

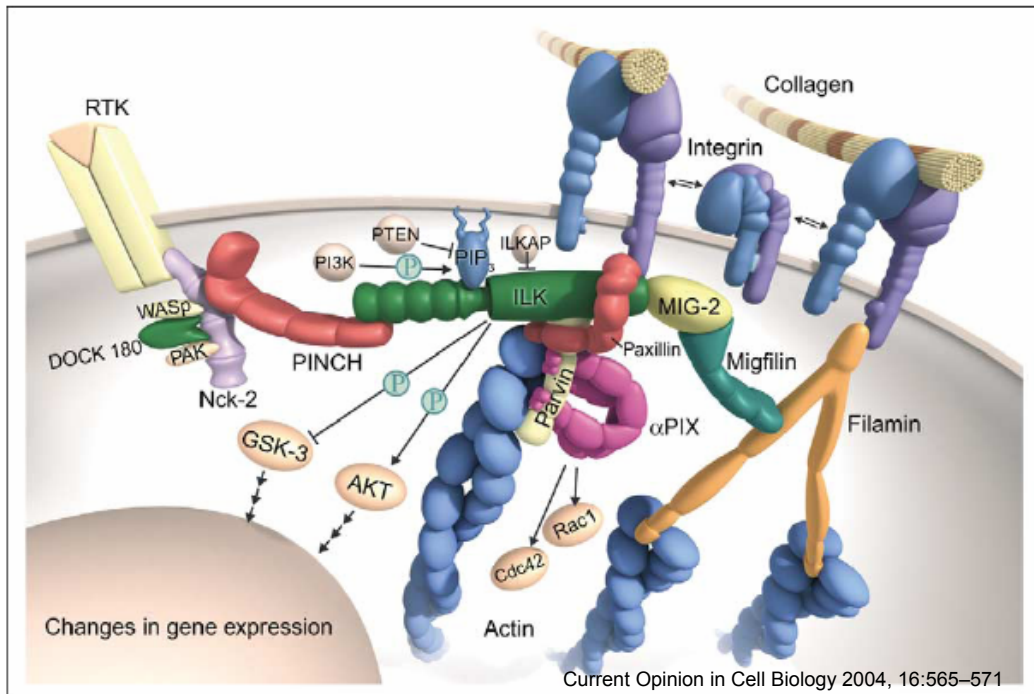
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών:
«Μοριακή Βιολογία και Βιοιατρική»

Ερευνητικό Εργαστήριο Αυτοανοσίας και Φλεγμονής
Τμήμα Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας και Αλλεργιολογίας

Εργασία Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

**Ο ρόλος της κινάσης Trp2 στο σηματοδοτικό μονοπάτι των
ιντεγκρινών και η σημασία της στην φλεγμονώδη αντίδραση**

Επιμέλεια: Ιωάννου Μαριάννα
Επιβλέποντες: Ιωάννης Τασιούλας, Δημήτριος.Τ Μπούμπας



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ABSTRACT.....	4
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Η κινάση <i>Trl2</i>	
1.2 Οι υποδοχείς των ιντεγκρινών	
2.ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ-ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	13
3.ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ.....	14
3.1 Κυτταρικές καλλιέργειες:	
3.1.1 Διαφοροποίηση μακροφάγων από πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών (<i>BMDMs-Bone Marrow Derived Macrophages</i>).	
3.1.2 Απομόνωση περιτοναϊκών μακροφάγων από ποντίκια(<i>PEMs-Peritoneal Elicited Macrophages</i>).	
3.1.3 Απομόνωση ανθρώπινων μονοκυττάρων από περιφερικό αίμα.	
3.1.4 Μεταχείριση των μακροφάγων (<i>BMDMs</i> και <i>PEMs</i>) με διεγέρτες και αναστολείς .	
3.2 Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (<i>whole cell extracts</i>) από κύτταρα.	
3.3 Ανάλυση κατά <i>Western(Western blot)</i> .	
3.4 Απομόνωση ολικού <i>RNA(total RNA)</i> από κύτταρα.	
3.5 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (<i>RT-PCR</i>).	
3.6 Ημιποσοτική <i>PCR (real time PCR)</i> .	
3.7 Δοκιμασία <i>ELISA</i> .	
3.8 <i>Flow cytometry</i> .	
3.9 Δοκιμασία ικανότητας μεταναστευσης των κυττάρων σε τρύβλιο-Δοκιμασία επούλωσης(<i>wound healing assay</i>).	
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	22
4.1 Τα <i>Trl2</i> ^{-/-} μακροφάγα παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα προσκόλλησης σε προσδέτες ιντεγκρινών.	
4.2 Η έλλειψη της <i>Trl2</i> δεν επηρεάζει την έκφραση των ιντεγκρινών στα μακροφάγα.	
4.3 Η έλλειψη της <i>Trl2</i> δεν επηρεάζει την διαφοροποίηση των μακροφάγων.	
4.4 Η <i>Trl2</i> απαιτείται για την ενεργοποίηση της <i>ERK</i> κατά την σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών στα μακροφάγα ποντικών.	

- 4.5 Παραγωγή κυτταροκινών και χυμοκινών στα *Trp2* ^{-/-} μακροφάγα μετά από ενεργοποίηση των ιντεγκρινών.
- 4.6 Η ενεργοποίηση του NFκB καθοδικά των ιντεγκρινών δεν επηρεάζεται από την έλειψη της *Trp2*.
- 4.7 Τα μακροφάγα από *Trp2* ^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν ελατωμένη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT1 και STAT3 μετά από ενεργοποίηση των ιντεγκρινών με pRGD.
- 4.8 Ικανότητα μετανάστευσης των *Trp2* ^{-/-} μακροφάγων σε τρύβλιο-Δοκιμασία επούλωσης(wound healing assay).
- 4.9 Η *Trp2* απαιτείται για την ενεργοποίηση της ERK κατά την σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών σε ανθρώπινα μακροφάγα.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....37

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Η πρωτεΐνη Tpl2 είναι μια MAP3K κινάση στο μονοπάτι των MAPK κινασών, η οποία επάγει σήματα μέσω των υποδοχέων TLRs (Toll like receptors) και TNFRs, υποδοχείς απαραίτητους για την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην παραγωγή TNFα και άλλων παραγόντων φλεγμονής. Στην φλεγμονή συμμετέχουν επίσης και οι ιντεγκρίνες καθώς η ενεργοποίηση του μονοπατιού κάτω από αυτές εμπλέκεται στην παραγωγή κυτταροκινών και χυμοκινών, ενώ ταυτόχρονα είναι απαραίτητες για την προσκόλληση και την μετανάστευση των κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής.

Σε αυτή τη μελέτη διερευνούμε τον ρόλο της κινάσης Tpl2 στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών σε μακροφάγα ποντικών και ανθρώπων, διερευνώντας περαιτέρω εάν η απαλοιφή της μπορεί να επηρεάσει σημαντικές λειτουργίες των μακροφάγων όπως είναι η διαφοροποίηση, προσκόλληση, η μετανάστευση και η παραγωγή κυτταροκινών. Τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη υποδηλώνουν ότι α) η Tpl2 συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών στα μακροφάγα αφού και η γονιδιακή απαλοιφή της (στα Tpl2^{-/-} ποντίκια) έχει ως αποτέλεσμα την ελαττωματική εκτέλεση λειτουργιών που βασίζονται στις ιντεγκρίνες όπως είναι η προσκόλληση των μακροφάγων και β) οδηγεί στην μειωμένη έκφραση κυτταροκινών και χυμοκινών που συνήθως παράγονται μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού των ιντεγκρινών κατά την φλεγμονή. Επομένως, η Tpl2 θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικό στόχο για την θεραπεία πολλών φλεγμονωδών νόσων.

ABSTRACT:

Integrin function is essential for the function of neutrophils and macrophages, key effector cells during the innate immune response. Integrin signaling is critical for cellular functions such as firm adhesion, cell spreading, chemotaxis and the production of various cytokines. Exaggerated inflammatory responses occur when integrins are inappropriately activated. Thus, tight control of integrin signaling and function is required for appropriate coordination of innate immune and inflammatory responses. Signaling pathways activated downstream of integrins include the p38, ERK1/2 and JNK MAPKs among others. Tpl2 is a MAP3K that has been shown to preferentially regulate activation of ERK1/2 MAPKs and pro-inflammatory cytokine production in response to LPS. We sought to evaluate the role of Tpl2 kinase in the integrin signaling pathway and macrophage functions such as adhesion, spreading and cytokine production after integrin stimulation. Experiments performed on murine and human macrophages, indicate that Tpl2 kinase is required for integrin-induced ERK1/2 MAPK activation, cell spreading and cytokine and chemokine production in primary macrophages. Our data identify Tpl2 as part of the integrin signalosome that is formed in adherent macrophages. Tpl2 may represent a potential therapeutic target in systemic inflammatory/autoimmune diseases where aberrant integrin function may play a pathogenic role.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

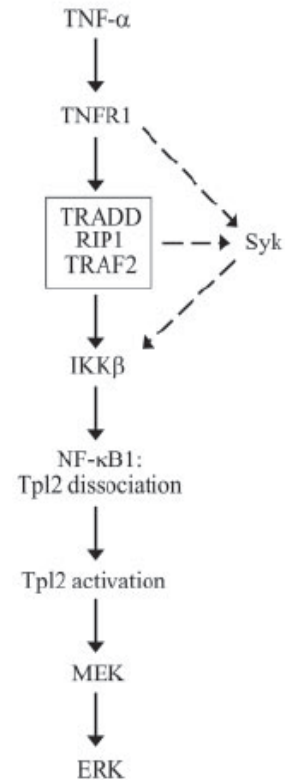
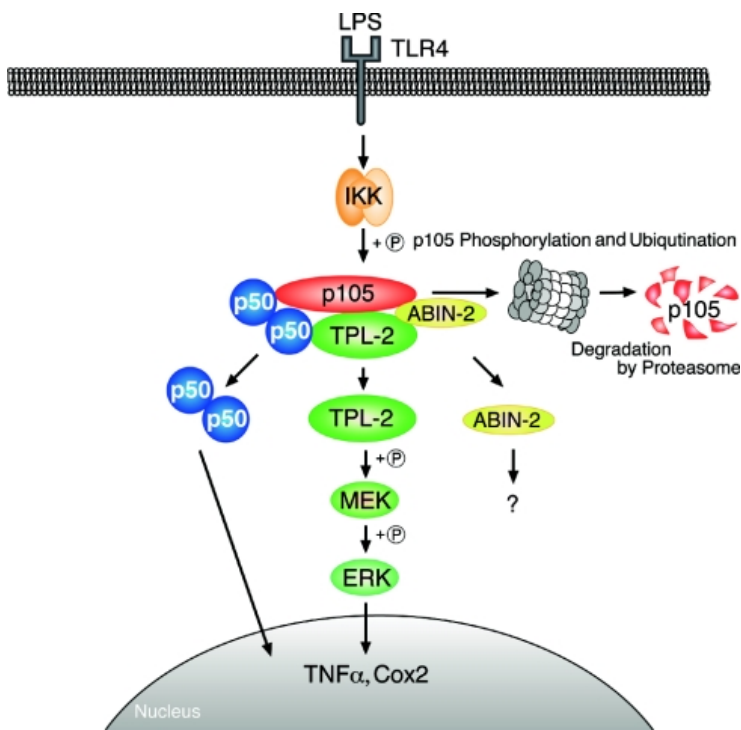
1.1 Η κινάση Trp2

Η πρωτεΐνη Trp2(γνωστή και ως Cot) είχε ταυτοποιηθεί αρχικά ως μια πρωτοογκοπρωτεΐνη της οποίας η υπερέκφραση ή κάποιες δομικές αλλαγές, επάγουν μετασχηματισμό των κυττάρων και κακοήθειες σε τρωκτικά(1). Εκφράζεται σε σπλήνα, θύμο, ήπαρ, πνεύμονες και κυρίως σε μακροφάγα, σε B και σε T κύτταρα. Το γονίδιο της Trp2(Tumor progression locus 2) κωδικοποιεί για μια κινάση σερίνης/θρεονίνης μέλος της οικογένειας των MAP3Ks, των γνωστών κινασών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPKs(ERK, JNK, P38).

Όταν η Trp2 υπερεκφράζεται ενεργοποιεί την ERK, JNK, P38, ERK5, NFκB, NFAT(2-5). Ωστόσο ο φυσιολογικός της ρόλος στο αιμοποιητικό σύστημα φαίνεται ότι είναι πιο περιορισμένος καθώς όταν μακροφάγα από Trp2^{-/-} ποντίκια διεγείρονται με LPS, CD40L και TNFα, τότε παρατηρείται ελαττωματική ενεργοποίηση της ERK (αλλά όχι των άλλων MAPKs: JNK, P38) και του NFκB (6,7). Παρομοίως, σε B κυτταρα από Trp2^{-/-} ποντίκια παρατηρείται ελαττωματική ενεργοποίηση της ERK μετά από διεγερση με CD40L(7).

Μέχρι τώρα έχει δειχθεί ότι η Trp2 εμπλέκεται στη σηματοδότηση μέσω διαφόρων υποδοχέων όπως TLRs[TLR4,TLR2,3,7,9(13α,13β)] αλλά και μέσω υποδοχέων της οικογένειας TNFR (TNFR1,CD40). Συγκεκριμένα τόσο οι TLRs(14) όσο και TNFRs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανοσολογική απόκριση και την φλεγμονή αφού ενεργοποιούν μονοπάτια που οδηγούν στην έκφραση διαφόρων κυτταροκινών και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην φλεγμονή.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια και ο μηχανισμός με τον οποίο η Trp2 συνεισφέρει στην επαγωγή προφλεγμονωδών σημάτων μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα TLR4 και TNFR1 φαίνονται στις εικόνες 1 και 2 και επεξηγούνται παρακάτω. Ο υποδοχέας TLR4 ενεργοποιείται από τον λιποπολυσακχαρίτη LPS(συστατικό των gram(-) βακτηρίων) ενώ ο υποδοχέας TNFR1 ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του κυτταροτοξικού παράγοντα φλεγμονής TNFα.



Εικόνα 1: Ενεργοποίηση της Trp2 μέσω του υποδοχέα TLR4. Η κινάση IKK είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της Trp2 μέσω φωσφορυλίωσης και τελικά αποικοδόμησης του αναστολέα του NfκB(p105). Η αποικοδόμηση του p105 οδηγεί σε αποδέσμευση και ενεργοποίηση του NFκB και της Trp2 που τελικά επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως TNFα και cox-2. Διέγερση Trp2 -/- μακροφάγων με LPS έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ενεργοποίηση της ERK και μειωμένη παραγωγή των προηγούμενων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, γι' αυτό τα Trp2-/- ποντίκια είναι ανθεκτικά στο ενδοτοξικό σοκ με LPS.

Πηγή: Journal of Biological Chemistry(2006)281:1371-1380

Εικόνα 2: Ενεργοποίηση της Trp2 μέσω του υποδοχέα TNFR1. Διέγερση με TNFα ενεργοποιεί την κινάση Syk η οποία σε συνεργασία με RIP1 και TRAF2 ενεργοποιεί την Trp2. Φαίνεται ότι η Syk κατέχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του καταρράκτη Trp2/MEK/ERK λειτουργώντας ανοδικά της κινάσης IKKβ η οποία ελέγχει την αποδέσμευση της Trp2 από τον NFκB1.

Πηγή: Biochemical Journal (2004)Volume 382, 393-409)

Όταν τα κύτταρα δεν έχουν διεγερθεί με κάποιο προσδέτη, η Tpl2 φαίνεται να δημιουργεί ένα στοιχειομετρικό σύμπλεγμα ισχυρής συγγένειας με τον κυτταροπλασματικό παράγοντα p105 NFκB1(αναστολέας του NFκB) (15,16,16α) και με τον αναστολέα ABIN-2 (NF-κB2). Αυτή η αλληλεπίδραση NFκB1:Tpl2:ABIN-2 σταθεροποιεί και ταυτόχρονα καταργεί την καταλυτική δράση της κινάσης Tpl2(16α,16β). Ωστόσο, όταν το LPS και ο TNFα προσδεθούν στους υποδοχείς τους, επάγουν την αποδέυσμεση της Tpl2 από τον p105(17). Τότε η ελεύθερη Tpl2 είναι ενεργή αλλά ασταθής και τελικά υπόκειται σε γρήγορη αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα(17). Παρ' ότι δεν είναι πλήρως καθορισμένο ακόμη, αυτό οφείλεται στο σύμπλεγμα IKK(IκB kinase signaling complex).

Μετά από διέγερση του μονοπατιού το σύμπλεγμα IKK ενεργοποιείται, φωσφορυλιώνει τον NFκB1 σε μια σερίνη και ακολουθεί η αποικοδόμηση του NFκB1 από το πρωτεόσωμα(18). Η απενεργοποίηση της υπομονάδας IKKβ(της καταλυτική υπομονάδας του IKK) εμποδίζει τόσο την σηματοδότη μέσω NFκB όσο και την ενεργοποίηση της Tpl2 και της ERK μετά από απόκριση σε LPS και TNFα(19,20). Επιπλέον, η καταλυτική υπομονάδα IKKβ απαιτείται για την άμεση φωσφορυλίωση της Tpl2 στην Thr²⁹⁰ η οποία ρυθμίζει την πρόσδεση της Tpl2 στον NFκB1(21,22). Ωστόσο, παρόλο που ο IKKβ και ο NFκB1 απαιτούνται για την ενεργοποίηση της Tpl2, είναι σίγουρο ότι υπάρχουν κι άλλα μόρια που ρυθμίζουν την δράση της.

