



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —



Εργαστήριο Κυτταρικής  
Ανοσολογίας,  
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών  
της Ακαδημίας Αθηνών, ΠΒΕΑΑ

## ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

#### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΘΕΜΑ: «Ο ρόλος της ακτιβίνης- Α στην καταστολή αυτοάνοσων  
αντιδράσεων σε πειραματικά μοντέλα σκλήρυνσης κατά πλάκας  
και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα»**

**ΤΡΟΧΟΥΤΣΟΥ Ι. ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

*Δεκέμβριος 2020, Αθήνα*



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —



Εργαστήριο Κυτταρικής  
Ανοσολογίας,  
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών  
της Ακαδημίας Αθηνών, ΠΒΕΑΑ

## ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

#### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΘΕΜΑ: «Ο ρόλος της ακτιβίνης- Α στην καταστολή αυτοάνοσων  
αντιδράσεων σε πειραματικά μοντέλα σκλήρυνσης κατά πλάκας  
και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα»**

**ΤΡΟΧΟΥΤΣΟΥ Ι. ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

*Δεκέμβριος 2020, Αθήνα*

**Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 25/02/2013**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- 1. Μπούμπας Δημήτριος:** Καθηγητής, Διευθυντής Δ' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων)
- 2. Καψογεώργου Ευσταθία:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Παθοφυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3. Ξάνθου-Τσιγκόγλου Γεωργία:** Β' Ερευνήτρια, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ

**Ημερομηνία Ορισμού Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 27/07/2020**

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1. Μπούμπας Δημήτριος:** Καθηγητής, Διευθυντής Δ' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων)
- 2. Θυφρονίτης Γεώργιος:** Καθηγητής, Μοριακής και Κυτταρικής Ανοσολογία, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών κ Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 3. Καψογεώργου Ευσταθία:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Παθοφυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 4. Ρουμπελάκη Μαρία:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Αναπτυξιακής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 5. Εμμανουηλίδου Ευαγγελία:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 6. Ξάνθου-Τσιγκόγλου Γεωργία:** Β' Ερευνήτρια, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ
- 7. Βεκρέλλης Κωνσταντίνος:** Β' Ερευνητής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ

**Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: Άριστα**

**Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης**

## Ὀρκος του Ιπποκράτη

---

1. Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν καὶ Ἀσκληπιὸν καὶ Ὑγίαν καὶ Πανάκειαν καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.
2. Ἠγήσεσθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσεσθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσεσθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφεοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι καὶ τοῖσι τοῦ ἐμέ διδάξαντος καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δέ οὐδενί.
3. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δέ καὶ ἀδικίῃ εἶρξιν.
4. Οὐ δώσω δέ οὐδέ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδέ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως δέ οὐδέ γυναικί πεσσόν φθόριον δώσω.
5. Ἄγνων δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.
6. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲν μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσιν πρήξιος τῆσδε.
7. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτός ἐών πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρείων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.
8. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἰδῶ ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.
9. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι καὶ μὴ ξυγγέοντι εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης, δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δέ καὶ ἐπιορκέοντι, τάναντία τουτέων.

## Όρκος του Ιπποκράτη (μετάφραση)

---

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **Τροχούτσου Αικατερίνη**

#### **ΣΠΟΥΔΕΣ**

- 2012 - σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα «Ο ρόλος της ακτιβίνης- Α στην καταστολή αυτοάνοσων αντιδράσεων σε πειραματικά μοντέλα σκλήρυνσης κατά πλάκας και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα»
- 2005 - 2008 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Γενετική Τοξικολογία», Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Πατρών, βαθμό πτυχίου “Άριστα”  
Διπλωματική εργασία: «Μελέτη της σχέσης μεταξύ απόπτωσης και μικροπυρήνων που επάγονται από την αντικαρκινική ουσία Δοξορουβικίνη στη μυική κυτταρική σειρά C2C12” (Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Γεωργία Στεφάνου), Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
- 2001 - 2005 Πτυχίο ΑΕΙ: Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών, βαθμό πτυχίου "Λίαν Καλώς" 7,6.
- 2001 Απόφοιτος 3<sup>ο</sup> Ενιαίου Λυκείου Χαλκίδας, βαθμός απολυτηρίου "Άριστα"

#### **ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

##### **I. Διάλεξη κατόπιν πρόσκλησης:**

Invited speaker at Sessional Workshop “Prospects in Rhinitis and Asthma”. Second Pediatric Clinic, Children’s Hospital "P & A Kyriakou", University of Athens. Lecture title “Viral and bacterial co-infections in epithelial airway”, Lefkada, 28-29 May 2011

## **II. Προφορικές Παρουσιάσεις:**

1. **K. Trochoutsou**, M. Efthimiou, G. Stephanou, N.A. Demopoulos. Study Of The Relationship Between Apoptosis And Micronucleated Cells Induced By The Anticancer Drug Doxorubicin On The Mouse Cell Line C2C12. 30th Annual Conference of the Hellenic Society for Biological Sciences, Thessaloniki, 22-24 May 2008
2. **Trochoutsou AI**, Spyridaki IS, Skevaki CL, Tsakris A, Papadopoulos NG. Human rhinoviruses stimulate the production of leukotrienes upon infection of bronchial epithelial cells. ERAM-SERIN 2010, Brussels, 4-6 November 2010
3. Skevaki CL, Spyridaki IS, **Trochoutsou K**, Spanakis N, Tsakris A, Papadopoulos NG. Infection of bronchial epithelial cells with human rhinoviruses induces the production of leukotrienes. 5th national congress of clinical microbiology and hospital acquired Infections, Athens, 10-12 February 2011
4. Spyridaki IS, Skevaki CL, **Trochoutsou A**, Papadopoulos NG. Effects of anti-leukotriene agents on rhinovirus-induced cytotoxicity in bronchial epithelial cells. Allergy 2011; 66 (Suppl. 94): 13-14.
5. Skevaki CL, **Trochoutsou AI**, Tsiakta P, Logotheti I, Makrinioti C, Lebessi E, Paraskaki I, Papadopoulos NG, Tsolia MN. The role of viral infections in nasopharyngeal bacterial colonization of allergic and non-allergic children. 31st Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Geneva 16-20 June, 2012
6. Amanatidou V, Kaforou M, Psarras S, **Trochoutsou AI**, Shailes H, Wright V, Levin M, Tsolia M. Novel biomarkers for the detection of Tuberculosis in children identified by transcriptomic profiling of stimulated peripheral blood mononuclear cells. 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Dublin May 2014
7. Tousa S, Semitekoulou M, Morianos I, Banos A, Brodie T, Poulos N, Samitas K, **Trochoutsou AI**, Kapasa M, Paraskevopoulos G, Gaga M, Hawrylowicz MC, Sallusto F and Xanthou G Activin-A drives the generation of human CD4+ICOS+IL-10-secreting regulatory T cells that suppress asthma in an aryl hydrocarbon receptor dependent pathway. 33<sup>rd</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Copenhagen June, 2014

### III. Παρουσιάσεις Γραπτών Αναρτήσεων:

1. **K. Trochoutsou**, M. Efthimiou, G. Stephanou, N.A. Demopoulos. Study Of The Relationship Between Apoptosis And Micronucleated Cells Induced By The Anticancer Drug Doxorubicin On The Mouse Cell Line C2C12. 30th Annual Conference of the Hellenic Society for Biological Sciences, Thessaloniki, 22-24 May 2008
- 2.I. Christodoulou, St. Psarras, I.Spyridaki, **K.Trochoutsou**, Chry. Skevaki and N. Papadopoulos "Role of rhinoviral infection in neuropeptide-mediated inflammation in bronchial epithelial cells" XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology in Warsaw 6-10 June, 2009)
3. Makrinioti Ch., Papaevangelou V., Maggina P., Christodoulou I., Tsolia M., **Trochoutsou K.**, Kafetzis D., Papadopoulos NG "From bronchiolitis to asthma: wheeze relapse is more frequent after rhinovirus rather than RSV bronchiolitis" , XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology in Warsaw 6-10 June, 2009
4. Spyridaki I, Skevaki CL, **Trochoutsou A**, Vittorakis S, Christodoulou I, Gaga, M, Papadopoulos N. Rhinovirus induced cytotoxicity in epithelial cells of asthmatic patients and controls differs between the upper and lower airways. Allergy 2010; 65 (Suppl. 92): 63
5. Makrinioti Ch., Wanke K., Wawrzyniak P., Chalubinski M., Meyer N., **Trohoutsou K.**, Akdis M., Papadopoulos NG, Akdis C "Rhinovirus breaks tight junctions' formation in polarized bronchial epithelial cells mainly by decreasing transepithelial resistance". 30<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology in Istanbul 11-15 June, 2011
6. Makrinioti H., Papadopoulos NG , Wanke K., Wawrzyniak P., **Trohoutsou K.**, Eiwegger T., Akdis M., Akdis C " Th0 cells' switch to a rather Th2 phenotype after culture with rhinovirus-infected supernatants" 30<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology in Istanbul 11-15 June, 2011
7. Spyridaki IS, Skevaki CL, **Trochoutsou A**, Papadopoulos NG. Effects of anti-leukotriene agents on rhinovirus-induced cytotoxicity in bronchial epithelial cells. Allergy 2011; 66 (Suppl. 94): 13-14.
8. Amanatidou V, Mavrikou M, **Trochoutsou K**, Benetatou K, Critselis E, Papadopoulos, Tsolia M. Performance of IP-10, an interferon gamma release assay and tuberculin skin test in children at high risk for tuberculosis infection. ERS Annual Congress 2012
9. **AI Trochoutsou\***, IS Spyridaki, CL Skevaki, M Passiotti, S Loukides, P Bakakos, P



Emmanouil, K Kontogianni, NG Papadopoulos. Rhinovirus-induced interferon type III responses in primary nasal epithelial cells of subjects with & without allergic rhinitis. 31st Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Geneva 16-20 June, 2012

10. Spyridaki I.S., Skevaki C.L., **Trochoutsou A.I.**, Megremis S., Taka S., Roumpedaki E., Manoussaki A.E., Emmanouil P., Bakakos P., Loukides S., Papadopoulos N.G. Rhinovirus-induced type I interferon responses and viral load in primary nasal epithelial cells of subjects with or without atopic rhinitis and asthma 32nd Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Milano June, 2013
11. Tousa S, Semitekolou M, Morianos I, Banos A, Brodie T, Poulos N, Samitas K, **Trochoutsou AI**, Kapasa M, Paraskevopoulos G, Gaga M, Hawrylowicz MC, Sallusto F and Xanthou G Activin-A drives the generation of human CD4+ICOS+IL-10-secreting regulatory T cells that suppress asthma in an aryl hydrocarbon receptor dependent pathway. 33<sup>rd</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Copenhagen June, 2014
12. **Trochoutsou AI**, Tousa S, Morianos I, Kalamatas T, Semitekolou M and Xanthou G Novel crucial role of activin-A in the regulation of T helper type 17 cell-mediated immune responses. 33<sup>rd</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Copenhagen, June, 2014
13. **Trochoutsou AI**, Tousa S, Morianos I, Kalamatas T, Semitekolou M and Xanthou G Activin-A attenuates central nervous system (CNS) autoimmune inflammation. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, September 6 - 9, Vienna, Austria, 2015

#### ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Spyridaki I, **Trochoutsou KI** and Papadopoulos NG (2009) Asthma exacerbations. Allergi I PrakXis
2. “Activin-A: A New Piece in the Puzzle of Tolerance in Asthma”. Sofia Tousa, Maria Semitekolou, Ioannis Morianos, **Aikaterini I Trochoutsou** and Georgina Xanthou. Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs (2014) vol.1 pp45-56
3. “Tolerogenic signaling by pulmonary CD1c+ dendritic cells induces regulatory T cells in COPD by IL-27/IL-10/ICOS-L”. Maria Tsoumakidou, Sofia Tousa, Maria Semitekolou,

Panagiota Panagiotou, Anna Panagiotou, Eleni Litsiou, Ioannis Morianos, **Aikaterini I Trochoutsou**, Maria Konstantinou, Konstantinos Potaris, Joseph Footitt, Patrick Mallia, Spyros Zakyntinos, Sebastian L Johnston and Georgina Xanthou. *J Allergy Clin Immunol* (2014),134(4):p 944-954

4. “Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions” **Trochoutsou AI**, Kloukina V, Samitas K, Xanthou G. *Mini Rev Med Chem.* (2015);15(11):953-63
5. “Associations Between Viral and Bacterial Potential Pathogens in the Nasopharynx of Children With and Without Respiratory Symptoms” Skevaki CL, Tsiakta P, **Trochoutsou AI**, Logotheti I, Makrinioti H, Taka S, Lebessi E, Paraskakis I, Papadopoulos NG, Tsolia MN. *Pediatr Infect Dis J.* (2015) Dec;34(12):1296-301
6. “Interferon gamma inducible protein-10 in the diagnosis of paediatric tuberculosis infection in a low TB incidence country” Amanatidou V, Critselis E, **Trochoutsou A**, Soldatou A, Benetatou K, Spyridis N, Papadopoulos NG, Tsolia MN *Int J Tuberc Lung Dis.* (2015) Dec;19(12):1463-9
7. “Clastogenic, aneugenic and apoptotic activity of Doxorubicin in human and mouse cells” Vasiliki Chondrou, **Katerina Trochoutsou**, Andreas Panayides, Maria Efthimiou, Nikos A Demopoulos, Georgia Stephanou (submitted)
8. “Activin-A co-opts IRF4 and AhR signaling to induce human regulatory T cells that restrain asthmatic responses Sofia Tousa, Maria Semitekolou, Ioannis Morianos , Aggelos Banos, **Aikaterini I. Trochoutsou**, Tess M. Brodie , Nikolaos Poulos , Konstantinos Samitas, Maria Kapasa , Dimitris Konstantopoulos , Giannis Paraskevopoulos, Mina Gaga, Catherine M. Hawrylowicz, Federica Sallusto , and Georgina Xanthou, . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E2891–E2900 (2017).

#### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ & Η/Υ**

- Πολύ Καλή Γνώση Αγγλικής γλώσσας: Firtst Certificate in English (University of Cambridge).
- Καλή γνώση Γαλλικής γλώσσας: DELF A1.
- Καλή γνώση Ισπανικής Γλώσσας: Inicial, Instituto Cervantes
- Άριστη γνώση χρήσης Η/Υ, προγραμμάτων Microsoft Office/Κάτοχος ECDL Core

## **ΒΡΑΒΕΙΑ & ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ**

### **I. ΔΙΕΘΝΗ**

1. JMA Poster Session Award, Best presentation (Juniors) “Persistence of wheeze 18 months after the first bronchiolitis episode”- Makrinioti H, Papaevangelou V, Xepapadaki P, Maggina P, Christodoulou I, Trochoutsou K, Tsofia M, Papadopoulos NG - 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London, UK, 05-09 June 2010
2. Travel Grant to attend ERAM/SERIN Focused Meeting 2010
3. Travel Grant to attend Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Geneva, Switzerland, 16-20 June 2012
4. Two Awards for best Poster and Oral Presentation “Activin-A drives the generation of human CD4+ICOS+IL-10-secreting regulatory T cells that suppress asthma in an aryl hydrocarbon receptor dependent pathway”- Tousa S, Semitekoulou M, Morianos I, Banos A, Brodie T, Poulos N, Samitas K, Trochoutsou AI, Kapasa M, Paraskevopoulos G, Gaga M, Hawrylowicz MC, Sallusto F and Xanthou G- 33<sup>rd</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Copenhagen June, 2014

### **II. ΕΛΛΗΝΙΚΑ**

Hellenic Microbiology Society Award, Best research study award 2011

## **ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ**

- Onassis Foundation Summer 2008
- “Theoharis” Fellowship Award 2012-2014

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Β' Τζ. Ξάνθου-Τσιγκόγλου, την οποία και ευχαριστώ θερμά που με δίδαξε και με καθοδήγησε στον Τομέα της Ανοσολογίας, δίνοντάς μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω πειράματα στο εργαστήριο της, με τη συνεχή υποστήριξή της και την καθοριστική συμμετοχή της στο σχεδιασμό τους. Οι συμβουλές και η στάση της απέναντι σε κάθε ερευνητικό και μη προβληματισμό μου, διαμόρφωσαν την ερευνητική μου προσέγγιση και με βοήθησαν να αντιμετωπίσω διάφορες πρωτόγνωρες καταστάσεις.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ, οφείλω στον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής, Κύριο Δ. Μπούμπα για την ανάθεση της διεκπεραίωσης της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και τη συμμετοχή του στην εξέλιξη και ολοκλήρωσή της.

Πολλά ευχαριστώ αναλογούν, στους συναδέλφους και βασικά μέλη του εργαστηρίου, Γ. Μοριανό και Μ. Σεμιτέκολου, που υπήρξαν οι εργαστηριακοί μου μέντορες, και με την επίβλεψη, καθοδήγηση και ενεργό συμμετοχή τους, βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, καθώς και στη συγγραφή της επιστημονικής εργασίας. Ευχαριστώ επίσης θερμά τους Τζ. Παπαδοπούλου και Δ. Κωνσταντόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση μέρους των πειραμάτων, στη βιοπληροφορική ανάλυση και την πάντα πρόθυμη διάθεσή τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πολύτιμη συνεργασία, στην πρωτομική ανάλυση τον Κύριο Γαρμπή, που πίστεψε και υποστήριξε την ερευνητική μας προσέγγιση.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να αναφερθώ με σεβασμό σε όλους τους δότες που συμμετείχαν οικειοθελώς στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Η παρουσία τους ήταν απαραίτητη και πραγματικά καθοριστική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλα τα μέλη της 7μελούς επιτροπής, που αποδέχτηκαν με χαρά την πρόταση να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής.

Βασικό ρόλο και κατά τη διεξαγωγή της διδακτορικής μου διατριβής, όπως και της μέχρι τώρα πορείας μου, έπαιξαν η οικογένειά μου και οι φίλοι, με την απεριόριστη υποστήριξη και εμπύχωση τους. Ιδιαίτερα ευχαριστώ το σύζυγό μου Πάνο, για την εμπιστοσύνη που δείχνει σε κάθε επιλογή μου, καθώς και τους γονείς μου που χωρίς τις θυσίες τους δε θα είχα πραγματοποιήσει τους σημερινούς μου στόχους.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω και στην κόρη μου, Ιωάννα, που ο ερχομός της με γέμισε ευγνωμοσύνη και μου έδωσε ένα επιπλέον ισχυρότατο κίνητρο να ολοκληρώσω το στόχο της απόκτησης του διδακτορικού διπλώματος

*Στην Ιωάννα μου,*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Summary	3
Εισαγωγή	
1. Σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ) – περιγραφή, συμπτώματα	5
2. Ανοσοπαθολογία της ΣΚΠ	8
3. Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)	11
4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις	12
5. Ο ρόλος των Th17 κυττάρων στην παθογένεια της ΣΚΠ	13
6. Μηχανισμοί διαφοροποίησης και λειτουργίας Th17 κυττάρων	16
7. Ετερογένεια και πλαστικότητα των Th17 κυττάρων	19
8. Ακτιβίνη-A και σηματοδοτικό μονοπάτι	22
9. Ο ρόλος της ακτιβίνης-A στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων	26
10. Ο ρόλος της ακτιβίνης-A στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών	34
Υπόθεση και Σκοποί	37
Ερευνητική Εργασία	38
• Περίληψη	39
• Σημαντικότητα μελέτης	40
• Εισαγωγή	41
Πειραματική Μεθοδολογία	44
Αποτελέσματα	62
Συζήτηση	102
Μελλοντικοί Στόχοι	109
Βιβλιογραφία	111

## Περίληψη

**Εισαγωγή & Σκοπός:** Τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 17 (Th17) παρουσιάζουν φαινοτυπική και λειτουργική ετερογένεια επιδεικνύοντας παθογενετικές και μη- παθογενετικές, ιστοπροστατευτικές λειτουργίες. Τα παθογενετικά Th17 κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτοάνοσης φλεγμονής του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και στην απομυελίνωση, στη σκληρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ). Μέχρι και σήμερα, οι παράγοντες που εμποδίζουν την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων δεν έχουν καθοριστεί πλήρως. Η ακτιβίνη-A είναι μια κυτταροκίνη που επιτελεί βασικές βιολογικές διεργασίες και επιδεικνύει προ- και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, αποκάλυψαν ότι η ακτιβίνη-A καταστέλλει τις Th2-διαμεσολαβούμενες αλλεργικές αποκρίσεις, σε ασθενείς με αλλεργικό άσθμα και προστατεύει από την ανάπτυξη άσθματος σε πειραματικά μοντέλα. Παρόλα αυτά ο ρόλος της ακτιβίνης-A, στις αυτοάνοσες ανοσολογικές αποκρίσεις, που μεσολαβούνται από αυτοειδικά Th1 και Th17 κύτταρα, δεν έχει αποσαφηνιστεί. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, υποθέσαμε ότι η ακτιβίνη-A καταστέλλει την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων στην αυτοάνοση φλεγμονή που παρουσιάζεται στο ΚΝΣ και περιορίζει τη σοβαρότητα της νόσου. Σκοποί μας είναι: α) η μελέτη της δράσης της ακτιβίνης-A στη ρύθμιση της παθογενετικής λειτουργίας των Th17 κυττάρων *in vivo*, και β) η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στα παθογενετικά Th17 κύτταρα.

**Υλικά & Μέθοδοι:** Ο *in vivo* ρόλος της ακτιβίνης-A στη ΣΚΠ μελετήθηκε με θεραπευτική χορήγησή της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης στο πειραματικό μοντέλο της αυτοάνοσης πειραματικής εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), σε C57BL/6 ποντίκια, που αποτελεί ένα καθιερωμένο πειραματικό μοντέλο της ΣΚΠ. Η επίδραση της ακτιβίνης-A στη ρύθμιση της παθογενετικής λειτουργίας των Th17 κυττάρων *in vivo*, μελετήθηκε με πειράματα μεταφοράς Th17 κυττάρων σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια *Rag<sup>-/-</sup>*, μετά την επαγωγή της ΠΑΕ. Μηχανιστικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν επίσης σε ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου *Nt5e<sup>-/-</sup>* και *Phd2<sup>-/-</sup>*. Εξετάστηκε ο ρόλος της ακτιβίνης-A σε Th17 κύτταρα, διαφοροποιημένα υπό παθογενετικές συνθήκες (IL-6, IL-1β, IL-23), στην τροποποίηση του μεταγραφικού και φαινοτυπικού προφίλ των Th17 κυττάρων, με τεχνικές κυτταρομετρίας ροής, ELISA, qPCR, RNA-seq, ανοσοφθορισμού, κατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP) και συνεστιακή μικροσκοπία. Βιοπληροφορικές, πρωτεομικές και μεταβολικές αναλύσεις, εξέτασαν τους μοριακούς μηχανισμούς, μέσω των οποίων η ακτιβίνη-A επηρεάζει τη διαφοροποίηση παθογενετικών Th17 κυττάρων. Μετρήθηκαν



τα επίπεδα ακτιβίνης-A σε ορό και εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας μορφής (n=23), υγιών-μαρτύρων (n=10) και μαρτύρων με μη αυτοάνοση ασθένεια (n=11). Τέλος, διερευνήθηκε η δράση της ακτιβίνης-A στη διαφοροποίηση ανθρώπινων Th17 κυττάρων και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις των CD4<sup>+</sup>T κυττάρων από ασθενείς με ΣΚΠ.

**Αποτελέσματα:** Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η θεραπευτική χορήγηση της ακτιβίνης-A στην ΠΑΕ ελάττωσε τη σοβαρότητα της νόσου και περιόρισε την ανοσοπαθολογία του ΚΝΣ καθώς και την απομυελίνωση, μέσω κυρίως της μειωμένης ενεργοποίησης των παθογενετικών Th17 κυττάρων. Η διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων παρουσία ακτιβίνης-A κατέστειλε γονίδια που σχετίζονται με παθογενετικά Th17 κύτταρα όπως *Ifng*, *Csf2*, *Il1b*, *Tbx21* και *Batf*, ενώ ταυτόχρονα οδήγησε σε σημαντική αύξηση γονιδίων που σχετίζονται με μη παθογενετικά Th17 κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των *Il10*, *Maf* και *Ahr*. Οι δράσεις αυτές της ακτιβίνης-A πραγματοποιήθηκαν κυρίως μέσω του κύριου σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τον υποδοχέα ALK4 και τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad2/3. Εκτεταμένες αναλύσεις του γονιδιώματος (RNAseq) καθώς και *in vivo* μελέτη, αποκάλυψαν ότι η ενεργοποίηση των CD39 και CD73 εκτονουκλεοτιδασών που τροποποιούν το ATP σε αδενοσίνη, είναι απαραίτητη για την κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A τόσο στην παθογενετική ταυτότητα όσο και στις εγκεφαλοτοξικές λειτουργίες των Th17 κυττάρων. Όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης της ακτιβίνης-A, δείξαμε ότι ο μεταγραφικός υποδοχέας, aryl hydrocarbon (Ahr), μαζί με τους STAT3 και c-Maf, επιστρατεύονται στους υποκινητές των γονιδίων *Entpd1* και *Nt5e* (που κωδικοποιούν για τις CD39 και CD73 εκτονουκλεοτιδάσες, αντίστοιχα) καθώς και της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, ελέγχοντας την έκφρασή τους στα Th17 κύτταρα. Δείξαμε επίσης, ότι η ακτιβίνη-A ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση και την πρωτεϊνική σταθερότητα του μεταβολικού παράγοντα, hypoxia-inducible factor-1-α (Hif1-α) καθώς και ποικίλες προφλεγμονώδεις πρωτεΐνες –κλειδιά που σχετίζονται με την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων. Τέλος δείξαμε ότι η ακτιβίνη-A αυξάνεται στο ΚΝΣ ατόμων με ΣΚΠ και η παρουσία της έχει την ικανότητα να καταστέλλει τις φλεγμονώδεις Th17 μεσολαβούμενες κυτταρικές αποκρίσεις στους ασθενείς.

**Συμπεράσματα:** Τα παραπάνω ευρήματα αποκαλύπτουν την ακτιβίνη-A, ως ένα νέο κρίσιμο ρυθμιστή της παθογενετικής δράσης των Th17 κυττάρων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα μόριο-στόχος για την καταστολή της αυτοάνοσης φλεγμονής στο ΚΝΣ.

## **Summary**

**Introduction and Purpose:** T helper type cells 17 (Th17) exhibit functional heterogeneity fostering both pathogenic and nonpathogenic, tissue-protective functions. In multiple sclerosis (MS), pathogenic Th17 cells are critical drivers of autoimmune central nervous system (CNS) inflammation and demyelination. Still, the factors that control Th17 cell pathogenicity remain incompletely defined. Activin-A is a pleiotropic cytokine that is involved in a variety of biological processes and exerts both pro- and anti- inflammatory functions. Our previous studies revealed that activin-A restrains Th2 allergic responses in asthmatic individuals and protects against experimental asthma. Still, the role of activin-A in autoimmune responses that are mediated with auto-reactive Th1 and Th17 cells remains to be elucidated. Our hypothesis is that activin-A plays a key role in Th17 pathogenicity and linked CNS autoimmune inflammation. Our aims are to investigate a) the role of activin-A in the regulation of autoimmune CNS inflammation *in vivo* and b) to explore the molecular mechanisms that are involved in the suppressive effects of activin-A on the pathogenicity of Th17 cells.

**Materials and Methods:** The *in vivo* role of activin-A in MS was explored following therapeutic administration in a C57BL/6 mouse model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The effects of activin-A on the regulation of Th17 pathogenicity *in vivo* were examined through adoptive transfer Th17 cells in to immunosuppressed *Rag*<sup>-/-</sup> mice following EAE induction. Functional experiments were also performed in *Nt5e* and *Phd2* deficient mice. Th17 cells were generated *in vitro* under highly-pathogenic conditions (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23) and the effects of activin-A on their transcriptional and phenotypic profile were examined by flow cytometry, ELISA, qPCR, RNA-seq, immunofluorescence, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays and confocal microscopy analyses. Bioinformatics, proteomics and metabolomics analyses deciphered the molecular mechanisms underlying the effects of activin-A on Th17 pathogenicity. The levels of activin-A were measured in the serum and cerebrospinal fluid of individuals with RRMS, (n=23), healthy donors (n=10) and patients with other non-autoimmune diseases (n=20). Finally, the role of activin-A on human Th17 differentiation and effector CD4<sup>+</sup>T cells responses of patients with MS was examined.

**Results:** Our findings demonstrated that *in vivo* therapeutic administration of activin-A in EAE mice, ameliorated disease severity and alleviated CNS immunopathology and demyelination,

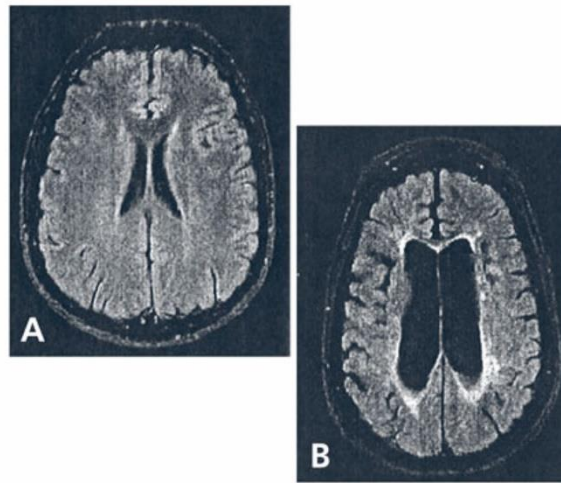
associated with decreased activation of pathogenic Th17 cells. During Th17 cell differentiation, activin-A stimulation repressed genes linked to Th17 pathogenicity, including *Ifng*, *Csf2*, *Il1b*, *Tbx21* and *Batf*, concomitant with an upregulation of genes associated with non-pathogenic Th17 cells, such as, *Il10*, *Maf* and *Ahr*. The aforementioned effects were mediated by activin-A's canonical signaling pathway, involving activin-like kinase-4 (ALK) receptor and the transcriptional factors phosphoSmad2/3. Extended analysis of the whole genome (RNAseq), combined with *in vivo* studies, revealed that activation of the ATP-depleting CD39 and CD73 ectonucleotidases is essential for activin-A-induced suppression of the pathogenic signature and the encephalitogenic functions of Th17 cells. Mechanistical studies, found that transcription factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr), along with STAT3 and c-Maf, are recruited to promoter elements on *Entpd1* and *Nt5e* (encoding CD39 and CD73 ectonucleotidases, respectively) and on anti-inflammatory cytokine IL-10 and control their expression in Th17 cells in response to activin-A. Moreover, we showed that activin-A negatively regulates the expression and stability of the metabolic sensor, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , and key inflammatory proteins linked to pathogenic Th17 cell states. Finally, we demonstrated that activin-A is induced in the CNS of individuals with MS and its presence restrains human Th17 cell-mediated responses.

**Conclusions:** Our studies uncovered activin-A as a critical controller of Th17 cell pathogenicity that can be targeted for the suppression of autoimmune CNS inflammation.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1) Σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ)-Περιγραφή, Συμπτώματα

Η ΣΚΠ αποτελεί μια αυτοάνοση ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), που προσβάλλει 2.5 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Σε αυτή την αυτοάνοση νόσο, κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος και ειδικότερα τα αυτοδραστικά T και B λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα στα νευρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στο ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα στη ΣΚΠ, καταστρέφεται ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός και εμφανίζεται σημαντική απώλεια της μυελίνης. Η μυελίνη είναι η λιπώδης μεμβράνη – έλυτρο που περιβάλλει το νευράξονα των νευρικών ιών. Η παρουσία της αυξάνει την αποδοτικότητα με την οποία οι άξονες μεταφέρουν τα δυναμικά ενέργειας από το ένα νεύρο στο άλλο ή από το νεύρο προς το μυ ή άλλα όργανα, και ειδικότερα τις αποστάσεις που διασχίζουν τα νεύρα μεταξύ του εγκεφάλου και των άκρων.



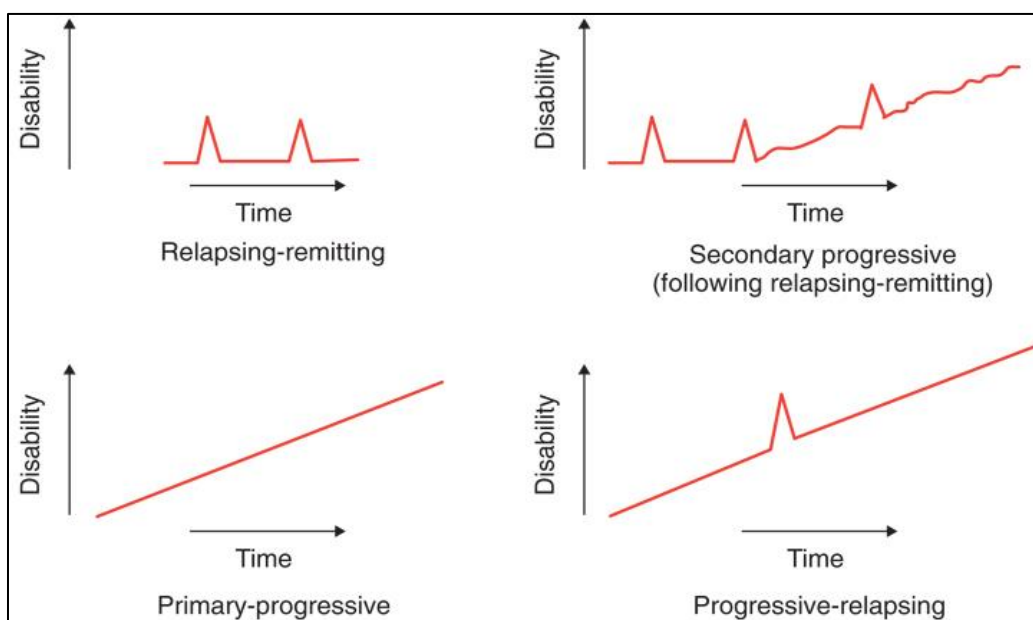
*adapted by [www.neuroimmunology.lv](http://www.neuroimmunology.lv)*

### Σχήμα 1: Αλλοιώσεις στον εγκέφαλο ασθενών με ΣΚΠ

(A) Φυσιολογική ιστολογική απεικόνιση εγκεφάλου ανδρός (31 ετών), (B) Αλλοιώσεις στον εγκέφαλο γυναίκας με ΣΚΠ (μαύρη περιοχή – 43 ετών)

Τυπικό χαρακτηριστικό της ΣΚΠ είναι ότι αναπτύσσονται διάσπαρτες εστίες (πλάκες) απομυελίνωσης στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό ποικίλου μεγέθους και ανατομικής

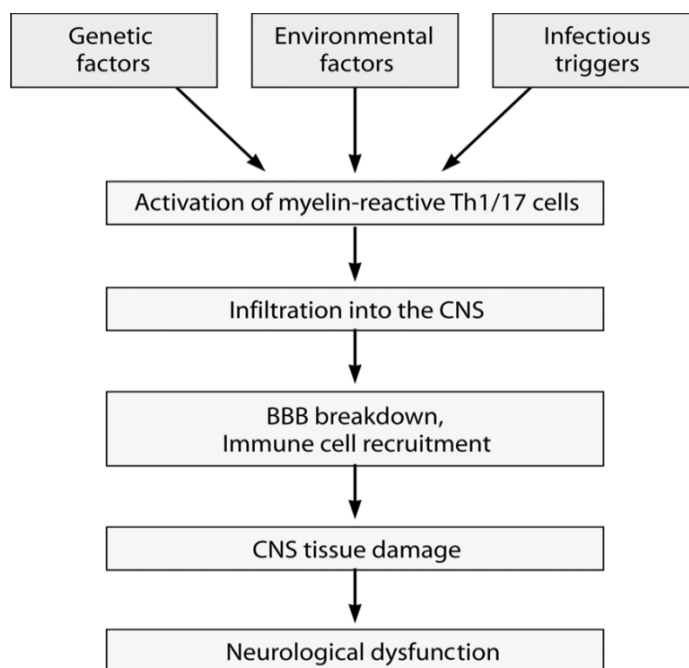
εντόπισης, γεγονός που οδηγεί σε μια μεγάλη ποικιλομορφία των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου (πχ. διαταραχές στην κίνηση, αλλοίωση της όρασης, συναισθηματικές διαταραχές-κατάθλιψη). Η πλειοψηφία των ασθενών με ΣΚΠ παρουσιάζει την πιο ήπια μορφή χωρίς κάποια σοβαρή αναπηρία. Σε αυτούς, η ασθένεια εμφανίζεται με τη μορφή εξάρσεων και υφέσεων, η λεγόμενη υποτροπιάζουσα ή διαλείπουσα μορφή (*Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis-RRMS*). Υπάρχουν ασθενείς όπου η αναπηρία σταδιακά εξελίσσεται μεταξύ των υποτροπών. Σημειώνονται απρόοπτα επεισόδια, συμπεριλαμβανομένης της επιδείνωσης αλλά και της νέας εμφάνισης νέων συμπτωμάτων και η κατηγορία αυτή καλείται δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis-SPMS*). Κάποιοι άλλοι ασθενείς παρουσιάζουν τη μορφή εξάρσεων- υφέσεων, με σταδιακή επιδείνωσή της νευρολογικής νόσου, είναι η πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή ΣΚΠ (*Primary Progressive Multiple Sclerosis-PPMS*) και τέλος, υπάρχει και η μορφή προϊούσας υποτροπιάζουσας ΣΚΠ (*Progressive- Relapsing Multiple Sclerosis-PPMS*) που διαγιγνώσκεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό ατόμων, τα οποία παρουσιάζουν σταθερή επιδείνωση των συμπτωμάτων μετά τη διάγνωση και ενδέχεται να έχουν βαριές υποτροπές.



*adapted by [www.neuroimmunology.lv](http://www.neuroimmunology.lv)*

**Σχήμα 2:** Διαφορετικές κατηγορίες ασθενών με ΣΚΠ

Η ΣΚΠ χαρακτηρίζεται από έναρξη σε νεαρή ηλικία και έχει παρατεταμένη εξέλιξη που μπορεί να διαρκέσει σχεδόν 25 έτη. Η εξέλιξη της νόσου μπορεί να καταλήξει και στο θάνατο, μειώνοντας το προσδόκιμο ζωής 5-10 χρόνια (1). Αναφορικά με τα άτομα που παρουσιάζουν ΣΚΠ, οι γυναίκες έχουν δύο φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης, συγκρινόμενες με τους άνδρες και ο μέσος όρος ηλικίας βρίσκεται στα 29 περίπου έτη, με εύρος ~ 25-30 έτη (WHO,2008). Η επεξεργασία διαφόρων επιδημιολογικών δεδομένων και ευρείας κλίμακας μελετών σχετιζόμενων με το ανθρώπινο γονιδίωμα (genome-wide association studies/GWAS) έχουν ενοχοποιήσει κάποιους γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την πιθανή εμφάνιση της ΣΚΠ. Στις επιδημιολογικές μελέτες παρουσιάζονται παράγοντες όπως οι μολύνσεις από μικρόβια ή βακτήρια, το μικροβίωμα, τα επίπεδα της βιταμίνης D, αλλά και γενικότερες διατροφικές συνήθειες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Από GWAS μελέτες έχει φανεί ότι άτομα με HLA τάξης II και ειδικότερα αλληλίων DRB1\*1501, DRB1\*0301 και DRB1\*1303, είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν ΣΚΠ. Επίσης, νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έχουν συνδιαστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου (πχ. interleukin-7 receptor/IL7R και TNF- $\alpha$  receptor).



*adapted from Dimitry N. Kremontsov et al. Mol. Cell. Biol. 2013*

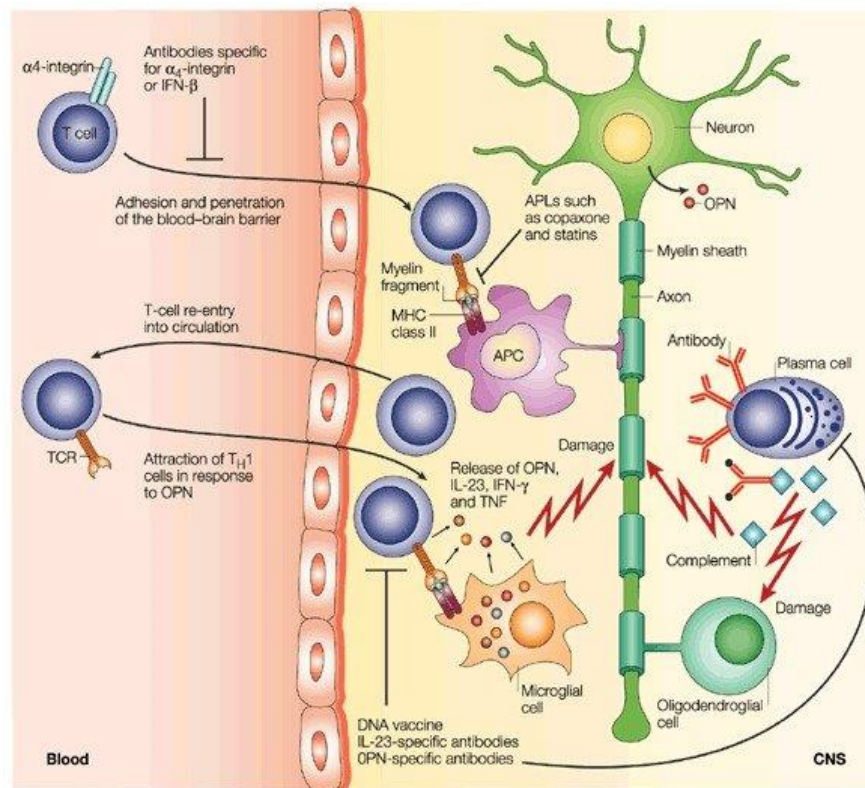
**Σχήμα 3:** Παθοφυσιολογία της ΣΚΠ: πιθανοί παράγοντες που προκαλούν ΣΚΠ και διαδοχικότητα των συμβάντων στην εξέλιξή της.

Η συχνότερα εμφανιζόμενη μορφή ΣΚΠ είναι η υποτροπιάζουσα διαλείπουσα. Κατά τη διάρκεια των υποτροπών, εμφανίζεται έντονη διαπερατότητα του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, διήθηση των ανοσοκυττάρων από την περιφέρεια στο ΚΝΣ, γλοίωση, απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων, απομυελίνωση των νευραξόνων και γενικότερος εκφυλισμός της φαιάς ουσίας. Σε αντίθεση με τις αλλοιώσεις της φαιάς ουσίας, μετά τη φάση της υποτροπής, ενεργοποιείται άμεση επαναμυελίνωση στη λευκή ουσία στην πλειοψηφία των ασθενών όταν βρίσκονται σε ύφεση. Κατά την ύφεση, περιορίζεται η φλεγμονή γεγονός που βοηθά στην επαναφορά της λειτουργικότητας των νευρικών κυττάρων και τις περισσότερες φορές μειώνεται η αποδοτικότητα του ΚΝΣ και καταλήγει σε κάποια μόνιμη βλάβη (2-3). Ο όρος 'σκλήρυνση' που αποδίδεται στη νόσο σχετίζεται με το σχηματισμό του ινώδους ιστού που παρεμποδίζει την ορθή και έγκαιρη μετάδοση των μηνυμάτων μεταξύ των νευρών και μεταξύ των μυών και των νευρών.

## **2) Ανοσοπαθολογία της ΣΚΠ**

Πληθώρα πειραματικών δεδομένων, έχει δείξει ότι η ΣΚΠ επάγεται από την ενεργοποίηση των αυτοδραστικών ειδικών για τη μυελίνη T λεμφοκυττάρων, που εισέρχονται στο ΚΝΣ και ξεκινούν ή/και ενισχύουν μια χρόνια φλεγμονώδη απόκριση. Όσον αφορά τους ανοσολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπλέκονται στη ΣΚΠ, μελέτες έχουν δείξει ότι στην παθοφυσιολογία της νόσου συμμετέχουν τόσο η φυσική ανοσία (innate immunity) όσο και η επίκτητη ανοσία (adaptive immunity). Στην επίκτητη ανοσία, κύριο ρόλο παίζουν τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται σε υποπληθυσμούς δραστικών T βοηθητικών (Th) κυττάρων, κυρίως ανάλογα με τις κυτταροκίνες που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον τους. Επιπλέον αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-presenting cells-APCs), όπως τα δενδριτικά κύτταρα εισέρχονται στο ΚΝΣ, παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και παρουσιάζουν το αυτοαντιγόνο οδηγώντας στην ενεργοποίηση των αυτο-δραστικών CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα της μικρογλοίας ενεργοποιούνται από τις φλεγμονώδεις ουσίες που παράγονται στο ΚΝΣ και μέσω φαγοκυττάρωσης και καταστροφής της μυελίνης συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των T κυττάρων και την καταστροφή των νευρικών κυττάρων. Στην παθογένεια της ΣΚΠ εμπλέκονται και άλλοι κυτταρικοί τύποι, όπως οι φυσικοί φονείς (natural killer), τα μαστοκύτταρα καθώς και τα γδ-T κύτταρα (4-5). Όπως προαναφέρθηκε, κύριο ρόλο στη ΣΚΠ διαδραματίζουν τα αυτο-δραστικά CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T και τα B λεμφοκύτταρα.

Συγκεκριμένα, τα T κύτταρα που αναγνωρίζουν αυτο-αντιγόνα στα νευρικά κύτταρα, ανήκουν στις Th1 και Th17 κατηγορίες, παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, με πιο χαρακτηριστικές τις IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και GM-CSF και προκαλούν καταστροφή των νευρώνων καθώς και ενίσχυση της φλεγμονής στο ΚΝΣ. Τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου, μέσω κυτταροτοξικών δράσεων έναντι των κυττάρων της μικρογλοίας και των νευρικών κυττάρων. Όσον αφορά τα B κύτταρα επάγουν την καταστροφή της μυελίνης μέσω παραγωγής αυτο-δραστικών αντισωμάτων και περαιτέρω ενεργοποίησης των CD4<sup>+</sup> T κυτταρικών αυτοάνοσων αποκρίσεων (5-6).



*adapted from Steinman, Nature Immunology 2003*

#### **Σχήμα 4: Η χρόνια αυτοάνοση φλεγμονή στη ΣΚΠ.**

Τα T, B και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, εισέρχονται στο ΚΝΣ, όπου εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες και καταστρέφουν τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα καταστρέφουν τη μυελίνη που περιβάλλει τους νευράξονες. Η κατεστραμμένη μυελίνη δεν μπορεί να μεταφέρει φυσιολογικά το ηλεκτρικό δυναμικό, δεδομένου ότι δεν υπάρχει συνέχεια στο κύκλωμα. Τα λεμφοκύτταρα διηθούνται το ΚΝΣ μέσω του επιφανειακού υποδοχέα integrin-4. Μόλις ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός καταστεί



διατριτός, και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα συγκεντρώνονται στη λευκή ουσία. Στον εγκέφαλο, τα T κύτταρα και μακροφάγα, μαζί με κύτταρα μικρογλοίας εκκρίνουν οστεοποντίνη (OPN), ιντερλευκίνη-23 (IL-23), IFN- $\gamma$  και tumour-necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , και όλοι αυτοί οι παράγοντες καταστρέφουν επίσης τη μυελίνη. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων μπορεί να ανασταλλεί από τροποποιημένα πεπτιδικά προσδέματα (altered peptide ligands /APLs), όπως η κοπαξόνη (copaxone), ή από τις στατίνες. Ταυτόχρονα, τα B κύτταρα (πλασματοκύτταρα) παράγουν ειδικά αντισώματα για τη μυελίνη και καταστρέφουν περαιτέρω τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα.

Άλλος κυτταρικός πληθυσμός που ρυθμίζει την εξέλιξη της ΣΚΠ είναι τα ρυθμιστικά CD4<sup>+</sup> T κύτταρα (T regulatory cells–Tregs). Συγκεκριμένα, τα Tregs που χαρακτηρίζονται ως CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> και εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 (FOXP3), είναι τα κύρια T κύτταρα που καταστέλλουν δραστικές κυτταρικές αποκρίσεις που προέρχονται τόσο από τη φυσική όσο και από την επίκτητη ανοσία. Η καταστολή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της μείωσης του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα T δραστικά κύτταρα και την καταστολή της δράσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (7). Έχει αποδειχθεί ότι τα Tregs συμμετέχουν και στη διατήρηση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (8). Η ανοσο-κατασταλτική δράση των Tregs καθορίζεται κυρίως από το FOXP3 που ελέγχει την έκφραση του cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) και της επαγόμενης από γλυκοκορτικοστεροειδή TNF receptor-related πρωτεΐνης (GITR) (9). Η συστράτευσή τους στο ΚΝΣ, γίνεται μέσω του παράγοντα CCL22 που παράγεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα (7). Μελέτες σε ασθενείς με ΣΚΠ έχουν δείξει ότι η κατασταλτική δράση των Tregs απορυθμίζεται και αυτό σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του FOXP3 (7-10). Αντιθέτως, κατά τη διάρκεια ύφεσης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης FOXP3 στα CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T ρυθμιστικά κύτταρα, αυξάνεται και βελτιώνεται η κλινική εικόνα (7). Ένας ακόμη ανοσορρυθμιστικός κυτταρικός πληθυσμός που εμπλέκεται στη ΣΚΠ, είναι τα Type 1 regulatory T λεμφοκύτταρα τα οποία φαίνεται ότι έχουν μειωμένη ανοσοκατασταλτική δράση, μειωμένη έκκριση της IL-10 και αυτά τα χαρακτηριστικά συνδέονται με αυξημένη σοβαρότητα της νόσου. Αναφορικά με τα Tr1 κύτταρα, πρέπει να σημειώσουμε ότι χαρακτηρίζονται από παραγωγή IL-10, TGF- $\beta$  και IFN- $\gamma$  και φέρουν τους επιφανειακούς δείκτες CD49b<sup>+</sup>, LAG-3<sup>+</sup>, CD226<sup>+</sup>. Οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη διαφοροποίησή τους είναι οι avian virus oncogene musculoaponeurotic fibrosarcoma (c-Maf), ο aryl hydrocarbon receptor (Ahr), ο

interferon regulatory factor 4 (IRF4), o repressor of GATA3 (ROG) και o early growth response protein 2 (Egr-2) (11). Ο ρόλος των Tr1 ρυθμιστικών κυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην καταστολή της αυτοάνοσης φλεγμονής στο ΚΝΣ, δεδομένου ότι έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να περιορίσουν την ανοσολογική απόκριση με έναν IL-10 εξαρτώμενο τρόπο, όταν μεταφέρονται σε ποντίκια με ΠΑΕ (12).

