

*Arrb1*基因敲除对小鼠T淋巴细胞发育的影响

陈燕华 蒋光洁 郭维 张航 吕文琼 邹琳*

(重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

摘要 该文旨在研究*Arrb1*(β -arrestin1)基因敲除对小鼠T细胞发育的影响, 进一步探讨急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphocytic leukemia, T-ALL)发病机制。该文使用q-PCR、Western blot分别检测*Arrb1*基因敲除的C57BL/6J小鼠中*Arrb1*的mRNA和蛋白质水平; 流式细胞术检测*Arrb1*基因敲除小鼠及野生型小鼠的胸腺、外周血、淋巴结的T细胞比例。结果显示, 与野生型相比, *Arrb1*基因敲除小鼠的胸腺CD4CD8双阴(double negative, DN)细胞比例明显增加, DN1期细胞比例增加最为显著($P<0.05$), 而DN4期细胞比例减少($P<0.05$); CD4CD8双阳(double positive, DP)细胞比例显著减少($P<0.05$)。外周血CD4阳性T细胞比例减少($P<0.05$), 淋巴结CD4阳性T细胞比例以及CD4/CD8阳性T细胞比值减少($P<0.05$)。研究结果证明, *Arrb1*基因敲除显著影响小鼠T细胞发育, 使T细胞发育阻滞在DN期, 从而可能成为影响T-ALL发病的重要因素。

关键词 *Arrb1*; T细胞发育; 胸腺细胞

Effects of *Arrb1* Knockout on the Development of Mice T Lymphocytes

Chen Yanhua, Jiang Guangjie, Guo Wei, Zhang Hang, Lü Wenqiong, Zou Lin*

(Center for Clinical Molecular Medicine, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract The purpose of this study was to identify the influence of β -arrestin1 (*Arrb1*) gene knockout on the development of mice T lymphocytes and lay the foundation for further study on the pathogenesis of T-cell acute lymphocytic leukemia (T-ALL) mechanism. The expression of *Arrb1* was detected by q-PCR and Western blot respectively in *Arrb1* knockout C57BL/6J mice. Cell suspensions prepared from the thymus, peripheral blood or lymph node of *Arrb1* knockout and wild-type mice were detected by flow cytometry. Compared with wild-type mice, the *Arrb1* knockout mice showed a higher proportion of CD4CD8 double negative (DN) cells, especially for cells in DN1 stage ($P<0.05$), while it displayed a decreased proportion of cells in DN4 stage. Decreased proportion of cells CD4CD8 double positive (DP) cells in the thymus and CD4 positive T lymphocytes in the peripheral blood were detectable in *Arrb1* knockout mice. Also, the proportion of CD4 positive T lymphocytes and the ratio of CD4/CD8 positive T lymphocytes in the lymph node was decreased ($P<0.05$). Overall, these findings indicated that sustained *Arrb1* deficiency perturbs the development of T lymphocytes, which led to T lymphocytes arrest in DN stage, suggesting that *Arrb1* might be important, particular in T-ALL progression.

Keywords *Arrb1*; T-cell development; thymocytes

收稿日期: 2017-09-27

接受日期: 2017-12-29

国家自然科学基金(批准号: 81373444、81570142)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63622128, E-mail: zoulin74@126.com

Received: September 27, 2017

Accepted: December 29, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81373444, 81570142)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63622128, E-mail: zoulin74@126.com

网络出版时间: 2018-03-08 17:01:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180308.1701.012.html>

正常T淋巴细胞来源于骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs), HSCs首先分化为多能祖细胞, 后逐步分化为共同淋巴祖细胞, 完成早期造血发育, 随后T淋巴祖细胞经血循环进入胸腺发育成T淋巴细胞前体细胞, 在胸腺发育为功能性T淋巴细胞, 该过程复杂但高效有序^[1]。近年来有研究认为T淋巴细胞发育阻滞是T-ALL发病的关键因素^[2]。Arrb1是 β -arrestin家族的重要成员, 广泛表达于机体细胞, 具有调控基因表达功能^[3], 转导信号通路^[4], 介导受体内化^[5]等作用。在斑马鱼研究中发现, Arrb1可通过调控造血系统发育关键的Hoxa9(homeobox A9)、Tall等基因影响T淋巴细胞分化前早期造血过程^[6]。然而, Arrb1能否影响T淋巴细胞在胸腺中的正常发育, 尚未有研究报道。本研究通过检测Arrb1基因敲除鼠胸腺及外周血中T淋巴细胞比例变化, 验证Arrb1基因敲除对小鼠T淋巴细胞发育的影响, 为进一步探索T淋巴细胞发育阻滞可能导致的T-ALL(T-cell acute lymphocytic leukemia)形成机制提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 小鼠购自美国Jackson Laboratory(Maine, USA), 品系为C57BL/6J。基因背景为Arrb1基因敲除(knockout, KO), 雄性, 4~6周龄。无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级C57BL/6J小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。动物饲养在重庆医科大学附属儿童医院动物中心SPF动物房, 喂饲SPF级小鼠维持饮料。饲养屏障环境内温度控制在20~25 °C, 湿度控制在55%~60%, 垫料、饲料和饮水均经高温高压灭菌处理后使用。统一采食和饮水, 垫料每周更换2~3次。该动物实验通过了重庆医科大学动物实验中心伦理委员会批准。

