



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Σχολή Θετικών Επιστημών - Τμήμα Βιολογίας**

**Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου**

**Διερεύνηση του τρόπου παραγωγής και δράσης πεπτιδικών  
θραυσμάτων της προθυμοσίνης α: νέα ανοσοενισχυτικά μόρια των  
λεμφοκυτταρικών αποκρίσεων**

Διδακτορική Διατριβή

της

Κυριακής Ιωάννου

Βιολόγου

Αθήνα 2013





**National and Kapodistrian University of Athens**

**School of Sciences – Faculty of Biology**

**Department of Animal and Human Physiology**

**Investigating the production and activity of prothymosin  $\alpha$  peptide  
fragments: novel adjuvants that enhance lymphocyte responses**

PhD Thesis

of

Kyriaki Ioannou

Biologist

Athens 2013



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

### **Επιβλέπουσα Καθηγήτρια**

Τσιτσιλώνη Ουρανία                      Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Χαμόδρακας Σταύρος                      Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα                      Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία                      Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Χαμόδρακας Σταύρος                      Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γερμενής Αναστάσιος                      Καθηγητής, Τομέας Κλινικοεργαστηριακός, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σιδεράς Πασχάλης                      Ερευνητής Α', Διευθυντής Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Παπαζαφείρη Παναγιώτα                      Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μπάμιας Αριστοτέλης                      Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Τρουγκάκος Ιωάννης                      Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία                      Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

**Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.**

**N.5343/1932 άρθρο 202**



**Στους γονείς μου...**

**Στο Θάνο...**





## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μπορεί να είμαι η μοναδική συγγραφέας της παρούσας διατριβής, ωστόσο στην επιτυχή ολοκλήρωσή της συνέβαλε ένα σύνολο ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως.

Την απερίφραστη ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω αρχικά στην Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ο. Τσιτσιλώνη για την ουσιαστική επίβλεψη της παρούσας διατριβής και τη διαρκή καθοδήγηση. Μέσα από τις «επιτυχημένες» στιγμές της πολυετούς συνεργασίας μας μου έμαθε να αγαπώ την επιστήμη και να αντιλαμβάνομαι την ομορφιά της, ενώ οι πιο «δύσκολες» στιγμές και οι πολύτιμες συμβουλές της διαμόρφωσαν το χαρακτήρα μου ως επιστήμονα αλλά πρωτίστως ως άνθρωπο.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Σ. Χαμόδρακα και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Π. Παπαζαφείρη για την εξαιρετική συνεργασία τους και τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Α. Γερμενή, τον Ερευνητή Α' κ. Π. Σιδερά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Α. Μπάμια και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Τρουγκάκο για τις υποδείξεις τους και την ιδιαίτερη τιμή που μου έκαναν συμμετέχοντας στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στη συνεργάτιδά μου, συνάδελφό μου και πρωτίστως, φίλη μου, Υποψήφια Δρ. Π. Σαμαρά για την απλόχερη βοήθειά της και την αδιάκοπη συμπαράστασή της, πρακτική και ηθική, τα επτά συνεχόμενα χρόνια της άριστης συνεργασίας μας.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Μ. Σκοπελίτη για τις συμβουλές της, τη βοήθειά της και την πολύτιμη καθοδήγηση της, καθώς υπό την επίβλεψή της έμαθα τις πρώτες πειραματικές τεχνικές, κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών. Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω, επίσης, παρόντα και παρελθόντα μέλη του εργαστηρίου και ειδικότερα τους Α. Μπιρμπίλη, Σ. Φόρτη, E. Williams και Ν. Καππά, για την εξαιρετική μας συνεργασία, τη βοήθειά τους και τη φιλία τους. Θα ήθελα ακόμα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη ΔΕΠ και το ερευνητικό προσωπικό του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, που συνετέλεσαν στην δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερα πολύτιμη υπήρξε η συμβολή και η πολύπλευρη βοήθεια των Καθηγητών κ. W. Voelter, S. Stevanovic, H. Kalbacher και ειδικότερα του Καθηγητή κ. G.Pawelec και της Δρ. E. Derhovanessian, εξωτερικών συνεργατών από το Πανεπιστήμιο Tübingen της Γερμανίας. Τους ευχαριστώ θερμά για την ακούραστη υποστήριξη τους και τη φιλοξενία στα εργαστήριά τους, απαραίτητες για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Την ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στην Υποψήφια Δρ. E. Τσακίρη για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της ανάλυσης κατά Western. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον Καθηγητή κ. M.A. Δημόπουλο και τον Δρ. M. Τσιατά από την Ιατρική Σχολή για την παροχή δειγμάτων και τη βοήθειά τους με την κυτταρομετρία ροής. Θερμά ευχαριστώ τους συνεργάτες μας από το Νοσοκομείο «Αγ. Σάββας» Δρ. K. Μπαξεβάνη και Δρ. I. Βουτσά για τη βοήθειά τους σε πειραματικές τεχνικές, από το Νοσοκομείο Παιδών «Αγ. Σοφία» τις Δρ. M. Κανάριου και Υποψήφια Δρ. I. Βαρελά για την τυποποίηση των δοτών, και τον κ. X. Γουλουμή από το Νοσοκομείο «Λαϊκό» για την παροχή δειγμάτων. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στην Δρ. Σ. Χαραλάμπους, Ερευνήτρια Β', και την Υποψήφια Δρ. N. Καβροχωριανού από το Ινστιτούτο Παστέρ, για τη βοήθειά τους με τα *in vivo* πειράματα.

Η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής δε θα ήταν δυνατή χωρίς την απαραίτητη οικονομική υποστήριξη από την υποτροφία «Ηράκλειτος II» που μου παρείχε το Υπουργείο Παιδείας & Θρησκευμάτων, Πολιτισμού & Αθλητισμού, αλλά και την υποστήριξη των ερευνητικών προγραμμάτων INSPiRE και IKYDA 2010/065, στα πλαίσια των οποίων είχα τη δυνατότητα να επισκεφθώ ερευνητικά εργαστήρια του εξωτερικού.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τις αδελφικές μου φίλες, Μαργαρίτα, Βάσω, Γιώτα, Νίνα και Αγγελική, που με τη μοναδική τους υποστήριξη και συμπαράσταση με ενθαρρύνουν στις πλέον δύσκολες στιγμές.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ είναι το ελάχιστο που μπορώ να πω στο θάνο για την υπομονή, την αδιάκοπη υποστήριξη και την αγάπη του όλα αυτά τα χρόνια, συμβάλλοντας με τον τρόπο του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδερφό μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου, χωρίς τη βοήθεια, την ουσιαστική στήριξη και την αγάπη των οποίων δε θα μπορούσα να φθάσω ως εδώ.

Κυριακή Ιωάννου

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>AAK</b>	anti-CD3-activated killer	αντι-CD3-ενεργοποιημένα φονικά (κύτταρα)
<b>Apaf</b>	apoptotic protease activating factor	παράγοντας ενεργοποίησης των αποπτωτικών πρωτεασών
<b>APS</b>	ammonium persulfate	υπερθειϊκό αμμώνιο
<b>AS</b>	adjuvant systems	συστήματα ανοσοενισχυτικών
<b>AWE</b>	acid wash extract	(τύπος κυτταρικού εκχυλίσματος)
<b>BSA</b>	bovine serum albumin	αλβουμίνη ορού βοδιού
<b>CFSE</b>	carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester	(πρότυπη ουσία για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού)
<b>CMV</b>	cytomegalovirus	κυτταρομεγαλοϊός
<b>CpG</b>	cytosine-phosphate-guanosine	κυτοσίνη-φωσφορικό-γουανοσίνη
<b>cpm</b>	counts per minute	κρούσεις ανά λεπτό
<b>CTL</b>	cytotoxic T lymphocyte	κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο
<b>DAMP</b>	damage-associated molecular pattern	μοτίβο σχετιζόμενο με βλάβες
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxide	διμεθυλοσουλφοξειδίο
<b>DPBS</b>	Dulbecco's phosphate buffer solution	πρότυπο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's
<b>DTT</b>	dithiothreitol	διθειοθρεϊτόλη
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetracetate	αιθυλοδιαμενιοτετραοξικό οξύ
<b>EMA</b>	ethidium monoazide	μονοαζίδιο του αιθιδίου
<b>FBS</b>	fetal bovine serum	ορός νεαρού μοσχარიού
<b>GM-CSF</b>	granulocyte-macrophage colony stimulation factor	παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυτάρων-μακροφάγων
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt solution	πρότυπο διάλυμα αλάτων Hank's
<b>HMGB1</b>	high mobility group B1	ομάδα υψηλής κινητικότητας B1
<b>HPV</b>	Human Papillomavirus	ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase	υπεροξειδάση του ραπανίου
<b>HSP</b>	heat shock protein	πρωτεΐνη θερμικού σοκ

<b>hTERT</b>	human telomerase reverse transcriptase	αντίστροφη μεταγραφάση της ανθρώπινης τελομεράσης
<b>ICS</b>	intracellular cytokine staining	ενδοκυτταρική χρώση κυτταροκινών
<b>IFA</b>	incomplete Freund's adjuvant	ατελές ανοσοενισχυτικό Freund's
<b>IFN</b>	interferon	ιντερφερόνη
<b>IL</b>	interleukin	ιντερλευκίνη
<b>IRF</b>	interferon regulatory factor	ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης
<b>Keap-1</b>	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch-τύπου ECH-σχετιζόμενη πρωτεΐνη 1
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide	λιποπολυσακχαρίτης
<b>LAK</b>	lymphokine-activated killer	ενεργοποιημένα από λεμφοκίνες φονικά (κύτταρα)
<b>MALDI</b>	matrix-assisted laser desorption/ionization	υποβοηθούμενη από στρώμα, αποδέσμευση και ιονισμός με laser
<b>MAP</b>	mitogen-activated protein	ενεργοποιημένη από μιτογόνα πρωτεΐνη
<b>MFI</b>	mean fluorescence intensity	μέση ένταση φθορισμού
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex	μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
<b>MPLA</b>	monophosphoryl lipid A	μονοφωσφορυλο-λιπίδιο A
<b>MyD88</b>	myeloid differentiation factor 88	μυελοειδής παράγοντας διαφοροποίησης 88
<b>NK</b>	natural killer	φυσικά φονικά (κύτταρα)
<b>NLS</b>	nuclear localization signal	σήμα πυρηνικού εντοπισμού
<b>προΤα</b>	prothymosin α	προθυμοσίνη α
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cells	μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
<b>PMN</b>	polymorphonuclear	πολυμορφοπύρηννα
<b>PGE2</b>	prostaglandin E2	προσταγλανδίνη E2
<b>PFA</b>	paraformaldehyde	παραφορμαλδεΐδη
<b>PAMP</b>	pathogen-associated molecular pattern	μοτίβο σχετιζόμενο με παθογόνα
<b>PRR</b>	pathogen recognition receptor	υποδοχέας αναγνώρισης παθογόνων
<b>RP-HPLC</b>	reverse phase-high performance	υγρή χρωματογραφία υψηλής

	liquid chromatography	απόδοσης αντίστροφης φάσης
<b>SDS</b>	sodium dodecyl-sulphate	θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
<b>Tα1</b>	thymosin α1	θυμοσίνη α1
<b>Tα11</b>	thymosin α11	θυμοσίνη α11
<b>TAA</b>	tumor-associated antigen	ογκοσχετιζόμενο αντιγόνο
<b>TAL</b>	tumor-associated lymphocyte	ογκοσχετιζόμενο λεμφοκύτταρο
<b>TEMED</b>	NNN'N'-tetramethylethylenediamine	NN'N'-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη
<b>TGF</b>	transforming growth factor	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
<b>TIR</b>	TLR-IL-1 receptor	υποδοχέας IL-1 σχετιζόμενος με TLR
<b>TIRAP</b>	TIR-associated protein	πρωτεΐνη σχετιζόμενη με TIR
<b>TLR</b>	Toll like receptor	υποδοχέας τύπου Toll
<b>TMB</b>	tetramethylbenzidine	τετραμεθυλβενζιδίνη
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor	παράγοντας νέκρωσης όγκων
<b>TRAM</b>	TLR-associated molecule	μόριο σχετιζόμενο με TLR
<b>Treg</b>	T regulatory	T ρυθμιστικό
<b>TRIF</b>	TLR-associated-activator of interferon	ενεργοποιητής της ιντερφερόνης, σχετιζόμενος με TLR



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ ..... 1

1.1. Ανοσοθεραπεία του καρκίνου και αντικαρκινικά εμβόλια.....	3
1.1.1. Εμβόλια που βασίζονται σε πεπτιδία (peptide-based vaccines).....	3
1.1.2. Εμβόλια που βασίζονται σε δενδριτικά κύτταρα (dendritic cell-based vaccines).....	4
1.2. Οι υποδοχείς τύπου Toll και οι συνδέτες τους.....	9
1.2.1. Βασικά χαρακτηριστικά και μονοπάτια σηματοδότησης των υποδοχέων τύπου Toll.....	9
1.2.2. Οι συνδέτες των υποδοχέων τύπου Toll στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.....	13
1.3. Προθυμοσίνη α: ένα μόριο με διττό ρόλο.....	17
1.3.1. Βασικά χαρακτηριστικά της προθυμοσίνης α.....	17
1.3.2. Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	18
1.3.3. Ο εξωκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	23
1.4. Η προθυμοσίνη α ως βιοδείκτης για τη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου.....	24
1.5. Η προθυμοσίνη α ως ανοσοθεραπευτικό μόριο.....	29
1.6. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) αποτελεί το ανοσοδραστικό κέντρο της προθυμοσίνης α.....	35
1.7. Σκοπός.....	41

### ΜΕΘΟΔΟΙ.....43

2.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος.....	45
2.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυτταρικών εναιωρημάτων.....	47
2.3. Καλλιέργεια ανθρώπινων και ποντικίσιων κυτταρικών σειρών - Κρυοσυντήρηση.....	49
2.4. Διαφοροποίηση δενδριτικών κυττάρων.....	52
2.5. Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	55
2.6. Μέθοδος Bradford - Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	56
2.7. Ανοσοστύπωμα κατά Western.....	57
2.8. Έλεγχος έκφρασης επιφανειακών δεικτών δενδριτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.....	62
2.9. Μέτρηση των παραγόμενων κυτταροκινών από τα δενδριτικά κύτταρα... 65	
2.10. Διέγερση T λεμφοκυττάρων παρουσία συγκεκριμένων πεπτιδίων-αντιγόνων.....	68
2.11. Έλεγχος παραγωγής κυτταροκινών από ενεργοποιημένα T κύτταρα με ενδοκυτταρική χρώση και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.....	76

2.12. Δοκιμασία ελέγχου της κυτταροτοξικότητας.....	79
2.13. Δοκιμασία ελέγχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	83
2.14. Εκχύλιση πεπτιδίων δεσμευμένων στην κυτταρική επιφάνεια.....	85
2.15. In vivo πρωτόκολλα ανοσοθραμισμού πειραματόζων και ανοσοθεραπευτικών χορηγήσεων.....	87
2.16. Απομόνωση σπληνοκυττάρων ποντικού για ex-vivo ανάλυση.....	90
2.17. Επαγωγή συνθηκών κυτταρικού θανάτου.....	92
2.18. Ανάλυση υπερκειμένων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP- HPLC).....	94
2.19. Φασματομετρία μάζας τύπου MALDI-TOF.....	95
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>97</b>
3.1. Μελέτη του μηχανισμού δράσης της προθυμοσίνης α και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου προΤα(100-109) σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα.....	99
3.1.1. Επίδραση των πεπτιδίων στην έκφραση του TLR-4.....	100
3.1.2. Επίδραση των πεπτιδίων στην ενδοκυτταρική ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης καταρροϊκά του TLR-4.....	103
3.2. Μελέτη του φαινοτύπου ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προθυμοσίνης α ή του πεπτιδίου προΤα(100-109).....	106
3.2.1. Επίδραση των πεπτιδίων στην έκφραση επιφανειακών μορίων- δεικτών.....	107
3.2.2. Επίδραση των πεπτιδίων στην έκκριση κυτταροκινών.....	109
3.3. Μελέτη της λειτουργικότητας ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προθυμοσίνης α ή προΤα(100-109).....	111
3.3.1. Η προθυμοσίνη α και το πεπτίδιο προΤα(100-109) ενεργοποιούν T κύτταρα μνήμης.....	113
3.3.2. Η προθυμοσίνη α και το πεπτίδιο (100-109) ενεργοποιούν παρθένα T κύτταρα.....	118
3.4. Μελέτη της ανοσοενισχυτικής δράσης της προθυμοσίνης α και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου προΤα(100-109) in vivo.....	138
3.4.1. Επιλογή του κατάλληλου in vivo καρκινικού μοντέλου.....	139
3.4.2. Ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο ετερόχρονης χορήγησης καρκινικών κυττάρων και ανοσοενισχυτικών παραγόντων.....	142
3.4.3. Ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο σύγχρονης χορήγησης καρκινικών κυττάρων και ανοσοενισχυτικών παραγόντων.....	146
3.5. Ex vivo μελέτη της ανοσοενισχυτικής δράσης της προθυμοσίνης α και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου προΤα(100-109) σε σπληνοκύτταρα ζώων	148
3.6. Μελέτη των συνθηκών παραγωγής και εξωκυττάρωσης του ανοσοδραστικού πεπτιδίου προΤα(100-109) υπό συνθήκες κυτταρικού θανάτου.....	152



<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>161</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>187</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>213</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>225</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>	<b>239</b>



# 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## **1.1. Ανοσοθεραπεία του καρκίνου και αντικαρκινικά εμβόλια**

Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου αποτελεί ένα κλάδο της κλινικής ανοσολογίας που έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα την τελευταία 20/ετία. Βασική της αρχή είναι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς έναντι του καρκίνου του και απώτερος στόχος της η επαγωγή ισχυρών δραστικών κυτταροτοξικών αποκρίσεων για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, αλλά και μνήμης για την αποτροπή μελλοντικών υποτροπών ή/και μεταστάσεων. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, μία πληθώρα αντικαρκινικών εμβολίων έχουν ήδη δοκιμαστεί στην κλινική στα πλαίσια ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

### **1.1.1. Εμβόλια που βασίζονται σε πεπτίδια (peptide-based vaccines)**

Σύντομα μετά την κλωνοποίηση του πρώτου ογκοσχετιζόμενου αντιγόνου (tumor-associated antigen, TAA) (van der Bruggen et al., 1991) και καθώς οι σύγχρονες μέθοδοι επιτρέπουν τη συνεχή ταυτοποίηση νέων TAAs έναντι των οποίων μπορούν να αναπτυχθούν ειδικές ανοσολογικές απαντήσεις και *in vivo*, οι προσπάθειες ανάπτυξης αντικαρκινικών εμβολίων, βασιζόμενων σε ανοσοεπικρατή πεπτίδια-αντιγόνα (πεπτιδικά αντικαρκινικά εμβόλια), άρχιζαν να κερδίζουν έδαφος. Ορισμένα από τα πεπτιδικά εμβόλια που έχουν αναπτυχθεί στοχεύουν αντιγόνα τα οποία εκφράζονται σε όγκους ενός μόνο συγκεκριμένου τύπου ιστού (πχ. Melan-A/MART-1 και gp 100 στο μελάνωμα), ή αποκλειστικά σε κακοήθεις ιστούς διαφόρων τύπων, αλλά όχι σε υγιείς ιστούς (πχ. Mage-3 σε μελάνωμα, καρκίνο ωοθηκών, πνεύμονα και παγκρέατος), ενώ, τέλος, ορισμένα στοχεύουν αντιγόνα που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα σε υγιείς ιστούς και υπερεκφράζονται σε κακοήθεις διαφόρων τύπων (πχ. HER-2/neu και Muc1 σε όλα τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα με υπερέκφραση στον καρκίνο του μαστού) (Mittendorf et al., 2007, Jager et al., 2002, Phan et al., 2003, Slingluff et al., 2008, Apostolopoulos et al., 2006, Mittendorf et al., 2008).

Παρά την ταυτοποίηση, όμως, εκατοντάδων TAAs μέχρι σήμερα, η πλειοψηφία τους αφορά τμήματα ή ακέραιες εαυτές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να έχει αναπτύξει ανοχή. Συνεπώς, αντικαρκινικά εμβόλια που περιέχουν τέτοια αντιγόνα συχνά χαρακτηρίζονται από χαμηλή ανοσογονικότητα. Επιπλέον, τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει πλήθος μηχανισμών για να διαφεύγουν από την ανοσοεπιτήρηση και να καταστέλλουν είτε την έναρξη είτε την εξέλιξη μίας

ανοσολογικής απάντησης που θα οδηγούσε στην εξάλειψή τους. Ένας από τους πιο συχνά ταυτοποιούμενους μηχανισμούς διαφυγής πολλών τύπων καρκίνου είναι η δημιουργία, μέσα και γύρω από τον όγκο, ενός μικροπεριβάλλοντος πλούσιου σε κατασταλτικές, για τα ανοσοκύτταρα, κυτταροκίνες (Topfer et al., 2011). Κατά συνέπεια, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι επανειλημμένες προσπάθειες επαγωγής ισχυρών ογκοειδικών T κυτταρικών απαντήσεων αποκλειστικά και μόνο με τη χορήγηση TAA-πεπτιδικών εμβολίων, δεν έχουν μέχρι σήμερα δώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Rosenberg et al., 2004). Για αυτό το λόγο, έχουν γίνει ήδη προσπάθειες ενίσχυσης της δραστηριότητας των αντικαρκινικών πεπτιδικών εμβολίων, εστιάζοντας αφενός στην αύξηση της ανοσογονικότητας των TAAs ώστε να προάγουν την ανάπτυξη ισχυρών ογκοειδικών T κυτταρικών απαντήσεων και αφετέρου, στην αναστροφή της κατασταλτικής δράσης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και της ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος.

