



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Ιατρική Σχολή
Λειτουργικός-Κλινικοεργαστηριακός Τομέας

Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ
Ινστιτούτο Ανοσολογίας

**Το δίκτυο σήμανσης των οστικών
πρωτεϊνών στο περιφερικό ανοσοποιητικό
σύστημα**

**ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΤΣΑΛΑΒΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2011



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Ιατρική Σχολή
Λειτουργικός-Κλινικοεργαστηριακός Τομέας

Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ
Ινστιτούτο Ανοσολογίας

**Το δίκτυο σήμανσης των οστικών
πρωτεϊνών στο περιφερικό ανοσοποιητικό
σύστημα**

**ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΤΣΑΛΑΒΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2011

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

*στους γονείς μου Θανάση και Τσαμπίκα
στην αδερφή μου Μαρία*

Πρόλογος.

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στις εγκαταστάσεις του Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ” στην Βάρη Αττικής. Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Φώτη για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική διατριβή μου. Αυτή η εργασία δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την καθοδήγηση του Δρ. Daniel Graf, Ερευνητή Γ΄ στο Ινστιτούτο Ανοσολογίας του Αλ. Φλέμιγκ. Ευχαριστώ τον Δρ. Graf για την ευκαιρία και τη γνώση που μου παρείχε στην ενασχόληση μου με την επιστήμη της ανοσολογίας καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσε ώστε να ξεπεραστούν όλες οι προκλήσεις που παρουσιάστηκαν σε αυτό το project.

Είμαι αρκετά ευγνώμων στα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Graf, Ουρανία Πασσά, Κατερίνα Σέγκλια, Βασιλική Ζούβελου, Ναυσικά Φρίμα και Όλγα Γράφου, που για όλα αυτά τα χρόνια υπήρξαν συνεργάτες και αρωγοί αυτής της προσπάθειας. Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ουρανία Πασσά και την Κατερίνα Σέγκλια για την συμμετοχή και βοήθεια τους σε καθοριστικά για την εργασία πειράματα. Είμαι ευγνώμων για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά καιρούς μέλη και συνεργάτες του Ινστιτούτου Ανοσολογίας του “Αλ. Φλέμιγκ”. Ευχαριστώ θερμά, την Γεωργία Οικονόμου και τη Δρ. Σωτηρία Τζίμα για την βοήθεια τους σε διάφορες τεχνικές. Χωρίς την συμβολή του φίλου και συνεργάτη Δρ. Παναγιώτη Βικτοράτου τα πειράματα κυτταροκαλλιέργειας θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθούν, τον ευχαριστώ από καρδιάς. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αλεξία Γιαννακοπούλου και τον Σπύρο Λάλο που βοήθησαν σε τεχνικό επίπεδο στα πρώτα στάδια της εργασίας.

Ευχαριστώ τους εξωτερικούς συνεργάτες, Ευτυχία Λέκκα, Νοσοκομείο “Ο Άγιος Σάββας” και Rainhard Maier, Research Department, Kantonal Hospital, St. Gallen Ελβετία, για την τεχνική υποστήριξη τους.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου, του γονείς μου Θανάση και Τσαμπίκα, την αδερφή μου Μαρία για την στήριξη τους από την αρχή έως το τέλος αυτής της προσπάθειας.

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	10
1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα.	10
1.2 Β κύτταρα.	12
1.2.1 Β κυτταρική ανάπτυξη.	12
1.2.2 Β κύτταρα της οριακής ζώνης (MZB) και B1 κύτταρα.	15
1.2.3 Τα Β κύτταρα στις θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις.	15
1.2.3.1 Βλαστικά Κέντρα.	16
1.2.3.2 Η εναλλαγή ισοτύπου.	18
1.2.3.3 Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση.	19
1.2.3.4 Η ωρίμανση της συγγένειας.	19
1.2.4 Τα Β κύτταρα στις θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις.	20
1.2.5 Τελική Β διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα.	22
1.3 Δενδριτικά κύτταρα.	27
1.4 Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (BMPs).	29
1.4.1 BMP υποδοχείς.	30
1.4.2 Ρύθμιση και λεπτός συντονισμός της σηματοδότησης μέσω των BMP στον εξωκυτταρικό χώρο.	31
1.4.2.1 Noggin και Chordin.	32
1.4.2.2 Twisted Gastrulation.	33
1.4.2.3 Gremlin.	34
1.4.3 Ενδοκυτταρική σηματοδότηση των BMPs και των γονιδίων στόχων τους.	34
1.4.4 Τα συστατικά στοιχεία του σηματοδοτικού δικτύου των BMP στην ανοσολογική ρύθμιση.	36
1.5 Διαγονιδιακή τεχνολογία.	40
1.6 Πολυπαραμετρική χρώση για τον προσδιορισμό του ανοσολογικού φαινοτύπου των κυττάρων (Mytlicolor Flow Cytometry - Immunophenotyping).	43
1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης.	48
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	50
2.1 Ποντικοί και <i>in vivo</i> πειράματα.	50
2.1.1 Ποντικοί.	50
2.1.2 Ανοσοποιήσεις.	51

2.2 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας.	52
2.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA.	52
2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	53
2.2.3 Απομόνωση γενομικού RNA, παραγωγή cDNA και αντιστρεφόμενης μεταγραφής - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR).	54
2.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών.	55
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμυδίου (SDS-PAGE).	55
2.2.6 Στύπωμα (ανοσοαποτύπωση) κατά Western.	56
2.3 Μέθοδοι Ανοσολογίας.	57
2.3.1 Δημιουργία αιωρίματος μεμονομένων κυττάρων από λεμφικό ιστό.	57
2.3.2 Διαδικασία χρώσης φθορισμού για κυτταρομετρία ροής (FACS).	58
2.3.3 Ανοσοϊστοχημεία.	60
2.3.4 ELISA.	61
2.3.5 ELISPOT.	62
2.3.6 Απομόνωση B κυττάρων.	62
2.4 Μέθοδοι Κυτταρικής Βιολογίας.	63
2.4.1 Καλλιέργεια B κυττάρων.	63
2.4.2 Καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό των οστών.	63
2.4.3 Καλλιέργεια μακροφάγων από μυελό των οστών.	64
2.4.4 Καλλιέργειες εκλυόμενων περιτοναϊκών μακροφάγων.	65
2.5 Υλικά	66
2.5.1 Εξοπλισμός	66
2.5.2 Αναλώσιμα	66
2.5.3 Χημικά, αντιδραστήρια και ένζυμα	67
2.5.4 Αντισώματα και δευτερογενή αντιδραστήρια	69
2.6 Εκκινήτες γενοτύπωσης των ποντικών και RT-PCR	70
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	74
3.1 Έκφραση των γονιδίων που απαρτίζουν το δίκτυο σηματοδότησης BMP σε ιστούς και κύτταρα του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος.	74
3.2 Έκφραση του <i>noggin</i> στο σπλήνα.	77
3.3 Το <i>gremlin</i> στα αιμοποιητικά κύτταρα.	78
3.3.1 Έκφραση του <i>gremlin</i> και φαινοτυπική ανάλυση του <i>Gremlin</i> ^{+lacZ} .	78
3.3.2 Απαλοιφή του <i>gremlin</i> από τα αιμοποιητικά κύτταρα.	82
3.4 Ο ρόλος του <i>twsg1</i> στις λειτουργίες του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος.	85
3.4.1 Η Έκφραση του <i>twsg1</i> στα βλαστικά κέντρα των λεμφοειδών ιστών και η απαλοιφή του από τα B κύτταρα.	85

3.4.2 Β κυτταρική ανάπτυξη, δημιουργία βλαστικών κέντρων και θυμοεξαρτώμενη ανοσοποιητική απόκριση στο <i>Twsg1</i> -cKO.	88
3.4.3 Η TWSG1 εμπλέκεται στην ωρίμανση συγγένειας της IgM.	91
3.4.4 Η έλλειψη της TWSG1 επηρεάζει τις θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις.	92
3.4.5 Η απουσία της TWSG1 επηρεάζει τον Β κυτταρικό πολλαπλασιασμό την ενεργοποίηση και την απόπτωση <i>in vitro</i> .	94
3.4.6 Η παραγωγή της TWSG1 δεν επηρεάζει ευθέως την Β κυτταρική ενεργοποίηση.	98
3.4.7 Τα Β κύτταρα αντιδρούν στα BMP σημάδια.	100
3.4.8 Η έλλειψη του <i>twsg1</i> επηρεάζει την παραγωγή IgG3 και αυξάνει την έκφραση του <i>id2 in vitro</i> .	103
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	106
4.1 Παρουσία των BMPs στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα.	106
4.2 Ρόλος του <i>gremlin</i> στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων.	109
4.3 Ο ρόλος του <i>twsg1</i> στην φυσιολογία του Β κυττάρου και στους μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης.	111
5 ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.	119
5.1 Περίληψη στα Ελληνικά	119
5.2 Summary in English	121
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	124

Συντμήσεις.

°C	βαθμοί Κελσίου
Act-R	Activin receptor, υποδοχέας ακτιβίνης
AID	activation-induced cytidine deaminase, δεαμινάση της κυτιδίνης
ΑΠΚ	Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
BAC	Bacterial artificial chromosome, βακτηριακό τεχνητό χρωμόσωμα
BCR	B cell receptor, B κυτταρικός υποδοχέας
BK	Βλαστικό Κέντρο
BLIMP1	B lymphocyte induced maturation protein, επαγόμενη πρωτεΐνη ωρίμανσης 1 των B λεμφοκυττάρων
BMP-R	BMP receptor, υποδοχέας BMP
CD40L	CD40 ligand, συνδέτης του CD40
CFA	Complete Freud's adjuvant, πλήρες ενισχυτικό του Freud
cKO	conditional knock-out, απαλοιφή υπό συνθήκη (ιστοειδική)
DNP	Di-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl, δι-υδρόξυ-3-νιτροφένυλ ακετυλίου
dNTP	deoxy nucleotide, δεόξυ νουκλεοτίδιο
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, κυτταρομετρία ροής
FO	Follicular, θυλιακό
FOB	Follicular B cell, Θυλακιώδη B κύτταρο
GDF	Growth differentiation factor, αναπτυξιακός αυξητικός παράγοντας
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor, Παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
Id	Inhibitor of differentiation, αναστολέας της διαφοροποίησης
Ig	immunoglobulin, ανοσοσφαιρίνη
IL	interleukin, ιντερλευκίνη
IRF4	Interferon regulatory factor 4, ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης 4
kDa	kilo Dalton
KO	knock-out
LPS	Lipopolysaccharide, λιποπολυσακχαρίτης
MITF	Microphthalmia Induced Transcription factor, Επαγόμενος παράγοντας της μικροφθαλμίας
min.	Λεπτά
PALS	Periarterial lymphoid sheath, περιαρτηριολικό λεμφικό έλυτρο
PCR	polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
pMHC	pre-Major Histocompatibility complex, προ-σύμπλοκο μείζονος ιστοσυμβατότητας
PMT	Photomultiplier, πολλαπλασιαστής φωτός
rpm	revolutions per minute, στροφές ανά λεπτό
TCR	T cell receptor, T κυτταρικός υποδοχέας
TGF-β	transforming growth factor β, μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β
TLR	Toll-like receptor, υποδοχέας που ομοιάζει με τον Toll
TNF	tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης των όγκων
TWSG1	Twisted Gastrulation
wt	Wild type, φυσικός τύπος/φυσιολογικός
BMP	Bone Morphogenetic Protein, Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη
ΔΚ	Δενδριτικό Κύτταρο

ΘΔΚ	Θυλακιώδη Δενδριτικό Κύτταρο
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor, Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων
MZ	Marginal zone, οριακή ζώνη
ΣΥΜ	σωματική υπερμεταλλαξιγένεση
TD	Thymus dependent, θυμοεξαρτώμενη
TI-1	Thymus independent type 1, θυμοανεξάρτητη τύπου 1
TI-2	Thymus independent type 2, θυμοανεξάρτητη τύπου 2

Εισαγωγή.

1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα στα σπονδυλωτά είναι ένα αρκετά εξελιγμένο σύστημα το οποίο προστατεύει τον οργανισμό από εξωγενή παθογόνα όπως βακτήρια, μύκητες και ιούς, καθώς και οιδήματα που προέρχονται από τον ίδιο τον οργανισμό. Το κύριο χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η δυνατότητα του να διακρίνει λοιμοξιογόνους παράγοντες (εξωγενείς και ενδογενείς) και να ενεργοποιεί μηχανισμούς για την εξολόθρευσή τους. Αυτοί οι μηχανισμοί που συμπεριλαμβάνουν την παραγωγή αντισωμάτων και λεκτινών, μπορούν να οψωνοποιήσουν για εξολόθρευση τους παθογόνους παράγοντες. Ενεργοποιώντας παράλληλα το σύστημα συμπληρώματος επιτρέπουν την φαγοκυττάρωση των παθογόνων οργανισμών από κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα, που έχουν προσβληθεί ή μεταλλαχθεί από ιούς, μπορούν να σκοτωθούν από τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα.

Οι ανοσολογικές αποκρίσεις μπορούν να χωριστούν κυρίως στην έμφυτη και στην επίκτητη ανοσία. Οι δυο τους διαφέρουν κυρίως στον τρόπο και τα κύτταρα που χρησιμοποιούν, για να ανιχνεύσουν αντιγόνα. Η έμφυτη ανοσία βασίζεται κυρίως στην αναγνώριση ακολουθιών μακρομορίων, που υπάρχουν στις επιφάνειες βακτηρίων και ιών. Η αναγνώριση αυτή γίνεται μέσω υποδοχέων που υπάρχουν στα διάφορα φαγοκύτταρα. Μια ομάδα τέτοιων υποδοχέων, που έχει χαρακτηριστεί εκτενώς, είναι η Toll-like (TLR). Αυτοί οι υποδοχείς αναγνωρίζουν μια ευρεία γκάμα συνδετών, όπως λιποπολυσακχαρίτης (LPS), φλαγελίνη, dsRNA, CpG, DNA και άλλους (Akira and Takeda, 2004). Το πλεονέκτημα της έμφυτης ανοσίας είναι ότι σε κάθε δεδομένη στιγμή, κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά, τα ουδετερόφιλα και άλλα μπορούν άμεσα να αναγνωρίσουν την εισβολή παθογόνων οργανισμών και να τους εξαλείψουν. Το μειονέκτημα όμως είναι ότι πολλά από αυτά τα παθογόνα εξελίσσονται, έτσι ώστε να παρακάμπτουν την αναγνώριση τους από τους υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας, είτε αποκρύπτοντας τους μοριακούς δείκτες ή συνδέτες, είτε χαλαρώνοντας την προσκόλλησή τους.

Η επίκτητη ανοσία, που χρησιμοποιεί τα λεμφοκύτταρα για την δράση της, προσαρμόζει μια διαφορετική στρατηγική για την αναγνώριση αντιγόνων. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας που αποκωδικοποιούνται από

φυσικά λειτουργικά γονίδια, τα γονίδια των υποδοχέων της επίκτητης ανοσίας αποτελούνται από ένα μεγάλο συνδυασμό γονιδιακών τμημάτων που ανασυνδυάζονται και συνδέονται δημιουργώντας ένα λειτουργικό υποδοχέα (Tonegawa, 1983). Αυτός ο ανασυνδυασμός επιτρέπει την δημιουργία μίας ποικιλομορφίας υποδοχέων που δυνητικά μπορούν να αναγνωρίσουν έναν τεράστιο αριθμό δομών χρησιμοποιώντας μικρό αριθμό γονιδίων. Όταν αυτή η τεράστια ποικιλία υποδοχέων δημιουργείται, πρέπει και να ελέγχεται για την ειδικότητα της. Ο κύριος κανόνας στην έκφραση αντιγονικών υποδοχέων στην επιφάνεια των πρώιμων αναπτυσσόμενων λεμφοκυττάρων είναι η ανάπτυξη της ιδιότητας της αυτοανοχής, κάτι που είναι απαραίτητο για την αναγνώριση δομών, που προέρχονται από τον ίδιο τον οργανισμό (Goodnow et al., 1988; Hartley et al., 1991; Kisielow et al., 1988). Αποτέλεσμα αυτού είναι η απομάκρυνση πιθανών αυτοδραστικών κυττάρων. Η διαδικασία της ανοχής σε δομές του “εαυτού” διαδραματίζεται στον μυελό των οστών για τα Β κύτταρα και στο θύμο αδένα για τα Τ κύτταρα.

Η φυσική και η επίκτητη ανοσία συνεργάζονται κατά τη διάρκεια μίας ανοσολογικής απόκρισης. Στην περίπτωση βακτηριακής μόλυνσης, τα περισσότερα βακτήρια αναγνωρίζονται από τα μακροφάγα και τα κοκκιόκυτταρα και εξολοθρεύονται. Κάποια βακτήρια ή βακτηριακά αντιγόνα μπορούν να προσληφθούν από τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται και μεταναστεύουν στους λεμφαδένες στην περιοχή της μόλυνσης, παρουσιάζοντας το αντιγόνο στα Τ κύτταρα. Όταν το Τ κύτταρο αναγνωρίσει το αντιγόνο, ενεργοποιείται και πολλαπλασιάζεται. Τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που προσελκύουν και ενεργοποιούν τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα την φαγοκυττάρωση του παθογόνου. Εναλλακτικά, ένα ενεργοποιημένο Τ κύτταρο μπορεί να βοηθήσει ένα Β κύτταρο, που είναι προ-ενεργοποιημένο, διαμέσου του Β κυτταρικού υποδοχέα του (BCR). Αυτή η βοήθεια από τα Τ κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη ενεργοποίηση του Β κυττάρου, που οδηγεί στην διαφοροποίηση του και σε πλασματοκύτταρο και κατά συνέπεια στην έκκριση αντισωμάτων.

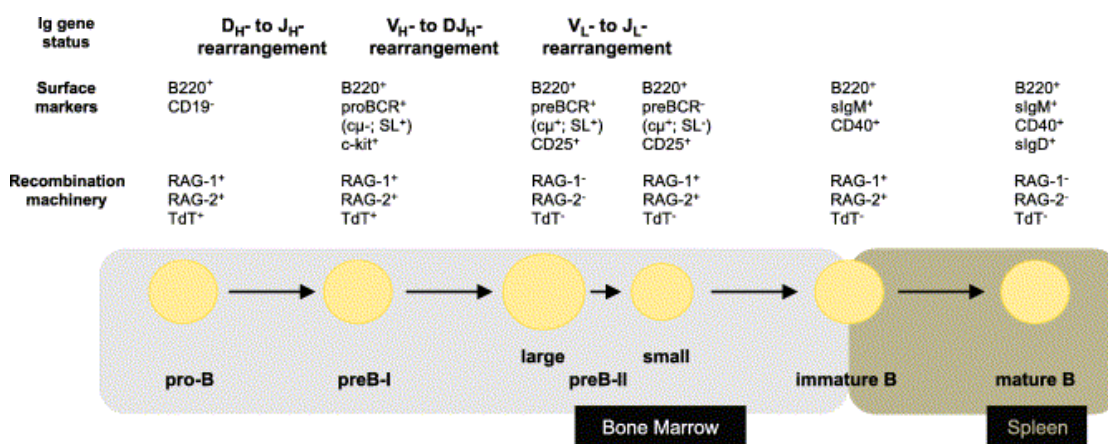
1.2 B κύτταρα

1.2.1 B κυτταρική ανάπτυξη

Η B κυτταρική ανάπτυξη αρχίζει στο εμβρυϊκό ήπαρ· στα ενήλικα ποντίκια όμως τα περισσότερα B προγονικά που εξελίσσονται σε B κύτταρα περιέχονται στο μυελό των οστών. Στόχος της πρώιμης B κυτταρικής ανάπτυξης είναι η ωρίμανση των B κυττάρων στον μυελό των οστών και η εξαγωγή τους στους λεμφικούς ιστούς, όπου μπορούν να ενεργοποιηθούν και να αντιμετωπίσουν ξένα αντιγόνα. Η διαδικασία αυτής της διαφοροποίησης οδηγεί αρχικά, μέσα από διάφορα στάδια, ένα αιμοποιητικό αρχέγονο κύτταρο σε ένα ανώριμο B κύτταρο. Σε όλα τα στάδια της B κυτταρικής διαφοροποίησης εκφράζεται ο επιφανειακός δείκτης B220 (μία ισομορφή του CD45, υποδοχέα της φωσφατάσης τυροσίνης), που ως επί το πλείστον χαρακτηρίζει κυρίως (και όχι αποκλειστικά) τη γενεαλογία των B κυττάρων (Hardy et al., 1991). Επίσης εκφράζονται και τα γονίδια *rag-1*, *rag-2*, καθώς και το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδυλική τρανσφεράση (terminal deoxynucleotidyl transferase-TdT), τα οποία είναι απαραίτητα για την αναδιάταξη των αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης. Κατά τη διαφοροποίηση, τα πρώιμα προ-προ-B κύτταρα συνθέτουν τη D-J βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgH). Κατά τα τέλη του πρώιμου προ-προ-B σταδίου η διαφοροποίηση έχει προχωρήσει στη V-DJ συνένωση της βαριάς αλυσίδας και γίνεται CD19⁺. Παράλληλα, εκφράζεται και ο επιφανειακός δείκτης c-kit. Η μη επιτυχής αναδιάταξη της αλυσίδας της Ig οδηγεί στην απώλεια του κυττάρου. Στην περίπτωση επιτυχούς αναδιάταξης και σύνδεσης, η μ αλυσίδα εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου μαζί με τις υποκατάστατες ελαφριές αλυσίδες V προB και λ5 και τις σταθερές αλυσίδες Iga, Igβ, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα προ-BCR (Bartholdy and Matthias, 2004).

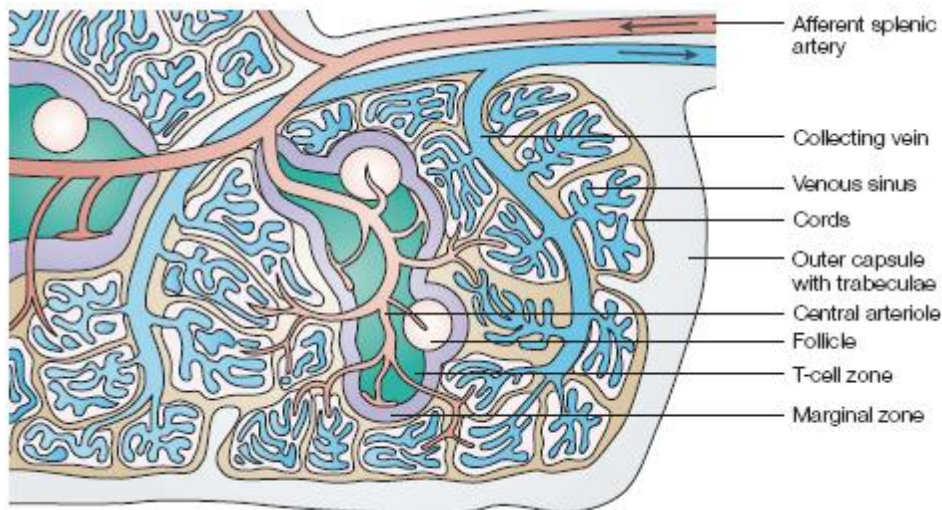
Η έκφραση του προ-BCR συμπλέγματος είναι ένα κρίσιμο σημείο στην πρωτογενή B κυτταρική ανάπτυξη (Kitamura et al., 1992). Ο προ-BCR σηματοδοτεί την αναστολή της έκφρασης των *rag1/2* για να διασφαλίσει τη μη περαιτέρω αναδιάταξη της IgH. Επίσης επάγει ένα κύμα συνεχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Benschop and Cambier, 1999). Τα κύτταρα σε αυτό το στάδιο ονομάζονται μεγάλα προ-B κύτταρα. Στη συνέχεια μετά-μιτοτικά μικρά προ-B κύτταρα επανεκφράζουν *rag1/2* και αρχίζουν να αναδιατάσσουν τις ελαφριές αλυσίδες (IgL) κ και λ. Επιτυχής αναδιάταξη του IgL τύπου έχει ως αποτέλεσμα την

έκφραση ενός πλήρους BCR που αποτελείται από διαμεμβρανική [surface] IgM (sIgM) και Igα/Igβ. Περαιτέρω αναδιάταξη αναστέλλεται και τα κύτταρα μπαίνουν στο στάδιο του ανώριμου B κυττάρου. Σε αυτό το στάδιο ελέγχεται η αυτοδραστικότητα του BCR, δηλαδή η ανοχή του BCR σε αυτοαντιγόνα. Αυτή η διαδικασία είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αποτρέπει την δημιουργία B κυττάρων που μπορεί να επιτεθούν σε αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού. Κύτταρα που εκφράζουν αυτοδραστικό BCR, αρχίζουν δευτερογενείς αναδιατάξεις του IgL τύπου σε μία προσπάθεια να αλλάξουν την ειδικότητα του BCR από την αυτοδραστικότητα. Ειδάλλως, τα αυτοδραστικά ανώριμα B κύτταρα πεθαίνουν από απόπτωση ή αδρανοποιούνται (Sandel and Monroe, 1999; Tiegs et al., 1993). Μόνο τα ανώριμα B κύτταρα που δεν δεσμεύουν αυτοαντιγόνα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα B κύτταρα (Nemazee and Buerki, 1989; Nemazee and Burki, 1989). Η μείωση δυναμικά αυτοδραστικών ανώριμων B κυττάρων συμβαίνει πριν τα κύτταρα διαφοροποιηθούν σε ώριμα B κύτταρα με την ανάπτυξη και της IgD (sIgD). Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των διαφόρων σταδίων της πρώιμης ανάπτυξης των κυττάρων B συνοψίζεται στην Εικόνα. 1.1.



Εικόνα 1.1 Στάδια της πρωτογενούς B κυτταρικής διαφοροποίησης στον μυελό των οστών (Από Bartholdy and Matthias, 2004)

Η δευτερογενής B κυτταρική ανάπτυξη πραγματοποιείται στα περιφερικά λεμφικά όργανα και κυρίως στον σπλήνα (Εικόνα 1.2) και στους λεμφαδένες. Τα B κύτταρα, που εξάγονται από τον μυελό των οστών, δεν είναι ακόμα πλήρως ώριμα και διαμέσου του αίματος εισέρχονται στον σπλήνα, εξωτερικά των λεμφικών θυλακίων



Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση των δομών του σπλήνα (Από Mebius and Kraal, 2005)

(λεμφοζίδια). Αυτά τα ανώριμα κύτταρα ονομάζονται μεταβατικά B κύτταρα (T1) και αναγνωρίζονται από τους δείκτες ($CD21^{\text{int}}CD23^{\text{+}}IgM^{\text{high}}IgD^{\text{+/-}}$) (Loder et al., 1999). Στο επόμενο μεταβατικό στάδιο (T2) τα B κύτταρα εισέρχονται στα λεμφοζίδια εκφράζοντας CD21, CD23, IgD και συνεχίζουν παράλληλα να είναι IgM^{high} . Το κοινό χαρακτηριστικό των T1 και T2 κυττάρων είναι ότι η διασύνδεση του BCR δεν οδηγεί στον πολλαπλασιασμό τους αλλά σε απόπτωση ή ανενεργία (Carsetti et al., 1995). Τέλος, τα μεταβατικά T2 κύτταρα διαφοροποιούνται σε δύο είδη B κυττάρων (απαρτίζοντας τα γνωστά σε όλους B κύτταρα ή B2 κύτταρα), τα θυλιακά B κύτταρα (Follicular B cells [FOB]) ($CD21^{\text{int}}CD23^{\text{+}}IgM^{\text{low}}IgD^{\text{high}}$) και τα B κύτταρα της οριακής ζώνης (Marginal Zone B cells [MZB]) ($CD21^{\text{high}}CD23^{\text{-}}IgM^{\text{high}}IgD^{\text{low}}$) (Pillai et al., 2005). Οι φαινότυποι και η τοπολογία τους στο σπλήνα παρατίθενται στον Πίνακα 1.1.

Τα FOB αποτελούν την κύρια ομάδα των ώριμων B κυττάρων. Κυκλοφορούν συνεχώς ανάμεσα στο αίμα και τα περιφερικά λεμφικά όργανα και παίρνουν μέρος στις περισσότερες B κυτταρικές λειτουργίες, όπως στις θυμοεξαρτώμενες (TD) και θυμοανεξάρτητες (TI) αποκρίσεις.

Πίνακας 1.1

Δείκτες επιφάνειας και τοποθεσία διαφόρων B κυτταρικών υπό-ομάδων

	T1	T2	FOP	MZB
sIgM	+++	+++	+	+++
sIgD	-	+++	+++	-
CD21	-	+++	-	+++
CD23	-	++	+++	-
Τοποθεσία	Ερυθρός πολφός	Λεμφοζίδιο	Λεμφοζίδιο	Οριακή ζώνη

1.2.2 B κύτταρα της οριακής ζώνης (MZB) και B1 κύτταρα

Τα MZB θα μπορούσαν να είναι μέρος της φυσικής ανοσίας, καθώς μπορούν να ενεργοποιηθούν και να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα, χωρίς την σύνδεση ενεργοποίησης του BCR ή την απαραίτητη βοήθεια των T κύτταρων (Oliver et al., 1999). Επίσης, τα MZB διαθέτουν μηχανισμούς έτσι ώστε να ωριμάζουν πολύ γρήγορα σε πλασμαβλάστες εκκρίνοντας IgM (Martin et al., 2001; Pillai et al., 2005). Επίσης, λόγω της ανατομικής τους θέσης στο σπλήνα, βοηθούν στην μεταφορά αντιγόνου σε ανοσοσυμπλέγματα μέσα στα θυλάκια και κατά κάποιο τρόπο συμβάλλουν στις TD αποκρίσεις (Allman and Pillai, 2008). Ένα πλεονέκτημα που έχουν, σε σχέση με τα FOB, είναι ότι εκφράζουν περισσότερη MHC-II, CD80 και CD86, γεγονός που τα καθιστά καλύτερους αντιγονοπαρουσιαστές στα T κύτταρα (Song and Cerny, 2003).

Τα B1 κύτταρα είναι μία ειδική υπό-ομάδα των B κυττάρων. Βρίσκονται κυρίως στην περιτοναϊκή κοιλότητα, παράλληλα όμως βρίσκονται και σε μικρούς αριθμούς στο σπλήνα. Φαινοτυπικά μπορούν να αναγνωριστούν από την έκφραση των δεικτών $B220^{low}IgM^{high}IgD^{low}CD23^{-}CD43^{+}$. Τα B1 κύτταρα μπορούν περαιτέρω να διαχωριστούν σε B1a και B1b κύτταρα αναφορικά με την έκφραση του CD5, ενός δείκτη που εκφράζεται μόνο στα B1a κύτταρα (Berland and Wortis, 2002; Hayakawa et al., 1983). Συνήθως, η αναφορά στα B1 κύτταρα υπονοεί τα B1a κύτταρα. Λειτουργικά, τα B1 κύτταρα αποτελούν μία γέφυρα ανάμεσα στη φυσική και την επίκτητη ανοσία, καθώς θεωρείται ότι είναι η κύρια πηγή φυσικής IgM, που την παράγουν χωρίς καμία δέσμευση αντιγόνου (Berland and Wortis, 2002). Παράλληλα συμβάλλουν στην παραγωγή IgA αντισωμάτων στο έντερο (Kroese et al., 1993). Τα B1 κύτταρα μαζί με τα MZB είναι οι κύριοι εκφραστές των θυμοανεξάρτητων αποκρίσεων, όπως αναφέρεται λεπτομερώς στην ενότητα 1.2.4

1.2.3 Τα B κύτταρα στις θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις

Οι θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις (Thymus Dependent, TD) αποτελούν έναν από τους πυλώνες της επίκτητης ανοσίας, καθώς B κύτταρα παράγουν αντισώματα υψηλής συγγένειας κατά των παθογόνων. Επίσης τα ενεργοποιημένα B κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν εκτός από πλασματοκύτταρα και σε B κύτταρα μνήμης. Στις θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις η παραγωγή αντισωμάτων εξαρτάται από

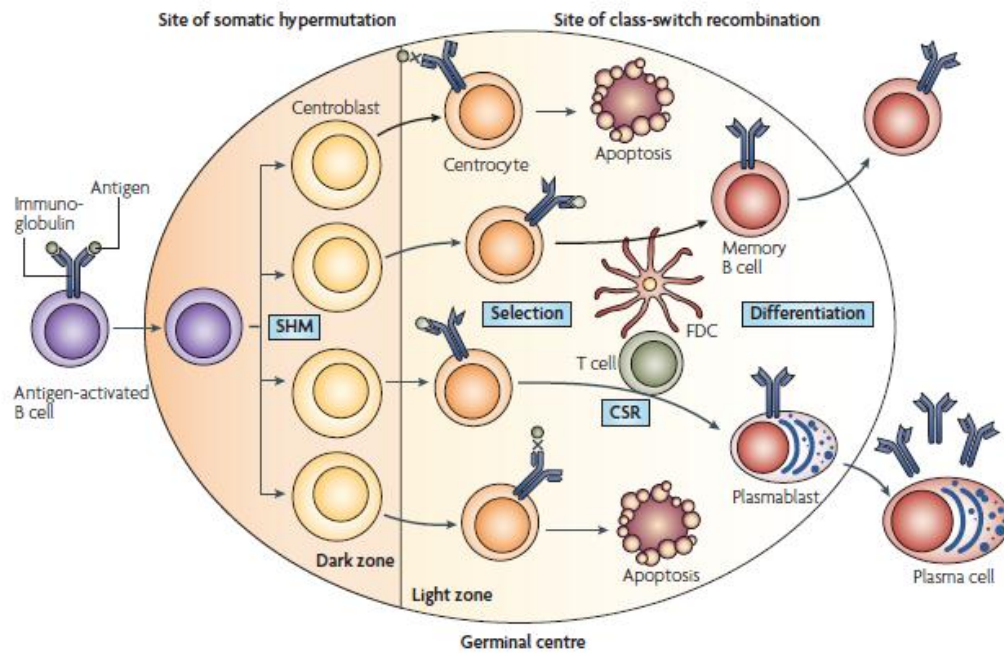
την ενεργοποίηση των B κυττάρων από τα CD4⁺ T βοηθητικά κύτταρα (Th), τα οποία αντιδρούν στο ίδιο το αντιγόνο. Τα αντιγόνα αυτά είναι κυρίως πρωτεϊνικά προερχόμενα από ιούς ή άλλα ενδοκυττάρια παθογόνα. Ο επίτοπος, που αναγνωρίζεται από το άμεσο βοηθητικό T κύτταρο, πρέπει να συνδέεται με αυτό που αναγνωρίζεται από το B κύτταρο. Τα άμεσα βοηθητικά T κύτταρα ενεργοποιούν τα B κύτταρα, όταν αναγνωρίζουν το κατάλληλο σύμπλεγμα πεπτιδίου MHC-II στην επιφάνεια των B κυττάρων. Το πιο σημαντικό μόριο στις πρώιμες φάσεις της αποκρίσεως των B κυττάρων είναι ο CD40 συνδέτης (CD40L), επειδή δεσμεύει στην επιφάνεια του B κυττάρου το CD40, που βρίσκεται στην επιφάνεια του T βοηθητικού κυττάρου. Το αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης οδηγεί τα ήρεμα B κύτταρα στον κυτταρικό κύκλο (Noelle et al., 1992). Καθώς τα B κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, δημιουργούνται διάφορες εστίες μέσα στα θυλάκια των περιφερικών λεμφικών οργάνων, που ονομάζονται βλαστικά κέντρα.

1.2.3.1 Βλαστικά Κέντρα

Τα βλαστικά κέντρα (BK) είναι οι περιοχές όπου υπάρχει έντονος B κυτταρικός πολλαπλασιασμός, σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, εναλλαγή ισοτύπων, ωρίμανση συγγένειας, απόπτωση, διαφοροποίηση πλασματοκυττάρων και παραγωγή B κυττάρων μνήμης. Στη δημιουργία των BK, τα ενεργοποιημένα θυλακιώδη βοηθητικά T κύτταρα (T_{FH}) μαζί με τη βοήθεια των θυλακιωδών δενδριτικών κυττάρων (ΘΔΚ), παρέχουν όλα τα απαραίτητα σήματα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης για τα ενεργοποιημένα B κύτταρα, έτσι ώστε να σχηματίσουν και να διατηρήσουν BK. Καθώς η θυμοεξαρτώμενη απόκριση αναπτύσσεται, τα T_{FH} και τα ΘΔΚ συνεχίζουν να παρέχουν σήματα, ώστε να ακολουθήσουν όλες οι προαναφερθείσες λειτουργίες (Cozine et al., 2005). Ανατομικά, τα BK εμπεριέχουν διαφορετικές περιοχές, σε καθεμιά από τις οποίες διαδραματίζονται διάφορες λειτουργίες (Εικόνα 1.3). Τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα B κύτταρα (κεντροβλάστες) είναι συγκεντρωμένα στην λεγόμενη “σκοτεινή ζώνη”. Καθώς αυτά τα κύτταρα ωριμάζουν, σταματούν να διαιρούνται και γίνονται μικρά κεντροκύτταρα, μετακινούμενα στην περιοχή πλούσια σε ΘΔΚ, μια περιοχή που ονομάζεται “φωτεινή ζώνη”. Παρότι τα ΘΔΚ βρίσκονται στη φωτεινή ζώνη δεν καθορίζουν απόλυτα τη θέση ανάμεσα στους κεντροβλάστες και στα κεντροκύτταρα. Η οργάνωση του BK ρυθμίζεται από τις χημειοκίνες CXCL12 και του υποδοχέα του CXCR4 και CXCL13 και του υποδοχέα του CXCR5. Πιο συγκεκριμένα, κεντροβλάστες (BrdU⁺) εκφράζουν υψηλά επίπεδα CXCR4, το

οποίο συμβαδίζει με τις υψηλές συγκεντρώσεις CXCL13 που βρίσκονται στη σκοτεινή ζώνη (Allen et al., 2004). Αναλογικά, επαφές ανάμεσα σε CXCL13 και CXCR5 οδηγούν τα κεντροκύτταρα στη φωτεινή ζώνη (Cyster et al., 2002). Όταν οι δυο αυτές ζώνες έχουν διαμορφωθεί, τότε αναπτύσσονται διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί στο μικροπεριβάλλον του ΒΚ που οδηγούν στην αλλαγή ισοτύπου, σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, ωρίμανση της συγγένειας και απόπτωση (Εικόνα 1.3).

Η φωτεινή ζώνη του ΒΚ είναι η περιοχή όπου αναπτύσσονται οι τρεις κύριες Β κυτταρικές λειτουργίες: η διαλογή των Β κυττάρων που παράγουν αντισώματα υψηλής συγγένειας, η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και η αρχική διαφοροποίηση των κεντροκυττάρων σε πλασματοκύτταρα ή κύτταρα μνήμης. Σε σύγκριση με τους κεντροβλάστες, τα κεντροκύτταρα είναι ένας ετερογενής πληθυσμός, πιθανότατα σύμφωνα με το γεγονός ότι μπορούν να επιλέξουν διάφορα μονοπάτια εξέλιξης, όπως διαφοροποίηση ξανά πίσω σε κεντροβλάστες και μετά-ΒΚ κυτταρική εξέλιξη –



Εικόνα 1.3 Το μικροπεριβάλλον του βλαστικού κέντρου (Από Klein and Dalla-Favera, 2008)

δηλαδή Β κύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα. Στις θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση στο επίπεδο του IgH γονιδίου αναδεικνύει ισχυρούς μηχανισμούς εντός του ΒΚ που διαμορφώνουν τη δημιουργία αντισωμάτων υψηλής συγγένειας (Blink et al., 2005; Shih et al., 2002). Ο κεντροβλάστης που εκφράζει μια καινούρια αντισωματική μετάλλαξη, πρέπει να ελεγχθεί για υψηλή συνδεσιμότητα

στο αντιγόνο. Αυτή η διαδικασία παίρνει μέρος στην φωτεινή ζώνη με τη συμμετοχή ειδικών κυττάρων που βρίσκονται εκεί. Η αντιγονική δέσμευση του BCR σε συνδυασμό με συν-διεγερτικά σήματα που μεταδίδονται στα B κύτταρα από τα T_{FH} συμβάλουν στην ζωτικότητα του κυττάρου, ενώ η αποτυχία του BCR να δεσμεύσει αντιγόνο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η διαφοροποίηση του BK κυττάρου σε πλασματοκύτταρα πιστεύεται ότι οδηγείται από τη δημιουργία ενός BCR υψηλής αντιγονικής συγγένειας (Phan et al., 2006). Για τα B κύτταρα μνήμης η επιλογή φέρεται να είναι στοχαστική, καθώς κατά τη διάρκεια δημιουργίας του BK, τα BK κύτταρα συνεχώς επιλέγονται στον εμπλουτισμό της δεξαμενής των B κυττάρων μνήμης (Blink et al., 2005).

Στην σκοτεινή ζώνη του BK δεσπόζουν οι κεντροβλάστες που το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού τους. Αυτό είναι αναγκαίο για τη δημιουργία (μέσα σε μικρό χρονικό πλαίσιο) μιας γκάμας διαφοροποιημένων ανοσοσφαιρινών, μετά τη διαλογή των οποίων στη φωτεινή ζώνη θα επιλεχτούν μερικοί B κυτταρικοί κλώνοι που θα παράγουν τα αντισώματα υψηλής συγγένειας. Ως επί το πλείστον οι κεντροβλάστες διαθέτουν μηχανισμούς επιβίωσης και συνάμα απόπτωσης (Klein and Dalla-Favera, 2008; MacLennan, 1994). Πιο συγκεκριμένα, οι κεντροβλάστες δεν διαθέτουν τον αντί-αποπτωτικό παράγοντα Bcl-2 (Martinez-Valdez et al., 1996), που επιτρέπει την εκτέλεση σημάτων κυτταρικού θανάτου μετά από απόρριψη.

1.2.3.2 Η εναλλαγή ισοτύπου

Η εναλλαγή ισοτύπου είναι η διεργασία κατά την οποία ένα ενεργοποιημένο B κύτταρο αλλάζει τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών επιτρέποντας έτσι την διεύρυνση του εύρους της χημικής ανοσίας ενάντια στα εξωγενή παθογόνα. Εμπεριέχει την αντικατάσταση της μ σταθερής περιοχής με τις προς τα κάτω σταθερές περιοχές γ, α ή ε. Αυτό επιτρέπει στα διαφοροποιημένα B κύτταρα να δημιουργούν καινούργιες βαριές αλυσίδες και κατά συνέπεια καινούρια μόρια αντισωμάτων με την ίδια αντιγονοειδικότητα. Η εναλλαγή ισοτύπου χρειάζεται την έκφραση του ενζύμου απαμινάση της κυτιδίνης [activation-induced cytidine deaminase, AID]. Διαφορετικές περιοχές της συγκεκριμένης πρωτεΐνης φέρεται να είναι απαραίτητες για την αλλαγή ισοτύπου ή την σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (Barreto et al., 2003; Okazaki et al., 2002). Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα CD40 με το συνδέτη CD40L είναι απαραίτητη ώστε να πραγματοποιηθεί η εναλλαγή ισοτύπου.

Επιπλέον οι κυτταροκίνες που παράγονται από βοηθητικά T κύτταρα καθορίζουν τον ισότυπο του B κυττάρου. Διαφορετικές κυτταροκίνες ενεργοποιούν διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι με τη σειρά τους προσδένονται σε διαφορετικούς υποκινητές. Για παράδειγμα, η ιντερλευκίνη 4 ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Stat6 ο οποίος προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων $\gamma 1$ και ϵ με αποτέλεσμα την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών IgG1 και IgE. Τρεις με τέσσερις μέρες μετά την ανοσοποίηση, η αλλαγή ισότυπου μπορεί να εντοπιστεί μέσα αλλά και έξω από τα θυλάκια (MacLennan et al., 2003; Toellner et al., 1996). Συνεπώς η εναλλαγή ισότυπου δεν χρειάζεται αποκλειστικά το περιβάλλον του BK.

1.2.3.3 Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση

Αντίθετα με την αλλαγή ισότυπου, η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (SYM) λαμβάνει χώρα κυρίως μέσα στο BK. Η διεργασία της SYM οδηγεί σε σημειακές μεταλλάξεις στις V περιοχές της ελαφριάς αλυσίδας (IgV) και έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή των θέσεων στις οποίες συνδέεται το αντιγόνο. Κατά την ανοσοποίηση η SYM δρα κυρίως κατά την 2^η-3^η εβδομάδα (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1992; McHeyzer-Williams et al., 1993). Η SYM συσχετίζεται με διασπάσεις στην DNA αλυσίδα και επομένως χρειάζεται την δράση του ενζύμου AID το οποίο δρα σε μονοκλωνικό DNA μετατρέποντας την κυτιδίνη σε ουρακίλη (Bross et al., 2000; Papavasiliou and Schatz, 2002). Στα BK η SYM περιορίζεται στους κεντροβλάστες της σκοτεινής ζώνης και αντανακλάται από την έκφραση του AID σε αυτούς (Cattoretti et al., 2006; Pasqualucci et al., 2004). Μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι πρωτεΐνες E (Sayegh et al., 2003) και η PAX5 (Gonda et al., 2003) φαίνεται να ρυθμίζουν την καταλυτική δράση του AID.

1.2.3.4 Η ωρίμανση της συγγένειας

Ένα από τα ειδικά χαρακτηριστικά του λεμφικού ιστού είναι η βαθμιαία αύξηση της συγγένειας των αντισωμάτων για το αντιγόνο που επάγει την πορεία της ανοσοαπόκρισης. Έτσι λοιπόν το φαινόμενο της ωρίμανσης της συγγένειας είναι συνέπεια της SYM των γονιδίων της ανοσοσφαιρίνης που ακολουθείται από επιλογή B κυττάρων με την υψηλής-συγγένειας επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη. Αυτό εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων B κυττάρων με κύτταρα από το μικροπεριβάλλον του BK όπως τα ΘΔΚ και τα T_{FH} (Vinuesa et al., 2005). Μερικά από αυτά τα επιλεγμένα B κύτταρα μεταναστεύουν στο μυελό των οστών

διαφοροποιημένα πια σαν πλασματοκύτταρα μνήμης. Τα κύτταρα αυτά τα χαρακτηρίζονται ως $IgM^+IgG1^+CD38^-$ όπου κυριαρχεί η αλλαγή ισοτύπου σε $IgG1$. Έχει δειχθεί όμως ότι η αλλαγή ισοτύπου δεν είναι απολύτως απαραίτητη για την καθιέρωση των B κυττάρων μνήμης (Gray, 1993; Klein et al., 1998). Η πλειοψηφία της διαδικασίας της ωρίμανσης της συγγένειας αρχίζει βαθμιαία κατά τις 3 πρώτες εβδομάδες και παρατηρείται γύρω στις 30 ημέρες μετά την πρωτογενή ανοσοποίηση (Davie and Paul, 1972). Παρότι τα BK είναι η κύρια περιοχή για την ωρίμανση της συγγένειας, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν και άλλες περιοχές όπου το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί (Takahashi et al., 1998).

1.2.4 Τα B κύτταρα στις θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις

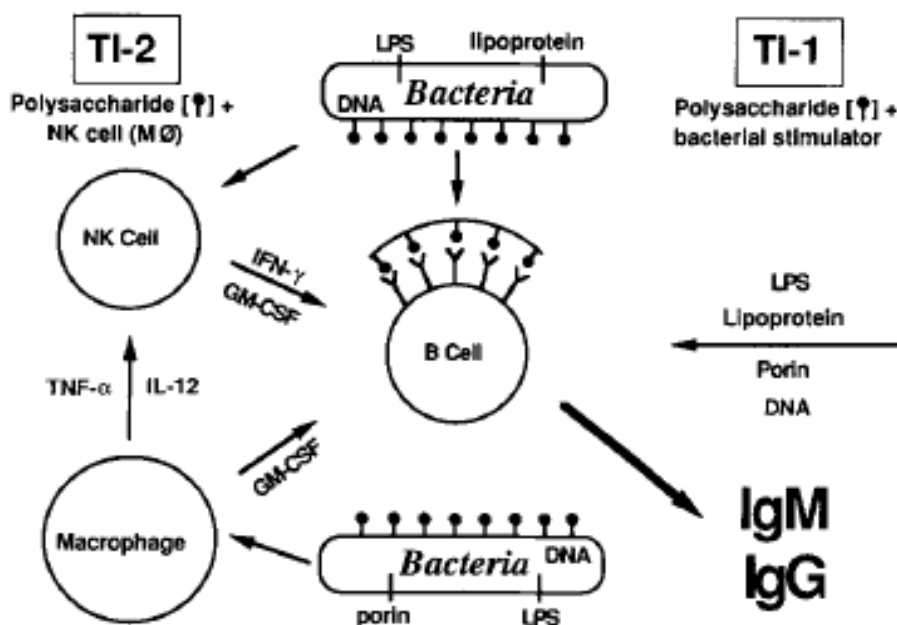
Πολλά συστατικά μικροβίων όπως οι βακτηριακοί, ιοικοί και μυκητιακοί πολυσακχαρίτες, μπορούν άμεσα να διεγείρουν τα B κύτταρα και να παράγουν αντισώματα απουσία της T κυτταρικής βοήθειας. Αυτά τα αντιγόνα ονομάζονται θυμοανεξάρτητα [Thymus Independent, (TI)] με κύρια χαρακτηριστικά τους την επαγωγή ανοσοαποκρίσεων χωρίς την επιστράτευση των T βοηθητικών κυττάρων.