1.1.2 主要实验设备 FACSCanto流式细胞仪购自BD公司。凝胶电泳仪、电泳转移仪和凝胶成像仪购自Bio-Rad公司。

1.1.3 主要试剂 小鼠DNA提取试剂配制如下。(1) 缓冲液A: 0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 100 μ L+10 mol/L NaOH 625 μ L, 加ddH₂O定容至250 mL, 室温保存;(2) 缓冲液B: 40 mmol/L Tribase 100 mL(pH3.0)。q-PCR引物购自武汉擎科生物技术有限公司。逆转录试剂盒、DNA Marker、SYBR Green II购自TaKaRa公司。PCR Master Mix(2 \times)购自北京天根生化科技有限公

司。RIPA细胞裂解液及Trizol RNA提取液购自北京百泰克生物技术有限公司。BCA蛋白质定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。兔源单克隆抗体Arrb1购自Abcam公司。兔源多克隆抗体GAPDH购自武汉三鹰生物技术有限公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL发光试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。胎牛血清购自Gibco公司。流式细胞术使用的抗体购自eBioscience公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 石蜡切片HE染色观察组织形态 取小鼠胸腺组织, 4%中性甲醛固定24 h后, 冲水、脱水、组织透明、浸蜡、包埋。进行组织切片, 切片厚度为4 μ m, 行HE染色, 光镜下观察组织形态学变化。

1.2.2 小鼠的基因型鉴定 子鼠3周龄时, 剪取子鼠耳部组织1.0 mm, 置于1.5 mL Eppendorf管中, 加入75 μ L缓冲液A, 100 °C金属浴40 min, 每20 min混匀、瞬离1次, 组织完全溶解后, 再加入225 μ L缓冲液B, 振荡混匀, 12 000 r/min离心3 min, 吸取上清用于扩增目的基因片段。小鼠基因型鉴定的q-PCR设计引物序列由Jackson Laboratory推荐(表1)。q-PCR体系为20 μ L, 扩增条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性1 min, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 拍照1次, 40个循环。

1.2.3 q-PCR法检测Arrb1基因的mRNA水平 Trizol法提取细胞总RNA, 逆转录为cDNA。PCR反应体系: 12.5 μ L SYBR II、10.5 μ L ddH₂O、1 μ L cDNA、上下游引物(表1)各0.5 μ L。反应条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性20 s, 58 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 循环35次, 每个循环结束检测荧光。

1.2.4 Western blot检测Arrb1蛋白质水平 RIPA裂解液提取细胞总蛋白质, 每30 μ L细胞沉淀加入150 μ L RIPA裂解液, 冰上裂解20 min, 每间隔5 min振荡混匀1次。4 °C、12 000 r/min离心20 min, 吸取上清。用BCA法检测蛋白质浓度, 加入5 \times Loading Buffer混匀后85 °C煮5 min, 取20 μ g蛋白质经10% SDS-PAGE电泳, PVDF膜转膜, 室温封闭1 h, 一抗Arrb1(1:500)、GAPDH(1:20 000), 4 °C孵育过夜。第2天, TBST洗膜, 山羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h, 配制ECL发光液进行显影定影。

1.2.5 流式细胞术分析 完整摘取胸腺和肠系膜淋巴结, 置于冰上预冷的染色缓冲液(含1% BSA的

PBS)中。将胸腺与淋巴结分别研磨, 200目滤网过滤置1.5 mL Eppendorf管中。离心后用红细胞裂解液去除红细胞, PBS洗1次, 收集到1.5 mL Eppendorf管中, 用PBS定容至1 mL, 混匀后, 取10 μ L细胞悬液, 稀释20倍后计数细胞数。细胞悬液1 000 r/min离心5 min, 将细胞浓度调整为 1×10^6 /mL。取 10^6 个细胞标记荧光抗体, 避光孵育30 min, 准备流式细胞术分析; 小鼠摘除眼球滴取外周血入EDTA抗凝管, 水平滚动混匀, 取200 μ L血液标记荧光抗体, 避光孵育30 min, 加入溶血剂放置5 min, 1000 r/min离心5 min, 100 μ L PBS重悬, 流式细胞术检测。

胸腺细胞、外周血以及淋巴结T细胞的流式细胞术分析用如下抗体进行标记。胸腺细胞DN1标记为 $CD3^+CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$, 胸腺细胞DN2标记为 $CD3^+CD4^-CD8^-CD44^+CD25^+$, 胸腺细胞DN3标记为 $CD3^+CD^-CD8^-CD44^-CD25^+$, 胸腺细胞DN4标记为 $CD3^+CD4^-CD8^-CD44^-CD25^-$, 胸腺细胞DP标记为

