



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

**Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα του
μυελού των οστών σε ζωϊκό μοντέλο του
Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου**

Χατζοπούλου Καλλιόπη

Λάρισα 2016

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δρ. Μπούμπας Δημήτριος

Καθηγητής Παθολογίας και Ρευματολογίας, Διευθυντής Δ' Πανεπιστημιακής Κλινικής Ιατρικής Αθηνών, συνεργαζόμενος Ερευνητής στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημία Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Δρ. Ψαρρά Άννα – Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Table of Contents

| | |
|---|-----------|
| Ευχαριστίες..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Περίληψη..... | 6 |
| Εισαγωγή..... | 7 |
| 1. Ο Συστημικός Ερυθηματώδης Λύκος σε κλινικό και μοριακό επίπεδο..... | 7 |
| 1.1 Αυτοάνοσα Νοσήματα..... | 7 |
| 1.2 Συστημικός Ερυθηματώδης Λύκος..... | 7 |
| 1.3 Αιτιολογία/Συμπτώματα..... | 9 |
| 2. Ζωϊκά Μοντέλα για Αυτοάνοσα Νοσήματα..... | 10 |
| 3. Αιμοποιητικά Βλαστοκύτταρα..... | 12 |
| 3.1 Χαρακτηριστικά Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων..... | 12 |
| 3.2 Μικρο-περιβάλλον του μυελού των οστών..... | 15 |
| 3.3 Κυτταρική Διαίρεση..... | 16 |
| 3.4 Ανάλυση, ρόλος και ρύθμιση της ανενεργούς κατάστασης (quiescence) των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων..... | 17 |
| 3.5 Κυτταρικός κύκλος των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων..... | 20 |
| 4. Εργαστηριακές Μέθοδοι & Τεχνικές..... | 22 |
| 4.1 Πειραματόζωα..... | 22 |
| 4.2 Απομόνωση Μυελού των Οστών..... | 22 |
| 4.3 Απομόνωση ορού από περιφερικό αίμα..... | 23 |
| 4.4 Κυτταρομετρία Ροής..... | 23 |
| 4.5 Κυτταροκαλλιέργειες..... | 23 |
| 4.6 Πρωτόκολλο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού..... | 24 |
| 4.7 Πρωτόκολλο Διαφοροποίησης Αιμοποιητικών Κυττάρων..... | 24 |
| 4.8 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου..... | 24 |
| 4.9 Απομόνωση RNA..... | 25 |
| 4.10 Αντίστροφη μεταγραφή..... | 26 |
| 4.11 PCR Πραγματικού Χρόνου..... | 27 |
| 4.12 Ανάλυση της έκφρασης CD80/CD86..... | 28 |
| 5. Αποτελέσματα – Συζήτηση..... | 29 |
| 5.1 Απομόνωση του κυτταρικού πληθυσμού LSK..... | 30 |
| 5.2 Ανάλυση έκφρασης CD80/CD86..... | 31 |
| 5.3 Ανάλυση Κυτταρικού Κύκλου..... | 34 |
| 5.4 Ανάλυση Κυτταρικού Κύκλου με PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR).... | 36 |
| 5.5 Συμπεράσματα..... | 39 |
| Βιβλιογραφία..... | 40 |

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε κατά το έτος 2016 στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, όπου και πραγματοποιήθηκε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον καθηγητή κ. Μπούμπα Δημήτριο, που δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο ΙΒΕΑΑ.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων της πτυχιακής μου εργασίας κ.Μπαλατσό Νικόλαο, επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Επίσης, θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Μπανό Άγγελο, μεταδιδακτορικό ερευνητή ΙΒΕΑΑ, για την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου. Σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου υπήρξε δίπλα μου τις στιγμές που τον χρειάστηκα προσφέροντάς μου την πολύτιμη βοήθειά του.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Γρηγορίου για την αμέριστη βοήθεια και τη στήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερη τιμή που μου δόθηκε η ευκαιρία στα αρχικά αυτά στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

Abstract

The mammalian blood system, containing more than ten distinct mature cell types, stands on one cell type, hematopoietic stem cells (HSCs). HSCs give rise to every lineage of blood cells, including granulocytes, lymphocytes, monocytes and endothelial cells. HSCs are protected in a metabolically dormant state within the bone marrow stem cell niche. It is known that all blood lineage cells referred are implicated in the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

Strong evidence shows that inflammation can disrupt HSC dormancy and cause multiple functional changes. In this project, we investigate whether HSC functions are altered in SLE-prone mice and whether this contributes to clinical manifestations of the disease, composing the major reason why studies are focused on the HSC population. Interestingly, HSCs are found expanded in lupus diseased NZBxNZW/F1 mice, instead of young pre-diseased NZBxNZW/F1 mice, which do not show clinical signs of the disease. The increase in HSC cellularity is caused by both genetic lupus risk factors and inflammatory cytokines in lupus mice. In addition, the inflammatory conditions of lupus lead to HSC mobilization and lineage-biased hematopoiesis and more specifically bone marrow populations (progenitor cells, lymphoid and myeloid lineages) seem to differ in homogeneity. Experiments focused on this hypothesis show that serum from F1 young mice promotes healthy HSCs to proliferation and skews their differentiation to myeloid lineage. The data shown here provide a better understanding of the basic aberrations of HSCs in SLE.

Περίληψη

Το σύστημα αιμοποίησης στα θηλαστικά περιλαμβάνει περισσότερους από δέκα διακριτούς ώριμους τύπους κυττάρων, που ανάμεσά τους διακρίνεται ο πληθυσμός των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα δίνουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς των ερυθροκυττάρων, περιλαμβάνοντας τα κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα βρίσκονται προστατευμένα σε μία μεταβολικά αδρανή κατάσταση, μέσα στο μυελό των οστών. Είναι γνωστό ότι όλες οι κυτταρικές σειρές των αιμοποιητικών κυττάρων εμπλέκονται στην παθογένεση της ασθένειας του συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου (ΣΕΛ). Μελέτες δείχνουν ότι μια φλεγμονώδης νόσος μπορεί να διαταράξει την αδρανή κατάσταση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και να προκαλέσει πολλές δυσλειτουργίες. Στην παρούσα μελέτη, διερευνάμε το πώς οι λειτουργίες αυτές των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων διαφοροποιούνται σε ποντίκια με ΣΕΛ και πώς οι αλλαγές αυτές συμβάλλουν στην εκδήλωση της ασθένειας. Οι παρατηρήσεις αυτές, αποτελούν τον λόγο για τον οποίο εστιάζουμε τις μελέτες μας στον πληθυσμό των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα έχουν βρεθεί αυξημένα σε ποντίκια NZBxNZW/F1 με συμπτώματα ΣΕΛ, σε αντίθεση με νεαρά NZBxNZW/F1 ποντίκια, τα οποία δεν εμφανίζουν τα κλινικά χαρακτηριστικά της ασθένειας. Η αύξηση αυτή των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων προκαλείται από γενετικούς παράγοντες που προκαλούν ΣΕΛ και από το φλεγμονώδες περιβάλλον (κυτταροκίνες). Επιπρόσθετα, το φλεγμονώδες περιβάλλον του ΣΕΛ, οδηγεί σε κινητοποίηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και η αιμοποίηση παρουσιάζει μία πόλωση ως προς τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, προγονικά κύτταρα, λεμφικές και μυελικές κυτταρικές σειρές φαίνεται να διαφέρουν ως προς την ομοιογένειά τους. Πειράματα τα οποία επικεντρώνονται στην υπόθεση αυτή, αποδεικνύουν ότι ορός από υβριδικά νεαρά ποντίκια παρακινεί τα υγιή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα σε πολλαπλασιασμό και στρεβλώνει τη διαφοροποίησή τους προς τη μυελική σειρά. Οι πληροφορίες που παρέχονται εδώ, μας δίνουν μία καλύτερη αντίληψη για τις αλλαγές που υφίστανται τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα στο ΣΕΛ.

Εισαγωγή

1. Ο Συστημικός Ερυθηματώδης Λύκος σε κλινικό και μοριακό επίπεδο

1.1 Αυτοάνοσα Νοσήματα

Στα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, η απόκριση κατευθύνεται έναντι ευρέος φάσματος αντιγόνων-στόχων και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό οργάνων και ιστών. Τα νοσήματα αυτά, αντικατοπτρίζουν μία γενικευμένη ανεπάρκεια στην ανοσορρύθμιση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση T και B κυττάρων. Η καταστροφή του ιστού είναι εκτεταμένη, τόσο από κυτταρομεσολαβητικές ανοσολογικές αποκρίσεις, όσο και από άμεση κυτταρική καταστροφή, η οποία προκαλείται από τα αυτοαντισώματα ή από τη συσσώρευση ανοσοσυμπλεγμάτων.⁶

1.2 Συστημικός Ερυθηματώδης Λύκος

Ένα από τα πιο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα συστηματικής αυτοάνοσης νόσου είναι ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), ο οποίος εμφανίζεται σε γυναίκες ηλικίας 20 έως 40 ετών.

Ο ΣΕΛ είναι πιο διαδεδομένος σε Αφροαμερικανές και Λατινικής καταγωγής γυναίκες, σε σχέση με τις Καυκάσιες, αν και δεν είναι γνωστό γιατί συμβαίνει αυτό. Τα προσβεβλημένα άτομα μπορεί να παράγουν αυτοαντισώματα έναντι μεγάλου εύρους ιστικών αντιγόνων, όπως είναι το DNA, οι ιστόνες, τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα λευκοκύτταρα και παράγοντες πήξης. Η αλληλεπίδραση αυτών των αυτοαντισωμάτων με τα συγκεκριμένα αντιγόνα προκαλεί ποικίλα συμπτώματα. Για παράδειγμα, αυτοαντισώματα ειδικά για τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια, μπορούν να προκαλέσουν τη λύση τους μέσω του συστήματος του συμπληρώματος, που οδηγεί σε αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενία, αντίστοιχα.⁷

Παρά το γεγονός ότι τα αίτια τα οποία προκαλούν την ασθένεια δεν έχουν πλήρως ξεκαθαριστεί, εμφανή είναι τα στοιχεία που αφορούν τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της ασθένειας. Ειδικότερα, ο μηχανισμός αφορά την «αποτυχημένη» αναγνώριση των εαυτών κυττάρων του οργανισμού και των αντιγόνων στα οποία

εκτίθεται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αυτο-αντισωμάτων, πυροδοτούνται δηλαδή μηχανισμοί άμυνας ενάντια στα εγγενή κύτταρα. Ωστόσο, έρευνες αποφαίνονται ότι γενετικοί, ορμονικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη μιας αυτοάνοσης απόκρισης. Μελετώντας τη φύση της ασθένειας, παρατηρούνται μη φυσιολογικές κυτταρικές και ορμονικές λειτουργίες, οι οποίες συμβάλλουν στην παθογένεση. Η κατανόηση των ανωμαλιών του ανοσοποιητικού συστήματος θα ενισχύσει περισσότερο τις γνώσεις μας πάνω στα αυτοάνοσα νοσήματα και όχι μόνο.⁷

Στον άνθρωπο, οι αλλαγές που εμφανίζονται κατά την εξέλιξη μιας αυτοάνοσης νόσου, ποικίλλουν. Μελέτες πάνω στη λειτουργία των κυττάρων, κατά τη διάρκεια της αυτο-ανοσοαπόκρισης, περιλαμβάνουν «ελλείμματα» ως προς την διαδικασία της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μια περιορισμένη έκφραση πληθυσμών των T-κυττάρων, γίνεται επιλογή ή αποκλεισμός ορισμένων T-υποδοχέων, γεγονός που οδηγεί σε έκφραση γονιδίων που επιδρούν αρνητικά σε «εαυτούς» T-υποδοχείς. Επίσης, αλλαγές διαφαίνονται στη ρύθμιση των αποπτωτικών μηχανισμών, αλλαγές στην παραγωγή λεμφοκυττάρων, καθώς και στη μετάδοση σήματος και έκφραση γονιδίων στο κύτταρο. Οι μελέτες πάνω στα αυτοάνοσα νοσήματα, έχουν σαν στόχο να διαλευκάνουν τη φύση των ανωμαλιών που αναφέρθηκαν παραπάνω και τη συμβολή τους στην παθογένεση της ασθένειας του ΣΕΛ. Όμως, οι προσπάθειες αυτές γίνονται ολοένα και πιο δύσκολες, λόγω της ύπαρξης ετερογένειας στα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας, δυσκολίες ως προς την κατανόηση της λειτουργίας των αυτοαντισωμάτων, φάρμακα και εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν το ιστορικό ενός ασθενούς, κ.α.

Η εργαστηριακή διάγνωση του ΣΕΛ εστιάζεται στην ανεύρεση των χαρακτηριστικών αντιπυρηνικών αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται εναντίον του δίκλωνου ή μονόκλωνου DNA, πυρηνικών πρωτεϊνών, ιστονών και του RNA του πυρηνίσκου.⁷

1.3 Αιτιολογία/Συμπτώματα

Ο ΣΕΛ αποτελεί μια χρόνια ασθένεια, η οποία περιλαμβάνει φάσεις μεταξύ των οποίων τα συμπτώματα εντείνονται και υποχωρούν. Τα αίτια παραμένουν ασαφή. Παρατίθενται κάποιοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του νοσήματος:

- Γενετικοί παράγοντες: η ασθένεια του ΣΕΛ έχει γενετικό υπόβαθρο, καθώς έχει καταγραφεί ότι ασθενείς έχουν συγγενείς οι οποίοι πάσχουν από την ίδια ή κάποια άλλη αυτοάνοση νόσο.
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες: ορισμένα φάρμακα, ισοωμάτια, σωματικό και συναισθηματικό στρες, εντείνουν τα συμπτώματα της ασθένειας.
- Φύλο και ορμόνες: η ασθένεια επηρεάζει περισσότερο τις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Φαίνεται τα οιστρογόνα να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία αυτοανοσίας.