Το θυμοανεξάρτητο μονοπάτι έκκρισης ανοσοσφαιρινών φαίνεται ότι είναι πιο απλοποιημένο συγκριτικά με το θυμοεξαρτώμενο και ως εκ τούτου παρέχει πιο άμεσες ανοσοαποκρίσεις. Η πλειονότητα των θυμοανεξάρτητων αντιγόνων είναι μεγάλα πολυσθενή μόρια και έχουν μακρά ημιζωή όταν χορηγούνται *in vivo* (Humphrey, 1981). Η πολυσθενικότητα αυτών των αντιγόνων τους δίνει τη δυνατότητα να επάγουν πολλαπλά δομικά τμήματα στενά συνδεδεμένων μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών που με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των B κυττάρων (Brunswick et al., 1988; Dintzis et al., 1989). Επιπρόσθετα, απαιτούνται χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου προκειμένου να επιτευχθεί το απαραίτητο επίπεδο του κατωφλίου ενεργοποίησης για να επαχθεί η ενεργοποίηση των B κυττάρων (Brunswick et al., 1988).

Τα θυμοανεξάρτητα αντιγόνα υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες με βάση τον τρόπο με τον οποίο επάγουν την ενεργοποίηση των B κυττάρων. Τα θυμοανεξάρτητα αντιγόνα τύπου 1 (TI-1) όπως ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης [lipopolysaccharide, (LPS)] μπορούν αμέσως να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να επάγουν μια πολυκλωνική, μη ειδική ως προς το αντιγόνο απόκριση των B κυττάρων τόσο στα νεογνά όσο και σε ενήλικα άτομα που στερούνται της λειτουργικής κινάσης τυροσίνης Bruton [Bruton's

tyrosine kinase (Btk)] (Mond et al., 1978). Σε αντίθεση με τα TI-1 ομόλογα τους, τα TI-2 αντιγόνα είναι βακτηριακοί πολυσακχαρίτες οι οποίοι απαρτίζονται από πολλαπλούς επαναλαμβανόμενους αντιγονικούς επίτοπους που μπορούν να προκαλούν εκτεταμένη σύνδεση των αντιγόνων με τους υποδοχείς. Έχουν μειωμένη ικανότητα να επάγουν ανοσοαποκρίσεις σε νεογνά και σε ξενιστές με συγγενή ή επαγόμενα ελαττώματα στην έκφραση της Btk (Khan et al., 1995; Mosier et al., 1977; Thomas et al., 1993). Αν και τα TI αντιγόνα δεν απαιτούν τη συνδρομή των T κυττάρων προκειμένου να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση στην περίπτωση των TI-2 αντιγόνων, ένα δεύτερο σήμα είναι απαραίτητο προκειμένου να επαχθεί η έκκριση αντισωμάτων από B κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από σύνδεση πολυσθενών μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών (Mond et al., 1995a; Mond et al., 1995b). Αυτό το σήμα μπορεί να παρέχεται από την δέσμευση υποδοχέων που μοιάζουν με τους Toll και να προκύπτει από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς.

Έχει δειχθεί ότι ο LPS επίσης συμμετέχει σε *in vivo* TI-2 αποκρίσεις ενισχύοντας σε συνέργεια με αδ-dextran (ένα *in vitro* ανεπτυγμένο TI-2 αντιγόνο), την επαγωγή της έκκρισης IgM σε μια διαδικασία που εξαρτάται από τον υποδοχέα TLR4 (Khan et al., 1995). Υψηλός βαθμός πολυπλοκότητας διέπει τους μηχανισμούς που διαμορφώνουν τις TI-2 αποκρίσεις. Έχει δειχθεί ότι το σύμπλοκο CD19/CD21 στην MZ των B κυττάρων εμπλέκεται άμεσα σε βοηθητικά σήματα που μεταδίδονται από TI-2 αντιγόνα (Tedder et al., 1997). Εκτός από τα B κύτταρα της MZ, άλλα συστατικά που τοποθετούνται στην MZ του σπλήνα, όπως για παράδειγμα τα μακροφάγα της οριακής ζώνης, εμπλέκονται στην TI-2 χυμική απόκριση (van den Eertwegh et al., 1992). Παράλληλα, τα συμβατικά T κυτταρικού υποδοχέα [T cell Receptor, TCR] αβ T κύτταρα, TCRγδ T κύτταρα, και τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες (Natural Killer cells) εμπλέκονται στην τροποποίηση των TI-2 αποκρίσεων παρέχοντας επιπρόσθετα σήματα που οδηγούνται από κυτοκίνες (Snapper and Mond, 1996; Vos et al., 2000). Οι μηχανισμοί που διέπουν την TI-2 καθώς και την TI-1 απόκριση απεικονίζονται στην εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4 Μοντέλο για την επαγωγή της Τ1 ανοσίας (προσαρμοσμένο από τους Snapper and Mond, 1996) (Βλέπε κείμενο για επεξήγηση)

1.2.5 Τελική Β κυτταρική διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα

Τα πλασματοκύτταρα είναι τελικά διαφοροποιημένα, μη διαιρούμενα εκτελεστικά κύτταρα τα οποία παράγουν αντισώματα σε μία ανοσοαπόκριση. Προκειμένου ένα Β κύτταρο να φτάσει σε αυτό το στάδιο πολυάριθμοι μηχανισμοί υπόκεινται σε στενή ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην τελική διαφοροποίηση των Β κυττάρων. Η τελική διαφοροποίηση των Β κυττάρων προς πλασματοκύτταρα είναι ειδική για κάθε υποκατηγορία Β κυττάρων (Εικόνα 1.5). Μετά τη συνάντηση με το αντιγόνο, τα πλασματοκύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν από τα ΜΖΒ και τα ΦΟΒ, από ενεργοποιημένα ΒΚ Β κύτταρα και από Β κύτταρα μνήμης. Ποιά υποκατηγορία Β κυττάρων θα γίνει τελικά διαφοροποιημένο κύτταρο που εκκρίνει αντίσωμα εξαρτάται από τη φύση του κυττάρου, τη δόση και τη μορφή του αντιγόνου και επίσης από τη θέση της συνάντησης με το αντιγόνο.

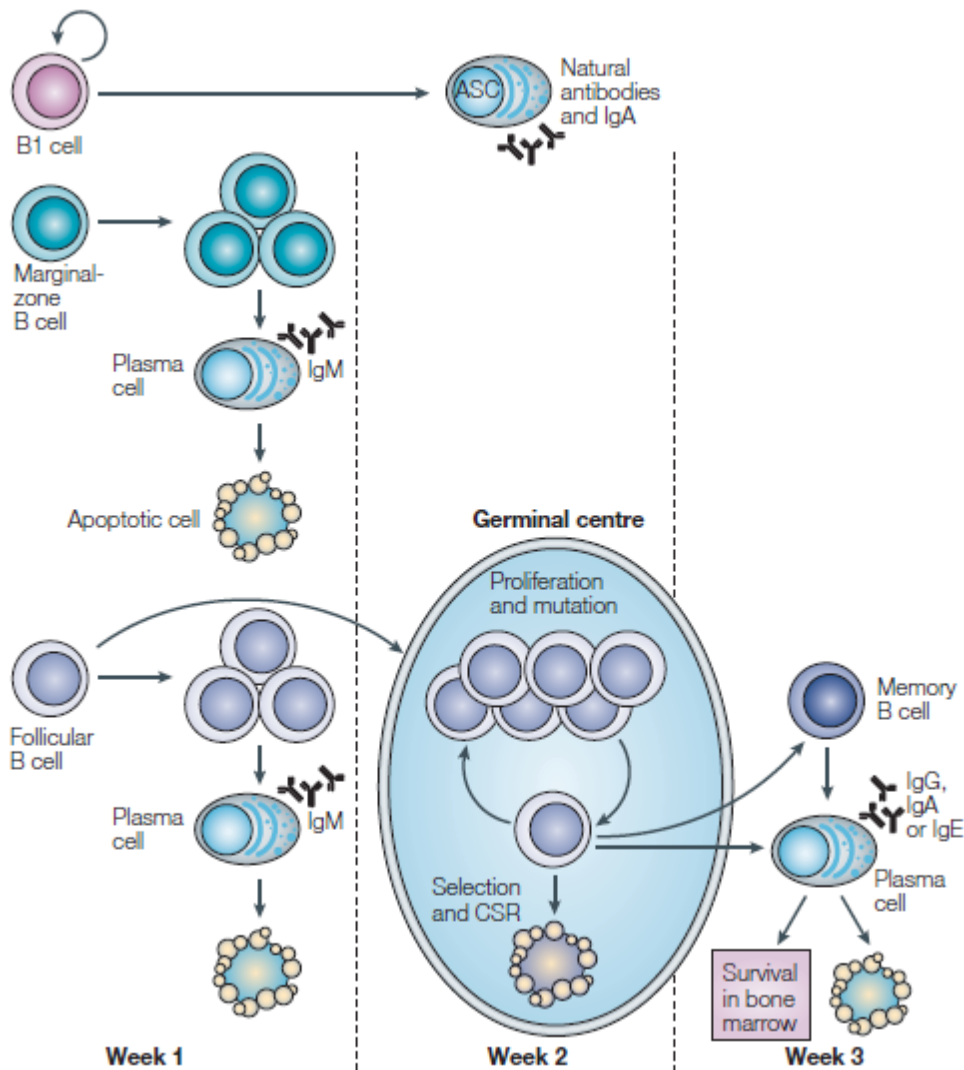
Η πλέον πρόωμη απόκριση αντισώματος σε ορισμένα παθογόνα παρέχεται από προϋπάρχοντα φυσικά αντισώματα και την IgA που εκκρίνονται από τα Β1 κύτταρα. Τα πρώτα Β κύτταρα που ανταποκρίνονται σε ένα ξένο αντιγόνο και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα είναι τα ΜΖΒ κύτταρα. Όπως προαναφέρθηκε, τα ΜΖΒ διαθέτουν ένα ρεπερτόριο που «προσανατολίζεται» προς τα ΤΙ-2 αντιγόνα, αν και μερικά από αυτά τα κύτταρα αναγνωρίζουν επίσης και τα ΤΙ-1

αντιγόνα και ως εκ τούτου παρουσιάζουν το αντιγόνο και παρέχουν συνδιέγερση στα T κύτταρα (Pillai et al., 2005). Μια κρίσιμη ιδιότητα των MZB αποτελεί η εγγενής τους ικανότητα να ανταποκρίνονται γρήγορα στο αντιγόνο. Διαθέτουν ένα χαμηλότερο κατώφλι για ενεργοποίηση από το αντιγόνο σε σύγκριση με τα FOB κύτταρα και όταν διεγείρονται με LPS και αντί-IgM, πολλαπλασιάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό (Oliver et al., 1997).

Τα ώριμα κυκλοφορούντα FOB τα οποία συναντούν αντιγόνο και λαμβάνουν βοήθεια από τα T κύτταρα επίσης αποκρίνονται γρήγορα (αν και πιο αργά σε σύγκριση με τα MZB), υφίστανται πολλαπλασιασμό και πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση προκειμένου να σχηματίσουν εξωθυλιακά κέντρα εστίασης πλασμαβλαστών και πλασματοκυττάρων (Cozine et al., 2005). Δύο ημέρες μετά από την ανοσοποίηση με ένα TD αντιγόνο, κέντρα εστίασης παρατηρούνται κατά μήκος των περιαρτηριολικών λεμφικών έλυτρων (Jacob et al., 1991). Τα πλασματοκύτταρα τα οποία σχηματίζονται είτε από τα MZBs ή από τα FOBs σε αυτή την πρώιμη εξωθυλιακή απόκριση δε διαθέτουν ΣΥΜ γονίδια και έχουν μικρή διάρκεια ζωής, υφιστάμενα απόπτωση *in situ* (Smith et al., 1996).

Πριν την διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, τα ενεργοποιημένα B κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχέως. Όταν ο πολλαπλασιασμός σταματά, σχηματίζονται μη διαιρούμενα πλασματοκύτταρα. Τα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης τα οποία διέπουν τα ενεργοποιημένα από αντιγόνο B κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα διαφέρουν αξιοσημείωτα ανάμεσα σε αυτά τα δύο στάδια. Διαφορετικοί συνδυασμοί μεταγραφικών ρυθμιστών απαιτούνται προκειμένου να διατηρήσουν τα ειδικά προγράμματα για αυτά τα B κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα. Τα πιο σημαντικά περιγράφονται στη συνέχεια.

Η Paired box protein 5 (PAX5) απαιτείται για την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση της ταυτότητας των B κυττάρων μέχρι το στάδιο των πλασματοκυττάρων (Nutt et al., 2001). Ωστόσο, η μεταγραφή του *rax5* πρέπει να κατασταλεί για να επιτραπεί η διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων (Lin et al., 2002). Η PAX5 ενεργοποιεί γονίδια στόχους τα οποία είναι σημαντικά για τα B λεμφοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των Iga και CD19 (Horcher et al., 2001). Η ενεργοποίηση της AID από την PAX5 και την Id2 [Inhibitor of differentiation 2, αναστολέας της διαφοροποίησης] είναι σημαντική στα B κύτταρα των βλαστικών κέντρων (Gonda et al., 2003).



Εικόνα 1.5 Σχηματισμός των πλασματοκυττάρων

Τα πλασματοκύτταρα που σχηματίζονται από B1 κύτταρα εκκρίνουν φυσικό αντίσωμα απουσία εξωγενούς αντιγόνου και επίσης IgA στο έντερο, σε απόκριση σε παθογόνα.

Τα αφελή MZB κύτταρα καθώς συναντούν το εξωγενές αντιγόνο (εβδομάδα 1), διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα. Τα περισσότερα από τα εξωθλακιδώδη πλασματοκύτταρα που σχηματίζονται σε αυτή την πρώιμη απόκριση έχουν μικρή διάρκεια ζωής.

Ορισμένα ενεργοποιημένα FOB κύτταρα σχηματίζουν βλαστικό κέντρο. Τα πλασματοκύτταρα που είναι τελικό προϊόν προερχόμενο από τα FOB ενδέχεται να διέρχονται από ένα στάδιο B κυττάρων μνήμης κατά τη διάρκεια της αρχικής απόκρισης ή μπορεί να αναπτύσσονται άμεσα από B κύτταρα βλαστικών κέντρων. Τα πλασματοκύτταρα που προκύπτουν από μια αντίδραση στο βλαστικό κέντρο ενδέχεται να ζήσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα εάν βρουν θέσεις επιβίωσης (survival niches), οι οποίες εδράζονται κυρίως στο μυελό των οστών. (Από Shapiro-Shelef and Calame, 2005)

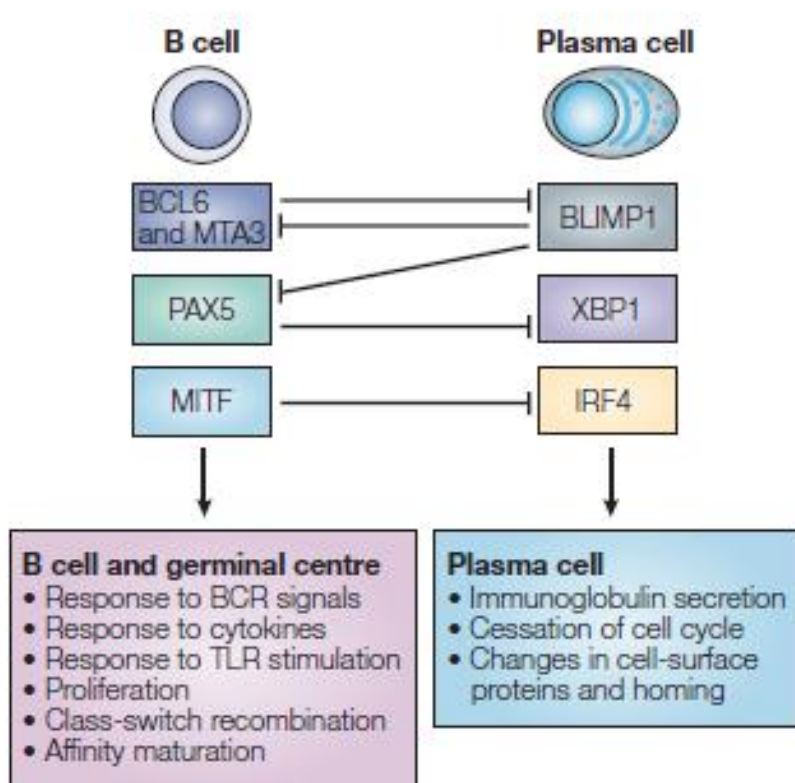
Ο MITF [Microphthalmia Induced Transcription Factor, επαγόμενος παράγοντας της μικροφθalmίας] που εκφράζεται από B ηρεμούντα κύτταρα επίσης αναστέλλει την ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση των ώριμων B κυττάρων σε ήρεμη κατάσταση. Η απουσία του MITF

επάγει την έκφραση της BLIMP1 [επαγόμενη πρωτεΐνη ωρίμανσης 1 των B λεμφοκυττάρων, B lymphocyte induced maturation protein 1] με αποτέλεσμα τα πλασματοκύτταρα να σχηματίζονται αυθόρμητα (Lin et al., 2004). Αυτή η δράση βασίζεται στην καταστολή της έκφρασης του IRF4 [interferon regulatory factor 4, ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης 4]. Η έκφραση του IRF4 επάγεται από την απουσία του MITF και μείωση της έκφρασης του IRF4 σταματά την αυθόρμητη ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων. Η πρωτεΐνη του λεμφώματος των B κυττάρων BCL-6 (B cell-lymphoma) είναι παρούσα σε υψηλά επίπεδα στα BK B κύτταρα και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των BK (Cattoretti et al., 1995; Shaffer et al., 2000). Μια κρίσιμη λειτουργία της BCL-6 είναι να καταστέλλει την έκφραση της BLIMP1, επιτρέποντας έτσι την αντίδραση στα BK να συνεχιστεί για ένα επαρκές χρονικό διάστημα πριν να συμβεί η διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων. Τα *Bcl6*^{-/-} ποντίκια παράγουν περισσότερα πλασματοκύτταρα σε TD ανοσοαποκρίσεις σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου, και τα *Bcl6*^{-/-} B κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με LPS εκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα ανοσοσφαιρινών σε σύγκριση με τα B κύτταρα ελέγχου (Tunyanlin et al., 2004).

Ο μεταγραφικός καταστολέας BLIMP1 είναι επαρκής, όταν εκφράζεται εκτοπικά από B κύτταρα στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο προκειμένου να οδηγήσει την διαφοροποίηση τους σε πλασματοκύτταρα (Turner et al., 1994). Η BLIMP1 εκφράζεται από τα πλασματοκύτταρα του σπλήνα και του μυελού των οστών και απαιτείται για το σχηματισμό των πλασματοκυττάρων και την έκκριση ανοσοσφαιρινών (Shapiro-Shelef et al., 2003). Η BLIMP1 οδηγεί στην έναρξη καταρρακτών γονιδιακής ρύθμισης οδηγώντας στην παύση του κυτταρικού κύκλου, την καταστολή γονιδίων που απαιτούνται για την ταυτότητα των ώριμων και των B κυττάρων των βλαστικών κέντρων καθώς και για την επαγωγή του εκκριτικού προγράμματος των ανοσοσφαιρινών (Lin et al., 1997; Shaffer et al., 2002; Shaffer et al., 2004). Η BLIMP1 καταστέλλει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που απαιτούνται για τις αντιδράσεις των BK – BCL-6 and PAX5- διασφαλίζοντας έτσι ότι αφού επαχθεί η ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων, τα B κύτταρα δε μπορούν να επιστρέψουν σε ένα πιο πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Η BLIMP1 είναι επίσης υπεύθυνη για την επαγωγή της έκφρασης πολλών γονιδίων στο πρόγραμμα των πλασματοκυττάρων, όπως είναι ο IRF4 και γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην έκκριση ανοσοσφαιρινών (Shaffer et al., 2004). Ο XBP1 αποτέλεσε τον πρώτο μεταγραφικό παράγοντα που ήταν απαραίτητος μοναδικά για τη διαφοροποίηση των

πλασματοκυττάρων (Reimold et al., 2001). Ο XBP1 δρα καταρροϊκά του BLIMP1 και φαίνεται να αποτελεί τον εγγύτερο ρυθμιστή του εκκριτικού φαινοτύπου των πλασματοκυττάρων.

Ο IRF4 είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής που φαίνεται ότι δρα νωρίς κατά την ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων επειδή, επιπρόσθετα από το γεγονός ότι απαιτείται για το σχηματισμό των πλασματοκυττάρων, χρειάζεται και για την έναρξη πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων B κυττάρων (Mitttrucker et al., 1997). Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας ωστόσο, ο IRF4 θα μπορούσε να εμπλέκεται στην «εξουσιοδότηση» ενός B κυττάρου για να αναπτυχθεί σε πλασματοκύτταρο επάγοντας τον πολλαπλασιασμό που χρειάζεται για την τελική διαφοροποίηση. Ένα τέτοιο μοντέλο είναι ιδιαίτερα θελκτικό, καθώς απώλεια του MITF οδηγεί σε αυθόρμητο σχηματισμό των πλασματοκυττάρων και επαγωγή της έκφρασης του IRF4 (Lin et al., 2004). Οι λειτουργίες των παραπάνω γονιδίων στην τελική διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, αλλά και οι σχέσεις μεταξύ τους συνοψίζονται στην Εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6 Η μεταγραφική καταστολή επιβάλλει αμοιβαία αποκλειόμενα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης στα B κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα (Από Shapiro-Shelef and Calame, 2005)

1.3 Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ) είναι μοναδικά ανάμεσα σε όλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ) στο ανοσοποιητικό σύστημα του ενήλικα. Σε αντίθεση με τα μακροφάγα, η πρωταρχική λειτουργία των ΔΚ φαίνεται ότι αποτελεί η αντιγονοπαρουσίαση, αποτελώντας έτσι τους εκκινητές των αποκρίσεων των Τ κυττάρων έναντι σε μικροβιακά παθογόνα και όγκους χάρη στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν «αφελή» Τ κύτταρα (Cella et al., 1997). Παρομοίως με τα μακροφάγα, τα ΔΚ διαφοροποιούνται από πρόδρομα κύτταρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία και προέρχονται από το μυελό των οστών και ολοκληρώνουν τη διαφοροποίησή τους καθώς εγκαταλείπουν την κυκλοφορία του αίματος και εγκαθίστανται στους ιστούς της περιφέρειας. Σχεδόν όλοι οι ιστοί περιέχουν ΔΚ, τα οποία συσσωρεύονται σε διακριτές περιοχές σε όργανα των λεμφοειδών ιστών. Τα ΔΚ εμπλουτίζονται σε περιοχές όπου αφελή Τ κύτταρα ενεργοποιούνται, σε μια αναζήτηση της βέλτιστης θέσης από ένα διαρκώς κινούμενο πλήθος Τ κυττάρων που αναζητούν τα συγγενή τους προ-σύμπλοκα μείζονος ιστοσυμβατότητας (pMHC) (Itano and Jenkins, 2003; von Andrian and Mempel, 2003). Τα ΔΚ έχουν μοναδικές ικανότητες επιτήρησης και μετανάστευσης (Randolph, 2001) που τους επιτρέπουν να μεταφέρουν αντιγόνα που έχουν αιχμαλωτιστεί στην περιφέρεια σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, ή να τα εσωτερικεύουν άμεσα από τη λέμφο (Itano et al., 2003). Αυτό συμπεριλαμβάνει τη δειγματοληψία των συμβιωτικών βακτηρίων, που πέπτονται και καταστρέφονται γρήγορα από τα μακροφάγα, αλλά μεταφέρονται από τα ΔΚ στους λεμφαδένες όπου επάγουν τις IgA αποκρίσεις (Macpherson and Uhr, 2004). Παρομοίως, τα αποπτωτικά κύτταρα που συμπεριλαμβάνονται στα μεταναστευτικά ΔΚ μπορούν να γίνουν ορατά στα προσαγωγά λεμφικά αγγεία του εντέρου καθοδόν προς τους λεμφαδένες (Huang et al., 2000), πιθανότατα προκειμένου να βοηθήσουν στη διατήρηση της ανοχής ως προς τον εαυτό (Steinman et al., 2003).

Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο σύστημα του ποντικού έχουν ταυτοποιήσει δύο υποκατηγορίες ΔΚ, τα λεμφοειδή και τα μυελοειδή ΔΚ με βάση την έκφραση των λεμφοειδών και μυελοειδών δεικτών CD8 and CD11b (Mac1) (Vremec and Shortman, 1997; Wu et al., 1996). Αν και διαφορετικές υποκατηγορίες ΔΚ εμφανίζουν συγκεκριμένα λειτουργικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, μοιράζονται ένα χαρακτηριστικό φαινοτυπικό προφίλ: στον ποντικό, τα ΔΚ θεωρούνται ότι είναι MHC-II⁺, CD11c⁺, CD86⁺, CD40⁺, HSA⁺, CD3⁻, CD4⁻, B220⁻,

Ig γ , Gr1 γ (Ardavin, 1997). Επιπρόσθετα, η διαφορετική έκφραση άλλων μορίων κυτταρικής επιφάνειας, όπως είναι το CD8, CD11b, DEC-205 and LFA-1, επιτρέπουν τον ορισμό των υποπληθυσμών των ΔΚ στον θύμο, τον σπλήνα, τους λεμφαδένες και το δέρμα στους C57/B16 ποντικούς (Anjuere et al., 1999).

Η κύρια λειτουργία των ΔΚ είναι η παρουσία του αντιγόνου μέσω των MHC μορίων ενεργοποιώντας έτσι τα T κύτταρα. Ειδικότερα, η έκφραση των MHC-II αρκεί για να δοθεί το έναυσμα για τις αποκρίσεις που μεσολαβούνται από τα CD4 T κύτταρα (Lemos et al., 2004; Lemos et al., 2003). Η υπεροχή των ΔΚ να διαδραματίζουν ηγετικό ρόλο στην έναρξη των ανοσοαποκρίσεων είναι πιθανό να αντανακλά ένα συνδυασμό βασικών χαρακτηριστικών της βιολογίας των ΔΚ: μια μεγαλύτερη ενδογενή ικανότητα για αντιγονοπαρουσίαση και την ικανότητα να συσσωρεύονται σε περιοχές των T κυττάρων των λεμφοειδών οργάνων. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των ΔΚ, επιπρόσθετα της ικανότητάς τους να δεσμεύουν το αντιγόνο, να το επεξεργάζονται και να το παρουσιάζουν, αποτελεί η παρουσία συνδιεγερτικών μορίων όπως είναι η οικογένεια B7 (CD80, CD86), η οικογένεια του TNF (CD40) και ενδοκυτταρικών μορίων προσκόλλησης. Αυτά τα μόρια είναι κρίσιμα για την κατάλληλη μετανάστευση των ΔΚ, τόσο πριν όσο και μετά τη δέσμευση του αντιγόνου, όπως και για την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων από τα ΔΚ στις T-κυτταρικές περιοχές στα περιφερικά λεμφικά όργανα συμβάλλει στην B-T κυτταρική αλληλεπίδραση η οποία είναι απαραίτητη για τις B κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις (Wolniak et al., 2004).

Έχει δειχθεί *in vitro* ότι τα ΔΚ μετά από πρόσδεση του CD40 προάγουν την έκκριση των ανοσοσφαιρινών IgG και IgA σε B κύτταρα μνήμης. Επιπλέον αφελή B κύτταρα παρουσία ΔΚ παράγουν μεγάλα ποσά της IgM ως απόκριση στην IL-2, γεγονός ενδεικτικό άμεσης επίδρασης των ΔΚ στην κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση των B κυττάρων (Dubois et al., 1997). Μαζί με τα θυλιακά δενδριτικά κύτταρα, τα ΔΚ επίσης εκφράζουν τον CD38L. Παρόμοια με το αντί-CD40, και την αντί-MHC ενεργοποίηση των ΔΚ, το αντί-CD38 μπορεί επίσης να παρέχει σήματα ωρίμανσης στα ΔΚ *in vitro*. Δέσμευση του CD38 *in vivo* και ταυτόχρονη χορήγηση αντιγόνου οδήγησε σε μειωμένες αποκρίσεις της IgG2a υπονοώντας ότι τα B και T κύτταρα που εκφράζουν CD38 μπορούν να τροποποιούν τους ισοτύπους των αντισωμάτων που παράγονται μέσω της αλληλεπίδρασης με τον CD38L στα ΔΚ (Wykes et al., 2004).

Τα ΔΚ είναι δύσκολο να απομονωθούν σε μεγάλους αριθμούς από τους λεμφοειδείς ιστούς. Ως εκ τούτου, η πλειοψηφία των ανοσολογικών δοκιμασιών που σχετίζονται με τα ΔΚ γίνονται με χρήση ΔΚ που έχουν διαφοροποιηθεί και επεκταθεί *in vitro*, ακολουθώντας μια ποικιλία πρωτοκόλλων που διαφοροποιούνται ως προς τον πρόδρομο κυτταρικό τύπο των ΔΚ, αλλά και το συνδυασμό κυτοκινών που χρησιμοποιούν (Caux et al., 1997). Τα ΔΚ μπορούν να παραχθούν καλλιεργώντας $CD34^+$ κύτταρα παρουσία ποικίλων κυτοκινών. Μια προσέγγιση αποτελεί η αρνητική επιλογή των $CD34^+$ κυττάρων από διαφοροποιημένα πρόδρομα κύτταρα και ακολούθως η καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία του GM-CSF και της IL-4. Τα $CD34^+$ κύτταρα μπορούν να αποκτηθούν από το μυελό των οστών, το αίμα του ομφάλιου λώρου ή από M-CSF συλλεγμένο περιφερικό αίμα (Syme and Gluck, 2001).

1.4 Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (BMPs)

Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες [Bone morphogenetic proteins (BMPs)] περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα εξελικτικά συντηρημένων, εκκρινόμενων σηματοδοτικών μορίων που ανήκουν στην υπεροικογένεια του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-βήτα (Transforming Growth Factor- β) TGF- β s. Εκτός από τις BMPs και τα TGF- β s, η υπεροικογένεια του TGF- β επίσης περιλαμβάνει τις ακτιβίνες/ πρωτεΐνες αναστολής (activins/inhibins), τη Nodal και τη μυοστατίνη (myostatin). Οι BMPs αρχικά ανακαλύφθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως μια ενεργότητα που επάγει το σχηματισμό οστών στο οστικό στρώμα το 1965 (Urist, 1965). Ωστόσο σε αντίθεση με αυτό που το όνομα τους υπονοεί, η λειτουργία των BMP δεν περιορίζεται στο σκελετό. Πρόσφατες μελέτες σε πολυάριθμους οργανισμούς έχουν αποκαλύψει πολλαπλούς ρόλους για τις BMPs κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όπου εμπλέκονται στον σχηματισμό του προτύπου των εβρυϊκών αξόνων, τη γαστριδίωση, την επαγωγή ιστών και τη διαφοροποίηση (Kishigami and Mishina, 2005).

Περισσότερες από είκοσι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις BMP έχουν ταυτοποιηθεί, και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε πολυάριθμες υποομάδες με βάση τις δομές και λειτουργίες τους (Kawabata et al., 1998). Οι BMP2, BMP4, και η *Drosophila decapentaplegic* (dpp) σχηματίζουν μία υποομάδα (την υποομάδα BMP2/4). Οι πρωτεΐνες BMP5, BMP6, BMP7 (που επίσης ονομάζεται οστεογόνος

πρωτεΐνη osteogenic protein OP1), BMP8 (OP2) και το προϊόν του γονιδίου *gbb60A* στη *Drosophila* σχηματίζουν μία άλλη υποομάδα (την υποομάδα OP1). Ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης Growth differentiation factor-5 (GDF5, που ονομάζεται επίσης μορφογεννητική πρωτεΐνη 1 που προέρχεται από τον χόνδρο), CDMP1, GDF6 (CDMP2 or BMP13), και GDF7 (BMP12) σχηματίζουν μια τρίτη ομάδα (την ομάδα GDF5). Τα μέλη της οικογένειας των BMP έχουν μεταξύ τους διακριτά πρότυπα έκφρασης. Επιπρόσθετα, οι βιολογικές δράσεις των BMPs δεν είναι πανομοιότυπες ανάμεσα στα μέλη, καθώς προσδένονται στους υποδοχείς τους με διαφορετικές συγγένειες. Η δράση των BMP ενδοκυτταρικά επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού Smad, αν και έχουν ταυτοποιηθεί πολλά ανεξάρτητα του Smad σηματοδοτικά μονοπάτια. Η μετατόπιση του Smad στον πυρήνα ενεργοποιεί πληθώρα στόχων που με τη σειρά τους ρυθμίζουν πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες. Η ενεργότητα των BMP επίσης ρυθμίζεται στενά στον εξωκυττάριο χώρο μέσω μιας ποικιλίας τροποποιητικών μορίων των BMP, που αποκαλούνται αγωνιστές ή ανταγωνιστές, οι οποίοι ελέγχουν την ισχύ του σήματος των BMP.

1.4.1 BMP υποδοχείς

Δύο τύποι διαμεμβρανικών υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης απαιτούνται για την ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος μέσω των BMPs. Ο επίτοπος του καρπού [wrist] των BMPs αποτελεί μια υψηλής συγγένειας θέση πρόσδεσης για τους υποδοχείς τύπου I, ενώ ο επίτοπος του δαχτύλου [knuckle] αποτελεί μία χαμηλή θέση πρόσδεσης για τους υποδοχείς τύπου II. Αυτοί οι δύο επίτοποι συνδέονται στενά μεταξύ τους και διευκολύνουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στους υποδοχείς τύπου I και II. Έξι διαφορετικοί υποδοχείς έχουν ταυτοποιηθεί ότι προσδέουν BMPs. Οι υποδοχείς τύπου I συμπεριλαμβάνουν τον υποδοχέα ακτιβίνης τύπου Ia [Activin receptor type Ia (Act-RIa or Alk2)], το BMP υποδοχέα τύπου Ia (BMP-RIa or Alk3) και τον BMP υποδοχέα τύπου Ib (BMPRIb ή Alk6). Σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τους ακόλουθους υποδοχείς τύπου II: το BMP υποδοχέα τύπου II (BMP-RII), τους υποδοχείς ακτιβίνης τύπου IIA και IIB [Activin receptors type IIA and IIB (Act-RIIA and Act-RIIB)] (Miyazono et al., 2005). Οι υποδοχείς είναι ομόλογοι και μπορούν να ενεργοποιήσουν τόσο τη σηματοδότηση μέσω Smad όσο και τη σηματοδότηση που δεν εμπλέκει Smad μόρια. Ωστόσο, οι οδοί σηματοδότησης

δεν είναι επικαλυπτόμενες αλλά έχουν ιδιαίτερα συγκεκριμένες λειτουργίες κατά την εμβρυογένεση, αλλά και στα ενήλικα άτομα.

Η πρόσδεση (σύνδεση) των BMPs στους υποδοχείς τύπου I και II γίνεται με διαφορετικές συγγένειες. Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες BMP2 και BMP4 εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς τύπου I BMP-RIa και BMP-RIb και μια συγκρίσιμα χαμηλή συγγένεια για τους υποδοχείς τύπου II BMP-RII. Ωστόσο η BMP7, προσδέεται κατά προτίμηση στους τύπου II υποδοχείς Act-RIIA and Act-RIIB, ενώ η συγγένειά της για τους υποδοχείς τύπου I είναι χαμηλότερη (Greenwald et al., 2003). Αυτές οι διαφορές οδηγούν τους αντίστοιχους υποδοχείς να ολιγομερίζονται κατά έναν πολύ συγκεκριμένο τρόπο, ο οποίος ακολούθως οδηγεί στην ενεργοποίηση διακριτών σηματοδοτικών καταρρακτών (Gilboa et al., 2000; Hartung et al., 2006; Nohe et al., 2002). Ο ολιγομερισμός συνδέτη-υποδοχέα καθορίζεται από:

- α) τον βαθμό συγγένειας της μεταξύ τους πρόσδεσης
- β) τα επίπεδα έκφρασης τους αντίστοιχα
- γ) τα επίπεδα έκφρασης μορίων με ρόλο συμπαραγόνα
- δ) την παρουσία ή απουσία προσχηματισμένων συμπλόκων που απαρτίζονται από τους υποδοχείς τύπου I / τύπου II

Αυτά τα χαρακτηριστικά δημιουργούν την τεράστια ποικιλία μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η σηματοδότηση των μορίων BMP.

1.4.2 Ρύθμιση και λεπτός συντονισμός της σηματοδότησης μέσω των BMP στον εξωκυτταρικό χώρο

Η πρόσδεση των μορίων BMP στους υποδοχείς τους, η επακόλουθη εσωτερίκευση του σύμπλοκου συνδέτη-υποδοχέα και η έναρξη των σηματοδοτικών καταρρακτών βρίσκονται υπό στενό έλεγχο. Κάθε BMP πρωτεΐνη βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με ένα εκτεταμένο εύρος πρωτεϊνών στον εξωκυτταρικό χώρο που τροποποιούν την πρόσδεση της στον υποδοχέα (Εικόνα 1.7). Αυτοί οι τροποποιητές μπορούν να δρουν κυρίως ως ανταγωνιστές των BMP με αποτέλεσμα το BMP σήμα να διαφοροποιείται ανάλογα με:

- α) την BMP πρωτεΐνη που προσδέεται/αλληλεπιδρά στον ανταγωνιστή
- β) τον ανταγωνιστή αυτόν καθεαυτό
- γ) τον περιβάλλοντα μικροχώρο
- δ) τον κυτταρικό τύπο που λαμβάνει το BMP σήμα

Η έκφραση κάποιων ανταγωνιστών ρυθμίζεται από τις ίδιες τις BMPs, με αποτέλεσμα αυτοί οι ανταγωνιστές να δημιουργούν αρνητική ανάδραση (Kameda et al., 1999; Pereira et al., 2000)

Όπως και οι συνδέτες των BMP, οι ανταγωνιστές αποτελούν ομοδιμερείς πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν ένα μοτίβο κυστεΐνης, το οποίο σταθεροποιεί τη δομή τους. Οι ανταγωνιστές ταξινομούνται με βάση το μοτίβο κυστεΐνης: Η οικογένεια των Chordin/Noggin εμφανίζει ένα δακτύλιο που απαρτίζεται από 10 κυστεΐνες, η Twisted gastrulation (TWSG1) έχει έναν εννεαμελή δακτύλιο και η οικογένεια των DAN/Cerebrus (Gremlin) περιέχει έναν οκταμελή δακτύλιο (Gazzerro and Canalis, 2006).

1.4.2.1 Noggin και Chordin

Η Noggin εκκρίνεται ως γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, ως ομοδιμερές ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μοριακό βάρος 64kDa. Η Noggin προσδένεται με ποικίλους βαθμούς συγγένειας με τις πρωτεΐνες BMP2, -4, -6 και -7, GDF5, -6 (Zimmerman et al., 1996). Ομόζυγες μεταλλάξεις που οδηγούν σε μη έκφραση του *noggin* γονιδίου έχουν ως αποτέλεσμα σοβαρές ανωμαλίες όπως η αποτυχία σχηματισμού του νευρικού σωλήνα, η δυσμορφογένεση του σκελετού των άκρων καθώς και βλάβες στον αξονικό σκελετό αλλά και στις αρθρώσεις (Brunet et al., 1998; McMahon et al., 1998). Η εμβρυική θνησιμότητα των *Noggin* μηδενικών ποντικών δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό του ρόλου του *noggin* σε ενήλικα συστήματα. Στον ποντικό η Noggin εκφράζεται μετά τη γέννηση στο μεσέγχυμα των εμφανών, αλλά όχι των συγχωνευμένων κρανιακών ραφών όπου παρατηρείται ελάττωση των μεταγράφων του *noggin* από τον FGF2. Η Noggin χρησιμοποιείται συχνά ως ειδικός αναστολέας των BMP.

Η Chordin αρχικά ταυτοποιήθηκε στο ραχιαίο μεσόδερμα για την ικανότητά της να ανταγωνίζεται τη δράση των BMP. Εκκρίνεται ως γλυκοζυλιωμένο ομοδιμερές μοριακού βάρους 120kDa και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τεσσάρων CR δομικών μοτίβων, τα οποία αποτελούν τις θέσεις αλληλεπίδρασης με τα BMPs. Η Chordin προσδένεται ειδικά στα μόρια BMP2, -4 and -7 (Piccolo et al., 1996). Το σύμπλοκο Chordin-BMP αποτελεί υπόστρωμα για τη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου BMP1/tolloid, που αποκόπτει την Chordin αναστέλλοντας τη βιολογική της δράση και απελευθερώνοντας ελεύθερα τα BMPs στον εξωκυτταρικό χώρο (Piccolo et al., 1997). Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε μηδενική έκφραση της Chordin έχουν ως

αποτέλεσμα οι ποντικοί να πεθαίνουν κατά τη γέννηση, λόγω ανωμαλιών στις φαρυγγική και καρδιαγγειακή οργάνωση. Διπλά μεταλλαγμένοι ποντικοί για τα γονίδια *noggin/chordin* εμφανίζουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη του προσθεγκεφάλου, στα μάτια και τις δομές του προσώπου, και εμφανίζουν προβληματική ανάπτυξη του μεσοδέρματος και σχηματισμό δομών του αριστερού και δεξιού προτύπου (Bachiller et al., 2000). Αυτό είναι ενδεικτικό του γεγονότος ότι οι *Noggin* και *Chordin* απαιτούνται για την ορθή εγκαθίδρυση και των τριών αξόνων στο έμβρυο του ποντικού.

1.4.2.2 Twisted Gastrulation

Η Twisted gastrulation (TWSG1), μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 26kDa, ταυτοποιήθηκε αρχικά στην *Drosophila*, που απαιτείται για την σωστή εγκαθίδρυση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα (Mason et al., 1994). Το *twsg1* γονίδιο κωδικοποιεί μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη με δύο συντηρημένα CR δομικά μοτίβα. Το αμινοτελικό δομικό τμήμα CR είναι ανάλογο με τα δομικά CR μοτίβα της *Chordin* και είναι απαραίτητο και επαρκές για την άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στην TWSG1 και τις πρωτεΐνες BMP2 και -4. Η καρβοξυτελική περιοχή δεν εμφανίζει σημαντική ομολογία με γνωστά ειδικά μοτίβα και αλληλεπιδρά με την *Chordin*. Η TWSG1 μπορεί να εκδηλώνει λειτουργίες τόσο αγωνιστή όσο και ανταγωνιστή των BMP. Ως αγωνιστής των BMP, η TWSG1 μπορεί να προάγει τη θραύση της *Chordin* από την BMP1/tolloid, και να παρεμποδίζει την εναπομείνασα αντί-BMP δράση των πρωτεολυτικών προϊόντων της *Chordin* (Larrain et al., 2001; Oelgeschlager et al., 2000). Ως ανταγωνιστής των BMP, η TWSG1 προσδέεται στην BMP2 ή την BMP4 ή στο προσχηματισμένο σύμπλοκο BMP-chordin δημιουργώντας έτσι μια τριμοριακή δομή, η οποία είναι πιο αποτελεσματική από τα μεμονωμένα συστατικά της μόρια στην αναστολή της σηματοδότησης μέσω των BMP (Ross et al., 2001; Scott et al., 2001). Η απενεργοποίηση του γονιδίου *twsg1* στους ποντικούς οδηγεί σε ποικίλους πολύπλοκους φαινοτύπους σε διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Οι ανάμικτοι C57Bl6/129 ποντικοί που δεν εκφράζουν την TWSG1, εμφανίζουν αυξημένη θνησιμότητα, ελαττώματα στην ενδοχονδρική οστεοποίηση και την ανάπτυξη του θύμου και του σπλήνα (Nosaka et al., 2003). Απώλεια του γονιδίου *twsg1* στους C57Bl6 ποντικούς επιφέρει εμβρυική θνησιμότητα και ελαττώματα στην κρανιοπροσωπική και προσθεγκεφαλική ανάπτυξη (Petryk et al., 2004).

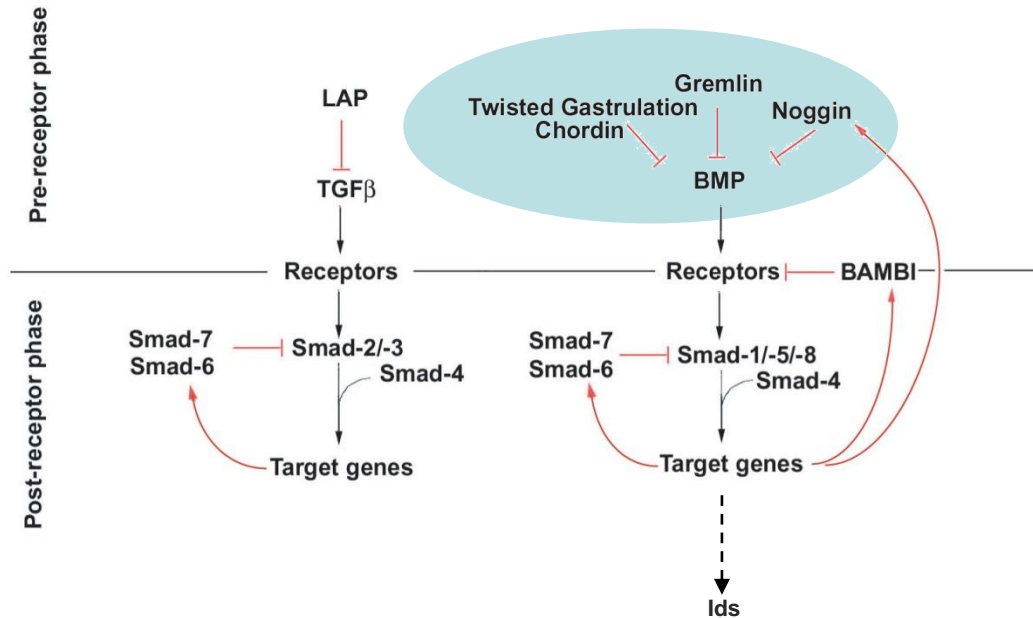
1.4.2.3 Gremlin

Η Gremlin αποτελεί το κυριότερο μέλος της οικογένειας των DAN/Cerebrus ανταγωνιστών των BMP η οποία επίσης περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Sclerostin, USAG-1, Cerebrus, Coco, PRDC και Dante. Το γονίδιο *gremlin*, που αναγνωρίστηκε αρχικά στον οργανισμό *Xenopus*, κωδικοποιεί για ένα γλυκοζυλιωμένο ομοδιμερές πεπτιδίο μοριακού βάρους 28kDa. Η Gremlin προσδένεται στις πρωτεΐνες BMP2, -4, -7 με υψηλή συγγένεια αλλά δεν αλληλεπιδρά με άλλα μέλη της υπερικογένειας του TGF- β (Hsu et al., 1998). Έχει δειχθεί *in vitro*, ότι η Gremlin ανταγωνίζεται τις δράσεις των BMP στη διαφοροποίηση των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών αλλά και στην λειτουργία των οστεοκλαστών (Pereira et al., 2000). Η ομόζυγη μηδενική μετάλλαξη του *gremlin* στους ποντικούς έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές ανωμαλίες στην ανάπτυξη των άκρων, βλάβες στον αεραγωγό του πνεύμονα, νεφρική αγεννησία και τελικά θνησιμότητα (Khokha et al., 2003; Michos et al., 2004). Αντίθετα, ποντικοί που υπερεκφράζουν Gremlin παρουσιάζουν μειωμένο αριθμό οστεοβλαστών με αποτέλεσμα την δημιουργία οστεοπενίας (Gazzerro et al., 2005). Παράλληλα, η υπερέκφραση του ομολόγου της Gremlin από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης κυκλινο-εξαρτώμενη κατασταλτική κινάση p21 και επάγει απόπτωση, υποδεικνύοντας έτσι έναν πιθανό ρόλο για την Gremlin στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (Chen et al., 2002; Topol et al., 2000).