$CD3^+CD4^+CD8^+$, 胸腺细胞SP(single positive)标记为 $CD3^+CD4^+CD8^-$ 、 $CD3^+CD4^-CD8^+$; 外周血T细胞标记为 $CD3^+CD4^+CD8^-/CD3^+CD4^-CD8^+$; 淋巴结T细胞标记为 $CD3^+CD4^+CD8^-/CD3^+CD4^-CD8^+$ 。

1.3 统计学分析

数据分析采用SPSS 13.0软件包进行统计分析, 并以均数 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示, 两组间比较采用两独立样本的*t*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生长情况和基因型鉴定

大体形态观察, 与同周龄野生型(wild type, WT)小鼠相比较, *Arrb1* KO(*Arrb1*^{-/-})小鼠的生长良好, 反应正常(图1)。小鼠基因型鉴定采用Jackson Laboratory推荐q-PCR法, 引物序列见表1, 得到结果为*Arrb1*基因敲除小鼠的扩增曲线有两条, 而野生型

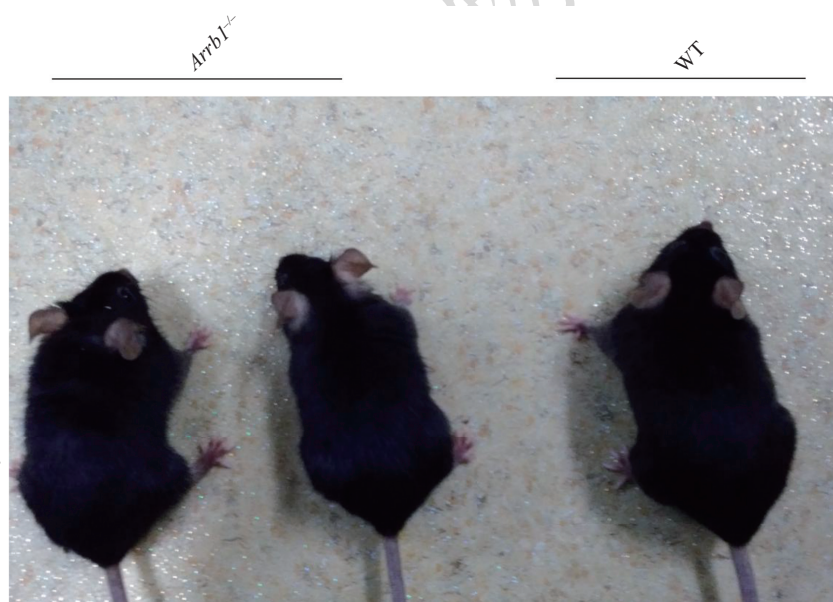


图1 *Arrb1*基因敲除小鼠大体形态

Fig.1 The gross morphology of *Arrb1* KO mice

表1 q-PCR引物信息

Table1 Sequences of the primers for q-PCR

基因名 Name	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reversed primer (5'→3')
Reference gene OIMR 1080/1081	CGG CTG CAT ACG CTT GAT C	CGA CAA GAC CGG CTT CCA T
<i>Arrb1</i> OIMR 1544/3580	CAC GTG GGC TCC AGC ATT	TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G
<i>Arrb1</i>	GAC AAA GGG ACC CGA GTG TT	GCA GGT CAG CGT CAC ATA GA
<i>GAPDH</i>	CAG CGA CAC CCA CTC CTC CAC CTT	CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT GCT

小鼠仅一条。

2.2 q-PCR检测*Arrb1*基因mRNA水平

裂解*Arrb1*基因敲除小鼠的胸腺和骨髓单个核细胞,用q-PCR的方法检测mRNA水平。引物序列见表1。结果发现,取对照组(WT组)为1,实验组*Arrb1*的mRNA表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$)(图2A和图2B)。