### **3) Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)**

Μελέτες που σχετίζονται με τη ΣΚΠ, τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτή καθώς και τον έλεγχο της δράσης διαφόρων φαρμάκων, χρησιμοποιούν στην πλειοψηφία τους το μυϊκό μοντέλο της ΠΑΕ (13). Στην ΠΑΕ, το αντιγόνο είναι γνωστό ενώ στη ΣΚΠ δεν υπάρχει ταυτοποιημένο-μοναδικό αντιγόνο. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η ανοσοποίηση στην ΠΑΕ επιτυγχάνεται με τη χρήση ανοσοενισχυτικού Freund's, που συνήθως περιέχει βακτηριακά τμήματα, ικανά να ενεργοποιήσουν τη φυσική ανοσία, μέσω αναγνώρισης υποδοχέων καθώς και με τη χορήγηση του αυτό-αντιγόνου MOG<sub>33-55</sub> (14). Στη συνέχεια, σε επτά-δέκα ημέρες, τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που αναγνωρίζουν το αυτό-αντιγόνο ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Έπειτα, τα μυελινο-ειδικά T κύτταρα εισέρχονται στο ΚΝΣ που αναγνωρίζουν τα αυτο-αντιγόνα στους επιτόπους μυελίνης στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (15). Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στο ΚΝΣ είναι περι-αγγειακά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έχουν περάσει στο ΚΝΣ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (16). Η επανενεργοποίηση των T κυττάρων στο ΚΝΣ, οδηγεί σε έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι οι IL-17, IL-6, IFN-γ και TNF-α, που ενεργοποιούν και στρατολογούν άλλα προ-φλεγμονώδη κύτταρα της φυσικής ανοσίας όπως τα κοκκιοκύτταρα και τα μακροφάγα που ευθύνονται για την καταστροφή των νευρικών κυττάρων και την απομυελίνωση (17). Παράλληλα εκκρίνονται και τοξικοί παράγοντες όπως το οξείδιο του αζώτου, που συμβάλλουν στην καταστροφή της μυελίνης. Το αυτο-αντιγόνο αποτελεί έναν επίτοπο της μυελίνης πολύ σημαντικό για την ΠΑΕ, γιατί αφενός επάγει αυτό-δραστικά T κύτταρα αλλά και έντονη παραγωγή αντισωμάτων έναντι της μυελίνης (18-20). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η ανοσολογική απόκριση καθώς και η απομυελίνωση των νευραξόνων που παρατηρούνται στην ΠΑΕ έχουν ομοιότητες με την παθολογία της ανθρώπινης νόσου (21).

#### **4) Θεραπευτικές προσεγγίσεις**

Η ΣΚΠ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια ως προς τη συμπτωματολογία και την εξέλιξη. Η ευρεία συμπτωματολογία περιλαμβάνει οφθαλμολογικές αλλοιώσεις, διαταραχές στην ισορροπία και το συντονισμό των κινήσεων, μούδιασμα στα άκρα, διαταραχές στη λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος, συναισθηματικές ακραίες διαταραχές καθώς και γνωσιακά προβλήματα. Κάθε ασθενής μπορεί να εμφανίσει διαφορετικό συνδυασμό συμπτωμάτων, αλλά και τα συμπτώματα του ίδιου ασθενή διαφοροποιούνται εντάσεως, κατά το πέρας του χρόνου. Για το λόγο αυτό, η ΣΚΠ χαρακτηρίζεται ως μια εξατομικευμένη πάθηση που χρίζει εξατομικευμένης θεραπείας. Οι υπάρχουσες θεραπείες στοχεύουν στην κύρια αιτία εκδήλωσης της νόσου, που είναι ο περιορισμός της φλεγμονής στο ΚΝΣ. Πρωτίστως αντιμετωπίζεται η οξεία φάση και τα συμπτώματα της νόσου και το θεραπευτικό σχήμα που εφαρμόζεται, εστιάζει κυρίως στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου, στην πρόληψη των επικείμενων υποτροπών και στην καθυστέρηση της εξέλιξης της αναπηρίας. Τα φαρμακευτικά σχήματα που χορηγούνται διακρίνονται σε 1ης και 2ης γραμμής και περιλαμβάνουν χημικούς αλλά και βιολογικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, στις θεραπείες συμπεριλαμβάνονται η ανασυνδιασμένη IFN-γ (1<sup>ης</sup> γραμμής), διάφορα συνθετικά πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν βασικές αλληλουχίες της μυελίνης, καθώς και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι παθολογικών κυτταροκινών (π.χ anti-IL-23 και anti-IL-17). Ιδιαίτερα γνωστή είναι η χρήση ναταλιζουμάμπης (*Tysabri*) (2<sup>ης</sup> γραμμής) που είναι μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων, εμποδίζοντάς τα να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η ναταλιζουμάμπη χορηγείται ενδοφλέβια και αποτελεί μια από τις πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Ωστόσο, οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται στενά, τόσο κλινικά όσο και εργαστηριακά, λόγω του ενδεχόμενου εμφάνισης προϊούσας πολυεστιακής λευκοεγκεφαλοπάθειας (Progressive multifocal leukoencephalopathy-PML). Η PML είναι μία πολύ σοβαρή εγκεφαλική λοίμωξη που μπορεί να καταλήξει στο θάνατο ή σε σοβαρότατη αναπηρία. Ηπιότερα, μπορεί να προκαλέσει αλλεργίες, καθώς και ευκαιριακές λοιμώξεις.

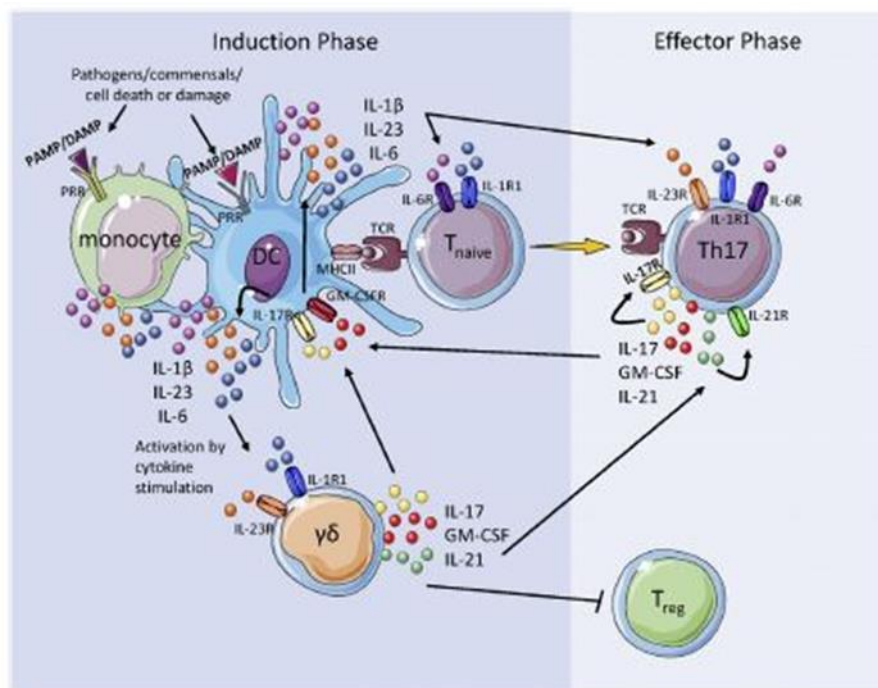
Στόχος των υπάρχόντων και των υπό μελέτη θεραπευτικών παραγόντων, είναι η καταστολή της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, η μετατροπή των παθογενετικών Th1/Th17 σε Tregs κύτταρα, η καταστολή της φλεγμονής μέσω δημιουργίας οργανο-προστατευτικών Th2 κυττάρων-ειδικών για το πεπτίδιο της μυελίνης-, η παρεμπόδιση της

εισόδου των λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ καθώς και η ελάττωση των αναστολέων της επαναμυελίνωσης (22). Τρέχουσες κλινικές μελέτες αποσκοπούν στην εύρεση νέων παραγόντων που θα έχουν τόσο νευροπροστατευτική όσο και αντιφλεγμονώδη δράση, περιορίζοντας ταυτόχρονα τις παρενέργειες όπως η κόπωση, η ναυτία, η δύσπνια, οι λοιμώξεις, οι καρδιακές αρρυθμίες και οι αλλεργικές αντιδράσεις. Δεδομένου ότι οι υπάρχουσες ανοσορρυθμιστικές θεραπείες για την ΣΚΠ, περιορίζουν τα συμπτώματα της νόσου, χωρίς όμως να οδηγούν σε ίαση αυτής και συνήθως σχετίζονται με σοβαρές παρενέργειες, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη να ταυτοποιηθούν νέοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες που θα έχουν τη δυνατότητα να καταστείλουν την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων και παράλληλα θα μειώνουν τη σοβαρότητα της αυτοάνοσης νόσου καθώς και την εξέλιξη αυτής.

## **5) Ο ρόλος των Th17 κυττάρων στην παθογένεια της ΣΚΠ**

Τα T λεμφοκύτταρα έχουν χαρακτηριστεί ως ο κύριος πληθυσμός που εμπλέκεται στην παθογένεια της ΣΚΠ. Η διαφοροποίησή τους ξεκινάει μετά από συνδιασμό σημάτων που σχετίζονται με τον κυτταρικό υποδοχέα T (TCR), το συν-ενεργοποιητικό μόριο και τους υποδοχείς των κυτταροκινών. Τα σήματα αυτά στη συνέχεια ενεργοποιούν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για την έκφραση συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων. Αθώα Th κύτταρα διαφοροποιούνται σε Th1 κύτταρα όταν επάγεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα T-bet. Αυτό είναι αποτέλεσμα της έκθεσης σε ιντερλευκίνη IL-12 (25). Παρουσία IL-4, αθώα Th κύτταρα εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα GATA-binding protein (GATA)-3 και διαφοροποιούνται σε Th2 κύτταρα. Τα Th1 κύτταρα έχουν ενοχοποιηθεί από πολλές μελέτες, ότι εκκρίνοντας IFN- $\gamma$  και tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), αποτελούν έναν από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στην παθογένεια της ΣΚΠ. Η παρατήρηση αυτή, υποστηριζόταν από το γεγονός ότι κατά την επαγωγή της ΠΑΕ, παρατηρούταν υψηλό ποσοστό Th1 κυττάρων και επιπέδων IFN- $\gamma$  στο ΚΝΣ των ποντικών. Επιπλέον, εγκεφαλοτοξικά Th1 κύτταρα μπορούσαν να επάγουν τη νόσο όταν μεταφέρονταν σε αθώα ποντίκια-δέκτες. Συμπληρωματικά, ποντίκια που είχαν έλλειψη για το T-bet<sup>2/2</sup> ή για τον παράγοντα signal transducer and activator of transcription (STAT)-4 ήταν ανθεκτικά στην εμφάνιση της ΠΑΕ. Είναι γνωστό ότι ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-4 είναι απαραίτητος για τη σηματοδότηση της IL-12, καθοδικά του υποδοχέα της και η ίδια απαιτείται για τη διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων.

Συνδυαστικά τα παραπάνω αποτελέσματα, αποδεικνύουν ότι τα Th1 κύτταρα εμπλέκονται στην παθογένεση της ΠΑΕ, και πιθανώς και της ΣΚΠ (26). Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι ποντίκια με έλλειψη της κυτταροκίνης IFN- $\gamma$  ή και του υποδοχέα της, όπως και ποντίκια με έλλειψη της IL-12 ή του υποδοχέα IL-12R $\beta$ 2, εμφανίζουν τη νόσο και πολλές φορές με χειρότερο φαινότυπο (27–31). Όσον αφορά τα Th2 κύτταρα, που εκκρίνουν IL-4, IL-5, IL-10, και IL-13, έχει προταθεί ότι λειτουργούν προστατευτικά στις αυτοάνοσες αποκρίσεις και παρεμποδίζουν την καταστροφή των νευρώνων στη ΣΚΠ.



*adapted from Mills et al. Journal of Autoimmunity. 2018*

**Σχήμα 5: Επαγωγή των  $\gamma\delta$  T και των Th17 κυττάρων και η αλληλεπίδρασή τους στην ΠΑΕ και τη ΣΚΠ.**

Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται από pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) από παθογόνα ή κοινά βακτήρια και damage associated molecular patterns (DAMPs), από νεκρά ή αποπτωτικά κύτταρα που προσδένονται στους pattern recognition receptors (PRRs), συμπεριλαμβανομένων των toll-like receptors -TLRs και NLR αγωνιστών. Στην ΠΑΕ, τα PAMPs προέρχονται μετά από ανοσοποίηση με το αυτό-αντιγόνο σε πλήρες Freund's ανοσοενισχυτικό (που περιλαμβάνει αδρανοποιημένο *Mycobacterium tuberculosis*) και χορήγηση pertussis toxin. Μόλις ενεργοποιηθούν μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που περιλαμβάνουν τις IL-1 $\beta$ , IL-23 και IL-6. Ενεργοποίηση με IL-1 $\beta$  και IL-23 άμεσα ενεργοποιεί τα  $\gamma\delta$  T κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν IL-17, GM-CSF και IL-21. Τα αντιγονικά τμήματα παρουσιάζονται από τα μόρια MHC κλάσης II στα δενδριτικά κύτταρα και στα CD4 T κύτταρα. Στη συνέχεια, σε συνδυασμό με συν-διεγερτικά σήματα και την

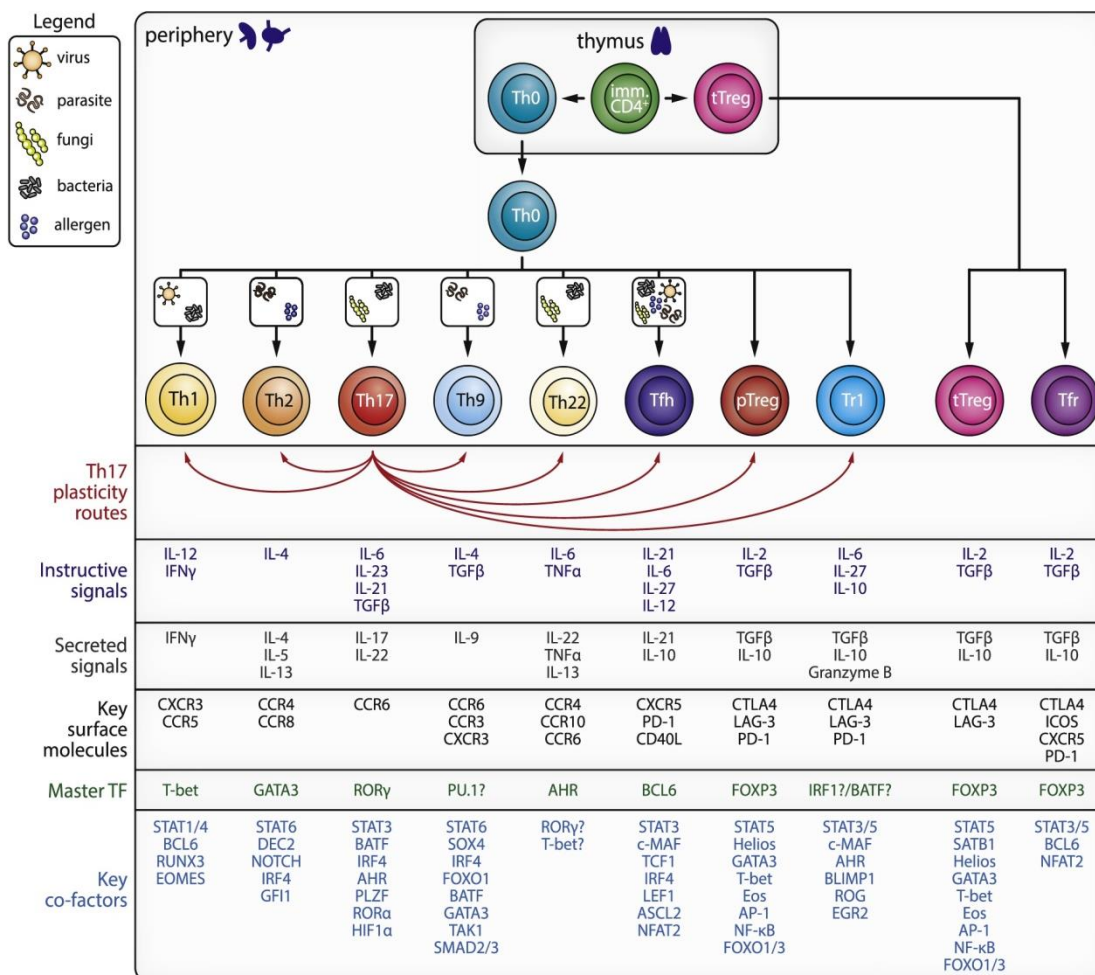
παρουσία κυτταροκινών που σχετίζονται με τα Th17 κύτταρα (IL-6, IL-1b και IL-23) επάγουν την ενεργοποίηση της διαφοροποίησης των Th17 κυττάρων που εκκρίνουν IL-17, GM-CSF, IL-21, IL-22, IL-17F και IFN- $\gamma$ . IL17 και GM-CSF εκλύονται από τα  $\gamma\delta$  T κύτταρα και Th17 κύτταρα ξεκινούν προ-φλεγμονώδη ανατροφοδότηση που ενισχύει την παραγωγή IL-6, IL-1b και IL-23 από τα APCs, καταλήγοντας σε ενισχυμένες Th17 αποκρίσεις και ενεργοποίηση των  $\gamma\delta$  T κυττάρων. Οι IL-17 και IL-21 δρουν μέσω αυτοκρινούς τροφοδότησης για να επάγουν περαιτέρω την παραγωγή της IL-17 από τα Th17 κύτταρα και τελικά την ανάπτυξη της ΠΑΕ. Τα ενεργοποιημένα  $\gamma\delta$  T κύτταρα καταστέλλουν τις αποκρίσεις των Tregs, επάγοντας την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα T δραστικά κύτταρα.

Η ανακάλυψη της IL-23, αποκάλυψε έμμεσα και την ύπαρξη των Th17 κυττάρων. Η IL-23, μοιράζεται την p40 αλυσίδα με την IL-12. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με έλλειψη της IL-23, έδειξαν ότι η απουσία της καθιστούσε τα ποντίκια ανθεκτικά στην ανάπτυξη της ΠΑΕ (33). Τα Th17 κύτταρα χαρακτηρίζονται από την παραγωγή κυρίως των ακόλουθων κυτταροκινών IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21, IL-22 (34) καθώς και της χημειοκίνης CCL20 (35), και δημιουργούνται παρουσία της IL-23. Η IL-17 αποκαλείται «πρωτότυπη κυτταροκίνη» της οικογένειας των IL-17, η οποία δομικά είναι ομόλογη με το κυστεϊνικό σύμπλοκο των πρωτεϊνών και παρουσιάζει διακριτές προ-φλεγμονώδεις δράσεις (36). Στην IL-17 οικογένεια υπάρχουν τα ακόλουθα μέλη: IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, και IL-17F (34), τα οποία επάγουν διάφορες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εμφανίζουν έντονη προ-φλεγμονώδη δράση σε διάφορες άλλες ομάδες ανοσολογικών και μη κυττάρων. Συνδυαστικά με τη ΣΚΠ, έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς έχουν υψηλότερα επίπεδα IL-17 και IL-17F στον ορό τους, τα οποία σχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου. Η συμμετοχή των Th17 κυττάρων στην παθογένεια της ΠΑΕ αποδεικνύεται από μελέτες σε ποντίκια, όπου παρεμποδίζεται η IL-17 ή υπάρχει έλλειψη αυτής, με αποτέλεσμα τα ποντίκια να μην εμφανίζουν τη νόσο (37). Ο υποδοχέας IL-17RA εκφράζεται σε πολλά μη ανοσολογικά κύτταρα, όπως τα επιθηλιακά και οι ινοβλάστες. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έκφρασή του σε T κύτταρα, σχετίζεται με τη θετική ανατροφοδότηση του IL-17 σηματοδοτικού μονοπατιού, προωθώντας έτσι την επαγωγή και τη λειτουργία των Th17 κυττάρων (39).

## **6) Μηχανισμοί διαφοροποίησης και λειτουργίας Th17 κυττάρων**

Κύριος μεταγραφικός παράγοντας που συμμετέχει στη διαφοροποίηση των Th17 κύτταρων είναι ο retinoic acid receptor-related orphan receptor gt (ROR-gt) (40), του οποίου όμως η έλλειψη δεν καταργεί ολοκληρωτικά την έκφραση των κυτταροκινών στα Th17 κύτταρα. Συνδυαστικά με τον ROR- $\alpha$ , ο οποίος επάγεται από τον transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) και την IL-6, μέσω STAT-3-εξαρτώμενου μηχανισμού, ο ROR-gt προκαλεί εντονότερη διαφοροποίηση προς Th17 κύτταρα και ενισχύει τη λειτουργία τους (41). Ο TGF- $\beta$  σε συνδυασμό με την IL-6 είναι υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση αθών CD4 T κυττάρων σε Th17, μιας διαδικασίας ανατροφοδοτούμενης από την αυτοκρινή παραγωγή της IL-21 (42). Μελέτες που έχουν γίνει από ερευνητικές ομάδες σχετικά με τους παράγοντες διαφοροποίησης των Th17 κυττάρων, υποστηρίζουν ότι τα διαφοροποιημένα Th17 κύτταρα παρουσία IL-6, IL-23 και IL-1 $\beta$  ή TGF- $\beta$ 3, χαρακτηρίζονται από επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα T-bet και μειωμένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων AhR και c-Maf. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η παραγωγή των GM-CSF και IFN- $\gamma$  και μειώνεται η παραγωγή της IL-10, και τα κύτταρα αυτά θεωρούνται παθογενετικά (43-46). Όσον αφορά τη CCL20 που εκκρίνεται σαν απόκριση στην ύπαρξη παθογόνων, γνωρίζουμε ότι στρατολογεί τα Th17 κύτταρα, μέσω αλληλεπίδρασης με τον CCR6 και ακολούθως τα Th17 κύτταρα την παράγουν, ενισχύοντας περαιτέρω τις Th17 κυτταρικές αποκρίσεις (35). Για την προφλεγμονώδη δράση των Th17 κυττάρων καθώς και για την επιβιώσή τους, ευθύνεται κυρίως η κυτταροκίνη IL-23 (34). Έχει προταθεί ότι η δημιουργία των Th17 κυττάρων, περιλαμβάνει: i) τη διαφοροποίηση, ii) τον πολλαπλασιασμό και iii) τη σταθεροποίησή τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι απουσία του TGF- $\beta$ , συνδυασμός των IL-1 $\beta$ , IL-6, και IL-23 επάγει τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων και την παθογένεση της νόσου τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους. Η παραγωγή της IL-21 εμπλέκεται στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού των ήδη διαφοροποιημένων Th17 κυττάρων και η IL-23 ευθύνεται για τη σταθερότητά τους (45). Παρεμπόδιση του TGF- $\beta$  ή της σηματοδότησης της IL-23 καταστέλλει τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων και μειώνει την εξέλιξη της νόσου (47-48). Αναφορικά με τον υποδοχέα της IL-23, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός σε αυτόν, σχετίζεται με αυτοάνοσες ασθένειες, επαναφέροντας τον προβληματισμό σχετικά με το κατά πόσο ο IL-23R, έχει κάποια λειτουργία συμπληρωματική με την ενδυνάμωση της παθογένειας των Th17 κυττάρων. Μηχανιστικές μελέτες παρουσιάζουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-23 επάγει τον SGK-1, ο οποίος

επάγει τη διαφοροποίηση των παθογενετικών Th17 κυττάρων, μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης του Foxo-1 και της έκφρασης του IL-23R (49).



*adapted from Stadhouders et al. Journal of Autoimmunity, 2018*

### Σχήμα 6: Επισκόπηση διαφοροποίησης Th κυττάρων.

Απεικόνιση της ανάπτυξης διαφορετικών πληθυσμών T βοηθητικών κυττάρων (T helper -Th), συμπεριλαμβανομένων των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs), από τα ανώριμα (immature -imm.) CD4 $\beta$  T κύτταρα στο θύμο αδέν. Αθώα περιφερικά Th (Th0) κύτταρα, διαφοροποιούνται σε Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 και follicular Th (Tfh) κύτταρα, σαν απόκριση στην ύπαρξη παθογόνου ή στην έκθεση σε κάποιο αλλεργιογόνο. Περιφερικά Tregs (pTreg) και T ρυθμιστικού τύπου 1 (Tr1) κύτταρα, διαφοροποιούνται επίσης από τα Th0. Η πλαστικότητα των Th17 κυττάρων απεικονίζεται με κόκκινες γραμμές. Κατευθυντικά σήματα για διαφοροποίηση Th/Treg κυττάρων, παρουσιάζονται με έντονο μπλε, τα αντιπροσωπευτικά εκκριτικά σινιάλα από κάθε διαφοροποιημένο κυτταρικό πληθυσμό, απεικονίζονται με γκρι γραμμές. Τα επιφανειακά μόρια-κλειδιά σε κάθε πληθυσμό T κυττάρων απεικονίζονται με μαύρο χρώμα, οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες με πράσινο και οι βασικοί συν-παράγοντες με γαλάζιο.



Στη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων συμμετέχουν επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες IRF-4, BATF, STAT-3, RORc και c-Maf (50), μεταξύ των οποίων κάποιοι επάγονται μέχρι τις πρώτες 4 ώρες (IRF-4, BATF και STAT-3) και κάποιοι αργότερα, στις 4-20 ώρες (RORc). Κατά την πρώτη φάση της διαφοροποίησης των Th17 κυττάρων, αρχίζει να εκφράζεται ο Ahr και στις 20-72 ώρες παρατηρείται η αύξηση των χαρακτηριστικών Th17 κυτταροκινών. Όσον αφορά την IL-23, φαίνεται να επάγεται μετά τις πρώτες 48ώρες, ισχυροποιώντας τα δεδομένα που υποστηρίζουν τη σταθεροποιητική της δράση (39). Οι IRF-4 και BATF, μαζί με το p300, έχει αποδειχθεί ότι λείτουργούν νωρίτερα, προκαλώντας αλλαγές στη χρωματίνη, έτσι ώστε να μπορούν να προσδεθούν ευκολότερα οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες STAT-3, RORc και c-Maf, και να δημιουργηθεί ένα ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι οι πέντε ανωτέρω μεταγραφικοί παράγοντες, συνεντοπίζονται σε πολλά Th17 γονίδια, ενώ οι BATF και IRF-4 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Έχει δειχθεί ότι για τη γονιδιακή ρύθμιση των γονιδίων που ενεργοποιούνται από τον RORc-dependent loci είναι απαραίτητη η ύπαρξη όλων των μεταγραφικών παραγόντων. Γενικά, υπάρχει η πεποίθηση ότι το σύμπλοκο IRF-4/BATF βρίσκεται σε μη ενεργοποιημένα αθώα T κύτταρα, και η προσέλκυση των STAT-3 και RORc στο παραπάνω σύμπλοκο κατευθύνει τη διαφοροποίηση των CD4<sup>+</sup> κυττάρων προς Th17 (50).

Οι κυτταροκίνες επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Th17 κύτταρων. Αναφορικά με τον TGF-β υπάρχουν αντιφατικά δεδομένα, με πρόσφατες μελέτες να υποστηρίζουν ότι η παρουσία του καταστέλλει τις Th1/Th2 διαφοροποιήσεις, επιτρέποντας την Th17 διαφοροποίηση (51). Οι IL-6 και IL-1β, επάγουν την έκφραση των RORc, IRF-4, BATF, c-Maf, Ahr, HIF-1α και IL23r, που αποτελούν γονίδια χαρακτηριστικά των Th17 κυττάρων (45, 52–53). Η ενδογενής παραγωγή της IL-1β από τα Th17 κύτταρα μέσω του ινφλαμασώματος, είναι σημαντική για τη δημιουργία των Th17 κυττάρων, την επιβίωσή τους και τις δραστικές λειτουργίες τους (54). Όσον αφορά την IL-23, μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του STAT-3, σε συνδυασμό με τον Ahr, προσδένονται και τροποποιούν τον εκκινητή του γονιδίου *Aiolos* που είναι μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται επίσης στα Th17 κύτταρα (55). Η παρουσία της IL-23 ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα JunB, μέσω ενός STAT-3 εξαρτώμενου τρόπου, που προσδένεται στους υποκινητές των *Blimp-1* και *RORc*, με τη βοήθεια άλλων μεταγραφικών παραγόντων (BATF και IRF-4) και κατευθύνει τον παθογενετικό φαινότυπο των Th17 κυττάρων. Η σηματοδότηση της IL-23 αυξάνει επίσης τον TGF-β3, που έχει δειχθεί ότι επάγει παθογενετικά

Th17 κύτταρα, καταστέλλοντας την έκφραση των c-Maf, Ahf και IL-10, με παράλληλη αύξηση των GM-CSF και IFN- $\gamma$ . Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι η IL-23 ενεργοποιεί τους STAT-4 και T-bet, αυξάνοντας την παραγωγή της IFN- $\gamma$  από τα Th17 κύτταρα (43,56). Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας RBPJ σχηματίζει σύμπλοκο με τον RORc και ενεργοποιούν τον εκκινητή του *IL-2* στα Th17 κύτταρα (57). Ο μεταγραφικός παράγοντας Blimp-1, συνεντοπίζεται με τους STAT-3, RORc και p300, αυξάνοντας τις IL-23, IFN- $\gamma$  και GM-CSF στα Th17 κύτταρα.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί και η ύπαρξη διαφόρων ρυθμιστικών παραγόντων-μορίων που έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο c-Maf δρα σαν καταστολέας των Th17 κυττάρων, μέσω αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του BATF και αύξησης της IL-10 συνδυαστικά με τον Ahf (50). Επιπλέον, η παρουσία της φωσφατάσης DUSP στα Th17 κύτταρα μειώνει τη σηματοδότηση του STAT-3. Η ενδοριβονουκλεοτιδάση MCP1 αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-17, με τον κατακερματισμό του mRNA IL-6 της IL-6 (58-59). Ο FOXP1 καταστέλει μέσω παρεμπόδισης της IL-21 τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων και τροποποιεί το Th17 κυτταρικό προφίλ, μέσω αναστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του RORc (60-61). Ο RORc αλληλεπιδρά με τον IRF-8 και διευκολύνει την καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της IL-17. Τέλος, ο IRF-1 ρυθμίζει αρνητικά το Th17 κυτταρικό δίκτυο μέσω αλλαγών στη διαμόρφωση της χρωματίνης (62-63). Όπως γίνεται αντιληπτό, η ισορροπία μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων, όπως και των κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον, επηρεάζει καθοριστικά την επαγωγή ή την καταστολή του παθογενετικού προφίλ των Th17 κυττάρων.

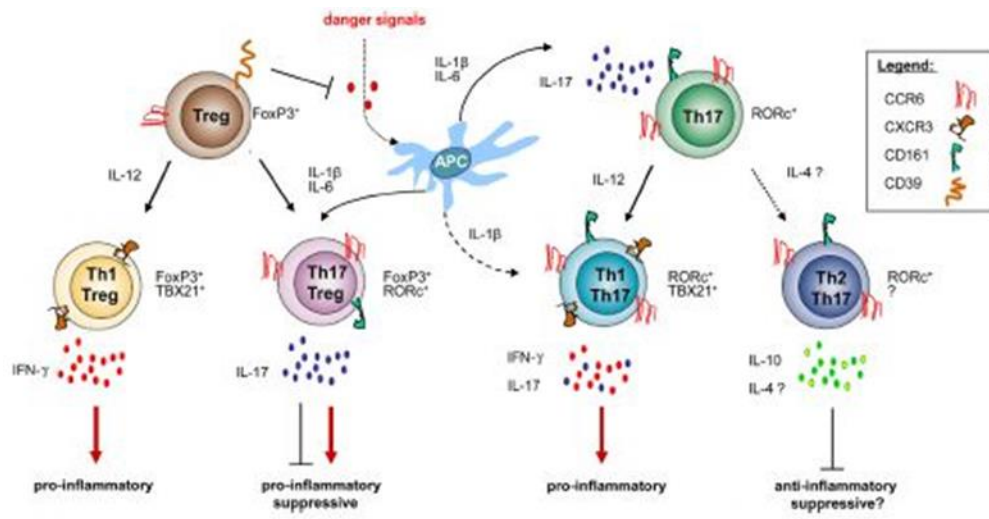
## **7) Ετερογένεια και πλαστικότητα των Th17 κυττάρων**

Τα Th17 κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, και μπορεί να κατηγοριοποιηθούν με βάση τους υποδοχείς χημειοκινών που εκφράζουν (trafficking receptors). Th17 κύτταρα εκφράζουν τόσο τους υποδοχείς CCR2, CXCR3, CCR5 και CXCR6 που σχετίζονται με τα Th1 κύτταρα, όσο και τον CCR4, που χαρακτηρίζει τα Th2 κύτταρα. Εκφράζουν επίσης τους CCR4, CCR5, CCR6, CXCR3 και CXCR6, όπως τα Tregs (64). Τα CCR6<sup>+</sup> Th17-κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 υπο-πληθυσμούς: i) τα Th17 (CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>), ii) τα CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>,

iii) τα Th17.1 (CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>) και τα iv) CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup> (65).

Οι διακριτοί αυτοί υποπληθυσμοί διαφέρουν στην έκκριση κυτταροκινών καθώς και στους μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση (66-67). Συγκεκριμένα τα CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> Th17 κύτταρα παράγουν υψηλά επίπεδα IL-17A. Τα CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> Th17.1 κύτταρα σε αντίθεση, παράγουν χαμηλότερα επίπεδα IL-17A και υψηλά επίπεδα IFN- $\gamma$ , εκφράζοντας παράλληλα το μεταγραφικό παράγοντα T-bet που σχετίζεται με τα Th1 κύτταρα (67-69). Ιδιαίτερης σημασίας είναι το ότι τα Th17/Th1 κύτταρα απαντώνται σε πολλές αυτοάνοσες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ΣΚΠ και η IBD τόσο στο αίμα των ασθενών όσο και στα σημεία της φλεγμονής. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν έντονη παθογενετική δράση, η οποία τεκμηριώνεται από την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται, την υψηλή παραγωγή GM-CSF, την αυξημένη έκφραση των T-BET, STAT-4, RUNX και τη μειωμένη έκφραση των IL-10 και AHR (67,70-71). Πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι τα παθογενετικά Th17 κύτταρα επάγουν την έκφραση των προ-φλεγμονωδών μοριών CXCL3, CCL4, CCL5, GM-CSF, IL-3, IL-22, Granzyme B, καθώς και των T-bet και STAT4 (43).

Όσον αφορά τα μη παθογενετικά Th17 κύτταρα, εμφανίζουν υψηλή έκφραση της IL-10 και των AHR, c-MAF καθώς και του ανταγωνιστή της IL-1 $\beta$ , του IL-1Ra (43). Πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπινα δείγματα αίματος αποκάλυψαν ότι τα IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> και IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> Th17 κύτταρα, έχουν διαφορετικά μεταγραφικά προφίλ, με τα IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17 να εμφανίζουν αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων (72). Επιπλέον RNA-Seq μελέτες στην ΠΑΕ αποκαλύπτουν νέες ομάδες γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, ανεξάρτητα από τους μεταγραφικούς παράγοντες και τις κυτταροκίνες-κλειδιά (50-51). Ενδεικτικά αναφέρουμε τον glycosphingolipid receptor Gpr65, του οποίου η γενετική τροποποίηση φαίνεται να σχετίζεται με τη ΣΚΠ (73), καθώς και τον CD5L, που δρα σα ρυθμιστής των Th17 κυττάρων (εκφράζεται κυρίως στα μη παθογενετικά), μέσω τροποποίησης του ενδοκυττάρου λιπιδώματος (lipidome).



*adapted from Markus Kleinewietfeld et al. Seminars in Immunology. 2013*

### **Σχήμα 7:** Πλαστικότητα Tregs και Th17 κυττάρων.

Απεικόνιση βασικών μονοπατιών πλαστικότητας των Tregs και Th17 κυττάρων στον άνθρωπο. Σήματα όπως το εξωκυττάριο ATP ή κάποιο μικροβιακό τμήμα μπορούν να προκαλέσουν την έκκριση κυτταροκινών (π.χ. IL-1) από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα FoxP3<sup>+</sup> Tregs μπορούν να εμποδίσουν αυτή τη διαδικασία μέσω της CD39 εκτονουκλεοτιδάσης που υδρολύει το ATP. Τα Tregs μπορούν να επαχθούν από την έκκριση της IL-12 και να μετατραπούν σε προ-φλεγμονώδη κύτταρα που παράγουν IFN, εκφράζουν TBX21 και CXCR3, και τα οποία χάνουν την κατασταλτική τους δράση ενώ συνεχίζουν να εκφράζουν FoxP3 (Th1 Treg). Παρουσία των IL-1 και IL-6, τα Tregs μπορούν να αποκτήσουν έναν Th17-like φαινότυπο. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν IL-17 και εκφράζουν RORc, υψηλά επίπεδα CCR6 και CD161 παρόλα αυτά μπορούν να διατηρούν την κατασταλτική τους δράση και να εκφράζουν FoxP3 (Th17 Treg). Έντονα παθογενετικά Th17 κύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν IFN-γ αυξάνοντας τους TBX21 και CXCR3 παρουσία IL-12 ή IL-1-β, όταν προέρχονται από το *C. albicans* (απεικονίζεται με διακεκομμένες γραμμές) αλλά διατηρούν την έκφραση των CCR6 και CD161 (Th1 Th17). Th17 κύτταρα μπορούν επίσης να τροποποιηθούν σε αντι-φλεγμονώδη Th17 κύτταρα που εκκρίνουν IL-4 ή IL-10 και εκφράζουν CD161+ CCR6+ παρουσία IL-4 ή όταν προέρχονται από *S. aureus*. Επιπρόσθετα, παρόμοιος φαινότυπος παρατηρείται όταν τα Th17 κύτταρα περνούν/redirected στο λεπτό (Th2 Th17).

Η διαφοροποίηση των αθών CD4<sup>+</sup> T κυττάρων σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς με διαφορετικό προφίλ κυτταροκινών θεωρείτο μέχρι πρόσφατα μία μη αναστρέψιμη διαδικασία. Τα τελευταία χρόνια όμως, με την ανακάλυψη των Tregs και των Th17 κυττάρων, νέες μελέτες υποστηρίζουν την αντίληψη ότι οι υποπληθυσμοί των Th κυττάρων έχουν τη δυνατότητα/ικανότητα να μετατρέπονται σε κάποιον άλλο υποπληθυσμό (reprogramming) *in vitro* και *in vivo*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα Th17 κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις αλλαγές του

μικροπεριβάλλοντος. Στο μικροπεριβάλλον υπάρχουν διάφορες κυτταροκίνες και έχει αποδειχθεί ότι συνδυαστικά με αυτές και τις συνθήκες που επικρατούν, επηρεάζεται η πλαστικότητα των κυττάρων. Επίσης η συν-διέγερση των T κυττάρων, τα δίκτυα των αλληλεπιδράσεων των μεταγραφικών παραγόντων και οι τροποποιήσεις της χρωματίνης φαίνεται να σχετίζονται τελικά με την ενεργοποίηση ή την καταστολή διαφόρων γονιδίων.

Αναλύσεις του μεθυλώματος (Methylome) έχουν αποκαλύψει ότι τα Th17 κύτταρα, προσομοιάζουν με τα αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα σε σχέση με τα Th1 κύτταρα, δεδομένου ότι έχουν περισσότερες απομεθυλιωμένες περιοχές, που τους δίνουν τη δυνατότητα να τροποποιούν γρήγορα το μεταγραφικό τους προφίλ, ανάλογα με το ερέθισμα που δέχονται από το περιβάλλον τους (74). *In vivo* μελέτες σε πειραματικά μοντέλα έδειξαν την ικανότητα των Th17 κυττάρων να μεταπίπτουν σε Th1-like ή κατασταλτικά Tr1-like κύτταρα, ανάλογα με την ανοσολογική φάση που κυριαρχεί (75-76). Άλλη μελέτη έδειξε ότι παρουσία της IL-12, οι STAT-4 και T-bet αυξάνονται στα Th17 κύτταρα και επάγουν επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν σε παραγωγή μιας Th1 κυτταροκίνης της IFN- $\gamma$  (77). Σχετικά με τη διαφοροποίηση των Th17 σε Tr1-like κύτταρα αποδείχθηκε ότι καθοριστικό ρόλο παίζουν η ενεργοποίηση του Ahr και ακολούθως η αύξηση της IL-10, καθώς και διάφορες αλλαγές στο μεταβολισμό των Th κυττάρων που οφείλονται στον Ahr (78). Με βάση όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η εύρεση παραγόντων καθώς και των μοριακών μηχανισμών που κατευθύνουν τη μετατροπή των παθογενετικών Th17 κυττάρων σε μη παθογενετικά είναι υψίστης σημασίας που μπορεί να οδηγήσουν σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη ΣΚΠ.

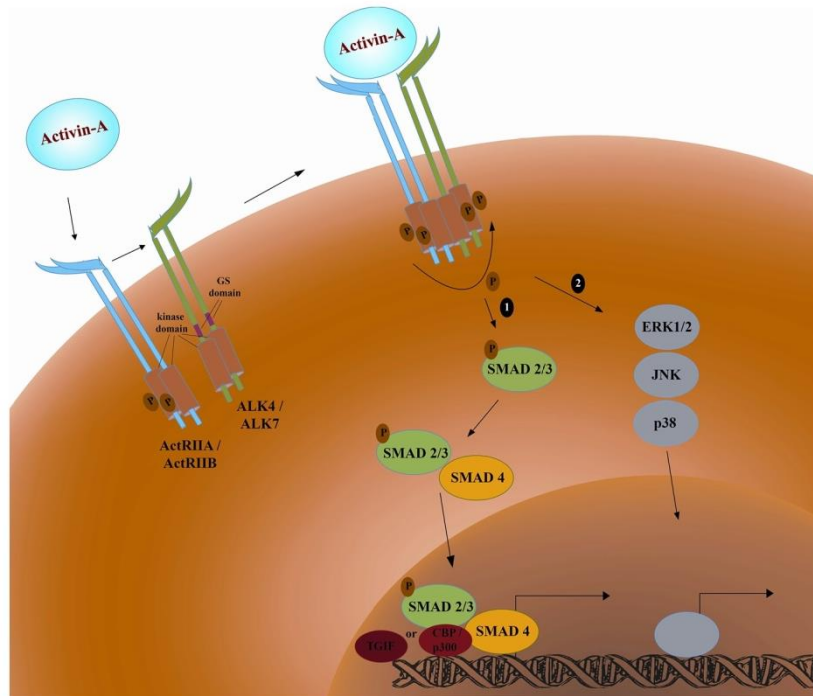
## **8) Ακτιβίνη-A και σηματοδοτικό μονοπάτι**

Οι ακτιβίνες είναι κυτταροκίνες που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια του TGF- $\beta$ , η οποία περιλαμβάνει 45 μέλη και διακρίνεται στις ακόλουθες υποκατηγορίες: ακτιβινών, των inhibins, της μυοστατίνης (myostatin), του παράγοντα διαφοροποίησης και ανάπτυξης 11 (GDF 11), των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMPs). Ως προς τη δομή τους, είναι ομοδιμερείς ή ετεροδιμερείς κυτταροκίνες οι οποίες προκύπτουν από το συνδυασμό  $\beta$ A ή/και  $\beta$ B υπομονάδων. Είναι σήμερα γνωστές τρεις ενεργές ισομορφές των ακτιβινών. Συγκεκριμένα, η ακτιβίνη-A που αποτελεί ομοδιμερές δύο  $\beta$ A υπομονάδων ( $\beta$ A $\beta$ A) μεγέθους 25 kDa (είναι η πιο καλά μελετημένη

ακτιβίνη), η ακτιβίνη-B που αποτελεί ομοδιμερές δύο βB υπομονάδων (βBβB) και τέλος η ακτιβίνη-AB που είναι ετεροδιμερές μίας βA και μίας βB υπομονάδας (βAβB). Επίσης, έχουν καταγραφεί οι υπομονάδες βC και βE (στα θηλαστικά) και η υπομονάδα βD (στον *Xenopus laevis*) (79). Η ένωση των υπομονάδων γίνεται με την ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών (80). Βασικό χαρακτηριστικό των β υπομονάδων είναι η ύπαρξη ενός συμπλόκου κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο. Το σύμπλοκο αποτελείται από εννέα συντηρημένες κυστεΐνες, καθοριστικές για τη σταθεροποίηση και το διμερισμό των προσδετών (81). Αναλυτικότερα, για το διμερισμό είναι απαραίτητη η 6<sup>η</sup> κυστεΐνη, ενώ οι άλλες οκτώ κυστεΐνες σχηματίζουν μια ενδομοριακή δισουλφιδική αλυσίδα που διαμορφώνει την τριτοταγή δομή των ακτιβινών. Αναφορικά με την έκφραση, γνωρίζουμε ότι οι υπομονάδες βA/ βB εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς στα θηλαστικά, με έντονη έκφραση στο αναπαραγωγικό σύστημα, ενώ οι υπομονάδες βC/βE εκφράζονται κυρίως στο ήπαρ (82). Αναφορικά με την ακτιβίνη-A, είναι γνωστό ότι είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των σπονδυλωτών, εμφανίζοντας ομοιότητα 95% μεταξύ των ειδών. Η ακτιβίνη-A ρυθμίζει θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες, όπως η αιμοποίηση, η εμβρυική ανάπτυξη, η διατήρηση των αρχέγονων κυττάρων, η επιδιόρθωση των ιστών και η ίνωση (83-84). Έχει αποδειχθεί ότι η έλλειψη του γονιδίου για την βA υπομονάδα της ακτιβίνης A, οδηγεί σε θάνατο εντός 24 ωρών μετά τη γέννα και σε τροποποιήσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη του κρανίου και του προσώπου. Επίσης, έλλειψη της υπομονάδας βB οδηγεί σε μη φυσιολογική ανάπτυξη και μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα (85).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A, περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή της με δύο τύπους υποδοχέων: (α) τύπου I (50-55kDa) και (β) τύπου II (70-75kDa), που σχετίζονται δομικά. Πιο συγκεκριμένα, οι υποδοχείς αυτοί φέρουν μία εξωκυτταρική περιοχή όπου προσδέεται η ακτιβίνη-A, μία μεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυτταρική περιοχή με ενεργότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Οι τύπου I υποδοχείς δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν από μόνοι τους με τις ακτιβίνες δεδομένου ότι χρειάζονται και την παρουσία των τύπου II υποδοχέων για να ολοκληρωθεί η πρόσδεση με τον προσδέτη. Παρόλα αυτά, η παρουσία του τύπου I υποδοχέα είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση οπότε συμπεραίνουμε ότι η λειτουργική μορφή των υποδοχέων των ακτιβινών είναι ένα σύμπλοκο και των δύο τύπων υποδοχέων μαζί με την ακτιβίνη. Οι υποδοχείς τύπου I περιλαμβάνουν τον Activin receptor type 1A (or Activin receptor Like Kinase 2, ALK2), τον Activin receptor type 1B (or ALK4) και τον Activin receptor type 1C (or ALK7). Η ακτιβίνη-A προσδέεται κυρίως με τον ALK4, ενώ εμφανίζει χαμηλότερη συγγένεια για τους

ALK2 και ALK7. Οι τύπου II υποδοχείς είναι οι Activin receptor type IIA (ActRIIA) και Activin receptor type IIB (ActRIIB) και χαρακτηρίζονται από συνεχώς- ενεργοποιημένη δραστηριότητα κινασών σερίνης/θρεονίνης (86). Αξίζει να σημειωθεί ότι το Acvr2b γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα ActRIIB παράγει τέσσερα εναλλακτικά ματισμένα μετάγραφα που παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια για την ακτιβίνη-A. Αναλύσεις κρυσταλλογραφίας έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη-A παρουσιάζει διαφορετικό μοτίβο πρόσδεσης με τον ActRIIB υποδοχέα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλη της υπερ-οικογένειας. Μόλις η ακτιβίνη-A προσδεθεί στους τύπου II υποδοχείς της, οι δύο τύπου I υποδοχείς φωσφορυλιώνονται από τους τύπου II υποδοχείς, και ενεργοποιείται η δράση τους ως κινάσες. Στη συνέχεια, οι τύπου I υποδοχείς φωσφορυλιώνουν τις ενδοκυττάρειες (mothers against decapentaplegic homolog) SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο, που φέρει την ακολουθία SSXS οι οποίες στη συνέχεια σχηματίζουν σύμπλοκο με το SMAD4, μετακινούνται στον πυρήνα και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση (87). Οι SMAD6 και SMAD7 είναι οι κύριες ανασταλτικές SMAD (I-SMAD) πρωτεΐνες που εμποδίζουν την πρόσδεση του SMAD4 στο σύμπλοκο SMAD2/3 και διακόπτουν τη μεταγραφική του δράση (88,87) (σχήμα 8). Η ακτιβίνη-A μπορεί να ενεργοποιήσει και ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, ανεξάρτητα από το τυπικό μονοπάτι που προαναφέρθηκε. Τα μονοπάτια αυτά περιλαμβάνουν το p38 (mitogen activated protein kinase /MAPK), extracellular signal-regulated κινάσες 1/2 (ERK1/2) και c-Jun N-terminal κινάσες (JNKs), που επηρεάζουν την κυτταρική μετανάστευση και τη διαφοροποίηση (89,88). Επιπλέον, η ακτιβίνη-A μπορεί να ενεργοποιήσει το Wnt μεσολαβούμενο μονοπάτι (82). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες SMAD φέρουν ένα linker domain που αποτελείται από ρυθμιστικές περιοχές, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και περιοχές για τις ERK και τις ασβεστο-ρυθμιζόμενες κινάσες (87). Έχειδειχθεί, ότι η φωσφορυλίωση σε αυτή την περιοχή, παρεμποδίζει τη μετακίνηση των SMAD στον πυρήνα καθώς και τη μεταγραφική δραστηριότητα, υποδεικνύοντας μια σύνθετη ρύθμιση της σηματοδότησης της ακτιβίνης-A, που εξαρτάται από τη χωροχρονική στιγμή και τον τύπο των εμπλεκόμενων κυττάρων (87).