Πρόσφατα έχει τονιστεί ο ρόλος των πρωτεϊνών με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης σχετικά με την ενεργοποίηση της Tpl2 μετά από απόκριση σε LPS(23) και ήδη η κινάση Syk φαίνεται ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της Tpl2 μετά από απόκριση σε TNFα στα μακροφάγα(24). Παράλληλα η πρωτεΐνη Akt (protein kinase B) μια κινάση σερίνης/θρεονίνης έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την Tpl2 και μπορεί να ρυθμίσει την δράση της Tpl2 στο μονοπάτι του NFκB στα T κύτταρα, φωσφορυλιώνοντας την στο καρβοξυτελικό άκρο στην θέση S400(25). Επιπρόσθετα, με την μέθοδο χρωματογραφίας IMAC(immobilized metal affinity chromatography)(26) έχουν ταυτοποιηθεί τρεις θέσεις φωσφορυλίωσης της Tpl2 που πιθανών ρυθμίζουν την δράση της. Οι τρεις θέσεις που έχουν χαρακτηριστεί με την προηγούμενη μέθοδο είναι: η S400, η S443 και η T80. Τα αποτελέσματα για την θέση S400 επιβεβαιώθηκαν αφού όντως η Tpl2 φωσφορυλιώνεται στην S400 απο την Akt ρυθμίζοντας την δράση της(25). Η βιολογική σημασία των θέσεων S443 και T80 δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη, ωστόσο κάποιες πιθανές κινάσες σερίνης/θρεονίνης που θα μπορούσαν να φωσφορυλιώσουν τις θέσεις είναι η PKC μ , PKC ζ , και CaMkII.

Η συμμετοχή της Tpl2 στα σηματοδοτικά μονοπάτια των TLRs και TNFRs, φανερώνει τον κρίσιμο ρόλο της στην φλεγμονώδη απόκριση. Επομένως η απουσία της Tpl2 περιμένουμε να οδηγεί σε αποτυχία της φωσφορυλίωσης της MEK/ERK μετά από διέγερση από LPS ή TNFα και τελικά ελαττωμένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών που είναι οι στόχοι των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από LPS ή TNFα. Πράγματι ζώα τα οποία δεν έχουν Tpl2 εκκρίνουν χαμηλά ποσά TNFα όταν εκτίθεται σε LPS, είναι ανθεκτικά στο ενδοτοξικό σοκ με LPS(6) όπως και στην TNFα επαγόμενη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου(IBD)(8) και στην αρθρίτιδα.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι παρόλο που η Tpl2 είχε θετικό ρόλο στην ανάπτυξη της IBD και της αρθρίτιδας(μέσω συμμετοχής στο μονοπάτι παραγωγής TNFα), η παθοφυσιολογία των δύο συνδρόμων εξαρτάται από σήματα που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων(8-11). Γι 'αυτό είναι σημαντικό να καθοριστεί ο ρόλος της Tpl2 σε αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε MEFs(murine embryonic fibroblasts) και σε αιμοποιητικά κύτταρα φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές στην δράση

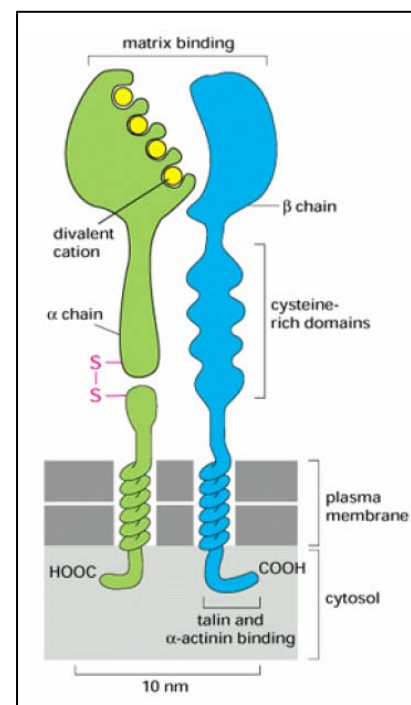
της Trp2 στα διαφορετικά είδη κυττάρων και ότι ο ρόλος της Trp2 στη σηματοδότηση εξαρτάται τόσο από τον κυτταρικό τύπο καθώς και από το είδος του σήματος(12).

Αφού λοιπόν η Trp2 είναι μια MAPKKK στο σηματοδοτικό μονοπάτι Trp2-MEK-ERK TPL2 και αφού είναι απαραίτητη για την έκφραση TNFα και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, η φαρμακολογική αναστολή της θα μπορούσε να βοηθήσει στην καταστολή της φλεγμονής σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και φλεγμονώδη νόσο του εντέρου(IBD/Inflammatory Bowel Disease). Μέχρι τώρα έχει σχεδιαστεί και δοκιμαστεί, μια σειρά από πιθανούς αναστολείς της TPL2 οι οποίοι επιβεβαίωσαν ότι η καταλυτική ενεργότητα της Trp2 απαιτείται για την ενεργοποίηση της MEK1/2 και ERK1/2 σε ανθρώπινα μονοκύτταρα μετά από διέγερση με LPS. Η καταστολή της Trp2 και σε άλλους τύπους ανθρώπινων κυττάρων θα μπορούσε εν δυνάμει να μειώσει την παραγωγή TNFα και άλλων προφλεγμονωδών μεσολαβητών που εμπλέκονται στην φλεγμονή και να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο τόσο για την παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της IBD όσο και άλλων φλεγμονωδών νοσημάτων του ανθρώπου.

1.2 Οι υποδοχείς των ιντεγκρινών

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικά μόρια/υποδοχείς που αποτελούνται από δυο υπομονάδες α και β(Εικόνα 3). Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί 18 α και 9 β υπομονάδες οι οποίες συνδυάζονται μεταξύ τους δημιουργώντας διαφορετικά ετεροδιμερή(Εικόνα 4)[27,28,29].

Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των υπομονάδων α και β καθορίζουν τους προσδέτες που αναγνωρίζουν οι διαφορετικές ιντεγκρίνες. Οι προσδέτες των ιντεγκρινών μπορεί να είναι είτε μόρια του εξωκυττάρου στρώματος (κολλαγόνο,λαμινίνη,ινωδογόνο κτλ) είτε μόρια επιφάνειας άλλων κυττάρων(ICAM,VCAM κλτ). Με αυτό τον τρόπο οι ιντεγκρίνες συνδέουν τα κύτταρα με το εξωκυτταριο περιβάλλον και ταυτόχρονα μεταδίδουν σήματα για να ρυθμίσουν σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων όπως επιβίωση, ανάπτυξη, απόπτωση, διαφοροποίηση προσκόλληση και κίνηση των κυττάρων(29-33). Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην ρύθμιση των διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης ενδοκυτταρικών σημάτων που προωθούν το κύτταρο να αναδιοργανώσει τον κυτταροσκελετό και να ενεργοποιήσει τα κατάλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια ανάλογα με αν το κύτταρο χρειάζεται να διαφοροποιηθεί, να πολλαπλασιαστεί, να μετακινηθεί ή να επιβιώσει(Εικόνα 5α,5β). Για να επιτευχθεί αυτός ο συντονισμός των κυττάρων με το εξωκυτταρικό περιβάλλον,



Εικόνα 3: Τα μόρια ιντεγκρίνης είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από μια α και μια β υπομονάδα (α και β διαμεμβρανικές γλυκοπρωτείνες) .

τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ιντεγκρινών μπορούν να δράσουν συνεργιστικά με σήματα που προέρχονται από άλλα μονοπάτια όπως με σήματα από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων(RTKs),

υποδοχείς κυτοκινών αλλά και με άλλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς(Εικόνα 5).

Η κυτταροπλασματική περιοχή των ιντεγκρινών απαιτείται για την μεταβίβαση του ενδοκυττάριου σήματος. Επειδή όμως οι ιντεγκρίνες δεν έχουν κάποια (γνωστή μέχρι τώρα) ενεργότητα κινάσης, επάγουν σήματα μέσω μορίων προσαρμοστών τα οποία συνδέουν τις ιντεγκρίνες με κινάσες του κυτταροπλάσματος. Όταν ο προσδέτης συνδεθεί στο εξωκυτταρικό τμήμα των ιντεγκρινών, τότε τα μόρια των ιντεγκρινών αλλάζουν στερεοδιαμόρφωση,

συσσωρεύονται και οργανώνονται σε ομάδες(clusters) προσδένοντας ταυτόχρονα στις κυτταροπλασματικές τους ουρές ινίδια ακτίνης.

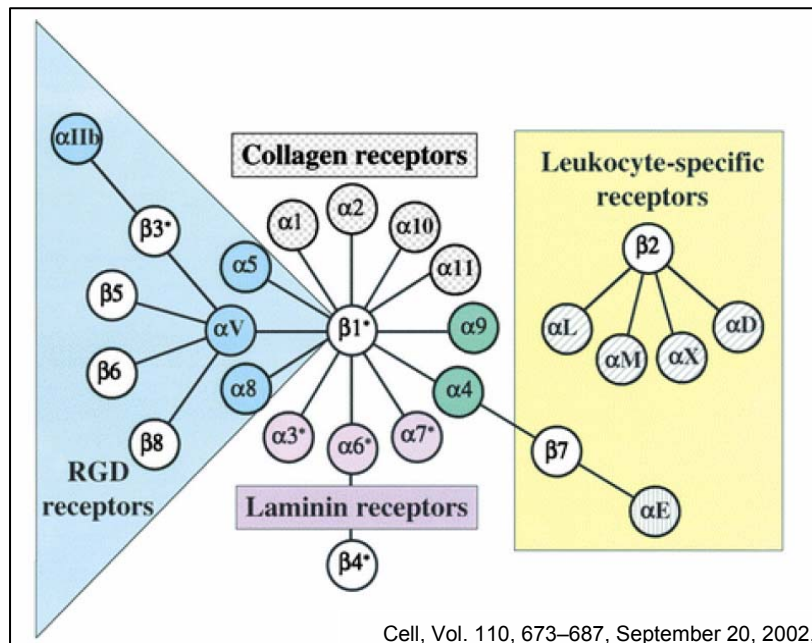
Η ομαδοποίηση των ιντεγκρινών(clustering) δευκολύνει την αλληλεπίδραση τους με άλλα σηματοδοτικά μόρια αυξάνοντας έτσι την αποδοτικότητα της ενεργοποίησης του μονοπατιού.

Για την ενεργοποίηση του μονοπατιού καθοδικά των ιντεγκρινών μετά την πρόσδεση του προσδέτη, απαιτείται η στρατολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που αποτελούνται από μόρια με ενεργότητα κινάσης ή μόρια προσαρμοστές όπως ILK, FAK, talin, paxillin, parvins, p130Cas, κινάσες της οικογένειας Src, Syk και GTPases της οικογένειας των πρωτεϊνών Rho.(Εικόνα 5) [34,35,36-38].

Επίσης όπως πρόσφατα έχει δείχθει, οι ιντεγκρίνες σε μακροφάγα και ουδετερόφιλα χρησιμοποιούν μόρια προσαρμοστές(όπως DAP12, FcRγ) που διαθέτουν μοτίβα ITAM(Immunoreceptor- tyrosine activation motifs)[39].

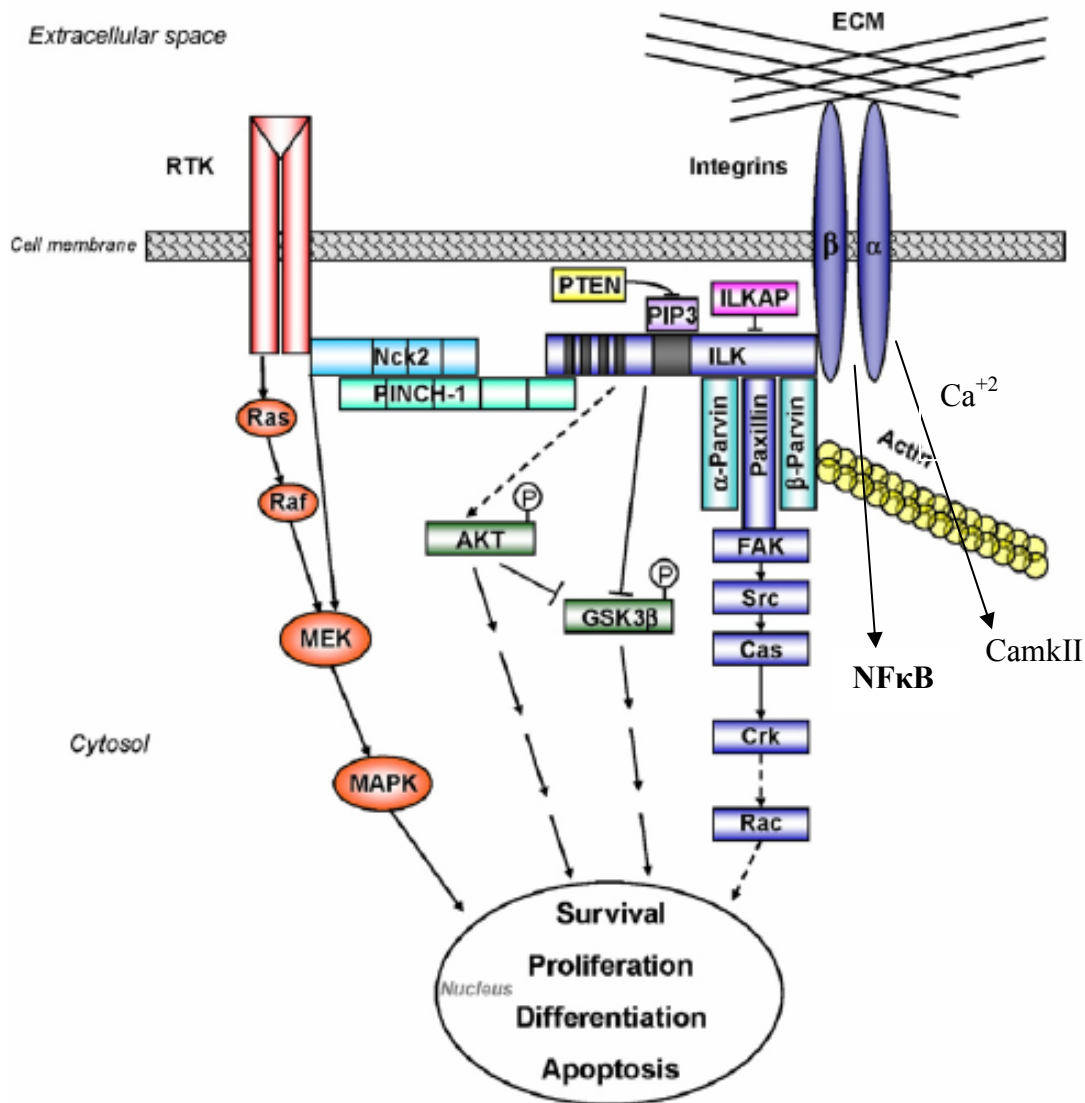
Παρόμοια μόρια με μοτίβα ITAM ως γνωστόν χρησιμοποιούνται από τους Fc υποδοχείς καθώς και από τους υποδοχείς των B και T κυτταρών. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών οδηγεί σε ενεργοποίηση κινάσων της οικογένειας Src οι οποίες φωσφορυλιώνουν τα μοτίβα ITAM σε κατάλοιπα τυροσίνης. Στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης προσδένεται η Syk(μέσω της SH2 περιοχής της) και ενεργοποιείται, επάγωντας τελικά την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών γεγονότων.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης στα αρχικά στάδια του μονοπατιού των ιντεγκρινών δεν έχει γίνει ακόμη πλήρως κατανοητός παρόλα αυτά ένας παρόμοιος



Εικόνα 4: Η οικογένεια των μορίων των ιντεγκρινών. Διαφορετικές α και β υπομονάδες συνδυάζονται μεταξύ τους για να δημιουργήσουν τουλάχιστον 25 διαφορετικά ετεροδιμερή που εκφράζονται διαφορετικά σε κάθε τύπο κυττάρου και έχουν ειδικότητα για διαφορετικούς συνδέτες.

μηχανισμός θα μπορούσε να ισχύει μιας και είναι γνωστό ότι οι κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src και Syk κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών.



Biochimica et Biophysica Acta 1775 (2007) 163–180

Εικόνα 5: Ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης ενεργοποιείται από τις ιντεγκρίνες και ρυθμίζει σε συνεργασία με άλλα μονοπάτια, βασικές λειτουργίες του κυττάρου όπως επιβίωση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση, μετανάστευση. Για παράδειγμα η κινάση ILK μπορεί να προσδέσει ιντεγκρίνες αλλά ταυτόχρονα και μόρια προσαρμοστές ή μεσολαβητές όπως PINCH, parvins, paxillin, PIP3 (φωσφατιδυλοinositol). Μέσω της PINCH (και Nck2) οι ιντεγκρίνες συνδέονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι αυξητικών παραγόντων ενώ μέσω των parvins συνδέονται με τον κυτταροσκελετό. Η ενεργότητα κινάσης της ILK εξαρτάται από την κινάση PI3K και καθοδικά μπορεί να ενεργοποιήσει ή καταστείλει μόρια όπως η Akt και Gsk3β αντίστοιχα, ρυθμίζοντας έτσι την επιβίωση του κυττάρου. Παράλληλα η φωσφορυλίωση μιας άλλης κινάσης τυροσίνης –FAK- από την ILK, μπορεί να στρατολογήσει μόρια όπως src, cas, crk, Rac που εμπλέκονται στην δημιουργία ψευδοποδίων και προωθούν την μετανάστευση του κυττάρου. Ανάμεσα σε άλλα, καθοδικά των ιντεγκρινών μπορούν να ενεργοποιηθούν πλειοτροπικοί παράγοντες όπως ο NFκB, CaMkII και διαφορετικά μονοπάτια κινασών MAP.