2.3 Western blot检测Arrb1蛋白质水平

进一步用Western blot验证*Arrb1*敲除水平,结果显示,在对照组胸腺及骨髓单个核细胞可检测到

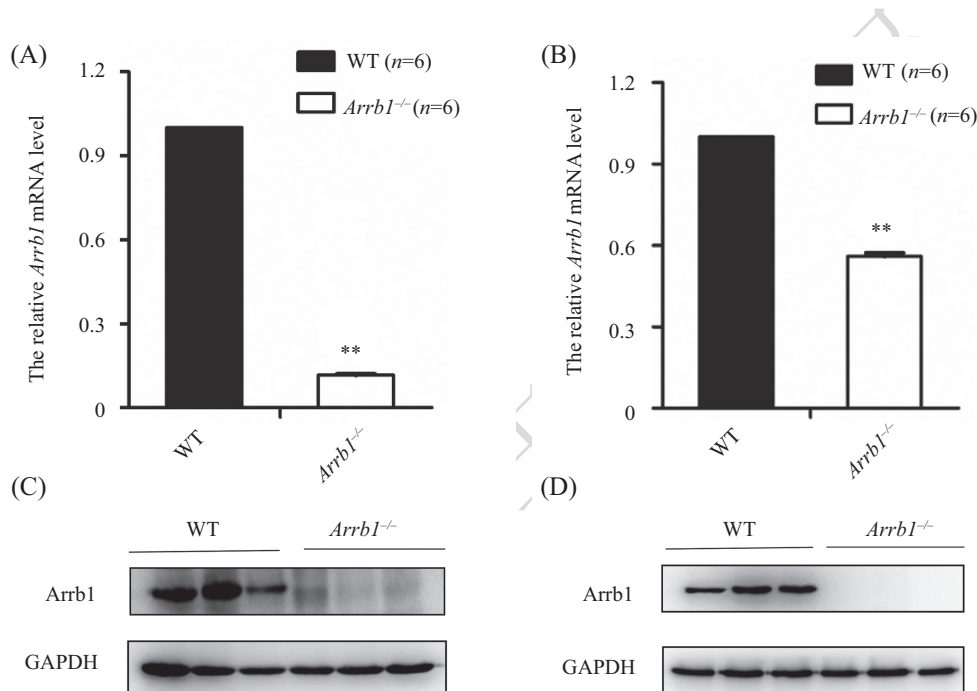
*Arrb1*蛋白质,而敲除组未检测到*Arrb1*蛋白质,证明*Arrb1*已敲除(图2C和图2D)。

2.4 HE染色观察胸腺组织形态学改变

选择相同周龄小鼠,进行胸腺HE染色,光镜下观察,与野生型鼠相比,*Arrb1*基因敲除鼠的胸腺组织无明显差异(图3)。

2.5 流式细胞术检测*Arrb1*敲除小鼠T淋巴细胞发育的各阶段细胞比例变化

2.5.1 胸腺T淋巴细胞的变化 为了解*Arrb1*对小鼠T淋巴细胞发育的影响,本研究分析了胸腺中发育



A: 胸腺组织中*Arrb1* mRNA水平; B: 骨髓单个核细胞的*Arrb1* mRNA; C: 胸腺组织中*Arrb1*蛋白质水平; D: 骨髓单个核细胞的*Arrb1*的蛋白质水平。 ** $P<0.01$,与WT组比较。

A: mRNA levels of *Arrb1* in thymus; B: mRNA levels of *Arrb1* in bone marrow mononuclear cells; C: protein levels of *Arrb1* in thymus; D: protein levels of *Arrb1* in bone marrow mononuclear cells. ** $P<0.01$ vs WT group.

