Μεταπτυχιακή Εργασία

«Ο ρόλος των απομεθυλασών των ιστονών, PHF8 και PHF2, στην επιγενετική ρύθμιση της ενεργοποίησης των μακροφάγων»

Κωνσταντίνος Αξαρλής

Επιστημονικώς Επιβλέπων: **Χρήστος Τσατσάνης**

09/2019 - 10/2020, Ηράκλειο

Εργαστήριο Κλινικής Χημείας

(Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας & Βιοϊατρικής

(2018-2020)

Πανεπιστήμιο Κρήτης
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

FORTH
FOUNDATION FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY - HELLAS

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE

Πανεπιστήμιο Κρήτης
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Περίληψη

Τα μακροφάγα είναι οι κεντρικοί διαμεσολαβητές των φλεγμονώδων αποκρίσεων, απαρτίζουν τη βάση της έμφυτης ανοσίας, ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες ομοιοστατικές λειτουργίες[1,2]. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων προϋποθέτει αυστηρή και πολυεπίπεδη γονιδιακή ρύθμιση, και μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φαινοτυπικό φάσμα που προκύπτει από διαβαθμίσεις του κλασικού τύπου «M1» προφλεγμονώδη φαινοτύπου ή του εναλλακτικού τύπου «M2» αντιφλεγμονώδη φαινοτύπου[2,3]. Ολοένα αυξανόμενος αριθμός δημοσιεύσεων καταδεικνύει πως η εντυπωσιακή αυτή πλαστικότητα των μακροφάγων ρυθμίζεται εκτενώς στο επιγενετικό επίπεδο, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επιπλέον, η επίδραση των διαφορετικών μεταβολικών προσαρμογών στην εκδήλωση της ανοσολογικής απόκρισης.

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας επιχειρήθηκε η διερεύνηση του ρόλου των απομεθυλασών ιστονών «PHF8» (KDM7B) και «PHF2» (KDM7C) στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ειδικότερα, εξετάστηκε η σημασία τους στη ρύθμιση γονιδίων και εκκρινόμενων κυτοκινών που εμπλέκονται στην TLR4-διαμεσολαβούμενη φλεγμονή, η δράση τους σε λειτουργικά χαρακτηριστικά των μακροφάγων, όπως η φαγοκυττάρωση, καθώς και ο ρόλος τους στην ανοσομεταβολική ρύθμιση. Τέλος, αποπειράθηκε η εξιχνίαση της πιθανής αλληλεπίδρασης της PHF8 με τις κινάσες AKT, που φέρουν κεντρική θέση στην ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων.

Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές με τη μέθοδο CRISPR που υπό- ή υπέρ- εκφράζουν τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, όπως γονιδιακή σίγηση με RNA σε πρωτογενή κύτταρα, κυτταρομετρία ροής, RT-qPCR, ELISA και WB.

Παρατηρήθηκε πως η PHF8 διαδραματίζει ταυτόχρονα έναν προ- και έναν αντί-φλεγμονώδη ρόλο στα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Επιπρόσθετα, προέκυψαν ισχυρές ενδείξεις ότι η ίδια καταστέλλει τη βιογένεση μιτοχονδρίων και, κατά επέκταση, την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Υπερέκφραση της PHF8 οδήγησε σε αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα. Ακόμη, αρχικές ενδείξεις προτείνουν ότι οι AKT1 και AKT2 κινάσες ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση της PHF8 με αντίθετο τρόπο και πως ενδέχεται να επηρεάζουν τα συνολικά και φωσφορυλιωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής.

Η απομεθυλάση ιστονών PHF2 βρέθηκε πως έχει σημαντική προ-φλεγμονώδη δράση. Ρυθμίζει με αντίθετο από την PHF8 τρόπο αρκετά γονίδια της ανοσοαπάντησης, υποδηλώνοντας μια ανταγωνιστική σχέση μεταξύ των δύο απομεθυλασών. Ταυτόχρονα, όμως, προέκυψαν περιπτώσεις κοινής ρύθμισης, που αποτελεί ένδειξη για συνεργιστικό μηχανισμό δράσης. Τέλος, η PHF2 φάνηκε πως είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική φαγοκυττάρωση.

Abstract

“The role of histone demethylases, PHF8 and PHF2, in the epigenetic regulation of activated macrophages”

Macrophages are the central mediators of inflammatory responses, they constitute the basis of innate immunity, while, at the same time, exhibit an important role in several functions of homeostasis[1,2]. Macrophage activation requires strict and multiple layers of gene regulation, which may lead in a vast spectrum of pro- or anti- inflammaroty phenotypes, termed as “M1” or “M2”, respectively[2,3]. A growing body of evidence indicates that this enormous macrophage plasticity is excessively regulated at the epigenetic level and that different metabolic adaptations influence the outcome of the immune response.

In the present postgraduate thesis, the role of histone demethylases “PHF8” (KDM7B) and “PHF2” (KDM7C) in macrophage activation was investigated, including the expression of genes and secretion of cytokines that are implicated in TLR4-induced inflammation, the impact on immunometabolic regulation, as well as macrophage phagocytosis capacity. Finally, a possible interaction of PHF8 with AKT kinases, which have a crusial role in immune response, was tested.

For that purpose, stable macrophage cell-lines which under- or over- express the aforementioned proteins were created with CRISPR. Several molecular- and cell- biology techniques were used, such as si RNA on primary macrophages, FACS, RT-qPCR, ELISA, and WB.

It was exhibited that PHF8 plays both a pro- and an anti- inflammatory role in macrophage activation. Furthermore, it was demonstrated that PHF8 downregulates mitochondrial biogenesis, and, by extension, oxidative phosphorylation. Overexpression of PHF8 led to elevated phatocytosis capacity. Initial indications suggested that AKT1 and AKT2 kinases control PHF8 expression in an opposite manner and that they may affect its total and phosphorylated protein levels.

Histone demethylase PHF2 was found to exhibit a strong pro-inflammatory activity. It was displayed that it regulates a number of immune regulation genes in an opposite way than PHF8, suggesting a potential competitive relashionship between the two proteins. Moreover, in some cases similar gene regulation was also observed, indicating a synergistic mechanism of action. Finally, it was displayed that PHF2 is necessary for effective phagocytosis.

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την ανάγκη αρχικά να ευχαριστήσω τον κ. Χρήστο Τσατσάνη για την ευκαιρία να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του. Ήταν μια χρονιά ιδιαίτερα διδακτική και παραγωγική, που με εφοδίασε με σημαντικές γνώσεις και ικανότητες για μια άρτια ερευνητική πορεία.

Ένα τεράστιο, εκγάρδιο, ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδίως στη Μαρία Δασκαλάκη, την Ουρανία Κολινιάτη, την Ελίνα Παφλιώτη, την Ιωάννα Λάπι και την Ιωάννα Πανταζή. Η αλληλεγγύη, το χιούμορ και η γνησιότητα στις συναναστροφές μας δημιουργούσαν καθημερινά ένα ένθερμο περιβάλλον αγαστής συνεργασίας και μου κληροδότησαν έναν θησαυρό από όμορφες, ξεκαρδιστικές ή συγκινητικές αναμνήσεις.

Στη Μαρία Δασκαλάκη θα ήθελα, ακόμη, να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου για όλον τον χρόνο που μου αφιέρωσε, την πολύτιμη -πάντα ευγενική- καθοδήγησή της και τις ενθαρρυντικές τις προτροπές.

Ευχαριστώ, επίσης, την Ελένη Βεργαδή για τη βοήθειά της στην κυτταρομετρία ροής και τις rotators Ερμιόνη Αρβανιτάκη και Σέβη Ξενικάκη που συνέβαλαν σε κάποια πειράματα.

Τέλος, την οικογένειά μου και τους αγαπημένους μου φίλους τους ευγνωμονώ από καρδιάς!

Παρά τις απανωτές και πρωτοφανείς δυσκολίες αυτής της χρονιάς, χαιρόμουν κάθε μέρα που πήγαινα σε αυτό το εργαστήριο, και κάθε μέρα έφευγα γεμάτος! Εύχαριστώ!

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη 2

Abstract 3

Εισαγωγή 8

Μακροφάγα 8

Ο γενικός ρόλος των μακροφάγων 8

Οντογένεση των μακροφάγων 9

Ετερογένεια και μακροφάγα 9

Ενεργοποίηση και πολικότητα μακροφάγων 10

Με μια ματιά 10

Ονοματολογία 11

Φάσμα ενεργοποίησης M1-M2 12

Ρύθμιση πολικότητας 13

Ανταγωνιστικά Σήματα 14

TLR4-διαμεσολαβούμενη Ανοσολογική Απόκριση 14

Επιγενετική Ρύθμιση 15

Απομεθυλάσες ιστονών: PHF2 και PHF8 16

Γενική δράση της απομεθυλάσης PHF2 16

Γενική δράση της απομεθυλάσης PHF8 17

Εμπλοκή της απομεθυλάσης PHF8 στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης των μακροφάγων 18

Ανοσομεταβολισμός 18

Σύνδεση μεταβολισμού-επιγενετικής 19

Υλικά και Μέθοδοι 20

Πειραματόζωα 20

Κυττατοκαλλιέργειες 20

Απομόνωση βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών (Bone Marrow Cells: BMCs) και διαφοροποίηση σε μακροφάγα (Bone Marrow Derived Macrophages: BMDMs) 20

Διαμόλυνση κυττάρων με siRNA 21

Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών RAW 264.7 με εξουδετερωμένα ή υπερεκφραζόμενα γονίδια. 21

Ενεργοποίηση μακροφάγων 22

Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα 22

Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών 22

Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) 22

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) 23

Ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης μονοξειδίου του αζώτου (NO) 23
Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης 23
Δοκιμή MTT 24
Δοκιμή φαγοκυττάρωσης 24
Φαρμακολογική αναστολή των AKT κινασών 24
Στατιστική Ανάλυση 25
Αποτελέσματα: PHF8 25
Διαλογή (screening) γονιδίων που οδήγησαν στην επιλογή της PHF8 ως πιθανό ρυθμιστή της ανοσολογικής απόκρισης 26
Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς μακροφάγων (RAW 264.7) που υπερεκφράζει την PHF8 με τη μέθοδο CRISPR 27
Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς μακροφάγων (RAW 264.7) με εξουδετερωμένο γονίδιο Phf8 με τη μέθοδο CRISPR 29
Το πρότυπο έκφρασης της Phf8 31
Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών PHF8 στην TLR-4 διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων 31
Η PHF8 ρυθμίζει την έκφραση προ- και αντι- φλεγμονώδων γονιδίων και εκκρινόμενων μορίων κατά την TRL4-διαμεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων 32
TNF-α 32
IL-6 33
Cxcl10 33
iNos & Νιτρικό Οξείδιο 34
Arg1 34
Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF8» στο μεταβολισμό των μακροφάγων 35
Η PHF8 ελέγχει τη βιογένεση μιτοχονδρίων 35
Η επίδραση της PHF8 σε σημαντικά γλυκολυτικά γονίδια 37
Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF8» στην φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων 38
Διερεύνηση πιθανής σχέσης PHF8-AKT 38
Αποτελέσματα: PHF2 40
Δημιουργία κυτταρικής σειράς μακροφάγων (Raw264.7) με εξουδετερωμένο γονίδιο Phf2 με τη μέθοδο CRISPR 40
Το πρότυπο έκφρασης της Phf2 41
Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF2» στην TLR-4 διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων 41
Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF2» στο μεταβολισμό των μακροφάγων 42

Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF2» στην φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων 44
Συζήτηση 44
Συμπεράσματα 55
Μελλοντικές Προοπτικές 57
Βιβλιογραφία..... 58
Παράρτημα 1: Συνοπτική περιγραφή εξεταζόμενων γονιδίων και εκκρινόμενων μορίων 67

Εισαγωγή

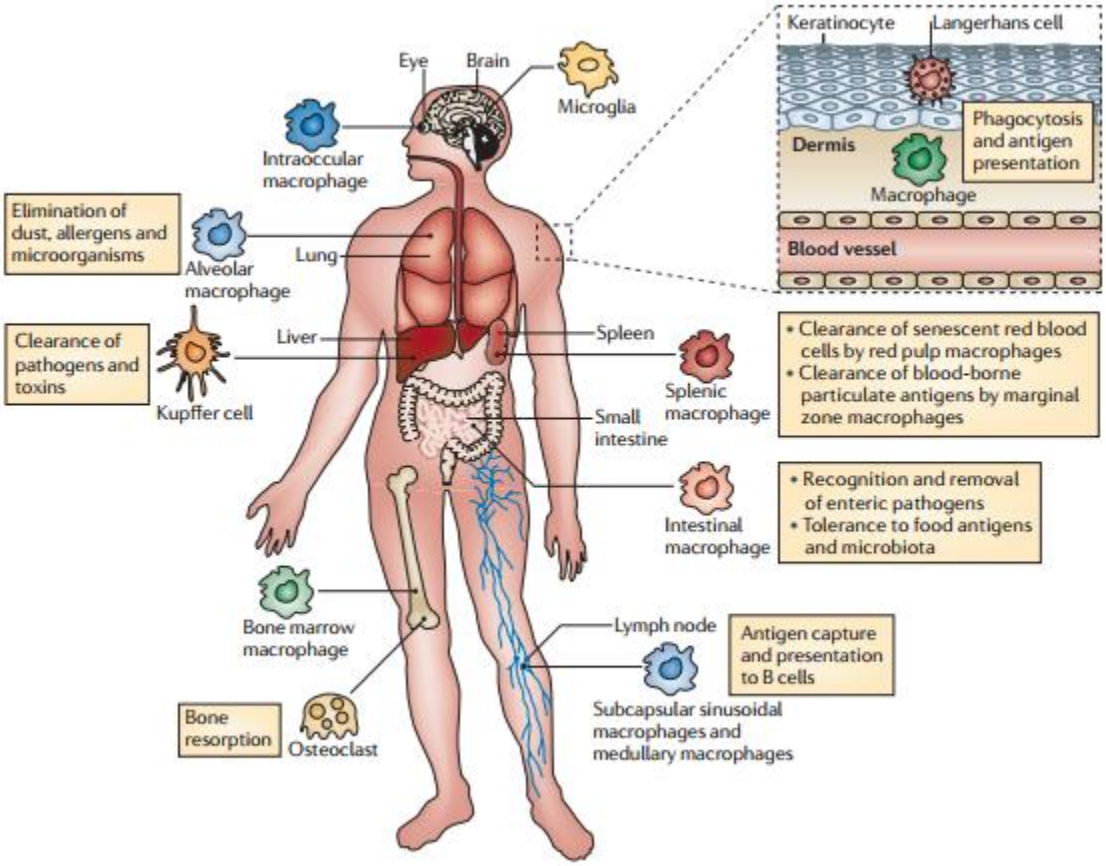
Μακροφάγα

Ο γενικός ρόλος των μακροφάγων

Τα μακροφάγα είναι μία κατηγορία κυττάρων που καλούνται να αναλάβουν πολλαπλές και κρίσιμες λειτουργίες. Για αρχή, ας τονιστεί ο κεντρικός τους ρόλος στην έμφυτη ανοσία ως μεσολαβητές των φλεγμονωδών αποκρίσεων και στην επαγωγή της προσαρμοστικής ανοσίας μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Θεμελιώδης ευθύνη τους είναι η ανοσολογική επιτήρηση, η επαγωγή και ο τερματισμός της φλεγμονής.

Τα μακροφάγα, μαζί με τα μονοκύτταρα, τα δεντροκύτταρα και τα ουδετερόφιλα, χαρακτηρίζονται ως φαγοκύτταρα-επαγγελματίες, καθώς είναι ιδιαίτερα ικανά στη διαδικασία της φαγοκύτωσης. Εκφράζουν στην επιφάνειά τους πολλαπλούς υποδοχείς που ανιχνεύουν παράγοντες οι οποίοι φυσιολογικά δεν εντοπίζονται σε υγιείς ιστούς και, επομένως, θα πρέπει να απομακρυνθούν ή/και να κοινοποιηθούν σε άλλες κατηγορίες κυττάρων, όπως τα λεμφοκύτταρα, με τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης ή της έκκρισης σηματοδοτικών μορίων (πχ κυτοκίνες). Τέτοιοι παράγοντες, μεταξύ άλλων, μπορεί να είναι αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα ή κυτταρικά θραύσματα, παθογόνοι μικροοργανισμοί, καθώς και εκκρινόμενες ουσίες αυτών[4]. Σε αντίθεση με τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα παρουσιάζουν εκτεταμένο χρόνο ημιζωής και δύνανται να αυτό-ανανεώνονται[5,6].

Έτσι, τα μακροφάγα βρίσκονται σε διαρκή επιτήρηση του μικροπεριβάλλοντός τους για σήματα κινδύνου και, όταν χρειάζεται, επάγουν φλεγμονή, την οποία καταστέλλουν, εφόσον αντιμετωπιστεί η αιτία που την πυροδότησε, ώστε να επαναφέρουν την ιστική ομοιοστασία έπειτα από μικροβιακή μόλυνση ή τραυματισμό. Επιπρόσθετα, τα μακροφάγα παρέχουν σημαντικά τροφικά σήματα στο μικροπεριβάλλον που τα φιλοξενεί[7], ενώ συμμετέχουν, παράλληλα, στην επιδιόρθωση και αναγέννηση των ιστών[4,8–11]. Είναι υπεύθυνα για βασικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η ανακύκλωση του σιδήρου μέσω της φαγοκυττάρωσης των ερυθροκυττάρων[1], ενώ εμπλέκονται σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις (π.χ., αθηροσκλήρωση), σε αυτοάνοσα και μεταβολικά νοσήματα (π.χ., διαβήτης, παχυσαρκία), στον καρκίνο, σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες και σε δερματοπάθειες, μεταξύ αρκετών άλλων[12].



Εικόνα 1: ***Τα μακροφάγα των ιστών επιτελούν σημαντικές ομοιοστατικές λειτουργίες.*** *Ποικίλοι πληθυσμοί ώριμων ιστικών μακροφάγων είναι στρατηγικά τοποθετημένα καθόλη την έκταση του σώματος και πραγματοποιούν κρίσιμες δράσεις ανοσοεπιτήρησης, όπως η φαγοκυττάρωση, η αντιγονοπαρουσίαση και η ανοσοκαταστολή*[4]*.*

Οντογένεση των μακροφάγων

Η πλειοψηφία των ιστικών μακροφάγων προέρχεται από τον λεκιθικό σάκο κατά το στάδιο της εμβρυογένεσης, καθώς και από το εμβρυικό ήπαρ, με μια διαδικασία ανεξάρτητη της αιμοποίησης. Η επακόλουθη διεργασία της αιμοποίησης συνιστά επιπρόσθετη πηγή μακροφάγων, κατά την οποία τα τελευταία προκύπτουν από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών, αφότου περάσουν από το ενδιάμεσο στάδιο των μονοκυττάρων[13,14]. Κατά το τελευταίο, πρόδρομα κύτταρα μακροφάγων (μονοκύτταρα) απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου παραμένουν για μερικές ημέρες, μέχρι τη μετανάστευσή τους στους διάφορους σωματικούς ιστούς, όπου θα ανανεώσουν τον πληθυσμό των μακροφάγων. Σημειωτέον, ο σπλήνας συνιστά σημαντική αποθηκευτική δεξαμενή τέτοιων ανώριμων κυττάρων[4,15]. Η περιεκτικότητα των ιστών σε μακροφάγα από την αιμοποιητική διαδικασία ή το εμβρυικό στάδιο είναι ιστοειδική και επιδρά στη λειτουργία αυτών των κυττάρων[14].

Ετερογένεια και μακροφάγα

Τα μακροφάγα είναι ένας κυτταρικός πληθυσμός χαρακτηριζόμενος από ιδιαίτερη πλαστικότητα. Οι διαφορετικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος των μακροφάγων στους ποικίλους ιστούς αντανακλάται στα ειδικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε μακροφαγικού υποπληθυσμού. Ανάλογα με τον ιστό στον οποίον έχουν εγκατασταθεί, τα μακροφάγα

διακρίνονται, ενδεικτικά, σε οστεοκλάστες (οστά), κυψελιδικά (πνεύμονες), ιστιοκύτταρα (συνδετικός ιστός) και κύτταρα του Kupffer (ήπαρ), κ.ο.κ. (εικόνα 1).

Επιπρόσθετα, γεγονότα όπως η μικροβιακή μόλυνση, λοίμωξη ή ο τραυματισμός των ιστών τροφοδοτούν περαιτέρω την ετερογένεια των μακροφάγων, πυροδοτώντας εκτεταμένες μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση και τον λειτουργικό ρόλο των συγκεκριμένων κυττάρων. Μάλιστα, μερικές από τις διαφορετικές λειτουργίες τους μπορεί ακόμα και να είναι αντιθετικές. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα μπορεί να παρουσιάζουν προφλεγμονώδη ή αντιφλεγμονώδη δράση, ανοσογόνο δράση ή δράση επαγωγής ανοσοανοχής, δράση καταστροφική για τους ιστούς ή δράση αποκατάστασης των ιστών[16].

Πρόκειται, επομένως, για μια κατηγορία κυττάρων με αξιοσημείωτη ποικιλομορφία, χωρίς, ωστόσο, να είναι ακόμα απόλυτα σαφές εάν ένα συγκεκριμένο μακροφάγο δύναται να υιοθετήσει το πλήθος των χαρακτηριστικών που υπαγορεύουν τα ποικίλα σήματα του μικροπεριβάλλοντός του σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ή εάν, στην πραγματικότητα, προϋπάρχουν διακριτές εξειδικευμένες λειτουργικές υποομάδες μακροφαγικών κυττάρων που ανταποκρίνονται στις διαφορετικές περιπτώσεις[4,17]. Πάντως, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για την εγγενή πλαστικότητα της λειτουργικότητας και των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης των μακροφάγων που συνηγορούν προς την πρώτη περίπτωση[18–22].

Ενεργοποίηση και πολικότητα μακροφάγων

Με μια ματιά

Αδρογραμμώς, παρουσία σημάτων κινδύνου τα τοπικά μακροφάγα πολώνονται προς μια φλεγμονώδη κατάσταση λειτουργίας και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται in situ υπό την επίδραση της IL-4, επάγεται η επιστράτευση των κυκλοφορόντων μονοκυττάρων, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, και αυξάνεται η παραγωγή του μυελού των οστών σε μονοκύτταρα (και ουδετερόφιλα)[23,24]. Στο μεταξύ, η απόκριση των μακροφάγων εξαρτάται από και πυροδοτεί πολύπλοκες ενδοκυττάριες και εξωκυττάριες σηματοδοτήσεις και διαδοχικές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις[25]. Φερειπείν, η παραγωγή της IFNγ από τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα 1 προϋποθέτει την παραγωγή της IL-12 από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, ώστε τελικά η IFNγ να ενεργοποιήσει το αντιμικροβιακό οπλοστάσιο των μακροφάγων[4,26].

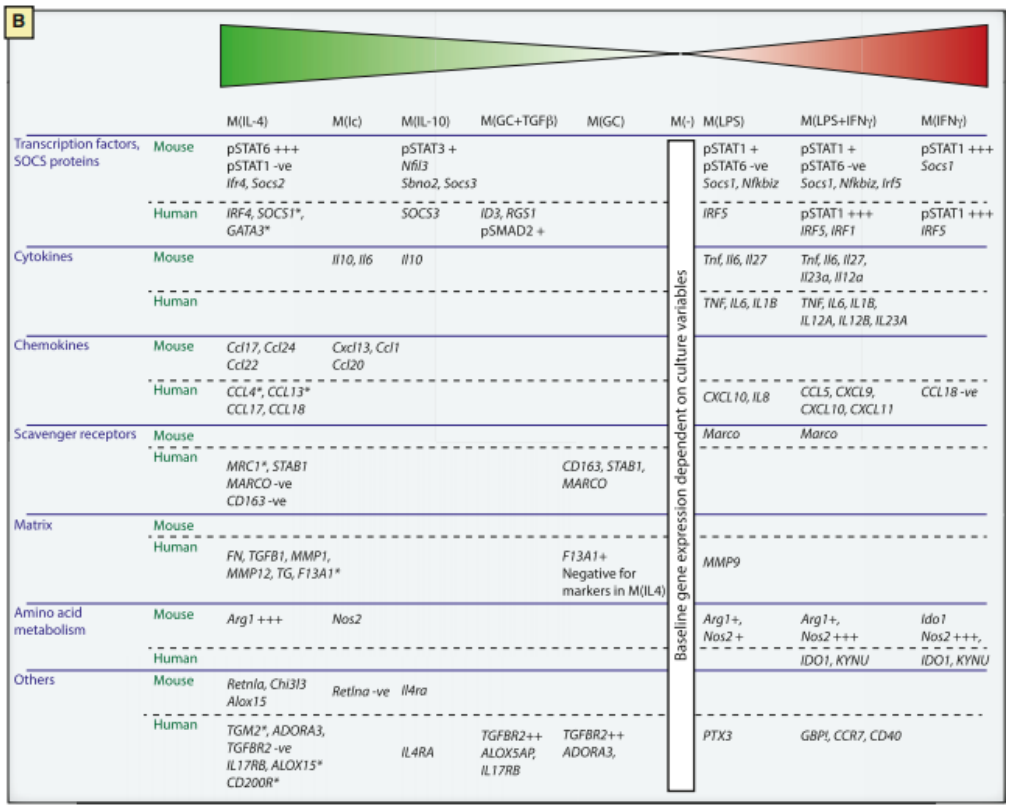
Όταν η φλεγμονή φτάσει σε προχωρημένο στάδιο και ο κίνδυνος έχει αντιμετωπιστεί, ακολουθεί η επαναπόλωση των μακροφάγων σε μια αντιφλεγμονώδη φάση, κεντρικό ρόλο στην οποία διαδραματίζει η απαραίτητη και μη πλεονάζουσα κυτοκίνη IL-10. Τα μακροφάγα, λοιπόν, συντελούν στον τερματισμό της πρώτης, προλαμβάνοντας την ενδεχόμενη ιστική βλάβη που θα μπορούσε να προκύψει από μια παρατεταμένη φλεγμονώδη αντίδραση, ενώ τα ίδια, πλέον, συνδράμουν στην επιδιόρθωση και την επαναφορά της ομοιοστασίας των ιστών, μέσω μιας διαδικασίας που φαίνεται να περιλαμβάνει την τροποποίηση της γενετικής τους έκφρασης και την έκκριση μορίων σχετιζόμενων με την κυτταρική μήτρα (matrix)[24,27]. Έναντι της επαναφοράς της ομοιοστασίας, υπάρχει, ωστόσο, το ενδεχόμενο να εγκαθιδρυθεί χρόνια φλεγμονή, μέσω λιγότερο κατανοητών μηχανισμών[4,28]. Τελικά, φαίνεται πως τα περισσότερα μακροφάγα που προέκυψαν από την επιστράτευση μονοκυττάρων είτε αποχωρούν από τον τόπο της φλεγμονής είτε, κυρίως, πεθαίνουν. Μερικά ενδέχεται να αποκτούν πανομοιότυπες ιδιότητες με τα τοπικά μακροφάγα και να εγκαθίστανται στους ιστούς[24].

Ονοματολογία

Στη σχετική με τη βιολογία των μακροφάγων βιβλιογραφία των τελευταίων χρόνων φαίνεται να επικρατεί μια σύγχυση όσον αφορά τον προσδιορισμό των διαφορετικών καταστάσεων «ενεργοποίησης» ή «πολικότητας» των μακροφαγικών υποπληθυσμών. Οι τελευταίες μπορούν να προκύψουν ή να επηρεαστούν πρακτικά από οποιοδήποτε ερέθισμα είναι ικανό να αναγνωρίσουν τα μακροφάγα, όπως μία κυτοκίνη, έναν αγωνιστή των TLR υποδοχέων, κάποιον αυξητικό παράγοντα (πχ CSF-1 και GM-CSF), μικρόβια και προϊόντα αυτών, νουκλεοτιδικά παράγωγα, γλυκοκορτικοειδή, αντισώματα κλπ. Οι διάφορες αυτές «ενεργοποιημένες» καταστάσεις χαρακτηρίζονται από διακριτά μοτίβα γονιδιακής έκφρασης και πρωτεϊνικής παραγωγής[29].

Όροι όπως «ρυθμιστικά» μακροφάγα, «M1» και «M2», «κλασική» και «εναλλακτική» ενεργοποίηση, και παράγωγα αυτών (πχ M2a, M2b κ.ο.κ.) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στις πρόσφατες ερευνητικές εργασίες, μα συχνά δεν είναι πολύ σαφές τι ακριβώς αντιπροσωπεύουν, καθώς δεν έχει συμφωνηθεί ένας αυστηρός ορισμός που να περιγράφει απόλυτα τους διαφορετικά ενεργοποιημένους μακροφαγικούς υποπληθυσμούς και έτσι υπεισέρχεται ο παράγοντας της υποκειμενικότητας της κάθε ερευνητικής ομάδας, δημιουργώντας παρανοήσεις στο συγκεκριμένο πεδίο έρευνας. Πάντως, διαδραματίζεται συλλογική προσπάθεια για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος. Η ιστορία και τα τεκμήρια της διαφορετικής ονοματολογίας περιγράφονται συνοπτικά στο άρθρο προοπτικής (perspective) των Murray et al. (2014)[29].

Στο ίδιο άρθρο[29] προτείνεται ως ένας καταλληλότερος τρόπος ονομάτισης εκείνος που προσδιορίζει τον παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων, δηλαδή M(IL-4), M(IFN-γ), M(LPS) κ.ο.κ., διατηρώντας παράλληλα την προϋπάρχουσα ιδέα του «φάσματος» ενεργοποίησης που είχε αναπτυχθεί ως προέκταση της θεωρίας M1-M2 πόλωσης των μακροφάγων[22,30–32], που είναι ένας νοητός άξονας διακριτών ή/και διαβαθμισμένων αποκρίσεων εξαρτώμενων από τα συγκλίνοντα σήματα των φλεγμονώδων ερεθισμάτων και του κυτταρικού περιβάλλοντος, με τις καταστάσεις M(IL-4) και M(IFN-γ) να αποτελούν τα δύο αντίθετα άκρα αυτού του άξονα (εικόνα 2). Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας κρίνεται σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί η «αναβαθμισμένη» έννοια του πολυεπίπεδου φάσματος μακροφαγικής ενεργοποίησης/πολικότητας M1-M2.



Εικόνα 2: Μία προσέγγιση του «φάσματος ενεργοποίησης» των μακροφάγων, όπου αναγράφονται οι αντίστοιχοι μάρτυρες για κάθε διακριτή κατάσταση ενεργοποίησης[29].

Φάσμα ενεργοποίησης M1-M2

Αρχικά, οι καταστάσεις M1 και M2 αποτελούσαν τη βάση ενός απλοποιημένου δυαδικού μοντέλου κατά αντιστοιχία με τις διαφορετικές αποκρίσεις των Th1 και Th2 βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, τα οποία επιδρούν στα μακροφάγα μέσω της έκκρισης ουσιών όπως η IFN-γ ή η IL-4, αντίστοιχα.[33] Όπως προαναφέρθηκε, οι καταστάσεις M1-M2 μπορούν να προσδιοριστούν σαφέστερα επισημαίνοντας τον ενεργοποιητικό παράγοντα των μακροφάγων. Στο φάσμα M1 περιλαμβάνονται οι καταστάσεις M(IFN-γ), M(LPS+IFN-γ) και M(LPS) που προκύπτουν αντιστοίχως από την έκθεση των μακροφάγων μόνο σε IFN-γ, ταυτοχρόνως σε LPS και IFN-γ ή μόνο σε LPS. Οι καταστάσεις M(IL-4), M(Ic), M(IL-10), M(GC+TGFβ) και M(GC) συνθέτουν το ευρύτερο φάσμα ενεργοποίησης M2, όταν η σηματοδότηση οφείλεται σε IL-4, ανοσοσύμπλοκα ή γλυκοκορτικοειδή συνδυαστικά με ή χωρίς TGFβ, αντίστοιχα (εικόνα 2)[29]. Η IL-13 χρησιμοποιείται επίσης για την επαγωγή της M2 πόλωσης.

Σε αδρές γραμμές, τα M1 μακροφάγα εντοπίζονται σε συνθήκες φλεγμονής, που καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σηματοδότηση των TLR υποδοχέων και των ιντερφερονών, και συνδέονται με την ανοσία έναντι βακτηρίων και ενδοκυττάριων παθογόνων[24]. Εκκρίνουν νιτρικό οξείδιο (NO) καθώς και πλήθος προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως TNF-α, IL-6 και IL-12[3]. Ειδικότερα, τα M(IFN-γ) μακροφάγα σχετίζονται με περιπτώσεις στις οποίες η παραγόμενη από τα Th1 κύτταρα IFN-γ είναι άφθονη. Τα M(LPS) και τα M(LPS+IFN-γ) μακροφάγα εντοπίζονται σε μολύνσεις από Gram-αρνητικά βακτήρια, πριν και μετά την παραγωγή IFN-γ από τα Th1 κύτταρα, αντίστοιχα[28].