*adapted from Tousa et al., Clinical Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Drugs, 2014*

**Σχήμα 8:** Η ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης-A. Η σηματοδότηση της ακτιβίνης-A μεσολαβείται από ένα ετερο-τετραμερές μεμβρανικό σύμπλοκο. Η ακτιβίνη-A προσδένεται στον σταθερά ενεργό ActRII (ActRIIA ή ActRIIB), που στη συνέχεια προσελκύει και φωσφορυλιώνει τον ActRI (ALK4, ALK7 or ALK2). Με βάση το σηματοδοτικό μονοπάτι, ο ενεργοποιημένος ActRI φωσφορυλιώνει τους κύριους ενδοκυττάριους διαβιβαστές της ακτιβίνης-A, Smad2/3. Οι pSmad2/3 σχηματίζουν σύμπλοκο με τον Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων –στόχων, μαζί με διάφορους μεταγραφικούς συν-παράγοντες (όπως είναι CBP/p300 ή transforming growth interacting factor -TGIF) (1). Στο ανεξάρτητο μονοπάτι σηματοδότησης από το smad, ο ActRI ενεργοποιεί τις ERK, p38 ή JNK κινάσες που ακολούθως ρυθμίζουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων (2).

Κύριος αναστολέας της ακτιβίνης-A είναι η φολλιστατίνη (follistatin /FS), δεδομένου ότι προσδένεται μαζί της, με υψηλή συγγένεια και παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τους τύπου II υποδοχείς της (90). Η φολλιστατίνη δεν είναι εξειδικευμένος αναστολέας της ακτιβίνης-A γιατί έχει αποδειχθεί ότι αδρανοποιεί τη δράση όλων των ακτιβινών και επίσης των BMPs και της μυστατίνης. Οι inhibins αντιπροσωπεύουν ετεροδιμερείς πρωτεΐνες, που αποτελούνται από την υπομονάδα inhibin α και την ακτιβίνη βA (inhibin A, αβA) ή την υπομονάδα βB (inhibin B, αβB). Ανταγωνίζονται με την ακτιβίνη-A για την πρόσδεση στους τύπου II υποδοχείς, αλλά



μπορεί να προσδεθούν και απευθείας με τις ακτιβίνες (90). Η Betaglycan είναι μια άλλη πρωτεΐνη που προσδέεται στις inhibins και ενισχύει τη συγγενειά τους για τον υποδοχέα ActRII, με αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ ακτιβινών και τύπου II υποδοχέων (90). Ο ψευδο-υποδοχέας BMP και ο activin membrane-bound inhibitor homolog (BAMBI) παρεμποδίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A, αλληλεπιδρώντας με τους τύπου I υποδοχείς και αποκλείοντας το σχηματισμό του συμπλέγματος σηματοδότησης υποδοχέα. Επιπρόσθετα, η υπερ-έκφραση του Cripto, του συν-υποδοχέα για την πρωτεΐνη nodal, αναστέλλει τη σηματοδότηση της ακτιβίνης-A, ενώ ενισχύει τη σηματοδότηση της nodal, μέσω πρόσδεσης της nodal στους υποδοχείς της ακτιβίνης-A (90). Όπως έχει προαναφερθεί, οι λειτουργίες της ακτιβίνης-A ρυθμίζονται και σε ενδοκυτταρικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, οι ανασταλτικές/inhibitory I-SMADs (Smad6 & Smad7) προσδέονται στους τύπου I υποδοχείς και περιορίζουν τη συγκέντρωση και τη φωσφορυλίωση των receptor-regulated SMADs (R-SMADs). Οι I-SMADs επίσης προωθούν την πρόσδεση των SMAD ουμπικιτινιομένη- ρυθμιστικών παραγόντων 1 και 2 στους υποδοχείς της ακτιβίνης-A, επάγοντας την ουμπικιτινιομένη-εξαρτώμενη αποδόμησή τους (91).

## **9) Ο ρόλος της ακτιβίνης-A στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων**

Πληθώρα μελετών έχει ασχοληθεί με την έκφραση και το ρόλο της ακτιβίνης-A, στους διάφορους τύπους κυττάρων τόσο στο ανοσοποιητικό όσο και στο νευρικό σύστημα. Η πλήρης κατανόησή του τρόπου δράσης της, συνδυαστικά με τα σηματοδοτικά μονοπάτια, θα αποκαλύψει πολύτιμη πληροφορία σχετικά με την παθογένεση και κατ'επέκταση τους τρόπους θεραπείας πολλών ασθενειών που σχετίζονται με τους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Συγκεκριμένα, θα αναφέρουμε δεδομένα σχετικά με ανοσολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς και τη ρύθμιση των λειτουργιών τους μέσω της ακτιβίνης-A.

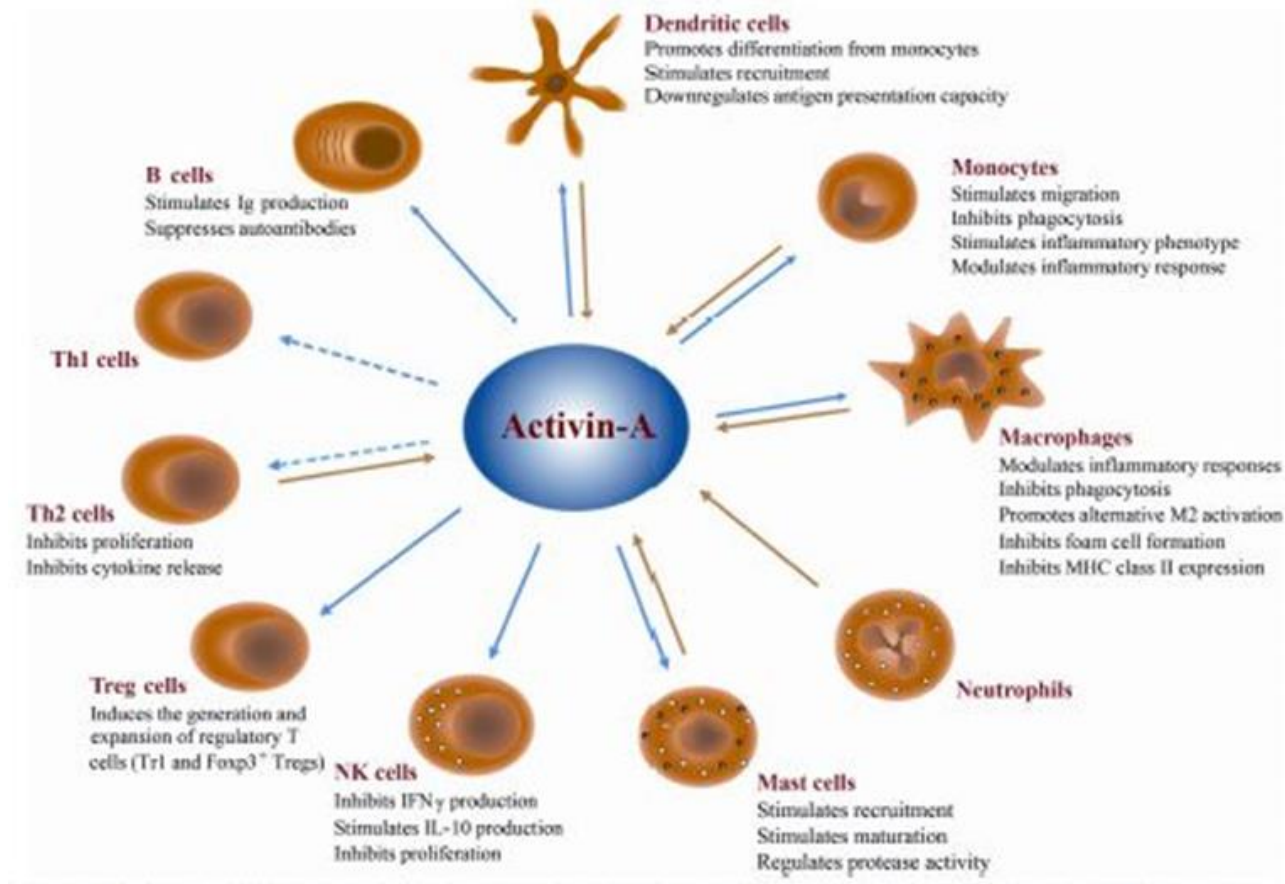
- **Μακροφάγα:**

Η ακτιβίνη-A επάγεται σε μυικά περιτοναϊκά μακροφάγα και στην κυτταρική σειρά RAW264.7, μετά από πρόσδεση του Pam3Cys, λιποσακχαρίτη (lipopolysaccharide/LPS) και του CpG στους Toll-Like υποδοχείς (TLR)2, TLR4 και TLR9, αντίστοιχα, με το LPS να προκαλεί την εντονότερη επαγωγή (92-93). Επιπρόσθετα, τα LPS –ενεργοποιημένα μακροφάγα, αυξάνουν τα mRNA επίπεδα των Acvr2a και SMAD2/3 (94). Η καλλιέργεια των RAW264.7 κυττάρων με ακτιβίνη-A αυξάνει τη φαγοκυτταρική και πινοκυτταρική τους ικανότητα, αυξάνοντας και τα επίπεδα mRNA των *iNOS* και *IL-1β* και ενισχύοντας την παραγωγή των IL1β, IL-6 και NO στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών (92,95). Η παρουσία της ακτιβίνης-A σε μη ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα μετατρέπει σε προ-φλεγμονώδη M1-like φαινότυπο. Αντίθετες μελέτες, καταδεικνύουν τον κατασταλτικό ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης-A, σε αυτά τα κύτταρα. Πράγματι, έχει δείχθει ότι η ακτιβίνη-A επάγει την έκφραση της M2-σχετιζόμενης αργινάσης-1 στα RAW264.7 κύτταρα, όταν χορηγείται μόνη της ή σε συνδυασμό με την IFN-γ (96). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η ακτιβίνη-A δεν επηρεάζει την έκφραση των μορίων MHC τάξης I και II σε μυικά περιτοναϊκά μακροφάγα, σε αντίθεση με τα RAW264.7 κύτταρα, όπου αυξάνει την έκφραση του MHC II, υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη-A έχει διαφορετική δράση στα πρωτογενή κύτταρα από ότι στις κυτταρικές σειρές. Παρόλα αυτά, και στις δύο περιπτώσεις επάγεται η ενεργοποίηση των μακροφάγων (95,97). Η χορήγηση της ακτιβίνης-A σε πρωτογενή μυικά μακροφάγα, ήδη ενεργοποιημένα με LPS, μειώνει τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα, την έκκριση NO, την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και την έκφραση του MHC II με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (92,98-100). *In vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση της ακτιβίνης-A σε ποντίκια, μετά από πρόκληση με LPS, οδηγεί σε μείωση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των μακροφάγων (100). Η ακτιβίνη-A επίσης ρυθμίζει τη λειτουργία των LPS–ενεργοποιημένων μακροφάγων μέσω καταστολής της έκφρασης των TLR4 και CD14 (92,94,100). Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν τις αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της ακτιβίνης-A στα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπινα μακροφάγα, αποδείχθηκε ότι η έκφραση της ακτιβίνης-A αυξανόταν σε granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/GM–CSF–καλλιιεργημένα M1-polarized μακροφάγα και η έκφρασή της ήταν υψηλότερη, συγκριτικά με τα M–CSF–καλλιιεργημένα M2 polarized κύτταρα, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (101-102). Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα γλυκοκορτικοστεροειδή και τα trans-ρετινοϊκά οξέα περιόριζαν την GM–CSF–μεσολαβούμενη

επαγωγή της ακτιβίνης-A στα ανθρώπινα μονοκύτταρα (102). Αντίθετα, ενεργοποίηση των μονοκυττάρων με LPS, IFN- $\gamma$  και GM-CSF ενίσχυε την παραγωγή της ακτιβίνης-A (103). Επίσης, τα T δραστικά κύτταρα επάγουν την παραγωγή της ακτιβίνης-A στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, γεγονός που εξαρτάται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις των CD40/CD40L μορίων και την έκκριση των IFN- $\gamma$  και GM-CSF (103). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι η χρήση ενός παρεμποδιστικού αντισώματος για την ακτιβίνη-A, καθώς και χημικοί αναστολείς των ALK4 και ALK7, έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A παρεμποδίζει την έκφραση των M2-τύπου γονιδίων, όπως το C-maf πρωτο-ογκογονίδιο (MAF), Insulin-like growth factor 1 (IGF1), plasminogen activator inhibitor 2 (SERPINB2) και coagulation factor XIII A chain (F13A1) και καταστέλλει την έκφραση της IL-10 στα ανθρώπινα μακροφάγα, παρουσία GM-CSF (101). Αφού ο GM-CSF αυξάνει την ακτιβίνη-A, γίνεται κατανοητό ότι τα μακροφάγα που έχουν εκτεθεί σε GM-CSF, αποκτούν M1 κυτταρικό φαινότυπο μέσω επαγωγής της ακτιβίνης-A, η οποία καταστέλλει την M2 διαφοροποίηση. Πολύ σημαντικό είναι ότι η έκφραση της ακτιβίνης-A και η φωσφορυλίωση των SMAD2/3 αυξάνεται σε ανθρώπινα μακροφάγα που δημιουργούνται από CD16<sup>+</sup> μονοκύτταρα και ενεργοποιούνται με M-CSF (M16), συγκρινόμενα με αυτά που προέρχονται από CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> μονοκύτταρα, υπό συνθήκες διαφοροποίησης (M14) (104). Αυτά τα M16 τύπου μακροφάγα, ομαδοποιούνται με βάση το μεταγραφικό τους προφίλ και το φαινότυπό τους με τα προ-φλεγμονώδη GM-CSF-διαφοροποιημένα M1 τύπου κύτταρα. Η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης-A αντιστρέφει μερικώς αυτή τη διαφοροποίηση (104). Ως εκ τούτου, η ακτιβίνη-A φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκτηση GM-CSF-κατευθυνόμενου M1 τύπου χαρακτηριστικών από τα CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> μονοκύτταρα ακόμη και παρουσία του μη φλεγμονώδους M-CSF (104). Άλλη ερευνητική ομάδα, απέδειξε ότι ο M-CSF δεν επηρεάζει την παραγωγή της ακτιβίνης-A από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα, χωρίς όμως να διαχωρίζονται οι μονοκυτταρικοί υποπληθυσμοί στη μελέτη. Κατά συνέπεια δεν καθορίστηκαν τα αποτελέσματα του M-CSF στα CD16<sup>+</sup> κύτταρα (103). Άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι σε LPS-ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, η ακτιβίνη-A περιορίζει την έκφραση της IL-1 $\beta$ , και ταυτόχρονα προκαλεί αύξηση του ανταγωνιστή της IL-1 $\beta$ , IL-1RA (105). Τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μόνο όταν η ακτιβίνη-A χορηγήθηκε παρουσία LPS. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν στα μυικά μακροφάγα, η ακτιβίνη-A φαίνεται να παρουσιάζει προ – ή αντι- φλεγμονώδεις δράσεις, ανάλογα με το επίπεδο της κυτταρικής ενεργοποίησης και τον τύπο της διέγερσης και στα ανθρώπινα μακροφάγα.

- **B Κύτταρα:**

Έχει αποδειχθεί ότι μυικά B κύτταρα μετά από *in vitro* διέγερση με LPS παράγουν υψηλά επίπεδα ακτιβίνης-A. Επιπλέον, B κύτταρα που προέρχονται από σπλήνες ανοσοποιημένων ποντικών με CFA/οβαλβουμίνη (Ovalbumin/OVA) εκφράζουν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A σε επίπεδο mRNA (106). Στο σημείο, αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A, ενεργοποιείται στα B κύτταρα, όπως αποδεικνύεται από την έκφραση και των δύο τύπων υποδοχέων I και II. Παρόλα αυτά, μετά την *in vitro* διέγερση με LPS, οι υποδοχείς της ακτιβίνης-A μειώνονται, παρατήρηση η οποία επιβεβαιώνεται και σε μυικά B κύτταρα μετά από ανοσοποίηση *in vivo* με CFA/OVA, υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη-A δρα σε μη ενεργοποιημένα B κύτταρα (106). Η ακτιβίνη-A δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό ή την παραγωγή των IgG ανοσοσφαιρινών, μετά από *in vitro* ενεργοποίηση των B κυττάρων με LPS ενώ αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την IgG παραγωγή από αθώα B - κύτταρα (106-107). *In vitro* καλλιέργεια μυικών LPS- διηγεμένων B κυττάρων με ακτιβίνη-A οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή IgA, ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση του TGF-β1 (107). Σύμφωνα με τα παραπάνω, έχει δειχθεί ότι η ακτιβίνη-A αυξάνει την IgA έκκριση και από τα κύτταρα των μεσεντερικών λεμφαδένων *ex vivo*, υπογραμμίζοντας το ρόλο της στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου (107). Η ακτιβίνη-A παρεμποδίζει τον (phytohemagglutinin) PHA-επαγόμενο πολλαπλασιασμό των B κυττάρων που προέρχονται από υγιή άτομα και από ασθενείς με πνευμονική κυψελιδική πρωτεϊνώση-ΠΚΠ (pulmonary alveolar proteinosis/PAP) και περιορίζει την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων έναντι του GM-CSF, κύριου παθογενετικού μηχανισμού της ΠΚΠ (108).



*adapted from Tousa et al. Clinical Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Drugs. 2014*

**Σχήμα 9:** Οι δράσεις της ακτιβίνης-A στις ανοσολογικές αποκρίσεις.

Η ακτιβίνη-A παράγεται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα Th2 λεμφοκύτταρα (κίτρινες γραμμές). Απεικόνιση των δράσεων της ακτιβίνης-A σε κάθε ξεχωριστό ανοσολογικό κυτταρικό τύπο (μπλε γραμμές). Ο ρόλος της ακτιβίνης-A στις Th1 και Th2 κυτταρικές αποκρίσεις παραμένει να αποσαφηνιστεί (διακεκομμένες γραμμές).

**- T Κύτταρα:**

Η ακτιβίνη-A φαίνεται ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη του θύμου αδένου, δεδομένου ότι η ίδια και τα σηματοδοτικά της μονοπάτια εκφράζονται από εμβρυικά και ενήλικα στρωματικά κύτταρα του θύμου καθώς και από θυμοκύτταρα (109-110). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A περιορίζει τον PHA- επαγόμενο πολλαπλασιασμό των ενήλικων θυμοκυττάρων στους αρουραίους, όπως και στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα του περιφερικού αίματος (111). Στον άνθρωπο, η ακτιβίνη-A καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των πολυκλωνικά ενεργοποιημένων CD4<sup>+</sup> T

κυττάρων του περιφερικού αίματος (112). Η ακτιβίνη-A παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των T follicular helper cell (TFH). Μετά από highthroughput screen μέσω ανθρώπινης εξωκυττάριας πρωτεομικής βιβλιοθήκης, η ακτιβίνη-A αναδείχθηκε ως ο πιο πιθανός ενεργοποιητής των μορίων CXCR5 και PD-1 που χαρακτηρίζουν τα TFH κύτταρα (113). Η ακτιβίνη-A επίσης συνεργάζεται με την IL-12, διαμορφώνοντας το ανθρώπινο TFH γονιδιακό πρόγραμμα. Τα SMAD2/3 δείχθηκε επιπλέον ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A, στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης των TFH κυττάρων (113). Άλλες μελέτες, έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη-A, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης TGF-β *in vitro* οδηγεί σε δημιουργία Th9 κυττάρων, ενώ *in vivo* παρεμπόδιση της σηματοδότησης της ακτιβίνης-A και του TGF-β1 περιορίζει την Th9 διαφοροποίηση και τις δραστικές τους αποκρίσεις (114). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η ακτιβίνη-A ενισχύει την TGF-β1-μεσολαβούμενη διαφοροποίηση των Tregs από μυικά CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T κύτταρα *in vitro* και προωθεί τη μετατροπή τους σε Foxp3<sup>+</sup> Treg κύτταρα *in vivo* (115). Μια πρόσφατη μελέτη επίσης έδειξε ότι η *in vitro* ενεργοποίηση αθών CD4<sup>+</sup> T κυττάρων με ακτιβίνη-A, ακόμη και απουσία του TGF-β, καταλήγει σε δημιουργία Foxp3<sup>+</sup> Treg κυττάρων, αν και ο συνδυασμός της ακτιβίνης-A με χαμηλές συγκεντρώσεις TGF-β παρουσίαζε συνεργιστικά αποτελέσματα στην επαγωγή των Treg κυττάρων. Η επαγόμενη από την ακτιβίνη-A, αύξηση του Foxp3, εξαρτιόταν από Yes-Associated Protein (YAP)-μεσολαβούμενη, έκφραση του ALK7 στα T κύτταρα. Εκτός από τη δράση της ακτιβίνης-A στη δημιουργία των Treg κυττάρων, η σηματοδότηση της μέσω ALK7 ενίσχυσε την κατασταλτική δράση των Treg κυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (116).

#### - **Κύτταρα «φυσικοί φονείς» / (natural killer NK)**

Τα κύτταρα αυτά έχει δειχθεί ότι εκφράζουν και τους δύο τύπους υποδοχέων της ακτιβίνης-A. Σε *in vitro* μελέτες φαίνεται ότι η ακτιβίνη-A παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό, την έκφραση των CD25 και T-bet, καθώς και την έκκριση των IFN-γ, CCL3, CCL4, CXCL8 και CXCL10 από τα ανθρώπινα NK κύτταρα (117). Τα μυικά NK κύτταρα ενεργοποιούνται από την ακτιβίνη-A δεδομένου ότι οι υποδοχείς activin type IIA και IIB και SMAD2/3 εκφράζονται στα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η παραγωγή της ακτιβίνης-A στα NK κύτταρα ποντικών εξαρτάται από την IL-2, και μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι η ακτιβίνη-A ενισχύει τη σύνθεση της IL-2 από τα NK κύτταρα. Επίσης, η ακτιβίνη-A καταστέλλει την ικανότητα των NK κυττάρων να

καταστρέφουν τα κύτταρα-στόχους τους (118). Πρόσφατες μελέτες ανακάλυψαν ότι η ακτιβίνη-A δρώντας μέσω του κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού, παρεμπόδιζε τη μεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα γλυκόλυση. Επίσης, η ακτιβίνη-A παρεμπόδιζε μεταβολικά μονοπάτια σχετικά με την οξειδωτική φωσφορύλιωση και την NK μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα, επάγοντας παράλληλα ιστοπροστατευτικά χαρακτηριστικά στα NK κύτταρα (119).

- **Ουδετερόφιλα:**

Τόσο τα ανθρώπινα όσο και τα μυικά ουδετερόφιλα παράγουν ακτιβίνη-A, της οποίας η έκκριση ενεργοποιείται άμεσα από τον TNF- $\alpha$  (120-122). Περιτοναϊκά και ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος εκφράζουν στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης-A, και η ενεργοποίησή τους με LPS αυξάνει την έκκριση της. *In vitro* ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων με ακτιβίνη-A ενισχύει την παραγωγή αυτοδραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species) την έκκριση IL-6 και τη φαγοκυττάρωση χωρίς όμως να επηρεάζει τη χημειοταξία τους. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι *in vivo* παρεμπόδιση του SMAD3 περιορίζει το ρόλο της ακτιβίνης-A στην έκκριση της IL-6 (121).

- **Κύτταρα μικρογλοίας:**

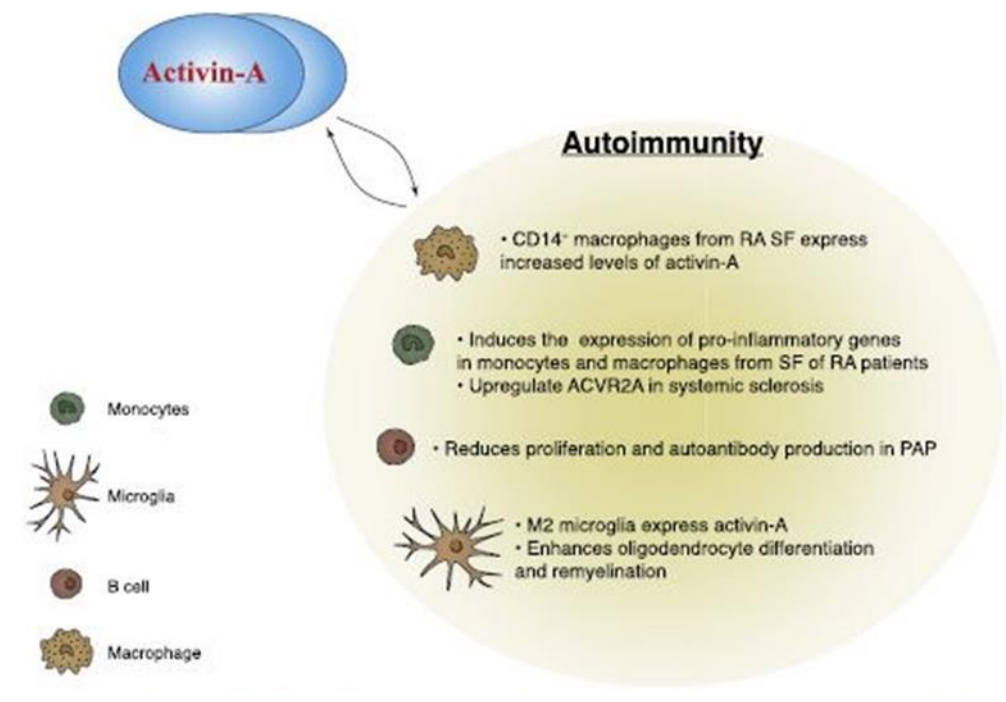
Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και μετά από ενεργοποίηση με LPS παράγουν ακτιβίνη-A (124-125). *In vitro* πειράματα αποκάλυψαν ότι η ακτιβίνη-A έχει αντιφλεγμονώδη δράση σε πρωτογενή μικρογλοιακά κύτταρα ποντικών, αρουραίων και στην κυτταρική σειρά MG6 (125-126). Υποστηρικτική *in vitro* μελέτη αποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση με ακτιβίνη-A, συνδυαστικά με την παρουσία IL-34 και χοληστερόλης, αυξάνει την επιβίωση των κυττάρων της μικρογλοίας (127). Αναφορικά με την LPS ή CPG ενεργοποίηση μυικών μικρογλοιακών κυττάρων, γνωρίζουμε ότι η ακτιβίνη-A, ακόμη και όταν προηγείται αυτής, δεν τροποποιεί τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα ή την έκκριση των TNF- $\alpha$ , IL-6 και CXCL1 (128). Επίσης, η χορήγηση της ακτιβίνης-A σε υψηλές δόσεις (13  $\mu\text{g/ml}$ ), πριν την ενεργοποίηση με TLR2 ή TLR4, μειώνει την παραγωγή του TNF- $\alpha$  (128). Σε άλλες μελέτες,

φαίνεται ότι καλλιέργεια μυικών MG6 μικρογλοιακών κυττάρων παρουσία ακτιβίνης-A, με ακόλουθη LPS ενεργοποίηση, μειώνει την έκφραση των IL-6, IL-18, iNOS, αλλά όχι της IL-1β (129). Επιπρόσθετα, τα M2 κύτταρα της μικρογλοίας παράγουν ακτιβίνη-A, που είναι σημαντική για τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων και την ενεργοποίηση της μυελίνωσης, υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη-A εμπλέκεται στην ομοιόσταση του ΚΝΣ (130). Η *in vivo* χορήγηση της ακτιβίνης-A, μετά την ενεργοποίηση με LPS, προκαλεί αλλαγές στην TLR4 σηματοδότηση στα κύτταρα της μικρογλοίας (125-126). Είναι αξιοσημείωτο ότι η παρουσία της σε καλλιέργειες μυικών μικρογλοιακών κυττάρων αυξάνει τη φαγοκυτταρική ικανότητα έναντι των *E. coli* K1 στελεχών, υποδεικνύοντας ενισχυμένες αντι-μικροβιακές δράσεις της ακτιβίνης-A (128). Όλα τα παραπάνω δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η ακτιβίνη-A προσδίδει έναν αντι-φλεγμονώδη φαινότυπο στα μικρογλοιακά κύτταρα, που είναι προστατευτικός έναντι των διάφορων παθογόνων.



## 10) Ο ρόλος της ακτιβίνης-A στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών

Η ακτιβίνη-A εμπλέκεται στην ανοσοπαθολογία διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών. Στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-A είναι αυξημένα στον ορό των ασθενών (131-132). Επιπρόσθετα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, η ακτιβίνη-A είναι αυξημένη στο αρθρικό υγρό και στον ορό τους, και αποδεικνύεται θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της και κλινικών παραμέτρων της ασθένειας, που περιλαμβάνουν το δείκτη Ritchie, καθίζηση ερυθροκυττάρων και τη C-διαδραστική πρωτεΐνη (CRP) (131,133). Αξίζει να σημειωθεί ότι CD14<sup>+</sup> μακροφάγα που απομονώθηκαν από αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα είχαν αυξημένα επίπεδα mRNA ακτιβίνης-A, συγκριτικά με τους υγιείς-μάρτυρες. Επιπλέον, αναλύσεις σε μεταγραφικό επίπεδο, αποκάλυψαν ομοιότητα των μακροφάγων του αρθρικού υγρού με τα GM-CSF-επαγόμενα M1 προ-φλεγμονώδη κύτταρα (101,134). Η προ-φλεγμονώδης γονιδιακή έκφραση που επάγεται σε μονοκύτταρα και μακροφάγα υγιών- μαρτύρων, μετά από επώαση με αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω της ακτιβίνης-A (134). Τα κύτταρα αυτά έχουν και υψηλά επίπεδα pSMAD2 (134). Τα CD68<sup>+</sup> μονοπύρνα κύτταρα και αρθρικοί ινοβλάστες από ασθενείς με ενεργή ρευματοειδή αρθρίτιδα φαίνεται επίσης ότι εκφράζουν ακτιβίνη-A και actR1IA mRNA (135). *In vitro* μελέτες σε αρθρικούς ινοβλάστες (fibroblast-like synoviocytes/FLS), έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A επάγει τον πολλαπλασιασμό τους (135). Υποπληθυσμοί B κυττάρων και von-Willebrand factor-εκφραζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν επίσης actR1IA σε αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (135). Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν πως η σηματοδότηση της ακτιβίνης-A αυξάνεται σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και σχετίζεται με τη νόσο. Παρόλα αυτά ο *in vivo* ρόλος της στην ανοσοπαθολογία της νόσου δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Στην ΠΣΠ, όπου αυτο-αντισώματα έναντι του GM-CSF αδρανοποιούν τη δραστηριότητά του και οδηγούν σε δυσλειτουργία του μεταβολισμού στους αεραγωγούς, η μειωμένη σηματοδότηση μέσω της ακτιβίνης-A βρέθηκε ότι αποτελεί κύριο γεγονός στην παθογένεια της νόσου. Μελέτες σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) έδειξαν μειωμένα επίπεδα ακτιβίνης-A, σε ασθενείς με ΠΣΠ, συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, τα μακροφάγα στην ΠΣΠ εκφράζουν μειωμένη ακτιβίνη-A (108). Είναι σημαντικό ότι η ακτιβίνη-A καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή αυτο-αντισωμάτων από τα B κύτταρα, σε ασθενείς με ΠΣΠ (108) (σχήμα 10).



*adapted from Morianos et al. Journal of Autoimmunity. 2019*

**Σχήμα 10:** Ο ρόλος της ακτιβίνης-A στην παθοφυσιολογία των αυτοάνοσων ασθενειών. Έχει δείχθει ότι η ακτιβίνη-A εμπλέκεται στην ανοσοπαθολογία των αυτοάνοσων ασθενειών συμπεριλαμβανομένων του ερυθματώδους λύκου και της PAP. Παρουσιάζεται συνολική εικόνα των ρόλων της ακτιβίνης-A και των σηματοδοτικών μονοπατιών στις αυτοάνοσες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Πιο πρόσφατες μελέτες από την ίδια ερευνητική ομάδα έδειξαν ότι η βιταμίνη-D ενεργοποιεί το μεταβολίτη καλσιτριόλη (calcitriol) και αυξάνει την έκφραση της ακτιβίνης-A σε ανθρώπινα μακροφάγα, καθώς και ότι τα επίπεδα της καλσιτριόλης μειώνονται στους ασθενείς με ΠΣΠ (136). Οι ερευνητές πρότειναν ένα μηχανισμό όπου η ανοσοπαθολογία σχετίζεται με τη μειωμένη σηματοδότηση της βιταμίνης-D που καταλήγει σε μειωμένη έκφραση της ακτιβίνης-A, αυξημένο πολλαπλασιασμό των B κυττάρων και αυξημένη παραγωγή αυτο-αντισωμάτων (136). Σχετικά με τη φλεγμονή στο ΚΝΣ, μια πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A ήταν καθοριστικό για τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδριτών και της επαναμυελίνωσης (137). Η παραγωγή της ακτιβίνης-A από τα M2-κατευθυνόμενα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα ήταν απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδριτών (130)

(σχήμα 10). Αναλυτικότερα, σε ποντίκια που είχαν έλλειψη του γονιδίου *Acvr2* σε ολιγοδενδροκύτταρα, οι ερευνητές έδειξαν ότι η έκφραση του *Acvr2* είναι καθοριστική για τη σύνθεση της μυελίνης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα πειραματικό μοντέλο lysolecithin-επαγόμενης απομυελίνωσης, δείχθηκε ότι ο *Acvr2a* αυξήθηκε και εκφράστηκε σε υψηλότερα επίπεδα, συγκρινόμενα με το *Acvr2b* στα σημεία της ενεργού μυελίνωσης/επαναμυελίνωσης, σε αντίθεση με μη-επαναμυελινωμένες περιοχές, όπου συνέβαινε το αντίθετο φαινόμενο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι υποδοχείς *Acvr2A* και *Acvr2B* εκφράζονταν από τα ολιγοδενδροκύτταρα, τη μικρογλοία και τα μακροφάγα, επίσης σε επαναμυελινωμένες αλλοιώσεις σε ασθενείς με ΣΚΠ (137). Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι η ακτιβίνη-A έχει νευρο-προστατευτικό και επιδιορθωτικό ρόλο στο ΚΝΣ. Παρόλα αυτά η δράση της στη ρύθμιση των παθογενετικών Th17 κυτταρικών αποκρίσεων που σχετίζονται με την αυτοάνοση φλεγμονή στο ΚΝΣ παραμένει αδιευκρίνιστη.

## ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΚΟΠΟΙ

Πρόσφατες μελέτες από την ομάδα μας έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A είναι μια ανοσορρυθμιστική κυτταροκίνη που καταστέλλει τις αλλεργικές αποκρίσεις των Th2 λεμφοκυττάρων και προστατεύει τα πειραματόζωα από το αλλεργικό άσθμα, επάγοντας τη δημιουργία CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Tr1-like κυττάρων (138). Επιπρόσθετα, δείξαμε ότι η ακτιβίνη-A κατευθύνει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων αθώων CD4<sup>+</sup> T κυττάρων σε Tr1-like Treg κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων IRF4 και Ahr (139). Ο ρόλος της ακτιβίνης-A όμως στις ανοσολογικές αποκρίσεις που διαμεσολαβούνται από αυτοειδικά Th17 λεμφοκύτταρα καθώς και στα, σχετιζόμενα με αυτές, αυτοάνοσα νοσήματα δεν είναι γνωστός.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, υποθέτουμε ότι η ακτιβίνη-A καταστέλλει την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων στην αυτοάνοση φλεγμονή που παρουσιάζεται στο ΚΝΣ και περιορίζει τη σοβαρότητα της νόσου.

Σκοποί μας είναι: α) η μελέτη της δράσης της ακτιβίνης-A στη ρύθμιση της παθογενετικής λειτουργίας των Th17 κυττάρων *in vitro* καθώς και στην αυτοάνοση φλεγμονή στο ΚΝΣ *in vivo*, και β) η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στα παθογενετικά Th17 κύτταρα.

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Η ακτιβίνη-A περιορίζει την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων και την αυτοάνοση φλεγμονή μέσω των εκτονουκλεοτιδασών CD39 και CD73 και Hif1-α εξαρτώμενων μεταβολιτών»

## Περίληψη

Στη σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), τα Th17 κύτταρα αποτελούν κυρίαρχο κυτταρικό πληθυσμό που συμμετέχει στην αυτοάνοση φλεγμονή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και στην απομυελίνωση. Τα Th17 κύτταρα παρουσιάζουν λειτουργική ετερογένεια συμμετέχοντας σε παθογενετικές και μη- παθογενετικές, ιστο- προστατευτικές λειτουργίες. Μέχρι και σήμερα, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων δεν έχουν καθοριστεί πλήρως. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο της ΠΑΕ, που αποτελεί καθιερωμένο πειραματικό μοντέλο μελέτης της ΣΚΠ, παρουσιάζουμε ότι η θεραπευτική χορήγηση της ακτιβίνης-Α μειώνει τη σοβαρότητα της νόσου και μέσω της μειωμένης ενεργοποίησης των Th17 κυττάρων, περιορίζει την ανοσοπαθολογία του ΚΝΣ καθώς και την απομυελίνωση. Επιπλέον, η ακτιβίνη-Α μέσω του (ALK)4 υποδοχέα καταστέλλει το παθογενετικό μεταγραφικό πρόγραμμα των Th17- διαφοροποιημένων κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την έκφραση αντι-φλεγμονωδών παραγόντων. Η μελέτη του γονιδιακού προφίλ καθώς και η εκτεταμένη *in vivo* μελέτη, αποκάλυψαν ότι η ενεργοποίηση των CD39 και CD73 εκτονουκλεοτιδασών, που καταλύουν τη μετατροπή του ATP σε αδενοσίνη, είναι απαραίτητη για τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-Α καταστολή της παθογενετικής ταυτότητας και των εγκεφαλοτοξικών λειτουργιών των Th17 κυττάρων.

Αναφορικά με τον εμπλεκόμενο μοριακό μηχανισμό, δείξαμε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας aryl hydrocarbon (Ahr), μαζί με τους STAT-3 και c-Maf, επιστρατεύονται στους υποκινητές των γονιδίων *Entpd1* και *Nt5e* (που κωδικοποιούν τα CD39 και CD73, αντίστοιχα) καθώς και άλλων αντι-φλεγμονωδών γονιδίων, ελέγχοντας την έκφρασή τους στα Th17 κύτταρα, παρουσία ακτιβίνης-Α. Αξιοσημείωτο είναι ότι η ακτιβίνη-Α καταστέλλει επίσης τη δράση του μεταβολικού παράγοντα hypoxia-inducible factor-1<sup>α</sup> (Hif1- $\alpha$ ) καθώς και φλεγμονώδεις πρωτεΐνες-κλειδιά που σχετίζονται με την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων. Σε μεταφραστικό επίπεδο, δείξαμε ότι η ακτιβίνη-Α επάγεται στο ΚΝΣ ατόμων με ΣΚΠ και περιορίζει τις αποκρίσεις των ανθρώπινων Th17 κυττάρων. Τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν την ακτιβίνη-Α ως ένα νέο κρίσιμο ρυθμιστή της παθογενετικής δράσης των Th17 κυττάρων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε θεραπευτικός στόχος για την καταστολή της αυτοάνοσης φλεγμονής στο ΚΝΣ.

## **Σημαντικότητα μελέτης**

Τα παθογενετικά Th17 κύτταρα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που καθοδηγούν την αυτοάνοση φλεγμονή στο ΚΝΣ, στη ΣΚΠ. Στην παρούσα εργασία, δείξαμε ότι η θεραπευτική χορήγηση της κυτταροκίνης ακτιβίνης-A περιορίζει τη σοβαρότητα της ασθένειας στο πειραματικό μοντέλο της ΣΚΠ, καθώς και τη φλεγμονή του ΚΝΣ, συνδυαστικά με μειωμένη παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων. Η ανάλυση του γονιδιακού προφίλ, καθώς και μηχανιστικές μελέτες, αποκάλυψαν ότι η ακτιβίνη-A αυξάνει τις αντι-φλεγμονώδεις εκτονουκλεοτιδάσες CD39 και CD73 στα Th17 κύτταρα, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για την καταστολή της παθογενετικής ταυτότητας και των εγκεφαλοτοξικών δράσεων των Th17 κυττάρων. Σχετικά με το μηχανισμό δράσης της ακτιβίνης-A, το σηματοδοτικό μονοπάτι της, επάγει την έκφραση αντι-φλεγμονωδών γονιδίων, μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων AhR, STAT-3 και c-Maf και εμποδίζει τη διαφοροποίηση και την παθογενετική λειτουργία των Th17 κυττάρων, μέσω καταστολής του μεταβολικού παράγοντα, Hif1-α και άλλων προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών. Όσον αφορά την κλινική σημασία της μελέτης, δείξαμε ότι η ακτιβίνη-A περιορίζει τις ανθρώπινες παθογενετικές Th17 αποκρίσεις σε ασθενείς με ΣΚΠ.

## Εισαγωγή

Η ΣΚΠ αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη απομυελινωτική νόσο του ΚΝΣ που προσβάλλει σχεδόν 2.5 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως (5,140). Η πλειοψηφία των ασθενών με ΣΚΠ, αντιμετωπίζει μια υποτροπιάζουσα μορφή, που αποτελεί το δεύτερο αίτιο αναπηρίας σε νέους ενήλικες και χαρακτηρίζεται από οξείες υποτροπές και υφέσεις με νευρολογικό υπόβαθρο (5,140). Μελέτες σε ΠΑΕ, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μυϊκό πειραματικό μοντέλο της ΣΚΠ, έχουν αποκαλύψει τα Τ βοηθητικά κύτταρα (Th) 17, σαν κύτταρα-καθοδηγητές της αυτοάνοσης φλεγμονής στο ΚΝΣ (140,141). Σχετικά με την κλινική σημασία, αυξημένες συχνότητες των Th17 κυττάρων ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) και στον εγκέφαλο ασθενών με ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας μορφής και σε άτομα με δευτερογενώς προϊούσα μορφή της νόσου (142-144). Ιδιαίτερης σημασίας είναι ότι η έκφραση Th17 παθογενετικών μορίων, σχετίζεται με παραμέτρους της δραστηριότητας της ΣΚΠ και της συχνότητας των υποτροπών (142-144). Ως εκ τούτου, η ανακάλυψη θεραπευτικών παραγόντων που θα στοχεύουν στην καταστολή της παθογενετικής λειτουργίας των Th17 κυττάρων, είναι κρίσιμη για την αντιμετώπιση της ΣΚΠ.

Δεδομένα από ποικίλες μελέτες, προτείνουν ότι η Th17 κυτταρική διαφοροποίηση και η παθογενετική τους δράση ελέγχονται από ποικίλες κυτταροκίνες και το μικροπεριβάλλον του ΚΝΣ (43,140-146). Για παράδειγμα, τα Th17 κύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro* παρουσία IL-6, IL-23 και IL-1β ή TGF-β3, παρουσιάζουν έντονα παθογενετικό προφίλ και επάγουν αυτοάνοση φλεγμονή στο ΚΝΣ, μετά τη μεταφορά τους *in vivo* (43,140-147). Σε αντίθεση, οι κυτταροκίνες TGF-β1 και IL-6 αναπτύσσουν Th17 κύτταρα με χαμηλή παθογενετική δράση (43, 140-147). Διαφορετικά μοριακά προγράμματα διαχωρίζουν τους παθογενετικούς και μη παθογενετικούς Th17 υποπληθυσμούς, με υψηλή έκφραση IL-23R, IFN-γ, GM-CSF και χαμηλή έκφραση CD5L, να χαρακτηρίζουν τα παθογενετικά κύτταρα και αυξημένα επίπεδα IL-10, CTLA-4 και c-Maf, να σχετίζονται με τα μη παθογενετικά (43,140-148). Ομοίως, στον άνθρωπο, τα Th17 κύτταρα που παράγουν IL-17 και IFN-γ προσομοιάζουν με τα παθογενετικά Th17 κύτταρα, ενώ αυτά που παράγουν IL-17 και IL-10, εκφράζουν ιδιότητες των μη παθογενετικών (72,76).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ετερογένεια και την πλαστικότητα των Th17



κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι τα Th17 κύτταρα που δημιουργούνται *in vivo* ή/και *in vitro* υπό μη φλεγμονώδεις συνθήκες, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 και μπορούν να μετατραπούν σε T ρυθμιστικά τύπου 1-like κύτταρα (149-150). Παρόλα αυτά, οι ακριβείς παράγοντες και τα μοριακά μονοπάτια που μετατρέπουν τα παθογενετικά Th17 κύτταρα (reprogramming), που έχουν δημιουργηθεί σε έντονα φλεγμονώδες περιβάλλον, σαν αυτό που επικρατεί κατά την αυτοανοσία του ΚΝΣ, σε μη παθογενετικά Th17 κύτταρα παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Η ακτιβίνη-A είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη, που παίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, η αιμοποίηση και η διατήρηση των βλαστικών κυττάρων. Η ακτιβίνη-A, εκφράζεται από την πλειοψηφία των κυττάρων που συμμετέχουν στη φυσική και επίκτητη ανοσία και δρα μέσω δύο τύπου I [Activin receptor type 1A (ή Activin receptor Like Kinase-ALK2), και Activin receptor type 1B (or ALK4)] και δύο τύπου II (ActRIIA και ActRIIB) υποδοχείς (151). Αν και η ακτιβίνη-A και ο TGF-β ανήκουν στην ίδια υπερ-οικογένεια, εμφανίζουν διακριτές και συνήθως αντίθετες λειτουργίες, σχετιζόμενες με τους διαφορετικούς σηματοδοτικούς υποδοχείς και το μοναδικό ρεπερτόριο των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων κυτταρικών ρυθμιστών τους (114). Η ακτιβίνη-A παρουσιάζει ευρύ φάσμα προ- και αντι-φλεγμονωδών λειτουργιών, που εξαρτάται από τον τύπο της ανοσιακής απόκρισης και το χωροχρονικό πλαίσιο που αναπτύσσεται (84,114). Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει σημαντικούς ρόλους της ακτιβίνης-A στη διαφοροποίηση των μυικών Th9 και Foxp3<sup>+</sup> ρυθμιστικών T (Treg) κυττάρων καθώς και των βοηθητικών T κυττάρων των θυλακίων (follicular T cells) στον άνθρωπο (113,115,138). Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A, καταστέλλει τις αλλεργικές αποκρίσεις που οφείλονται σε Th2 κύτταρα, τόσο σε πειραματικό μοντέλο άσθματος όσο και σε ασθματικούς ασθενείς, μέσω δημιουργίας ρυθμιστικών Treg κυττάρων που εκκρίνουν IL-10 (139,152). Παρόλα αυτά, η επίδραση της ακτιβίνης-A σε καίρια μονοπάτια των Th17 κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης και της παθογενετικής τους δράσης, καθώς και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη δράση της ακτιβίνης-A, δεν έχουν αποσαφηνιστεί.

Στην παρούσα εργασία, δείχνουμε ότι η θεραπευτική χορήγηση της ακτιβίνης-A *in vivo* μειώνει τη φλεγμονή στο ΚΝΣ, την απομυελίνωση και περιορίζει τη σοβαρότητα της ΠΑΕ. Η ακτιβίνη-A, μέσω του σηματοδοτικού της μονοπατιού και του κύριου τύπου I υποδοχέα της,

ALK4, καταστέλλει το παθογενετικό μεταγραφικό προφίλ των Th17 κυττάρων και παράλληλα ενισχύει την έκφραση και λειτουργία αντι-φλεγμονώδων παραγόντων. Μελέτες του γονιδιακού προφίλ, συνδυαστικά με τα μηχανιστικά πειράματα, αποκάλυψαν ότι οι εκτονουκλεοτιδάσες CD39 και CD73 εμπλέκονται στην επαγόμενη από την ακτιβίνη-A καταστολή των παθογενετικών Th17 αποκρίσεων. Επιπλέον μηχανιστικά πειράματα έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα AhR, ο οποίος μαζί με τους STAT-3 και c-Maf, ελέγχουν την έκφραση των CD39 και CD73 στα Th17 κύτταρα. Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα των μελετών μας, είναι ότι η ακτιβίνη-A ρυθμίζει αρνητικά φλεγμονώδεις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα παθογενετικά Th17 κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολικού παράγοντα Hif1-α.

Συμπερασματικά, οι μελέτες μας αναδεικνύουν την ακτιβίνη-A, ως ένα νέο θεραπευτικό στόχο που μπορεί να αξιοποιηθεί για την καταστολή της αυτοάνοσης φλεγμονής στο ΚΝΣ, που οφείλεται στα Th17 κύτταρα.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

### **Ανθρώπινα Δείγματα**

Συλλέχθησαν ορός, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και περιφερικό αίμα από ασθενείς με ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας μορφής, (n=23), με βάση τα ανανεωμένα κριτήρια McDonald (168), από αντίστοιχης ηλικίας ασθενείς-μάρτυρες (χωρίς ενδείξεις αυτοανοσίας, n=20) και από υγιείς μάρτυρες (n= 10). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν 24-66 χρόνια. Για την εισαγωγή στη μελέτη μας, οι συμμετέχοντες βρίσκονταν σε σταθερή κατάσταση και δεν είχαν εμφανίσει κλινικά σημάδια λοίμωξης για διάστημα τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων, πριν την ένταξη. Οι πληροφορίες για όλους τους δότες παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν φόρμα συγκατάθεσης και το πρωτόκολλο της μελέτης μας εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή Ηθικών Θεμάτων του «ΓΝΑ Γεννηματάς» και το «Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών».