图2 *Arrb1*基因敲除小鼠*Arrb1* mRNA和蛋白质水平

Fig.2 The mRNA and protein levels of *Arrb1* in *Arrb1* KO mice

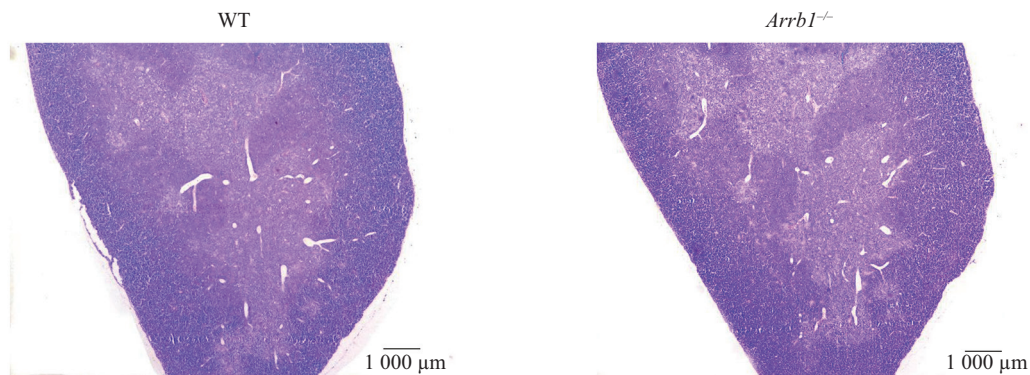
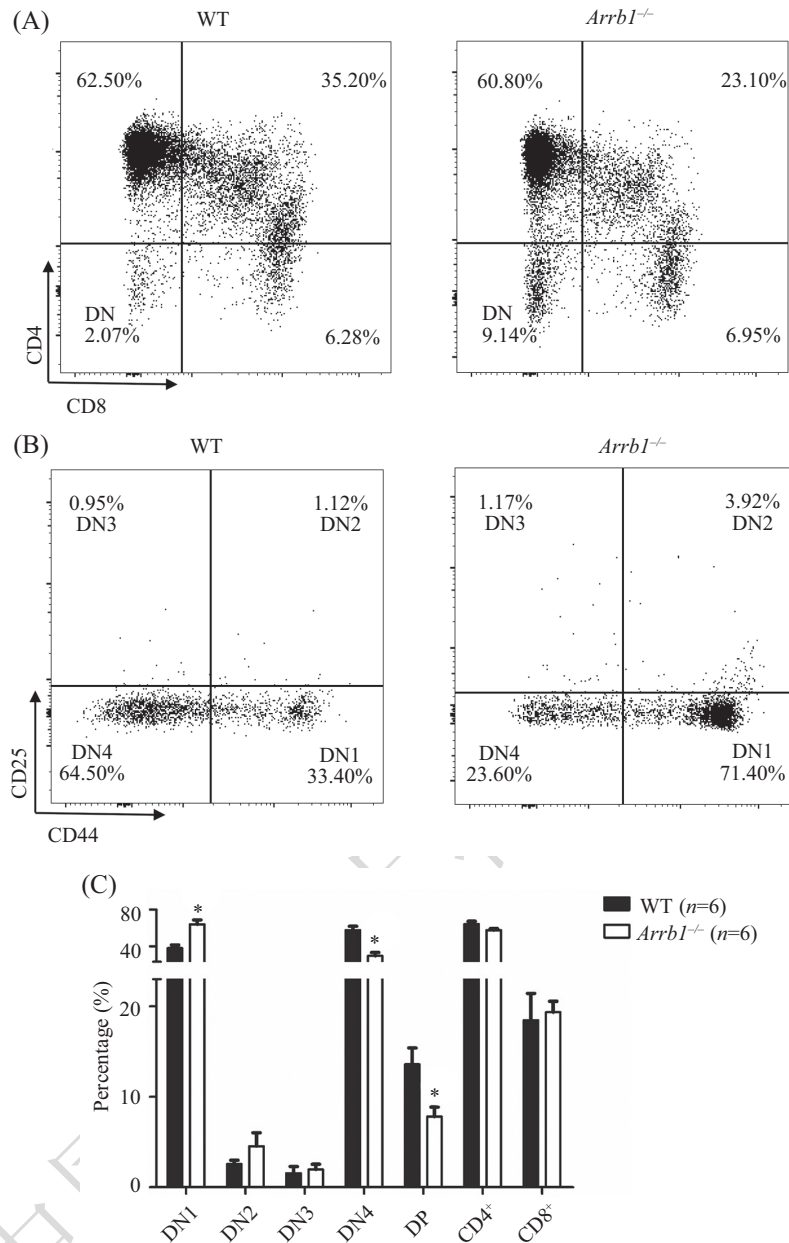


图3 胸腺组织形态学改变

Fig.3 Histopathological changes of thymus



A: 流式细胞术检测胸腺细胞比例; B: 流式细胞术检测DN期细胞比例; C: 直方图显示胸腺各阶段细胞的比例变化, * $P < 0.05$, 与WT组比较。

A: the percentage of thymocytes detected by flow cytometry; B: flow cytometry analysis showing the proportion of thymocytes in DN stage; C: histogram showing the proportion of thymocytes in each stages, * $P < 0.05$ vs WT group.

图4 *Arrb1*基因敲除小鼠的胸腺细胞比例变化

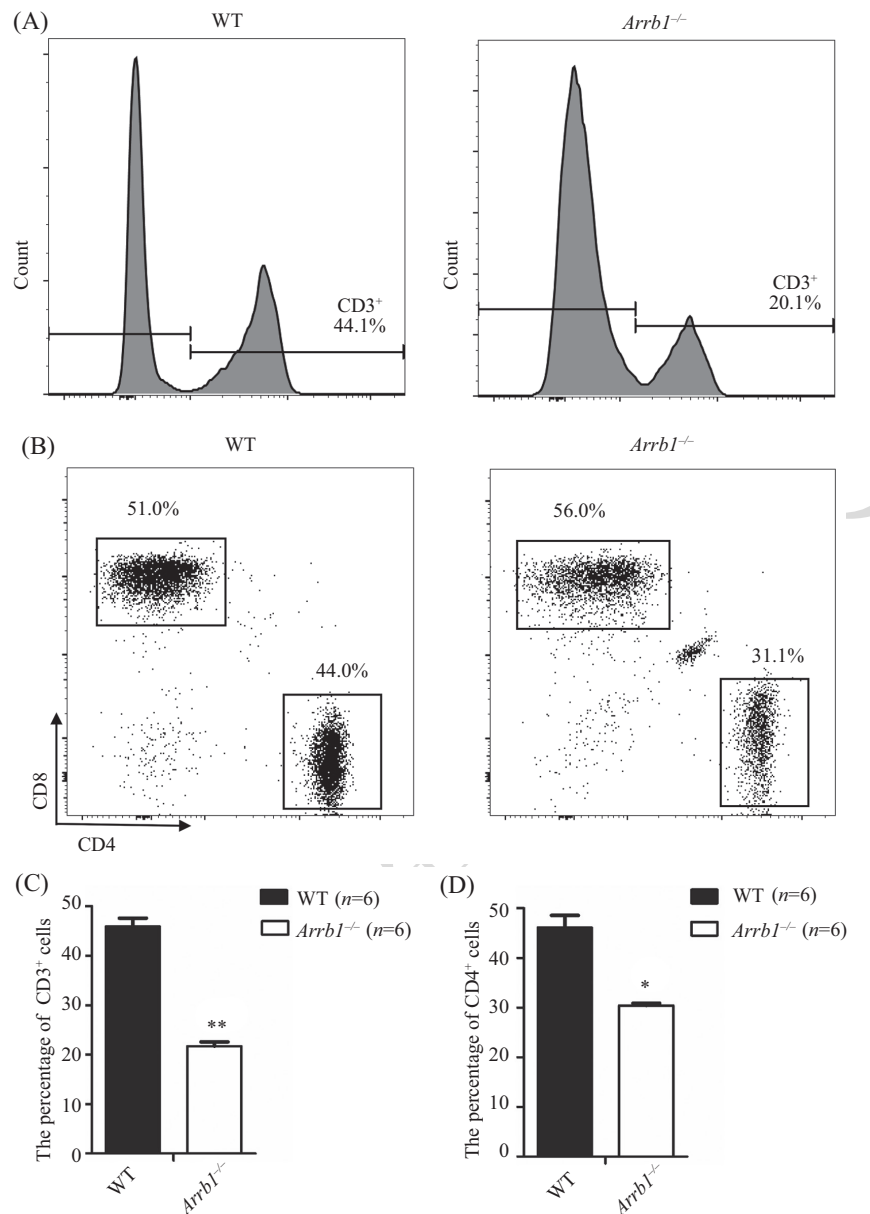
Fig.4 Changes of the proportion of thymocytes in *Arrb1* KO mice