Όπως έχει δειχθεί σε λευκοκύτταρα, υπάρχουν επιπρόσθετα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από κυτοκίνες/χυμοκίνες και επηρεάζουν την ενεργοποίηση και λειτουργία των ιντεγκρινών-τέτοια μονοπάτια ενεργοποιούν μόρια όπως CaMkII, PI3K, RHO (ομόλογη της RAS), RAP1, RPL και DOCK2, πρωτεΐνες που σχετίζονται κυρίως με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [40,41,42]. Η δράση που έχουν αυτά τα μονοπάτια στη λειτουργία των ιντεγκρινών είναι ότι αυξάνουν την στρατολόγηση διαφόρων μορίων στην κυτταροπλασματική ουρά των ιντεγκρινών πριν ακόμη αυτές προσδέσουν τον προσδέτη τους, με αποτέλεσμα να προκαλούν αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση των ιντεγκρινών οι οποίες τελικά αποκτούν μια πιο 'ενεργοποιημένη μορφή' με αυξημένη συγγένεια για τον προσδέτη.

Επομένως οι ιντεγκρίνες δρουν ως μοριακές γέφυρες που συνδέουν το εξωτερικό στρώμα με τον ενδοκυτταρικό σκελετό ενεργοποιώντας τα κατάλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια(outside-in signalling). Ταυτόχρονα όμως έχουν την δυνατότητα μέσω της αλληλεπίδρασης τους με κυτταροπλασματικά μόρια που ενεργοποιούνται από άλλα μονοπάτια, να αλλάζουν την στερεοδιαμόρφωση τους, ρυθμίζοντας έτσι την συγγένεια τους με τον εξωκυτταρικό προσδέτη(inside-out signaling).

Αυτή είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για τα κυκλοφορούντα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία πρέπει να μεταναστεύσουν γρήγορα στο σημείο της φλεγμονής. Σε αυτή την περίπτωση οι κυτταροκίνες/χυμοκίνες που παράγονται κατά την φλεγμονή επάγουν την ενεργοποιημένη μορφή των ιντεγκρινών, η οποία έχει αυξημένη συγγένεια με τον προσδέτη, με φυσικό επακόλουθο τα κύτταρα να μπορούν να προσδεθούν πιο αποτελεσματικά στο ενδοθήλιο και να μεταναστεύσουν στο σημείο της φλεγμονής γρηγορότερα.

Η πρόσδεση του συνδέτη στις ιντεγκρίνες οδηγεί σε ενεργοποίηση ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφική ενεργοποίηση, ανάλογα πάντα με τον κυτταρικό τύπο και το είδος του σήματος.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται καθοδικά των ιντεγκρινών περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την ενεργοποίηση των κινάσων της οικογένειας MAP(mitogen activated protein kinase/MAPK proteins) δηλαδή τις κινάσες p38, ERK1/2 και JNK. Επιπλέον οι ιντεγκρίνες φαίνεται ότι επάγουν δραματικά και την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων όπως TNF- α , IL-1 β , reactive oxygen intermediates και IL-8 in vitro[44,45-48].

Ενας εύλογος μηχανισμός για την παραγωγή αυτών των παραγόντων είναι μέσω της ενεργοποίησης πλεοτροπικών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF- κ B. Ο NF- κ B αποτελεί έναν σημαντικό υποψήφιο μιας και η ενεργοποίησή του είναι γνωστό ότι επηρεάζει ένα μεγάλο εύρος γονιδίων που απαντούν κατά την φλεγμονή συμπεριλαμβανομένων των TNF- α , ILs, χυμοκίνες και αυξητικών παραγόντων(CSFs) [49-52,53,54].

Ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης του NF- κ B μέσω των ιντεγκρινών δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη αλλά σημαντικός φαίνεται ότι είναι ο ρόλος των κινάσων Syk και PI3K (55,56,57). Επιπλέον κάποιες ιντεγκρίνες(π.χ Mac) φαίνεται ότι χρησιμοποιούν μόρια όπως IRAK1, TRAF6, και TAK1(TGF β -activated kinase) που μέχρι τώρα εμπλέκονταν στην ενεργοποίηση του NF- κ B μέσω του υποδοχέα Toll/IL1 [58].

Η λειτουργία των ιντεγκρινών είναι πολύ σημαντική σε κύτταρα όπως ουδετερόφιλα και μακροφάγα τα οποία εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση. Οι ιντεγκρίνες που εκφράζουν τα ουδετερόφιλα είναι κυρίως β 1, β 2, β 3 όπως παρουσιάζονται και στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Οι ιντεγκρίνες που εκφράζονται από ουδετερόφιλα και μακροφάγα αποτελούνται κυρίως από τις $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ υπομονάδες και έχουν ειδικότητα για διαφορετικούς συνδέτες (Cell. Signal. Vol. 11, No. 9, pp. 621–635, 1999)

Integrins	Ligands
$\beta 1$	
$\alpha 4/\beta 1$ (CD49d/CD29; VLA-4)	Fibronectin, VCAM-1 (CD106)
$\alpha 5/\beta 1$ (CD49e/CD29; VLA-5)	Fibronectin
$\alpha 6/\beta 1$ (CD49f/CD29; VLA-6)	Laminin
$\beta 2$	
$\alpha L/\beta 2$ (CD11a/CD18; LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha M/\beta 2$ (CD11b/CD18; CR3; Mac-1)	ICAM-1, ICAM-2, C3bi, Fibrinogen, Factor X, High molecular weight kinogen, Filamentous hemagglutinin of <i>bordetella pertussis</i> , lipophosphoglycan and gp63 of <i>leishmania mexicana</i> , Histoplasma capsulatum, Lipopolysaccharide, β -glucan, Heparin, Neutrophil inhibitory factor (NIF), Oligodeoxynucleotides, Elastase
$\alpha x/\beta 2$ (CD11c/CD18; gp150/95)	Fibrinogen, Lipopolysaccharide, C3bi
$\alpha D/\beta 2$ (CD11d/CD18)	ICAM-3
$\beta 3$	
$\alpha v/\beta 3$ (CD51/CD61)	Vitronectin, Entactin and other RGD- and KGAGDV containing ECM proteins

Η σηματοδότηση μέσω αυτών των ιντεγκρινών στα ουδετερόφιλα και στα μακροφάγα είναι κρίσιμη για λειτουργίες όπως η προσκόλληση, η παραγωγή κυτταροκινών και αντιμικροβιακών παραγόντων, ο χημειοτακτισμός και η μετανάστευση(43). Τέτοιου είδους λειτουργίες είναι απαραίτητες για την έγκαιρη μετανάστευση αυτών των κυττάρων στα σημεία της φλεγμονής.

Πράγματι, ελαττωματικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις συμβαίνουν όταν οι ιντεγκρίνες δεν ενεργοποιούνται σωστά όπως έχει δείχθει σε ποντίκια με γονιδιακή απαλοιφή συγκεκριμένων τύπων ιντεγκρινών όπως με γενετική ανεπάρκεια της $\beta 2$ αλυσίδας της ιντεγκρίνης κατι που τελικά οδηγεί σε οξείες βακτηριακές μολύνσεις λόγω ελαττωματικής ανοσολογικής απόκρισης.

Τέλος, η σηματοδότηση μέσω διαφόρων τύπων ιντεγκρινών, είναι κρίσιμη για την διεξαγωγή των διαδικασιών χημειοτακτισμού και παραγωγής διαφόρων κυτταροκινών σε πολλές περιπτώσεις φλεγμονωδών/αυτοάνοσων νοσημάτων. Επομένως, η ορθή ενεργοποίηση και σηματοδότηση του μονοπατιού των ιντεγκρινών είναι ζωτικής σημασίας για την ορθή λειτουργία και τον συντονισμό της ανοσολογικής και φλεγμονώδους απόκρισης.

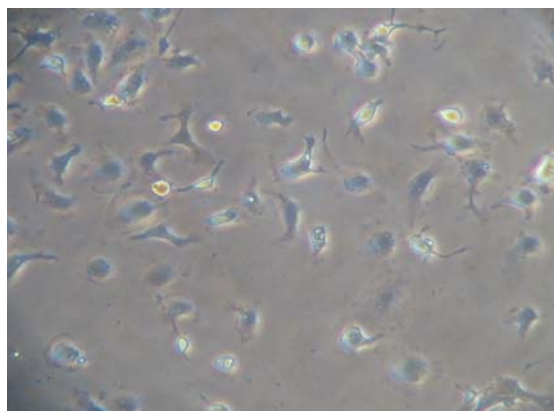
2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ- ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Σε αυτή την εργασία θα μελετηθεί εάν η κινάση Trp2 εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών. Ειδικότερα θα εξεταστεί εάν η έλλειψη της Trp2 μπορεί να επηρεάζει λειτουργίες των μακροφάγων όπως είναι η προσκόλληση, μετανάστευση, διαφοροποίηση και παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών και χυμοκινών μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού των ιντεγκρινών. Στην συνέχεια θα αποσαφηνιστεί (εν μέρη)ο ρόλος της Trp2 στο πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης που ενεργοποιείται από τις ιντεγκρίνες διερευνώντας κάποια μόρια που εμπλέκονται ανοδικά και καθοδικά από αυτήν.

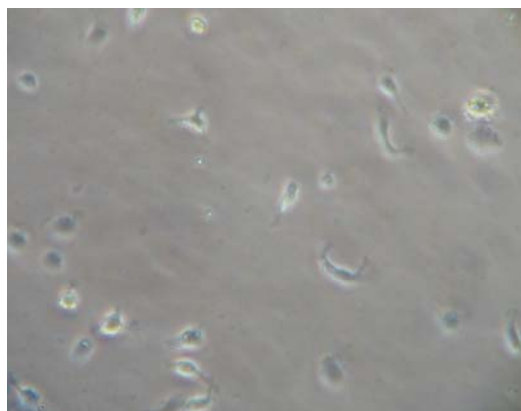
Υπόθεση Εργασίας:

Η παρατήρηση ότι τα μακροφάγα με γονιδιακή απαλοιφή της Trp2-/- προσκολλούνται λιγότερο σε σύγκριση με τα wt κύτταρα σε επιφάνεια τριβλίου, μας έδωσε το ερέθισμα να υποθέσουμε ότι η Trp2 ευθύνεται για την ελαττωματική λειτουργία των ιντεγκρινών. Η έλλειψη της Trp2, δεν επηρεάζει την έκφραση των ιντεγκρινών στα μακροφάγα όπως έδειξαν τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, επομένως υποθέτουμε ότι η Trp2 εμπλέκεται σε κάποιο από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τα μόρια των ιντεγκρινών.

WT C57BL/6



Trp2-/-



Η εικόνα που παρουσιάζουν τα μακροφάγα μυελού των οστών(BMDMs) όταν επιστρώνονται σε τρυβλία:

Είναι εμφανής η ελαττωματική προσκόλληση των Trp2-/- μακροφάγων στο τρυβλίο, σε σύγκριση με τα μακροφάγα αγρίου τύπου/wt.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ:

3.1 Κυτταρικές καλλιέργειες:

3.1.1 Διαφοροποίηση μακροφάγων από πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών (BMDMs-Bone Marrow Derived Macrophages).

Μονοπύρηννα κύτταρα μυελού των οστών απομονώνονται από μηριαίο οστό και οστό κνήμης ποντικού. Ο μυελός ξεπλένεται με PBS και τελικά εξέρχεται από τα οστά με χρήση βελόνας διαμέτρου 18G και σύριγγα των 20ml. Τα συσσωματώματα κυττάρων επαναδιαλύονται με πιπετάρισμα μέσω της σύριγγας και τα κύτταρα επιστρώνονται σε φλάσκα εμβαδού 175 cm² και καλλιεργούνται για επτά ημέρες σε θρεπτικό μέσο DMEM/10%FBS εμπλουτισμένο με 20% LCM(L-conditioned medium)*. Την έβδομη μέρα της καλλιέργειας τα προσκολλημένα κύτταρα αποτελούν τον πληθυσμό μακροφάγων που χρησιμοποιούνται στις μετέπειτα πειραματικές δοκιμασίες(περίπου το 80% των προσκολλημένων κυττάρων στη φλάσκα είναι μακροφάγα). Τα προσκολλημένα κύτταρα απομονώνονται και επαναδιαλύονται σε νέο θρεπτικό DMEM/10%FBS σε συγκέντρωση 10⁶ κύτταρα/ml για να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα πειραματικές δοκιμασίες.

*LCM(L-conditioned medium):θρεπτικό πλούσιο στον αυξητικό παράγοντα MCSF που παράγεται μετά από κάλλιέργεια της κυτταρικής σειράς ινοβλαστών L929.

3.1.2 Απομόνωση περιτοναϊκών μακροφάγων από ποντίκια(PEMs-Peritoneal Elicited Macrophages).

Τα περιτοναϊκά μακροφάγα συσσωρεύονται στο περιτόνιο ποντικού 3-4 μέρες μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση 2ml θειογλυκολικού 2%. Την τέταρτη ημέρα το ποντίκι θυσιάζεται και η περιτοναϊκή κοιλότητα ξεπλένεται με HBSS. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και επαναιωρούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ορρό. Στη συνέχεια επιστρώνονται σε φλάσκα και επωάζονται για δύο ώρες στους 37°C. Τα προσκολλημένα κύτταρα απομονώνονται και επανδιαλύονται σε φρέσκο θρεπτικό DMEM/10%FBS σε συγκέντρωση 10⁶ κύτταρα/ml για να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα πειραματικές δοκιμασίες.

3.1.3 Απομόνωση ανθρώπινων μονοκυττάρων από περιφερικό αίμα.

Περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) απομονώνονται με φυγοκέντρηση κλίσης (gradient centrifugation) ηπαρινισμένου δείγματος σε κλινές φικόλης. Συγκεκριμένα, μετά από αραιώση 1:1 του δείγματος σε HBSS ακολουθεί στοιβαδοποίησή του σε 1/3 όγκο φικόλης μέσα σε σωληνάριο χωρητικότητας 15 ml και φυγοκέντρηση σε 1750 στροφές / λεπτό για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 20°C. Εν συνεχεία απομονώνεται η κυτταρικής μεσόφαση με τη χρήση πιπέτας Pasteur σε falcon χωρητικότητας 50 ml και 2 πλυσίματα με προσθήκη 5 όγκων HBSS και φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Ακολουθεί επαναιώρηση της πελέτας σε 5 ml διαλύματος HBSS και μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο. Τα μονοκύτταρα απομονώνονται από τα υπόλοιπα μονοπύρρηνα με τη μέθοδο ανοσομαγνητικού διαχωρισμού χρησιμοποιώντας το σύστημα μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού (high gradient magnetic cell separation system MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα με χρήση hMCSF σε τελική συγκέντρωση 10ng/ml . Την επόμενη μέρα τα διαφοροποιημένα μακροφάγα επαναδιαλύονται σε φρέσκο θρεπτικό RPMI /10%FBS σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml για να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα πειραματικές δοκιμασίες.

3.1.4 Διέγερση των μακροφάγων (BMDMs και PEMs) με διεγέρτες και αναστολείς .

Τα μακροφάγα επιστρώνονται σε τρυβλία σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml και διεγείρονται με διεγέρτες στις κατάλληλες τελικές συγκεντρώσεις:

polyRGD-προσδέτης ιντεγκρινών(Sigma): 10ng/ml

LPS(Invivogen): 10ng/ml

PMA: 1μg/ml

MCSF(Peprotech): 10ng/ml

IFNα A/D(PBL): 10^3 u/ml

IFNγ(Peprotech): 10ng/ml

IL-10(Peprotech): 10ng/ml

Σε περίπτωση χρήσης αναστολέων, τα μακροφάγα επωάζονται με τον αναστολέα 30 λεπτά πριν την διέγερση τους με τους διεγέρτες που προαναφέραμε. Ο αναστολέας που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι ο αναστολέας της Trl2(Calbiochem) και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 5μM.

Τα μακροφάγα διεγείρονται με τους διεγέρτες που αναφέραμε για τριάντα λεπτά αν πρόκειται να απομονωθεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα για να διεξαχθεί Western, για 3h αν πρόκειται να γίνει απομόνωση RNA , και για 18-24h στην περίπτωση που είτε τα κύτταρα θα χρησιμοποιηθούν κυτταρομετρία ροής είτε θα γίνει δοκιμασία Elisa από το υπερκείμενο τους.

3.2 Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (*whole cell extracts*) από κύτταρα.

Τα κύτταρα πριν τη συλλογή τους ξεπλένονται τρεις φορές με 1XPBS(KCl 0.2gr/lit, KH₂PO₄ 0.2gr/lit, NaCl 8.00gr/lit, Na₂HPO₄ 1.15gr/lit pH 7.4) και στη συνέχεια αποκολλώνται από το τρυβλίο με την βοήθεια ειδικού εργαλείου προσεκτικά χωρίς ποσοτικές απώλειες και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 3.000rpm στους 4°C. Προσεκτικά απομακρύνουμε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης (Ripa buffer) το οποίο προκαλεί ρηξη των κυτταρικών και των πυρηνικών μεμβρανών. Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση στους 4°C στις 14.000rpm για 15 λεπτά προκειμένου να διαχωριστεί το διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το γενωμικό DNA και τα μεμβρανικά τμήματα που καθιζάνουν. Μετά τη φυγοκέντρηση, το διαλυτό υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

3.3 Ανάλυση κατά *Western*(*Western blot*).

