, C. Hsieh, M. D. Layne, M. T. Chin, H. Wang, M. A. Perrella, M. K. Jain, and M. Lee, "Human EZF , a Krüppel-like Zinc Finger Protein , Is Expressed in Vascular Endothelial Cells and Contains Transcriptional Activation and Repression Domains *," *J. Biol. Chem.*,

- vol. 273, no. 2, pp. 1026–1031, 1998.
- [100] H. Vangapandu and W. Ai, “Kruppel like factor 4 (KLF4): A transcription factor with diverse context-dependent functions,” *Gene Ther. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 194–203, 2009.
 - [101] W. Zhang, D. E. Geiman, J. M. Shields, D. T. Dang, C. S. Mahatan, K. H. Kaestner, J. R. Biggs, A. S. Kraft, and V. W. Yang, “The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21(WAF1)/(Cip)1 promoter,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 24, pp. 18391–18398, 2000.
 - [102] D. Malik and D. Kaul, “KLF4 Genome: A double edged sword,” *J. Solid Tumors*, vol. 5, no. 1, pp. 49–64, 2015.
 - [103] Minal Patel & Shuying Yang, “Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells,” *Stem Cell Rev.*, vol. 6, no. 3, pp. 367–380, 2011.
 - [104] M. Kriegler, “Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual,” no. December, p. 1991, 1991.
 - [105] H. Inoue, H. Nojima, and H. Okayama, “High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids,” *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23–28, 1990.
 - [106] H. C. Bimboim and J. Doly, “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 1513–1523, 1979.
 - [107] H. Klenow and I. Henningsen, “Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli B by Limited Proteolysis,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 65, no. 2, pp. 168–175, 1970.
 - [108] A. Kretsovali, T. Agaloti, C. Spilianakis, E. Tzortzakaki, M. Merika, and J. Papamatheakis, “Involvement of CREB Binding Protein in Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Genes via Interaction with the Class II Transactivator,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 6777–6783, 1998.
 - [109] C. Spilianakis, J. Papamatheakis, and A. Kretsovali, “Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 22, pp. 8489–98, 2000.
 - [110] “REFERENCEaa,” vol. 17, no. 18, p. 7539, 1989.
 - [111] J. S. Bartlett and D. Stirling, “PCR Protocols: A Short History of the Polymerase Chain Reaction,” *PCR Protoc. SE - 1*, vol. 226, pp. 3–6, 2003.
 - [112] S. A. Bustin, “Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, 2000.
 - [113] M. L. Wong and J. F. Medrano, “<Real-time PCR for mRNA quantitation.pdf>,” vol. 39, no. 1, pp. 75–85, 2005.
 - [114] C. Scientific, “Instruction Manual,” *Flux*, vol. 01010070, no. c, 2004.
 - [115] K. Suzuki, P. Bose, R. Y. Leong-Quong, D. J. Fujita, and K. Riabowol, “REAP: A two minute cell fractionation method,” *BMC Res. Notes*, vol. 3, no. 1, p. 294, 2010.
 - [116] M. Llano, M. Vanegas, N. Hutchins, D. Thompson, S. Delgado, and E. M. Poeschla, “Identification and Characterization of the Chromatin-binding Domains of the HIV-1 Integrase Interactor LEDGF/p75,” *J. Mol. Biol.*, vol. 360,

- no. 4, pp. 760–773, 2006.
- [117] B. Lehner, B. Sandner, J. Marschallinger, C. Lehner, T. Furtner, S. Couillard-Despres, F. J. Rivera, G. Brockhoff, H. C. Bauer, N. Weidner, and L. Aigner, “The dark side of BrdU in neural stem cell biology: Detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival,” *Cell Tissue Res.*, vol. 345, no. 3, pp. 313–328, 2011.
 - [118] M. H. Julius, T. Masuda, and L. A. Herzenberg, “Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 69, no. 7, pp. 1934–8, 1972.
 - [119] N. Bell, V. Hann, C. P. F. Redfern, and T. R. Cheek, “Store-operated Ca²⁺ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 3, pp. 643–651, 2013.
 - [120] J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, and L. S. Freedman, “Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones,” *Cancer Res.*, vol. 38, no. 11 Part 1, pp. 3751–3757, 1978.
 - [121] R. Constantinescu, a T. Constantinescu, H. Reichmann, and B. Janetzky, “Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y,” *J. Neural Transm. Suppl.*, no. 72, pp. 17–28, 2007.