各阶段的T淋巴细胞比例。结果显示, *Arrb1*基因敲除组的CD4CD8 DN期细胞比例显著增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图4A), 其中DN1期细胞比例增高明显($P < 0.05$)(图4B), DN2、DN3期细胞比例具有增高趋势, 但无统计学意义; DN4及DP期细胞显著下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); CD4CD8 SP细胞无明显改变($P > 0.05$)(图4C)。

2.5.2 外周血T淋巴细胞的变化 为了解*Arrb1*敲除对外周血(peripheral blood, PB)T淋巴细胞的影响,

本研究检测了外周血中CD3⁺T淋巴细胞比例以及CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞的比例。结果发现, 与野生型小鼠比较, *Arrb1*基因敲除小鼠的CD3⁺T淋巴细胞比例降低($P < 0.01$)(图5A和图5C), 其中CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞比例明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图5B和图5D)。

2.5.3 淋巴结T细胞的变化 为了解*Arrb1*敲除后对淋巴结(lymph node)T细胞的影响, 本研究检测了淋巴结中CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺T细胞的比例, 与



A: 流式细胞术检测外周血CD3⁺ T细胞的比例; B: 流式细胞术检测外周血CD4⁺和CD8⁺ T细胞的比例; C: 直方图显示CD3⁺ T细胞比例变化, ** $P < 0.01$, 与WT组比较; D: 直方图显示CD4⁺ T细胞比例变化, * $P < 0.05$, 与WT组比较。

A: the percentage of CD3⁺ T lymphocytes in the PB detected by flow cytometry; B: the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the PB detected by flow cytometry; C: histogram showing the proportion of CD3⁺ T lymphocytes, ** $P < 0.01$ vs WT group; D: histogram showing the proportion of CD4⁺ T lymphocytes, * $P < 0.05$ vs WT group.

图5 *Arrb1*基因敲除小鼠的外周血T淋巴细胞比例变化

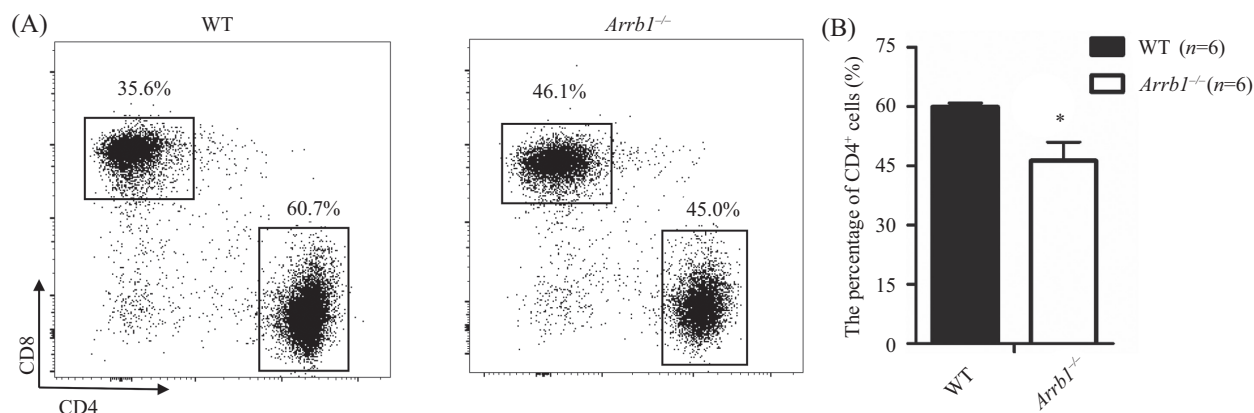
Fig.5 Changes of the proportion of T lymphocytes in the PB after *Arrb1* KO in vivo