### **1.1.2. Εμβόλια που βασίζονται σε δενδριτικά κύτταρα (dendritic cell-based vaccines)**

Η επαγωγή τόσο της ανοσολογικής απάντησης, όσο και της ανοχής, ρυθμίζεται από ένα δίκτυο επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι τα δενδριτικά κύτταρα (Gilboa, 2007). Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα πιο ικανά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για την ενεργοποίηση αυτόλογων T κυττάρων, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Διαθέτουν αξιοσημείωτη ικανότητα πρόσληψης αντιγόνων και μετανάστευσης, γεγονός που τους επιτρέπει να μετακινούνται από την περιφέρεια, όπου προσλαμβάνουν τα αντιγόνα, στους λεμφαδένες ή τον σπλήνα, όπου παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα T κύτταρα και τα διεγείρουν. Η παρουσίαση των αντιγόνων περιορίζεται από τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα (Palucka et al., 2008). Εκτός από την παρουσίαση του αντιγόνου, που αποτελεί και το πρώτο σήμα διέγερσης των T κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα παρέχουν και το δεύτερο σήμα διέγερσης, μέσω των συνδιεγερτικών μορίων CD80/CD86 που εκφράζουν στην επιφάνειά τους για τη βέλτιστη ενεργοποίηση των T κυττάρων (Palucka et al., 2011). Η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων είναι

ιδιαίτερης σημασίας, καθώς αδυναμία των δενδριτικών κυττάρων να παρέχουν το συνδιεγερτικό σήμα μπορεί να οδηγήσει τα T κύτταρα σε ανέργια ή σε διαφοροποίησή τους προς ρυθμιστικά (T regulatory cells, Tregs), τα οποία καταστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις (Fujii et al., 2009). Επιπλέον, τα δενδριτικά κύτταρα, μετά την ενεργοποίησή τους, παράγουν και εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF)-α και η ιντερλευκίνη (interleukin, IL)-12, οι οποίες σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές θεωρούνται ως το τρίτο σήμα που απαιτείται για την ικανή διέγερση των T κυττάρων (Navabi et al., 2009, Kalinski et al., 2011). Λόγω των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών τους, τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να συνδέουν τις αποκρίσεις του έμφυτου και του ειδικού σκέλους της ανοσίας, ενορχηστρώνοντας την ανοσολογική απάντηση στο σύνολό της για την αντιμετώπιση παθογόνων, αλλά και καρκινικών κυττάρων.

Ωστόσο, είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι τα κύτταρα αυτά έχουν και κατασταλτική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς μία κατηγορία δενδριτικών κυττάρων, γνωστά ως ανοχογονικά δενδριτικά κύτταρα, είναι ικανά να επάγουν αντιγονοειδική ανοχή (Steinman et al., 2003) (**Εικόνα 1.1Α**). Σύμφωνα με πρόσφατες ενδείξεις, τα ανοχογονικά δενδριτικά κύτταρα δεν πρέπει να θεωρούνται ως ένας ξεχωριστός υποπληθυσμός αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, αλλά κυρίως, ως ένας τύπος ανώριμων δενδριτικών κυττάρων εξαιρετικής πλαστικότητας, με ικανότητα μεταβολής του φαινοτύπου τους (από ανοχογονικό σε ανοσογονικό και αντίστροφα), ανάλογα με τα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντός τους (Bronte and Mocellin, 2009, Hubo et al., 2013). Προς υπεράσπιση της υπόθεσης αυτής, ανώριμα δενδριτικά κύτταρα που συναθροίζονται στο μικροπεριβάλλον των όγκων έχει δειχθεί ότι επάγουν T κυτταρική ανοχή στον άνθρωπο (Yang and Carbone, 2004). Η βασική αιτία για το φαινόμενο αυτό έγκειται στο ότι, αντίθετα με τα κοινά παθογόνα, οι όγκοι δεν επάγουν επαρκείς φλεγμονώδεις απαντήσεις για να ευνοήσουν τη βέλτιστη ενεργοποίηση/ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και συνεπώς, η επακόλουθη ανοσολογική απάντηση είναι αναποτελεσματική (Gilboa, 2007).

Δεδομένης, λοιπόν, της έλλειψης «σημάτων» για τη βέλτιστη ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων *in vivo* και τη μειωμένη λειτουργικότητά τους σε ασθενείς με καρκίνο (Almand et al., 2000, Della Bella et al., 2003), προτάθηκε η χρήση *ex vivo*-ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων για την αύξηση της ανοσογονικότητας των TAAs

και την επαγωγή αποτελεσματικών T ογκοειδικών απαντήσεων, αντί T κυτταρικής ανοχής. Στη χρήση των δενδριτικών κυττάρων σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας συνέβαλε σημαντικά και η δυνατότητα *in vitro* διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) ή πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών (Inaba et al., 2001) σε ιδιαίτερα μεγάλους αριθμούς, απαραίτητους για την *in vivo* χορήγησή τους.

Πράγματι, εμβολιασμός ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα χρησιμοποιώντας αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα φορτωμένα με ένα MHC τάξης I επίτοπο της πρωτεΐνης MAGE-1, οδήγησε σε ανάπτυξη αντιγονοειδικών T κυτταροτοξικών απαντήσεων (Mukherji et al., 1995). Μετά από αυτή την πρώτη αναφορά, πραγματοποιήθηκε πλήθος κλινικών δοκιμών στοχεύοντας διαφορετικούς τύπους καρκίνου και χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους διαφοροποίησης και ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, διαφορετικά αντιγόνα και διαφορετικές τεχνικές «φόρτωσης» των δενδριτικών κυττάρων με τα αντιγόνα αυτά (Galluzzi et al., 2012, Cranmer et al., 2004, Ridgway, 2003). Στο σύνολό τους, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η χρήση δενδριτικών κυττάρων, ωριμασμένων και φορτωμένων με TAAs *ex vivo*, είναι ασφαλής και επάγει TAA-ειδικές απαντήσεις *in vivo*, ενώ σε ορισμένους ασθενείς οδήγησε ακόμα και σε καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου και παρατεταμένη επιβίωση (Trepiaakas et al., 2010, Lacy et al., 2009, Perroud et al., 2011, Thomas-Kaskel et al., 2006, Schwaab et al., 2009, Lee et al., 2005, Burgdorf et al., 2008). Πλέον πρόσφατα το Sipuleucel-T, το πρώτο ανοσοθεραπευτικό εμβόλιο βασιζόμενο σε δενδριτικά κύτταρα, εγκρίθηκε για ευρεία κλινική χρήση υπό την ονομασία Provenge<sup>R</sup>, σε ασθενείς με ασυμπτωματικό ή ελάχιστα συμπτωματικό ορμονο-ανθεκτικό καρκίνο του προστάτη (Cheever and Higano, 2011). Πριν την επίσημη έγκρισή του από το FDA, είχε δειχθεί ότι ο εμβολιασμός των ασθενών αυτών με Sipuleucel-T, δηλ. αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιημένα *ex vivo* με μία χιμαιρική πρωτεΐνη αποτελούμενη από το αντιγόνο όξινη φωσφατάση του προστάτη και τον παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony stimulation factor, GM-CSF), παρέτεινε την επιβίωσή τους κατά 4 μήνες (Kantoff et al., 2010).

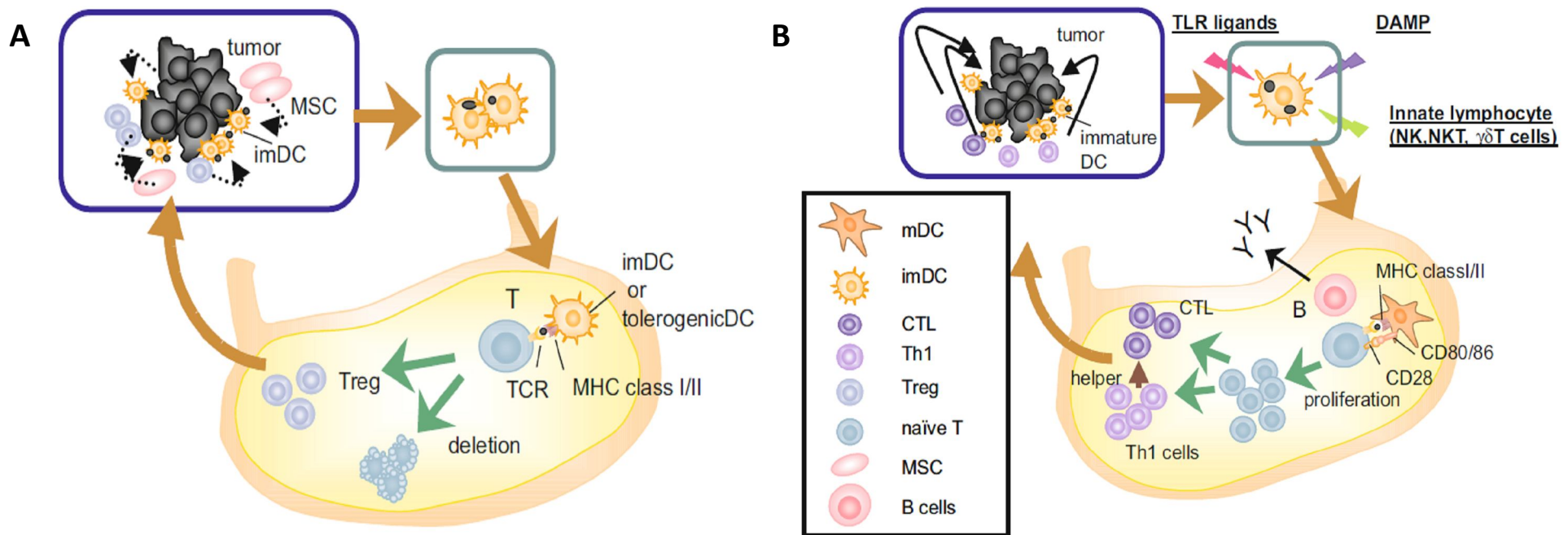
Όμως, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών που αφορούν αντικαρκινικά εμβόλια βασιζόμενα σε δενδριτικά κύτταρα δεν έχει ενταχθεί στη φάση III των μελετών και οι θεραπευτικές δυνατότητες των εμβολίων αυτών εξακολουθούν να είναι υπό αμφισβήτηση (Galluzzi et al., 2012). Βασική αιτία για



αυτό αποτελεί το γεγονός ότι πολλές κλινικές μελέτες στο παρελθόν δε στέφθηκαν με επιτυχία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα συνιστά μία κλινική δοκιμή φάσης III σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα, στην οποία ο εμβολιασμός με δενδριτικά κύτταρα επέφερε παρόμοια ή και χειρότερα αποτελέσματα από την καθιερωμένη και ελάχιστα αποτελεσματική χημειοθεραπεία με δακαρβαζίνη, γεγονός που οδήγησε και στον τερματισμό της μελέτης (Schadendorf et al., 2006).

Η *ex vivo* ανάπτυξη των δενδριτικών κυττάρων αποτελείται από πολλά επιμέρους στάδια, τα οποία δεν είναι ευρέως καθιερωμένα/τυποποιημένα και στο σύνολό τους συμβάλλουν στην ποιότητα των αναπτυσσόμενων δενδριτικών κυττάρων. Συνεπώς, προτάθηκε ότι στην αποτυχία της προαναφερθείσας μελέτης συνέβαλε ένα ή περισσότερα στάδια κατά την *ex vivo* ανάπτυξη των δενδριτικών κυττάρων, όπως η διαφοροποίησή τους από τα πρόδρομα κύτταρα, η κρυοσυντήρησή τους, η διαδικασία με την οποία «φορτώθηκαν» με το αντιγόνο, καθώς επίσης και οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν για την ωρίμανσή τους (Gilboa, 2007, Schadendorf et al., 2006, Nestle et al., 2005). Για το λόγο αυτό, αρκετές μελέτες στη συνέχεια, εστιάστηκαν στην *in vivo* στόχευση και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, παρακάμπτοντας τη δαπανηρή και απαιτητική *ex vivo* ανάπτυξή τους (Kreutz et al., 2013).

Στα πλαίσια των μελετών αυτών χρησιμοποιήθηκαν ανοσοενισχυτικά μόρια με ικανότητα να διεγείρουν *in vivo* συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, διέγερση η οποία επάγει την αύξηση της έκφρασης των CD80/CD86 μορίων στην επιφάνειά τους και τη βέλτιστη ωρίμανσή τους. Η παρουσία τόσο των συνδιεγερτικών μορίων, όσο και η έκκριση ανοσοεπαγωγικών κυτταροκινών (πχ. IL-12) οδηγεί με τη σειρά της στην αποτελεσματική ενεργοποίηση των βοηθητικών και κυτταροτοξικών T κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους προς κύτταρα τύπου T<sub>H</sub>1 και T<sub>C</sub>1, αντίστοιχα, τα οποία προάγουν τις επιθυμητές κυτταρομεσολαβητικές απαντήσεις για την αντιμετώπιση του καρκίνου (**Εικόνα 1.1B**). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ανοσοενισχυτικών μορίων αποτελούν και οι συνδέτες των υποδοχέων τύπου Toll (Toll like receptor, TLR), που θα αναλυθούν διεξοδικά στη συνέχεια.



**Εικόνα 1.1.** Η σημασία της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων στην αντιμετώπιση των όγκων. Α) Στο μικροπεριβάλλον του όγκου τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (imDC) ή τα ανοχογονικά δενδριτικά κύτταρα (tolerogenic DC) προσλαμβάνουν τα καρκινικά αντιγόνα και μεταναστεύοντας στους γειτονικούς λεμφαδένες, τα παρουσιάζουν στα παρθένα T κύτταρα. Απουσία συνδिएγερτικών σημάτων, τα παρθένα T κύτταρα είτε εξαλείφονται, είτε διαφοροποιούνται σε T ρυθμιστικά κύτταρα (Treg), τα οποία σε συνεργασία με άλλα κατασταλτικά κύτταρα, όπως τα μυελοειδή (myeloid suppressor cells, MSC) προάγουν περαιτέρω την ανάπτυξη του όγκου. Β) Αντίθετα, όταν τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα προσλάβουν το καρκινικό αντιγόνο και, κατά τη μετανάστευσή τους στους λεμφαδένες, ωριμάσουν, αναπτύσσονται CD4+ T κύτταρα τύπου Th1 και δραστικά κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTL) ειδικά για τα καρκινικά αντιγόνα, τα οποία μπορούν και λύουν τα καρκινικά κύτταρα. Ως παράγοντες ωρίμανσης των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων μπορούν να δράσουν είτε διάφοροι συνδέτες των υποδοχέων τύπου Toll (TLR ligands), ανάμεσά τους και μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβες (DAMP), είτε η επαφή των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων με άλλους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς που ανήκουν στη φυσική ανοσία, όπως τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα, τα NKT κύτταρα ή τα  $\gamma\delta$ T κύτταρα (ανατύπωση από Fujii et al., 2009).

## 1.2. Οι υποδοχείς τύπου Toll και οι συνδέτες τους

### 1.2.1. Βασικά χαρακτηριστικά και μονοπάτια σηματοδότησης των υποδοχέων τύπου Toll

Η ενεργοποίηση και απάντηση του έμφυτου σκέλους του ανοσοποιητικού συστήματος βασίζεται στην αναγνώριση εξελικτικά συντηρημένων δομών των παθογόνων, που είναι γνωστά ως μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), από κατάλληλους υποδοχείς (pathogen recognition receptors, PRRs) που εκφράζουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Από τους PRRs οι πλέον μελετημένοι είναι οι TLRs (Mogensen, 2009), μία ιδιαίτερα συντηρημένη οικογένεια υποδοχέων, που εκφράζονται σε πληθώρα κυττάρων και ιδιαίτερα σε κύτταρα του μη ειδικού σκέλους της ανοσίας (Baxevanis et al., 2013).

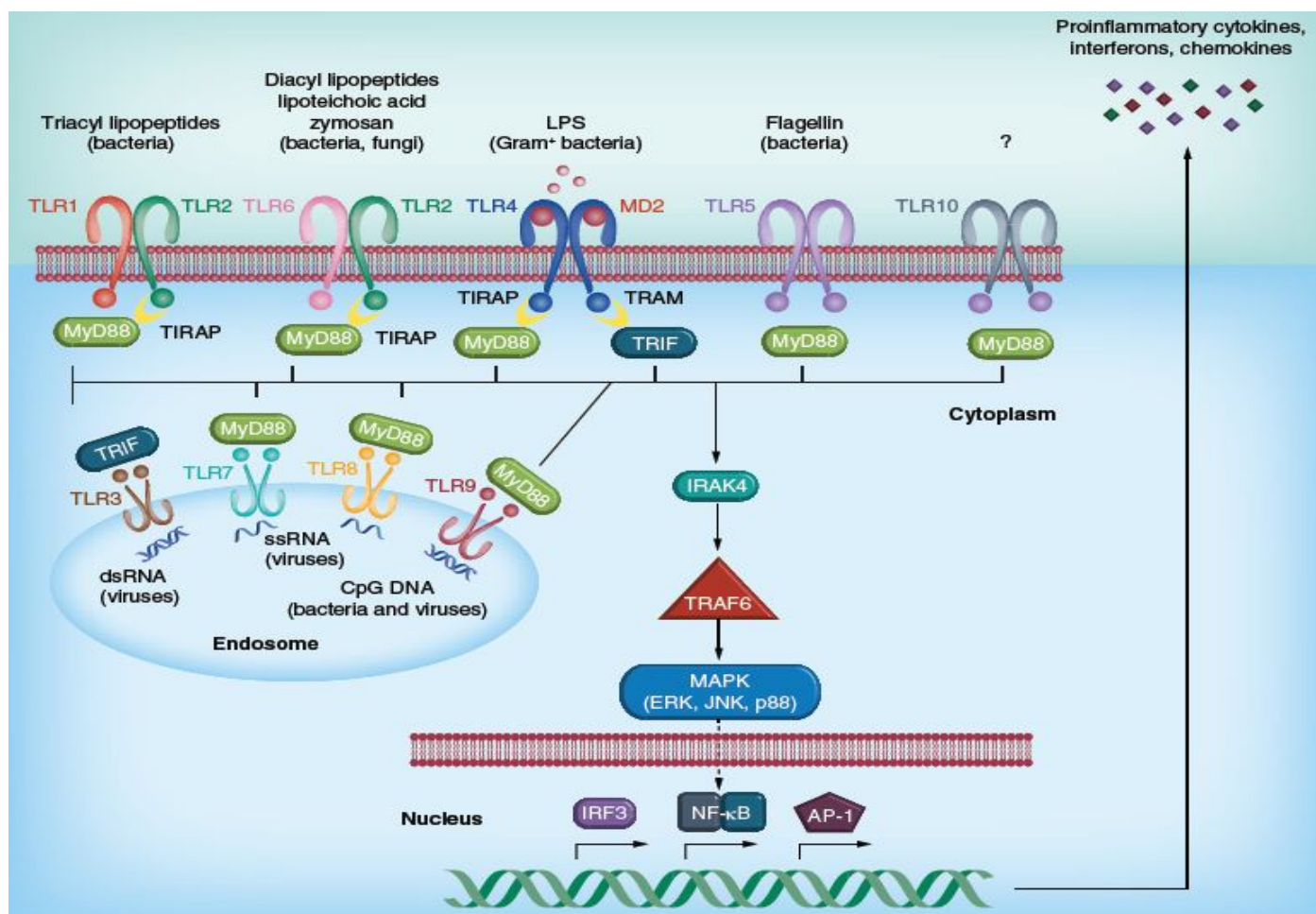
Οι TLRs πήραν το όνομά τους βάσει της ομολογίας τους με την πρωτεΐνη Toll της *Drosophila melanogaster*. Το γονίδιο *Toll* ανακαλύφθηκε το 1985 στη *Drosophila* και ο ρόλος του είναι να ρυθμίζει τη σπονδυλοκοιλιακή ανάπτυξη κατά την εμβρυογένεση, αλλά και τις λειτουργίες του φυσικού σκέλους της ανοσίας (Anderson et al., 1985). Το ανθρώπινο ομόλογο της πρωτεΐνης Toll αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1997 από τους Medzhiton και συνεργάτες, οι οποίοι έδειξαν ότι η σηματοδότηση καταρροϊκά της πρωτεΐνης αυτής είναι συντηρημένη στον άνθρωπο και ενεργοποιεί τις ανοσοαπαντήσεις του ειδικού σκέλους της ανοσίας (Medzhiton et al., 1997). Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 10 TLRs στον άνθρωπο, εκ των οποίων οι TLR-1, -2, -4, -5, -6 και -10 εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια και οι -3, -7/8 και -9 στα ενδοσώματα (Akira et al., 2006).