1.4.3 Ενδοκυτταρική σηματοδότηση των BMPs και των γονιδίων στόχων τους

Η πρόσδεση των μελών της οικογένειας του TGF- β στα ετεροδιμερή σύμπλοκα των υποδοχέων τύπου I και II επιτρέπει στον υποδοχέα τύπου II να φωσφορυλιώνουν και να ενεργοποιούν τον υποδοχέα τύπου I. Αν και πολυάριθμα υποστρώματα για τον υποδοχέα τύπου I έχουν ταυτοποιηθεί, τα πλέον σημαντικά για την μετάδοση των ενδοκυτταρικών σημάτων είναι τα μέλη της οικογένειας των μεταγωγέων σήματος Smad (Εικόνα 1.7). Οι ενεργοποιημένες από τον υποδοχέα πρωτεΐνες Smads (Smad1, Smad5, Smad8 για τα BMPs και Smad2, Smad3 για τον TGF- β και τις ακτιβίνες) φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I (pSmad1, 5, 8 και pSmad2, 3) και σχηματίζουν ετερο-ολιγομερή σύμπλοκα με τον κοινό μεσολαβητή Smad4, τα οποία μεταφέρονται στον πυρήνα όπου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Η τρίτη υποοικογένεια των Smad εκπροσωπείται από τις ανασταλτικές

πρωτεΐνες Smads (Smad6, Smad7), οι οποίες από τη μια πλευρά αναστέλλουν τη σηματοδότηση σχηματίζοντας ετερομερή σύμπλοκα υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης σε ένα μηχανισμό ανατροφοδότησης και, από την άλλη προάγουν ορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία δεν συμμετέχουν οι πρωτεΐνες Smad.



Εικόνα 1.7 Το δίκτυο σήματος BMP και TGF-β στον εξωκυττάριο και εσωκυττάριο χώρο (Από Graf and Economides, 2008)

Η μελέτη των πρωτεϊνών Smads 1, και 5 *in vivo* εμφανίζει ορισμένες δυσκολίες. Εξαιτίας της εμβρυικής θνησιμότητας των ποντικών που δεν εκφράζουν Smad1 ή Smad5 πολλά από τα *in vivo* στοιχεία για την κυτταρική λειτουργία τους περιορίζονται στην εμβρυική ανάπτυξη. Οι ποντικοί στους οποίους έχει εξαλειφθεί το Smad1 (KO) πεθαίνουν *in utero* και τα έμβρυα εμφανίζουν ελαττώματα σε εξω-εμβρυικούς ιστούς και στο σχηματισμό των αναπαραγωγικών κυττάρων (Lechleider et al., 2001). Οι Smad5 KO ποντικοί πεθαίνουν στα μισά της κύησης εξαιτίας πολυάριθμων εμβρυικών ελαττωμάτων και επιπρόσθετα εμφανίζουν ελαττώματα στην αγγειογένεση και τη μεσεγχυματική απόπτωση (Chang et al., 1999; Yang et al., 1999). Η Smad8 δεν παίζει καθοριστικό στην ανάπτυξη, εν μέρει λόγω των αλληλεπικαλυπτόμενων δράσεων της με τις πρωτεΐνες Smad1 και Smad5 (Arnold et al., 2006). Οι μεταλλαγμένοι Smad8 ποντικοί είναι βιώσιμοι ωστόσο έχουν παθολογικά ελαττώματα παρόμοια με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και σε μερικές περιπτώσεις εμφανίζουν αδενώματα στον πνεύμονα (Huang et al., 2009).

Εκτός από το κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης των Smad, η ενεργοποίηση των συμπλόκων των BMP υποδοχέων τύπου I και II μπορεί επίσης να επάγει και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία δεν εμπλέκονται οι Smad. Στοιχεία υποστηρίζουν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ή «συνομιλίας» ανάμεσα στα BMP και άλλα πρωταρχικής σημασίας σηματοδοτικά μονοπάτια όπως είναι του TGF-β/ακτιβίνης, Notch, p38 MAPK και Toll (Herpin and Cunningham, 2007). Η σηματοδοτική συνομιλία των BMP και άλλων μονοπατιών προσθέτει στην πολυπλοκότητα μέσω της οποίας τα σήματα μέσω των BMP δρουν στα κύτταρα στόχους.

Η μεταφορά των pSmad1, 5, 8 στον πυρήνα ενεργοποιεί έναν αριθμό γονιδίων όπως είναι τα Runx2/Cbfa1, JunB, Msx2, και Dlx5 (ten Dijke et al., 2003). Ανάμεσα στα πολυάριθμα γονίδια στόχους των BMP, οι πρωτεΐνες Id [αναστολέας της διαφοροποίησης ή αναστολέας της πρόσδεσης στο DNA (inhibitor of differentiation or inhibitor of DNA binding)] επάγονται από την ενεργοποίηση των BMP σε ποικίλου τύπους κυττάρων, και αποτελούν από τους πλέον σημαντικούς στόχους των BMPs (Ogata et al., 1993). Οι Id πρωτεΐνες λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της κυτταρικής διαφοροποίησης και ως θετικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Yokota and Mori, 2002). Και οι τέσσερις Id πρωτεΐνες (Id1 έως 4) εμφανίζουν παρόμοιες, αλλά όχι ταυτόσημες βιολογικές δραστηριότητες με αλληλεπικαλυπτόμενα πρότυπα έκφρασης. Η επαγόμενη από το BMP σήμα αναστολή της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε μυοβλάστες και αδιποκύτταρα μπορεί να μεσολαβηθεί μέσω των Id πρωτεϊνών (Hollnagel et al., 1999) (Moldes et al., 1997). Επιπρόσθετα, η BMP2 βρέθηκε ότι οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των Id1 και Id3 σε νευροεπιθηλιακά κύτταρα (Nakashima et al., 2001). Η εκτοπική έκφραση των πρωτεϊνών Id1 και Id3 αναστέλλει τη νευρογένεση προτείνοντας έτσι έναν σημαντικό ρόλο στις μεσολαβούμενες από τις BMP αλλαγές στη νευρογενετική μοίρα αυτών των κυττάρων.

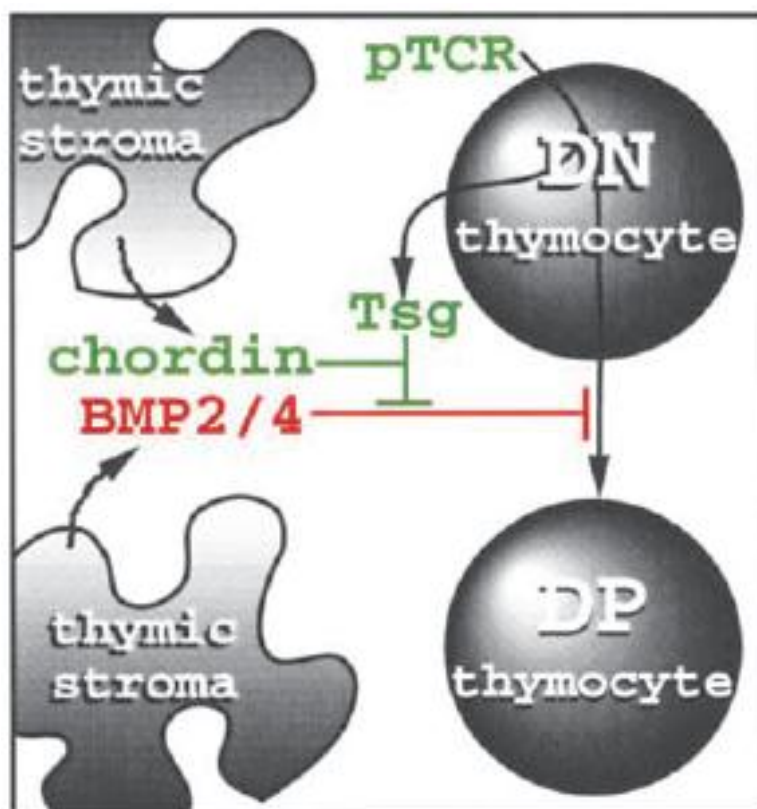
1.4.4 Τα συστατικά στοιχεία του σηματοδοτικού δικτύου των BMP στην ανοσολογική ρύθμιση

Η πλειοψηφία των διαθέσιμων αποτελεσμάτων αναφορικά με τη λειτουργία των BMP επικεντρώνεται στην εμβρυογένεση και το σχηματισμό των οστών. Αναδυόμενες μελέτες των τελευταίων ετών υποδεικνύουν πρωταγωνιστικό ρόλο για τις BMPs και σε άλλα συστήματα πέρα από τα οστά (Wagner et al.), με το ανοσοποιητικό σύστημα να μην αποτελεί εξαίρεση. Πολλές από τις πληροφορίες που

αφορούν μέλη του BMP δικτύου σηματοδότησης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού προέρχεται από *in vitro* μελέτες. Η σάρωση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών που περιλαμβάνουν αιμοποιητικές γενεαλογίες αποκάλυψαν ότι η *Bmp4* εκφράζεται από λεμφοειδείς T κυτταρικές σειρές, η *Bmp6* και η *Bmp7* εκφράζονται στην κυτταρική σειρά B κυττάρων Ramos και η *Bmp7* επίσης εκφράζεται σε ανθρώπινα B και T κύτταρα (Detmer et al., 1999). Αναφορικά με τα B κύτταρα, η *Bmp2* μπορεί να επάγει αναστολή της αύξησης στην κυτταρική σειρά από υβριδώματα B κυττάρων ποντικού την HS-72 (Ishisaki et al., 1999; Yamato et al., 2001) και η *Bmp6* έχει εμπλακεί στη λεπτή ρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση των αναπτυσσόμενων ανθρώπινων B κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών *Id1* και *Id3* (Kersten et al., 2006; Kersten et al., 2005).

Αναφορικά με τους ανταγωνιστές BMP, έχειδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Gremlin και Dan αλληλεπιδρούν με τη Slits και λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της χημειόταξης των μονοκυττάρων (Chen et al., 2004a). Στον εξωκυττάριο χώρο, η TWSG1 εκφράζεται από τα αναπτυσσόμενα θυμοκύτταρα κατά τρόπο που εξαρτάται από τον TCR και συνεργάζεται με την Chordin για να μπλοκάρει τη δράση των *Bmp2/4* που ρυθμίζουν αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων (Εικόνα 1.8) (Graf et al., 2002). Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι η έκφραση της TWSG1 σε ώριμα T κύτταρα κατά τρόπο που εξαρτάται από την Tob, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτοκινών από αλλοδραστικά $CD4^+$ T κύτταρα (Tzachanis et al., 2007). Τα *in vivo* στοιχεία για την πιθανή εμπλοκή των BMPs στη λειτουργία του ανοσοποιητικού, προέρχονται από ποντικούς που δεν εκφράζουν την TWSG1. Μερικοί από αυτούς εμφανίζουν προβλήματα στην ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων, τόσο στο θύμο όσο και στο σπλήνα (Nosaka et al., 2003).

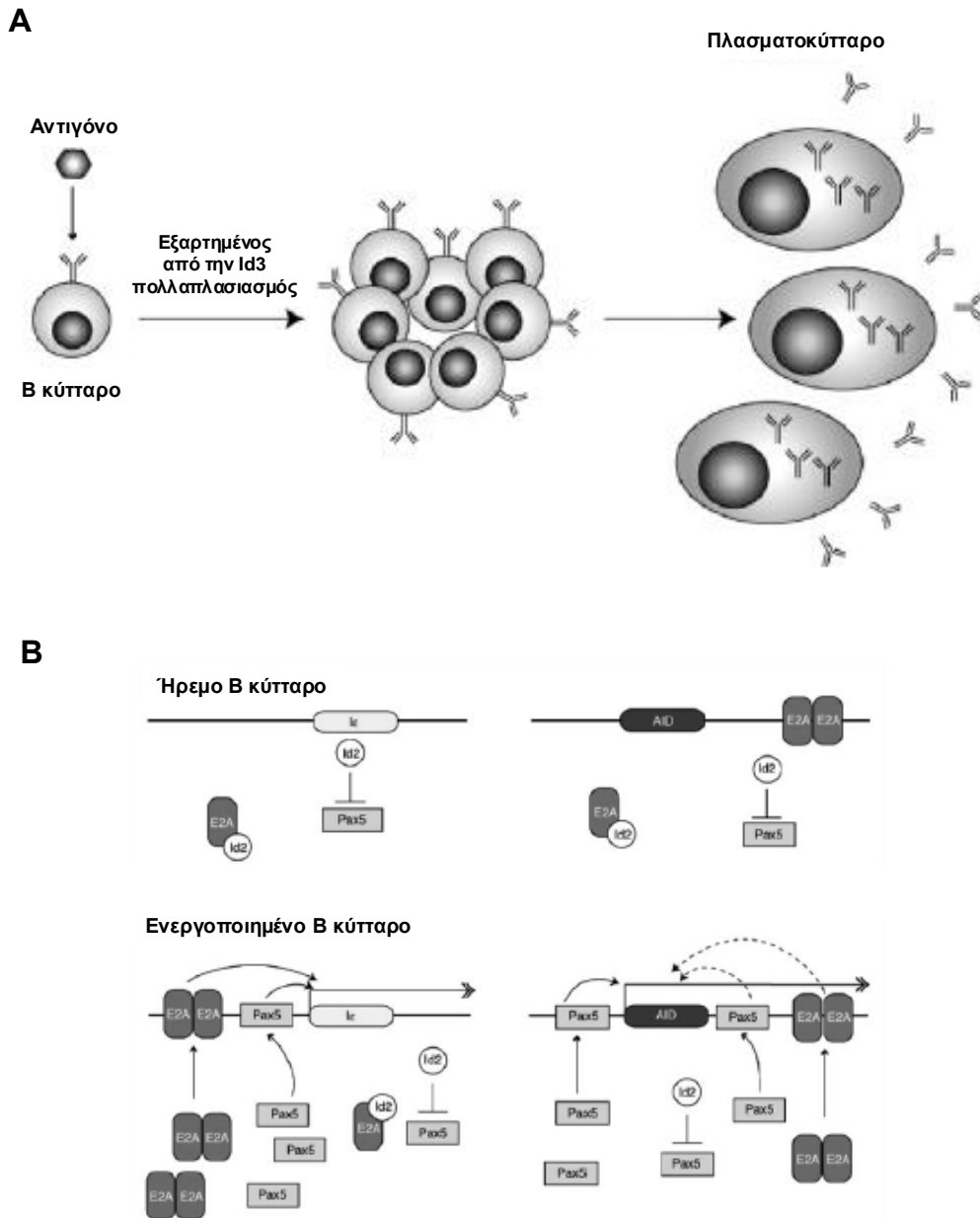
Τα στοιχεία που υποστηρίζουν την παραπάνω άποψη συμπληρώνονται από τα γονίδια στόχους των BMP, την οικογένεια των *Id*. Μια από τις πολυάριθμες λειτουργίες των πρωτεϊνών *Id* είναι ότι αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1.9A) (Engel and Murre, 2001; Sugai et al., 2004). Αναφορικά με τα B κύτταρα, οι Knock-out (KO) ποντικοί για την *Id3* εμφανίζουν προβλήματα στον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων και στις ανοσοαποκρίσεις (Ishisaki et al., 1999) ενώ από τους *Id2* KO ποντικούς βρέθηκε ότι η



Εικόνα 1.8 Αλληλεπίδραση των BMP2/4 με τους ανταγωνιστές TWSG1 και Chordin ανάμεσα στα στρωματοκύτταρα και τα αναπτυσσόμενα T κύτταρα στο θύμο αδέν, καθορίζει τον ρυθμό της T κυτταρικής ανάπτυξης (βλέπε κείμενο για επεξήγηση) (Από Graf et al., 2002)

Id2 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των B κυττάρων στην περιθωριακή ζώνη (MZ) (Becker-Herman et al., 2002), καταστέλλει την εναλλαγή ισότυπου (class switch recombination) για την IgE και σχετίζεται με την Pax5, ρυθμίζοντας έτσι την ενεργότητα της AID (Εικόνα 1.9B) (Gonda et al., 2003).

Ωστόσο, παρά τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, άμεσα *in vivo* στοιχεία για τη λειτουργία των BMP στα λεμφοκύτταρα και στην ανοσολογική ρύθμιση ακόμα λείπουν, γεγονός που πιθανά αποτελεί αντανάκλαση των πρώιμων αλλά και πολύπλοκων φαινοτύπων που παρατηρούνται στους περισσότερους BMP KO ποντικούς (Πίνακας 1.2) (Graf and Economides, 2008).



Εικόνα 1.9 Οι Ids εμπλέκονται σε μέρη της B κυτταρικής διαφοροποίησης και της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης. **A)** B κυτταρική ενεργοποίηση και διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα. Αντιγόνο ενεργοποιεί B κύτταρα και προκαλεί άμεσα τον πολλαπλασιασμό που είναι απαραίτητος για την επέκταση αντιγονοειδικών B κυτταρικών κλώνων, επιτρέποντας στα ενεργοποιημένα B κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα. Η Id3 είναι απαραίτητη για την εκκίνηση του B κυτταρικού πολλαπλασιασμού. **B)** Μοντέλο ρύθμισης έκφρασης της AID και του Iε γονιδίου από τις E2A, Pax5 και Id2. Στα ήρεμα B κύτταρα η Pax5 δεν μπορεί να προσδεθεί στις περιοχές του *aid* και του *Iε*. Αντίθετα η E2A μπορεί να προσδεθεί στο *aid* αλλά όχι στο *Iε*. Με την ενεργοποίηση, η E2A και η Pax5 προσδένονται στον εκκινητή του *Iε* και προωθούν εGLT. Στην περιοχή του *aid*, η Pax5 προσδένεται στα ρυθμιστικές περιοχές του και προωθεί έκφραση του *aid* γονιδίου μαζί με την E2A. Και στις δυο περιπτώσεις η Id2 λειτουργεί σαν ανταγωνιστής της δράσης της Pax5. (Από Sugai et al., 2004)

Πίνακας 1.2 Φαινότυποι ποντικών με απαλοιφή διαφόρων γονιδίων της BMP ομάδας*

<i>Γονίδιο</i>	<i>Φαινότυπος</i>	<i>Αναφορά γονιδιακής απαλοιφής</i>
<i>bmp2</i>	Εμβρυική θνησιμότητα: ελαττώματα στο άμνιο, καρδιακές ανωμαλίες	(Zhang and Bradley, 1996)
<i>bmp4</i>	Εμβρυική θνησιμότητα: ελαττώματα στο σχηματισμό του μεσοδέρματος	(Winnier et al., 1995)
<i>bmp6</i>	Βιώσιμοι: ελαττώματα στην ανάπτυξη του στέρνου	(Solloway et al., 1998)
<i>bmp7</i>	Θνησιμότητα αμέσως μετά τη γέννηση: αγένεση νεφρού, ελαττώματα στον οφθαλμό, σκελετικές ανωμαλίες	(Dudley et al., 1995) (Luo et al., 1995)
<i>noggin</i>	Εμβρυική θνησιμότητα: σκελετικά ελαττώματα, ελαττώματα στο ΚΝΣ	(Brunet et al., 1998) (McMahon et al., 1998)
<i>gremlin</i>	Εμβρυική θνησιμότητα: προβλήματα στο νεφρό, τον πνεύμονα και το σκελετό	(Khokha et al., 2003) (Michos et al., 2004)
<i>chordin</i>	Θνησιμότητα κατά τη γέννηση: φαρυγγικά ελαττώματα (σύνδρομο DiGeorge)	(Bachiller et al., 2000)
<i>twisted gastrulation</i>	Ποικίλοι γονότυποι ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο: εμβρυική θνησιμότητα στο υπόβαθρο C57/B16 με κρανιοπροσωπικές, σκελετικές, λεμφοειδείς και εντερικές ανωμαλίες	(Nosaka et al., 2003) (Petryk et al., 2004)
<i>smad1</i>	Εμβρυική θνησιμότητα: ελαττώματα στο σπλαχνικό ενδόδερμα και στο εξωεμβρυικό μεσόδερμα	(Tremblay et al., 2001) (Lechleider et al., 2001)
<i>smad5</i>	Εμβρυική θνησιμότητα: Βλάβες στην αγγειογένεση στο λεκκιθικό σάκο, μειωμένο μεσόδερμα και ελαττώματα στην αριστερή-δεξιά ασυμμετρία	(Chang et al., 1999) (Yang et al., 1999)
<i>smad8</i>	Βιώσιμοι: παθολογικές βλάβες που προσομοιάζουν την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση	(Huang et al., 2009)

*προσαρμόστηκε από (Graf and Economides, 2008; Zhao, 2003)

1.5 Διαγονιδιακή τεχνολογία

Καθώς οι κυτταρικές πηγές των περισσότερων BMPs και των BMP ανταγωνιστών που εκφράζονται στους ενήλικες ιστούς δεν είναι γνωστές, χρειάστηκαν συγκεκριμένες πειραματικές προσεγγίσεις που θα καθιστούσαν εφικτή την περιγραφή της έκφρασης των μορίων BMP/BMP ανταγωνιστών *in situ* σε

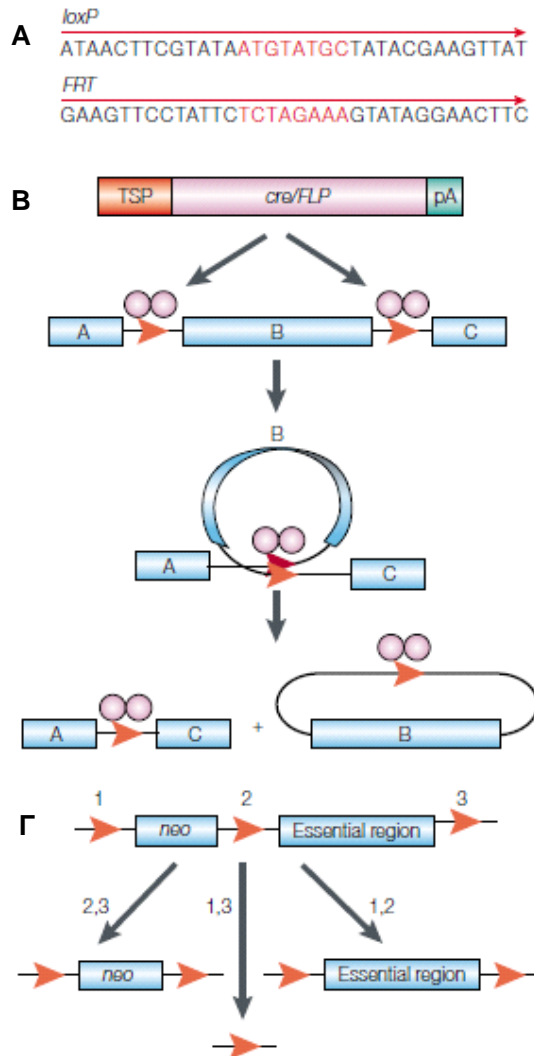
επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, προαπαιτούμενο γεγονός για την περαιτέρω μελέτη *in vivo* μέσω ιστοειδικής γονιδιακής απαλοιφής. Ανάλυση του προτύπου έκφρασης για να ταυτοποιηθεί ο χρόνος και η θέση της έκφρασης ενός γονιδίου χρησιμοποιώντας ένα γονίδιο δείκτη που έχει γίνει knocked in στο γενετικό τόπο που κωδικοποιεί το γονίδιο που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση. Σε αυτή τη μέθοδο, ένα γονίδιο αναφοράς, συχνότερα το βακτηριακό γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) εισάγεται σταθερά μέσω γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ή με διαγένεση βακτηριακών τεχνητών χρωμοσωμάτων [bacterial artificial chromosome (BAC)] στο γονιδίωμα του ποντικού κατά τέτοιο τρόπο που η έκφραση του *lacZ* καθορίζεται από τον υποκινητή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει (παράδειγμα εικόνα. 1.10). Η χρώση για ενεργότητα του *lacZ* είναι ευαίσθητη και επιτρέπει την οπτικοποίηση της έκφρασης σε ολόκληρα έμβρυα, ή σε ιστολογικές τομές. Συνήθως με ανάλυση σε επίπεδο ενός κυττάρου (Adams and Gale, 2006).



Εικόνα 1.10 Εισαγωγή κασσέτας β-γαλακτοσιδάσης μαζί με το *neo* resistant (*neo^r*) τμήμα ανάμεσα στο Εξόνιο 1 (*Ex1*) του γονιδίου *bmp7* (Προσαρμοσμένο από Godin et al., 1998)

Όπως προαναφέρθηκε, η απαλοιφή των συστατικών στοιχείων του σηματοδοτικού στοιχείου των BMP οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα, θνησιμότητα κατά τη γέννηση ή πολύπλοκους φαινοτύπους, δημιουργώντας έτσι εμπόδια στην αποκάλυψη του ρόλου της σηματοδότησης μέσω των BMP στους ιστούς των ενηλίκων (Πίνακας 1.2). Η χρήση της τεχνολογίας της ιστοειδικής στόχευσης καθιστά εφικτή τη δημιουργία ποντικών με ιστο-/ κυτταροειδική απαλοιφή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Σε αυτή τη μέθοδο, τυπικές τεχνικές γονιδιακής στόχευσης χρησιμοποιούνται προκειμένου να παράγουν ποντικούς στους οποίους μια βασική περιοχή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει είναι floxed, έτσι ώστε ιστοειδική έκφραση της *cre* ανασυνδυάσης (*cre* recombinase) επιφέρει την απενεργοποίηση του αλληλίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι θέσεις *loxP* τοποθετούνται στα εσώνια (introns). Διασταυρώνοντας μια σειρά ποντικών με ένα κατά συνθήκη στοχευόμενο αλληλίο με μια σειρά ποντικού με εκτελεστική δράση που εκφράζει την *cre* κατά ιστοειδικό τρόπο, παράγονται απόγονοι στους οποίους το στοχευόμενο αλληλίο

απενεργοποιείται μόνο σε εκείνους τους ιστούς που εκφράζουν την *cre* (Gu et al., 1994). Ένας δείκτης που μπορεί να τεθεί υπό επιλογή (όπως αυτός που περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη *neo*), χρησιμοποιείται για να επιλεγούν οι στοχευόμενοι κλώνοι των κλώνων των βλαστικών κυττάρων και αποτελεί απαραίτητως μέρος του αρχικά στοχευμένου αλληλίου (Εικόνα 1.11A,B).



εκκινητής, pA, θέση πολυαδενυλίωσης) (Από Lewandoski, 2001)

Εικόνα 1.11. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τροποποίησης του γονιδιώματος με το τοποειδικό σύστημα ανασυνδυασμού Cre/loxP, Frt A)

Οι αλληλουχίες loxP και FRT οι οποίες αποτελούνται από δυο ανεστραμμένες επαναλήψεις η καθεμιά (μαύρο), οι οποίες χωρίζονται από μία κεντρική αλληλουχία (κόκκινο) στην οποία γίνεται η αποκοπή και η ανταλλαγή των αλυσίδων. **B)** Απενεργοποίηση του γονιδίου μέσω του ανασυνδυασμού της περιοχής (B) που βρίσκεται ανάμεσα στα δύο loxP ή frt τμήματα. **Γ)** Συνδυασμοί απαλοιφής του γονιδιακού τμήματος (essential region) και του neo χρησιμοποιώντας την τεχνική τοποθέτησης τριών loxP αλληλουχιών (TSP, ιστοειδικός

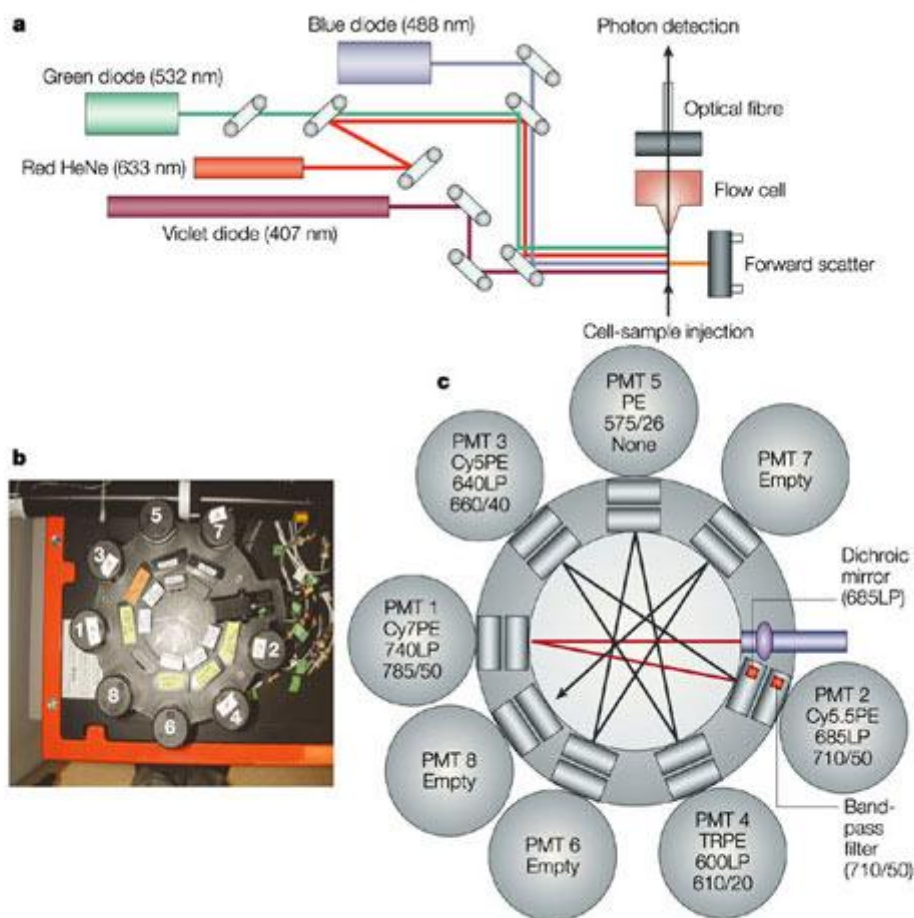
Ωστόσο, η τοποθέτηση της κασέτας neo cassette σε εσώνια πολλές φορές επηρεάζει την έκφραση του στοχευόμενου αλληλίου, αλλοιώνοντας την φυσικού τύπου [wild type, wt] γονιδιακή ενεργότητα ακόμα και εν τη απουσία του ανασυνδυασμού που μεσολαβείτε από την Cre. Μια κοινή στρατηγική για αυτό το πρόβλημα αποτελεί η χρήση τριών θέσεων loxP, που τοποθετούνται κατά τέτοιο

τρόπο ώστε το neo, αλλά και η βασική περιοχή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει να είναι στοχευόμενα (Gu et al., 1994). Ένας μερικός ανασυνδυασμός που μεσολαβεί από την Cre απομακρύνει το neo (χρησιμοποιώντας τον ποντικό *Flp-cre*) αφήνοντας τη βασική περιοχή στοχευόμενη (Εικόνα 1.11Γ). Όταν η neo κασέτα απομακρυνθεί, τότε ένα επιπρόσθετο γεγονός ανασυνδυασμού που μεσολαβεί από την cre (χρησιμοποιώντας έναν ποντικό που έχει την έκφραση της cre υπό έλεγχο του κυτταρικού τύπου που μας ενδιαφέρει) αξιοποιείται προκειμένου να υλοποιηθεί η απαλοιφή του γονιδίου σε έναν συγκεκριμένο κυτταρικό ιστό ή κυτταρικό τύπο.

1.6 Πολυπαραμετρική χρώση για τον προσδιορισμό του ανοσολογικού φαινοτύπου των κυττάρων (Multicolour Flow Cytometry – Immunophenotyping)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια από τις πλέον ισχυρές τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην Ανοσολογία. Καθιστά εφικτή τη γρήγορη και πολυπαραμετρική ανάλυση των κυττάρων σε επίπεδο 1 μόνο κυττάρου και επιπρόσθετα το διαχωρισμό (διαλογή, sorting) κυτταρικών πληθυσμών υψηλής καθαρότητας. Η κυτταρομετρία ροής ανακαλύφθηκε από το εργαστήριο του Herzenberg στα τέλη της δεκαετίας του 60. Τα πρώτα όργανα που κατασκευάστηκαν είχαν τη δυνατότητα μέτρησης τριών παραμέτρων: ενός σήματος φθορισμού και δύο σημάτων σκέδασης του φωτός.

Η δύναμη της πολυπαραμετρικής ανάλυσης προκειμένου να διακριθούν λειτουργικά διαφορετικές υποκατηγορίες λευκοκυττάρων οδήγησε στην ανάπτυξη των μηχανημάτων με ικανότητα διάκρισης 6 παραμέτρων για κάθε κύτταρο εκ των οποίων οι 4 αφορούν σήματα φθορισμού. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 90 περαιτέρω τεχνολογική πρόοδος σημειώθηκε στον τομέα της κυτταρομετρίας ροής προκειμένου να ανταποκριθεί στην αυξανόμενη ανάγκη κατανόησης της πολυπλοκότητας του ανοσοποιητικού συστήματος. Η πρόοδος σε επίπεδο τεχνολογίας, λογισμικών προγραμμάτων αλλά και χημείας κατέστησε εφικτή τη δημιουργία μηχανημάτων με δυνατότητα να ανιχνεύουν περισσότερα από 10 φθοριοχρώματα. Στις μέρες μας, είναι πλέον εφικτή η μέτρηση μέχρι 17 διαφορετικών φθοριοχρωμάτων (Εικόνα 1.12).



Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 1.12 Η γεωμετρία του laser και του συστήματος ανίχνευσης της εκπομπής φθορισμού 1 κυτταρόμετρου ροής με ικανότητα ανίχνευσης 19 χρωμάτων. Α. Σχηματική απεικόνιση του οργάνου που είναι εξοπλισμένο με τρία laser-το μπλε (488 nm), το πράσινο (534 nm) και το ιώδες (407 nm)- καθώς και 1 κόκκινο laser ηλίου νέου (HeNe) (633 nm). **Β** Φωτογραφία της διάταξης του οκταγώνου για την ανίχνευση των εκπομπών του πράσινου laser. **Γ** Η γραφική αναπαράσταση της οκταγωνικής διάταξης αποκαλύπτει ένα μοναδικό σύστημα συλλογής, το οποίο συνίσταται από μια σειρά σωλήνων φωτοπολλαπλασιασμού (PMTs 1-8) καθώς και οπτικών σε οκταγωνική διάταξη. Φωτόνια εισέρχονται σε αυτό το σύστημα και ανακλώνται συστηματικά στον επόμενο ανιχνευτή μέσω ενός διχρωϊκού καθρέπτη ή μεταφέρονται μέσω 1 φίλτρου και μετρώνται στο PMT. (Από Perfetto et al., 2004)

Αναπόδραστα τίθεται το ερώτημα: Είναι πραγματικά απαραίτητη η ταυτόχρονη μέτρηση τόσων πολλών παραμέτρων; Σε τι εξυπηρετεί η απόκτηση τόσων πολλών πληροφοριών; Όσοι δουλεύουν με λεμφοκύτταρα, όμως, μπορούν αβίαστα να πιστοποιήσουν ότι η ενδελεχής μελέτη και εις βάθος κατανόηση της πολυπλοκότητας του ανοσοποιητικού συστήματος προϋποθέτει την ανάκτηση όλης αυτής της

πληροφορίας. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελούν οι πληθυσμοί των Β λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης καθώς και οι πληθυσμοί των ενεργοποιημένων Β κυττάρων, οι οποίοι υποδιαιρούνται περαιτέρω σε άλλους υποπληθυσμούς με βάση την έκφραση συγκεκριμένων μορίων.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της τεχνολογικής προόδου που έχει επιτευχθεί προκειμένου να καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός μέχρι και 19 παραμέτρων αποτελεί το κυτταρόμετρο LSR II, της Becton Dickinson. Το LSR II χρησιμοποιεί 3 laser στερεής κατάστασης (solid phase) τα οποία εκπέμπουν στο πράσινο (532 nm), το μπλε (488 nm) και το ιώδες (407 nm). Επιπρόσθετα, ένα τέταρτο laser (ήλιο-νέο) εκπέμπει στο εύρος του κόκκινου (633 nm). Αυτά τα τέσσερα laser παρέχουν την ενέργεια ενεργοποίησης για τα αντισώματα που συζευγνύονται με φθοριόχρωμα. Μετά την εκπομπή, κάθε φθοριόχρωμα εκπέμπει φωτόνια σε ένα συγκεκριμένο εύρος μηκών κύματος. Τα εκπεμπόμενα φωτόνια συλλέγονται σε ένα σύστημα ανίχνευσης οκταγώνου ή τριγώνου ειδικό για κάθε laser. Το οκταγωνικό σύστημα ανίχνευσης για τα φθοριοχρώματα που εκπέμπονται από το πράσινο laser απεικονίζεται στην εικόνα 1.12. Σε κάθε γωνία αυτού του σχηματισμού ένας σωλήνας φωτοπολλαπλασιασμού ανιχνεύει το φως σε ένα συγκεκριμένο εύρος μηκών κύματος. Αυτό καθορίζεται από τα φίλτρα στο κέντρο του συστήματος. Ως εκ τούτου, κάθε ανιχνευτής μετρά κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, την εκπομπή από ένα συγκεκριμένο φθοριόχρωμα. Αυτή η διαδικασία υλοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά, τα εκπεμπόμενα φωτόνια συναντούν έναν ή περισσότερους διχροϊκούς καθρέπτες, οι οποίοι είτε ανακλούν είτε μεταδίδουν φωτόνια, ανάλογα με το χαρακτηριστικό μήκος κύματος του φίλτρου. Ακολούθως, το εκπεμπόμενο φως «καθαρίζεται» περαιτέρω από ένα φίλτρο πριν φτάσει στον ανιχνευτή.

Πέρα όμως από την τεχνολογική εξέλιξη για την ανάπτυξη κυτταρόμετρων ροής με δυνατότητες μέτρησης πολλαπλών παραμέτρων κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη κατάλληλων αντιδραστηρίων, που μπορούν να ανταποκριθούν στις ανάγκες του προσδιορισμού του ανοσολογικού φαινοτύπου των κυττάρων (immunophenotyping). Στο πλαίσιο αυτό, επιλέγονται επιφανειακές ή ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες κατάλληλες προς μελέτη. Ιδανικούς δείκτες για τον προσδιορισμό του ανοσολογικού φαινοτύπου αποτελούν πρωτεΐνες που πιθανόν σχετίζονται με τον ρόλο ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου και εκφράζονται διαφορετικά στους διαφορετικούς υπό εξέταση κυτταρικούς τύπους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μόρια των πλασματοκυττάρων Ig(G, M, A). Οι καλύτεροι δείκτες για τον προσδιορισμό του

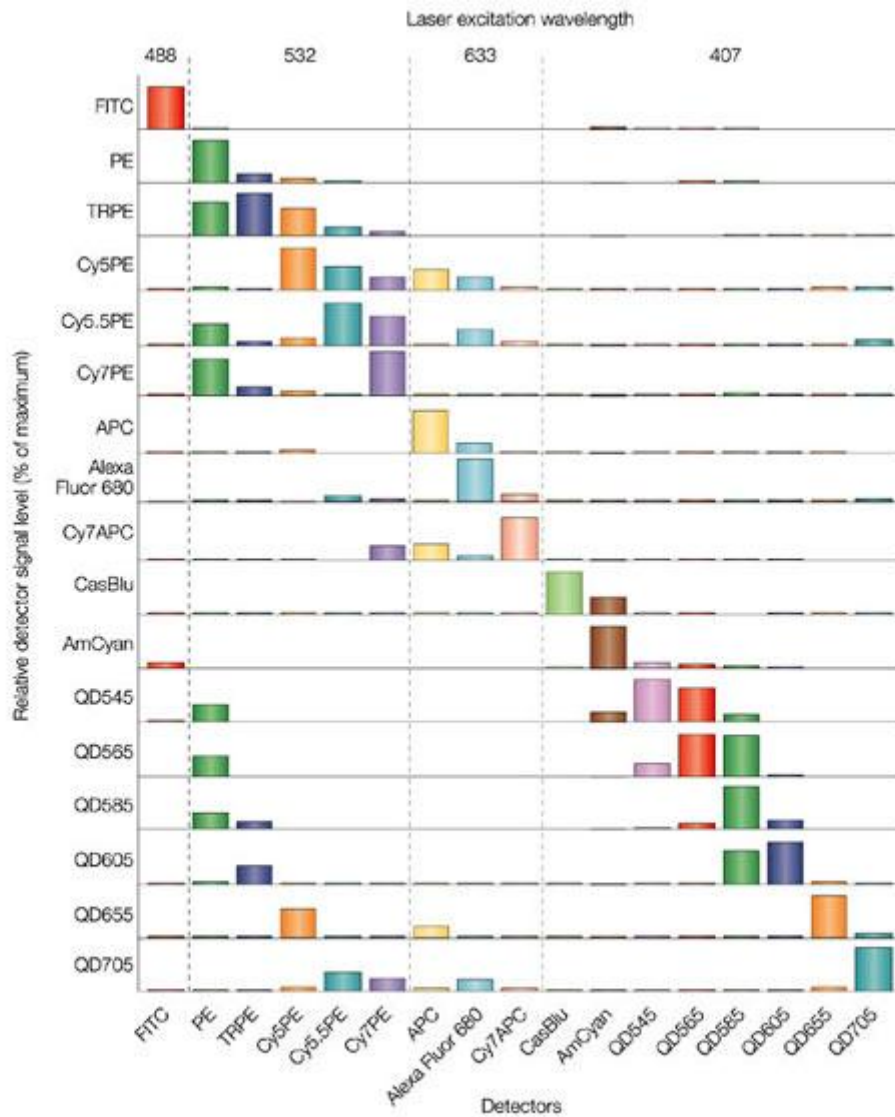
ανοσολογικού φαινοτύπου κυτταρικών υποτύπων παραμένουν αμετάβλητοι σε 3 καταστάσεις:

- σε *in vitro* ενεργοποίηση, που απαιτείται σε πολυάριθμες λειτουργικές μεθόδους,
- στην ικκή μόλυνση που ενδέχεται να μεταβάλει την έκφραση πρωτεϊνών ως μηχανισμό ανοσοδιαφυγής
- στην κυτταρική κρυσυντήρηση που μπορεί για παράδειγμα να απομακρύνει από την κυτταρική μεμβράνη το μόριο CD62L.

Αφού επιλεγούν οι κατάλληλες πρωτεΐνες που μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες πρέπει να επιλεγθούν τα πλέον κατάλληλα φθοριοχρώματα. Η διαθεσιμότητα πολλών φθοριοχρωμάτων, με διακριτά φάσματα εκπομπής καθιστά εφικτό τον συνδυασμό πολλών παραμέτρων σε 1 δείγμα. Ωστόσο, μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη είναι η φασματική επικάλυψη των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Αυτή η επικάλυψη είναι απαραίτητο να εξαλειφθεί μαθηματικά χρησιμοποιώντας μια διαδικασία που είναι γνωστή ως αντιστάθμιση (compensation) (Εικόνα 1.13).

Η αντιστάθμιση αποτελεί τη μαθηματική αποκωδικοποίηση των σημάτων εξόδου από πολλούς ανιχνευτές προκειμένου να προκύψουν μετρήσιμες τιμές αναλογικά με κάθε μία από τις φθορίζουσες χρωστικές που έχουν χρησιμοποιηθεί. Η ανάγκη για αντιστάθμιση προκύπτει από την «υπερχείλιση» (spillover) του φωτός ανάμεσα στους ανιχνευτές και το σχετικά ευρύ φάσμα μηκών κύματος εκπομπής από τα περισσότερα φθοριοχρώματα. Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.13, τα σήματα που εκπέμπονται από 1 φθοριόχρωμα μπορούν να «επιμολύνουν» γειτνιάζοντες ανιχνευτές γεγονός που οδηγεί σε αρκετές πιθανές πηγές επιμόλυνσης.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε πολυπαραμετρική ανάλυση μέχρι και 8 διαφορετικών παραμέτρων, εκ των οποίων οι 6 ήταν παράμετροι φθορισμού.



Εικόνα 1.13: Φασματική αλληλεπικάλυψη των πρωταρχικών φθοριοχρωμάτων σε όλους τους ανιχνευτές. Σφαιρίδια σημάνθηκαν με κάθε 1 από τα 17 αντισώματα συζευγμένα με αντίστοιχες χρωστικές και αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο. Υπολογίστηκε το ποσοστό του φωτός από την εκπομπή του πρωταρχικού φθοριοχρώματος που επιμόλυνε κάθε έναν από τους άλλους ανιχνευτές. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το ποσοστό του σήματος σε έναν δεδομένο ανιχνευτή από κάθε φθοριοχρώμα σε σύγκριση με το σήμα του φθοριοχρώματος στον αντίστοιχο πρωταρχικό του ανιχνευτή. (Από Perfetto et al., 2004)

1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη των ανταγωνιστών των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα.

Ποιο συγκεκριμένα η εργασία επικεντρώνεται αρχικά:

- **Στον χαρακτηρισμό της δυναμικότητας και της τοπολογίας έκφρασης των γονιδίων Chordin, Noggin, Gremlin and Twisted Gastrulation σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε διάφορα στάδια της ανοσολογικής απόκρισης χρησιμοποιώντας φυσιολογικούς διαγονιδιακούς ποντικούς αναφοράς (lacZ).**

Οι επόμενοι στόχοι είναι:

- **Ο χαρακτηρισμός της φυσιολογικής λειτουργίας των Gremlin και Twisted Gastrulation σε ποντικούς όπου έχει γίνει η ιστοειδική απενεργοποίηση τους στα δενδριτικά και B κύτταρα αντίστοιχα.**
Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση, ανοσοποιήσεις και καλλιέργειες δενδριτικών και B κυττάρων θα αναδείξουν τις όποιες επιρροές των γονιδίων αυτών στην συμπεριφορά των αντίστοιχων κυττάρων αλλά και την ανοσοαπόκριση στα περιφερικά λεμφικά όργανα.
- **Η αναγνώριση δικτύου/ων μετάδοσης σήματος των BMP στις διαδικασίες ανοσοαπόκρισης όπου εμπλέκεται η Twisted Gastrulation**

2 Υλικά και μέθοδοι.

Λεπτομερής λίστα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρατίθεται στην ενότητα 2.5.