Μερικά από τα χαρακτηριστικότερα συμπτώματα της ασθένειας είναι:

- Κόπωση
- Πόνοι στις αρθρώσεις
- Πονοκέφαλοι
- Ερεθισμός σε μάγουλα και μύτη, με τη χαρακτηριστική ονομασία «εξάνθημα πεταλούδας»
- Αλωπεκία
- Αναιμία
- Σύνδρομο Raynaud's: τα δάχτυλα αποκτούν μπλε/άσπρο χρώμα, τρέμουλο στο κρύο
- Καρδιαγγειακά προβλήματα

Ως αποτέλεσμα αυτών των παραγόντων που συμβάλλουν στην αιτιολογία της ασθένειας, παρατηρούνται συστηματική δυσλειτουργία των Τ-κυττάρων, ενεργοποίηση των Β-κυττάρων και ανισορροπία στα επίπεδα των κυτοκινών, γεγονός που δημιουργούν ένα περιβάλλον ανοσοποιητικής αποδιοργάνωσης.

Πιο ειδικά, τα Β και Τ κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας, τα μεν Β-κύτταρα εμπλέκονται διαμέσου των αυτο-αντισωμάτων που παράγουν και των κυτταροκινών και τα δε Τ-κύτταρα οδηγούν την ενεργοποίηση των Β-κυττάρων στον οργανισμό.⁷

Σε πρώιμα στάδια της ασθένειας, τα δενδριτικά και άλλα μυελικά κύτταρα ενεργοποιούν τα T-κύτταρα και παράγουν «διαμεσολαβητές», όπως ενεργοποιητές των B-κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στο περιβάλλον του ΣΕΛ, ενεργοποιούνται δραστικά T-κύτταρα και αυτο-αντισώματα, τα οποία στοχεύουν τα εαυτά όργανα, όπως για παράδειγμα, τα νεφρά. Τέτοιου είδους διαδικασίες συμβάλλουν στη χρόνια φλεγμονή, επηρεάζοντας τους αντίστοιχους ιστούς.⁷

2. Ζωϊκά Μοντέλα για Αυτοάνοσα Νοσήματα

Τα πειραματικά μοντέλα ζώων για αυτοάνοσα νοσήματα έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς εκδήλωσης αυτοανοσίας, την κατανόησή τους στον άνθρωπο και τις πιθανές θεραπείες.

Η αυτοανοσία αναπτύσσεται αυθόρμητα σε συγκεκριμένες ομομικτικές φυλές ζώων, αλλά μπορεί επίσης να επαχθεί μετά από συγκεκριμένους πειραματικούς χειρισμούς.

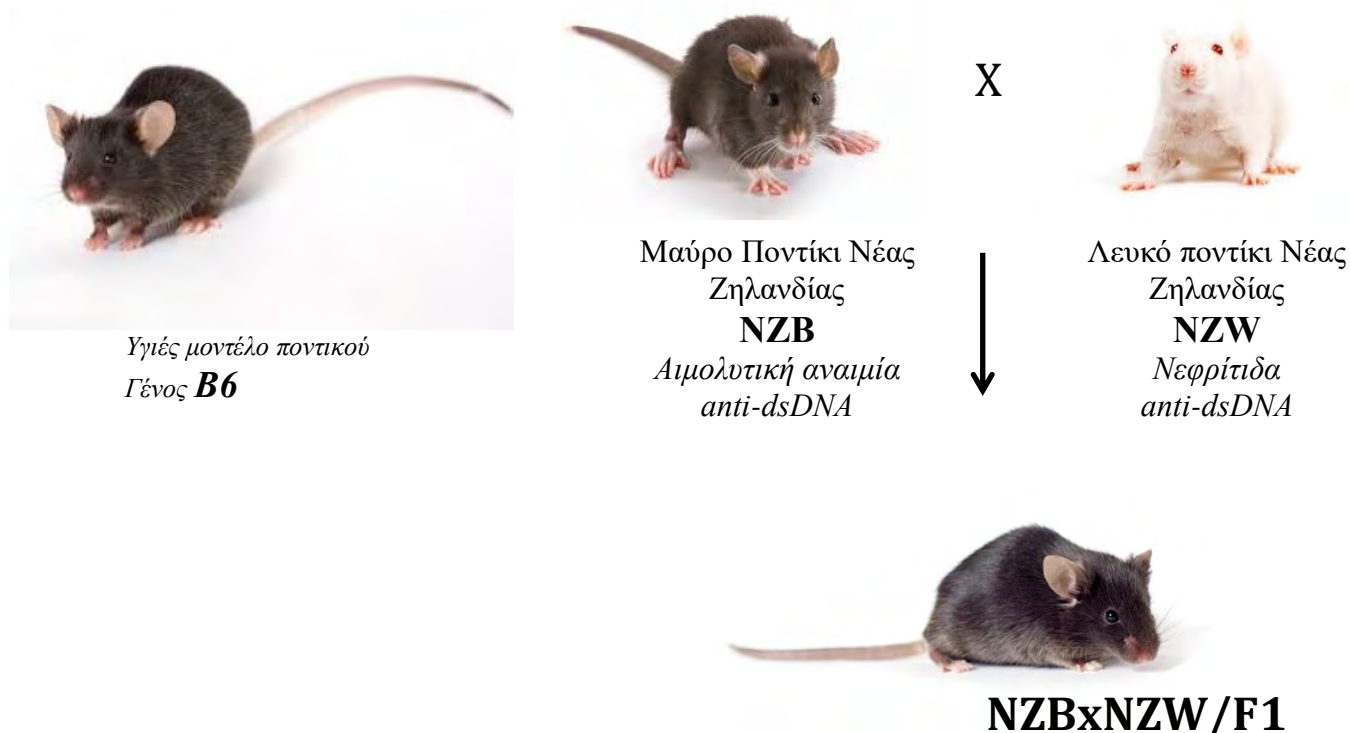
Ένας αριθμός αυτοάνοσων νοσημάτων που αναπτύσσονται αυθόρμητα σε ζώα, εμφανίζουν σημαντικές κλινικές και παθολογικές ομοιότητες με συγκεκριμένα αυτοάνοσα νοσήματα του ανθρώπου. Συγκεκριμένες ομομικτικές φυλές ποντικών έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη διερεύνηση ανοσολογικών ανεπαρκειών οι οποίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη αυτοανοσίας.

Τα F1 υβρίδια των μαύρων ποντικών Νέας Ζηλανδίας (New Zealand Black, NZB) και λευκών ποντικών Νέας Ζηλανδίας (New Zealand White, NZW), αναπτύσσουν αυθόρμητα αυτοάνοσο νόσημα, που προσομοιάζει με το ΣΕΛ (εικόνα 1). Τα NZB ποντίκια αναπτύσσουν αυθόρμητα αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία σε ηλικία 2-4 μηνών, περίοδο κατά την οποία μπορούν να ανιχνευθούν διάφορα αυτοαντισώματα, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται και αντισώματα έναντι των ερυθροκυττάρων, πυρηνικών πρωτεϊνών, του DNA και των T κυττάρων. Τα NZBxNZW/F1 υβριδικά ζώα αναπτύσσουν σπειραματονεφρίτιδα από εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων στους νεφρούς και πεθαίνουν, πρόωρα στους 18 μήνες. Επίσης, χαρακτηριστική είναι μετέπειτα και η εμφάνιση πρωτεϊνουρίας.

Το ζωϊκό μοντέλο ποντικού, το οποίο είναι φυσιολογικό (δεν εμφανίζει τα συμπτώματα της ασθένειας) και χρησιμοποιείται στα πειράματα, ανήκει στο γένος C57BL/6 (εικόνα 1).

Τα περιστατικά εκδήλωσης αυτοανοσίας στα NZBxNZW/F1 υβρίδια είναι περισσότερα στα θηλυκά άτομα, όπως και στον άνθρωπο.⁸

Όσον αφορά το γενετικό «προφίλ» των πειραματοζώων, όπως και στον άνθρωπο, τα NZBxNZW/F1 ποντίκια είναι ετερόζυγα για όλους τους γονιδιακούς τόπους, όπου τα NZB και NZW διαφέρουν και ομόζυγα για τους γονιδιακούς τόπους όπου και τα δύο γονικά στελέχη έχουν τους ίδιους. Ως αποτέλεσμα, η έκφραση ορισμένων γονιδίων στα NZBxNZW/F1 ποντίκια παρατηρείται αυξημένη παραγωγή των χαρακτηριστικών αντιπυρηνικών αντισωμάτων, αντισωμάτων εναντίον δίκλωνου DNA και κυκλοφορούντων συμπλόκων ως ανοσιακής απόκρισης. Τέλος, τα Β-κύτταρα που προέρχονται από τα NZBxNZW/F1 ποντίκια, διαφέρουν κατά πολύ από τα φυσιολογικά Β-κύτταρα ποντικού, στην ικανότητά τους να παράγουν IgG αντισώματα, έπειτα από ενεργοποίηση από τα Τ-κύτταρα.⁷



- Νεαρά ποντίκια – προ-στάδιο ασθένειας: 3 έως 6 μηνών ⇔ όχι συμπτώματα
- Μεγάλα σε ηλικία ποντίκια – στάδιο νεφρίτιδας: 6 έως 9 μηνών ⇔ συμπτώματα

Εικόνα 1: Ζωϊκά Μοντέλα για Αυτοάνοσα Νοσήματα⁹

3. Αιμοποιητικά Βλαστοκύτταρα

3.1 Χαρακτηριστικά Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων

Η αιμοποίηση είναι μια διαρκής διαδικασία, μέσω της οποίας όλα τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος παράγονται ιεραρχικά και όλα προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, τον πληθυσμό των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Πιο ειδικά, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα δίνουν γένεση στους απόγονους, οι οποίοι διαφοροποιούνται στις διακριτούς κυτταρικούς πληθυσμούς των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων (εικόνα 2). Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα είναι «προστατευμένα» σε μία μεταβολικά αδρανή κατάσταση μέσα στην περιοχή του μυελού των οστών. Πιο συγκεκριμένα, είναι μία διαδικασία η οποία επιτυγχάνεται χάρη στην ισορροπία ανάμεσα στη φάση της «αδράνειας» (quiescence), τη φάση του πολλαπλασιασμού (proliferation) και μεταξύ των φάσεων της αυτο-ανανέωσης των κυττάρων (self-renewal) και της διαφοροποίησης (differentiation).¹

Σε καταστάσεις φλεγμονής, η ιδιότητα αυτή των κυττάρων «μεταλλάσσεται» και προκαλούνται διαφόρων ειδών αλλαγές στον ιστό όπου εδράζονται. Ενδείξεις από τις μελέτες αυτές, αποδεικνύουν ότι τα HSCs αυξάνονται σημαντικά κατά την ασθένεια του ΣΕΛ, γεγονός που πυροδοτείται από γενετικούς παράγοντες και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Στις συνθήκες αυτές παρατηρείται αυξημένη η δραστηριότητα αιμοποίησης και συγκεκριμένα τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα ξεκινούν τη διαφοροποίηση, εγκαταλείποντας την κατάσταση αδράνειας.

Στη σταθερή κατάσταση, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τα περισσότερα HSCs βρίσκονται στη φάση της αδράνειας και ένα μόνο μικρό ποσοστό από αυτά βρίσκονται στη φάση της αυτο-ανανέωσης ή της διαφοροποίησης. Η φάση αδράνειας φαίνεται να είναι σημαντική για τη διατήρηση της βλαστικής ικανότητας των HSCs, καθώς η αλόγιστη διαφοροποίησή τους διακινδυνεύει την ικανότητά τους για ανανέωση και διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του μυελού των οστών.¹

Οι φάσεις αδράνειας και αυτο-ανανέωσης των HSCs, είναι στενά συνδεδεμένες με εγγενή κυτταρικά σήματα και περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι προέρχονται από την περιοχή του μυελού των οστών. Σε μία πιθανή απώλεια κυττάρων στο μυελό, τα HSCs διαφοροποιούνται πολύ γρήγορα ώστε να αποκαταστήσουν τη «βλάβη».