Οι TLRs έχουν εξελιχθεί για να αναγνωρίζουν τα PAMPs, τα οποία χαρακτηρίζονται από σχεδόν απόλυτα συντηρημένες δομές/μοτίβα κοινές μεταξύ ιών, βακτηρίων, πρωτοζώων και μυκήτων (Akira et al., 2006) και σαφώς διακριτές από εαυτά μοτίβα των ξενιστών, ώστε να αναγνωρίζονται ως «ξένα» από το ανοσοποιητικό σύστημά του (Mogensen, 2009). Χαρακτηριστικά παραδείγματα PAMPs αποτελούν ο λιποπολυσακχαρίτης (lipopolysaccharide, LPS) που αναγνωρίζεται από τον TLR-4, συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων όπως οι πεπτιδογλυκάνες και οι λιποπρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από τον TLR-2 (μετά τον ομοδιμερισμό του με τους TLR-1 ή -6), συστατικά των μαστιγίων των βακτηρίων (φλαγγελίνες), που προσδένονται στον TLR-5, μη μεθυλιωμένα βακτηριακά ή ιικά CpG DNA τμήματα,

καθώς και ιικά RNA, μονόκλωνα και δίκλωνα, που αναγνωρίζονται από τους TLR-9, -7/8 και -3, αντίστοιχα (Baxevanis et al., 2013) (**Εικόνα 1.2**). Οι TLRs ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση του συνδέτη τους και σε μερικές περιπτώσεις, επιφανειακοί TLRs μπορούν να ενδοκυτταρωθούν μετά την ενεργοποίησή τους, όπως έχει παρατηρηθεί για τους TLR-2 και -4 οι οποίοι μπορούν να μετακινηθούν στα φαγοσώματα και ενδοσώματα, αντίστοιχα (McGettrick and O'Neill, 2010). Ωστόσο, εκτός από τα «ξένα» μοτίβα, συγκεκριμένοι TLRs μπορούν να αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα που βρίσκονται σε εαυτές δομές και ονομάζονται μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβες (damage-associated molecular patterns, DAMPs), τα οποία λειτουργούν ως «σήματα κινδύνου» για τον οργανισμό (Beg, 2002, Kawai and Akira, 2010). Χαρακτηριστικά παραδείγματα DAMPs αποτελούν διάφορα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού shock (heat shock proteins, HSPs), αλλά και η πρωτεΐνη B1 της ομάδας των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (high mobility group B1 protein, HMGB1).

Δομικά, οι TLRs ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων TIR (TLR-IL-1 receptor), είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και διαθέτουν ένα κυτταροπλασματικό μοτίβο TIR για καταρροϊκή σηματοδότηση και ένα εξωκυτταρικό τμήμα με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη για την πρόσδεση του συνδέτη τους (Goutagny et al., 2012). Η ενεργοποίηση των TLRs από το συνδέτη τους οδηγεί στη στρατολόγηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-προσαρμογέων (**Εικόνα 1.2**), που φέρουν μοτίβα TIR, όπως η MyD88 (myeloid differentiation factor-88), η TIRAP (TIR-associated protein), η TRIF (TLR-associated-activator of interferon) και η TRAM (TLR-associated molecule) (Kawai and Akira, 2010). Όλοι οι TLRs απαιτούν τη MyD88 για ενδοκυττάρια σηματοδότηση, με εξαίρεση τον TLR-3, ο οποίος σηματοδοτεί αποκλειστικά μέσω της TRIF, και τον TLR-4 που στρατολογεί τόσο τη MyD88, όσο και την TRIF (Akira and Takeda, 2004). Η ενεργοποίηση της MyD88 οδηγεί στη φωσφορυλίωση των MAP (mitogen-activated protein) κινασών, στην ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB και τελικά στην έκφραση γονιδίων που προάγουν τη φλεγμονή. Η TIRAP ενεργοποιεί το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι καταρροϊκά των TLR-2 και -4, ενώ η TRIF επάγει, μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού, την ενεργοποίηση των MAP κινασών, της IRF (interferon regulatory factor)-3 και του NF-κB, καταρροϊκά των TLR-3 και -4. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση της IRF-3 είναι ιδιαίτερης σημασίας για την παραγωγή των ιντερφερονών (interferon, IFN) τύπου I. Τέλος, η TRAM ενεργοποιεί το TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι καταρροϊκά του TLR-4 (Kawai and Akira, 2010). Τα

προαναφερθέντα γεγονότα οδηγούν στην έκφραση γονιδίων και τη σύνθεση ποικίλων μορίων, στα οποία περιλαμβάνονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τύπου I IFNs, χημειοκίνες, μόρια προσκόλλησης καθώς και υποδοχείς (Mogensen, 2009), που συνολικά ενορχηστρώνουν την πρόιμη ανοσολογική απάντηση και ταυτόχρονα ενεργοποιούν το ειδικό σκέλος της ανοσίας.



**Εικόνα 1.2.** Οι συνδέτες των TLRs και τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά αυτών. Διάφορα μόρια όπως οι λιποπρωτεΐνες, οι πεπτιδογλυκάνες, ο LPS, οι φλαγγελίνες, τα μη μεθυλιωμένα βακτηριακά ή ιικά CpG DNA τμήματα, καθώς και τα μονόκλινα ή δίκλινα ιικά RNA προσδένονται και ενεργοποιούν διάφορα μέλη της οικογένειας των TLRs. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών εκκινεί καταρροϊκά μονοπάτια που μεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες-προσαρμογείς MyD88, TIRAP, TRIF και TRAM και από τις κινάσες IRAK-4, ERK, JNK και p38, και μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB, οδηγούν στην έκφραση γονιδίων για την παραγωγή και έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, τύπου I IFN και χημειοκινών (ανατύπωση από Baxevanis et al., 2013).

### **1.2.2. Οι συνδέτες των υποδοχέων τύπου Toll στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου**

Γνωρίζοντας πόσο σημαντική είναι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και η απόκτηση ενός ώριμου φαινοτύπου για την εξέλιξη μιας αποτελεσματικής αντικαρκινικής απάντησης, σειρά ανοσοενισχυτικών μορίων που στοχεύουν υποδοχείς των δενδριτικών κυττάρων βρίσκονται υπό μελέτη, ενώ αρκετά από αυτά έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές ανοσοθεραπείας του καρκίνου, σε συνδυασμό με TAAs. Στα πλαίσια, λοιπόν, της βελτιστοποίησης των αντικαρκινικών εμβολίων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν οι συνδέτες των TLRs, των οποίων η ανοσοενισχυτική δράση μελετάται ευρέως (Baxevanis et al., 2013).

Οι συνδέτες των TLRs επάγουν την ωρίμανση και ενεργοποίηση τόσο των δενδριτικών, όσο και άλλων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, μέσω της αύξησης της έκφρασης των MHC μορίων, των συνδιεγερτικών σημάτων (CD80, CD86 και CD40) και των υποδοχέων των χημειοκινών (CCR7), αλλά και μέσω της ενίσχυσης της ικανότητας φαγοκυττάρωσης του αντιγόνου και μετανάστευσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στους γειτονικούς λεμφαδένες. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, βελτιστοποιείται η παρουσίαση του αντιγόνου στα T κύτταρα, η οποία συνοδεύεται από έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-12, TNF-α) και τύπου I IFNs. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα δενδριτικά και λοιπά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ενεργοποιούν χυμικές και T<sub>H</sub>1-μεσολαβούμενες αντικαρκινικές απαντήσεις, οδηγώντας σε ενίσχυση της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας και της CD8+ T κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα (Kanzler et al., 2007). Από το σύνολο των μορίων που προσδένονται σε TLRs, ιδιαίτερα υποσχόμενοι είναι οι συνδέτες των TLR-4, -7/8 και -9, καθώς έχουν δείξει υψηλή ανοσοενισχυτική ικανότητα και *in vivo* (Cheever, 2008), χαρακτηριστικά παραδείγματα των οποίων αναλύονται παρακάτω.

#### **Μονοφωσφορυλο-λιπίδιο A (MPLA)**

Το λιπίδιο A είναι το βιολογικά ενεργό τμήμα του LPS, συστατικού των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram αρνητικών (-) βακτηρίων. Χαρακτηρίζεται από ισχυρή ανοσορυθμιστική ικανότητα την οποία ασκεί μέσω πρόσδεσής του στον TLR-4 και έχει δοκιμαστεί ως ανοσοενισχυτικό μόριο για την επαγωγή ανοσολογικών

απαντήσεων έναντι ασθενώς ανοσογονικών αντιγόνων, όπως είναι πολλά TAAs (Cluff, 2000). Από τα παράγωγα του λιπιδίου A, το 3-Ο-διακυλικό-4'-μονοφωσφορυλο-λιπίδιο A (MPLA) έδειξε την πιο ισχυρή ανοσοενισχυτική δράση και παράλληλα ήταν 100 φορές λιγότερο τοξικό σε σύγκριση με τον LPS (Cluff, 2010). Μείγματα του MPLA σε συνδυασμό με άλλους ανοσοδραστικούς παράγοντες, που ονομάζονται ανοσοενισχυτικά συστήματα (adjuvant systems, AS), έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ως στοιχεία αντικαρκινικών εμβολίων σε δημοσιευμένες κλινικές δοκιμές. Αναλυτικότερα, το AS02B, που περιέχει MPLA και τη σαπονίνη QS21, μαζί με το αντιγόνο MAGE-A3 χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, και οδήγησαν στην ανάπτυξη αντιγονοειδικών απαντήσεων και σε παρατεταμένη, ελεύθερης νόσου επιβίωση (Vansteenkiste, 2007). Αντίστοιχα, το AS04, που περιέχει MPLA και υπεροξείδιο του αλουμινίου, ενίσχυσε τη δραστική Β κυτταρική ανοσία αλλά και τη Β κυτταρική μνήμη, ενώ παράλληλα ενεργοποίησε τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και την τοπική παραγωγή κυτταροκινών, τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους που εμβολιάστηκαν με σωματίδια που ομοιάζουν με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (human papillomavirus, HPV) 16/18 (Gianini et al., 2006). Λόγω της εξαιρετικής του αποτελεσματικότητας και της μειωμένης τοξικότητας, το AS04 είναι το πρώτο ανοσοενισχυτικό εμβολίων που περιέχει ένα συνδέτη των TLRs που εγκρίθηκε για χρήση στον άνθρωπο, και ήδη αποτελεί συστατικό δύο προστατευτικών αντικαρκινικών εμβολίων, κατά του ιού της ηπατίτιδας Β (Fendrix™) και του HPV (Cervarix™).

### **Ιμιδαζοκινολίνες-imiquimod**

Το imiquimod είναι μία συνθετική ιμιδαζοκινολίνη που ενεργοποιεί τον TLR-7 και έχει δειχθεί να ενισχύει τις ανοσολογικές απαντήσεις. Αναλυτικότερα, η χορήγηση imiquimod σε συνδυασμό με πεπτίδια της τυροσινάσης, του Melan-A, του NY-ESO-1 και του ιού της γρίπης, οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά αντιγονοειδικών CD8+ T κυττάρων στην περιφέρεια ασθενών με μεταστατικό ή υψηλής κακοήθειας μελάνωμα (Shackleton et al., 2004). Αντίστοιχα, οι Adams και συνεργάτες ανέφεραν ότι η τοπική χορήγηση imiquimod σε συνδυασμό με το NY-ESO-1 σε ασθενείς με μελάνωμα, οδήγησε στην ανάπτυξη τόσο χυμικής, όσο και κυτταρικής ανοσίας σε σημαντικό ποσοστό ασθενών (Adams et al., 2008). Προσφάτως, σε κλινική δοκιμή φάσης I/II σε ασθενείς με ορμονοευαίσθητο καρκίνο του προστάτη, η χορήγηση 11 HLA-A2-περιοριζόμενων και 2



MHC τάξης II επιτόπων από καρκινικά αντιγόνα του προστάτη σε συνδυασμό με imiquimod, σταθεροποίησε ή/και καθυστέρησε το χρόνο διπλασιασμού του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) σε ορισμένους ασθενείς (Feyerabend et al., 2009).

### **Ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια CpG**

Τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια δεοξυκυτιδίνης-δεοξυγουανοσίνης (CpG oligonucleotides, CpG ODNs) είναι μικρές συνθετικές αλληλουχίες DNA που περιέχουν μη μεθυλωμένα μοτίβα CpG. Μπορούν να διαχωριστούν σε 4 βασικές κατηγορίες (C, D, K και P) με βάση τη δομή και τη βιολογική τους λειτουργία, ωστόσο όλα μοιράζονται έναν κοινό τρόπο δράσης, μέσω ενεργοποίησης του TLR-9. Ενεργοποιούν κυρίως τα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα, επάγοντας την ωρίμανσή τους και την παραγωγή IFN- $\alpha$  και TNF- $\alpha$  (Bode et al., 2011).

Η χορήγηση των CpG ODN σε συνδυασμό με TAAs μελετήθηκε σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών δοκιμών. Σε ασθενείς με μελάνωμα που έλαβαν CpG 7909 σε συνδυασμό με Melan A και MART-1, παρατηρήθηκε σημαντική ενίσχυση των αντιγονοειδικών CD8+ T κυτταρικών αποκρίσεων (Speiser et al., 2005), ενώ συνδυαστική χορήγηση CpG 7909 και πρωτεΐνης NY-ESO-1 σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου οδήγησε και πάλι σε ενίσχυση των CD8+ T κυτταρικών απαντήσεων και παρατεταμένη επιβίωση (Karbach et al., 2010). Αντίθετα, χορήγηση του CpG 1018 σε συνδυασμό με επιτόπους του ογκοσχετιζόμενου αντιγόνου αντίστροφη μεταγραφάση της ανθρώπινης τελομεράσης (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) δεν είχε αντίστοιχη ευεργετική επίδραση σε ασθενείς με σάρκωμα ή νευροβλάστωμα (Haining et al., 2008). Όμως παρά το γεγονός ότι το συγκεκριμένο εμβόλιο δεν κατάφερε να επάγει αντιγονοειδικές T κυτταρικές απαντήσεις, προκάλεσε τη σημαντική παραγωγή χημειοκινών και τη μετανάστευση των T κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς. Επομένως, τα ευρήματα αυτά πρότειναν ότι οι στοχευμένες χορηγήσεις CpG 1018 θα μπορούσαν να κατευθύνουν τη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων σε συγκεκριμένα σημεία, όπως οι εστίες των όγκων. Έτσι, σε επόμενη μελέτη, χορήγηση του CpG PF-3512676 στις εστίες των όγκων σε ασθενείς με χαμηλής κακοήθειας B κυτταρικό λέμφωμα, οδήγησε στην επαγωγή συστηματικών αντικαρκινικών απαντήσεων και σε υποστροφή των όγκων (Brody et al., 2010).

Δεδομένης της ανάγκης για συνεχή βελτίωση των αντικαρκινικών εμβολίων, η ανακάλυψη νέων και περισσότερο αποτελεσματικών ανοσοενισχυτικών μορίων είναι

απαραίτητη. Στα πλαίσια της προσπάθειας αυτής θα άξιζε να διερευνηθεί και η ικανότητα των DAMPs να δρουν ως ανοσοενισχυτικά μόρια σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας, εφόσον και τα DAMPs δρουν ενεργοποιώντας συγκεκριμένους TLRs. Η έρευνα όμως προς αυτή την κατεύθυνση δεν έχει ακόμα δώσει κλινικά εφαρμόσιμα αποτελέσματα.

Στην ιδιαίτερα ετερόκλητη κατηγορία των DAMPs ανήκουν ενδογενή μόρια τα οποία δε μοιράζονται κοινά δομικά στοιχεία ή κοινές βιολογικές δράσεις και τα περισσότερα από αυτά παράγονται ή εξωκυτταρώνονται, ως αποτέλεσμα κυτταρικού θανάτου ή/και κυτταρικού τραυματισμού (Kawai and Akira, 2010). Στην κατηγορία των DAMPs περιλαμβάνονται προϊόντα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας όπως το υαλουρονικό οξύ, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας A, το ινωδογόνο και η διγλυκάνη που δρουν ενεργοποιώντας τον TLR-2 ή/και τον TLR-4 (Kawai and Akira, 2010).

Εκτός όμως από τα προϊόντα της εξωκυττάριας ουσίας, ως συνδέτες των TLRs δρουν και διάφορα μέλη της οικογένειας των HSPs, αλλά και η HMGB1. Αναλυτικότερα, ενδοκυτταρικά οι HSPs δρουν ως μοριακές συνοδοί, αλλά εξωκυτταρικά, συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας αυτής, όπως οι HSP 60, 70, 22 και η gp96, έχουν συνδεθεί με την ενεργοποίηση μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων μέσω των TLR-2, -4 ή και των δύο TLRs, επάγοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Tsan and Gao, 2009). Η HMGB1 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που ενδοκυτταρικά δρα ως ρυθμιστικό μόριο της μεταγραφής, ενώ όταν απελευθερώνεται εξωκυτταρικά υπό συνθήκες κυτταρικού stress, αναγνωρίζεται από τους TLR-2 και -4 και δρα ως μεσολαβητής της προφλεγμονώδους αντίδρασης. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι επάγει την ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων (Dumitriu et al., 2005, Messmer et al., 2004) και δρα *in vivo* ενισχύοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε πρωτεΐνες- ή πεπτίδια-αντιγόνα (Saenz et al., 2010).

Αντίστοιχος διττός ρόλος, εντός και εκτός κυττάρου, έχει περιγραφθεί και για την προθυμοσίνη α (προΤα), μία κυρίως πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία όταν βρεθεί εξωκυτταρικά, κάτω από συνθήκες κυτταρικού θανάτου, ασκεί έναν πλειοτροπικό ανοσοενισχυτικό ρόλο.

### 1.3. Προθυμοσίνη α: ένα μόριο με διττό ρόλο

#### 1.3.1. Βασικά χαρακτηριστικά της προθυμοσίνης α

Η προΤα απομονώθηκε πρώτη φορά το 1984 από θύμο αδένα αρουραίου (Haritos et al., 1984a) και χαρακτηρίστηκε ως το κύριο ανοσοδραστικό συστατικό ενός εκχυλίσματος θυμικής προέλευσης, της θυμοσίνης-κλάσμα 5 το οποίο διέθετε σημαντικές ανοσοενισχυτικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo* (Ioannou et al., 2012). Μαζί με τη θυμοσίνη α1 (Τα1), της οποίας αποτελεί πρόδρομο μόριο (Haritos et al., 1984a), συνιστούν τους σημαντικότερους εκπροσώπους της οικογένειας των α-θυμοσινών. Η ανθρώπινη προΤα είναι ένα πολυπεπτίδιο μήκους 109 αμινοξικών καταλοίπων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *PTMA*, το οποίο εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q37.1) (Szabo et al., 1993). Η αλληλουχία της προΤα είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος, με αποτέλεσμα το μόριο να αποκτά έναν ιδιαίτερα όξινο χαρακτήρα και να έχει χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (pI 3,55). Αν και αρχικά χαρακτηρίστηκε ως «θυμική ορμόνη», η προΤα δεν εκφράζεται αποκλειστικά στο θύμο αδένα, αλλά εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς (Haritos et al., 1984b). Εμφανίζει υψηλή εξελικτική συντηρητικότητα και η πρωτοταγής δομή του πολυπεπτιδίου παρουσιάζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των διαφόρων ειδών θηλαστικών (Hannappel and Huff, 2003). Η προΤα αφθονεί σε κύτταρα με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (Haritos, 1987) και ο αριθμός των ενδοκυτταρικών αντιγράφων του πολυπεπτιδίου σχετίζεται με τον κυτταρικό τύπο (Eschenfeldt and Berger, 1986).

Επειδή τα περισσότερα όξινα κατάλοιπα που περιέχει η προΤα βρίσκονται στο κεντρικό τμήμα της αλληλουχίας της, το πολυπεπτίδιο δεν έχει σαφή δευτεροταγή δομή και αποκτά τελικά μία τυχαία, ακανόνιστη δομή στο χώρο. Είναι πιθανό, ωστόσο, να αποκτά δευτεροταγή δομή μετά από αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή μακρομόρια στην κυτταρική επιφάνεια (Pineiro et al., 2000), ενώ είναι ήδη γνωστό ότι υπό ορισμένες συνθήκες (χαμηλό pH και υψηλή συγκέντρωση) δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια (Pavlon et al., 2002).

Αν και έχει αναφερθεί η έκκρισή της από νευρώνες υπό νεκρωτικές συνθήκες μέσω ενός μη κλασικού μονοπατιού (Matsunaga and Ueda, 2010), η προΤα δε διαθέτει πεπτίδιο-οδηγητή για έκκριση. Αντίθετα φέρει στην αλληλουχία της ένα πολύ ισχυρό, πλούσιο σε λυσίνες, διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal,

NLS), που εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων <sup>87</sup>KR<sup>89</sup> και <sup>100</sup>TKKQKT<sup>105</sup>, με αποτέλεσμα το πολυπεπτίδιο να εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (Manrow et al., 1991). Ωστόσο, πολυάριθμες είναι και οι μελέτες που υποστηρίζουν και τον κυτταροπλασματικό της εντοπισμό (Sburlati et al., 1990, Tsitsiloni et al., 1989). Οι Enkemann και συνεργάτες προσπαθώντας να εξηγήσουν αυτές τις αντιφατικές παρατηρήσεις, έδειξαν ότι η προΤα εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων στα σημεία ενεργού μεταγραφής, με ένα μικρότερο ποσοστό της να παραμένει στο κυτταρόπλασμα (Enkemann et al., 2000a). Επιπλέον, προτάθηκε ότι λόγω του μικρού μεγέθους της που διευκολύνει τη συνεχή μετακίνηση της μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, η προΤα πιθανά μεταφέρει θετικά φορτισμένα μόρια στον πυρήνα, όπως για παράδειγμα τις ιστόνες, εξουδετερώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το ισχυρό αρνητικό της φορτίο (Enkemann et al., 2000a).