2.1 Ποντικοί και *in vivo* πειράματα

2.1.1 Ποντικοί

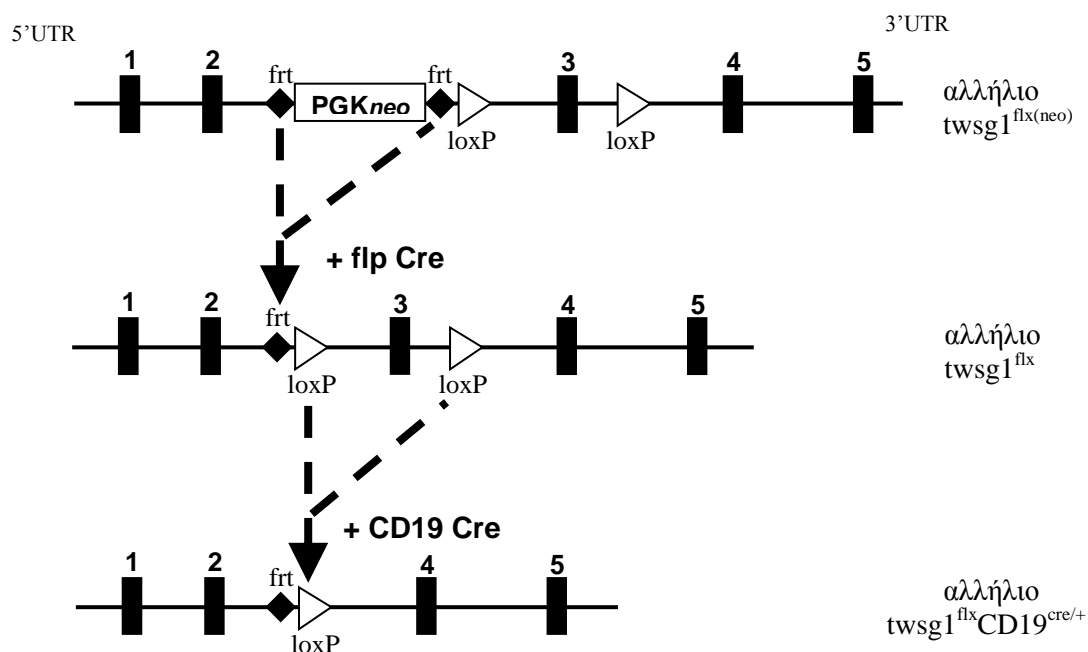
Οι ποντικοί που χρησιμοποιήθηκαν στα παρακάτω πειράματα έχουν ήδη περιγραφεί και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1

Ποντικός	Είδος διαγονιδιακής στόχευσης	Λειτουργία	Αναφορά
<i>Twsg1</i> ^{+/<i>lacZ</i>}	Knock-in	Αναγνώριση κυττάρων που εκφράζουν <i>twsg1</i>	(Gazzerro et al., 2006)
<i>Gremlin</i> ^{+/<i>lacZ</i>}	Knock-in	Αναγνώριση κυττάρων που εκφράζουν <i>gremlin</i>	(Khokha et al., 2003)
<i>Noggin</i> ^{+/<i>lacZ</i>}	Knock-in	Αναγνώριση κυττάρων που εκφράζουν <i>noggin</i>	(Brunet et al., 1998)
<i>Twsg1</i> ^{flx(neo)/+}	Knock-in	Στοχευμένη ιστοειδική απαλοιφή του <i>twsg1</i>	(Petryk et al., 2004)
<i>Gremlin</i> ^{flx/+}	Knock-in	Στοχευμένη ιστοειδική απαλοιφή του <i>gremlin</i>	(Gazzerro et al., 2007)
<i>p55KO</i>	Knock-in	Απαλοιφή του p55 TNF υποδοχέα	(Rothe et al., 1993)
<i>Cd19</i> ^{cre}	Knock-in	Απαλοιφή στοχευμένου γονιδίου στα B κύτταρα	(Rickert et al., 1997)
<i>Vav</i> ^{cre}	Knock-in	Απαλοιφή στοχευμένου γονιδίου στα αιμοποιητικά κύτταρα	(de Boer et al., 2003)
<i>Flp-cre</i>	Knock-in	Απαλοιφή neo κασέτας	(Rodriguez et al., 2000)

Οι ποντικοί *Twsg1*^{flx(neo)/+} διασταυρώθηκαν με *Flp-cre* για την εξαγωγή της neo κασέτας που προϋπήρχε δίνοντας *Twsg1*^{flx/+} και ακολούθως διασταυρώθηκαν με C57Bl/6 ποντικούς για τουλάχιστον έξι γενιές μέχρι και οκτώ γενιές. Για την ιστοειδική απαλοιφή του *twsg1* στα B κύτταρα, ποντικοί *Twsg1*^{flx/+} διασταυρώθηκαν με ομοίотυπους έτσι ώστε να γεννηθούν ποντικοί *Twsg1*^{flx/flx}. Οι F1 ομόζυγοι *Twsg1*^{flx/flx} απόγονοι στη συνέχεια διασταυρώθηκε με *Cd19*^{cre} ποντικούς δίνοντας *Twsg1*^{flx/flx}*Cd19*^{cre} (*Twsg1*-cKO) (Εικ. 2.1). Σε όλα τα επικείμενα πειράματα ο ποντικός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Twsg1*^{flx/flx}. Η ιστοειδική απαλοιφή

του *gremlin* στα αιμοποιητικά κύτταρα επιτυγχάνθηκε με παραπλήσιο τρόπο όπως του *twsg1*. Ποντικοί *Gremlin*^{flx/+} διασταυρώθηκαν με ομοιότυπους τους δίνοντας *Gremlin*^{flx/flx} απογόνους και στη συνέχεια με ποντικούς *Vav*^{cre} προκειμένου να γεννηθούν *Gremlin*^{flx/flx}*Vav*^{cre} (*Gremlin*-cKO).



Εικόνα 2.1 Εξαγωγή της neo κασσέτας και ιστοειδική απαλοιφή του *twsg1*
Ποντικοί *TwsG1*^{(flx(neo))} που στο στοχευμένο τους αλλήλιο έχει απομείνει η *neo* κασέτα διασταυρώθηκαν με *Flp*-cre deleter ποντικούς. Ο ανασυνδυασμός στις *frt* περιοχές επιτρέπει την εξαγωγή της *neo* κασσέτας. Η εξαγωγή του *neo* ελέγχθη με PCR. Στη συνέχεια τα ποντίκια *TwsG1*^{flx} διασταυρώθηκαν με ποντίκια *Cd19*^{cre} όπου ο ανασυνδυασμός στις *loxP* περιοχές έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του 3^{ου} *TwsG1* εξωνίου από τα B κύτταρα όπου βρίσκεται η καταλυτική περιοχή της TWSG1 πρωτεΐνης

2.1.2 Ανοσοποιήσεις

Για την επαγωγή θυμοεργαζαρτώμενης ανοσολογικής απόκρισης, χρησιμοποιήθηκε το ανοσογόνο του απτένιου (Keyhole Lympet Hemocyanin, KLH) δι-υδρόξυ-3-νιτροφαινυλ ακετυλίου (di-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl, DNP) (DNP-KLH). Στην πρωτογενή ανοσοποίηση χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά στα ποντίκια 100μg DNP-KLH σε PBS αναγμυόμενο 1:1 (v/v) με πλήρες ενισχυτικό του Freud (CFA). Μετά από 28 ή 70 ημέρες χορηγήθηκε η ίδια ποσότητα DNP-KLH σε PBS αναγμυόμενο με CFA. Ορός από την ουρά συλλέχθηκε 7 και 35 ή 14, 28, 70 και 77 ημέρες μετά την πρώτη ανοσοποίηση.

Το DNP-KLH αποκτήθηκε από την Calbiochem και το CFA από την SIGMA.

Σε μία ανεξάρτητη από τα T λεμφοκύτταρα ανοσοαπόκριση τύπου I (T-independent type 1 response, TI-1), οι υποδοχείς που προσομοιάζουν τους υποδοχείς Toll (Toll like receptors, TLRs) των B λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν συντηρημένα πρότυπα μικροοργανισμών που είναι προσδεδεμένα στο αντιγόνο. Προκειμένου να αξιολογηθεί η τύπου 1 ανεξάρτητη από τα T λεμφοκύτταρα ανοσοαπόκριση (TI-1) ποντικοί ηλικίας οκτώ έως δώδεκα εβδομάδων ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με 25 μικρογραμμάρια του απτένιου δι-υδροξυ-3-νιτροφενυλ ακετυλίου (di-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl, DNP) το οποίο ήταν συζευγμένο με λιποπολυσακχαρίτη (DNP-LPS) σε PBS.

Η τύπου 2 ανεξάρτητη από τα T λεμφοκύτταρα ανοσοαπόκριση των B λεμφοκυττάρων όχι μόνο δεν απαιτεί τα T λεμφοκύτταρα αλλά δε χρειάζεται ούτε τους TLRs. Αυτός ο τύπος ανοσοαπόκρισης των B κυττάρων διέπεται από την ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων ακόμα και σε καλλιέργειες όπου υπάρχουν αποκλειστικά B λεμφοκύτταρα. Έτσι, προκειμένου να διερευνηθεί η ανεξάρτητη από τα T λεμφοκύτταρα ανοσοαπόκριση τύπου 2 (T-independent type 1 response, TI-2), χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά στους ποντικούς 25μg DNP₃-φικόλλης σε PBS. Και στις 2 περιπτώσεις οι οροί συλλέχθηκαν μετά από 7 και 14 ημέρες. Το DNP-LPS και το DNP3-Ficoll αποκτήθηκαν από την Biosearch Technologies.

Διάλυμα PBS: 0.138M NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄, pH 7.4

2.2 Μεθόδοι Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας

2.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA

Προκειμένου να απομονωθεί το γενομικό DNA το τμήμα του ιστού ή τα κύτταρα επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C με 300μL διάλυμα TENS και 5μL πρωτεΐνάση K (από διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/ml) ανά δείγμα. Την επόμενη μέρα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 300μL «διάλυμα DNA» και αφού αναδεύτηκαν ισχυρά για 10 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν για 10min σε 13.000rpm. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν περίπου 250μL από την υπερκείμενη υδατική φάση με κομμένα ακρορύγχια (tips), για να αποφευχθεί η θραύση του γενομικού DNA. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια (eppendorf) και σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 480μL ισοπροπανόλης. Το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά μέχρι να σχηματιστεί μια ορατή λευκή μάζα, το DNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 6min

στις 13000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά ώστε να μην διαταραχτεί το DNA που ήταν ορατό ως ίζημα στον πυθμένα του erpendorf.

Στο σημείο αυτό σε κάθε δείγμα προστέθηκε 70% αιθανόλη προκειμένου να πλυθεί το DNA. Πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5min και αφού το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά το DNA αφέθηκε να στεγνώσει. Στο τέλος, επαναδιαλύθηκε σε 100μL H₂O.

Διάλυμα TENS (Tris EDTA NaCl SDS): 50mM Tris pH 8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 10% SDS

Διάλυμα DNA: φαινολη: χλωροφόρμιο: ισοαμλική αλκοόλη (1:1:25), 100mM Tris pH 8.0, 2.5mM EDTA

2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσδιορισθεί ο γονότυπος των ποντικών αλλά και σε πειράματα ημι-ποσοτικής αντίστροφης μεταγραφής. Τα αντιδραστήρια του μίγματος για την PCR όπως και οι συνθήκες, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήριο/Διάλυμα	Όγκος	Πρόγραμμα PCR		
		Βήμα	Θερμ.	Χρόνος
Διάλυμα PCR	2.0μL	1.	95°C	5min
Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl ₂) 1M	1.2μL	2.	95°C	1min
Δεόξυ-νουκλεοτίδια (dNTP) 2.5mM	0.9μL	3.	57°C	5min
Μίγμα εκκινητών	0.4μL	4.	72°C	1min 30sec
Απομονωμένο DNA	0.5μL	Επιστροφή στο Βήμα 2, 34 φορές		
Ταq πολυμεράση	0.3μL	5.	14°C	15min
Διπλά-απεσταγμένο νερό (ddH ₂ O)	14.7μL	Τέλος		

Τα μείγματα των εκκινητών (primer sequence) που χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλή γενοτύπωση γονιδίων είναι τα ακόλουθα. Οι αλληλουχίες τους παρατίθενται στην ενότητα 2.6.

TwsGI^{+lacZ}: D18/D19/D20

TwsGI^{flx/+}: D25/D182, D183/D184

Gremlin^{+lacZ} και *Noggin*^{+lacZ}: D25/D34, D126/D127

Gremlin^{flx/+}: D139/D140

neo: D13/D16

Cd19^{cre}: D118/D119, D135/D136

Vav^{cre}: D169/D170

Στα προϊόντα της PCR προστέθηκαν 5μL Orange G και το μείγμα ηλεκτροφορέθηκε σε γέλη 1.5% αγαρόζης με διάλυμα 1X TBE.

10X διάλυμα PCR: 0.5M KCl, 0.1M Tris pH 9.0, 1% Triton-X

Orange G: 50% (w/v) Σουκρόζη, 0.25% (w/v) Orange G

10X διάλυμα TBE: Για 1lt διάλυμα, 103g Tris, 55g Βορικό οξύ, 9.3g EDTA σε dH₂O

2.2.3 Απομόνωση γενωμικού RNA, παραγωγή cDNA και αντιστρεπτής μεταγραφής - αλυσιδωτη αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TRIZOL (Invitrogen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του δείγματος προσδιορίζεται με φωτομέτρηση. Για κάθε δείγμα 2mg RNA μεταγράφηκαν αντιστρεπτά σε cDNA χρησιμοποιώντας superscript II (Invitrogen).

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών NucleoSpin RNA II της Macherey-Nagel (Γερμανία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του δείγματος προσδιορίζεται με φωτομέτρηση. Για την παρασκευή cDNA 5-10mg ολικού RNA σε τελικό όγκο 6μL τοποθετήθηκε σε μικροσωληνίσκο των 0,5mL. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 80pmol oligo dT προς υβριδισμό όλων των πολυαδενυλιωμένων μεταγραφημάτων (polyA+). Το μείγμα επώαστηκε τους 65°C για 5min. Μετα το περας του υβριδισμού, η αντίδραση μεταφέρθηκε στους 37°C όπου προστέθηκαν τα ακόλουθα:

	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα RT	1X	4μL
DTT	10mM	2 μL
BSA	1X	2 μL
dNTPs	0,25mM	2 μL
Αναστολέας ριβονουκλεασών (RNAsin)	40U	1 μL
ddH ₂ O		4 μL
MMLV-RT	200U	1 μL

Η αντίδραση επωάστηκε για 1hour στους 37°C και ακολούθησε κατακρήμνη των cDNA προϊόντων με προσθήκη 1/10 5M NaCl και 2 όγκων αιθανόλης. Τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 50-100μL ddH₂O και ήταν έτοιμα για αντιδράσεις PCR.

Ημι-ποσοτική RT-PCR πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές αραιώσεις 1:5 σε διάλυμα που περιείχε 1,2μL MgCl₂ (25 mM), 4μL μίγματος που περιείχε dNTPs, 0,4μL μίγματος εκκινητών, 3μL Taq πολυμεράσης. Οι συνθήκες του προγράμματος για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι όπως αναφέρονται στον πίνακα της ενότητας 2.2.2. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο παράρτημα A2.

2.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών

5 x 10⁶ B λεμφοκύτταρα επαναιωρήθηκαν σε RPMI που περιείχε 1% FBS και μετά από 1hour στέρησης από ορό υπέστησαν ερεθισμό με 1 μg/mL LPS και (κατά περίπτωση) 100 ng/mL rBmp2. Τα κύτταρα υπέστησαν λύση μετά από διάφορα επιθυμητά χρονικά διαστήματα ερεθισμού σε διάλυμα RIPA (30μL διαλύματος RIPA ανα 10⁶ κύτταρα). Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 13,000rpm για 15min όπου και συλλέχτηκε το υπερκείμενο.

Διάλυμα RIPA: 50mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF/ 1X αναστολείς των πρωτεασών

2.2.5 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολούθηθηκε όπως περιγράφεται από τον Laemmli (1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πήκτες διαχωρισμού 10 και 13% όπως παρείστανται στον παρακάτω πίνακα.

<u>Πηκτή επιστέγασης</u>	<u>3 mL</u>	<u>Πηκτή διαχωρισμού 10% (13%)</u>	<u>10 mL</u>
dH ₂ O	2.1	dH ₂ O	4.0 (2.7)
30% ακρυλαμύδιο	0.5	30% ακρυλαμύδιο	3.3 (4.6)
1.0M Tris pH 6.8	0.38	1.5M Tris pH 8.8	2.5
10% SDS (w/v)	0.03	10% SDS (w/v)	0.1
10% APS (w/v)	0.03	10% APS (w/v)	0.1
TEMED	0.003	TEMED	0.004

Υπολογίστηκε η περιεκτικότητα κάθε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πρωτεΐνη ώστε να αναλυθούν δείγματα με ίσες ποσότητες πρωτεΐνης Πριν από την ηλεκτροφόρηση στα δείγματα προστέθηκε 5X διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 1:5v/v. Τα δείγματα

βράστηκαν για 5min, φυγοκεντρήθηκαν στις 11000rpm για 1min στους 4°C και ψύχτηκαν σε πάγο για τουλάχιστον 10min. 10μg ολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα φορτώθηκαν στην πηκτή και διαχωρίστηκαν με σύστημα Mini-Protean II (Bio-rad) σε 1X διάλυμα ηλεκτροφόρησης για κατάλληλο χρονικό διάστημα, στα 90-100Volt. Ως δείκτης πρότυπων μοριακών βάρων χρησιμοποιήθηκε το Prestained MW Standards της Invitrogen.

30% ακρυλαμίδιο (29:1): 29.2g ακρυλαμίδιο, 0.8g bis-ακρυλαμίδιο σε 100mL dH₂O τελικό όγκο

5X διάλυμα φόρτωσης: 250mM Tris pH 6.8, 9.2% (w/v) SDS, Μπλέ της βρωμοφαινόλης (w/v), 40% (w/v) Γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη

1X Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 3.03g Γλυκίνη, 14.4g Tris, 0.1% SDS

2.2.6 Στύπωμα (ανοσοαποτύπωση) κατά Western

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε σε ειδική διάταξη και πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman) σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, διαπιστώνεται με χρώση της μεμβράνης με ειδική κόκκινη χρωστική (ponceau, 0,1% Ponceau S σε 5% glacial acetic acid).

Διάλυμα μεταφοράς: 6g Tris 24.4g Γλυκίνη, 1600mL dH₂O, 400mL μεθανόλη

Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και υπέστη κατεργασία με διάλυμα επικάλυψης (blocking), (PBS 1X με 0.1% Tween-20, 5% BSA) για τουλάχιστον 1hour . Το διάλυμα επικάλυψης αφαιρέθηκε, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS, προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween20, 1% BSA και ακολούθησε επώαση όλη την νύχτα στους 4°C. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο Παράρτημα Α2.

Το πρώτο αντίσωμα, απομακρύνθηκε ξεπλένοντας τρεις φορές από δέκα λεπτά με PBS 1X, το οποίο περιέχει 0.1% Tween20 (PBS-T). Στη συνέχεια προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα, σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween20, 1% BSA, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο. Η επώαση έγινε για 1hour και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS-T για την μη ειδική απομάκρυνση και του δεύτερου αντισώματος.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL plus ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Amersham). Η ανίχνευση του σήματος επιτεύχθηκε με Biomax film (Kodak).

Η μεμβράνη στην οποία είχε προστεθεί το πρώτο αντίσωμα, υπέστη την διαδικασία της απομάκρυνσης αντισώματος (stripping). Με την διαδικασία αυτή, απομακρύνθηκαν τα αντισώματα που είχαν προηγουμένως προσδεθεί στις θέσεις που αντιστοιχούσαν στην μελετώμενη πρωτεΐνη, καθώς και στις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Η μεμβράνη με το διάλυμα απομάκρυνσης αντισώματος (stripping) τοποθετήθηκε σε μια πλαστική συσκευασία επιτρέποντας την διεξαγωγή αντίδρασης για 30min στους 50°C. Αφαιρέθηκε το διάλυμα stripping και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 10min με PBS-T. Τέλος αφαιρέθηκε το διάλυμα πλύσης και πραγματοποιήθηκε επανάληψη της αντίδρασης με διαφορετικά αντισώματα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί συνολικά 2 φορές.

Διάλυμα απομάκρυνσης αντισώματος (stripping buffer): 12, ml 0.5 M Tris pH 6.8, 2 ml 10% SDS, 700μL β-μερκαπτοαιθανόλη, τελικός όγκος διαλύματος 100 ml.

2.3 Μέθοδοι Ανοσολογίας

2.3.1 Παρασκευή αιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων από λεμφικό ιστό

Οι ποντικοί θανατώθηκαν με ασφυξία που προκλήθηκε από CO₂. Όργανα όπως ο θύμος, ο σπλήνας και οι λεμφαδένες απομονώθηκαν και μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο Petri των 60mm που περιείχε περίπου 1ml παγωμένου PBS. Από το σημείο αυτό όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στον πάγο. Ακολούθως, τα όργανα ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια γυάλινου εμβόλου σε μεταλλικό δίχτυ (cell dissociation sieve) σε διάλυμα FACS.

Προκειμένου να απομονωθούν κύτταρα του μυελού των οστών, αφού θανατώθηκε ο ποντικός, αφαιρέθηκε το δέρμα από τα πόδια τα οποία και αποκόπηκαν από το ζώο. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν οι μυς, κόπηκαν οι αρθρώσεις και φυλάχθηκαν τα καθαρά πλέον οστά σε falcons των 15mL σε διάλυμα FACS. Τα οστά μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο Petri όπου πραγματοποιήθηκε έκπλυση της κοιλότητας του οστού που περιέχει τον μυελό εισάγοντας σε αυτό βελόνα 20-25G προσαρτημένη σε

σύριγγα των 5ml και απελευθερώνοντας περίπου 1ml διάλυμα FACS σε κάθε οστό. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής το οστό κρατείται υπό γωνία 45 μοιρών με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας πάνω από τρυβλίο Petri. Ο μυελός και των 2 οστών του ζώου συλλέχθηκε στο ίδιο τρυβλίο. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία συλλογής του μυελού δημιουργήθηκε ένα ομοιογενές εναιώρημα που απαρτίζεται από μεμονωμένα κύτταρα (single cell suspension). Το εναιώρημα αυτό μεταφέρθηκε σε πλαστικό σωλήνα κωνικού πυθμένα των 15mL. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C για 10min. Ακολούθως, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα ACK και επωάστηκαν στον πάγο για 2-5min προκειμένου να επέλθει λύση των ερυθροβλαστών όταν αυτό ήταν επιθυμητό. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στους 4°C για 10min. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα FACS και μετρήθηκαν.

Τα εκλυόμενα περιτοναϊκά μακροφάγα απομονώθηκαν από ποντικούς τρεις μέρες μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 1ml θρεπτικού θειογλυκολλικού (Thioglycollate broth). Οι ποντικοί θυσιάστηκαν, έγινε έγχυση 2 ml RPMI-10%FBS στην περιτοναϊκή κοιλότητα και αναρρόφηση μετά από μαλάξεις στην περιοχή της κοιλιάς. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 1000rpm για 10min στους 4°C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10ml RPMI-10% FBS. Το αρχικό περιτοναϊκό εξίδρωμα περιέχει 90% μακροφάγα 2-3% ουδετερόφιλα, 2% ηωσινόφιλα, 1% ιστιοκύτταρα και 2-3% λεμφοκύτταρα (Thorens, 1987).

Διάλυμα FACS: 25mL Fetal Bovine Serum (FBS), 0.05g NaN₃ σε τελικό όγκο 475μL PBS

Διάλυμα ACK: 0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH 7.2

2.3.2 Χρώση φθορισμού για κυτταρομετρία ροής (FACS)

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο. Εναιωρήματα μεμονωμένων κυττάρων 50μL που περιέχει 10⁶ κύτταρα εναποτίθεται σε φρεάτιο πλάκας V-bottom 96 φρεατίων. Για την χρώση των κυττάρων προστίθεται διάλυμα FACS που περιέχει φθοριογόνα αντισώματα στην κατάλληλη αραίωση και 1μg/mL CD16/32 για την κάλυψη των Fc υποδοχέων. Πλήρης λίστα των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται παρατίθεται στην ενότητα 2.5.4. Τα κύτταρα επωάζονται για 15min στο σκοτάδι. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 100μL διαλύματος FACS και η πλάκα φυγοκεντρείται για 5min στις 1500rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα κύτταρα

πλένονται με 200μL διάλυμα FACS και φυγοκεντρώνται ξανα, εναποτίθενται σε 150-250μL PBS και μεταφέρονται σε σωλήνα Falcon.

Για να ανιχνευθούν τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα ακολούθησε επώαση με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με κατάλληλο φθοριογόνα κατά περίπτωση. Για την ανίχνευση του γονιδίου αναφοράς lacZ τα κύτταρα επωάζονται με 2mM FDG (Fluorescein, di-β-D-Galactopyranoside) φθοριογόνο (Marker Gene Technologies) στους 37°C για 1min πριν την χρώση με αντισώματα.

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής επιβίωσης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρώση για αννεξίνη V και Propidium Iodide. Οι αννεξίνες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που προσδένονται σε φωσφολιπίδια και εξαρτώνται από το ασβέστιο. Η αννεξίνη V αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφατιδυλοσερίνη εντοπίζεται πρωταρχικά στην εσωτερική στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, που αντικρίζει το κυτταρόπλασμα. Κατά την έναρξη της απόπτωσης, η φωσφατιδυλοσερίνη χάνει την ασύμμετρη της διάταξη στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα και μετατοπίζεται στην εξωκυτταρική στιβάδα όπου εκεί αναγνωρίζει κύτταρα προς φαγοκυττάρωση. Από τη στιγμή που η PS βρεθεί στην εξωκυτταρική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της αννεξίνης V που έχει συζευχθεί με φθοριόχρωμα, κατά τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου.

Στα αρχικά αποπτωτικά στάδια, η πλασματική μεμβράνη αποκλείει την είσοδο χρωστικών βιωσιμότητας όπως είναι το PI (Propidium Iodide). Ως εκ τούτου, τα κύτταρα που βρίσκονται σε αυτό το στάδιο θα βαφούν μόνο με αννεξίνη V η οποία ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμος δείκτης της απόπτωσης. Ωστόσο, σε μεταγενέστερα αποπτωτικά στάδια, η κυτταρική μεμβράνη χάνει την ακεραιότητά της. Έτσι, τα κύτταρα που βρίσκονται σε προχωρημένη απόπτωση θα αλληλεπιδράσουν, τόσο με την αννεξίνη V, όσο με από το PI. Ακριβώς επειδή η αννεξίνη V εξαρτάται από την παρουσία ασβεστίου είναι κρίσιμο η χρώση να γίνει σε διάλυμα πρόσδεσης αννεξίνης V.

Διάλυμα Πρόσδεσης σε Αννεξίνη (10 X): 0,1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂. Η χρώση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1X

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο FACSCanto II και χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό DIVA v6 (Becton Dickinson). Τα γραφήματα

κυτταρομετρίας ροής καταγράφηκαν με το πρόγραμμα FlowJo (Tree Star, Inc). Διαφορές στους υποπληθυσμούς των κυττάρων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το unpaired student t test όπως υπολογίστηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Graphpad Prism 5.

2.3.3 Ανοσοϊστοχημεία

Οι ιστοί που συλλέχθηκαν εμβαπτίστηκαν απευθείας στην ουσία κρυοσυντήρησης OCT (BDH) και αμέσως ψύχτηκαν σε ατμό από υγρό άζωτο. Πραγματοποιήθηκαν τομές κρυοστάτη πάχους 5-6μm, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλυμμένες με ζελατίνη. Οι τομές αφέθηκαν να στεγνώσουν το λιγότερο για 30min, μονιμοποιήθηκαν σε παγωμένη ακετόνη για 10min και επανυδατώθηκαν σε PBS. Στη συνέχεια εναποτέθηκαν σε διάλυμα οξειδάσης της γλυκόζης [glucose oxidase (GO)] σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3hours. Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται η απενεργοποίηση του ενδογενούς ενζύμου της υπεροξειδάσης. Η απενεργοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου είναι απαραίτητη καθώς παρεμβαίνει σε τεχνικές χρώσης που χρησιμοποιούν το ένζυμο χρενοπεροξειδάση (HRP) και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂). Έπειτα οι πλάκες ξεπλύθηκαν με PBS και εναποτέθηκαν σε PBS/5%FBS για 30min. Στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα αντισώματος (αντίσωμα στην κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS/5%FBS) για 1hour. Στη συνέχεια οι πλάκες ξεπλύθηκαν με PBS και τοποθετήθηκε το δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με -HRP ή -AP (αλκαλική φωσφατάση) για 1hour. Στην περίπτωση που το αντίσωμα είναι συζευγμένο με βιοτίνη (biotin) τότε ακολουθήθηκε ένας νέος γύρος εκπλύσεων και μετά τοποθετήθηκε Straptavidin-HRP ή Streptavidin-AP. Για τον εντοπισμό του HRP χρησιμοποιήθηκε η χρώση DAB για 5min και για του AP το πακέτο υλικών Blue Alkaline Phosphatase Substrate kit (Vector Labs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά το τέλος της διαδικασίας χρώσης η αντίδραση σταμάτησε με H₂O. Στις τομές τοποθετήθηκε υλικό σταθεροποίησης Mowiol® (Sigma) και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Οι τομές αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο.

Διάλυμα GO: 50mL PBS, 6.5mg NaN₃, 0.180g β-D(+) γλυκόζη, 5mg οξειδάση της γλυκόζης (από A. niger)

Χρώση DAB: 1mL PBS, 0.01g DAB, 0.5μL 30%H₂O₂

Χρώση lac-Z Οι τομές μονιμοποιήθηκαν σε παγωμένο φρέσκο διάλυμα μονιμοποίησης για 5min και ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS/2mM MgCl₂. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση και εναποτέθηκε σε αυτές διάλυμα χρώσης-lacZ. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες επώαστηκαν κατά τη διάρκεια την νύχτας σε ειδικά υγρά κουτιά στους 37°C. Την επόμενη μέρα οι πλάκες ξεπλύθηκαν με PBS/2mM MgCl₂. Ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας από το στάδιο εφαρμογής απενεργοποίησης της ενδογενούς υπεροξειδάσης.

Διάλυμα μονιμοποίησης: PBS, 0.01% Na deoxycholate, 0.02% NP-40, 2% Φορμαλδεΰδη, 2% Γλουτεράλδεΰδη

Διάλυμα χρώσης lac-Z: 0.1M διάλυμα Na Phosphate pH7.3, 2mM MgCl₂, 0.01% Na deoxycholate, 0.02% NP-40, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 1mg/ml X-gal

2.3.4 ELISA

Οι συγκεντρώσεις αντισωμάτων έναντι ειδικών αντιγόνων στον ορό προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ELISA. Για το προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων των Ig σε συνθήκες μη ενεργοποίησης στον ορό αλλά και στην περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικών, NUNC υψηλής προσδετικής ικανότητας δισκία 96 οπών επιστρώθηκαν με 2μg/mL anti-mouse Ig(H+L) απομονωμένο από αίγα σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης για 1hour. (Ο τελικός όγκος σε αυτή τη διαδικασία ήταν 100μL σε κάθε οπή). Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές με PBS/ 0.05% Tween20. Οι οροί που απομονώθηκαν από ποντικούς και από τα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών αραιώθηκαν σε τέσσερις διαδοχικές συγκεντρώσεις και προστέθηκαν σε κάθε οπή του δισκίου για 2hours. Μετά το πέρας των 2hours, οι οπές ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS/ 0.05% Tween20. Οι ανοσοσφαιρίνες Igs ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας goat anti-mouse IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA σημασμένα με HRP για 1,5hours σε διάλυμα PBS/ 0.05% Tween20. Ακολούθησε ξέπλυμα όπως και στα προηγούμενα βήματα και ένα τελικό με PBS. Στη συνέχεια ακολούθησε χρώση με διάλυμα OPD μέχρι την εμφάνιση χρώματος. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 50μL 2M H₂SO₄. Τα δισκία φωτομετρήθηκαν σε OD₄₉₀.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών IgM, IgG2b και IgG3 στις *in vitro* καλλιέργειες. Ειδικές αντί-DNP ανοσοσφαιρίνες Igs ανιχνεύθηκαν στους ορούς που συλλέχθηκαν επιστρώνοντας τα δισκία με 1μg/mL DNP-BSA (από την Calbiochem). Για τον προσδιορισμό της ωρίμανσης συνάφειας

των αντισωμάτων τα δισκία επιστρώθηκαν με 1mg/mL DNP₃₁-BSA (χαμηλή/υψηλή συνάφεια) ή DNP₃-BSA (υψηλή συνάφεια). Ακολούθησε χρώση με διάλυμα OPD (O-Phenylene Diamine) και τα δισκία φωτομετρήθηκαν σε OD₄₉₀. Οι τιμές που προέκυψαν μετατράπηκαν σε τυχαίες μονάδες (arbitrary units A.U.) μετά από σύγκριση με ένα άθροισμα ορών από την ομάδα ελέγχου.

Ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης: 0.795g Na₂CO₃ και 1.47g NaHCO₃ σε 500mL τελικό όγκο H₂O pH 9.6)

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (150mM): 7.3g Κιτρικό οξύ και 11,86g Na₂HPO₄·H₂O σε 1000μL τελικό όγκο H₂O pH 5.0)

Διάλυμα χρώσης OPD: (150mM Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης, 0.4mg/mL OPD, 0.03% H₂O₂.)

2.3.5 ELISPOT

Για την ανίχνευση των πλασματοκυττάρων που εκκρίνουν IgM χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ELISPOT. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλάκες MAIP N4510 Multiscreen IP (Millipore, Germany) 96 οπών. Την προηγούμενη μέρα πριν την απομόνωση οι οπές βράχθηκαν με 35% αιθανόλη για 1min και μετά πλύθηκαν 2 φορές με PBS. Στη συνέχεια επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C (όπως και σε όλη τη μέθοδο που ακολουθεί) με 1μg/mL DNP-BSA. Την επόμενη μέρα οι οπές μπλοκαρίστηκαν με complete RPMI-10%FBS (Ενότητα 2.4.1) και προστέθηκαν 10⁶ B κύτταρα απομονωμένα από ανοσοποιημένους ποντικούς με DNP-Ficoll 4 ημέρες πριν. Οι πλάκες επώαστηκαν για 24hours. Την επόμενη μέρα οι πλάκες επώαστηκαν με βιοτινυλιωμένο anti-mouse IgM, πλύθηκαν με PBS/ 0.05% Tween 20 για 2hours και ακολούθησε επώαση με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP για 45min. Η ανίχνευση έγινε χρησιμοποιώντας AEC Peroxidase Substrate Kit, 3-amino-9-ethylcarbazole (Vector Labs, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα σημεία (spots) μετρήθηκαν σε A.EL.VIS Eli.Expert 4-Plate ELISPOT Reader (A.EL.VIS, GmbH).

2.3.6 Απομόνωση B κυττάρων

Για την απομόνωση των B κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες MACS (Miltineyi Biotech). Σπλήνες από ποντικούς σε σωληνάκια με PBS μεταφέρθηκαν σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας και ακολούθηθηκε η διαδικασία δημιουργίας

αιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων (Ενότητα 2.3.1). Στο αιώρημα μεμονωμένων κυττάρων προστέθηκαν μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμένα με αντί-CD19 (Miltineyi Biotech) για 15min στους 4°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με διάλυμα FACS 3 φορές. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στις στήλες MACS και η απομόνωση τους έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το θετικό κλάσμα (CD19⁺ κύτταρα) αναλύθηκε με FACS με ποσοστό καθαρότητας >98% κάθε φορά.

2.4 Μέθοδοι Κυτταρικής Βιολογίας

2.4.1 Καλλιέργεια Β κυττάρων

Τα απομονωμένα Β κύτταρα ερεθίστηκαν με τα παρακάτω αντιδραστήρια (μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς): αντί-CD40 (FGK-45, ευγενική προσφορά του Dr. A. Rolink, Πανεπιστήμιο της Βασιλείας, Βασιλεία, Ελβετία), αντί-IgM F(ab)₂, LPS (Sigma), 100 ng/mL rBmp2, rTwsg1 και 1μg/mL rChordin. Προκειμένου να μετρηθεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, απομονωμένα Β λεμφοκύτταρα σε πλήρες RPMI διάλυμα μεταφέρθηκαν σε πιάτα των 96 οπών και σε πυκνότητα 2×10^5 κυττάρων ανά οπή. Τα κύτταρα σημάνθηκαν με 0.5 μCi ³H-θυμιδίνη ανά οπή για 16hours πριν συλλεχθούν. Η ³H-θυμιδίνη μετρήθηκε σε Beckman LS 6500 μετρητή σπινθηρισμού. Προκειμένου να επιτευχθεί ενεργοποίηση Β κυττάρων, τα κύτταρα ερεθίστηκαν με 5μg/mL αντί-IgM F(ab)₂ ή με 1μg/mL LPS για 24hours, ενώ για να επαχθούν πλασματικά κύτταρα, τα Β κύτταρα επώαστηκαν με 1μg/mL LPS για 72hours. Οι ανοσοσφαιρίνες (IgGs) που εκκρίθηκαν στο υπερκείμενο, μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA (όπως προαναφέρθηκε), μετά από ερεθισμό με 1μg/mL LPS και 7 ημέρες καλλιέργειας. Όλες οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν σε επωαστήρα (37°C, 5% CO₂).

IX πλήρες RPMI (500mL): 10% v/v RPMI 1640 stock, 5% v/v FBS (heat inactivated), 100U/mL Πενικιλίνη, 100μg/mL Στρεπτομυκίνη, 50μM 2-μερκαπτοαιθανόλη

2.4.2 Καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό των οστών

Ο μυελός των οστών περιέχει ένα πλήθος από πρόδρομα κύτταρα της μυελώδους σειράς, τα οποία παρουσία των κατάλληλων ερεθισμάτων και συγκεκριμένα παρουσία του παράγοντα GM-CSF, διαφοροποιούνται και μετατρέπονται σε δενδριτικά κύτταρα. Τα παραγόμενα κύτταρα αντιπροσωπεύουν ώριμα δενδριτικά κύτταρα των ιστών και της περιφέρειας.

Στη συγκεκριμένη διαδικασία από τους ποντικούς αφαιρέθηκε το δέρμα από τα πόδια τα οποία και αποκόπηκαν από το ζώο. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν οι μυς, κόπηκαν οι αρθρώσεις και φυλάχθηκαν τα καθαρά πλέον οστά σε falcons των 15 mL σε διάλυμα FACS. Αφού μαζεύτηκαν όλα τα femur και tibia (άνω και κάτω τμήματα των ποδιών του ποντικού), τοποθετήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής για να υπάρχουν αποστειρωμένες συνθήκες. Για να αποστειρωθούν τα κομμένα μέρη, αφέθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα σε αποστειρωμένη 70% αιθανόλη και έπειτα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο που περιείχε αποστειρωμένο PBS. Χρησιμοποιώντας σύριγγες ινσουλίνης και RPMI ασκήθηκε πίεση κατά μήκος του αυλού, μέχρι που ο μυελός ωθήθηκε έξω από τον αυλό. Τα διάφορα τμήματα του μυελού περισυλλέχθηκαν και μετατράπηκαν σε μονοκύτταρο εναιώρημα μετά από δίοδο διαμετρήματος 26G. Το εναιώρημα συλλέχθηκε σε σωλήνες κωνικού πυθμένα (15ml) και ο όγκος αυξήθηκε στα 10ml. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλύθηκαν προσθέτοντας διάλυμα ACK με σκοπό την αφαίρεση των ερυθροκυττάρων. Φυγοκεντρήθηκαν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλύθηκαν σε RPMI. Επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση για πλύση και τέλος επαναδιάλυση σε 20ml RPMI. Ο GM-CSF επάγει διαφοροποίηση των κυττάρων της μυελώδους σειράς σε δενδριτικά κύτταρα. Στρώθηκαν 10^7 κύτταρα σε τρυβλία βακτηριακού τύπου και τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα σε συνθήκες 37°C με 5% CO₂ για 2 ημέρες. Κάθε 3 ημέρες το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα κύτταρα από κάθε τρυβλίο χωρίστηκαν σε 2 νέα τρυβλία για την αποφυγή κορεσμού των κυττάρων. Η επώαση διήρκησε 10-12 ημέρες, μετά το πέρας της οποίας η πλειονότητα των κυττάρων βρισκόταν στην προσδεδεμένη φάση της καλλιέργειας.

Για την ενεργοποίηση των κυττάρων προστέθηκε στα τρυβλία 100ng/mL LPS και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24hours. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και ακολούθησε χρώση με διάφορους δείκτες ενεργοποίησης. Στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής, όπως στην ενότητα 2.3.2.

2.4.3 Καλλιέργεια μακροφάγων από μυελό των οστών

Για την καλλιέργεια μακροφάγων από το μυελό των οστών ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία όπως στην 2.4.2. Χρησιμοποιήθηκε ο M-CSF για την επαγωγή των μακροφάγων σε διάλυμα RPMI με 20% L-medium. Το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν κάθε 3 ημέρες με την επώαση να κρατά για 10-12 ημέρες. Η διαδικασία

διαφοροποίησης γίνεται αντιληπτή με την παρουσία προσδεδεμένων κυττάρων στον πυθμένα των τριβλίων. Αυτό οφείλεται στην επαγωγή μορίων πρόσδεσης των μακροφάγων κατά την διαφοροποίηση, όπως του μορίου επιφανείας Mac-1. Επειδή η πρόσδεση σε κανονικά τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας πολυστυρενίου δεν είναι εύκολα αναστρέψιμη, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία βακτηριακού τύπου (10cm²). Έτσι όταν τα κύτταρα πλησίασαν σε συνθήκες κορεσμού, διαχωρίστηκαν μηχανικά με απόξεση. Στο τέλος της επώασης κύτταρα αποκολλήθηκαν μηχανικά. Σε κάθε πιάτο προστέθηκε 5ml από το διάλυμα αποκόλλησης και αφού επώαστηκαν τα κύτταρα για 5min στον επωαστήρα, αναδεύτηκαν μηχανικά για να αποκολληθούν. Μεταφέρθηκαν σε σωλήνα (falcon) χωρητικότητας 15ml και προστέθηκαν άλλα 5ml RPMI. Αφού φυγοκεντρήθηκαν και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml RPMI. Για την χρήση των κυττάρων για την απομόνωση RNA, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία πολυστυρενίου (10cm²) κυτταροκαλλιέργειας και σε πυκνότητα 1×10^7 κύτταρα/τριβλίο.

2.4.4 Καλλιέργειες εκλυόμενων περιτοναϊκών μακροφάγων

Τα εκλυόμενα περιτοναϊκά μακροφάγα (elicited-peritoneal macrophages) αποτελούν έναν πειραματικά διαφοροποιημένο κυτταρικό τύπο, ο οποίος αντιπροσωπεύει τα φλεγμονώδη μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά δημιουργούνται μετά από έκθεση περιφερικών μονοκυττάρων σε εξωγενή ερεθίσματα, όπως το βακτηριακό θρεπτικό μέσο Thioglycollate Broth. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά έχουν τη μέγιστη ικανότητα παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών.

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 4% Thioglycollate (TG) σε PF-ddH₂O μετά από βρασμό και αποστείρωση. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C σε μη διαπερατές από φως φιάλες, διότι είναι φωτοευαίσθητο και διάσπαση των περιεχόμενων ουσιών του οδηγεί στην απελευθέρωση ριζών οξυγόνου, που μπορούν να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα. Στη συνέχεια χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά 1ml TG σε ποντικούς ηλικίας 8 εβδομάδες και άνω. Μετά από 3 ημέρες, οι ποντικοί θανατώνονται και τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας συλλέγονται με έκχυση και απορρόφηση 5ml θρεπτικού μέσου RPMI-5. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 1000rpm για 10min στους 4°C και κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 10ml RPMI. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας και επωάζονται (σε κλίβανο 37°C, 5% CO₂) για μία 1hour. Το αρχικό περιτοναϊκό έκχυμα εμπεριέχει 90% μακροφάγα, 2%-3% ουδετερόφιλα, 2% ηωσινόφιλα, 1% ιστιοκύτταρα και 2% με 3% λεμφοκύτταρα. Κατά

την διάρκεια της επώασης μόνον τα μακροφάγα προσκολλώνται στον πυθμένα του τριβλίου. Μετά το πέρας της επώασης, τα μη προσκολλημένα κύτταρα αφαιρούνται με έκπλυση και η τελική καλλιέργεια περιέχει μακροφάγα σε ποσοστό 99%. Τέλος τοποθετούνται 10^6 μακροφάγα ανά τρυβλίο και ερεθίζονται με 100ng/μL LPS για 6 ή 18hours όπου και συλλέγονται για την απομόνωση RNA.