Μία ανάλογη «βλάβη», παρατηρείται σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΕΛ, καθώς παρατηρείται έλλειψη λεμφοκυττάρων.¹

Ευρήματα των μελετών, πάνω στο πειραματικό μοντέλο ποντικού για το ΣΕΛ, δείχνουν ότι ανάμεσα στον άνθρωπο και το ποντίκι παρατηρούνται ίδιες τροποποιήσεις και βλάβες, οι οποίες περιλαμβάνουν τα εξής:

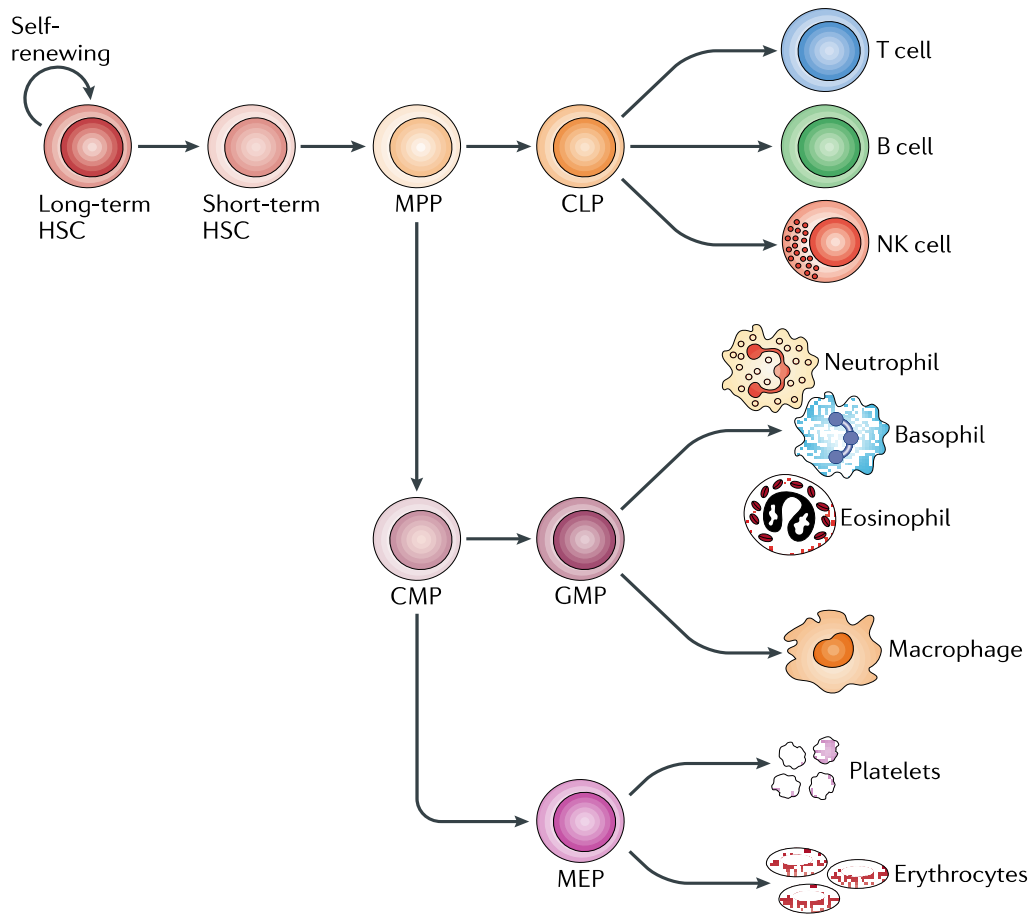
1. εκτεταμένο πολλαπλασιασμό των HSCs στην περιοχή του μυελού των οστών (bone marrow),
2. μη φυσιολογική συσσώρευση των HSCs στην περιφέρεια
3. «προτίμηση» των HSCs, κατά τη διαφοροποίησή τους, προς τη μυελική σειρά, παρά τη λεμφική σειρά.¹

Μέσα στον πλυθησμό των κυττάρων του μυελού των οστών, τα μόνα κύτταρα που διαθέτουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και πολυδυναμικότητας (multipotency) είναι τα HSCs. Η πολυδυναμικότητα, είναι η ικανότητα διαφοροποίησης σε όλους τους λειτουργικούς πληθυσμούς κυττάρων αίματος. Η ικανότητα αυτο-ανανέωσης αφορά τη δημιουργία κυττάρων HSCs από τα εαυτά κύτταρα, **χωρίς** αυτά να διαφοροποιούνται. Λόγω του μικρού χρόνου ζωής των ερυθροκυττάρων, τα HSCs διαφοροποιούνται σε πολλούς κυτταρικούς πληθυσμούς, διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ανάμεσα στα κύτταρα του μυελού, εκείνα που διαθέτουν την ικανότητα της μακράς διάρκειας αναδόμησης (long-term reconstitution) είναι ο πληθυσμός (με τους επιφανειακούς δείκτες-markers): Lin⁻ (lineage markers)- Sca-1⁺c-Kit⁺ και αντιπροσωπεύουν περίπου το 0,05% των κυττάρων του μυελού σ'ένα ενήλικο ποντίκι.¹ Τα μακράς διάρκειας αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης προς όλους τους πληθυσμούς των κυττάρων του αίματος, ενώ τα βραχυπρόθεσμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτο-ανανέωσης, αλλά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς (εικόνα 2).

Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται και πειραματικά. Πιο συγκεκριμένα, ποντίκια της σειράς C57/BL6, ελέγχθησαν με στόχο να διαπιστωθεί η επίδραση της χρόνιας φλεγμονής στη λειτουργία των HSCs κυττάρων. Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν, φάνηκε ότι μέσα στον πληθυσμό της αρνητικής σειράς για ορισμένους δείκτες (Lin⁻), τα HSCs και τα προγονικά τους κύτταρα (HSPCs) είναι εμπλουτισμένα στον τύπο c-Kit⁺ Sca-1⁺ (LSK cells). Πιο ειδικά, ο πληθυσμός LSK παρατηρήθηκε

αυξημένος τρεις φορές στο μυελό των ποντικών με ΣΕΛ και η μορφολογία-αριθμός των κυττάρων μακράς διάρκειας – όσον αφορά την ικανότητα αυτο-ανανέωσης (long-term HSCs), δηλαδή τα κύτταρα: $CD150^+ CD48^- LSK$ cells, βρέθηκε παραλλαγμένη. Επομένως, οι μελέτες εστιάζονται στον πληθυσμό των αιμοποιητικών κυττάρων με φαινότυπο $Lin^- Sca-1^+ c-Kit^+$.¹

Ως γενικό συμπέρασμα, αποφαίνεται ότι τα ποντίκια που πάσχουν από ΣΕΛ, παρουσιάζουν μια εκτεταμένη αύξηση του πληθυσμού των HSC κυττάρων, με ταυτόχρονη αυξημένη την ικανότητα αυτο-ανανέωσης.¹

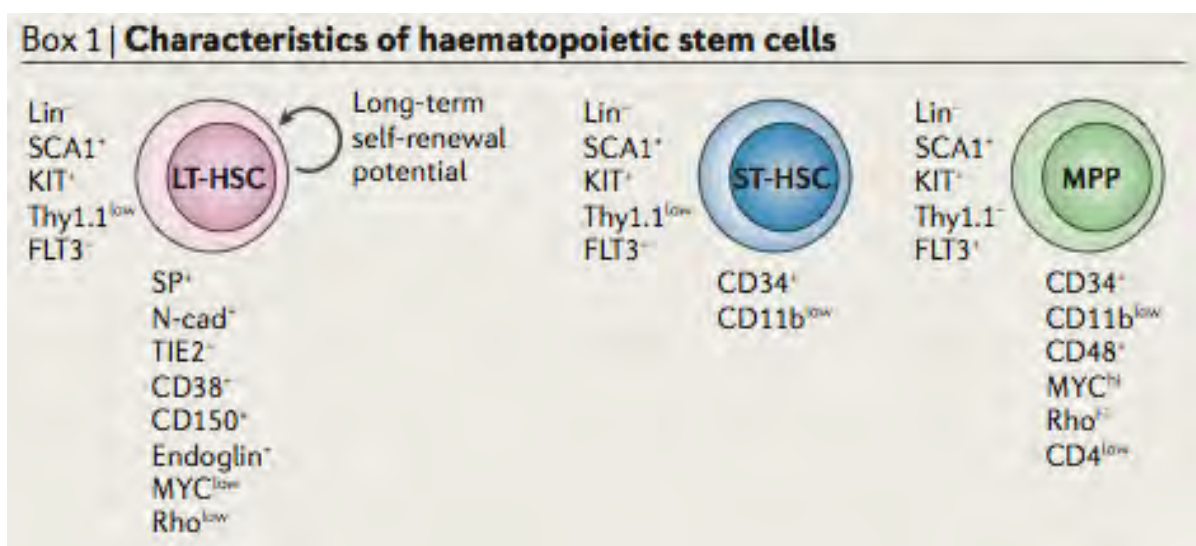


Εικόνα 2: Πληθυσμοί αιμοποιητικών κυττάρων, προερχόμενοι από κοινό πρόγονο.²

3.2 Μικρο-περιβάλλον του μυελού των οστών.

Η περιοχή στο μυελό των οστών, όπου τα HSCs εδράζονται και αυτο-ανανεώνονται, παρέχει όλους τους παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη ρύθμιση διαδικασιών τους. Η περιοχή έξω από αυτή παύει να προσδίδει τα χαρακτηριστικά αυτά, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην έχουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και ξεκινούν τη διαδικασία διαφοροποίησης σε ώριμα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος.⁸ Γενικά, η ικανότητα του περιβάλλοντος αυτού έγκειται στην ικανότητα παραγωγής περισσότερων βλαστικών κυττάρων του ίδιου τύπου (αυτο-ανανέωση) και στην ικανότητα γένεσης ενός πληθυσμού ώριμων κυττάρων, ώστε αυτά να διατηρήσουν σε ισορροπία ή να «επιδιορθώσουν» βλάβες στον ιστό τον οποίο εδράζονται.¹

Όλα τα λειτουργικά HSCs που βρίσκονται στον πληθυσμό των κυττάρων του μυελού, τα οποία εκφράζουν τους κυτταρικούς επιφανειακούς παράγοντες, φυσιολογικά είναι παρόντα σε πληθυσμούς Lin⁻ δεσμευμένων HSCs και εκφράζουν υψηλά επίπεδα των SCA-1 (stem cell antigen-1) και KIT (Lin⁻Scal⁺c-Kit⁺). Επίσης, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε μακροπρόθεσμα HSCs (CD34⁻), CD150⁺, τα οποία έχουν μακράς διάρκειας ικανότητα αυτο-ανανέωσης και δίνουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς και σε βραχυπρόθεσμα HSCs, τα οποία είναι CD34⁺FLT3⁻ και έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτο-ανανέωσης (εικόνα 3).²



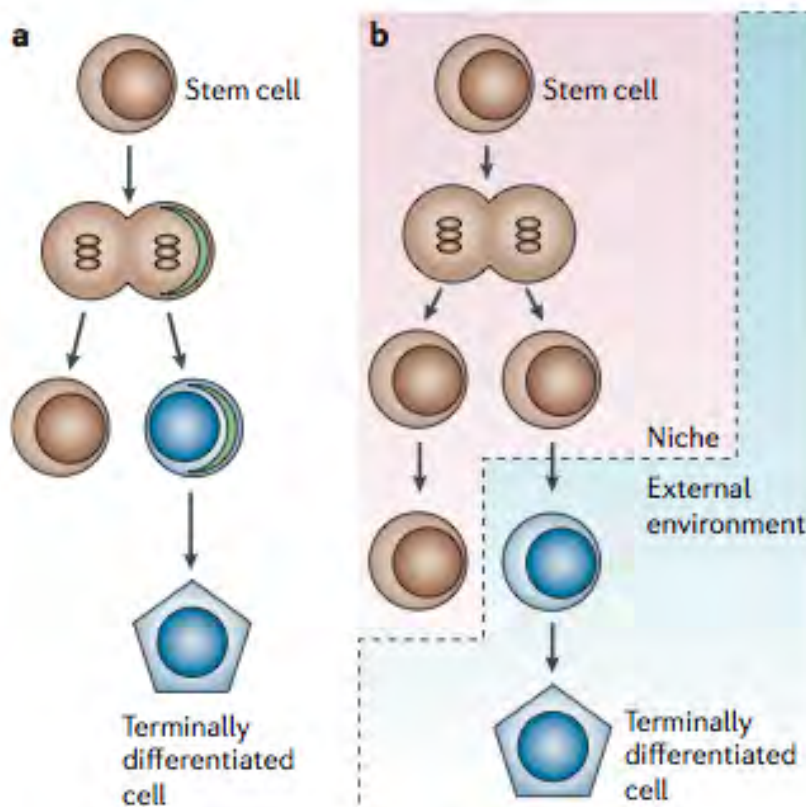
Εικόνα 3: Χαρακτηριστικά αιμοποιητικών κυττάρων²

3.3 Κυτταρική Διαίρεση

Όσον αφορά τις κυτταρικές διαιρέσεις, οι περισσότερες από αυτές είναι συμμετρικές, δηλαδή παράγονται πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, τα οποία αυξάνονται.

Στο επίπεδο των βλαστικών κυττάρων, έχει παρατηρηθεί ότι ένα μοναδικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να δώσει γένεση σε δύο μη-πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, με το ένα εξ' αυτών να διατηρεί την ιδιότητα του βλαστικού κυττάρου και το άλλο να διαφοροποιείται.⁷

Ασύμμετρη διαίρεση: στη διαδικασία αυτή, διάφοροι παράγοντες που είναι καθοριστικοί για την «τύχη» των κυττάρων, διανέμονται στο κυτταρόπλασμα ανισόπεδα, πριν την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, το σημείο διαχωρισμού των κυττάρων είναι τέτοιο, ώστε μόνο το ένα από τα θυγατρικά κύτταρα να μπορέσει να λάβει τους ρυθμιστικούς αυτούς παράγοντες. Έτσι, παράγονται τα δύο μη-πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, όπου το ένα διατηρεί τη βλαστική ικανότητα, ενώ το άλλο ξεκινά τη διαφοροποίηση (εικόνα 4).² Χαρακτηριστικό παράδειγμα ασύμμετρης διαίρεσης αποτελούν τα HSCs.