	Healthy Controls	Disease Controls	RRMS <sup>A</sup> Patients
<i>n</i>	10	20	23
Age (years, mean ± SD)	48.7 ± 7.7	44.2 ± 11.5	52.5 ± 10.1
Female : Male ( <i>n</i> )	6:4	12:8	16:7
Disease ( <i>n</i> )			
Multiple Sclerosis	-	-	23
Viral encephalitis	-	8	-
TB meningitis	-	4	-
Diplopia	-	8	-
MS disease duration <sup>B</sup> (median, range)	-	-	10 (2-19)
EDSS (median, range)	-	-	2 (0,5-6)
Treatment ( <i>n</i> )			
Natalizumab	-	-	7
Interferon	-	-	6
Fingolimod	-	-	5
Glatiramer acetate	-	-	4
Dimethyl fumarate	-	-	1

<sup>A</sup>RRMS = relapsing remitting multiple sclerosis,

<sup>B</sup>Disease duration = years

### **Πίνακας 1. Κλινικά Χαρακτηριστικά των ομάδων που μελετήθηκαν**

## **Πειραματικά μοντέλα**

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια, ηλικίας 8-12 εβδομάδων που διατηρούνταν στο ΠΙΒΕΑΑ, στις πειραματικές ζωικές εγκαταστάσεις του Johns Hopkins και του Πανεπιστημίου της Grenoble. C57BL/6, C57BL/6-*Rag1*<sup>-/-</sup>, C57BL/6-*Nt5e*<sup>-/-</sup> (B6.129S1Nt5etm1Lft/J), *Cd4Cre* (Tg(Cd4-cre)1Cwi) και LSL-Hif1dPA (B6.129S6(C) Gt(ROSA)26Sortm3(Hif1A\*) Kael/J) (167) ποντίκια αγοράστηκαν από το Jackson Laboratory. Τα *Phd1* (*Egln2*)<sup>-/-</sup> ποντίκια δημιουργήθηκαν από την ομάδα του Peter Carmeliet (VIB, Λουβένη, Βέλγιο), όπως έχει προαναφερθεί (169) και παραχωρήθηκαν αναπαραγωγικά ζευγάρια για επέκταση των αποικιών στο Πανεπιστήμιο της Grenoble. *Il7α*<sup>Cre</sup> και *Il7α*<sup>Cre</sup>/*R26R*<sup>eYFP</sup> ποντίκια σε υπόβαθρο C57BL/6, παραχωρήθηκαν από την

Καθηγήτρια Brigitta Stockinger (155). *R26R<sup>eYFP</sup>* ποντίκια σε C57BL/6 υπόβαθρο, παραχωρήθηκαν από τον Καθηγητή Frank Costantini (170). 2D2 TCR διαγονιδιακά ποντίκια, προσφέρθηκαν από την Καθηγήτρια Lesley Probert (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα). Τα ποντίκια από τις διάφορες πειραματικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των ποντικίων με ελλείψεις σε γονίδια και των αντίστοιχων «αγρίου τύπου», στεγάστηκαν στο ίδιο κλουβί προκειμένου να περιοριστεί ο παράγοντας της διαφορετικότητας στο μικροβίωμα, στη μεταβλητότητα των πειραματικών αποτελεσμάτων. Οι διαδικασίες και οι χειρισμοί των πειραματοζώων ήταν σύμφωνοι με τις οδηγίες των US National Institutes of Health Statement of Compliance (Assurance), με τα Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals (#A5736-01 and A38 516 10006), σε συμφωνία με την προστασία ζώων και σύμφωνοι με τις Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης 86/609/EEC για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται σε πειραματικές διαδικασίες.

### **Απομόνωση και καλλιέργεια ανθρώπινων CD4<sup>+</sup> T κυττάρων**

Περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα αίματος απομονώθηκαν από ασθενείς με ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας μορφής, και αντίστοιχης ηλικίας υγιών-μαρτύρων με φυγοκέντρηση διαχωρισμού με Histopaque (Sigma Aldrich). Απομονώθηκαν αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα (Miltenyi Biotec) και δραστικά CD4<sup>+</sup> T κύτταρα (Dynal CD4 positive isolation kit, Invitrogen). Αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα διαφοροποιήθηκαν προς Th17 κύτταρα, με πολυκλωνική ενεργοποίηση προσδεδεμένου αντισώματος στο βοθρίο, anti-human CD3 (2μg/ml, OKT3, Biolegend) και διαλυτό anti-human CD28 (2μg/ml, CD28.2, Biolegend), σε πλάκες 96 βοθρίων, μαζί με ανασυνδιασμένη IL-6 (50ng/ml, Peprotech), IL-1β (20ng/ml, Peprotech) και IL-23 (20ng/ml, Peprotech) παρουσία PBS (Th17-treated κύτταρα) ή ανασυνδιασμένης ακτιβίνης-A (100ng/ml, R&D Systems) (act-A-treated κύτταρα) για 7-10 ημέρες. CD4<sup>+</sup> T κύτταρα ( $5 \times 10^4$ ) ενεργοποιήθηκαν με πολυκλωνική ενεργοποίηση προσδεδεμένου αντισώματος στο βοθρίο, anti-human CD3 και διαλυτό anti-human CD28 (όπως προηγουμένως), παρουσία PBS ή ανασυνδιασμένης ακτιβίνης-A (100ng/ml, R&D Systems) για 3-5 ημέρες (139). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δοσο-εξάρτησης που καθόρισαν τις βέλτιστες δόσεις ακτιβίνης-A καθώς και των αντισωμάτων anti-CD3/CD28. Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με ποσοτική PCR, τα επίπεδα κυτταροκινών αξιολογήθηκαν με ELISA σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών

και με κυτταρομετρία ροής, μετά από ενδοκυττάρια χρώση.

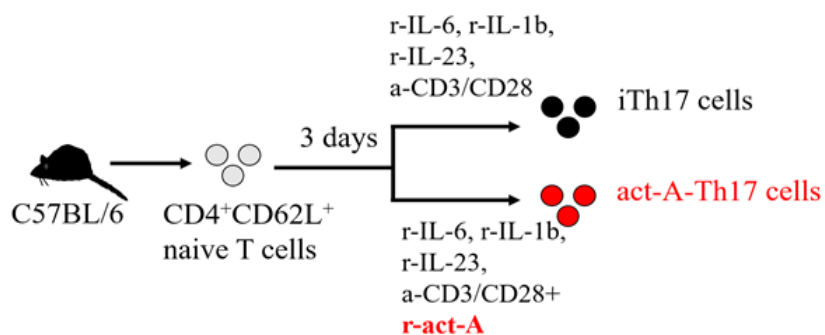
### **Επαγωγή ΠΑΕ και αξιολόγηση συμπτωμάτων**

Η επαγωγή της ΠΑΕ έγινε όπως έχει περιγραφεί (171). Συνοπτικά, C57BL/6 ποντίκια ανοσοποιήθηκαν, υποδόρια, την ημέρα 0, με 1:1 γαλάκτωμα 200 mg της γλυκοπρωτεΐνης μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG<sub>35-55</sub>) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (GENEMED Synthesis), μαζί με ανοσοενισχυτικό παράγοντα complete Freund's adjuvant (CFA) που περιέχει 4 mg/ml αδρανοποιημένο *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* (Difco Laboratories). Χορηγήθηκε επίσης ενδοπεριτοναϊκά, τοξίνη 300ng *Bordetella pertussis* (PTX) (List Biological Laboratories), διαλυμένη σε PBS, τη στιγμή της ανοσοποίησης (ημέρα 0) και την ημέρα 2. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ (171). Ανεξάρτητοι παρατηρητές κατέγραφαν το κλινικό σκορ της ασθένειας όπως ακολούθως: 0, μη παράλυση; 1, άτονη ουρά; 2, αδυναμία πίσω άκρων; 3, ολική παράλυση πίσω άκρων; 4, παράλυση εμπρόσθιων άκρων; 5, θάνατος. Μετρήσαμε τον πολλαπλασιασμό των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων, από τους απομονωμένους εγγύς λεμφαδένες, παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ύστερα από ενεργοποίηση για 72 ώρες, με τριτιωμένη θυμιδίνη {[<sup>3</sup>H], 1μl/well} την οποία προσθέσαμε στις κυτταροκαλλιέργειες τις τελευταίες 12 ώρες επώασης. Η ενσωματωμένη ραδιενέργεια μετρήθηκε με τη χρήση β-scintillation counter (Microbeta-Trilux; PerkinElmer). Η απελευθέρωση των κυτταροκινών μετρήθηκε σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργιών με ELISA.

### **In vitro T κυτταρική διαφοροποίηση**

CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> αθώα T κύτταρα απομονώθηκαν με μαγνητικά σφαιρίδια (Miltenyi Biotec) ή διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια του κυτταροδιαχωριστή BD FACSAria II, από σπλήνες και λεμφαδένες C57BL/6, Hif1-Tg/CD4 I17a<sup>Cre</sup>/R26R<sup>eYFP</sup> ή *Egln2*<sup>-/-</sup> ποντικών και ενεργοποιήθηκαν πολυκλωνικά με πρόσδεση στο βοθρίο anti-CD3 (1μg/ml, eBioscience) και διαλυμένο anti-CD28 (1μg/ml, eBioscience) σε πλάκες 96 βοθρίων για 3-4 ημέρες. Για την Th17 κυτταρική διαφοροποίηση, 10<sup>5</sup> αθώα T κύτταρα, καλλιεργήθηκαν παρουσία ανασυνδιασμένης IL-6 (20ng/ml, Peprotech), IL-1β (20ng/ml, Peprotech) και IL-23 (20ng/ml, R&D Systems), παρουσία

PBS (μάρτυρας) ή ακτιβίνης-A (100ng/ml) (146). Με τη διεξαγωγή δοσο-εξαρτώμενων πειραμάτων, επιλέχθηκαν οι ιδανικές συγκεντρώσεις των αντισωμάτων anti-CD3/anti-CD28, καθώς και της ακτιβίνης-A. Σε κάποια πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταρικές καλλιέργειες, AhR- ανταγωνιστής (CH-223191, 5μM, Sigma-Aldrich), ο CD73 ανταγωνιστής (AMP-CP, 100μM, Sigma-Aldrich), ο Smad3 αναστολέας (SIS3, 20μM, Sigma-Aldrich), το αντίσωμα anti-ALK4 (10μg/ml, R&D), ο STAT3- αναστολέας (STA-21, 10μM, Cayman Chemical) ή αρνητικός μάρτυρας (PBS). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τις ημέρες 3-4, μετά τη διαφοροποίηση, για απομόνωση του RNA, και τις ημέρες 3-9 για εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια ανάλυση με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής καθώς και ανάλυση των κυτταροκινών με ELISA στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών.



**Σχήμα 11:** Πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την Th17 κυτταρική διαφοροποίηση, παρουσία ακτιβίνης-A.

### Μεταφορά T κυττάρων σε πειραματικό μοντέλο ΠΑΕ

C57BL/6 ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με πεπτίδιο MOG35-55 και CFA όπως περιγράφεται (171). Κύτταρα περιφερικών λεμφαδένων, συλλέχθηκαν τη 10<sup>η</sup> μέρα, μετά την ανοσοποίηση και επανενεργοποιήθηκαν *ex vivo* με 20μg/ml MOG35-55, IL-23 (20ng/ml, R&D Systems) (Th17 συνθήκες) παρουσία PBS ή ακτιβίνης-A (100ng/ml), για 72 ώρες. Τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα απομονώθηκαν και μεταφέρθηκαν (3×10<sup>6</sup> /ποντίκι), ενδοπεριτοναϊκά σε αθώα C57BL/6-*Rag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια-δέκτες και 48 ώρες αργότερα τους χορηγήθηκε PTX, όπως έχει προαναφερθεί. Τα ποντίκια παρακολουθούνταν, ως προς την κλινική τους εικόνα τουλάχιστον μέχρι την 30<sup>η</sup> μέρα. Σε άλλη ομάδα πειραμάτων, Th17 ή act-A-Th17 κύτταρα (3x10<sup>6</sup>), που δημιουργήθηκαν όπως

προαναφέρθηκε, καλλιεργήθηκαν παρουσία anti-CD73 παρεμποδιστικού αντισώματος (BioXCell; 20 µg/ml) ή IgG μάρτυρα, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε C57BL/6-*Rag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια (μέρα 0), όπως παραπάνω. Στα C57BL/6-*Rag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια, χορηγήθηκε (ενδοπεριτοναϊκά) anti-CD73 (50µg/ποντίκι) ή IgG μάρτυρας τις ημέρες 4,7,10 και 14, μετά τη μεταφορά των T κυττάρων. Σε άλλα πειράματα, Th17 ή act-A-Th17 κύτταρα ( $3 \times 10^6$ ), προερχόμενα από CFA-MOG ανοσοποιημένα *Nt5e*<sup>-/-</sup> ή *Nt5e*<sup>+/+</sup> ποντίκια, μεταφέρθηκαν σε C57BL/6-*Rag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια (ημέρα 0).

### **Χαρακτηρισμός ανοσοκυττάρων στο ΚΝΣ στα ποντίκια**

Απομονώθηκαν νωτιαίοι μυελοί ποντικίων στην έξαρση της ΠΑΕ (ημέρες 17-20) και επώαστηκαν με μείγμα κολλαγενάσης -D (2.5mg/ml, Millipore) για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup> C (171). Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια 70mm cell strainer (BD Biosciences), ακολούθησε φυγοκέντρηση με 30%-70% Percoll (Sigma-Aldrich) και απομονώθηκαν τα μονοπύρηνια κύτταρα από τη μεσόφαση. Τα ερυθροκύτταρα λύθηκαν με υποτονικό διάλυμα. Τα ανοσο-κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS, σημάνθηκαν με αντισώματα συνδεδεμένα με φθοροχρώματα και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής.

### **Ποσοτικοποίηση της φλεγμονώδους εστίας σε ιστούς του ΚΝΣ**

Δείγματα νωτιαίου μυελού μονιμοποιήθηκαν με 10% (v/v) διάλυμα φορμαλίνης και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Κόπηκαν τομές των 4µm και πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη/ εωσίνη (H&E) με σκοπό να αξιολογηθεί η φλεγμονή στο νωτιαίο μυελό (171). Για την εκτίμηση της απομυελίνωσης των αξόνων, αφυδατωμένες τομές επώαστηκαν 18 ώρες στους 57<sup>0</sup> C με διάλυμα Luxol Fast Blue (LFB, Sigma Aldrich), ξεπλύθηκαν, εμβαπτίστηκαν σε 0.05% καρβονικό λίθιο (lithium carbonate) και στη συνέχεια σε χρωστική Cresyl Violet (Sigma Aldrich) για 6 λεπτά στους 57<sup>0</sup> C. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν, αφυδατώθηκαν και προετοιμάστηκαν για μικροσκοπική παρατήρηση. Οι αναλύσεις όλων των ιστολογικών και μικροσκοπικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκαν τυφλά από δυο ανεξάρτητους παρατηρητές.



## **Μέθοδος μέτρησης ελεύθερου ATP**

Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα διαφοροποιήθηκαν για 48 ώρες. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με RPMI 1640- ελεύθερο φαινολών (Gibco, USA) και στερήθηκαν ορού 18 ώρες. ATP (500μM, Jena Bioscience) προστέθηκε τις τελευταίες 8 ώρες της καλλιέργειας. Η συγκέντρωση του ATP μετρήθηκε στα υπερκείμενα των καλλιεργείων με τη μέθοδο ATPlite Luminescence Assay System (PerkinElmer).

## **Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού**

$5 \times 10^4$  κύτταρα/πλακίδιο προετοιμάστηκαν σε poly-L-lysine αντικειμενοφόρους (Thermo Scientific), μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (στους 4<sup>0</sup> C) και επώαστηκαν σε 10% διάλυμα σουκρόζης (139). Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και δεσμεύτηκαν οι μη ειδικές θέσεις με 10% ορό γαϊδάρου, διαλυτοποιημένο σε 0.1% Triton-X. Τα πλακίδια επώαστηκαν 18 ώρες στους 4<sup>0</sup> C με πρωτογενή αντισώματα έναντι mouse AHR (Santa Cruz), c-Maf (Santa Cruz) και Hif1- $\alpha$  (R&D Systems) ή ισotyπov-μαρτύρων (R&D Systems). Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν και επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με φθοροχρώματα (Invitrogen), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση των πυρήνων και η στεγανοποίηση των πλακιδίων πραγματοποιήθηκαν με το To-pro-3 (ThermoFischer Scientific T3605) και Fluoromount-G (eBioscience 00-4958). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με τη χρήση συνεστιακού laser scanning μικροσκοπίου (Leica TCS SP5) και οπτικά αντίθεσης φάσεων. Η ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από τον ανοσοφθορισμό πραγματοποιήθηκε με Image J software. Καταμετρήθηκαν AHR<sup>+</sup>, c-Maf<sup>+</sup> και Hif1- $\alpha$ <sup>+</sup> T κύτταρα, σε κάθε πλακίδιο από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, τυφλά, και εκφράστηκαν σαν ποσοστά των συνολικών CD4<sup>+</sup> T κυττάρων (139).

## **Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής**

Κύτταρα σημάνθηκαν με αντισώματα συνδεδεμένα με φθοροχρώματα έναντι CD45, CD11b, Ly6C, CD4, CD73, CD39, CD3, CD8, και CD25 (όλα από eBioscience) και TCR  $\gamma/\delta$  (Biolegend). Για την ενδοκυττάρια χρώση των κυτταροκινών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 4

ώρες στους 37°C, με καλλιεργητικό μέσο που περιείχε PMA (10 ng/ml, Sigma), ionomycin (250 ng/ml, Sigma-Aldrich) και Golgi-Stop (1μl/ml, BD Biosciences) (138,139). Τα κύτταρα σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι IL-17 (eBioscience και Biolegend), IFN-γ, GM-CSF, IL-10 και Foxp3, phospho-STAT3 (Tyr705) (BD Biosciences), με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής Cytomics FC500 (Beckman Coulter) και BD FACSAria II (Becton Dickinson). Η επεξεργασία των κυτταρομετρικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα FlowJo software 8.7 (Tree Star, Inc).

### **Ποσοτική ανάλυση real-time PCR**

Απομονώθηκε ολικό RNA με τη χρήση RNAeasy Mini Kit (Qiagen) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την αντίστροφη μεταγραφή, Superscript II (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ίδια ποσότητα RNA χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση cDNA, μετρημένη με NanoDrop Spectrophotometer (ThermoScientific). Η έκφραση των γονιδίων μελετήθηκε με τη χρήση SYBR Green Master mix και στοχευμένων εκκινητών (Πίνακας 2). Η σχετική έκφραση των γονιδίων συγκριτικά με την έκφραση των *Gapdh* και *Polr2a*, υπολογίστηκε με τη μέθοδο 2-ΔΔCt (172).

Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
Il17a	M. musculus	TCATCCCTCAAAGCTCAGCG	TTCATTGCGGTGGAGAGTCC
Tnf		CCAGACCCTCACACTCACAA	ATAGCAAATCGGCTGACGGT
Ifng		GCGTCATTGAATCACACCTG	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
Il1b		ACCTTCCAGGATGAGGACATGA	CTAATGGGAACGTCACACACCA
Csf2		CTCACCCATCACTGTCACCC	TGAAATTGCCCGTAGACCC
Il10		TGAATCCCTGGGTGAGAAG	GCTCCACTGCCTTGCTCTTA
Rorc		CCCGAGATGCTGTCAAGTTT	CTTGGCCACTTGTTCCTGTT
Tbx21		GGTGTCTGGGAAGCTGAGAG	GAAGGACAGGAATGGGAACA
Maf		CCCTTGACAGTTTGCTTCTA	CCCATTCTGCTATCTTTGAC
Ahr		CTCCTTCTTGCAAATCCTGC	GGCCAAGAGCTTCTTTGATG
Foxp3		CCCATCCCCAGGAGTCTTG	ACCATGACTAGGGGCACTGTA

Cyp1a1		TCAGTCCCTCCTTACAGCCC	GGGTTCCTCCCCACAGTCAG
Nt5e		CTACCCAGGAACTCGGGAGA	GGATGCCACCTCCGTTTACA
Entpd1		GGAAACCTGATCTGTGATGC	CTTCAGGGTGGACCCTTTTA
Gzmb		GACCAAACGTGCTTCCTTTC	GCAGGATCCATGTTGCTTCT
Lag3		ACATTCAACCAGACAGTGGCCA	GCATCCCCTGGTGAAGGTC
Egln1		AGGCTATGTCCGTCACGTTG	TGGGCTTTGCCTTCTGGAAA
Egln2		GTAGAAGGTCACGAGCCAGG	CGCCATGCACCTTAACATCC
Egln3		AGGCAATGGTGGCTTGCTAT	GACCCCTCCGTGTAACCTGG
Hif1a		AGTGCTGATCCTGCACTGAA	AGGCTGGGAAAAGTTAGGAGTG
Hif1an		CCGTGGGGAGGAAGATTGTC	CACTCGAACTGATCCGGAGG
Gfi1		TCAAATGCAGCAAGGTGTTTC	ACAGTCAAAGCTGCGTTCTCCT
Glut1		CACTGTGGTGTGCGCTGTTTG	AAAGATGGCCACGATGCTCA
Pdhk1		ACGGGACAGATGCGGTTATC	GCTTCCAGGCGGCTTTATTG
Ldha		GCATGGCAGCCTCTTCCTTA	GTTTCGCTGGACCAGGTTGA
Uqcrh		CATGGGACTAGAGGACGAACG	AGCTGTTACAGTGCTCTCTC
B2M		TGAGTATGCCTGCCGTGTGA	TGATGCTGCTTACATGTCTCGAT
RORC		GCAGCGCTCCAACATCTTCTC	GCACACCGTTCCCACATCTC
TBX21		GATGCGCCAGGAAGTTTCAT	GCACAATCATCTGGGTACATT
AHR	H. sapiens	CCGTGTGATGTATCAGTGC	GCCTGGCAGTACTGGATTGT
MAF		ACGAGAAGTTGGTGAGCAGC	TTCCAAAATGTGGCGTATCC
IL17A		AAGAACTTCCCCGGACTGT	GTGGTAGTCCACGTTCCCAT
IFNG		TTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAA	TGCGTTGGACATTCAAGTCAG
IL10		GGCGCTGTCATCGATTTCTT	TTGGAGCTTATTAAGGCATTCTTC
CSF2		CCTGGGAGCATGTGAATGCCA	GGTCGGCTCCTGGAGGTCAA
NT5E		CTGGGAGAACCTGGCTGCTG	CACATGGATTCCGCCACCT
ENTPD1		GGATGCGGGTTCCTTCTCACA	CCCAGGTAAACGGGTGTCTC
CYP1A1		CAGCTGACTTCATCCCTATTC	AGCTGGACATTGGCGTTCTCA

**Πίνακας 2.**

**Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για real-time PCR αναλύσεις**

### **Ανάλυση ανοσοτυπώματος (Immunoblot analysis)**

Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα ξεπλύθηκαν δυο φορές με PBS και συλλέχθηκαν σε λυτικό διάλυμα, ενισχυμένο με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (Invitrogen) (139). Ομογενοποιημένα πρωτεϊνών ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bradford (Thermo Scientific) και 5μg πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε γέλη ακρυλαμιδίου (BioRad). Η γέλη μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF (Millipore), για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων χρησιμοποιήθηκε 5% άπαχο γάλα στους 25<sup>0</sup> C για 1 ώρα και τέλος χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα έναντι AHR (Enzo; BML-SA210), c-Maf (Santa Cruz; sc-7866), HIF1-α (R&D; AF1935) και TATA-binding protein (TBP) (Santa Cruz; SC-204), στους 4<sup>0</sup> C για 18 ώρες. Το ανοσοτύπωμα στη συνέχεια επώαστηκε με δευτερογενή αντισώματα-συνδεδεμένα με horseradish peroxidase, στους 25<sup>0</sup> C για 1 ώρα, και εμφανίστηκε χρησιμοποιώντας το ECL Chemiluminescence kit (Millipore). Η έκφραση των πρωτεϊνών, κανονικοποιήθηκε διαιρώντας τα densitometric τμήματα που αναφέρονται στην υπό εξέταση πρωτεΐνη με αυτά του TBP, από το ίδιο δείγμα. Για τις μελέτες σταθερότητας του Hif-1α, χρησιμοποιήθηκε η κυκλοεξαμίδη (100μg/ml; Calbiochem), η οποία προστέθηκε κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα της Th17 διαφοροποίησης, στις καλλιέργειες για 8 ώρες. Κύτταρα που είχαν διαφοροποιηθεί παρουσία κυκλοεξαμίδης ή μάρτυρα και ακτιβίνης-A ή μάρτυρα συλλέχθηκαν όπως παραπάνω και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Hif1-α ποσοτικοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης western blot.

### **Ανάλυση κυτταροκινών**

Κυτταροκίνες μετρήθηκαν σε ομογενοποιημένα ΚΝΣ ποντικών και σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργείων, σε ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε δείγματα ορού και σε υπερκείμενα ανθρώπινων T κυτταροκαλλιεργείων (138,139,156) χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits για ακτιβίνη-A, IL-17, IL-1β, IFN-γ, IL-10, TNF-α και GM-CSF (R&D Systems). Για την ανάλυση της ELISA, χρησιμοποιήθηκε μια 4 παραμέτρων λογιστική καμπύλη (4-PL), και ακολουθήθηκαν οι συστάσεις του κατασκευαστή (R&D Systems).

## Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)

Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα ( $8 \times 10^6$  ανά συνθήκη) μονιμοποιήθηκαν για 10 λεπτά σε 1% διάλυμα φορμαλδεΐδης σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση εξουδετερώθηκε με προσθήκη 0.125M γλυκίνης (139,156). Πραγματοποιήθηκε απομόνωση της χρωματίνης και ακολούθησε ο κατακερματισμός της με χρήση υπερήχων του συστήματος Covaris. Τα τμήματα χρωματίνης επώαστηκαν για 18 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$  με anti-mouse AHR (Enzo BML-SA210), c-Maf (Santa Cruz sc-7866) και STAT3 (Cell Signaling 79D7) ή IgG αντισώματα- μάρτυρες. Τα ανοσοσύμπλοκα απομονώθηκαν με μαγνητικά σφαιρίδια (Dynabeads Protein G, Life Technologies). Το DNA απομονώθηκε από τα ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα, μέσω reverse crosslinking στους  $65^{\circ}\text{C}$  και επίδραση με πρωτεΐνάση K. Τα τμήματα DNA καθαρίστηκαν με NGS μαγνητικά σφαιρίδια (Macherey-Nagel 744970). Η σχετική ενίσχυση του ChIP έναντι IgG (αναφορικά με την ποσότητα του DNA) κατακρημνισμένου DNA, εκτιμήθηκε μέσω qPCR ανάλυσης των περιοχών ενδιαφέροντος χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών:

NT5e Site 1: FW: 5'- CGGCTCCCAACAGCACTTGT - 3', REV: 5' - TGCCCTCCCCTTCAGCTTCT - 3' (-3kb); NT5e Site 2: FW: 5' - AGCAAGAGAAATAGCAGGGCG - 3', REV: 5' - GTTAGAGCCGTTCTTGCATTGAG - 3';  
Entpd1 Site 1: FW: 5' - CTTACACCGTCCTCCCTGAG - 3', REV: 5'- GCCAGCTGTGAAATGACAAA - 3'; Entpd1 Site 2: FW: 5' - AAGGAGGTGGACACAACCAG - 3', REV: 5' - TGAATAAATGTGTGCAGAAGGA - 3';  
Entpd1 STAT3-SRE1: FW: 5'-GCTGGGCTTTAGAGACTTGTGGGC -3', REV: 5'- ACCCATGCAAATGGTTTGGGCA-3'; Il10: AhR -300bp: FW: 5' - ACCTGGGAGTGCGTGAATGGAATCC - 3', REV: 5' - GTGACTTCCGAGTCAGCAAGAAATA - 3'; Il10: c-Maf MARE1: FW: 5' - GGAGAAAGTGAAAGGGATGGAG - 3', REV: 5' - GGAATGGAATTGACTCAAGAACTG - 3'; Il10: c-Maf MARE2: FW: 5' - ACCCTCTACATGGGTCTACTT - 3', REV: 5' - CAAGCAACTACTTGTCCCTCCT - 3'; Cyp11a1: FW: 5'-AGGCTCTTCTCACGCAACTC- 3', REV: 5'- CTGGGGCTACAAAGGGTGAT- 3'; Egln2 XRE2: FW: 5'- TAGATGACAGACTGGGCCAC-3', REV: 5'-TGTCTCCCTATCACCTTCCTC-3'.

## **Sequential ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης**

Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε θεωρητικά σημεία συν-πρόσδεσης των STAT3 και AhR, αναλύθηκαν τα peaks κάθε μεταγραφικού παράγοντα από τις ChIP-seq SRA βάσεις δεδομένων σε διαφοροποιημένα Th17 κύτταρα (50), χρησιμοποιήθηκαν επιβεβαιωτικά διάφορα εργαλεία, και οι αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές εξετάστηκαν περαιτέρω για STAT3 και AhR DNA μοτίβα, μέσω της βάσης δεδομένων JASPAR motif. Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα ( $12 \times 10^6$  ανά συνθήκη) επεξεργάστηκαν όπως παραπάνω. Μετά τον κατακερματισμό της χρωματίνης, η ανοσοκατακρήμνιση έγινε 18 ώρες στους  $4^{\circ}$  C, με τη χρήση αντισώματος anti-STAT3 (Cell Signaling 79D7) ή μάρτυρα IgG αντισώματος. Τα ανοσοσύμπλοκα απομονώθηκαν με μαγνητικά σφαιρίδια (Dynabeads Protein G, Life Technologies), μετά από 3 ώρες επώαση στους  $4^{\circ}$  C. Τα ανοσοκατακρημνισμένα DNA τμήματα, απεδεσμεύτηκαν από τα σφαιρίδια μετά από 30 λεπτά επώαση στους  $37^{\circ}$  C, σε διάλυμα TE - 10 mM DTT, αραιώθηκαν 1:100 και ακολούθησε δεύτερη ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση anti-AhR (Enzo BML-SA210) ή μάρτυρα IgG αντισώματος, στους  $4^{\circ}$  C. Τα DNA τμήματα που είχαν προσδεθεί με τον AhR, συλλέχθηκαν με διαχωρισμό μέσω μαγνητικών σφαιριδίων και η χρωματίνη απομονώθηκε και καθαρίστηκε όπως προαναφέρεται. Η σχετική ενίσχυση του ChIP έναντι IgG (σχετικό με το DNA που χρησιμοποιήθηκε) κατακρημνισμένου DNA, εκτιμήθηκε μέσω qPCR ανάλυσης χρησιμοποιώντας το ακόλουθο ζεύγος εκκινητών: *IL10* 8600: FW: 5'-AGGTCTATGAGCAGATTCATCCA-3', REV: 5'-CACCCCTAGGGATGGTGTGAT3'.

## **Ανάλυση των δημοσιευμένων ChIP-Seq δεδομένων**

ChIP-seq SRA βάσεις δεδομένων (50,161,162,163) των STAT3 (GSM1004860, GSM1004861), c-Maf (GSM1004799, GSM1004800), ROR $\gamma$ t (GSM1004855, GSM1004856), Hif1- $\alpha$  (GSM1004819, GSM1004820), BATF (GSM1004786, GSM1004787), IRF4 (GSM1004827, GSM1004828, GSM1004831), p300 (GSM1004849, GSM1004850), τροπουσίες ιστονών H3K27ac (GSM2905773, GSM2905774) και H3K4me1 (GSM2429057, GSM2429058) από *in vitro* διαφοροποιημένα Th17 κύτταρα, επεξεργάστηκαν με τη χρήση του sra toolkit prefetch command, και μετατράπηκαν σε fastq αρχεία χρησιμοποιώντας το fastq-dump. Η ποιότητα των fastq αξιολογήθηκε, ενώ υψηλής ποιότητας διαβάσματα αντιστοιχίστηκαν με το UCSC mm9

γονιδίωμα αναφοράς, χρησιμοποιώντας bwa-mem (173), χρησιμοποιώντας προεπιλεγμένες παραμέτρους και επιτρέποντας 2 λάθη μεταξύ της εξεταζόμενης αλληλουχίας και των αλληλουχιών αναφοράς. Δημιουργήθηκαν UCSC genome browser tracks με τη χρήση bedtools (174) και UCSC εργαλείων (175). Οι κορυφές κατονομάστηκαν με τη χρήση του MACS2 suite, και κάθε αποκαλούμενη κορυφή με επίπεδο αλλαγής μικρότερο του 1 και FDR τιμή μεγαλύτερη του 0.01 δεν αξιολογούταν.

### **In silico αναλύσεις των ρυθμιστικών περιοχών σε επιλεγμένα γονίδια**

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των consensus αλληλουχιών πρόσδεσης των AhR, c-Maf και STAT3 στα γονίδια *Nt5e* και *Entpd1*, στα ποντίκια. Οι αλληλουχίες των γονιδίων *Nt5e* και *Entpd1* με αριθμό πρόσβασης ENSMUSG00000032420 και ENSMUSG00000048120, αντίστοιχα, προέκυψαν από τη βάση δεδομένων Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Οι ρυθμιστικές περιοχές που εκτείνονται 5000bp ανοδικά και 5000bp καθοδικά του κάθε γνωστού TSS του κάθε γονιδίου, υποβλήθηκαν στην πλατφόρμα MatInspector της βάσης δεδομένων Genomatix (<http://www.genomatix.de/en/index.html>) για να εντοπίσουν θεωρητικά σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων (TFBS) για όλους τους μεταγραφικούς παράγοντες της Matrix Family Library Version 9.0, που περιέχει 1381 μοριακά βάρη. Με σκοπό να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα του αλγόριθμου, τα πειραματικά αποδεδειγμένα σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, των γνωστών ρυθμιστών στα *Nt5e* και *Entpd1* γονίδια (50, 156), θεωρήθηκαν σα θετικά αποτελέσματα. Κάθε προβλεπόμενο TFBS με τιμή p και σκορ κατώτερο από τις τιμές των πειραματικά αποδεδειγμένων αναφορών, διεγραφόταν από τα αποτελέσματα.

### **In silico δομική μελέτη των αλληλεπιδράσεων AhR-ARNT-STAT3**

STAT3 και AhR-ARNT ζητήθηκαν από την Protein Data Bank (PDB) ([www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)) και οι πιο σχετικές δομές (με κωδικούς PDB ID 3CWG και 5V0L, αντίστοιχα) ανακτήθηκαν. Η αναλυόμενη δομή των ετεροδιμερών Hif1- $\alpha$ -ARNT σύμπλοκο με HRE DNA (PDB ID κωδικός 4ZPR) χρησιμοποιήθηκαν σα δομές-αναφοράς για τους θετικούς

μάρτυρες στα πειράματα πρόσδεσης. Τα μοριακά πειράματα πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν μέσω pyDockweb server (176). Οι υπολογισμοί της συγγένειας πρόσδεσης {binding affinities ( $\Delta G$ ) και dissociation constant ( $K_d$ ) values} των συμπλόκων, παρουσιάστηκαν μέσω PRODIGY (PROtein binDIng enerGY prediction) (177). Οι μοριακές δυναμικές προσομοιώσεις παρουσιάστηκαν στο Gromacs forcefield για 10ns με τη βοήθεια του MDWEB (178). Superimpositions/υπερθέσεις, rmsd υπολογισμοί και οπτικοποίηση των δομών παρουσιάστηκαν με τη χρήση του PyMOL Package (DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System 2002 DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>).

### **RNA αλληλούχιση και βιοπληροφορικές αναλύσεις**

Οι βιβλιοθήκες για την αλληλούχιση του RNA των Th17 και τα act-A-Th17 κυττάρων, έγιναν με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (Illumina, Inc.), και επεξεργάστηκαν με τον αλληλουχητή νέας γενιάς HiSeq 2000, στο European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Αρχικά, η ποιότητα των πρωταρχικών fastq αρχείων έγινε με το fastQC (Babraham Bioinformatics) και όπου κρίθηκε αναγκαίο, οι adapters απομακρύνθηκαν και χαμηλής ποιότητας διαβάσματα (Phred score > 10) αφαιρέθηκαν με το cutadapt (179), επιτρέποντας το ελάχιστο 20 βάσεις/διάβασμα. Ακολούθως, τα υψηλής ποιότητας διαβάσματα αντιστοιχίστηκαν με το mm9 γονιδίωμα αναφοράς {University of California Santa Cruz (UCSC)}, χρησιμοποιώντας το tophat2 (180) με παραμέτρους: `-- library-type fr-unstranded --keep-fastx-order --bowtie1 --read-mismatches 2`. Οι αντιστοιχίες αξιολογήθηκαν περαιτέρω με mapping quality score of 10, χρησιμοποιώντας samtools (181), και μόνο οι αντιστοιχίες στα χρωμοσώματα αξιοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας bash programming. Τελικά, η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης έγινε με τη χρήση του Bioconductor package metaseqR (182). Η αντιστοίχιση των μετρήσεων έγινε με τη βοήθεια των εξωνίων από το Ensembl, και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με τη μέθοδο trimmed mean of M-values από edgeR (182). Γονίδια με (i) μήκος < 500bp και (ii) μέσο όρο αριθμού διαβασμάτων ανά 100bp < 0.25 αφαιρέθηκαν προς αποφυγή πιθανώς στατιστικών λαθών. Χρησιμοποιήθηκε DESeq για την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης, δίνοντας αποτελέσματα με  $\log_2(FC) \geq 1$ . Τα 972 ταυτοποιημένα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (differentially expressed genes- DEGs), επεξεργάστηκαν περαιτέρω με το εργαλείο Ingenuity Pathway Analysis (IPA), για να αποκαλυφθούν ενισχύσεις κανονικών

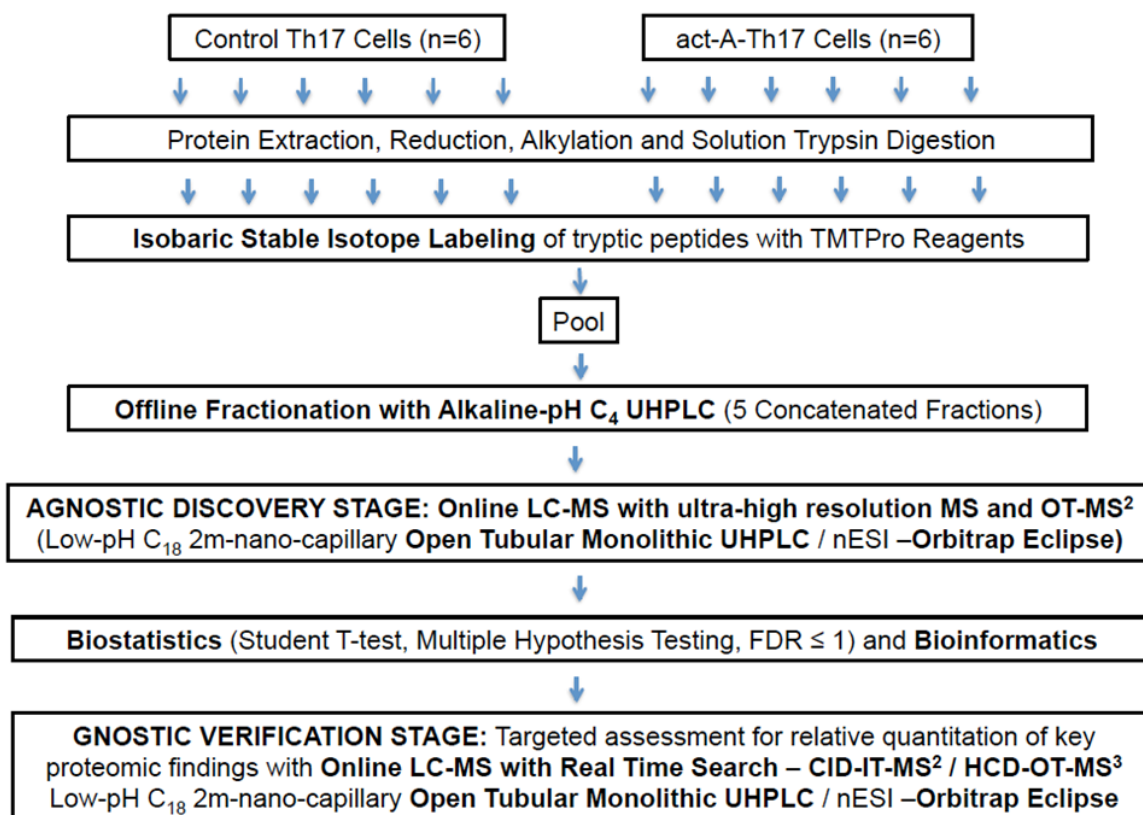


μονοπατιών, ρυθμιστικές λειτουργίες αυτών, εμπλοκή τους στην παθογένεια της ασθένειας καθώς και λειτουργικές συσχετίσεις.

### **Ποσοτικές Πρωτεομικές αναλύσεις**

Κυτταρικά ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 0.5 M triethylammonium bicarbonate (TEAB), 0.05% sodium dodecyl sulphate (SDS) και υποβλήθηκαν σε παλμική ανίχνευση ενισχυτή υπερήχων (Misonix, Farmingdale, NY, USA). Τα κύτταρα λύθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν (16,000 g, 10 λεπτά, 4°C) και στα υπερκείμενα μετρήθηκαν οι πρωτεΐνες με τη χρήση του BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Χρησιμοποιήθηκαν 100 µg συνολικής πρωτεΐνης ανά δείγμα, αναφορικά με το μέγιστο όγκο. Οι πρωτεΐνες κόπηκαν [tris 2-carboxyethyl phosphine hydrochloride (TCEP), 4 µl από 50mM solution, επώαση στους 60°C για 1 ώρα], αλκυλιώθηκαν [methyl-methanethiosulfonate (MMTS), 2 µl από 200mM solution, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά] και πρωτεολύθηκαν ενζυμικά με θρυψίνη (1:25). Τα πεπτίδια από κάθε δείγμα σημάνθηκαν με δώδεκα TMTpro reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Τα σημασμένα πεπτίδια ανακατεύτηκαν και αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία δύο-διαστάσεων και tandem φασματογραφία μάζας, όπως αναφέρθηκε (183). Το μοτίβο σήμανσης ήταν το ακόλουθο: έξι δείγματα Th17 κυττάρων-μαρτύρων σημάνθηκαν με TMTpro-126, TMTpro-127N, TMTpro-127C, TMTpro-128N, TMTpro-128C, και TMTpro-129N; τα έξι δείγματα Act-A treated Th17 κυττάρων σημάνθηκαν με TMTpro-129C, TMTpro-130N, TMTpro-130C, TMTpro-131N, TMTpro-131C, και TMTpro-132N. Τα δείγματα των πεπτιδίων αναμείχθηκαν, στη συνέχεια κλασματώθηκαν με υψηλής καθαρότητας υγρή χρωματογραφία (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) με RP C4 stationary phase chemistry (Kromasil 150 × 2.1 mm, 3.5 µm particle, 100 Å pore size, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) χρησιμοποιώντας κινητή φάση, υπό κλίση και αλκαλικές συνθήκες, όπως περιγράφεται (183). Τα τμήματα πεπτιδίων, συνενώθηκαν, μετά αποξηράθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση της φασματομετρίας μάζας. Η ανάλυση υγρής-χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας (LC-MS) πραγματοποιήθηκε στο EASY-nLC 1000 (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) σε συνδυασμό με το φασματογράφο μάζας Orbitrap Eclipse Tribrid (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Τα δείγματα των πεπτιδίων επαναδιαλύθηκαν σε 2% ACN, 0.2% φορμικό οξύ, και 3-4µg πεπτιδίων ανά δείγμα φορτώθηκε στη μονολυθική στήλη

(Capillary EX-Nano MonoCap C18 HighResolution 2000, 0.1 x 2000 mm, Merck, Darmstadt Germany) συνδυαστικά με ένα silica coated PicoTip πομπό (New Objective FS360-20-10-D) και διαχωρίστηκαν για περισσότερα από 180 λεπτά, με ρυθμό 0.5  $\mu$ l/λεπτό με την ακόλουθη διαβάθμιση: 2–6% Διαλύτης B (10 λεπτά), 6–40% B (135 λεπτά), 40–100% B (1 λεπτό), και 100% B (34λεπτά). Ο διαλύτης A αποτελούταν από 97.8% H<sub>2</sub>O, 2% ACN, και 0.2% φορμικό οξύ, και ο διαλύτης B, από 19.8% H<sub>2</sub>O, 80% ACN, και 0.2% φορμικό οξύ.



**Σχήμα 12.** Δύο επιπέδων πειραματική ροή εργασιών για την πρωτεϊνική ποσοτικοποίηση

### **Πρωτεομική ανάλυση δεδομένων και βιοστατιστική ανάλυση**

Μη επεξεργασμένα πρωτογενή δεδομένα καταγράφηκαν στο Proteome Discoverer 2.3, για αναζήτηση στόχου με τη χρήση του Byonic. Χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων UniProtKB *mus musculus* (ημερομηνία κυκλοφορίας Ιανουάριος 2020). Η αναζήτηση επέτρεπε μέχρι δύο χαμένες περιοχές/cleavages και ανοχή μάζας 10ppm, ελάχιστο μήκος πεπτιδίων έξι και μέγιστο

με δύο ποικίλες τροποποιήσεις (one equal): οξείδωση (M), απαμίδωση (N, Q), ή φωσφορυλίωση (S, T, Y). Methylthio (C) και TMTpro (K, N-terminus) ορίστηκαν σα σταθερές τροποποιήσεις. FDR διορθωμένη p-τιμή σε επίπεδο πεπτιδίων, ορίστηκε σε <0.01. Το ποσοστό συν-απομόνωσης excluding peptides από την ποσοτικοποίηση ορίστηκε σε 50. Η TMT αναλογία πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκε με το μέσο όρο και λογαριθμίστηκε με βάση το 2. Υπολογίσαμε την αναλογία των act-A treated κυττάρων έναντι των κυττάρων-μαρτύρων, ανά ποντίκι και στη συνέχεια τη λογαριθμίσουμε με βάση το 2. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση T-Test με Benjamini, Krieger και Yekutieli διορθώσεις. Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με  $q < 0.05$ , θεωρήθηκαν σα διαφορεικά εκφραζόμενες στα act-A-Th17 κύτταρα, συγκριτικά με τα Th17 κύτταρα. Η ανάλυση IPA χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστούν σημαντικές αυξήσεις στα κανονικά μονοπάτια, στα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και στους upstream ρυθμιστές. Χρησιμοποιήθηκε DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) για να ταυτοποιήσουμε σημαντικούς υπερ- αντιπροσωπευμένους GO όρους. Σαν κατώφλιος τιμή σημαντικότητας ορίστηκε το  $p \leq 0.05$ .

### **Διαθεσιμότητα δεδομένων**

Τα αποτελέσματα από το RNA-Seq, που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη είναι διαθέσιμα στο Gene Expression Omnibus (GEO) Dataset και έχουν αριθμό πρόσβασης GSE146439 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE146439>). Τα δεδομένα από την πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μάζας, έχουν καταγραφεί στο ProteomeXchange Consortium μέσω PRIDE partner repository, με το αναγνωριστικό PXD017757 (<http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD017757>).

### **Στατιστική ανάλυση**

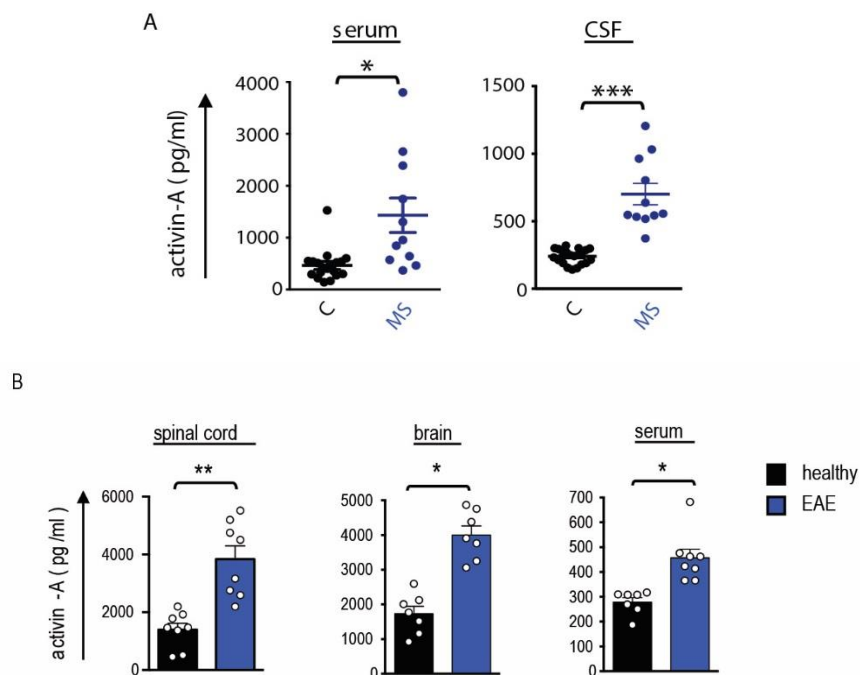
Ο αριθμός των ανεξάρτητων πειραμάτων, οι βιολογικές επαναλήψεις και οι δότες που αναλύθηκαν, παρουσιάζονται σε κάθε λεζάντα εικόνας. Το Graph Pad Prism Version 6 (Graph Pad Software Inc.) χρησιμοποιήθηκε για τις στατιστικές αναλύσεις. Όλα τα δεδομένα παρουσιάστηκαν σαν mean  $\pm$  SEM. Για να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, εφαρμόστηκαν Student's t test, one-way και two-way ANOVA, με ακόλουθη διόρθωση

Bonferroni, Mann-Whitney test και Wilcoxon matched-pairs signed rank test ανάλογα με την περίπτωση. Θεωρήσαμε κάθε διαφορά με τιμή  $p \leq 0.05$  ως στατιστικά σημαντική (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  και \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Η ακτιβίνη-A αυξάνεται στο ΚΝΣ ασθενών με RRMS.

Αρχικά, μελετήσαμε την έκφραση της ακτιβίνης-A σε άτομα με ΣΚΠ υποτροπιάζουσας μορφής, όταν βρίσκονταν σε περίοδο ύφεσης (Πίνακας 1). Τα ευρήματά μας έδειξαν αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων της ακτιβίνης-A, στο ΕΝΥ και στον ορό των ασθενών, συγκρινόμενα με αυτά των μαρτύρων, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο της στη ρύθμιση της ΣΚΠ (Εικ. 1Α). Ομοίως, ανιχνεύσαμε και μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ακτιβίνης-A στο νωτιαίο μυελό, στον ορό και στον εγκέφαλο C57BL/6 ποντικών με ΠΑΕ, επαγόμενη από ανοσοποίηση με το πεπτίδιο της μυελίνης MOG<sub>35-55</sub>, γαλακτοποιημένο με CFA (Εικ. 1Β).