2.5 Υλικά

2.5.1 Εξοπλισμός

Φυγόκεντροι	Heraeus, Eppendorf
Συσκευές ηλεκτροφόρησης	Biorad
Επωαστικοί κλίβανοι κυτταροκαλλιέργειας (CO ₂)	Thermo
UV transilluminator. Gel documentation system	GDS 8000-UVP-UK
Θερμικός κυκλοποιητής	MJ research
Συσκευή PAGE/ στυπώματος (Western)	Biorad
Φωτόμετρο πλακών 96 φρεατίων	MRX. DYNATECH
Μικροσκόπια	NIKON
Κρυοτόμος	Thermo Fisher Scientific
Phosphoimager STORM860	Molecular Dynamics
Coulter Particle Counter	Beckman-Coulter
FACS Canto II™	BD biosciences
Rotor Gene 6000	Corbett
Πιπέττες (P2, P20, P200, P1000)	Gilson
Pipette boy	Eppendorf

2.5.2 Αναλώσιμα

Τρυβλία Petri	Conring
Κωνικοί σωλήνες	Sarstedt
Πλάκες μικροσκοπίου	Manzel-Glaser
Πλάκες επίπεδου πάτου 24, 48, 96 φρεατίων	Conring
Πλάκες V-πάτου 96 φρεατίων	Conring
Πλάκες NUNC (ELISA)	Conring

Πλαστικές Πιπέττες (2, 5, 10 και 25mL)	Sarstedt
Ειδικά ακρορύγχια	Sarstedt
Σωληνάκια χωρητικότητας 0,5 και 1,5mL	Sarstedt
Σωλήνες χωρητικότητας 15 και 50mL (Falcon)	BD Biosciences
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Whatman
Πλαστικές σύριγγες	BD Biosciences
Βελόνες	BD Biosciences
Nylon mesh 40mm	Sefar
Χαρτί Whatman	Whatman

2.5.3 Χημικά, αντιδραστήρια και ένζυμα

2-μερκαπτοαιθανόλη	Sigma
2-μερκαπτοαιθανόλη (κυτταροκαλλιέργεια)	Gibco
Αγαρόζη	Applichem
Αιθανόλη	Riedel-de Haën
Ακετόνη	Riedel-de Haën
Ακρυλαμίδιο	Riedel-de Haën
B-D-γλυκόζη	Sigma
Βρομιούχο Αιθύδιο	Invitrogen
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Γλουτεράλδεϋδη (25%)	Sigma
Γλυκερόλη	Sigma
Γλυκίνη	Sigma
Γλυκόζη	Riedel-de Haën
Θειικό οξύ	Riedel-de Haën
Ισοαμλική αλκοόλη	Riedel-de Haën
Ισοπροπανόλη	Riedel-de Haën
Λιποπολυσακχαρίτης (LPS)	Riedel-de Haën
Μεθανόλη	Riedel-de Haën
Υδροχλωρικό οξύ	Sigma
Φαινόλη	Sigma
Φορμαλδεϋδη	Sigma

Annexin V	BP Pharmigen
CFA	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
FBS	Gibco
Ipegal (NP-40)	Sigma
$K_3Fe(CN)_6$	Riedel-de Haën
$K_4Fe(CN)_6$	Sigma
KCl	Sigma
KH_2PO_4	Riedel-de Haën
$MgCl_2$	Riedel-de Haën
Mowviol	Sigma
Na_2CO_3	Riedel-de Haën
NaCl	Riedel-de Haën
Na_2HPO_4	Riedel-de Haën
NaH_2PO_4	Riedel-de Haën
$NaHCO_3$	Riedel-de Haën
NaN_3	Fluka
O-phenylenediamine (OPD)	Sigma
Polyvinylpyrrolidone	Sigma
Propidium Iodide	Fluka
Protein Marker	Sigma
RPMI medium	Gibco
rBMP2	Peprotech
rTwsg1	R n D
rChrocin	R n D
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma
Sodiumdeoxycholate	Sigma
TEMED	Fluka
Tris base	Sigma
Triton-X	Fluka
Tween-20	Fluka
X-gal	Sigma

2.5.4 Αντισώματα και δευτερογενή αντιδραστήρια

Ειδικότητα Αντισώματος	Κλώνος	Σήμανση	Εφαρμογή	Εταιρία
a-Smooth muscle actin (α -SMA)	1A4		W	Sigma
B-actin	AC-15		W	Sigma
BMP2	πολυκλωνικό		IHC	Peptotech
B220	RA3-6B2	PE, bio	F, IHC	Biolegend
CD11b (Mac1)	M1/70	PE, bio	F, IHC	Biolegend
CD11c	HL3	FITC, bio	F, IHC	BD Pharmigen
CD16/32	2.4.G2		F	BD Pharmigen
CD19	5D5	APC, FITC	F	eBioscience
CD21/CD35	7E9	APC, PE	F	Biolegend
CD23	B3B4	FITC, PE-Cy7	F	Biolegend
CD25	PC61	Alexa700, APC	F	Biolegend
CD3 ϵ	145-2C11	FITC	F	BD Pharmigen
CD3 ϵ	KT3		IHC	BD Pharmigen
CD40	1C10	PE	F	eBioscience
CD40	FGK-45		TC	Dr A. Rolink
CD43		Bio	F	BD Pharmigen
CD45.1	A20	APC-Cy7	F	eBioscience
CD45.2	104	Alexa700	F	eBioscience
CD5	53-7.3	FITC	F	Biolegend
CD69	H1.2F3	PE-Cy7	F	Biolegend
CD80	16-10A1	Alexa647	F	Biolegend
CD86	PO3	PE-Cy7	F	Biolegend
CD117 (c-kit)	2B7	PE-Cy7	F	BD Pharmigen
CD138	2B8	APC	F	Biolegend
DEC-205	NLDC145		IHC	Biolegend
F4/80	BM8	Bio	IHC	eBioscience
FDC	FDC-M1		IHC	BD Pharmigen
GL7	GL-7	Bio, FITC	F, IHC	eBioscience
Gr-1	RB6-8C5	PE-Cy7	F	eBioscience
Gremlin	πολυκλωνικό		IHC	RnD Systems
IgD	11-26c.2a	FITC, PE	F	Biolegend
IgM (Fab) ₂	πολυκλωνικό	FITC, HRP, bio	F, E	Southern Biotech
IgM (Fab) ₂	πολυκλωνικό		TC	Southern Biotech
IgA	πολυκλωνικό	HRP	E	Southern Biotech
MHC-II ^{I-ab}	AF6-120.1	FITC	F	Biolegend
MOMA-2	MOMA-2		IHC	Serotec
mouse IgG	πολυκλωνικό	HRP	E	Southern Biotech
mouse IgG1	πολυκλωνικό	HRP	E	Southern Biotech
mouse IgG2a	πολυκλωνικό	HRP	E	Southern Biotech
mouse IgG2b	πολυκλωνικό	HRP	E	Southern Biotech
mouse IgG3	πολυκλωνικό	HRP	E	Southern Biotech
mouse Ig (M+G+A)	πολυκλωνικό		E	Southern Biotech
Goat IgG	πολυκλωνικό	AP, HRP, bio	IHC, W	Southern Biotech

Ειδικότητα Αντισώματος	Κλώνος	Σήμανση	Εφαρμογή	Εταιρία
Rabbit IgG	πολυκλωνικό	AP, HRP, bio	IHC	Southern Biotech
Rat IgG	πολυκλωνικό	AP, HRP, bio	IHC, W	Southern Biotech
pSmad1/5/8	πολυκλωνικό		W	Cell Signaling
Smad1	πολυκλωνικό		W	Sigma
Streptavidin		HRP	IHC	Vector Labs
Streptavidin		AP	IHC	Southern Biotech
Streptavidin		APC, PE, PerCP	F	BD Pharmigen
Twsg1	πολυκλωνικό		W	RnD Systems

Επεξήγηση: **F:** κυτταρομετρία ροής **E:** ELISA **IHC:** ανοσοϊστοχημεία
W: στύπωμα κατά Western **TC:** κυτταροκαλλιέργεια

2.6 Εκκινητές γενοτύπωσης των ποντικών και RT-PCR

Γενοτύπωση *Twsg1^{+lacZ}*:

D18: 5'-AGA CAC AGC AGG AAC GTC AG-3'

D19: 5'-CTC CAT GTC TGA GTA GTT TGC-3'

D20: 5'-GGG AAC AAA CGG ATT GAC CG-3'

Γενοτύπωση *Twsg1^{+flx}*:

D25: 5'-ACT TTC TCC CCA CCC GTC TA-3'

D182: 5'-CAT TGA TGG CTC ACA GCA GTC-3'

D183: 5'-TGG TCC TGA TGA ACA CCG AG-3'

D184: 5'-TTT CAG GTC AGC CTG GTC TG-3'

Γενοτύπωση *Gremlin^{+lacZ}* και *Noggin^{+lacZ}*:

D25: 5'-ACT TTC TCC CCA CCC GTC TA-3'

D34: 5'-AAC AAC AAT GGC ACA ACC TAA T-3'

D126: 5'-TGG TCG CTG GGG AAT GAA TC-3'

D127: 5'-GCC AAA ATC ACC GCC GTA AG-3'

Γενοτύπωση *Gremlin^{+flx}*:

D139: 5'-TGG CAG AAA GAA TGA TAC CAG CC-3'

D140: 5'-ACA GGT CAC ACA GTG AAT TTG CC-3'

Γενοτύπωση *neo*:

D13: 5'-CGT GGT CTC GAG AAG TTC-3'

D16: 5'-AAA CAG GAG TGG TCA GCA-3'

Γενοτύπωση *Cd19^{cre}*:

D118: 5'-AGA CTC TTT AGT GAG CAT TTT CAA C-3'

D119: 5'-AGC CCA ATT TCC ACA ACT TC-3'

D135: 5'-ATT ACC GGT CGA TGC AAC GAG T-3'

D136: 5'-CAG GTA TCT CTG ACC AGA GTC A-3'

Γενοτύπωση *Vav*^{cre}:

D169: 5'-CTG GCT GTG AAG ACC ATC CAA C-3'

D170: 5'-GCA TTC TCC CAC CAT CGG TG-3'

RT-PCR

- Bmp2*:** D97: 5'-TAC CGC AGG CAC TCA GG-3'
D98: 5'-CAT TCC ACC CCA CAT CAC T-3'
- Bmp4*:** D99: 5'-CGA GGC GAC ACT TCT ACA G-3'
D100: 5'-TGG GGG CTT CAT AAC CT-3'
- Bmp5*:** D4: 5'-AGC GGC TGG GTT CAA GT-3'
D5: 5'-AGG TGG GCT CTG GGT AGT-3'
- Bmp6*:** D6: 5'-TCT TCT TCG GGC TTC CTC TA-3'
D7: 5'-CAA ATT CCA GCC AAC CTT CT-3'
- Bmp7*:** D54: 5'-AGG AGG GCT GGT TGG TGT-3'
D55: 5'-GGT GGC GTT CAT GTA GGA GT-3'
- Noggin*:** D52: 5'-CTC TAC GCC CTG GTG GTG-3'
D53: 5'-AAG CCC GGG TCG TAG TG-3'
- Gremlin*:** D2: 5'-CTG TTT CCG GCT GGT GTT-3'
D3: 5'-AAC AGC CGC ACT ATC ATC AA-3'
- Twsg1*:** D109: 5'-AGG GGG CGT GGA CAT TG-3'
D110: 5'-CTG TGT CTC CCC GTG TCC-3'
- Chordin*:** D105: 5'-CAA GCC TCA GCG GAA GAA-3'
D106: 5'-CAA GCC CAG CCA ATA GAA CT-3'
- Alk-1*:** D115: 5'-GGC CGA TAT GGT GAG GTG-3'
D116: 5'-TGT TGC CGA TAT CCA GGT AA-3'
- Alk-2*:** D88: 5'-GCC CAG CTG CCC ACT AA-3'
D89: 5'-CAG CTG CCC CTC CAT ACT T-3'
- Alk-3*:** D58: 5'-AAG GCC GCT ATG GAG AAG T-3'
D59: 5'-AGC GGT TAG ACA GCA TTG G-3'
- Alk-6*:** D60: 5'-ACC CGG CCA TAA GTG AAG-3'
D61: 5'-CAG ATG GGG GTG GAG GTC-3'
- BmpR-II*:** D62: 5'-AGA AGC CTG GAA AGA AAA TAG C-3'
D63: 5'-TGT GGC GTG CAA ATG TGT-3'
- ActR-II*:** D86: 5'-GTG GCC ACC GAG GAG AAC-3'
D87: 5'-CCG GGT GTG CTG AAG ATT T-3'

Blimp1: D225: 5'-TTG TCG GGA CTT TGC GGA G-3'
D226: 5'-TGG AAG ACG GAA GGG GAC TG-3'

Irf4: D235: 5'-TTG CTG AGC CAC CTG GAG AG-3'
D236: 5'-TGG ATG GAA GAA TGA CGG AGG-3'

Xbp1: D229: 5'-GCA GCA AGT GGT GGA TTT GG-3'
D230: 5'-TTC TGG GGA GGT GAC AAC TGG-3'

Mitf: D231: 5'-GCA ACG GAA CAG CAA CGA G-3'
D232: 5'-CAA CAG GTG AGA GGG CAT CG-3'

Bcl6: D227: 5'-AGT CGG GAC ATC TTG ACG GAC-3'
D228: 5'-TCA GGA ACT CTT CAC GGG GAG-3'

Pax5: D233: 5'-AGT GGC ATC CTG GGC ATC AC-3'
D234: 5'-GGG CTC GTC AAG TTG GCT TTC-3'

Gapdh: D192: 5'-TCT TCT TGT GCA GTG CC-3'
D193: 5'-ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3'

Αποτελέσματα.

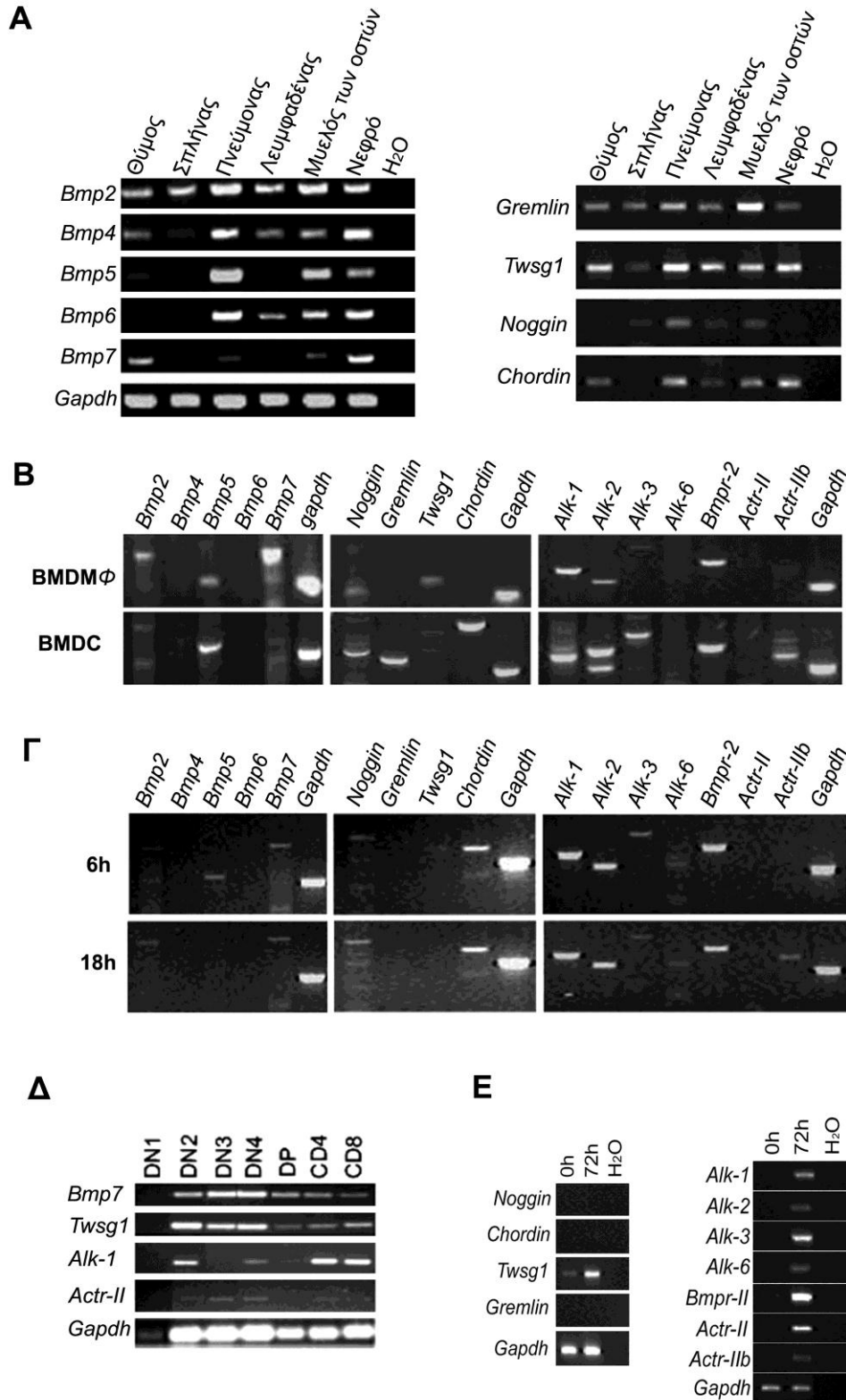
3.1 Έκφραση των γονιδίων που απαρτίζουν το δίκτυο σηματοδότησης BMP σε ιστούς και κύτταρα του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος

Τα κύτταρα ενός ενήλικου σπονδυλωτού οργανισμού που παράγουν τα μακρομόρια τα οποία απαρτίζουν το δίκτυο σηματοδότησης BMP παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Η μελέτη των BMPs σε ενήλικους ιστούς απαιτεί τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων αυτών από ιστούς και κύτταρα, δίνοντας έτσι μία γενική πρώτη εικόνα προσδιορισμού του πιθανού ρόλου τους στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Συνεπώς, ο πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η χαρτογράφηση των γονιδίων που αποτελούν το δίκτυο σηματοδότησης BMP συμπεριλαμβανομένων των BMPs, των ανταγωνιστών τους και των υποδοχέων τους, αρχικά στα λεμφικά όργανα και κατά συνέπεια σε διάφορους τύπους κυττάρων που τα απαρτίζουν. Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αυτών σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο RT-PCR, απομονώνοντας RNA από διάφορα όργανα ή κυτταρικούς τύπους φυσιολογικού ποντικού. Οι BMPs καθώς και οι ανταγωνιστές τους φαίνεται να εκφράζονται από μια ευρεία γκάμα οργάνων που συσχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και τις λειτουργίες του, όπως θύμος αδένας, σπλήνας, λεμφαδένες και μυελός των οστών (Εικόνα 3.1A). Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα τα γονίδια των BMPs καθώς και αυτά των ανταγωνιστών τους εκφράζονται στο μυελό των οστών, την κύρια περιοχή παραγωγής αιμοποιητικών κυττάρων στον ενήλικα. Έτσι εξετάστηκαν δενδριτικά (BMDC) και μακροφάγα (BMDMΦ) κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών και διαφοροποιημένα *in vitro* (Εικόνα 3.1B). Παρατηρήθηκε ότι τα BMDCs εκφράζουν μόνο *bmp5* αλλά αρκετούς ανταγωνιστές όπως *noggin*, *gremlin* και *chordin*. Επίσης εκφράζουν σχεδόν όλους τους BMP υποδοχείς εκτός του *actR-II*. Τους ίδιους σχεδόν BMP υποδοχείς εκφράζουν και τα BMDMΦs. Σε αντίθεση όμως με τα BMDCs, τα BMDMΦs εκφράζουν *bmp2*, *bmp5*, *bmp7*, *noggin* και *twsg1*. Μολονότι τα δενδριτικά και τα μακροφάγα προέρχονται από κοινό μυελώδη πρόγονο, εκφράζουν διαφορετικά *bmps* και *bmp* ανταγωνιστές σε αντιστοιχία με τους διαφορετικούς ρόλους τους στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού.

Η περιτοναϊκή κοιλότητα είναι πλούσια σε πληθυσμούς ώριμων μακροφάγων. Εξετάστηκε κατά πόσο τα ώριμα μακροφάγα εκφράζουν *bmps* και κατ' επέκταση αν μετά από ερεθισμό η οποιαδήποτε έκφραση των γονιδίων αυτών διαφοροποιείται. Συνεπώς, μακροφάγα απομονώθηκαν από την περιτοναϊκή κοιλότητα φυσιολογικού ποντικού και ερεθίστηκαν *ex vivo* με LPS για 6 και 18hours (Εικόνα 3.1Γ). Στο διάστημα των 6hours μετά τον ερεθισμό δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκφραση των *bmps*, των ανταγωνιστών και των υποδοχέων σε σύγκριση με τα BMDMs. Στις 18hours όμως υπάρχει έλλειψη του *twsg1* γονιδίου σε σχέση με τις 6hours. Αυτό αναδεικνύει μια πιθανή δυναμική ως προς την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που απαρτίζουν το BMP δίκτυο. Η δυναμική αυτή αποτυπώνεται ξεκάθαρα στην περίπτωση των B κυττάρων όπου υπάρχει υπέρ-ρύθμιση στην έκφραση του *twsg1* καθώς και όλων των BMP υποδοχέων σε απομονωμένα B κύτταρα μετά από ερεθισμό με LPS (Εικόνα 3.1Ε).

Τέλος όσον αφορά τα T κύτταρα έχειδειχθεί ότι εκφράζουν *bmp2/4*, *twsg1* και διάφορους υποδοχείς των BMP (Bleul and Boehm, 2005; Hager-Theodorides et al., 2002). Η έκφραση των γονιδίων αυτών εξετάστηκε λεπτομερώς σε απομονωμένα T κύτταρα κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης τους στο θύμο αδένα. Και σε αυτή την περίπτωση, υπάρχει υπο-ρύθμιση στην έκφραση του *bmp7* και *twsg1* από το στάδιο όπου τα T κύτταρα είναι διπλά-θετικά (DP) έως ώριμα (CD4, CD8) σε σχέση με τα διάφορα στάδια των «διπλά-αρνητικών» (Εικόνα 3.1Δ). Επίσης και οι υποδοχείς παρουσιάζουν μεταβολές ως προς την έκφρασή τους ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν την παρουσία των γονιδίων που απαρτίζουν το BMP δίκτυο σηματοδότησης σε ιστούς και μεμονωμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Περαιτέρω, η ρύθμιση της έκφρασης μερικών από αυτά σε διάφορα στάδια κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, προϋποθέτει για την εμπλοκή ενός ή και πολλαπλών BMP δικτύων ρυθμίζοντας έτσι διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες.

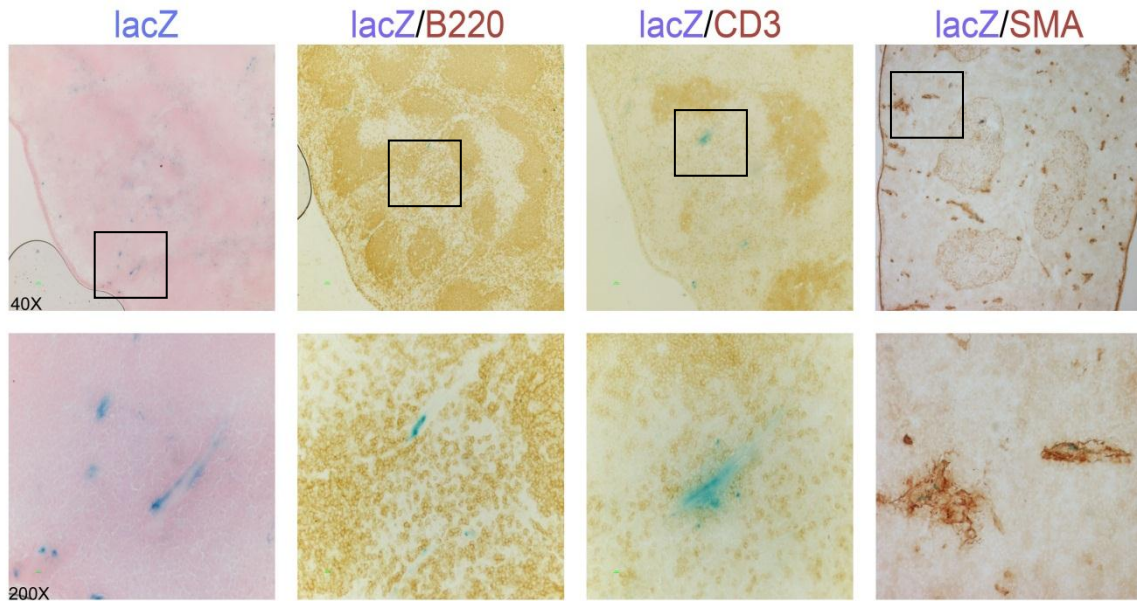


Εικόνα 3.1 Έκφραση του BMP δικτύου σηματοδότησης στο ανοσοποιητικό σύστημα RT-PCR των *bmps* των ανταγωνιστών και των υποδοχών τους σε **A**) διάφορα λεμφικά όργανα, **B**) δενδριτικά και μακροφάγα αναπτυγμένα από μυελό των οστών, **Γ**) μακροφάγα απομονωμένα από την περιτοναϊκή κοιλότητα ερεθισμένα με LPS για 6 και 16hours, **Δ**) Τ θυμοκύτταρα απομονωμένα σε διάφορα στάδια στην ανάπτυξη τους, **Ε**) απομονωμένα Β κύτταρα ερεθισμένα με LPS για 72hours. Το RNA απομονώθηκε από φυσιολογικούς ποντικούς.

3.2 Έκφραση του *noggin* στο σπλήνα

Η μετάδοση του σήματος των BMPs σε κύτταρα στόχους ρυθμίζεται από τους ανταγωνιστές των BMPs. Οι BMP ανταγωνιστές μπορούν να προσδεθούν σε παραπάνω από ένα BMP και σε άλλες περιπτώσεις να μπλοκάρουν ταυτόχρονα ένα BMP σήμα. Η μελέτη των ανταγωνιστών των BMPs μπορεί να δώσει μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα των λειτουργιών του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος στις οποίες μπορεί να εμπλέκονται τα BMP σήματα. Σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη και η χαρτογράφηση της τοπολογίας έκφρασης των BMP ανταγωνιστών *in vivo* σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Έτσι δίνεται μία εικόνα από το μικροπεριβάλλον όπου μπορεί να λειτουργούν οι BMP ανταγωνιστές. Κυρίως, με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η μελέτη των γονιδίων των BMP ανταγωνιστών *in vivo* προσδιορίζοντας την ιστοειδική απαλοιφή τους από συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο μελετήθηκαν τα γονίδια *noggin*, *gremlin* και *twisted gastrulation* χρησιμοποιώντας για το καθένα από αυτά ξεχωριστούς ποντικούς αναφοράς *lacZ*.

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης του *noggin* χρησιμοποιήθηκε ο ποντικός *Noggin^{+lacZ}*. Η έκφραση του *noggin* είναι εμφανής στο σπλήνα όπως φαίνεται από τη μπλε *lacZ* χρώση (Εικόνα 3.2). Τα κύτταρα που εκφράζουν *noggin* υπάρχουν στο λευκό και στον ερυθρό πολφό. Το πρότυπο της χρώσης δεν προμηνύει παραγωγή του *noggin* από B ή T λεμφοκύτταρα και επιβεβαιώνεται από τις διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις *lacZ* με B (B220) και T (CD3) κυτταρικούς δείκτες όπου δεν διακρίνεται κάποιος συνεντοπισμός. Πιθανότατα κύτταρα που αποτελούν τη διαφραγματική αρτηρία ή φλέβα καθώς και τα αρτηριόλια να εκφράζουν *noggin*. Οι ιστοί αυτοί αποτελούνται κυρίως από υψηλό ενδοθήλιο ή επιθήλιο και μαλακό μυϊκό ιστό. Αυτό επαληθεύεται με την ανίχνευση του *lacZ* σε κύτταρα που έχουν βαφτεί με αντίσωμα για μαλακό μυϊκό ιστό (SMA).



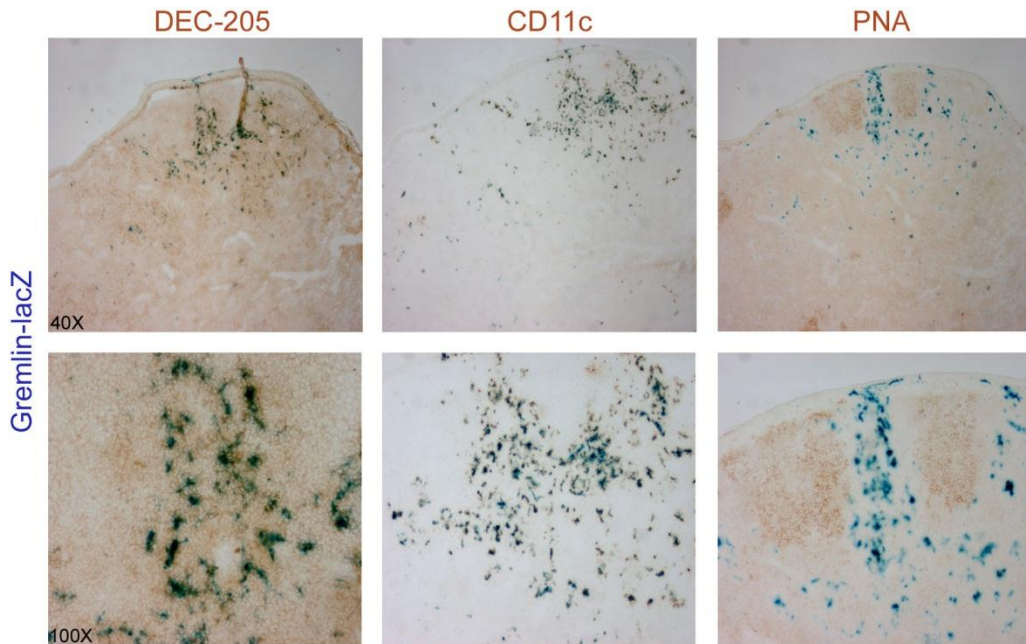
Εικόνα 3.2 Ανίχνευση του *noggin* μέσω του *lacZ* γονιδίου αναφοράς στο σπλήνα σε ποντικό *noggin*^{+lacZ}. Χρώση X-gal σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία για κυτταρικούς δείκτες B (B220), T (CD3) κυττάρων και μαλακού μυϊκού ιστού (SMA).

3.3 Το *gremlin* στα αιμοποιητικά κύτταρα

3.3.1 Έκφραση του *gremlin* και φαινοτυπική ανάλυση του *Gremlin*^{+lacZ}

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης του *gremlin* χρησιμοποιήθηκε ο ποντικός *Gremlin*^{+lacZ}. Σε χρώση X-gal που πραγματοποιήθηκε αρχικά στο σπλήνα και στους λεμφαδένες δεν παρατηρήθηκε κάποιο συγκεκριμένο τοπολογικό πρότυπο που να προδίδει κάποιον κυρίαρχο κυτταρικό πληθυσμό. Τα κύτταρα που εξέφραζαν *lacZ* ήταν λίγα και διάσπαρτα στην κάψα, στον ερυθρό και λευκό πολφό. Μετά από ανοσοποίηση με DNP-KLH σε CFA παρατηρήθηκε έκφραση του *lacZ* σε σημεία ανάμεσα στις περιοχές των βλαστικών κέντρων. Παρατηρείται συνεντοπισμός ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν *gremlin* και παράλληλα τους δείκτες DEC-205 και CD11c ταυτοποιώντας έτσι την έκφραση του *gremlin* από τα δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 3.3). Όπως αναμενόταν, τα B κύτταρα των βλαστικών κέντρων (PNA) δεν εκφράζουν *gremlin*. Στο σπλήνα παρατηρήθηκε το ίδιο όμως σε πολύ μικρότερη κλίμακα.

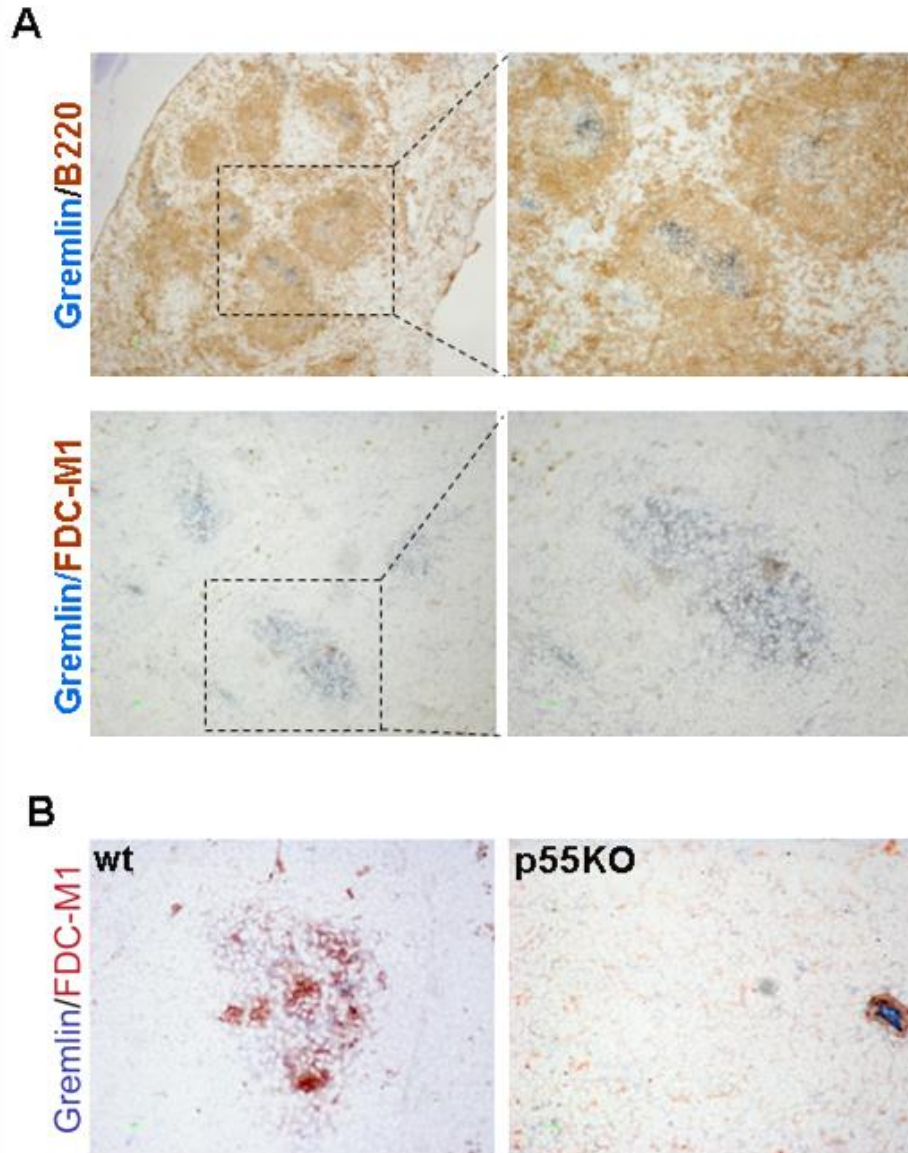
Παρόλο που σε επίπεδο έκφρασης mRNA το *gremlin* ανιχνεύεται στο σπλήνα φυσιολογικού ποντικού, δεν παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο στον ποντικό *Gremlin*^{+lacZ} στη χρώση *lacZ*. Για την περαιτέρω διερεύνηση των κυττάρων που εκφράζουν



Εικόνα 3.3 Ανίχνευση του *gremlin* μέσω του *lacZ* γονιδίου αναφοράς στους λεμφαδένες σε ποντικούς *Gremlin^{+lacZ}*. Χρώση X-gal σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία για κυτταρικούς δείκτες δενδριτικών κυττάρων (DEC-205 και CD11c) και B κυττάρων των βλαστικών κέντρων (PNA).

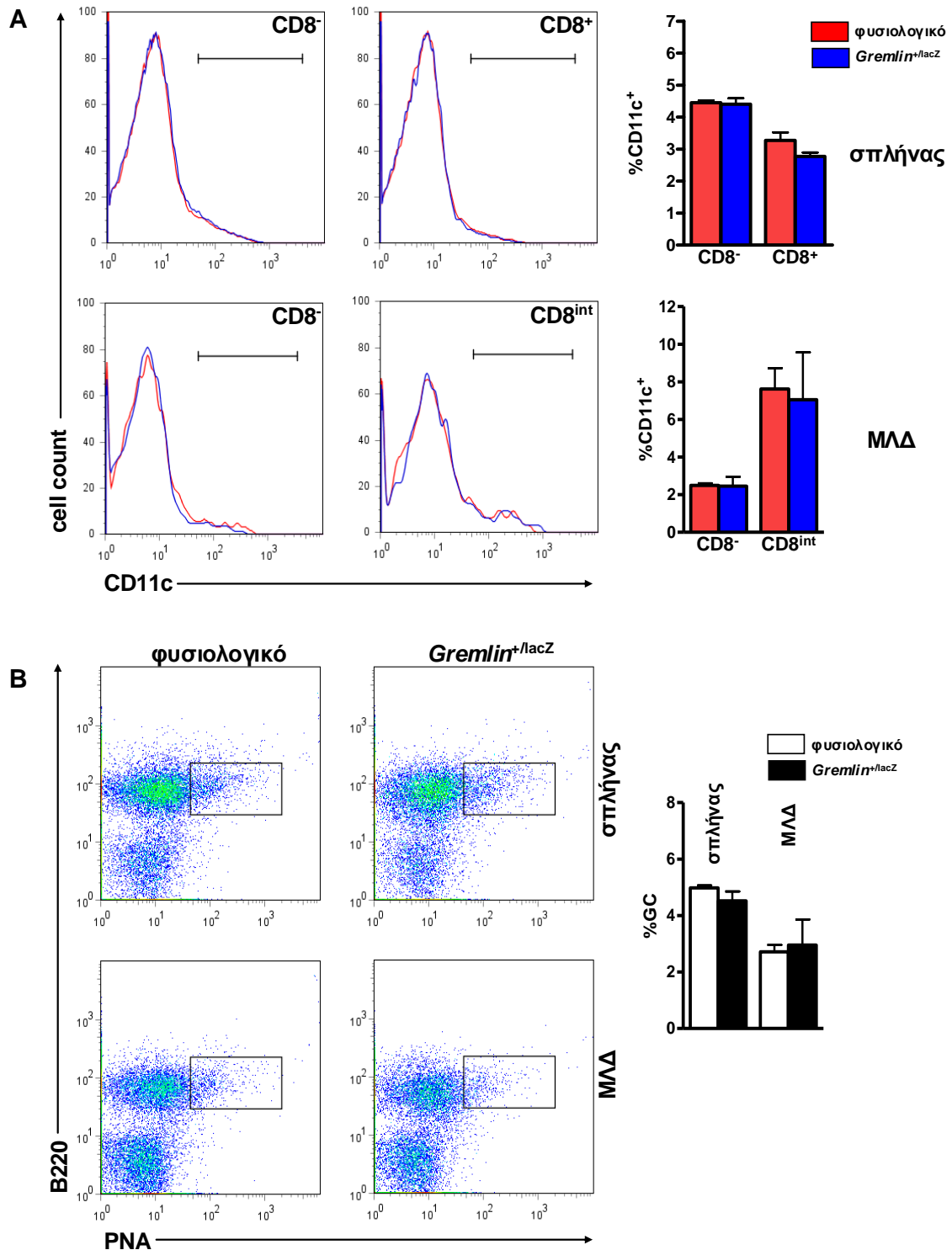
gremlin εξετάστηκε η παραγωγή πρωτεΐνης Gremlin στο σπλήνα με τη χρησιμοποίηση αντί-*gremlin*. Διπλή ανοσοϊστοχημεία σε σπλήνες από φυσιολογικούς ποντικούς έδειξε ότι παράγεται *gremlin* από τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα (ΘΔΚ) (Εικόνα 3.4). Αρχικά εντοπίστηκε η Gremlin συγκεντρωμένη σε περιοχές ανάμεσα στα θυλάκια του σπλήνα. Έπειτα ανιχνεύτηκε συνεντοπισμός της Gremlin με το δείκτη των ΘΔΚ FDC-M1. Η απουσία του TNF υποδοχέα p55 στον ποντικό (p55KO) έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία των ΘΔΚ από το σπλήνα (Pasparakis et al., 1996). Η μη ανίχνευση Gremlin στο σπλήνα των p55KO ποντικών (Εικόνα 3.4B) αποτελεί ακόμα μία ένδειξη της παραγωγής Gremlin από τα ΘΔΚ.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προδίδουν πιθανό ρόλο του *gremlin* στην ανάπτυξη και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και των ΘΔΚ. Διερευνήθηκε αρχικά η τυχόν επιρροή της απουσίας ενός αλληλίου *gremlin in vivo* (χρησιμοποιώντας τον ποντικό *Gremlin^{+lacZ}*) στα κύτταρα αυτά καθώς τα όποια ευρήματα παρουσιαστούν θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν οδηγοί αποσαφήνισης των πιθανών ανοσοποιητικών στις οποίες μπορεί να εμπλέκεται το *gremlin*. Χρησιμοποιήθηκε η ανοσοποίηση με DNP-KLH σε CFA καθώς θα μπορούν να μελετηθούν ταυτόχρονα πιθανές αλλαγές α) στα ποσοστά λεμφοειδών και μυελωδών κυττάρων σε ένα



Εικόνα 3.4 Τα ΘΔΚ εκφράζουν Gremlin **A)** Ανίχνευση πρωτεΐνης Gremlin στα ΘΔΚ μέσω διπλής ανοσοϊστοχημείας σε φυσιολογικούς ποντικούς. **B)** Μη ανίχνευση της Gremlin σε ποντικούς *p55KO* που δεν αναπτύσσουν ΘΔΚ.

ενεργοποιημένο περιβάλλον, β) στα ποσοστά των ΒΚ Β κυττάρων καθώς ένας από τους κύριους παράγοντες ανάπτυξης τους είναι τα ΘΔΚ. Η ανάλυση στα κύτταρα αυτά έγινε σε φυσιολογικούς και *Gremlin*^{+lacZ} ποντικούς, 12 ημέρες μετά από την ανοσοποίηση τους, όπου τα ποσοστά των ΒΚ είναι στο μέγιστο. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορές στα ποσοστά των λεμφοειδών και μυελωδών δενδριτικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά των ΒΚ ανάμεσα στους φυσιολογικούς και *Gremlin*^{+lacZ} ποντικούς. Φαίνεται ότι η μονοαλληλική έλλειψη του *gremlin* δεν είναι αρκετή ώστε να επηρεάσει την



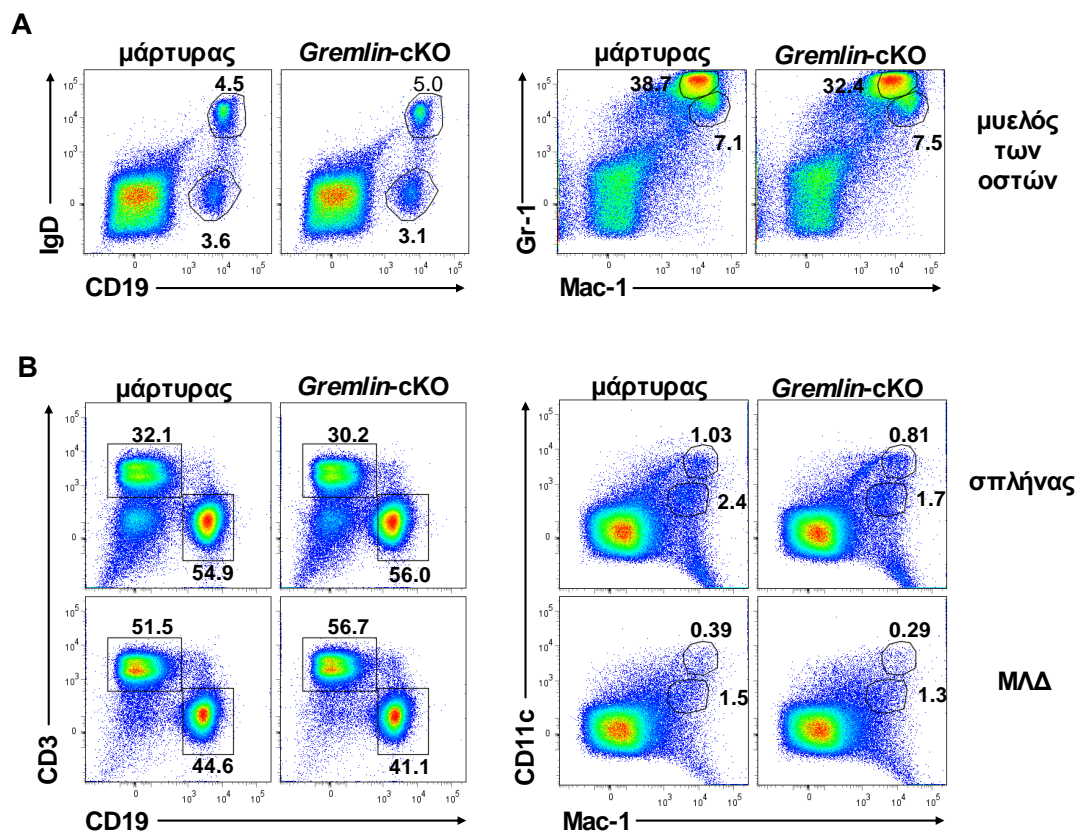
Εικόνα 3.5 Ανάπτυξη δενδριτικών κυττάρων και Βλαστικών Κέντρων μετά από θυμοεξαρτώμενη ανοσοποίηση. Κυτταρομετρία ροής σε φυσιολογικούς ποντικούς και *Gremlin*^{+lacZ} ($n = 3$) 12 ημέρες μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση DNP-KLH σε CFA. Ποσοστά **A**) των λεμφοειδών ($CD8^+CD11c^+$ ή $CD8^{int}CD11c^+$) και μυελωδών ($CD8^-CD11c^+$) δενδριτικών **B**) Βλαστικών Κέντρων ($B220^+PNA^+$) σε σπλήνα και ΜΛΔ αντίστοιχα.

ανάπτυξη των δενδριτικών κυττάρων ή την συμμετοχή τους στις θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις. Παρόλα αυτά, η συμμετοχή του *gremlin* στις διαδικασίες ανάπτυξης των δενδριτικών κυττάρων ή την διαμόρφωση του ΒΚ δεν μπορεί πλήρως να αποκλειστεί.

3.3.2 Απαλοιφή του *gremlin* από τα αιμοποιητικά κύτταρα

Για την περαιτέρω μελέτη του *gremlin* στις λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων είναι απαραίτητη η ιστοειδική απαλοιφή του από τα δενδριτικά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε ο ποντικός που φέρει δυο περιοχές floxed στο κάθε αλληλίο του *gremlin* (*Gremlin^{flx/flx}*) (Gazzerro et al., 2007) και διασταυρώθηκε με τον ποντικό *Vav^{cre}* (de Boer et al., 2003). Ο *Vav^{cre}* ποντικός χρησιμοποιείται για την απαλοιφή γονιδίου από τα αιμοποιητικά κύτταρα: επιλέχτηκε σε αυτή την περίπτωση, διότι έχει υψηλό ποσοστό ανασυνδυασμού σε σχέση με άλλους οδηγούς. Επίσης το *gremlin* δεν φαίνεται να εκφράζεται από άλλους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων (Εικόνα 3.1) και συνεπώς η διασταύρωση του *Gremlin^{flx/flx}* με το *Vav^{cre}* δεν εμπνέει κινδύνους για ανάμιξη πιθανών φαινοτύπων.

Ο ποντικός με απαλειμμένο το *gremlin* (*Gremlin-cKO*) από τα αιμοποιητικά κύτταρα δεν φαίνεται να έχει κάποια ανωμαλία ως προς την ανάπτυξη των λεμφοειδών οργάνων. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για διάφορους πληθυσμούς μυελωδών κυττάρων καθώς και των Β κυττάρων στο μυελό των οστών δεν έδειξε διαφορές ανάμεσα στον ποντικό μάρτυρα (*Gremlin^{flx/flx}*) και στον *Gremlin-cKO* (Εικόνα 3.5A). Η εξέταση των Β κυττάρων στο μυελό των οστών και στο σπλήνα όπως και των Τ κυττάρων στο σπλήνα επιλέχτηκε σαν έλεγχος της ομαλής ανάπτυξης των λεμφοειδών κυττάρων και μετακίνησης τους στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Ανάλυση στα περιφερικά όργανα σπλήνα και μεσεντερικό λεμφαδένα έδειξε ότι υπάρχει μείωση γύρω στο 35% στα μυελώδη δενδριτικά (*CD11c⁺Mac-1⁺*) του μεσεντερικού λεμφαδένα στο *Gremlin-cKO* (Εικόνα 3.5B) ζώο. Επίσης παρατηρείται η ίδια περίπου ποσοστιαία μείωση στα μυελώδη κύτταρα (*Mac-1⁺*) στο σπλήνα. Συνεπώς το *gremlin* δεν είναι απαραίτητο για την πρωτογενή ανάπτυξη των δενδριτικών κυττάρων, συμβάλλει όμως στην πλήρη ανάπτυξη των δενδριτικών και γενικά των μυελωδών κυττάρων στην περιφέρεια. Στη συνέχεια εξετάστηκε η περίπτωση συμμετοχής του *gremlin* στη ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων *in vitro*. Απομονωμένα κύτταρα μυελού των οστών από ποντικό μάρτυρα και *Gremlin-*

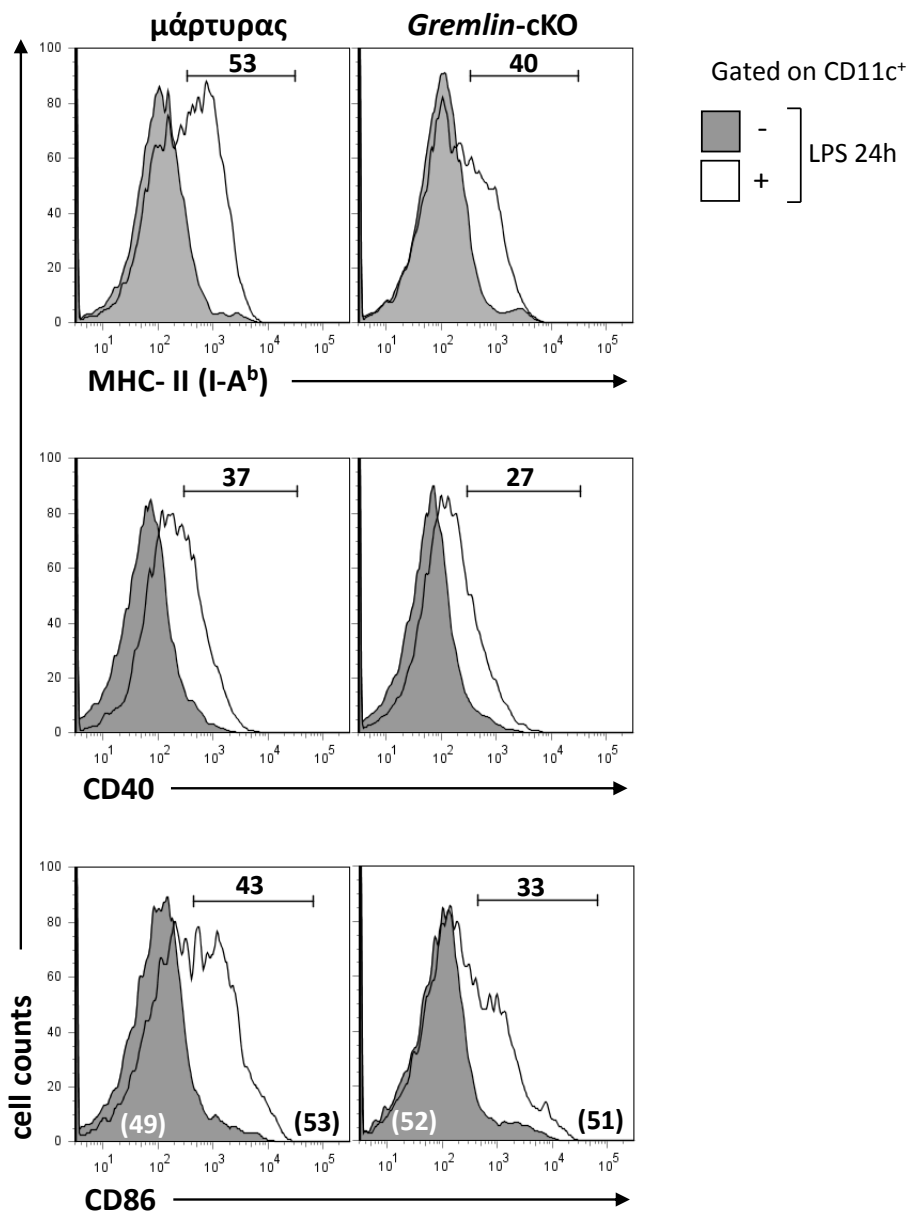


Εικόνα 3.6 Φαινοτυπική ανάλυση του *Gremlin-cKO* Κυτταρομετρία ροής σε ποντικό μάρτυρα και *Gremlin-cKO*. Ποσοστά κυτταρικών δεικτών από **A**) μυελό των οστών για ανώριμα B κύτταρα (IgD⁺CD19⁺), ώριμα περιφερόμενα B κύτταρα (IgD⁺CD19⁺), κοκκιοκύτταρα (Gr-1^{high}Mac-1⁺), ουδετερόφιλα (Gr-1^{low}Mac-1⁺) και **B**) από σπλήνα και μεσεντερικό λεμφαδένα (ΜΛΔ) για B κύτταρα (B220), T κύτταρα (CD3), μυελώδη (Mac-1) και μυελώδη δενδριτικά (CD11c⁺Mac-1⁺). $n = 3$ ποντικοί ανά ομάδα.

cKO καλλιεργήθηκαν με GM-CSF για να διαφοροποιηθούν σε δενδριτικά κύτταρα. Ερεθισμός αυτών των κυττάρων με LPS για 24ώρες ενεργοποιεί τα δενδριτικά κύτταρα και αυξάνει την έκφραση δεικτών που συμβάλλουν στην αντιγονοπαρουσιαστικότητα τους. Η έκφραση των δεικτών MHC-II, CD40 και CD86 με κυτταρομετρία ροής αποκλειστικά στα δενδριτικά (gated CD11c⁺) δείχνει μείωση 25-30% περίπου στο ποσοστό έκφρασης τους στο *Gremlin-cKO* σε σχέση με το μάρτυρα (Εικόνα 3.7). Η μείωση της έκφρασης αυτών των δεικτών προιδεάζει για κάποια ανωμαλία ενεργοποίησης της αντιγονοπαρουσιαστικότητας των δενδριτικών κυττάρων.

Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδηλώνει τη συμμετοχή του *gremlin* στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Επίσης δεν φέρεται το *gremlin* να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των δενδριτικών κυττάρων *in vitro* καθώς δεν

παρατηρούνται διαφορές στο ποσοστό του CD11c⁺ κυττάρων ανάμεσα στο μάρτυρα και το *Gremlin-cKO* πριν και μετά τον ερεθισμό, κάτι που ήταν αναμενόμενο από τα *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο μυελό των οστών.



Εικόνα 3.7 Η έλλειψη του *gremlin* μειώνει την αντιγονοπαρουσιατικότητα ερεθισμένων δενδριτικών κυττάρων Δενδριτικά κύτταρα από μυελό των οστών ερεθίστηκαν με LPS για 24hours και ανιχνεύτηκαν για τους δείκτες MHC-II, CD40 και CD86 με κυτταρομετρία ροής. Στις παρενθέσεις αναγράφονται τα ποσοστά των δενδριτικών (CD11c⁺) που μετρήθηκαν σε μάρτυρα και *Gremlin-cKO* χωρίς ενεργοποίηση (άσπρο) και με LPS (μαύρο). Τα ποσοστά είναι ο μέσος όρος για n = 2 ποντικούς από την κάθε ομάδα. Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

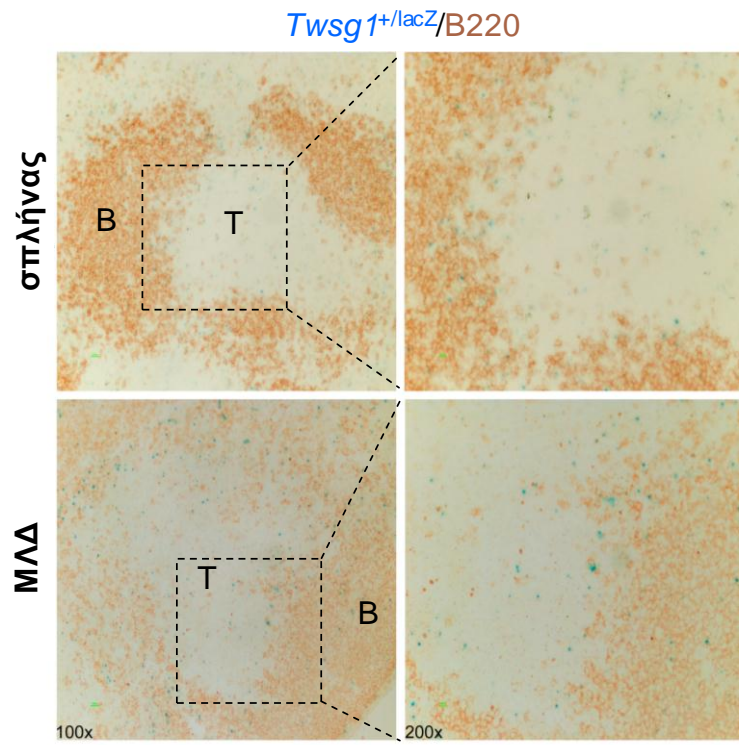
3.4 Ο ρόλος του *twsg1* στις λειτουργίες του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος

3.4.1 Η έκφραση του *twsg1* στα βλαστικά κέντρα των λεμφοειδών ιστών και η απαλοιφή του από τα B κύτταρα

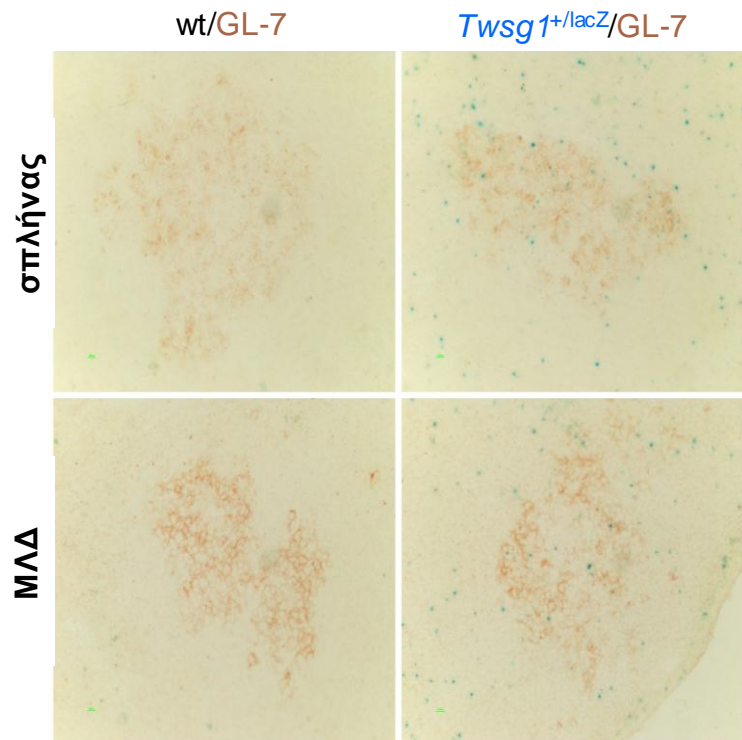
Ο τοπολογικός προσδιορισμός έκφρασης του *twsg1* πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση του ποντικού *Twsg1^{+lacZ}*. Χρώση X-gal σε τομές σπλήνα και ΜΛΔ στο *Twsg1^{+lacZ}* έδειξε έκφραση του *twsg1* στην ινώδη κάψα, στον λευκό και ερυθρό πολφό του σπλήνα. Επίσης ανιχνεύτηκε στον περιφερικό κόλπο, στο φλοιό και στην παραφλοιώδη περιοχή του ΜΛΔ. Συνδυασμός της χρώσης X-gal με ανοσοϊστοχημεία για τον δείκτη B220 δείχνει ότι υπάρχει έκφραση του *twsg1* στις B και T κυτταρικές περιοχές του λευκού πολφού στο σπλήνα και σε φλοιό και παραφλοιώδη περιοχή στους ΜΛΔ (Εικόνα 3.8Α). Μετά από ανοσοποίηση με το θυμοεξαρτώμενο αντιγόνο DNP-KLH παρατηρήθηκε ότι τα B κύτταρα των βλαστικών κέντρων (BK) παράγουν *twsg1* (Εικόνα 3.8Β). Παρότι τα B κύτταρα των BK είναι ένας σχετικά μικρός υποπληθυσμός των B κυττάρων δεν φαίνεται να εκφράζουν όλα *twsg1*. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του *twsg1* με κυτταρομετρία ροής στις πλάκες του Peyer έδειξε ότι ένα 10%-20% περίπου των B κυττάρων στα BK (GC) εκφράζει *twsg1* σε αντίθεση με τα υπόλοιπα B κύτταρα (non-GC) που εκφράζουν πολύ λιγότερο (Εικόνα 3.8Γ).

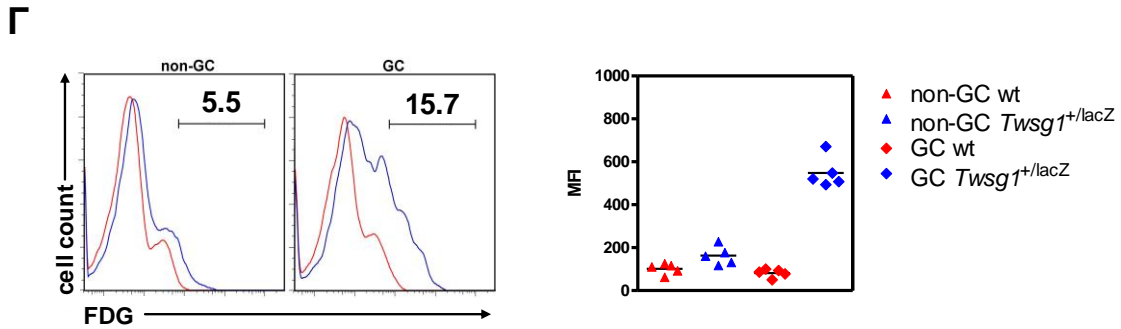
Τα BK είναι περιοχές με έντονο πολλαπλασιασμό των B κυττάρων, όπου συμβαίνει σωματική υπερμεταλλαξιγένεση των αναδιατεταγμένων γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης, η μεταστροφή ισοτύπου της B αλυσίδας, η ωρίμανση συγγένειας και εν τέλει η παραγωγή πλασματοκυττάρων και αντισωμάτων. Η έκφραση του *twsg1* στα BK συνεπώς υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή του στις προαναφερθείσες λειτουργίες του BK. Για την μελέτη του *twsg1* στα BK καθώς και σε όλα τα B κύτταρα ο ποντικός *Twsg1^{flx/flx}* διασταυρώθηκε με τον ποντικό *Cd19^{cre}*. Στον *Cd19^{cre}*, η ενεργοποίηση του cre υποκινητή αρχίζει από το στάδιο του πρώιμου προ-προ B κυττάρου και έτσι επιτυγχάνεται η απαλοιφή του *twsg1* στα B κύτταρα από αυτό το στάδιο της ανάπτυξης τους. Η επιτυχής απαλοιφή του *twsg1* στα B κύτταρα επιβεβαιώθηκε σε επίπεδο mRNA με ημι-ποσοτικοποιημένη RT-PCR. Απομονωμένα B κύτταρα από ποντικό *Twsg1^{flx/flx}Cd19^{cre}* (*Twsg1*-cKO) μετά από ανοσοποίηση δεν περιέχουν *twsg1* mRNA σε σχέση με τον *Twsg1^{flx/flx}* (μάρτυρας)

A



B





Εικόνα 3.8 Έκφραση του *twsg1* σε σπλήνα, μεσεντερικούς λεμφαδένες και στα Βλαστικά Κέντρα στον *Twsg1*^{+lacZ} ποντικό **A)** Χρώση X-gal στο *Twsg1*^{+lacZ} συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία για το B κυτταρικό δείκτη B220 στο σπλήνα και στους μεσεντερικούς λεμφαδένες (ΜΛΔ). Διακρίνονται η Β κυτταρική περιοχή (B) και η Τ κυτταρική περιοχή (T) του λευκού πλφού. **B)** Χρώση X-gal σε φυσιολογικό ποντικό (wt) και *Twsg1*^{+lacZ} συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία για το δείκτη των βλαστικών κέντρων GL-7 στο σπλήνα και στους ΜΛΔ. **Γ)** Ανίχνευση του *twsg1* στα Β κύτταρα των βλαστικών κέντρων (GC) (B220⁺GL-7⁺) και μη (non-GC) (B220⁺GL-7⁻) των πλακών του Peyer με κυτταρομετρία ροής με τη χρησιμοποίηση του φθορίζοντος υποστρώματος FDG (αριστερά). Στα δεξιά καταγράφεται η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) ανάμεσα σε φυσιολογικό (wt) και στο *Twsg1*^{+lacZ} στα GC και non-GC (n = 5).



Εικόνα 3.9 Απαλοιφή του *twsg1* από τα Β κύτταρα **A)** Ημι-ποσοτικοποιημένη RT-PCR σε απομονωμένα Β κύτταρα 7 ημέρες μετά από ανοσοποίηση με DNP-KLH σε μάρτυρα και *Twsg1*-cKO. Οι διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων είναι 1:5 και για τον έλεγχο ίσης ποσότητας δείγματος χρησιμοποιήθηκε το *gapdh*. **B)** Στύπωμα Western για την TWSG1 σε απομονωμένα Β κύτταρα μάρτυρα και *Twsg1*-cKO ερεθισμένα με LPS. Πρωτεΐνη από τα κύτταρα απομονώθηκε κάθε 24hours από το ερέθισμα μέχρι και 3 ημέρες. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικός ποσοτικός έλεγχος των δειγμάτων.

(Εικόνα 3.9A). Επιπρόσθετα η μη παραγωγή *twsg1* mRNA δεν επιτρέπει την παραγωγή TWSG1 πρωτεΐνης από ενεργοποιημένα Β κύτταρα με LPS *in vitro* στο *Twsg1*-cKO (Εικόνα 3.9B). Η επιβεβαίωση της έλλειψης της TWSG1 από τα Β κύτταρα σηματοδοτεί την πραγματοποίηση περαιτέρω πειραμάτων για την αποσαφήνιση του ρόλου της στην βιολογία του Β κυττάρου.

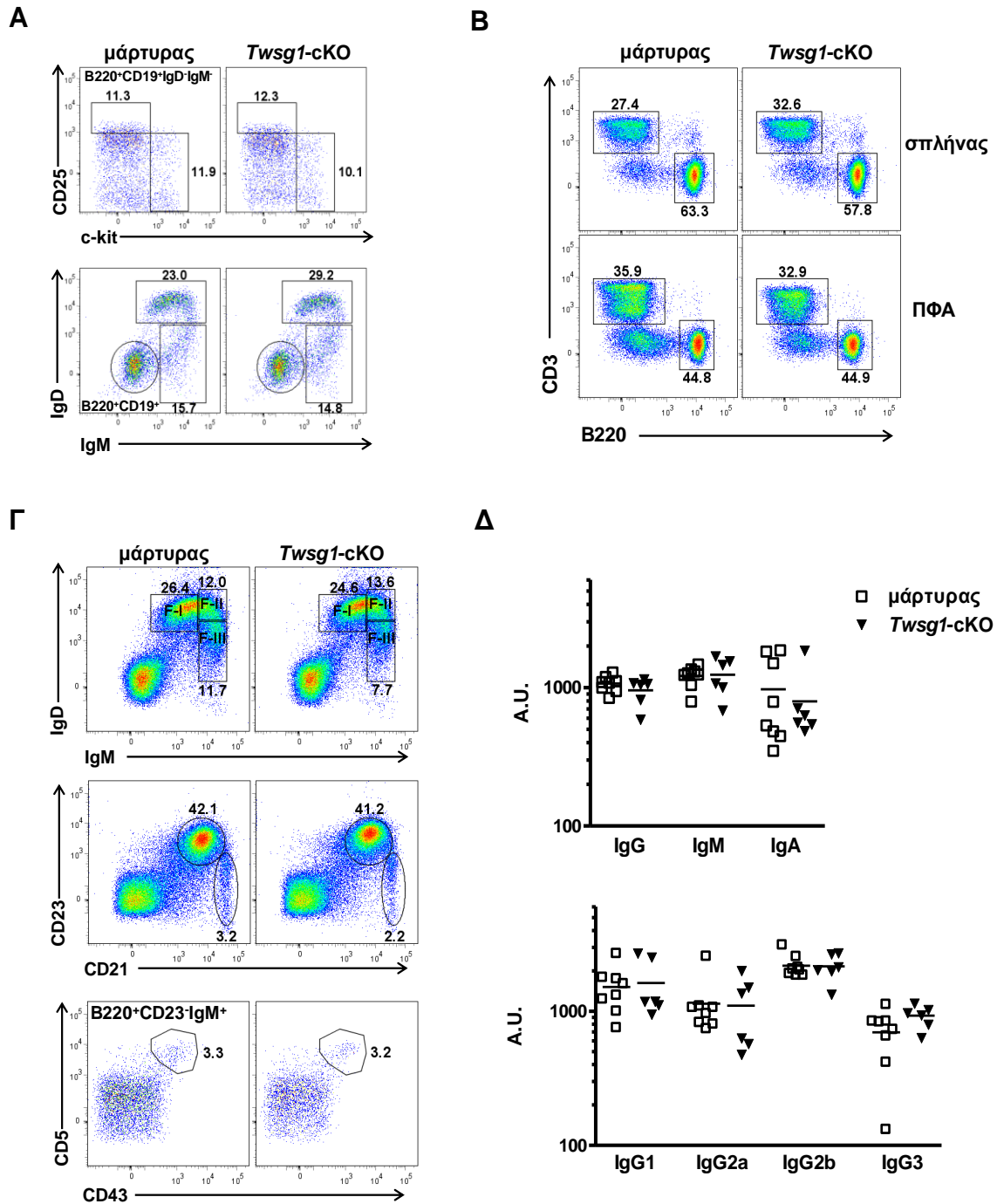
3.4.2 B κυτταρική ανάπτυξη, δημιουργία βλαστικών κέντρων και θυμοεξαρτώμενη ανοσοποιητική απόκριση στο *Twsg1-cKO*

Η έκφραση του *twsg1* από τα B κύτταρα προμηνύει την εμπλοκή του *twsg1* σε διαδικασίες όπως η B κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, διάφορα στάδια της χυμικής ανοσίας. Επίσης είναι πιθανή η εμπλοκή του *twsg1* και στη φυσιολογία των οργάνων του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ποντικοί με απαλειμμένο το *twsg1* από τα B κύτταρα εξετάστηκαν αρχικά ως προς την ανάπτυξη του σπλήνα, λεμφαδένα και μυελού των οστών. Μακροσκοπική ανάλυση που περιλάμβανε εξέταση της μορφολογίας, του όγκου αλλά και ιστοπαθολογία των παραπάνω οργάνων, δεν έδειξε διαφορές ανάμεσα στο μάρτυρα και το *Twsg1-cKO*. Έπειτα εξετάστηκε η B κυτταρική ανάπτυξη στο μυελό των οστών, στο σπλήνα και το περιφερικό αίμα με κυτταρομετρία ροής. Δεν υπήρχαν αξιοσημείωτες διαφορές στα διάφορα στάδια της B κυτταρικής ανάπτυξης στο μυελό των οστών (Εικόνα 3.10Α). Από αυτά συμπεριλαμβανομένων των όψιμο προ-προ B κύτταρο ($B220^+CD19^+IgD^-IgM^-CD25^+c-kit^+$), προ-B κύτταρο ($B220^+CD19^+IgD^-IgM^-CD25^-c-kit^+$), ανώριμο B κύτταρο ($B220^+CD19^+IgD^+IgM^+$), ώριμο B κύτταρο ($B220^+CD19^+IgD^+IgM^{+/-}$) κανένα δεν έδειξε διαφορές ανάμεσα στο μάρτυρα και το *Twsg1-cKO*. Αυτό έχει σαν συνέπεια τα συνολικά ποσοστά των B κυττάρων ($B220^+$) στο σπλήνα και το περιφερικό αίμα να είναι αναλλοίωτα (Εικόνα 3.10Β). Ο σπλήνας είναι ένα από τα κύρια όργανα που πραγματοποιείται η τελική διαφοροποίηση των B κυττάρων, περιέχοντας B κύτταρα των βλαστικών κέντρων, B κύτταρα της οριακής ζώνης, B1 κύτταρα και πλασματοκύτταρα. Στους διάφορους υποπληθυσμούς που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο μάρτυρα και το *Twsg1-cKO* (Εικόνα 3.10Γ). Πιο συγκεκριμένα δεν υπήρχαν διαφορές στα ποσοστά των B1 κυττάρων ($B220^+CD23^-IgM^+CD5^+CD43^+$) και των ομάδων F-I ($IgD^{high}IgM^{low}$) (θυλακιώδη B κύτταρα), F-II ($IgD^{high}IgM^{high}$) (μεταβατικά B κύτταρα). Παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση στα ποσοστά της ομάδας F-III ($IgD^{low}IgM^{high}$) στο *Twsg1-cKO* όπου εμπεριέχει τα B κύτταρα της οριακής ζώνης αλλά και τα NF/T1 κύτταρα. Αυτοί οι δύο υποπληθυσμοί τοποθετούνται έξω από το θυλάκιο σε αντίθεση με τα κύτταρα των ομάδων F-I και F-II. Επιπρόσθετη ανάλυση με τους δείκτες CD23, CD21 για τα κύτταρα της οριακής ζώνης ($CD23^-CD21^+$) επιβεβαίωσε τη μείωση του ποσοστού τους από 3.2% στο μάρτυρα σε 2.2% στο *Twsg1-cKO*.

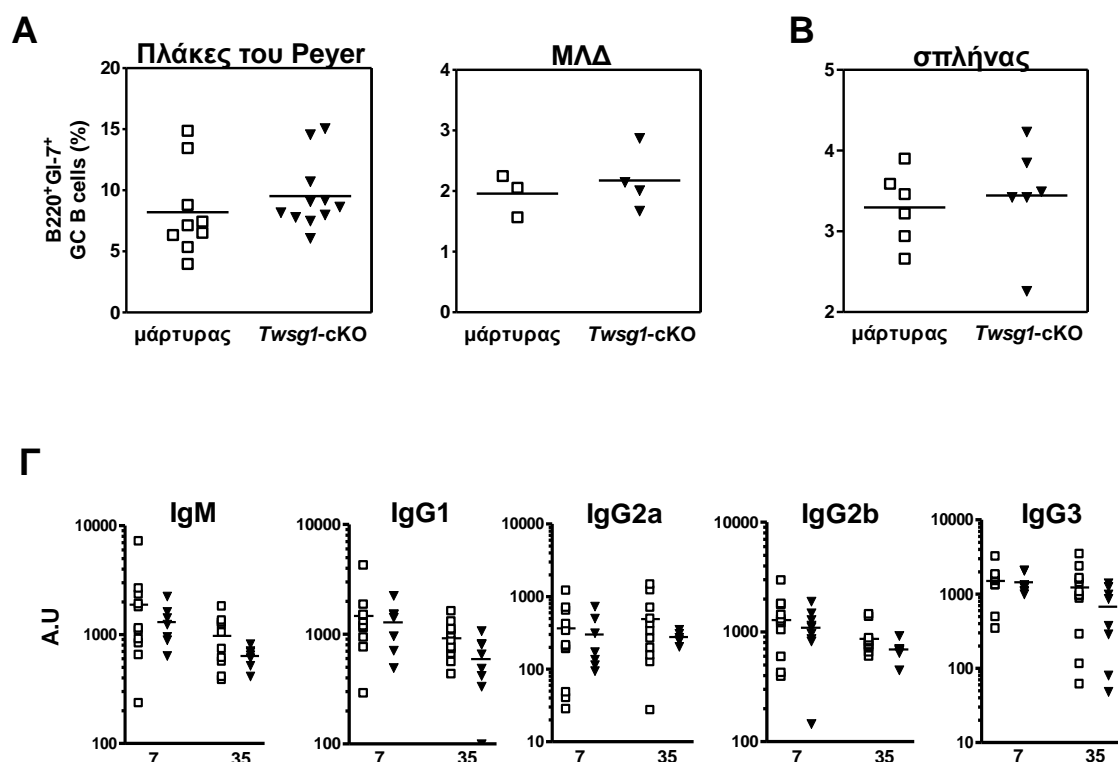
Όπως έχει προαναφερθεί, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των B κυττάρων είναι η έκκριση αντισωμάτων. Με τη μέθοδο ELISA εξετάστηκαν τα επίπεδα των

ανοσοσφαιρινών σε ορούς του μάρτυρα και *TwsG1*-cKO υπό φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 3.9Δ). Αναλύοντας τις συγκριτικές τιμές για κάθε τύπο ανοσοσφαιρίνης δεν διαπιστώθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στους υπό εξέταση ποντικούς. Συνεπώς η TWSG1 δεν είναι απαραίτητη για τη αυτοτελή έκκριση αντισωμάτων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης η TWSG1 φέρεται να μην επηρεάζει την Β κυτταρική ανάπτυξη. Πιθανότατα η έλλειψη της TWSG1 να επηρεάζει την διαφοροποίηση των Β κυττάρων της οριακής ζώνης που αν ισχύει θα επηρεάζει και την βιολογία τους, ως προς τις TI-2 αποκρίσεις.

Η έκφραση του *twsG1* είχε πρωταρχικά παρατηρηθεί στα Βλαστικά Κέντρα (BK) του σπλήνα. Εξετάστηκε λοιπόν αν η έλλειψη της TWSG1 επηρεάζει την ανάπτυξη των BK. Κυτταρομετρία ροής για τα Β κύτταρα των BK ($B220^{+}GL-7^{+}$) σε πλάκες του Peyer και μεσεντερικούς λεμφαδένες (ΜΛΔ) δεν έδειξε διαφορές στα ποσοστά τους ανάμεσα στο μάρτυρα και το *TwsG1*-cKO (Εικόνα 3.11Α). Σε αυτά τα όργανα η δημιουργία των BK είναι συνεχής υπο φυσιολογικές συνθήκες. Διερευνήθηκε η πιθανότητα ανάμειξης της TWSG1 στα BK του σπλήνα μετά από επαγωγή με το θυμοεξαρτώμενο αντιγόνο DNP-KLH σε CFA. Ούτε και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά των BK Β κυττάρων του μάρτυρα και του *TwsG1*-cKO (Εικόνα 3.11Β). Παρόλο που η TWSG1 δεν έχει ρόλο στην ανάπτυξη των BK πιθανότατα να εμπλέκεται στη μεταστροφή ισotyπου. Για την εξέταση αυτή, ποντικοί μάρτυρες και *TwsG1*-cKO ανοσοποιήθηκαν με DNP-KLH σε CFA και μετά από 28 ημέρες με DNP-KLH σε IFA. Οροί από τους ποντικούς που συγκεντρώθηκαν 7 ημέρες μετά την πρώτη και 7 ημέρες μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση, αναλύθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε ειδικές DNP-ανοσοσφαιρίνες με τη μέθοδο ELISA (Εικόνα 3.11Γ). Και σε αυτή τη περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά ανάμεσα στο μάρτυρα και το *TwsG1*-cKO, που δείχνει την μη εμπλοκή της TWSG1 σε αυτή τη διαδικασία. Επίσης η TWSG1 δεν φαίνεται να εμπλέκεται και στην Β κυτταρική μνήμη *in vivo* εφόσον οι τιμές των ανοσοσφαιρινών ως προς την δευτερεύουσα απόκριση ήταν οι ίδιες και στις δύο ομάδες.



Εικόνα 3.9 Β κυτταρική ανάπτυξη και έκκριση ανοσοσφαιρινών υπό φυσιολογικές συνθήκες στο *Twsg1*-cKO Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των Β κυττάρων σε **A**) μυελό των οστών, **B**) περιφερικό αίμα, **Γ**) σπλήνα. $n = 3$ ποντικοί ανά ομάδα. Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. **Δ**) ELISA για διάφορες ανοσοσφαιρίνες σε ορούς από ποντικούς μάρτυρες ($n = 8$) και *Twsg1*-cKO ($n = 6$). Οι τιμές απεικονίζονται σε συγκριτικές μονάδες (Arbitrary Units).

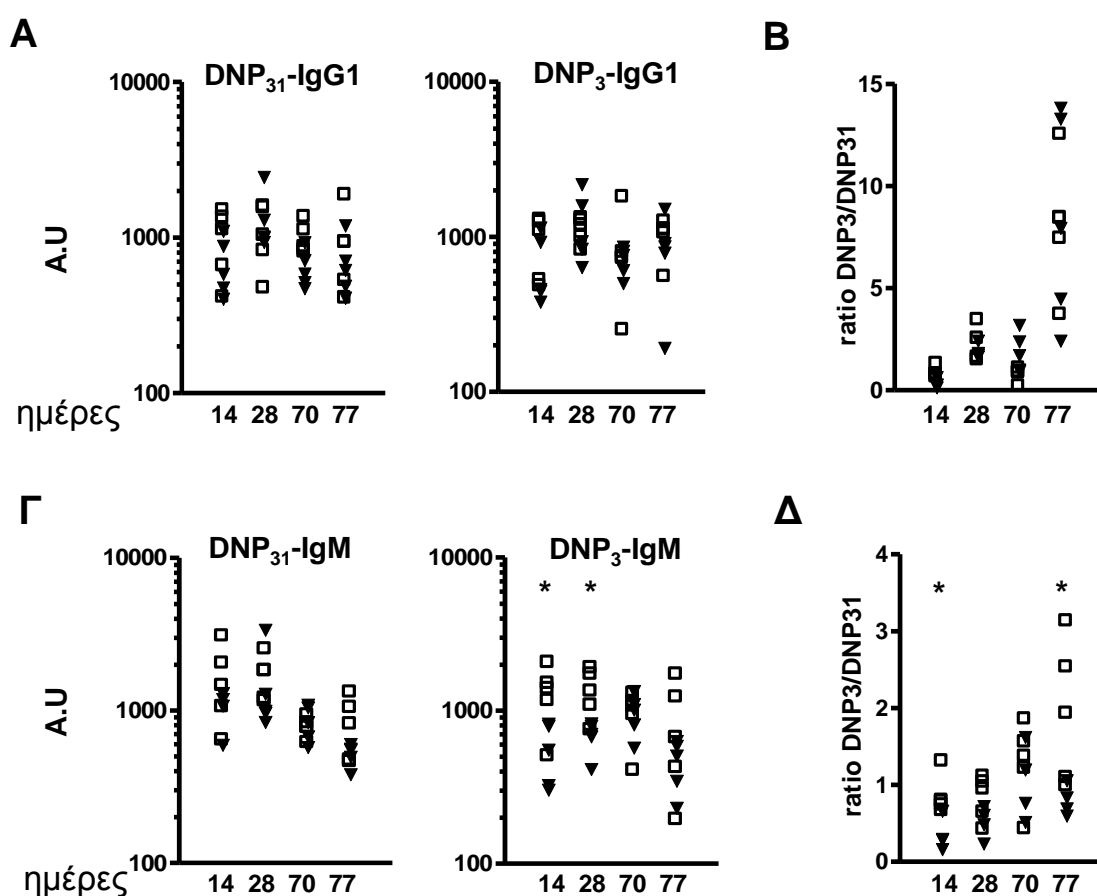


Εικόνα 3.11 Ανάπτυξη των ΒΚ και θυμοεξαρτώμενες αποκρίσεις στο *Twsg1-cKO*
Κυτταρομετρία ροής για ΒΚ (B220⁺GL-7⁺) **A**) στις πλάκες του Peyer και στους ΜΛΔς και **B**) στο σπλήνα μετά από ανοσοποίηση με DNP-KLH σε CFA. **γ)** ELISA για ανοσοσφαιρίνες μετά από ανοσοποίηση με DNP-KLH σε CFA και DNP-KLH σε IFA 28 ημέρες μετά. (n = 10 για κάθε ομάδα)

3.4.3 Η TWSG1 εμπλέκεται στην ωρίμανση συγγένειας της IgM

Η ωρίμανση της συγγένειας επιτρέπει την διαλογή ανοσοσφαιρινών υψηλής συγγένειας για την καλύτερη προσκόλληση τους στο αντιγόνο. Αυτή η διαλογή γίνεται στα ΒΚ και συνήθως περιγράφεται για τις ανοσοσφαιρίνες της ομάδας IgG. Σε αυτή την περίπτωση επιστρατεύτηκε και πάλι η μέθοδος ELISA μόνο που αυτή τη φορά διαφορετικά πιάτα επιστρώθηκαν με DNP₃₁-BSA για τη δέσμευση αντισωμάτων χαμηλής και υψηλής συγγένειας και με DNP₃-BSA για τη δέσμευση αντισωμάτων υψηλής συγγένεια αποκλειστικά. Ποντικοί μάρτυρες καθώς και *Twsg1-cKO* ανοσοποιήθηκαν με DNP-KLH σε CFA και ακολούθησε έπειτα από 70 ημέρες ανοσοποίηση με DNP-KLH σε PBS. Τα πειράματα ELISA πραγματοποιήθηκαν σε ορό 14, 28, και 70 ημέρες μετά την πρωτογενή ανοσοποίηση καθώς και 7μέρες μετά την δευτερογενή ανοσοποίηση. Όσον αφορά την ωρίμανση της IgG1 δεν βρέθηκαν διαφορές στις συγκριτικές τιμές ανάμεσα στο μάρτυρα και στο *Twsg1-cKO* (Εικόνα

3.12A). Επίσης δεν υπήρχαν διαφορές και στο λόγο ανάμεσα στην υψηλή και χαμηλή-υψηλή συγγένεια (DNP_3/DNP_{31}) (Εικόνα 3.12B). Παρατηρήθηκε όμως μείωση στην ωρίμανση της IgM. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση παρουσιάζεται στις τιμές της IgM στις 14, 28 και 77 ημέρες δηλαδή στην αρχή της πρωτογενούς και δευτερογενούς ανοσοποίησης (Εικόνα 3.12Γ). Παράλληλα, ο λόγος DNP_3/DNP_{31} ήταν μειωμένος στις 14 και 77 ημέρες (Εικόνα 3.12Δ). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πιθανή εμπλοκή του *TwsG1* στην ωρίμανση συγγένειας αποκλειστικά και μόνο για την IgM και κυρίως μετά την ανοσοποίηση στα πρώτα στάδια της απόκρισης.

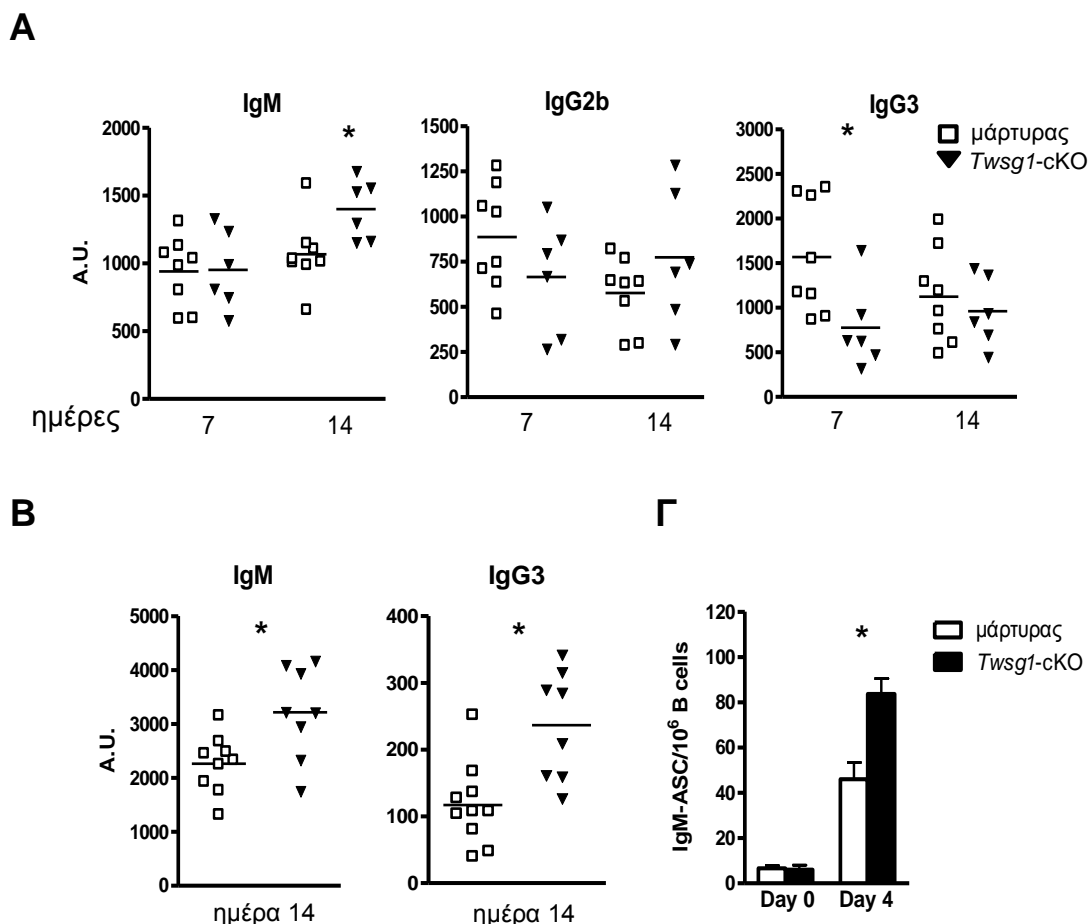


Εικόνα 3.12 Ωρίμανση συγγένειας στο *TwsG1*-cKO Ποντικοί μάρτυρες (ανοιχτά τετράγωνα) και *TwsG1*-cKO (κλειστά τρίγωνα) ανοσοποιήθηκαν με DNP-KLH σε CFA και DNP-KLH σε PBS 70 ημέρες μετά. ELISA για **A)** IgG1 και **Γ)** IgM, σε ορούς 14, 28, 70 και 77 ημέρες μετά την πρωτογενή ανοσοποίηση. **B,Δ)** Λόγος υψηλής/χαμηλής και υψηλής) συγγένειας DNP_3/DNP_{31} για την IgG1 και IgM αντίστοιχα. $n = 5$ ποντικοί ανά ομάδα. * $p < 0.05$

3.4.4 Η έλλειψη της *TWSG1* επηρεάζει τις θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις

Οι θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις αποτελούν τον κύριο μηχανισμό για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων καθώς ενεργοποιούνται από βακτηριακά συμπλέγματα όπως ο βακτηριακός πολυσακχαρίτης. Τα αντισώματα εκκρίνονται κυρίως από τα Β κύτταρα της οριακής ζώνης και τα Β1 Β κύτταρα. Για την επαγωγή θυμοανεξάρτητης αντίδρασης τύπου 1 (ΤΙ-1) ποντικοί ανοσοποιήθηκαν με το αντιγόνο DNP-LPS. Ορός συλλέχθηκε από ποντικούς μάρτυρες και *TwsG1-cKO* 7 και 14 ημέρες μετά την ανοσοποίηση και οι ανοσοσφαιρίνες ανιχνεύτηκαν με ELISA. Παρατηρήθηκε ότι υπήρχε αύξηση 1.5X στις τιμές της IgM στις 14 ημέρες και σχεδόν τριπλάσια μείωση της IgG3 στις 7 ημέρες στους *TwsG1-cKO* ποντικούς (Εικόνα 3.13Α). Οι τιμές της IgG2b δεν έδειξαν μεταβολές. Η έλλειψη της *TWSG1* φέρεται να επηρεάζει ποικιλοτρόπως την ΤΙ-1 απόκριση και όσο αφορά την ποσότητα της IgM και IgG3 στον ορό αλλά και το χρονικό στάδιο παραγωγής τους.

Η ΤΙ-2 απόκριση επάγεται με το αντιγόνο DNP-Ficoll και παράγει ανοσοσφαιρίνες τύπου IgM και IgG3. Οι τιμές τους στον ορό είναι αυξημένες κατά 50% στις 14 ημέρες στους *TwsG1-cKO* ποντικούς σε σχέση με τους ποντικούς μάρτυρες (Εικόνα 3.13Β). Πιθανότατα η αύξηση στις τιμές των IgM και IgG3 να είναι αποτέλεσμα αύξησης των πλασματοκυττάρων κατά τα αρχικά στάδια της απόκρισης. Εξετάστηκε ο αριθμός των πλασματοκυττάρων που εκκρίνουν ειδικά DNP αντισώματα τύπου IgM με ELISPOT. Τα DNP-IgM πλασματοκύτταρα ήταν αυξημένα κατά 50% στους *TwsG1-cKO* ποντικούς 4 ημέρες μετά την ανοσοποίηση (Εικόνα 3.13Γ). Συνεπώς, η έλλειψη της *TWSG1* αυξάνει την παραγωγή των IgM πλασματοκυττάρων στην ΤΙ-2 απόκριση και η αύξηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της IgM.



Εικόνα 3.13 Θυμοανεξάρτητες TI-1 και TI-2 αποκρίσεις στον *Twsg1-cKO* ποντικό ELISA για διάφορες ανοσοσφαιρίνες μετά από ανοσοποίηση με **A)** DNP-LPS σε μάρτυρα (n = 8) και *Twsg1-cKO* (n = 6), **B)** DNP-Ficoll, n = 10 (μάρτυρας) και n = 8 (*Twsg1-cKO*). **Γ)** ELISPOT για ειδικά anti-DNP IgM πλασματοκύτταρα 4 ημέρες μετά από ανοσοποίηση με DNP-Ficoll. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές, n = 3 ποντικοί ανά ομάδα. *p<0.05.

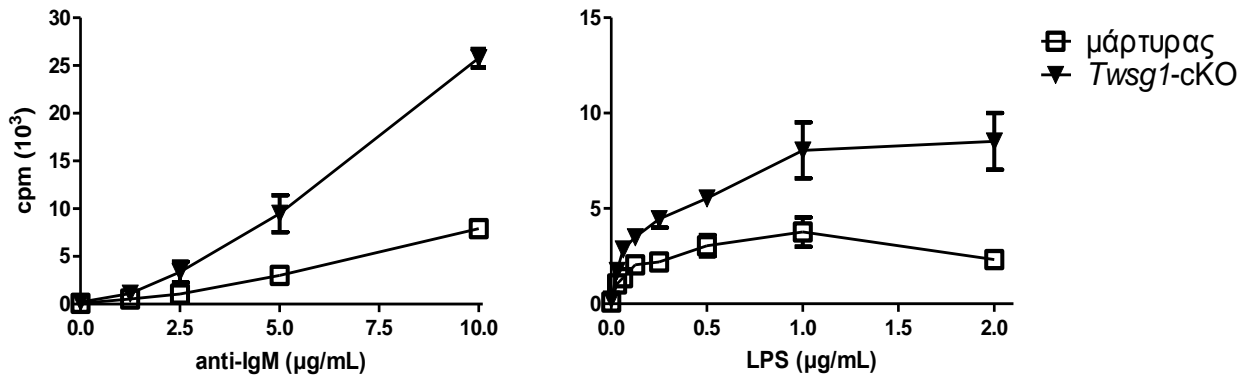
3.4.5 Η απουσία της TWSG1 επηρεάζει τον B κυτταρικό πολλαπλασιασμό την ενεργοποίηση και την απόπτωση *in vitro*

Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι η TWSG1 επιδρά στην αύξηση της παραγωγής ειδικών anti-DNP IgM πλασματοκυττάρων και κατά συνέπεια στην έκκριση αντισωμάτων στις θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις. Επειδή η TWSG1 λειτουργεί κυρίως σαν ανταγωνιστής των BMPs, το αποτέλεσμα της αύξησης αυτής μπορεί να προέρχεται από τη δράση κάποιας BMP που λόγω της έλλειψης της TWSG1 παρεμβάλλεται ελεύθερα στις λειτουργίες των B κυττάρων. Γεννιέται έτσι το ερώτημα αν η αύξηση αυτή των πλασματοκυττάρων είναι άμεσο αποτέλεσμα της έλλειψης της TWSG1 ή της υπερδράσης κάποιας BMP. Για την διερεύνηση του

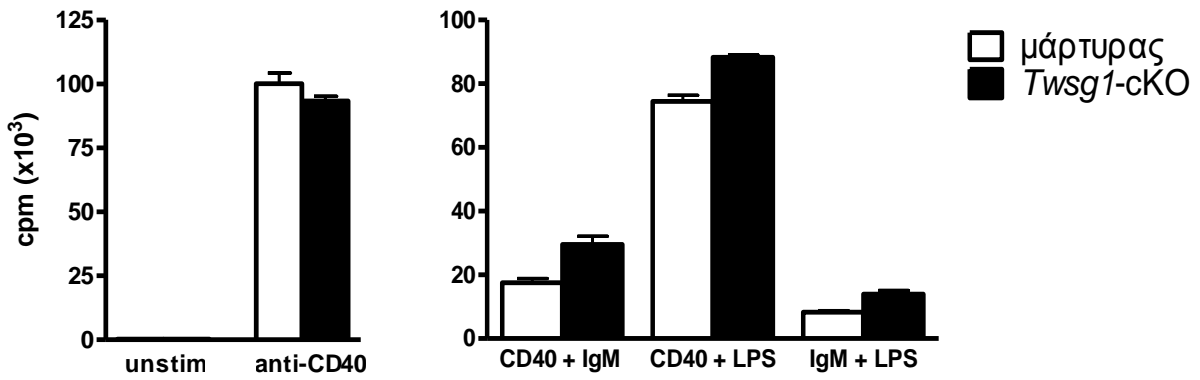
παραπάνω ερωτήματος απομονώθηκαν B κύτταρα από ποντικούς μάρτυρες και *TwsG1*-cKO, ενεργοποιήθηκαν *in vitro* και εξετάστηκαν για διάφορες ιδιότητες τους.

Η πρώτη ιδιότητα που εξετάστηκε ήταν ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός με μιτογόνα που προσομοιάζουν τις θυμοεξαρτώμενες (anti-CD40) και θυμοανεξάρτητες (anti-IgM, LPS) αποκρίσεις *in vitro*. Ερεθισμός των κυττάρων με τα παραπάνω μιτογόνα έδειξε ότι τα *TwsG1*-cKO B κύτταρα πολλαπλασιάζονται δύο φορές περισσότερο περίπου σε σχέση με τα κύτταρα από μάρτυρες κατόπιν ερεθισμού με anti-IgM ή LPS (Εικόνα 3.14A) και όχι με anti-CD40 (Εικόνα 3.14B αριστερά). Η αύξηση αυτή είναι ανεξάρτητη για το κάθε μιτογόνο καθώς δεν παρατηρήθηκε η ανάλογη αύξηση ή μείωση στον πολλαπλασιασμό όταν εξετάστηκαν συνεργιστικά (Εικόνα 3.14B δεξιά). Η παραπάνω παρατήρηση πιθανότατα οφείλεται σε κάποια υπερλειτουργία μηχανισμών B κυτταρικής ενεργοποίησης η και καταστολή μηχανισμών νέκρωσης των κυττάρων. Εξετάστηκαν διάφοροι επιφανειακοί δείκτες ενεργοποίησης των B κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι οι δείκτες CD25 και CD69 υπερεκφράζονται κατά περίπου 30%, 24ώρες μετά από ερεθισμό με anti-IgM (Εικόνα 3.14Δ, Ε). Αυτή η υπερ-ενεργοποίηση των B κυττάρων συμπίπτει και με 30% περίπου μείωση της απόπτωσης των B κυττάρων 24ώρες μετά τον ίδιο ερεθισμό ενώ παράλληλα δεν παρατηρούνται διαφορές σε κύτταρα μη ερεθισμένα και ερεθισμένα με LPS (Εικόνα 3.14ΣΤ). Όσον αφορά την αύξηση του πολλαπλασιασμού με LPS και IgM καθώς και την υπερ-ενεργοποίησή, τους πιθανότατα να είναι αποτέλεσμα αύξησης των κυττάρων που επιβιώνουν στην καλλιέργεια. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρείται όπως φαίνεται από τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονται ανάμεσα στο πεδίο FSC/SSC μετά από ενεργοποίηση με όλα τα προαναφερθέντα μιτογόνα (Εικόνα 3.14Γ). Άρα η έλλειψη της *TWSG1* επηρεάζει θετικά την ζωτικότητα των B κυττάρων καθώς και την ενεργοποίησή τους, χωρίς όμως να εμπλέκεται σε μηχανισμούς που επιδρούν στη βιωσιμότητά τους.