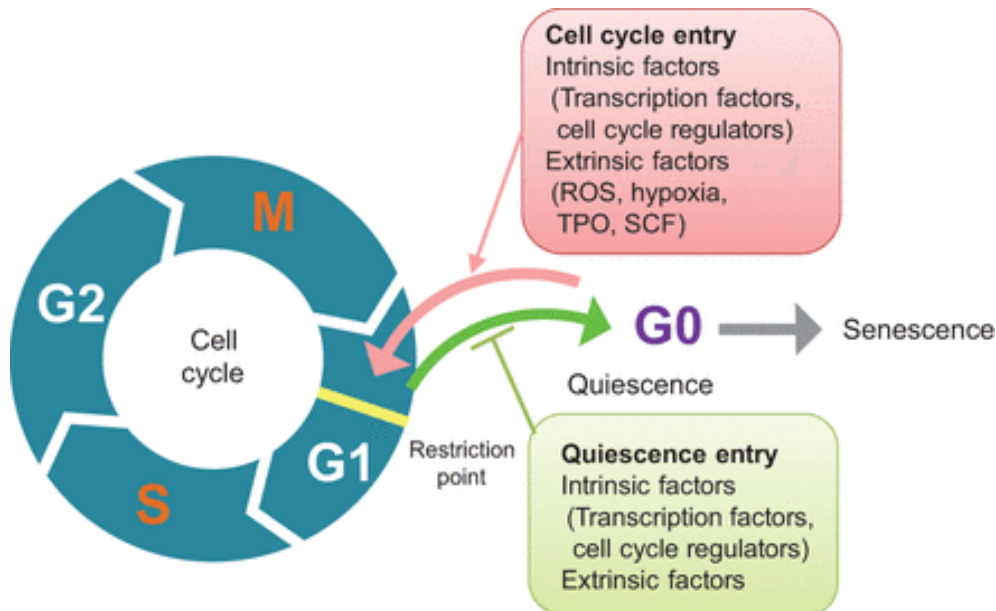
Εικόνα 4: Κυτταρικές διαιρέσεις αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων²

Σε απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα μπορούν να ελευθερωθούν στην κυκλοφορία (διαδικασία κινητοποίησης, εκτός του μυελού των οστών), να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο ώστε να εδραιωθεί η αιμοποίηση και έπειτα να μεταναστεύσουν σε άλλα μικροπεριβάλλοντα, όπως σπλήνα και ήπαρ. Μετά από την αποκατάσταση του οποιοδήποτε «προβλήματος», επιστρέφουν στο μυελό, όπου γίνονται και πάλι αδρανή.²

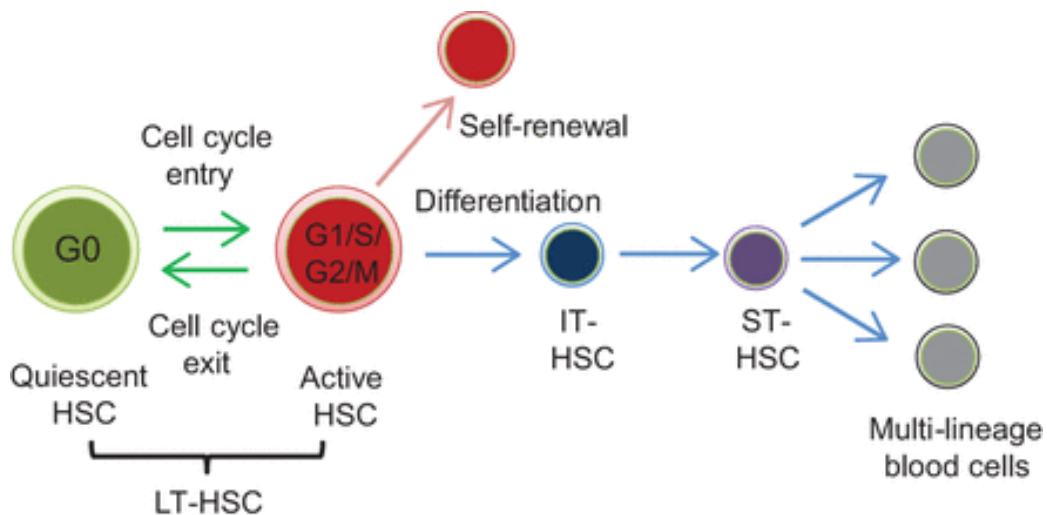
3.4 Ανάλυση, ρόλος και ρύθμιση της ανενεργούς κατάστασης (quiescence) των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων

Η κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα του μυελού των οστών αλληλοδιαδέχεται τις εξής φάσεις: αδράνεια και είσοδος στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η κατάσταση αδράνειας, αποτελεί ένα δομικό μηχανισμό του κυττάρων HSCs, που δρα ως προστασία ενάντια στην «εξάντληση» των κυττάρων από το μυελό και ως άμυνα απέναντι στις κυτταρικές προσβολές, παρέχοντας μια δια βίου παραγωγή HSCs στον οργανισμό.³

Τα σωματικά κύτταρα διαιρούνται καθώς αναπτύσσονται μέσω του κυτταρικού κύκλου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από 4 φάσεις: G₁ (interphase), S (DNA synthesis phase), G₂ (interphase) και M (mitosis phase). Κύτταρα τα οποία προχωρούν πέρα από τη φάση G₁ εισέρχονται στη φάση S, όπου αυτά τα οποία δεν ακολουθούν αυτή την πορεία παραμένουν αδιαφοροποίητα. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να αποχωρήσουν από τον κυτταρικό κύκλο και να εισέλθουν στη φάση G₀, μια κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται ως αδράνεια. Τα κύτταρα αυτά, μπορούν είτε να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο και να διαιρεθούν, είτε να παραμείνουν στην κατάσταση αδράνειας, χάνοντας την ικανότητα διαίρεσης και σε μερικές περιπτώσεις προχωρούν σε κατάσταση ωρίμανσης (senescence) (εικόνες 5 και 6). Η κατάσταση αδράνειας των κυττάρων προστατεύει επίσης τα κύτταρα από μεταλλάξεις και αλλαγές που επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Η έξοδος ή παραμονή στην κατάσταση αυτή ελέγχεται από ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς παράγοντες, που επιτρέπουν στα κύτταρα να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν.³



Εικόνα 5: Φάσεις του κυτταρικού κύκλου³



Εικόνα 6: Καταστάσεις στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου³

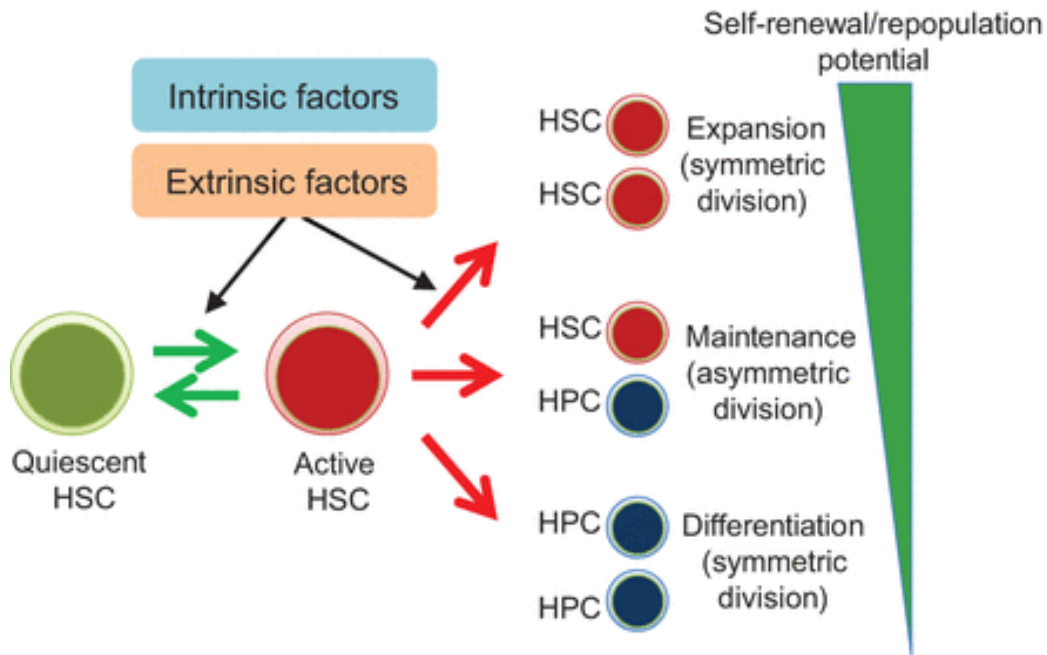
Γενικά, η βλαστική ικανότητα των HSCs βασίζεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων: 1) αδράνεια (quiescence), 2) δυναμικό ανασύστασης πληθυσμού (repopulation capacity), 3) ικανότητα αυτο-ανανέωσης (self-renewal capacity), 4) ικανότητα πολυδυναμικής διαφοροποίησης (multi-lineage differentiation potential).

Η ικανότητα αυτο-ανανέωσης και αδράνειας είναι δύο καταστάσεις που παραλληλίζονται. Για παράδειγμα, υπερβολικός πολλαπλασιασμός και απώλεια της αδράνειας καταλήγουν σε ελαττωματική ανασύσταση του πληθυσμού των HSCs, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη κυτταρικής αυτονομίας, ενδοκυτταρικών ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι συνδέουν την αδράνεια με την ικανότητα

ανασύστασης του πληθυσμού. Επίσης, μελέτες δείχνουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας της G₀ φάσης και της ικανότητας ανασύστασης του πληθυσμού των HSCs. Οι διαπιστώσεις αυτές οφείλονται στη λειτουργική ετερογένεια των ανενεργών HSCs ή σε αποτυχία διάκρισης μεταξύ **συμμετρικής** (παραγωγή 2 HSC κυττάρων ή 2 προγόνων) ή **ασύμμετρης** (παραγωγή ενός HSC και ενός προγονικού κυττάρου) κυτταρικής διαίρεσης. Με άλλα λόγια, μία μείωση στις κυτταρικές διαιρέσεις (αυτο-ανανέωση) και μια αύξηση στις διαιρέσεις (διαφοροποίηση) μπορεί να καταλήξει σε χαμηλότερα επίπεδα κυτταρικής ανασύστασης και το αντίστροφο.

Η δυναμική των βλαστικών κυττάρων είναι συνδεδεμένη με τα επίπεδα έκφρασης KIT στα μακροπρόθεσμα HSCs: LT-HSCs που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα KIT είναι αδρανή και παρουσιάζουν χαμηλότερες ικανότητες ανασύστασης του πληθυσμού τους. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα HSCs είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψιν το συμπέρασμα αυτό διαφαίνεται στενή σχέση της ανασύστασης του πληθυσμού των κυττάρων με τον κυτταρικό κύκλο.³

Οι διαδικασίες αυτές (διαφοροποίηση, αυτο-ανανέωση, αδράνεια) ελέγχονται από πολλούς παράγοντες, ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς (εικόνα 7). Ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Cyclin D1 and D3), ελέγχουν σήματα διαφοροποίησης, όπως το μονοπάτι TGF-β και Smad2/3, υποδεικύοντας μία ισχυρή σύνδεση μεταξύ της «τύχης» των κυττάρων και του κυτταρικού κύκλου. Η σύνδεση αυτή (τύχη κυττάρων και αδράνεια των HSCs) ελέγχεται από κοινούς μηχανισμούς. Ένας από αυτούς εμπλέκει τις κυτταροκίνες, οι οποίες είναι εξωκυτταρικοί ρυθμιστικοί παράγοντες που τροποποιούν την «τύχη» των κυττάρων. Ως ενδοκυτταρικοί ρυθμιστικοί παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στην ικανότητα αδράνειας των HSCs. Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBPα λειτουργεί σαν μοριακός «διακόπτης», καθώς ρυθμίζει τη μεταφορά από την κατάσταση πολλαπλασιασμού στην κατάσταση αδράνειας, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.³



Εικόνα 7: Παράγοντες που επηρεάζουν τις κυτταρικές διαιρέσεις³

3.5 Κυτταρικός κύκλος των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων

Η ικανότητα αυτο-ανανέωσης είναι άμεσα συνδεδεμένη και ελέγχεται από διάφορα σηματοδοτικά και ρυθμιστικά μόρια του κυτταρικού κύκλου, καθώς επίσης και από μεταγραφικούς παράγοντες. Πιο ειδικά, κυκλινο-εξαρτώμενοι αναστολείς, όπως τα γονίδια p21, p18, p27, επιδρούν σημαντικά στην ικανότητα «αδράνειας» (quiescence) και «αυτο-ανανέωσης» (self-renewal) που έχουν τα HSC κύτταρα.⁴

Η λειτουργία των γονιδίων αυτών είναι να ρυθμίζουν τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, με το p21 να μπλοκάρει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, από τη φάση G₁ στη φάση S. Η δράση του αυτή αφορά την αναστολή της ενεργότητας του συμπλόκου CDK4/Cyclin D1. Επίσης, θεωρείται απαραίτητος παράγοντας για τη διατήρηση της «αδράνειας» των HSC κυττάρων. Συμπληρωματικά με τη λειτουργία του στην αναστολή της αύξησης, λειτουργεί και σαν μεσολαβητής που εμποδίζει την κυτταρική ωρίμανση (cellular senescence).⁴

Το γονίδιο p18 δρα σε σύνδεση με το p21 ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, αναχαιτίζοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου πέρα από τη φάση G₁.

Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, όσων αφορούν στον κυτταρικό κύκλο, μελέτες δείχνουν ότι χρόνια φλεγμονή μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των HSCs, παρακινώντας τα να αφήσουν τη φάση της αδράνειας (dormant state) και να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, επιταχύνοντας ταυτόχρονα τη διαδικασία της

κυτταρικής γήρανσης. Τα σήματα που πυροδοτούν τις αντιδράσεις αυτές, εκτός από την προώθηση της κυτταρικής γήρανσης, τη διαταραγμένη ικανότητα αυτο-ανανέωσης, προκαλούν τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς τη μυελική σειρά, παρά στη λεμφική, όπως έχει αναφερθεί.⁴

Επίσης, σημαντική είναι η παρουσία του γονιδίου p27. Εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά με τα παραπάνω, καθώς είναι κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας. Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Cip/Kip (Cdk αναστολείς) και ελέγχει τη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ως αναστολέας, διότι η κύρια λειτουργία του είναι να σταματά ή να επιβραδύνει τη διαφοροποίηση των κυττάρων, δηλαδή την καθήλωση των κυττάρων στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου.⁴

Κατά την παθολογική κατάσταση στο ΣΕΛ, παρατηρείται άρση της αναστολής και της περαιτέρω διαφοροποίησης των κυττάρων διαμέσου του κυτταρικού κύκλου.⁴

Η είσοδος των HSCs στον κυτταρικό κύκλο ή η παραμονή τους στη φάση G₀, ελέγχεται από ορισμένους παράγοντες – ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, οι οποίοι είναι:

- 1) Cdk, τα οποία ενισχύουν την κυτταρική ανάπτυξη και
- 2) CKIs, τα οποία δρουν αντιστρόφως.

Η οικογένεια του συμπλέγματος Cyclin D- Cdk4/6 ελέγχει την ανάπτυξη των κυττάρων διαμέσου της φάσης G₁. Πιο ειδικά, η οικογένεια των Cyclin D περιλαμβάνει τις Cyclin D1 (Cnd1), Cyclin D2 (Cnd2) και Cyclin D3 (Cnd3), τα οποία εκφράζονται σε διαφορετικά μεταξύ τους επίπεδα.⁵

Η οικογένεια Ink4 περιλαμβάνει τις CKI p15^{Ink4a}, p16^{Ink4b}, p18^{Ink4c} και p19^{Ink4d}. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν όλες ως ανταγωνιστές των πρωτεϊνών CyclinD-Cdk4/6, αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Rb και άρα την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου.⁵

Η οικογένεια CIP/KIP περιλαμβάνει τις CKIs p21^{Cip}, p27^{Kip1} και p57^{Kip2}, οι οποίες επίσης εμποδίζουν την είσοδο στη φάση S, αναστέλλοντας την ενεργότητα των Cyclin E-Cdk2 πρωτεϊνών.¹¹

4. Εργαστηριακές Μέθοδοι & Τεχνικές

4.1 Πειραματόζωα

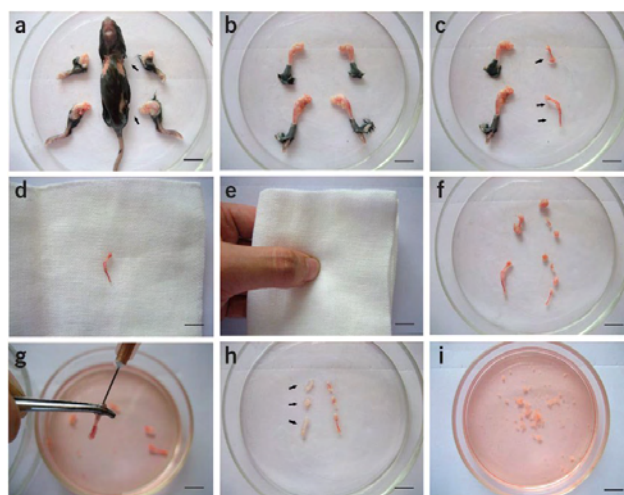
Χρησιμοποιήθηκαν NZBxNZW/F1 υβριδικά ποντίκια και ποντίκια C57BL/6.

Τα νεαρά υβριδικά ποντίκια (2-4 μηνών) δεν εμφανίζουν συμπτωματολογία της ασθένειας, ενώ μεγαλύτερα ποντίκια (7-9 μηνών) εμφανίζουν συμπτώματα (π.χ. πρωτεϊνουρία).

4.2 Απομόνωση Μυελού των Οστών

Η απομόνωση του μυελού των οστών γίνεται από τα οστά της κνήμης, του μηριαίου οστού και του βραχιόνιου. Η έκπλυση των κυττάρων από τα οστά πραγματοποιείται με τη χρήση σύριγγας (τύπου ινσουλίνης, 27 G) και διαλύματος 5% FBS/PBS. Έπειτα, με τη χρήση σύριγγας 23 G, πραγματοποιείται επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων, για ομογενοποίηση του δείγματος.

Προστίθεται στο δείγμα διάλυμα λύσης των ερυθροκυττάρων (Hemolysis buffer: NH_4Cl , pH: 7-7,4, 2min και όγκος $V=n+1$, όπου n ο αριθμός των πειραματόζωων), με σκοπό να επιτευχθεί λύση των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται «χρώση» του δείγματος (staining) με το κατάλληλο μείγμα αντισωμάτων, προκειμένου να απομονωθεί ο επιθυμητός κυτταρικός πληθυσμός (LSK cells). Τα κύτταρα συλλέγονται σε διάλυμα 5% FBS/PBS (500μl για 20", σε θερμοκρασία 4°C). Τα κύτταρα συλλέγονται σε διάλυμα 5% FBS/PBS (2-3mL), αφού περάσουν από ειδικό φίλτρο και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα για τη διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 8: Απομόνωση μυελού των οστών από ποντίκι

4.3 Απομόνωση ορού από περιφερικό αίμα

Μικρή ποσότητα αίματος απομονώνεται από την κοιλιακή αορτή ποντικού. Το δείγμα φυγοκεντρείται (30", 5000rpm/25°C). Τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο σε ένα νέο tube, το οποίο και φυλάσσεται στους -80°C.

4.4 Κυτταρομετρία Ροής

Διαδικασία «κατηγοριοποίησης» των κυτταρικών πληθυσμών που μας ενδιαφέρουν, με τη χρήση αντισωμάτων. Τα αντισώματα έναντι των δεικτών που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση κυτταρομετρίας, είναι:

- 1) PE/Cy7 anti-mouse/human CD11b (BioLegend),
 - 2) PE/Cy7 anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (BioLegend),
 - 3) FITC anti-mouse/human CD45R/B220 (BioLegend),
 - 4) FITC anti-mouse TER-119/Erythroid Cells (BioLegend),
 - 5) FITC anti-mouse CD16/CD32 (FcγII/III receptor) (BD Bioscience),
 - 6) APC anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) (BioLegend),
 - 7) PE anti-mouse CD117 (c-Kit) (BioLegend)
- και για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου:
- 1) PercP 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)
 - 2) DAPI Ki-67 Pacific Blue (BioLegend)

4.5 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα LSK κύτταρα καλλιεργούνται σε 96-well bottom-flat dish, σε μέσο καλλιέργειας IMDM. Το μέσο αυτό περιέχει 5μl FBS H.I. (heat inactivated), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2mM L-γλουταμίνη, καθώς επίσης μείγμα κυτταροκινών (διαλυτοποιημένα, με αραιώση 1:20): 50ng/ml IL-6, 20ng/ml IL-3, 20ng/ml SCF, 20ng/ml TPO. Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέγονται, χωρίζονται και προστίθεται σε αυτά κατάλληλο ερέθισμα (ορός από NZBxNZW/F1 νεαρά & NZBxNZW/F1 ενήλικα ποντίκια ή C57/BL6 ποντίκια), έτσι ώστε να δοθεί το κατάλληλο «ερέθισμα» στα κύτταρα. Έπειτα πάλι από 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέγονται. Ακολουθεί ανάλυση με τα παρακάτω πρωτόκολλα.

4.6 Πρωτόκολλο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού

Στόχος του πειράματος αυτού είναι η καταγραφή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους πληθυσμούς των κυττάρων, έπειτα από κατάλληλο ερέθισμα που έχει δοθεί στα κύτταρα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, χρησιμοποιούμε 5mM του Cell Trace Violet, το οποίο διαλύουμε αρχικά σε DMSO και έπειτα το προσθέτουμε σε διάλυμα PBS. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37°C για 20 λεπτά (σε σκοτάδι). Έπειτα προστίθεται 1ml μέσου καλλιέργειας IMDM – 10% FBS και έπειτα βάζουμε σε καλλιέργεια.

4.7 Πρωτόκολλο Διαφοροποίησης Αιμοποιητικών Κυττάρων

Τα κύτταρα LSK (σε αριθμό 1×10^3) καλλιεργούνται, χρησιμοποιώντας πιάτα καλλιέργειας 35mm (NZBxNZW/F1 νεαρά & NZBxNZW/F1 ενήλικα), τα οποία περιέχουν 1,1ml μεθυλκυτταρίνη. Ακολουθεί, επώαση 12-15 ημερών στους 37°C, με 5% CO₂. Τελικά, οι κυτταρικοί πληθυσμοί CFU-M, CFU-G, CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-E, αναλύονται με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου.

4.8 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Τα LSK κύτταρα εξετάζονται ως προς τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται, έπειτα από ερέθισμα. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια, συλλέγονται, ακολουθεί έκπλυση με PBS και φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα υφίστανται χρώση με τα κατάλληλα αντισώματα, για την απομόνωση του πληθυσμού LSK. Στη συνέχεια, προστίθεται 70% αιθανόλη (στους -20°C), η οποία μονιμοποιεί τα κύτταρα. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους -20°C. Έπειτα, ακολουθεί έκπλυση με PBS και επαναδιαλυτοποίηση σε διάλυμα 5% FBS/PBS. Ακολούθως, προστίθεται το αντίσωμα Ki-67 και ακολουθεί επώαση του δείγματος για 30min, σε σκοτάδι. Στη συνέχεια, ακολουθεί έκπλυση του δείγματος με διάλυμα PBS, επαναδιαλυτοποίηση σε διάλυμα 5% FBS/PBS και τέλος χρώση με το αντίσωμα 7-AAD. Τα αντισώματα προστίθενται με αραιώση 1:200.

Ki-67: πυρηνική πρωτεΐνη, παρούσα σε όλες τις ενεργές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, αλλά απουσιάζει από τη φάση G₀. Είναι ιδανική για την ανίχνευση της ανάπτυξης των κυττάρων.

7-AAD: φθορίζων δείκτης για το DNA, χρησιμοποιείται σαν δείκτης «ζωντάνιας» των κυττάρων.

4.9 Απομόνωση RNA

Η διαδικασία επιτυγχάνεται με τη χρήση του πρωτοκόλλου Qiagen RNeasy Micro Kit, Nucleospin RNA XS. Σύμφωνα με αυτό, στα δείγματα προστίθεται cell lysis buffer και μερκαπτοαιθανόλη. Σύριγγα 27G χρησιμοποιείται για την επαναδιαλυτοποίηση του μίγματος. Στη συνέχεια, προστίθεται συγκεκριμένος όγκος 70% αιθανόλης και τα δείγματα μεταφέρονται σε στήλη ιοντοανταλλαγής.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων (11000xg, 4°C) και προστίθεται διάλυμα MDB. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (11000xg, 4°C). Έπειτα, προστίθεται κατάλληλο διάλυμα DNase, για πέψη του DNA. Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση των δειγμάτων. Αρχικά, προστίθεται Buffer RA2 στις στήλες, με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται (30s, 11000xg). Οι στήλες μεταφέρονται σε νέα tubes. Στη συνέχεια, προστίθεται Buffer RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση (30s, 11000xg). Οι στήλες τοποθετούνται σε νέα tubes. Ακολούθως, προστίθεται ξανά Buffer RA3, με φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 2 min, 11000xg. Οι στήλες μεταφέρονται σε νέα tubes. Τέλος, ακολουθεί έκλυση του RNA σε συγκεκριμένη ποσότητα νερού και φυγοκέντρηση (30s, 11000xg).

4.10 Αντίστροφη μεταγραφή

Ολικό RNA χρησιμοποιείται για σύνθεση cDNA.

Συστατικά:

SuperScript™ II RT, 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 at room temperature; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 0.1 M DTT

Buffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol

Μία αντίδραση 20μl μπορεί να περιλαμβάνει 1ng-5μg ολικού RNA.

Βήματα:

- 1) Προσθήκη των συστατικών: Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μg/mL) ή 1 μL 50–250 ng τυχαίων primers ή 2 pmole ειδικού για το γονίδιο primer (GSP), 1 ng σε 5 μg ολικό RNA ή x μL 1–500 ng mRNA, 1 μL dNTP Mix (10 mM each), 1 μL αποστειρωμένο νερό στα 12 μL.
- 2) Θέρμανση δείγματος στους 65°C για 5 min και μετά γρήγορη ψύξη στον πάγο. Έπειτα από φυγοκέντρηση του δείγματος, προσθήκη:
5X First-Strand Buffer 4 μL, 0.1 M DTT, 2 μL RNaseOUT™ (40 units/μL).
- 3) Ανάδευση των συστατικών. Στη χρήση oligo(dT)₁₂₋₁₈ or GSP, επώαση στους 42°C για 2 min. Στη χρήση τυχαίων primers, επώαση στους 25°C για 2 min.
- 4) Προσθήκη 1 μL (200 units) SuperScript™ II RT και ανάδευση με την πιπέττα (up and down).
- 5) Επώαση στους 42°C για 50 min.
- 6) Απενεργοποίηση αντίδρασης με θέρμανση στους 70°C για 15 min.

4.11 PCR Πραγματικού Χρόνου

Η Real time PCR πραγματοποιείται με τη χρήση του SYBR Green Supermix. Τα βήματα της αντίδρασης έχουν ως εξής: Προετοιμάζεται κατάλληλο μείγμα αντίδρασης για το κάθε γονίδιο που μελετάται. Το μείγμα αυτό περιέχει: primers (σε συγκέντρωση 5μmoles/μl από αρχική συγκέντρωση 100μmoles/μl), Kapa Mix (συγκέντρωση 1x από αρχική συγκέντρωση 2x), H₂O και στη συνέχεια προστίθεται το DNA. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιούνται με τη χρήση της HPRT (ιδιοσύστατο γονίδιο). Το πρόγραμμα της PCR περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 95°C (για 2min), έπειτα ακολουθούν 40 κύκλοι με εκκίνηση του ενζύμου (Taq-polymerase) στους 95°C (15sec), υβριδοποίηση των primers (annealing) στους 65 °C (15 sec), επέκταση-σύνθεση DNA στους 75 °C και τέλος το στάδιο της τήξης (melting temperature) στους 90 °C.