野生型小鼠比较, 敲除小鼠CD3⁺CD4⁺ T细胞比例明显降低($P < 0.05$)(图6A和图6B), CD4⁺/CD8⁺ T细胞的比值显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

3 讨论

T淋巴细胞在胸腺发育过程中, 根据T淋巴细胞CD4和CD8表面分子表达, 可分为DN、DP和SP

三个主要阶段。DN期细胞还可进一步根据CD25和CD44表面分子表达分为幼T祖细胞DN1、DN2、DN3和DN4期。DN1细胞首先分化为T系前体细胞, 经T细胞受体基因编码与重排, 阳性选择后, 发育成CD4或CD8 SP细胞^[7-8]。本研究结果中, *Arrb1*基因敲除小鼠胸腺组织HE染色与野生型小鼠相比无明显差异, 提示*Arrb1*基因敲除不会造成胸腺组织结构



A: 流式细胞术检测淋巴结CD4⁺和CD8⁺T细胞的比例; B: 直方图显示CD4⁺T细胞比例变化, **P*<0.05, 与WT组比较。

A: the percentage of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes in the lymph node detected by flow cytometry; B: histogram showing the proportion of CD4⁺T lymphocytes, **P*<0.05 vs WT group.

图6 *Arrb1*基因敲除小鼠的淋巴结T细胞比例变化

Fig.6 Changes of the proportion of T lymphocytes in the lymph node after *Arrb1* KO in vivo

表2 淋巴结T细胞检测结果

Table 2 The results of T lymphocytes in the lymph node

细胞 Cell	对照组 WT	敲除组 <i>Arrb1</i> ^{-/-}
CD4 ⁺ (%)	60.20±2.00	44.70±4.50
CD8 ⁺ (%)	33.80±3.40	43.10±4.60
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.80±0.24	1.05±0.21*

**P*<0.05, 与WT组比较。

**P*<0.05 vs WT group.

自发性病理改变。接着,又检测了处于胸腺各个时期的T淋巴细胞的比例,发现*Arrb1*基因敲除鼠DN期细胞总比例增高,其中DN1-DN3期细胞比例明显增加, DN1期细胞比例增高最为显著,具有统计学意义。而DN4期细胞比例却减少,随后DP期细胞比例急剧减少且具有统计学意义。这表明, T淋巴细胞发育异常阻滞可能主要在DN1期, DN2和DN3也有相应程度的发育异常,从而导致DN4期及DP期细胞比例减少。CD4、CD8 SP细胞比例差异无统计学意义。原因可能是, *Arrb1*主要影响DN期细胞发育,对DP期的影响在于促进DP细胞阴性选择(即删除自身反应T淋巴细胞),而不抑制甚至促进DP细胞的阳性选择(能识别自身抗体,不与其反应的DP细胞存活),进而发育为SP细胞。为明确*Arrb1*是否能造成T淋巴细胞最终输出异常,本研究检测了小鼠外周血以及淋巴结中CD3⁺(T淋巴细胞均表达的表面标志物)以及CD4⁺、CD8⁺T细胞比例。结果显示, *Arrb1*基因敲除鼠外周血中CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T细胞的比例明显降低,而CD8⁺T细胞比例无明显改变;淋巴结中

CD3⁺CD4⁺T细胞的比例降低, CD4⁺/CD8⁺T细胞的比值减少且具有统计学意义。这一结果的原因可能是,由于T细胞从胸腺迁出至外周的过程经历缺氧到富氧环境的改变,需要通过自噬清除部分线粒体,减少活性氧类的产生才能在外周富氧环境下存活^[9]。已有文献报道,在脑缺氧的小鼠模型中, *Arrb1*的缺失会限制脑细胞自噬进程而增加其凋亡^[10]。因此,我们认为, *Arrb1*缺失也可能导致外周血和淋巴结的CD4⁺T细胞的自噬过程受限而凋亡增加。于是我们得出, *Arrb1*与胸腺T细胞发育相关,并且其缺失可能会导致T细胞发育阻滞于DN期,外周CD4⁺T细胞比例减少, CD4⁺/CD8⁺T细胞比值降低,但究竟如何影响DN期T细胞比例改变以及调控CD4⁺T细胞的存活,还有待进一步研究。

从HSC到T淋巴细胞整个发育过程中有众多转录因子参与,包括*Tal1*、*ID2*等^[11-12]。这些转录因子的表达被有序调控,进一步影响下游基因表达, T细胞发育和向不同种系分化^[13]。在胸腺T淋巴细胞发育过程中, Zhang等^[1]扫描不同发育阶段的T淋巴细