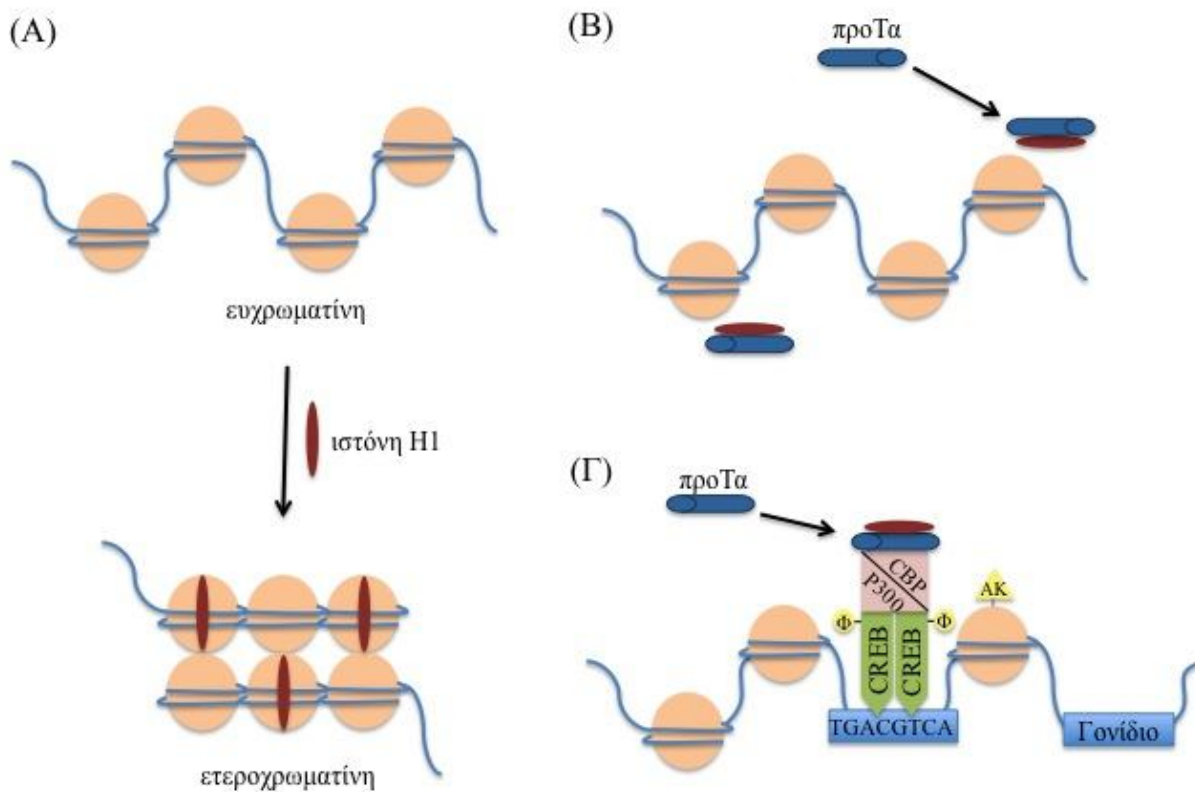
Αναφορικά με το βιολογικό της ρόλο, οι μέχρι τώρα έρευνες υποδεικνύουν ένα διπλό ρόλο για το πολυπεπτίδιο: ενδοκυτταρικά συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ εξωκυτταρικά δρα ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Οι δύο ρόλοι της προΤα αναλύονται διεξοδικά στη συνέχεια.

### **1.3.2. Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α**

Είναι ήδη γνωστό ότι η προΤα είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων (Eschenfeldt and Berger, 1986). Πολλές αναφορές έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του mRNA της προΤα αυξάνονται μετά από διέγερση λεμφοκυττάρων και ινοβλαστών NIH3T3 (Eschenfeldt and Berger, 1986), ενώ αναστολή της έκφρασής της με αντικωδικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides) προκαλεί ανάσχεση της κυτταρικής διαίρεσης ανθρώπινων μυελωματικών κυττάρων (Sburlati et al., 1991).

Στον πυρήνα, έχει βρεθεί ότι η προΤα, μέσω του κεντρικού της τμήματος, είναι ικανή να απομακρύνει την ιστόνη H1 από τα νουκλεοσώματα με αποτέλεσμα την αποσυσπείρωση της ίνας της χρωματίνης (Papamarcaki and Tsolas, 1994), συμμετέχοντας έτσι σε διαδικασίες που απαιτούν αναδιάταξη των νουκλεοσωμάτων, όπως είναι η μεταγραφή και η αντιγραφή (Segade and Gomez-Marquez, 1999).

Παράλληλα, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με την προσδένουσα πρωτεΐνη του CREB (CREB-binding protein) (Karetsou et al., 2002) και να ρυθμίζει και τη δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης p300 (Subramanian et al., 2002).

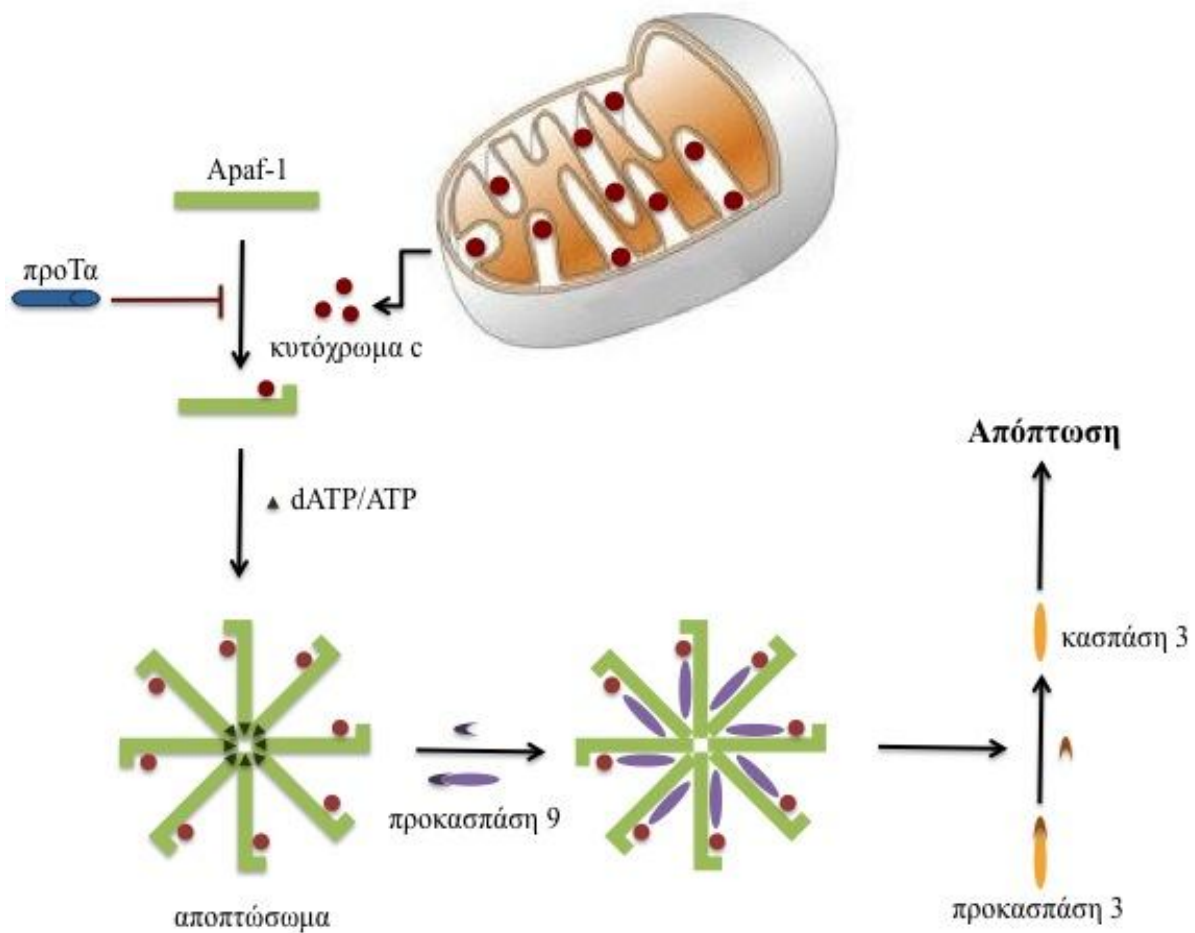


**Εικόνα 1.3.** Η προΤα αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 βοηθώντας τη διαδικασία της μεταγραφής γονιδίων. Α) Απουσία προΤα, η ιστόνη H1 προσδένεται στα νουκλεοσώματα και προκαλεί τη συμπίκνωση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. Β) Παρουσία προΤα, το πολυπεπτίδιο αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 βοηθώντας στη μεταφορά της από και προς τη χρωματίνη. Γ) Κατά τη μεταγραφή αποκαλύπτεται η αλληλουχία CRE (TGACGTCA) στο γενετικό υλικό, όπου προσδένεται το ομοδιμερές CREB. Το CREB φωσφορυλιώνεται (Φ) από κινάσες και το σύμπλεγμα CBP-p300 στρατολογείται από την προΤα. Το σύμπλοκο CREB-CBP-p300 σταθεροποιείται, οδηγώντας σε ακετυλίωση (AK) ιστονών από την p300, με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τη μεταγραφή γονιδίων (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013).

Σκιαγραφείται, επομένως, ένας τρόπος δράσης μέσω του οποίου η προΤα επάγει τη μεταγραφή γονιδίων (**Εικόνα 1.3**). Αρχικά, η προΤα απομακρύνει την ιστόνη H1 από τα νουκλεοσώματα επιτρέποντας τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων. Η μετέπειτα αλληλεπίδρασή της με τη CBP και την p300, έχει ως αποτέλεσμα την ακετυλίωση των ιστονών, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τελικά τη μεταγραφή γονιδίων. Άλλες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση του ογκογονιδίου *c-myc* με

το *PTMA* (Eilers et al., 1991). Ενεργοποίηση του *c-myc* σε ινοβλάστες αρουραίου και ποντικού οδήγησε σε αύξηση της μεταγραφής του *PTMA*, με αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού κύκλου.

Στο κυτταρόπλασμα, η παρουσία της προΤα αποτρέπει την απόπτωση, καθώς ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα της κασπάσης-9, αναστέλλοντας το σχηματισμό του αποπτώσωματος (Jiang et al., 2003) (**Εικόνα 1.4**).

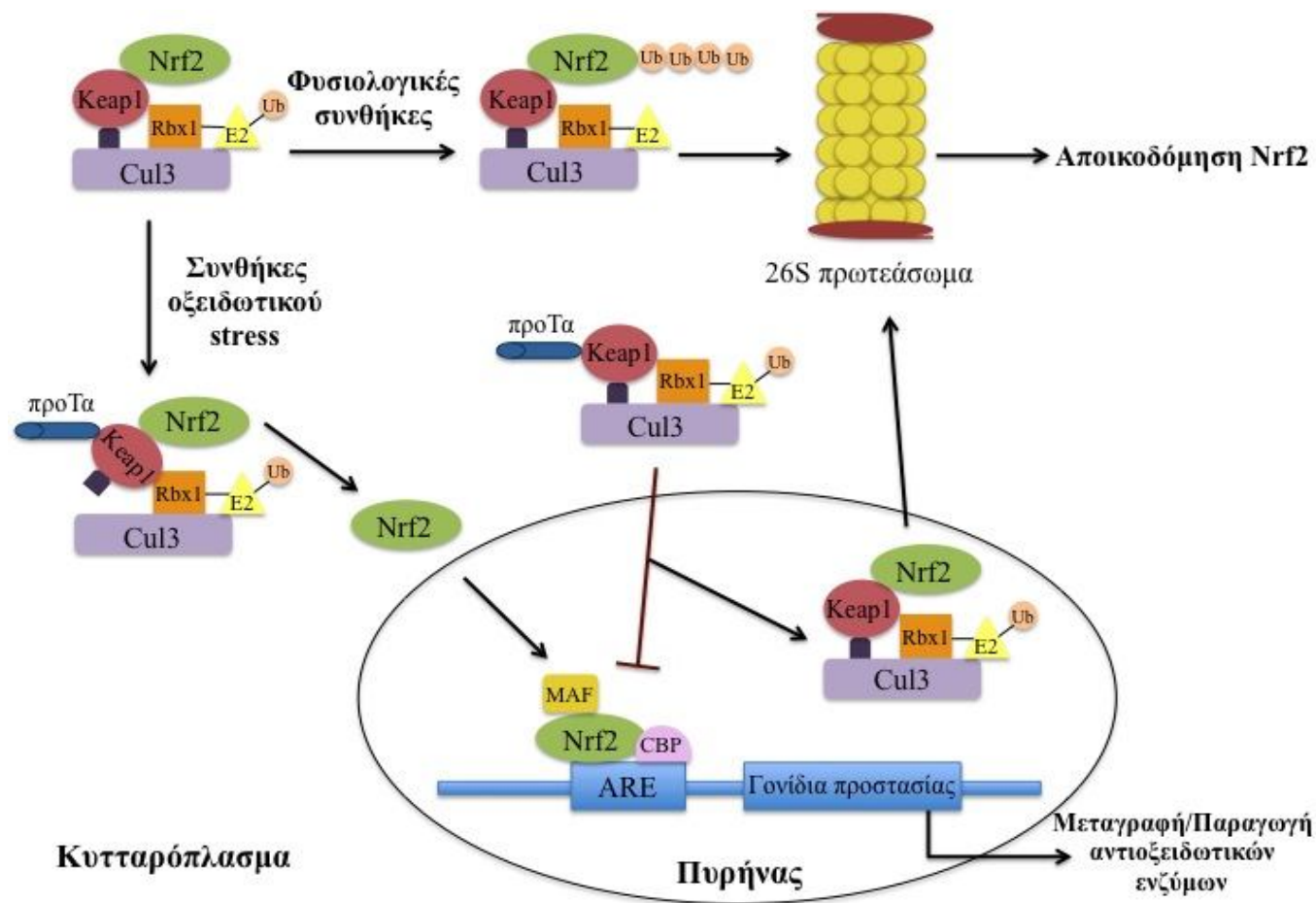


**Εικόνα 1.4.** Η προΤα ασκεί αντιαποπτωτικό ρόλο. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από το μεσομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο κυτταρόπλασμα και συνδέεται με τον Araf-1 ενεργοποιώντας τον και σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Ακολουθεί η ενεργοποίηση της κασπάσης 9 που με τη σειρά της ενεργοποιεί την προκασπάση 3 προς κασπάση 3, η οποία επάγει την απόπτωση του κυττάρου. Παρουσία προΤα, παρεμποδίζεται η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1 και συνεπώς αναστέλλεται το αποπτωτικό μονοπάτι (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013).

Το αποπτώσωμα συγκροτείται από τη σύνδεση του ενεργοποιητικού παράγοντα των πρωτεασών της απόπτωσης (apoptotic protease activating factor, Araf)-1 και του

κυτοχρώματος c που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια (Qi et al., 2010). Ο σχηματισμός του αποπτωσώματος ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών, ξεκινώντας αρχικά από την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την προ-κασπάση-3 σε κασπάση-3, οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Παρουσία προΤα παρεμποδίζεται η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1 και για το λόγο αυτό τα επίπεδα έκφρασης του πολυπεπτιδίου θεωρούνται ως ένας μοριακός «διακόπτης» μεταξύ απόπτωσης και αυτοφαγικού τύπου κυτταρικού θανάτου σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα (Piacentini et al., 2003). Σε συμφωνία με τον προτεινόμενο αντιαποπτωτικό της ρόλο, τα επίπεδα έκφρασης της προΤα συσχετίστηκαν με αυτά της πρωτεΐνης Bcl-2 σε καρκινώματα θυρεοειδή, όπου η προΤα πιθανά προάγει την κυτταρική επιβίωση μέσω του αντιαποπτωτικού μονοπατιού της Bcl-2 (Letsas et al., 2005).

Η προΤα ρυθμίζει, επίσης, τους αμυντικούς μηχανισμούς προστασίας των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού stress, μέσω αλληλεπίδρασής της με την Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Karapetian et al., 2005), η οποία καταστέλλει το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας Nrf2 αλληλεπιδρά με την Keap1 και το σύμπλοκο Nrf2-Keap1 ουβικιτινιλιώνεται από τη Cul3/Rbx1-εξαρτώμενη E3 λιγάση της ουβικιτίνης και στη συνέχεια οδηγείται στο πρωτεάσωμα, όπου αποικοδομείται (McMahon et al., 2006). Σε συνθήκες οξειδωτικού stress, η προΤα αλληλεπιδρά με την Keap1, μέσω του κεντρικού της τμήματος (Khan et al., 2013), απελευθερώνοντας τον Nrf2, ο οποίος στη συνέχεια επάγει την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων συμβάλλοντας, έτσι, στην επιβίωση των κυττάρων (Karapetian et al., 2005). Αξίζει να αναφερθεί ότι η προΤα μεσολαβεί επίσης και τη μεταφορά του συμπλόκου Keap1/Cul3/Rbx1 στον πυρήνα για την αποικοδόμηση του Nrf2, λειτουργώντας και εδώ ως «διακόπτης» της επαγωγής κυτταρο-προστατευτικών μηχανισμών (Niture and Jaiswal, 2009) (**Εικόνα 1.5**).



**Εικόνα 1.5.** Η προΤα λειτουργεί ως «διακόπτης» επάγοντας και αναστέλλοντας μονοπάτια κατά το οξειδωτικό stress. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το σύμπλοκο Nrf2-Keap1-Cul3-Rbx1 ουβικιτινιλιώνεται (Ub) στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα όπου αποικοδομείται. Υπό συνθήκες οξειδωτικού stress, η προΤα αλληλεπιδρά με την Keap1, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του Nrf2, τη μετανάστευσή του στον πυρήνα και την ενεργοποίηση του μηχανισμού μεταγραφής γονιδίων και παραγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων. Απενεργοποίηση του μηχανισμού προκαλείται από το σύμπλοκο προΤα-Keap1-Cul3-Rbx1, το οποίο μεταναστεύει στον πυρήνα, προσδένει τον Nrf2 και τον οδηγεί στο πρωτεάσωμα όπου αποικοδομείται (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013).



### 1.3.3. Ο εξωκυτταρικός ρόλος της προϋμοσίνης α

Εξωκυτταρικά, η προϋμοσίνη έχει την ικανότητα να διεγείρει τις ανοσολογικές αποκρίσεις, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Η εξωκυτταρική ανοσορρυθμιστική δράση της προϋμοσίνης φάνηκε ήδη από τα αρχικά *in vivo* πειράματα, όπου η χορήγηση προϋμοσίνης προστάτευσε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια από ευκαιριακές λοιμώξεις (πχ. από *Candida albicans*), αλλά και διεγείρει την έκκριση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μακροφάγων (Pan et al., 1986). Προσθήκη προϋμοσίνης σε *in vitro* καλλιέργειες λεμφοκυττάρων διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων μέσω της αύξησης της παραγωγής IL-2 και έκφρασης του υποδοχέα της στα Τ κύτταρα, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό (Baxevanis et al., 1990, Cordero et al., 1991). Επιπλέον, ενεργοποίηση ανθρώπινων μονοκυττάρων με προϋμοσίνη οδήγησε σε αυξημένη επιφανειακή έκφραση των MHC μορίων τάξης II (Baxevanis et al., 1992a). Στα πλαίσια της μελέτης της επίδρασης της προϋμοσίνης σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, το πολυπεπτίδιο φάνηκε ότι είναι ικανό να διεγείρει την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών (natural killer, NK) κυττάρων (Cordero et al., 1992), ενώ συνεργιστικά με την IL-2, να ενισχύει τη δράση των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (lymphokine-activated killer, LAK) κυττάρων (Lopez-Rodriguez et al., 1994). Η επίδραση με προϋμοσίνη δείχθηκε, επίσης, ότι επάγει την ωρίμανση ανώριμων δενδριτικών κυττάρων, διαφοροποιημένων από ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, αυξάνοντας την επιφανειακή έκφραση χαρακτηριστικών μορίων-δεικτών στην επιφάνειά τους (HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD40 και CD86) (Skopeliti et al., 2009). Τέλος, η προϋμοσίνη ενισχύει τη φαγοκυτταρική ικανότητα, καθώς και την ενδοκυτταρική παραγωγή και εξωκυτταρική απελευθέρωση ριζών οξυγόνου από ουδετερόφιλα περιφερικού αίματος υγιών δοτών (Heidecke et al., 1997, Samara et al., 2013a).

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης της προϋμοσίνης και να ταυτοποιηθεί ένας υποδοχέας στον οποίο πιθανά προσδένεται το μόριο, οι Cordero και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ραδιενεργά σημασμένα προϋμοσίνη για να μελετήσουν τις θέσεις πρόσδεσης του μορίου στην κυτταρική επιφάνεια ανθρώπινων λεμφοβλαστών (Cordero et al., 1996). Παρατηρήθηκαν 2 θέσεις δέσμησης του μορίου, μία υψηλής και μία χαμηλής συγγένειας, οι οποίες ήταν ειδικές για την προϋμοσίνη και όχι για την Τα1 (Pineiro et al., 2000). Σε επόμενη μελέτη στον ίδιο τύπο κυττάρων, οι θέσεις πρόσδεσης

της προΤα έγιναν τρεις, υψηλής, μέσης και χαμηλής συγγένειας (Pineiro et al., 2001), ενώ με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού εντοπίστηκε δομή τύπου «καπέλου» στον ένα πόλο των λεμφοβλαστών, στην οποία δεσμευόταν η προΤα. Η δομή αυτή αποτελείτο από τρεις υπομονάδες και σχετιζόταν με λιπιδικές σχεδίες (Salgado et al., 2005), αλλά τα πειραματικά δεδομένα δεν επιβεβαιώθηκαν με ταυτοποίηση ειδικού υποδοχέα για την προΤα.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι η προΤα σηματοδοτεί μέσω του TLR-4 σε μακροφάγα ποντικού (Mosoian et al., 2010). Αναλυτικότερα, επίδραση με προΤα σε μακροφάγα απομονωμένα από φυσιολογικούς (αγρίου τύπου) ποντικούς οδήγησε στην παραγωγή IFN-β, μέσω ενεργοποίησης του TRIF-εξαρτώμενου μονοπατιού, αλλά και στην παραγωγή TNF-α, μέσω ενεργοποίησης του MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού. Αντίστοιχη ενεργοποίηση δεν παρατηρήθηκε μετά από την επίδραση της προΤα σε μακροφάγα ποντικών με εξάλειψη του γονιδίου (knock-out) του TLR-4.