Γονίδια:

- Cdkn2c (p18) Fw: CCT TGG GGG AAC GAG TTG G
Rv: AAA TTG GGA TTA GCA CCT CTG AG
- Cdkn1a (p21) Fw: CCT GGT GAT GTC CGA CCT G
Rv: CCA TGA GCG CAT CGC AAT C
- Cdkn1b (p27) Fw: TCA AAC GTG AGA GTG TCT AAC G
Rv: CCG GGC CGA AGA GAT TTC TG
- Cyclin D Fw: GCG TAC CCT GAC ACC AAT CTC
Rv: GAG CAG AAG TGC GAA GAG GA
- Nfe2l2 (Nrf2) Fw: CTT TAG TCA GCG ACA GAA GGAC
Rv: AGG CAT CTT GTT TGG GAA TGT G
- HPRT Fw: GTG AAA CTG GAA AAG CCA AA
Rv: GGA CGC AGC AAC TGA CAT

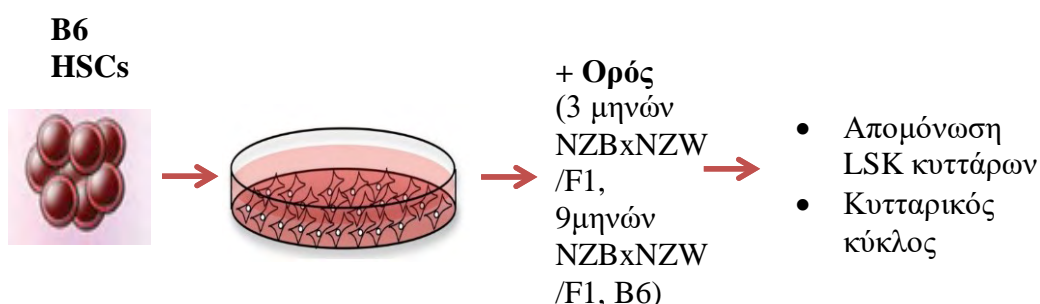
4.12 Ανάλυση της έκφρασης CD80/CD86

Τα επιφανειακά μόρια των T- κυττάρων: CD28 και CTLA4, αλληλεπιδρούν με τους προσδέτες τους: CD80 και CD86, πάνω στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, έτσι ώστε να επηρεάσουν την πρόσδεση και αναγνώριση των T-κυττάρων με τα αντιγόνα. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, στον πληθυσμό των κυττάρων του μυελού, θέλουμε να εντοπίσουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που προκύπτουν: τα B κύτταρα προκύπτουν από το «συνδυασμό» των κυττάρων B220 και των προσδετών CD80/CD86, ενώ τα μυελικά κύτταρα προκύπτουν απ το συνδυασμό των Gr1 με τους προσδέτες CD80/CD86.

Κύτταρα από ερυθρό μυελό απομονώνονται και τοποθετούνται σε καλλιέργεια για 4 ώρες με μέσο καλλιέργειας RPMI – 10% FBS. Έπειτα από 4 ώρες επώασης, προστίθεται το κατάλληλο ερέθισμα (ορός 2,5% NZBxNZW/F1 νεαρά, NZBxNZW/F1 ενήλικα, B6). Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέγονται, εκπλένονται με PBS και φυγοκεντρώνονται (1800rpm, 4°C). Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε διάλυμα 5%FBS/PBS και ακολουθεί χρώση με αντισώματα (B220, CD11b, CD80, CD86), επώαση για 20 λεπτά (4°C, χωρίς φως). Ακολουθεί έκπλυση με PBS, φυγοκέντρηση και επαναιώρηση με διάλυμα 5%FBS/PBS.

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

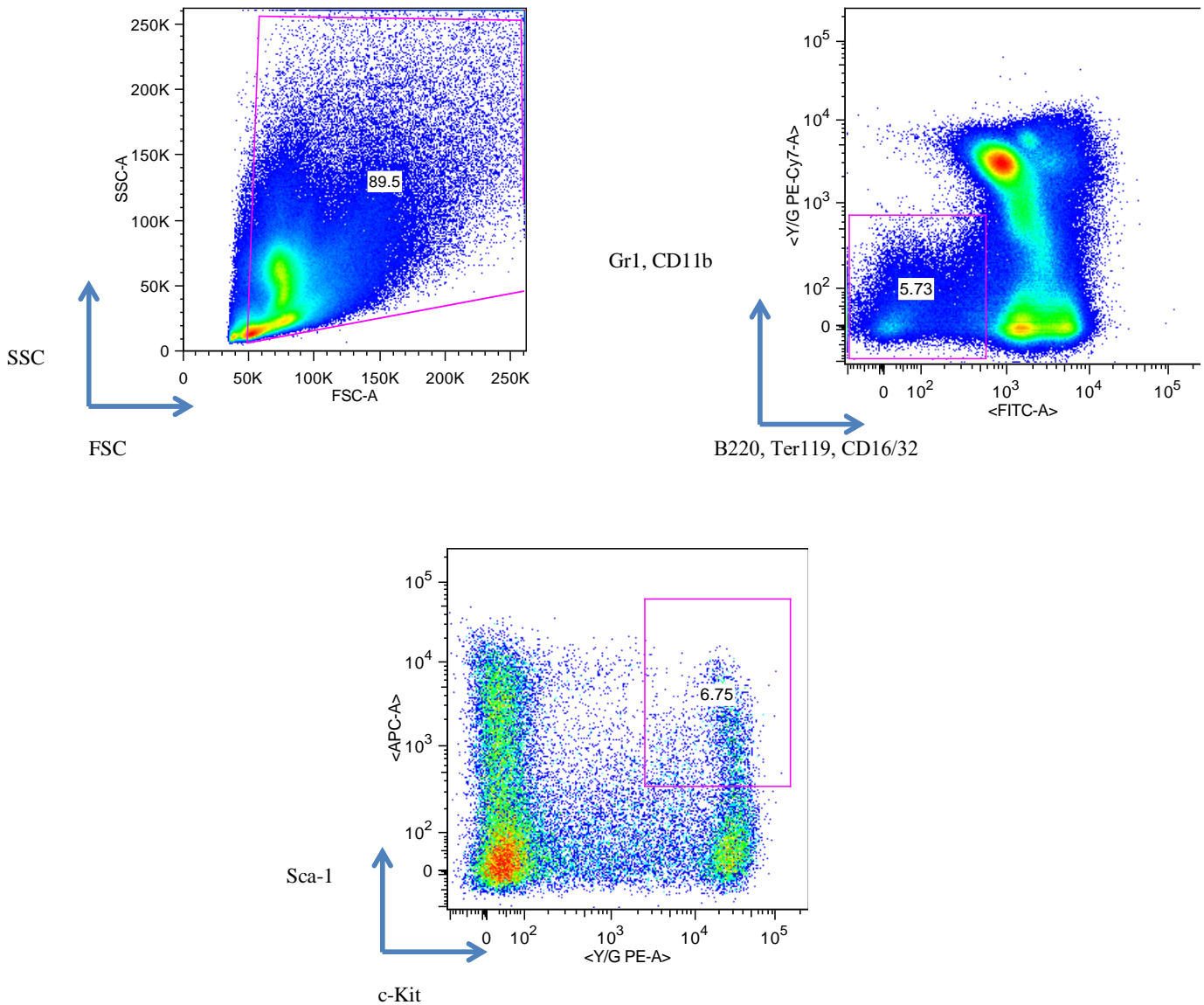
Όπως αναφέραμε προωύτερα, τα πειράματα που διεξήχθησαν είχαν στόχο τη μελέτη των ιδιοτήτων και των διαφορετικών αποκρίσεων των αιμοποιητικών κυττάρων με τη χρήση των παρακάτω πρωτοκόλλων. Η εκάστοτε πειραματική διαδικασία έχει ως κοινό παρανομαστή την απομόνωση του ερυθρού μυελού των οστών από τα ποντίκια. Σχηματικά:



Γενικά, στα πειράματα αυτά, έπειτα από την κυτταρομετρία ροής, τα κύτταρα HSC που συλλέγουμε είναι κατά μέσο όρο: 100.000 κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά στη συνέχεια καλλιεργούνται σε κατάλληλες συνθήκες (κυτταροκίνες, μέσο καλλιέργειας) και στη συνέχεια προστίθεται το ερέθισμα (ορός από NZBxNZW/F1 υβριδικά νεαρά ποντίκια, ορός από NZBxNZW/F1 υβριδικά ποντίκια με συπτώματα και ορός από φυσιολογικά ποντίκια). Πιο συγκεκριμένα, γνωρίζουμε ότι τα HSCs μπορούν να επικοινωνούν με το εξωτερικό περιβάλλον τους με πολλούς τρόπους, όπως η επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου, συστατικά τα οποία προσδένονται στην εξωκυτταρική επιφάνεια του κυττάρου και άλλες αλληλεπιδράσεις με πολλά προσδετικά μόρια και διαλυτούς αναπτυξιακούς παράγοντες. Έτσι, χρησιμοποιώντας παράγοντες όπως IL-6, IL-3 (interleukins), TPO (thrombopoietin), SCF (stem cell factor), επηρεάζεται η ικανότητα των κυττάρων για πολλαπλασιασμό, διατήρηση βλαστικής ικανότητας, ικανότητα ανάπτυξης, όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται υπό κατάλληλες συνθήκες. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελούν οι σωστοί συνδυασμοί των παραγόντων και η συγκέντρωσή τους.⁶

5.1 Απομόνωση του κυτταρικού πληθυσμού LSK

Χρησιμοποιούμε τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής, με στόχο να απομονώσουμε LSK κύτταρα, από τον ολικό μυελό των οστών.⁹ Κατά μέσο όρο, από ένα C57/BL6 ποντίκι μπορούν να απομονωθούν περίπου 100.000 κύτταρα LSK.



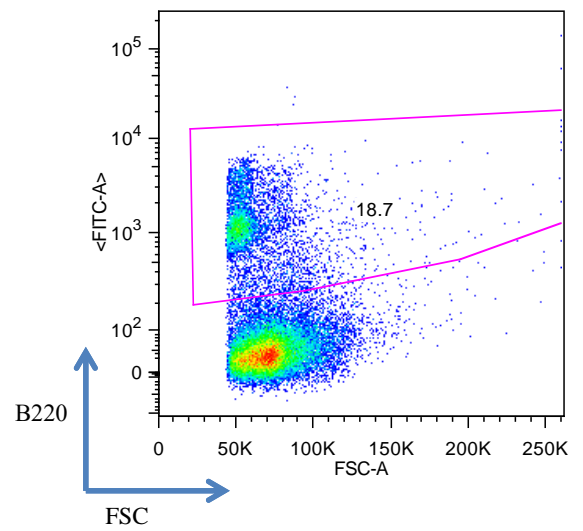
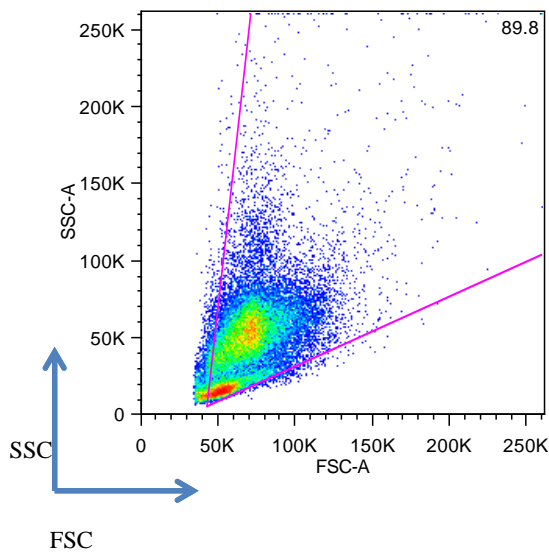
Από το αρχικό διάγραμμα, σύμφωνα με τους δείκτες που χρησιμοποιούμε εξετάζουμε τον πληθυσμό των LSK κυττάρων ως προς το μέγεθος (FSC) και την κοκκιομετρία (SSC). Στη συνέχεια, στο διπλανό διάγραμμα χρησιμοποιώντας τους δείκτες Gr1, CD11b, B220, Ter119, CD16/32 ανιχνεύουμε τους εξής πληθυσμούς: Gr-1: κοκκιοκύτταρα, CD11b: μακροφάγα, B220: λευκοκύτταρα, Ter119: ερυθροκύτταρα,

CD16/32: Τ-κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα, Β-κύτταρα. Όμως, επιλέγουμε τα κύτταρα τα οποία είναι αρνητικά για τους δείκτες αυτούς, διότι θέλουμε να τα απομονώσουμε. Τέλος, διαλέγουμε τα διπλά θετικά κύτταρα για τους δείκτες c-Kit⁺ και Sca-1⁺, καθώς αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό που μελετάμε.

5.2 Ανάλυση έκφρασης CD80/CD86

Χρησιμοποιούμε κυτταρομετρία ροής, με σκοπό να απομονώσουμε τα κύτταρα που διαφοροποιούνται προς Β λεμφοκύτταρα και εκείνα που διαφοροποιούνται προς τη μυελική σειρά.