Τα M2 μακροφάγα εμπλέκονται σε μολύνσεις από παράσιτα (π.χ., έλμινθες), την επιδιόρθωση των ιστών ή παθολογίες όπως το άσθμα[34,35] (υψηλά επίπεδα IL-4), η ρευματοειδής αρθρίτιδα[36] και το σκληρόδερμα[37] (ενεργοποίηση από ανοσοσύμπλοκα), το καρκινικό στρώμα ή οι φλεγμένοι ιστοί[38,39] (ενεργοποίηση από IL-10), τα προχωρημένα στάδια σήψης[40,41] ή του καρκίνου[41,42] (υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών)[4,28]. Εκκρίνουν παράγοντες επίλυσης της φλεγμονής όπως IL-10, YM1, MRC1, and FIZZ1[1]. Τα χαρακτηριστικά της πόλωσης των μακροφάγων σε περιπτώσεις φλεγμονής που δεν επιλύεται, όπως συμβαίνει με τους στερεούς όγκους, είναι πολύ δυσκολότερο να προσδιοριστούν με έναν συστηματικό τρόπο[43].

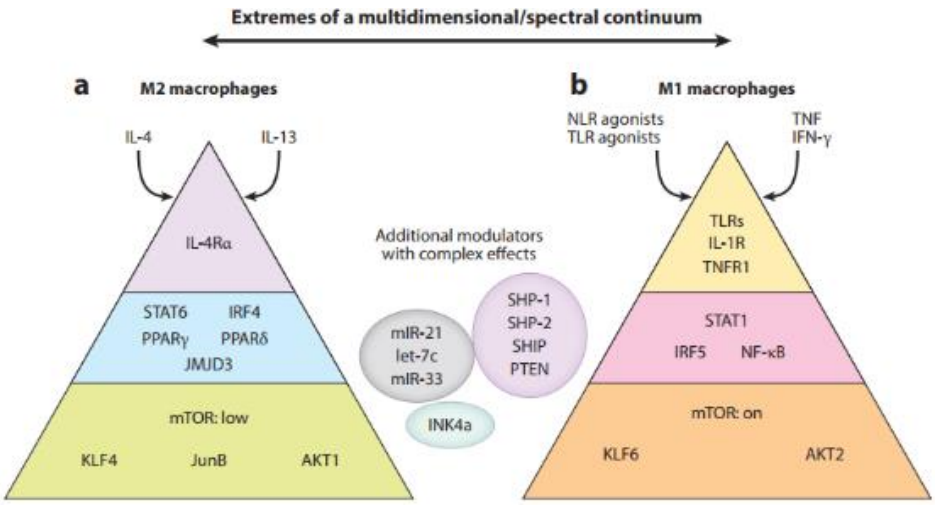
Ρύθμιση πολικότητας

Η τοπικά και χρονικά κατάλληλη ενεργοποίηση των μακροφάγων προς έναν συγκεκριμένο λειτουργικό φαινότυπο είναι απαραίτητη για την κυτταρική και οργανισμική ομοιοστασία και προϋποθέτει μηχανισμούς αυστηρής, μα, ταυτόχρονα, ταχείας ρύθμισης των εμπλεκόμενων γονιδιακών προγραμμάτων, οι οποίοι δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί μοριακά. Μη ειδική επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης συνεπάγεται περιττές φλεγμονώδεις αντιδράσεις, οι οποίες, τελικά, συνεισφέρουν στην ανάπτυξη πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως ο διαβήτης τύπου 2[44], η αθηροσκλήρωση[45] ή κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες[46].

Ένα θεμελιώδες επίπεδο ρύθμισης πραγματοποιείται στο μεταγραφικό επίπεδο, κατά το οποίο προσλαμβάνονται τα συγκλίνοντα ενεργοποιητικά ερεθίσματα και κινητοποιούνται τα αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια, που θα οδηγήσουν σε διαφορική γονιδιακή έκφραση και εκκριτική δραστηριότητα . Τα τελευταία περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, το PI3K/Akt, το JAK/STAT, το C-Jun N-terminal kinase (JNK) και το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι[47]. Για παράδειγμα, κατόπιν έκθεσης των μακροφάγων σε IFNγ, φωσφορυλιώνεται ο STAT1, εισέρχεται στον πυρήνα και προσδένεται σε υποκινητές προ-φλεγμονώδων γονιδίων, ελέγχοντας την έκφραση των τελευταίων[48].

Με γενετικά πειράματα έχει δειχθεί πως για την M2 πόλωση των μακροφάγων απαιτούνται ή συνεισφέρουν η IL-4, η IL-13, ο IL-4R υποδοχέας, ο STAT6, καθώς και σημαντικοί κάτωθεν (downstream) μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι IRF4, JMJD3, PPARγ και PPARδ. Ο TNF φαίνεται να συνιστά τον κύριο αντι-M2 παράγοντα και εκτιμάται πως σε περιπτώσεις φλεγμονής η σημαντική μείωση του TNF θα ωθήσει την M2 κατάσταση, δεδομένου ότι υπάρχουν οι αντίστοιχες ευνοϊκές συνθήκες, όπως η ύπαρξη της IL-4 ή της IL-13. Στην M1 πόλωση εμπλέκονται ο υποδοχέας της IFN-γ, οι TLR και IL-1R υποδοχείς, ο TNF, ο IRF5, ενώ ιντερφερόνες τύπου 1 ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1, ο οποίος μαζί με τον NF-κB συνθέτουν πιθανά το κύριο M1 μονοπάτι[24]. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν μεταλλάγματα που επηρεάζουν με μη απόλυτο τρόπο την πολικότητα των μακροφάγων, τα οποία περιλαμβάνουν miRs, φωσφατάσες και μεταβολικούς ρυθμιστές.

[1] Η IL-10 και η Arg1 παράγονται επίσης από τα M1 μακροφάγα, αλλά σε μικρότερες ποσότητες[24].



Εικόνα 3: Εξωγενείς και εγγενείς παράγοντες ελέγχουν την πόλωση των μακροφάγων[24].

Ανταγωνιστικά Σήματα

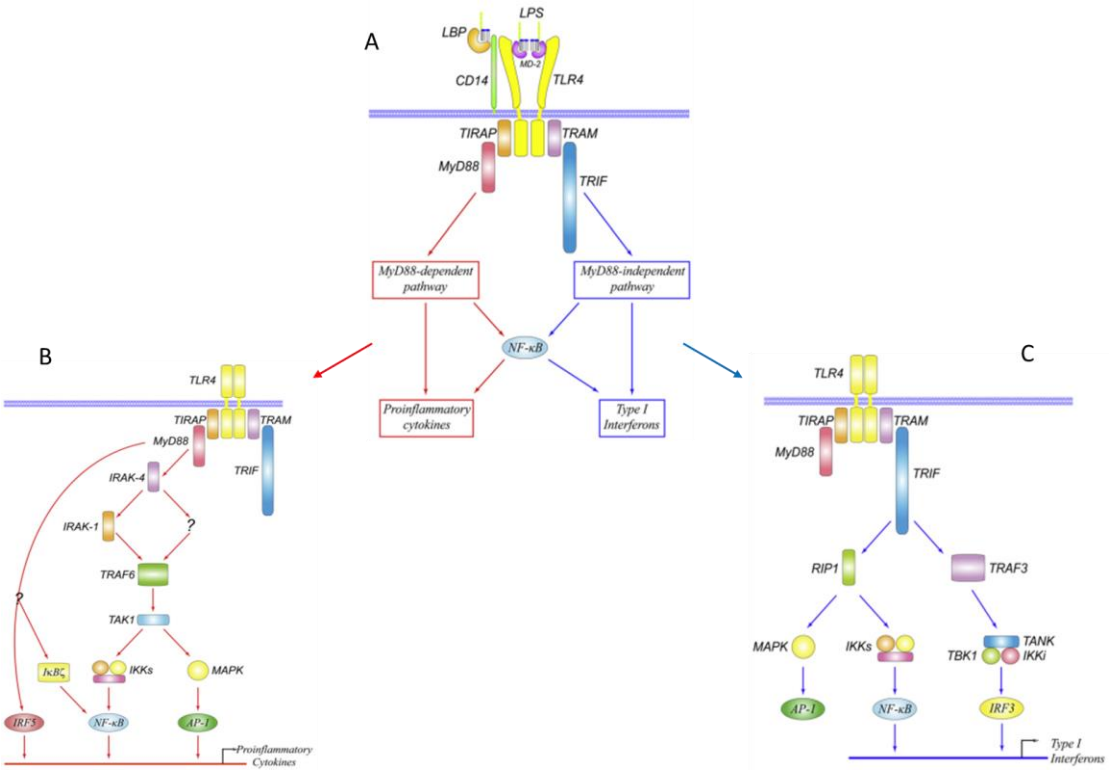
In vivo συχνά προκύπτουν περιπτώσεις που διέπονται από σήματα ανταγωνιστικά. Μία μόλυνση από ένα ενδοκυττάριο παθογόνο, όπως ένας ιός, και ένα παράσιτο, όπως ένας έλμινθας, θα προκαλούσε ταυτόχρονα τον καταιγισμό σηματοδοτικών μορίων (π.χ. IFN-γ και IL-4, αντίστοιχα) με αντικρουόμενη δράση ως προς την επαγωγή της M1 ή M2 πόλωσης των μακροφάγων. Ακόμη, υπάρχουν μικροοργανισμοί που πυροδοτούν παράλληλα M1 και M2 αποκρίσεις, όπως το *Leishmania major*[49]. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και σε περιπτώσεις καρκινικών όγκων ή κατά το στάδιο επίλυσης της φλεγμονής[50]. Είναι αναμενόμενο η ταυτόχρονη έκθεση των μακροφάγων σε ανταγωνιστικά σήματα να επηρεάζει τη βιολογία τους.

TLR4-διαμεσολαβούμενη Ανοσολογική Απόκριση

Ο TLR4 (toll-like receptor 4) είναι ένας υψηλά συντηρημένος διαμεμβρανικός υποδοχέας μοριακού βάρους 95 kDa, γνωστός και ως CD284, που ανήκει στην οικογένεια TLR, η οποία αποτελεί μέρος της οικογένειας υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (pattern recognition receptor family: PRR). Εκφράζεται σε αφθονία στον πλακούντα και στα λευκά αιμοσφαίρια. Παρότι προσδένει ένα πλήθος μορίων, είναι περισσότερο γνωστός για την ενεργοποίησή του από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ένα συστατικό κυρίως των γκραμ-αρνητικών (gram-negative) βακτηρίων. Η επαγωγή του μέσω LPS επάγει την έκκριση σημαντικών προ-φλεγμονώδων κυτοκινών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση ισχυρών ανοσολογικών αποκρίσεων[51].

Ο υποδοχέας TLR4 φέρει στην εξωτερική του πλευρά μια επικράτεια επαναλήψεων πλούσιων σε λευκίνη (leucine-rich repeated domain: LRR) και ενδοκυττάρια μια επικράτεια υποδοχέα διοδίου/ιντερλευκίνης-1 (toll/interleukin-1 receptor domain: TIR). Παρουσία LPS σχηματίζεται το σύμπλοκο TLR4 στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, το οποίο αποτελείται από αρκετές συμπληρωματικές πρωτεΐνες. Αλλαγές στη στερεοδιάταξη του υποδοχέα στρατολογούν ενδοκυττάριες πρωτεΐνες-προσαρμογείς (adaptor proteins) στην TIR επικράτειά του, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κάτωθεν σηματοδοτικών μονοπατιών[51].

Δύο διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να επαχθούν με την ενεργοποίηση του TLR4 υποδοχέα, τα οποία φαίνονται αναλυτικότερα στην εικόνα 4. Το ένα προϋποθέτει τους προσαρμογείς TIRAP [Toll/interleukin-1-receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein] και MyD88 και προκαλεί την παραγωγή προ-φλεγμωνώδων κυτοκινών. Το άλλο διαμεσολαβείται από τους προσαρμογείς TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β) και TRAM (TRIF-related adaptor molecule) και έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των ιντερφερονών τύπου I. Υπάρχει πλήθος αρνητικών ρυθμιστών της TLR4-διαμεσολαβούμενης σηματοδότησης σε ποικίλα επίπεδα.[51] Από κλινική άποψη, η TLR4-διαμεσολαβούμενη σηματοδότηση έχει συσχετιστεί με προ-καρκινική δράση[52] και αντίσταση στην ινσουλίνη[53].



Εικόνα 4: Ανασκόπηση της σηματοδότησης TLR4[51].

Επιγενετική Ρύθμιση

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων δεν ρυθμίζεται μόνο σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό ή μεταφραστικό επίπεδο, αλλά, επίσης, σε επιγενετικό. Φαίνεται πως τα μακροφάγα ενσωματώνουν τα σήματα του μικροπεριβάλλοντός τους αναδιαμορφώνοντας τη χρωματινική δομή τους, γεγονός που με τη σειρά του επηρεάζει τον μεταγραφικό και λειτουργικό φαινότυπό τους. Μάλιστα, τα μακροφάγα των ποικίλων ιστών φέρουν διακριτά αποτυπώματα χρωματίνης, τα οποία αντανακλούν την ιστο-ειδική τους λειτουργία. Στρεσσογόνα σήματα μπορούν, επιπρόσθετα, να πυροδοτήσουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με τέτοιον τρόπο, ώστε τα κύτταρα να επέλθουν σε μία κατάσταση «ετοιμότητας» για την αντιμετώπιση μελλοντικών προκλήσεων. Το φαινόμενο κατά το οποίο τροποποιούνται οι μελλοντικές αποκρίσεις της έμφυτης ανοσίας λόγω της παρελθοντικής έκθεσης σε ένα σήμα ονομάστηκε «εκπαιδευόμενη ανοσία» ή «έμφυτη μνήμη» («trained immunity» ή «innate memory», αντίστοιχα)[12,54,55]. Γενικά, έχει αρχίσει να πιστεύεται πως η

επιγενετική ρύθμιση μάλλον αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της πλαστικότητας των μονοκυττάρων, αφενός, και των μακροφάγων, αφετέρου, τόσο κατά την ομοιοστασία του οργανισμού όσο και σε περιπτώσεις οξείας ή χρόνιας φλεγμονής[12]. Ποικίλες μελέτες συνηγορούν στην καταστολή ομάδων γονιδίων που εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις πριν την έκθεση σε ανάλογα σήματα, μέσω συμπλόκων συγκαταστολέων, όπως τα NCOR, SMRT και COREST[56–59].

Η ρύθμιση στο επιγενετικό επίπεδο εμπλέκει τη δράση των ενζύμων τροποποίησης των ιστονών, τα οποία προκαλούν ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα των ουρών των ιστονών. Τέτοια ένζυμα περιλαμβάνουν τις ακετυλοτρανσφεράσες και απακετυλάσες ιστονών, καθώς και τις μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες ιστονών. Η δράση των τελευταίων έχει συσχετιστεί άμεσα με τη ρύθμιση της ενεργότητας των μακροφάγων[2]. Η θέση του τροποποιημένου καταλοίπου της ιστόνης και του είδους της τροποποίησης, οι τροποποιήσεις των γειτονικών καταλοίπων και η παραλλαγή της ίδιας της ιστόνης, μπορεί να μεταβάλλουν το αποτέλεσμα.

Απομεθυλάσες ιστονών: PHF2 και PHF8

Δύο ένζυμα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη μελέτη των διαφορετικών αποκρίσεων των μακροφάγων είναι η PHF2 (KDM7C) και η PHF8 (KDM7B). Οι δύο πρωτεΐνες, μαζί με την KIAA1718 (KDM7A), ανήκουν στην ίδια υποοικογένεια απομεθυλασών των ιστονών (KDM7) και διαθέτουν από μια plant homeodomain (PHD) επικράτεια στο αμινοτελικό άκρο τους, που αναγνωρίζει και προσδένεται σε μοτίβα μεθυλιωμένης λυσίνης και μια Jumonji C (JmjC) επικράτεια, που καταλύει απομεθυλίωση λυσινών ιστονών. Μια ενδιάμεση εύκαμπτη περιοχή συνδέει τις δύο παραπάνω επικράτειες. Οι πρωτεΐνες με JmjC επικράτεια είναι Fe(II)- και 2-οξογλουταρικό- (oxoglutarate) (2OG-) εξαρτώμενες διοξυγενάσες, που ζευγνύουν την οξείδωση ενός υποστρώματος με την αποκαρβοξυλίωση του 2OG, σχηματίζοντας ηλεκτρικό (succinate) και CO_2[60,61].

Η υποοικογένεια KDM7 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο, καθώς η ανάπτυξη ορισμένων τύπων όγκων προωθείται από αυτήν, ενώ ή αύξηση άλλων καρκινικών όγκων παρεμποδίζεται[62]. Έχει δειχθεί πως η PHF8 και η PHF2 μπορεί να ανταγωνίζονται η μία την άλλη in vitro για την πρόσδεση της H3K4me3 μέσω των PHD επικρατειών τους[63]. Η στόχευση των δύο ενζύμων στους κατάλληλους υποκινητές γονιδίων και η ικανότητά τους να απομεθυλιώνουν ορισμένα κατάλοιπα φαίνεται να εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση τους.

Γενική δράση της απομεθυλάσης PHF2

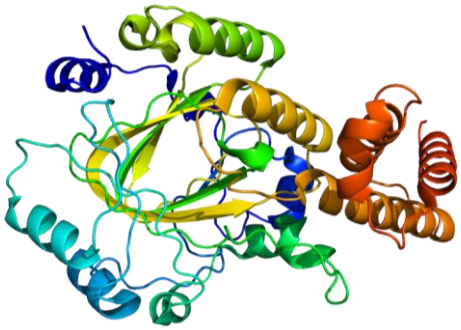
Έχει αναφερθεί πως η PHF2 μπορεί να δράσει και ως μεταγραφικός συγκαταστολέας (γονιδίων που ρυθμίζονται από τις Pol I και Pol II[63,64]) και ως συνενεργοποιητής (προ-φλεγμονώδων γονιδίων[65]). Γενικά, παρουσιάζει χαμηλή δραστηριότητα απομεθυλίωσης[62]. Μέσω της PHD επικράτειας, προσδένει H3K4me2/3 και απομεθυλιώνει H3K9me1 in vivo[66], αν και η τελευταία παρατήρηση δεν έχει επιβεβαιωθεί in vitro[67]. Η συγγένεια πρόσδεσης για την H3K4me3 είναι 4 φορές ισχυρότερη συγκριτικά με την PHF8[62]. Επιπρόσθετα, απομεθυλιώνει H4K20me3, ενώ, όταν φωσφορυλιωθεί από την PKA, απομεθυλιώνει και H3K9me2. Μεταξύ άλλων, είναι θετικός ρυθμιστής της αδιπογένεσης και, αλληλεπιδρώντας με τον NF-κB, των φλεγμονώδων αποκρίσεων[65]. Καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων ριβοσωμικών RNA[63], αποτρέπει την πρόοδο της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος

(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) στην παχυσαρκία ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό υδατανθράκων[68], ελέγχει την έκφραση σημαντικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου και αποτρέπει τη γονιδιακή βλάβη και αστάθεια[69]. Επίσης, έχει συσχετιστεί με την καταστολή αρκετών τύπων καρκίνου[62].

Μία σημαντική εργασία υπέδειξε πρόσφατα τον πιθανό ρόλο της PHF2 στην ανοσολογική δράση των μακροφάγων. Συγκεκριμένα, προτάθηκε πως η ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης των μακροφάγων μέσω του TLR4, που περιλαμβάνει την έκφραση γονιδίων όπως του Tnf-α και του Cxcl10, επιτυγχάνεται με την απομεθυλίωση της H4K20m3 από την PHF2, η οποία κατευθύνεται στα γονίδια-στόχους από τον NF-κB[65].

Γενική δράση της απομεθυλάσης PHF8

Η PHF8 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και η οποία προσδένεται κατά μήκος όλου του γονιδιώματος σε πλήθος υποκινητών. Ωστόσο, η παρουσία της δεν συσχετίζεται πάντα με ενεργοποίηση της μεταγραφής[70]. Είναι απαραίτητη για την νευρική ανάπτυξη, ιδιαίτερα για τη νευρική διαφοροποίηση[71] και την απόκτηση κατάλληλης νευρικής μορφολογίας[72]. Η PHF8 ελέγχει την έκφραση πλήθους γονιδίων[73], που εμπλέκονται, για παράδειγμα, στον κυτταρικό κύκλο[74], τον κυτταροσκελετό[72], ή τη σηματοδότηση Notch1[75]. Εμπλέκεται σε ποικίλους τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα, η αφαίρεσή της από καρκινικά κύτταρα προστάτη είναι αποτελεσματική στην παρεμπόδιση της αύξησης και της μετάστασης του αντίστοιχου καρκίνου, ενώ υπερεκφράζεται σε πλήθος άλλων, όπως στον καρκίνο του μαστού. Μεταλλαγές στην PHF8 μπορεί να οδηγήσουν σε θανατηφόρα βιολογική δυσλειτουργία[62], ενώ ορισμένες εμπλέκονται στη συνδεόμενη με το X χρωμόσωμα νοητική στέρηση με λαγόχειλο/λυκόστομα (cleft lip/cleft palate)[76], καθώς και σε σύνδρομα αυτισμού (ASDs)[77], τα οποία έχουν συσχετιστεί με νευροφλεγμονή[78].



Εικόνα 5: Η δομή της PHF8[62].

Η PHF8 προσδένει H3K4me3 (ενεργοποιητικός επιγενετικός δείκτης[79]), που εντοπίζονται κυρίως σε σημεία έναρξης της μεταγραφής ενεργών υποκινητών ή υποκινητών σε ετοιμότητα (poised) και δρα ως συνεργοποιητής[80], ενδεχομένως αλληλεπιδρώντας με το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II (RNAPII)[81], και απομεθυλιώνει H3K9me1/2, ή H3K27me2 ή H4K20me1/2[70,74,82–85]. Η PHF8 συνιστά τη μοναδική απομεθυλάση ιστονών ικανή για την απομεθυλίωση της H4K20me1, αν και πολύ πρόσφατα παρατηρήθηκε η ίδια δράση σε δύο hHR23 πρωτεΐνες[86]. Η H4K20me1 έχει συσχετιστεί τόσο με μεταγραφική ενεργοποίηση[64,87–89] όσο και καταστολή[90,91], και τα επίπεδά της εξαρτώνται αυστηρά από τη φάση του κυτταρικού

κύκλου, επομένως, υπάρχει το ενδεχόμενο η PHF8, πέρα από μεταγραφικός ενεργοποιητής, να δρα και ως μεταγραφικός καταστολέας[59] με χωρο- και χρονο- εξαρτώμενο τρόπο[59]. Σε μια in silico εργασία, προτάθηκε πως η PHF8 συμμετέχει στη συγκαταστολή γονιδίων μέσω του συμπλόκου REST/NRSF[92].

Εμπλοκή της απομεθυλάσης PHF8 στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης των μακροφάγων

Λίγα είναι γνωστά για τη δράση της PHF8 στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και τη φλεγμονή. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, η ικανότητα της φωσφορυλιωμένης PHF8 να απομεθυλιώνει H3K9me2 καθορίζει τον φλεγμονώδη φαινότυπο των μακροφάγων που έχουν υποστεί οξεία ενεργοποίηση με LPS, μέσω επαναπρογραμματισμού των τροποποιήσεων χρωματίνης που ευνοούν την μεταγραφική ενεργοποίηση προ-φλεγμονώδων γονιδίων. Μελετώντας το PHF8-εξαρτώμενο secretome των μακροφάγων, παρατηρήθηκε ότι αυτό σχετίζεται με την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων[93]. Έτσι, η επιγενετική δράση της PHF8 συνδέθηκε με τη ρύθμιση φλεγμονωδών αποκρίσεων στα μακροφάγα και την μετέπειτα ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας.

Πρόσφατα, δείχθηκε, επίσης, πως η PHF8 μπορεί, πέρα από τον ρόλο της ως συνενεργοποιητής, να παρεμποδίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα ορισμένων γονιδίων ανοσολογικής απόκρισης, ώστε να εξασφαλίσει περισσότερη ειδικότητα και ακρίβεια στην επαγωγή της τελευταίας. Ειδικότερα, παρουσιάστηκε ότι αλληλεπιδρά με τους συγκαταστολείς SIN3A και HDAC1 διατηρώντας σε σίγηση μια ομάδα IFNγ-σχετιζόμενων υποκινητών και χαμηλά επίπεδα H4K20me1. Κατόπιν έκθεσης σε IFNγ, η PHF8 φωσφορυλιώνεται από την ERK2, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται από τους παραπάνω υποκινητές, γεγονός που συνοδεύεται από αύξηση των H4K20me1 επιπέδων και μεταγραφική ενεργοποίηση[59].

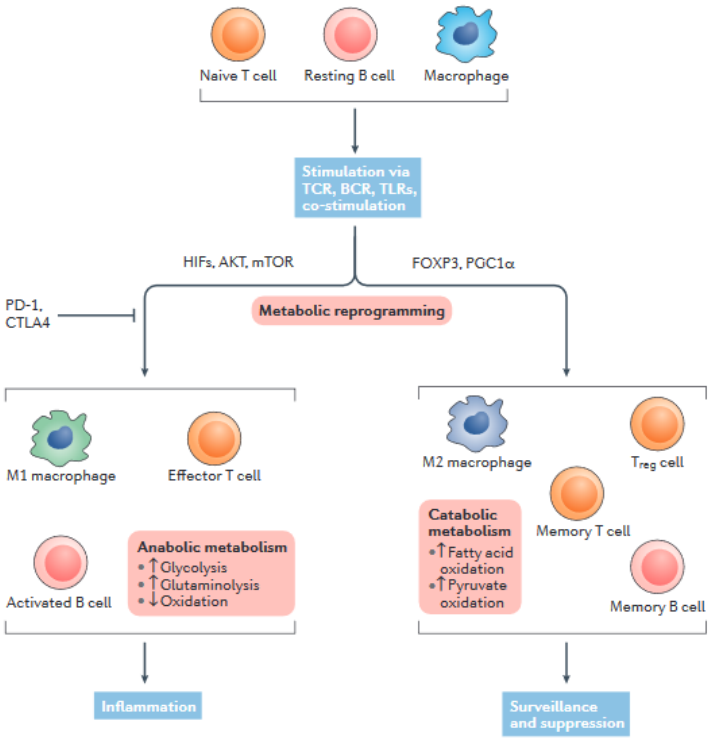
Ανοσομεταβολισμός

Έχει πλέον αρχίσει να συσσωρεύεται άφθονο υλικό που να καταδεικνύει πως οι μεταβολικές διεργασίες δεν αποσκοπούν μονάχα στην κυτταρική αύξηση και συντήρηση, μα πως, επιπρόσθετα, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Η γενική πεποίθηση είναι πως τα M1 μακροφάγα στρέφονται προς τη γλυκόλυση ως την κύρια πηγή ενέργειας, ενώ η κατανάλωση οξυγόνου και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) εξασθενούν. Αυτό μπορεί αρχικά να φαίνεται παράδοξο, δεδομένου ότι η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει 36 μόρια ATP, ενώ η γλυκόλυση μόλις 2 ανά μόριο γλυκόζης. Αρκεί, ωστόσο, να αναλογιστεί κανείς ότι η γλυκόλυση μπορεί να επαχθεί σε υψηλό βαθμό πολύ γρηγορότερα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία προϋποθέτει την πιο χρονοβόρα διαδικασία βιογένεσης μιτοχονδρίων. Επιπλέον, η γλυκόλυση παρέχει βιοσυνθετικά ενδιάμεσα μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης, συμπεριλαμβανομένων άλλων μονοπατιών και διεργασιών, που είναι κρίσιμα για την ενεργοποίηση και λειτουργία των μακροφάγων[94,95].

Η αυξημένη γλυκόλυση στα φλεγμονώδη μακροφάγα εξαρτάται σημαντικά από τον HIF1a, ο οποίος, πέρα από τις συνθήκες υποξίας, έχει δειχθεί ότι επάγεται και σε απόκριση προ-φλεγμονώδων ερεθισμάτων, όπως το LPS, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) αποτελεί άλλη μία σπουδαία μεταβολική συνιστώσα που επιδρά ιδιαίτερα στην ανοσολογική απόκριση, καθώς μέσα από αυτόν

προκύπτουν ενδιάμεσα μόρια που είναι απαραίτητα στα διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια. Στα M1 μακροφάγα διασπάται σε δύο τμήματα, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται συγκεκριμένοι μεταβολίτες, όπως το κιτρικό, το ιτακονικό (itaconate) και το ηλεκτρικό, τα οποία πυροδοτούν προ-φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το κιτρικό, για παράδειγμα, ωθεί τη σύνθεση λιπαρών οξέων και την ακετυλίωση ιστονών, και αποτελεί πρόδρομο για το ιτακονικό, που είναι ένας από τους πιο υψηλά επαγώμενους μεταβολίτες στα ενεργοποιημένα από LPS μακροφάγα. Τα M1 μακροφάγα διεκπεραιώνουν πρωτίστως τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (FAS), έναντι της οξείδωσης των τελευταίων, καθώς η επακόλουθη λιπογένεση χρειάζεται στην αναδιαμόρφωση της πλασματικής μεμβράνης και της σύνθεσης φλεγμονωδών διαμεσολαβητών[94,95].

Αντιφλεγμονώδη σήματα, όπως η IL-4 ή η IL-10 καταστέλλουν τη γλυκόλυση στα μακροφάγα και επάγουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, π.χ., μέσω ενεργοποίησης του STAT6 και του PGC-1β. Τα μακροφάγα σε κατάσταση ηρεμίας ή τα πολωμένα προς έναν M2 φαινότυπο θεωρείται, λοιπόν, πως στηρίζονται, ως επί το πλείστων, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, που ενισχύεται από την πρόσληψη λιπαρών οξέων, τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται (FAO), ενώ έχουν άθικτο τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Ο άθικτος TCA πιστεύεται ότι συνεισφέρει στην UDP-GlcNAc-διαμεσολαβούμενη γλυκοζυλίωση των υποδοχέων λεκτίνης και μαννόζης, που είναι υψηλά εκφραζόμενοι στα M2 μακροφάγα. Τελευταία έχει αρχίσει να πιστεύεται πως και η γλυκόλυση φέρει σημαντική θέση στη λειτουργία των M2 μακροφάγων[94,95].



Εικόνα 6: Ο μεταβολισμός των μακροφάγων επιδρά στην ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων[96].

Σύνδεση μεταβολισμού-επιγενετικής

Ο συνδυασμός της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και της έκφρασης μεταβολικών ενζύμων μπορεί να επιδράσει στην επιγενετική ρύθμιση των κυττάρων. Η εξάρτηση των ενζύμων απομεθυλίωσης ιστονών με επικράτεια JMJC (συμπεριλαμβανομένων των PHF8 και PHF2) από το οξυγόνο και το α-κετογλουταρικό ως συν-υποστρώματα καθιστά το ρυθμό

απομεθυλίωσης ευαίσθητο τόσο στην οξυγόνωση όσο και στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Από τους μεταβολίτες του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, το α-κετογλουταρικό προωθεί την απομεθυλίωση, ενώ το ηλεκτρικό (succinate) και το φουμαρικό (fumarate) την παρεμποδίζουν. Το κιτρικό μπορεί να μετατραπεί σε ακετυλ-CoA και να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ακετυλίωση ιστονών. Η συσσώρευση γαλακτικού από την LPS-επαγόμενη γλυκόλυση έχει ήπια κατασταλτική δράση έναντι των απακετυλασών ιστονών τύπου II. Η σηματοδότηση μέσω TLR υποδοχέων οδηγεί σε τροποποιημένες αναλογίες NAD^+/NADH, γεγονός που επιδρά στην ενεργότητα των απακετυλασών ιστονών τύπου III, SIRT1 και SIRT6, ενδεχομένως μεταβάλλοντας την απακετυλίωση ιστονών ή άλλων υποστρωμάτων. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το ενδεχόμενο μεταβολικά μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκουν μόρια όπως η ινσουλίνη και ο HIF να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην βραχυπρόθεσμη προσαρμογή των κυττάρων, ενώ οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης να συνεισφέρουν σε μακροπρόθεσμες προσαρμογές απέναντι στη διαθεσιμότητα οξυγόνου και μεταβολιτών ή άλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα[97,98].

Υλικά και Μέθοδοι

Πειραματόζωα

Όλοι οι μύες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη είχαν γενετικό υπόβαθρο C57BL/6J. Τα ζώα στεγάζονταν στο ζωοκομείο του Πανεπιστημίου Κρήτης στη σταθερή θερμοκρασία των 25°C με δωδεκάωρο κύκλο φωτός-σκοταδιού.

Κυττατοκαλλιέργειες

Όλα τα κύτταρα καλλιεργούνταν στους 37°C με 5% CO_2.