 - [122] Y. T. Cheung, W. K. W. Lau, M. S. Yu, C. S. W. Lai, S. C. Yeung, K. F. So, and R. C. C. Chang, “Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research,” *Neurotoxicology*, vol. 30, no. 1, pp. 127–135, 2009.
 - [123] J. A. Korecka, R. E. van Kesteren, E. Blaas, S. O. Spitzer, J. H. Kamstra, A. B. Smit, D. F. Swaab, J. Verhaagen, and K. Bossers, “Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, 2013.
 - [124] I. Guzhova, A. Hultquist, C. Cetinkaya, K. Nilsson, S. Pålman, and L. G. Larsson, “Interferon-gamma cooperates with retinoic acid and phorbol ester to induce differentiation and growth inhibition of human neuroblastoma cells,” *Int. J. Cancer*, vol. 94, no. 1, pp. 97–108, 2001.
 - [125] J. G. Thomas Scholzen, “The Ki-67 protein: From the known and the unknown,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 322, no. August 1999, pp. 311–322, 2000.
 - [126] Y. Arai, J. N. Pulvers, C. Haffner, B. Schilling, I. Nüsslein, F. Calegari, and W. B. Huttner, “Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production,” *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 154, 2011.
 - [127] I. J. D. Neuroscience, “INTERLEUKIN-1 [3 A N D INTERFERON ~ / INTERACT WITH FIBROBLAST G R O W T H FACTOR-2 IN THE CONTROL OF N E U R O B L A S T O M A CELL PROLIFERATION A N D,” vol. 12, no. 5, pp. 405–410, 1994.
 - [128] N. Perrone-Bizzozero and F. Bolognani, “Role of HuD and other RNA-Binding proteins in neural development and plasticity,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 121–126, 2002.
 - [129] K. D. A, J. Sengupta, M. M, R. L. Neve, C. F. V, and N. I. Perr, “Overexpression of HuD Accelerates Neurite Outgrowth and Increases G AP-43 mRNA Expression in Cortical Neurons and Retinoic Acid- I nduced Embryonic Stem Cells in Vitro,” vol. 258, pp. 250–258, 2001.

- [130] F. D. Morgenthaler, G. W. Knott, J. C. Floyd Sarria, X. Wang, J. K. Staple, S. Catsicas, and H. Hirling, "Morphological and molecular heterogeneity in release sites of single neurons," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 17, no. 7, pp. 1365–1374, 2003.
- [131] A. Ferreira and M. Rapoport, "The synapsins: Beyond the regulation of neurotransmitter release," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 59, no. 4, pp. 589–595, 2002.
- [132] J. M. Redwine and C. F. Evans, "Markers of central nervous system glia and neurons in vivo during normal and pathological conditions," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 265, pp. 119–140, 2002.
- [133] F. Francis, A. Koulakoff, D. Boucher, P. Chafey, B. Schaar, M. C. Vinet, G. Friocourt, N. McDonnell, O. Reiner, A. Kahn, S. K. McConnell, Y. Berwald-Netter, P. Denoulet, and J. Chelly, "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons," *Neuron*, vol. 23, no. 2, pp. 247–256, 1999.
- [134] J. C. Arévalo and S. H. Wu, "Neurotrophin signaling: Many exciting surprises!," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 13, pp. 1523–1537, 2006.
- [135] L. F. Reichardt, "Neurotrophin-regulated signalling pathways," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 361, no. 1473, pp. 1545–1564, 2006.
- [136] T. Hagg and S. Varon, "Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 13, pp. 6315–9, 1993.
- [137] N. Tr, "THE GDNF FAMILY : SIGNALLING , BIOL OGICAL FUNCTIONS AND THERAPEUTI C VALUE," 2002.
- [138] D. R. Kaplan, K. Matsumoto, E. Lucarelli, and C. J. Thielet, "Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells," *Neuron*, vol. 11, no. 2, pp. 321–331, 1993.
- [139] C. L. Esposito, A. D'Alessio, V. de Franciscis, and L. Cerchia, "A cross-talk between TrkB and ret tyrosine kinase receptors mediates neuroblastoma cells differentiation," *PLoS One*, vol. 3, no. 2, 2008.
- [140] K. Wang, F. Zhou, X. Zhu, K. Zhang, B. Huang, L. Zhu, and L. Zhu, "Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor on retinoic acid (RA) -predi ff erentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells," pp. 121–127, 2014.
- [141] S. P. Presgraves, T. Ahmed, S. Borwege, and J. N. Joyce, "Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists," *Neurotox. Res.*, vol. 5, no. 8, pp. 579–598, 2004.