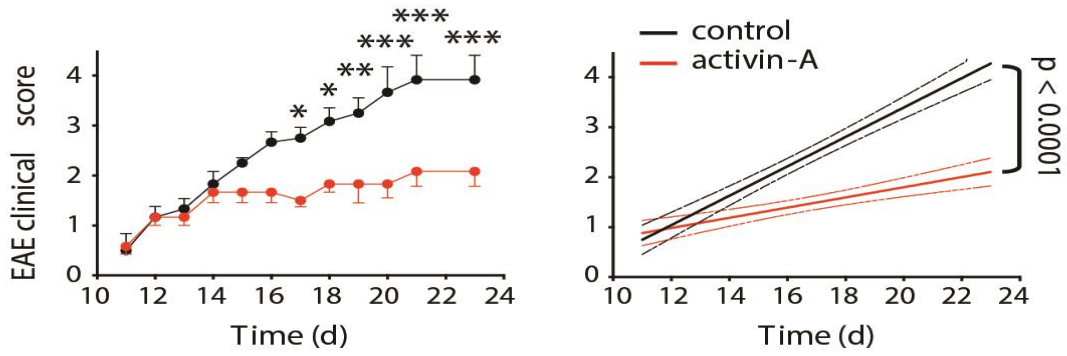
**Εικόνα 1.** Αυξημένα επίπεδα της ακτιβίνης-A σε ασθενείς με ΣΚΠ και πειραματόζωα με ΠΑΕ.

(Α) Η έκφραση της ακτιβίνης-A σε ασθενείς με ΣΚΠ (n=11) και σε μάρτυρες (n=20). Κάθε σύμβολο αντιστοιχεί σε ένα δότη. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε με το Mann-Whitney test, CSF=cerebrospinal fluid (εγκεφαλονωτιαίο υγρό). (Β) Επίπεδα ακτιβίνης-A σε δείγματα νωτιαίου μυελού, εγκεφάλου και ορού υγιών ποντικών και ποντικών με ΠΑΕ. Κάθε κυκλικό σημείο αποτελεί το mean±SEM τριών επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα ποντίκι (n=7-8 ποντίκια/ομάδα). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από δύο ανεξάρτητα *in vivo* πειράματα.

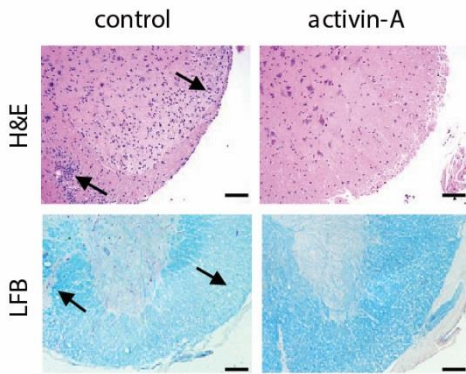
## **In vivo χορήγηση της ακτιβίνης-A περιορίζει την κλινική σοβαρότητα της ΠΑΕ.**

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω ευρήματα, μελετήσαμε το ρόλο της ακτιβίνης-A στην αυτοάνοση φλεγμονή του ΚΝΣ. Για το λόγο αυτό, χορηγήσαμε ακτιβίνη-A συστηματικά στα ποντίκια, κάθε τρεις μέρες μετά την έναρξη της ΠΑΕ, σε θεραπευτικό πλαίσιο. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η χορήγηση της ακτιβίνης-A μείωσε τη σοβαρότητα της ΠΑΕ, όπως αποδείχτηκε από τη στατιστικά σημαντική μείωση της απώλειας της κίνησης και της παράλυσης, κατά την κλινική αξιολόγηση, ενώ τα ποντίκια-μάρτυρες (λάμβαναν PBS), παρουσίασαν την τυπική εξέλιξη της νόσου (Εικ. 2Α). Επιβεβαιωτικά δεδομένα από ιστοπαθολογικές αναλύσεις αποκάλυψαν σημαντική μείωση της ανοσοκυτταρικής διήθησης και της απομυελίνωσης στο νωτιαίο μυελό (Εικ. 2Β). Η μείωση της ΠΑΕ, από την ακτιβίνη-A, συνδυάστηκε επίσης με σημαντικά μειωμένες συχνότητες των ΚΝΣ-διηθούντων φλεγμονωδών κυττάρων CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>, όπως και των IL-17<sup>+</sup>, IFN-γ<sup>+</sup> και IL-17<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T κυττάρων (Εικ. 2C & 2D). Σε συμφωνία με την καταστολή της διήθησης των φλεγμονωδών κυττάρων, η ακτιβίνη-A μείωσε και την παραγωγή των GM-CSF, TNF-α και IL-1β στο ΚΝΣ (Εικ. 2Ε). Σε αντίθεση, τα επίπεδα της IL-10 αυξήθηκαν σημαντικά στο νωτιαίο μυελό, μετά τη θεραπευτική χορήγηση της ακτιβίνης-A (Εικ. 2Ε).

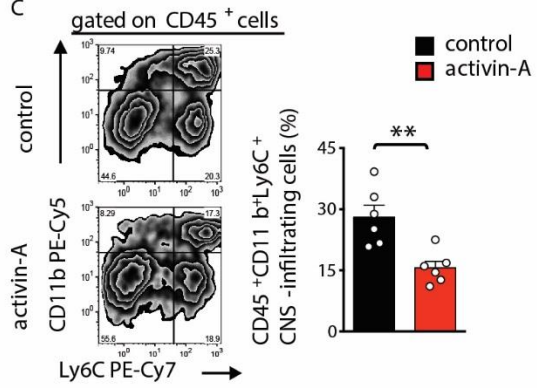
A



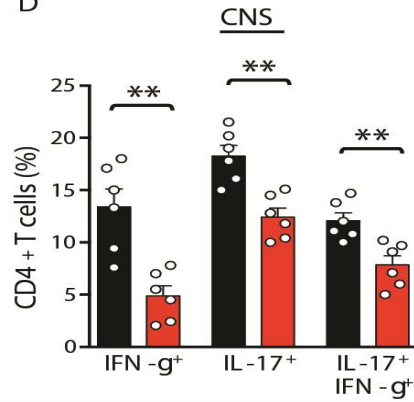
B



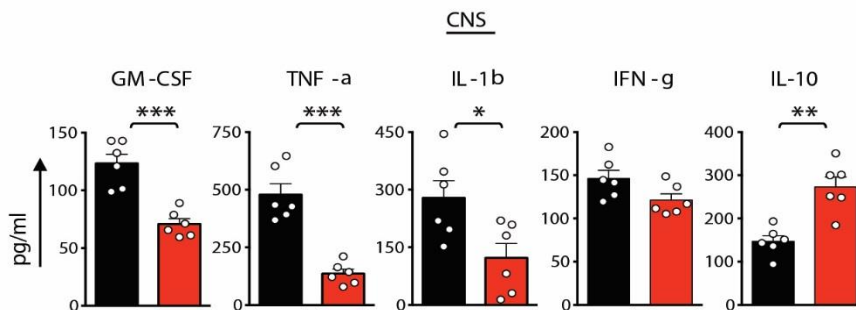
C



D



E

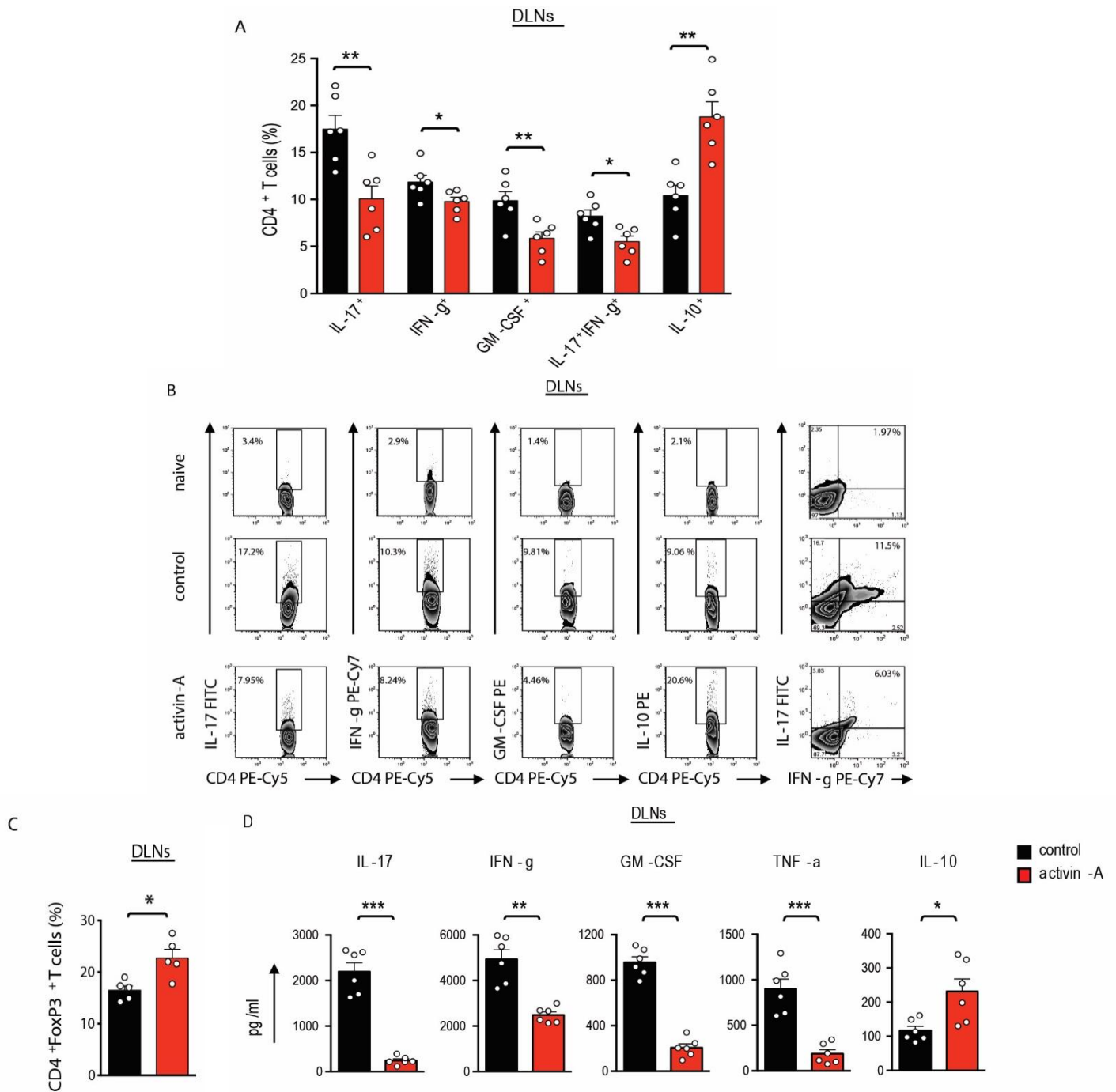


## **Εικόνα 2. In vivo χορήγηση της ακτιβίνης-A περιορίζει την κλινική σοβαρότητα της ΠΑΕ.**

(A) ΠΑΕ επάχθηκε σε ποντίκια C57BL/6, με υποδόρια ανοσοποίηση με πεπτίδιο MOG35-55 σε CFA και ένεση PTX. Χορηγήθηκαν ακτιβίνη-A ή μάρτυρας (PBS) (ενδοπεριτοναϊκά), από την έναρξη της νόσου (ημέρες 10-12) και κάθε 3 ημέρες μέχρι τη θυσία. Απεικονίζονται η κλινική αξιολόγηση και η γραμμική συσχέτιση. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν με 95% τα όρια αξιοπιστίας της γραμμικής συσχέτισης. Η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται με two-way ANOVA και ακολουθήθηκε η εφαρμογή Bonferroni's multiple comparisons test. (B) Αντιπροσωπευτικές χρώσεις αιματοξυλίνης/εοσίνης (H&E) και Luxol Fast Blue (LFB) σε τομές νωτιαίου μυελού (κλίμακας, 50μm). (C) Αντιπροσωπευτικά FACS γραφήματα (αριστερά) και συγκεντρωτικά δεδομένα (δεξιά), που απεικονίζουν διηθούντα μυελοειδή κύτταρα στο ΚΝΣ. (D) Συγκεντρωτικά δεδομένα που δείχνουν τα ποσοστά των ΚΝΣ-διηθούντων κυττάρων και τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες. (E) Παραγωγή κυτταροκινών σε ομογενοποιημένα νωτιαίου μυελού. Τα δεδομένα είναι mean±SEM τριπλής επανάληψης και κάθε κυκλικό σημείο αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι. Τα αποτελέσματα (A-E) είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n=6 ποντίκια/ομάδα). Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν με Student's t test \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, και \*\*\*p < 0.001.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την επίδραση της ακτιβίνης-A στις αποκρίσεις των εγκεφαλοτοξικών T κυττάρων, αναλύσαμε τη δευτερογενή απόκρισή τους κατά την επανέκθεση στο πεπτίδιο MOG35-55. Οι αναλύσεις της κυτταρομετρίας ροής, έδειξαν ότι τα κύτταρα των περιφερικών λεμφαδένων από ποντίκια που έχουν λάβει ακτιβίνη-A είχαν σημαντικά μειωμένες συχνότητες IL-17<sup>+</sup>, GM-CSF<sup>+</sup>, IFN-γ<sup>+</sup> και IL-17<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T κυττάρων, μετά την επανενεργοποίησή τους με το αυτοαντιγόνο *ex vivo* (Εικ. 3A & 3B). Αντίθετα, παρατηρήσαμε μια σχεδόν διπλάσια αύξηση των ποσοστών των IL-10<sup>+</sup> και Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T κυττάρων στα ποντίκια όπου είχε χορηγηθεί ακτιβίνη-A, συγκριτικά με τους μάρτυρες που είχαν λάβει PBS (Εικ. 3A, 3B & 3C). Σε συμφωνία με τα δεδομένα από την κυτταρομετρία ροής, η έκλυση IL-17, GM-CSF, IFN-γ και TNF-α σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών περιφερικών λεμφαδένων είχε μειωθεί σημαντικά, ταυτόχρονα με μια αξιοσημείωτη αύξηση της παραγωγής IL-10, στα ποντίκια που είχαν λάβει ακτιβίνη-A (Εικ. 3D). Συγκεντρωτικά, τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η *in vivo* χορήγηση της ακτιβίνης-A μειώνει την κλινική σοβαρότητα της ΠΑΕ και σχετίζεται με μειωμένες αποκρίσεις των εγκεφαλοτοξικών T δραστικών κυττάρων.





**Εικόνα 3. *In vivo* χορήγηση της ακτιβίνης-A μειώνει την ΠΑΕ και καταστέλλει τις T δραστικές αποκρίσεις.**

(Α) Συγκενρωτικά δεδομένα που απεικονίζουν τα ποσοστά των T κυττάρων που εκκρίνουν κυτταροκίνες στους περιφερικούς λεμφαδένες μετά από επανέκθεση *ex vivo* με MOG35-55. (Β) Αντιπροσωπευτικά κυτταρομετρικά γραφήματα που απεικονίζουν τα ποσοστά των T κυττάρων που εκκρίνουν κυτταροκίνες στους περιφερικούς λεμφαδένες μετά από *ex vivo* MOG35-55 επανέκθεση, που προέρχονται από ποντίκια που έχουν λάβει ακτιβίνη-A ή μάρτυρες (PBS), όπως στο Εικ. 2Α Παρουσιάζεται επίσης η παραγωγή κυτταροκινών από T κύτταρα περιφερικών

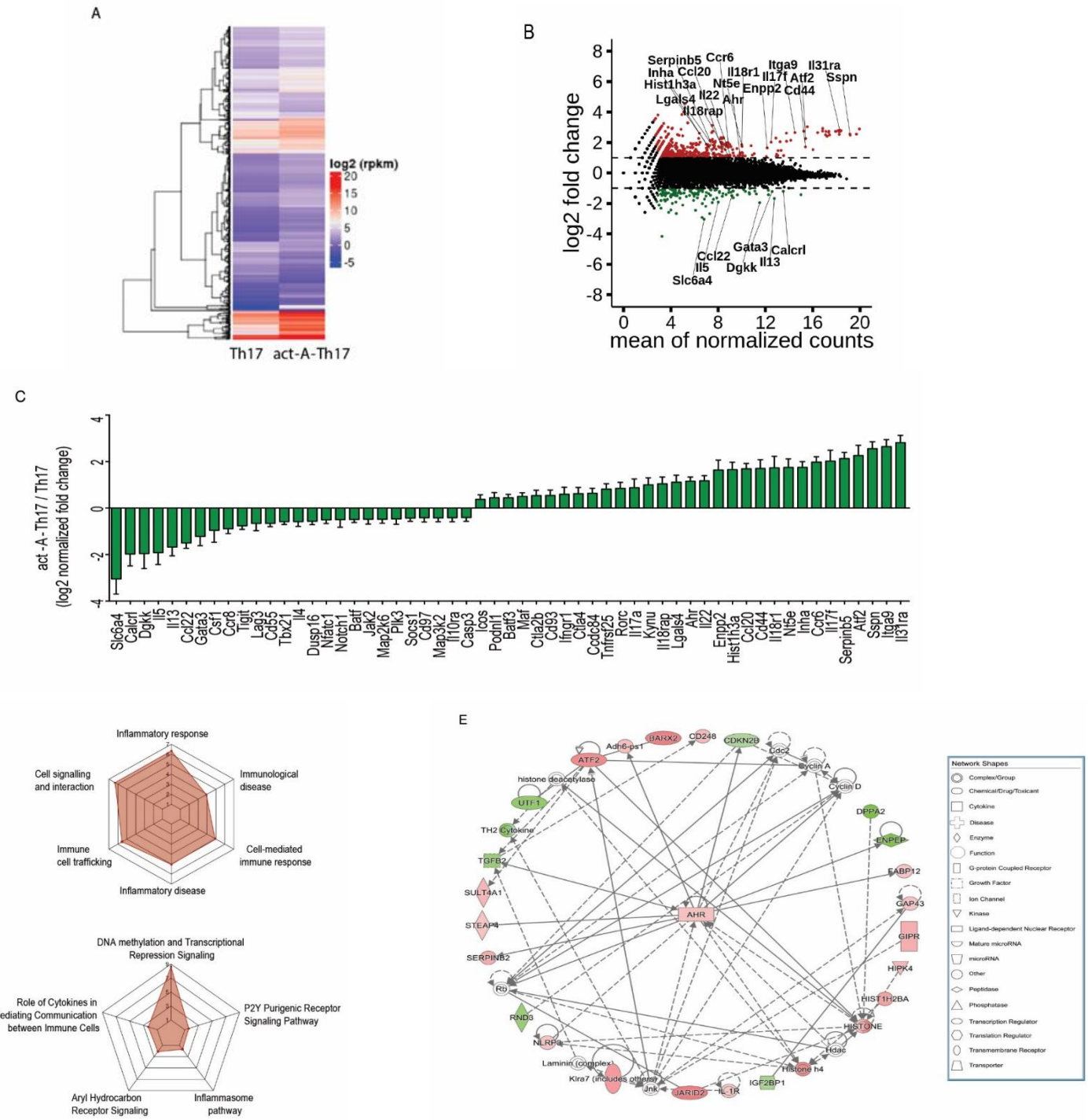
λεμφαδένων από μη ανοσοποιημένα ποντίκια. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από τρία ανεξάρτητα πειράματα (n=6 ποντίκια/ομάδα). (C) Συγκεντρωτικά δεδομένα, που απεικονίζουν τα ποσοστά των CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T κυττάρων σε περιφερικούς λεμφαδένες ποντικών που έχουν λάβει ακτιβίνη-A ή μάρτυρες (PBS). Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ποντίκι (n=5 ποντίκια/ομάδα). Στατιστικά σημαντικές διαφορές εξετάστηκαν μέσω Student's t test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. (D) Απελευθέρωση κυτταροκινών σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών από περιφερικούς λεμφαδένες. Τα δεδομένα είναι mean±SEM τριπλής επανάληψης. Τα αποτελέσματα (A&D) είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n=6 ποντίκια/ομάδα). Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν με Student's t test \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, και \*\*\*p < 0.001.

### **Η ακτιβίνη-A καταστέλλει το παθογενετικό προφίλ των Th17 κυττάρων.**

Βασιζόμενοι στην καταστολή των παθογενετικών Th17- σχετιζόμενων δραστικών αποκρίσεων και της ΠΑΕ, διερευνήσαμε ακολούθως εάν η ακτιβίνη-A επηρεάζει τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων. Στα πειράματα αυτά, διαφοροποιήσαμε αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, υπό φλεγμονώδεις Th17 συνθήκες (IL-1β, IL-6 και IL-23), παρουσία ακτιβίνης-A (actin-A-treated Th17 cells/ act-A-Th17) ή μάρτυρα (PBS) (Th17 κύτταρα) και αναλύσαμε το γονιαδιακό προφίλ έκφρασής τους μέσω RNA αλληλούχισης (RNA Sequencing –RNA Seq). Η διαφορική γονιδιακή ανάλυση, συνοψίζεται σε ένα MA γράφημα και οπτικοποιείται σε ένα heat map, αποκαλύπτοντας αξιοσημείωτες διαφορές στο μεταγράφομα των act-A-Th17 κυττάρων με 972 γονίδια στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένα [περισσότερο από 2-φορές (log<sub>2</sub> (FC) < -1 ή > 1)], 741 εκ των οποίων ήταν αυξημένα και 231 μειωμένα, σε σχέση με τα Th17 κύτταρα (Εικ. 4A & 4B).

Ανιχνεύσαμε σημαντική μείωση των γονιδίων που σχετίζονται με το παθογενετικό προφίλ των Th17 κυττάρων, όπως *Tbx21* και *Batf*, ενώ γονίδια σχετιζόμενα με μη παθογενετικά Th17 κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των *Ahr*, *Maf* και *Ctla4*, είχαν αυξηθεί στα act-A Th17 κύτταρα (Εικ. 4B & 4C) (146-148, 153, 154). Οι μελέτες με το πρόγραμμα IPA και gene ontology (GO) κατέδειξαν ενίσχυση του «Ρόλου των Κυτταροκινών που παρεμβαίνουν στην επικοινωνία μεταξύ των Ανοσοκυττάρων»/ ‘Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells’, «Της κυκλοφορίας των ανοσοκυττάρων»/ ‘Immune cell trafficking’ και «Φλεγμονωδών και Κυτταρομεσολαβούμενων ανοσοαποκρίσεων»/ ‘Inflammatory and Cell-mediated immune

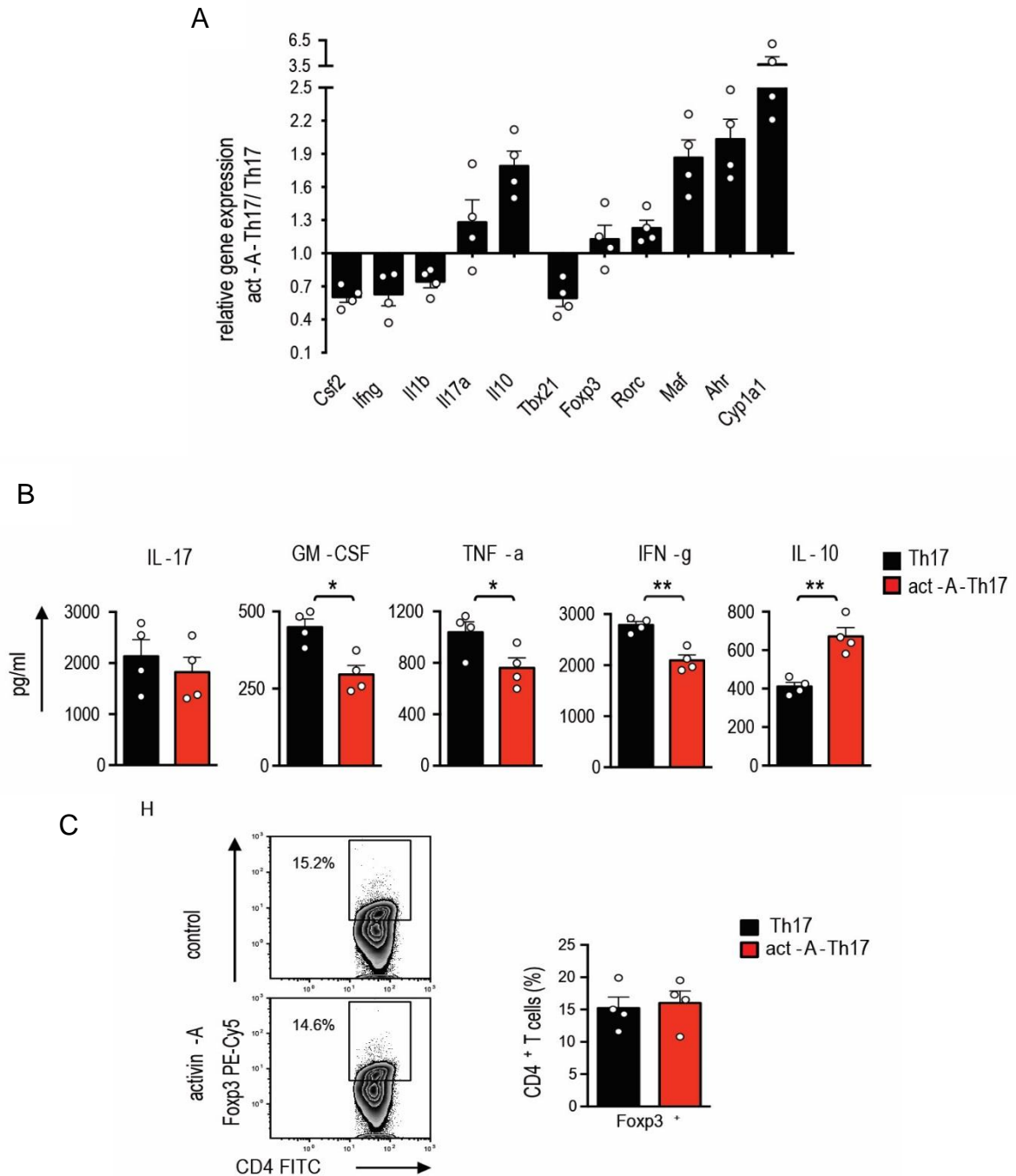
response' μεταξύ των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (differentially expressed genes-DEGs) στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 4D). Επιπλέον, αποκαλύφθηκε ένα ενισχυμένο δίκτυο μοριακών αλληλεπιδράσεων στα act-A-Th17 κύτταρα που σχετίζεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του AhR, ενός μεταγραφικού παράγοντα, γνωστού για την επίδραση του στην T κυτταρική διαφοροποίηση (142) (Εικ. 4E).



**Εικόνα 4. Η ακτιβίνη-A καταστέλλει το παθογενετικό προφίλ των Th17 κυττάρων.**

(A) Heatmap και ιεραρχική ομαδοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (logarithmized rpkm values) απεικονίζουν το μεταγραφικό προφίλ των 972 DEGs ( $\log_2(FC) \geq 1$ ) στα act-A-Th17 κύτταρα, αναφορικά με τα Th17 κύτταρα. (B) Αθώα CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T κύτταρα, απομονώθηκαν από σπλήνα και λεμφαδένες ποντικών C57BL/6, ενεργοποιήθηκαν με anti-CD3/CD28, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 και ακτιβίνη-A (act-A-Th17 κύτταρα) ή PBS (Th17 κύτταρα). Λογαριθμικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (y-άξονας) και ο μέσος όρος των φυσιολογικών μετρήσεων (x-άξονας) στα act-A-Th17 κύτταρα, συγκριτικά με τα Th17 κύτταρα παρουσιάζονται σαν MA plot (red:  $\log_2FC > 1.5$ , green:  $dFC < -1.5$ ). (C) Παρουσίαση 57 DEGs στα act-A-Th17 κύτταρα συγκριτικά με τα Th17 κύτταρα. (D) Ιστογράμματα που συνοψίζουν τα φυσιολογικά μονοπάτια, τις κατηγορίες ασθενειών καθώς και λειτουργίες που ενισχύονται στα 972 DEGs στα act-A-Th17 κύτταρα. Αναλύσεις έγιναν στο IPA και οι τιμές των αξόνων αντιπροσωπεύουν το σημαντικό επίπεδο κάθε ευρήματος, εκφραζόμενο σε λογάριθμο του 10 (p value). (E) AhR-σχετιζόμενο μοριακό δίκτυο, όπως ταυτοποιήθηκε από τα 972 DEGs, απεικονίζεται σε radical layout. Τα χρώματα των γονιδιακών κόμβων απεικονίζουν την αύξηση (κόκκινο), τη μείωση (πράσινο) και την έλλειψη πληροφορίας σχετικά με τις διαφορές έκφρασης. Οι συμπαγείς ευθείες δείχνουν άμεσες συσχετίσεις και οι διακεκομμένες δείχνουν έμμεσες σχέσεις. Τα δεδομένα B-E είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων *in vivo* πειραμάτων.

Για να επιβεβαιώσουμε τα ευρήματα που προέκυψαν από το RNA-Seq, πραγματοποιήσαμε αναλύσεις qPCR. Πράγματι, τα Th17 κύτταρα που είχαν διαφοροποιηθεί παρουσία ακτιβίνης-A, παρουσίασαν μειωμένη έκφραση των *Ifng*, *Csf2*, *Tbx21* και *Il1b* γονιδίων, που σχετίζονται με τις παθογενετικές λειτουργίες των Th17 κυττάρων, επιδεικνύοντας ταυτόχρονα όμως αυξημένα επίπεδα mRNA των *Il10*, *Ahr* και *Maf*, που σχετίζονται με μη παθογενετικά κύτταρα (Εικ. 5A) (75,76,146). Υποστηρικτικά με τις βιοπληροφορικές αναλύσεις, παρατηρήσαμε ότι η ακτιβίνη-A αύξησε σχεδόν 4 φορές την έκφραση του ξενοβιοτικού μεταβολικού ενζύμου, κυτόχρωμα P450 (που κωδικοποιείται από το *Cyp1a1*), το οποίο αποτελεί κύριο μεταγραφικό στόχο του AhR (Εικ. 5A) (138). Το προφίλ των κυτταροκινών επίσης έδειξε ότι η ακτιβίνη-A κατέστειλε την έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IFN- $\gamma$ , GM-CSF και TNF- $\alpha$  στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών, συνδυαστικά με σημαντική αύξηση της παραγωγής της αντι-φλεγμονώδους IL-10 (Εικ. 5B). Σε συμφωνία των δεδομένων από την qPCR, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Foxp3 παρέμεναν ανεπηρέαστα στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 5C). Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα ότι τα επίπεδα των *Il17* και *Rorc*, δεν τροποποιήθηκαν, υποδεικνύοντας ότι αν και η ακτιβίνη-A μειώνει την έκφραση κρίσιμων παθογενετικών γονιδίων, διατηρεί την έκφραση των παραγόντων που σχετίζονται με το θεμελιώδες Th17 κυτταρικό πρόγραμμα (Εικ. 5A & 5B) (43, 146,147,153,154).

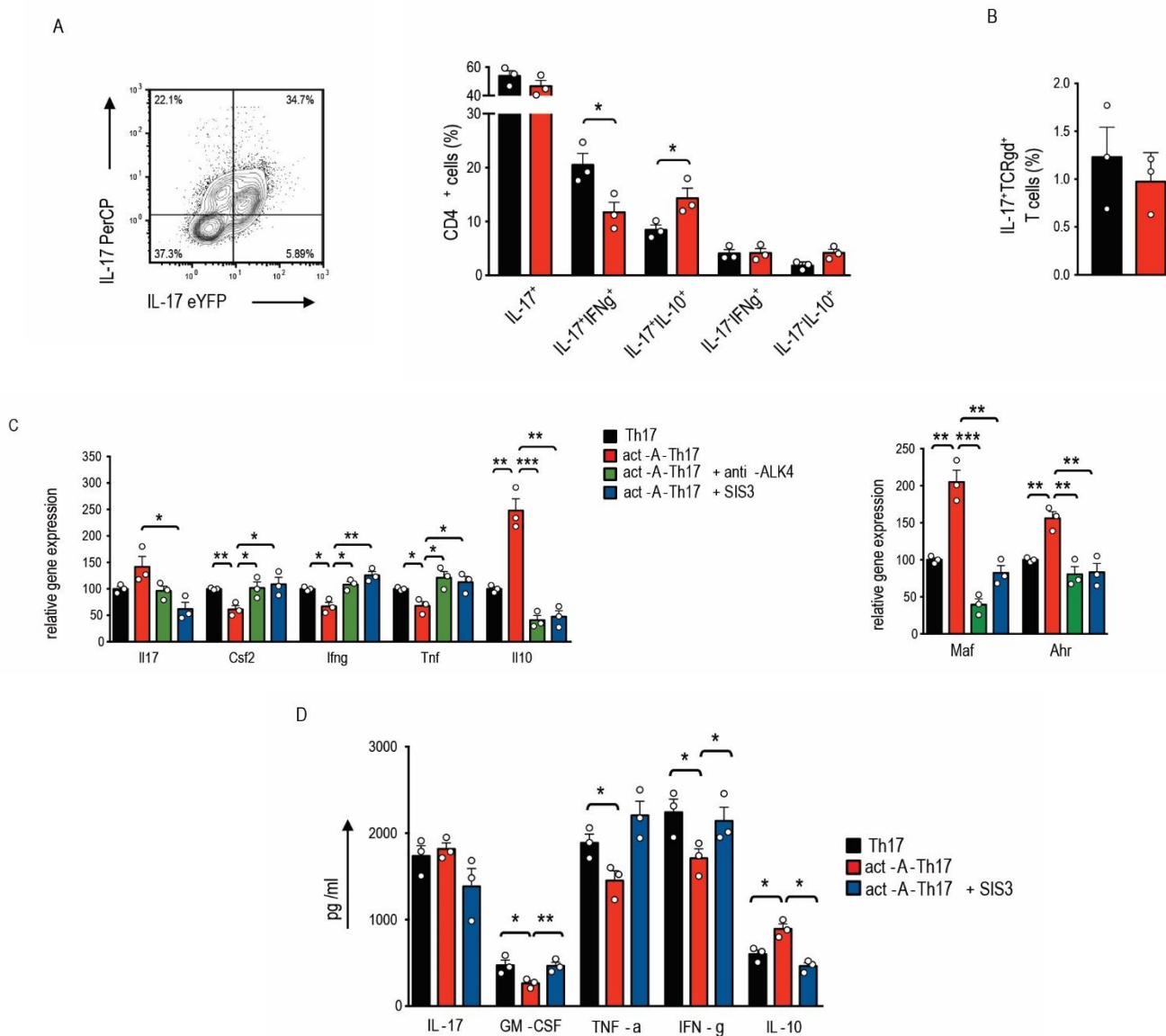


**Εικόνα 5.** Η ακτιβίνη-A μειώνει την έκφραση παθογενετικών γονιδίων στα Th17 κύτταρα. (A) Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα, δημιουργήθηκαν όπως στο (4A). Το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης αναλύθηκε με qPCR και για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, διπλής επανάληψης και σχετίζεται με ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (B) Απελευθέρωση κυτταροκινών σε υπερκείμενα T κυτταρικών καλλιιεργειών. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει mean±SEM τριπλής επανάληψης και σχετίζεται με ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test, \* $p < 0.05$  και \*\* $p < 0.01$ . (C) Αντιπροσωπευτικά γραφήματα

κυτταρομετρίας ροής (αριστερά) και συγκεντρωτικά αποτελέσματα (δεξιά), απεικονίζουν την έκφραση του Foxp3, στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ανεξάρτητο *in vivo* πείραμα (n=4).

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω την κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στο παθογενετικό προφίλ των Th17 κυττάρων, χρησιμοποιήσαμε τα ποντίκια αναφοράς *Il17a<sup>Cre</sup>R26R<sup>eYFP</sup>*. Εν συντομία, αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα απομονώθηκαν με κυτταροδιαχωριστή από τα ποντίκια *Il17a<sup>Cre</sup>R26R<sup>eYFP</sup>*, διαφοροποιήθηκαν όπως αναφέρεται ανωτέρω, παρουσία ακτιβίνης-A, και αναλύθηκε το προφίλ των κυτταροκινών τους. Όπως αναμενόταν, τα ποσοστά των IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> και IL-17<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T κυττάρων, μαζί με τα  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T κύτταρα που εκκρίνουν IL-17, ήταν χαμηλότερα από αυτά των Th17 κυττάρων, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων (Εικ. 6A & 6B) (156). Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα, η ακτιβίνη-A μείωσε σημαντικά τα ποσοστά των IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> Th17 κυττάρων, που αναφέρονται ως παθογενετικά, και αύξησε τα ποσοστά των μη παθογενετικών IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> Th17 κυττάρων (Εικ. 6A).

Ακολούθως, μελετήσαμε εάν η ακτιβίνη-A καταστέλλει τη διαφοροποίηση των παθογενετικών Th17 κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κανονικών σηματοδοτικών μονοπατιών της. Παρατηρήσαμε ότι η προσθήκη του SIS3, που είναι αναστολέας του Smad3 ή παρεμποδιστικού αντισώματος έναντι του κύριου υποδοχέα ALK4, ανέστρεψε την αύξηση των *Il10*, *Ahr* και *Maf*, που οφειλόταν στην ακτιβίνη-A στα Th17 κύτταρα, ενώ αύξησε την έκφραση των *Ifng*, *Tnf* και *Csf2*, σε επίπεδα ίδια με αυτά των Th17 κυττάρων (Εικ. 6C). Ομοίως, η παραγωγή των GM-CSF, TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  αυξήθηκαν στα act-A-Th17 κύτταρα παρουσία του SIS3, ενώ δεν υπήρχε αύξηση της IL-10 (Εικ. 6D). Συγκεντρωτικά, αυτά τα αποτελέσματα, ταυτοποιούν την ακτιβίνη-A σαν ένα νέο αρνητικό ρυθμιστή του παθογενετικού μεταγραφικού προφίλ των Th17 κυττάρων.



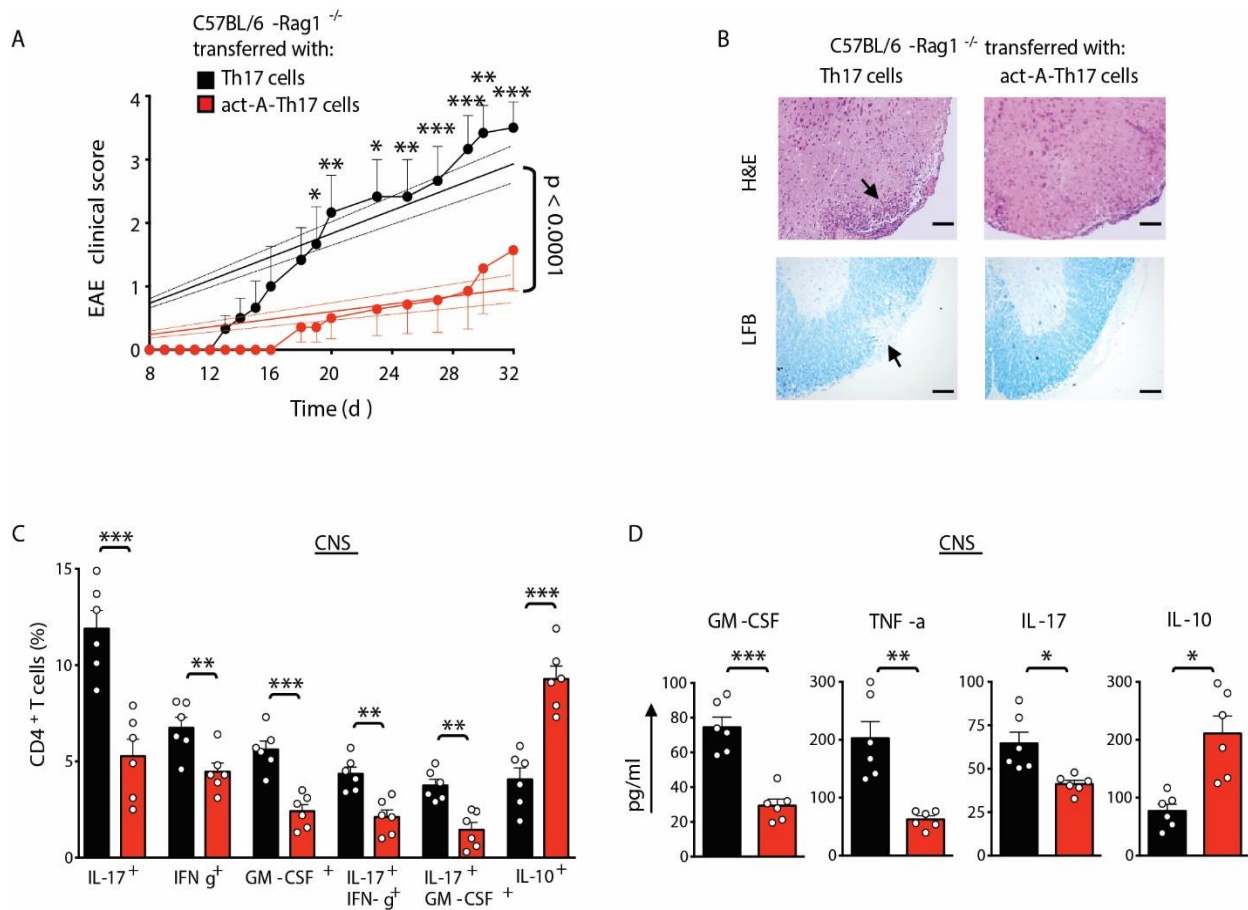
**Εικόνα 6. Η ακτιβίνη-A περιορίζει τα παθογενετικά Th17 κύτταρα.**

(A) Th17 ή act-A-Th17 κύτταρα δημιουργήθηκαν από ποντίκια Il17aCreR26ReYFP, όπως στο Εικ. 2. Αντιπροσωπευτικά γραφήματα κυτταρομετρίας ροής (αριστερά) και συγκεντρωτικά αποτελέσματα (δεξιά), απεικονίζουν την έκφραση κυτταροκινών στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα και (B) στα IL-17<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> T κύτταρα. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ανεξάρτητο *in vitro* πείραμα (n=3). (C) Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, δύο επαναλήψεων και απεικονίζει ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=3). (D) Έκκριση κυτταροκινών σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών Th17 ή act-A-Th17 κυττάρων. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, τριών επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=3). Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001.

## **Η ακτιβίνη-A περιορίζει την εγκεφαλοτοξική δράση των Th17 κυττάρων.**

Δεδομένου του ευρήματός μας που αφορούσε την κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στο παθογενετικό προφίλ των Th17 κυττάρων, εξετάσαμε στη συνέχεια εάν η ακτιβίνη-A μπορεί να περιορίσει τις εγκεφαλοτοξικές δράσεις τους *in vivo*. Για να το διερευνήσουμε αυτό, απομονώθηκαν κύτταρα περιφερικών λεμφαδένων από ποντίκια C57BL/6, ανοσοποιημένα με CFA/πεπτίδιο της μυελίνης (MOG<sub>35-55</sub>), και επανενεργοποιήθηκαν με MOG<sub>35-55</sub> *in vitro*, υπό συνθήκες Th17 κυτταρικής διαφοροποίησης, παρουσία ακτιβίνης-A (146,147,155). Στη συνέχεια, CD4<sup>+</sup> T κύτταρα απομονώθηκαν από τις κυτταροκαλλιέργειες και μεταφέρθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα *Rag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια-δέκτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση της κλινικής εικόνας και της ιστοπαθολογίας κατά την εξέλιξη της νόσου, στα *Rag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια που είχαν λάβει act-A-Th17 κύτταρα, αποκάλυψε σημαντικά μειωμένο κλινικό σκορ, ελαττωμένη διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων καθώς και περιορισμένη απομυελίνωση στο νωτιαίο μυελό, συγκριτικά με τα ποντίκια που είχαν λάβει Th17 κύτταρα (Εικ. 7A & 7B). Η μειωμένη σοβαρότητα της ΠΑΕ συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένα ποσοστά των IL-17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, GM-CSF<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> και IL-17<sup>+</sup>GM-CSF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T διηθούντων κυττάρων στο ΚΝΣ, ενώ τα ποσοστά των IL-10<sup>+</sup> T κυττάρων ήταν αυξημένα (Εικ. 7C). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα επίπεδα των GM-CSF, TNF- $\alpha$  και IL-17 στο ΚΝΣ μειώθηκαν, με ταυτόχρονο διπλασιασμό των επιπέδων της IL-10 (Εικ. 7D).

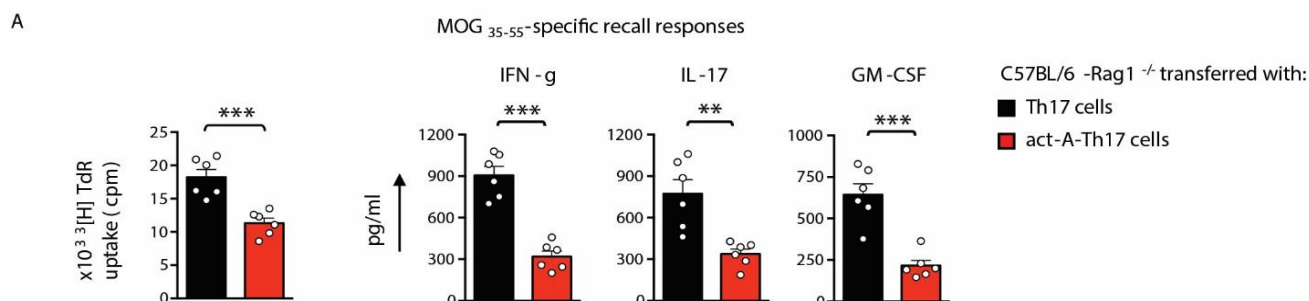




**Εικόνα 7. Η ακτιβίνη-A καταστέλλει την εγκεφαλοτοξικότητα των Th17 κυττάρων.**

(A) Κλινική αξιολόγηση της ΠΑΕ σε C57BL/6-Rag1<sup>-/-</sup> ποντίκια που έχουν λάβει CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που προέρχονται από ανοσοποιημένα ποντίκια με CFA/MOG35-55 και έχουν ενεργοποιηθεί για 3 ημέρες με MOG35-55, IL-23 και ακτιβίνη-A (act-A-Th17 κύτταρα) ή PBS (Th17 κύτταρα). Παρουσιάζεται επίσης, συγκριτική ανάλυση και γραμμική συσχέτιση των κλινικών σκορ. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν με 95% τα όρια αξιοπιστίας της γραμμικής συσχέτισης. Η στατιστική διαφορά αξιολογήθηκε με two-way ANOVA, και ακολούθησε το Bonferroni's multiple comparisons test (n=6 ποντίκια/ομάδα). (B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες αιματοξυλίνης/εοσίνης (H&E) και LFB (Luxol Fast Blue) σε τομές νοτιαίου μυελού (κλίμακας, 50  $\mu$ m). (C) Συγκεντρωτικά δεδομένα που δείχνουν τα ποσοστά των ΚΝΣ-διηθούντων κυττάρων και των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων που εκκρίνουν κυτταροκίνες. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιστοιχεί σε ένα ποντίκι. Τα δεδομένα είναι mean $\pm$ SEM (n=6 ποντίκια/ομάδα). (D) Απελευθέρωση κυτταροκινών σε ομογενοποιήματα νοτιαίου μυελού. Τα δεδομένα είναι mean $\pm$ SEM τριών επαναλήψεων (n=6 ποντίκια/ομάδα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εξετάστηκαν με Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, και \*\*\*p < 0.001. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν ένα από δύο ανεξάρτητα *in vivo* πειράματα.

Σε συμφωνία με τα ευρήματα στο ΚΝΣ, ο έλεγχος των T κυτταρικών αποκρίσεων μετά από επανέκθεση των λεμφοκυττάρων, από τους περιφερικούς λεμφαδένες, στο MOG35-55, έδειξε ότι ο T κυτταρικός πολλαπλασιασμός, συνδυαστικά με την έκκριση των IL-17, GM-CSF και IFN- $\gamma$ , μειώθηκε σημαντικά στα ποντίκια-δέκτες των act-A-Th17 κυττάρων (Εικ. 8A). Συνολικά, όλα τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, αποκαλύπτουν ότι η ακτιβίνη-A περιορίζει την εγκεφαλοτοξική δράση των Th17 κυττάρων.



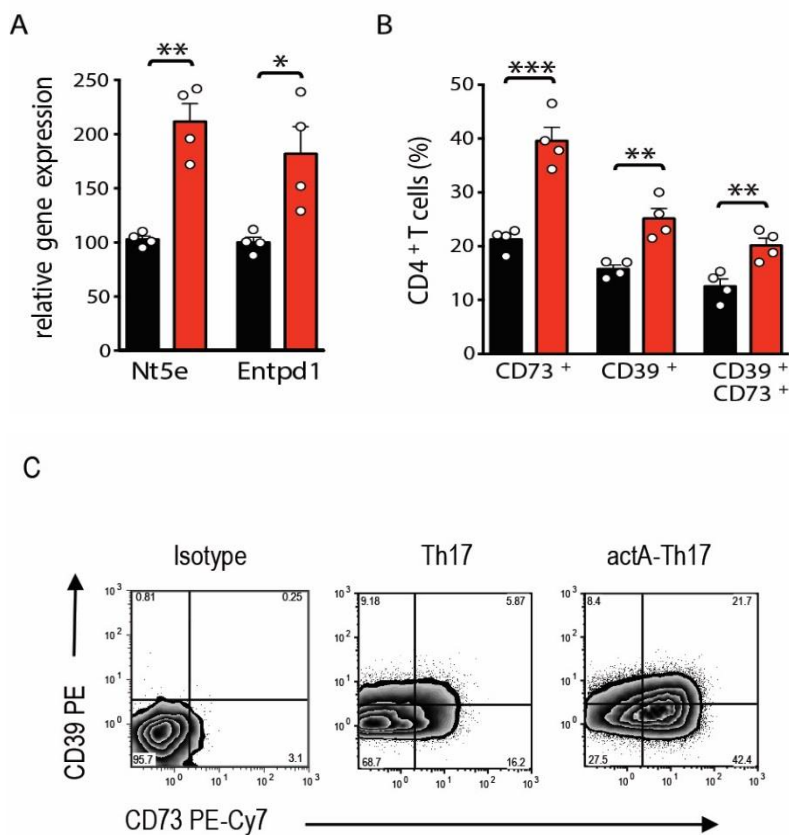
**Εικόνα 8. Η ακτιβίνη-A περιορίζει την εγκεφαλοτοξική δράση των Th17 κυττάρων.**

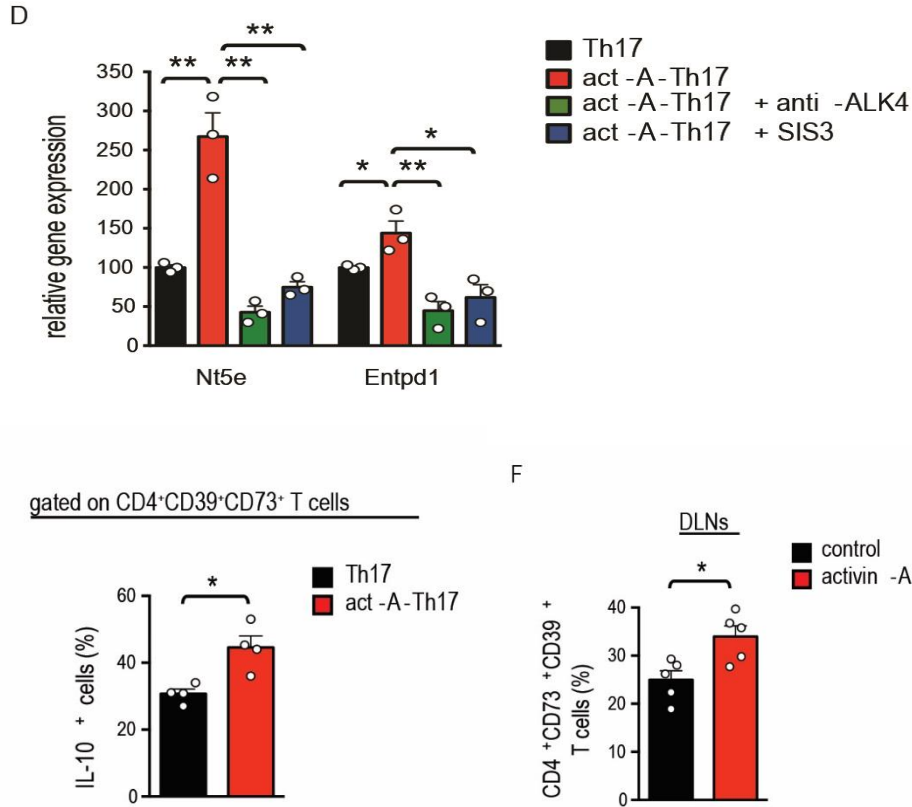
(A) Πολλαπλασιασμός των T κυττάρων και έκκριση κυτταροκινών από κύτταρα περιφερικών λεμφαδένων που προέρχονται από C57BL/6-Rag1<sup>-/-</sup> ποντίκια-δέκτες, μετά από *ex vivo* επανενεργοποίηση με MOG35-55. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean $\pm$ SEM, τριών επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό ποντίκι (n=6 ποντίκια/ομάδα).