#### **1.4. Η προθυμοσίνη α ως βιοδείκτης για τη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου**

Δεδομένης της εμπλοκής της προΤα στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και γνωρίζοντας ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, η έκφραση της προΤα μελετήθηκε σε διάφορους τύπους καρκίνου και τα υψηλά επίπεδα που ανιχνεύθηκαν τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης ήταν αναμενόμενα. Για το λόγο αυτό, πολλές μελέτες έχουν εστιαστεί στη διερεύνηση της πιθανής της χρήσης ως προγνωστικού παράγοντα στον καρκίνο.

Σε αρχικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους, ανιχνεύθηκε υψηλή έκφραση του mRNA της προΤα σε T κύτταρα σπλήνα και θυμοκύτταρα διεγερμένα με μιτογόνα (Bustelo et al., 1991), σε όγκους της υπόφυσης (Alvarez et al., 1993), καθώς και κατά τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης στο ήπαρ. Ειδικά στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, το mRNA της προΤα διατηρήθηκε σε δεκαπλάσια επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια εξέλιξης της νόσου. Μάλιστα, ο *in situ* υβριδισμός έδειξε ότι η υπερέκφραση του mRNA της προΤα ήταν περιορισμένη στους νεοπλασματικούς όζους του ηπατικού ιστού και στα καρκινικά κύτταρα που διηθούν τα αιμοφόρα αγγεία (Wu et al., 1997a).

Στον άνθρωπο, τα επίπεδα μεταγραφής του *PTMA* έχουν συσχετιστεί με αυτά του *c-myc* στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Mori et al., 1993) και του ήπατος (Wu et al., 1997b), καθώς και με αυτά του *N-myc* στο νευροβλάστωμα (Sasaki et al., 2001a) (**Πίνακας 1.1**). Αντίθετα, τα υψηλά επίπεδα mRNA της προΤα που ανιχνεύθηκαν στον καρκίνο του πνεύμονα δε συσχετίστηκαν με αυτά του *c-myc*, τα οποία δεν εμφάνισαν αντίστοιχη αύξηση (Sasaki et al., 2001b), υποδηλώνοντας ότι η ταυτόχρονη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των *c-myc* και *PTMA* δεν επάγεται σε όλους τους τύπους καρκίνου. Σε αυτή τη μελέτη, μάλιστα, προτάθηκε το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα της προΤα ως βιοδείκτης, καθώς υψηλές συγκεντρώσεις του mRNA της προΤα συσχετίστηκαν με κακή πρόγνωση. Σημαντικά αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του *PTMA* έχουν βρεθεί και σε βιοψίες ραβδομυοσαρκωμάτων (Carey et al., 2006), αλλά και σε καλά διαφοροποιημένα θυρεοειδικά καρκινώματα, σε αντίθεση με θυρεοειδικά αδενώματα και βρογχοκήλες (Letsas et al., 2007). Στην τελευταία μελέτη κατέστη δυνατή η ανίχνευση των επιπέδων της προΤα σε πολύ μικρά δείγματα βιοψιών με τη βοήθεια μιας μεθόδου με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία που αναπτύχθηκε από τους Letsas και συνεργάτες, οι οποίοι πρότειναν και την πιθανή χρήση της προΤα ως δείκτη πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα των Ojima και συνεργατών, όπου αυξημένα επίπεδα mRNA της προΤα σε καρκινικά κύτταρα του ορθού σχετίστηκαν με την ανθεκτικότητά τους στην ακτινοθεραπεία (Ojima et al., 2007), ανοίγοντας νέες προοπτικές για τη χρήση του πολυπεπτιδίου στην κλινική πρακτική.

Σε επίπεδο πρωτεΐνης, τα αποτελέσματα πολυάριθμων μελετών έδειξαν ότι η προΤα εκφράζεται σαφώς περισσότερο σε επιθετικούς τύπους καρκίνου. Η ερευνητική ομάδα των Tsitsiloni και συνεργατών, χρησιμοποιώντας ραδιοανοσοδοκίμασιες υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας για το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου, έδειξε ότι ιστοί από καρκίνο του μαστού και του εντέρου περιέχουν αυξημένη προΤα σε σύγκριση με γειτονικούς υγιείς ιστούς (Tsitsiloni et al., 1993). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τους Dominguez και συνεργάτες, οι οποίοι ανέφεραν υψηλή συγκέντρωση προΤα σε καρκινικούς ιστούς μαστού, η οποία όταν ξεπερνούσε τα 124 ng/mg, συσχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μετάστασης στους ασθενείς (Dominguez et al., 1993). Όπως αποδείχτηκε στη συνέχεια από τις δύο προαναφερθείσες ερευνητικές ομάδες, τα επίπεδα της προΤα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξαρτώνται από το βαθμό κακοήθειας (grade) του όγκου (Tsitsilonis et al.,

1998) και συσχετίζονται με την πιθανότητα μετάστασης (Tsitsilonis et al., 1998), τη συχνότητα υποτροπής (Magdalena et al., 2000), αλλά και τη συνολική επιβίωση των ασθενών (Tsitsilonis et al., 1998, Magdalena et al., 2000). Έτσι, ασθενείς με χαμηλά ή μέτρια επίπεδα προΤα στον πρωτοπαθή όγκο παρουσίασαν στατιστικά χαμηλότερη συχνότητα υποτροπής και θνησιμότητα, σε σύγκριση με ασθενείς στους όγκους των οποίων ανιχνεύθηκε υψηλή συγκέντρωση προΤα (Magdalena et al., 2000).

Αργότερα, οι Suzuki και συνεργάτες μελέτησαν τα επίπεδα της προΤα κατά την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημείας και ανοσοοστευπώματος. Από τα αποτελέσματα της μελέτης διαπιστώθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων του πολυπεπτιδίου κατά τη μετάπτωση του φυσιολογικού επιθηλίου σε ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και, τελικά, σε αδenoκαρκίνωμα (Suzuki et al., 2006). Διακυμάνσεις των επιπέδων της προΤα παρατηρήθηκαν και σε καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (Tsai et al., 2009, Yamasaki et al., 2012). Με μικροσυστοιχίες διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του μορίου σε καρκινικούς συγκριτικά με γειτονικούς υγιείς ιστούς, ενώ σε όγκους υψηλότερης κακοήθειας τα επίπεδα της προΤα ήταν ακόμη πιο αυξημένα (Tsai et al., 2009). Σε καρκίνο του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος, η παρατηρούμενη υπερέκφραση της προΤα συσχετίστηκε με την πιθανότητα υποτροπής, μόνο, όμως, στις περιπτώσεις που το πολυπεπτίδιο εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων (Jou et al., 2009). Συνολικά τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την πιθανή χρήση της προΤα ως διαγνωστικού δείκτη για τους καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος. Τέλος, υψηλά επίπεδα προΤα έχουν σχετιστεί με επιθετικότερους όγκους και πτωχότερη πρόγνωση σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (Fraga et al., 1993), υποφυσιακούς όγκους (Pawlikowski and Winczyk, 2009) και καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου (Tripathi et al., 2011), αλλά όχι σε καρκίνους του στομάχου (Leys et al., 2007).

Δεδομένου ότι η προΤα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι ένα αμιγώς ενδοκυτταρικό πολυπεπτίδιο, οι πρώτες μελέτες για τη συσχέτισή της με τον καρκίνο είχαν εστιαστεί, κυρίως, στους κακοήθεις όγκους ή/και στα κυτταρικά εκχυλίσματα τους. Αυτές οι αναλύσεις πλεονεκτούν έναντι των υπολοίπων, καθώς μπορούν να ανιχνεύουν τα επίπεδα του περιεχόμενου mRNA ή της πρωτεΐνης άμεσα στα κύτταρα του όγκου, αλλά ταυτόχρονα απαιτούν και επαρκή ποσότητα ιστού η οποία, όμως, δεν είναι πάντα διαθέσιμη.

**Πίνακας 1.1:** Η προθυμοσίνη α ως βιοδείκτης για την πρόγνωση του καρκίνου στον άνθρωπο

Τύπος καρκίνου	Μετρήσεις επιπέδων	Συσχέτιση με	Βιβλιογρ. παραπομπή
Ανώτερου ουροποιητικού συστήματος	πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	Jou et al., 2009
Ήπατος	mRNA/πρωτεΐνη σε ιστούς	Έκφραση του <i>c-myc</i> , κακή πρόγνωση	Wu et al., 1997b, Fraga et al., 1993
Θυρεοειδούς	mRNA σε ιστούς/πρωτεΐνη σε ιστούς και ορό	Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων	Letsas et al., 2007, Kashat et al., 2010
Κεφαλής και τραχήλου	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	Tripathi et al., 2011
Μαστού	Πρωτεΐνη σε ιστούς και ορό	Βαθμό κακοήθειας, υποτροπή, μετάσταση, μειωμένη επιβίωση	Tsitsiloni et al., 1993, Dominguez et al., 1993, Tsitsilonis et al., 1998, Magdalena et al., 2000, Costopoulou et al., 1998
Νευροβλάστωμα Ορθού	mRNA σε ιστούς	Έκφραση του <i>N-myc</i>	Sasaki et al., 2001a
Ουροδόχου κύστης	mRNA σε ιστούς	Αποτελεσματικότητα ακτινοθεραπείας	Ojima et al., 2007
Ουροδόχου κύστης	Πρωτεΐνη σε ιστούς και ούρα	Ανίχνευση και βαθμό κακοήθειας, παρακολούθηση νόσου	Tsai et al., 2009, Yamasaki et al., 2012, Tzai et al., 2006
Παχέος εντέρου	mRNA σε ιστούς	Έκφραση του <i>c-myc</i>	Mori et al., 1993 Tsitsiloni et al., 1993
Πνεύμονα	mRNA σε ιστούς	Κακή πρόγνωση	Sasaki et al., 2001b
Προστάτη	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων, εξέλιξη του όγκου	Suzuki et al., 2006
Ραβδομυοσάρκωμα	mRNA σε ιστούς	-	Carey et al., 2006
Στομάχου	Πρωτεΐνη σε ιστούς	-	Leys et al., 2007
Υπόφυσης	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	Pawlikowski et al., 2009

Ένας καρκινικός βιοδείκτης ποσοτικοποιείται σε βιολογικά υγρά, συνήθως στο αίμα ή/και στα ούρα. Έτσι και η προΤα, σύντομα μετά το χαρακτηρισμό της, ανιχνεύθηκε στο ανθρώπινο αίμα (Panneerselvam et al., 1987) και η παρουσία της αυτή αποδόθηκε είτε σε «διαρροή» της από νεκρά λευκοκύτταρα, είτε σε απελευθέρωσή της από πλούσια σε προΤα κύτταρα, μέσω ενός αγνώστου μέχρι σήμερα μηχανισμού.

Παρ' όλα αυτά, η ανίχνευση προΤα στον ορό ασθενών με καρκίνο έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής μόνο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Costopoulou et al., 1998) και σε ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από καρκίνο του θυρεοειδούς (Kashat et al., 2010). Ωστόσο, σε καμία από τις μελέτες αυτές τα επίπεδα της προΤα στο αίμα δε φάνηκαν να συσχετίζονται με την εξέλιξη ή την πρόγνωση της νόσου.

Αντίθετα, σύμφωνα με τη μελέτη των Tzai και συνεργατών, τα επίπεδα της προΤα στα ούρα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμο βιοδείκτη ανίχνευσης και παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου (Tzai et al., 2006). Τα επίπεδα της προΤα εκτιμήθηκαν σε δείγματα ούρων που ελήφθησαν από υγιείς δότες, ασθενείς με λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος ή ασθενείς με χαμηλής ή υψηλής διαφοροποίησης όγκους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι η προΤα στα ούρα ήταν: (α) υψηλότερη στους ασθενείς που διαγνώστηκαν σχετικά πρόσφατα με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, (β) χαμηλότερη στους ασθενείς με υψηλής διαφοροποίησης όγκους σε σχέση με ασθενείς με χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο της ουροδόχου κύστης, και (γ) κατά τη διάρκεια τρίμηνης παρακολούθησης, τα επίπεδα της προΤα στα ούρα αυξάνονταν σε περιπτώσεις παρουσίας υπολειμματικής νόσου ή υποτροπής μετά τη θεραπεία.

Συνολικά, τα ευρήματα των προαναφερθέντων μελετών καταδεικνύουν τη δυνατότητα της προΤα να χρησιμοποιηθεί ως ένας νέος βιοδείκτης στην κλινική για τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του θυρεοειδούς και ιδιαίτερα για τους καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων και των καρκίνων του προστάτη και της ουροδόχου κύστεως.

### 1.5. Η προθυμοσίνη α ως ανοσοθεραπευτικό μόριο

Πέραν του ενδοκυτταρικού της ρόλου, η προΤα δρα και εξωκυτταρικά ενισχύοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Έτσι, σχετικά σύντομα μετά την απομόνωσή της, μελετήθηκε και η πιθανή αντικαρκινική της δράση (**Πίνακας 1.2**).

Τα πρώτα αποτελέσματα για τη αντικαρκινική δράση της προΤα αναφέρθηκαν σε μία σειρά *in vivo* μελετών σε ένα επιθετικό πειραματικό μοντέλο όγκου σε ποντίκια. Συγκεκριμένα, η χορήγηση προΤα σε DBA/2 ποντίκια (σε δόση 300 ng ανά ζώο για τρεις εβδομάδες) πριν τη χορήγηση των συγγενικών λευχαιμικών κυττάρων L1210, καθυστέρησε το χρονικό διάστημα ανάπτυξης του ασκίτη και επιμήκυνε την επιβίωση ενός σημαντικού ποσοστού (40-60%) των πειραματοζώων κατά 60 περίπου ημέρες σε σχέση με τα ζώα-μάρτυρες (Papanastasiou et al., 1992). Η *ex vivo* ανάλυση των περιτοναϊκών μακροφάγων των ποντικών που έλαβαν προΤα, έδειξε ότι τα κύτταρα αυτά παρήγαγαν 6-7 φορές υψηλότερα επίπεδα TNF-α, ενώ παράλληλα ήταν έντονα κυτταροτοξικά έναντι κυτταρικών σειρών, ευαίσθητων αλλά και ανθεκτικών στη λύση από TNF-α (Papanastasiou et al., 1992). Επόμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο ίδιο *in vivo* μοντέλο, έδειξε ότι τα σπληνοκύτταρα ποντικών που έλαβαν προΤα παρουσίασαν *ex vivo* αυξημένη κυτταροτοξικότητα έναντι στόχων ευαίσθητων και μη σε λύση από NK κύτταρα, αλλά και εναντίον των συγγενικών λευχαιμικών κυττάρων και η παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα συσχετίστηκε με αυξημένα ποσοστά ενεργοποιημένων και ισχυρά λυτικών NK και T κυττάρων (Baxevanis et al., 1994). Επιπλέον, *in vitro* διέγερση σπληνοκυττάρων με προΤα οδήγησε στην παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων TNF-α και IL-2 στις καλλιέργειες, η οποία πιθανά επάγεται και *in vivo* και μεσολαβεί, με έναν έμμεσο τρόπο, την ενίσχυση των κυτταροτοξικών απαντήσεων (Baxevanis et al., 1994). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη χορήγηση προΤα και λευχαιμικών κυττάρων στα ποντίκια προκαλούσε την παραγωγή και ογκοειδικών T κυτταροτοξικών κυττάρων (CTLs), τα οποία στόχευαν και έλυαν ειδικά τα λευχαιμικά κύτταρα. Τα ζώα αυτά συνεπώς, ανέπτυσαν τόσο μη περιορισμένη από τα MHC μόρια (NK και LAK) όσο και περιορισμένη από τα MHC μόρια (CTLs) κυτταροτοξικότητα, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν για μεγαλύτερο διάστημα (Baxevanis et al., 1995).

Η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης της προΤα δεν περιορίστηκε μόνο σε *in vivo* μοντέλα ζώων, αλλά δοκιμάστηκε και σε *in vitro* καλλιέργειες λεμφοκυττάρων

καρκινοπαθών. Δεδομένου ότι τα λεμφοκύτταρα των καρκινοπαθών παρουσιάζουν μειωμένη κυτταροτοξική δράση και χαμηλή παραγωγή κυτταροκινών, αρχικά ελέγχθηκε *in vitro* η ικανότητα της προΤα να επαναφέρει τις ανεπαρκείς αυτές αποκρίσεις στα φυσιολογικά επίπεδα. Πράγματι, η προΤα ενίσχυσε την κυτταροτοξική αντίδραση (CML) και τη δραστικότητα των NK κυττάρων, οι οποίες λόγω της νόσου, είναι ιδιαίτερα χαμηλές σε ασθενείς με προχωρημένες κακοήθειες. Το φαινόμενο αυτό σχετίστηκε με τη μείωση της παραγωγής της ανοσοκατασταλτικής προσταγλανδίνης E2 (prostaglandin E2, PGE2) και την αύξηση της παραγωγής της ανοσοενισχυτικής IL-2 από τα λεμφοκύτταρα των καρκινοπαθών παρουσία προΤα, υποδεικνύοντας ότι το πολυπεπτίδιο είναι ικανό να αποκαθιστά, μερικώς ή και πλήρως, τις ανοσοανεπάρκειες που προκαλούνται από τον καρκίνο (Baxevanis et al., 1993).