Σε κατάλληλη ποσότητα ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος προσθέτουμε ίσο όγκο 2XSDS loading buffer(100 mM Tris, 200 mM DTT, 4% SDS 0.2% Bromophenol blue, 20% glycerol) και βράζουμε το δείγμα για 5 λεπτά. Οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά αρχικά στα 60 volt(stacking gel/πήκτωμα συμπύκνωσης) και κατόπιν στα 80-120 volt (separating gel/διαχωριστικό πήκτωμα), σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης διπλής σύστασης. (πήκτωμα συμπύκνωσης: 5% polyacrylamide, 0,125 M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% ammonium persulfate, πολυμερισμός με TEMED) και διαχωριστικό πήκτωμα: 10% polyacrylamide, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% ammonium persulfate, πολυμερισμός με TEMED. Αρχικά το δείγμα «συμπυκνώνεται» διερχόμενο από τη στρώση του αραιότερου stacking gel (4%) και εν συνεχεία οι περιεχόμενες πρωτεΐνες διαχωρίζονται στο πυκνότερο Separating gel (6-15% ανάλογα με την επιθυμητή διαχωριστική κλίμακα μεγεθών). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες του πήκτωματος μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά γίνεται σε ειδική συσκευή της Biorad σε transfer buffer(20% methanol, 24mM Tris, 192 mM glycine) στους 4 °C για μία ώρα σε 350 mA. Στο ίδιο διάλυμα διαποτίζονται τα ειδικά σφουγγάρια τα οποία τοποθετούμε στις πλάκες της συσκευής και τα χαρτόνια Whatman στα οποία επανατοποθετούμε την μεμβράνη και το πήκτωμα σχηματίζοντας «sandwich» (αποφεύγουμε τη δημιουργία φυσαλίδων-κενών αέρα που εμποδίζουν την μεταφορά). Μετά το πέρας της μίας ώρας γίνεται αναστρέψιμη χρώση της μεμβράνης σε διάλυμα Ponceau S (0,1% Ponceau S (Merck), 5% οξικό οξύ) για την εξακρίβωση της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών, ακολουθούμενη από απομάκρυνση της χρωστικής με πλύσεις με TBST (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 ml/ L Tween-20). Κατόπιν γίνεται επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα

προϋβριδοποίησης (TBST-5% w/v άπαχο ξηρό γάλα) για 1-16 ώρες. Ακολουθούν 4 πλύσεις των 15 λεπτών με TBST και η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα-κατά της πρωτεΐνης που πρόκειται να ανιχνευθεί- σε κατάλληλη αραιώση(σε TBST-1% w/v άπαχο ξηρό γάλα) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 4 πλύσεις των 15 λεπτών σε TBST για την απομάκρυνση του μη ειδικά συνδεδεμένου καθώς και της περίσσειας του ελεύθερου αντισώματος ακολουθεί επώαση με δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit, anti-goat, or anti-mouse –horseradish peroxidase-conjugated IgG) στη κατάλληλη αραιώση (σε TBST-1% άπαχο ξηρό γάλα) για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 4 πλύσεις με TBST για 15 λεπτά και ταυτοποίηση της χημειοφωταύγειας των ζητούμενων πρωτεϊνών με τη χρήση ECL (thermo-science) και τέλος έκθεση σε φωτογραφική πλάκα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: p-ERK(Sigma), p-p38(Cell signaling), p-JNK(Cell signaling), ERK(Cell signaling), p38(Cell signaling), IκB-a (Cell signaling), pY-STAT1(Cell signaling), pY STAT3(Cell signaling), STAT1(BD Bioscience), STAT3(BD Bioscience).

3.4 Απομόνωση ολικού RNA(*total RNA*) από κύτταρα.

Τα μόρια του RNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αποικοδόμησή τους και επιπλέον οι ριβονουκλεάσες είναι άφθονες στα χέρια, τα μαλλιά, τα ρούχα μας και κατά συνέπεια σε οτιδήποτε ακουμπάμε. Για αυτό το λόγο κατά την «συναναστροφή» μας με το συγκεκριμένο μόριο θα πρέπει να τηρούμε όλες τις απαραίτητες προφυλάξεις. Τα υλικά που χρησιμοποιούμε(πιπέτες,tips,falcon) είναι συσκευασμένα και τα γυαλικά είναι πλυμένα με DEPC απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό και έχουν αποστειρωθεί σε κλίβανο για 1 ώρα. Όλα τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε πειράματα RNA αποθηκεύονται σε καθαρό μέρος μόνα τους. Απαραίτητο είναι να χρησιμοποιούνται γάντια τα οποία θα αλλάζονται συχνά. Στην παρούσα εργασία απόμονώσαμε RNA από μακροφάγα ποντικών τα οποία είχαν μπει σε καλλιέργεια. Τα κύτταρα ξεπλένονται 2-3 φορές με 1XPBS και στη συνέχεια συλλέγονται και φυγοκεντρούνται στις 1500 στροφές/λεπτό, για 10 λεπτά. Ακολουθεί επαναιώρησή τους σε 0,750 ml Trizol (5-10 x 10⁶ κύτταρα/0,750 ml Trizol) το οποίο περιέχει μείγμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης και φαινόλης. Τα κύτταρα παραμένουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία προστίθενται 0,2 ml χλωροφόρμιο. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με το χέρι (για 15 δευτερόλεπτα) και το δείγμα μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ακόμη λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση τους δείγματος στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 15 λεπτά. Αποτέλεσμα αυτής της φυγοκέντρωσης είναι ο διαχωρισμός του δείγματος σε 3 φάσεις: μία κατώτερη, οργανική φάση (κόκκινου χρώματος) που περιέχει τις πρωτεΐνες, τη μεσόφαση που περιέχει το DNA και μία άχρωμη υδατική φάση, που περιέχει το RNA. Η υδατική αυτή φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, όπου προστίθενται 500 ml ισοπροπανόλης προκειμένου να επιτευχθεί η κατακρήμνιση του RNA και ακολουθεί παραμονή του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Εν συνεχεία το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 15 λεπτά και

αφαιρείται το υπερκείμενο. Η πελέτα ξεπλένεται σε 1 ml αιθανόλης 75% με φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, η πελέτα που περιέχει το RNA αφήνεται να στεγνώσει για 10 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επαναιωρείται σε 50 µl ελεύθερου από RNase νερού. Ακολουθεί θέρμανση του δείγματος για 5 λεπτά στους 65°C προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη διάλυση του RNA. Ο προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA γίνεται με τη χρήση του μετρητή nanodrop.

3.5 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Πρόκειται για μέθοδο μετατροπής του mRNA σε συμπληρωματικό DNA προκειμένου αυτό στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την εκλεκτική ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων (αντίδραση PCR).

Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει: 1 µg ολικού RNA, 1 µl (100 ng) εκκινητή –εν προκειμένω τυχαίων εξαμερών- και επεξεργασμένου με DEPC H₂O έτσι ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 9 µl. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή με την επώαση του δείγματος μέσα στο θερμικό κυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65°C και με άμεση ψύξη στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να αναστείλουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Εν τω μεταξύ προετοιμάζεται το κύριο μείγμα της αντίδρασης το οποίο περιέχει 4 µl cDNA buffer (5x), 1 µl DTT, 1 µl RNase OUT, 1 µl DEPC treated H₂O, 2 µl dNTPs και 1 µl (15 U) ενζύμου Thermoscript(Thermoscript RT kit -Invitrogen). Το παραπάνω δείγμα προστίθεται στο αρχικό. Ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά στους 50°C, οπότε πραγματοποιείται υβριδοποίηση του εκκινητή με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων και ενεργοποίηση της ανάστροφης μεταγραφής. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος στους 85°C για 5 λεπτά, οπότε τα υβρίδια αποδιατάσσονται και η ανάστροφη μεταγραφή απενεργοποιείται. Ακολουθεί προσθήκη 1 µl RNase και επώαση στους 37°C για 20 λεπτά προκειμένου να καταστραφεί τυχόν εναπομείνασα ποσότητα RNA. Το cDNA φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

Εκτός του cDNA που προκύπτει από τα άγνωστα υπό μελέτη δείγματα, με την ίδια μέθοδο δημιουργείται και ένα σταθερό “πρότυπο/standard” cDNA από κύτταρα τα οποία εκφράζουν το γονίδιο που μελετάται –στην προκειμένη περίπτωση πρόκειται για RNA από κύτταρα τα οποία έχουν διεγερθεί με LPS, το οποίο είναι σταθερό για όλες τις αντιδράσεις real time PCR που θα ακολουθήσουν, και χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνουν και να κανονικοποιηθούν οι καμπύλες ενίσχυσης σε κάθε πείραμα.

3.6 Ημιποσοτική PCR (real time PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) διεξάγεται μέσα σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή (ABI-Prism 7000 Real time PCR). Στην περίπτωση αυτή το dsDNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί στο τέλος του κάθε κύκλου. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια ενός παράγοντα σύνδεσης στο DNA (DNA-binding agent), που εν προκειμένω είναι η SYBR green η οποία έχει την ιδιότητα να εντίθεται μη ειδικά στο dsDNA, αλλά όχι στο μονόκλωνο DNA.

Το cDNA που έχει προκύψει από την αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription), αραιώνεται 10 φορές σε νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC). 5 μl αραιωμένου δείγματος χρησιμοποιούνται ως μήτρα για κάθε αντίδραση PCR. Το cDNA επωάζεται παρουσία του ζεύγους εκκινήτων για το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, μείγματος dNTPs, διαλύματος MgCl₂, ρυθμιστικού διαλύματος PCR, SYBR green και ROX στις κατάλληλες κάθε φορά συνθήκες.

Η ποσοτικοποίηση του προϊόντος του γονιδίου στόχου απαιτεί την κανονικοποίηση του λαμβανόμενου σήματος προς το σήμα ενός ενδογενούς γονιδίου μάρτυρα που είναι ένα καθολικά εκφραζόμενο γονίδιο του οποίου ο ρυθμός μεταγραφής δεν επηρεάζεται από την επίδραση των ενεργοποιητών που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση. Στην προκειμένη περίπτωση το γονίδιο αυτό είναι η ακτίνη, μια πρωτεΐνη του κυττροσκελετού. Προκειμένου να γίνει η σχετική ποσοτικοποίηση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, για κάθε δείγμα γίνεται ταυτόχρονα ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου και του γονιδίου-μάρτυρα. Στη συγκεκριμένη εργασία για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου χρησιμοποιείται ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη μεθοδολογία σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification) με χρήση καμπύλης αναφοράς (standard curve). Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς τόσο για το γονίδιο-στόχο όσο και για το γονίδιο αναφοράς, ενισχύονται με PCR ταυτόχρονα με τα άγνωστα δείγματα και διαδοχικές γνωστές αραιώσεις ενός δείγματος που είναι θετικό για την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου (στην προκειμένη περίπτωση πρόκειται για cDNA που απομονώθηκε από μακροφάγα τα οποία έχουν διεγερθεί με LPS). Για κάθε δείγμα, η κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου στόχου ορίζεται ως ο λόγος της σχετικής ποσότητας του γονιδίου στόχου προς τη σχετική ποσότητα του γονιδίου αναφοράς.

Τα παραπάνω γίνονται με τη χρήση του λογισμικού του ABIprism 7000 για τη δημιουργία καμπυλών και τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας μεταγράφων και μεταφορά των αποτελεσμάτων σε μία βάση δεδομένων Excel όπου επιτυγχάνεται αυτοματοποίηση των μαθηματικών πράξεων.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

mTNF

F: 5' ATGAGCACAGAAAGCATGATC 3'

R: 5' TAGAGGCTTGTCACCTCGAATT

mMCP1

F: 5' AGGTCCCTGTCATGCTTCTG

R: 5' TGGGATCATCTTGCTGGTG

mRANTES

F: 5' GCCCACGTCAAGGAGTATTTCTA

R: 5' ACACACTTGGCGGTTCCCTTC

mCOX-2

F: 5' TCCTCACATCCCTGAGAACC 3'

R: 5' AAGTGGTAACCGCTCAGGTG 3'

m B-actin

F: 5' AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA 3'

R: 5' TGTATGAAGGCTTTGGTCTCCCT 3'

mMIP-1a

F: 5' ACTGCCTGCTGCTTCTCCTACA 3'

R: 5' AGGAAAATGACACCTGGCTGG 3'

mMIP-1b

F: 5' AAACCTAACCCCGAGCAACA 3'

R: 5' CCATTGGTGCTGAGAACCCT 3'

mSOCS3

F: 5' CACTCTTCAGCATTCTCTGTCGGAAG 3'

R: 5' CATAGGAGTCCAGGTGGCCGTTGAC 3'

IL12p40

F: 5' GCTCAGGATCGCTATTACAATTCC 3'

R: 5' TCTTCCTTAATGTCTTCCACTTTTCTT 3'

IP-10

F: 5' CTGCAACTGCATCCATATCG 3'

R: 5' CAATGATCTCAACACGTGGG 3'

3.7 Δοκιμασία ELISA

Μακροφάγα διεγείρονται με τους διεγέρτες που προαναφέραμε(4.1.4) για 3-24h και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για δοκιμασία Elisa. Με τη χρήση κατάλληλων Elisa kit εξετάστηκαν τα επίπεδα έκκρισης των παρακάτω φλεγμονωδών παραγόντων σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας:

IP-10: Mouse CXCL10/IP-10(R&D systems)

TNF α : Mouse TNF(Mono/Mono) Elisa set(BD)
IL-10 : Mouse IL-10 Elisa set (BD)
IL-12p70 : Mouse IL-12(p70) Elisa set (BD)

3.8 Flow cytometry

Ποσότητα κυττάρων 5×10^5 επωάζεται με το κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα για επιφανειακές πρωτεΐνες ή με το αντίστοιχο ισοτυπικό αντίσωμα ελέγχου για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά από 2 πλύσεις σε διάλυμα PBS/FCS 1% γίνεται μονιμοποίησή τους σε 300 μl διαλύματος PBS/PFA 2%. Τα κύτταρα προσάγονται κατά 200.000-500.000 κυτταρικά γεγονότα (cellular events)/δείγμα στον κυττατομετρητή όπου και αναλύονται.

Για κάθε αντίσωμα που μελετάται και σε καθένα από τα δείγματα, γίνεται χρώση των κυττάρων και με το κατάλληλο ισοτυπικό αντίσωμα ελέγχου (isotype control, αντίσωμα της ίδιας υποτάξης με το προς μελέτη, χωρίς ειδικότητα για κάποια από τις κυτταρικές πρωτεΐνες) προκειμένου από τις αναλύσεις να αποκλειστούν τα κύτταρα που δεσμεύονται με μη ειδικό τρόπο.

Η επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται στο πρόγραμμα WinMDI 2.8.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τα πιο κάτω επιφανειακά μόρια: β 1(CD29) , β 2 (CD18), β 3(CD61) , CD11a , CD11b, CD51 F4/80, CD16/32, CD64, MHCII. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την BD Biosciences.

3.9 Δοκιμασία ικανότητας μετανάστευσης των κυττάρων σε τρύβλιο (Δοκιμασία επούλωσης(wound healing assay)).

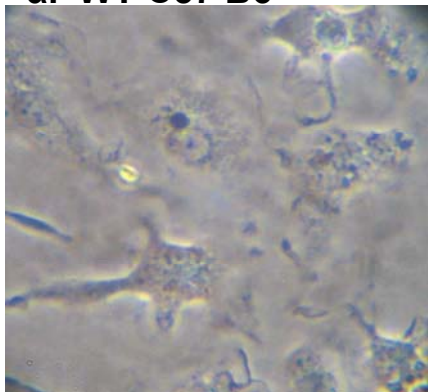
Τα BMDMs μακροφάγα(wt και Trp12 $^{-/-}$) επιστρώνονται και αφήνονται μέχρι να γεμίσουν την φλάσκα. Στη συνέχεια γίνεται απομάκρυνση κάποιων κυττάρων από συγκεκριμένο σημείο της φλάσκας(συγκεκριμένα με ένα ακρορύγχιο των 20μl προκαλείται μια μικρή εκδορά στην φλάσκα σε περιοχή όπου υπάρχουν πολλά κύτταρα). Τέλος παρατηρείται σε μικροσκόπιο η ικανότητα των κυττάρων που παρέμειναν στην φλάσκα να 'επουλώνουν' την απογυμνωμένη περιοχή. Η ικανότητα επούλωσης είναι ανάλογη με την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

4.1 Τα $Trp2^{-/-}$ μακροφάγα παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα προσκόλλησης σε προσδέτες ιντεγκρινών.

Για να καθοριστεί εάν η απουσία της $Trp2$ είναι απαραίτητη για την ικανότητα των μακροφάγων να προσκολλώνται σε προσδέτες ιντεγκρινών, μακροφάγα μυελού των οστών (BMDMs) από w^t (B6) και $Trp2^{-/-}$ ποντίκια επιστρώνονται σε τρυβλία επικαλυμμένα με το συνθετικό πεπτίδιο polyRGD (προσδέτης ιντεγκρινών $\beta 1, \beta 2, \beta 3$). Φωτογραφίες κυτταρικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι τα $Trp2^{-/-}$ μακροφάγα (εικόνα 6β) έχουν μειωμένο αριθμό ψευδοποδίων σε σύγκριση με τα w^t μακροφάγα (εικόνα 6α) και ανταποκρίνονται λιγότερο αποτελεσματικά στην προσκόλληση που επάγει ο συνδέτης ιντεγκρινών. Οι μορφολογικές ανωμαλίες που παρουσιάζουν τα $Trp2^{-/-}$ μακροφάγα σε απόκριση στο polyRGD ενοχοποιούν την $Trp2$ (άμεσα ή έμμεσα) στο μονοπάτι που ενεργοποιείται καθοδικά των ιντεγκρινών και είναι υπεύθυνο για την αναδιοργάνωση του κυττροσκελετού και την επέκταση των ψευδοποδίων.