**Το σηματοδοτικό μονοπάτι του CD73 εμπλέκεται στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στα Th17 κύτταρα.**

Με την ανάλυση του πλήρους γονιδιακού προφίλ, ταυτοποιήθηκε το *Nt5e* ως ένα από τα πιο αυξημένα γονίδια στα Th17 κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί παρουσία ανασυνδιασμένης ακτιβίνης-A (Εικ. 4C). Το γονίδιο *Nt5e* κωδικοποιεί την εκτο-5'-νουκλεοτιδάση (CD73) που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και βοηθάει στη μετατροπή της μονοφωσφατάσης της αδενοσίνης (AMP) σε αδενοσίνη (157,158). Βασιζόμενοι σε αυτό το εύρημα, πραγματοποιήσαμε

πειράματα για να διερευνήσουμε το ρόλο του CD73 στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στην παθογενετικότητα των Th17 κυττάρων. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την RNA-Seq ανάλυση, βρήκαμε σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD73 στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 9A, 9B & 9C). Παρατηρήθηκε επίσης, ότι το CD39 (το οποίο κωδικοποιείται από το *Entpd1*) που βοηθά στη μετατροπή του εξωκυττάριου ATP (eATP) σε AMP, δημιουργώντας το υπόστρωμα για το CD73, ήταν αυξημένο στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 9A, 9B & 9C). Επιπρόσθετα, η χρήση SIS3 ή anti-ALK4 αντισώματος περιόρισε τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *Nt5e* και *Entpd1* στα Th17 κύτταρα (Εικ. 9D). Η ενδοκυτταρική χρώση κυτταροκινών έδειξε ότι τα CD73<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που δημιουργούνται κατά τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων, παρουσία ανασυνδιασμένης ακτιβίνης-A, είχαν επίσης αυξημένη παραγωγή IL-10 (Εικ. 9E). Επιβεβαιωτικά με αυτά τα *in vitro* ευρήματα, φάνηκε ότι και η *in vivo* θεραπευτική χορήγηση της ακτιβίνης-A ενίσχυσε την έκφραση των CD73 και CD39 στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που προέρχονταν από λεμφαδένες ποντικών με ΠΑΕ (Εικ. 9F).



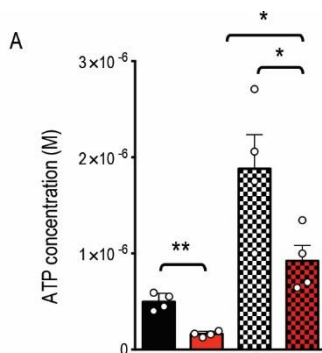


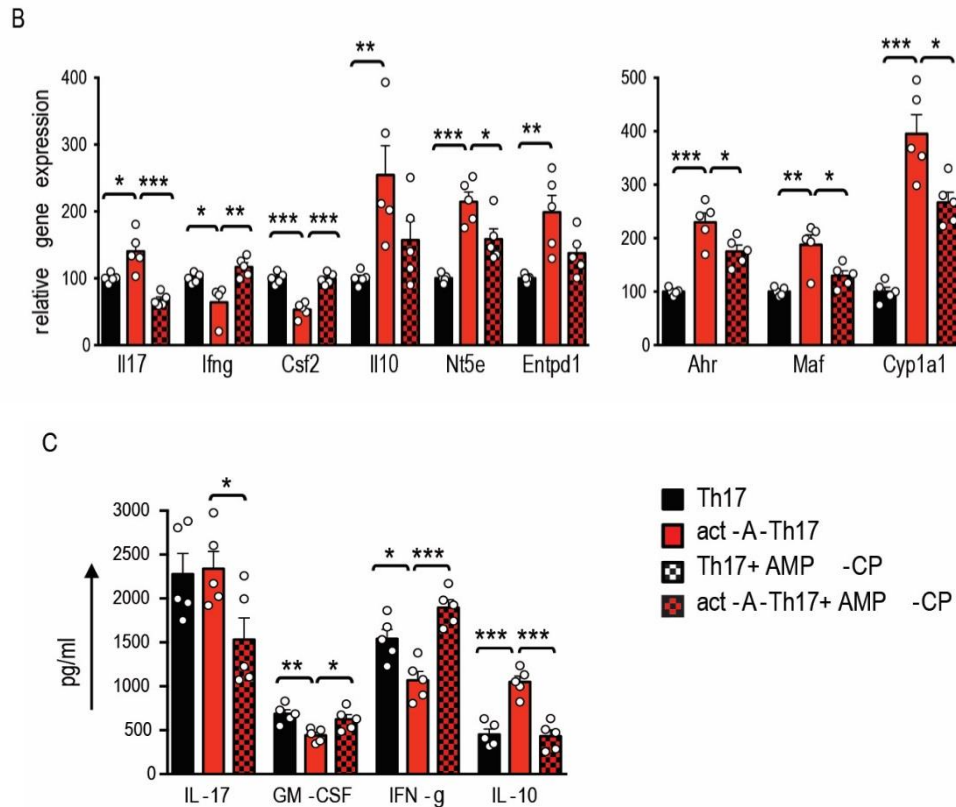
**Εικόνα 9.** Το μονοπάτι του CD73 εμπλέκεται στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στα παθογενετικά Th17 κύτταρα.

(A) Η έκφραση των *Nt5e* και *Entpd1* αναλύθηκε με qPCR και κανονικοποιήθηκε με τα *Gapdh* και *Polr2a*, στα actA-Th17 ή Th17 κύτταρα. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM δύο επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (B) Συγκεντρωτικά δεδομένα δείχνουν την έκφραση των CD39 και CD73 σε CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) Γραφήματα κυτταρομετρίας ροής απεικονίζουν την έκφραση των CD39 και CD73 στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά από n=4 ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. Απεικονίζονται και ισότυποι-μάρτυρες. (D) Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, δύο επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=3). (E) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απεικονίζουν τα ποσοστά των IL-10<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κυττάρων. Τα δεδομένα είναι mean±SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). (F) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απεικονίζουν τα ποσοστά των CD73<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κυττάρων στους περιφερικούς λεμφαδένες, όπως προέκυψαν στο Εικ. 2, από ποντίκια μάρτυρες ή ποντίκια που είχαν λάβει ακτιβίνη-A. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ποντίκι (n=5 ποντίκια/ομάδα). Η στατιστική ανάλυση εξετάστηκε με unpaired Student's t test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001.

Δεδομένου ότι η ακτιβίνη-A αυξάνει την έκφραση του CD73, που εμπλέκεται στην μετατροπή του eATP σε αδενοσίνη, μελετήσαμε τις δράσεις του CD73 στα act-A-Th17 κύτταρα. Για το λόγο αυτό, προσθέσαμε εξωγενώς ATP και ποσοτικοποιήσαμε το υπολειπόμενο eATP, μετά από επώαση 8 ωρών. Πράγματι, παρατηρήσαμε μειωμένη συγκέντρωση του eATP στα υπερκείμενα act-A-Th17 κυτταροκαλλιιεργειών, συγκριτικά με τις Th17 κυτταροκαλλιέργειες (Εικ. 10A). Αντιστρόφως, η χρήση του CD73-αναστολέα, AMP-CP, προκάλεσε αύξηση των επιπέδων eATP, υποδεικνύοντας ότι το CD73 που εκφράζεται στα act-A-Th17 κύτταρα, επάγει το μεταβολισμό του eATP (Εικ. 10A).

Βασιζόμενοι στα παραπάνω ευρήματα, και δεδομένου του σημαντικού ρόλου του φλεγμονώδους eATP στην παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων, διερευνήσαμε την επίδραση του CD73 στη μεσολαβούμενη καταστολή από την ακτιβίνη-A, του παθογενετικού προφίλ των Th17 κυττάρων. Η αναστολή του μονοπατιού του CD73 ανέστρεψε τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A καταστολή των *Csf2* και *Ifng* στα Th17 κύτταρα (Εικ. 10B). Αντιθέτως, το AMP-CP μείωσε τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση των γονιδίων που σχετίζονται με μη παθογενετικά Th17 κύτταρα, όπως είναι τα *Il10*, *Entpd1*, *Ahr*, *Maf*, *Cyp11a1* και *Nt5e* (Εικ. 10B). Επιπρόσθετα, η αναστολή του CD73 μείωσε τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A παραγωγή της IL-10 και αύξησε την παραγωγή των GM-CSF και IFN- $\gamma$  από τα Th17 κύτταρα (Εικ. 10C).



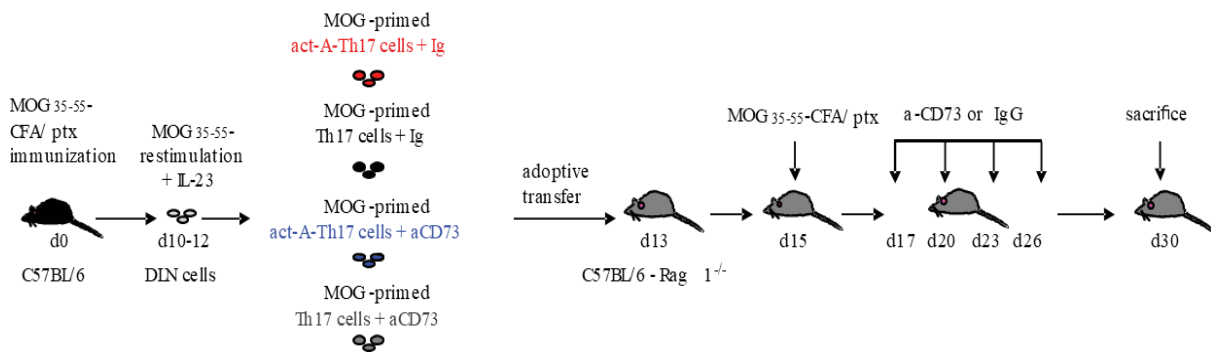


**Εικόνα 10.** Το σηματοδοτικό μονοπάτι του CD73 επηρεάζει την κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στα παθογενετικά Th17 κύτταρα.

(A) Απεικονίζονται τα επίπεδα ATP σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Τα δεδομένα είναι mean±SEM τριών επαναλήψεων, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (B) Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε όπως παραπάνω. Κάθε σύμβολο είναι mean±SEM, δύο επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από πέντε ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) Απελευθέρωση κυτταροκινών σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Κάθε κυκλικό σύμβολο είναι mean±SEM, τριών επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από πέντε ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εξετάστηκαν με ανάλυση Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, και \*\*\*p < 0.001.

Για να επιβεβαιώσουμε αυτές τις παρατηρήσεις μας *in vitro*, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η *in vivo* καταστολή του μονοπατιού του CD73 αναστρέφει τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A καταστολή της εγκεφαλοτοξικής δράσης των Th17 δραστηκών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, απομονώσαμε κύτταρα από λεμφαδένες ανοσοποιημένων ποντικών με CFA/MOG<sub>35-55</sub> και τα επανεργοποιήσαμε *in vitro* σε συνθήκες Th17 διαφοροποίησης με το αυτό-αντιγόνο MOG<sub>35-55</sub>, παρουσία ακτιβίνης-A (όπως περιγράφεται Εικ. 7A) και παρουσία παρεμποδιστικού αντισώματος

CD73 ή Ig μάρτυρα. Κατόπιν, τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα απομονώθηκαν από τις κυτταροκαλλιέργειες και μεταφέρθηκαν σε *Rag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε anti-CD73 ή Ig μάρτυρας (πειραματικό πρωτόκολλο Σχήμα 13).

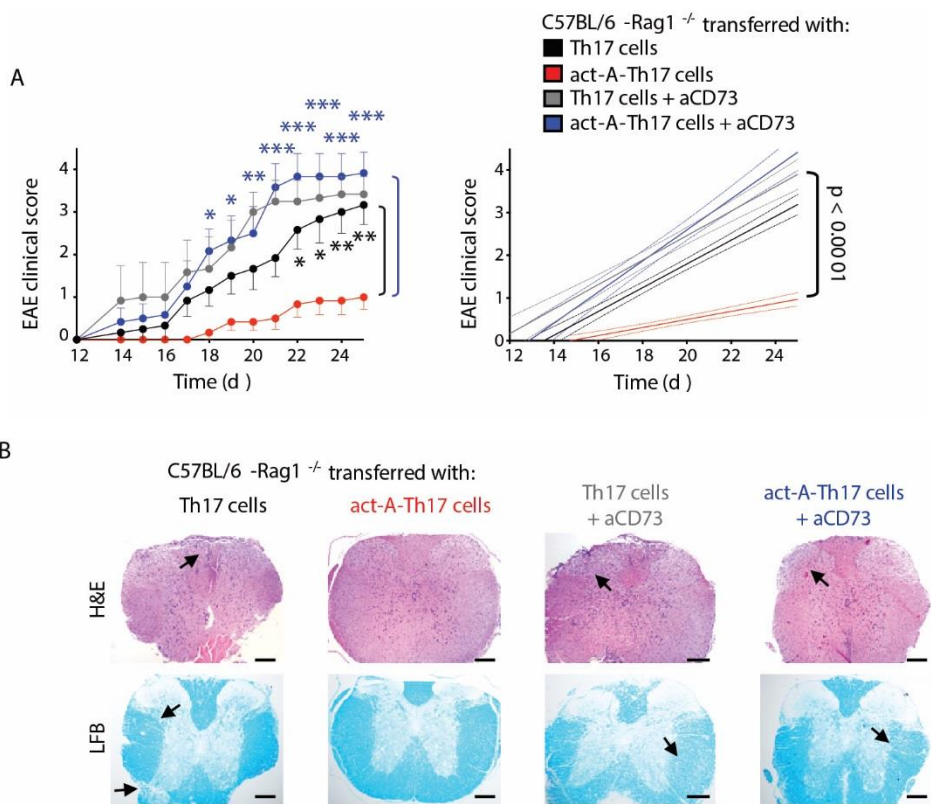


**Σχήμα 13:** Πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε.

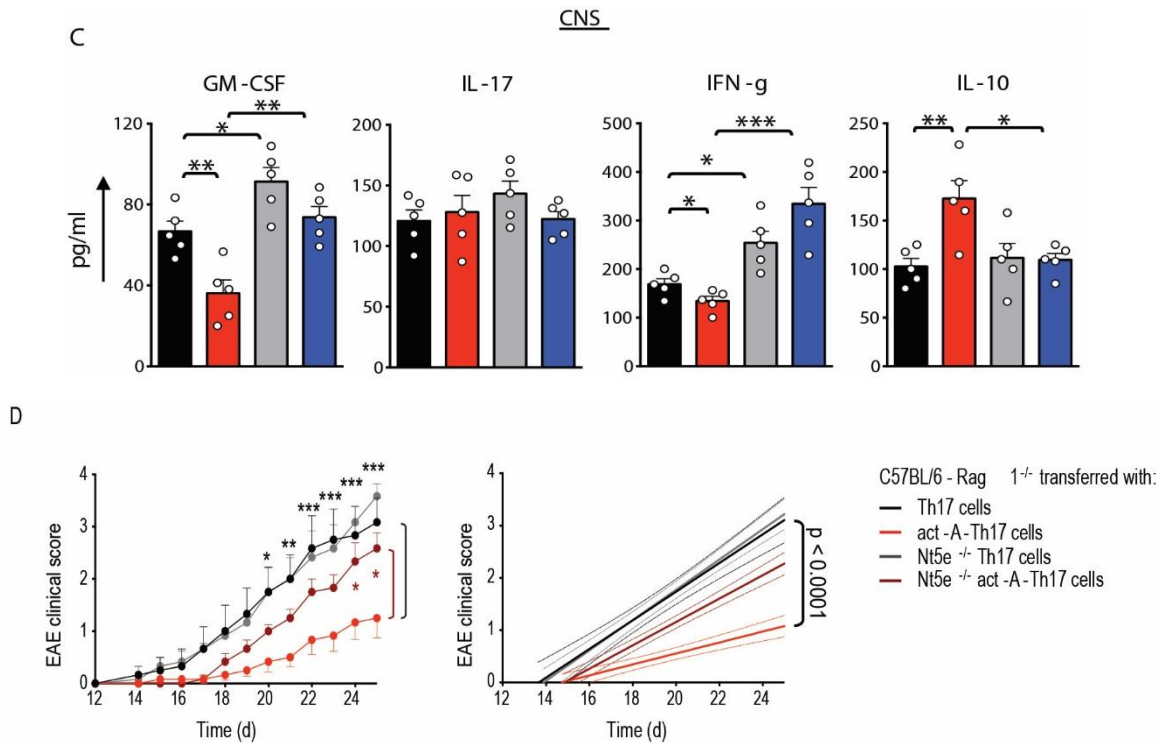
Τα ποντίκια που είχαν λάβει Th17 κύτταρα και αντίσωμα anti-CD73, παρουσίασαν αυξημένο κλινικό σκορ στην ΠΑΕ, συγκρινόμενα με τα ποντίκια που είχαν λάβει Ig μάρτυρα, σε συμφωνία με προαναφερθέντα αποτελέσματα που έχουν δείξει ανοσοκατασταλτική δράση του CD73 σε T κυτταρικές αποκρίσεις (Εικ. 11A) (157, 158). Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε αντίθεση με τα ποντίκια που είχαν λάβει act-A-Th17 κύτταρα και Ig μάρτυρα, τα ποντίκια που είχαν λάβει act-A-Th17 κύτταρα και αντίσωμα anti-CD73, παρουσίασαν νωρίτερα έναρξη της ΠΑΕ και είχαν πιο οξεία εξέλιξη της νόσου (Εικ. 11A). Επιπρόσθετα, τα ευρήματα από τις ιστοπαθολογικές αναλύσεις κατέδειξαν αξιοσημείωτη αύξηση των διηθούντων ανοσοκυττάρων και της απομυελίνωσης του νωτιαίου μυελού των ποντικίων που είχαν λάβει act-A-Th17 κύτταρα μετά από χορήγηση αντισώματος anti-CD73 (Εικ. 11B). Σε συμφωνία με τον πιο οξύ φαινότυπο της νόσου, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα GM-CSF, IFN- $\gamma$  και μειωμένα επίπεδα IL-10 στο νωτιαίο μυελό (Εικ. 11C).

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε και να επεκτείνουμε τα *in vivo* αποτελέσματά μας από τη χρήση του παρεμποδιστικού αντισώματος για το CD73 (anti-CD73), πραγματοποιήσαμε πειράματα σε *Nt5e*<sup>-/-</sup> ποντίκια. Δεδομένης της ύπαρξης αντιφατικών βιβλιογραφικών δεδομένων, που έχουν δείξει είτε επιδείνωση, είτε βελτίωση της ΠΑΕ σε ποντίκια που δεν έχουν το γονίδιο

*Nt5e* (159-161), εστίασαμε το ενδιαφέρον μας στην επίδραση της ακτιβίνης-A στον CD4<sup>+</sup> T κυτταρικό πληθυσμό που προέρχονται από *Nt5e*<sup>-/-</sup> ποντίκια. Για να το πετύχουμε αυτό, δημιουργήσαμε MOG-αυτοδραστικά Th17 κύτταρα παρουσία ακτιβίνης-A ή μάρτυρα (όπως προηγουμένως), από ανοσοποιημένα με CFA/MOG<sub>35-55</sub> ποντίκια *Nt5e*<sup>+/+</sup> ή *Nt5e*<sup>-/-</sup>, και τα μεταφέραμε σε *Rag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια-δέκτες. Όντως, αποδείχτηκε ότι η έλλειψη του γονιδίου *Nt5e* στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, εμπλέκεται στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στην εγκεφαλοτοξική δράση των Th17 κυττάρων, οδηγώντας σε υψηλότερο κλινικό σκορ της ΠΑΕ στα ποντίκια που είχαν δεχθεί act-A-treated *Nt5e*<sup>-/-</sup> Th17 κύτταρα, σε σχέση με τα *Rag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια που είχαν δεχθεί *Nt5e*<sup>-/-</sup> Th17 κύτταρα (Εικ. 11D). Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των ανωτέρω πειραμάτων, φαίνεται ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του CD73 συμμετέχει καθοριστικά στη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A καταστολή της παθογένειας και της εγκεφαλοτοξικής δράσης των Th17 κυττάρων.





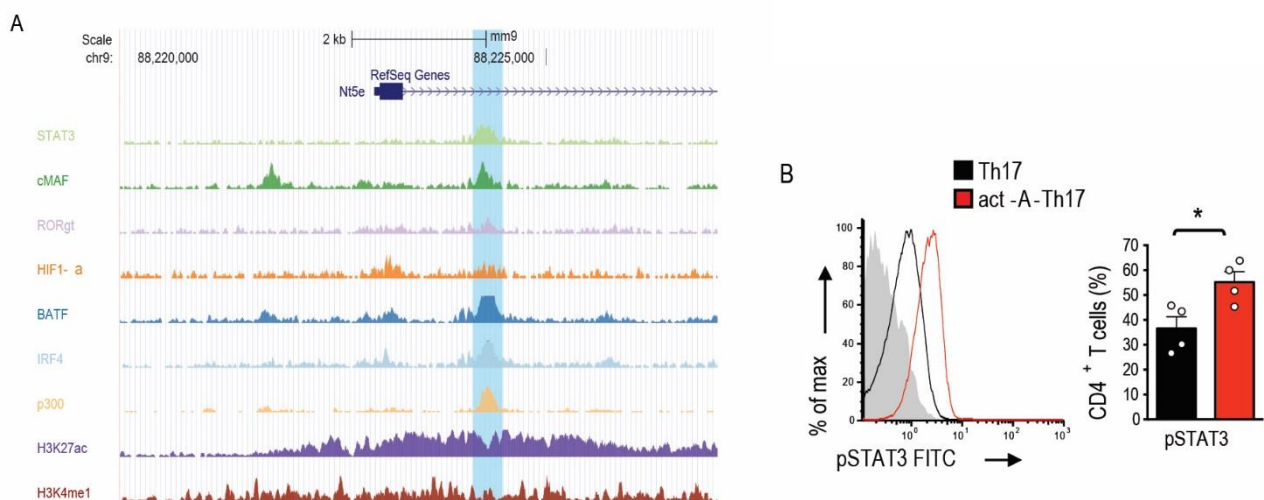


**Εικόνα 11. Αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του CD73, αναστρέφει τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A καταστολή της εγκεφαλοτοξικότητας των Th17 κυττάρων.**

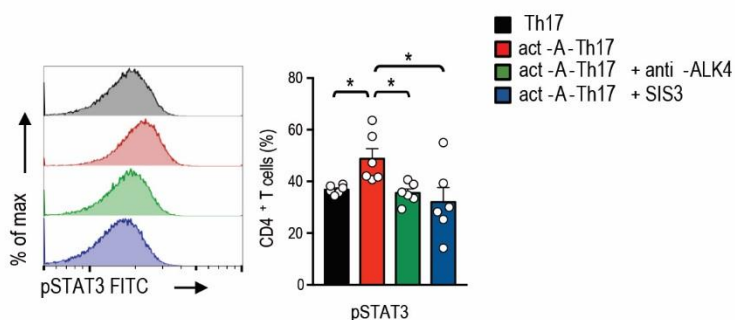
(A) Κλινική εικόνα της ΠΑΕ σε ποντίκια C57BL/6-Rag1<sup>-/-</sup> που είχαν λάβει act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα, καλλιεργημένα παρουσία anti-CD73 αντισώματος ή Ig μάρτυρα (πειραματικό πρωτόκολλο στο Σχήμα 12). Απεικονίζονται, κλινική αξιολόγηση (αριστερά) και γραμμική συσχέτιση (δεξιά) (n=5 ποντίκια/ομάδα). Στατιστικά σημαντικές διαφορές εξετάστηκαν με ανάλυση two-way ANOVA, και ακολούθησε Bonferroni's multiple comparisons test. (B) Εικόνες H&E και LFB χρώσεων σε τομές νωτιαίου μυελού, σε C57BL/6Rag1<sup>-/-</sup> ποντίκια, που έχουν λάβει act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα (bars, 50μm). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από δύο ανεξάρτητα πειράματα (n=5 ποντίκια/ομάδα). (C) Επίπεδα κυτταροκινών σε ομογενοποιημένα νωτιαίου μυελού. Τα δεδομένα είναι mean±SEM τριών επαναλήψεων, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ποντίκι (n=5 ποντίκια/ομάδα). Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, και \*\*\*p < 0.001. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν ένα από δύο ανεξάρτητα πειράματα. (D) Κλινικό σκορ ποντικών C57BL/6-Rag1<sup>-/-</sup>, που έχουν λάβει act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα, που προήλθαν από ανοσοποίηση με CFA/MOG35-55, Nt5e<sup>+/+</sup> ή Nt5e<sup>-/-</sup> ποντικών. Ανάλυση γραμμικής συσχέτισης των κλινικών σκορ, απεικονίζεται δεξιά. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με two-way ANOVA, ακολουθώντας Bonferroni's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM και απεικονίζουν ένα από τα δύο ανεξάρτητα πειράματα (n=6 ποντίκια/ομάδα); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001.

## Ο AhR ρυθμίζει την έκφραση του CD73 και την αντι-φλεγμονώδη δράση της ακτιβίνης-A στα παθολογικά Th17 κύτταρα.

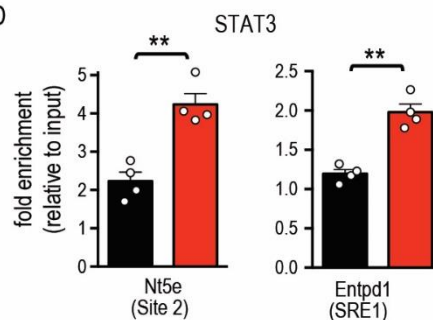
Στη συνέχεια, μελετήσαμε τους μεταγραφικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η ακτιβίνη-A επάγει την αύξηση του CD73 στα Th17 κύτταρα. Μέσω αναλύσεων δημοσιευμένων δεδομένων από ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης {(ChIP)-Seq} ταυτοποιήσαμε ενισχυμένα ChIP-Seq σήματα, για διάφορους Th17-σχετιζόμενους μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των STAT3, c-Maf και RORγt, στην περιοχή του *Nt5e* γονιδίου, 1700 bp καθοδικά της αρχής της μεταγραφής (TSS) (Εικ. 12A) (50, 162-164). Επίσης, βρήκαμε σημαντική αύξηση των ιστονών H3K4me1 και H3K27ac, που περιβάλλουν αυτή την περιοχή καταδεικνύοντας πιθανή ενεργοποίηση της χρωματίνης (Εικ. 12A). Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα ευρήματα και γνωρίζοντας το σημαντικό ρόλο του STAT3 στην επαγωγή της έκφρασης του CD73 από τα T κύτταρα (50), μελετήσαμε την επίδραση της ακτιβίνης-A στην ενεργοποίηση του STAT3. Πειράματα κυτταρομετρίας ροής αποκάλυψαν ότι η ακτιβίνη-A οδήγησε σε αύξηση της φωσφορύλιωσης του STAT3 στα Th17 κύτταρα (Εικ. 12B), ενώ αναστολή του κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης-A, μείωσε την ενεργοποίηση του STAT3 (Εικ. 12C). Οι ChIP αναλύσεις μας έδειξαν επιπλέον ενισχυμένη πρόσδεση του STAT3 στους εκκινητές των γονιδίων *Nt5e* και *Entpd1*, στα Th17 κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί παρουσία ακτιβίνης-A, σε σχέση με τα Th17 κύτταρα (Εικ. 12D) (50, 157).



C



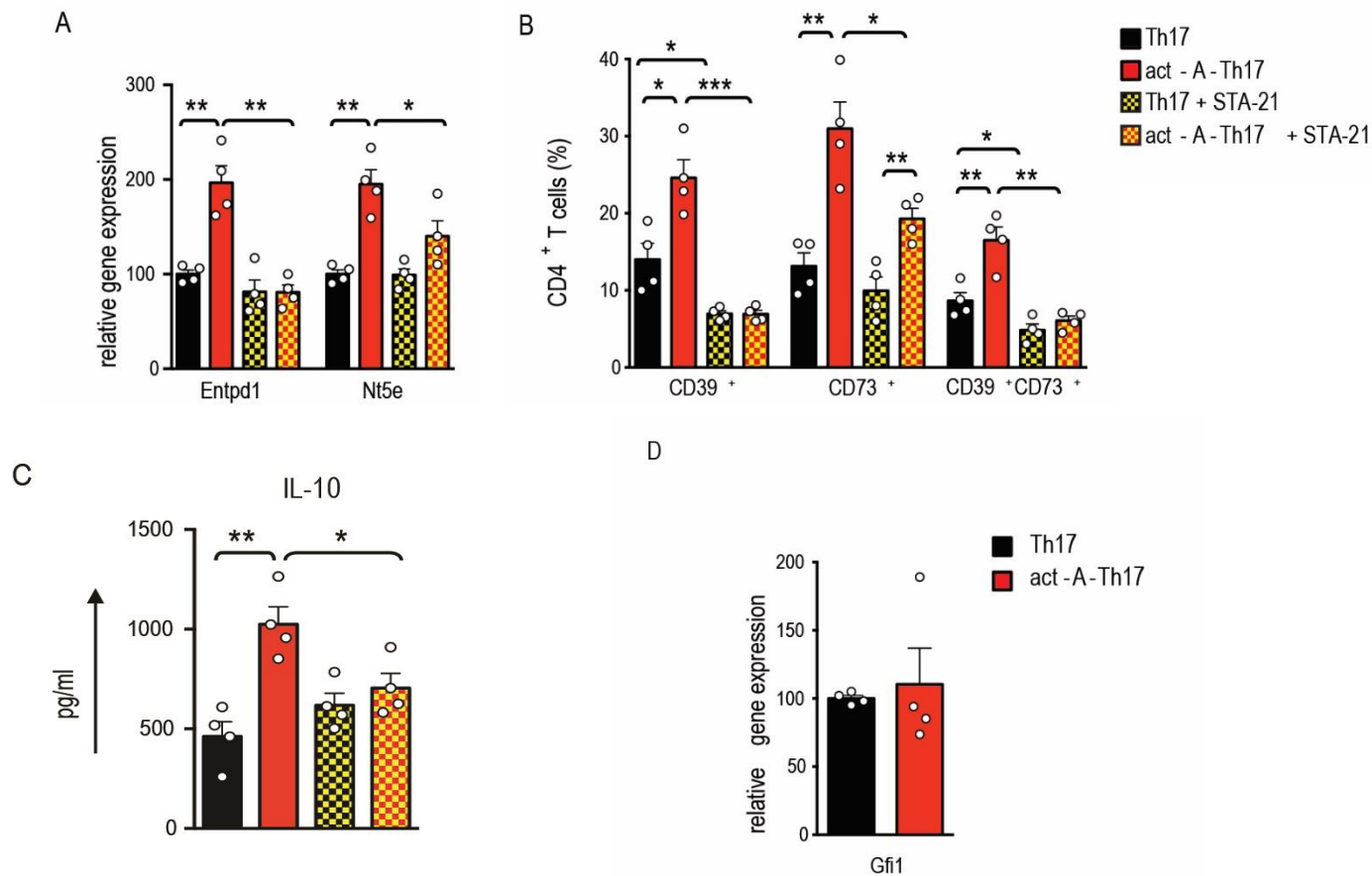
D



**Εικόνα 12. Η επαγόμενη από την ακτιβίνη-A ενεργοποίηση του STAT3, ενισχύει την έκφραση του CD73 στα Th17 κύτταρα.**

(A) University of California Santa Cruz genome browser απεικόνιση της εκτεταμένης γενομικής περιοχής *Nt5e* γύρω από το TSS. Στη σκιαγραφημένη διακριτή περιοχή, 1,700 bp καθοδικά του TSS, απεικονίζεται ο συνεντοπισμός των TFs και των H3K27ac και H3K4me1. (B) Αντιπροσωπευτικά FACS γραφήματα των act-A-Th17 ή Th17 κυττάρων που απεικονίζουν την έκφραση του pSTAT3. Το σκιασμένο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύει τον ισότυπο-μάρτυρα. Συγκεντρωτικά δεδομένα εμφανίζονται σαν mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα δημιουργήθηκαν όπως στο Εικ. 2. Αντιπροσωπευτικά γραφήματα κυτταρομετρίας ροής απεικονίζουν την έκφραση του pSTAT3, στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Το γκρι ιστόγραμμα αντιπροσωπεύει το μάρτυρα-ισότυπο. Συγκεντρωτικά δεδομένα απεικονίζονται ως mean±SEM. Κάθε κυκλικό σύμβολο απεικονίζει ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=6). (D) ChIP αναλύσεις αποκαλύπτουν την πρόσδεση του STAT3 στο γονίδιο *Nt5e* (site 2, +1700 bp, αριστερά) και στον εκκινητή του *Entpd1*, στο σημείο SRE1 (-3740 bps) (δεξιά). Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο είναι mean±SEM, δύο επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001.

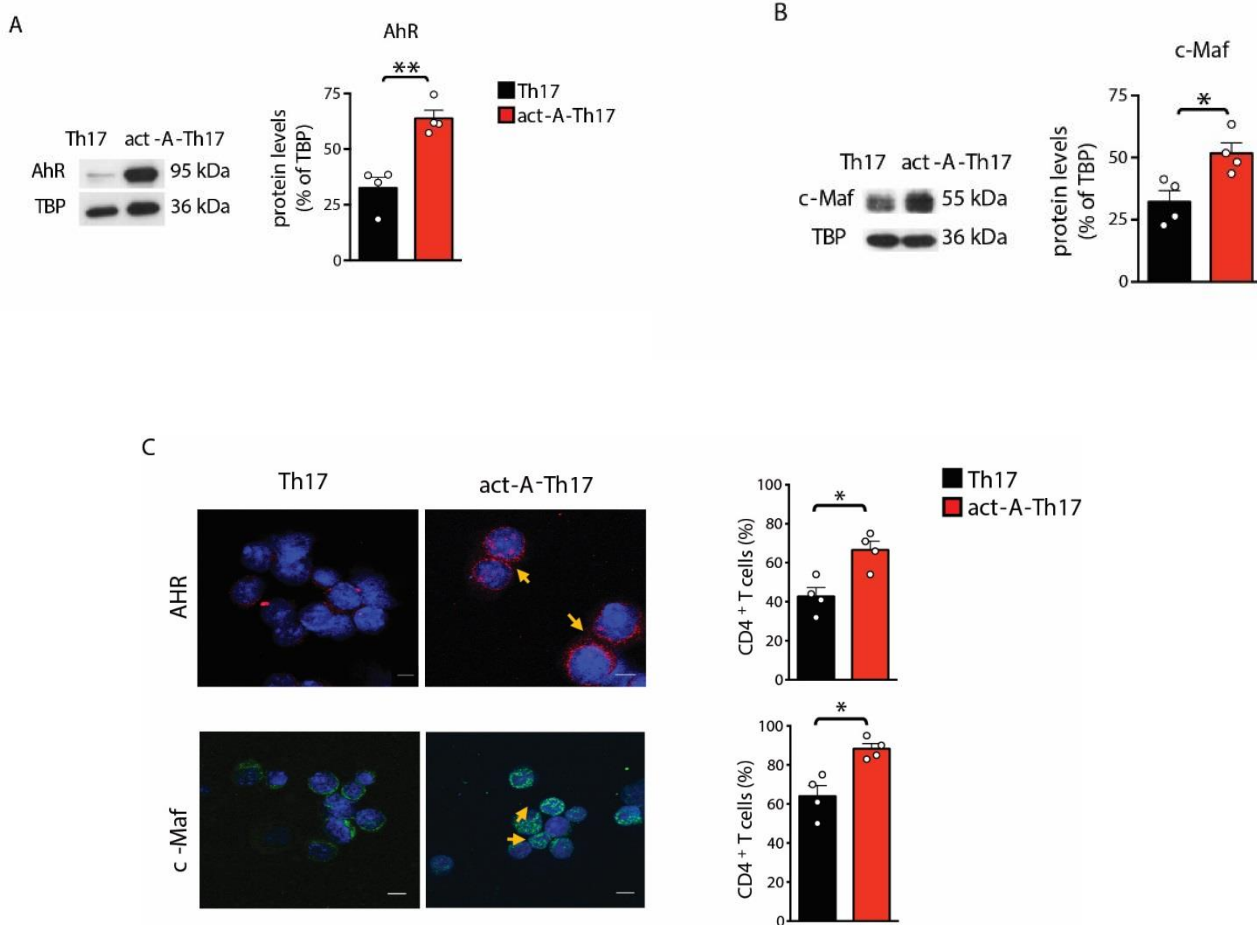
Παρεμπόδιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του STAT3, κατά την Th17 κυτταρική διαφοροποίηση, μέσω του αναστολέα STA21, μείωσε την αύξηση των CD39 και CD73 στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 13A & 13B). Η αναστολή του STAT3 επίσης μείωσε τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση της IL-10 στα Th17 κύτταρα (Εικ. 13C). Η ακτιβίνη-A δεν ελάττωσε τα mRNA επίπεδα του CD73 μεταγραφικού repressor, Growth factor independent 1 (Gfi-1), ενός μηχανισμού που χρησιμοποιείται από τον TGF-β για την επαγωγή της έκφρασης του CD73 στα T κύτταρα (Εικ. 13D) (50).

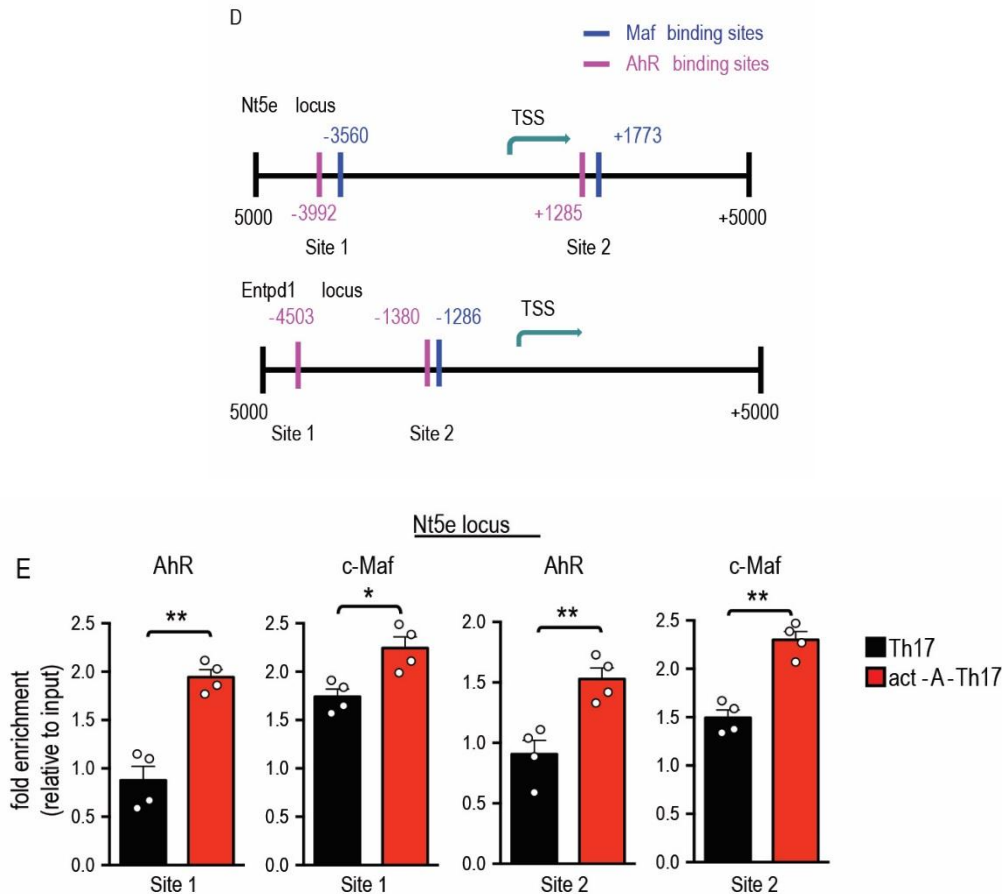


**Εικόνα 13.** Παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω του STAT3, αναστρέφει την επαγόμενη από την ακτιβίνη-αύξηση αντιφλεγμονωδών γονιδίων.

(A) Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του STA-21. Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει mean±SEM, δύο επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. (B) Συγκενρωτικά αποτελέσματα απεικονίζουν τα ποσοστά των CD39<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> και CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) IL-10 σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Κάθε κυκλικό σύμβολο είναι mean±SEM, τριών επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001. (D) Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, δύο επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4).

Δεδομένου ότι η αναστολή της σηματοδότησης μέσω STAT3 δεν κατέστειλε πλήρως τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση του *Nt5e* στα Th17 κύτταρα, θελήσαμε να μελετήσουμε τους ρόλους των μεταγραφικών παραγόντων AhR και c-Maf. Πράγματι, βρήκαμε αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των c-Maf και AhR στα Th17 κύτταρα που είχαν διαφοροποιηθεί παρουσία ανασυνδιασμένης ακτιβίνης-A (Εικ. 14A & 14B). Επιπλέον, μελέτη με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου έδειξε αυξημένη μετατόπιση των AhR και c-Maf στον πυρήνα των act-A-Th17 κυττάρων (Εικ. 14C). Οι βιοπληροφορικές μας αναλύσεις, αποκάλυψαν δύο νέα σημεία πρόσδεσης του AhR και δύο του c-Maf στο γονίδιο του *Nt5e*, που περιλαμβάνουν το σημείο +1700 bps (Εικ. 14D, site 2). Χρησιμοποιώντας αυτά τα γονιδιακά τμήματα, προχωρήσαμε σε ChIP τεχνικές και παρατηρήσαμε ενισχυμένη πρόσδεση των AhR και c-Maf στο σημείο +1700 bps και επίσης στο σημείο -3600 bps, του εκκινήτη του *Nt5e* στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 14E).





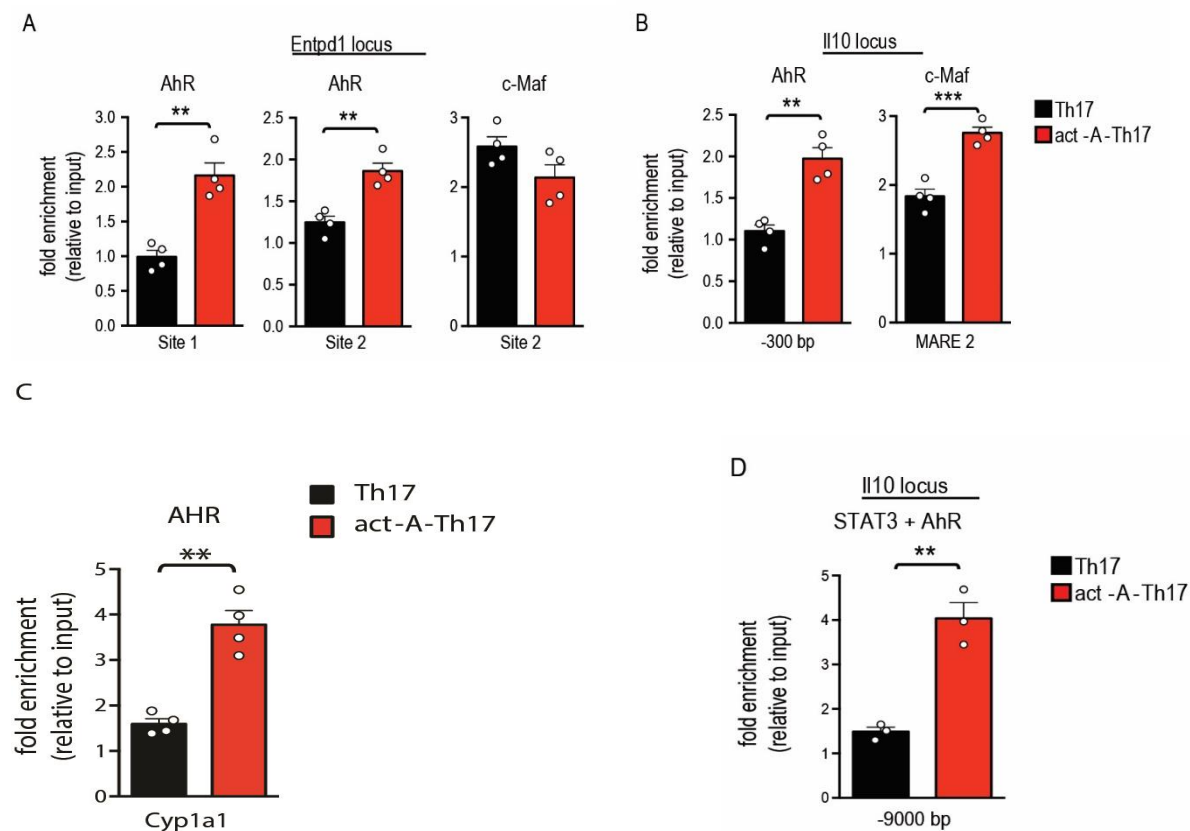
**Εικόνα 14. AhR και c-Maf καθοδηγούν την επαγόμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση του CD73 και αντιφλεγμονωδών γονιδίων στα Th17 κύτταρα.**

(A) Αντιπροσωπευτικά ανοσο-αποτυπώματα απεικονίζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των AhR και c-Maf στα act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα. (B) Παρουσιάζεται ποσοτικοποίηση της σχετικής έκφρασης των AhR και c-Maf, TATA Binding protein (TBP). Τα δεδομένα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας (αριστερά) και συγκεντρωτικά αποτελέσματα (δεξιά) των CD4<sup>+</sup> T σημασμένων κυττάρων με αντισώματα anti-AhR (κόκκινο) ή anti-cMaf (πράσινο). Οι πυρήνες είναι σημασμένοι μπλε, με DAPI (bars, 20μm). Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). (D) Σχηματική απεικόνιση των *Nt5e* και *Entpd1* γονιδίων που καταδεικνύει πιθανά σημεία πρόσδεσης των AhR και c-Maf. (E) ChIP αναλύσεις δείχνουν την πρόσδεση του AhR και c-Maf στο *Nt5e* γονίδιο. Τα δεδομένα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα.

Περαιτέρω βιοπληροφορικές αναλύσεις του εκκινήτη του γονιδίου *Entpd1* (που κωδικοποιεί την CD39 εκτονουκλεοτιδάση), ταυτοποίησαν δύο AhR-περιοχές πρόσδεσης, που

είχαν περιγραφεί παλαιότερα, μία εκ των οποίων ήταν σε μεγάλη εγγύτητα με ένα νέο σημείο πρόσδεσης του c-Maf (Εικ. 14D). Παρατηρήσαμε αυξημένη πρόσδεση του AhR στο σημείο -1 και στο σημείο -2 στον εκκινητή του *Entpd1* στα act-A-Th17 κύτταρα, ενώ δεν παρατηρήσαμε διαφορές στην πρόσδεση του c-Maf συγκριτικά με τα Th17 κύτταρα (Εικ. 15A). Επιπλέον δεδομένα αποκάλυψαν σημαντική αύξηση της πρόσδεσης του AhR, στον εκκινητή του *I110* (-300bps) και εντόπιση του c-Maf στο γονίδιο *I110* (MARE-2 site) στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 15B) (157, 165, 166). Όπως αναμενόταν, ο AhR προσδέθηκε στο αντίστοιχο σημείο του στον εκκινητή του *Cyp1a1* στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 15C) (75).

Επιπρόσθετα, μέσω των βιοπληροφορικών αναλύσεων, ταυτοποιήσαμε μια περιοχή που εντοπίζεται στη συντηρημένη μη κωδική περιοχή του *I110*, (CNS)-9 locus, 9kb ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής, όπου οι STAT3 και AhR προβλεπόταν ότι προσδέονται πολύ κοντά (156). Όντως, μετά από επαναλαμβανόμενες ChIP αναλύσεις (Re-ChiP analyses), εντοπίσαμε μια αξιοσημείωτη αύξηση της πρόσδεσης του AhR και του STAT3 στο *I110* CNS-9 σημείο, στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 15D).