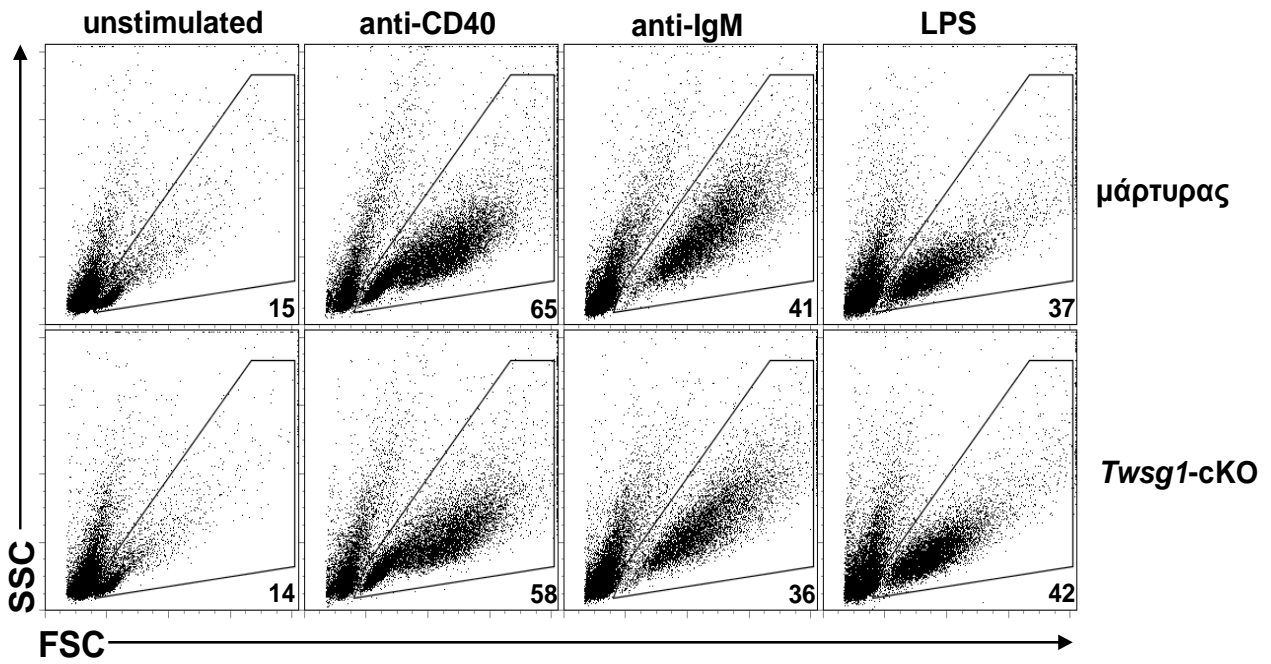
A

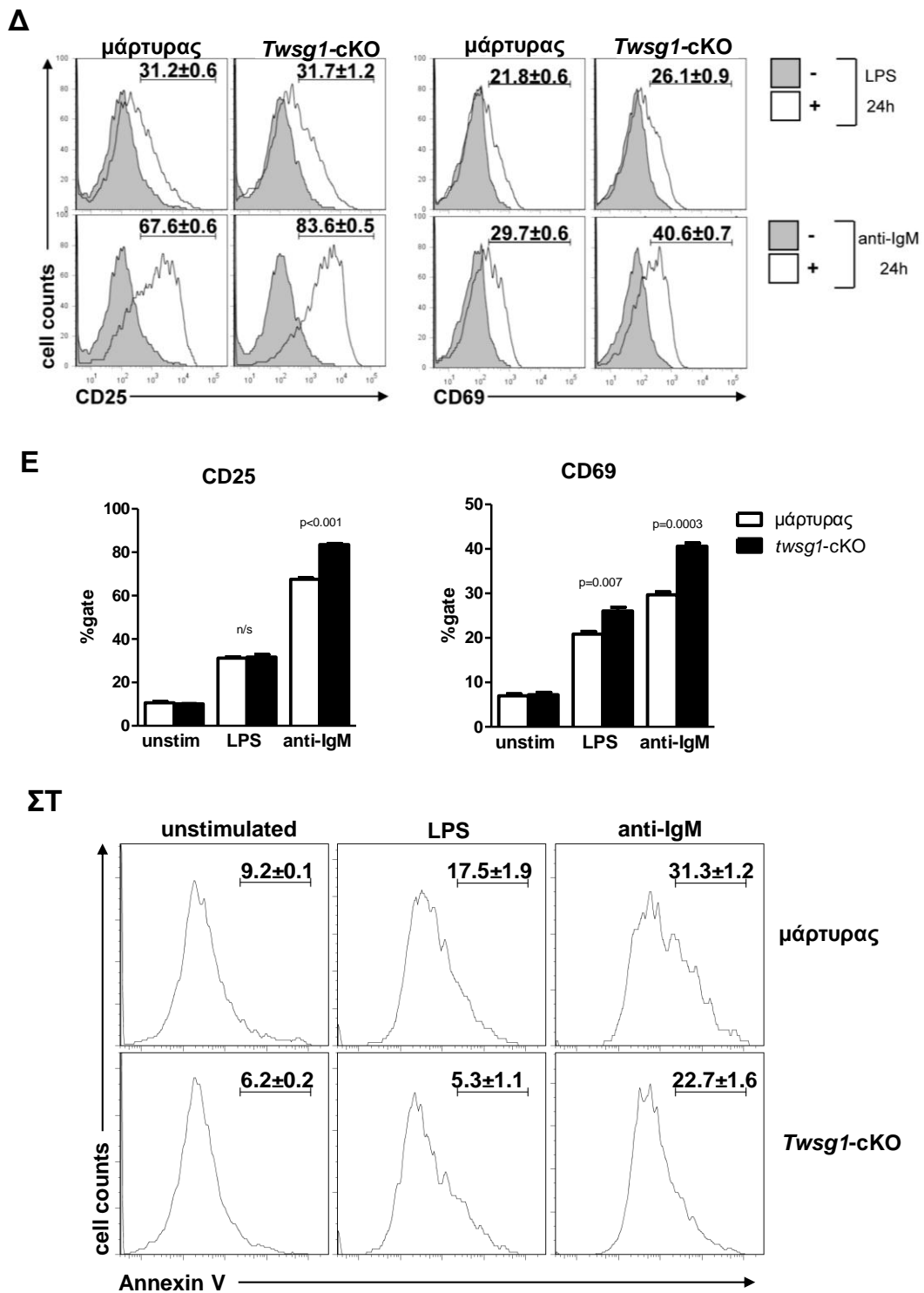


B



Γ

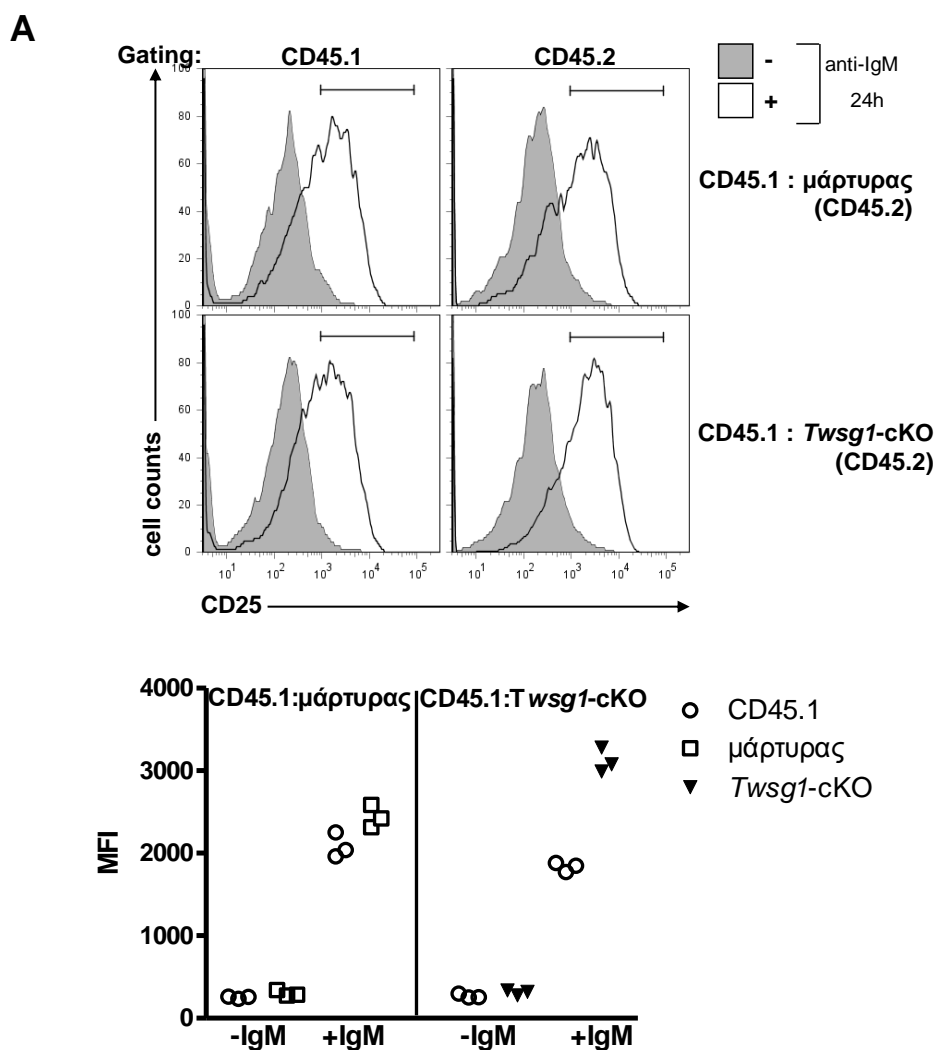




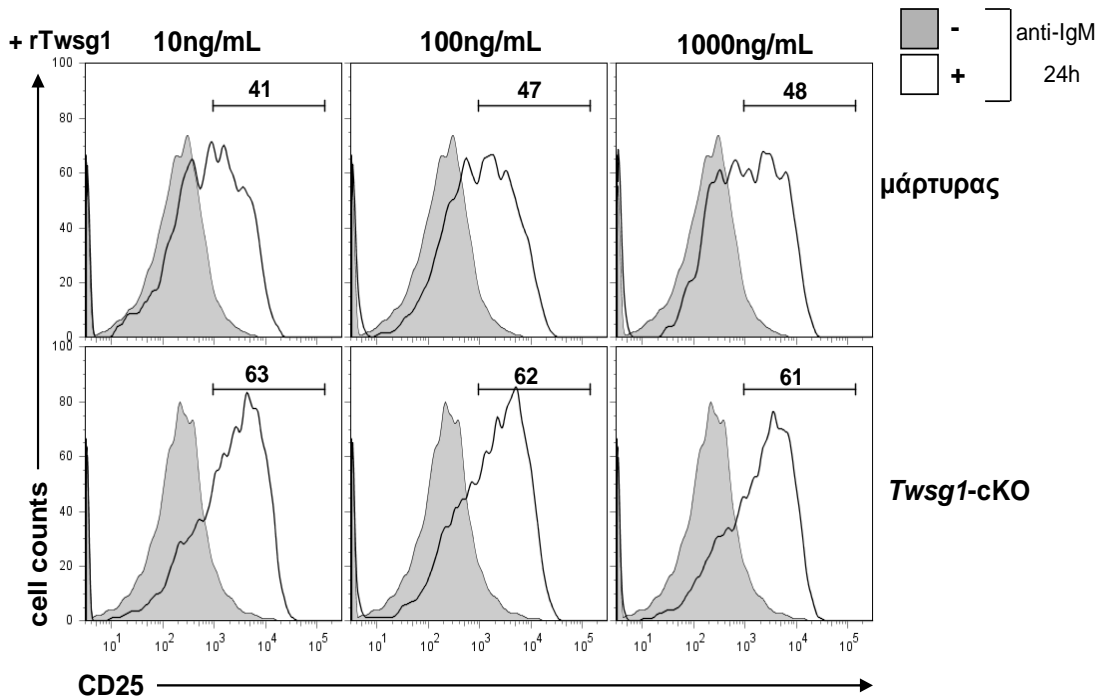
Εικόνα 3.13 Πολλαπλασιασμός, ενεργοποίηση και απόπτωση των Β κυττάρων *in vitro*
Α,Β) Διάχυση ³H-θυμιδίνης 72hours μετά από ερεθισμό με anti-CD40, anti-IgM και LPS. Κυτταρομετρία ροής για **Γ)** επιβίωση μετά από 72hours όπως το **α Δ,Ε)** ενεργοποίηση των δεικτών CD25, CD69 **ΣΤ)** απόπτωση ως AnnexinV⁺PI 24hours μετά από ερεθισμό με LPS και anti-IgM. Οι μετρήσεις και τα ποσοστά είναι οι μέσοι όροι από τρία δείγματα. Τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν δύο φορές. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τρεις ποντικοί ανά ομάδα. (ns, non-significant)

3.4.6 Η παραγωγή της TWSG1 δεν επηρεάζει ευθέως την B κυτταρική ενεργοποίηση

Μέχρι στιγμής, έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος της TWSG1 στην ρύθμιση της δράσης των BMPs. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η έλλειψη της TWSG1 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των B κυττάρων. Τίθεται λοιπόν το ερώτημα αν η παραγωγή μη λειτουργικής TWSG1 επηρεάζει αυτοτελώς το B κύτταρο ή η έλλειψη της δεν ενεργοποιεί κάποιον πιθανό υποδοχέα καταστολής της ενεργοποίησης. Εξετάστηκε αν η παραγωγή της TWSG1 από ερεθισμένα φυσιολογικά B κύτταρα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ενεργοποίηση των *Twsg1*-cKO κυττάρων. Αναμείχθηκαν B κύτταρα από φυσιολογικό ποντικό (CD45.1) μαζί με B κύτταρα από μάρτυρα και *Twsg1*-cKO σε ξεχωριστά πηγαδάκια και ερεθίστηκαν με anti-IgM για 24ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.14A δεν παρατηρήθηκαν



B



Εικόνα 3.14 Αυτούσια έλλειψη της TWSG1 δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση των B κυττάρων *in vitro* **A)** ενεργοποίηση του CD25 σε κύτταρα από μάρτυρα και *Twsg1*-cKO αναμειγμένα ξεχωριστά σε αναλογία 1:1 με B κύτταρα από ποντικό CD45.1 ερεθισμένα με anti-IgM (πάνω). MFI του CD25 στις τρεις ομάδες πριν και μετά τον ερεθισμό (κάτω). **B)** ενεργοποίηση του CD25 σε κύτταρα από μάρτυρα και *Twsg1*-cKO ερεθισμένα με anti-IgM και rTWSG1 σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις και δύο φορές αντίστοιχα. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τρεις ποντικοί ανά ομάδα.

αποκλίσεις στην έκφραση του CD25 από κύτταρα μάρτυρα και *Twsg1*-cKO. Η ίδια διαφορά στα ποσοστά του CD25 στα *Twsg1*-cKO αποδεικνύεται και από τις μετρήσεις της μέσης έντασης φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) στο CD25 (Εικόνα 3.14A κάτω). Παρατηρείται επίσης, ότι τα CD45.1 B κύτταρα ανταποκρίνονται εξίσου το ίδιο στην έκφραση του CD25 και στις δύο αναμειξεις.

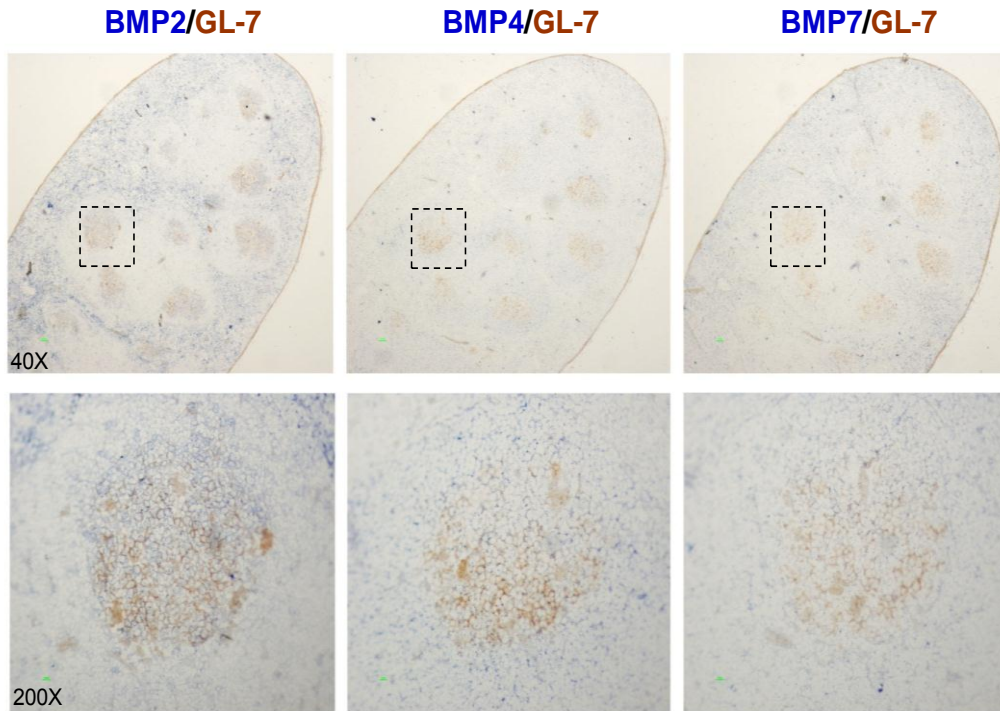
Η διαφορά στην έκφραση του CD25 ανάμεσα στα κύτταρα μάρτυρα και *Twsg1*-cKO παραμένει η ίδια ακόμα και με την προσθήκη rTWSG1 πρωτεΐνης στην καλλιέργεια. Οι διάφορες συγκεντρώσεις της rTWSG1 που προστέθηκαν στα κύτταρα σε συνδυασμό με anti-IgM δεν είχαν αντίκτυπο στην υπερενεργοποίηση των *Twsg1*-cKO κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα (Εικόνα 3.14B). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν τη μη επιρροή της TWSG1 πάνω στην φυσιολογία των B κυττάρων. Πιστοποιούν επίσης το γεγονός ότι η TWSG1 δεν δρα καθεαυτή στα κύτταρα αλλά ρυθμίζει την πρόσδεση των BMPs ή άλλων πρωτεϊνών πάνω σε αυτά.

3.4.7 Τα B κύτταρα αντιδρούν στα BMP σήματα

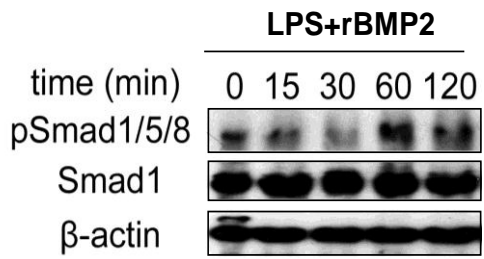
Η κύρια δράση της TWSG1 είναι να ανταγωνίζεται και να αποτρέπει την σύνδεση των BMPs στους υποδοχείς τους. Προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι οι BMPs εκφράζονται στο σπλήνα (Εικόνα 3.1Α). Εφόσον ο χώρος δράσης της TWSG1 είναι περιοχές όπου υπάρχει έκκριση αντισωμάτων είναι πιθανόν να υπάρχει σε αυτές τις περιοχές κάποια BMP που η δράση της να ρυθμίζεται από την TWSG1. Αυτή η πιθανότητα ενδυναμώνεται από το γεγονός ότι τα ερεθισμένα B κύτταρα εκφράζουν τους BMP υποδοχείς (Εικόνα 3.1Ε), συνεπώς είναι σε θέση να δεχτούν BMP σήματα. Εξετάστηκε αρχικά με την τεχνική της διπλής ανοσοϊστοχημείας η παρουσία κάποιας BMP στα ΒΚ του σπλήνα. Από τις BMP2, 4 και 7 που εξετάστηκαν μόνο η BMP2 ήταν παρούσα στα ΒΚ (Εικόνα 3.15Α). Επιπλέον φαίνεται να εκφράζεται στην φωτεινή περιοχή του ΒΚ όπου κυριαρχούν τα θυλακιώδη T κύτταρα (T_{FH}) και τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα. Παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις για την έκφραση της BMP7 από τα T_{FH} δεν διαπιστώθηκε με αυτή την τεχνική τίποτα παρόμοιο. Η ανταπόκριση των B κυττάρων στα BMP σήματα στηρίζεται από το γεγονός της παρουσίας pSmad1/5/8 σε αυτά. Αυτό φαίνεται από την ανίχνευση του pSmad1/5/8 στα B κύτταρα φυσιολογικών ποντικών μετά από ταυτόχρονο ερεθισμό με LPS και rBMP2 (Εικόνα 3.15Β) σε στύπωμα Western. Η BMP2 προτιμήθηκε από την BMP6 και BMP7 λόγω του γεγονότος ότι ήταν η μοναδική BMP που εντοπίστηκε σε περιοχές παραγωγής πλασματοκυττάρων στο σπλήνα. Παρόλο που το pSmad1/5/8 ανιχνεύεται σε ήμερα κύτταρα δίχως ερεθισμό με BMP2 (time = 0min) εντούτοις παρατηρείται αύξηση του σήματος pSmad1/5/8 κατά την διάρκεια του ερεθισμού (time = 60 και 120min), ενώ παράλληλα τα επίπεδα του Smad1 παραμένουν σταθερά. Συνεπώς, B κύτταρα τα οποία είναι υπό ενεργοποίηση δέχονται BMP σήματα. Αυτά τα κύτταρα φαίνεται ότι βρίσκονται στα ΒΚ. Η ανίχνευση φωσφορυλιωμένου Smad1/5/8 στους πυρήνες των B κυττάρων των ΒΚ, επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενός BMP δικτύου σηματοδότησης στα ΒΚ (Εικόνα 3.15Γ). Παρατηρείται επίσης ότι αρκετά από τα κύτταρα αυτά είναι δίπλα στα κύτταρα που εκφράζουν *twsG1*.

Η BMP2 εκτός από τα ΒΚ φαίνεται να εκφράζεται και μερικώς στον ερυθρό πολφό φτάνοντας μέχρι την οριακή ζώνη. Μια πιο λεπτομερή εξέταση ανέδειξε συνεντοπισμό της BMP2 και μακροφάγων (F4/80) σε αυτή την περιοχή (Εικόνα 3.15Δ). Υπάρχουν δύο ειδών μακροφάγα που εντοπίζονται στην οριακή ζώνη,

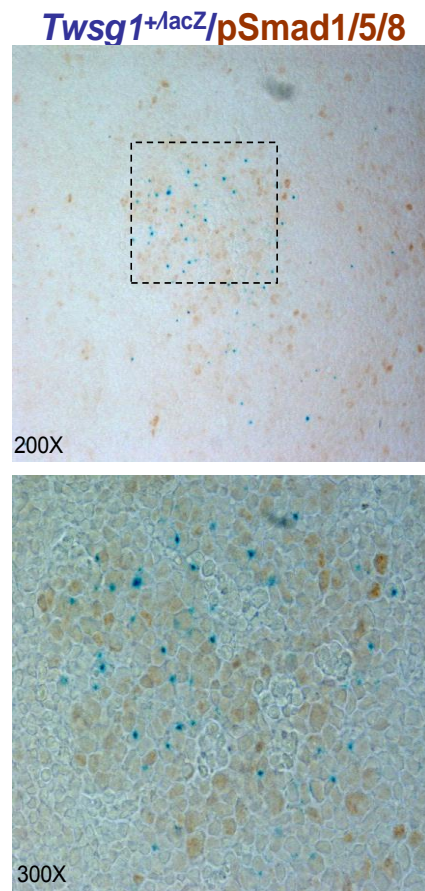
A



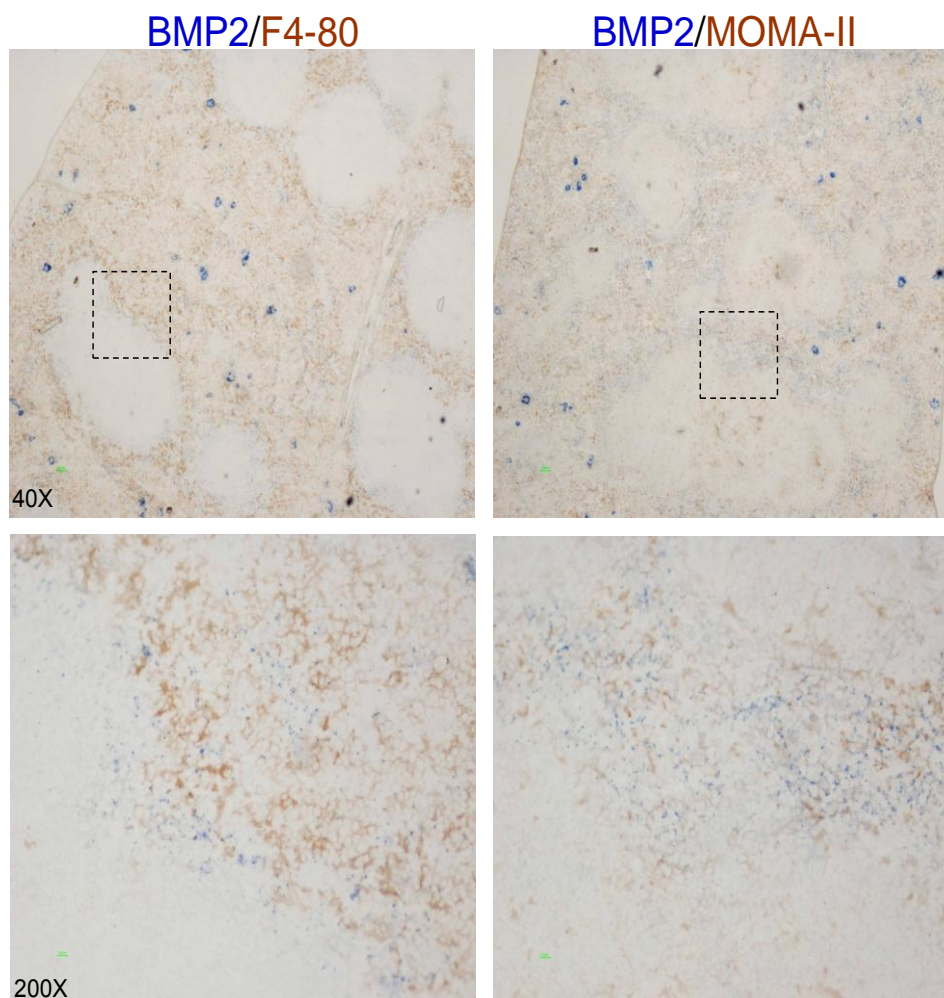
B



Г



Δ

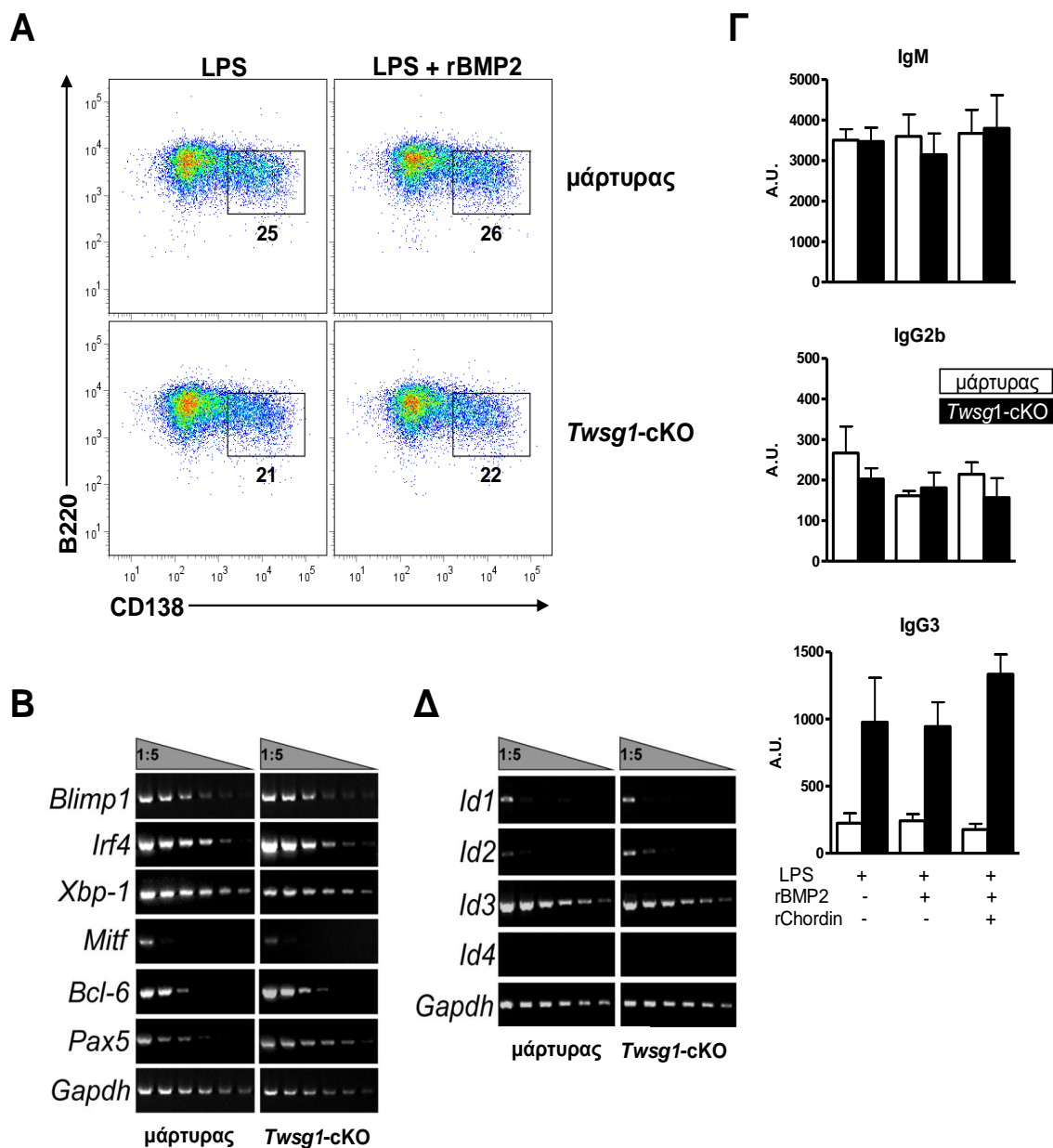


Εικόνα 3.15 Τα Β κύτταρα ανταποκρίνονται στις BMPs Α) Διπλή ανοσοϊστοχημεία σε σπλήνα με BMP2, 4 και 7 σε συνδυασμό με GL-7 σε ποντικούς 12 ημέρες μετά από ανοσοποίηση με DNP-KLH σε CFA. Β) Στύπωμα κατά Western για την ανίχνευση του pSmad1/5/8, Smad1 από Β κύτταρα φυσιολογικού ποντικού ερεθισμένα με LPS και BMP2 σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία. Η φόρτωση ίσης ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε χρονικό σημείο ανιχνεύτηκε με β-actin Γ) χρώση X-gal σε *TwsqI*^{+lacZ} ανοσοποιημένους ποντικούς όπως στο Α, σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία για pSmad1/5/8. Δ) Διπλή ανοσοϊστοχημεία BMP2 σε συνδυασμό με δείκτες μακροφάγων F4/80 και MOMA-II σε σπλήνα φυσιολογικών ποντικών.

τα μακροφάγα της οριακής ζώνης (MZMΦs) και τα οριακά μεταλλοφιλικά μακροφάγα (MMMs). Διπλή χρώση για BMP2 και MOMA-II ανέδειξε μερικό συνεντοπισμό οπότε πιθανότατα η BMP2 να εκφράζεται από τα δύο αυτά είδη μακροφάγων. Τα παραπάνω πειράματα συνηγορούν στην ύπαρξη ενεργών BMP δικτύων σηματοδότησης σε περιοχές παραγωγής αντισωμάτων όπου η δράση τους στοχεύει τα Β κύτταρα.

3.4.8 Η έλλειψη του *twsg1* επηρεάζει την παραγωγή IgG3 και αυξάνει την έκφραση του *id2* *in vitro*

Η έλλειψη του *twsg1* από τα B κύτταρα προκαλεί την αύξηση στην παραγωγή των ανοσοσφαιρινών στους *Twsg1*-cKO ποντικούς. Η ύπαρξη της BMP2 στις περιοχές διαφοροποίησης των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα σε συνδυασμό με την ιδιότητα της να προσδεθεί στα B κύτταρα και να ενεργοποιήσει την σηματοδοτική οδό του pSmad1/5/8 προμηνύει την ύπαρξη ενός BMP δικτύου σηματοδότησης που πιθανότατα εμπλέκεται στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Εξετάστηκε η διαφοροποίηση απομονωμένων B κυττάρων από ποντικό μάρτυρα και *Twsg1*-cKO σε πλασματοκύτταρα μετά από ερεθισμό με LPS *in vitro*. Δεν υπήρχε καμία διαφορά στα ποσοστά των πλασματοκυττάρων (B220^{low}CD138⁺) και στις δύο ομάδες (Εικόνα 3.16Α). Επιπρόσθετα ημι-ποσοτική RT-PCR για γονίδια που επάγουν (*blimp1*, *irf4*, *xbp-1*) ή μπλοκάρουν (*mitf*) την διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα δεν έδειξε διαφορές (Εικόνα 3.16Β). Επίσης εξετάστηκαν γονίδια που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων *in vitro* (*bcl-6*, *pax5*) όπου και παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση τους, αποτέλεσμα που πιστοποιεί το γεγονός ότι τα *Twsg1*-cKO B κύτταρα πολλαπλασιάζονται περισσότερο σε σχέση με αυτά του μάρτυρα (Εικόνα 3.16Β). Η προσθήκη της BMP2 σε συνδυασμό με LPS δεν επηρέασε τα συνολικά ποσοστά των πλασματοκυττάρων όπως και στην περίπτωση του LPS. Στη συνέχεια εξετάστηκε η ποσότητα των ανοσοσφαιρινών IgM, IgG2b και IgG3 που παράχθηκαν στην καλλιέργεια. Διαπιστώθηκε αύξηση της IgG3 από τα *Twsg1*-cKO B κύτταρα μετά από ερεθισμό με LPS ενώ οι τιμές των IgM και IgG2b παρέμειναν αμετάβλητες (Εικόνα 3.16Γ). Η προσθήκη της BMP2 με LPS δεν κατάφερε να διαφοροποιήσει τις τιμές των υπό εξέταση ανοσοσφαιρινών σε καμία από τις δύο ομάδες· όπως και η προσθήκη της rChordin μαζί με rBMP2 και LPS (Εικόνα 3.16Γ). Συνεπώς η BMP2 δεν επηρεάζει τα B κύτταρα στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών *in vitro*. Παρατηρήθηκε τελικώς ότι τα ερεθισμένα με LPS *Twsg1*-cKO B κύτταρα εκφράζουν λίγο περισσότερο Id2 mRNA σε σχέση με τα B κύτταρα του μάρτυρα (Εικόνα 3.16Δ). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα *Twsg1*-cKO B κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν γρηγορότερα παράγοντας περισσότερη ανοσοσφαιρίνη IgG3 και παράλληλα υπερεκφράζοντας το γονίδιο *id2* χωρίς τον έλεγχο της BMP2.



Εικόνα 3.15 Τα *Twsg1-cKO* B κύτταρα παράγουν περισσότερη IgG3 και υπερεκφράζουν *id2* Α) Κυτταρομετρία ροής για πλασματοκύτταρα 4 ημέρες μετά από ερεθισμό με LPS ή συνδυασμό με rBMP2. Οι μετρήσεις και τα ποσοστά είναι οι μέσοι όροι από τρία δείγματα. Β, Δ) ημι-ποσοτική RT-PCR από mRNA B κυττάρων μάρτυρα και *Twsg1-cKO* 3 ημέρες μετά από ερεθισμό με LPS για Β) γονίδια ρυθμιστές πλασματοκυττάρων και πολλαπλασιασμού Δ) οικογένειας κυτταρικών BMP στόχων *id* Γ) ELISA για IgM, IgG2b και IgG3 7 ημέρες μετά από ερεθισμό με LPS και rChordin. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων από τρεις ποντικούς ανά ομάδα. Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. A.U.: Arbitrary Units

4 Συζήτηση.

4.1 Παρουσία των BMPs στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα

Σε αυτή τη μελέτη, η έκφραση των συστατικών στοιχείων του σηματοδοτικού δικτύου των BMP ταυτοποιήθηκε στους περιφερικούς λεμφοειδείς ιστούς. Στις περισσότερες περιπτώσεις η έκφραση των γονιδίων μελών που απαρτίζουν το σηματοδοτικό δίκτυο των BMP ποικίλει ανάμεσα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, περιορίζεται σε συγκεκριμένες ιστολογικές τοπολογίες και ακολουθεί ένα δυναμικό πρότυπο που σχετίζεται με την ιδιαίτερη κατάσταση του κυττάρου. Ειδικότερα:

α) BMPs, οι ανταγωνιστές των BMP και οι υποδοχείς των BMP εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που έχουν λεμφοειδή και μυελοειδή προέλευση

β) Η έκφρασή τους παρατηρείται πρωτίστως σε ενεργοποιημένα κύτταρα

Το πρότυπο της διαφορικής έκφρασης των κυρίων μελών του σηματοδοτικού δικτύου των BMP έχει ως εξής:

BMPs και υποδοχείς των BMP. Το *bmp2* εκφράζεται σε καλλιέργειες μακροφάγων τα οποία διαφοροποιούνται από κύτταρα του μυελού των οστών [bone marrow derived macrophages (BMDMΦs)] και όχι από τα δενδριτικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών [bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)]. Επιπρόσθετα, η BMP2 έχει παρατηρηθεί στην περιοχή του δακτυλίου της οριακής ζώνης (MZ) όπου τα μακροφάγα της οριακής ζώνης ή τα οριακά μεταλλοφιλικά μακροφάγα αποτελούν τους πλέον πιθανούς υποψήφιους κυτταρικούς τύπους που εκφράζουν την BMP2. Είναι ασαφές εάν η έκφραση του *bmp2* επηρεάζεται από την κατάσταση ενεργοποίησης των μακροφάγων ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της BMP2 στην ρύθμιση ωρισμένων διαδικασιών της εγγενούς ανοσίας που υπαγορεύονται από τα μακροφάγα. Επιπλέον, η BMP2 εντοπίζεται στην φωτεινή ζώνη των βλαστικών κέντρων (BK) σε ανοσοποιημένους ποντικούς. Με βάση την τοποθεσία και την

παρατήρηση άλλων πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας σε μη ανοσοποιημένους ποντικούς (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται), είναι ιδιαίτερα πιθανό ότι και τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα (ΘΔΚ) εκφράζουν την BMP2. Η παρατήρηση αυτή υπονοεί έναν επιπρόσθετο ρόλο της BMP2, συμμετέχοντας σε μηχανισμούς αντίδρασης του βλαστικού κέντρου.

Το *bmp5* εκφράζεται από τα BMDMΦs αλλά και από τα BMDCs σε καλλιέργεια. Επιπρόσθετα, η έκφραση του φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα δυναμική καθώς εμφανίζεται να ελαττώνεται σε ένα μεταγενέστερο στάδιο του καταρράκτη ενεργοποίησης των μακροφάγων που εντοπίζονται στην ενεργοποιημένη περιτοναϊκή κοιλότητα. Καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία για τη λειτουργία του *bmp5* σε κάποιο από τα λεμφοειδή όργανα, θα ήταν ιδιαίτερο ενδιαφέρον να αποκαλυφθούν λειτουργίες του *bmp5* αναφορικά με την κυτταρική φυσιολογία των μακροφάγων αλλά και των δενδριτικών κυττάρων.

Το *bmp7* εκφράζεται επιλεκτικά από τα BMDMΦs και όχι από τα BMDCs. Αν και εκφράζεται επίσης δυναμικά από τα αναπτυσσόμενα αλλά και τα ώριμα T κύτταρα δεν ανιχνεύθηκε στο τμήμα του σπλήνα με ανοσοϊστοχημεία. Αποτελέσματα από πειράματα μικροσυστοιχιών υποδεικνύουν την έκφραση του *bmp7* από κυστιδιακά T κύτταρα τα οποία εδράζονται στο ΒΚ (Nurieva et al., 2008). Εάν το *bmp7* διαδραματίζει κάποιο ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις στην έμφυτη ή την επίκτητη ανοσία απομένει να διαλευκανθεί.

Σχεδόν κάθε υποδοχέας των BMP εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανοσοποιητικού που έχουν δοκιμασθεί με την εξαίρεση του Alk6 και του ActRII που δεν εκφράζονται στα BMDMΦs και τα BMDCs. Όλοι οι υποδοχείς των BMP εκφράζονται σε B λεμφοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με LPS αλλά όχι στα B κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Σε αντίθεση με τα BMDMΦs αυτή η δυναμική έκφραση που παρατηρείται στα B λεμφοκύτταρα αναδεικνύει την αναγκαιότητα της σηματοδότησης μέσω των BMP σε διεργασίες όπως είναι η τελική διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων, η ενεργοποίηση αλλά και η παραγωγή ανοσοσφαιρινών.

Chordin and Noggin Η *chordin* βρέθηκε ότι εκφράζεται στα BMDCs καθώς και στα ενεργοποιημένα μακροφάγα της περιτοναϊκής κοιλότητας. Απουσία της Chordin παρατηρήθηκε ακόμα στον σπλήνα (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Η έκφραση του *chordin* καθώς και των *noggin*, *gremlin* και *bmp5* από τα BMDCs

καταδεικνύουν την παρουσία του σηματοδοτικού δικτύου των BMP που ρυθμίζει πτυχές τις φυσιολογίας των δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ) πιθανότατα στο στάδιο της ανάπτυξης. Παρά την απουσία αποτελεσμάτων αναφορικά με την έκφραση των BMPs και των ανταγωνιστών τους στα ενεργοποιημένα BMDCs, τα προαναφερθέντα ευρήματα δείχνουν ότι η ανάπτυξη ή/και η μετανάστευση των ΔΚ ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMP. Στα ενεργοποιημένα μακροφάγα της περιτοναϊκής κοιλότητας, αποτελεί αξιοσημείωτο γεγονός ότι η έκφραση του *chordin* σε συνδυασμό με την απουσία των ανταγωνιστών των BMP υποδηλώνει την όποια λειτουργία ενός συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού των BMP σε αυτά τα κύτταρα. Η ανάπτυξη ποντικών αναφοράς για το *chordin* ('chordin reporter' mice) καθώς και ποντικών που φέρουν μια ιστοειδική απαλειφή του *chordin* στα μακροφάγα ή τα ΔΚ θα αποκαλύψει τη λειτουργία του *chordin* σε αυτά τα κύτταρα.

Κατά έναν παρόμοιο τρόπο, το πρότυπο έκφρασης του *noggin* στα ΔΚ και τα μακροφάγα υποδηλώνει παράλληλες λειτουργίες με την *chordin*. Ένα επιπλέον ερώτημα που αναδύεται είναι εάν οι Noggin και Chordin λειτουργούν συνεργατικά στον εξωκυττάριο χώρο ρυθμίζοντας έτσι ένα κοινό δίκτυο σηματοδότησης των BMP που δρα στα μακροφάγα και τα ΔΚ. Εκτός από την έκφραση του *noggin* στα μακροφάγα και τα ΔΚ, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους ποντικούς αναφοράς *noggin^{+lacZ}*, ανέδειξαν την έκφραση του *noggin* από λεία μυϊκά κύτταρα ακτίνης τα οποία συνθέτουν ίνες στρες στον κόκκινο πολφό του σπλήνα. Αυτές οι ίνες στρες που ομοιάζουν με ινίδια ακτίνης συνδέουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα με συστατικά του εξωκυτταρικού στρώματος και με παράλληλη αναδιάταξη των ενδοθηλιακών κυττάρων λειτουργούν επιβοηθητικά στην φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων (Mebius and Kraal, 2005). Ως εκ τούτου καθίσταται πιθανό ότι το *noggin* εμπλέκεται στην αναδιάταξη των ινιδίων στρες.

Gremlin και Twisted gastrulation Η έκφραση της Gremlin εντοπίστηκε στα ΘΔΚ. Επιπρόσθετα, η παρουσία της BMP2 επίσης στην περιοχή του ΒΚ (πιθανότατα από τα ΘΔΚ) και η έκφραση του *twsg1* από τη ΒΚ Β κύτταρα σε συνδυασμό με την ανίχνευση του pSmad1/5/8 στο ΒΚ εδραιώνει την άποψη ότι κάποιο σηματοδοτικό δίκτυο των BMP λειτουργεί στα ΒΚ. Όσον αφορά το *gremlin*, το ρεπερτόριο της ανοσολογικής λειτουργίας του επεκτείνεται ακόμα περισσότερο καθώς η έκφραση του παρατηρείται στα DMDCs καθώς και στα ΔΚ των μεσεντέριων λεμφαδένων που

είναι παρακείμενα στα ΒΚ των ανοσοποιημένων ποντικών. Ο όποιος ρόλος του στα ΔΚ και στη δημιουργία του ΒΚ μελετήθηκε περαιτέρω (Ενότητα 4.2).

Το *twsg1* βρέθηκε να εκφράζεται μόνο από τα Β κύτταρα που έχουν υποστεί ενεργοποίηση με LPS καθώς και στα Β κύτταρα των ΒΚ. Μαζί με την αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων των BMP, εμφανώς τα ενεργοποιημένα Β κύτταρα που εμπλέκονται στις ανοσολογικές αποκρίσεις αποτελούν στόχους ρύθμισης μέσω των BMP. Με βάση αυτά τα ευρήματα ο ρόλος του *twsg1* στα Β κύτταρα αποτέλεσε θέμα περαιτέρω μελέτης.

Οι εκτεταμένες μελέτες έκφρασης που πραγματοποιήθηκαν για τα BMP, τους υποδοχείς αλλά και τους ανταγωνιστές των BMP ανέδειξαν ποικίλα πιθανά δίκτυα σηματοδότησης των BMP που λειτουργούν στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς. Καθώς τα μέλη της BMP οικογένειας φαίνεται να εκφράζονται από διάφορους τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, πιθανότατα να εμπλέκονται σε μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η ενεργοποίηση, η ομοιόσταση, και η μετανάστευση: λειτουργίες οι οποίες έχουν ήδη παρατηρηθεί επίσης σε άλλα συστήματα του οργανισμού (Chen et al., 2004b).

4.2 Ρόλος του *gremlin* στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων

Ποντικοί που φέρουν απαλοιφή του *gremlin* σε αιμοποιητικά κυτταρα αποκάλυψαν εμπλοκή του σε πτυχές της βιολογίας των δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ). Ειδικότερα:

- α) η απώλεια του *gremlin* προκαλεί μείωση των μυελωδών δενδριτικών κυττάρων στον σπλήνα και τους μεσεντέριους λεμφαδένες (ΜΛΔ) αλλά και των μυελωδών κυττάρων στον σπλήνα.
- β) η απώλεια του *gremlin* επηρεάζει την ενεργοποίηση των BMDCs επιφέροντας μειωμένη έκφραση των μορίων MHC-II, CD40 and CD86
- γ) το *gremlin* δεν έχει καμία επίδραση στην ανάπτυξη των DMDCs *in vitro*
- δ) η απώλεια του *gremlin* δεν έχει καμία επίδραση στην ανάπτυξη των κοκκιοκυττάρων και των ουδετερόφιλων

Η έκφραση του *gremlin* από τα ΔΚ και τα ΘΔΚ αναδεικνύει πιθανούς του ρόλους σε διαδικασίες της επίκτητης ανοσίας. Καθώς και οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των Β κυττάρων, η οποιαδήποτε αλλοίωση τους (ή των λειτουργιών τους) θα είχε αντίκτυπο στην δημιουργία των ΒΚ. Συνεπώς, αν η έλλειψη του *gremlin* επέφερε αλλοιώσεις στην λειτουργία αυτών των κυττάρων θα είχε σαν αποτέλεσμα αλλοιώσεις στην ανάπτυξη των ΒΚ. Οι ετερόζυγοι ποντικοί *gremlin*^{+/*lacZ*} δεν ανέδειξαν (έστω εν μέρει) κάτι τέτοιο, πιθανότατα λόγω της μη επαρκούς έλλειψης του *gremlin* από αυτά τα κύτταρα. Με βάση το παραπάνω αποτέλεσμα η χρήση των CD21-cre ποντικών (Kraus et al., 2004) για την απαλοιφή του *gremlin* στα ΘΔΚ θα μπορούσε να αποκωδικοποιήσει πιο αποτελεσματικά την δυναμική λειτουργία του *gremlin* στην αντίδραση του ΒΚ.

Ανάλυση των ποντικών όπου το *gremlin* έχει απαλειφθεί στο αιμοποιητικό τμήμα (*Gremlin*-cKO) δεν αποκάλυψε αναπτυξιακές ή δομικές ανωμαλίες, γεγονός που υποδηλώνει ότι το *gremlin* δεν επιτελεί λειτουργίες όσον αφορά στην ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων και των ουδετερόφιλων στο μυελό των οστών. Η μικρή ελάττωση στα ποσοστά των ΔΚ στον σπλήνα και τους ΜΛΔ είναι αμφίβολο εάν οφείλεται στη διαταραχή του σηματοδοτικού δικτύου των BMP στο μικροπεριβάλλον των ΔΚ ή εάν αποτελεί μια ενδογενή επίδραση του *gremlin* σε αυτά τα κύτταρα. Τα ΔΚ εκτός από το *gremlin* εκφράζουν *bmp5*, *noggin*, *chordin* καθώς και μία ποικιλία BMP υποδοχέων. Με την έκφραση των BMP υποδοχέων φαίνεται ότι τα ΔΚ υπόκεινται πιθανότατα στη σηματοδότηση μέσω των BMP. Η μικρή ελάττωση στα ποσοστά των ΔΚ στους *Gremlin*-cKO ποντικούς υποδηλώνει ότι η εκκρινόμενη *Gremlin* μπορεί να λειτουργεί σε συνεργασία με έναν άλλο BMP ανταγωνιστή στον εξωκυττάριο χώρο, προκειμένου να εμποδίσει τα ΔΚ από το να λάβουν ένα BMP σήμα. Παράλληλα, αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τα BMDCs που στερούνται *gremlin* και μεγαλώνουν *in vitro* δεν εμφανίζουν αναπτυξιακά προβλήματα. Συνεπώς η μικρή ελάττωση στα ποσοστά των ΔΚ στο σπλήνα πιθανότατα να είναι αποτέλεσμα αλλοιωμένης BMP σηματοδότησης σε αυτούς τους ποντικούς και όχι της ενδογενούς απουσίας του *gremlin*. Εκτός από την ανάπτυξη των ΔΚ, παρατηρήθηκε *in vitro*, μικρή μείωση της έκφρασης μορίων αντιγονοπαρουσίασης και ενεργοποίησης στην επιφάνεια των ΔΚ. Το γεγονός αυτό εγείρει το ερώτημα εάν μια τέτοια επίδραση αποδίδεται στην απώλεια του *gremlin* σε αυτό τον κυτταρικό τύπο. Καθώς η απουσία της ενεργοποίησης των BMDCs δεν υπόκειται σε εξωτερικό BMP ερέθισμα είναι πιθανόν ότι υπάρχει μια ενδογενής

απαίτηση για το *gremlin* προκειμένου (τουλάχιστον εν μέρει) τα ΔΚ να μπορούν να ενεργοποιηθούν όπως πρέπει.