Η προΤα ήταν, επίσης, ικανή να αποκαταστήσει μερικώς τη λειτουργικότητα των μονοκυττάρων από ασθενείς με μελάνωμα (Garbin et al., 1994). Αναλυτικότερα, μονοκύτταρα ασθενών με μελάνωμα που είχαν επωαστεί με προΤα ή το συνδυασμό προΤα και IFN- $\gamma$ , παρεμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό των SK-MEL-28 μελανωματικών κυττάρων *in vitro*. Επιπλέον, το πολυπεπτίδιο αποκατέστησε μερικώς και τη μειωμένη LAK κυτταροτοξικότητα και την έκκριση IL-2 από τα λεμφοκύτταρα ασθενών με μελάνωμα, αλλά η ενίσχυση αυτή εξαρτιόταν από το στάδιο της νόσου, καθώς κύτταρα ασθενών με μελάνωμα σε πρώιμα στάδια ανταποκρίθηκαν καλύτερα στην επίδραση με προΤα (Eckert et al., 1995). Αντίστοιχα, η προΤα σε συνεργιστική δράση με την IL-2 κατάφερε να ενισχύσει τη LAK κυτταροτοξικότητα λεμφοκυττάρων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, μόνο όταν οι ασθενείς βρίσκονταν στα αρχικά στάδια της νόσου (Eckert et al., 1997a, Garbin et al., 1997, Eckert et al., 1997b). Η προΤα και η IL-2 αύξησαν την έκφραση των επιφανειακών μορίων CD56, CD16/56 στα NK κύτταρα, των CD3/16/56 στα NK-τύπου T κύτταρα και των CD25, CD18 και CD11a στα λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, επίδραση της προΤα σε συνδυασμό ή όχι με την IFN- $\gamma$  σε μονοκύτταρα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου αύξησε την αντικαρκινική δράση τους έναντι των καρκινικών κυττάρων SW620 και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$ ) και μείωσε τις συγκεντρώσεις του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (transforming growth factor, TGF)- $\beta$  και της PGE2 στα υπερκείμενα των καλλιέργειών (Garbin et al., 1997, Eckert et al., 1997b). Συνολικά, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το πολυπεπτίδιο μπορεί να αποκαθιστά εν μέρει τις μειωμένες λειτουργίες των λεμφοκυττάρων, ενισχύοντας μερικές από τις βασικές λειτουργίες των



**Πίνακας 1.2:** Η προθυμοσίνη α ως ανοσοθεραπευτικό εργαλείο

<b>Τύπος Καρκίνου</b> <i>In vitro</i> (ανθρώπινα κύτταρα)	<b>Συνέργεια</b> με	<b>Επίδραση</b>	<b>Βιβλιογρ.</b> παραπομπή
Διάφοροι όγκοι	-	Αποκατάσταση CML και NK δραστικότητας, αύξηση παραγωγής IL-2, ελάττωση παραγωγής PGE2	Baxevanis et al., 1993, Voutsas et al., 2000
	IL-2	Αύξηση πολλαπλασιασμού CD4+ T λεμφοκυττάρων, ανάπτυξη ογκοειδικών CTLs	
Μαστού	Αντι-CD3	Βελτίωση NK και T κυτταροτοξικότητας	Baxevanis et al., 1999,
	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	Heidecke et al., 1997 Samara et al., 2013a
	-	Αύξηση φαγοκυττάρωσης, οξειδωτικής έκκρισης και κυτταροτοξικότητας ουδετερόφιλων	
Μελάνωμα	±IFN-γ	Ενίσχυση κυτταροτοξικότητας	Garbin et al., 1994,
	IL-2	Αποκατάσταση LAK δραστικότητας	Eckert et al., 1995
	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	Heidecke et al., 1997
Παχέος εντέρου	±IFN-γ	Ελάττωση παραγωγής TGF-β και PGE2, αύξηση παραγωγής IL-1β και TNF-α από μονοκύτταρα, αύξηση της επαγόμενης από μονοκύτταρα κυτταροτοξικότητας	Eckert et al., 1997a, Garbin et al., 1997, Eckert et al., 1997b, Heidecke et al., 1997
	IL-2	Ενίσχυση LAK δραστικότητας, αύξηση έκφρασης επιφανειακών μορίων ενεργοποίησης σε NK, NKT και T λεμφοκύτταρα	
	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	
Πνεύμονα	Αντι-CD3	Βελτίωση κυτταροτοξικότητας	Baxevanis et al., 1999
Ωοθηκών	Αντι-CD3	Βελτίωση κυτταροτοξικότητας	Baxevanis et al., 1999
<b><i>In vivo</i> (ποντίκια)</b>			
Λευχαιμία	-	Επιμήκυνση επιβίωσης, ενίσχυση NK και επαγωγή LAK δραστικότητας σε λεμφοκύτταρα, αύξηση παραγωγής TNF-α, επαγωγή ογκολυτικής δραστικότητας από περιτοναϊκά κύτταρα, έκπτυξη ογκοειδικών T λεμφοκυττάρων	Papanastasiou et al 1992, Baxevanis et al., 1994, Baxevanis et al., 1995

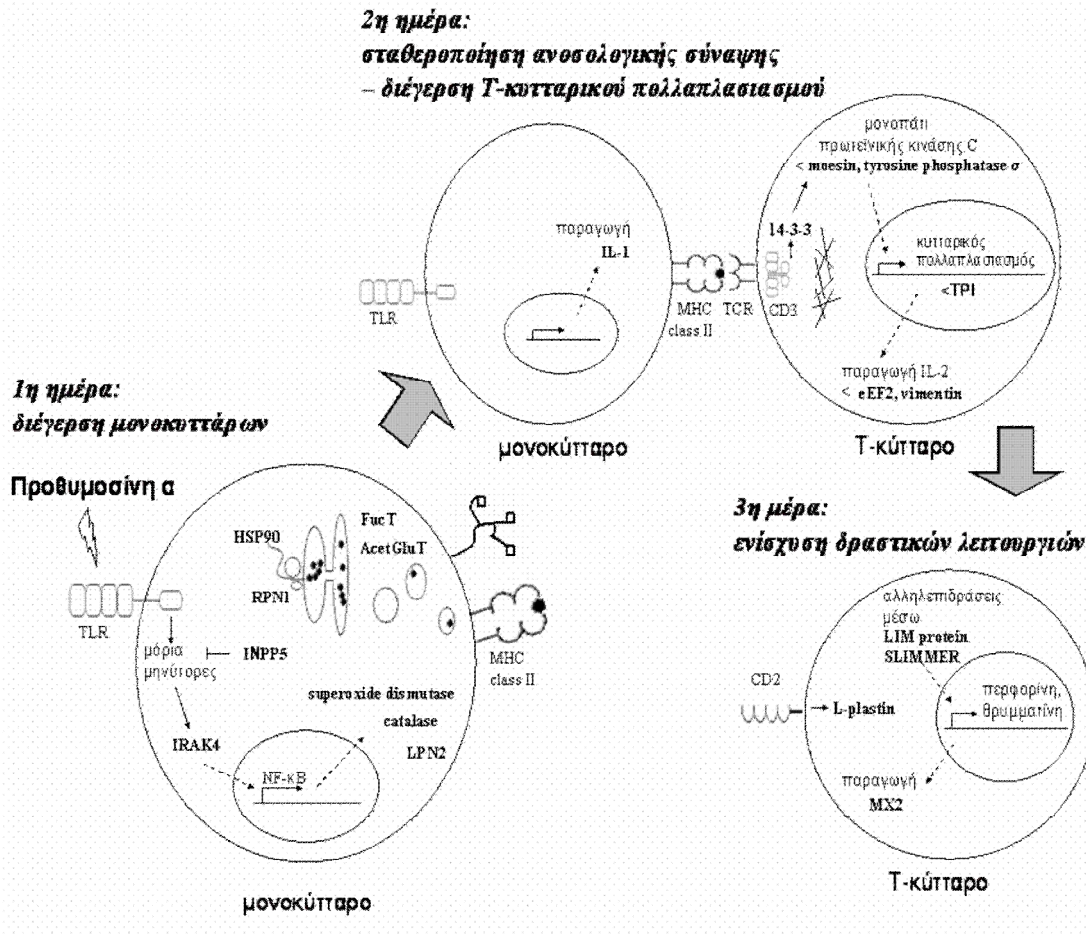
μονοκυττάρων, μόνο στις περιπτώσεις όμως που τα κύτταρα αυτά προέρχονται από ασθενείς με καρκίνους χαμηλής κακοήθειας και η παρατηρούμενη ανοσοκαταστολή είναι ήπιου βαθμού.

Ο συνδυασμός προΤα και αντι-CD3 μονοκλωνικού αντισώματος, το οποίο ενισχύει την έκπτυξη μη MHC-περιοριζόμενων κυτταροτοξικών πληθυσμών, γνωστών ως αντι-CD3-ενεργοποιημένων φονικών (anti-CD3-activated killer, AAK) κυττάρων, αύξησε την AAK κυτταροτοξικότητα μονοπύρηνων περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), απομονωμένων από ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, των ωοθηκών και του πνεύμονα (Baxevanis et al., 1999). Στα πλαίσια της μελέτης αυτής η προΤα ενίσχυσε τη μη MHC- και την MHC-περιοριζόμενη λύση καρκινικών στόχων Daudi, αλλά και αυτόλογων καρκινικών κυττάρων, αντίστοιχα, μέσω αύξησης της έκφρασης επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, της παραγωγής κυτταροκινών (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) και των επιπέδων περφορίνης. Αντίστοιχα, συνεργιστική δράση προΤα και IL-2 ενίσχυσε την ανάπτυξη ογκοειδικών κυτταροτοξικών T κυττάρων έναντι αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (Voutsas et al., 2000). Στη μελέτη αυτή, PBMCs ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου καλλιεργήθηκαν παρουσία αυτόλογων καρκινικών κυττάρων, προΤα ή/και IL-2. Η συνεργιστική δράση των δύο παραγόντων αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων και την παραγωγή έντονα κυτταροτοξικών ογκοειδικών CTLs. Ωστόσο η ανάπτυξη αυτών των CTLs απαιτούσε την ταυτόχρονη παρουσία στην ίδια καλλιέργεια και CD4<sup>+</sup> T κυττάρων και μονοκυττάρων. Η απουσία ενός από τους δύο υποπληθυσμούς ή η απουσία αντιγόνου οδηγούσε σε μείωση τόσο του ρυθμού πολλαπλασιασμού, όσο και της κυτταροτοξικής δράσης των T κυττάρων. Επομένως, έγινε σαφές πως για να εκδηλωθεί η ευεργετική επίδραση της προΤα απαιτείται η παρουσία τόσο των βοηθητικών T κυττάρων, όσο και των αντιγονοπαρουσιαστικών μονοκύτταρων, διαλευκάνοντας σε ένα ποσοστό τον τρόπο δράσης της προΤα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, οι Skopeliti και συνεργάτες διερεύνησαν τις ενδοκυτταρικές αλλαγές που επάγονται σε ολικά PBMCs μετά από διέγερσή τους με προΤα για 3 ημέρες. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της πρωτεομικής που επιτρέπει την ταυτόχρονη αναγνώριση αλλαγών στις εκφραζόμενες πρωτεΐνες, αναλύθηκαν οι πρωτεΐνες από μονοπύρηνια φυσιολογικών δοτών και καρκινοπαθών και έτσι σκιαγραφήθηκε για πρώτη φορά το μοντέλο δράσης της προΤα (Skopeliti et al., 2007). Το σημαντικότερο στοιχείο που αποκαλύφθηκε ήταν ότι η ενεργοποίηση των

μονοκυττάρων με την προΤα επάγεται καταρροϊκά των TLRs, καθώς τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης IRAK-4 που συμμετέχει στα μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης των υποδοχέων αυτών, βρέθηκαν αυξημένα. Έτσι, λοιπόν, προτάθηκε ότι η προΤα αρχικά διεγείρει τα μονοκύτταρα μέσω πρόσδεσής της σε TLRs. Στη συνέχεια τα μονοκύτταρα υπερεκφράζουν MHC μόρια τάξης II στην επιφάνεια τους ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση και τη σύναψή τους με τα T λεμφοκύτταρα και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1). Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα παράγουν IL-2 και πολλαπλασιάζονται έντονα, εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων προσκόλλησης (CD2) και ενδοκυτταρικών κυτταρολυτικών μορίων (περφορίνη), με αποτέλεσμα τη γενικότερη ενίσχυση της κυτταροτοξικής τους δράσης (Skoreliti et al., 2007, **Εικόνα 1.6.**). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν αργότερα από τους Mosoian και συνεργάτες που έδειξαν ότι πράγματι η προΤα σηματοδοτεί μέσω του TLR-4 σε μακροφάγα ποντικού (Mosoian et al., 2010).

Στα πλαίσια της μελέτης της επίδρασης της προΤα σε διάφορους πληθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, διερευνήθηκε και η ικανότητα του πολυπεπτιδίου να ενισχύει τις λειτουργίες των πολυμορφοπύρηνων (polymorphonuclear cells, PMNs) του περιφερικού αίματος, που αποτελούν και τον πολυπληθέστερο υποπληθυσμό λευκοκυττάρων. Σε PMNs απομονωμένα από ασθενείς με μελάνωμα και από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και του παχέος εντέρου, η προΤα ενίσχυσε τη χημειοταξία και τις οξειδωτικές αποκρίσεις, αλλά και την κυτταροτοξική τους ικανότητα εναντίον των καρκινικών κυττάρων HCT-116 (Heidecke et al., 1997). Τέλος, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, επίδραση με προΤα σε ουδετερόφιλα περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού οδήγησε σε αύξηση της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας, της απελευθέρωσης ενεργών ριζών οξυγόνου από αυτά, αλλά και της κυτταροτοξικότητάς τους εναντίον καρκινικών κυττάρων (Samara et al., 2013a).



**Εικόνα 1.6.** Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μοντέλου της ανοσολογικής δράσης της προΤα, όπως σκιαγραφήθηκε από τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης σε PBMCs. Η προΤα αρχικά διεγείρει τα μονοκύτταρα καταρροϊκά των TLRs και μέσω της κινάσης IRAK-4 επάγει την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από τον NF-κB. Ως αποτέλεσμα, τα μονοκύτταρα αυξάνουν το αντιγονοπαρουσιαστικό τους δυναμικό μέσω υπερέκφρασης των MHC μορίων τάξης II στην επιφάνεια τους και έτσι ενισχύεται η σύναψή τους με τα T λεμφοκύτταρα, ενώ παράλληλα παράγουν και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1). Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκκρίνουν IL-2 η οποία επάγει των πολλαπλασιασμό τους και εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων προσκόλλησης, όπως εντεγκρίνης CD2, αλλά και περφορίνης, με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση της κυτταροτοξικής τους δράσης (ανατύπωση από Σκοπελίτη 2008, Διδακτορική Διατριβή).

### **1.6. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) αποτελεί το ανοσοδραστικό κέντρο της προθυμοσίνης α**

Αντίστοιχα με άλλα μέλη των β-θυμοσινών, (Hannappel and Huff, 2003), διαφορετικά τμήματα της προΤα χαρακτηρίζονται και από διαφορετικές εξωκυτταρικές δράσεις (**Πίνακας 1.3, Εικόνα 1.7**).

Αναλυτικότερα, έχει ήδη αναφερθεί ότι η προΤα αποτελεί το πρόδρομο μόριο της Τα1, η αλληλουχία της οποίας εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της προΤα, μεταξύ των αμινοξέων 1-28 (Haritos et al., 1984a). Η Τα1 παρουσιάζει επίσης ανοσορυθμιστικό ρόλο, στα πλαίσια του οποίου μπορεί να ενεργοποιεί δενδριτικά κύτταρα, ενώ παράλληλα διαθέτει αντικαρκινική, αντική και αντιμυκητιασική δράση (Goldstein, 2007). Επιπλέον, η προΤα αποτελεί πρόδρομο μόριο μίας ακόμα α-θυμοσίνης, της θυμοσίνης α-11 (Τα11). Η αλληλουχία της Τα11 είναι μεγαλύτερη της Τα1 κατά 7 αμινοξέα και αντιστοιχεί στο τμήμα 1-35 της προΤα [προΤα(1-35)] (Hannappel and Huff, 2003). Αντίστοιχα με την Τα1, η Τα11 παρουσιάζει αντιμυκητιασική δράση (Hannappel and Huff, 2003).

Εστιάζοντας στο κεντρικό τμήμα της αλληλουχίας της προΤα, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το πεπτίδιο προΤα(49-78) χαρακτηρίζεται από νευροπροστατευτική δράση (Halder et al., 2013a), η οποία μάλιστα οφείλεται κατά κύριο λόγο στο εννεαπεπτίδιο προΤα(52-60) (Halder et al., 2013b). Προστατευτική δράση αναφέρθηκε ότι διαθέτει και ένα άλλο τμήμα της προΤα, το προΤα(1-100) ή αλλιώς προΤα(Δ101-111), καθώς είναι ικανό να αυξάνει την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων κατά τη διάρκεια ισχαιμίας (Cannavo et al., 2013). Επιπλέον, επίσης πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το τμήμα προΤα(50-89) έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση του ιού HIV-1, μέσω επαγωγής της παραγωγής IFN τύπου I από ανθρώπινα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα (Mosoian et al., 2010).

Τέλος, ερευνητικές προσπάθειες των Skopeliti και συνεργατών ταυτοποίησαν το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) ως το τμήμα του μορίου που συγκεντρώνει το ανοσορυθμιστικό δυναμικό της προΤα (Skopeliti et al., 2009). Αναλυτικότερα, στα πλαίσια των μελετών αυτών διερευνήθηκε αρχικά η ενεργότητα τρυπτικών θραυσμάτων του πολυπεπτιδίου *in vitro*, όπου τη μεγαλύτερη ανοσοενισχυτική ικανότητα έδειξαν τμήματα του καρβοξυτελικού άκρου της προΤα και συγκεκριμένα τα θραύσματα 89-102 και 102-109 (Skopeliti et al., 2006). Για την ακριβή ταυτοποίηση της

**Πίνακας 1.3.** Πεπτίδια της προΤα με γνωστή εξωκυτταρική δράση

Τμήμα αμινοξικής αλληλουχίας/ Ονοματολογία	Δράση	Βιβλιογρ. παραπομπή
προΤα(1-28)/Τα1	Ανοσορυθμιστική, αντικαρκινική, αντική, αντιμυκητιασική, ενεργοποίηση δενδριτικών κυττάρων	Goldstein, 2007
προΤα(1-35)/Τα11	Αντιμυκητιασική	Goldstein, 2007
προΤα (49-78) προΤα(52-60)	Νευροπροστατευτική	Halder et al., 2013a, Halder et al., 2013b
προΤα(50-89)	Αντι-HIV-1	Mosoian et al., 2010
προΤα(100-109)	Ανοσορυθμιστική, αντικαρκινική, ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων, ενίσχυση φαγοκυττάρωσης, οξειδωτικής έκρηξης και κυτταροτοξικότητας ουδετερόφιλων	Skopeliti et al., 2009, Samara et al., 2013a, Voutsas et al., 2013
προΤα(1-100)/προΤα(Δ101-111)	Καρδιοπροστατευτική	Cannavo et al., 2013

ανοσοδραστικής περιοχής της προΤα, συντέθηκαν πεπτίδια με συνεχείς, αμινοτελικά επεκτεινόμενες κατά ένα αμινοξικό κατάλοιπο αλληλουχίες, που κάλυπταν την περιοχή 89-109. Τα συνθετικά αυτά πεπτίδια ελέγχθηκαν παράλληλα με το ακέραιο μόριο ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν την αυτόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση και την κυτταροτοξικότητα των PBMCs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), με αμινοξική αλληλουχία TKKQKTDEDD, είναι υπεύθυνο για την ανοσοτροποποιητική δράση της προΤα, καθώς ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά του ακέραιου μορίου (Skopeliti et al., 2009). Επιπλέον, δείχθηκε ότι το δεκαπεπτίδιο αυτό επάγει *in vitro* την ωρίμανση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων, αποκτά διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου και η ανοσοδραστικότητά του ήταν ειδική για την αλληλουχία του (Skopeliti et al., 2009).

Σε πρόσφατη έρευνα των Samara και συνεργατών μελετήθηκε η επίδραση του προΤα(100-109) στην ενεργοποίηση ουδετερόφιλων υγιών δοτών και ασθενών με καρκίνο του μαστού (Samara et al., 2013a). Διέγερση με προΤα(100-109) ενίσχυσε τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την παραγωγή και απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου ουδετερόφιλων ασθενών με καρκίνο του μαστού, ενώ ιδιαίτερης σημασίας

ήταν η ικανότητα του προΤα(100-109) να αυξάνει και την κυτταροτοξική τους ικανότητα έναντι καρκινικών κυττάρων. Η δράση του αποδείχθηκε ότι ήταν, και πάλι, ειδική για την αλληλουχία του και αντίστοιχη με αυτή της προΤα.

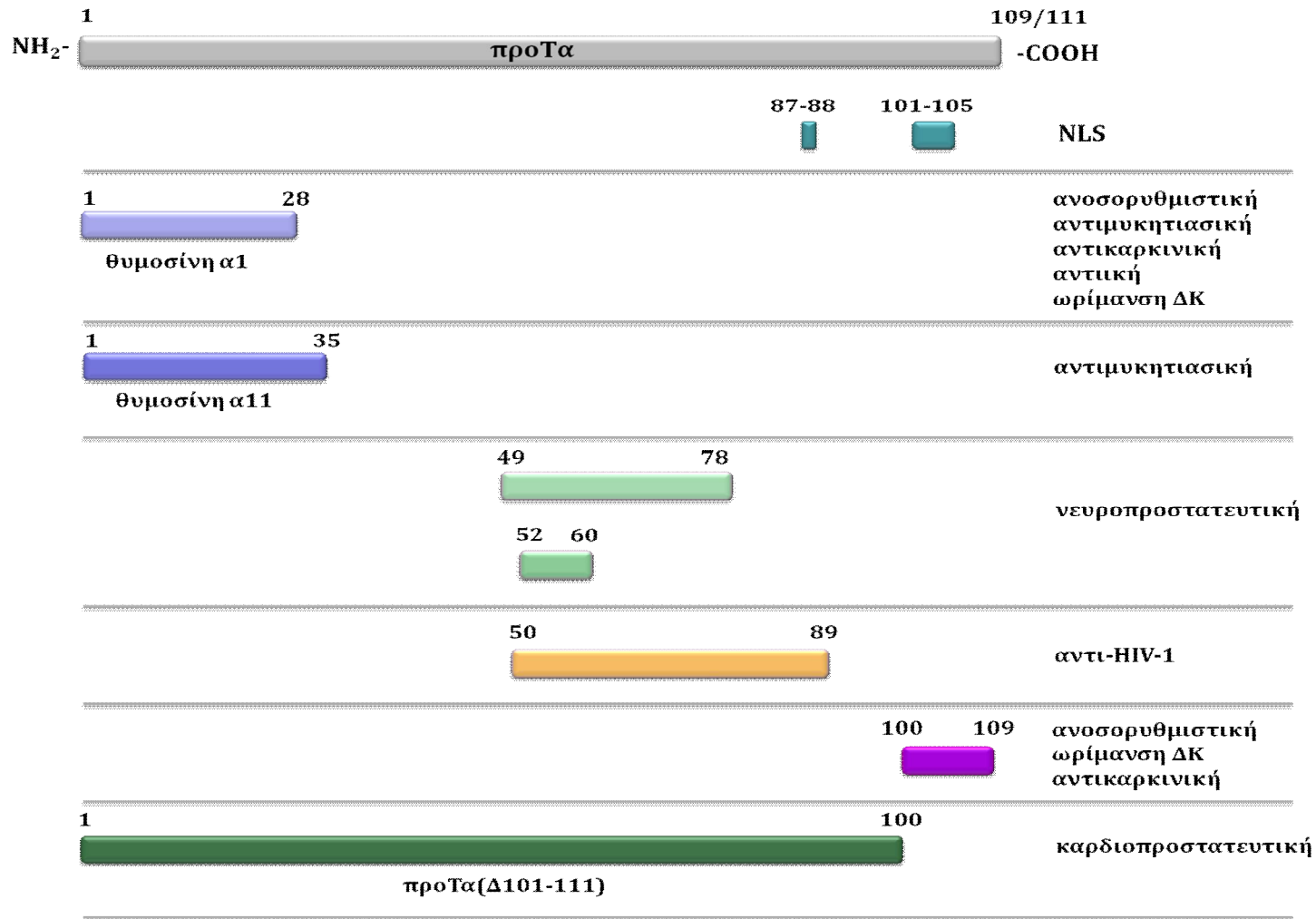
Στην επίσης πρόσφατη έρευνα των Voutsas και συνεργατών, μελετήθηκε η επίδραση της προΤα και του προΤα(100-109) σε λεμφοκύτταρα απομονωμένα από ασκίτικο υγρό ασθενών με καρκίνο των ωθηκών (tumor-associated lymphocytes, TALs) (Voutsas et al., 2013). Τα TALs εμφανίζουν μειωμένη δραστικότητα εξαιτίας της ενδογενούς ανοσοκαταστολής που υφίστανται στο περιβάλλον του ασκίτη και για το λόγο αυτό η ενίσχυση της κυτταροτοξικής τους ικανότητας είναι ιδιαίτερης κλινικής σημασίας. Η *in vitro* καλλιέργεια των TALs παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) οδήγησε στη βελτίωση της κυτταροτοξικής τους δράσης έναντι και των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Τα *ex vivo* ενεργοποιημένα με προΤα ή προΤα(100-109) TALs χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID), τα οποία είχαν ενοφθαλμιστεί με καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από το ασκίτικο υγρό των ίδιων ασθενών. Τα ζώα που έλαβαν θεραπευτικά τα αυτόλογα με τον όγκο και ενεργοποιημένα με τα πεπτίδια TALs παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης των όγκων και παρατεταμένη επιβίωση συγκριτικά με τα ζώα-μάρτυρες, υποδεικνύοντας την ικανότητα της προΤα και του προΤα(100-109) να επάγουν ανοσοενισχυτική δράση και *in vivo*.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί τουλάχιστον μία συνθήκη παραγωγής του πεπτιδίου προΤα(100-109) σε συνθήκες κυτταρικού θανάτου. Συγκεκριμένα, ένα πρώιμο γεγονός κατά την πρόοδο της απόπτωσης είναι η πέψη της προΤα από τις ενεργοποιημένες κασπάσες 3 και 7 στο ασπαρτικό οξύ (D)<sup>99</sup> (Evstafieva et al., 2000). Έτσι παράγονται δύο τμήματα, το υπολειπόμενο (truncated) ως προς το καρβοξυτελικό άκρο πολυπεπτίδιο προΤα(1-99) και το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109). Αποτέλεσμα της θραυσματοποίησης αυτής είναι ότι το υπολειπόμενο προΤα(1-99) δε φέρει στην αλληλουχία το κύριο τμήμα του NLS (<sup>100</sup>TKKQKT<sup>105</sup>), και έτσι αναστέλλεται η μετακίνησή του στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα (Evstafieva et al., 2000; Evstafieva et al., 2003). Αυτή η «απομάκρυνση» της προΤα από τον πυρήνα, φαίνεται να είναι καίριας σημασίας γιατί αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό νωρίς κατά την πρόοδο της απόπτωσης και οδηγεί το κύτταρο μη αναστρέψιμα σε θάνατο (Evstafieva et al., 2000). Ωστόσο, μελέτη σε κύτταρα HeLa έδειξε ότι τα αυξανόμενα επίπεδα του προΤα(1-99) στο κυτταρόπλασμα κατά την