α. WT C57 B6



β. $Trp2^{-/-}$

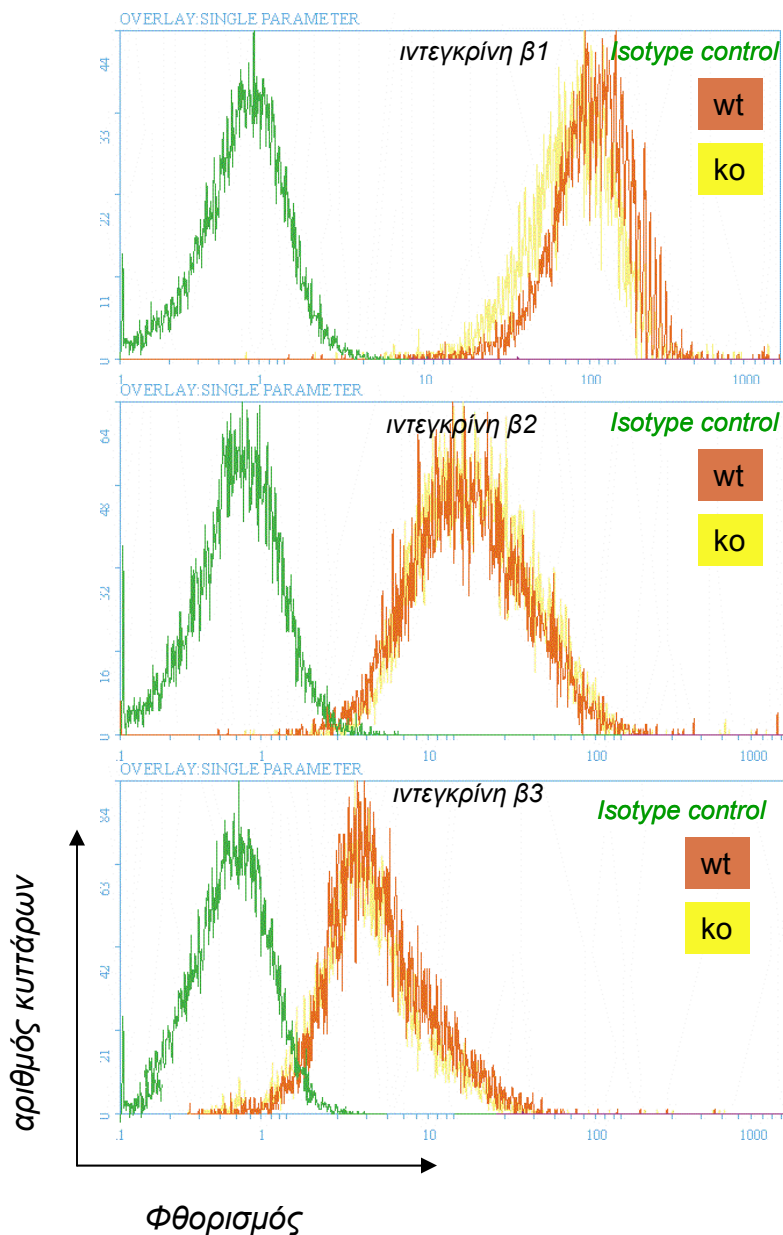


Εικόνα 6: Προσκόλληση των w^t και $Trp2^{-/-}$ μακροφάγων (BMDMs) σε τρυβλίο επιστρωμένο με polyRGD. Τα $Trp2^{-/-}$ μακροφάγα (εικόνα 6β) φαίνεται να παραμένουν πιο στρογγυλά και να προσκολλώνται λιγότερο αποτελεσματικά στο polyRGD σε σύγκριση με τα w^t μακροφάγα.

4.2 Η έλλειψη της *Trp2* δεν επηρεάζει την έκφραση των ιντεγκρινών στα μακροφάγα.

Για να μπορεί να γίνει αντικειμενική σύγκριση ανάμεσα στα σηματοδοτικά γεγονότα που συμβαίνουν καθοδικά των ιντεγκρινών στα wt και *Trp2*^{-/-} μακροφάγα, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων β1(CD29),β2(CD18),β3(CD61) σε wt και *Trp2*^{-/-} κύτταρα. Μελετήθηκαν αρχικά οι υπομονάδες (β1, β2, β3) γιατί είναι γνωστό ότι εκφράζονται κυρίως στα μακροφάγα και ευθύνονται για λειτουργίες των μακροφάγων όπως η προσκόλληση και η μετανάστευση.

Η κυτταρομετρία ροής έδειξε παρόμοια επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών αυτών σε wt και *Trp2*^{-/-} μακροφάγα(εικόνα 7). Γενικά, τα μακροφάγα(τόσο τα wt όσο και τα *Trp2*^{-/-}) φαίνεται ότι εκφράζουν τις υπομονάδες β1 και β2 σε αυξημένα επίπεδα ενώ η έκφραση της β3 είναι αρκετά χαμηλότερη.



Εικόνα 7: Τα *Trp2*^{-/-} μακροφάγα εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα των υπομονάδων β1,β2,β3. *Wt* και *Trp2*^{-/-} μακροφάγα(BMDMs) επωάζονται με μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές(PE,FITC) και στη συνέχεια αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Οι γραμμές με πορτοκαλί και κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα wt και *Trp2*^{-/-} κύτταρα αντίστοιχα. Με πράσινο χρώμα φαίνεται η μη ειδική χρώση των κυττάρων από τα μονοκλωνικά αντισώματα .

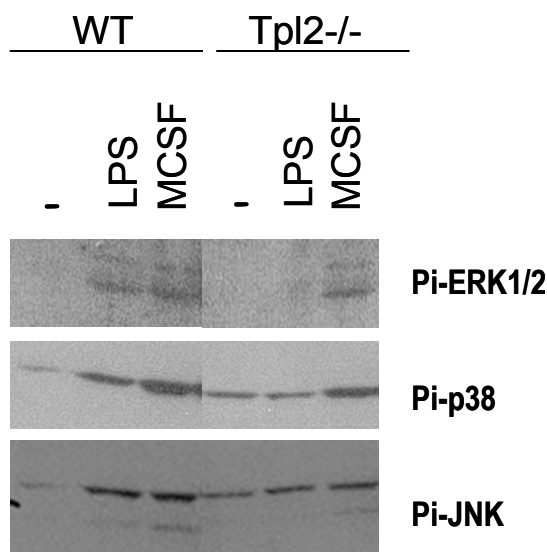
Επομένως η αδυναμία προσκόλλησης των *Trp2*^{-/-} μακροφάγων δεν οφείλεται στην προβληματική έκφραση των ιντεγκρίνων σε αυτά τα κύτταρα, αλλά στην συμμετοχή της *Trp2* σε κάποιο από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται καθοδικά των ιντεγκρινών.

4.3 Η έλλειψη της *Trp2* δεν επηρεάζει την διαφοροποίηση των μακροφάγων.

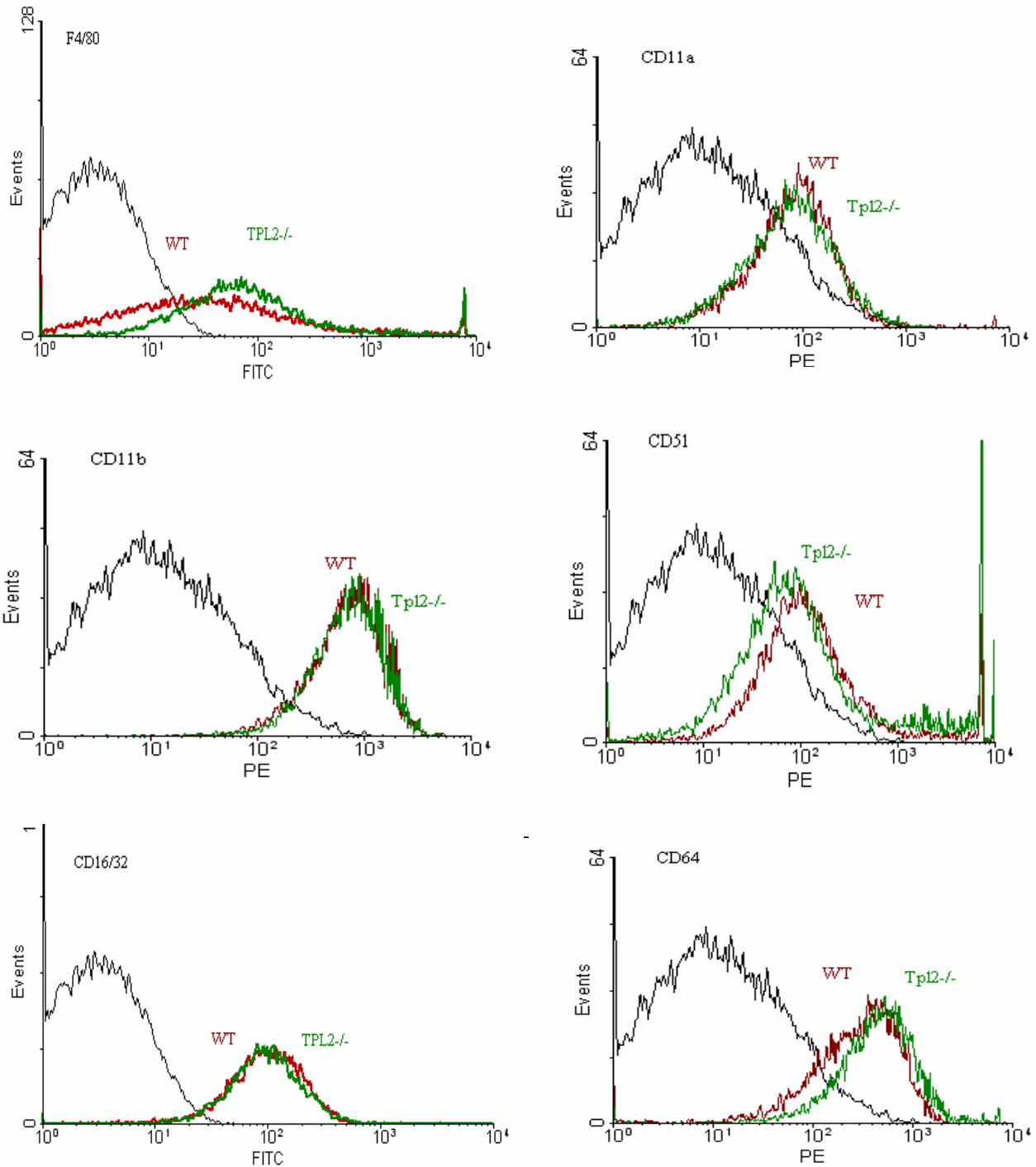
Ο επόμενος στόχος είναι να διευκρινιστεί ότι η *Trp2* δεν εμπλέκεται σε μονοπάτια διαφοροποίησης των μακροφάγων και επομένως οι μορφολογικές ανωμαλίες που παρουσιάζουν τα *Trp2*^{-/-} μακροφάγα δεν οφείλονται στην ελαττωματική διαφοροποίησή τους. Για τον σκοπό αυτό, μακροφάγα μυελού των οστών (BMDMs) διεγέρθηκαν με mMCSF και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργοποίηση της ERK, p38 και JNK (εικόνα 8). Το μονοπάτι διαφοροποίησης φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της *Trp2* αφού τόσο η ERK όσο η p38 και η JNK ενεργοποιούνται φυσιολογικά στα *Trp2*^{-/-} μακροφάγα (εικόνα 8).

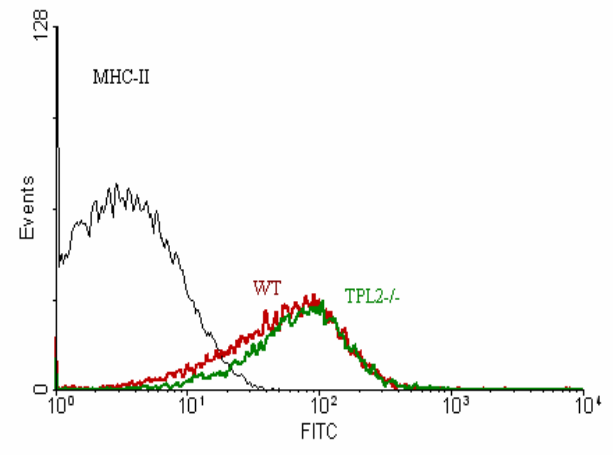
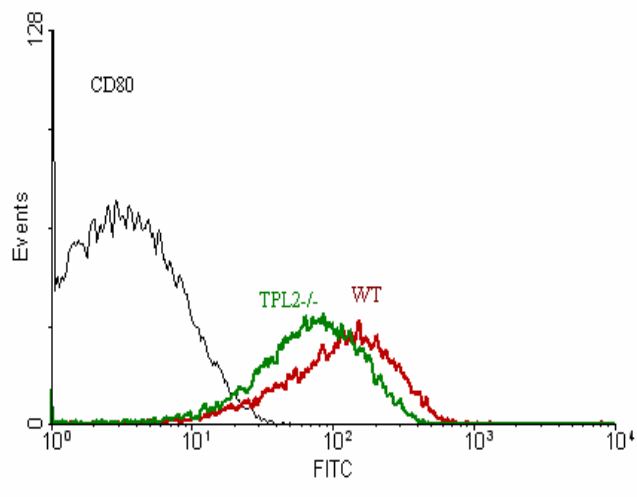
Επιπλέον μελετήθηκε η έκφραση διαφόρων επιφανειακών μορίων (F4/80, CD11a, CD11b, CD16/32, CD64, CD80, MHCII) που εκφράζονται στα ώριμα μακροφάγα. Στα *Trp2*^{-/-} μακροφάγα δεν διαπιστώθηκε κάποια διαφορά στην έκφραση τους σε σχέση με τα wt μακροφάγα (εικόνα 9).

Εικόνα 8 : Η ενεργοποίηση της ERK μετά από διέγερση με MCSF δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της *Trp2*, συγκρίνοντας την αξιοσημείωτη μείωση που παρατηρείται μετά από διέγερση με LPS. Μακροφάγα μυελού των οστών (BMDMs) από wt και *Trp2*^{-/-} ποντίκια διεγέρθηκαν με mMCSF και LPS (θετικός μάρτυρας) και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργοποίηση της ERK, p38 και JNK.



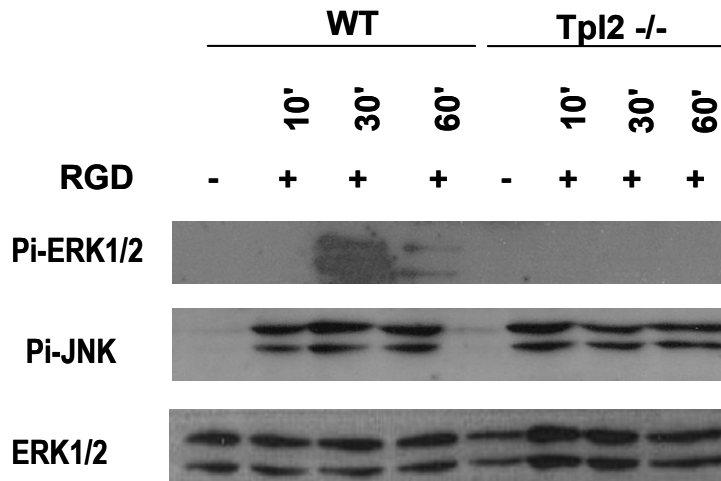
Εικόνα 9 : Η απώλεια της *Trp12* στα μακροφάγα δεν επηρεάζει την έκφραση των επιφανειακών μορίων που εκφράζονται στα ώριμα μακροφάγα όπως ο πανμακροφαγικός δείκτης *F4/80*, η ιντεγκρίνη *LFA1-alpha*(*CD11a*), α_M (*CD11b*) και *CD51* καθώς επίσης υποδοχείς και συνδιεγερτικά μόρια όπως *CD16/32*(*FcγR11/III*), *CD64*, *CD80* και *MHCII*. Με κυτταρομετρία ροής και χρήση μονοκλωνικών φθορίζοντων αντισωμάτων αναλύθηκε η έκφραση αυτών των μορίων σε *BMDMs*. Στα παρακάτω ιστογράμματα αναπαρίστανται η έκφραση τους σε *wt* και *Trp12*^{-/-} μακροφάγα, με κόκκινο και πράσινο χρώμα αντίστοιχα.



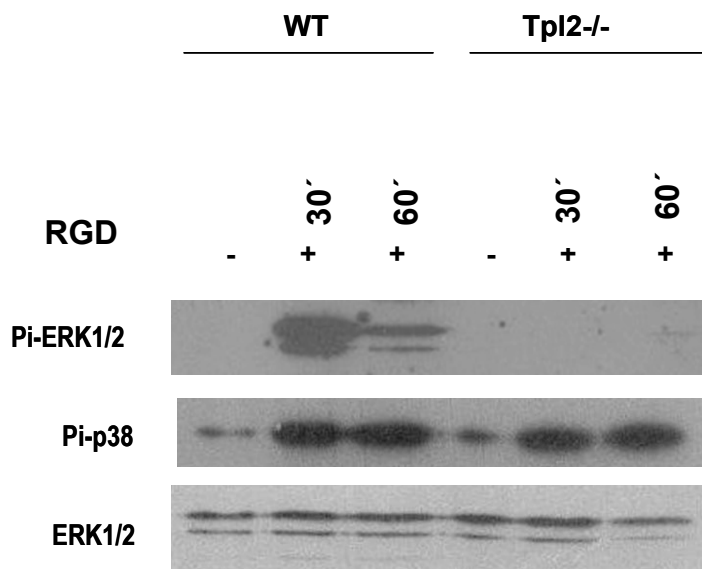


4.4 Η Trp2 απαιτείται για την ενεργοποίηση της ERK κατά την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών στα μακροφάγα ποντικών.