- [142] Q. Zhang and Y. Tan, "Nerve growth factor augments neuronal responsiveness to noradrenaline in cultured dorsal root ganglion neurons of rats," *Neuroscience*, vol. 193, pp. 72–79, 2011.
- [143] a Edsjö, B. Hallberg, S. Fagerström, C. Larsson, H. Axelson, and S. Pålman, "Differences in early and late responses between neurotrophin-stimulated trkA- and trkC-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells," *Cell Growth Differ.*, vol. 12, no. January, pp. 39–50, 2001.
- [144] D. Guérette, P. A. Khan, P. E. Savard, and M. Vincent, "Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins," *BMC Evol. Biol.*, vol. 7, p. 164, 2007.
- [145] S. K. Thomas, C. A. Messam, B. A. Spengler, J. L. Biedler, and R. A. Ross,

- "Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 27, pp. 27994–27999, 2004.
- [146] D. O. S. A. P. R. KATHERINE K. MATTHAY, JUDITH G. VILLABLANCA, ROBERT C. SEEGER, "Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid," *Medicine (Baltimore)*, vol. 341, pp. 1165–1173, 1999.
- [147] C. Hirschmann-Jax, A. E. Foster, G. G. Wulf, J. G. Nuchtern, T. W. Jax, U. Gobel, M. A. Goodell, and M. K. Brenner, "A distinct 'side population' of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 39, pp. 14228–33, 2004.
- [148] E. F. Garner and E. A. Beierle, "Cancer stem cells and their interaction with the tumor microenvironment in neuroblastoma," *Cancers (Basel)*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [149] Z. Y. Chen, "STAT1 Is Required for IFN- γ Mediated Gut-Enriched Kruppel-like Factor Expression," *Exp. Cell Res.*, vol. 281, pp. 19–27, 2002.
- [150] C. K. Y. Shum, S. T. Lau, L. L. S. Tsoi, L. K. Chan, J. W. P. Yam, M. Ohira, a Nakagawara, P. K. H. Tam, and E. S. W. Ngan, "Krüppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation," *Oncogene*, vol. 32, no. 35, pp. 4086–99, 2013.
- [151] J. Shi, B. Zheng, S. Chen, G. Ma, and J. Wen, "Retinoic acid receptor α mediates all-trans-retinoic acid-induced Klf4 gene expression by regulating Klf4 promoter activity in vascular smooth muscle cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 14, pp. 10799–811, 2012.
- [152] J. Altman and G. D. Das, "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats," *J. Comp. Neurol.*, vol. 124, no. 3, pp. 319–335, 1965.
- [153] J. Altman and G. D. Das, "Autoradiographic and Histological Studies o Postnatal Neurogenesis," *J. Comp. Neurol.*, vol. 126, no. 3, pp. 337–389, 1966.
- [154] F. H. Gage, P. W. Coates, T. D. Palmer, H. G. Kuhn, L. J. Fisher, J. O. Suhonen, D. a Peterson, S. T. Suhr, and J. Ray, "Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 25, pp. 11879–11883, 1995.
- [155] A. Chavarria and J. Alcocer-Varela, "Is damage in central nervous system due to inflammation?," *Autoimmun. Rev.*, vol. 3, no. 4, pp. 251–260, 2004.
- [156] Y. Kim, K. Na, A. Myint, and B. E. Leonard, "Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry The role of pro-in fl ammatory cytokines in neuroin fl ammation , neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression," vol. 64, pp. 277–284, 2016.
- [157] G. Singhal, E. J. Jaehne, F. Corrigan, C. Toben, and B. T. Baune, "Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review," *Front. Neurosci.*, vol. 8, no. SEP, pp. 1–22, 2014.
- [158] O. Butovsky, Y. Ziv, A. Schwartz, G. Landa, A. E. Talpalar, S. Pluchino, G. Martino, and M. Schwartz, "Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 31, no. 1, pp. 149–160, 2006.
- [159] N. P. Whitney, T. M. Eidem, H. Peng, Y. Huang, and C. Zheng, "Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of

- brain injury and neurodegenerative disorders," *J. Neurochem.*, vol. 108, no. 6, pp. 1343–1359, 2010.
- [160] R. Baron, A. Nemirovsky, I. Harpaz, H. Cohen, T. Owens, and A. Monsonego, "IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease," *FASEB J.*, vol. 22, no. 8, pp. 2843–52, 2008.
- [161] S. Johansson, J. Price, and M. Modo, "Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells," *Stem Cells*, vol. 26, no. 9, pp. 2444–54, 2008.