Raw264.7

Η ποντικίσια κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7[99] καλλιεργούνταν σε θρεπτικό DMEM (Gibco, 21885-025) συμπληρωμένο με 10% (v/v) θερμικά αδρανοποιημένο FBS [Fetal Bovine Serum (Gibco, 10270-106)] και 1% (v/v) πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco, 15070-063).

Ο φαινότυπος (δηλαδή η έκφραση ειδικών για τα μακροφάγα γονιδίων και επιφανειακών μαρτύρων) και λειτουργικά χαρακτηριστικά (όπως η φαγοκύτωση και η παραγωγή νιτρικού οξέος) έχει δειχθεί ότι παραμένουν σταθερά στην κυτταρική σειρά αυτή από το πέρασμα (passage) 10 μέχρι το πέρασμα 30[100]. Όλα τα πειράματα αυτής της εργασίας εκτελέστηκαν με κύτταρα εντός του προαναφερθέντος πλαισίου (21-26).

HEK 293T

Τα ανθρώπινα εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα 293T (Human Embryonic Kidney 293T: HEK 293T) καλλιεργούνταν σε θρεπτικό DMEM medium (Gibco, 41996-029) συμπληρωμένο με 10% (v/v) θερμικά αδρανοποιημένο FBS [Fetal Bovine Serum (Gibco, 10270-106)] και 1% (v/v) πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco, 15070-063).

Απομόνωση βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών (Bone Marrow Cells: BMCs) και διαφοροποίηση σε μακροφάγα (Bone Marrow Derived Macrophages: BMDMs)

Αφότου θυσιάστηκε το ζώο, αποκόπηκαν τα οπίσθια πόδια και αφαιρέθηκε το τρίχωμα και ο λιπώδης ιστός από αυτά, ώστε να απομονωθεί το οστέινο μέρος, το οποίο διατηρήθηκε προσωρινά σε PBS σε πάγο. Η συνέχεια της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό κυτταροκαλλιεργειών υπό στείρες συνθήκες. Είχε ήδη προετοιμαστεί το κατάλληλο θρεπτικό

υλικό, το οποίο αποτελούνταν από συνδυασμό κατά 70% DMEM με χαμηλή περιεκτικότητα γλυκόζης, στο οποίο είχε προστεθεί 10% FBS και 1% P/S, και 30% LCCM (L929 cell condition medium) που εκκρίνουν παράγοντες διαφοροποίησης, όπως M-CSF. Πριν την απομόνωση των κυττάρων, το οστό απολυμάνθηκε με επώαση σε 70% αιθανόλη και ξεπλύθηκε με PBS. Έπειτα, με χειρουργικό ψαλίδι κόπηκαν τα δύο άκρα του μηριαίου οστού, ώστε να απομονωθεί το τμήμα που εσωκλείει τον μυελό. Με τη χρήση σύριγγας ξεπλύθηκε ο μυελός των οστών με θρεπτικό, τοποθετώντας τη μύτη της βελόνας στο εσωτερικό του μηριαίου οστού. 2-3 ml αρκούσαν για να απομονωθούν τα κύτταρα (σε αυτή τη φάση το οστό είχε πλέον ασπρίσει). Αυτά, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (5' 1000 στροφές), το υπερκείμενο απορρίφθηκε, η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε στο προαναφερθέν θρεπτικό και τα κύτταρα απλώθηκαν σε μεσαία φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας με τελικό όγκο 15 ml θρεπτικού. Η διαφοροποίηση απαιτούσε γύρω στις 7 με 10 μέρες. Περίπου στη μέση αυτού του διαστήματος, προστέθηκε ίση ποσότητα του ίδιου θρεπτικού (δεν αφαιρέθηκε το προηγούμενο, αφενός διότι τα κύτταρα δεν ήταν ακόμα διαφοροποιημένα, ώστε να έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας, αφετέρου επειδή τα ίδια τα κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες που συμβάλλουν στη διαφοροποίησή τους).

Διαμόλυνση κυττάρων με siRNA

Για τη σίγηση της έκφρασης του γονιδίου Phf8 σε BMDMs πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάτων με siRNA χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη (Invitrogen™ Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent) και το θρεπτικό Gibco™ Opti-MEM™, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλουχία του siRNA ήταν η εξής:

PHF8 si (Silencer® Select, Ambion)

Sense: CACCCAGGAUUGUUCGCAAtt
Antisense: UUGCGAAGAACAAUCCUGGGUGtt

Ως controls χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα διαμολυσμένα με scrambled si (Silencer® Select Negative control No 1 siRNAs, Ambion).

Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών RAW 264.7 με εξουδετερωμένα ή υπερεκφραζόμενα γονίδια.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CRISPR-Cas9[101], χρησιμοποποιώντας ως φορέας κλωνοποίησης το πλασμίδιο lentiCRISPRv2 (addgene) για τη δημιουργία Knock Out (KO) κυτταρικών σειρών ή τα πλασμίδια lentiSAMv2 (addgene) και lentiMPHv2 για τη δημιουργία των Overexpression (OE) κυτταρικών σειρών, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση περιορισμού στα παραπάνω πλασμίδια με την περιοριστική ενδονουκλεάση BsmbI (NEB), απομόνωση των κομμένων πλασμιδίων, αντίδραση λιγάσης με τα υποψήφια guide RNAs, βακτηριακός μετασχηματισμός *E. coli* (DH5a) με τη χρήση θερμικού σοκ, απομόνωση των κλωνοποιημένων πλασμιδίων, ξανά αντίδραση περιορισμού με το ένζυμο BsmbI και ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης για επιλογή των κατάλληλων αποικιών. Οι επιλεγμένες αποικίες καλλιεργήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες και από αυτές απομονώθηκαν τα αντίστοιχα κλωνοποιημένα πλασμίδια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή lenti-ιών μέσω επιμόλυνσης (transfection) κυττάρων HEK 293T. Με τους παραχθέντες ιούς μολύνθηκαν RAW 264.7 μακροφάγα στα οποία έγινε, στη συνέχεια, επιλογή των μολυσμένων κυττάρων με τη χρήση κατάλληλου αντιβιοτικού. Για την πιστοποίηση της επιτυχούς δημιουργίας των επιθυμητών κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκαν RT-QPCR και WB.

Οι αλληλουχίες των gRNAs που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

PHF8 OE:

5'	CACCGGCACTGCGTGACGCGGCATG	3'
5'	AAACCATGCCGCGTCACGCAGTGCC	3'

PHF8 KO:

5'	CACCGACAGTCAGCTGACTTCCAGT	3'
5'	AAACACTGGAAGTCAGCTGACTGTC	3'

PHF2 KO:

5'	CACCGGCTCACCGTGGGCTACATGG	3'
5'	AAACCCATGTAGCCCACGGTGAGCC	3'

Ενεργοποίηση μακροφάγων

Απομονωμένος πολυσακχαρίτης (LPS) από το βακτήριο *E.coli* (O111:B4; catalogue no. L2630; Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση των μακροφάγων σε καθορισμένες χρονικές στιγμές, κατόπιν διαδοχικών αραιώσεων, με τελική συγκέντρωση 100 ng/ml. Τα κύτταρα παρέμεναν εκτεθειμένα στο LPS για την αναγραφόμενη, ανά περίπτωση, χρονική διάρκεια (π.χ., 6 ώρες).

Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων στρώθηκε σε πηγάδια κυτταροκαλλιέργειας με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Έπειτα από τους επιθυμητούς χειρισμούς (π.χ., έκθεση σε LPS), το θρεπτικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS (κυρίως για την απομάκρυνση του FBS, το οποίο παρεμβαίνει στην ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών). Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα RIPA (10mM Tris pH=8, 10mM EDTA pH=8, 140mM NaCl, 1% Triton, 1% Na deoxycholate, 0.1% SDS) που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (Roche). Στην περίπτωση που εξετάζονταν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκαν, επιπλέον, αναστολείς φωσφατασών. Ορισμένες φορές, πραγματοποίηθηκε επεξεργασία με υπερήχους, διότι τα κυτταρολύματα ήταν υπερβολικά παχύρευστα για περαιτέρω χρήση. Ο χειρισμός των απομονωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε πάγο και η φύλαξή τους στους -80°C.

Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με τη χρήση της μεθόδου BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (SIGMA-ALDRICH kit, catalog numbers: BCA1 and B9643)

Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Τα κυτταρολύματα ηλεκτροφορήθηκαν σε τζελ SDS-πολυακρυλαμίδης κατάλληλης πυκνότητας (η οποία αναφέρεται κατά περίπτωση στα «Αποτελέσματα») και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή μεμβράνη PVDF (400mA για 1 ώρα). Η επεξεργασία των μεμβρανών διεξάχθηκε σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες της τεχνικής: 1 ώρα blocking σε 5% BSA, ολονύχτια επώαση σε πρωταρχικά αντισώματα (primary antibodies), 1 ώρα επώαση με δευτερεύοντα αντισώματα (secondary antibodies) συζευγμένα με HRP, οπτικοποίηση με «Immobilon Classico Western HRP substrate» (Merck) χρησιμοποιώντας το

μηχάνημα ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad) και το πρόγραμμα ImageLab© Software (Bio-Rad). Ακολουθεί η λίστα των αντισωμάτων που αξιοποιήθηκαν:

anti-PHF8 (Cell Signaling, #93801), anti-PHF2 (Cell Signaling, #3497), anti-actin (Abcam, ab6276), anti-tubulin (clone 1A2; Sigma-Aldrich), anti-vinculin.

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Η συγκέντρωση των κυτοκινών στο υπερκείμενο των κυττάρων προσδιορίστηκε με ELISA kits (BioLegend) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Η συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου στο υπερκείμενο ενεργοποιημένων κυττάρων προσδιορίστηκε με την αντίδραση Griess, η οποία ανιχνεύει νιτρώδη (NO_2^-), ένα οξειδωτικό προϊόν του μονοξειδίου του αζώτου. Η συλλογή του υπερκειμένου πραγματοποιείται αρκετές ώρες μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων (24-48 ώρες), ώστε να έχει προλάβει να συσσωρευτεί το μονοξείδιο του αζώτου. Η αντίδραση Griess πραγματοποιήθηκε με την ανάμιξη 50μl του υπερκειμένου της καλλιέργειας με ίσο όγκο διαλύματος σουλφανιλαμιδίου (1% σουλφανιλαμίδιο σε 5% H3PO4) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, 50 μl διαλύματος NED (0,1% dihydrochlorite N-1-napthylethylenediamine σε H2O) προστέθηκαν και η απορρόφηση μετρήθηκε σε αυτόματο φωτομετρητή (plate reader infinate 200 PRO, Tecan) στα 540nm.

Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων στρώθηκε σε πηγάδια κυτταροκαλλιέργειας με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Έπειτα από τους επιθυμητούς χειρισμούς, το θρεπτικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS. Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol™ (Catalog number: 15596026), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το cDNA παρήχθη με το TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας ως μήτρα 500-1000 ng ολικού RNA για κάθε αντίδραση. Στη συνέχεια, το cDNA χρησιμοποιήθηκε για RT-QPCR με τη χρήση KAPA Taq DNA Polymerase kit (KAPA BIOSYSTEMS), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως γονίδιο αναφοράς στις RT-qPCRs χρησιμοποιήθηκε το Rsp9[2]. Ακολουθούν οι αλληλουχίες των εκκινητών:

Cxcl10	FW	TCATCCTGCTGGGTCTGAGT
	REV	ATCGTGGCAATGATCTCAACAC
Tnf-a	FW	CACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG
	REV	GGCTGGGTAGAGAATGGATGAACACC

[2] Θα μπορούσε κανείς να αναρωτηθεί ευλόγως για την καταλληλότητά του, δεδομένου ότι είναι ένα ριβοσωμικό γονίδιο, τη στιγμή που έχει δειχθεί ότι η PHF8 και η PHF2 ρυθμίζουν τη μεταγραφή ριβοσωμικών γονιδίων. Αφενός το Rsp9 δεν συγκαταλέγεται στα γνωστά γονίδια που ελέγχονται από τα δύο ένζυμα, αφετέρου δοκιμάστηκαν και άλλα γονίδια οικιακής οικονομίας (house-keeping) ως γονίδια αναφοράς, όπως το Gadph, χωρίς να παρατηρηθεί διαφορά στα πρότυπα έκφρασής τους σε σχέση με το Rsp9 (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Επιπρόσθετα, δεν φάνηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του Rsp9 κατόπιν υπερέκφρασης ή εξουδετέρωσης των δύο γονιδίων (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Για τους λόγους αυτούς, καθώς και για να είναι συγκρίσιμα τα νέα δεδομένα με παλαιότερα του εργαστηρίου, χρησιμοποιήθηκε, λοιπόν, το Rsp9 ως γονίδιο αναφοράς.

Pgc1a	FW	ACCCTGCCATTGTTAAGACC
	REV	TGCTGCTGTTCCTGTTTTC
Fabp4	FW	GCTCCTCCTCGAAGGTTTACAA
	REV	AATCCCCATTTACGCTGATGAT
Phf8	FW	CGCCCAACAAATGCTAATCT
	REV	AGAAGTTCCCTCCGAATGCT
Phf2	FW	TACTGCCTGATCTGTGTGAAGGA
	REV	CTGGCCGGATGAGATAGAAGA
Rsp9	FW	GCTAGACGAGAAGGATCCCC
	REV	CAGGCCCAGCTTAAAGACCT
Il-6	FW	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG
	REV	CACTCCTTCTGTGACTCCAGC
iNos	FW	TCCTGGAGGAAGTGGGCCGAAG
	REV	CCTCCACGGGCCCGGTACTC
Hif1a	FW	AGCAGCAGGAATTGGAACATT
	REV	TGCTCCGTTCCATTCTGTTCA
Arg1	FW	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG
	REV	CAGATATGCAGGGAGTCACC

Δοκιμή MTT

Για τον προσδιορισμό της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Applichem). Μακροφάγα καλλιεργήθηκαν για το επιθυμητό διάστημα και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά MTT σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml. Έπειτα, τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 επιπλέον ώρες. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο των κυττάρων απομακρύνθηκε και τα κύτταρα λύθηκαν σε ισοπροπανόλη + 0,4% HCl. Η οπτική απορρόφηση κάθε δείγματος μετρήθηκε σε αυτόματο φωτομετρητή (plate reader infinate 200 PRO, Tecan) στα 610nm.

Δοκιμή φαγοκυττάρωσης

Για τον προσδιορισμό της φαγοκυτταρικής ικανότητας των μακροφάγων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο PHAGOTEST™ (Glycotope Biotechnology GmbH), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επισημαίνεται ότι τα μακροφάγα επωάστηκαν για 2 ώρες με τα σημασμένα βακτήρια σε αναλογία 1:10.

Φαρμακολογική αναστολή των AKT κινασών

Για την φαρμακολογική παρεμπόδιση της ενεργότητας των AKT κινασών χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας MK 2206 διυδροχλωρίδιο, ο οποίος αναστέλλει την AKT1, AKT2 και AKT3 στις συγκεντρώσεις των 8 nM, 12 nM και 65 nM, αντίστοιχα. Το φάρμακο αυτό είναι ένας αλλοστερικός αναστολέας και ενεργοποιείται από την επικράτεια ομολογίας πλεκστρίνης

(pleckstrin homology domain). Αναστέλλει την αυτοφωσφορυλίωση της AKT κινάσης και στα δύο κατάλοιπα φωσφορυλίωσης: T308 και S473. Το MK 2206 διυδροχλωρίδιο παρεμποδίζει, επίσης, τη διαμεσολαβούμενη από AKT φωσφορυλίωση κάτωθεν (downstream) σηματοδοτικών μορίων, όπως των TSC2, PRAS40 και ριβοσωμικών S6 πρωτεΐνων[102].

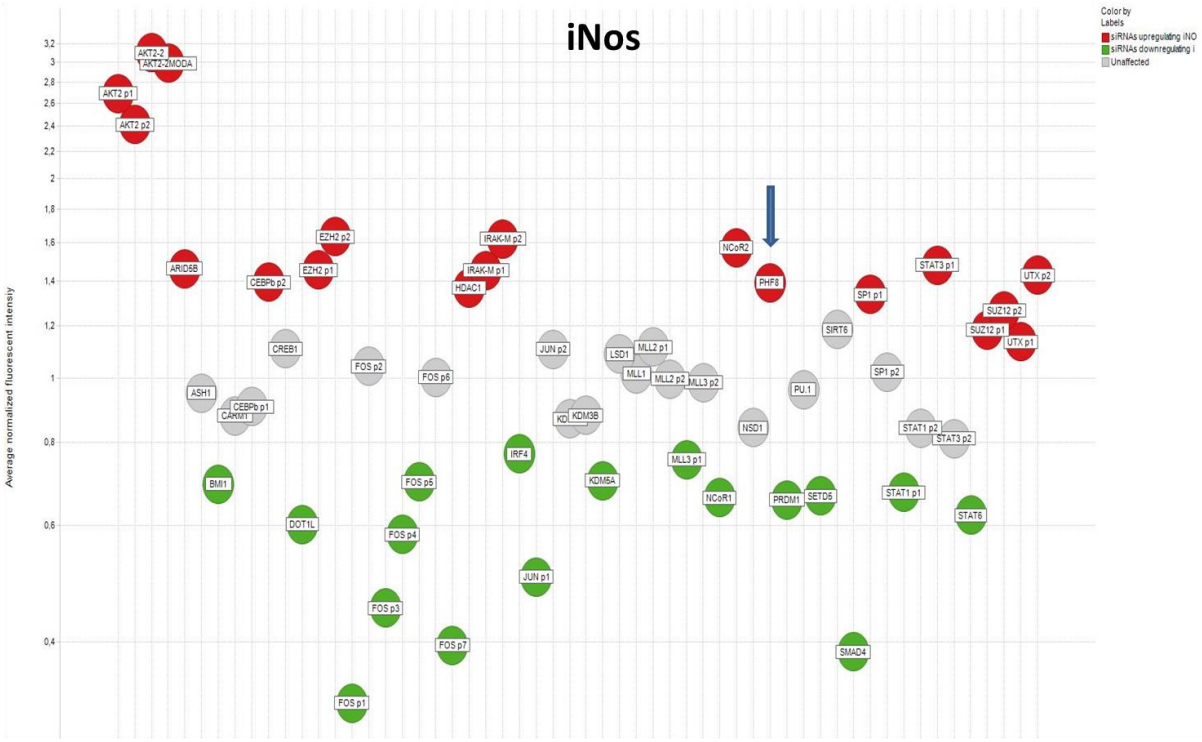
Ο αναστολέας προστέθηκε σε πηγάδια με κύτταρα σε συγκεντρώσεις των 8 nM ή 12 nM και αφέθηκε να δράσει για 24 ώρες πριν γίνει επαγωγή με LPS. Ήταν διαλυμένος σε DMSO, επομένως, στα κύτταρα-μάρτυρες προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Κατά τη συλλογή των πρωτεϊνών με RIPA χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα 1X αναστολείς φωσφατασών.

Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism (έκδοση 7, Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Στα γραφήματα τύπου «bloxplot» τα δεδομένα απεικονίζονται ως ελάχιστη-μέγιστη τιμή, με το κουτί να περιλαμβάνει τις τιμές του 25^{ου} με 75^{ου} εκατοστημορίου και τη γραμμή να αντιπροσωπεύει τον διάμεσο. Στα γραφήματα τύπου «column bar» τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέση τιμή +/- SD. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε το στατιστικό τεστ «nonparametric Mann-Whitney test», με εξαίρεση τα γραφήματα των MTT δοκιμών, στα οποία εφαρμόστηκε το τεστ «Two-way ANOVA». *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001.

Αποτελέσματα: PHF8

Διαλογή (screening) γονιδίων που οδήγησαν στην επιλογή της PHF8 ως πιθανό ρυθμιστή της ανοσολογικής απόκρισης



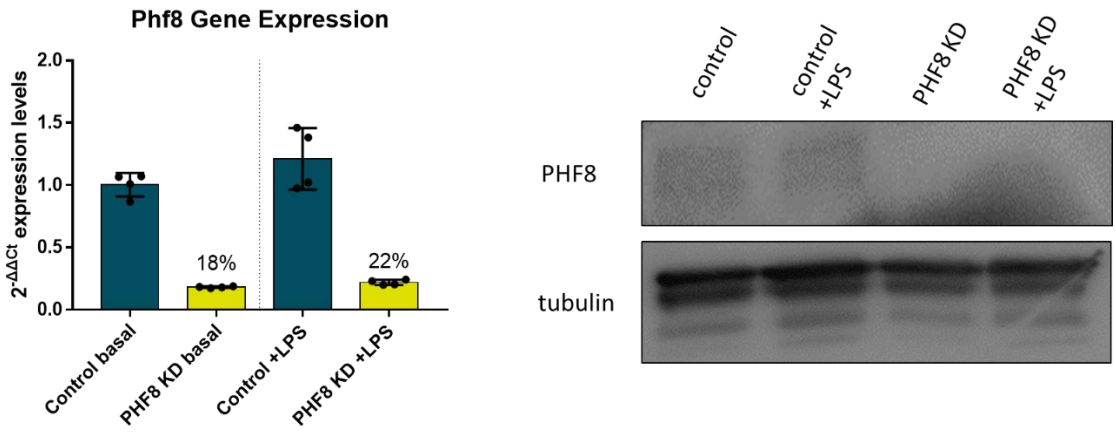
RAW 264.7 MΦs → siRNA transfection → LPS (100ng/ml) → IF signal intensity

Εικόνα 7: Διαλογή γονιδίων που ρυθμίζουν την έκφραση της iNOS. RAW 264.7 μακροφάγα επιμολύνθηκαν με siRNAs για τα απεικονιζόμενα γονίδια. Με κόκκινο ή πράσινο φαίνονται τα γονίδια η σίγηση των οποίων αύξησε ή μείωσε, αντίστοιχα, την έκφραση του γονιδίου iNos κατόπιν ενεργοποίησης με LPS, ενώ με γκρίζο εκείνα τα γονίδια των οποίων η σίγηση δεν είχε σημαντικό αποτέλεσμα.

Πραγματοποιήθηκε διαλογή γονιδίων που επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου iNos στα μακροφάγα μέσω επιμόλυνσης με siRNAs (εικόνα 7). Με κόκκινο και με πράσινο παρουσιάζονται τα γονίδια εκείνα που, όταν σιγηθούν, οδηγούν στην αύξηση ή μείωση, αντίστοιχα, της έκφρασης της iNOS, ενώ με γκρίζο εμφανίζονται τα γονίδια εκείνα η σίγηση των οποίων δεν είχε σημαντικό αποτέλεσμα. Η παραγωγή νιτρικού οξέος ως μέρος της ανοσολογικής απόκρισης είναι ένα από τα θεμελιώδη λειτουργικά χαρακτηριστικά των μακροφάγων και προϋποθέτει τη δράση του ενζύμου iNOS (βλ. παράρτημα 1). Ένας παράγοντας που ρυθμίζει αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ πιθανό να ελέγχει και άλλες συνιστώσες της ανοσολογικής απόκρισης. Δεδομένου, λοιπόν, ότι η υποέκφραση της PHF8 προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου iNos, καθώς και ότι η ίδια απομεθυλάση αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου στο παρελθόν, αποφασίστηκε να εξεταστεί η PHF8 ως πιθανός ρυθμιστής της ανοσολογικής απόκρισης στα μακροφάγα. Σημειώνεται ότι η παραπάνω διαλογή γονιδίων δεν πραγματοποιήθηκε από τον συγγραφέα της παρούσας εργασίας.

Ως επόμενο βήμα της διερεύνησης της απομεθυλάσης PHF8 σαν πιθανό ρυθμιστή της ανοσοαπάντησης, απομονώθηκαν πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών, αυτά διαφοροποιήθηκαν σε μακροφάγα (BMDMs) και μετά υποβλήθηκαν στη διαδικασία γονιδιακής σίγησης της PHF8 με si RNA και χρήση λιποφεκταμίνης (PHF8 Knock Down).

Αφότου ενεργοποιήθηκαν με LPS, εκτελέστηκε ακόμα μία διαλογή γονιδίων, και συγκεκριμένα γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση, ώστε να επαληθευτεί η αρχική εκτίμηση ότι η PHF8 αξίζει να μελετηθεί στο πλαίσιο της ανοσολογικής ρύθμισης. Μετά από αυτήν την επιβεβαίωση, ακολούθησε η δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών μακροφάγων που υπερεκφράζουν (Phf8 OE) ή υποεκφράζουν (PHF8 KO) το γονίδιο της PHF8. Τα αποτελέσματα από τα παραπάνω Phf8 KD κύτταρα παρουσιάζονται μαζί με τα αποτελέσματα των Phf8 OE και Phf8 KO κυττάρων στη συνέχεια.

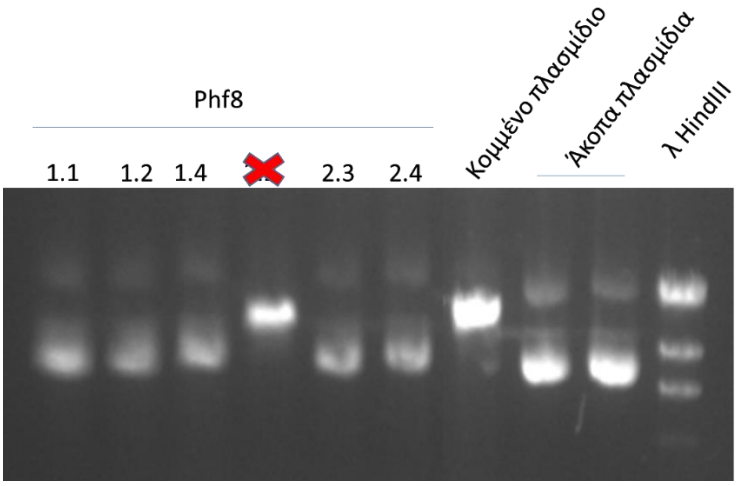


Εικόνα 8: Δημιουργία PHF8 KD BMDMs με si RNA και χρήση λιποφεκταμίνης.

Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται η επιτυχημένη σίγηση του γονιδίου Phf8 στα BMDMs. Συγκεκριμένα, τα βασικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης (χωρίς LPS) της PHF8 σημείωσαν πτώση στο 18%, ενώ κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε LPS, η έκφραση του γονιδίου έπεσε στο 22%. Η μείωση αυτή είναι ικανοποιητική και αντανακλάται στα επίπεδα πρωτεΐνης, τα οποία ήταν μη ανιχνεύσιμα, ακόμα και μετά από κορεσμό του σήματος της φωτογραφίας.

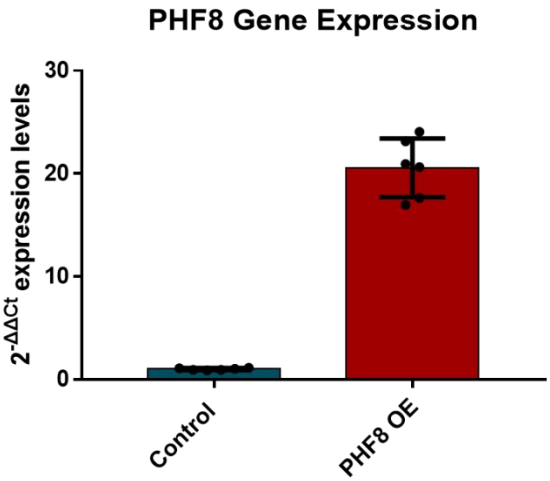
Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς μακροφάγων (RAW 264.7) που υπερεκφράζει την PHF8 με τη μέθοδο CRISPR

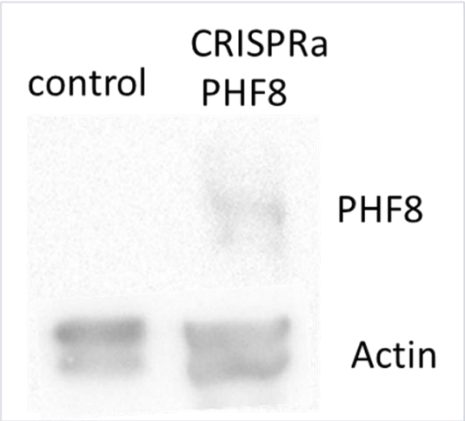
Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση περιορισμού στο πλασμίδιο lentiSAMv2, απομόνωση του κομμένου πλασμιδίου, αντίδραση λιγάσης με υποψήφια guide RNAs (gRNA), βακτηριακός μετασχηματισμός *E. coli* (DH5a) με τη χρήση θερμικού σοκ, απομόνωση των κλωνοποιημένων πλασμιδίων, αντίδραση περιορισμού με το ένζυμο BsmbI και ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης για επιλογή των κατάλληλων αποικιών (εικόνα 9). Έπειτα, οι επιλεγμένες αποικίες καλλιεργήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες και απομονώθηκαν τα αντίστοιχα κλωνοποιημένα πλασμίδια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή lenti-ιών μέσω επιμόλυνσης (transfection) κυττάρων HEK 293T. Με τους παραχθέντες ιούς μολύνθηκαν RAW 264.7 μακροφάγα, τα οποία στη συνέχεια επιλέχθηκαν με χρήση αντιβιοτικών. Για την πιστοποίηση της υπερέκφρασης των γονιδίων Phf2 / Phf8 πραγματοποιήθηκαν RT-QPCR και WB (εικόνα 10).



Εικόνα 9: Αντίδραση περιορισμού με BsmbI για επιλογή βακτηριακών κλώνων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την αλληλουχία που στοχεύει την Cas9 στο γονίδιο της PHF8.

Στην εικόνα 9 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης των απομονωμένων κλωνοποιημένων πλασμιδίων κατόπιν αντίδρασης περιορισμού με το ένζυμο BsmbI, με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων βακτηριακών αποικιών για τη συνέχιση του πρωτοκόλλου. Τα επιθυμητά πλασμίδια είναι εκείνα τα οποία έχουν ενσωματώσει την επιπρόσθετη αλληλουχία των gRNAs. Στα πλασμίδια αυτά θα πρέπει να έχει καταστραφεί η απαιτούμενη αλληλουχία για την αντίδραση περιορισμού με το ένζυμο BsmbI, αφού στο ενδιάμεσο αυτής θα έχει προστεθεί η καινούργια αλληλουχία. Επομένως, οι επιθυμητές αποικίες έχουν φαινότυπο όμοιο με αυτόν του άκοπου πλασμιδίου.





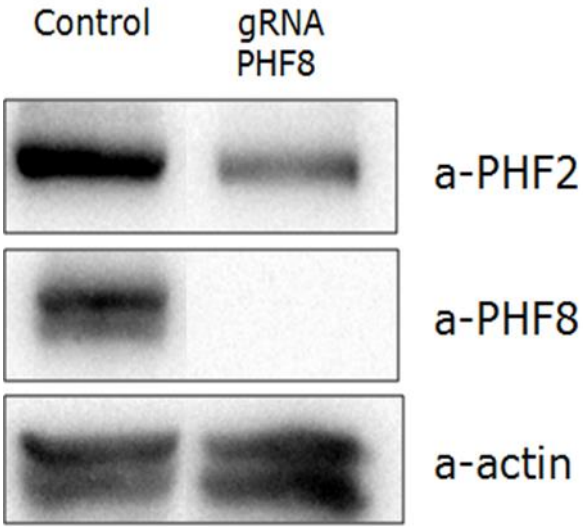
Εικόνα 10: Δημιουργία RAW264.7 μακροφάγων που υπερεκφράζουν την PHF8.

Σε επίπεδο mRNA η έκφραση της PHF8 φαίνεται να επάχθηκε κατά 20, περίπου, φορές, γεγονός που δηλώνει την επιτυχία και αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου υπερέκφρασης του γονιδίου και του gRNA που χρησιμοποιήθηκε, πράγμα που επιβεβαιώνεται και σε επίπεδο πρωτεΐνης (εικόνα 10). Θεωρήθηκε, λοιπόν, πως η νέα αυτή κυτταρική σειρά ήταν κατάλληλη για χρήση.

Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς μακροφάγων (RAW 264.7) με εξουδετερωμένο γονίδιο Phf8 με τη μέθοδο CRISPR

Πρώτη απόπειρα

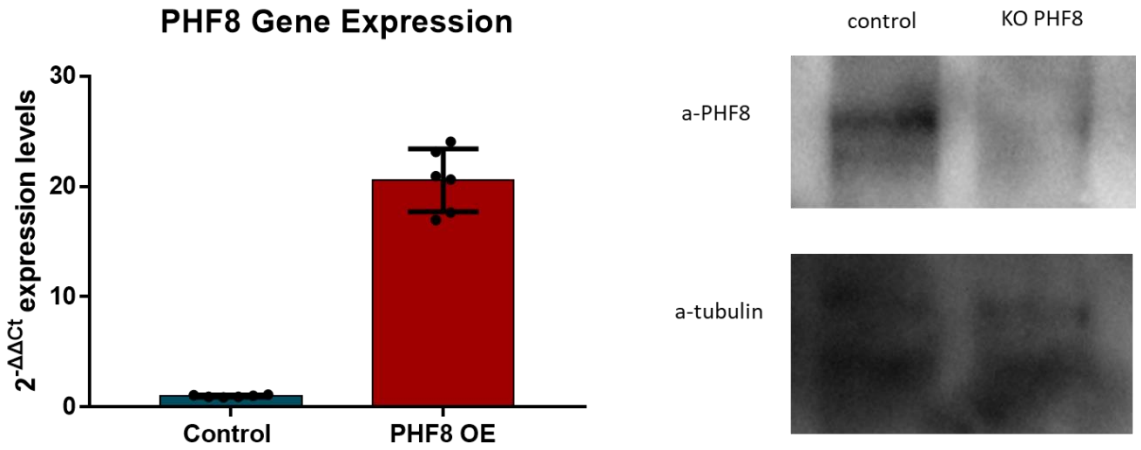
Παρόμοια διαδικασία με την προαναφερθείσα ακολουθήθηκε για τη δημιουργία μακροφάγων με εξουδετερωμένο το γονίδιο Phf8.



Εικόνα 11: Δημιουργία RAW264.7 μακροφάγων με εξουδετερωμένο το γονίδιο της Phf8 (1η απόπειρα).

Φαίνεται πως το πρωτόκολλο ήταν επιτυχημένο ως προς τη δημιουργία των επιθυμητών κυτταρικών σειρών. Η πρωτεΐνη PHF2 έχει υψηλή ομολογία με την PHF8, επομένως εξετάστηκαν παράλληλα τα επίπεδα αυτής, για τη διερεύνηση πιθανών αστοχιών του χρησιμοποιούμενου gRNA. Ωστόσο, δυστυχώς, κατόπιν μέτρησης της συγκέντρωσης του νιτρικού οξειδίου στα υπερκείμενα των κυττάρων, φάνηκε ότι τα κύτταρα ήταν ήδη ενεργοποιημένα, ανεξαρτήτως επαγωγής με LPS. Μετρώντας υπερκείμενο από φλάσκες ξεπαγωμένων ίδιων RAW264.7 PHF8/PHF2 KO μακροφάγων, διαπιστώθηκε πως και τα κυτταρικά αποθέματα ήταν ήδη ενεργοποιημένα, καθιστώντας τα άχρηστα για πειράματα που έμελλε να ακολουθήσουν. Η διαδικασία έπρεπε να πραγματοποιηθεί ξανά από το στάδιο μόλυνσης των HEK κυττάρων, εφόσον αποδείχθηκε πως τουλάχιστον οι ιοί με τις ενθέσεις των επιλεγμένων ζευγών gRNAs ήταν αποτελεσματικοί.

Δεύτερη απόπειρα

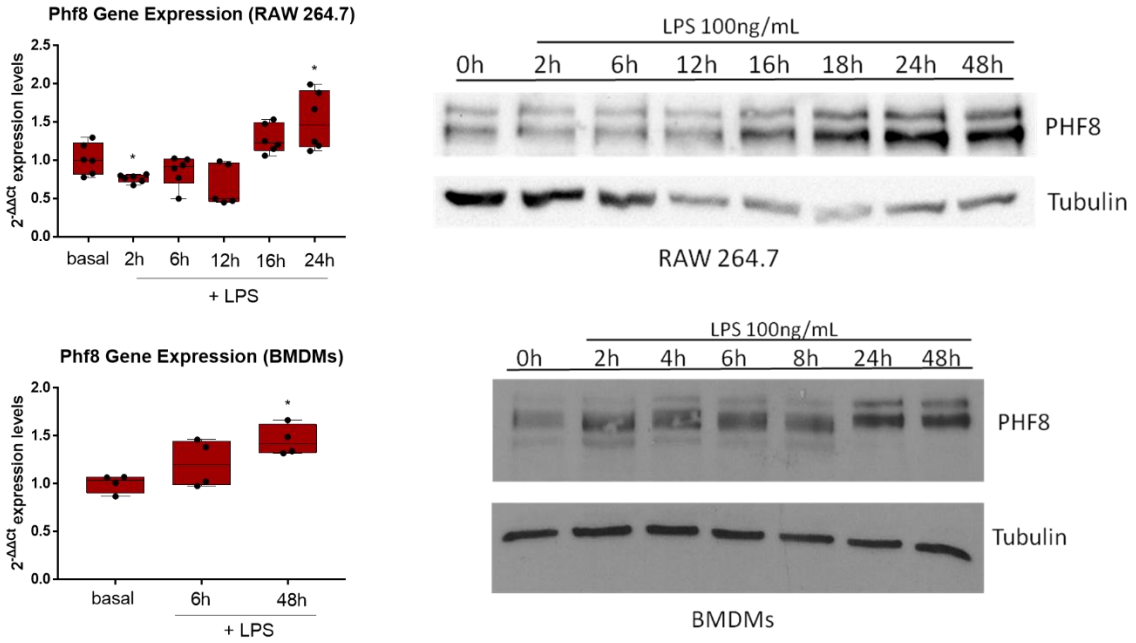


Εικόνα 12: Δημιουργία RAW264.7 μακροφάγων με εξουδετερωμένο γονίδιο Phf8 (2η απόπειρα).

Η γονιδιακή έκφραση της PHF8 παρουσίασε μείωση κατά 51% (εικόνα 12, αριστερά). Επειδή πραγματοποιείται μία μικρή απαλοιφή βάσεων στο γονίδιο-στόχο, είναι αναμενόμενο να υπάρχει υπολειπόμενη έκφραση ενός τροποποιημένου μεταγράφου του γονιδίου[3]. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η εξέταση των πρωτεϊνικών επιπέδων. Παρότι οι φωτογραφίες από το WB δεν είναι καλής ποιότητας, αρκούν για να δείξουν την αποτελεσματική παρεμπόδιση της παραγωγής των δύο ενζύμων στις δύο κυτταρικές σειρές (εικόνα 12, δεξιά), δεδομένης μάλιστα της ήδη επαληθευμένης καταλληλόλητας των επιλεγμένων ζευγών gRNAs (εικόνα 11).

[3] Καθώς δεν φαίνεται μια ολοκληρωτική καταστολή της έκφρασης του γονιδίου, αξίζει να αναφερθεί η δράση του επιλεγμένου CRSPR συστήματος. Αυτό, λοιπόν, προκαλεί διπλή εγκοπή στην επιθυμητή περιοχή του γονιδίου-στόχου. Η τελευταία επιδιορθώνεται κατά κύριο λόγω από τον μηχανισμό NHEJ (non-homologous end joining), ο οποίος είναι ανακριβής, με αποτέλεσμα την υψηλή πιθανότητα δημιουργίας νουκλεοτιδικών προσθηκών ή ελλείψεων που θα μπορούσαν να αλλάξουν το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου ή να εισάγουν κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης νωρίτερα από το φυσιολογικό, οδηγώντας σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη. Ακριβώς στην ανακρίβεια αυτή βασίζεται η εξουδετέρωση ενός γονιδίου με το επιλεγμένο σύστημα. Είναι αναμενόμενο, επομένως, τα γονίδια να εξακολουθούν να εκφράζονται και να παράγουν μόρια mRNA, πιθανόν μικρότερου τμήματος (κάτι που θα μπορούσε να ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης). Σημασία έχει είτε να μην παράγεται καθόλου πρωτεΐνη, είτε αυτή που παράγεται να μην είναι λειτουργική πρωτεΐνη.

Το πρότυπο έκφρασης της Phf8



Εικόνα 13: Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Phf8 και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα κατόπιν επαγωγής με LPS σε κύτταρα RAW 264.7 και BMDMs

Αρχικά, μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Phf8, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του αντίστοιχου ενζύμου, τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε LPS, που είναι γνωστό ότι επάγει την TLR-4 διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων. Παρατηρείται ότι η PHF8 παρουσιάζει τα μέγιστα επίπεδα 24-48 ώρες μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων, το οποίο συνάδει με την αύξηση σε επίπεδο mRNA. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα των BMDMs. Αξίζει να σημειωθεί πως η PHF8 είναι εκτενώς υποκείμενη στη δράση μετα-μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών ρυθμιστών, όπως οι MYC-mir-22[103,104] και USP7[105] και, συνεπώς, τα πραγματικά πρωτεϊνικά επίπεδα ενδέχεται να διαφέρουν από τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA.

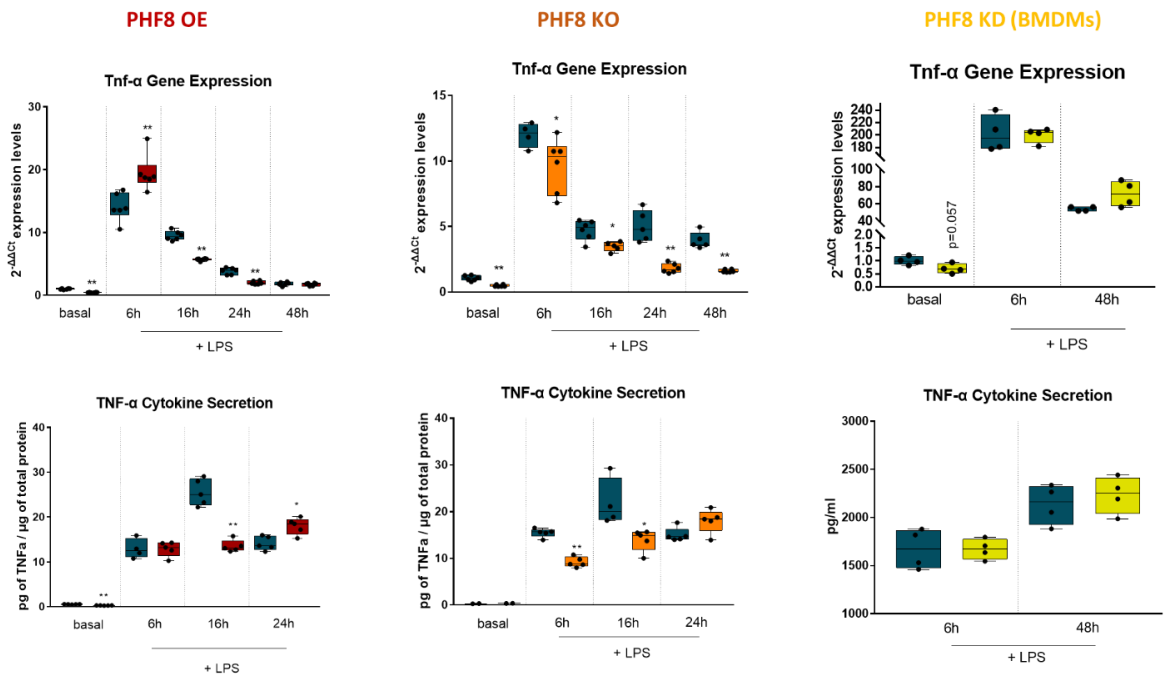
Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών PHF8 στην TLR-4 διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων

Ο ρόλος του ενζύμου PHF8 στην φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων μελετήθηκε εξετάζοντας τη γονιδιακή έκφραση βασικών προ- (M1-) και αντι- (M2-) φλεγμονώδων μαρτύρων, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτών, τόσο σε RAW 264.7 μακροφάγα με εξουδετερωμένη ή υπερεκφραζόμενη PHF8 όσο και σε BMDMs με σιγημένο το γονίδιο Phf8. Η δράση και η σημασία του κάθε εξεταζόμενου παράγοντα περιγράφονται συνοπτικά στο Παράρτημα 1.

Η PHF8 ρυθμίζει την έκφραση προ- και αντι- φλεγμονώδων γονιδίων και εκκρινόμενων μορίων κατά την TRL4-διαμεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων

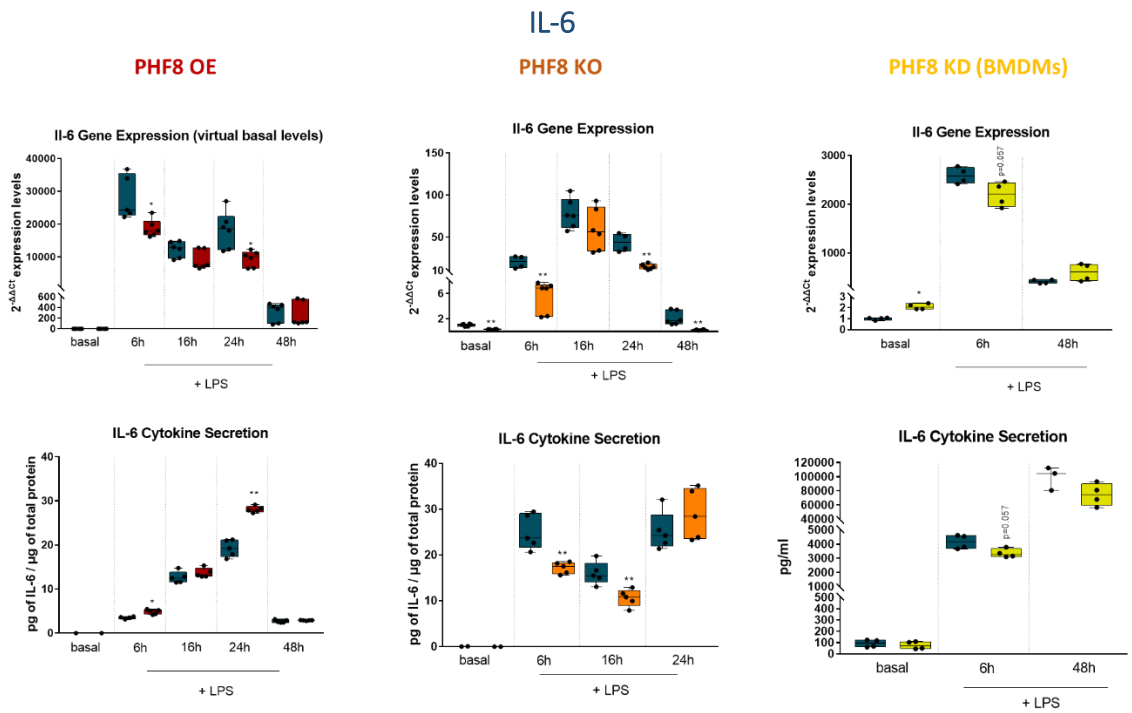
Για τη μελέτη της δράσης της PHF8 στην φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων που πυροδοτείται από τη σηματοδότηση του TLR4 υποδοχέα κατόπιν πρόσδεσης LPS, προσδιορίστηκε η έκφραση βασικών εμπλεκόμενων γονιδίων και η συγκέντρωση σημαντικών εκκρινόμενων μορίων, ειδικότερα κυτοκινών και νιτρικού οξειδίου, στο υπερκείμενο των κυττάρων.

TNF-α



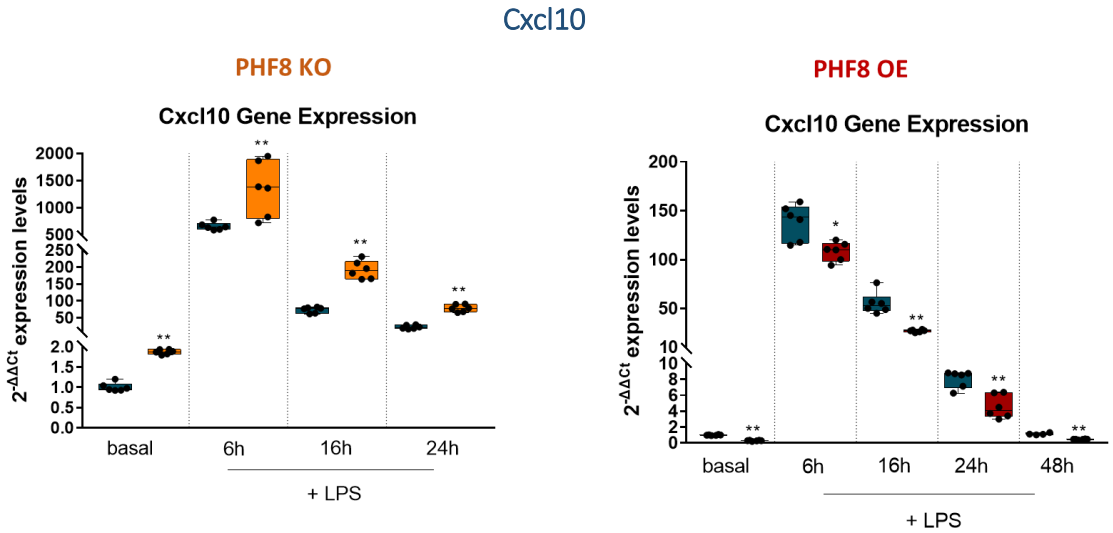
Εικόνα 14: Η PHF8 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση και έκκριση του TNF-α

Τα επίπεδα mRNA και εκκρινόμενου TNF-α μειώνονται όταν η έκφραση της PHF8 καταστέλλεται, ακόμα και στην κατάσταση ηρεμίας (εικόνα 14). Επομένως, φαίνεται πως η PHF8 ρυθμίζει θετικά τον TNF-α. Το ίδιο συμβαίνει στα μακροφάγα που υπερεκφράζουν την PHF8, με εξαίρεση στις 6 ώρες, όπου το γονίδιο παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Παρατηρείται, δηλαδή, ότι υπερέκφραση της PHF8 οδηγεί σε επικρατώς αρνητικό φαινότυπο, δηλαδή αντίστοιχο των PHF8 KO κυττάρων. Αυτό ερμηνεύεται στην ενότητα της Συζήτησης. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επαληθεύτηκαν στα PHF8 KD BMDMs στα δύο εξεταζόμενα χρονικά σημεία.



Εικόνα 15: Η PHF8 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση και έκκριση της IL-6

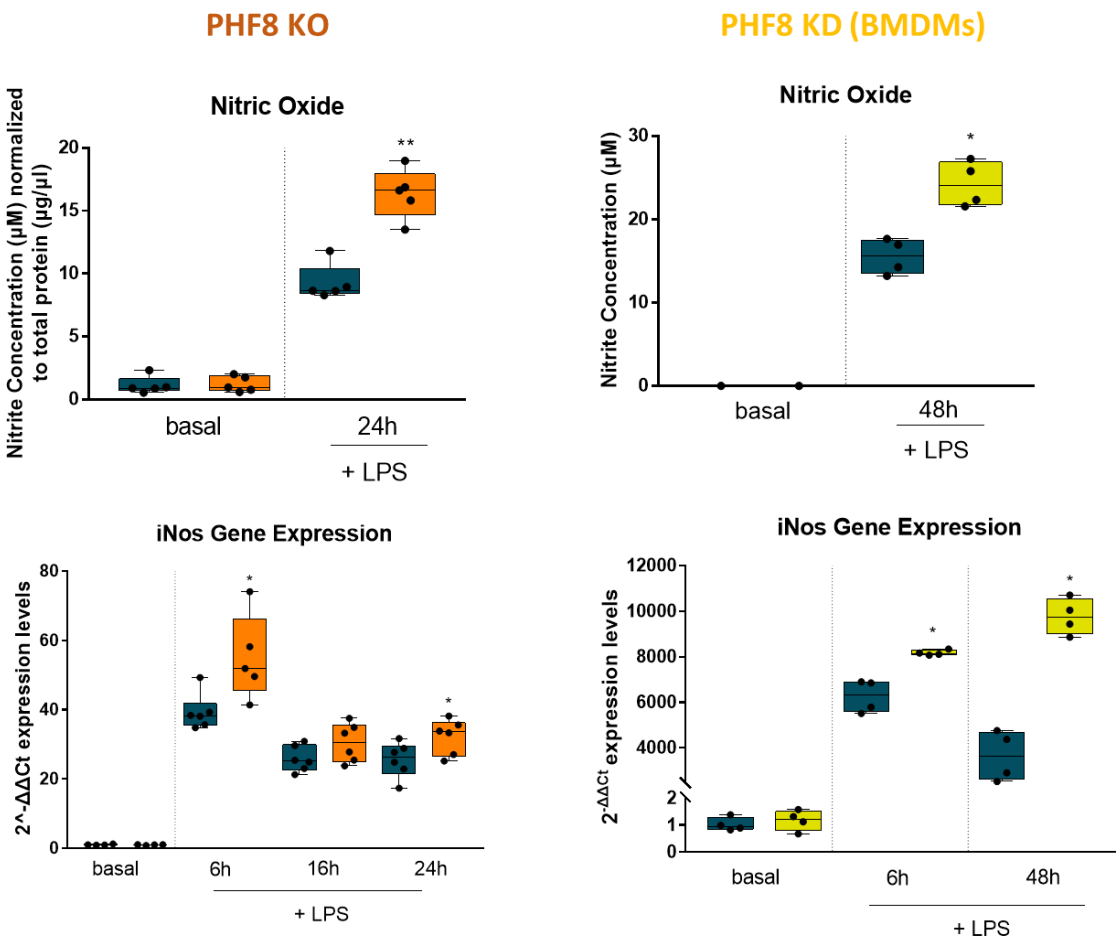
Όταν υποεκφράζεται η PHF8, μειώνεται η γονιδιακή έκφραση και τα εκκρινόμενα επίπεδα της IL-6 στα RAW 264.7 μακροφάγα (εικόνα 15). Η παρατήρηση αυτή επαληθεύεται από την πτωτική τάση που εμφανίζουν τα BMDMs. Επομένως η PHF8 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά την IL-6. Η υπερέκφραση της PHF8 οδηγεί σε επικρατώς αρνητικό φαινότυπο όσον αφορά στην έκφραση του γονιδίου, ενώ αυξάνει την εκκρινόμενη πρωτεϊνη (όπως ακριβώς συμβαίνει στα PHF2 KO, βλ. Συζήτηση).



Εικόνα 16: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση του CXCL10

Είναι εμφανέστατο πως η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του CXCL10, καθώς, όταν η πρώτη υπο- ή υπερ- εκφράζεται, η δεύτερη αυξάνεται ή μειώνεται, αντίστοιχα (εικόνα 16).

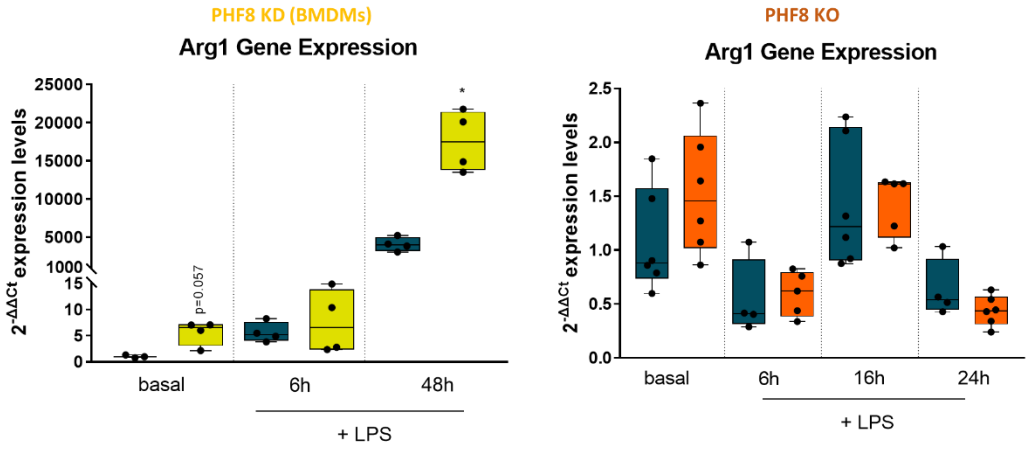
iNos & Νιτρικό Οξείδιο



Εικόνα 17: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση της iNOS και τα εκκρινόμενα επίπεδα νιτρικού οξειδίου

Υποέκφραση της PHF8 αυξάνει τα παραγόμενα επίπεδα νιτρικού οξειδίου τόσο στα RAW 264.7 όσο και τα BMDMs, γεγονός που συνάδει με την άνοδο της γονιδιακής έκφρασης της iNOS (εικόνα 17). Άρα, η PHF8 φαινεται να ρυθμίζει αρνητικά την iNOS και την έκκριση του νιτρικού οξέος.

Arg1



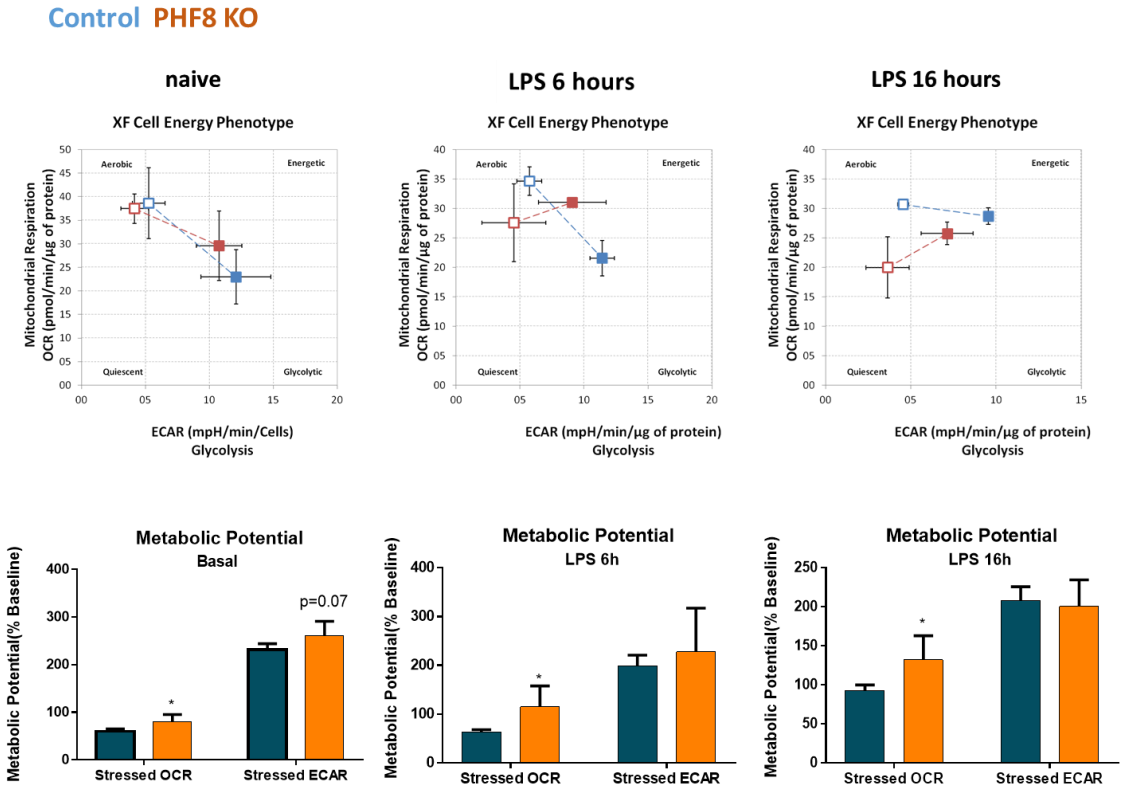
Εικόνα 18: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση της ARG1 σε πρωτογενή μακροφάγα

Η ARG1 είναι ένας κλασικός M2. Οι M2 μάρτυρες κατά κανόνα επάγονται αρκετές ώρες μετά την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης. Πράγματι, στα BMDMs είναι εμφανές πως, όταν υποεκφράζεται η PHF8, υπάρχει σημαντική αύξηση της έκφρασης της ARG1 στις 48 ώρες (εικόνα 18). Τα RAW 264.7 μακροφάγα είναι ένα σύστημα στο οποίο δύσκολα μελετώνται M2 μάρτυρες, διότι γενικά δεν επάγονται ως γονίδια, όπως φαίνεται και εν προκειμένω. Πάντως, σημειώνεται μια αυξητική τάση στην κατάσταση ηρεμίας, που συνάδει με αυτό που συμβαίνει στα BMDMs. Επομένως, φαίνεται πως η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της ARG1.

Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF8» στο μεταβολισμό των μακροφάγων

Είναι πλέον γνωστό ότι η ανοσολογική απόκριση ρυθμίζει και ρυθμίζεται από τον μεταβολισμό των κυττάρων. Διαφορετικές καταστάσεις ενεργοποίησεις απαιτούν διαφορετικές μεταβολικές προσαρμογές. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η έκφραση κρίσιμων μεταβολικών γονιδίων, η μεταβολική δραστηριότητα των μακροφάγων, καθώς και η περιεκτικότητα αυτών σε μιτοχόνδρια.

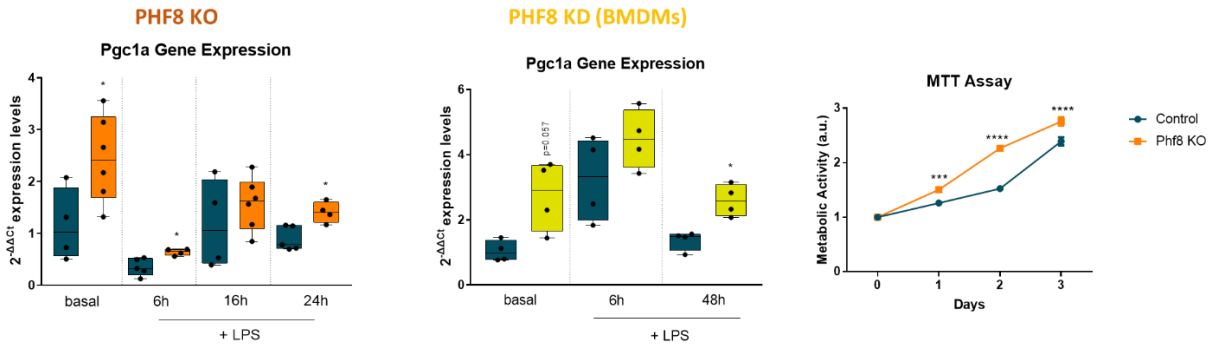
Η PHF8 ελέγχει τη βιογένεση μιτοχονδρίων



Εικόνα 19: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

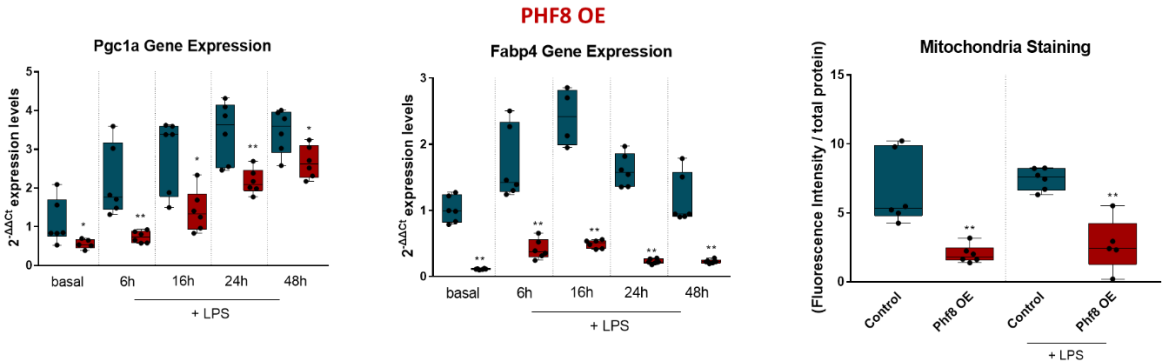
Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου που πραγματοποιήθηκαν σε PHF8 KO RAW 264.7 μακροφάγα με τη τεχνολογία Seahorse, που μετράει σε ζωντανά κύτταρα τον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου (oxygen consumption rate: OCR), ο οποίος είναι ενδεικτικός της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, και τον ρυθμό εξωκυττάριας οξείδωσης (extracellular acidification rate: ECAR), ο οποίος είναι ενδεικτικός της γλυκόλυσης,

καταδεινύουν πως η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των κυττάρων, τόσο πριν όσο και μετά την ενεργοποίησή τους με LPS (εικόνα 19).



Εικόνα 20: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση του PGC1a και τη μεταβολική δραστηριότητα των μακροφάγων

Γνωρίζοντας ότι η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, ένα εύλογο επόμενο βήμα θα ήταν η εξέταση των επιπέδων έκφρασης του κύριου ρυθμιστή της βιογένεσης μιτοχονδρίων, PGC1a. Πράγματι, παρατηρείται αυξητική τάση στη γονιδιακή έκφραση του PGC1a τόσο στα RAW 264.7 όσο και τα BMDMs που υποεκφράζουν την PHF8 (εικόνα 20). Αυτό συναδει με τη δοκιμή MTT, η οποία εκτιμάει τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, κυρίως (άλλα όχι απόλυτα) των μιτοχονδρίων, και η οποία εν προκειμένω δείνχει πως τα PHF8 KO μακροφάγα έχουν σταθερά και σημαντικά αυξημένη μεταβολική ενεργότητα.

