

Επαγωγή έκφρασης IDO1 σε CD4+ T λεμφοκύτταρα υπο αγωγή ντεσιταμπίνης

Μ.Λυσάνδρου, Χ.Πιερίδου, Δ.Κεφάλια, Π.Στάμου, Μ.Κυριάκου, Ν.Σαββόπουλος, Π.Κωστέας, Α.Σπυριδωνίδης

1Εργαστήριο Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών

2Ινστιτούτο Κυτταρικών Θεραπειών, Πανεπιστήμιο Πατρών

3The Centre for the Study of Haematological and other Malignancies, Λευκωσία, Κύπρος

Σκοπός: Προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας έχει δείξει ότι η Decitabine (Dec) επάγει την de novo έκφραση του HLA-G στα T κύτταρα μέσω απομεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου. Τα HLA-G+ CD4+ T κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή με Dec αποκτούν ισχυρή ανοσοκατασταλτική λειτουργία in vitro, η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενη, αλλά όχι αποκλειστική, από το HLA-G, υποδηλώνοντας έτσι μια συμπληρωματική κατασταλτική λειτουργία διαμεσολαβούμενη από άλλα γονίδια. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο χαρακτηρισμός του πλήρους μηχανισμού δράσης του ανοσοκατασταλτικού αυτού πληθυσμού.

Υλικά και Μέθοδοι: Απομονώθηκαν T κυττάρα (n=5) και μετά από αγωγή με Dec, απομονώθηκαν οι πληθυσμοί HLA-G+CD4+ και HLA-G-CD4+ με την χρήση κυτταροδιαχωρισμού (BD FACSAria III). Στη συνέχεια, απομονώθηκε υλικό RNA (miRNeasy kit, Qiagen) και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing - HiSeq 2000, Illumina) όπου οι αναγνώσεις αλληλουχιών ευθυγραμμίστηκαν με το γονιδίωμα αναφοράς (Homo sapiens: hg19 GRCh38). Για την αξιολόγηση της έκφρασης του IDO1, πραγματοποιήθηκαν RT-PCR σε HLA-G+ και HLA-G- απομονωμένα CD4+ T κύτταρα (n = 4). Μετά από απομόνωση υλικού RNA και σύνθεση cDNA, πραγματοποιήθηκαν TaqMan assays για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (BioRad CFX96). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη μέθοδο ΔΔCT και υπολογίστηκε η σχετική έκφραση του γονιδίου ως προς το ABL1 (housekeeping γονίδιο). Η έκφραση του IDO1 στα HLA-G+CD4+ T κύτταρα αξιολογήθηκε και με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (n=3). Τέλος, η στατιστική ανάλυση και η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκαν στα λογισμικά GraphPad Prism και FlowJo αντίστοιχα.

Αποτελέσματα: Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis – PCA) μαζί με το προφίλ γονιδιακής έκφρασης που προέκυψε από τη βιοπληροφορική ανάλυση απεικονίζουν έναν σαφή διαχωρισμό μεταξύ των δύο πληθυσμών. Επιπλέον, μια στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγράφων του γονιδίου IDO1 σημειώθηκε στον πληθυσμό HLA-G+CD4+ (log2 fold change = 2,55, padj = 0,028). Τα αποτελέσματα RT-PCR ανέδειξαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην σχετική έκφραση του IDO1 στα HLA-G+ κύτταρα σε σχέση με τα HLA-G- κύτταρα (εύρος HLA-G-CD4+ IDO1-σχετικής έκφρασης = $6,76 \times 10^{-5}$ – $65,14 \times 10^{-5}$, διάμεση = $11,22 \times 10^{-5}$ και εύρος HLA-G+CD4+ IDO1-σχετικής έκφρασης = $102,94 \times 10^{-5}$ – $184,41 \times 10^{-5}$, διάμεση = $142,8 \times 10^{-5}$, paired t-test p = 0,0476). Η κυτταρομετρία ροής επικύρωσε την αύξηση στην έκφραση του IDO1 στον HLA-G+CD4+ πληθυσμό μέσω της αύξησης της διάμεσης έντασης φθορισμού - MdfI - του IDO1 (εύρος HLA-G+CD4+IDO1-MdfI = 4680-7441, διάμεση = 6114 και εύρος HLA-G-CD4+IDO1-MdfI = 4070-6561, διάμεση 5096, paired t-test p = 0,02).

Συμπεράσματα: Συνοπτικά, στην παρούσα μελέτη αναδεικνύεται η επαγωγή της έκφρασης του IDO1 σε CD4+ T κύτταρα μετά από υπομεθυλιωτική αγωγή με Dec. Το IDO1 είναι γνωστό για τις ισχυρές ανοσορρυθμιστικές του ιδιότητες και θα μπορούσε έτσι να συμβάλει στη λειτουργία των HLA-G+CD4+ T κυττάρων. Μελλοντικά, η αποσαφήνιση του μηχανισμού ανοσοκαταστολής που προκαλείται από το IDO1 στα IDO1^{high} HLA-G+CD4+ T κύτταρα θα διερευνηθεί μέσω μοριακών, ανοσολογικών και λειτουργικών δοκιμασιών.