- [162] O. Von Bohlen Und Halbach, "Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus," *Cell Tissue Res.*, vol. 329, no. 3, pp. 409–420, 2007.
- [163] A. Ratti, C. Fallini, L. Cova, R. Fantozzi, C. Calzarossa, E. Zennaro, A. Pascale, A. Quattrone, and V. Silani, "A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 7, pp. 1442–1452, 2006.
- [164] A. Y. Maslov, T. A. Barone, R. J. Plunkett, and S. C. Pruitt, "Neural Stem Cell Detection, Characterization, and Age-Related Changes in the Subventricular Zone of Mice," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 7, pp. 1726–1733, 2004.
- [165] J. Zhang and J. Jiao, "Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis," vol. 2015, 2015.
- [166] S. W. Barger, L. J. Van Eldik, and M. P. Mattson, "S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation," *Brain Res.*, vol. 677, no. 1, pp. 167–170, 1995.
- [167] C. A. Goddard, D. a Butts, and C. J. Shatz, "Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 16, pp. 6828–6833, 2007.
- [168] S. Jeong and A. Stein, "Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 3, pp. 370–375, 1994.
- [169] F. Schnappauf, S. B. Hake, M. M. Camacho Carvajal, S. Bontron, B. Lisowska-Grospierre, and V. Steimle, "N-terminal destruction signals lead to rapid degradation of the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 8, pp. 2337–2347, 2003.
- [170] S. F. Greer, E. Zika, B. Conti, X. Zhu, and J. P. Ting, "Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1074–82, 2003.
- [171] K. P. Bhat, A. D. Truax, J. K. Brooks, and S. F. Greer, "Association of the 19S proteasomal ATPases with the ATPase-binding domain of CIITA is essential for CIITA stability and MHC class II expression," *Immunol Cell Biol*, vol. 88, no. 8, pp. 807–816, 2010.
- [172] A. Ferdous, F. Gonzalez, L. Sun, T. Kodadek, and S. A. Johnston, "The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II," *Mol. Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 981–991, 2001.
- [173] F. Gonzalez, A. Delahodde, T. Kodadek, S. Albert, S. A. Johnston, F. Gonzalez, and A. Delahodde, "Activated Promoter Proteasome Subcomplex to an," vol. 296, no. 5567, pp. 548–550, 2016.

- [174] G. Reid, M. R. Hübner, R. Métivier, H. Brand, S. Denger, D. Manu, J. Beaudouin, J. Ellenberg, and F. Gannon, "Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER?? on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 695–707, 2003.
- [175] and O. C. Véronique Baldin,* Muriel Militello,* Yann Thomas,* Christine Doucet,* Weronika Fic,† Stephanie Boireau,† Isabelle Jariel-Encontre,† Marc Piechaczyk,† Edouard Bertrand,† Jamal Tazi, "A Novel Role for PA28?-Proteasome in Nuclear Speckle Organization and SR Protein Trafficking," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 1, pp. 308–317, 2007.
- [176] C. Wójcik and G. N. DeMartino, "Intracellular localization of proteasomes," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 5, pp. 579–589, 2003.
- [177] K. A. Publishers, "INTERFERON~/INDUCED DIFFERENTIATION OF HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS INCREASES CELLULAR UPTAKE AND HALFLIFE OF METAIODOBENZYLGUANiDINE P.G.Montaldo, R. Carbone, P. Cornaglia Ferraris and M. Ponzoni, Oncology Res. Lab., G. Gaslini Children's Hosp., Genoa, ita," pp. 140–143, 1993.
- [178] D. S. Ghorpade, S. Holla, A. Y. Sinha, S. K. Alagesan, and K. N. Balaji, "Nitric oxide and KLF4 protein epigenetically modify class II transactivator to repress major histocompatibility complex II expression during Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Gu??rin infection," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 28, pp. 20592–20606, 2013.
- [179] Z. Wei, F. Gao, S. Kim, H. Yang, J. Lyu, W. An, K. Wang, and W. Lu, "Klf4 organizes long-range chromosomal interactions with the OCT4 locus in reprogramming and pluripotency," *Cell Stem Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 36–47, 2013.
- [180] J. M. Blackwell, S. E. Jamieson, and D. Burgner, "HLA and infectious diseases," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 370–385, 2009.
- [181] K. Masternak, N. Peyraud, M. Krawczyk, E. Barras, and W. Reith, "Chromatin remodeling and extragenic transcription at the MHC class II locus control region.," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 2, pp. 132–137, 2003.