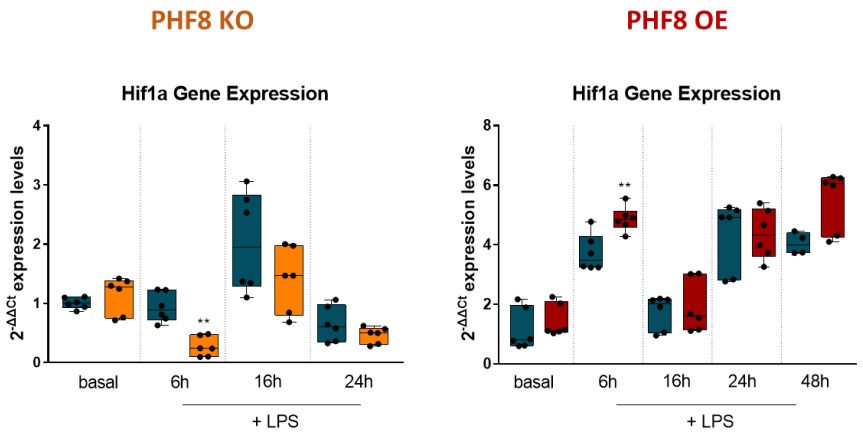


Εικόνα 21: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση του PGC1a, της FABP4, καθώς και το μιτοχονδριακό φορτίο των μακροφάγων

Στα μακροφάγα που υπερεκφράζουν την PHF8, η γονιδιακή έκφραση του PGC1a είναι σημαντικά και μονίμως μειωμένη (εικόνα 21). Η FABP4 είναι μια σαπερόνη λιπιδίων, η οποία εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, την οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη μιτοχονδριακή απόκριση αναδιπλωμένης πρωτεϊνης (mUPR). Αυτή ρυθμίζεται άμεσα από τον PGC1a, και, πράγματι, η έκφρασή της εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη στα PHF8 OE κύτταρα. Η χρώση των μιτοχονδρίων με την ουσία mitotracker δείχνει σαφώς πως το μιτοχονδριακό φορτίο είναι χαμηλότερο στα PHF8 OE μακροφάγα, τόσο πριν όσο και μετά από LPS. Επομένως, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των κυττάρων, παρεμποδίζοντας τη βιογένεση μιτοχονδρίων μέσω αρνητικής ρύθμισης του PGC1a.

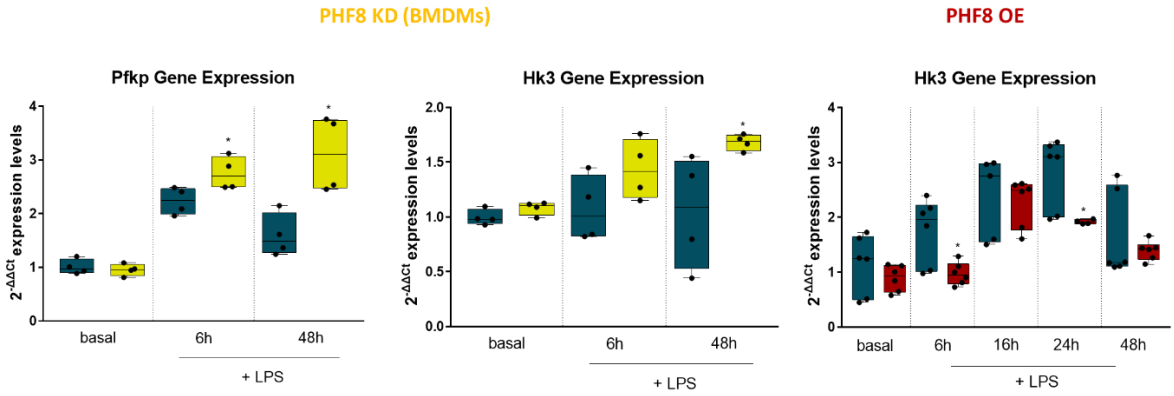
Η επίδραση της PHF8 σε σημαντικά γλυκολυτικά γονίδια

Στην αντίπερα όχθη του PGC1a και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που χρειάζονται για την αντιφλεγμονώδη πόλωση των μακφροφάγων, βρίσκονται σημαντικά ρυθμιστικά μόρια όπως ο HIF1a, ο οποίος απαιτείται για την επαγωγή της γλυκόλυσης και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων κατά την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης[96].



Εικόνα 22: Η PHF8 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση του HIF1a στην αρχή της ανοσολογικής απόκρισης

Όπως φαίνεται, η PHF8 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση του HIF1a στην αρχή της ανοσολογικής απόκρισης (6 ώρες), καθώς, όταν η πρώτη υπο- ή υπέρ- εκφράζεται, η δεύτερη σημειώνει πτώση ή άνοδο, αντίστοιχα (εικόνα 23).

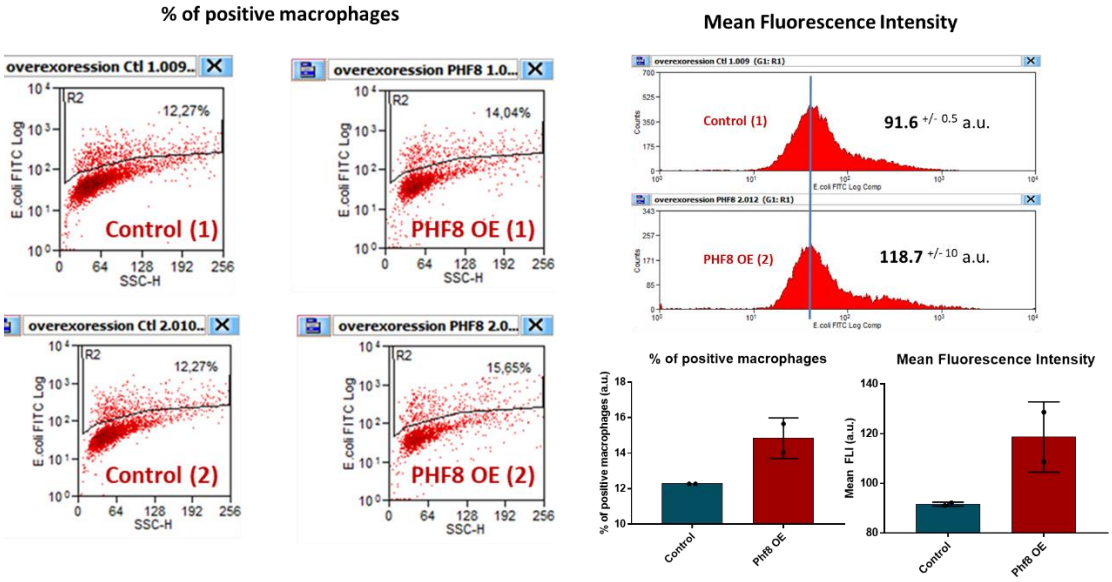


Εικόνα 23: Η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση των γλυκολυτικών ενζύμων HK3 και PFKP

Όταν εξετάστηκαν δύο ένζυμα της γλυκόλυσης, φάνηκε πως η PHF8 μάλλον ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση αυτών (εικόνα 23). Η φωσφοφρουκτοκινάση 1 (PFK1) καταλύει τη μη αντιστρέψιμη μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, που αποτελεί το τρίτο βήμα στη διεργασία της γλυκόλυσης. Η έκφραση αυτής αυξάνεται στα BMDMs απουσία PHF8, επομένως η PHF8 τη ρυθμίζει αρνητικά. Η εξοκινάση είναι το πρώτο ένζυμο της γλυκόλυσης, το οποίο καταλύει τη μη αντιστρέψιμη μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P). Στα PHF8 KD BMDMs, η γονιδιακή έκφραση της εξοκινάσης 3 (HK3), παρουσιάζει μια αυξητική τάση μετά από LPS, ενώ στα PHF8 KO μακροφάγα μια πτωτική τάση. Επομένως, ενδέχεται η PHF8 να τη ρυθμίζει αρνητικά.).

Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF8» στην φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων

Ένα από τα θεμελιώδη και πιο κρίσιμα λειτουργικά χαρακτηριστικά των μακροφάγων είναι η ικάνοτητά τους να φαγοκυτταρώνουν. Για τη διερεύνηση της συμμετοχής της απομεθυλάσης PHF8 στην φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με σημασμένα (FITC) βακτήρια *E. coli* (εικόνα 24).

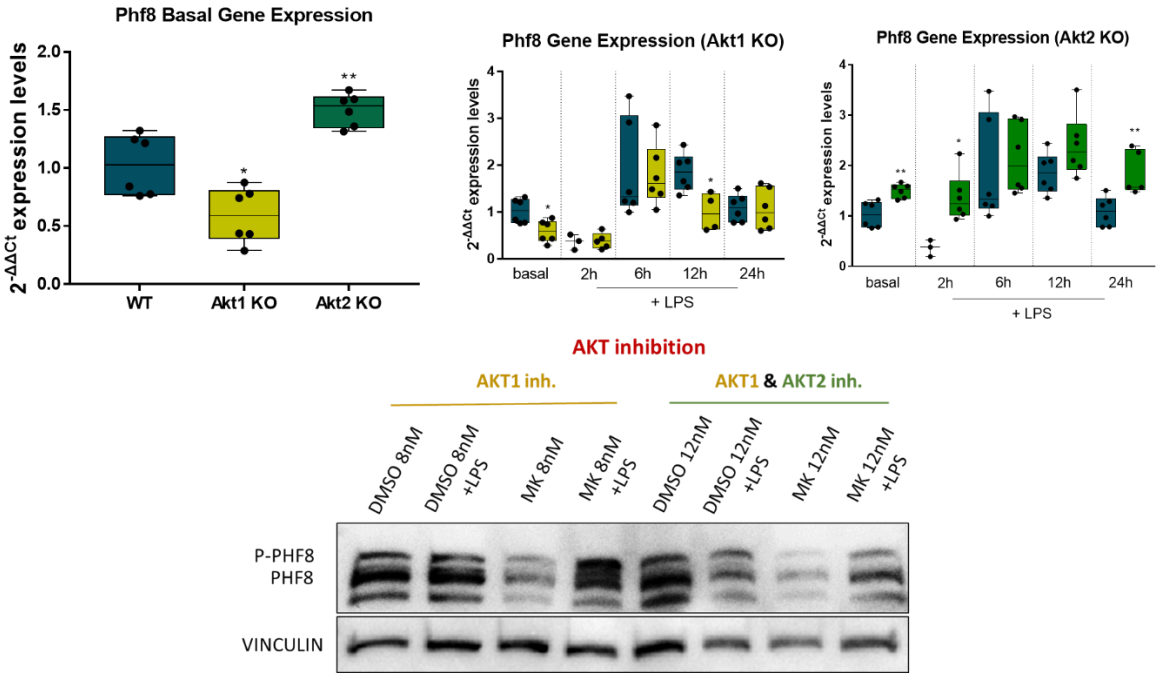


Εικόνα 24: Υπερέκφραση της PHF8 οδηγεί σε αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα

Τα PHF8 OE μακροφάγα που φαγοκυτταρώνουν αυξάνεται περίπου κατά 3%, ενώ σημαντική άνοδο παρουσιάζει η μέση ένταση φθοριμού, που αντανακλά το ενδοκυττάριο βακτηριακό φορτίο. Φαίνεται, λοιπόν, πως υπερέφραση της PHF8 οδηγεί σε αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα.

Διερεύνηση πιθανής σχέσης PHF8-AKT

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt έχει σπουδαία θέση στη ρύθμιση της πολικότητας των μακροφάγων, καθώς επιδρά, μεταξύ άλλων, στην παραγωγή κυτοκινών, την φαγοκυττάρωση και το μεταβολισμό των κυττάρων[28]. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι σημαντικό μέρος της ενεργότητας της PHF8 καθορίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσής της, τις ενδείξεις ότι η AKT φωσφορυλιώνει την PHF20[106], και δεδομένης της προϊστορίας του εργαστηρίου με τις κινάσες AKT, κρίθηκε σκόπιμο να εξιχνιαστεί το ενδεχόμενο πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ της PHF8 και των AKT κινασών. Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση της PHF8 σε περιτονιακά μακροφάγα από Akt1 KO ή Akt2 KO ποντικούς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PHF8 και της P-PHF8 κατόπιν φαρμακευτικής παρεμπόδισης των AKT κινασών.



Εικόνα 25: Η επίδραση των AKT κινασών στη γονιδιακή έκφραση, τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τη φωσφορυλίωση της PHF8

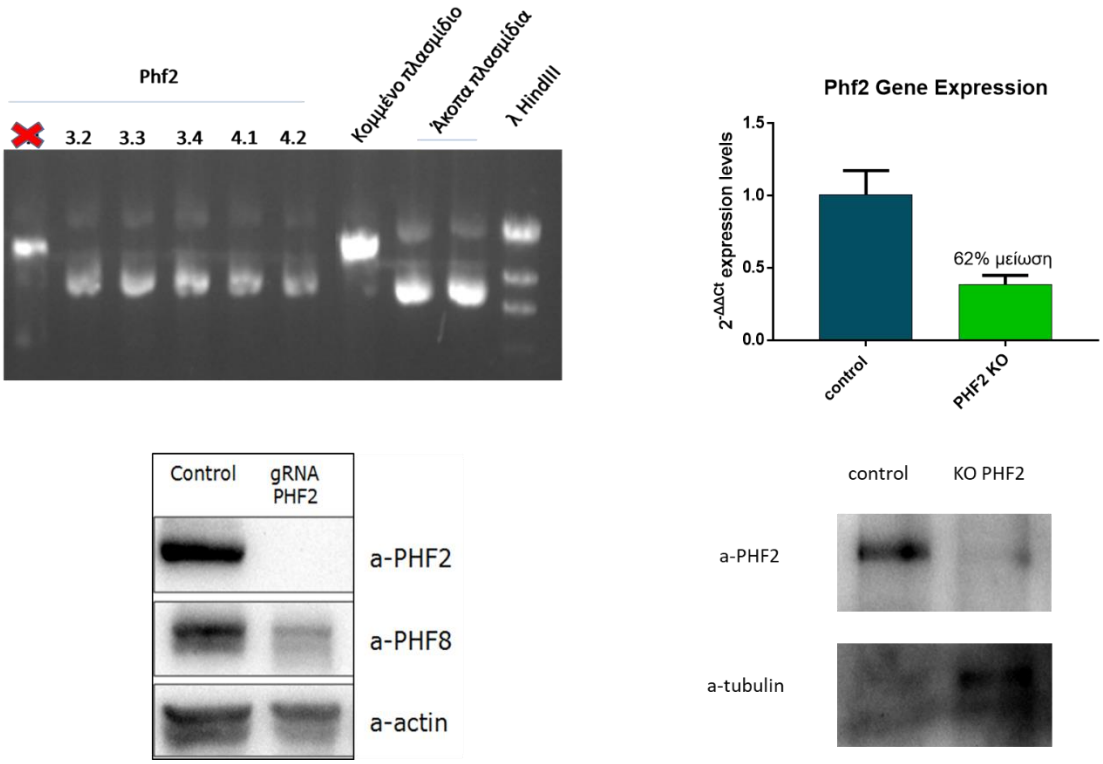
Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η έκφραση της PHF8 είναι σημαντικά μειωμένη στα Akt1 KO και σημαντικά αυξημένη στα Akt2 KO πρωτογενή μακροφάγα σε κατάσταση ηρεμίας (εικόνα 25). Στα Akt2 KO κύτταρα, η έκφραση της PHF8 παρουσιάζει αυξητική τάση και μετά από LPS.

Το φάρμακο MK 2206 αναστέλλει την AKT1, AKT2 και AKT3 χρησιμοποιούμενο σε συγκεντρώσεις των 8 nM, 12 nM και 65 nM, αντίστοιχα. Αναστολή της AKT1 κινάσης σε κατάσταση ηρεμίας (χωρίς LPS) έχει ως συνέπεια τη μείωση όχι μόνο της φωσφορυλιωμένης PHF8, αλλά των ίδιων των συνολικών επιπέδων της PHF8 (εικόνα 25), γεγονός που συνάδει με την ελαττωμένη έκφραση του γονιδίου Phf8 στα Akt1 KO μακροφάγα. Η αναστολή της AKT1 φαίνεται να μην οδηγεί σε λιγότερη P-PHF8 ή συνολική PHF8 κατόπιν ενεργοποίησης των κυττάρων με LPS (16 ώρες). Στο υπόλοιπο μισό της εικόνας 25 που αφορά στην παρεμπόδιση ταυτόχρονα των δύο κινασών, AKT1 και AKT2 (MK 12 mM), φαίνεται ότι τα δείγματα δεν ήταν το ίδιο καλά ισοφορτωμένα. Μπορεί, ωστόσο, να παρατηρηθεί ότι η P-PHF8 στο δείγμα «MK 12 mM +LPS» είναι λιγότερη από το αντίστοιχο δείγμα-μάρτυρα «DMSO 12 mM +LPS», παρότι στο πρώτο υπάρχει εμφανώς μεγαλύτερη ποσότητα συνολικής πρωτεϊνης σε σχέση με το δεύτερο.

Αποτελέσματα: PHF2

Η απομεθυλάση ιστονών PHF2 ανήκει στην ίδια οικογένεια με την PHF8. Είναι γνωστό πως σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στη ρύθμιση του ριβοσωμικού DNA, η PHF2 ανταγωνίζεται την PHF8 για τα ίδια γονίδια-στόχους[63], ενώ άλλοτε μπορεί να δρουν συνεργατικά. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι και αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης στα μακροφάγα[65]. Για τους λόγους αυτούς, παράλληλα με τη δράση της PHF8 μελετήθηκε με αντίστοιχο, αν και λιγότερο εκτεταμένο, τρόπο η σημασία της PHF2 στη φλεγμονώδη ενεργοποίηση των μακροφάγων. Σημειώνεται ότι η δημιουργία RAW 264.7 κυτταρικής σειράς που να υπερεκφράζει το γονίδιο της PHF2 ήταν ανεπιτυχής (βλ. Συζήτηση), για αυτό παρουσιάζονται δεδομένα μόνο από PHF2 KO μακροφάγα.

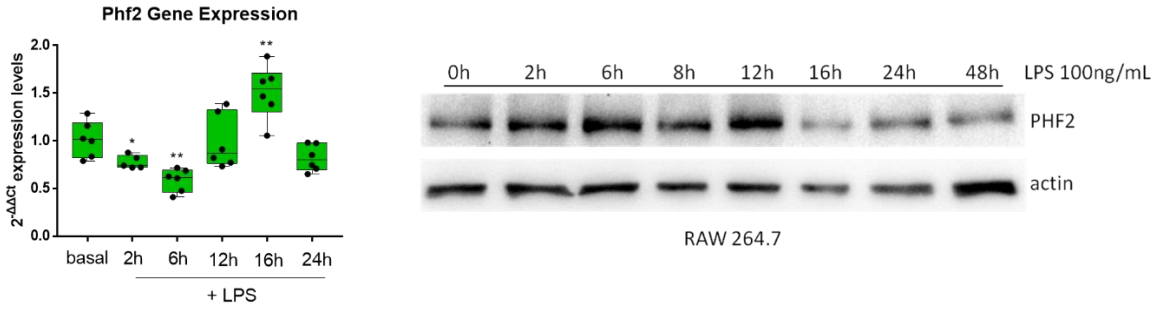
Δημιουργία κυτταρικής σειράς μακροφάγων (Raw264.7) με εξουδετερωμένο γονίδιο Phf2 με τη μέθοδο CRISPR



Εικόνα 26: Δημιουργία PHF2 KO RAW 264.7 μακροφάγων

Η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία της PHF8 KO κυτταρικής σειράς εφαρμόστηκε, αντίστοιχα, για την παραγωγή PHF2 KO μακροφάγων. Στην εικόνα 26, πάνω αριστερά, φαίνεται η διαλογή των επιθυμητών βακτηριακών αποικιών που φέρουν το κατάλληλο πλασμίδιο με αντίδραση περιορισμού. Κάτω αριστερά απεικονίζεται η πρώτη απόπειρα δημιουργίας των κυττάρων, τα οποία, ωστόσο, αποδείχθηκαν μολυσμένα. Επιβεβαιώθηκε, τουλάχιστον, ότι το επιλεγμένο gRNA ήταν κατάλληλο για τη στόχευση της Cas9 στο γονίδιο της PHF2. Πάνω δεξιά παρουσιάζεται η γονιδιακή έκφραση της PHF2 (62% μείωση, ερμηνεύεται στην ενότητα PHF8 KO το ποσοστό μείωσης) και κάτω δεξιά τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα στα νέα PHF2 KO μακροφάγα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία (με το προαναφερθέν gRNA).

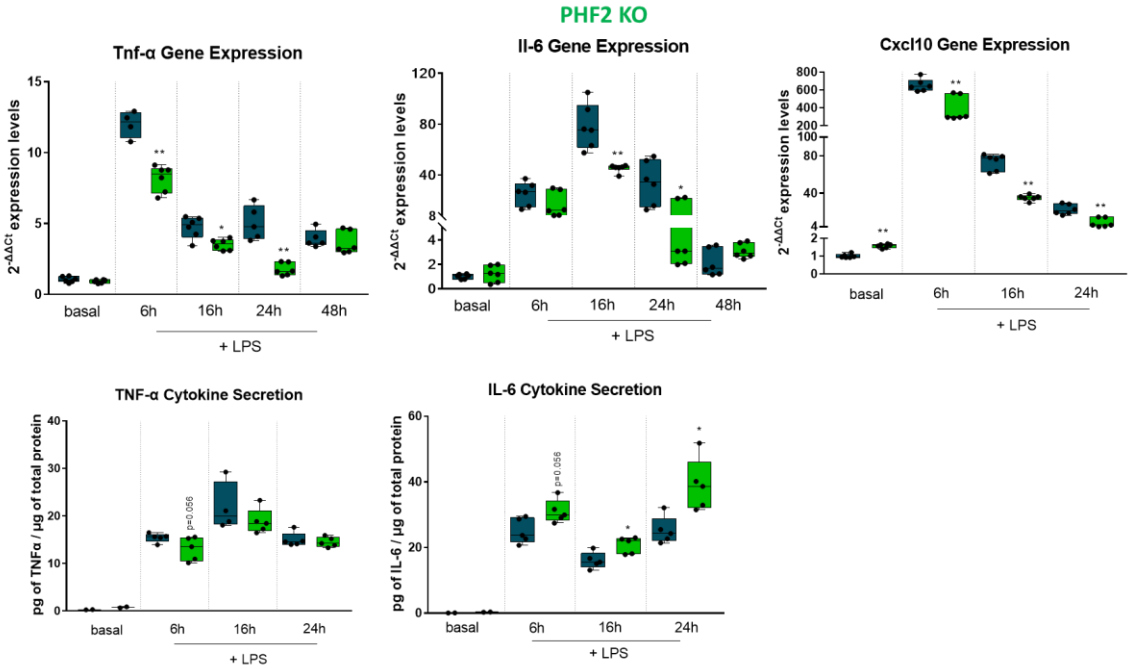
Το πρότυπο έκφρασης της Phf2



Εικόνα 27: Το πρότυπο έκφρασης της PHF2

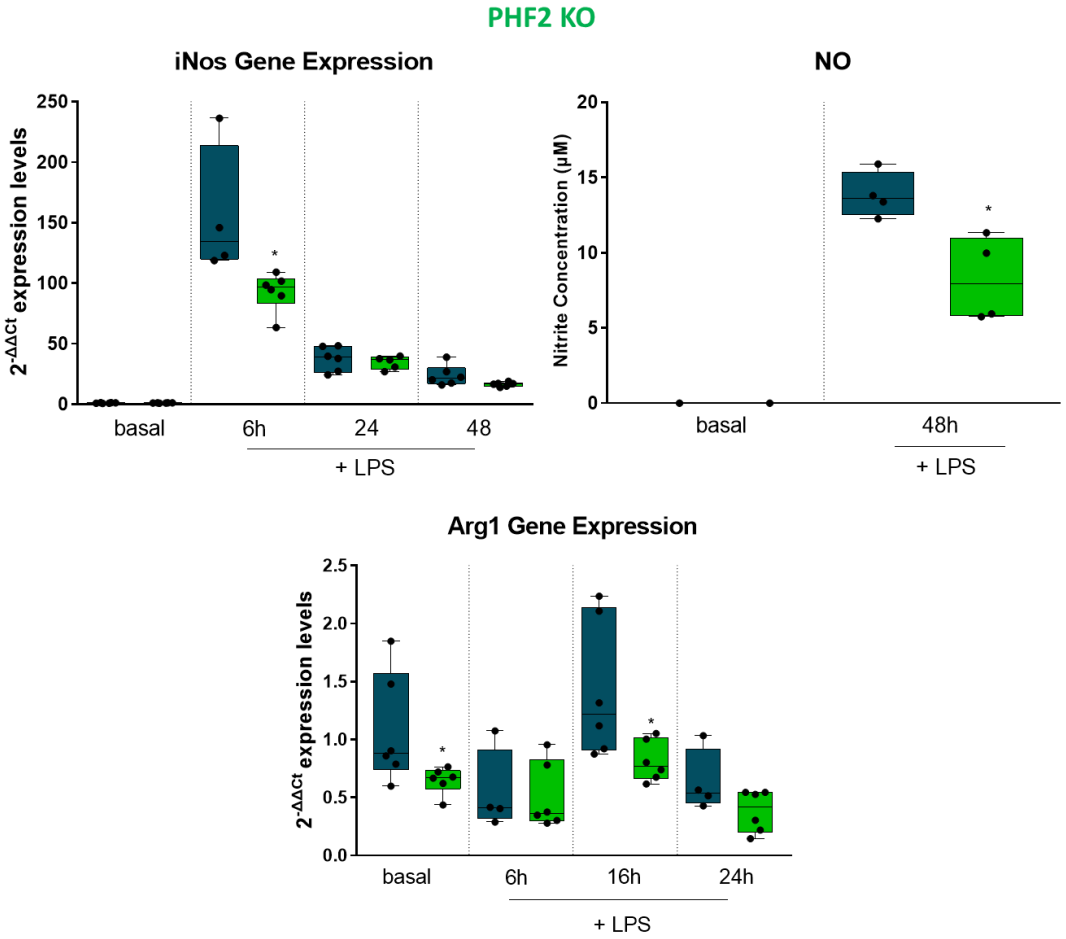
Στα RAW 264.7 μακροφάγα η έκφραση της PHF2, κατόπιν ενεργοποίησης των κυττάρων με LPS, αρχικά μειώνεται σημαντικά, φτάνοντας στα ελάχιστα επίπεδα έκφρασης στις 6 ώρες, ενώ στη συνέχεια αυξάνεται, αγγίζοντας τη μέγιστη έκφραση στις 16 ώρες, και έπειτα, στις 24 ώρες, επανέρχεται στα βασικά επίπεδα, με μία πτωτική τάση (εικόνα 27). Αυτό που έχει ενδιαφέρον να τονιστεί είναι ότι, σε αντιδιαστολή με την PHF8, η PHF2 παρουσιάζει μέγιστα πρωτεϊνικά επίπεδα στην αρχή της ανοσολογικής απόκρισης. Είναι ευνόητο ότι η έκφραση της PHF2 υπάγεται σημαντικά σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση, καθώς υπάρχουν διαφορές μεταξύ των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης.

Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF2» στην TLR-4 διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων



Εικόνα 28: Η PHF2 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση των TNF-α, IL-6 και CXCL10, αλλά όχι τα εκκρινόμενα επίπεδα TNF-α και IL-6

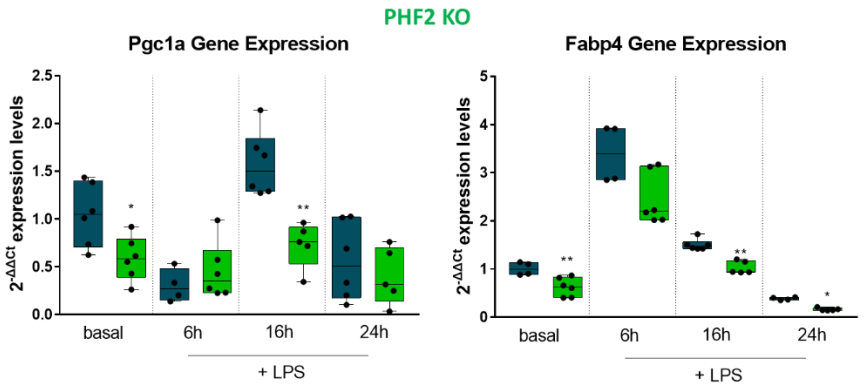
Εξουδετέρωση της PHF2 οδηγεί σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση των TNF-α, IL-6 και CXCL10 (εικόνα 28). Η μείωση αυτή, ωστόσο, δεν γίνεται εμφανής στα εκκρινόμενα επίπεδα του TNF-α. Ίσως εάν εξετάζονταν νωρίτερα χρονικά σημεία, δεδομένου ότι η PHF2 συσσωρεύεται ήδη από την αρχή της ενεργοποίησης των μακροφάγων, να εντοπιζόταν κάποια σημαντική πτώση. Σημειοτέον, η έκκριση της IL-6 παρουσιάζει άνοδο, παρά τη μειωμένη γονιδιακή της έκφραση. Είναι γνωστό ότι η IL-6 ρυθμίζεται εκτενώς στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο, επομένως ενδέχεται η έλλειψη της PHF2 να επηρεάζει παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτό.



Εικόνα 29: Η PHF2 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση της iNOS, την έκκριση του νιτρικού οξειδίου και τη γονιδιακή έκφραση της ARG1

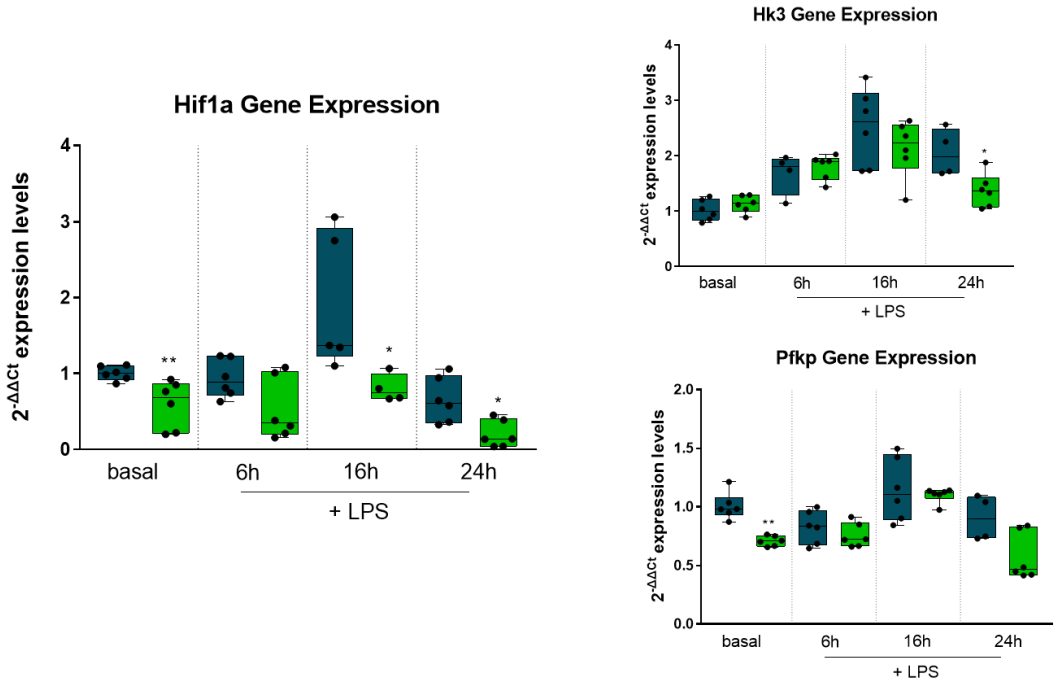
Η γονιδιακή έκφραση της iNOS ελαττώνεται στην αρχή της ανοσοαπάντησης, όταν εξουδετερώνεται η PHF2, το οποίο συνάδει με τα μειωμένα εκκρινόμενα επίπεδα νιτρικού οξειδίου (εικόνα 29). Πτωτική τάση παρουσιάζει, επίσης, η έκφραση της ARG1. Επομένως η PHF2 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά τους παραπάνω παράγοντες.

Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF2» στο μεταβολισμό των μακροφάγων



Εικόνα 30: Η PHF2 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση των PGC1α και FABP4

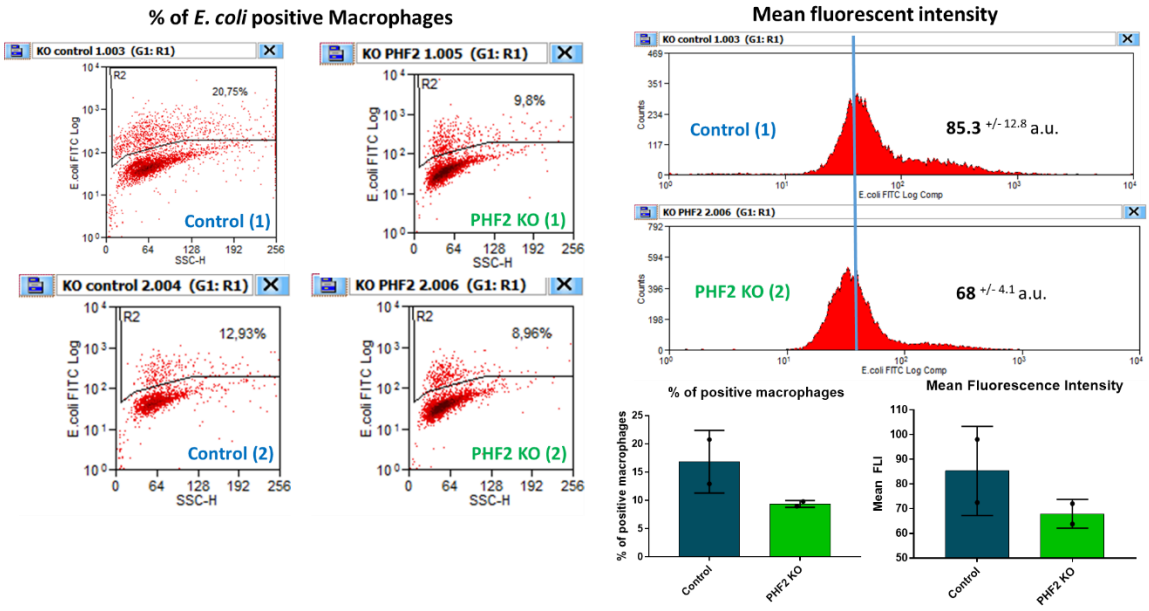
Ακολουθώντας τα χνάρια της PHF8, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση του κύριου ρυθμιστή βιογένεσης μιτοχονδρίων, PGC1a, και της σαπερόνης λιπιδίων, FABP4. Σε αντίθεση με την PHF8, φαίνεται ότι η PHF2 ρυθμίζει θετικά αυτά τα γονίδια. Προκύπτει, λοιπόν, η υπόθεση ότι η PHF2 θα μπορούσε να έχει τον αντίστροφο ρόλο στον έλεγχο των επιπέδων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε σχέση με την PHF8.



Εικόνα 31: Η PHF2 ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση του HIF1α

Απουσία της PHF2 μειώνεται η γονιδιακή έκφραση του HIF1a, τόσο πριν όσο και μετά από LPS, επομένως φαίνεται πως η PHF2 τη ρυθμίζει θετικά (εικόνα 31). Δεν παρατηρήθηκε, πάντως, κάποιος ισχυρός φαινότυπος στην έκφραση των γλυκολυτικών γονιδίων Hk3 και Pfkp όταν εξουδετερώθηκε η PHF2.

Ο ρόλος της απομεθυλάσης ιστονών «PHF2» στην φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων



Εικόνα 32: Η PHF2 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική φαγοκυττάρωση

Η κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι το ποσοστό των μακροφάγων που έχουν φαγοκυτταρώσει το σημασμένο βακτήριο *E. coli* είναι σημαντικά μειωμένο όταν εξουδετερώνεται η PHF2 (εικόνα 20). Ταυτοχρόνως, στα ίδια κύτταρα, η μέση ένταση φθορισμού, δηλαδή ο αριθμός των ενδοκυτταρωμένων βακτηρίων ανά μακροφάγο, ελαττώνεται επίσης σημαντικά. Επομένως, η PHF2 φαίνεται να απαιτείται για την αποτελεσματική φαγοκυττάρωση.

Συζήτηση

Ο ρόλος της PHF8 στην ανοσολογική απόκριση

Από τη διαλογή γονιδίων που πραγματοποιήθηκε βρέθηκε ότι η σίγαση της PHF8 στα μακροφάγα αυξάνει την έκφραση του γονιδίου iNos, το προϊόν του οποίου είναι απαραίτητο για την παραγωγή και έκκριση νιτρικού οξειδίου, που αποτελεί ένα από τα κρίσιμα λειτουργικά χαρακτηριστικά των μακροφάγων (εικόνα 7). Η παρατήρηση αυτή λειτούργησε ως καταλύτης για την περαιτέρω μελέτη της δράσης της PHF8 στην ανοσολογική απόκριση. Τονίζεται πως ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά για το ρόλο της PHF8 κατά τη φλεγμονώδη απάντηση των μακροφάγων, που οφείλονται σε μόλις δύο δημοσιευμένες μελέτες[59,93].

Αρχικά, εξετάστηκε το πρότυπο της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης της PHF8 κατόπιν ενεργοποίησης των μακροφάγων με LPS και βρέθηκε ότι το γονίδιο επάγεται ελαφρώς αρκετές ώρες μετά το ερέθισμα, ενώ η παραγωγή της πρωτεΐνης αυξάνεται σημαντικά μετά τις 12 ώρες και παρουσιάζει μέγιστο στις 24-48 ώρες (εικόνα 13). Τα επίπεδα πρωτεΐνης είναι δυσανάλογα μεγαλύτερα σε σύγκριση με τα επίπεδα mRNA, που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η PHF8 υπάγεται σε εκτενή μετα-μεταγραφική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση, π.χ.,

μέσω MYC-mir-22[103,104] και USP7[105]. Στη συνέχεια, η σημασία της απομεθυλάσης ιστονών PHF8 πριν και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας την έκφραση και έκκριση σημαντικών προ- και αντί- φλεγμονώδων παραγόντων σε BMDMs (bone marrow-derived macrophages) με σιγημένο το γονίδιο Phf8, καθώς και σε σταθερές κυτταρικές σειρές RAW 264.7 PHF8 KO (Knock Out) ή OE (Over-Expression) μακροφάγων.

Μια ενδιαφέρουσα διαπίστωση είναι ότι η PHF8 επηρεάζει τα βασικά επίπεδα έκφρασης (δηλαδή εκείνα σε κατάσταση ηρεμίας των κυττάρων, πριν την έκθεση σε LPS) σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων, και συγκεκριμένα των γονιδίων Tnf-α, Il-6, Cxcl10 και Arg1 (εικόνες 14, 15, 16 και 18, αντίστοιχα). Παρότι έγινε μια απόπειρα να προσδιοριστεί εάν η PHF8 προσδένεται η ίδια στα εξεταζόμενα γονίδια με την τεχνική της ανοσοκαταρκήμνισης χρωματίνης, αυτή ήταν ανεπιτυχής και μέλλεται να επαναληφθεί. Οι παραπάνω μάρτυρες, καθώς και άλλοι, μελετήθηκαν, επιπρόσθετα, κατόπιν έκθεσης των μακροφάγων σε LPS, το οποίο πυροδοτεί την TLR4-διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη απόκριση και παρουσιάζονται στη συνέχεια.

TNF-α: Η PHF8 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση και τα εκκρινόμενα επίπεδα του TNF-α, αν και αυτό δεν επαληθεύτηκε στα BMDMs (εικόνα 14). Το γεγονός ότι τα επίπεδα mRNA του TNF-α δε συνάδουν απόλυτα με την αντίστοιχη εκκρινόμενη κυτοκίνη μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι η παραγωγή του διαλυτού TNF-α υπάγεται σε εκτεταμένη μετα-μεταφραστική ρύθμιση. Για την ακρίβεια, από το mRNA του γονιδίου αρχικά παράγεται ο διαμεμβρανικός TNF-α, που αποτελεί την πρόδρομη μορφή του διαλυτού TNF-α. Κατόπιν της ενζυμικής δράσης του TACE (TNF-α-converting enzyme), η διαλυτή μορφή του TNF-α αποκόπτεται από την αντίστοιχη διαμεμβρανική και ενεργεί μέσω της πρόσδεσης στους TNF υποδοχείς. Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως και η διαμεμβρανική μορφή του TNF-α εμπλέκεται στην ανοσολογική απόκριση τόσο ως προσδέτης (ligand) όσο και ως υποδοχέας κατά την άμεση κυτταρική επαφή[107]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε μόνο η εκκρινόμενη μορφή του TNF-α . Δεν είναι απίθανο, για παράδειγμα, τα υψηλότερα επίπεδα mRNA των PHF8 OE κυττάρων στις 6 ώρες που δεν συνεπάγονται υψηλότερα επίπεδα διαλυτού TNF-α, να έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα διαμεμβρανικού TNF-α, ενδεχόμενο μη αμελητέο, εφόσον θα μπορούσε να επηρεάσει την ανοσολογική απόκριση.

IL-6: Προέκυψαν σημαντικές ενδείξεις ότι η γονιδιακή έκφραση της IL-6 ρυθμίζεται θετικά από την PHF8 (εικόνα 15). Είναι αξιοσημείωτο πως, παρά την ομοιότητα της επίδρασης στην έκφραση του γονιδίου ανάμεσα στα κύτταρα που υπό- και που υπέρ- εκφράζουν την PHF8, το αποτέλεσμα είναι αντίθετο όσον αφορά στα πρωτεϊνικά επίπεδα της εκκρινόμενης IL-6. Για την ακρίβεια, στα PHF8 OE μακροφάγα η IL-6 αυξάνεται, ενώ στα PHF8 KO μακροφάγα (και τα Phf8 KD BMDMs) η IL-6 ελαττώνεται. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει η υπερ-παραγωγή της PHF8 ή η απουσία της να επιδρά με αντίθετο τρόπο στην προστασία, αποικοδόμηση ή έναρξη της μετάφρασης του mRNA, που αποτελούν σημεία-κλειδιά για τη ρύθμιση της IL-6[108].

Cxcl10: Η χημειοκίνη CXCL10 εκκρίνεται σε σημαντικό βαθμό από τα μακροφάγα στα πλαίσια μιας ανοσολογικής απόκρισης και είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργικότητα των Τ-λεμφοκυττάρων, για αυτό έχει χαρακτηριστεί ως συνδετικός κρίκος μεταξύ της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας[93,109]. Είναι εμφανέστατο πως η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του Cxcl10, καθώς, όταν υπερεκφράζεται, τα επίπεδα mRNA παρουσιάζουν σημαντική μείωση, ενώ, όταν εξουδετερώνεται, αυτά αυξάνονται σημαντικά, τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και κατόπιν ενεργοποίησης με LPS (εικόνα 16). Ο ισχυρός

φαινότυπος που παρατηρείται αποτελεί βάσιμη ένδειξη ότι το γονίδιο Cxcl10 περιλαμβάνεται στους άμεσους στόχους της PHF8, το οποίο θα μπορούσε να διακριβωθεί με μία δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Μάλιστα, εν προκειμένω, η PHF8 φαίνεται να δρα ως συγκαταστολέας και όχι ως συνενεργοποιητής, παρά το γεγονός ότι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει τονιστεί κυρίως η ενεργοποιητική της δράση. Ο CXCL10 έχει συσχετιστεί ισχυρά με περιπτώσεις καρκίνου, αυτοανοσίας και νευροφλεγμονής[109–111], επομένως θα είχε ενδιαφέρον να εξεταζόταν τι συμβαίνει με τα επίπεδα της PHF8 σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις.

iNos / Νιτρικό Οξείδιο: Η PHF8 φαίνεται να παρεμποδίζει τόσο την έκφραση της iNOS όσο και την παραγωγή του νιτρικού οξειδίου στα ενεργοποιημένα μακροφάγα (εικόνα 17). Υπερέκφραση της PHF8 είχε ως αποτέλεσμα μια ελαφριά, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, πτώση στη γονιδιακή έκφραση της iNOS (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

Arg: Το ένζυμο αργινάση καταλύει την υδρόλυση της L-αργινίνης σε ορνιθίνη και ουρία και ανταγονίζεται την iNOS ως προς τα ενδοκυττάρια αποθέματα L-αργινίνης και, όταν η πρώτη υπερτερεί, οδηγεί τα μακροφάγα προς τον M2 φαινότυπο[112]. Αυτή, όπως και οι περισσότεροι M2 μάρτυρες, επάγονται υψηλά πολλές ώρες μετά την πρόκληση φλεγμονής. Πράγματι, η PHF8 φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την αργινάση στην κατάσταση ηρεμίας και αρκετές ώρες μετά την έναρξη της ανοσολογικής απάντησης στα πρωτογενή μακροφάγα (48 ώρες).

Γενικό συμπέρασμα και σύγκριση με άλλες μελέτες πάνω στη δράση της PHF8 στην ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων

Συνολικά, η PHF8 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά κάποια σημαντικά γονίδια της φλεγμονώδους απόκρισης των μακροφάγων, ενώ να παρεμποδίζει την έκφραση άλλων. Επομένως, δεν μπορεί να χαρακτηριστεί η δράση της ξεκάθαρα ως προ-φλεγμονώδης ή αντί-φλεγμονώδης με βάση τα παρουσιαζόμενα δεδομένα.

Πάντως, οι Erdogan et al.[93] το 2016 πρότειναν πως η PHF8 δρα ως προφλεγμονώδης γονιδιο-ειδικός ρυθμιστής της χρωματίνης μέσω αφαίρεσης της κατασταλτικής επιγενετικής τροποποίησης H3K9m2 στα οξείως ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα και μέσω θετικής ρύθμισης του NF-κB. Η έκφραση γονιδίων όπως το Tnf-α ή το Il-6 μειώθηκε όταν μακροφάγα με σιγημένη PHF8 εκτέθηκαν σε LPS, παρατήρηση που συνάδει με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω (εικόνες 14, 15). Υπογραμμίζεται, πάντως, ότι στη συγκεκριμένη δημοσίευση τα μακροφάγα εκτίθεντο σε 1000 ng/ml LPS, δηλαδή δεκαπλάσια συγκέντρωση από τη χρησιμοποιούμενη στην τρέχουσα εργασία, γεγονός που κατά πάσα πιθανότητα πυροδοτεί διαφορετικές αποκρίσεις.

Περίπου έναν χρόνο αργότερα, παρουσιάστηκε από τους Asensio-Juan et al.[59] πως η PHF8 μπορεί, πέρα από τη δράση της ως συνενεργοποιητής, να παρεμποδίζει τη μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση (όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση του Cxcl10 παραπάνω), με την αιτιολόγηση πως έτσι εξασφαλίζεται περισσότερη ειδικότητα και ακρίβεια στην επαγωγή της τελευταίας. Συγκεκριμένα, προτάθηκε πως αλληλεπιδρά με τους συγκαταστολείς SIN3A και HDAC1 διατηρώντας κατεσταλμένο μεν, σε ετοιμότητα δε, ένα σετ IFNγ-εξαρτώμενων υποκινητών και χαμηλά τα επίπεδα της ενεργοποιητικής H4K20me1 στην κατάσταση ηρεμίας. Η φωσφορυλίωση της PHF8 από την ERK2, λόγω έκθεσης των μακροφάγων σε IFNγ, έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της πρώτης από τους προαναφερθέντες υποκινητές, άνοδο των επιπέδων H4K20me1 και ενεργοποίηση της μεταγραφής.

Η σημασία της PHF8 στον ανοσομεταβολισμό

Πολυάριθμες έρευνες καταδεικνύουν πλέον ότι η ανοσολογική απόκριση επηρεάζει, μα και ελέγχεται η ίδια από τον μεταβολισμό των κυττάρων. Η βιογένεση μιτοχονδρίων αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ειδοποιείς διαφορές στις μεταβολικές προσαρμογές των M1-M2 μακροφάγων και παρατηρείται κατά κόρον στα αντιφλεγμονώδη M2 κύτταρα[94]. Ο PGC-1α συνιστά κεντρικό ρυθμιστή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και ελέγχει μεταγραφικά έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό[113]. Είναι οφθαλμοφανές πως η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του PGC1a, ενδεχομένως δρώντας ως συγκαταστολέας, καθώς υπερέκφραση της πρώτης μειώνει δραματικά τα επίπεδα mRNA αυτού τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και κατόπιν LPS, ενώ εξουδετέρωση ή σίγηση της Phf8 οδηγεί σε άνοδο των βασικών, αλλά και των επαγόμενων από LPS επίπεδων έκφρασης του εξεταζόμενου γονιδίου (εικόνα 20). Μία τέτοια παρατήρηση συνάδει απόλυτα με το μειωμένο φορτίο μιτοχονδρίων που μετρήθηκε στα μακροφάγα με υπερεκφραζόμενη PHF8 έπειτα από χρώση των πρώτων με τη φθορίζουσα χρωστική mitotracker (εικόνα 21).

Έχει δειχθεί πως σε AKT2 KO μυϊκά κύτταρα τα βασικά επίπεδα έκφρασης του PGC1a είναι σημαντικά μειωμένα[114], χωρίς, ωστόσο, να έχει προταθεί κάποιος μοριακός μηχανισμός. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας παρουσιάζεται ότι τα AKT2 KO μακροφάγα έχουν αυξημένα βασικά επίπεδα Phf8 (εικόνα 25) και ότι η PHF8 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του Pgc1a (εικόνα 21). Θα ήταν εφικτό, επομένως, η προαναφερθείσα ελάττωση του PGC1a σε AKT2 KO κύτταρα να διαμεσολαβείται από την PHF8.

Ο PGC1a είναι γνωστό πως ρυθμίζει την FABP4. Η πρωτεΐνη FABP4 είναι μια σαπερόνη λιπιδίων που ελέγχει τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων συμμετέχοντας στη μιτοχονδριακή οξειδοαναγωγή, καθώς και τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα μέσω της απόκρισης αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (mUPR). Η ίδια έχει συσχετιστεί με την πυροδότηση φλεγμονώδων αποκρίσεων μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών NF-κB και JNK/AP-1 σε μακροφάγα, ενώ η απώλεια της έχει συνδεθεί με έναν αντιφλεγμονώδη M2 φαινότυπο[115,116]. Είναι αξιοσημείωτη η μείωση της έκφρασης του Fabp4 γονιδίου στα PHF8 OE κύτταρα, που συνάδει απόλυτα με την αντίστοιχη πτώση της έκφρασης του Pgc1a (εικόνα 21), γεγονός που θα μπορούσε να εξασθενεί την ανοσολογική απόκριση.

Η δοκιμή MTT είναι μία χρωματομετρική τεχνική εκτίμησης της μεταβολικής δραστηριότητας ενός κυττάρου, η οποία χρησιμοποιείται συχνά και για τον προσδιορισμό της κυτταρικής διαίρεσης ή απόπτωσης, καθώς περισσότερα ή λιγότερα ζωντανά κύτταρα συνεπάγονται αυξημένη ή μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα, αντίστοιχα[117]. Το άλας τετραζολίου MTT ανάγεται σε φορμαζάνη, έναν μοβ κρύσταλλο αδιάλυτο στο νερό, στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα μέσω των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών[118], και κυρίως την ηλεκτρική αφυδρογονάση[119]. Η φορμαζάνη, αφού διαλυτοποιηθεί, μπορεί στη συνέχεια να μετρηθεί σε φασματοφωτόμετρο[4].

Η αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των PHF8 KO μακροφάγων συνάδει με την αυξημένη έκφραση του κεντρικού ρυθμιστή βιογένεσης μιτοχονδρίων Pgc1a (εικόνα 20). Ο αριθμός των μιτοχονδρίων εξαρτάται, επιπρόσθετα, από τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G2 έχουν περισσότερα μιτοχόνδρια, τα οποία μπορούν να

[4] Σημειώνεται ότι έχει πλέον δειχθεί πως το MTT μπορεί να αναχθεί αυθόρμητα σε φορμαζάνη σε λιπιδικές κυτταρικές δομές χωρίς τη μεσολάβηση ενζυμικής κατάλυσης[133].

αναγάγουν περισσότερο MTT σε φορμαζάνη[120]. Έχει δειχθεί πως η PHF8 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση κρίσιμων G2/M γονιδίων κατά την G2 φάση και ότι η απώλειά της οδηγεί σε παρατεταμένη G2 φάση και προβληματική μίτωση[121]. Η αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των PHF8 KO μακροφάγων που φαίνεται στη δοκιμή MTT (εικόνα 20), λοιπόν, θα μπορούσε να οφείλεται, επίσης, στο ότι μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων ενδέχεται να βρίσκεται στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου και να έχουν, για το λόγο αυτό, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια.

Η γλυκόλυση θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους δραστηριότητας των M1 μακροφάγων. Ο HIF1a είναι σημαντικός μεταβολικός ρυθμιστής της γλυκόλυσης και έχει κεντρικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις[94,95]. Η PHF8 φαίνεται πως ρυθμίζει θετικά τον HIF1a μόνο στην αρχή της ανοσοαπάντησης (6 ώρες), το οποίο είναι ευνόητο, καθώς τότε μόνο είναι απαραίτητος για την επαγωγή προ-φλεγμονώδων γονιδίων (εικόνα 22). Πάντως, ο HIF1a δεν φαίνεται να ρυθμίζει θετικά τα δύο εξεταζόμενα γλυκολυτικά γονίδια, Hk3 και Pfkp (εικόνα 23). Αυτό συνάδει με την τρέχουσα εκτίμηση ότι μόνο σε συνθήκες υποξίας επάγεται η έκφραση της HK3 μέσω του HIF[122]. Απεναντίας, τα δύο ένζυμα μάλλον υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση από την PHF8 (εικόνα 23).

PHF8 & φαγοκυτταρική ικανότητα

Η κυτταρομετρία ροής μακροφάγων που επωάστηκαν με βακτήρια σημασμένα με το φθορίζον αντίσωμα FITC έδειξε ότι εκείνα που υπερεκφράζουν την PHF8 παρουσιάζουν ελαφρώς μεγαλύτερο ποσοστό φαγοκυττάρωσης και αρκετά αυξημένη μέση ένταση φθορισμού, η οποία μπορεί να ερμηνευτεί ως ο μέσος αριθμός φαγοκυτταρωμένων βακτηρίων ανά μακροφάγο (εικόνα 24). Η επίδραση της εξουδετέρωσης της PHF8 στο ποσοστό των μακροφάγων θετικών για το βακτήριο δεν είναι σαφής, λόγω μεγάλης απόκλισης στα κύτταρα-μάρτυρες, ενώ, όσον αφορά στη μέση ένταση φθορισμού, δεν φάνηκε διαφορά στα PHF8 KO μακροφάγα (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

Αξίζει να επισημανθεί ότι τα βακτήρια ήταν οψωνινοποιημένα, επομένως η σηματοδότηση στα μακροφάγα, πέρα από τους TLR4 υποδοχείς (λόγω του LPS στην επιφάνεια της *E. coli*) επιτυγχανόταν και μέσω Fc υποδοχέων. Επομένως, η όποια επίδραση φαίνεται λόγω γενετικών χειρισμών της PHF8 στη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην τροποποίηση της TLR4-διαμεσολαβούμενης απόκρισης που περιγράφηκε προηγουμένως.

Μάλιστα, είναι ακόμα περισσότεροι οι παράγοντες που χρειάζεται να ληφθούν υπόψη για τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Έχει γνωστοποιηθεί ότι η PHF8 ρυθμίζει πλήθος κατηγοριών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του κυτταροσκελετού[72]. Το φαινόμενο της φαγοκυττάρωσης είναι μια διεργασία που απαιτεί οπωσδήποτε την αυστηρά ελεγχόμενη αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Επομένως, οτιδήποτε επιδρά στο κυτταροσκελετό θα μπορούσε να επιδρά και στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι ένας κυτταρικός πληθυσμός εμφανίζει μεγαλύτερη μέση ένταση φθορισμού θα μπορούσε να αποδοθεί σε εξασθενημένη ενδοκυττάρια καταστροφή του μικροοργανισμού (π.χ., λόγω προβληματικής σύντηξης του φαγοσώματος με το λυσόσωμα ή/και λιγότερο λειτουργικών λυσοσωμάτων).

Σχέση PHF8-AKT

Το Akt σηματοδοτικό μονοπάτι κατέχει κεντρική θέση στην ανοσολογική απόκριση. Προηγούμενη δημοσιευμένη εργασία του εργαστηρίου έχει δείξει πως διαφορετικές ισομορφές των AKT κινασών ωθούν τα μακροφάγα σε αντιδιαμετρικό λειτουργικό φαινότυπο. Συγκεκριμένα, εξουδετέρωση της Akt1 οδηγεί τα μακροφάγα προς την M1 πόλωση, ενώ εξουδετέρωση της Akt2 κινάσης τα πολώνει προς έναν M2 φαινότυπο[123]. Η ισχυρή εξάρτηση της ενεργότητας της PHF8 από την κατάσταση φωσφορυρίωσής της και ενδείξεις ότι η AKT φωσφορυλιώνει την PHF20, κινητοποίησαν την εξιχνίαση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ PHF8 και AKT.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η έκφραση της PHF8 επηρεάζεται με αντίθετο τρόπο κατόπιν εξουδετέρωσης του γονιδίου της AKT1 ή της AKT2 κινάσης, τόσο σε κατάσταση ηρεμίας, όσο και μετά από επαγωγή με LPS. Ειδικότερα, η PHF8 ελαττώνεται στα Akt1 KO κύτταρα, ενώ αυξάνεται στα AKT2 KO (εικόνα 25). Αναδύεται, επομένως, η πιθανότητα η Akt1 να ρυθμίζει θετικά, ενώ η Akt2 αρνητικά την έκφραση της PHF8 στα μακροφάγα. Είναι δελεαστικός ο ισχυρισμός ότι ο M2 φαινότυπος των AKT2 KO μακροφάγων θα μπορούσε εν μέρει να διαμεσολαβείται από την επαγωγή της PHF8, η οποία φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά αρκετά M1-σχετιζόμενα γονίδια, ενώ ο M1 φαινότυπος των AKT1 KO κυττάρων να οφείλεται σε έναν βαθμό στη μειωμένη PHF8. Μα για να ειπωθεί κάτι τέτοιο, θα πρέπει πρώτα να έχουν ελεγχθεί τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PHF8 και η κατάσταση φωσφορυλίωσης της τελευταίας στις συνθήκες αυτές.

Φαρμακευτική παρεμπόδιση της AKT1 κινάσης σε κατάσταση ηρεμίας (χωρίς LPS) έχει ως συνέπεια τη μείωση της ίδιας της PHF8, γεγονός που συνάδει με την ελαττωμένη έκφραση του γονιδίου Phf8 σε AKT1 KO μακροφάγα (εικόνα 25). Κατόπιν ενεργοποίησης των μακροφάγων με LPS, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PHF8, όπως και της P-PHF8[5], είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα των κυττάρων-μάρτυρες, το οποίο υποδηλώνει ότι η αναστολή της AKT1 δεν ελαττώνει τη φωσφορυλίωση ή τη συνολική πρωτεϊνη του υπό μελέτη ενζύμου στα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Παρεμπόδιση ταυτόχρονα των δύο κινασών, AKT1 και AKT2, φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη P-PHF8 στα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Δεν επιδιώχθηκε παρεμπόδιση της AKT3 κινάσης, διότι η περιεκτικότητα του αναστολέα σε DMSO θα ήταν υπερβολικά τοξική για τα κύτταρα. Επισημαίνεται ότι η AKT3 αποτελεί περίπου το 25% του συνολικού φορτίου AKT κινασών στα μακροφάγα, ενώ η AKT2 είναι η κυρίαρχη ισομορφή[124], που θα μπορούσε να δικαιολογήσει τον τελευταίο φαινότυπο. Πραγματοποιήθηκε, πάντως, μια προσπάθεια συν-ανοσοκατακρήμνισης, που θα έδινε άμεση απάντηση στο ερώτημα σχετικά με την αλληλεπίδραση PHF8-AKT, ωστόσο ήταν ανεπιτυχής (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

Ίδιος φαινότυπος στην έκφραση γονιδίων μακροφάγων που υπό- ή υπέρ- εκφράζουν την PHF8

Κινεί το ενδιαφέρον το γεγονός πως σε μερικές περιπτώσεις ο φαινότυπος στη γονιδιακή έκφραση είναι παρόμοιος, είτε η PHF8 υπερεκεφράζεται είτε εξουδετερώνεται. Είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση ενός γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε επικρατώς αρνητικό (dominant negative) φαινότυπο, δηλαδή να προσομοιάζει την εικόνα που προκύπτει από την εξουδετέρωση του ίδιου γονιδίου[125]. Ωστόσο, αν κάτι τέτοιο συμβαίνει με την υπερέκφραση

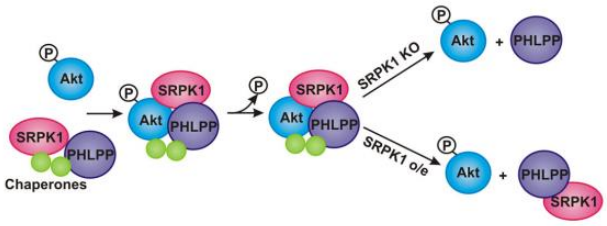
[5] Επισημαίνεται ότι επιβεβαιώθηκε πειραματικά πως η μπάντα πάνω από την PHF8 είναι η P-PHF8. Συγκεκριμένα, δείγματα πρωτεϊνης επωάστηκαν με φωσφατάσες και διαπιστώθηκε ότι η υψηλότερη μπάντα (P-PHF8) εξαφανιζόταν.

της PHF8 στα κύτταρα που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, σίγουρα δεν είναι απόλυτο, καθώς υπάρχουν περιπτώσεις όπως η έκφραση του γονιδίου Pgc1a ή του Cxcl10 που συμπεριφέρεται με εμφανώς αντίθετο τρόπο όταν υπερεκφράζεται σε σχέση με όταν εξουδετερώνεται η PHF8.

Έχει δειχθεί πως η PHF8 μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση των γονιδίων-στόχων απομεθυλιώνοντας συγκεκριμένα κατάλοιπα ιστονών, αλλά και να καταστείλει την έκφραση άλλων, μέσω της αλληλεπίδρασής της με σύμπλοκα μεταγραφικής καταστολής. Επίσης, η φωσφορυλίωση της PHF8 είναι καθοριστική για την απομεθυλιωτική της δραστικότητα, καθώς και για την αλληλεπίδρασή της με ενεργοποιητικά ή κατασταλτικά σύμπλκοκα της μεταγραφής, και διεκπεραιώνεται από έναν αριθμό κινασών που ανήκουν σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως η ERK2, η CDK1/2 κλπ.

Παρατηρείται ότι, κατά κύριο λόγο, η ομοιότητα του φαινοτύπου από την υπερέκφραση της PHF8 με τον φαινότυπο από την εξουδετέρωση αυτής σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Η ερώτηση που προκύπτει είναι η εξής: θα μπορούσε η υπερ-παραγωγή της PHF8 να οδηγεί σε καταστολή των γονιδίων-στόχων που φυσιολογικά θα ενεργοποιούσε; Στη συνέχεια συζητιούνται μερικοί τρόποι που θα καθιστούσαν εφικτό ένα τέτοιο φαινόμενο.

1) Δεδομένου ότι η υπερέκφραση της PHF8 συνεπάγεται δραματική αύξηση των πρωτεϊνικών της επιπέδων (εικόνα 10), χρειάζεται κατόπιν να εξεταστεί η ενεργότητα αυτής. Δεν αποκλείεται η υπερπαραγωγή μιας πρωτεΐνης να έχει ως αποτέλεσμα τη μη σωστή αναδίπλωση αυτής και τη δημιουργία συσσωματωμάτων, άρα και μειωμένη ενεργότητα.
2) Άφθονη PHF8 θα μπορούσε να δημιουργεί δυσανάλογα περισσότερα κατασταλτικά σύμπλοκα σε σχέση με τα ενεργοποιητικά, ενώ σε φυσιολογικά επίπεδα πιθανόν να σχηματίζει «κατά προτίμηση» σύμπλοκα με τα ενεργοποιητικά, λόγω μεγαλύτερης συγγένειας. Τα κατασταλτικά σύμπλοκα θα μπορούσαν να έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τα γονίδια στόχους από τα ενεργοποιητικά, επομένως να καταστέλλεται η έκφραση αυτών.
3) Η αφθονία της PHF8 θα μπορούσε να οδηγεί στην αδυναμία σχηματισμού ενεργοποιητικών συμπλόκων, λόγω διαταραχής της ιδανικής στοιχειομετρίας. Παρουσιάζεται, για παράδειγμα, το μοντέλο συστατικής ενεργοποίησης (constitutive activation) της Akt σε απόκριση τόσο της υπερ- όσο και υπο- έκφρασης της πρωτεΐνης SRPK1[125]. Όταν η SRPK1 βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, τότε η PHLPP δεν μπορεί να επιστρατευτεί στην Akt αποτελεσματικά, ενώ, όταν η SRPK1 είναι άφθονη, η PHLPP τιτλοδοτείται μακριά από την Akt, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Akt είτε η SRPK1 υπερεκφράζεται είτε υποεκφράζεται.



Εικόνα 33: Μοντέλο συστατικής ενεργοποίησης της Akt ως απόκριση τόσο στην υπερέκφραση όσο και την εξουδετέρωση του γονιδίου της Srpk1[125]

4) Υπερ-παραγωγή της PHF8 θα μπορούσε να οδηγεί σε χαμηλότερη αναλογία φωσφορυλιωμένης PHF8 προς μη-φωσφορυλιωμένης PHF8, με αποτέλεσμα οι θέσεις πρόσδεσης στα γονίδια-στόχους να καταλαμβάνονται συχνότερα από τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της PHF8 και έτσι να προκύπτει το αντίθετο αποτέλεσμα.
5) Μπορεί να επάγονται μηχανισμοί αντιστάθμισης. Για παράδειγμα, υπερέκφραση της PHF8 θα μπορούσε να προκαλεί επαγωγή ενός παράγοντα που καταστέλλει είτε την ίδια είτε τους κάτωθεν στόχους της.