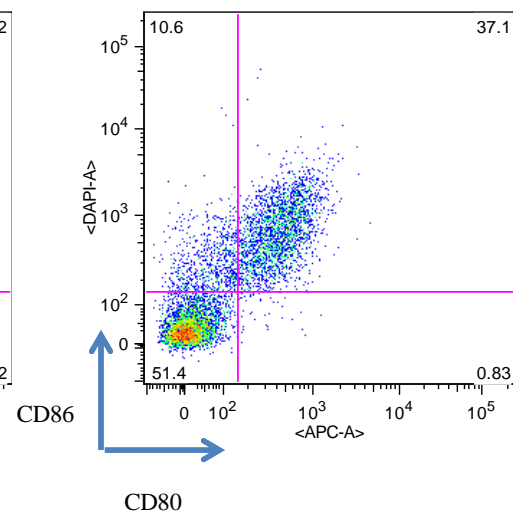
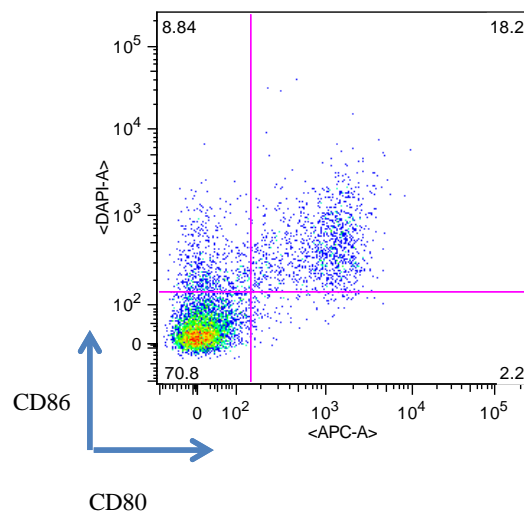
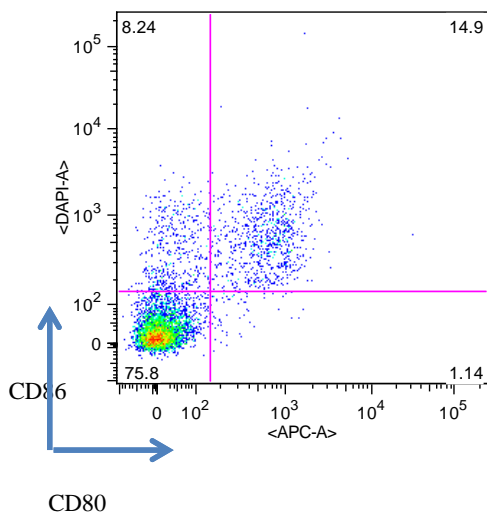
Β-κύτταρα:



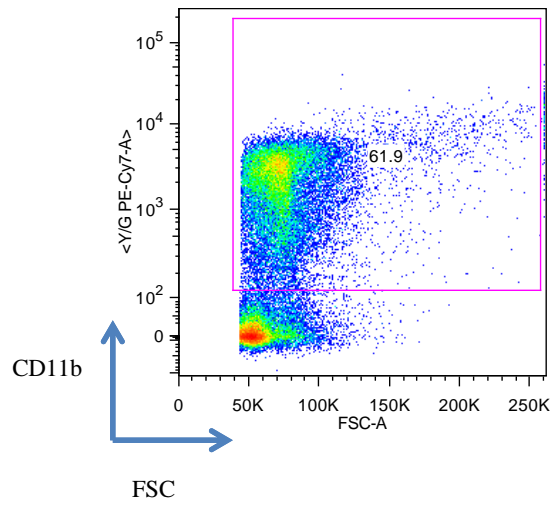
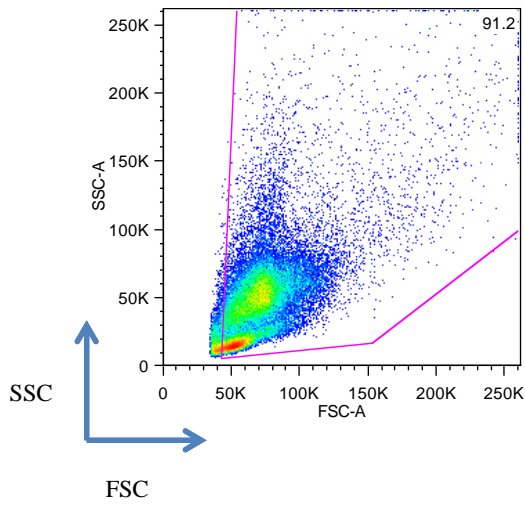
B6

NZBxNZW/F1Young

NZBxNZW/F1Old



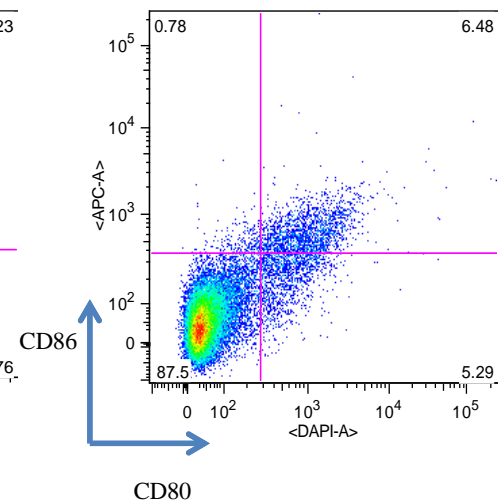
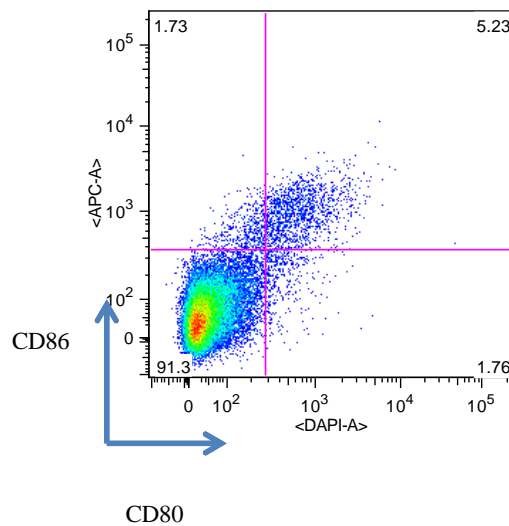
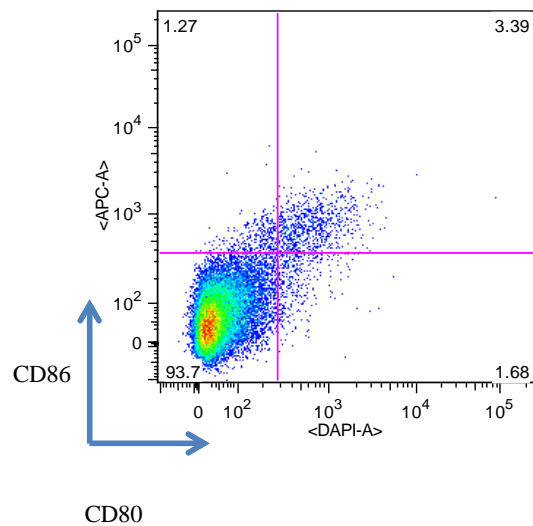
Μυελική Σειρά:



B6

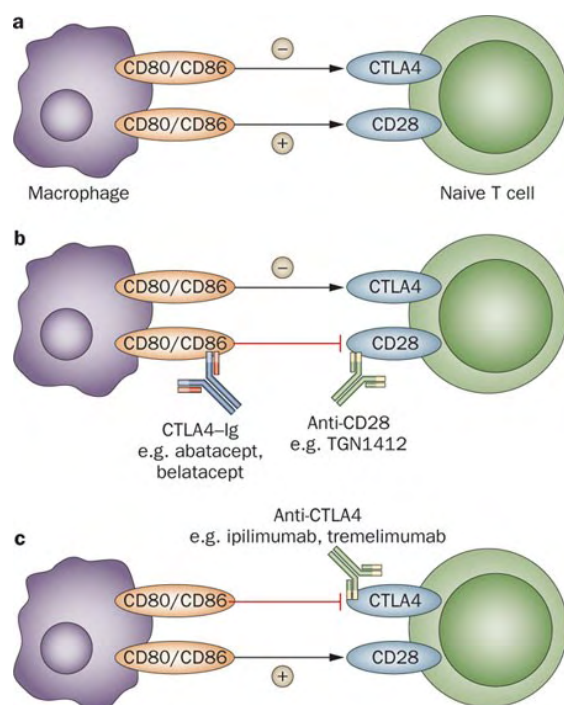
NZBxNZW/F1 Young

NZBxNZW/F1 Old



Όπως αναφέραμε παραπάνω, οι πρωτεΐνες CD80 και CD86 επηρεάζουν τη σύνδεση αντιγόνου και Τ-κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η CD80 βρίσκεται σε ενεργοποιημένα Β-κύτταρα και μονοκύτταρα και παρέχει συνδιεγερτικά σήματα για την ενεργοποίηση και επιβίωση των Τ-κυττάρων. Αποτελεί τον προσδέτη για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των Τ-κυττάρων, την CD28 (με ρόλο στην αυτο-ρύθμιση και κυτταρική επικοινωνία) και το CTLA-4 (αναστολή αυτο-ρύθμισης και κυτταρικής επικοινωνίας). Η CD80 λειτουργεί σε συνδυασμό με την CD86 με στόχο να αλληλεπιδράσουν με τα Τ-κύτταρα. Επίσης, η CD86 εκφράζεται στα αντιγονο-

παρουσιαστικά κύτταρα, παρέχοντας συνδιεγερτικά σήματα (λειτουργία ανάλογη με της CD80). Είναι επίσης προσδέτης των CD28 & CTLA-4.



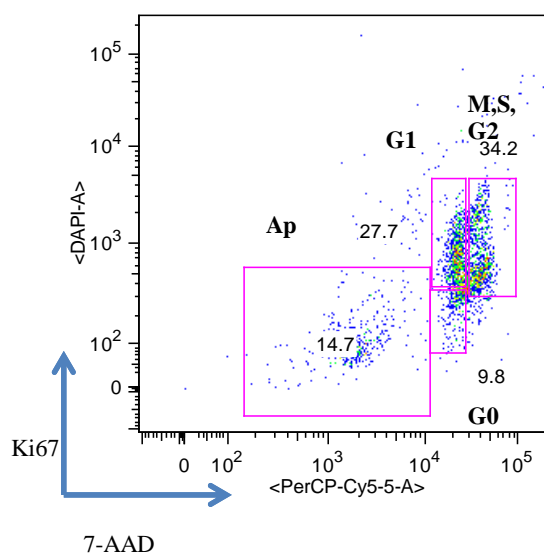
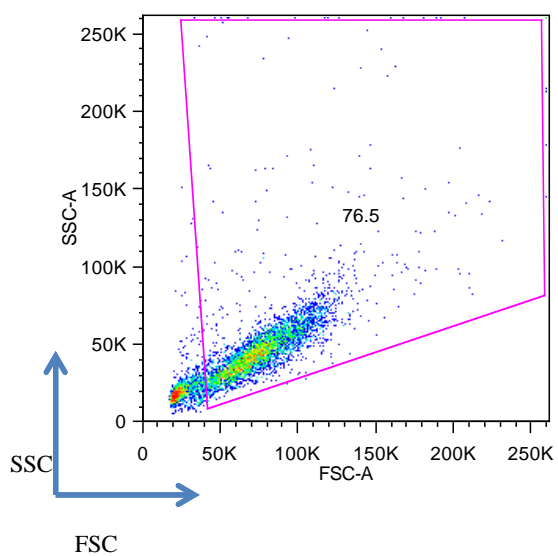
Εικόνα 9: Συνδιέγερση μέσω των μορίων CD80/CD86

Από τα διαγράμματα παραπάνω, μελετώντας τον πληθυσμό των κυττάρων που είναι διπλά θετικά για τα CD80/C86 (και στις δύο περιπτώσεις: Β-κύτταρα και μυελική σειρά, στα διαγράμματα CD80/C86 τα τετράγωνα πάνω και δεξιά), παρατηρούμε αυξημένη την παρουσία τέτοιων κυττάρων στο δείγμα NZBxNZW/F1 ενήλικα (δείγμα που έχει δεχθεί ερέθισμα από ορό NZBxNZW/F1 υβριδικών ποντικών με προχωρημένη την ασθένεια). Το γεγονός αυτό, είναι αναμενόμενο, διότι στο περιβάλλον του ΣΕΛ αναμένουμε μία αύξηση στους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων, καθώς επικρατεί μια γενικευμένη κατάσταση ανοσοαπόκρισης. Η ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων πραγματοποιείται και προφανώς τα συνδιεγερτικά σήματα από τα μόρια αυτά είναι περισσότερα, σε ποντίκια με προχωρημένη νόσο. Τέλος, συγκρίνοντας τα παραπάνω διαγράμματα είναι προφανής η τάση των κυττάρων να διαφοροποιούνται περισσότερο προς τη μυελική σειρά, παρά τα Β-κύτταρα.