Για να επιβεβαιωθεί η επίδραση που έχει η απώλεια της Trp2 στην σηματοδότηση καθοδικά των ιντεγκρινών, εξετάστηκε η ενεργοποίηση των κινασών MAPK(ERK, p38, JNK) μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού των ιντεγκρινών σε wt και Trp2^{-/-} μακροφάγα. Για το σκοπό αυτό μακροφάγα μελοού των οστών(BMDMs) αλλά και περιτοναϊκά μακροφάγα(PEMs) από wt και Trp2^{-/-} ποντίκια επιστρώνονται σε επιφάνειες επικαλυμμένες με polyRGD για τριάντα λεπτά. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα απομονώνεται και αναλύεται με ανοσοποτύπωση τύπου Western για την ενεργοποίηση των κινασών MAPK. Η ενεργοποίηση των κινασών ERK, p38 και JNK στα wt μακροφάγα είναι φανερή(εικόνα 10α,β) και αναμενόμενη. Ωστόσο στα Trp2^{-/-} μακροφάγα η ενεργοποίηση της κινάσης ERK μειώνεται δραματικά(σχεδόν καταργείται-εικόνα 10α,β) ενώ η ενεργοποίηση των κινασών JNK(εικόνα 10α) και p38(εικόνα 10β) δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της Trp2. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν αφενός την συμμετοχή της Trp2 στο μονοπάτι των ιντεγκρινών και αφετέρου την ειδικότητα της δράσης της για την ERK.



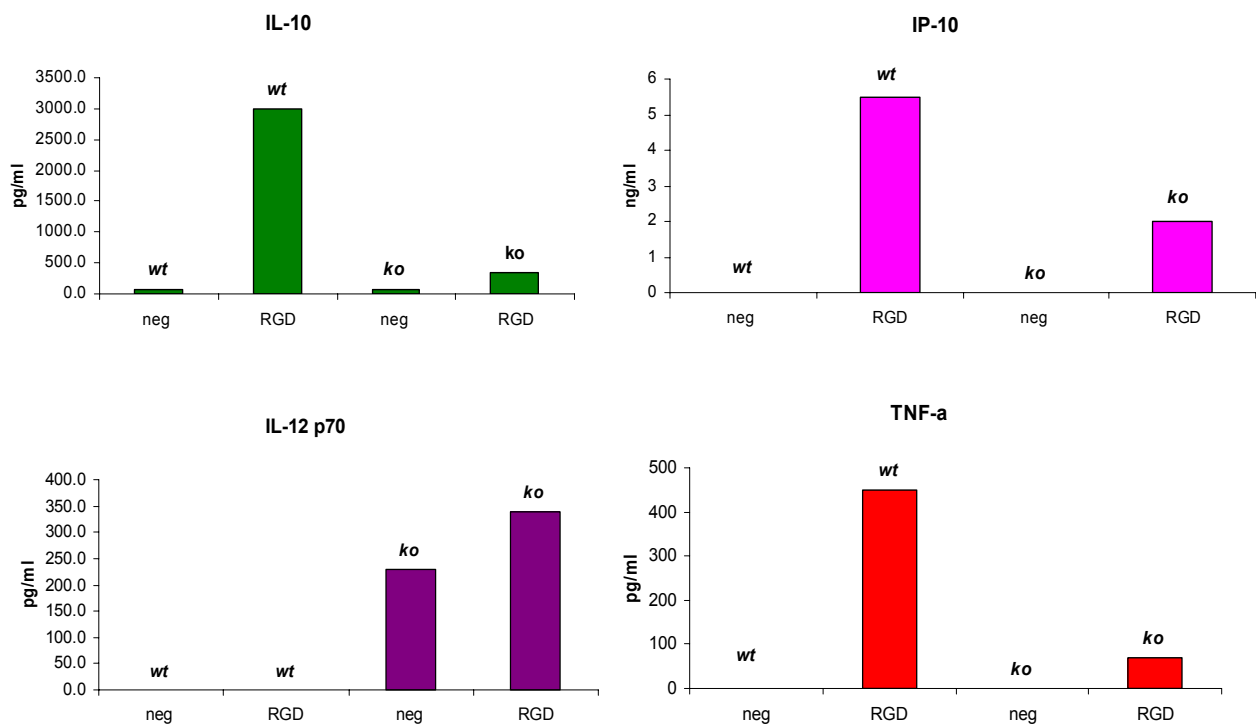
Εικόνα 10α : Η ενεργοποίηση της ERK καταργείται στα Trp2^{-/-} μακροφάγα μετά από διέγερση με pRGD. Η ενεργοποίηση της JNK δεν επηρεάζεται από την απώλεια της Trp2. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από wt και Trp2^{-/-} μακροφάγα αναλύονται με ανοσοαποτύπωση τύπου western. Η μεμβράνη υβριδοποιείται αρχικά με αντι-pERK, pp38, α-ERK. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων.



Εικόνα 10β : Η ενεργοποίηση της ERK μπλοκάρεται στα Trp2^{-/-} μακροφάγα μετά από διέγερση με pRGD. Ωστόσο η ενεργοποίηση της p38 δεν επηρεάζεται από την απώλεια της Trp2. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από wt και Trp2^{-/-} μακροφάγα αναλύονται με ανοσοαποτύπωση τύπου western. Η μεμβράνη υβριδοποιείται με αντι-pERK, pJNK, α-ERK. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων.

4.5 Παραγωγή κυτοκινών και χυμοκινών στα *Trl2* *-/-* μακροφάγα μετά από ενεργοποίηση των ιντεγκρινών.

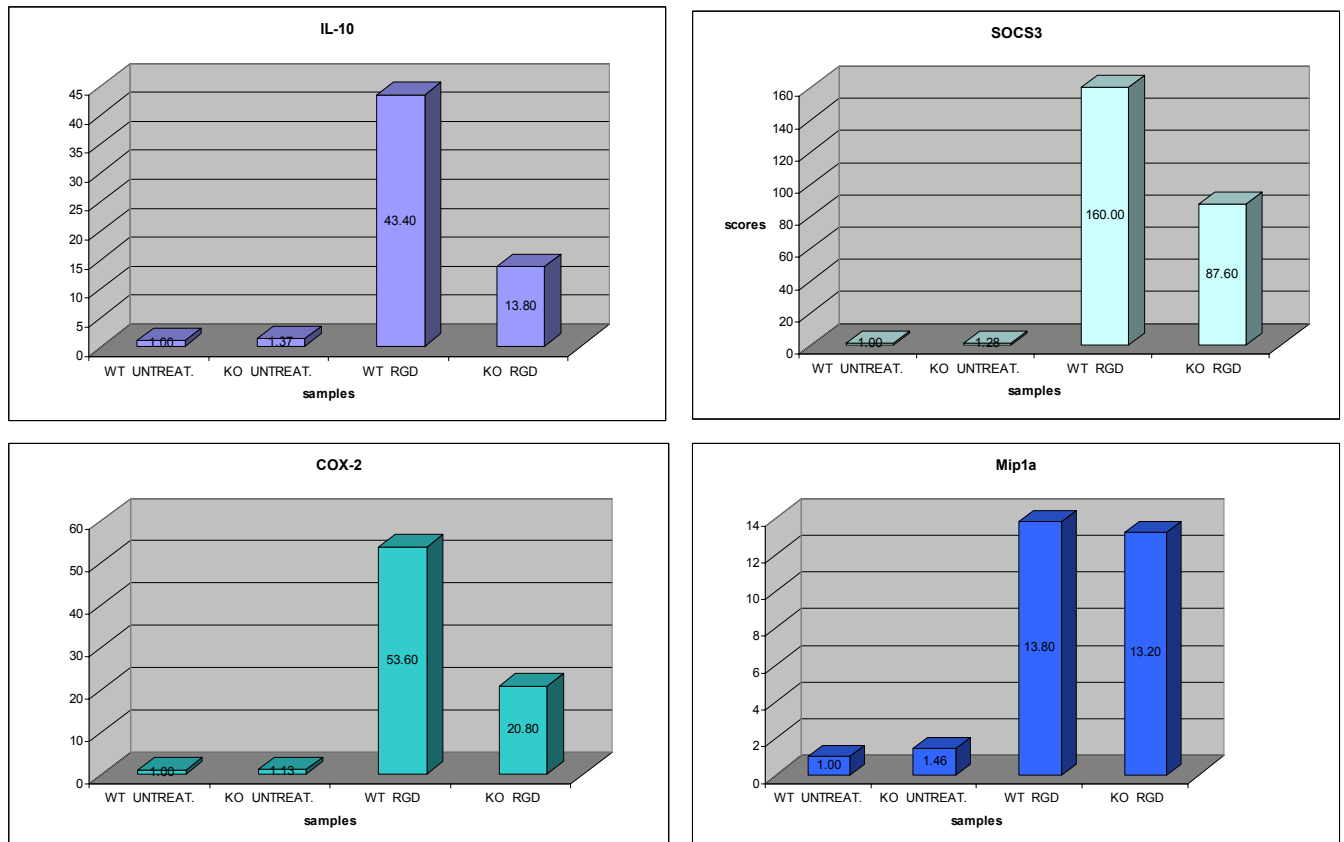
Το αποτέλεσμα της ανεπαρκούς σηματοδότησης που παρατηρείται στα *Trl2**-/-* μακροφάγα αποκτά ακόμη μεγαλύτερη βιολογική σημασία όταν επηρεάζει την έκφραση γονιδίων στόχων. Στην προκειμένη περίπτωση έγινε έλεγχος της έκφρασης κάποιων γονιδίων που ενεργοποιούνται καθοδικά των ιντεγκρινών και η μείωση που παρατηρείται τόσο στην μεταγραφή αλλά και στην μετάφραση κάποιων γονιδίων είναι αξιοσημείωτη. Αρχικά εξετάστηκε η παραγωγή των κυτταροκινών IL-10, TNF α , IL12p70 και της χυμοκίνης IP-10 με χρήση των κατάλληλων Elisa κιτ(εικόνα 11α). Για τον σκοπό αυτό μακροφάγα μυελού των οστών από *wt* και *Trl2**-/-* ποντίκια καλλιεργούνται σε DMEM/10%FBS για 18 ώρες παρουσία polyRGD και τα υπερκείμενα χρησιμοποιούνται για ανάλυση Elisa. Η παραγωγή των κυτταροκινών IL-10, TNF α και της χυμοκίνης IP-10 φαίνεται να μειώνονται περισσότερο από το μισό στα *Trl2**-/-* μακροφάγα σε σύγκριση με τα *wt* όταν αυτά ενεργοποιούνται με pRGD. Ωστόσο αυξημένη φαίνεται η παραγωγή της IL-12p70 στα *Trl2**-/-* όταν διεγείρονται με pRGD, κάτι που μπορεί να εξηγηθεί λόγω της ταυτόχρονης μείωσης της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10 στα *Tr2**-/-*. Ενδιαφέρουσα επίσης είναι η συστατική έκφραση της IL-12p70 (δηλ. η παραγωγή της IL-12p70 στα μη διεγερμένα *Trl2**-/-* μακροφάγα), κάτι το οποίο θα μπορούσε να διερευνηθεί μελλοντικά.

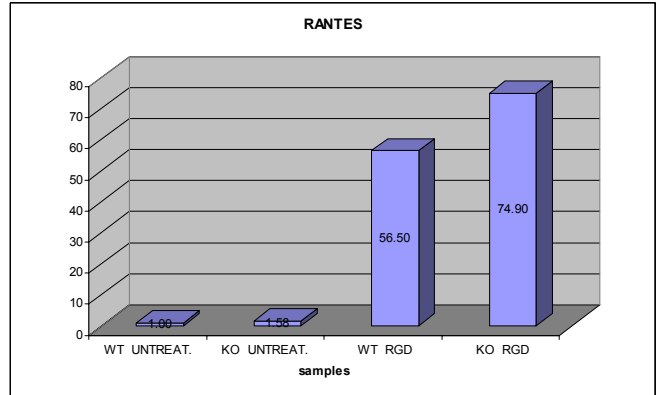
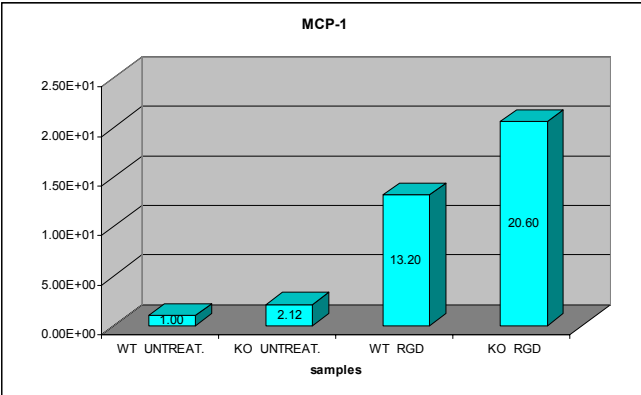
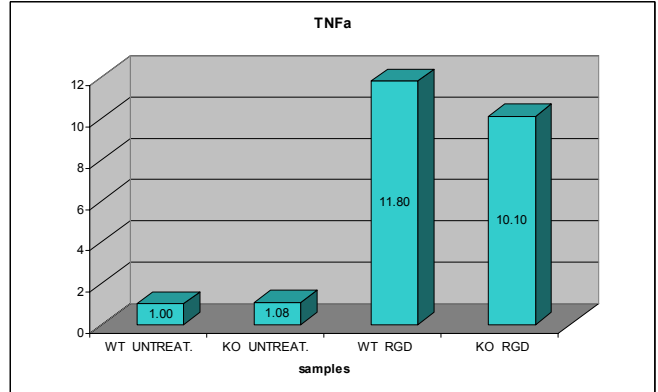
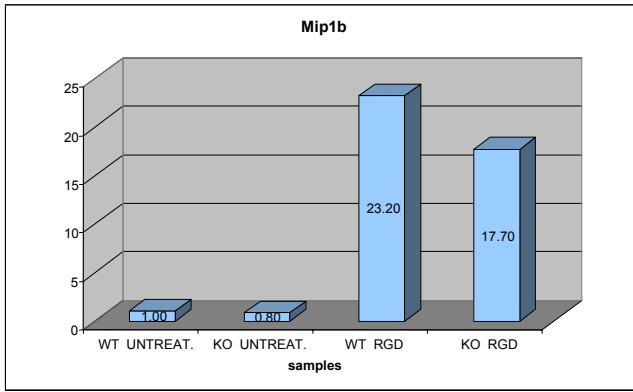


Εικόνα 11α : Μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών και χυμοκινών στα *Trl2**-/-* μακροφάγα μετά από ενεργοποίηση με pRGD. Αξιοσημείωτη είναι η μείωση της IL-10, IP-10 και TNF α . Επιπλέον η μειωμένη IL-10 οδηγεί ταυτόχρονα στην αύξηση της IL12p70 στα *Trl2**-/-* μακροφάγα.

Στη συνέχεια εξετάστηκε σε μεταγραφικό επίπεδο η παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών και προφλεγμονωδων μορίων. Τα wt και Tr2^{-/-} μακροφάγα καλλιεργούνται σε DMEM/10%FBS για 3-4 ώρες παρουσία polyRGD, το RNA απομονώνεται και χρησιμοποιείται για διεξαγωγή ημιποσοτικής PCR(real time PCR).Τα γονίδια που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στην εικόνα 11β. Από αυτά φαίνεται να δείχνουν μειωμένη έκφραση: το γονίδιο της IL-10(όπως έδειξε και η elisa), το γονίδιο SOCS3(γονίδιο στόχος της IL-10 που ενεργοποιείται μέσω STAT3) καθώς και το γονίδιο της κυκλοογεννάσης (cox-2). Ωστόσο η έκφραση των χυμοκινών MIP1a, MIP1b, MCP1 και RANTES παραμένει ανεπηρέαστη. Η έκφραση του TNFα φαίνεται επίσης να μην επηρεάζεται-σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της elisa που έδειξαν αξιοσημείωτη μείωση της παραγωγής TNFα από τα Tr12^{-/-} μακροφάγα. Αυτό πιθανών να υποδηλώνει ότι υπάρχει μεταμεταγραφική ρύθμιση του mRNA του TNFα μέσω της ERK(6). Δηλαδή η μεταγραφή του mRNA του TNFα γίνεται κανονικά αλλά υπάρχει μειωμένη μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα (που οφείλεται σε έλλειψη σταθερότητας λόγω μειωμένης ενεργοποίησης της ERK). Έτσι τα τελικά επίπεδα του TNFα που παράγονται από τα Tr12^{-/-} κύτταρα είναι μειωμένα.

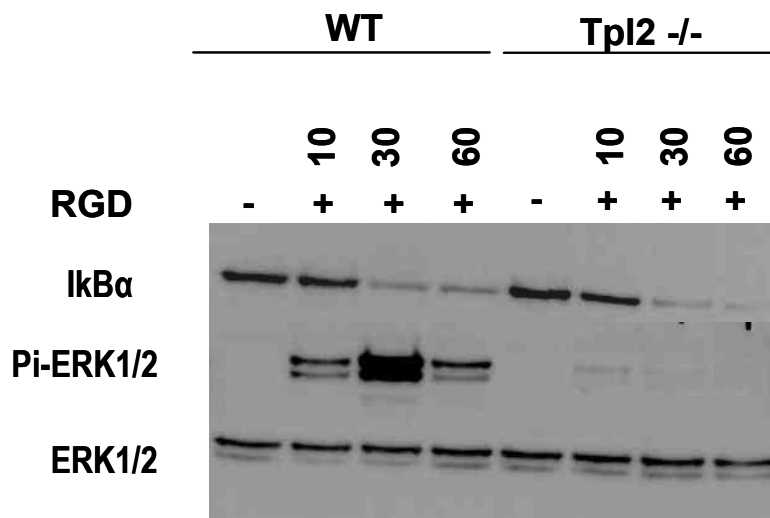
Εικόνα 11 β : Αλλαγές στην μεταγραφή φλεγμονωδών γονιδίων σε wt και Tr12^{-/-} μακροφάγα μετά από ενεργοποίηση με pRGD.





4.6 Η ενεργοποίηση του NFκB καθοδικά των ιντεγκρινών δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της Tpl2.