Ο ρόλος της PHF2 στην ανοσολογική απόκριση

Η PHF2 είναι επίσης μία απομεθυλάση ιστονών και αποτελεί μέλος της ίδιας οικογένειας με την PHF8. Τα δύο αυτά ένζυμα μπορεί να ανταγωνίζονται το ένα το άλλο για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης στις ιστόνες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του ριβοσωμικού DNA[63], ενώ σε μία διδακτορική διατριβή προτάθηκε πως οι δύο πρωτεΐνες μπορεί να δρουν συνεργατικά. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την εμπλοκή της PHF2 στην ανοσολογική απόκριση στα μακροφάγα, αν και αυτές οφείλονται σε μόλις μία δημοσιευμένη έρευνα το 2012 των Stender et al.[65]. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο, ταυτόχρονα με την PHF8, να εξεταστεί και ο ρόλος της PHF2 στη φλεγμονώδη απάντηση των μακροφάγων.

Η έκφραση του γονιδίου Phf2 κατόπιν έκθεσης των μακροφάγων σε LPS ακολουθεί μια κυματική συμπεριφορά, καθώς αρχικά μειώνεται, έπειτα αυξάνεται ξεπερνώντας τα βασικά επίπεδα, και τέλος επιστρέφει περίπου στα επίπεδα της κατάστασης ηρεμίας (εικόνα 27). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα επάγονται με το LPS και συσσωρεύονται για αρκετές ώρες στην αρχή της απόκρισης, μέχρι που μετά τις 12 ώρες αρχίζουν να ελαττώνονται (αντίθετα από ότι συμβαίνει με την PHF8) (εικόνα 27 vs εικόνα 13). Φαίνεται ότι η έκφραση της PHF2 πρέπει να ελέγχεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, καθώς τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης είναι δυσανάλογα.

Tnf-α: Η έκφραση του γονιδίου Tnf-α ελαττώνεται στα PHF2 KO μακροφάγα (ομοίως με τα PHF8 KO) μετά από LPS, ενώ τα επίπεδα του εκκρινόμενου TNF-α μειώνονται ελαφρώς μόνο στο αρχικό διάστημα της απόκρισης (εικόνα 28). Η χαμηλότερη έκφραση mRNA συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Stender et al. μετά την έκθεση των μακροφάγων σε KLA (συστατικό του LPS που σηματοδοτεί μέσω TLR4 υποδοχέα)[65].

Il-6: Η έκφραση του γονιδίου Il-6 είναι χαμηλότερη στα κύτταρα με εξουδετερωμένη PHF2, ωστόσο η εκκρινόμενη κυτοκίνη σημειώνει σημαντική αύξηση (εικόνα 28). Σημειώνεται ότι ο φαινότυπος αυτός είναι ο ίδιος με εκείνον στα PHF8 OE μακροφάγα, τα οποία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα mRNA αλλά αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης (εικόνα 15).

Cxcl10: Το γονίδιο Cxcl10 ρυθμίζεται θετικά από την PHF2 (αντίθετα από την PHF8), καθώς εξουδετέρωση του γονιδίου Phf2 συνεπάγεται σταθερά μειωμένα επίπεδα Cxcl10 mRNA μετά από LPS, αν και στην κατάσταση ηρεμίας ήταν αυξημένα (εικόνα 28). Ο αντίθετος φαινότυπος, κατόπιν LPS, μεταξύ PHF8 και PHF2 KO κυττάρων επιβεβαιώνεται από τη δημοσίευση των Stender et al., στην οποία μακροφάγα με σιγημένο γονίδιο Phf2 ή Phf8 και εκτεθειμένα σε KLA για 4 ώρες εμφάνισαν μειωμένη ή αυξημένη έκφραση Cxcl10, αντίστοιχα[65]. Έχει δειχθεί πως η PHF2 επιστρατεύεται στους υποκινητές των γονιδίων Tnf-α και Cxcl10 μόνο κατόπιν ενεργοποίησης της TLR4 σηματοδότησης, γεγονός που συσχετίζεται με απομεθυλίωση της κατασταλτικής τροποποίησης H4K20me3[65]. Αυτό συνάδει με τα

αποτελέσματα για τον Tnf-α, αλλά δεν εξηγεί την ελάττωση των βασικών επιπέδων του Cxcl10.

iNos / Νιτρικό Οξείδιο / Arg1: Το γονίδιο της iNOS, εμφανίζει χαμηλότερη έκφραση απουσία PHF2 στην αρχή της απόκρισης, το οποίο συνάδει με τα χαμηλότερα επίπεδα νιτρικού οξειδίου (εικόνα 29). Η έκφραση της ARG1 είναι επίσης μειωμένη στα PHF2 KO μακροφάγα (εικόνα 29).

Η επίδραση της PHF2 στον ανοσομεταβολισμό

Σε αντίθεση με τα PHF8 KO κύτταρα, τα PHF2 KO μακροφάγα εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου Pgc1a (εικόνα 30). Η γονιδιακή έκφραση της FABP4 παρουσιάζει πολύ ισχυρότερο φαινότυπο εδώ σε σχέση με τα PHF8 KO κύτταρα (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα), καθώς παρατηρείται σταθερή και σημαντική μείωση τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και μετά από LPS (εικόνα 30). Τα γονίδια αυτά αποτελούν πιθανές περιπτώσεις στις οποίες η PHF8 και PHF2 εκδηλώνουν ανταγωνιστική δράση.

Στα PHF2 KO μακροφάγα, σημαντικά ελαττωμένη είναι και η έκφραση του HIF1a τόσο πριν όσο και μετά από LPS (εικόνα 31). Υπενθυμίζεται ότι τα PHF8 KO παρουσίασαν επίσης μια πτωτική τάση στην έκφραση του HIF1a κατόπιν LPS (εικόνα 22). Δεν είναι έντονος ο φαινότυπος από την εξουδετέρωση της PHF2 στα δύο γλυκολυτικά γονίδια Hk3 και Pfkp, αν και υπάρχουν κάποιες μικρές διαφορές στην έκφραση αυτών, που θα μπορούσαν να οφείλονται σε γενικότερη απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης παρά σε άμεσο έλεγχο των γονιδίων αυτών από τις απομεθυλάσες (εικόνα 22).

Η PHF2 στην φαγοκυτταρική ικανότητα

Η φαγοκυτταρική ικανότητα των PHF2 KO μακροφάγων φαίνεται να βάλλεται, καθώς παρουσιάζεται σημαντικά μειωμένο το ποσοστό εκείνων που έχουν φαγοκυτταρώσει, μα και ο αριθμός των ενδοκυτταρωμένων βακτηρίων (εικόνα 32). Είναι αναμενόμενο μία πρωτεΐνη που ρυθμίζει γονίδια του κυτταρικού κύκλου να χρειαζεται για την αποτελεσματική φαγοκυττάρωση.

Αδυναμία υπερέκφρασης του γονιδίου Phf2 σε RAW 264.7 μακροφάγα, πιθανώς λόγω ενδογενών μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης

Παρά τις πολλαπλές απόπειρες δημιουργίας RAW 264.7 μακροφάγων που υπερεκφράζουν το γονίδιο Phf2 με τη χρήση διαφορετικών gRNAs, τόσο από τον συγγραφέα αυτής της εργασίας όσο και από παλαιότερο μέλος του εργαστηρίου, το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό. Στην καλύτερη περίπτωση, προκλήθηκε διπλασιασμός της έκφρασης του γονιδίου (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Μια πολύ πιθανή αιτία είναι η ακαταλληλότητα των επιλεγμένων gRNAs.

Κατά την περεταίρω διερεύνηση της αιτίας, παρατηρήθηκε πως πολύ κοντά στον υποκινητή της PHF2 υπάρχει με αντίθετο προσανατολισμό ένα ακόμη μικρό γονίδιο που εκφράζει ένα anti-sense RNA έναντι του Phf2, ονομαζόμενο Phf2os1 (PHD finger protein 2, opposite strand 1). Μάλιστα, σύμφωνα με δεδομένα μεταγραφικής ανάλυσης του πρότζεκτ ENCODE σε ποντίκια, από όλους του εξεταζόμενους ιστούς, αυτό το anti-sense RNA παράγεται περισσότερο - και με μεγάλη διαφορά - στον θύμο αδένα. Αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει πως η έκφραση του Phf2os1 γονιδίου διαδραματίζει κάποιον σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, πιθανότατα ρυθμίζοντας την παραγωγή της PHF2.

Έτσι, εξετάστηκε εάν το Phf2os1 εκφράζεται σε RAW 264.7 μακροφάγα τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και κατόπιν LPS (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

Είναι ενδιαφέρον ότι τα μέγιστα επίπεδα του Phf2os1 RNA εντοπίστηκαν στην κατάσταση ηρεμίας, ενώ μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS τα επίπεδα RNA του γονιδίου άρχισαν να μειώνονται, φτάνοντας και παραμένοντας στο ελάχιστο σημείο από τις 6 μέχρι τις 24 ώρες που εξετάστηκαν, το οποίο αντιστοιχούσε λίγο χαμηλότερα από το 50% της έκφρασης των βασικών επιπέδων. Εάν το anti-sense RNA Phf2os1 έχει πράγματι κατασταλτικό ρόλο έναντι της PHF2, και δεδομένου ότι η PHF2 έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση TLR4-σχετιζόμενων γονιδίων στα μακροφάγα[65], προκύπτει η εξής υπόθεση: η σταθερά μειωμένη έκφραση του anti-sense RNA κατόπιν LPS θα μπορούσε να συμβαίνει ώστε η PHF2 να μπορεί να επαχθεί ταχύτερα ή/και περισσότερο σε επόμενη έκθεση των μακροφάγων σε σήματα κινδύνου, ενδεχόμενο που παραπέμπει στο φαινόμενο της εκπαιδευόμενης ανοσίας. Αυτό θα ήταν εύκολο να επιβεβαιωθεί μετρώντας τα επίπεδα mRNA ή/και πρωτεΐνης της PHF2 κατόπιν επανέκθεσης των μακροφάγων σε LPS. Πάντως, η PHF2 έχει υπερεκφραστεί σε άλλους κυτταρικούς τύπους (π.χ., ηπατοκύτταρα[68]), αλλά ποτέ σε μακροφάγα (ή άλλα λευκά αιμοσφαίρια).

Συσχέτιση PHF2-PHF8

Θα ήταν αξιοπρόσεκτο η ανταγωνιστική σχέση που εμφανίζουν μεταξύ τους τα ένζυμα PHF2 και PHF8 στη ρύθμιση των ριβοσωμικών γονιδίων να επεκτείνεται επίσης σε άλλες γονιδιακές ομάδες, όπως εκείνες που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση ή σε μεταβολικές προσαρμογές. Αυτό όμως θα σήμαινε ότι η εξουδετέρωση της έκφρασης της μίας πρωτεΐνης θα έπρεπε να έχει τον αντίθετο φαινότυπο στην έκφραση κοινών γονιδίων-στόχων με την εξουδετέρωση της έκφρασης της άλλης πρωτεΐνης. Αυτό πράγματι επαληθεύεται από τα τρέχοντα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στις περιπτώσεις της έκφρασης των γονιδίων Cxcl10, Pgc1a, iNos, Arg1 και ίσως Fabp4, καθώς και της συγκέντρωσης της εκκρινόμενης IL-6.

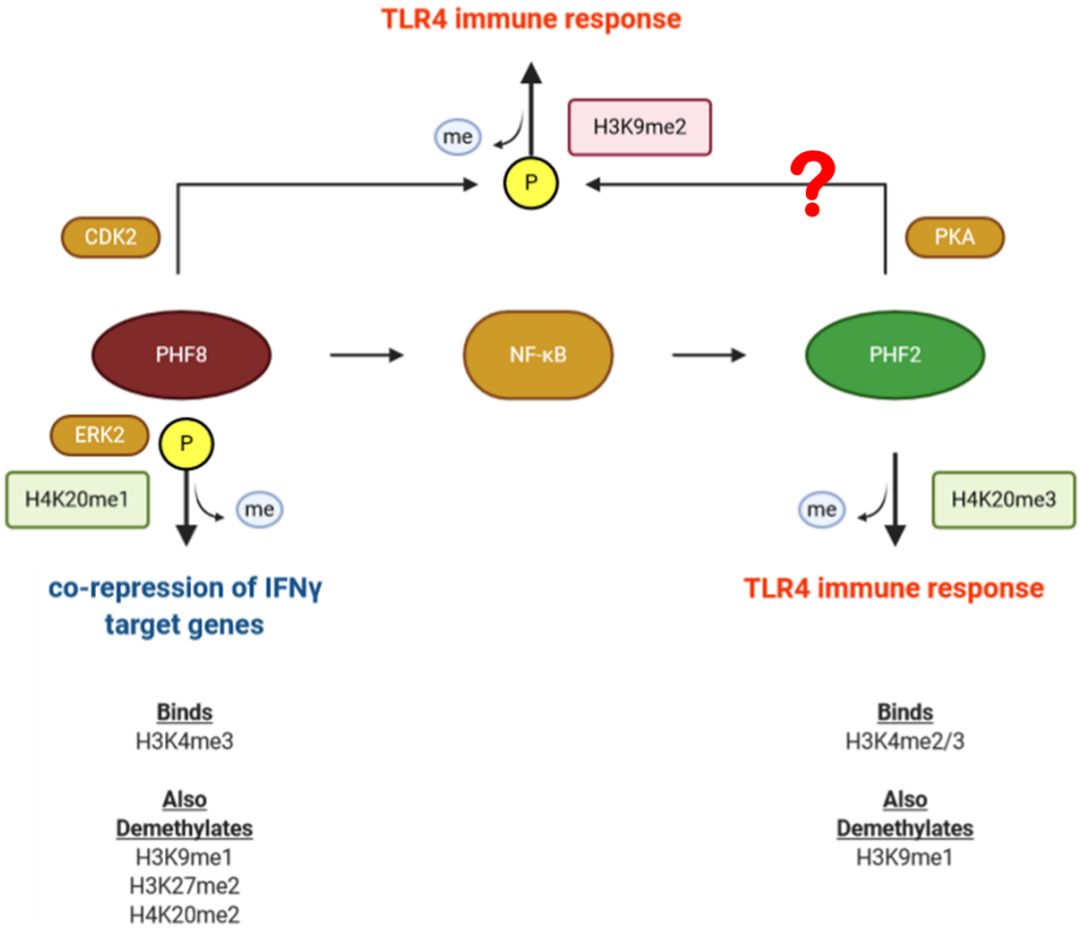
Θα μπορούσε, παράλληλα, οι δύο απομεθυλάσες να δρουν συνεργιστικά για τη ρύθμιση άλλων γονιδίων-στόχων; Τότε, εξουδετέρωση της μίας θα είχε παρόμοιο φαινότυπο με την εξουδετέρωση της άλλης. Στο σημείο αυτό θα είχε νόημα να εξεταστεί εάν η υποέκφραση της μίας πρωτεΐνης επηρεάζει τα επίπεδα της άλλης και εάν ταυτόχρονη υποέκφραση των δύο προκαλεί ισχυρότερο φαινότυπο στα υποτιθέμενα γονίδια-στόχους. Πάντως, η υπερέκφραση της PHF8 οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Phf2 σε κατάσταση ηρεμίας και αυξημένα μετά από LPS (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Όμως, αφενός επειδή η έκφραση των δύο γονιδίων ελάχιστα μεταβάλλεται κι αφετέρου επειδή υπόκεινται σε υψηλή μετα-μεταγραφική ρύθμιση, τα πρωτεϊνικά επίπεδα είναι αυτά που χρειάζεται πρωτίστως να εξεταστούν.

Επιστρέφοντας στο ενδεχόμενο κοινής ρύθμισης γονιδίων-στόχων της ανοσολογικής απόκρισης, έχει προταθεί ότι τόσο η PHF8 όσο και η PHF2 ασκούν τη δράση τους εν μέρει μέσω του NF-κB. Ανάλυση των PHF2-εξαρτώμενων υποκινητών γονιδίων-στόχων εμφάνισε υψηλό εμπλουτισμό σε αλληλουχίες-μοτίβα που αναγνωρίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF. Σίγηση της υπομονάδας του NF-κB, p65, είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της επιστράτευσης της PHF2 στους υποκινητές των γονιδίων Tnf-α και Cxcl10, προτείνοντας ότι η p65 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική στόχευση της PHF2[65]. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως όταν η PHF2 φωσφορυλιωθεί από την PKA, αποκτά δράση H3K9me2

απομεθυλάσης σε αδιποκύτταρα. Στην ίδια δράση της φωσφορυλιωμένης PHF8 αποδίδεται η LPS-επαγώμενη ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων από τους Erdogan et al.[93].

Οι Erdogan et al., επίσης, υποδεικνύουν πως η PHF8 ρυθμίζει θετικά τον NF-κB και τα γονίδια-στόχους του. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι στα PHF8 KD (Knock Down) μακροφάγα τα επίπεδα φωσφορυλιωμένης p65 ήταν χαμηλότερα μετά από LPS, και ειδικότερα εκείνης που βρισκόταν στον πυρήνα. Εφόσον είναι γνωστό ότι η μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB ελέγχεται μετα-μεταγραφικά, περιλαμβάνοντας τη μεθυλίωσης λυσίνης, προτείνουν πως η PHF8 μπορεί να προωθεί την μετενεργοποίησή του (transactivation) κατά τη διάρκεια οξείας φλεγμονής μέσω PHF8-διαμεσολαβούμενης απομεθυλίωσης του NF-κB. Η άμεση επαφή μεταξύ μίας απομεθυλάσης ιστονών που φέρει PHD επικράτεια με τον NF-κB έχει υποστηριχτεί και από μια έρευνα που δείχνει ότι η PHF20 διατηρεί την ενεργή κατάσταση του μεταγραφικού παράγοντα αλληλεπιδρώντας με τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης αυτού και αποτρέποντας έτσι την αποφοσφωρυλίωσή του από τη φωσφατάση PP2A[126]. Εξάλλου, είναι αποδεκτό πλέον πως ένζυμα τροποποίησης ιστονών ενδέχεται να έχουν στόχους μη-ιστόνες.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω ενδείξεις, προκύπτει το ακόλουθο σχήμα, με βάση το οποίο προτείνονται οι 5 ακόλουθες περιπτώσεις, που θα χρησιμοποιηθούν για την ερμηνεία των παρατηρούμενων φαινοτύπων της παρούσας εργασίας:



Εικόνα 34: Σύνοψη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας που συχετίζει τις δύο απομεθύλασες PHF8 και PHF2 με την ανοσολογική απόκριση στα μακροφάγα[59,65,93]. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τα εργαλεία BioRender.

1) Η P-PHF2 πιθανότατα να εκδηλώνει και η ίδια δράση απομεθυλίωσης H3K9me2 στα γονίδια μακροφάγων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση, όπως η P-PHF8. Επομένως, καθίσταται εφικτή μια συνεργατική ή αντισταθμιστική σχέση και εξουδετέρωση της μίας θα έχει παρόμοιο φαινότυπο με την εξουδετέρωση της άλλης.
2) Εξουδετέρωση της PHF2 θα μπορούσε να έχει συγκρίσιμο φαινότυπο με την εξουδετέρωση της PHF8, εφόσον η τελευταία μειώνει την ενεργότητα του NF-κB, με αποτέλεσμα να βάλλεται η στόχευση της PHF2 στα κατάλληλα γονίδια-στόχους.
3) Εφόσον υπάρχουν κοινοί γονιδιακοί στόχοι και σε ορισμένες περιπτώσεις ανταγωνιστική δράση μεταξύ των δύο απομεθυλασών, υποέκφραση της μίας ή της άλλης θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντίθετο φαινότυπο
4) Όταν η δράση της PHF8 εξαρτάται από την φωσφορυλίωσή της (π.χ., ενεργοποίηση γονιδίων μέσω απομεθυλίωσης H3K9me2 ή καταστολή γονιδίων μέσω απομεθυλίωσης H4K20me1), υπερέκφρασή της θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρόμοιο φαινότυπο που θα προκαλούσε η εξουδετέρωσή της, καθώς ο λόγος P-PHF8/PHF8 ενδεχομένως να μειώνεται δραματικά.
5) Όταν η δράση της PHF8 εξαρτάται από τη στόχευσή της στα γονίδια-στόχους μέσω της δημιουργίας συγκεκριμένων συμπλόκων (στα οποία ενδέχεται να συμμετέχει η PHF2), η υπερέκφρασή της θα μπορούσε να διαταράσσει τον παραπάνω σχηματισμό ή να δημιουργεί περισσότερα σύμπλοκα με αντίθετη δράση, προκαλώντας έναν φαινότυπο παρόμοιο με την υποέκφρασή της.

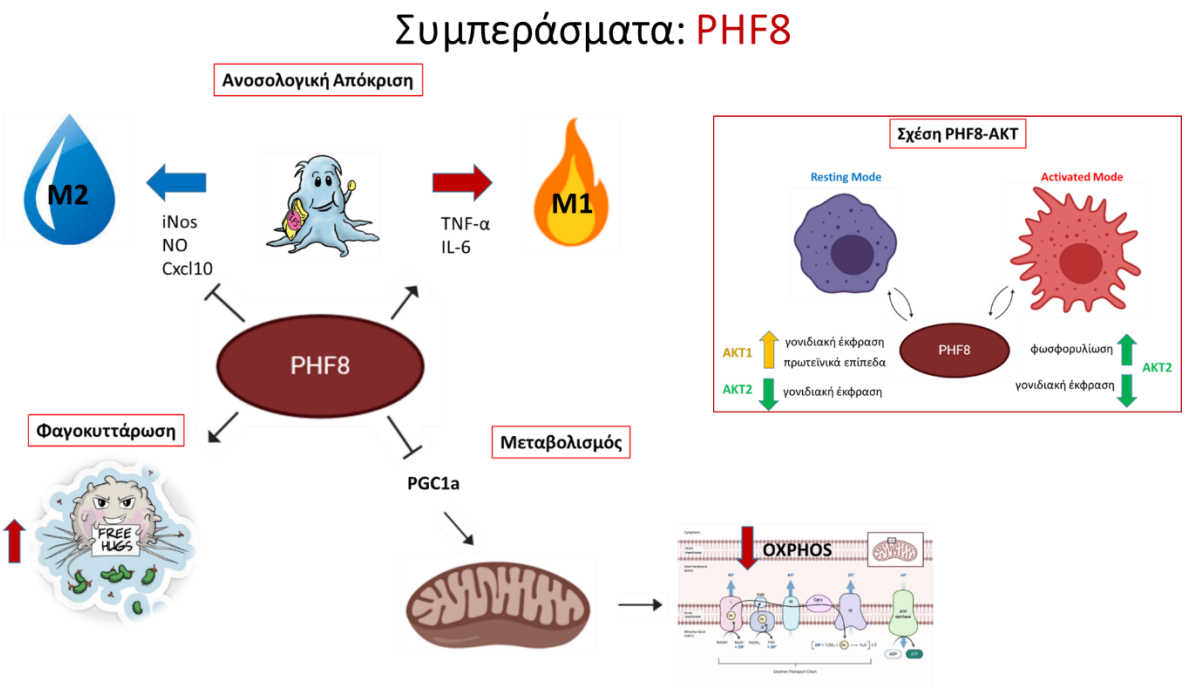
Στις περιπτώσεις 1 και 2 θα μπορούσαν να υπάγονται τα εξεταζόμενα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται με παρόμοιο τρόπο τόσο στα PHF8 όσο και τα PHF2 KO μακροφάγα, όπως τα Tnf-α, Il-6. Η περίπτωση 3 ενδεχομένως να εξηγεί τον αντίθετο φαινότυπο των Phf8-Phf2 KO μακροφάγων στην έκφραση γονιδίων, όπως τα Cxcl10, Pgc1α. Στις περιπτώσεις 4 και 5 πιθανώς να συγκατατάσσονται τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται με παρόμοιο τρόπο τόσο στα PHF8 KO όσο και τα PHF8 OE μακροφάγα, όπως τα γονίδια Tnf-α, Il-6.

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία επιχειρεί να εξιχνιάσει τον ρόλο των ενζύμων απομεθυλίωσης ιστονών, PHF8 και PHF2, στην ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων. Όσον αφορά στην PHF8, μερικά από τα ακόλουθα συμπεράσματα διεξάγονται κυρίως από την επίδραση της εξουδετέρωσης του αντίστοιχου γονιδίου ή της σίγησης αυτού, καθώς θεωρήθηκε πολύ πιθανό ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, που εξαρτάται από τον μηχανισμό δράσης της PHF8, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης οδηγεί σε επικρατή αρνητικό φαινότυπο, δηλαδή προσομοιάζει εκείνον της υποέκφρασής της.

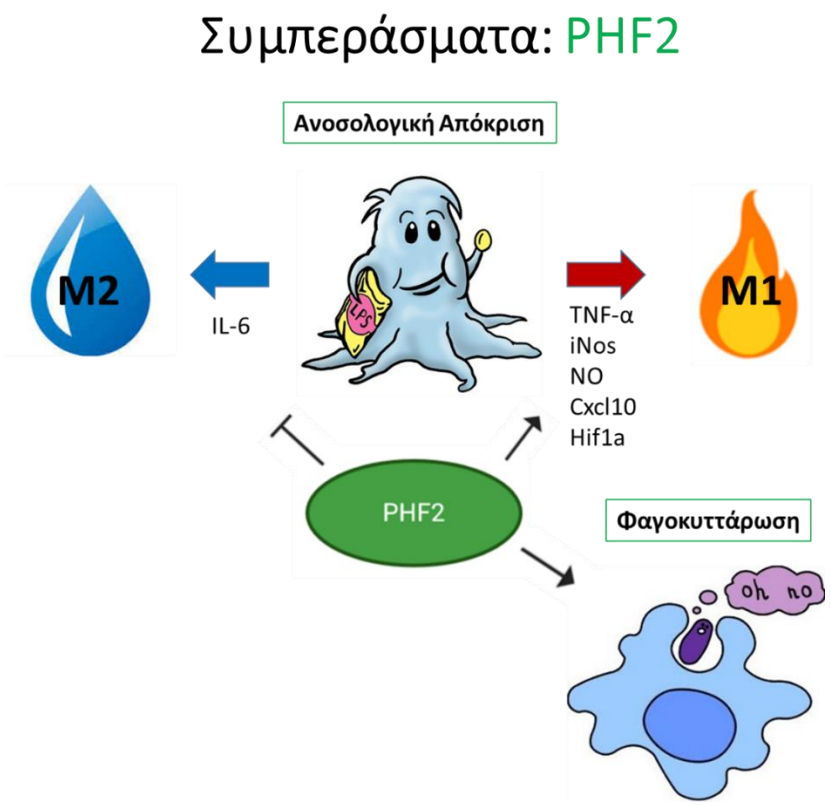
Η απομεθυλάση ιστονών PHF8, λοιπόν, φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση και τα προϊόντα σημαντικών ανοσολογικών και μεταβολικών γονιδίων στα μακροφάγα, ήδη από την κατάσταση ηρεμίας. Κατόπιν πυροδότησης της TLR4-διαμεσολαβούμενης ανοσολογικής απόκρισης, συμπεραίνεται ότι η PHF8 ρυθμίζει θετικά τα εμπλεκόμενα γονίδια (και τα προϊόντα αυτών) Tnf-α, Il-6 και Hif1a, ενώ αρνητικά τα γονίδια Cxcl10, Pgc1a, Fabp4, iNos (NO) και Arg1. Επομένως, διαδραματίζει παράλληλα έναν προ- και έναν αντί- φλεγμονώδη ρόλο.

Η PHF8, επιπλέον, εμφανίζεται να ενεργεί ως καταστολέας της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και, κατά επέκταση, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και, ενδεχομένως, του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, ενώ παρουσιάζει ήπια κατασταλτική δράση στα γλυκολυτικά γονίδια Hk3 και Pfkp. Υπερέκφραση της PHF8 οδηγεί σε αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα. Οι δύο εξεταζόμενες ισομορφές των AKT κινασών, AKT1 και AKT2, επιδρούν με τρόπο αντίθετο στη γονιδιακή έκφραση της PHF8 σε κατάσταση ηρεμίας ή φλεγμονώδους απόκρισης. Ειδικότερα, η AKT1 τη ρυθμίζει θετικά, ενώ η AKT2 αρνητικά. Ακόμη, ελέγχονται θετικά τα βασικά πρωτεϊνικά επίπεδα της PHF8 από την AKT1, και τα φωσφορυλιωμένα επίπεδα της PHF8 από την AKT2 στα ενεργοποιημένα μακροφάγα.



Εικόνα 35: Συμπεράσματα για την PHF8. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τα εργαλεία BioRender.

Η απομεθυλάση ιστονών PHF2, φαίνεται, αδρογραμμώς, να τείνει προς έναν προ-φλεγμονώδη ρόλο, καθώς ελέγχει θετικά όλους τους εξεταζόμενους προφλεγμονώδεις παράγοντες (με εξαίρεση την έκκριση της IL-6). Ενδεχομένως να υπάρχει μια σχέση συνεργιστική μεταξύ της PHF2 και της PHF8 σε ορισμένες περιπτώσεις, ενώ σε αρκετές άλλες, φαίνεται η μία να ανταγωνίζεται την άλλη. Τέλος, η PHF2 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική φαγοκυττάρωση.



Εικόνα 36: Συμπεράσματα για την PHF2. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τα εργαλεία BioRender.

Μελλοντικές Προοπτικές

Ο έλεγχος της ενεργότητας της PHF8 στα PHF8 OE μακροφάγα θα μπορούσε να εξεταστεί με κυτταρικό εντοπισμό (ανοσοφθορισμό), ώστε να φανεί εάν σχηματίζονται πρωτεϊνικά συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα. Ταυτόχρονα, η εξέταση του βαθμού μεθυλίωσης των γνωστών γονιδίων-στόχων της PHF8 στα ίδια κύτταρα θα ήταν ενδεικτική της ενεργότητάς της. Σε περίπτωση που δεν προκύψουν αποδείξεις για ελαττωμένη ενεργότητα, ο προσδιορισμός των επιπέδων φωσφορυλίωσης της PHF8 στα PHF8 OE κύτταρα θα ήταν διαφωτιστική για την διερεύνηση του ενδεχομένου η υπερέκφραση της πρωτεΐνης να προκαλεί παρόμοιο φαινότυπο με την εξουδετέρωσή της λόγω δραματικά χαμηλότερου λόγου φωσφορυλιωμένης προς μη φωσφορυλιωμένης PHF8, δεδομένου ότι η φωσφορυλίωση επενεργεί στη δράση του ενζύμου. Επανάληψη του πειράματος συν-ανοσοκατακρήμνισης θα απαντούσε στην υποψία οι AKT κινάσες να φωσφορυλιώνουν άμεσα την PHF8.

Με ChIP ή, ιδανικά, ChIP-seq, θα μπορούσαν να εντοπιστούν τα γονίδια εκείνα που ρυθμίζονται άμεσα από την PHF8 ή την PHF2, καθώς και οι κοινοί τους στόχοι, που θα μαρτυρούσαν μια πιθανή συνεργατική ή/και ανταγωνιστική σχέση. Με την ίδια τεχνική θα μπορούσαν να προσδιοριστούν τα επίπεδα μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων (ή συνολικά του γονιδιώματος), τα οποία θα ήταν ενδεικτικά του τρόπου δράσης των δύο ενζύμων, π.χ., ως απομεθυλάσες ή ως συμπαράγοντες σε σύμπλοκα ενεργοποίησης ή καταστολής της μεταγραφής χωρίς ενζυμική δραστηριότητα. Για την διερεύνηση των συμπλόκων με τα οποία αλληλεπιδρούν οι δύο πρωτεΐνες θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί φασματοσκοπία μάζας.

Δεδομένης της επίδρασης της υπερέκφρασης της PHF8 στη γονιδιακή έκφραση της PHF2, και στα πλαίσια εξιχνίασης πιθανών αντισταθμιστικών μηχανισμών που συνδέουν τις δύο απομεθυλάσες, θα είχε νόημα η εξέταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PHF2 στα PHF8 OE/KO κύτταρα, και αντίστροφα. Παράλληλη γονιδιακή σίγηση της PHF8 και της PHF2 [εναλλακτικά, δημιουργία (PHF8-PHF2) KO κυττάρων ή γονιδιακή σίγηση του ενός γονιδίου στην κυτταρική σειρά που είναι KO για το άλλο], και εξέταση της έκφρασης και των επιπέδων μεθυλίωσης των γονιδίων-στόχων θα φανέρωνε εάν υπάρχει συνεργατική ή/και ανταγωνιστική δράση μεταξύ των δύο απομεθυλασών.