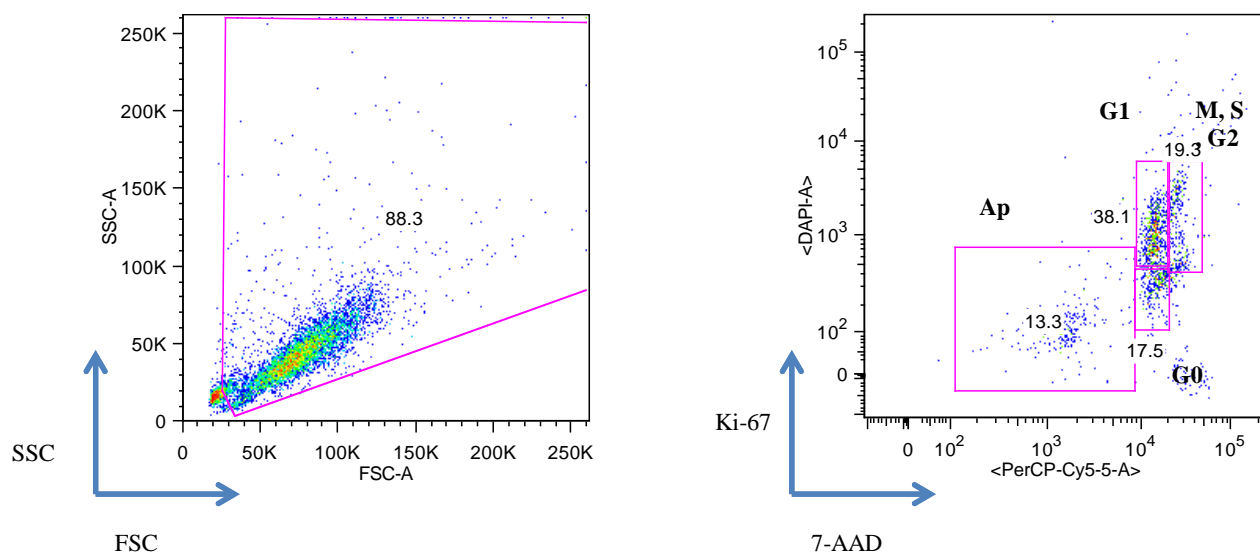
5.3 Ανάλυση Κυτταρικού Κύκλου

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με τη βοήθεια της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής, μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση των φάσεων που βρίσκεται ο κυτταρικός πληθυσμός που μελετάμε (απόπτωση, φάσεις G₀, G₁, S, M), καθώς επίσης είναι δυνατή και η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων αυτών. Η δυνατότητα αυτή δίνεται μέσω δύο αντισωμάτων, των Ki-67 και 7-AAD. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα. (Η ανίχνευση γίνεται στον ολικό πληθυσμό κυττάρων και όχι στα κύτταρα LSK, εξαιτίας του μικρού τους αριθμού στο δείγμα).

NZBxNZW/F1 Young:



NZBxNZW/F1 Old:



Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα, από το συνολικό πληθυσμό των κυττάρων, έχει γίνει κατηγοριοποίηση τους με τη βοήθεια δύο δεικτών, 7-AAD και Ki-67. Η κατηγοριοποίηση αυτή αφορά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα και οι δείκτες αυτοί είναι ενδεικτικοί της κάθε μίας. Πιο συγκεκριμένα, η Ki-67, είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη, που όπως αναφέρθηκε, είναι παρούσα σε όλες τις ενεργές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ απουσιάζει από τη G₀. Έτσι, τα κύτταρα στα οποία η Ki-67 φαίνεται «αυξημένη» είναι εκείνα τα οποία βρίσκονται σε μία ενεργή φάση του κυτταρικού κύκλου και είναι έτοιμα για διαίρεση. Αντίστοιχα, το 7-AAD είναι φθορίζων δείκτης ζωντάνιας, επομένως αφορά τα «ζωντανά» κύτταρα (φάσεις G₀, G₁, M, S, G₂). Τέλος, η φάση της απόπτωσης αναφέρεται στα αποπτωτικά κύτταρα, στα οποία οι δύο δείκτες είναι σαφώς μειωμένοι.

Από τα διαγράμματα παραπάνω, παρατηρούμε μία διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που έχουν δεχθεί ερέθισμα με ορό NZBxNZW/F1 υβριδικών νεαρών ποντικών και NZBxNZW/F1 ποντικών που νοσούν. Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός ότι στα ενήλικα ποντίκια NZBxNZW/F1, τα κύτταρα στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου είναι περισσότερα από αυτά στα νεαρά ποντίκια NZBxNZW/F1. Το γεγονός αυτό εξηγείται, καθώς γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα LSK στη φυσιολογική κατάσταση βρίσκονται αδρανοποιημένα στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, η πρόοδος τους πέρα από τη φάση G₁ «μπλοκάρεται» από την παρουσία γονιδίων – αναστολεών

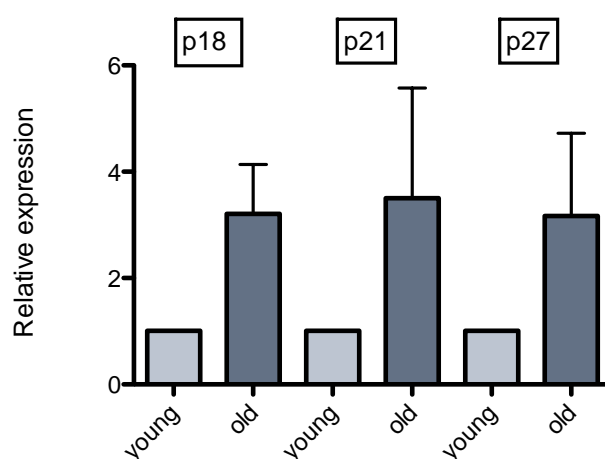
(p21,p27,p18). Φαίνεται, λοιπόν, πώς στο περιβάλλον της ασθένειας αυτοί οι ανασταλτικοί μηχανισμοί αίρονται και τα κύτταρα περνούν στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου και συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό.

Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο p21 είναι αναστολέας και ρυθμίζει την πρόοδο από τη φάση G₁ στην S. Το p27 και το p18 ελέγχουν τη μετάβαση στη φάση G₁. Αντίθετα, η Cyclin D προωθεί την είσοδο των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G₁.¹⁰

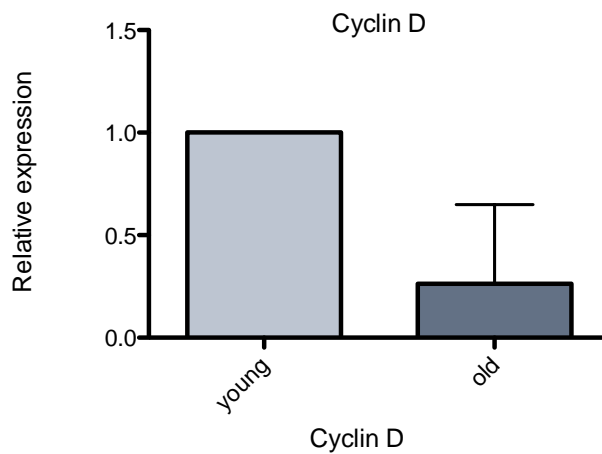
5.4 Ανάλυση Κυτταρικού Κύκλου με PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)

Πραγματοποιήσαμε PCR πραγματικού χρόνου, έτσι ώστε να ελέγξουμε την έκφραση των γονιδίων p21, p27, p18 και Cyclin D του κυτταρικού κύκλου. Χρησιμοποιήσαμε τα δείγματα NZBxNZW/F1 ενήλικα & NZBxNZW/F1 νεαρά (τα δείγματα αυτά έχουν δεχθεί ερέθισμα από ορό NZBxNZW/F1 υβριδικών ποντικών που εμφανίζουν τα συμπτώματα της ασθένειας και NZBxNZW/F1 υβριδικών νεαρών ποντικών με ήπια συμπτώματα).

Τα αποτελέσματα της έκφρασης φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα:



Διάγραμμα 1: Έκφραση γονιδίων p18, p21, p27



Διάγραμμα 2: Έκφραση Cyclin D

Από τα διαγράμματα παρατηρούμε ότι τα γονίδια p18, p21 και p27 (διάγραμμα 1) εκφράζονται περισσότερο στα NZBxNZW/F1 υβριδικά ενήλικα ποντίκια (που νοσούν). Γνωρίζοντας τη λειτουργία των γονιδίων αυτών, καταλαβαίνουμε ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων οδηγεί τη «συσσώρευση» των κυττάρων στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου (ελέγχουν όλα τη φάση G₁). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την αρχική μας υπόθεση, ότι δηλαδή σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας τα κύτταρα εγκαταλείπουν τη φυσιολογική κατάσταση αδράνειας στην οποία βρίσκονται (φάση G₀) και εισέρχονται σε μια ενεργή φάση, όπου είναι έτοιμα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν (φάση G₁). Η τάση αυτή των κυττάρων δεν εμφανίζεται σε φυσιολογικά δείγματα ποντικίων και σε δείγματα νεαρών υβριδικών ποντικίων NZBxNZW/F1, των οποίων τα συμπτώματα της ασθένειας δεν είναι ακόμη εμφανή.

Τέλος, για το γονίδιο Cyclin D (διάγραμμα 2) παρατηρούμε ότι εκφράζεται περισσότερο στα δείγματα NZBxNZW/F1 νεαρά από ό,τι στα δείγματα NZBxNZW/F1 ενήλικα. Η πρωτεΐνη Cyclin D ελέγχει την πρόοδο των κυττάρων από τη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου, στη φάση S. Έτσι, καταλαβαίνουμε ότι η τάση

των κυττάρων σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, είναι η παρατεταμένη παραμονή τους στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου.

Τα αποτελέσματα αυτά, είναι συναφή με τα αποτελέσματα που λάβαμε από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Πράγματι, στα δείγματα NZBxNZW/F1 ενήλικα φαίνεται ότι περισσότερα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G₁, σε σχέση με τα δείγματα NZBxNZW/F1 νεαρά, χαρακτηριστικό δείγμα της προόδου της ασθένειας.

5.5 Συμπεράσματα

Η ασθένεια του Συστηματικού Ερυθρηματώδους Λύκου αποτελεί μία από τις πιο χαρακτηριστικές αυτοάνοσες νόσους. Παρά τις εκτενείς έρευνες, τα ακριβή αίτια της ασθένειας παραμένουν ακόμη ασαφή. Σε άτομα που νοσούν, παρατηρείται μια γενικευμένη απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, με χαρακτηριστική την αύξηση των Β- και Τ-κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, οι μελέτες εστιάζονται σε έναν συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος είναι πιθανόν υπεύθυνος για τις αλλαγές που παρατηρούνται στο ΣΕΛ. Πιο ειδικά, ο πληθυσμός αυτός αφορά τα αρχέγονα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα τα οποία δίνουν γένεση σε όλες τις σειρές των κυττάρων του αίματος. Ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών είναι: Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺, λόγω των δεικτών που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Σε φυσιολογική κατάσταση, τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε αδρανή φάση. Αντίθετα, στο περιβάλλον της ασθένειας το προφίλ αυτό αλλάζει, τα κύτταρα παύουν να είναι ανενεργά και διαφοροποιούνται. Η ισορροπία μεταξύ των φάσεων στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Όπως ήδη αναφέραμε, η αδρανής κατάσταση αντιστοιχεί στην παραμονή των κυττάρων στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου, ενώ σε συνθήκες του ΣΕΛ, τα κύτταρα εγκαταλείπουν τη φάση G₀ και εισέρχονται στη φάση G₁, έτοιμα για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Τα γεγονότα αυτά ελέγχονται από γονίδια του κυτταρικού κύκλου, τους αναστολείς p21, p27, p18, οι οποίοι ελέγχουν τη φάση G₁ και είναι αυξημένοι στα δείγματα ποντικών που πάσχουν.

Επίσης, σε πειράματα μελέτης μορίων – συνδιεγερτών, που επηρεάζουν την πρόσδεση αντισώματος και Τ-κυττάρου, παρατηρούμε μια γενικευμένη αύξηση έκφρασης των σημάτων από τα μόρια CD80 & CD86, στο περιβάλλον του ΣΕΛ. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η σύνδεση αντιγόνου – Τ-κυττάρων είναι ισχυρότερη, επομένως διεγείρεται περισσότερο ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Επίσης, παρατηρείται «προτίμηση» των κυττάρων για διαφοροποίηση προς τη μυελική σειρά. Τέλος, στόχος των ερευνών πάνω στην ασθένεια του ΣΕΛ είναι η πλήρης αποσαφήνιση των μηχανισμών που διέπουν την ασθένεια και κατ' επέκταση η μείωση και καταστολή των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Βιβλιογραφία

- 1 Purton, L. E. & Scadden, D. T. The hematopoietic stem cell niche. (2008).
- 2 Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology* **6**, 93-106 (2006).
- 3 Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H. & Suda, T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* **141**, 4656-4666 (2014).
- 4 Niu, H. *et al.* The function of hematopoietic stem cells is altered by both genetic and inflammatory factors in lupus mice. *Blood* **121**, 1986-1994 (2013).
- 5 Pietras, E. M., Warr, M. R. & Passegué, E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology* **195**, 709-720 (2011).
- 6 Sauvageau, G., Iscove, N. N. & Humphries, R. K. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* **23**, 7223-7232 (2004).
- 7 Ema, Hideo, *et al.* "In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells." *The Journal of experimental medicine* 192.9 (2000): 1281-1288.
- 8 Seita, Jun, and Irving L. Weissman. "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2.6 (2010): 640-653.
- 9 Petriz, Jordi. "Flow cytometry of the side population (SP)." *Current protocols in cytometry* (2007): 9-23.
- 10 Bernards, R "E2F: a nodal point in cell cycle regulation, *Biochem. Biophys. Acta* 1997, 1333, M33-M40
- 11 Draetta, G and Eckstein, J., Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation, *Biochem. Biophys. Acta* 1997, 1332, M53-63
- 12 Robert G. Lahita, Systemic lupus erythematosus
- 13 Kuby, Thomas J. Kindt/Richard A. Goldsby/Barbara A. Osborne, Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Κωνσταντίνος Μπαξεβάνης. Εκδόσεις Πασχαλίδης, Ανοσολογία
- 14 <http://www.envigo.com>