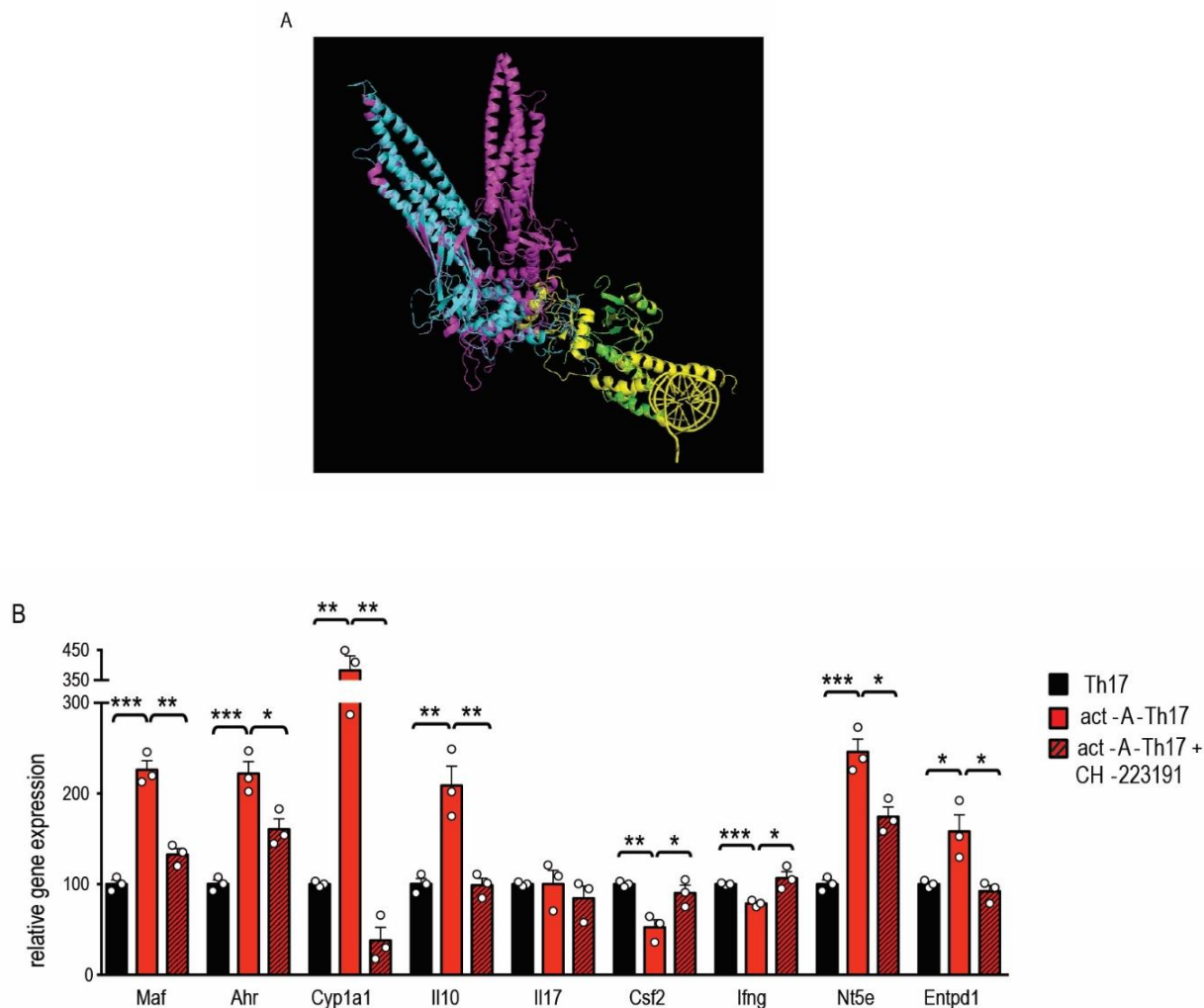
**Εικόνα 15. AhR και c-Maf εμπλέκονται στην αύξηση αντι-φλεγμονωδών μορίων στα act-A-Th17 κύτταρα.** (A) ChIP αναλύσεις δείχνουν την πρόσδεση του AhR και c-Maf στα γονίδια *Entpd1* και (B) *Il10*. Τα δεδομένα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) ChIP ανάλυση που υποδεικνύει την πρόσδεση του AhR στον εκκινήτη του *Cyp1a1*. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). (D) Ακόλουθη ChIP ανάλυση, έδειξε ότι STAT3 και AhR συν-προσδέονται στην *Il10* συντηρημένη μη κωδική αλληλουχία -9 (-9.0kb). Τα δεδομένα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τρία ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα.

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω τα αποτελέσματα από τις μοριακές μας προσεγγίσεις, προχωρήσαμε σε *in silico* ανάλυση των AhR και STAT3 αλληλεπιδράσεων. Χρησιμοποιώντας την κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς Hif1- $\alpha$ -ARNT σε σύμπλοκο με HRE-DNA ως θετικό μάρτυρα, προχωρήσαμε σε πειράματα μοριακής αγκυροβόλησης. Πράγματι τα πειράματά μας κατέδειξαν μια δομή αγκυροβολημένου συμπλόκου AhR-ARNT σε μη φωσφορυλιωμένη δομή του STAT3 που παρουσίασε παρόμοιες τιμές ενέργειας δέσμευσης ( $\Delta G = -11.3$  KJ/mol,) και σταθεράς αποδιάταξης ( $K_d = 4.9e-09$ ) με τις αντίστοιχες τιμές ( $\Delta G$ ) και ( $K_d$ ) του θετικού μας μάρτυρα Hif1- $\alpha$ -ARNT συμπλόκου ( $\Delta G = -11.6$  KJ/mol,  $K_d = 3.0e-09$ ). Επιπλέον, η υπέρθεση των παραπάνω δομών έδειξε ότι η απόκλιση στο χώρο μεταξύ των κεντρικών ατόμων άνθρακα ήταν εξαιρετικά μικρή ( $RMSD < 0.01$ ) (Εικ. 16A). Επίσης, όταν η αγκυροβολημένη δομή του AhR-ARNT στη STAT3 υποβλήθηκε σε πειράματα προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (molecular dynamics simulation) παρέμεινε σταθερή για 10ns και όταν μετά το τέλος των πειραμάτων υπερτέθηκε με την αρχική δομή (πριν τη μοριακή δυναμική), η απόκλιση στο χώρο μεταξύ των κεντρικών ατόμων άνθρακα των δομών ήταν πολύ μικρή ( $RMSD = 0.2 \text{ \AA}$ ). Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι το προτεινόμενο σύμπλοκο των STAT3-AhR-ARNT είναι θερμοδυναμικά σταθερό και επομένως αξιόπιστο. Επίσης, υποδεικνύουν ότι οι AhR, ARNT και STAT3 σχηματίζουν ένα τριμερές μοριακό σύμπλοκο στο γονίδιο *Il10*.

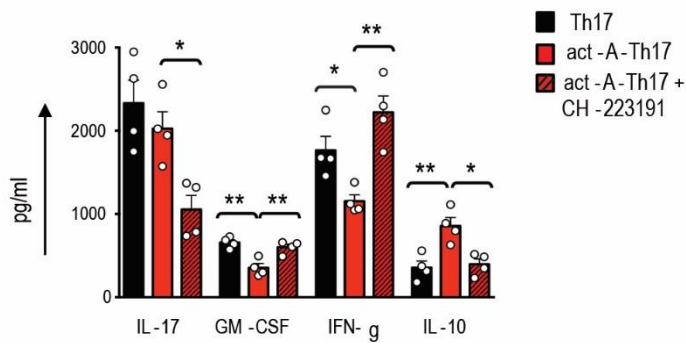
Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα που αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του AhR στην έκφραση των *Nt5e* και *Entpd1* στα act-A-Th17 κύτταρα, υποθέσαμε ότι η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του AhR θα αναστρέψει τη δράση της ακτιβίνης-A στην επαγωγή των αντι-φλεγμονωδών γονιδίων. Πράγματι, η φαρμακευτική αναστολή της δράσης του AhR (CH-223191) αντέστρεψε την αύξηση των *Nt5e*, *Il10*, *Entpd1* και *Maf* στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 16B). Αντιθέτως, η προσθήκη του CH223191 αύξησε τα επίπεδα των *Csf2* και *Ifng* στα act-



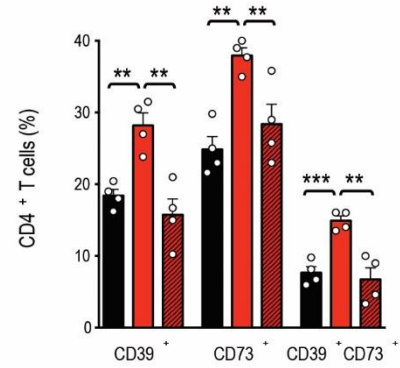
A-Th17 κύτταρα (Εικ. 16B). Όπως αναμενόταν, η καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του AhR ανέστειλε την επαγόμενη από την ακτιβίνη-A ενεργοποίηση του AhR, όπως αποδείχθηκε από τη μείωση της έκφρασης του *Cyp1a1* (Εικ. 16B). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν ποσοτικοποιήθηκαν σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών οι IL-10, IFN- $\gamma$  και GM-CSF (Εικ. 16C), επίσης η καταστολή του AhR ελάττωσε τα ποσοστά των CD73<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κυττάρων (Εικ. 16D). Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο AhR ελέγχει άμεσα την επαγόμενη από την ακτιβίνης-A αύξηση αντι-φλεγμονωδών γονιδίων στα Th17 κύτταρα.



C



D



**Εικόνα 16. Ο AhR ρυθμίζει την έκφραση του CD73 και την αντι-φλεγμονώδη δράση της ακτιβίνης-A στα παθογενετικά Th17 κύτταρα.**

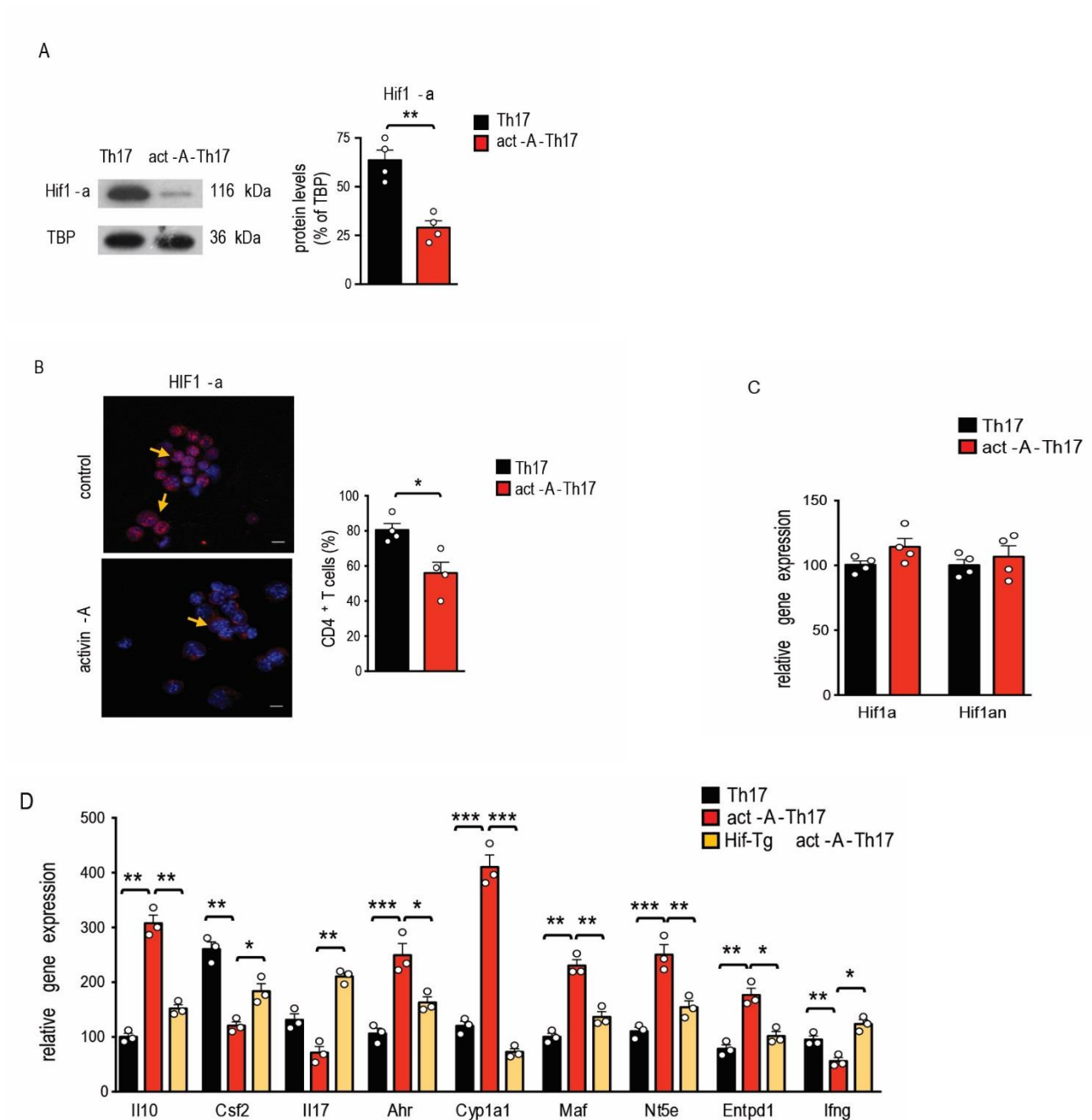
(A) Παρουσιάζεται υπολογιστικό μοντέλο πιθανών αλληλεπιδράσεων των STAT3 και AhR. Υπέρθεση της κρυσταλλογραφικά λυμένης δομής των AhR / ARNT σε σύμπλεγμα με το DRE [κωδικός PDB: 5V0L] (κίτρινο) με τη δομή της μη φωσφορυλιωμένης κεντρικής περιοχής του STAT3 ποντικού [κωδικός PDB: 3CWG] (ματζέντα). Οι δομές αυτές συγκροτούν το αγκυροβολημένο σύμπλοκο των AhR-ARNT (πράσινο) στην STAT3 (κυανό). Το DNA παρουσιάζεται με κίτρινο χρώμα. (B) Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα, διαφοροποιήθηκαν παρουσία του AhR ανταγωνιστή, CH-223191 ή μάρτυρα (DMSO). Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει mean±SEM, δύο επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τρία ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  και \*\*\* $p < 0.001$ . (C) Απελευθέρωση κυτταροκινών σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, τριών επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). (D) Παρουσιάζονται τα ποσοστά των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων που εκφράζουν CD39 και CD73. Τα δεδομένα είναι mean±SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  και \*\*\* $p < 0.001$ .

## **Η καταστολή του Hif1-α είναι απαραίτητη για τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A παρεμπόδιση της παθογενετικής δράσης των Th17 κυττάρων.**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Hif1-α διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των παθογενετικών Th17 κυττάρων (157, 167, 184). Γνωρίζοντας ότι η ακτιβίνη-A καταστέλλει το μεταγραφικό πρόγραμμα που σχετίζεται με την παθογένεια των Th17 κυττάρων, υποθέσαμε ότι η ακτιβίνη-A μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά τις Hif1-α αποκρίσεις. Παρατηρήσαμε ότι τα Th17 κύτταρα που είχαν διαφοροποιηθεί παρουσία ακτιβίνης-A, εμφάνιζαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα Hif1-α (Εικ. 17A). Επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω, οι μελέτες μας μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου αποκάλυψαν ότι ενώ ο Hif1-α εντοπιζόταν κυρίως στον πυρήνα των Th17 κυττάρων, στα act-A-Th17 κύτταρα, συγκεντρωνόταν ως επί το πλείστον στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 17B). Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A δεν επηρέασε τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του Hif1-α, υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη-A δρα μέσω κυρίως μετα-μεταγραφικού μηχανισμού (Εικ. 17C).

Προκειμένου να εκτιμηθεί η λειτουργική συσχέτιση της καταστολής της έκφρασης του Hif1-α, με την τροποποίηση της παθογενετικής δράσης των Th17 κυττάρων από την ακτιβίνη-A, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης του Hif1-α. Για το λόγο αυτό, διασταυρώσαμε ποντίκια LSL-Hif1dPA, με ποντίκια στελέχους Cd4-Cre(Tg(CD4-Cre)1Cwi) (184). Στους απογόνους τους (εφεξής θα αναφέρονται ως Hif-Tg/CD4), επιτρέπεται η υπερέκφραση του Hif1-α στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Όντως, βρήκαμε ότι τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που απομονώθηκαν από τα Hif-Tg/CD4 ποντίκια και διαφοροποιήθηκαν υπό Th17 συνθήκες παρουσία ακτιβίνης-A, παρουσίασαν αυξημένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια των Th17 κυττάρων (Εικ. 17D). Αντιθέτως, η υπερέκφραση του Hif1-α κατέστειλε την επαγόμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση των αντι-φλεγμονωδών γονιδίων στα Th17 κύτταρα (Εικ. 17D).

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η ακτιβίνη-A ρυθμίζει την έκφραση του Hif1-α στα Th17 κύτταρα. Υποστηρικτικά με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα από την qPCR, η έκφραση του Hif1-α αναστολέα (που κωδικοποιείται από το *Hif1an*) και ελέγχει το Hif1-α μεταγραφικά (185), δεν τροποποιήθηκε στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 17C).



**Εικόνα 17.** Η αρνητική ρύθμιση του Hif1- $\alpha$  εμπλέκεται στην κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-A στα παθογενετικά Th17 κύτταρα.

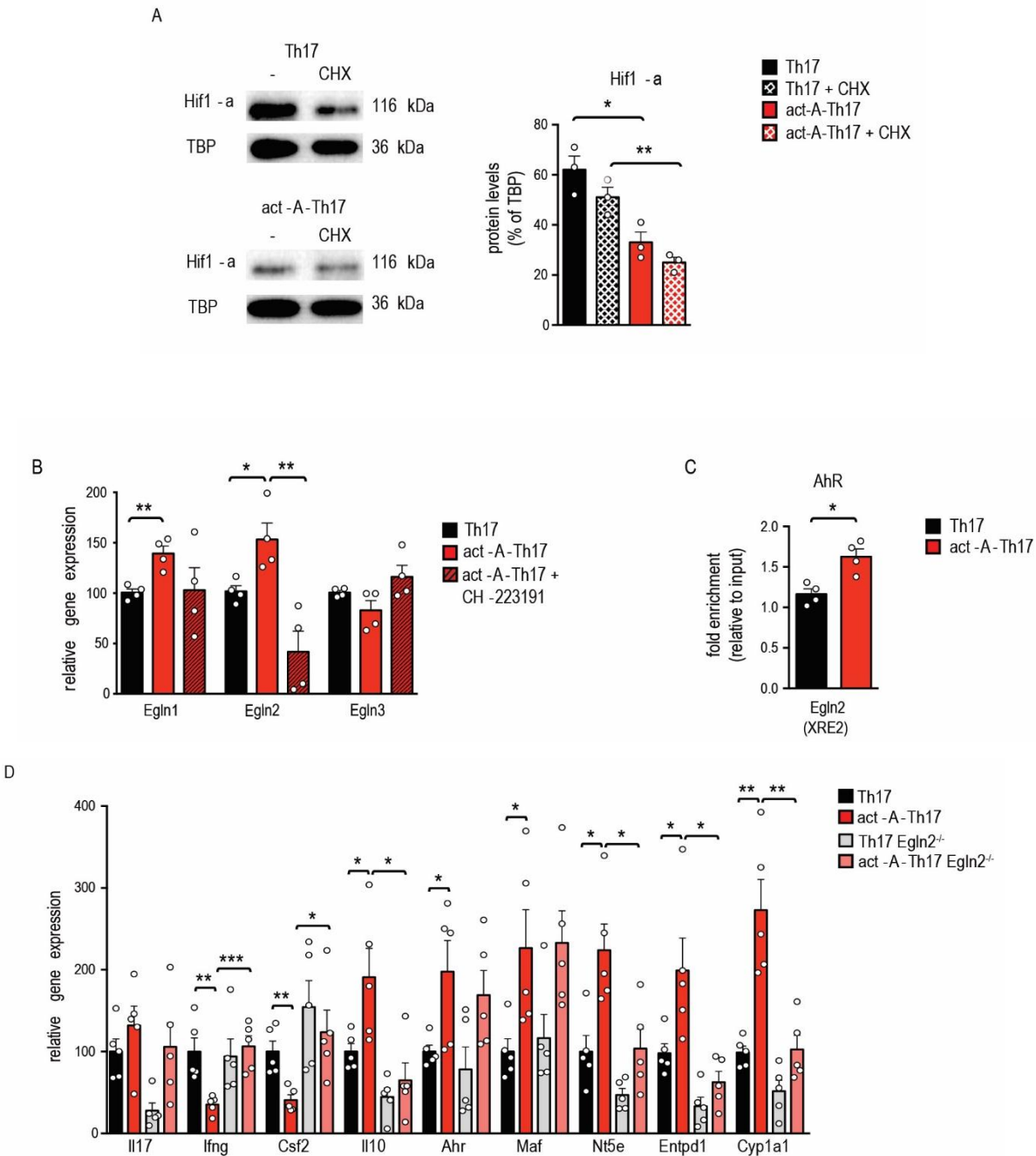
(A) Αντιπροσωπευτικά ανοσο-τυπώματα δείχνουν την έκφραση του Hif1- $\alpha$ . Παρουσιάζεται ποσοτικοποίηση της σχετικής πρωτεϊνικής έκφρασης του Hif1- $\alpha$ , TATA Binding protein (TBP). Τα δεδομένα είναι mean $\pm$ SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (B) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας (αριστερά) και συγκεντρωτικά δεδομένα δεξιά (δεξιά), των Th17 ή act-A-Th17 κυττάρων που είναι σημασμένα με αντίσωμα anti-Hif1- $\alpha$ , που φέρει το φθορόχρωμα (κόκκινο). Οι πυρήνες είναι σημασμένοι μπλε με DAPI (bars, 20 $\mu$ m). Τα δεδομένα είναι mean $\pm$ SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο

αντιπροσωπεύει ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). (C) Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, δύο επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=4). (D) Η γονιδιακή έκφραση στα act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα, από C57BL/6 ή Hif1Tg/CD4 ποντίκια, αναλύθηκε με qPCR και κανονικοποιήθηκε με *Gapdh*. Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει mean±SEM, τριών επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τρία ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα.

Μελέτες μέσω κυκλοξαμίδης έδειξαν ότι ακόμη και σε καταστάσεις ελαττωμένης πρωτεϊνικής έκφρασης, τα επίπεδα του Hif1-α παρέμεναν υψηλότερα στα Th17 κύτταρα συγκριτικά με τα act-A-Th17 κύτταρα, αποκαλύπτοντας πως η σηματοδότηση της ακτιβίνης-A επηρεάζει σημαντικά την πρωτεϊνική σταθερότητα του Hif1-α στα Th17 κύτταρα (Εικ. 18Α). Προηγούμενες μελέτες από την ερευνητική μας ομάδα, έχουν δείξει ότι ο AhR μειώνει τη σταθερότητα του Hif1-α στα Tr1 και Foxp3<sup>+</sup> Treg κύτταρα μέσω πρόσδεσής του στους υποκινητές των γονιδίων *Egln1*, *Egln2* και *Egln3* (που κωδικοποιούν αντίστοιχα τις prolyl hydroxylase domain proteins (Phd)2, Phd1 και Phd3) και ενεργοποιώντας την αποδόμηση του Hif1-α, που επάγεται μετά από ενεργοποίηση των Phd1, Phd2 και Phd3 (157). Λαμβάνοντας υπόψη, τα ανωτέρω ευρήματα, θεωρήσαμε ότι η ακτιβίνη-A μπορεί να επηρεάζει τη σταθερότητα του Hif1-α μέσω επαγωγής των *Egln1*, *Egln2* ή *Egln3*. Πράγματι, εντοπίσαμε σημαντική αύξηση της έκφρασης των *Egln1* και *Egln2* στα διαφοροποιημένα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 18Β). Επιπρόσθετα, CHIP αναλύσεις αποκάλυψαν σημαντική ενίσχυση της πρόσδεσης του AhR στο XRE σημείο, στον εκκινητή του *Egln2*, στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 18C). Επιπλέον, καταστολή του AhR μονοπατιού, ανέστειλε τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση των *Egln2* επιπέδων (Εικ. 18B). Όλα τα παραπάνω δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του AhR, μέσω ακτιβίνης-A, καταστέλλει το παθογενετικό πρόγραμμα των Th17 κυττάρων, μέσω Phd1-μεσολαβούμενης ρύθμισης του Hif1-α.

Θέλοντας να διαλευκάνουμε εάν η επαγωγή του Phd1 είναι απαραίτητη για την τροποποίηση από την ακτιβίνη-A του προφίλ των Th17 κυττάρων, απομονώσαμε αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα από *Egln2*<sup>-/-</sup> ποντίκια και τα διαφοροποιήσαμε, προς Th17 συνθήκες, παρουσία ή απουσία ακτιβίνης-A. Παρατηρήθηκε ότι η έλλειψη του *Egln2* ανέστρεψε την επαγόμενη από την ακτιβίνη-A αύξηση των *Il10*, *Cyp11a1*, *Nt5e* και *Entpd1*, ενώ αύξησε τα επίπεδα των *Csf2* και *Ifng* στα Th17 κύτταρα (Εικ. 18D). Η έκφραση των *Il17*, *Ahr* και *Maf* δεν επηρεάστηκε από την

έλλειψη του *Egln2*, καταδεικνύοντας ότι άλλα μέλη της Phd οικογένειας εμπλέκονται στα αποτελέσματα της ακτιβίνης-A (Εικ. 18D).



**Εικόνα 18.** Η ακτιβίνη-A επηρεάζει τη σταθερότητα του Hif1-α στα Th17 κύτταρα.

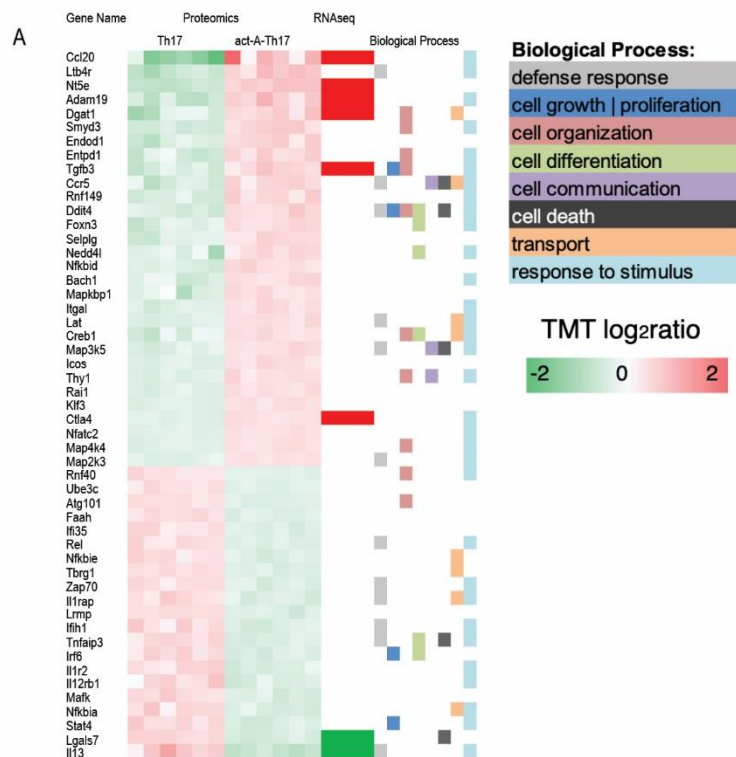
(A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοτυπώματα απεικονίζουν την έκφραση του Hif1-α σε μάρτυρες και cycloheximide-treated (CHX) Th17 ή act-A-Th17 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων Hif1-α, απεικονίζεται δεξιά, TATA Binding protein (TBP). Τα δεδομένα είναι mean±SEM και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ξεχωριστό *in vitro* πείραμα (n=3). (B) Act-A-Th17 ή Th17 κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία

του CH-223191 ή DMSO. Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, δύο επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (C) CHIP ανάλυση κατέδειξε την πρόσδεση του AhR στο XRE2 σημείο στο γονίδιο *Egln2*. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM, κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα από τέσσερα ανεξάρτητα *in vitro* πειράματα. (D) Αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα απομονώθηκαν από σπλήνα και λεμφαδένες C57BL/6 ή *Egln2*<sup>-/-</sup> ποντικών, και διαφοροποιήθηκαν υπό Th17 συνθήκες (όπως στο Εικ. 2). Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με τα *Gapdh* και *Polr2a*. Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει το mean±SEM, δύο επαναλήψεων και σχετίζεται με ένα ξεχωριστό πείραμα (n=5). Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001.

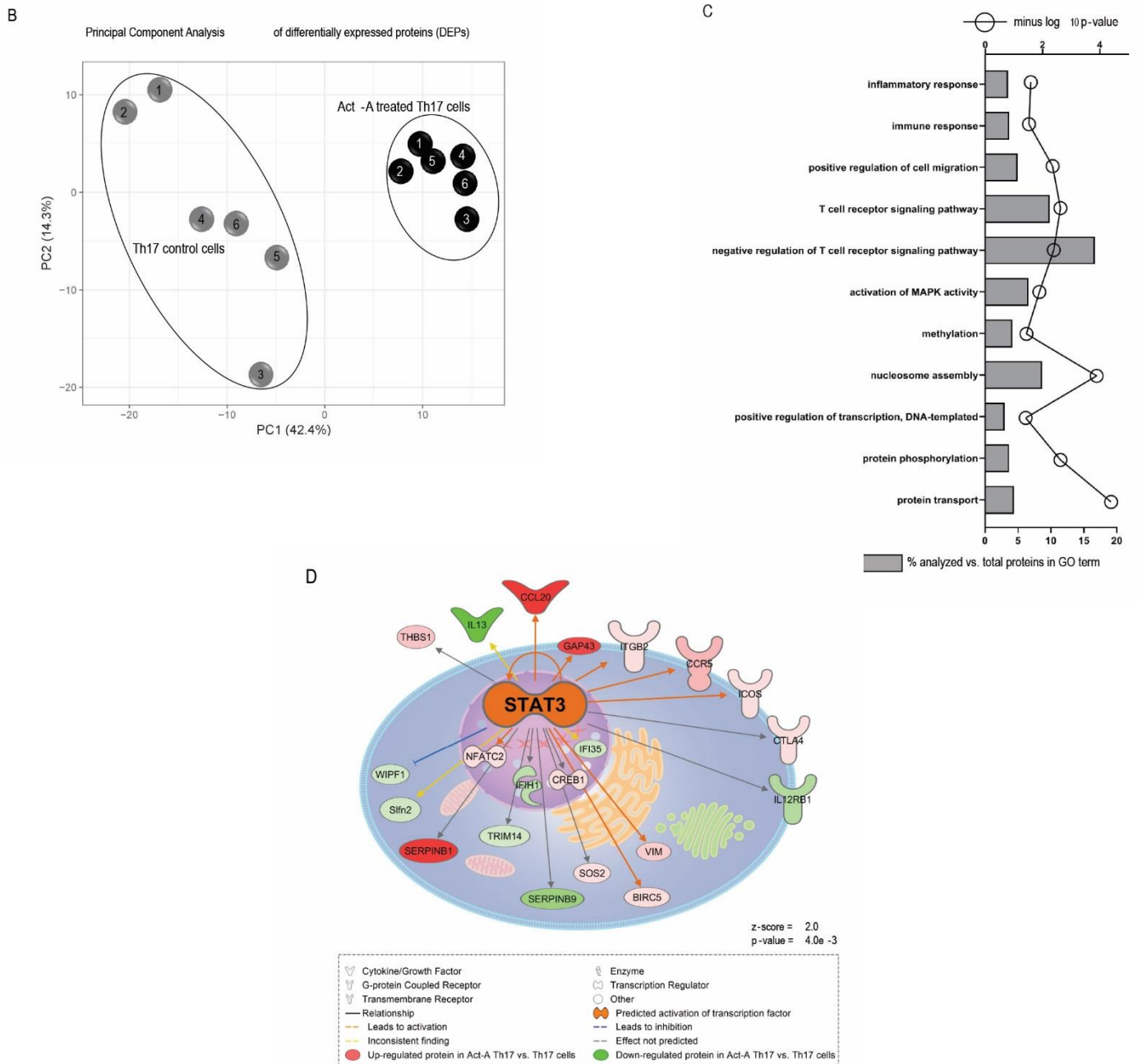
## **Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-Α τροποποιεί το πρωτεομικό προφίλ των Th17 κυττάρων.**

Προσπαθώντας να συσχετίσουμε τα μεταγραφώματα και τις παρατηρήσεις μας από την qPCR, με στοιχεία σε πρωτεϊνικό επίπεδο, προχωρήσαμε σε ποσοτικές πρωτεομικές αναλύσεις, χρησιμοποιώντας μια πρωτοποριακή μέθοδο που επιτρέπει τη δύο διαστάσεων υψηλής ανάλυσης υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με nanospray ultra-high resolution tandem φασματομετρία μάζας. Παρατηρήσαμε ότι 6,488 πρωτεΐνες ήταν ποσοτικοποιημένες σε όλα τα δείγματα (επίπεδο πεπτιδίου q<0.01), εκ των οποίων 409 ήταν διαφορετικά εκφραζόμενες στα act-A-Th17 κύτταρα (Εικ. 19A). Principal Component Analysis (PCA) των διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών (differentially expressed proteins- DEPs) έδειξε ότι τα act-A-Th17 κύτταρα ομαδοποιούνται ξεχωριστά από τα Th17 κύτταρα (Εικ. 19B). Επιλεγμένα DEPs, ανάλογα με τη βιολογική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν, απεικονίζονται με τη μορφή του heat map (Εικ. 19A). Αξιοσημείωτο είναι ότι αρκετά από τα DEPs είχαν επίσης ταυτοποιηθεί στα δεδομένα του RNAseq (Εικ. 19A). Η GO ανάλυση των DEPs έδειξε σημαντική ενίσχυση βασικών ανοσολογικών μονοπατιών, συμπεριλαμβάνοντας τη θετική ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης, την αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης του T κυτταρικού υποδοχέα, την ενεργοποίηση MAPK δραστηριότητας, τη μεθυλίωση, τη θετική ρύθμιση της μεταγραφής και της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης (Εικ. 19A). Η ανάλυση με το IPA canonical pathway ταυτοποίησε ένα ευρύ φάσμα διάφορων κυτοσολικών, προσδεδεμένων στην μεμβράνη και εκκρινόμενων

πρωτεϊνών που συγκεντρωτικά, υποδεικνύουν την ενεργοποίηση του STAT3 στα Th17 διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία της ακτιβίνης-A, υποστηρίζοντας επιπλέον τα προαναφερθέντα μηχανιστικά αποτελέσματα αναφορικά με τη μεσολαβούμενη από την ακτιβίνη-A ενεργοποίηση του STAT3 ( $P = 4.0 \times 10^{-3}$ ;  $z\text{-score} = 2.0$ ) (Εικ. 19C). Επιπρόσθετα, η ανάλυση IPA κατέδειξε σημαντική ενίσχυση του T κυτταρικού υποδοχέα ( $P = 5.2 \times 10^{-4}$ ) και του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-kappa B, μεταξύ των DEPs στα act-A-Th17 κύτταρα ( $P = 1.3 \times 10^{-3}$ ).





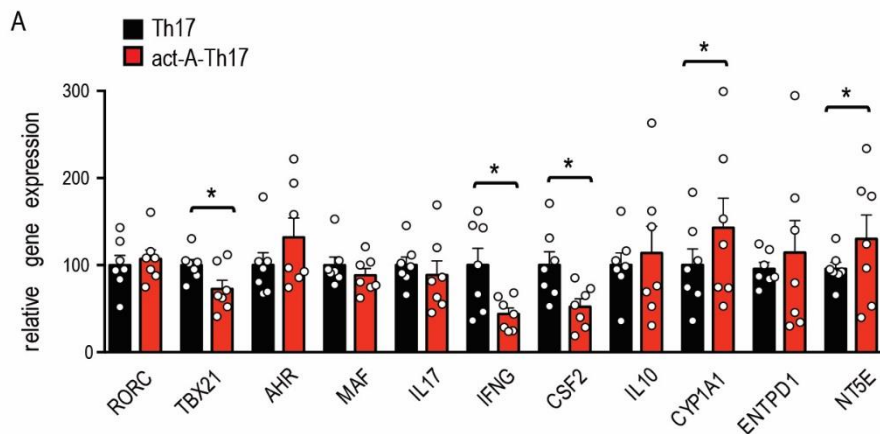


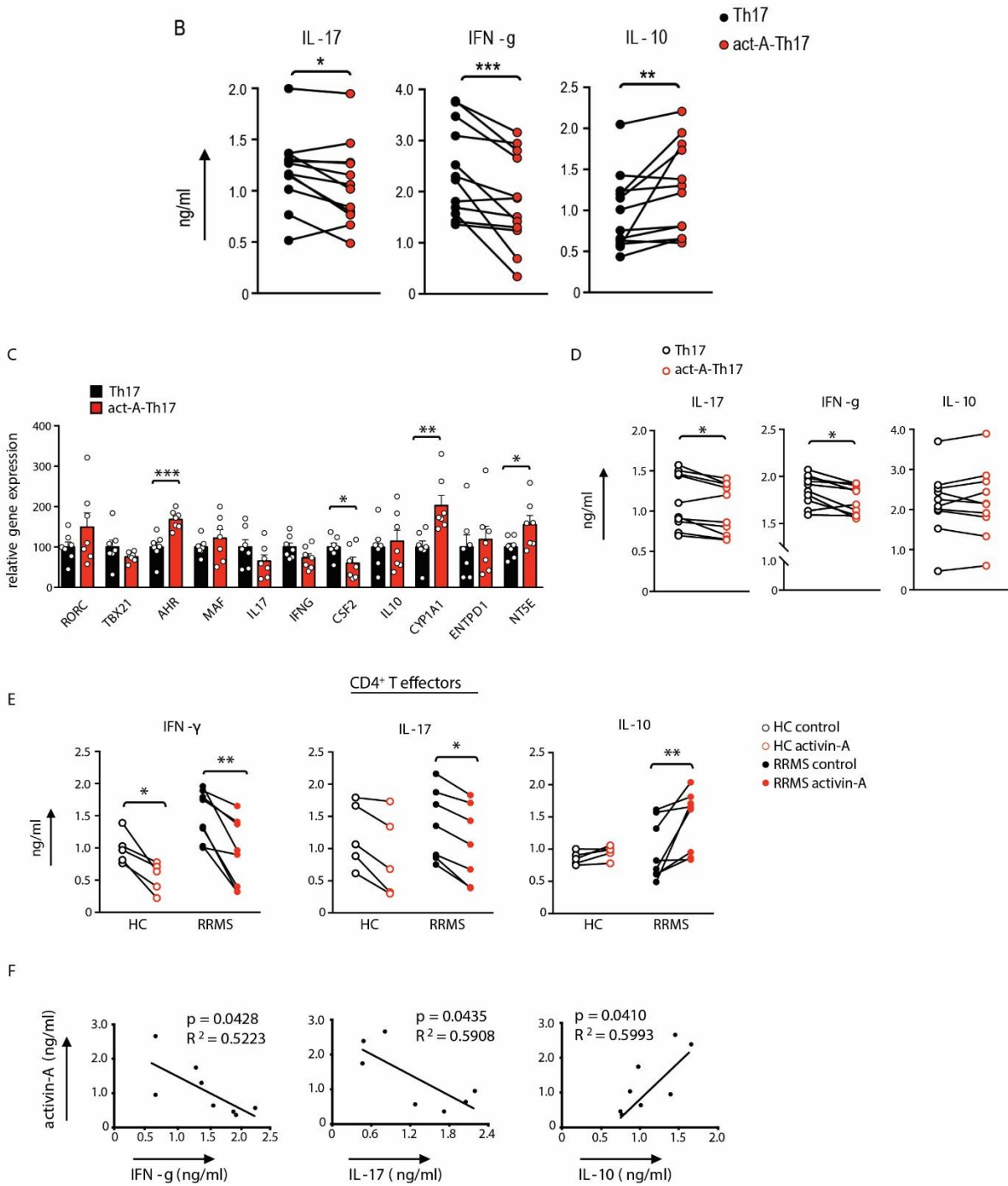
**Εικόνα 19.** Η παρουσία της ακτιβίνης-A τροποποιεί το πρωτεϊνικό προφίλ των Th17 κυττάρων.

(A) Heatmap των DEPs σε act-A-Th17 κύτταρα συγκριτικά με τα Th17, σε συνδυασμό με τις βιολογικές διαδικασίες που συμμετέχουν. Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης αντιστοιγήθηκαν με τα αποτελέσματα της RNAseq ανάλυσης και ένας υποπληθυσμός των DEPs επιβεβαιώθηκε ότι τροποποιεί την έκφρασή τους σε επίπεδο mRNA. (B) Principal Component Analysis των DEPs κατέδειξε ότι τα act-A-Th17 κύτταρα ομαδοποιούνται ξεχωριστά από τα Th17 κύτταρα. (C) Ανάλυση GO των DEPs στα act-A Th17 κύτταρα. (D) Η ανάλυση με IPA προέβλεψε ότι ο STAT3 είναι σημαντικά ενεργοποιημένος, βασικό στις αναλυθείσες πρωτεΐνες στα act-A-Th17 κύτταρα.

Θέλοντας να αποκρυπτογραφήσουμε την κλινική σημασία των *in vivo* ευρημάτων μας, απομονώσαμε αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα και τα διαφοροποιήσαμε προς Th17 κύτταρα, παρουσία ή απουσία ακτιβίνης-A. Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις μας στα T κύτταρα ποντικών, η ακτιβίνη-A μείωσε την έκφραση παραγόντων που σχετίζονταν με παθογενετικά Th17 κύτταρα, όπως είναι οι *Ifng*, *Tbx21* και *Csf2*, ενώ ενίσχυσε την έκφραση των *Cyp11a1* και *Nt5e* (Εικ. 20A & Εικ. 19B). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των IFN-γ και IL-17 ήταν επίσης σημαντικά μειωμένα, ενώ η IL-10 ήταν αυξημένη στα ανθρώπινα Th17 κύτταρα, που είχαν διαφοροποιηθεί παρουσία ακτιβίνης-A (Εικ. 20B & Εικ. 19D).

Στη συνέχεια, ελέγξαμε εάν η ακτιβίνη-A μπορεί να καταστείλει ισχυρές φλεγμονώδεις αποκρίσεις που επάγονται από τα CD4<sup>+</sup> T δραστικά κύτταρα σε ασθενείς με ΣΚΠ και υγιών δοτών. Πράγματι, η χρήση ακτιβίνης-A, σε ενεργοποιημένα με anti-CD3/CD28, CD4<sup>+</sup> T δραστικά κύτταρα, προκάλεσε σημαντική μείωση της παραγωγής των IFN-γ και IL-17, με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων IL-10 (Εικ. 20C). Τέλος, αναλύσαμε τη συσχέτιση μεταξύ της έκκρισης της ακτιβίνης-A στον ορό και των επιπέδων IFN-γ, IL-17 και IL-10 που εκλύονται από τα δραστικά CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ακτιβίνης-A στον ορό και στην παραγωγή IFN-γ και IL-17 στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα από ασθενείς με ΣΚΠ, ενώ ταυτοποιήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ υψηλότερης έκφρασης IL-10 στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα και στην έκφραση της ακτιβίνης-A στον ορό (Εικ. 20D). Αυτά τα ευρήματα, συνολικά, υποδεικνύουν ότι η ακτιβίνη-A, περιορίζει επίσης προ-φλεγμονώδεις ανθρώπινες Th17 κυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται σε ασθενείς με ΣΚΠ.





**Εικόνα 20.** Η ακτιβίνη-A περιορίζει τις προ-φλεγμονώδεις δραστικές αποκρίσεις των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων σε ασθενείς με ΣΚΠ υποτροπιάζουσας μορφής.

(A) Αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα από ασθενείς με ΣΚΠ διαφοροποιήθηκαν προς Th17 κύτταρα, όπως αναφέρθηκε. Η γονιδιακή έκφραση μελετήθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με το *B2M*. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM δύο επαναλήψεων και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα δότη (n=7 δότες). (B) Απελευθέρωση κυτταροκινών σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει mean±SEM, τριών

επαναλήψεων και αντιπροσωπεύει ένα δότη (n=12 δότες). Η στατιστική ανάλυση έγινε με unpaired Student's t test και Wilcoxon matched-pairs signed rank test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 και \*\*\*p < 0.001. (C) Αθώα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα από φυσιολογικούς μάρτυρες διαφοροποιήθηκαν προς Th17 κύτταρα, παρουσία ή απουσία ακτιβίνης-A. Η γονιδιακή έκφραση αναλύθηκε με qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με το *B2M*. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM, δύο επαναλήψεων και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό δότη (n=7). Στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με το Mann-Whitney test; \*p < 0.05 και \*\*p < 0.01. (D) Η έκκριση κυτταροκινών ποσοτικοποιήθηκε σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει mean±SEM, τριών επαναλήψεων και αναφέρεται σε ένα ξεχωριστό δότη (n=10). Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (E) CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΚΠ και υγιών δοτών (HC), ενεργοποιήθηκαν με αντισώματα έναντι CD3/CD28 παρουσία ακτιβίνης-A ή PBS (μάρτυρας). Παρουσιάζεται η έκκριση κυτταροκινών σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα είναι mean±SEM, τριών επαναλήψεων και κάθε κυκλικό σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό δότη (n=5-7). Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με Wilcoxon matched-pairs signed rank test \*p < 0.05 και \*\*p < 0.01. (F) Συσχέτιση της έκφρασης της ακτιβίνης-A στον ορό με τα επίπεδα IL-10, IL-17 και IFN-γ στα υπερκείμενα από καλλιέργειες CD4<sup>+</sup> T κυττάρων περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΣΚΠ. Παρουσιάζεται ανάλυση γραμμικής συσχέτισης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ταυτοποίηση παραγόντων που ελέγχουν την ισορροπία μεταξύ παθογενετικών και μη-παθογενετικών Th17 κυττάρων είναι υψίστης σημασίας για την αξιοποίησή τους στην άμυνα του οργανισμού, αλλά και στην καταστολή των επιβλαβών επιπτώσεων που προέρχονται από την πυροδότηση αυτοάνοσων ασθενειών (140,141). Η παρούσα ερευνητική μελέτη έδειξε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, ότι η χορήγηση της ακτιβίνης-A μειώνει τη σοβαρότητα της ΠΑΕ, γεγονός που σχετίζεται με σημαντικά μειωμένη ενεργοποίηση των παθογενετικών Th17 κυττάρων. Αξιοσημείωτο εύρημα ήταν, ότι η ακτιβίνη-A χρησιμοποιεί ένα CD73-εξαρτώμενο μοριακό μονοπάτι, το οποίο καταστέλει την έκφραση παθογενετικών γονιδίων και παρεμποδίζει τις εγκεφαλοτοξικές δράσεις των Th17 κυττάρων. Ταυτόχρονα, δείξαμε ότι η ακτιβίνη-A ενεργοποιεί τη σηματοδότηση των μεταγραφικών παραγόντων AhR, cMaf και STAT3, προκειμένου να ενισχύσει ένα ισχυρά αντι-φλεγμονώδες γονιδιακό πρόγραμμα στα Th17 κύτταρα. Ενδιαφέρον είναι επίσης το εύρημά μας, ότι η καταστολή της παθογένειας των Th17 κυττάρων, που επάγεται από την ακτιβίνη-A, σχετίζεται με αρνητική ρύθμιση του μεταβολικού ρυθμιστή Hif1-α, αποδεικνύοντας μια νέα σύνδεση μεταξύ του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης-A και της ρύθμισης του μετασχηματισμού των Th17 κυττάρων.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ακτιβίνη-A επιδεικνύει νευρο-προστατευτικές δράσεις σε ζωικά μοντέλα με εγκεφαλικό επεισόδιο και διαταραχές υπερδιεγερτικότητας (186,187). Επιπρόσθετα, δείχτηκε ότι η διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων και η μυελίνωση είναι σημαντικά ελαττωμένες σε ποντίκια που φέρουν ολιγοδενδροκύτταρα με έλλειψη του γονιδίου *ALK4*, τονίζοντας επιδιορθωτικές λειτουργίες της ακτιβίνης-A στο ΚΝΣ (137). Η έκφραση της ακτιβίνης-A επίσης είναι αυξημένη στα μικρογλοιακά κύτταρα και στα μακροφάγα με M2-like φαινότυπο, γεγονός που υποστηρίζει επιπλέον την επιδιορθωτική δράση της ακτιβίνης-A στο ΚΝΣ (130). Παρόλα αυτά, ο ρόλος της ακτιβίνης-A στις εγκεφαλοτοξικές T κυτταρικές αποκρίσεις και στη σχετιζόμενη αυτοανοσία στο ΚΝΣ, παραμένει αδιευκρίνιστος.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, δείξαμε ότι η χορήγηση της ακτιβίνης-A *in vivo* περιορίζει την ΠΑΕ και αυτό οφείλεται μερικώς στην καταστολή των Th17 δραστικών αποκρίσεων. Η παρατήρηση αυτή τεκμηριώθηκε από τη μειωμένη διήθηση των παθογενετικών

IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T κυττάρων στο ΚΝΣ και συνδυαζόταν με μειωμένες δευτερογενής αποκρίσεις, μετά από ενεργοποίηση με το αυτο-αντιγόνο στους περιφερικούς λεμφαδένες. Επιπλέον, η χορήγηση της ακτιβίνης-A *in vivo* περιόρισε σημαντικά τη διήθηση των φλεγμονωδών μυελοειδών κυττάρων στο ΚΝΣ, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των κυτταροκινών GM-CSF, IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$ , οι οποίες καθοδηγούν τη στρατολόγηση των μυελοειδών κυττάρων και την παθογένεση της ΠΑΕ. Μελέτες από την ερευνητική μας ομάδα καθώς και από άλλες, έχουν αναδείξει τον κρίσιμο ρόλο της ακτιβίνης-A στη διαφοροποίηση των Th κυττάρων και στις λειτουργίες τους (113,115,138,139,152). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, επεκτείνουν το εύρος των λειτουργιών της πλειοτροπικής αυτής κυτταροκίνης, αποκαλύπτοντας τη συμμετοχή της στην καταστολή των παθογενετικών Th17 κυτταρικών αποκρίσεων που σχετίζονται με την αυτοανοσία στο ΚΝΣ.

Ένα επιπρόσθετο ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας, ήταν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A παρεμπόδιζε τη διαφοροποίηση των παθογενετικών Th17 κυττάρων, μέσω καταστολής μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με τη δράση τους και περιλαμβάνουν τα *Ifng*, *Csf2*, *Il1b*, *Tbx21* και *Batf* (60,146-148,153,154). Επίσης, τα Th17 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση παρουσία ακτιβίνης-A, παρουσίασαν μειωμένη εγκεφαλοτοξικότητα, γεγονός που τεκμηριώνεται από τη μειωμένη ικανότητά τους να επάγουν ΠΑΕ, έπειτα από τη μεταφορά τους *in vivo*. Ανακαλύψαμε επίσης, ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης-A μέσω του κύριου υποδοχέα ALK4, ήταν υπεύθυνο για την αύξηση της έκφρασης αντι-φλεγμονωδών γονιδίων που σχετίζονται με μη παθογενετικά Th17 κύτταρα, όπως είναι *Il10*, *Maf* και *Ahr* (60,147-148,153,154,157).