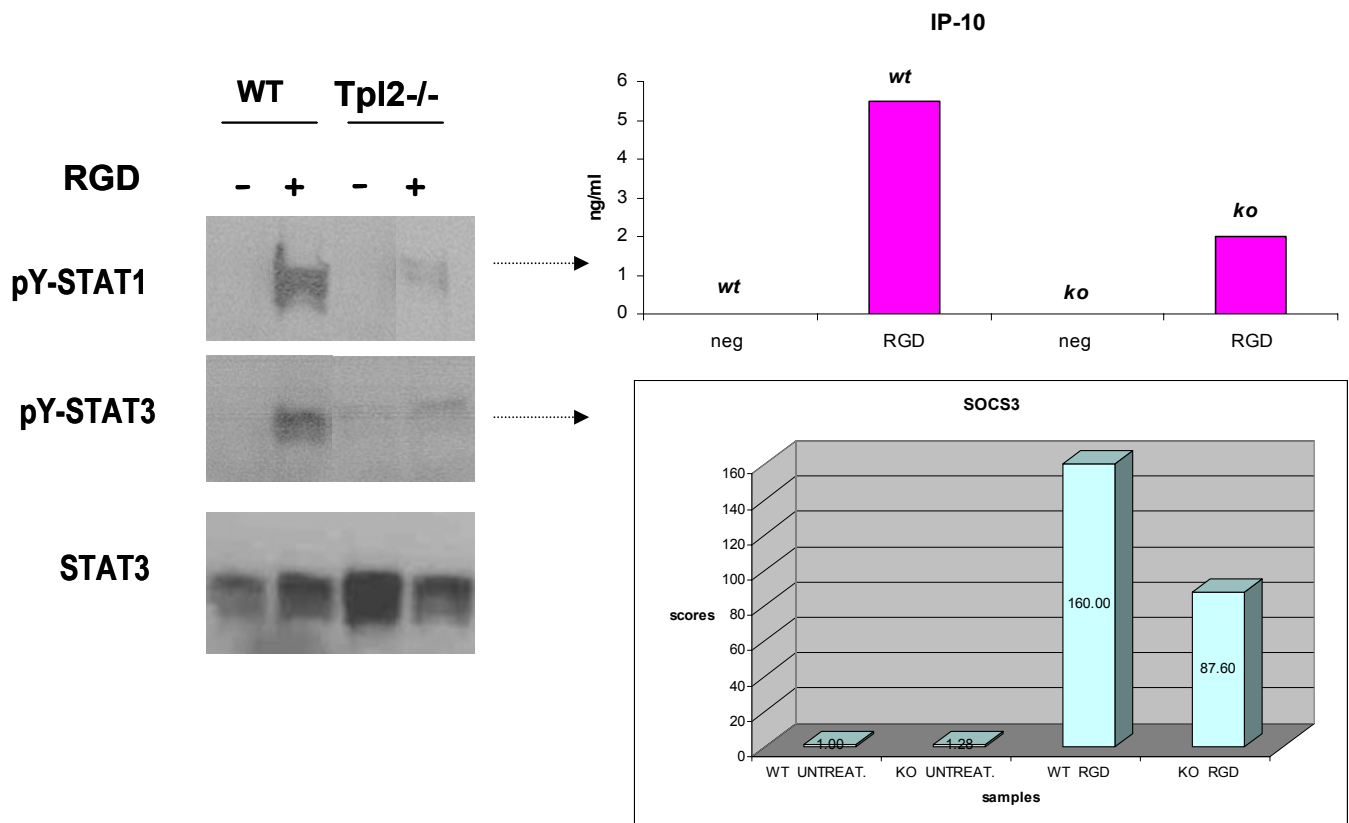
Ο NFκB αποτελεί πλειτροπικό μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιείται καθοδικά των ιντεγκρινών(54,57,58) και ευθύνεται για την ρύθμιση προφλεγμονωδών κυτοκινών(44-47) όπως TNFα, IL-1b ,IL-8, πολλών χυμοκινών (MCP1, MIP1α MIP1β) και αυξητικών παραγόντων (CSF). Η Tpl2 έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο μονοπάτι ενεργοποίησης του NFκB(6,7,12,16,24) ειδικά μέσω των υποδοχέων TLR4 και TNFR. Επομένως ο NFκB αποτελεί τον πρώτο υποψήφιο που η ενεργοποίηση του θα μπορούσε να επηρεάζεται από την απώλεια της Tpl2 και επομένως να ευθύνεται για την μειωμένη παραγωγή των προφλεγμονωδων κυτοκινών που παρουσιάζονται στην παράγραφο 5.5. Η ενεργοποίηση του NFκB μελετάται μέσω παρακολούθησης της αποικοδόμησης του IκBa(αναστολέας του NFκB) σε διαφορετικούς χρόνους διέγερσης με polyRGD(εικόνα 12). Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση τύπου western έδειξε ότι η απώλεια της Tpl2 δεν επηρεάζει το πρότυπο ενεργοποίησης του NFκB. Αυτό ενισχύει τα αποτελέσματα της ημιποσοτικής PCR κατά την οποία η μεταγραφή χυμοκινών όπως MCP1, MIP1α, MIP1β(των οποίων η μεταγραφή εξαρτάται από τον NFκB) δεν φαίνεται να επηρεάζεται.



Εικόνα 12 : Ενεργοποίηση του NFκB καθοδικά των ιντεγκρινών. Μακροφάγα από wt και Tpl2-/- ποντίκια διεγείρονται με polyRGD για 10,30,60 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώνονται και αναλύονται με ανοσοαποτύπωση τύπου Western με χρήση του αντισώματος anti-IκBa. Η αποικοδόμηση του IκBa υποδεικνύει την ενεργοποίηση του NFκB. Η ενεργοποίηση του NFκB δεν διαφέρει ανάμεσα σε wt και Tpl2-/- μακροφάγα.

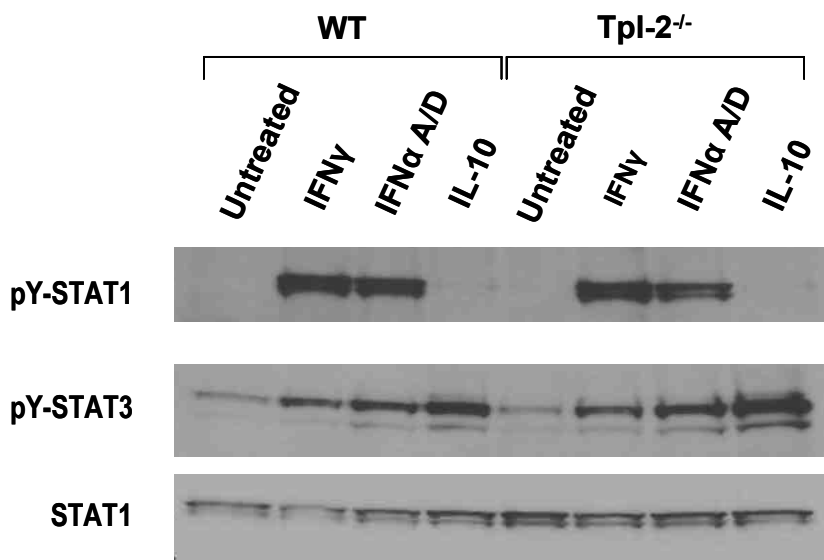
4.7 Τα μακροφάγα από *Trp2*^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν ελλεισμένη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT1 και STAT3 μετά από ενεργοποίηση των ιντεγκρινών με pRGD.

Η ενεργοποίηση γονιδίων που είναι γνωστοί στόχοι των πρωτεϊνών STAT1 και STAT3, όπως η χυμοκίνη IP-10 (στόχος του STAT1) και η πρωτεΐνη SOCS3(στόχος του STAT3) έδειξαν μειωμένη έκφραση στα *Trp2*^{-/-} κύτταρα. Wt και *Trp2*^{-/-} μακροφάγα που καλλιεργήθηκαν παρουσία pRGD για 3 ώρες αναλύθηκαν με western για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT1 και STAT3. Τόσο το STAT1 όσο και το STAT3 ήταν ενεργοποιημένα στα wt μακροφάγα ενώ μειωνόταν δραματικά η φωσφορυλίωση τους στα *Trp2*^{-/-}(εικόνα 13). Τα δεδομένα αυτά δικαιολογούν την μειωμένη έκφραση IP-10(λόγω της μείωσης του pSTAT1) αλλά και του SOCS3(λόγω της μείωσης του pSTAT3) όπως αναφέρθηκε προηγουμένως(παραγραφος 5.5).



Εικόνα 13 : Μειωμένη ενεργοποίηση των STAT1 και STAT3 στα *Trp2*^{-/-} μακροφάγα μετά από διέγερση(για 3h) με pRGD. Η μειωμένη ενεργότητα των STAT1 και STAT3 οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή των γονιδίων στόχων IP-10 και SOCS3 αντίστοιχα.

Η μείωση της φωσφορυλίωσης των STAT1 και STAT3 δεν παρατηρείται νωρίτερα από τις τρεις ώρες(τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), άρα προφανώς τα αποτελέσματα αυτά προκαλούνται έμμεσα. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι τα μακροφάγα αρχικά παράγουν μειωμένη IL-10(δεδομένα από elisa και real time PCR) η οποία στη συνέχεια δρα με αυτοκρινή τρόπο στα μακροφάγα και μέσω του STAT3 οδηγεί στην μειωμένη παραγωγή του SOCS3. Με παρόμοιο τρόπο υποθέτουμε ότι τα *Trl2*^{-/-} μακροφάγα πιθανών να εκφράζουν αρχικά μειωμένη IFN τύπου I η οποία θα δρα στα μακροφάγα και μέσω του STAT1 θα προκαλεί την μειωμένη παραγωγή IP-10 που παρατηρήσαμε. Η υπόθεση αυτή προϋποθέτει ότι το μονοπάτι μέσω των STAT1 και STAT3 θα πραγματοποιείται φυσιολογικά. Για να επιβεβαιωθεί η τελευταία υπόθεση, wt και *Trl2*^{-/-} μακροφάγα διεγέρθηκαν με IFN τύπου I και IL-10 και εν συνεχεία εξετάστηκε η ενεργοποίηση του STAT1,3 η οποία πράγματι δεν επηρεάστηκε από την απουσία της *Trl2*(εικόνα 14).

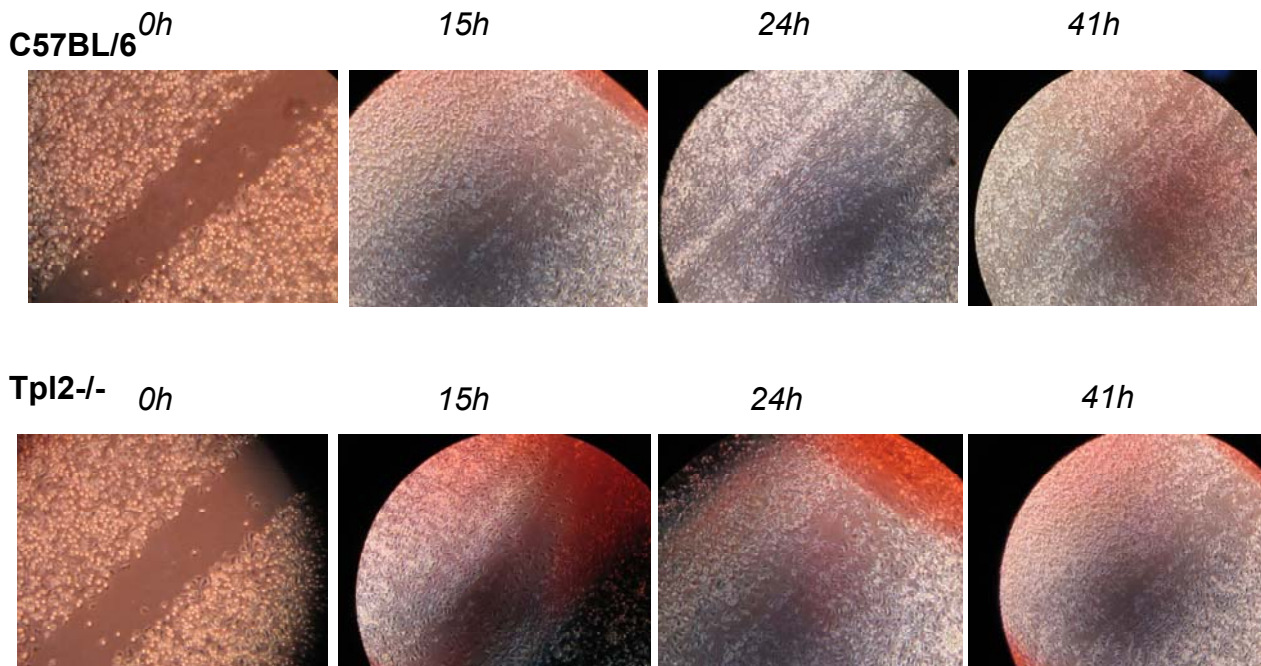


Εικόνα 14: Το μονοπάτι της IL-10 και των IFN τύπου I και II δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της *Trl2*. Διέγερση των wt και *Trl2*^{-/-} μακροφάγων με IFN τύπου I και IL-10 οδηγεί σε φυσιολογική ενεργοποίηση των STAT1 και STAT3 αντίστοιχα.

Επομένως, η μειωμένη ενεργοποίηση των STAT1 και STAT3 φαίνεται να είναι ένα έμμεσο αποτέλεσμα που προκαλείτε λόγω μειωμένης παραγωγής ιντερφερόνης τύπου I και IL-10 από τα *Trl2*^{-/-} μακροφάγα όταν αυτά διεγερθούν με pRGD.

4.8 Ικανότητα μετανάστευσης των *Trp12*^{-/-} μακροφάγων σε τρύβλιο-Δοκιμασία επούλωσης(wound healing assay).

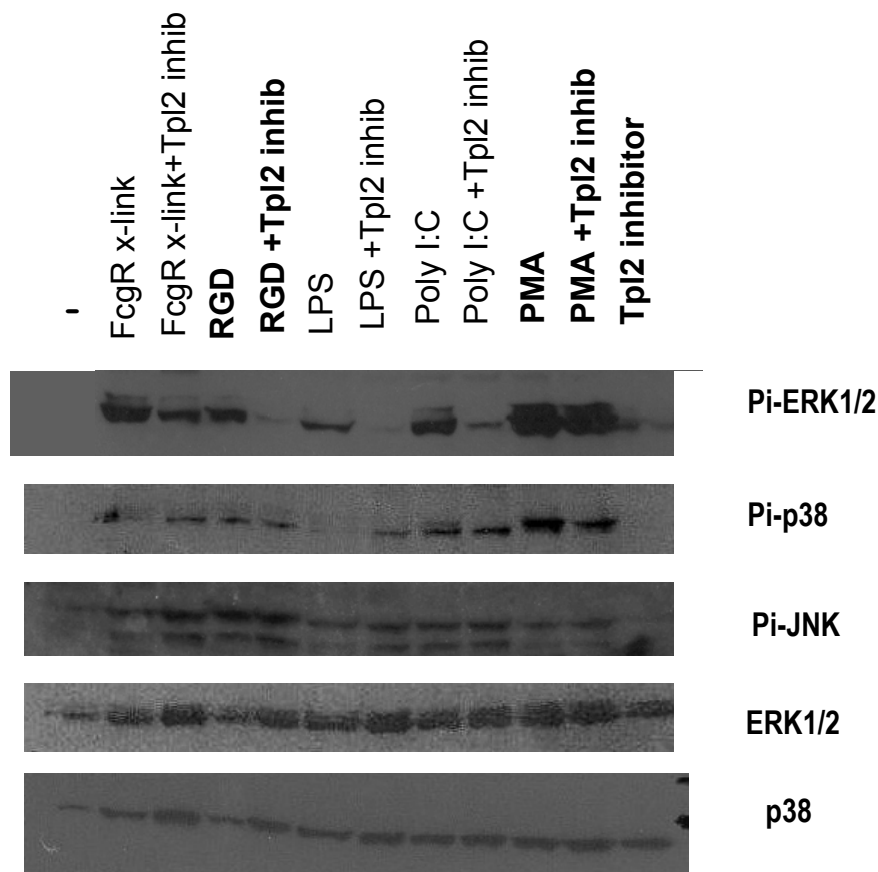
Προκειμένου να μελετηθεί αν η *Trp12* επηρεάζει την ικανότητα των μακροφάγων να μετανάστευουν πραγματοποιήθηκε *in vitro* η δοκιμασία επούλωσης (wound healing assay) κατά την οποία μελετάται η ικανότητα των *Trp12*^{-/-} μακροφάγων να μεταναστεύουν και να επουλώνουν ένα σημείο της φλάσκας το οποίο έχει υποστεί εκδορά. Η ικανότητα των *Trp12*^{-/-} μακροφάγων να μεταναστεύουν δεν φαίνεται να είναι ελαττωματική σε σύγκριση με τα *wt* μακροφάγα αφού καταφέρνουν στον ίδιο χρόνο και το ίδιο αποτελεσματικά να επουλώνουν το σημείο εκδοράς(εικόνα 15).



Εικόνα 15: Σε τρυβλία επιστρωμένα με μακροφάγα (*wt* και *Trp12*^{-/-} BMDMs) προκαλείται μικρή εκδορά, παρόμοιου μεγέθους κάθε φορά και σε συγκεκριμένα σημεία των τρυβλίων. Στη συνέχεια τα μακροφάγα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο σε διάφορα χρονικά διαστήματα(15, 24 και 41h) και μελετώνται για την ικανότητα τους να 'επουλώνουν' την απογυμνωμένη περιοχή. Η ικανότητα επούλωσης είναι ανάλογη με την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στα *wt* και *Trp12*^{-/-} μακροφάγα όσον αφορά την ικανότητα τους να επουλώνουν το σημείο εκδοράς. Ωστόσο για την αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί.

4.9 Η Trp2 απαιτείται για την ενεργοποίηση της ERK κατά την σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών στα ανθρώπινα μακροφάγα.