胞全基因组发现,在干性相关基因*Tal1*被沉默前,其顺式转录元件位置激活性组蛋白标志H3K4me3及H3ac减少,而抑制性组蛋白修饰H3K27me3增多,并维持至T淋巴细胞发育成熟。同时又有研究表明,*Arrb1*可通过调控H3K27me3,调控造血系统发育关键的*Hoxa9*、*Tal1*等基因表达与正常造血^[6],那么,*Arrb1*是否能够通过调控H3K27me3,调控*Tal1*的基因表达从而影响胸腺细胞的发育,是我们下一步研究重点。

近年来研究认为,T细胞发育异常与阻滞会导致T-ALL的发生^[2],在*Tal1*与*Lmo2*共表达的转基因鼠中,T细胞阻滞于其发育的幼稚阶段,3个月后发展为T-ALL^[14];*Tal1/Lmo2*也可干扰胸腺正常发育,导致T-ALL发生^[15]。有文献表明,在T-ALL患者标本中检测*Arrb1*的表达水平明显降低^[16]。*Arrb1*可能是影响T-ALL的重要因素。由此,结合我们的研究,*Arrb1*缺失能够造成T细胞在胸腺发育异常。同时,*Arrb1*又与T-ALL发生发展密切相关。那么,*Arrb1*可能调控*Tal1*或其他T细胞发育关键因子的组蛋白H3甲基化修饰,最终影响T细胞命运与T-ALL是否发病。

综上所述,*Arrb1*能够影响T细胞胸腺阶段的发育,引起DN期发育异常和阻滞,同时也会影响外周CD4⁺T细胞的存活,此结果为进一步研究其具体机制以及白血病的发生发展提供实验基础。

参考文献 (References)

- Zhang JA, Mortazavi A, Williams BA, Wold BJ, Rothenberg EV. Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell* 2012; 149(2): 467-82.
- Ha VL, Luong A, Li F, Casero D, Malvar J, Kim YM, *et al.* The T-ALL related gene BCL11B regulates the initial stages of human T cell differentiation. *Leukemia* 2017; 31(11): 2503-14.
- Smith JS, Rajagopal S. The β -arrestins: Multifunctional regulators of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2016; 291(17): 8969-77.
- Yang Y, Guo Y, Tan S, Ke B, Tao J, Liu H, *et al.* β -Arrestin1 enhances hepatocellular carcinogenesis through inflammation-mediated Akt signalling. *Nat Commun* 2015; 6: 7369.
- Wong AM, Abrams MC, Micevych PE. β -arrestin regulates estradiol membrane-initiated signaling in hypothalamic neurons. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120530.
- Yue R, Kang J, Zhao C, Hu W, Tang Y, Liu X, *et al.* β -Arrestin1 regulates zebrafish hematopoiesis through binding to YY1 and relieving polycomb group repression. *Cell* 2009; 139(3): 535-46.
- Hoover AR, Dozmorov I, MacLeod J, Du Q, de la Morena MT, Forbess J, *et al.* MicroRNA-205 maintains T cell development following stress by regulating forkhead box N1 and selected chemokines. *J Biol Chem* 2016; 291(44): 23237-47.
- Sashida G, Wang C, Sato D, Oshima M, Iwama A. Ezh2 loss promotes the transformation of early T cell precursor leukemia via suppressing critical genes for T-Cell differentiation. *Blood* 2015; 126: 308.
- Bronietzki AW, Schuster M, Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunol Cell Biol* 2015; 93(1): 25-34.
- Wang P, Xu TY, Wei K, Guan YF, Wang X, Xu H, *et al.* ARRB1/ β -arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy* 2014; 10(9): 1535-48.
- Mckinney-Freeman S, Cahan P, Li H, Lacadie SA, Huang HT, Curran M, *et al.* The transcriptional landscape of hematopoietic stem cell ontogeny. *Cell Stem Cell* 2012; 11(5): 701-14.
- Vigano MA, Ivanek R, Balwierz P, Berninger P, van Nimwegen E, Karjalainen K, *et al.* An epigenetic profile of early T-cell development from multipotent progenitors to committed T-cell descendants. *Eur J Immunol* 2014; 44(4): 1181-93.
- Rothenberg EV. Epigenetic mechanisms and developmental choice hierarchies in T-lymphocyte development. *Brief Funct Genomics* 2013; 12(6): 512-24.
- Gerby B, Laflamme G, Kwok B, Roux P, Hébert J, Sauvageau G, *et al.* Targeting pre-leukemic stem cells in T-acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematol* 2015; 43(9): S49-S49.
- Draheim KM, Hermance N, Yang Y, Arous E, Calvo J, Kelliher MA. A DNA-binding mutant of TAL1 cooperates with LMO2 to cause T cell leukemia in mice. *Oncogene* 2011; 30(10): 1252-60.
- Nakahata S, Ichikawa T, Maneesay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, *et al.* Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun* 2014; 5: 3393.