4.3 Ο ρόλος του *TwsG1* στην φυσιολογία του B κυττάρου και στους μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης

Η απαλοιφή του *twsG1* στα B κύτταρα, αποκάλυψε πολλαπλούς ρόλους για το *twsG1* σε ποικίλες λειτουργίες που διέπουν την φυσιολογία των B κυττάρων. Είναι εμφανές ότι το *twsG1* αποτελεί μέρος της ρυθμιστικής μηχανής που λειτουργεί στους μηχανισμούς της ανοσοαπόκρισης. Μια περίληψη των ευρημάτων παρατίθεται ακολούθως:

α) Απαλοιφή του *twsG1* στα B κύτταρα, επηρεάζει την ανάπτυξη των B λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης καθώς και των νεοσχηματισμένων / μεταβατικού τύπου I κυττάρων (NF/T1)

β) Απαλοιφή του *twsG1* έχει επιλεκτικά αντίκτυπο στην αλλαγή ισοτύπου της IgM και όχι της IgG

γ) Το *twsG1* επηρεάζει τις θυμοανεξάρτητες αποκρίσεις και την ανάπτυξη κυττάρων που εκκρίνουν αντιγονοειδικά αντισώματα anti-IgM

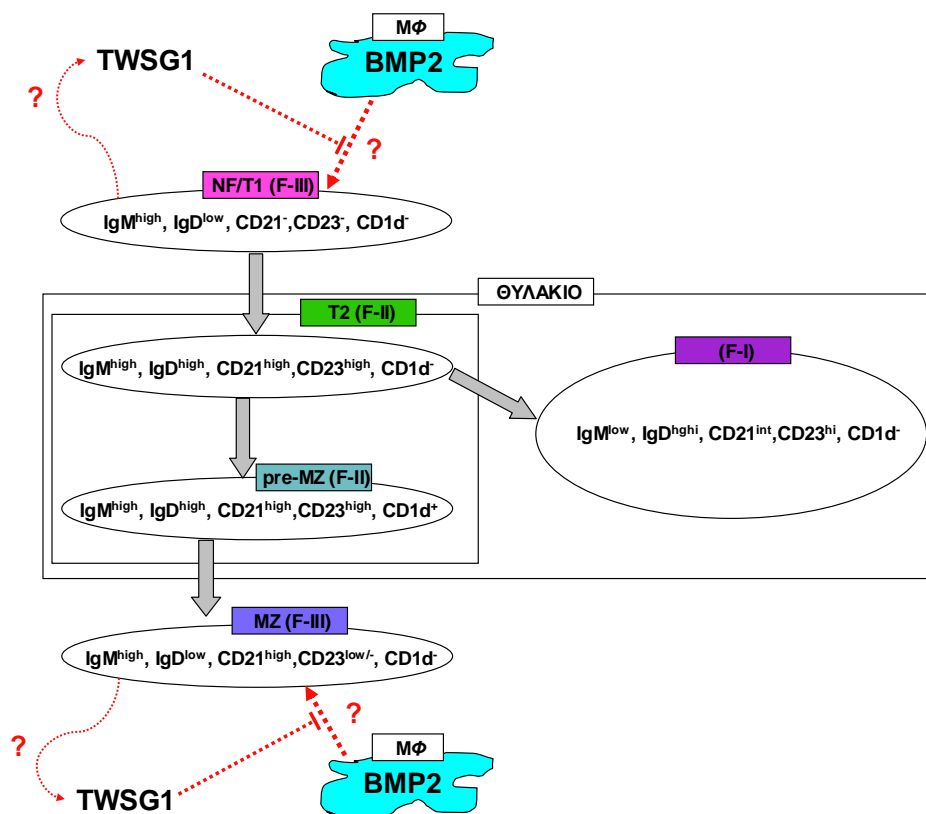
δ) Οι μεσολαβούμενες από το *twsG1* επιδράσεις στα B κύτταρα ενδέχεται να είναι ενδογενείς

ε) Ο πολλαπλασιασμός των B κυττάρων, η ενεργοποίηση, η έκκριση IgG3, η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *bcl-6*, *pax5* και του γονιδίου που ανταποκρίνεται στα BMP (BMP responsive gene) *id2* προάγονται κατά την απαλοιφή του *twsG1* στα B κύτταρα

Ομοίωση στον δακτύλιο της οριακής ζώνης

Ακολουθώντας την ειδική στα B κύτταρα απαλοιφή του *twsG1*, τα πρωτογενή ή δευτερογενή λεμφοειδή όργανα των *TwsG1*-cKO ποντικών εμφάνισαν φυσιολογικούς αριθμούς B κυττάρων. Παρόμοια, η ιστοειδική απαλοιφή σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα χρησιμοποιώντας τον *Vav^{Cre}* ποντικό (de Boer et al., 2003) είχε ως αποτέλεσμα και πάλι φυσιολογικούς κυτταρικούς αριθμούς στα λεμφοειδή όργανα, όπως και στον *TwsG1*-cKO ποντικό. Είναι γνωστό ότι οι *TwsG1^{-/-}* ποντικοί έχουν προβλήματα ανάπτυξης των λεμφοειδών οργάνων (Nosaka et al., 2003). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι ενδεικτικό ότι το *twsG1* που προέρχεται από τα

αιμοποιητικά κύτταρα δεν μπορεί να είναι υπεύθυνο για τα προβλήματα που παρατηρούνται στους λεμφοειδείς ιστούς των ποντικών που δεν εκφράζουν καθόλου *twsg1*. Πιο λεπτομερής ανάλυση των B κυτταρικών υποομάδων από σπλήνες που απομονώθηκαν από τους *Twsg1*-cKO ποντικούς αποκάλυψε 30% ελάττωση των MZB κυττάρων. Αυτή η ελάττωση αντανακλάται στο κλάσμα των $IgD^{low}IgM^{high}$, το οποίο περιλαμβάνει νεοσχηματισμένα / μεταβατικού σταδίου 1 (NF/T1) και MZB κύτταρα. Αξιοσημείωτα, αυτοί οι πληθυσμοί των B κυττάρων εδράζονται στον εξωτερικό δακτύλιο της οριακής ζώνης (Pillai et al., 2005; Saito et al., 2003). Η μετάβαση των NF ανώριμων B κυττάρων στα κυστιδιακά B κύτταρα της οριακής ζώνης ρυθμίζεται από πολυάριθμα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι ποντικοί που δεν εκφράζουν *id2*, στους οποίους οι NF/T1 και MZB πληθυσμοί έχουν επίσης υποστεί βλάβη με μια άνοδο προς τα κυστιδιακά κύτταρα (Becker-Herman et al., 2002). Το *id2* αποτελεί γονίδιο στόχο του BMP σήματος. Έτσι είναι αντιληπτό ότι ένα σήμα BMP ρυθμίζει αυτήν την πτυχή της διαφοροποίησης των B κυττάρων. Σε συμφωνία με την παρατήρηση για τους ποντικούς που δεν εκφράζουν *id2*, μειωμένα ποσοστά στους πληθυσμούς των NF/T1 και τους πληθυσμούς των MZB παρατηρούνται επίσης στους *Twsg1*-cKO ποντικούς. Η παρουσία της BMP2 στην περιοχή της MZ προάγει την υπόθεση ότι ένα δίκτυο σηματοδότησης των BMP παρέχει ομοιοστατικά σήματα στο μικροπεριβάλλον του εξωτερικού δακτυλίου της MZ που στεγάζει τα NF/T1 και τα MZB κύτταρα. Η έκφραση του *twsg1* από τα MZB κύτταρα ή από τα πρόδρομα κύτταρά τους δεν ανιχνεύθηκε σε σημαντικά ποσά. Επιπρόσθετα, δεν ανιχνεύθηκαν άλλες πηγές του *twsg1* στην MZ, γεγονός που αποκλείει την πιθανότητα ενός μη B κυττάρου το οποίο παράγοντας TWSG1 θα μπορούσε να επηρεάσει την ομοιόσταση των MZB (Εικόνα 4.1). Είναι πιθανόν ότι μικρές ποσότητες της TWSG1 παράγονται υπό συγκεκριμένες συνθήκες και ρυθμίζουν τις επιδράσεις που παρατηρούνται. Τίθεται επιπλέον το ερώτημα αν τα NF/T1 και τα MZB κύτταρα όντως δέχονται BMP σήματα και αν η TWSG1 ρυθμίζει πράγματι τη δράση της BMP2 στα NF/T1 κύτταρα καθώς και στα MZB κύτταρα. Αν και η αλληλεπίδραση των TWSG1-BMP είναι γνωστή (Chang et al., 2001; Larrain et al., 2001; Oelgeschlager et al., 2000) δεν είναι ξεκάθαρο εάν η TWSG1 δρα στα MZB κύτταρα με ανταγωνιστικό τρόπο ως προς το BMP σήμα. Περαιτέρω λειτουργικές μελέτες σε διαχωρισμένους πληθυσμούς MZB και πρόδρομων MZB σε μη ενεργοποιημένες και ενεργοποιημένες καταστάσεις θα ρίξει φως στον τρόπο με τον οποίο η σηματοδότηση μέσω των BMP λειτουργεί σε αυτά τα κύτταρα.



Εικόνα 4.1 Προτεινόμενος έλεγχος της ομοιόστασης του δακτυλίου της MZ από τη σηματοδότηση των BMP (βλέπε κείμενο για επεξήγηση)

Εμπλοκή της TWSG1 στις TD και TI αποκρίσεις

Τα βλαστικά κέντρα (BK) αποτελούν θέσεις θυμοεξαρτώμενων (TD) αποκρίσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων που εκκρίνουν υψηλής συγγένειας αντισώματα [antibody secreting cells, ASCs]. Πειράματα που υλοποιήθηκαν σε *Twsg1*-cKO και ποντικούς ελέγχου δεν έδειξαν αλλαγές στην ανάπτυξη των BK καθώς και στην εναλλαγή των συγκεκριμένων Ig υποτύπων. Ωστόσο, αποκάλυψαν προβλήματα στην συγγένεια ωρίμανσης των IgM και όχι των IgG. Αυτή η παρατήρηση είναι μοναδική καθώς γονίδια που να εμπλέκονται σε έναν τέτοιο μηχανισμό δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Η TWSG1 θα μπορούσε να εμπλέκεται στην κλωνική επιλογή των πλασμαβλαστών που εκκρίνουν IgM και που απαιτούνται για να παράγουν υψηλής συγγένειας IgM αντισώματα. Η ταυτοποίηση θετικών για pSmad1/5/8 B κυττάρων καθώς η παρουσία των Gremlin και BMP2 στα BK παρέχει ισχυρή ένδειξη για τη ρύθμιση της ωρίμανσης συγγένειας της IgM από τη σηματοδότηση μέσω BMP. Παραμένει ανοικτό το ερώτημα πώς η σηματοδότηση

μέσω των BMP λειτουργεί σε αυτό το μηχανισμό και επιπρόσθετα εάν οι TWSG1, Gremlin and BMP2 συνεργάζονται σε αυτό το πλαίσιο. Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα θα μπορούσε να δοθεί με έναν συνδυασμό ποντικών όπου θα έχει απαλειφθεί η Gremlin και η BMP2 ή ακόμα και με υπερέκφραση στα ΘΔΚ. Επιπρόσθετες μελέτες θα μπορούσαν επίσης να ταυτοποιήσουν άλλες επιδράσεις της σηματοδότησης μέσω των BMP σε μηχανισμούς ωρίμανσης των ΒΚ.

Οι μεταβολές στην θυμοανεξάρτητη παραγωγή ανοσοσφαιρινών που παρατηρήθηκαν στους *TwsG1-cKO* ποντικούς, αναδεικνύουν την εμπλοκή της TWSG1 σε μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης. Η ανοσοποίηση με αντιγόνα TI-1 και TI-2 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη έκκριση IgM και ορισμένων κατηγοριών IgG. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση των DNP-IgM τιμών στις TI-2 αποκρίσεις προκαλείται από την αύξηση των DNP-IgM ASCs. Οι TI αποκρίσεις θεωρείται ότι ξεκινούν στα MZB κύτταρα, καθώς έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται πολύ γρήγορα στα TI αντιγόνα εξαιτίας του χαμηλού επιπέδου ενεργοποίησης που τους επιτρέπει να χειριστούν χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου προάγοντας έτσι τις κυτταρικές αποκρίσεις (Levy et al., 1998). Ποντικοί με ιστοειδική απαλοιφή του RBP-Jκ σε Β κύτταρα εμφανίζουν φυσιολογικές αποκρίσεις IgM και IgG3 ως απόκριση στην NP-Ficoll. Σε αυτούς τους ποντικούς η έλλειψη RBP-Jκ δεν επηρέασε κανέναν από τους κυτταρικούς υποτύπους των Β κυττάρων εκτός από τα MZ B κύτταρα (Tanigaki et al., 2002). Επιπρόσθετα, οι διαγονιδιακοί IL-7 (ιντερλευκίνη 7) ποντικοί οι οποίοι εμφανίζουν υψηλούς αριθμούς FO αλλά όχι MZ B κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη απόκριση IgM στην NP-Ficoll (Ceredig et al., 2003). Αν και οι σπλήνες των *TwsG1-cKO* ποντικών περιέχουν χαμηλούς αριθμούς των MZB κυττάρων η ικανότητά τους να αποκρίνονται στα TI-1 και TI-2 αντιγόνα προάγεται. Η παρατήρηση αυτή δρα προσθετικά στο μοντέλο λειτουργίας της σηματοδότησης μέσω BMP, προτείνοντας τη ρύθμιση πολλαπλών μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια της κυτταρικής ομοιόστασης.

Υπερ-απόκριση των Β κυττάρων που στερούνται *twsG1*

Η *in vitro* ενεργοποίηση απομονωμένων Β κυττάρων με anti-IgM ή LPS ανέδειξε αυξημένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη απόπτωση στα κύτταρα που στερούνται *twsG1*. Αντιθέτως, ο πολλαπλασιασμός που επάγεται από το anti-CD40 δεν άλλαξε, και η ενεργοποίηση με CD40 δεν αντιστρέφει τον επαγόμενο από το anti-IgM ή LPS υπερπολλαπλασιασμό. Ο υπερπολλαπλασιασμός συνοδεύτηκε με αυξημένα επίπεδα

έκφρασης του CD25, ενώ άλλοι δείκτες ενεργοποίησης/ διαφοροποίησης όπως οι CD69, CD86, MHC-II δεν μεταβλήθηκαν. Δεν είναι φανερό εάν τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του CD25 αποτελούν άμεσο αποτέλεσμα της έλλειψης της TWSG1 ή εάν αποτελούν ένα φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με τον αυξημένο πολλαπλασιασμό. Χρησιμοποιήσαμε τα τροποποιημένα επίπεδα έκφρασης του CD25 για να εξετάσουμε εάν ο υπερπολλαπλασιασμός που παρατηρήθηκε ήταν αποτέλεσμα της επαγόμενης από την ενεργοποίηση TWSG1 που επιδρά στα B κύτταρα κατά έναν αυτοκρινή/ παρακρινή τρόπο ή εάν τα κύτταρα που στερούνται *twsg1* είχαν ήδη υποστεί μεταβολές *in situ* και συνεπώς ο αυξημένος πολλαπλασιασμός αποτελούσε απλά μια αντανάκλαση αυτού του φαινομένου. Καθώς η προερχόμενη CD45.1 (ανταγωνιστική)-προερχόμενη TWSG1 δεν μπορούσε να επηρεάσει τον υπερπολλαπλασιασμό των *Twsg1*-cKO B κυττάρων σε πειράματα συν-καλλιέργειας συμπεραίνεται ότι η τάση για υπερπολλαπλασιασμό σε αυτά τα κύτταρα είναι ενδογενής. Υπό το φως αυτής της άποψης δεν αποτελούσε έκπληξη ότι η εξωγενής προσθήκη εξωγενών μορίων του BMP μονοπατιού (rTWSG1, rBmp2, rChordin) δεν είχαν καμία επίδραση σε *in vitro* ενεργοποιημένα B κύτταρα (φυσιολογικά και *Twsg1*-cKO).

Η ενεργοποίηση με LPS των *Twsg1*-cKO B κυττάρων *in vitro* επέφερε αυξημένη παραγωγή IgG3 καταδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο του *twsg1* στην αλλαγή τάξης προς IgG3. Αυτά τα υψηλότερα επίπεδα της IgG3 δεν ανταποκρίνονται σε μια συνολική αύξηση των πλασματοκυττάρων ούτε στην έκφραση των κύριων μεταγραφικών παραγόντων που οδηγούν την διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια αύξηση στην έκφραση των *bcl-6*, *pax5* και *id2*. Οι *Bcl-6* και *Pax5* είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν ρόλο κλειδί στον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων, την ωρίμανση και την διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων (Max et al., 1995; Shaffer et al., 2000; Usui et al., 1997; Wakatsuki et al., 1994). Ο Gonda και οι συνεργάτες έχουν προτείνει ότι η τροποποίηση της σχετικής αφθονίας των πρωτεϊνών Pax5, E2A και Id παρέχει έναν μηχανισμό για τη λεπτή ρύθμιση των επιδράσεων των μορίων Pax5 και E2A στην ενεργοποίηση των B κυττάρων και αυτές οι διαφορικές δραστηριότητες καθορίζουν την ενεργοποίηση του κυρίαρχου ρυθμιστή της αλλαγής τάξης που είναι η AID (Gonda et al., 2003). Τα αποτελέσματα από τους *Twsg1*-cKO ποντικούς προτείνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μορίων Pax5 και Id2, τα οποία ρυθμίζονται από την ενεργότητα της TWSG1, μετατοπίζουν την ισορροπία της μεταγραφής του

γενετικού τύπου του Cγ3 προάγοντας έτσι την παραγωγή των IgG3 σε ενεργοποιημένα B κύτταρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η TWSG1 αποτελεί έναν τροποποιητή της ενεργότητας των BMP και καμία λειτουργία της TWSG1 χωρίς να αλληλεπιδρά με BMP δεν έχει αναφερθεί. Σε αναζήτηση ενός σηματοδοτικού δικτύου του BMP που θα μπορούσε να υπόκειται σε ρύθμιση από την TWSG1 *in situ* ταυτοποιήσαμε την BMP2 στην περιοχή των ΒΚ και στον δακτύλιο ΜΖ του σπλήνα. Αποτελεί ερωτηματικό εάν η TWSG1 τροποποιεί την ενεργότητα της BMP2 από μόνη της ή σε συνεργασία με άλλους ανταγωνιστές *in vivo*. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην κινητική των IgM και Ig υποτύπων σε *Twsg1*-cKO B κύτταρα προτείνουν ότι ένα τέτοιο BMP σήμα θα μπορούσε να επηρεάσει την ενεργοποίηση των B κυττάρων. Οι επακόλουθες αποκρίσεις των Ig βασίζονται στο γεγονός ότι μια κατηγορία κοινών μορίων που ενσωματώνουν τη σηματοδότηση μέσω του BCR και του BMP αποτελούν οι πρωτεΐνες Id (Engel and Murre, 2001). Αξιοσημείωτα, τα B κύτταρα που στερούνται *twsg1* έχουν αυξημένα επίπεδα του *id2*.

Τα *in vitro* πειράματα δεν κατέστη δυνατό να αποκαλύψουν μια άμεση επίδραση της εξωγενούς BMP2 στην ενεργοποίηση των B κυττάρων (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται), τον πολλαπλασιασμό και παραγωγή των Ig είτε σε κύτταρα ελέγχου είτε σε *Twsg1*-cKO κύτταρα. Η παραγωγή Ig δεν επηρεάστηκε επίσης από την Chordin, που αποτελεί γνωστό συνεργάτη της TWSG1 (Ross et al., 2001). Επειδή οι BMP υποδοχείς εκφράζονται μετά βίας στα B κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά η έκφρασή τους αυξάνεται ισχυρά μετά από ενεργοποίησή τους *in vitro*, αυτό θα μπορούσε να παρέχει μια πιθανή εξήγηση για τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις. Παρόλο που δεν ήταν εφικτό να ταυτοποιηθεί ένας μηχανισμός στα πλαίσια της παρούσας μελέτης καθώς και οι ακριβείς συνθήκες υπό τις οποίες τα BMP σήματα επηρεάζουν τα B κύτταρα, δε μπορεί να αποκλειστεί ότι η *in vitro* υπεραπόκριση που παρατηρήθηκε στα B κύτταρα που στερούνται TWSG1 αποτελεί απόρροια ενός ενδογενούς BMP σήματος 'προ-προγραμματισμού' του B κυττάρου για μια τροποποιημένη απόκριση *in vitro*.

Συνολικά, οι παρατηρούμενοι φαινότυποι στους *Twsg1*-cKO ποντικούς δε δείχνουν ότι η TWSG1 είναι απαραίτητη σε αυτές τις διαδικασίες αλλά μάλλον αναδεικνύουν ένα δεύτερο επίπεδο ελέγχου που αποσκοπεί στη λεπτή ρύθμιση της απόκρισης του B κυττάρου κατά την έκθεση στο αντιγόνο. Η αποκάλυψη των μηχανισμών που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση μέσω των BMP αλλά και η κατανόηση του τρόπου ανταπόκρισης των κυττάρων σε αυτά τα σήματα θα αποτελέσει ένα

ακόμα σημαντικό βήμα στην κατανόηση της ρυθμιστικής πολυπλοκότητας πίσω από την διαφοροποίηση των Β κυττάρων, καθώς και της παραγωγής των αντισωμάτων.

5. Περιλήψεις

5.1 Περίληψη στα Ελληνικά.

Η διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης επιτυγχάνεται δυναμικά μέσω της λειτουργίας εξωκυττάρων δικτύων μεταγωγής σήματος, η δράση των οποίων συντονίζει τη λειτουργία των μεμονωμένων κυττάρων. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs) είναι μία οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος. Είναι μέλη της υπεροικογένειας του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-βήτα (TGF- β) και είναι άμεσα εμπλεκόμενες σε μηχανισμούς διατήρησης της ομοιόστασης. Η οδός μεταγωγής σήματος των BMPs είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη στον εξωκυττάριο χώρο από διάφορους εκκρινόμενους ρυθμιστές (ανταγωνιστές) των BMPs. Παράγοντες όπως οι πρωτεΐνες Noggin, Chordin, Gremlin και Twisted Gastrulation (TWSG1) διαμορφώνουν τη διαβάθμιση της δράσης των BMPs, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την ικανότητα τους να συνδέονται με τους υποδοχείς τους. Η εμφάνιση τους έχει παρατηρηθεί σε νόσους όπως ο καρκίνος του προστάτη και του μαστού, μυελώματα, λευχαιμία και λεμφώματα, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους ακόμα και σε κυτταρικό επίπεδο.

Οι στόχοι της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η αναγνώριση μελών της BMP οικογένειας που επιδρούν/συσχετίζονται με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ο χαρακτηρισμός πιθανών φαινοτύπων που θα προκύπτουν από την ιστοειδική απαλοιφή διαφόρων ρυθμιστών της BMP οδού μεταγωγής σήματος σε ποντικούς. Στη συνέχεια, με βάση τα ευρήματα, στόχος είναι ο χαρακτηρισμός των BMP δικτύων σηματοδότησης που επιδρούν στη φυσιολογία των λεμφοκυττάρων.

Υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα σχετικά με την παρουσία και τις επιδράσεις των BMPs σε ενήλικες ιστούς. Με τη χρησιμοποίηση διαγονιδιακών ποντικών αναφοράς σε συνδυασμό με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας χαρτογραφήθηκε η παρουσία διαφόρων μελών της BMP οικογένειας σε ιστούς του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος. Παρατηρήθηκε η έκφραση των BMPs (BMPs, ρυθμιστές των BMPs, BMP υποδοχείς) από δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και B λεμφοκύτταρα. Η έκφραση των BMPs φαίνεται να είναι δυναμικά ρυθμιζόμενη και να σχετίζεται με την κυτταρική ενεργοποίηση.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, κατέστη δυνατή η μελέτη των BMP ανταγωνιστών Gremlin και TWSG1 μέσω της απαλοιφής στους από τα δενδριτικά και

B κύτταρα ποντικών αντίστοιχα. Η απαλοιφή του *gremlin* από τα δενδριτικά κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των μυελωδών δενδριτικών κυττάρων *in vivo*, αλλά και τη μείωση της έκφρασης των δεικτών ενεργοποίησης/αντιγονοπαρουσίασης MHC-II, CD40 και CD86 στα κύτταρα αυτά *in vitro*. Η απουσία της TWSG1 από τα B κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα διάφορες επιπλοκές στην φυσιολογία τους. Παρατηρήθηκαν μειώσεις στην ωρίμανση της IgM συγγένειας μετά από ανοσοποίηση με θυμοεξαρτώμενο αντιγόνο. Στις θυμοανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις υπήρχαν αυξήσεις στα επίπεδα ανοσοσφαιρινών, συνέπεια (εν μέρει) της αύξησης του αριθμού των αντιγονοειδικών IgM πλασματοκυττάρων που παράγονται από αυτές. *In vitro*, τα B κύτταρα χωρίς την TWSG1 παρουσίαζαν υπερπολλαπλασιασμό, υπερέκφραζαν τους δείκτες ενεργοποίησης CD25 και CD69 και υπερέκκριναν IgG3 μετά από ερεθισμό σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επίσης, υπερέκφραζαν τα γονίδια *bcl-6*, *pax5* και το γονίδιο στόχο του BMP σήματος *id2*.

Οι αλλαγές που υφίστανται τα B κύτταρα από την έλλειψη της TWSG1, οδήγησαν στην προσπάθεια ανίχνευσης των BMP δικτύων μεταγωγής σήματος που πιθανόν υφίστανται και παράλληλα εμπλέκονται στη φυσιολογία των B κυττάρων. Η φωσφορυλίωση του Smad1/5/8 από τα ενεργά B κύτταρα, καθώς και η παρουσία της BMP2 σε περιοχές B κυτταρικής ενεργοποίησης και διαφοροποίησης στο σπλήνα του ποντικού, προδίδει την παρουσία BMP δικτύων μεταγωγής σήματος, που πιθανότατα εμπλέκονται σε διάφορα στάδια των ανοσοαποκρίσεων.

Τα παραπάνω ευρήματα αναδεικνύουν την παρουσία της BMP οικογένειας στους λεμφικούς ιστούς του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος και προδίδουν τους πιθανούς ρόλους των BMP δικτύων μεταγωγής σήματος στις ανοσοαποκρίσεις. Τέλος, συμβάλλουν στην περαιτέρω κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών που ρυθμίζουν τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος.

5.2 Summary in English.

The role of BMP signaling network in the peripheral immune system

Sotirios Tsalavos

Cellular homeostasis is dynamically maintained through extracellular signaling networks which control the functioning of individual cells. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are a group of secreted signaling proteins. BMPs are members of the Transforming Growth Factor – β (TGF- β) superfamily and are directly involved in the maintenance of tissue homeostasis. BMP signaling is highly regulated at the extracellular space by several BMP modulators (antagonists). Factors such as Noggin, Chordin, Gremlin and Twisted Gastrulation (TWSG1) fine-tune BMP signaling by regulating their capability to bind to their receptors. The presence of BMPs has been observed in prostate and breast cancer, myelomas, leukemia and lymphoma albeit their function has not been characterized even at the cellular level.

The aims of this work were the identification of the BMP family members which act on cells of the immune system and the characterization of potential phenotypes that arise from the cell-specific deletion of various BMPs antagonists in gene targeted mice. Based on the findings an attempt will be made to identify and characterize potential BMP signaling networks that affect lymphocyte physiology. With the use of transgenic gene reporter mice in combination with immunohistochemistry techniques, the presence of several BMP members in tissues of the peripheral immune system was mapped. Thereby the expression of BMPs (including BMPs, BMP antagonists and receptors) by dendritic cells, macrophages and B lymphocytes was observed. The expression of BMPs was dynamically regulated depending on the cell's activation status.

Based on above findings, the antagonists Gremlin and TWSG1 were selected for further study and were deleted in dendritic cells and B cell respectively. Deletion of *Gremlin* from dendritic cells resulted in a numerical reduction of myeloid dendritic cells *in vivo* and also in reduced expression levels of activation/antigen presentation makers MHC-II, CD40 and CD86 in these cells *in vitro*. Absence of TWSG1 from B cells has different effects. IgM affinity maturation after immunization with a thymus

dependent antigen was reduced. In thymus independent responses, Ig production was increased, in part the consequence (of increased numbers of antigen specific IgM secreting cells. *In vitro*, TWSG1 deficient B cells were hyperproliferative, overexpressed the activation markers CD25 and CD69 and secreted more IgG3 after stimulation, compared to wt cells. Furthermore they overexpressed *bcl-6*, *pax5* and the BMP target gene *id2*.

The alterations observed in TWSG1-deficient B cells lead to the attempt to detect BMP signaling networks *in situ* that could affect B cell physiology. Phosphorylation of Smad1/5/8 in activated B cells and the presence of BMP2 in regions of the murine spleen, where B cells are activated and differentiate indicated the presence of BMP signaling networks that operate at various stages of immune responses.

In summary, the findings demonstrate that various members of the BMP family are present in peripheral lymphoid tissues and describe the potential roles of BMP signalling in immune responses. Finally, they add to the understanding of the complex mechanisms that regulate immune function.

6 Βιβλιογραφία.

- Adams, N.C., and Gale, N.W. (2006). High Resolution Gene expression analysis in mice using genetically inserted reporter genes. In *Mammalian and Avian Transgenesis - New Approaches*, S. Peace, and C. Loins, eds. (Berlin: Springer).
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature immunology* 5, 943-952.
- Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology* 20, 149-157.
- Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M.L., del Hoyo, G.M., Wright, N., and Ardavin, C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93, 590-598.
- Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18, 350-361.
- Arnold, S.J., Maretto, S., Islam, A., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2006). Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Dev Biol* 296, 104-118.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J.A., Anderson, R.M., May, S.R., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J., and De Robertis, E.M. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 403, 658-661.
- Barreto, V., Reina-San-Martin, B., Ramiro, A.R., McBride, K.M., and Nussenzweig, M.C. (2003). C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell* 12, 501-508.
- Bartholdy, B., and Matthias, P. (2004). Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* 327, 1-23.
- Becker-Herman, S., Lantner, F., and Shachar, I. (2002). Id2 negatively regulates B cell differentiation in the spleen. *J Immunol* 168, 5507-5513.
- Benschop, R.J., and Cambier, J.C. (1999). B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Current opinion in immunology* 11, 143-151.
- Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67, 1121-1129.
- Berland, R., and Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annual review of immunology* 20, 253-300.
- Bleul, C.C., and Boehm, T. (2005). BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol* 175, 5213-5221.
- Blink, E.J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., and Tarlinton, D.M. (2005). Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *The Journal of experimental medicine* 201, 545-554.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., and Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 13, 589-597.

- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., and Harland, R.M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280, 1455-1457.
- Brunswick, M., Finkelman, F.D., Highet, P.F., Inman, J.K., Dintzis, H.M., and Mond, J.J. (1988). Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation. *J Immunol* 140, 3364-3372.
- Carsetti, R., Kohler, G., and Lamers, M.C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *The Journal of experimental medicine* 181, 2129-2140.
- Cattoretti, G., Buttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967-3975.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45-53.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90, 1458-1470.
- Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology* 9, 10-16.
- Ceredig, R., Bosco, N., Maye, P.N., Andersson, J., and Rolink, A. (2003). In interleukin-7-transgenic mice, increasing B lymphopoiesis increases follicular but not marginal zone B cell numbers. *Eur J Immunol* 33, 2567-2576.
- Chang, C., Holtzman, D.A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Bodorova, J., Gearing, D.P., Holmes, W.E., and Brivanlou, A.H. (2001). Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410, 483-487.
- Chang, H., Huylebroeck, D., Verschueren, K., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Zwijsen, A. (1999). Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* 126, 1631-1642.
- Chen, B., Athanasiou, M., Gu, Q., and Blair, D.G. (2002). Drm/Gremlin transcriptionally activates p21(Cip1) via a novel mechanism and inhibits neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 1135-1141.
- Chen, B., Blair, D.G., Plisov, S., Vasiliev, G., Perantoni, A.O., Chen, Q., Athanasiou, M., Wu, J.Y., Oppenheim, J.J., and Yang, D. (2004a). Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Drm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *J Immunol* 173, 5914-5917.
- Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G.R. (2004b). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233-241.
- Cozine, C.L., Wolniak, K.L., and Waldschmidt, T.J. (2005). The primary germinal center response in mice. *Current opinion in immunology* 17, 298-302.
- Cyster, J.G., Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hargreaves, D.C., and Lu, T.T. (2002). Traffic patterns of B cells and plasma cells. *Advances in experimental medicine and biology* 512, 35-41.

- Davie, J.M., and Paul, W.E. (1972). Receptors on immunocompetent cells. V. Cellular correlates of the "maturation" of the immune response. *The Journal of experimental medicine* *135*, 660-674.
- de Boer, J., Williams, A., Skavdis, G., Harker, N., Coles, M., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., Roderick, K., Potocnik, A.J., and Kioussis, D. (2003). Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *European journal of immunology* *33*, 314-325.
- Detmer, K., Steele, T.A., Shoop, M.A., and Dannawi, H. (1999). Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines. *Blood Cells Mol Dis* *25*, 310-323.
- Dintzis, R.Z., Okajima, M., Middleton, M.H., Greene, G., and Dintzis, H.M. (1989). The immunogenicity of soluble haptened polymers is determined by molecular mass and hapten valence. *J Immunol* *143*, 1239-1244.
- Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Van Kooten, C., Briere, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1997). Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *185*, 941-951.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., and Robertson, E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* *9*, 2795-2807.
- Engel, I., and Murre, C. (2001). The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol* *1*, 193-199.
- Gazzerro, E., and Canalis, E. (2006). Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* *7*, 51-65.
- Gazzerro, E., Deregowski, V., Stadmeier, L., Gale, N.W., Economides, A.N., and Canalis, E. (2006). Twisted gastrulation, a bone morphogenetic protein agonist/antagonist, is not required for post-natal skeletal function. *Bone* *39*, 1252-1260.
- Gazzerro, E., Pereira, R.C., Jorgetti, V., Olson, S., Economides, A.N., and Canalis, E. (2005). Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinology* *146*, 655-665.
- Gazzerro, E., Smerdel-Ramoya, A., Zanotti, S., Stadmeier, L., Durant, D., Economides, A.N., and Canalis, E. (2007). Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass. *J Biol Chem* *282*, 31549-31557.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* *11*, 1023-1035.
- Godin, R.E., Takaesu, N.T., Robertson, E.J., and Dudley, A.T. (1998). Regulation of BMP7 expression during kidney development. *Development* *125*, 3473-3482.
- Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *The Journal of experimental medicine* *198*, 1427-1437.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., and et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* *334*, 676-682.

- Graf, D., and Economides, A.N. (2008). Dissection of BMP signaling using genome engineering tools. In *Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics*, S. Vukicevic, and K.T. Sampath, eds. (Basel/Switzerland: Birkhauser), pp. 115-139.
- Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D.B., Fisher, A.G., and Merckenschlager, M. (2002). The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *The Journal of experimental medicine* *196*, 163-171.
- Gray, D. (1993). Immunological memory. *Annual review of immunology* *11*, 49-77.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., and Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* *11*, 605-617.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* *265*, 103-106.
- Hager-Theodorides, A.L., Outram, S.V., Shah, D.K., Sacedon, R., Shrimpton, R.E., Vicente, A., Varas, A., and Crompton, T. (2002). Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* *169*, 5496-5504.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine* *173*, 1213-1225.
- Hartley, S.B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A.B., Basten, A., and Goodnow, C.C. (1991). Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* *353*, 765-769.
- Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M.M., Wenzel, V., Boergemann, J.H., Hassel, S., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2006). Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Molecular and cellular biology* *26*, 7791-7805.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., and Herzenberg, L.A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *The Journal of experimental medicine* *157*, 202-218.
- Herpin, A., and Cunningham, C. (2007). Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS J* *274*, 2977-2985.
- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U., and Nordheim, A. (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* *274*, 19838-19845.
- Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* *14*, 779-790.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., and Harland, R.M. (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* *1*, 673-683.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* *191*, 435-444.

- Huang, Z., Wang, D., Ihida-Stansbury, K., Jones, P.L., and Martin, J.F. (2009). Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet* 18, 2791-2801.
- Humphrey, J.H. (1981). Tolerogenic or immunogenic activity of hapten-conjugated polysaccharides correlated with cellular localization. *Eur J Immunol* 11, 212-220.
- Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H., and Nishihara, T. (1999). Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 13637-13642.
- Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology* 4, 733-739.
- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., and Jenkins, M.K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 47-57.
- Jacob, J., Kassir, R., and Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *The Journal of experimental medicine* 173, 1165-1175.
- Jacob, J., Miller, C., and Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the antigen-driven somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Immunol Cell Biol* 70 (Pt 2), 145-152.
- Kameda, T., Koike, C., Saitoh, K., Kuroiwa, A., and Iba, H. (1999). Developmental patterning in chondrocytic cultures by morphogenic gradients: BMP induces expression of indian hedgehog and noggin. *Genes Cells* 4, 175-184.
- Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 49-61.
- Kersten, C., Dosen, G., Myklebust, J.H., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Smeland, E.B., and Rian, E. (2006). BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3. *Experimental hematology* 34, 72-81.
- Kersten, C., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Forfang, L., Smeland, E.B., and Myklebust, J.H. (2005). BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC immunology* 6, 9.
- Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A., and et al. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 3, 283-299.
- Khokha, M.K., Hsu, D., Brunet, L.J., Dionne, M.S., and Harland, R.M. (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* 34, 303-307.
- Kishigami, S., and Mishina, Y. (2005). BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 265-278.
- Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.

- Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F., and Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* 69, 823-831.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8, 22-33.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological reviews* 162, 261-280.
- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* 117, 787-800.
- Kroese, F.G., Ammerlaan, W.A., and Kantor, A.B. (1993). Evidence that intestinal IgA plasma cells in mu, kappa transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1 B) cells. *International immunology* 5, 1317-1327.
- Larrain, J., Oelgeschlager, M., Ketpura, N.I., Reversade, B., Zakin, L., and De Robertis, E.M. (2001). Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development* 128, 4439-4447.
- Lechleider, R.J., Ryan, J.L., Garrett, L., Eng, C., Deng, C., Wynshaw-Boris, A., and Roberts, A.B. (2001). Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Dev Biol* 240, 157-167.
- Lemos, M.P., Esquivel, F., Scott, P., and Laufer, T.M. (2004). MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine* 199, 725-730.
- Lemos, M.P., Fan, L., Lo, D., and Laufer, T.M. (2003). CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cell-restricted MHC class II controls Th1 CD4+ T cell immunity. *J Immunol* 171, 5077-5084.
- Levy, S., Todd, S.C., and Maecker, H.T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annual review of immunology* 16, 89-109.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2, 743-755.
- Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and cellular biology* 22, 4771-4780.
- Lin, L., Gerth, A.J., and Peng, S.L. (2004). Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of experimental medicine* 200, 115-122.
- Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596-599.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine* 190, 75-89.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9, 2808-2820.

- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annual review of immunology* 12, 117-139.
- MacLennan, I.C., Toellner, K.M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M., Zuniga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunological reviews* 194, 8-18.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617-629.
- Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *The Journal of experimental medicine* 183, 971-977.
- Mason, E.D., Konrad, K.D., Webb, C.D., and Marsh, J.L. (1994). Dorsal midline fate in *Drosophila* embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor. *Genes Dev* 8, 1489-1501.
- Max, E.E., Wakatsuki, Y., Neurath, M.F., and Strober, W. (1995). The role of BSAP in immunoglobulin isotype switching and B-cell proliferation. *Current topics in microbiology and immunology* 194, 449-458.
- McHeyzer-Williams, M.G., McLean, M.J., Lalor, P.A., and Nossal, G.J. (1993). Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine* 178, 295-307.
- McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L.B., Fan, C.M., Harland, R.M., and McMahon, A.P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12, 1438-1452.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606-616.
- Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R., and Zuniga, A. (2004). Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 131, 3401-3410.
- Mittrucker, H.W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T.M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P.S., and Mak, T.W. (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275, 540-543.
- Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-263.
- Moldes, M., Lasnier, F., Feve, B., Pairault, J., and Djian, P. (1997). Id3 prevents differentiation of preadipose cells. *Molecular and cellular biology* 17, 1796-1804.
- Mond, J.J., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995a). T cell-independent antigens type 2. *Annual review of immunology* 13, 655-692.
- Mond, J.J., Scher, I., Mosier, D.E., Baese, M., and Paul, W.E. (1978). T-independent responses in B cell-defective CBA/N mice to *Brucella abortus* and to trinitrophenyl (TNP) conjugates of *Brucella abortus*. *Eur J Immunol* 8, 459-463.

- Mond, J.J., Vos, Q., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995b). T cell independent antigens. *Current opinion in immunology* 7, 349-354.
- Mosier, D.E., Mond, J.J., and Goldings, E.A. (1977). The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect. *J Immunol* 119, 1874-1878.
- Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R., and Taga, T. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5868-5873.
- Nemazee, D., and Buerki, K. (1989). Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 8039-8043.
- Nemazee, D.A., and Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337, 562-566.
- Noelle, R.J., Roy, M., Shepherd, D.M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A., and Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6550-6554.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277, 5330-5338.
- Nosaka, T., Morita, S., Kitamura, H., Nakajima, H., Shibata, F., Morikawa, Y., Kataoka, Y., Ebihara, Y., Kawashima, T., Itoh, T., *et al.* (2003). Mammalian twisted gastrulation is essential for skeleto-lymphogenesis. *Molecular and cellular biology* 23, 2969-2980.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., and Dong, C. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- Nutt, S.L., Eberhard, D., Horcher, M., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (2001). Pax5 determines the identity of B cells from the beginning to the end of B-lymphopoiesis. *Int Rev Immunol* 20, 65-82.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D., and De Robertis, E.M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757-763.
- Ogata, T., Wozney, J.M., Benezra, R., and Noda, M. (1993). Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9219-9222.
- Okazaki, I.M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K., and Honjo, T. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* 416, 340-345.

- Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H., and Kearney, J.F. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* 27, 2366-2374.
- Oliver, A.M., Martin, F., and Kearney, J.F. (1999). IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 162, 7198-7207.
- Papavasiliou, F.N., and Schatz, D.G. (2002). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* 109 Suppl, S35-44.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine* 184, 1397-1411.
- Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (2004). Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood* 104, 3318-3325.
- Pereira, R.C., Economides, A.N., and Canalis, E. (2000). Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology* 141, 4558-4563.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., and Roederer, M. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 648-655.
- Petryk, A., Anderson, R.M., Jarcho, M.P., Leaf, I., Carlson, C.S., Klingensmith, J., Shawlot, W., and O'Connor, M.B. (2004). The mammalian twisted gastrulation gene functions in foregut and craniofacial development. *Dev Biol* 267, 374-386.
- Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *The Journal of experimental medicine* 203, 2419-2424.
- Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L., and De Robertis, E.M. (1997). Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* 91, 407-416.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E.M. (1996). Dorsventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annual review of immunology* 23, 161-196.
- Randolph, G.J. (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* 13, 267-274.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300-307.
- Rickert, R.C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1317-1318.

- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25, 139-140.
- Ross, J.J., Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S.C., O'Connor, M.B., and Marsh, J.L. (2001). Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410, 479-483.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., *et al.* (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675-685.
- Sandel, P.C., and Monroe, J.G. (1999). Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289-299.
- Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y., and Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nature immunology* 4, 586-593.
- Scott, I.C., Blitz, I.L., Pappano, W.N., Maas, S.A., Cho, K.W., and Greenspan, D.S. (2001). Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature* 410, 475-478.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., and Staudt, L.M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., *et al.* (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81-93.
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., and Staudt, L.M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199-212.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5, 230-242.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607-620.
- Shih, T.A., Meffre, E., Roederer, M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nature immunology* 3, 570-575.
- Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 26, 444-448.

- Snapper, C.M., and Mond, J.J. (1996). A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J Immunol* 157, 2229-2233.
- Solloway, M.J., Dudley, A.T., Bikoff, E.K., Lyons, K.M., Hogan, B.L., and Robertson, E.J. (1998). Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 22, 321-339.
- Song, H., and Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *The Journal of experimental medicine* 198, 1923-1935.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 21, 685-711.
- Sugai, M., Gonda, H., Nambu, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2004). Role of Id proteins in B lymphocyte activation: new insights from knockout mouse studies. *J Mol Med* 82, 592-599.
- Syme, R., and Gluck, S. (2001). Generation of dendritic cells: role of cytokines and potential clinical applications. *Transfus Apher Sci* 24, 117-124.
- Takahashi, Y., Dutta, P.R., Cerasoli, D.M., and Kelsoe, G. (1998). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *The Journal of experimental medicine* 187, 885-895.
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T., and Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature immunology* 3, 443-450.
- Tedder, T.F., Inaoki, M., and Sato, S. (1997). The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6, 107-118.
- ten Dijke, P., Korchynskiy, O., Valdimarsdottir, G., and Goumans, M.J. (2003). Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol* 211, 105-113.
- Thomas, J.D., Sideras, P., Smith, C.I., Vorechovsky, I., Chapman, V., and Paul, W.E. (1993). Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 261, 355-358.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of experimental medicine* 177, 1009-1020.
- Toellner, K.M., Gulbranson-Judge, A., Taylor, D.R., Sze, D.M., and MacLennan, I.C. (1996). Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation. *The Journal of experimental medicine* 183, 2303-2312.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Topol, L.Z., Bardot, B., Zhang, Q., Resau, J., Huillard, E., Marx, M., Calothy, G., and Blair, D.G. (2000). Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/Gremlin. *J Biol Chem* 275, 8785-8793.
- Tremblay, K.D., Dunn, N.R., and Robertson, E.J. (2001). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* 128, 3609-3621.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173, 1158-1165.

- Turner, C.A., Jr., Mack, D.H., and Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.
- Tzachanis, D., Li, L., Lafuente, E.M., Berezovskaya, A., Freeman, G.J., and Boussiotis, V.A. (2007). Twisted gastrulation (Tsg) is regulated by Tob and enhances TGF-beta signaling in activated T lymphocytes. *Blood* 109, 2944-2952.
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Usui, T., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Kaneko, S., Koseki, H., and Kita, T. (1997). Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype. *J Immunol* 158, 3197-3204.
- van den Eertwegh, A.J., Laman, J.D., Schellekens, M.M., Boersma, W.J., and Claassen, E. (1992). Complement-mediated follicular localization of T-independent type-2 antigens: the role of marginal zone macrophages revisited. *Eur J Immunol* 22, 719-726.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5, 853-865.
- von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3, 867-878.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.Q., Snapper, C.M., and Mond, J.J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological reviews* 176, 154-170.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.
- Wagner, D.O., Sieber, C., Bhushan, R., Borgermann, J.H., Graf, D., and Knaus, P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* 3, mr1.
- Wakatsuki, Y., Neurath, M.F., Max, E.E., and Strober, W. (1994). The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 179, 1099-1108.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9, 2105-2116.
- Wolniak, K.L., Shinall, S.M., and Waldschmidt, T.J. (2004). The germinal center response. *Critical reviews in immunology* 24, 39-65.
- Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *The Journal of experimental medicine* 184, 903-911.
- Wykes, M.N., Beattie, L., Macpherson, G.G., and Hart, D.N. (2004). Dendritic cells and follicular dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses. *Immunology* 113, 318-327.
- Yamato, K., Hashimoto, S., Imamura, T., Uchida, H., Okahashi, N., Koseki, T., Ishisaki, A., Kizaki, M., Miyazono, K., Ikeda, Y., and Nishihara, T. (2001). Activation of the p21(CIP1/WAF1) promoter by bone morphogenetic protein-2 in mouse B lineage cells. *Oncogene* 20, 4383-4392.

- Yang, X., Castilla, L.H., Xu, X., Li, C., Gotay, J., Weinstein, M., Liu, P.P., and Deng, C.X. (1999). Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development* 126, 1571-1580.
- Yokota, Y., and Mori, S. (2002). Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* 190, 21-28.
- Zhang, H., and Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122, 2977-2986.
- Zhao, G.Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56.
- Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M., and Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.