Η επίδραση που έχει η απώλεια της Trp2 στην σηματοδότηση καθοδικά των ιντεγκρινών, εξετάστηκε και σε ανθρώπινα μακροφάγα. Για απαλοιφή της δράσης της Trp2 χρησιμοποιήθηκε ειδικός αναστολέας της Trp2(Calbiochem) και ακολούθησε ενεργοποίηση του μονοπατιού των ιντεγκρινών με polyRGD. Τα κύτταρα(με και χωρίς αναστολέα Trp2) επιστρώνονται σε επιφάνειες επικαλυμμένες με polyRGD για τριάντα λεπτά και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα απομονώνεται και αναλύεται με ανοσοδοτύπωση τύπου Western για την ενεργοποίηση των κινάσων MAPK(ERK,p38,JNK). Η ενεργοποίηση της κινάσης ERK στα κύτταρα που επωάστηκαν με αναστολέα φαίνεται να μειώνεται δραματικά(εικόνα 16) -όπως και στα Trp2-/- μακροφάγα ποντικών-ενώ η ενεργοποίηση των κινάσων JNK και p38 δεν επηρεάζεται.



Εικόνα 16: Ανθρώπινα περιφερικά μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα με χρήση hMCSF και επωάζονται με αναστολέα της Trp2 για τριάντα λεπτά πριν την διέγερση με pRGD. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα συλλέγονται και αναλύονται με ανοσοδοτύπωση τύπου western για τα αντισώματα pERK, pp38, pJNK, ERK, p38, JNK. Με έντονα μαύρα γράμματα φαίνονται τα δείγματα RGD, RGD&Trp2 inhibitor καθώς και PMA, PMA &Trp2 inhibitor που χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα του αναστολέα της Trp2.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή την αναφορά αποδεικνύουν ότι η Tpl2 απαιτείται για την ενεργοποίηση της MAPK-ERK μετά από ενεργοποίηση των ιντεγκρινών σε μακροφάγα και τελικά ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων TNF- α , IL-10, IP-10, Cox2-γονίδια σημαντικά σε καταστάσεις φλεγμονής.

- Αρχικά αποδείχθηκε ότι η απώλεια της Tpl2 δεν επηρεάζει την διαφοροποίηση των μακροφάγων αλλά ούτε και την έκφραση των ιντεγκρινών.
- Τα δεδομένα αυτά επιτρέπουν να υποθέσουμε ότι η έλλειψη της Tpl2 οδηγεί σε ελαττωματική σηματοδότηση καθοδικά των ιντεγκρινών γιατί η ίδια(η Tpl2) αποτελεί μέλος του σηματοδοτικού μονοπατιού των ιντεγκρινών.
- Η δραματική μείωση της ERK στα Tpl2^{-/-} μακροφάγα ποντικού σε απόκριση στο pRGD δείχνει ότι η συμμετοχή της Tpl2 στην ενεργοποίηση των MAPKs είναι ειδική για την MAPK-ERK αφού οι MAPKs- p38 και JNK ενεργοποιούνται κανονικά.
- Επίσης η απώλεια της Tpl2 δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση της ERK όταν τα μακροφάγα εκτίθενται σε άλλους διεγέρτες όπως PMA, MCSF τα οποία ενεργοποιούν την ERK μέσω διαφορετικών μονοπατιών από αυτό των ιντεγκρινών.
- Επιπρόσθετα, ο ρόλος της Tpl2 στην ενεργοποίηση του NFkB αποκλείστηκε με βάση διαφορετικά αποτελέσματα: καταρχήν η αποικοδόμηση του Ikb α (και επομένως η ενεργοποίηση του NFkB) δεν επηρεάζεται στα Tpl2^{-/-} μακροφάγα που διεγείρονται με pRGD και επιπλέον δεν φαίνεται να επηρεάζεται ούτε η έκφραση γονιδίων στόχων του NFkB όπως οι χυμοκίνες MIP1a, MIP1b, MCP1 και RANTES.
- Ωστόσο η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων όπως TNF- α , IL-10, IP-10, cox-2 καθοδικά των ιντεγκρινών φαίνεται ότι μειώνεται στα Tpl2^{-/-} μακροφάγα και η έκφραση τους ρυθμίζεται τόσο μεταγραφικά όσο και μεταμεταγραφικά. Η μεταμεταγραφική ρύθμιση του TNF- α μέσω της σηματοδότησης Tpl2/ERK αφορά την μειωμένη σταθερότητα του mRNA του TNF- α λόγω μειωμένης ενεργοποίησης της ERK όπως έχει αποδειχθεί καθοδικά του υποδοχέα TLR4 στα Tpl2^{-/-} μακροφάγα(6).
- Τέλος, σημαντικά είναι τα αποτελέσματα που αποδुकνεύουν ότι η ενεργοποίηση της ERK μετά από ενεργοποίηση των ιντεγκρινών εξαρτάται από την Tpl2 και στα ανθρώπινα μακροφάγα. Η απενεργοποίηση της Tpl2 έγινε με χρήση αναστολέα για την Tpl2 σε περιφερικά μονοκύτταρα και πρόκειται να εξεταστεί περαιτέρω για την δράση της στην ρύθμιση των γονιδίων φλεγμονής που ενεργοποιούνται καθοδικά των ιντεγκρινών.

Η απενεργοποίηση της Tpl2 με χρήση αναστολέων έχει μελετηθεί σε ανθρώπινα μονοκύτταρα καθώς και σε ινοβλάστες άρθρωσης από άλλες ερευνητικές ομάδες που έδειξαν μείωση στην παραγωγή TNF- α μετά από χρήση ειδικού αναστολέα της Tpl2 και ακόλουθη απόκριση σε LPS. Το ίδιο υποθέτουμε ότι θα ισχύει καθοδικά των ιντεγκρινών σε απόκριση στο pRGD. Επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης θα ενισχύσει ακόμη περισσότερο όλες τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας σχετικά με την συμμετοχή της Tpl2 στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών, και θα ταυτοποιήσει την Tpl2 ως ένα εξαιρετικό θεραπευτικό στόχο για την καταστολή της φλεγμονής, μέσω εμπλοκής στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών. Μέχρι τώρα η απενεργοποίηση της Tpl2 in

νίνο(σε ποντίκια) φαίνεται ότι όχι μόνο δεν προκαλεί προβλήματα αλλά προστατεύει τα ποντίκια από το ενδοτοξικό σοκ που επάγει το LPS(6), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την φλεγμονώδη νόσο του εντέρου(8). Πιστεύουμε ότι τα παραπάνω θα επιβεβαιωθούν και στο ανθρώπινο σύστημα με την χρήση ειδικών αναστολέων για την Tri2.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Patriotis, C., A. Makris, S.E. Bear, and P.N. Tsihchlis. (1993). Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2251-2255.
2. Tsatsanis, C., C. Patriotis, and P.N. Tsihchlis. (1998). Tpl-2 induces IL-2 expression in T-cell lines by triggering multiple signaling pathways that activate NFAT and NF-kappaB. *Oncogene* 17:2609-2618.
3. Tsatsanis, C., C. Patriotis, S.E. Bear, and P.N. Tsihchlis. (1998). The Tpl-2 protooncprotein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3827-3832.
4. Patriotis, C., A. Makris, J. Chernoff, and P.N. Tsihchlis.(1994). Tpl-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9755-9759.
5. Ceci, J.D., C.P. Patriotis, C. Tsatsanis, A.M. Makris, R. Kovatch, D.A. Swing, N.A. Jenkins, P.N. Tsihchlis, and N.G. Copeland. (1997). Tpl-2 is an oncogenic kinase that is activated by carboxy-terminal truncation. *Genes Dev* 11:688-700.
6. Dumitru, C.D., J.D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J.H. Lin, C. Patriotis, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, G. Kollias, and P.N. Tsihchlis.(2000). TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103:1071-1083.
7. Eliopoulos, A. G., Wang, C. C., Dumitru, C. D., and Tsihchlis, P. N. (2003). Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *EMBO J.* 22: 3855–3864.
8. Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T., Kotlyarov, A., Forster, I., Flavell, R., Gaestel, M., Tsihchlis, P., Cominelli, F., and Kollias, G. (2002) Genetic Dissection of the Cellular Pathways and Signaling Mechanisms in Modeled Tumor Necrosis Factor–induced Crohn’s-like Inflammatory Bowel Disease. *J. Exp. Med.* 196, 1563–1574.
9. Mori, L., Iselin, S., De Libero, G., and Lesslauer, W. (1996) *J. Immunol.* 157,3178–3182.
10. Yamaguchi, N., Ohshima, S., Umeshita-Sasai, M., Nishioka, K., Kobayashi, H., Mima, T., Kishimoto, T., and Saeki, Y. (2003) *J. Rheumatol.* 30, 22–27.
11. Plows, D., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. (1999) *J. Immunol.* 162,1018–1023.

- 12.** Santasabuj Das, Jeonghee Cho, Irina Lambertz, Michelle A. Kelliher, Aristides G. Eliopoulos, Keyong Du, and Philip N. Tsichlis. (2005) Tpl2/Cot Signals Activate ERK, JNK, and NF- κ B in a Cell-type and Stimulus-specific Manner *JBC.* 280, 23748–23757.
- 13 α .** Banerjee A., Gugasyan R., McMahon M. & Gerondakis S.. (2006). Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *PNAS* 103: 3274–3279.
- 13 β .** Kenji Sugimoto, Mutsuhiro Ohata, Jun Miyoshi, Hiroyoshi Ishizaki, Naotake Tsuboi, Akio Masuda, Yasunobu Yoshikai, Masaya Takamoto, Kazuo Sugane, Seiichi Matsuo, Yasuhiro Shimada, and Tetsuya Matsuguchi. (2004). A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *The Journal of Clinical Investigation* :114.
- 14.** Anderson, K.V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response *Current Opin. Immunol* 12, 13-19.
- 15.** Matthew S. Hayden and Sankar Ghosh. (2004). Signaling to NF- κ B, *GENES & DEVELOPMENT* 18: 2195–2224.
- 16.** Belich, M. P., Salmeron, A., Johnston, L. H., and Ley, S. C. (1999) *Nature* 397, 363–368.
- 16 α .** Beinke S., Lang D.V., Belich M.P., Walker P.A., Howell S., Smerdon S.J., Gamblin S.J. & Ley S.C.. (2003). NF- κ B1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 23: 4739-4752.
- 16 β .** Lang V., Symons A., Watton S.J., Jansen J., Soneji Y., Beinke S., Howell S. & Ley S.C.. 2004. ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF- κ B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5235-5248.
- 17.** Waterfield, M. R., Zhang, M., Norman, L. P., and Sun, S. C. (2003) *Mol. Cell* 11, 685–694.
- 18.** Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F. G., and Scheidereit, C. (1999) *EMBO J.* 18, 4766–4778.
- 19.** Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S. C. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24, 6040–6048.
- 20.** Beinke, S., Robinson, M. J., Hugunin, M., and Ley, S. C. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24 9658–9667.
- 21.** Cho, J., and Tsichlis, P. N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2350–2355.
- 22.** Cho, J., Melnick, M., Solidakis, G. P., and Tsichlis, P. N. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 20442–20448.
- 23.** Caivano, M., Rodriguez, C., Cohen, P., and Alemany, S. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 52124–52130.

- 24.** Aristides G. Eliopoulos[‡]§1, Santasabuj Das, and Philip N. Tsichlis
Syk Regulates TNF-induced Tpl2 Activation Signals(2006)
Journal of Biological Chemistry 281:1371–1380.
- 25.** Lawrence P. Kane, N. Mollenauer, Zheng Xu,¹ Christoph W. Turck, and Arthur Weiss.(2002). Akt-Dependent Phosphorylation Specifically Regulates Cot Induction of NF-κB-Dependent Transcription.
Molecular and Cellular Biology. 22: 5962–5974.
- 26.** Terrence M. Black,Christine L. Andrews, Geoffrey Kilili, Mircea Ivan, Philip N. Tsichlis, and Paul Vouros.(2007)Characterization of Phosphorylation Sites on Tpl2 Using IMACEnrichment and a Linear Ion Trap Mass Spectrometer
Journal of Proteome Research 6: 2269-2276.
- 27.** R.O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines,
Cell 110 (2002) 673–687.
- 28.** M.A. Schwartz, M.H. Ginsberg, (2002)
Networks and crosstalk: integrinsignalling spreads.
Nat. Cell Biol. 4 E65–E68.
- 29.** F.M.Watt, (2002)
Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation,
EMBO J. 21 3919–3926.
- 30.** C. Brakebusch, R. Fassler, (2003)
The integrin–actin connection, an eternal love affair.
EMBO J. 22 2324–2333.
- 31.** M.A. Schwartz, (2001) Integrin signaling revisited,
Trends Cell Biol 11 466–470.
- 32.** M.A. Schwartz, R.K. Assoian, (2001)
Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways.
J. Cell Sci. 114 2553–2560.
- 33.** N. Zahir, V.M.Weaver (2004)
Death in the third dimension: apoptosis regulationand tissue architecture.
Curr. Opin. Genet. Dev. 14 71–80.
- 34.** G.E. Hannigan, C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M.G. Coppelino, G. Radeva, J. Filmus, J.C. Bell, S. Dedhar, (1996)
Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase.
Nature 379 91–96.
- 35.** M.D. Schaller,(2001)
Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase,
Biochim. Biophys. Acta 1540 1–21.
- 36.** C. Rosales, V. O'Brien, L. Kornberg, R. Juliano, (1995)
Signal transduction by cell adhesion receptors,

Biochim. Biophys. Acta 1242 ,77–98.

- 37.** M.D. Schaller, J.T. Parsons, (1994)
Focal adhesion kinase and associated proteins,
Curr. Opin. Cell Biol. 6 705–710.
- 38.** C.F. Welsh, R.K. Assoian, (2000)
A growing role for Rho family GTPases as intermediaries in growth factor- and adhesion-
dependent cell cycle progression,
Biochim. Biophys. Acta 1471 M21–M29.
- 39.** Attila Mocsai, Clare L Abram, Zoltan Jakus¹, Yongmei Hu, Lewis L Lanier & Clifford A
Lowell. (2006)
Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor
tyrosine-based activation motifs
NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 7 NUMBER 12.
- 40.** T. Kinashi, (2005)
Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes,
Nat. Rev., Immunol. 5 546–559.
- 41.** M.H. Ginsberg, A. Partridge, S.J. Shattil, (2005)
Integrin regulation,
Curr. Opin. Cell Biol. 17 509–516.
- 42.** B.H. Luo, T.A. Springer, J. Takagi, (2004)
A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand,
PLoS Biol. 2e153.
- 43.** Berton, G. & Lowell, C.A. (1999)
Integrin signalling in neutrophils and macrophages.
Cell.Signal. 11, 621–635.
- 44.** Perez, R., and J. Roman.(1995)
Fibrin enhances the expression of IL-1b by human peripheral blood mononuclear cells.
J. Immunol. 154:1879.
- 45.** Fan, S., and T. Edgington. (1991) Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to
functional enhancement of effector macrophage tissue factor response.
J. Clin. Invest. 87:50.
- 46.** Fan, S., and T. Edgington. (1993). Integrin regulation of leukocyte inflammatory
functions: CD11b/CD18 enhancement of the TNF- α responses of monocytes.
J. Immunol. 150:2972.
- 47.** Trezzini, C., B. Schüpp, F. Maly, and T. Jungi.(1991). Evidence that exposure to
fibrinogen or to antibodies directed against Mac-1 (CD11b/CD18; CR3) modulates
human monocyte effector functions.
Brit. J. Haematol. 77:16.
- 48.** Pakianathan, D. (1995). Extracellular matrix proteins and leukocyte function.
J. Leukocyte Biol. 57:699.
- 49.** Blackwell, T., and J. Christman.(1997).The role of nuclear factor- κ B in cytokine

gene regulation.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 17:3.

50. Baldwin, A. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights.
Annu. Rev. Immunol. 14:649.

51. Grilli, M., J. J.-S. Chiu, and M. Lenardo. (1993). NF- κ B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system.
Int. Rev. Cytol. 143:1.

52. Müller, J. M., H. W. L. Ziegler-Heitbrock, and P. A. Baeuerle. (1993). Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects.
Immunobiology 187:233.

53. Lin, T., C. Rosales, K. Mondal, J. Bolen, S. Haskill, and R. Juliano. (1995). Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells: a possible signaling role for the Syk tyrosine kinase.
J. Biol. Chem. 270:16189.

54. Robert G. Sitrin,² Pauline M. Pan, Sujata Srikanth, and Robert F. Todd (1998) Fibrinogen Activates NF- κ B Transcription Factors in Mononuclear Phagocytes.
The Journal of Immunology, 161: 1462–1470.

55. Clifford A. Lowell and Giorgio Berton (1999) Integrin signal transduction in myeloid leukocytes
J. Leukoc. Biol. 65: 313–320.

56. Fanying Meng and Clifford A. Lowell (1998) A β 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration
The EMBO Journal Vol.17 No.15 pp.4391–4403.

57. Merit REYES-REYES, Nancy MORA, Gerardo GONZALEZ and Carlos ROSALES (2002) β 1 and β 2 integrins activate different signalling pathways in monocytes
Biochem. J. 363, 273±280

58. Can Shi, Xiaobin Zhang, Zhiping Chen, Martyn K. Robinson, Daniel I. Simon (2001) Leukocyte Integrin Mac-1 Recruits Toll/Interleukin-1 Receptor Superfamily Signaling Intermediates to Modulate NF- κ B Activity
Circulation Research November 9.

59. Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K. and Cheresh, D.A. (1998) CAS/Crk coupling serves as a 'molecular switch' for induction of cell migration.
J. Cell Biol., 140, 961–972.

60. Wolfgang Bergmeier et al. (2007). Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEF represent a model of leukocyte adhesion deficiency type III.
The Journal of Clinical Investigation: 17, number 6.