Αναζητώντας τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται, στις ανωτέρω διαδικασίες, ταυτοποιήσαμε τη CD73 εκτονουκλεοτιδάση, ως ένα κύριο καθοδηγητή της επαγόμενης από την ακτιβίνη-A, καταστολής του παθογενετικού προφίλ και των εγκεφαλοτοξικών δράσεων των Th17 κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του CD73 στα Th17 κύτταρα εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3, που επάγεται από την IL-6, καθώς και από την TGF- $\beta$ -μεσολαβούμενη καταστολή του μεταγραφικού καταστολέα, Gfi-1 (50). Στη μελέτη μας δείξαμε ότι η ακτιβίνη-A χρησιμοποιεί STAT3- εξαρτώμενα μονοπάτια προκειμένου να επάγει την έκφραση του CD73 στα Th17 κύτταρα, αλλά η δράση της είναι ανεξάρτητη από την καταστολή της σηματοδότησης του Gfi-1 ή της ενεργοποίησής του

μονοπατιού του TGF-β. Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας, το CD73 επάγεται σε CD4<sup>+</sup> T κύτταρα που δεν έχουν τον TGF-β υποδοχέα (187), υποδεικνύοντας ότι η έκφρασή του ενεργοποιείται επίσης και από άλλους παράγοντες. Παρόλο που οι δύο κυτταροκίνες, ακτιβίνη-A και TGF-β ανήκουν στην ίδια υπερικογένεια, είναι ενδιαφέρον ότι δρουν μέσω ξεχωριστών μηχανισμών. Αξιοσημείωτη είναι και η μειωμένη φωσφορυλίωση του STAT3 στα Th17 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση παρουσία ακτιβίνης-A, που παρατηρήσαμε, κατά την καταστολή των Smad2/3 σηματοδοτικών μονοπατιών. Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη-A επάγει την έκφραση του Connective Tissue Growth Factor (CTGF) σε κύτταρα του ενδομητρίου, μέσω STAT3-επαγόμενης φωσφορυλίωσης των Smad2/3 (189). Όλες αυτές οι μελέτες αποκαλύπτουν μια νέα σύνδεση μεταξύ Smad2/3 και STAT3 ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών στα Th17 κύτταρα που ενεργοποιούνται από την ακτιβίνη-A.

Μέσω αναλύσεων των ChIP-Seq δεδομένων, παρατηρήσαμε ενισχυμένη πρόσδεση των Th17-σχετιζόμενων μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των STAT3, c-Maf και RORγt, καθώς και των τροποποιημένων ιστονών H3K4me1 και H3K27me1, σε ένα νέο σημείο (+1700bp), πάνω στο γονίδιο *Nt5e*, αναδεικνύοντας αυτή την περιοχή σαν πιθανό ρυθμιστικό σημείο ελέγχου της έκφρασης του *Nt5e*. Πράγματι, βρήκαμε στα Th17 κύτταρα μετά από ενεργοποίηση παρουσία ακτιβίνης-A, ενισχυμένη πρόσδεση του c-Maf στο σημείο αυτό, αποκαλύπτοντας, έναν μέχρι σήμερα, άγνωστο ρόλο του c-Maf στη ρύθμιση της μεταγραφής του *Nt5e*. Επίσης, δείξαμε ότι ο c-Maf ελέγχει την αύξηση της IL-10 στα act-A- Th17 κύτταρα, μέσω ενισχυμένης πρόσδεσης στο *Il10* γονίδιο. Συνδυαστικά με πρόσφατες μελέτες που έδειξαν μειωμένη έκφραση της IL-10 σε *Maf*<sup>-/-</sup> Th17 κύτταρα, τα προαναφερθέντα αποτελέσματά μας ενισχύουν τον καθοριστικό ρόλο του c-Maf στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-10 στα Th17 κύτταρα (190). Εκτός από το c-Maf, παρατηρήσαμε εντυπωσιακή αύξηση των επιπέδων του AhR στα Th17 κύτταρα που είχαν διαφοροποιηθεί παρουσία ακτιβίνης-A. Επίσης, ανακαλύψαμε αυξημένη πρόσδεση του AhR στα *Nt5e*, *Entpd1* και *Il10* γονίδια στα Th17 κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί παρουσία ακτιβίνης-A. Αναλύσεις μοριακής προσομοίωσης (molecular dynamic simulation) έδειξαν ότι ο STAT3 σχηματίζει ένα πολυμερές μεταγραφικό σύμπλοκο με τους AhR και ARNT, που είναι σημαντικό στην επαγόμενη από την ακτιβίνη-A, αύξηση της *IL10* στα Th17 κύτταρα. Τέλος, δείξαμε ότι η καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του AhR, ανέστρεψε την επαγόμενη από την ακτιβίνη-A, αύξηση των *Nt5e*, *Entpd1*, *Il10* και *Maf* στα Th17 κύτταρα. Γνωρίζοντας ότι ο AhR ελέγχει τη διαφοροποίηση διαφορετικών Th κυτταρικών υποπληθυσμών,

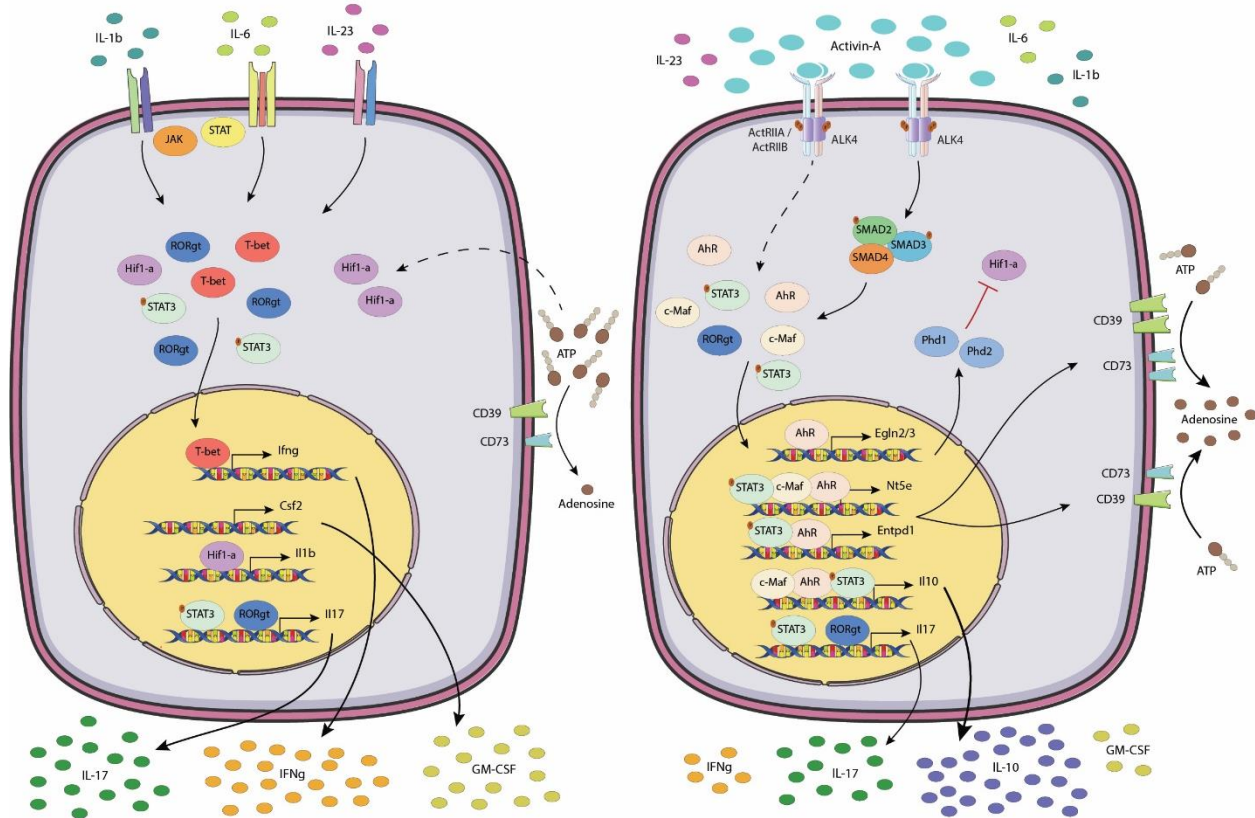
συμπεριλαμβανομένων των Foxp3<sup>+</sup> Tregs, Th17 και Tr1 κυττάρων, ανάλογα με τις υπάρχουσες κυτταροκίνες και άλλα στοιχεία του μικροπεριβάλλοντός τους (43,75, 157,165,166), τα αποτελέσματά μας προσθέτουν την ακτιβίνη-A στον αυξανόμενο αριθμό των παραγόντων που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του AhR, διαμορφώνοντας τις Th κυτταρικές αποκρίσεις.

Οι εκτονουκλεοτιδάσες CD39 και CD73 δρουν εξωκυττάρια και καταλύουν την παραγωγή της αδενοσίνης από ATP. Το ATP απελευθερώνεται μετά από ενεργοποίηση των T κυττάρων καθώς και από κατεστραμμένα ή αποπτωτικά κύτταρα στα σημεία φλεγμονής. Η συγκέντρωση του eATP είναι πολύ χαμηλή σε φυσιολογικές συνθήκες και μικρές αυξήσεις αυτής, μπορεί να λειτουργήσουν ως προ-φλεγμονώδες σήμα, επάγοντας τη διήθηση ανοσοκυττάρων καθώς και την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (194). Οι CD73/CD39 εκτονουκλεοτιδάσες αποφωσφορυλιώνουν το eATP, δημιουργώντας αδενοσίνη, η οποία δρα ως ανοσοκατασταλτικό μόριο που παρεμποδίζει την κυτταρική ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών (194,195). Η απομάκρυνση του ATP αντιπροσωπεύει έναν από τους βασικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα T ρυθμιστικά κύτταρα για να καταστείλουν τις φλεγμονώδεις T δραστικές αποκρίσεις (157,194,195). Το CD39 δρα στα πρώτα στάδια του μονοπατιού, δημιουργώντας AMP, που μπορεί να μετατραπεί πάλι σε ATP, εξωκυττάρια, μέσω λειτουργίας των diphosphate κινάσων NDP και adenylylate κινάσες (194). Το CD73 χρησιμοποιεί το AMP ως υπόστρωμα, δημιουργώντας αδενοσίνη που μπορεί να μετατραπεί πάλι σε AMP, μόνο όταν μεταφέρεται ενδοκυτταρικά (194). Γίνεται συνεπώς αντιληπτό ότι η κατασταλτική δράση του CD73 είναι πιο σημαντική από αυτή του CD39, καθώς όχι μόνο δημιουργεί αδενοσίνη, αλλά επίσης απομακρύνει το AMP, που μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ATP.

Οι μελέτες μας έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη-A χρησιμοποιεί τις ανοσοκατασταλτικές δράσεις των CD39 και CD73, προκειμένου να μειώσει τις φλεγμονώδεις συγκεντρώσεις του eATP, στα Th17 κύτταρα. Επιπρόσθετα, η ακτιβίνη-A μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του επαγόμενου από το ATP, Hif1- $\alpha$  στα Th17 κύτταρα μέσω αύξησης των αναστολέων του Hif- $\alpha$ , Phd-1 και Phd-2 (157,167,184). Ο Hif1- $\alpha$  είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των παθογενετικών Th17 κυττάρων, καθώς ενεργοποιεί τη μεταγραφή παραγόντων που εμπλέκονται στη γλυκόλυση και τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (196). Συγκεκριμένα,



δείξαμε ότι η μείωση των επιπέδων Hif1- $\alpha$ , παρουσία ακτιβίνης-A στα Th17 κύτταρα, συνδυάζεται με αύξηση των PHD1/2 πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αποδόμηση του Hif1- $\alpha$ . Επιπρόσθετα δείξαμε μια ενισχυμένη πρόσδεση του Ahr στο *Egln2*- που κωδικοποιεί την PHD1-, συνδιαστικά με μειωμένη έκφραση του PHD1 κατά την παρεμπόδιση της λειτουργίας του Ahr, υποδεικνύοντας για ακόμη μια φορά την εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού του Ahr, στη δράση της ακτιβίνης-A. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, προτείνουν ένα μηχανισμό όπου η ακτιβίνη-A, μέσω των ALK4, pSmad2/3 μονοπατιών, επάγει την ενεργοποίηση των Ahr, STAT3 και c-Maf, που στη συνέχεια οδηγούν στην αύξηση των εκτονουκλεατιδασών CD39 και CD73 στα Th17 κύτταρα, που με τη σειρά τους, απομακρύνουν το eATP, ελαττώνοντας τη σηματοδότηση του Hif1- $\alpha$  και περιορίζοντας την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων (Σχήμα 14). Πολύ σημαντικό, είναι ότι οι πρωτεομικές αναλύσεις μας, αποκάλυψαν περαιτέρω πιθανές δράσεις της ακτιβίνης-A στις Th17 κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με το ενδοκυττάριο μονοπάτι ενεργοποίησης του T-κυτταρικού υποδοχέα, το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-kappa B, της ενεργοποίησης των MAPK ιστονών, της φωσφορυλίωσης και μεθυλίωσης των ιστονών κ.ά (50,60,145).



#### Σχήμα 14. Η ακτιβίνη-A καταστέλλει την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων.

Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων μοριακών μηχανισμών, μέσω των οποίων η ακτιβίνη-A περιορίζει την παθογενετική δράση των Th17 κυττάρων. Η ακτιβίνη-A προσδένεται στους τύπου I και II υποδοχείς της, οι οποίοι ενεργοποιούν το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι pSmad2/3. Αυτό ακολούθως επάγει την ενεργοποίηση των AhR, STAT3 και c-Maf, που μεταφέρονται στον πυρήνα και προκαλούν αύξηση των CD39, CD73 και IL-10 στα Th17 κύτταρα. Ταυτόχρονα, ο AhR καθοδηγεί την έκφραση της πρωτεΐνης Phd1, η οποία μαζί με το Phd2, μειώνει τη σταθερότητα του Hif1- $\alpha$ . Τα CD39 και CD73 εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια των Th17 κυττάρων, όπου και αποικοδομούν το eATP και περιορίζουν περαιτέρω τη σηματοδότηση του Hif1- $\alpha$ . Τελικά, όλα αυτά τα πυροδοτούμενα από την ακτιβίνη-A μοριακά γεγονότα, οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή της IL-10 και μειωμένη έκκριση των IFN- $\gamma$  και GM-CSF, καθιστώντας τα Th17 κύτταρα λιγότερο παθογενετικά.

Οι μελέτες μας είχαν και μεταφραστικό ενδιαφέρον καθώς έδειξαν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας μορφής, σε σχέση με μάρτυρες. Αναλογιζόμενοι την έντονη ανοσοκατασταλτική δράση της

ακτιβίνης-A στην ΠΑΕ, η αυξημένη έκφρασή της στο πλαίσιο της ΣΚΠ, μπορεί να φαίνεται οξύμωρη. Παρόλα αυτά, αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν καταγραφεί για την έκφραση των IL-10 και TGF- $\beta$ , σε ασθενείς με ΣΚΠ, υποστηρίζοντας την άποψη ότι παρόλο που αυτοί οι ανοσορρυθμιστικοί παράγοντες είναι αυξημένοι, οι δράσεις τους και/ή στοιχεία της σηματοδότησής τους δε λειτουργούν φυσιολογικά πιθανώς λόγω του έντονα φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος του ΚΝΣ κατά την αυτοανοσία (191-193). Επιπλέον, περιορισμοί και μεταβλητές παράμετροι (π.χ. η φαρμακευτική αγωγή) που συνήθως παρατηρούνται κατά την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων σε μελέτες μικρού αριθμού ατόμων πιθανώς να επηρεάζουν τα ευρήματά μας και νέες αναλύσεις σε μεγαλύτερης κλίμακας μελέτες πρέπει να διεξαχθούν για την πιστοποίηση των αποτελεσμάτων μας. Είναι επίσης πολύ ενδιαφέρον το εύρημα ότι η ακτιβίνη-A καταστέλλει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων Th17 κυττάρων με παθογενετικές δράσεις. Ταυτόχρονα, η ακτιβίνη-A μειώνει την έκκριση των IFN- $\gamma$  και IL-17 και αυξάνει τα επίπεδα της IL-10, στα T δραστικά κύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ. Αυτά τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση με ακτιβίνη-A των αυτοδραστικών Th17 κυττάρων σε ασθενείς με ΣΚΠ, είναι ικανή να τα εφοδιάσει με αντι-φλεγμονώδεις, ιστο-προστατευτικές ιδιότητες και πιστεύουμε ότι μελλοντικές μελέτες, θα αποσαφηνίσουν τη συγκεκριμένη παρατήρηση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας αποκάλυψαν νέες δράσεις της ακτιβίνης-A, στην καταστολή της παθογένειας των Th17 κυτταρικών αποκρίσεων, στη βελτίωση της κλινικής εικόνας της ΠΑΕ καθώς και μείωση της αυτοάνοσης φλεγμονής στο ΚΝΣ. Έχοντας υπόψη ότι τρέχουσες κλινικές μελέτες στοχεύουν στη μείωση/τροποποίηση της παθογενετικής δράσης των Th17 κυττάρων για τη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών, τα ευρήματά μας παρουσιάζουν σημαντικές ευκαιρίες για την αξιοποίηση της ακτιβίνης-A και/ή του σηματοδοτικού της μονοπατιού, ως θεραπευτικούς στόχους για τη μείωση της σοβαρότητάς της ΣΚΠ καθώς και την επιβράδυνση της εξέλιξής της. Τέλος, ανάλυση των προστατευτικών μηχανισμών που επάγονται από την ακτιβίνη A καθώς και του ρόλου τους στην καταστολή των Th17 κυτταρικών αποκρίσεων μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό και την υλοποίηση νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων και για άλλες αυτοάνοσες ασθένειες που σχετίζονται με υπερ-αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος όπως ο ερυθρηματώδης λύκος και η νόσος σταθερής φλεγμονής του εντέρου.

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κατασταλτική δράση της ακτιβίνης-Α στην εξέλιξη της ΠΑΕ, συνδυαστικά με τη γενικότερη τροποποίηση της παθογενετικής δράσης των Th17 κυττάρων, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση της παθογένειας της ΣΚΠ αλλά και για την εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Παρόλα αυτά, θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί και η επίδραση της ακτιβίνης-Α σε άλλους κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στις αυτοάνοσες αποκρίσεις στη ΣΚΠ, όπως είναι τα μυελοειδή κύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, κύτταρα της μικρογλοίας και τα αστροκύτταρα. Παράλληλα, θα μπορούσε να εξετασθεί με ποικίλες μοριακές και ανοσολογικές μεθόδους το προφίλ των προ- και αντι- φλεγμονωδών παραγόντων που παράγονται στο ΚΝΣ, παρουσία ακτιβίνης-Α, προκειμένου να βρεθούν νέοι μοριακοί δείκτες που σχετίζονται με την καταστολή της παθογένειας της ΣΚΠ και με μια βελτιωμένη απόκριση των ασθενών στις διάφορες θεραπείες.

Επιπλέον, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το πειραματικό μυικό μοντέλο επαγόμενης ΠΑΕ από PLP<sub>139-151</sub>, το οποίο αποτελεί μοντέλο που προσομοιάζει πολύ στενά με την υποτροπιάζουσα μορφή ΣΚΠ, καθώς και τη χρόνια μορφή της νόσου, προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσο η θεραπευτική χορήγηση της ακτιβίνης-Α μπορεί να ελαττώσει τον αριθμό και τη σοβαρότητα των εξάρσεων της νόσου. Με τα πειράματα αυτά, θα μας δοθεί επιπλέον η δυνατότητα να εξετάσουμε το μηχανισμό δράσης της κυτταροκίνης αυτής στις περιόδους υφέσεων και εξάρσεων και στους ανοσοκυτταρικούς πληθυσμούς Th1, Th17 και σε κύτταρα του ΚΝΣ.

Η μελέτη του ρόλου της ακτιβίνης-Α στις αυτοάνοσες αποκρίσεις των T λεμφοκυττάρων, σε ασθενείς με ΣΚΠ, υποτροπιάζουσας μορφής, που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μπορεί να επεκταθεί σε ευρύτερης κλίμακας μελέτη, που θα περιλαμβάνει μεγαλύτερο αριθμό ασθενών από διάφορους υπότυπους της νόσου και σε ασθενείς που βρίσκονται σε διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να αποκαλυφθούν οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της ακτιβίνης-Α ανάλογα με το φαινότυπο της ασθένειας και να ανακαλυφθούν νέοι βιοδείκτες που σχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου και την ανοσοαπόκριση στις υπάρχουσες θεραπείες. Συμπληρωματικά, θα μπορούσαμε να επεκτείνουμε τη μελέτη μας διερευνώντας το ρόλο της ακτιβίνης-Α στην καταστολή των ανθρώπινων T κυτταρικών κλώνων, που έχουν

δημιουργηθεί από ασθενείς με ΣΚΠ, μετά από *ex vivo* ενεργοποίηση, έναντι συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων που προέρχονται από το ΚΝΣ και για τα οποία είναι ειδικοί οι Τ κυτταρικοί κλώνοι. Με τον τρόπο αυτό θα αποσαφηνιστεί ο ρόλος της ακτιβίνης-Α στην αυτοάνοση φλεγμονή αυτοδραστικών Τ κυττάρων στους ασθενείς με ΣΚΠ. Πολύ σημαντικό εργαλείο σε αυτά τα πειράματα, θα είναι η χρήση κυτταρομετρίας μάζας (cytometry by time-of-flight, CyTOF), που έχει τη δυνατότητα, χρησιμοποιώντας μικρό αριθμό κυττάρων ( $<10^6$  Τ κύτταρα), να εξετάζει τον πλήρη ανοσοφαινότυπο των Τ κυτταρικών κλώνων, αποκαλύπτοντας πολύτιμες πληροφορίες που θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν έτσι ώστε να σχεδιαστούν νέα στοχευμένα πειραματικά πρωτόκολλα.

Συμπερασματικά, η πλήρης αποσαφήνιση της δράσης της ακτιβίνης-Α καθώς και του μηχανισμού της στη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων, μπορεί να την εμπλέξει ενεργά στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Compston A., Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2008;372(9648):1502-1517
2. Ontaneda D., Hyland M., Cohen J. Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics. *Annu Rev Med*. 2012;63(1):389-404.
3. Plemel J., Liu W, Yong V. Remyelination therapies: a new direction and challenge in multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017;16(9):617-634.
4. Gandhi R., Laroni A., Weiner H. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;221(1-2):7-14.
5. Dendrou C., Fugger L., Friese M. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(9):545-558.
6. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(6):393-407
7. Lowther D., Hafler D. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev*. 2012;248(1):156-169.
8. Montero E., Nussbaum G., Kaye J. et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun*. 2004;23(1):1-7.
9. Khattry R., Cox T., Yasayko S., Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337-342.
10. Frisullo G. Nociti V., Iorio R. et al. Regulatory T cells fail to suppress CD4+ T-bet+T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology*. 2009;127(3):418-428.
11. Zeng H., Zhang R., Jin B., Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):566-571.
12. Barrat F., Cua D., Boonstra A. et al. In Vitro Generation of Interleukin 10-producing Regulatory CD4+T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper Type 1 (Th1)- and Th2-inducing Cytokines. *J Exp Med*. 2002;195(5):603-616.
13. Farooqi N., Gran B., Constantinescu CS. Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurochem*. 2010;115:829-844.
14. Libbey JE, Fujinami RS. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine*. 2010

15. Kawakami N., et al. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med* 201, 1805-1814 (2005).
16. Greter M., et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11, 328-334 (2005).
17. Dijkstra C.D., De Groot, C.J. & Huitinga, I. The role of macrophages in demyelination. *J Neuroimmunol* 40, 183-188 (1992).
18. Schluesener H.J., Sobel, R.A., Linington, C. & Weiner, H.L. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 139, 4016-4021 (1987).
19. Liningto, C., Bradl, M., Lassmann H., Brunner C. & Vass, K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130, 443-454 (1988)
20. Genain C.P., et al. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a non human primate. *J Clin Invest* 96, 2966-2974 (1995)
21. Korn T., Mitsdoerffer M. & Kuchroo V.K. Immunological basis for the development of tissue inflammation and organ-specific autoimmunity in animal models of multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ* 51, 43-74 (2010).
22. Torkildsen Ø, Myhr K, Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol.* 2015;23:18-27.
23. Louveau, A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., et al.(2015). Structural and functional features of central nervous system lymphaticvessels. *Nature* 523, 337–341
24. Da Mesquita, S., Louveau A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison R. C.,Kingsmore, K. M., et al. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics inaging and Alzheimer’s disease. *Nature* 560, 185–191
25. Lazarevic V., Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(11):777-789.
26. Rostami A., Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013;333(1-2):76-87.
27. Ferber IA, Brocke S., Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D., Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of

- experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) *J Immunol.* 1996;156:5–7
28. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1996;157:3223–3227.
29. Becher, B., Durell, B.G., Noelle, R.J. 2002. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of IL-12. *J. Clin. Invest.* 110:493-497.
30. Gran, B., et al. 2002. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J. Immunol.* 169:7104-7110.
31. Zhang, G.X., et al. 2003. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J. Immunol.* 170:2153-2160.
32. Fernando V, Omura S, Sato F, et al. Regulation of an autoimmune model for multiple sclerosis in Th2-biased GATA3 transgenic mice. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):1700-1718. Published 2014 Jan 23.
33. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421(6924):744-748.
34. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517
35. Graeber K, Olsen N. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. *Inflammation Research.* 2011;61(2):87-96.
36. Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3747-3757.
37. Babaloo Z, Aliparasti MR, Babaiea F, Almasi S, Baradaran B, Farhoudi M. The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. *Immunol Lett.* 2015;164(2):76-80.
38. Gaffen L et al. “Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 10,4 a028522. 2 Apr. 2018
39. Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature.* 2013;496(7446):461-468.
40. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs



the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-1133.

41. Yang J, Stark GR. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res*. 2008;18(4):443-451.

42. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008;454(7202):350-352.

43. Lee Y, Awasthi A, Yosef N et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012;13(10):991-999.

44. El-Behi M, Ciric B, Dai H et al. The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*. 2011;12(6):568-575

45. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-971.

46. Yang Y, Weiner J, Liu Y et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med*. 2009;206(7):1549-1564.

47. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-189.

48. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10(3):314-324.

49. Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., & Kuchroo, V. K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, 496(7446), 513–517.

50. Ciofani M, Madar A, Galan C et al. A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell*. 2012;151(2):289-303

51. Harrington L, Mangan P, Weaver C. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(3):349-356.

52. Chewing J, Weaver C. Development and Survival of Th17 Cells within the Intestines: The Influence of Microbiome- and Diet-Derived Signals. *The Journal of Immunology*. 2014;193(10):4769-4777.

53. Tanaka S, Suto A, Iwamoto T et al. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR $\gamma$ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med*.

2014;211(9):1857-1874.

54. Martin B, Wang C, Zhang C et al. T cell–intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Immunol.* 2016;17(5):583-592.

55. Quintana F, Jin H, Burns E et al. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. *Nat Immunol.* 2012;13(8):770-777

56. Hasan Z, Koizumi S, Sasaki D et al. JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun.* 2017;8:15628.

57. Meyer zu Horste G, Wu C, Wang C et al. RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell Rep.* 2016;16(2):392-404

58. Lu D, Liu L, Ji X et al. The phosphatase DUSP2 controls the activity of the transcription activator STAT3 and regulates TH17 differentiation. *Nat Immunol.* 2015;16(12):1263-1273.

59. Garg A, Amatya N, Chen K et al. MCP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. *Immunity.* 2015;43(3):475-487.

60. Gaublomme J, Yosef N, Lee Y et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell.* 2015;163(6):1400-1412.

61. Lainé A, Martin B, Luka M et al. Foxo1 Is a T Cell–Intrinsic Inhibitor of the ROR $\gamma$ t-Th17 Program. *The Journal of Immunology.* 2015;195(4):1791-1803.

62. Ouyang X, Zhang R, Yang J et al. Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for TH17 cell differentiation. *Nat Commun.* 2011;2(1).

63. Karwacz K, Miraldi E, Pokrovskii M et al. Critical role of IRF1 and BATF in forming chromatin landscape during type 1 regulatory cell differentiation. *Nat Immunol.* 2017;18(4):412-421.

64. H.W. Lim, J. Lee, P. Hillsamer, C.H. Kim, Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3 $\beta$  regulatory T cells, *J. Immunol.* 180 (2008) 122-129.

65. Lubberts E., The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2015) 562.

66. R. Ramesh, L. Kozhaya, K. McKeivitt, I.M. Djuretic, T.J. Carlson, M.A. Quintero, et al., Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids, *J. Exp. Med.* 211 (2014) 89-104.

67. L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, M.C. Rossi, V. Querci, A. Mazzoni, et al., Distinctive

features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells, *Eur. J. Immunol.* 42 (2012) 3180-3188.

68. E.V. Acosta-Rodriguez, L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, et al., Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 639-646.

69. K. Nistala, S. Adams, H. Cambrook, S. Ursu, B. Olivito, W. de Jager, et al., Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 14751-14756.

70. R. Noster, R. Riedel, M.F. Mashreghi, H. Radbruch, L. Harms, C. Haftmann, et al., IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014), 241ra80.

71. D.M. Kofler, A. Marson, M. Dominguez-Villar, S. Xiao, V.K. Kuchroo, D.A. Hafler, Decreased RORC-dependent silencing of prostaglandin receptor EP2 induces autoimmune Th17 cells, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 2513-2522.

72. D. Hu, S. Notarbartolo, T. Croonenborghs, B. Patel, R. Cialic, T.H. Yang, et al., Transcriptional signature of human pro-inflammatory TH17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1600.

73. H. Kubagawa, M.C. Carroll, C.O. Jacob, K.S. Lang, K.H. Lee, T. Mak, et al., Nomenclature of Toso, Fas apoptosis inhibitory molecule 3, and IgM FcR, *J. Immunol.* 194 (2015) 4055-4057

74. Yang B, Floess S, Hagemann S et al. Development of a unique epigenetic signature during in vivo Th17 differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):1537-1548.

75. Hirota K, Duarte J, Veldhoen M et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011;12(3):255-263.

76. Gagliani N, Vesely M, Iseppon A et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature.* 2015;523(7559):221-225.

77. Mukasa R, Balasubramani A, Lee Y et al. Epigenetic Instability of Cytokine and Transcription Factor Gene Loci Underlies Plasticity of the T Helper 17 Cell Lineage. *Immunity.* 2010;32(5):616-627.

78. Quintana F. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response. *Immunology.* 2013;138(3):183-189.

79. Woodruff TK. Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem Pharmacol*

1998; 55:953-63.

80. Wong WL, Garg SJ, Woodruff T, Bald L, Fendly B, Lofgren JA. Monoclonal antibody based ELISAs for measurement of activins in biological fluids. *J Immunol Methods* 1993; 165:1-10.

81. A.J. Mason, P.G. Farnworth, J. Sullivan, Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) 1055–1065

82. Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun Signal* 2009; 7:15.

83. Kariyawasam H. H, M. Semitekolou, D.S. Robinson, G. Xanthou, Activin-A: a novel critical regulator of allergic asthma, *Clin. Exp. Allergy* 41 (2011) 1505–1514

84. Chen W., P.T. Dijke, Immunoregulation by members of the TGF $\beta$  superfamily, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 723–740

85. M.M. Matzuk, T.R. Kumar, A. Bradley, Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II, *Nature* 374 (1995) 356–360

86. S.A. Pangas, T.K. Woodruff, Activin signal transduction pathways, *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (2000) 309–314

87. J. Massagué, Y.G. Chen, Controlling TGF- $\beta$  signaling, *Genes Dev.* 14 (2000) 627–644

88. M. Namwanje, C.W. Brown, Activins and inhibins: roles in development, physiology, and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (2016) a021881

89. Y. Xia, A.L. Schneyer, The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function, *J. Endocrinol.* 202 (2009) 1–12

90. C.A. Harrison, P.C. Gray, W.W. Vale, D.M. Robertson, Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications, *Trends Endocrinol. Metab.* 16 (2005) 73–78

91. M. Afrakhte, A. Morén, S. Jossan, S. Itoh, K. Sampath, B. Westermarck, et al., Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- $\beta$  family members, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998) 505–511

92. S.-Y. Wang, G.-X. Tai, P.-Y. Zhang, D.-P. Mu, X.-J. Zhang, Z.-H. Liu, Inhibitory effect of activin A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells, *Cytokine* 42 (2008) 85–91

93. S. Ebert, M. Zeretzke, R. Nau, U. Michel, Microglial cells and peritoneal macrophages

- release activin A upon stimulation with Toll-like receptor agonists, *Neurosci. Lett.* 413 (2007) 241–244
94. N. Li, X. Cui, J. Ge, J. Li, L. Niu, H. Liu, et al., Activin A inhibits activities of lipopolysaccharide-activated macrophages via TLR4, not of TLR2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435 (2013) 222–228
95. J. Ge, Y. Wang, Y. Feng, H. Liu, X. Cui, F. Chen, et al., Direct effects of activin a on the activation of mouse macrophage RAW264.7 cells, *Cell. Mol. Immunol.* 6 (2009) 129–133
96. K. Ogawa, M. Funaba, Y. Chen, M. Tsujimoto, Activin a functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages, *J. Immunol.* 177 (2006) 6787–6794
97. Y. Wang, X. Cui, G. Tai, J. Ge, N. Li, F. Chen, et al., A critical role of activin a in I maturation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo, *Cell. Mol. Immunol.* 6 (2009) 387–392
98. X.J. Zhang, Y. Li, G.X. Tai, G.Y. Xu, P.Y. Zhang, Y. Yang, F.X. Lao, Z.H. Liu, Effects of activin a on the activities of the mouse peritoneal macrophages, *Cell. Mol. Immunol.* 2 (2005) 63–67.
99. K. Ogawa, M. Funaba, L.S. Mathews, T. Mizutani, Activin a stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages, *J. Imm*
100. J. Zhou, G. Tai, H. Liu, J. Ge, Y. Feng, F. Chen, et al., Activin A down-regulates the phagocytosis of lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo, *Cell. Immunol.* 255 (2009) 69–75
101. E. Sierra-Filardi, A. Puig-Kroger, F.J. Blanco, C. Nieto, R. Bragado, M.I. Palomero, et al., Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers, *Blood* 117 (2011) 5092–5101
102. J. Yu, L.E. Shao, J.N.L. Frigon, J. Lofgren, R. Schwall, Induced expression of the new cytokine, activin A, in human monocytes: inhibition by glucocorticoids and retinoic acid, *Immunology* 88 (1996) 368–374
103. M. Abe, Y. Shintani, Y. Eto, K. Harada, M. Kosaka, T. Matsumoto, Potent induction of activin A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002)
104. É. González-Domínguez, Á. Domínguez-Soto, C. Nieto, J.L. Flores-Sevilla, M. Pacheco-

- Blanco, V. Campos-Peña, et al., Atypical activin a and IL-10 production impairs human CD16 monocyte differentiation into anti-inflammatory macrophages, *J. Immunol.* 196 (2016) 1327–1337
105. M. Ohguchi, K. Yamato, Y. Ishihara, M. Koide, N. Ueda, N. Okahashi, et al., Activin a regulates the production of mature interleukin-1/3 and interleukin-1 receptor antagonist in human monocytic cells, *J. Interferon Cytokine Res.* 18 (1998) 491–498
106. K. Ogawa, M. Funaba, M. Tsujimoto, A dual role of activin A in regulating immunoglobulin production of B cells, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008)
107. H.-J. Lee, P.-H. Kim, Further characterization of activin A-induced IgA response in murine B lymphocytes, *Immune Netw.* 9 (2009)
108. T.L. Bonfield, B.P. Barna, N. John, A. Malur, D.A. Culver, M.S. Kavuru, et al., Suppression of activin A in autoimmune lung disease associated with anti-GM-CSF, *J. Autoimmun.* 26 (2006) 37–41
109. A. Rosendahl, Transforming growth factor- $\beta$ - and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis, *Int. Immunol.* 15 (2003) 1401–1414
110. P. Licona, J. Chimal-Monroy, G. Soldevila, Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development, *Dev. Dynam.* 235 (2006) 1124–1132
111. M. Hedger, A. Drummond, D. Robertson, G. Risbridger, D.D. Kretse, Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro, *Mol. Cell. Endocrinol.* 61 (1989) 133–138
112. C. Karagiannidis, G. Hense, C. Martin, M. Epstein, B. Ruckert, P. Mantel, et al., Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF $\beta$ -mediated airway remodeling in asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 (2006) 111–118
113. M. Locci, J.E. Wu, F. Arumemi, Z. Mikulski, C. Dahlberg, A.T. Miller, et al., Activin A programs the differentiation of human TFH cells, *Nat. Immunol.* 17 (2016)
114. C.P. Jones, L.G. Gregory, B. Causton, G.A. Campbell, C.M. Lloyd, Activin A and TGF- $\beta$  promote TH9 cell-mediated pulmonary allergic pathology, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 1000–1010
115. S. Huber, F.R. Stahl, J. Schrader, S. Lüth, K. Presser, A. Carambia, et al., Activin a promotes the TGF- $\beta$ -induced conversion of CD4 CD25- T cells into Foxp3 induced regulatory T cells, *J. Immunol.* 182 (2009) 4633–4640
116. X. Ni, J. Tao, J. Barbi, Q. Chen, B.V. Park, Z. Li, et al., YAP is essential for treg-mediated

suppression of antitumor immunity, *Cancer Discov.* 8 (2018) 1026–1043

117. N.C. Robson, H. Wei, T. Mcalpine, N. Kirkpatrick, J. Cebon, E. Maraskovsky, Activin-A attenuates several human natural killer cell functions, *Blood* 113 (2009) 3218–3225.

118. C. Ma, Z. Liu, S. Shang, L. Jiang, X. Lv, Y. Qi, et al., Activin A regulates activities of peripheral blood natural killer cells of mouse in an autocrine and paracrine manner, *Exp. Cell Res.* 374 (2019) 114–121

119. J. Rautela, L.F. Dagley, I.S. Schuster, S. Hediye-Zadeh, R. Delconte, J. Cursons, et al., Therapeutic blockade of Activin-A improves NK cell function and anti-tumor immunity, *BioRxiv Data v1*, (2018)

120. H. Wu, Y. Chen, W.R. Winnall, D.J. Phillips, M.P. Hedger, Regulation of activin A release from murine bone marrow-derived neutrophil precursors by tumour necrosis factor- $\alpha$  and insulin, *Cytokine* 61 (2013) 199–204

121. Y. Qi, J. Ge, C. Ma, N. Wu, X. Cui, Z. Liu, Activin A regulates activation of mouse neutrophils by Smad3 signalling, *Open Biol.* 7 (2017) 160342

122. Y. Chen, H. Wu, W.R. Winnall, K.L. Loveland, Y. Mankanji, D.J. Phillips, et al., Tumour necrosis factor- $\alpha$  stimulates human neutrophils to release preformed activin A, *Immunol. Cell Biol.* 89 (2011) 889–896

123. D. Xie, Z. Liu, J. Wu, W. Feng, K. Yang, J. Deng, et al., The effects of activin A on the migration of human breast cancer cells and neutrophils and their migratory interaction, *Exp. Cell Res.* 357 (2017) 107–115

124. H. Wilms, T. Schwark, L.-O. Brandenburg, J. Sievers, R. Dengler, G.N. Deuschl, et al., Regulation of activin A synthesis in microglial cells: pathophysiological implications for bacterial meningitis, *J. Neurosci. Res.* 88 (2010) 16–23

125. A. Abdipranoto-Cowley, J.S. Park, D. Croucher, J. Daniel, S. Henshall, S. Galbraith, et al., Activin a is essential for neurogenesis following neurodegeneration, *Stem Cells* 27 (2009) 1330–1346

126. S. Stayte, P. Rentsch, A.R. Tröscher, M. Bamberger, K.M. Li, B. Vissel, Activin a inhibits mptp and LPS-induced increases in inflammatory cell populations and loss of dopamine neurons in the mouse midbrain in vivo, *PLoS One* 12 (2017) e0167211

127. C.J. Bohlen, F.C. Bennett, A.F. Tucker, H.Y. Collins, S.B. Mulinyawe, B.A. Barres, Diverse requirements for microglial survival, specification, and function revealed by defined-medium cultures, *Neuron* 94 (2017) 759–773 e8

128. C. Diesselberg, S. Ribes, J. Seele, A. Kaufmann, S. Redlich, S. Bunkowski, et al., Activin A increases phagocytosis of Escherichia coli K1 by primary murine microglial cells activated by toll-like receptor agonists, *J. Neuroinflammation* 15 (2018) 175
129. S. Sugama, T. Takenouchi, H. Kitani, M. Fujita, M. Hashimoto, Activin as an antiinflammatory cytokine produced by microglia, *J. Neuroimmunol.* 192 (2007) 31–39
130. V.E. Miron, A. Boyd, J.-W. Zhao, T.J. Yuen, J.M. Ruckh, J.L. Shadrach, et al., M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination, *Nat. Neurosci.* 16 (2013) 1211–1218
131. S.S. El-Gendi, A.E.A. Moniem, N.M. Tawfik, M.M. Ashmawy, O.A. Mohammed, A.K. Mostafa, et al., Value of serum and synovial fluid activin A and inhibin A in some rheumatic diseases, *Int. J. Rheum. Dis.* 13 (2010) 273–279
132. M. Torricelli, F. Bellisai, R. Novembri, L.R. Galeazzi, A. Iuliano, C. Voltolini, et al., High levels of maternal serum IL-17 and activin a in pregnant women affected by systemic lupus erythematosus, *Am. J. Reprod. Immunol.* 66 (2011) 84–89
133. Dolter Yu, Yu Shao, Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies, *Clin. Exp. Immunol.* 112 (1998) 126–132
134. B.S. Palacios, L. Estrada-Capetillo, E. Izquierdo, G. Criado, C. Nieto, C. Municio, et al., Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile, *J. Pathol.* 235 (2014) 515–526
135. F. Ota, A. Maeshima, S. Yamashita, H. Ikeuchi, Y. Kaneko, T. Kuroiwa, et al., Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 2442–2449
136. B.P. Barna, A. Malur, H. Dalrymple, R. Karnekar, D.A. Culver, S. Abraham, et al., A novel 1,25-dihydroxyvitamin D–activin A pathway in human alveolar macrophages is dysfunctional in patients with pulmonary alveolar proteinosis (PAP), *Autoimmunity* 42 (2009) 56–62
137. A. Dillenburg, G. Ireland, R.K. Holloway, C.L. Davies, F.L. Evans, M. Swire, et al., Activin receptors regulate the oligodendrocyte lineage in health and disease, *Acta Neuropathol.* 135 (2018) 887–906
138. M. Semitekolou et al., Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. *J. Exp. Med.* 206, 1769–1785 (2009).



139. S. Tousa et al., Activin-A co-opts IRF4 and AhR signaling to induce human regulatory T cells that restrain asthmatic responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E2891–E2900 (2017).
140. T. Korn, A. Kallies, T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 179–194 (2017).
141. P. R. Burkett, G. Meyer zu Horste, V. K. Kuchroo, Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 125, 2211–2219 (2015).
142. G. R. Dos Passos, D. K. Sato, J. Becker, K. Fujihara, Th17 cells pathways in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders: Pathophysiological and therapeutic implications. *Mediators Inflamm.* 2016, 5314541 (2016).
143. D. Matuszevicius et al., Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 5, 101–104 (1999).
144. J. S. Tzartos et al., Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172, 146–155 (2008).
145. B. Stockinger, S. Omenetti, The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 535–544 (2017).
146. K. Ichiyama et al., The MicroRNA-183-96-182 cluster promotes T helper 17 cell pathogenicity by negatively regulating transcription factor Foxo1 expression. *Immunity* 44, 1284–1298 (2016).
147. C. Wang et al., CD5L/AIM regulates lipid biosynthesis and restrains Th17 cell pathogenicity. *Cell* 163, 1413–1427 (2015).
148. C. E. Zielinski et al., Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 484, 514–518 (2012).
149. C. Heinemann et al., IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1. *Nat. Commun.* 5, 3770 (2014).
150. M. P. Hedger, D. M. de Kretser, The activins and their binding protein, follistatin Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 285–295 (2013).
151. I. Morianos, G. Papadopoulou, M. Semitekolou, G. Xanthou, Activin-A in the regulation of immunity in health and disease. *J. Autoimmun.* 104, 102314 (2019).
152. L. Berod et al., De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T

- helper 17 cells. *Nat. Med.* 20, 1327–1333 (2014).
153. P. W. F. Karmaus et al., Metabolic heterogeneity underlies reciprocal fates of TH17 cell stemness and plasticity. *Nature* 565, 101–105 (2019).
154. F. J. Quintana et al., Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71 (2008).
155. A. L. Croxford, F. C. Kurschus, A. Waisman, Cutting edge: An IL-17F-CreEYFP reporter mouse allows fate mapping of Th17 cells. *J. Immunol.* 182, 1237–1241 (2009).
156. I. D. Mascalfroni et al., Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- $\alpha$ . *Nat. Med.* 21, 638–646 (2015).
157. S. Deaglio et al., Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257–1265 (2007).
158. J. H. Mills et al., CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9325–9330 (2008).
159. G. Hernandez-Mir, M. J. McGeachy, CD73 is expressed by inflammatory Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis but does not limit differentiation or pathogenesis. *PLoS One* 12, e0173655 (2017).
160. M. Jakovljevic et al., Down-regulation of NTPDase2 and ADP-sensitive P2 purinoceptors correlate with severity of symptoms during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 333 (2017).
161. F. Chalmin et al., Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36, 362–373 (2012).
162. Y. Jiang et al., Epigenetic activation during T helper 17 cell differentiation is mediated by Tripartite motif containing 28. *Nat. Commun.* 9, 1424 (2018).
163. X.-P. Yang et al., Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat. Immunol.* 12, 247–254 (2011).
164. L. Apetoh et al., The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11, 854–861 (2010).
165. R. Gandhi et al., Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 11, 846–853 (2010).

166. L. Z. Shi et al., HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 208, 1367–1376 (2011).
167. E. V. Dang et al., Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146, 772–784 (2011).
168. C. Teunissen et al., Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 13, 1802–1809 (2013).
169. J. Aragonés et al., Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat. Genet.* 40, 170–180 (2008).
170. S. Srinivas et al., Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol.* 1, 4 (2001).
171. I.M. Stromnes, and J.M. Goverman, Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* 1, 1810–1819 (2006).
172. K.J. Livak, and T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-TimeQ quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 25, 402–408 (2001).
173. L. Heng, Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Available at <https://arxiv.org/abs/1303.3997>. V2. Deposited 16 Mar 2013.
174. A.R. Quinlan, and I.M. Hall, BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 26, 841–842 (2010).
175. W.J. Kent et al., BigWig and BigBed: enabling browsing of large distributed datasets. *Bioinformatics.* 26, 2204–2207 (2010).
176. B. Jimenez-Garcia et. al, "pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring". *Bioinformatics.* 29, 1698-1699 (2013).
177. Xue L. et al., "PRODIGY: a web-server for predicting the binding affinity in protein-protein complexes". *Bioinformatics.* 32, 3676-3678 (2016).
178. Adam Hospital, Pau Andrio, Carles Fenollosa, Damjan Cicin-Sain, Modesto Orozco, Josep Lluís Gelpí. MDWeb and MDMoby: an integrated web-based platform for molecular dynamics simulations. *Bioinformatics.* 28, 1278-1279 (2012).
179. M. Martin, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.* 17, 10 (2011).
180. D. Kim, G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, and S.L. Salzberg, TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.

Genome Biol. 14, R36 (2013).

181. H. Li et al., The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25, 2078–2079 (2009).

182. P. Moulos, and P. Hatzis, Systematic integration of RNA-Seq statistical algorithms for accurate detection of differential gene expression patterns. *Nucleic Acids Res.* 43, e25 (2014).

183. A. Manousopoulou et al., Quantitative proteomic profiling of primary cancer-associated fibroblasts in oesophageal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*. 118, 1200–1207 (2018).

184. P. C. Mahon, K. Hirota, G. L. Semenza, FIH-1: A novel protein that interacts with HIF1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15, 2675–2686 (2001).

185. S. E. Weinberg et al., Mitochondrial complex III is essential for suppressive function of regulatory T cells. *Nature* 565, 495–499 (2019).

186. B. Buchthal, U. Weiss, H. Bading, Post-injury nose-to-brain delivery of activin A and SerpinB2 reduces brain damage in a mouse stroke model. *Mol. Ther.* 26, 2357–2365 (2018).

187. D. Lau, C. P. Bengtson, B. Buchthal, H. Bading, BDNF reduces toxic extrasynaptic NMDA receptor signaling via synaptic NMDA receptors and nuclear-calcium-induced transcription of *inhba/activin A*. *Cell Rep.* 12, 1353–1366 (2015).

188. F. S. Regateiro et al., Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* 41, 2955–2965 (2011).

189. Z. Zhang et al., Activin a promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells via STAT3-dependent Smad/CTGF pathway. *Cell Commun. Signal.* 17, 45 (2019).

190. L. Gabryšová et al., c-Maf controls immune responses by regulating disease-specific gene networks and repressing IL-2 in CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* 19, 497–507 (2018).

191. A. L. Ji, Z. H. Liu, W. W. Chen, W. J. Huang, The clinical significance of level changes of hs-CRP, IL-10 and TNF for patients with MS during active and relieving period. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 4274–4276 (2016).

192. J. Mellergård, M. Edström, M. Vrethem, J. Ernerudh, C. Dahle, Natalizumab treatment in multiple sclerosis: Marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. *Mult. Scler.* 16, 208–217 (2010).

193. J. D. Lünemann, O. Aktas, P. Gniadek, R. Zschenderlein, F. Zipp, Downregulation of transforming growth factor-beta1 in interferon-beta1a-treated MS patients. *Neurology* 57,

1132–1134 (2001).

194. Bono M, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3454-3460.

195. Takenaka M, Robson S, Quintana F. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol.* 2016;37(7):427-439.

196. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev.* 2013;252(1):52-77.