Με RNA-seq στα μακροφάγα που υπερ- ή υπο- εκφράζουν τις δύο πρωτεινες θα αποκτιόταν μια σφαιρική εικόνα της επίδρασής τους στην έκφραση του γονιδιώματος. Ανάλυση του «εκκρινώματος» (secretome) των παραπάνω κυττάρων θα αποσαφήνιζε πώς η διαφορική γονιδιακή έκφραση επηρεάζει πρακτικά έναν από τους βασικούς λειτουργικούς φαινοτύπους των μακροφάγων, δηλαδή την έκκριση κυτοκινών. Παράλληλα, θα μπορούσαν να εξεταστούν και άλλες κρίσιμες λειτουργίες των μακροφάγων, όπως η ικανότητα να εξοντώνουν παθογόνους μικροοργανισμούς (bacterial killing).

Βιβλιογραφία

1. Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology* (2008). doi:10.1038/nri2215

2. Daskalaki, M. G., Tsatsanis, C. & Kampranis, S. C. Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *Journal of Cellular Physiology* (2018). doi:10.1002/jcp.26497

3. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology* (2011). doi:10.1038/nri3088

4. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology* (2011). doi:10.1038/nri3073

5. Sieweke, M. H. & Allen, J. E. Beyond stem cells: Self-renewal of differentiated macrophages. *Science* (2013). doi:10.1126/science.1242974

6. Gordon, S., Plüddemann, A. & Martinez Estrada, F. Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* (2014). doi:10.1111/imr.12223

7. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* (2013). doi:10.1038/nature12034

8. Muñoz-Cánoves, P. & Serrano, A. L. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2015). doi:10.1016/j.tem.2015.07.005

9. Lech, M. & Anders, H. J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (2013). doi:10.1016/j.bbadis.2012.12.001

10. Novak, M. L., Weinheimer-Haus, E. M. & Koh, T. J. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *J. Pathol.* (2014). doi:10.1002/path.4301

11. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* (2012). doi:10.1172/JCI59643

12. Schultze, J. L. Chromatin Remodeling in Monocyte and Macrophage Activation. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (2017). doi:10.1016/bs.apcsb.2016.09.001

13. Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature13989

14. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013

15. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* (2010). doi:10.1126/science.1178331

16. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* (2003). doi:10.1038/nri978

17. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* (2016). doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015

18. Hagemann, T. *et al.* 'Re-educating' tumor-associated macrophages by targeting NF-κB. *J. Exp. Med.* (2008). doi:10.1084/jem.20080108

19. Rutschman, R. *et al.* Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. *J. Immunol.* (2001). doi:10.4049/jimmunol.166.4.2173

20. Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. & Suzuki, K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc. Immunol. Rev.* (2010).

21. Mylonas, K. J., Nair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D. & Allen, J. E. Alternatively Activated Macrophages Elicited by Helminth Infection Can Be Reprogrammed to Enable Microbial Killing. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0803463

22. Stout, R. D. & Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* (2004). doi:10.1189/jlb.0504272

23. Jenkins, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation. *Science (80-.).* (2011). doi:10.1126/science.1204351

24. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* (2017). doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339

25. Nish, S. & Medzhitov, R. Host Defense Pathways: Role of Redundancy and Compensation in Infectious Disease Phenotypes. *Immunity* (2011). doi:10.1016/j.immuni.2011.05.009

26. Borden, E. C. *et al.* Interferons at age 50: Past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery* (2007). doi:10.1038/nrd2422

27. Varga, T. *et al.* Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage

Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *J. Immunol.* (2016). doi:10.4049/jimmunol.1502490

28. Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K. & Tsatsanis, C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *J. Immunol.* (2017). doi:10.4049/jimmunol.1601515

29. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008

30. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* (2008). doi:10.1038/nri2448

31. Stout, R. D. *et al.* Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.175.1.342

32. Xue, J. *et al.* Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006

33. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* (2000). doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166

34. Girodet, P. O. *et al.* Alternative macrophage activation is increased in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2016). doi:10.1165/rcmb.2015-0295OC

35. Thomas, G. D. *et al.* The biology of nematode- and IL4Rα-dependent murine macrophage polarization in vivo as defined by RNA-Seq and targeted lipidomics. *Blood* (2012). doi:10.1182/blood-2012-07-442640

36. Vogelpoel, L. T. C. *et al.* Fc gamma receptor-TLR cross-talk elicits pro-inflammatory cytokine production by human M2 macrophages. *Nat. Commun.* (2014). doi:10.1038/ncomms6444

37. Kato, A. *et al.* Oligosaccharide modification by N-acetylglucosaminyltransferase-V in macrophages are involved in pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *Exp. Dermatol.* (2015). doi:10.1111/exd.12730

38. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience* (2008). doi:10.2741/2692

39. Domínguez-Soto, A. *et al.* Dendritic Cell-Specific ICAM-3–Grabbing Nonintegrin Expression on M2-Polarized and Tumor-Associated Macrophages Is Macrophage-CSF Dependent and Enhanced by Tumor-Derived IL-6 and IL-10. *J. Immunol.* (2011). doi:10.4049/jimmunol.1000475

40. Pena, O. M., Pistolic, J., Raj, D., Fjell, C. D. & Hancock, R. E. W. Endotoxin Tolerance Represents a Distinctive State of Alternative Polarization (M2) in Human Mononuclear Cells. *J. Immunol.* (2011). doi:10.4049/jimmunol.1001952

41. Jurado-Camino, T. *et al.* Chronic Lymphocytic Leukemia: A Paradigm of Innate Immune Cross-Tolerance. *J. Immunol.* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1402272

42. Sica, A. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology* (2008). doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.004

43. Movahedi, K. *et al.* Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* (2010).

doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4672

44. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature05485

45. Tedgui, A. & Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews* (2006). doi:10.1152/physrev.00024.2005

46. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. & Gage, F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.02.016

47. Zhou, D. *et al.* Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular Signalling* (2014). doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.004

48. Darnell, J. E. STATs and gene regulation. *Science (80-.).* (1997). doi:10.1126/science.277.5332.1630

49. Schleicher, U. *et al.* TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. *Cell Rep.* (2016). doi:10.1016/j.celrep.2016.04.001

50. Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J. & Natoli, G. Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology* (2015). doi:10.1016/j.it.2015.02.004

51. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* (2008). doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006

52. Korneev, K. V. *et al.* TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine* (2017). doi:10.1016/j.cyto.2016.01.021

53. Pal, D. *et al.* Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* (2012). doi:10.1038/nm.2851

54. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* (2016). doi:10.1126/science.aaf1098

55. Ieronymaki, E., Daskalaki, M. G., Lyroni, K. & Tsatsanis, C. Insulin signaling and insulin resistance facilitate trained immunity in macrophages through metabolic and epigenetic changes. *Frontiers in Immunology* (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.01330

56. Ogawa, S. *et al.* A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004). doi:10.1073/pnas.0405786101

57. Hoberg, J. E., Yeung, F. & Mayo, M. W. SMRT derepression by the IκB kinase α: A prerequisite to NF-κB transcription and survival. *Mol. Cell* (2004). doi:10.1016/j.molcel.2004.10.010

58. Pascual, G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-γ. *Nature* (2005). doi:10.1038/nature03988

59. Asensio-Juan, E. *et al.* The histone demethylase PHF8 is a molecular safeguard of the IFNκ response. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1346

60. Hausinger, R. P. Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology (2004). doi:10.1080/10409230490440541

61. Walport, L. J., Hopkinson, R. J. & Schofield, C. J. Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases. *Current Opinion in Chemical Biology* (2012). doi:10.1016/j.cbpa.2012.09.015

62. Chaturvedi, S. S., Ramanan, R., Waheed, S. O., Karabencheva-Christova, T. G. & Christov, C. Z. Structure-function relationships in KDM7 histone demethylases. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* (2019). doi:10.1016/bs.apcsb.2019.08.005

63. Shi, G. *et al.* PHD finger protein 2 (PHF2) represses ribosomal RNA gene transcription by antagonizing PHF finger protein 8 (PHF8) and recruiting methyltransferase SUV39H1. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M114.571653

64. Barski, A. *et al.* High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.05.009

65. Stender, J. D. *et al.* Control of Proinflammatory Gene Programs by Regulated Trimethylation and Demethylation of Histone H4K20. *Mol. Cell* (2012). doi:10.1016/j.molcel.2012.07.020

66. Wen, H. *et al.* Recognition of histone H3K4 trimethylation by the plant homeodomain of PHF2 modulates histone demethylation. *J. Biol. Chem.* (2010). doi:10.1074/jbc.C109.097667

67. Horton, J. R., Upadhyay, A. K., Hashimoto, H., Zhang, X. & Cheng, X. Structural basis for human PHF2 Jumonji domain interaction with metal ions. *J. Mol. Biol.* (2011). doi:10.1016/j.jmb.2010.12.013

68. Bricambert, J. *et al.* The histone demethylase Phf2 acts as a molecular checkpoint to prevent NAFLD progression during obesity. *Nat. Commun.* (2018). doi:10.1038/s41467-018-04361-y

69. Pappa, S. *et al.* PHF2 histone demethylase prevents DNA damage and genome instability by controlling cell cycle progression of neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2019). doi:10.1073/pnas.1903188116

70. Qi, H. H. *et al.* Histone H4K20/H3K9 demethylase PHF8 regulates zebrafish brain and craniofacial development. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature09261

71. Qiu, J. *et al.* The X-linked mental retardation gene PHF8 is a histone demethylase involved in neuronal differentiation. *Cell Res.* (2010). doi:10.1038/cr.2010.81

72. Asensio-Juan, E., Gallego, C. & Martínez-Balbás, M. A. The histone demethylase PHF8 is essential for cytoskeleton dynamics. *Nucleic Acids Res.* (2012). doi:10.1093/nar/gks716

73. Fortschegger, K. & Shiekhattar, R. Plant homeodomain fingers form a helping hand for transcription. *Epigenetics* (2011). doi:10.4161/epi.6.1.13297

74. Liu, W. *et al.* PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature09272

75. Yatim, A. *et al.* NOTCH1 Nuclear Interactome Reveals Key Regulators of Its Transcriptional Activity and Oncogenic Function. *Mol. Cell* (2012). doi:10.1016/j.molcel.2012.08.022

76. Laumonnier, F. *et al.* Mutations in PHF8 are associated with X linked mental retardation and cleft lip/cleft palate. *J. Med. Genet.* (2005). doi:10.1136/jmg.2004.029439

77. Nava, C. *et al.* Analysis of the chromosome X exome in patients with autism spectrum disorders identified novel candidate genes, including TMLHE. *Transl. Psychiatry* (2012). doi:10.1038/tp.2012.102

78. Croonenberghs, J., Bosmans, E., Deboutte, D., Kenis, G. & Maes, M. Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology* (2002). doi:10.1159/000048665

79. Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.05.042

80. Suganuma, T. & Workman, J. L. Features of the PHF8/KIAA1718 histone demethylase. *Cell Res.* (2010). doi:10.1038/cr.2010.110

81. Fortschegger, K. *et al.* PHF8 Targets Histone Methylation and RNA Polymerase II To Activate Transcription. *Mol. Cell. Biol.* (2010). doi:10.1128/mcb.01520-09

82. Kleine-Kohlbrecher, D. *et al.* A Functional Link between the Histone Demethylase PHF8 and the Transcription Factor ZNF711 in X-Linked Mental Retardation. *Mol. Cell* (2010). doi:10.1016/j.molcel.2010.03.002

83. Horton, J. R. *et al.* Enzymatic and structural insights for substrate specificity of a family of jumonji histone lysine demethylases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2010). doi:10.1038/nsmb.1753

84. Zhu, Z. *et al.* PHF8 is a histone H3K9me2 demethylase regulating rRNA synthesis. *Cell Res.* (2010). doi:10.1038/cr.2010.75

85. Sun, L. *et al.* Cyclin E-CDK2 protein phosphorylates plant homeodomain finger protein 8 (PHF8) and regulates its function in the cell cycle. *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M114.602532

86. Cao, X. *et al.* Histone H4K20 Demethylation by Two hHR23 Proteins. *Cell Rep.* (2020). doi:10.1016/j.celrep.2020.03.001

87. Li, Z., Nie, F., Wang, S. & Li, L. Histone H4 Lys 20 monomethylation by histone methylase SET8 mediates Wnt target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011). doi:10.1073/pnas.1009353108

88. Vakoc, C. R., Sachdeva, M. M., Wang, H. & Blobel, G. A. Profile of Histone Lysine Methylation across Transcribed Mammalian Chromatin. *Mol. Cell. Biol.* (2006). doi:10.1128/mcb.01529-06

89. Talasz, H., Lindner, H. H., Sarg, B. & Helliger, W. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M505563200

90. Beck, D. B., Oda, H., Shen, S. S. & Reinberg, D. PR-set7 and H4K20me1: At the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev.* (2012). doi:10.1101/gad.177444.111

91. Wang, Y. & Jia, S. Degrees make all the difference: The multifunctionality of histone H4 lysine 20 methylation. *Epigenetics* (2009). doi:10.4161/epi.4.5.9212

92. Wang, J. *et al.* PHF8 and REST/NRSF co-occupy gene promoters to regulate proximal gene expression. *Sci. Rep.* (2014). doi:10.1038/srep05008

93. Erdogan, Ö. *et al.* Proteomic dissection of LPS-inducible, PHF8-dependent secretome reveals novel roles of PHF8 in TLR4-induced acute inflammation and T cell proliferation. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep24833

94. Diskin, C. & Pålsson-McDermott, E. M. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Frontiers in Immunology* (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.00270

95. O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J. & Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology* (2016). doi:10.1038/nri.2016.70

96. Rhoads, J. P., Major, A. S. & Rathmell, J. C. Fine tuning of immunometabolism for the treatment of rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* (2017). doi:10.1038/nrrheum.2017.54

97. Su, X., Wellen, K. E. & Rabinowitz, J. D. Metabolic control of methylation and acetylation. *Current Opinion in Chemical Biology* (2016). doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.030

98. Phan, A. T., Goldrath, A. W. & Glass, C. K. Metabolic and Epigenetic Coordination of T Cell and Macrophage Immunity. *Immunity* (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.04.016

99. Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* (1978). doi:10.1016/0092-8674(78)90101-0

100. Taciak, B. *et al.* Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One* (2018). doi:10.1371/journal.pone.0198943

101. Joung, J. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat. Protoc.* (2017). doi:10.1038/nprot.2017.016

102. Hirai, H. *et al.* MK-2206, an allosteric akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* (2010). doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1012

103. Shao, P. *et al.* Histone demethylase PHF8 promotes epithelial to mesenchymal transition and breast tumorigenesis. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1093

104. Maina, P. K. *et al.* c-MYC drives histone demethylase PHF8 during neuroendocrine differentiation and in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.12310

105. Wang, Q. *et al.* Stabilization of histone demethylase PHF8 by USP7 promotes breast carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* (2016). doi:10.1172/JCI85747

106. Park, S. *et al.* Identification of Akt interaction protein PHF20/TZP that transcriptionally regulates p53. *J. Biol. Chem.* (2012). doi:10.1074/jbc.M111.333922

107. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H. & Shimoda, T. Transmembrane TNF-α: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* (2010). doi:10.1093/rheumatology/keq031

108. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2014). doi:10.1101/cshperspect.a016295

109. Vazirinejad, R., Ahmadi, Z., Arababadi, M. K., Hassanshahi, G. & Kennedy, D. The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis. *NeuroImmunoModulation* (2014). doi:10.1159/000357780

110. Koper, O. M., Kaminska, J., Sawicki, K. & Kemona, H. CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (2018). doi:10.17219/acem/68846

111. Karin, N. & Razon, H. Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity. *Cytokine* (2018). doi:10.1016/j.cyto.2018.02.012

112. Rodriguez, P. C., Ochoa, A. C. & Al-Khami, A. A. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology* (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.00093

113. Vats, D. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* (2006). doi:10.1016/j.cmet.2006.05.011

114. Southgate, R. J. *et al.* PGC-1α gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle. *FASEB J.* (2005). doi:10.1096/fj.05-3993fje

115. Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miura, T. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* (2014). doi:10.4137/CMC.S17067

116. Steen, K. A., Xu, H. & Bernlohr, D. A. FABP4/aP2 Regulates Macrophage Redox Signaling and Inflammasome Activation via Control of UCP2. *Mol. Cell. Biol.* (2017). doi:10.1128/mcb.00282-16

117. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. & Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica* (2018). doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005

118. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* (1983). doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

119. Rai, Y. *et al.* Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci. Rep.* (2018). doi:10.1038/s41598-018-19930-w

120. Martínez-Diez, M., Santamaría, G., Ortega, Á. D. & Cuezva, J. M. Biogenesis and dynamic of mitochondria during the cell cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS One* (2006). doi:10.1371/journal.pone.0000107

121. Lim, H.-J. *et al.* The G2/M Regulator Histone Demethylase PHF8 Is Targeted for Degradation by the Anaphase-Promoting Complex Containing CDC20. *Mol. Cell. Biol.* (2013). doi:10.1128/mcb.00689-13

122. Wyatt, E. *et al.* Regulation and cytoprotective role of hexokinase III. *PLoS One* (2010). doi:10.1371/journal.pone.0013823

123. Arranz, A. *et al.* Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012). doi:10.1073/pnas.1119038109

124. Babaev, V. R. *et al.* Loss of 2 Akt (Protein Kinase B) Isoforms in Hematopoietic Cells Diminished Monocyte and Macrophage Survival and Reduces Atherosclerosis in Ldl Receptor-Null Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2019). doi:10.1161/ATVBAHA.118.312206

125. Wang, P. *et al.* Both decreased and increased SRPK1 levels promote cancer by interfering with PHLPP-mediated dephosphorylation of Akt. *Mol. Cell* (2014). doi:10.1016/j.molcel.2014.03.007

126. Zhang, T. *et al.* PHF20 regulates NF-κB signalling by disrupting recruitment of PP2A to p65. *Nat. Commun.* (2013). doi:10.1038/ncomms3062

127. Cohen, S., Doyle, W. J. & Skoner, D. P. Psychological stress, cytokine production, and severity of upper respiratory illness. *Psychosom. Med.* (1999). doi:10.1097/00006842-199903000-00009

128. Lowenstein, C. J. & Padalko, E. iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science* (2004). doi:10.1242/jcs.01166

129. Rius-Pérez, S. *et al.* PGC-1 α, Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2020). doi:10.1155/2020/1452696

130. Federzoni, E. A. *et al.* CEBPA-dependent HK3 and KLF5 expression in primary AML and during AML differentiation. *Sci. Rep.* (2014). doi:10.1038/srep04261

131. Lee, J. H. *et al.* Stabilization of phosphofructokinase 1 platelet isoform by AKT promotes tumorigenesis. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-00906-9

132. Koo, S. jie & Garg, N. J. Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. *Redox Biology* (2019). doi:10.1016/j.redox.2019.101198

133. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. & Villanueva, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* (2012). doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006

Παράρτημα 1: Συνοπτική περιγραφή εξεταζόμενων γονιδίων και εκκρινόμενων μορίων

TNFα

Ο TNFα (tumor necrosis factor alpha, επίσης γνωστός ως TNF, καχεξίνη ή καχεκτίνη) είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη που εμπλέκεται σε πολλαπλούς ομοιοστατικούς και παθολογικούς μηχανισμούς και κατέχει θεμελιώδη θέση στη ρύθμιση των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος. Έχει μοριακό βάρος 17 kDa, ομοτριμερίζεται και εκκρίνεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα, ενώ στην παραγωγή του μπορεί να συμβάλλουν άλλα λευκά αιμοσφαίρια, τα μαστικά κύτταρα, ακόμα και οι νευρώνες. Έχει κεντρικό ρόλο στη συστημική φλεγμονή, τη κλιμάκωση αποκρίσεων οξείας φάσης[6] (acute phase response) και την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών. Φυσιολογικά, η σηματοδοτική του δραστηριότητα περιλαμβάνει την πρόκληση πυρετού, καχεξίας, κυτταρικής απόπτωσης, την παρεμπόδιση της καρκινογένεσης και της ιικής αναπαραγωγής, ενώ εμπλέκεται στη σήψη. Σε παθολογικές συνθήκες, ο TNFα μπορεί να εμπλέκεται σε ποικίλες ασθένειες, όπως αυτοάνοσες (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα), νευροεκφυλιστικές (π.χ. Alzheimer's), καρκίνο, ακόμα και κατάθλιψη[107].

IL-6

Η IL-6 (ιντερλευκίνη 6) μπορεί να δράσει τόσο ως προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη όσο ως αντι-φλεγμονώδης μυοκίνη[7] επάγοντας διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια. Κατόπιν μολύνσεων και τραυματισμών ιστών η σύνθεσή της πραγματοποείται με τρόπο ταχύ και παροδικό. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή μέσω πυροδότησης των αποκρίσεων οξείας φάσης και πυρετού, της αιμοποίησης (παραγωγή ουδετεροφίλων) και των ανοσολογικών αντιδράσεων. Η έκφρασή της ελέγχεται αυστηρά από μεταγραφικούς και μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Εκκρίνεται πρωταρχικά από τα μακροφάγα, στα οποία η σηματοδότηση στηρίζεται στην ενεργοποίηση του NF-κB. Ευνοεί την αύξηση των Β λεμφοκυττάρων και ανταγωνίζεται τα Τ ρυθμιστικά. Η έκκρισή της μπορεί να αυξηθεί σε περιπτώσεις ψυχολογικού στρες[127]. Η απορρύθμιση της έκφρασής της εμπλέκεται στην παθολογία νοσημάτων χρόνιας φλεγμονής (π.χ., διαβήτης, κατάθλιψη, καρκίνος) και αυτοανοσίας (π.χ., σκλήρυνση κατά πλάκας, ρευματοειδής αρθρίτιδα, Alzheimer's)[108].

iNOS & Νιτρικό Οξείδιο

Το ένζυμο NOS2 ή iNOS (inducible nitric oxide synthase: επαγόμενη συνθάση νιτρικού οξειδίου) καταλύει την αντίδραση παραγωγής νιτρικού οξειδίου (NO) από το αμινοξύ L-αργινίνη, είναι διαλυτό και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Το νιτρικό οξείδιο είναι μια ένωση με σπουδαία σηματοδοτική δραστηριότητα, που, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει την ρύθμιση του αγγειακού τόνου και την έκκριση ινσουλίνης. Στα πλαίσια ανοσολογικών φαινομένων, το NO έχει ισχυρή αντι-βακτηριακή και αντι-ιική δράση, για αυτό αποτελεί

[6] Πρόκειται για συστημικές μη-ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις (τις οποίες ξεκινούν κυρίως τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα) που προκαλούνται από μόλυνση ή στρες (π.χ., τραυματισμός ιστού ή τραύμα).

[7] Οι μυοκίνες είναι μικρές ενώσεις που περιλαμβάνουν πλήθος κυτοκινών και παράγονται από τα μυοκύτταρα κατά τις μυικές συσπάσεις.

μέρος του οπλοστασίου κυττάρων όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και οι φυσικοί φονιάδες. Σε κατάσταση ηρεμίας, τα παραπάνω κύτταρα δεν παράγουν το ένζυμο. Η παραγωγή του τελευταίου επάγεται κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε ποικίλα ερεθίσματα κινδύνου. Για παράδειγμα, ο λιποπολυσακχαρίτης LPS ενεργοποιεί τον TLR4 υποδοχέα, που επάγει τα μονοπάτια MAPK και NF-κB, τα οποία συγκλείνουν στη μεταγραφή του γονιδίου του ενζύμου. Κυτοκίνες, όπως ο TNFα, η IL-1β και η IFN-γ, επίσης επάγουν την παραγωγή NO. Σε παθολογικές περιπτώσεις, το NO μπορεί να οδηγήσει σε σηπτικό σοκ και να εμπλακεί σε αυτοάνοσα νοσήματα[128]. Τόσο το ένζυμο όσο και το NO αποτελούν βασικούς M1 μάρτυρες.

Arginase

Το ένζυμο αργινάση καταλύει την υδρόλυση της L-αργινίνης σε ορνιθίνη και ουρία. Η ορνιθίνη συνιστά πρόδρομο μόριο για την παραγωγή πολυαμινών και προλίνης. Οι πρώτες εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, ενώ η δεύτερη είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του κολλαγόνου, που απαιτείται κατά την επούλωση τραυματισμών. Διακρίνεται σε δύο ισομορφές που προκύπτουν από διαφορετικά ένζυμα: την αργινάση1 και την αργινάση2. Ενώ και οι δύο μορφές του ενζύμου διεκπεραιώνουν την ίδια αντίδραση, διαφέρει η κατανομή τους στους ποικίλους τύπους ιστών και ο ενδοκυττάριος εντοπισμός τους. Η αργινάση1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων και των μακροφάγων, μεταξύ άλλων, ενώ η αργινάση2 είναι μιτοχονδριακό ένζυμο και εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα. Η αργινάση1 έχει σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα μακροφάγα ποντικών που βρίσκονται σε ηρεμία εκφράζουν σε πολύ μικρές ποσότητες το αντίστοιχο γονίδιο, το οποίο ωστόσο μπορεί να ενεργοποιηθεί κατόπιν έκθεσης σε IL-4 και IL-13, μέσω της επαγωγής του STAT6 μεταγραφικού παράγοντα. Η αργινάση ανταγωνίζεται την iNOS ως προς τα ενδοκυττάρια αποθέματα L-αργινίνης και, όταν η πρώτη υπερτερεί, οδηγεί τα μακροφάγα προς τον M2 φαινότυπο[112].

CXCL10

Η CXCL10 είναι μια φλεγμονώδης χημειοκίνη που προσδένεται στον υποδοχέα CXCR3. Και οι δύο παράγοντες έχουν σημαντικό ρόλο στη διακίνηση και εποίκιση των λευκοκυττάρων, ήτοι μακροφάγων, μονοκυττάρων, T και NK κυττάρων, στους φλεγμένους ιστούς, καθώς και τη διαιώνιση της φλεγμονής. Η μικρή πρωτεΐνη (10 kDa) CXCL10 εκφράζεται από πλήθος κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα δενδροκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα. Η CXCL10 διαμορφώνει την ανάπτυξη και λειτουργία των T λεμφοκυττάρων και σχετίζεται κυρίως με τον Th1 φαινότυπο. Μεταξύ άλλων, παράγεται, επίσης, από κερατινοκύτταρα, ενδοθυλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μεσεγχυματικά κύτταρα, ηπατοκύτταρα και αστροκύτταρα. Η CXCL10 είναι αγγειοστατική χημειοκίνη. Μεταγραφικά ρυθμίζεται σε απόκριση εξωτερικών ερεθισμάτων όπως η IFNγ και ο LPS. Η ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου περιέχει θέσεις για τον NF-κB, για την AP1, για HS (heat shock) παράγοντες και ένα ISRE (interferon-stimulated response element). Όσον αφορά την επαγωγή της έκφρασης της CXCL10, έχει παρατηρηθεί συνεργία μεταξύ του TNFa και της IFNγ, λόγω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης του STAT1a και του NF-κB, αντίστοιχα. Η CXCL10 έχει συνδεθεί, μεταξύ άλλων, με παθολογίες όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας[109].

[συσχέτιση έμφυτης με προσαρμοστικής ανοσίας]

PGC-1

Η οικογένεια των μεταγραφικών συνενεργοποιητών PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) αποτελούν έναν μοριακό σύνδεσμο μεταξύ των κυτταρικών προγραμμάτων φλεγμονής και λιπιδικής ομοιόστασης, αν και η δράση τους είναι αρκετά ευρεία. Ο PGC-1α είναι γνωστός ως ο κύριος ρυθμιστής της βιογένεσης μιτοχονδρίων και αποτελεί μεταγραφικό συνενεργοποιητή πλήθους γονιδίων που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό. Εκφράζεται σε υψηλό βαθμό σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών, της καρδιάς και του καφέ λίπους. Προβληματική αύξηση της δραστηριότητάς του έχει συσχετιστεί με πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως η καρδιακή ανακοπή και ο διαβήτης. Στα μακροφάγα μόλις πρόσφατα άρχισε να εκτιμάται ο ρόλος του. Ο PGC- 2β έχει συσχετιστεί με την πόλωση των μακροφάγων προς τον M2 φαινότυπο, μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον PPARγ και την ενεργοποίηση του STAT6[113,129].

FABP4

Οι πρωτεΐνες FABP (fatty acid-binding proteins, πρωτεΐνες πρόσδεσης λιπαρών οξέων) είναι μία οικογένεια σαπερονών λιπιδίων μεγέθους ~15 kDa οι οποίες συμβάλλουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της κυκλοφορίας των λιπαρών οξέων στα κύτταρα. Διαφορετικές ισοφορμές εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και, γενικά, η ποσότητα αυτών των πρωτεϊνών είναι ανάλογη του ρυθμού μεταβολισμού λιπιδίων σε καθέναν από αυτούς τους ιστούς. Η FABP4, γνωστή και ως aP2, εκφράζεται ως επί το πλείστων στα αδιποκύτταρα και τα μακροφάγα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας και αντίστασης στην ινσουλίνη στα πλαίσια χρόνιας και χαμηλού βαθμού φλεγμονής λόγω μεταβολικών τροποποιήσεων, φαινόμενο ονομαζόμενο ως «μεταφλεγμονή» (metaflammation). Η έκφρασή της επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς μακροφάγα και κατά την έκθεση των τελευταίων σε παράγοντες όπως ο LPS, αγωνιστές του PPARγ και οξειδωμένη LDL. Πυροδοτεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών NF-κB και JNK/AP-1[115]. Έχει αναφερθεί πως ο άξονας FABP4/UCP2 ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή οξειδοαναγωγή, τη μιτοχονδριακή απόκριση αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (mUPR: mitochondrial unfolded-protein response) και την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (inflammasome) στα μακροφάγα. Στην ίδια έρευνα παρουσιάστηκε πως απώλεια της FABP4 σε μακροφάγα οδήγησε σε έναν αντιφλεγμονώδη M2 φαινότυπο, λόγω εξασθένισης της σηματοδότησης του NF-κB, της φωσφορυλίωσης της JNK και της έκκρισης φλεγμονώδων κυτοκινών[116].

HIF-1α

Ο HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1 alpha) αποτελεί υπομονάδα του ετεροδιμερή μεταγραφικού παράγοντα HIF, που θεωρείται ο κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής των γενετικών προγραμμάτων απόκρισης στις συνθήκες υποξίας. Ο HIF-1α είναι σημαντικός μεταβολικός ρυθμιστής της γλυκόλυσης και εμπλέκεται στις ανοσολογικές αποκρίσεις. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως η HIF-1α-διαμεσολαβούμενη γλυκόλυση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους δραστηριότητας των M1 μακροφάγων. Ο HIF-1α δεν

επάγει μόνο τη γλυκόλυση, μα και την έκφραση γονιδίων φλεγμονώδων κυτοκινών, ιδιαίτερα της IL-1β, καθώς και την παραγωγή NO. Έκθεση των μακροφάγων σε LPS οδηγεί στην αύξηση και σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α [τουλάχιστον εν μέρει μέσω της συσσώρευσης του ηλεκτρικού (succinate)], με αποτέλεσμα ο λειτουργικός, πλέον, HIF-1 να προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxic response elements: HREs) των γονιδίων-στόχων. Ο NF-κB αποτελεί μεταγραφικό ενεργοποιητή του HIF-1α. Ο HIF-1α έχει, επίσης, εμπλακεί στην εκπαιδευόμενη ανοσία[94,95].

Hk3

Η εξοκινάση (1, 2 ή 3) είναι το πρώτο ένζυμο της γλυκόλυσης, το οποίο καταλύει τη μη αντιστρέψιμη μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P). Λόγω αυτής της φωσφορυλίωσης, η γλυκόζη παρεμποδίζεται από την απομάκρυνσή της από το εσωτερικό του κυττάρου και έτσι δεσμεύεται να αξιοποιηθεί στον ενεργειακό μεταβολισμό. Καθώς η εξοκινάση 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για τη γλυκόζη και τη χαμηλότερη αναστολή από τη φωσφορυλιωμένη γλυκόζη (G6P) σε σύγκριση με την εξοκινάση 1 και 2, θεωρείται πως είναι η σημαντικότερη ισομορφή του ενζύμου. Αποτελεί την κύρια εξοκινάση στα μυελικά κύτταρα και είναι κυτταροπλασματική[122,130].

PFKP

Η φωσφοφρουκτοκινάση 1 (PFK1) καταλύει τη μη αντιστρέψιμη μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη και αποτελεί ένζυμο-κλειδί για τη διεργασία της γλυκόλυσης. Εντοπίζεται σε 3 ισομορφές, εκ των οποίων η PFKP αποτελεί την κύρια ισομορφή στα μακροφάγα. Η AKT φωσφορυλιώνει την PFKP, αποτρέποντας την αποικοδόμησή της κι επάγοντας την έκφρασή της, προωθώντας την αερόβια γλυκόλυση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό[131,132].