απόπτωση, επιτρέπουν στο υπολειπόμενο πολυπεπτίδιο να ανταγωνίζεται με τον Araf-1 για τη δέσμευση του κυτοχρώματος c, αναστέλλοντας την απόπτωση τουλάχιστον στα αρχικά στάδια (Markova et al., 2003). Επιπλέον, το υπολειπόμενο πολυπεπτίδιο, φαίνεται να αποτελεί εκτός από κυτταροπλασματικό, και μεμβρανικό δείκτη των αποπτωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι μετά από επαγωγή απόπτωσης σε κύτταρα HeLa, το τμήμα προΤα(52-89), μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού, εντοπίζεται εκλεκτικά στην κυτταρική επιφάνεια των αποπτωτικών και όχι των φυσιολογικών κυττάρων, όπου πιθανά δρα ως σήμα φαγοκυττάρωσης/ενδοκυττάρωσης («eat me» signal) των αποπτωτικών κυττάρων (Evstafieva et al., 2003).

Αντιθέτως, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) δεν έχει ανιχνευθεί μέχρι στιγμής στο εσωτερικό του κυττάρου, είτε γιατί υπόκειται σε περαιτέρω πέψη από ενεργοποιημένες πεπτιδάσες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανιχνευθεί, είτε γιατί εξωκυτταρώνεται με έναν άγνωστο, ως τώρα μηχανισμό.





**Εικόνα 1.7.** Τμήματα της αλληλουχίας της προΤα χαρακτηρίζονται από διαφορετική εξωκυτταρική δράση. Πεπτίδια εκτεινόμενα στο αμινοτελικό, κεντρικό και καρβοξυτελικό τμήμα της προΤα χαρακτηρίζονται από πλειοτροπικές διακριτές εξωκυτταρικές λειτουργίες που αναφέρονται στο δεξί τμήμα της εικόνας. Οι αριθμοί υποδεικνύουν το αρχικό και τελικό αμινοξικό κατάλοιπο. NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού, ΔΚ: δενδριτικά κύτταρα.



## 1.7. Σκοπός

Η προΤα είναι ένα πολυπεπτίδιο στο οποίο έχει αποδοθεί ένας διττός ρόλος, σύμφωνα με τον οποίο ενδοκυτταρικά ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εξωκυτταρικά επάγει και ενισχύει τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Επιπλέον, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, η προΤα σηματοδοτεί μέσω του TLR-4 σε μακροφάγα ποντικού, ενώ τόσο αυτή, όσο και το ανοσοδραστικό της τμήμα προΤα(100-109) επάγουν τη φαινοτυπική ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων, που συνιστούν τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της προΤα και του προΤα(100-109) να δρουν ως ανοσοενισχυτικά μόρια (adjuvants) ενεργοποιώντας δενδριτικά κύτταρα, εστιάζοντας:

- I. Στην αναγνώριση του υποδοχέα, αλλά και των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται καταρροϊκά αυτού και μεσολαβούν τη δράση της προΤα και του δεκαπεπτιδίου της προΤα(100-109) σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα,
- II. Στη μελέτη του φαινοτύπου, αλλά κυρίως της λειτουργικότητας των δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) και του τύπου των T κυτταρικών ανοσοαπαντήσεων που επάγουν *in vitro*,
- III. Στη διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης της προΤα και του προΤα(100-109) σε ένα *in vivo* μοντέλο μελανώματος σε ποντίκια και στον *ex vivo* έλεγχο των επαγόμενων από τα δύο πεπτίδια ανοσολογικών απαντήσεων, και
- IV. Στην προσπάθεια συσχέτισης των δύο διακριτών ρόλων (ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού) της προΤα και τη μελέτη της πιθανότητας το ακέραιο μόριο ή/και το ανοσοδραστικό δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) να δρουν εξωκυτταρικά ως «σήματα κινδύνου».

Η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της προΤα και του προΤα(100-109), καθώς και η μελέτη του τύπου των ανοσοαπαντήσεων που επάγουν τα δύο μόρια *in vitro* και *in vivo*, θα βοηθήσουν στην πιθανή χρήση τους, μελλοντικά, ως ανοσοενισχυτικά μόρια, σε κλινικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου που βασίζονται στον εμβολιασμό με πεπτιδικά αντιγόνα



# 2

## ΜΕΘΟΔΟΙ

*Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν αναλυτικά οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, όπως επίσης και τα αναλώσιμα, όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μέθοδο.*

**Βασικά αναλώσιμα και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην πλειοψηφία των μεθόδων**

- Πιπέττες μεταβλητού όγκου Pipetman (Gilson Inc, WI, USA)
- Ρύγχη πιπετών τύπου Gilson 10, 20, 1000  $\mu$ L (Greiner, Bio-one, Germany)
- Πλαστικές πιπέττες 1, 2, 5, 10, 25 mL (Greiner, Bio-one)
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης τύπου falcon 15, 50 mL (Greiner, Bio-one)
- Επωαστικός κλίβανος σε θερμοκρασία 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo Electric Co, Japan)
- Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (Jouan, DJB Labcare, UK)

## 2.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος

Τα μονοπύρηννα κύτταρα (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) μπορούν να απομονωθούν από ολικό περιφερικό αίμα σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία. Το δείγμα αίματος φυγοκεντρείται σε διάλυμα πολυσακχαρίτη και διατριζοϊκού νατρίου με τελική πυκνότητα 1,077 g/mL. Η διαφορική μετακίνηση των κυτταρικών υποπληθυσμών κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης, λόγω της διαφορετικής τους πολυπλοκότητας, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό στοιβάδων, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων. Στον πυθμένα του σωλήνα συγκεντρώνονται τα ερυθροκύτταρα, τα οποία συγκολλούνται παρουσία του πολυσακχαρίτη, και τα κοκκιοκύτταρα, τα οποία λόγω της υψηλής πυκνότητάς τους διαπερνούν το διάλυμα. Λόγω της χαμηλότερης πυκνότητάς τους, τα μονοπύρηννα εντοπίζονται στην επιφάνεια του διαλύματος του πολυσακχαρίτη, μαζί με τα αιμοπετάλια. Η στοιβάδα των μονοπύρηνων συλλέγεται και υπόκειται σε διαδικασία έκπλυσης (με 3 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις) για την τελική απομάκρυνση του πλάσματος, των αιμοπεταλίων, αλλά και του τοξικού πολυσακχαρίτη, έτσι ώστε να προκύψει ένα καθαρό κυτταρικό εναιώρημα έτοιμο για καλλιέργεια.

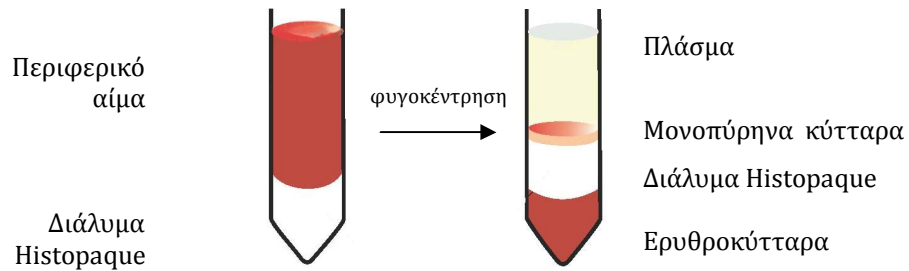
### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Δείγμα αίματος συλλεγμένο σε σωλήνα ή σε ασκό αιμοδοσίας με αντιπηκτικό
- Διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων Histopaque (Lonza, Germany)
- Πρότυπο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's, χωρίς  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  (DPBS) (Lonza)
- Πλαστικές πιπέττες pasteur (Greiner, Bio-One)

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Υπό στείρες συνθήκες, τοποθετούμε σε σωλήνα falcon, 10 mL διαλύματος διαχωρισμού λεμφοκυττάρων ώσπου να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.
2. Επιστοιβάζουμε αργά και προσεκτικά (χωρίς να αναμείξουμε) 10-20 mL αίματος, κρατώντας το σωλήνα ελαφρά κεκλιμένο.
3. Φυγοκεντρούμε το σωλήνα στα 700xg για 30 λεπτά, χωρίς φρένο στη φάση της επιβράδυνσης.
4. Μετά τη φυγοκέντρηση, διακρίνουμε τέσσερις ζώνες-στοιβάδες (**Εικόνα 2.1**) στο σωλήνα, με τα μονοπύρηννα να περιέχονται στη δεύτερη (από επάνω προς τα κάτω), υπόλευκη στοιβάδα. Με πιπέττα pasteur απομακρύνουμε και αποχύνουμε την περίσσεια του πλάσματος, μέχρι περίπου 0,5 εκατοστό από τη στοιβάδα των μονοπύρηνων.
5. Με την ίδια πιπέττα pasteur συλλέγουμε και μεταφέρουμε σε καινούριο σωλήνα φυγοκέντρου τη στοιβάδα των μονοπύρηνων.
6. Προσθέτουμε περίσσεια διαλύματος DPBS και ξεπλένουμε με φυγοκέντρηση στα 400xg για 10 λεπτά.
7. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6 δύο φορές.

8. Επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε 5-10 mL DPBS και προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση και τη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων στο δείγμα μας μετά από χρώση με κυανό του τρυπανίου.



**Εικόνα 2.1.** Εικόνα του σωληναρίου πριν και μετά τη φυγοκέντρηση δείγματος αίματος επιστοιβαγμένου σε διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων (Histopaque). Μετά τη φυγοκέντρηση τα μονοπύρηννα κύτταρα του αίματος εντοπίζονται στη δεύτερη κατά σειρά, υπόλευκη στοιβάδα πάνω από το διάλυμα διαχωρισμού.



## 2.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυτταρικών εναιωρημάτων

Για τον άμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της βιωσιμότητας ενός κυτταρικού εναιωρήματος χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα χρώσης του προς μέτρηση δείγματος με κατάλληλες χρωστικές ουσίες, όπως το κυανό του τρυπανίου (trypan blue). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στο γεγονός ότι τα ζωντανά κύτταρα, έχοντας άθικτη κυτταρική μεμβράνη, αποκλείουν την είσοδο της χρωστικής στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα νεκρά κύτταρα, λόγω της αυξημένης διαπερατότητάς τους, χρωματίζονται μπλε παρουσία του trypan blue. Παράλληλα με την εκτίμηση της βιωσιμότητας, η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε γνωστό όγκο δείγματος επιτρέπει και την εκτίμηση της συγκέντρωσής τους στο αρχικό εναιώρημα.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα κυττάρων προς μέτρηση
- Διάλυμα κυανού του τρυπανίου (trypan blue) 0,4% (w/v) (Sigma-Aldrich, Germany)
- Μικροπλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U (Greiner, Bio-One)
- Αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρος πλάκα τύπου Neubauer (Sigma-Aldrich)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Novex)

### Πρωτόκολλο εργασίας

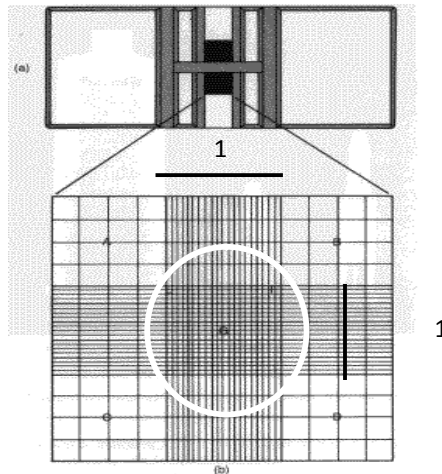
1. Μεταφέρουμε 10-20  $\mu\text{L}$  από το αρχικό κυτταρικό εναιώρημα σε φρεάτιο μικροπλάκας καλλιέργειας 96 φρεατίων.
2. Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος trypan blue στο φρεάτιο και αναμειγνύουμε, με αποτέλεσμα ο λόγος της αραιώσης στην προκειμένη περίπτωση να είναι 2. Σε περιπτώσεις εναιωρημάτων με μεγάλη συγκέντρωση κυττάρων, προσθέτουμε μεγαλύτερο όγκο χρωστικής για να επιτύχουμε μεγαλύτερο λόγο αραιώσης.
3. Αφού βάλουμε την καλυπτρίδα, τοποθετούμε την απαραίτητη ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων με trypan blue στο θάλαμο μέτρησης της πλάκας Neubauer.
4. Εστιάζουμε στην περιοχή μέτρησης (περιοχή με κάθετες και οριζόντιες γραμμές). Η περιοχή αυτή περιέχει εννέα επιμέρους μικρότερες περιοχές, ίσου εμβαδού ( $1 \text{ mm}^2$ ) και ίσου όγκου ( $0,1 \text{ mm}^3$ ) (Εικόνα 2.2).
5. Μετράμε όλα τα κύτταρα σε μία περιοχή όγκου  $0,1 \text{ mm}^3$  ή σε περισσότερες, και υπολογίζουμε το μέσο όρο. Ταυτόχρονα σημειώνουμε τον αριθμό (στην ίδια/ίδιες περιοχές μέτρησης) των κυττάρων που έχουν βαφτεί μπλε (= νεκρά κύτταρα).

Υπολογισμός ποσοστού (%) βιωσιμότητας:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = \frac{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων} - \text{αριθμός νεκρών κυττάρων}}{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

Υπολογισμός της συγκέντρωσης του αρχικού κυτταρικού εναιωρήματος:

$$C \text{ (κύτταρα/mL)} = \text{αριθμός κυττάρων (ανά } 0,1 \text{ mm}^3) \times \text{λόγος αραιώσης} \times 10^4$$



**Εικόνα 2.2.** Αναπαράσταση της αιμοκυτταρομετρικής πλάκας Neubauer (άνω μέρος) και της εικόνας του θαλάμου μέτρησης κατά την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (κάτω μέρος). Η περιοχή μέτρησης στο κέντρο του θαλάμου (μέσα στο λευκό κύκλο) έχει πλευρές 1 mm, ενώ ο όγκος της μετά την τοποθέτηση της καλυπτρίδας ισούται με 0,1 mm<sup>3</sup>.

### 2.3. Καλλιέργεια ανθρώπινων και ποντικίστων κυτταρικών σειρών - Κρυοσυντήρηση

Με τον όρο κυτταροκαλλιέργεια αναφερόμαστε στην ανάπτυξη κυττάρων *in vitro*, έξω από το φυσικό τους περιβάλλον, υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Οι συνθήκες αυτές ποικίλλουν και εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων, αλλά και τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα θηλαστικών, και ειδικά τα ανθρώπινα και ποντικίσια κύτταρα, αναπτύσσονται ιδανικά σε θερμοκρασία 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, εντός επωαστικού κλιβάνου, παρουσία πρότυπων διαλυμάτων θρεπτικού υλικού. Αν και διαφορετικές κυτταρικές σειρές έχουν διαφορετικές απαιτήσεις σε θρεπτικό υλικό, στη συντριπτική τους πλειοψηφία τα θρεπτικά υλικά εμπλουτίζονται πάντα με αμινοξέα και ορό βοδιού για την κατάλληλη θρέψη των κυττάρων, ενώ συνήθως συμπληρώνονται και με αντιβιοτικά για αποφυγή μολύνσεων, παρά το γεγονός ότι πρέπει πάντα να διατηρούνται στείρα.

#### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- RPMI-1640 Glutamax (Lonza)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1M HEPES (Lonza)
- Μικτό διάλυμα αντιβιοτικών 10.000 U/mL Penicillin, 10.000 µg/mL Streptomycin sulfate (Lonza)
- Διάλυμα αντιβιοτικού Gentamycin 10 mg/mL (Lonza)
- Διάλυμα 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα θερμικά απενεργοποιημένου ορού βοδιού (FBS, Lonza)
- Διάλυμα FBS - 20% διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα DPBS - 2 mM αιθυλοδιαμινοτετραφθορικού οξέως (EDTA, Sigma-Aldrich) (διάλυμα DPBS-EDTA)
- Πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο στο καπάκι (Greiner, Bio-One)
- Σωληνάρια κρυοσυντήρησης 2 mL (cryovials, Greiner, Bio-One)
- Υδατόλουτρο
- Καταψύκτης σε θερμοκρασία -20°C (Whirlpool)
- Καταψύκτης σε θερμοκρασία -80°C (Forma Scientific)
- Δοχείο υγρού αζώτου

#### Πρωτόκολλο εργασίας

Για την παρασκευή πλήρους θρεπτικού υλικού εργαζόμαστε ως εξής:

Σε διάλυμα RPMI-1640 Glutamax προσθέτουμε τις απαραίτητες ποσότητες από τα διαλύματα HEPES, Penicillin/Streptomycin, Gentamycin και FBS ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα με την παρακάτω σύσταση. Επιπλέον, για καλλιέργεια ποντικίστων κυτταρικών σειρών, το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται με β-μερκαπτοαιθανόλη.

RPMI-1640 Glutamax  
 10 mM Hepes  
 100 U/mL Penicillin  
 100 µg/mL Streptomycin  
 25 µg/mL Gentamycin  
 50 µM β-μερκαπτοαιθανόλη  
 10% FBS

- Για κυτταρικές σειρές που αναπτύσσονται σε εναιώρημα:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση  $0,3-1 \times 10^6$  κύτταρα/mL και κάθε 2-3 ημέρες το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ανανεώνεται, αφαιρώντας και προσθέτοντας την επιθυμητή ποσότητα παλαιού και νέου θρεπτικού υλικού, αντίστοιχα.

- Για κυτταρικές σειρές που προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες:

Για την ανανέωση του θρεπτικού υλικού σε τέτοιου τύπου καλλιέργειες, απαιτούνται μερικά επιπλέον βήματα. Όταν ο πυθμένας της φλάσκας καλλιέργειας είναι καλυμμένος κατά 80% και ο πληθυσμός των κυττάρων θέλουμε να πολλαπλασιαστεί περαιτέρω:

1. Με πιπέττα απομακρύνουμε και αποχύνουμε το καλλιεργητικό υλικό της φλάσκας, το οποίο περιέχει και τα νεκρά κύτταρα.
  2. Προσθέτουμε 3-6 mL DPBS-EDTA στη φλάσκα, ξεπλένουμε τον πυθμένα αναδεύοντας προσεκτικά και αποχύνουμε το DPBS-EDTA.
  3. Προσθέτουμε νέα 3-6 mL DPBS-EDTA και επωάζουμε την φλάσκα στους 37°C για 10-15 λεπτά.
  4. Με τη βοήθεια μίας πιπέττας ανασηκώνουμε όλα τα προσκολλημένα κύτταρα στον πυθμένα της φλάσκας και μεταφέρουμε όλον τον όγκο του DPBS-EDTA σε σωλήνα φυγοκέντρου.
  5. Φυγοκεντρούμε τον σωλήνα στα 300xg για 5 λεπτά.
  6. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε καινούριο πλήρες θρεπτικό υλικό.
  7. Μεταφέρουμε σε νέες φλάσκες καλλιέργειας μοιράζοντας τα κύτταρα περίπου σε τρία ίσα μέρη, δηλαδή σε τρεις όμοιες φλάσκες της αρχικής καλλιέργειας, και επωάζουμε στους 37°C.
- Για την κρυσυντήρηση κυττάρων που απομονώνουμε από περιφερικό αίμα ή κυττάρων κυτταρικών σειρών που θέλουμε να διατηρήσουμε για μελλοντική χρήση, εργαζόμαστε ως εξής:
    1. Συλλέγουμε το εναιώρημα των κυττάρων προς συντήρηση σε σωλήνα falcon, και προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων.
    2. Εφόσον η καλλιέργεια παρουσιάζει > 95% βιωσιμότητα, φυγοκεντρούμε το σωλήνα στα 300xg για 5 λεπτά.

3. Επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 και προσθέτουμε στάγδην ίσο όγκο από το διάλυμα FBS-20% DMSO. Δείγματα όγκου 1-2 mL με  $1-5 \times 10^6$  κύτταρα/mL τοποθετούνται στα cryovials.
  4. Αναγράφουμε στο σωληνάκι τα απαραίτητα στοιχεία (ημερομηνία, όνομα σειράς, πλήθος κυττάρων) και τα τοποθετούμε απ'ευθείας στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , σε χάρτινο κουτί.
  5. Τα κύτταρα παραμένουν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 24 ώρες. Στη συνέχεια τα μεταφέρουμε στο υγρό άζωτο.
- Για να επαναφέρουμε σε καλλιέργεια κύτταρα που έχουμε συντηρήσει στο υγρό άζωτο :
    1. Θερμαίνουμε το cryovial με τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι το περιεχόμενο να ρευστοποιηθεί.
    2. Μεταφέρουμε το διάλυμα των κυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρου που περιέχει ήδη 10 - 15 mL πλήρες θρεπτικό υλικό.
    3. Φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
    4. Αποχύνουμε το υπερκείμενο, επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε νέο θρεπτικό υλικό και το μεταφέρουμε σε φλάσκα καλλιέργειας.
    5. Επωάζουμε σε κλίβανο στους  $37^{\circ}\text{C}$  με ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$ .

## 2.4. Διαφοροποίηση δενδριτικών κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία όμως συναντώνται σε χαμηλή συχνότητα (<1%) στο περιφερικό αίμα. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την απομόνωσή τους σε μεγάλο αριθμό, που είναι απαραίτητος για την *in vitro* μελέτη της δράσης τους. Για να γίνει αυτό εφικτό, καθιερώθηκε ένα πρωτόκολλο για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε δενδριτικά κύτταρα, μετά από συνεργασία ερευνητικών ομάδων σε διεθνές επίπεδο (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, μονοκύτταρα, τα οποία μπορούν να απομονωθούν σε ικανοποιητικές ποσότητες από ανθρώπινο περιφερικό αίμα, διαφοροποιούνται, παρουσία των κυτταροκινών GM-CSF και IL-4 για 5 ημέρες, σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, δεχόμενα το κατάλληλο ερέθισμα (παράγοντα ωρίμανσης), μεταπίπτουν, εντός 24-48 ωρών, σε ώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν σε αυξημένα επίπεδα μόρια, όπως τα HLA-DR, CD80, CD83, CD86, που αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες του «ώριμου» φαινοτύπου τους. Παράγοντες ωρίμανσης που χρησιμοποιούνται ευρέως σε τέτοια πρωτόκολλα είναι ο TNF- $\alpha$ , αλλά και συνδέτες των TLRs, όπως ο LPS και το polyI:C (Gilboa, 2007). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τόσο η προΤα, όσο και το προΤα(100-109), καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ικανοί επαγωγείς της ωρίμανσης ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων (Skoropeliti et al., 2009).

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

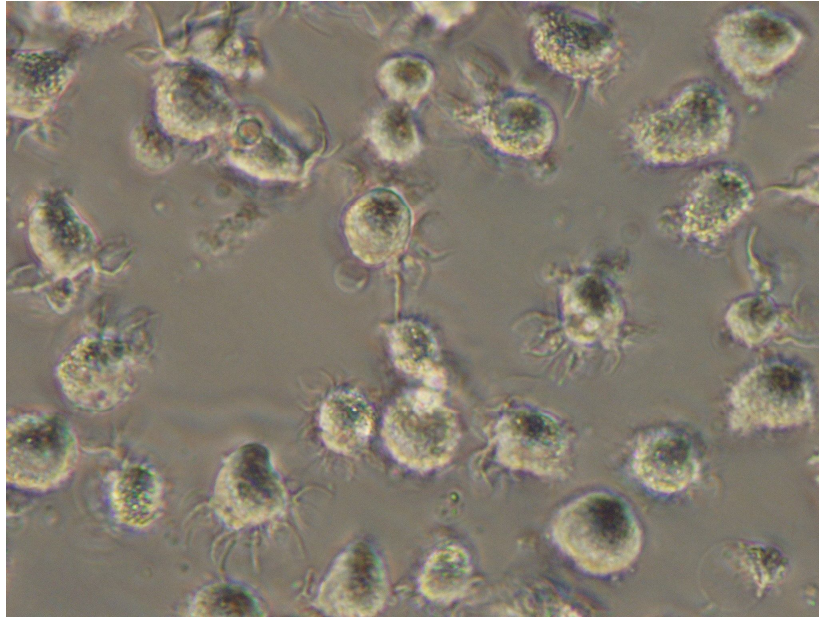
- Εναιώρημα μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος
- X-VIVO 15 (Lonza)
- Πλαστικές πιπέττες pasteur
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων (Greiner, Bio-One)
- Διάλυμα κυτταροκίνης GM-CSF ανθρώπου (R&D)
- Διάλυμα κυτταροκίνης IL-4 ανθρώπου (R&D)
- Διάλυμα κυτταροκίνης TNF- $\alpha$  ανθρώπου (R&D)
- Διάλυμα λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (Sigma-Aldrich)
- ΠροΤα (Thymoorgan GmbH, Germany)
- Συνθετικό πεπτίδιο προΤα(100-109) (συντέθηκε από τον Καθηγητή Η. Kalbacher, Πανεπιστήμιο Tuebingen)
- Ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο (Euromex)

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Εναιώρημα μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος, με συγκέντρωση  $5 \times 10^6$  κύτταρα/mL επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15, επιστρώνεται σε μικροπλάκα καλλιέργειας 6 φρεατίων σε τελικό όγκο 3 mL/φρεάτιο, και

επωάζεται στους 37°C για 2 ώρες, έτσι ώστε να προσκολληθούν τα μονοκύτταρα.

2. Συλλέγουμε με προσοχή όλο το υπερκείμενο καλλιεργητικό μέσο, που περιέχει τα μη προσκολλώμενα κύτταρα, τα οποία και θα καταψύξουμε για μετέπειτα χρήση (§ 2.10.). Προσθέτουμε εκ νέου 3 mL X-VIVO 15 σε κάθε φρεάτιο και αναδεύουμε το υλικό με πιπέττα *pasteur*, αναρροφώντας και απορρίπτοντάς το ήπια, απομακρύνοντας με αυτό τον τρόπο από τον πυθμένα του φρεατίου τα μη ειδικά προσκολλημένα κύτταρα που τυχόν έχουν απομείνει.
3. Επαναλαμβάνουμε την έκπλυση των φρεατίων άλλες τρεις φορές, παρακολουθώντας ενδιάμεσα σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο τα κύτταρα που αιωρούνται να μειώνονται και στο τέλος, να παραμένουν στον πυθμένα του φρεατίου μόνο τα σταθερά προσκολλημένα κύτταρα.
4. Προσθέτουμε 2 mL θρεπτικού υλικού X-VIVO 15 σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας, εμπλουτισμένο με τις κυτταροκίνες GM-CSF και IL-4 σε τελική συγκέντρωση 800 International Units (IU)/mL και 500 IU/mL, αντίστοιχα.
5. Επωάζουμε στους 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για δύο ημέρες.
6. Προσθέτουμε 2 mL θρεπτικού υλικού X-VIVO 15 σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας, που περιέχει 1600 IU/mL GM-CSF και 1000 IU/mL IL-4, ώστε η τελική συγκέντρωση των κυτταροκινών να παραμείνει ίδια. Επωάζουμε στους 37°C για δύο ημέρες.
7. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6, αφού πρώτα αφαιρέσουμε 2 mL θρεπτικού υλικού από κάθε φρεάτιο. Επωάζουμε στους 37°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
8. Τα μονοκύτταρα έχουν πια διαφοροποιηθεί σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και θα ακολουθήσει η ωρίμανσή τους. Για το σκοπό αυτό, αφαιρούμε τα 2 από τα συνολικά 4 mL της καλλιέργειας, και προσθέτουμε 1 mL φρέσκου θρεπτικού υλικού X-VIVO 15 και τον παράγοντα ωρίμανσης. Οι τελικές συγκεντρώσεις των παραγόντων ωρίμανσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:
  - LPS: 0,5 µg/mL
  - TNF-α: 10 ng/mL
  - προΤα: 160 ng/mL
  - προΤα(100-109): 25 ng/mL
9. Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία μετά την προσθήκη των παραγόντων ωρίμανσης, τα δενδριτικά κύτταρα συλλέγονται και ελέγχονται για την έκφραση του TLR-4 (§ 2.8.) και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά αυτού (§ 2.5-2.7.). Για τον έλεγχο της έκφρασης των μορίων CD14, HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD40 και CD11b με κυτταρομετρία ροής (§ 2.8) και για την εκτίμηση των παραγόμενων κυτταροκινών (§ 2.9), τα δενδριτικά κύτταρα και τα υπερκείμενα των καλλιέργειών τους, αντίστοιχα, συλλέγονται 48 ώρες μετά την προσθήκη των παραγόντων ωρίμανσης (**Εικόνα 2.3**). Σε αυτό το χρονικό σημείο, επίσης, συλλέγονται και τα δενδριτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση των αυτόλογων T λεμφοκυττάρων (§ 2.10.).



**Εικόνα 2.3.** *In vitro* διαφοροποιημένα ώριμα δενδριτικά κύτταρα. Μονοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν για 5 ημέρες παρουσία GM-CSF και IL-4 και στη συνέχεια ωρίμασαν παρουσία του επιθυμητού παράγοντα [LPS, TNF- $\alpha$ , προΤα ή προΤα(100-109)] για 48 ώρες. Είναι εμφανής η χαρακτηριστική μορφολογία (αποφυάδες) των ώριμων δενδριτικών κυττάρων.



## 2.5. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Για την μελέτη των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά του TLR-4 σε δενδριτικά κύτταρα, είναι απαραίτητη η λύση των κυττάρων. Έτσι γίνεται δυνατή η διαλυτοποίηση και η συλλογή των πρωτεϊνών που περιέχουν, ανάμεσα στις οποίες και οι πρωτεΐνες που θα μελετηθούν. Για την κυτταρική λύση επιλέγονται κατάλληλα διαλύματα που περιέχουν απορρυπαντικές ουσίες, όπως για παράδειγμα το NP-40 το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα δενδριτικών κυττάρων
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης NP-40 που αποτελείται από:
  - 150 mM χλωριούχου νατρίου (NaCl, Sigma-Aldrich)
  - 1% NP-40 (Sigma-Aldrich)
  - 50 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich), σε 500 mL dH<sub>2</sub>O
- Διάλυμα DPBS
- Σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 1,5 mL (Greiner, Bio-One)

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Φυγοκεντρούμε το εναιώρημα των δενδριτικών κυττάρων στα 300xg για 10 λεπτά.
2. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL DPBS.
3. Φυγοκεντρούμε ξανά στα 300xg για 10 λεπτά.
4. Απομακρύνουμε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο του κυτταρικού ιζήματος.
5. Προσθέτουμε στο σωλήνα 80 μL του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά, αναδεύοντας ενδιάμεσα 2-3 φορές ήπια.
6. Φυγοκεντρούμε στα 1850xg για 15 λεπτά στους 4°C .
7. Συλλέγουμε σε νέο σωληνάριο erpendorf όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες, προσέχοντας να μην διαταράξουμε και αναρροφήσουμε μέρος του ιζήματος, που περιέχει κυτταρικά υπολείμματα.
8. Ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.

## 2.6. Μέθοδος Bradford - Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Μετά την κυτταρική λύση, εφαρμόζεται η μέθοδος Bradford για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα απομονωθέντα εκχυλίσματα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδένεται στην αργινίνη και σε αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών παρουσιάζοντας μετατόπιση στην απορρόφηση από τα 470 nm (αδέσμευτη μορφή) στα 595 nm (δεσμευμένη μορφή). Με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς που κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γνωστές ποσότητες αλβουμίνης ορού, μπορεί τελικά να προσδιορισθεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση σε ένα άγνωστο δείγμα.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Πρωτεϊνικό διάλυμα άγνωστης συγκέντρωσης
- Αλβουμίνη ορού βοδιού (bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich)
- Αντιδραστήριο Bradford που περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad Laboratories, Germany)
- Απεσταγμένο νερό
- Σωληνάρια τύπου erppendorf όγκου 1,5 mL (Greiner, Bio-One)
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης (BioRad Laboratories)
- Φωτόμετρο με φίλτρο απορρόφησης στα 595 nm

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Σε σωληνάρια erppendorf προετοιμάζουμε τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, με 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 και 20 µg BSA, ενώ σε άλλα σωληνάρια προετοιμάζουμε τα άγνωστα δείγματα πρωτεϊνών.
2. Σε όλα τα σωληνάρια προσθέτουμε 200 µL αντιδραστηρίου Bradford και 800 µL απεσταγμένου νερού.
3. Στη συνέχεια προσθέτουμε 2 µL από τα εκχυλίσματα άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης και από τα πρότυπα διαλύματα BSA στα αντίστοιχα σωληνάρια.
4. Αναδεύουμε τους σωλήνες περιστρέφοντάς τους κατά 180°.
5. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
6. Μετράμε την απορρόφηση κάθε σωλήνα στα 595 nm.
7. Κατασκευάζουμε την καμπύλη αναφοράς και προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα μας.

## 2.7. Ανοσοσύτρωμα κατά Western

Για την ανίχνευση και τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης μίας πρωτεΐνης σε ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος ανάλυσης κατά Western. Στη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες του μείγματος αρχικά διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και στη συνέχεια μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία αποτυπώνει το πρότυπο των πρωτεϊνικών ζωνών που διαχωρίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση. Κατόπιν, η μεμβράνη επώαζεται με κατάλληλα αντισώματα, πρωτογενή και δευτερογενή, και έτσι καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση και η ημι-ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

### Α. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης

#### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Δις απεσταγμένο νερό
- Διθειοθρεϊτόλη, (dithiothreitol, DTT) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα ακρυλαμίδης:δις-ακρυλαμίδης σε αναλογία 37,5:1 (BioRad Laboratories)
- Γλυκερόλη (Sigma-Aldrich)
- Γλυκίνη (Sigma-Aldrich)
- Υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) (Sigma-Aldrich)
- NNN'N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη(NNN'N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα 20% (w/v) θειικό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl-sulphate, SDS) (Sigma-Aldrich)
- Tris
- Κυανό της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) (Sigma-Aldrich)
- Αγαρόζη (BioRad Laboratories)
- Πρωτεϊνικός δείκτης: Cruz Marker Molecular Weight Standards, εύρους 23 – 132 kDa, sc-2035 (Santa Cruz Biotechnologies, USA)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πήκτωμάτων (BioRad Laboratories)

#### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Παρασκευάζουμε το διάλυμα Laemmli (2x LSB) που αποτελείται από 65,8 mM Tris, 2,1% SDS, 26,3% γλυκερόλη και 0,01% bromophenol blue.
2. Για την ηλεκτροφορητική ανάλυση προσθέτουμε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα 2x LSB και διάλυμα DTT 1M με αναλογία:  
5 μέρη 2x LSB : 4 μέρη πρωτεϊνικό δείγμα : 1 μέρος DTT
3. Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά.

4. Παρασκευάζεται πήκτωμα ακρυλαμίδης που αποτελείται από τη φάση επιστοιβάξης και τη φάση διαχωρισμού.
  - Η σύσταση του πηκτώματος επιστοιβάξης είναι η εξής: 3,05% διαλύματος ακρυλαμίδης, 0,127 M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS και 0,17% TEMED.
  - Η σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού είναι η εξής: 12% διαλύματος ακρυλαμίδης, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,025% APS και 0,083% TEMED
5. Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος ακολουθεί το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x) αποτελείται από: 17,7 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 0,1% SDS. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται σε αραιώση 1x. Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται σε 20 mA και λόγω τους αρνητικού τους φορτίου, παρουσία SDS, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με καθοριστικό παράγοντα το μοριακό τους βάρος.
6. Ηλεκτροφορούμε μέχρις ότου τα δείγματα φτάσουν στο τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού.

## **B. Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

### **Υλικά, αναλώσιμα και όργανα**

- Δις απεσταγμένο νερό
- Γλυκίνη
- Διάλυμα SDS
- Διάλυμα Tris
- Μεθανόλη (Sigma-Aldrich)
- 12 φύλλα χαρτιού Whatman κομμένα σε διαστάσεις 6 x 9,3 cm (Macherey-Nagel, Germany)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διαστάσεις 5,5 x 8,8 (Porablot NCP)
- Συσκευή ημίξηρης (semi-dry) μεταφοράς (Transblot Semi-Dry, BioRad Laboratories)

### **Πρωτόκολλο εργασίας**

Η μέθοδος μεταφοράς των πρωτεϊνών είναι ημίξηρη (semi-dry). Στη μέθοδο αυτή τα φύλλα Whatman απλώς διαβρέχονται με το διάλυμα μεταφοράς, ώστε να δημιουργηθεί μια ροή διαλύματος και με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος οι πρωτεΐνες να μεταφερθούν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, κινούμενες από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο.

1. Παρασκευάζουμε το διάλυμα μεταφοράς που αποτελείται από: 40 mM γλυκίνη, 50 μM Tris, 0,04% SDS και 20% μεθανόλη.
2. Εμβαπτίζουμε τα φύλλα Whatman στο διάλυμα μεταφοράς για 20-25 λεπτά.
3. Τοποθετούμε 6 φύλλα Whatman στη συσκευή απομακρύνοντας κάθε φορά τις φουσαλίδες αέρα.

4. Τοποθετούμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην κορυφή των φύλλων Whatman, αφού πρώτα έχει βυθιστεί σε απεσταγμένο νερό, και απομακρύνουμε τις φυσαλίδες.
5. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετούμε το πήκτωμα ακρυλαμίδης και άλλα 6 φύλλα Whatman με τον ίδιο τρόπο.
6. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 20 Volt για μία ώρα περίπου.

### **Γ. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών ζωνών**

#### **Υλικά, αναλώσιμα και όργανα**

- Απεσταγμένο νερό
- NaCl
- Tris
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- Σκόνη γάλακτος με χαμηλά λιπαρά (Regilait)
- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης TIRAP (αντι-TIRAP), παραγμένο σε κουνέλι (eBioscience, Germany)
- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης TRIF (αντι-TRIF), παραγμένο σε αίγα (Novus Biologicals, USA)
- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης MyD88 (αντι-MyD88), παραγμένο σε κουνέλι (eBioscience)
- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης GAPDH (αντι-GAPDH), παραγμένο σε ποντίκι (Santa Cruz)
- Δευτερογενές αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής των ανοσοσφαιρινών τάξης G του κουνελιού, συζευγμένο με HRP, παραγμένο σε αίγα (Santa Cruz)
- Δευτερογενές αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής των ανοσοσφαιρινών τάξης G της αίγας, συζευγμένο με HRP, παραγμένο σε όνο (Santa Cruz)
- Δευτερογενές αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής των ανοσοσφαιρινών τάξης G του ποντικού, συζευγμένο με HRP, παραγμένο σε αίγα (Santa Cruz)
- Kit ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced chemiluminescence kit, ECL; Santa Cruz), που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου (αντιδραστήριο A), λουμινόλη και ενισχυτή χημειοφωταύγειας (αντιδραστήριο B).
- Φιλμ ακτίνων X (Agfa-Gevaert N.V., Belgium)
- Διάλυμα εμφάνισης (developer)
- Διάλυμα σταθεροποίησης (fixer)

#### **Πρωτόκολλο εργασίας**

Με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος κατά Western μπορεί να ανιχνευτεί η υπό μελέτη πρωτεΐνη πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (**Εικόνα 2.4**).

1. Παρασκευάζουμε αρχικά το διάλυμα πλύσης TBS-T, ως εξής: αραιώνουμε το αρχικό διάλυμα 20x TBS (20 mM Tris pH 7,6 και 137 mM NaCl) σε απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια προσθέτουμε στο 1x TBS 0,1% Tween-20 για την παρασκευή του διαλύματος TBS-T.
2. Παρασκευάζουμε επίσης το διάλυμα κορεσμού (blocking), προσθέτοντας σκόνη γάλακτος σε διάλυμα TBS-T, με τελική συγκέντρωση 5% (w/v).
3. Επωάζουμε τη μεμβράνη σε διάλυμα κορεσμού για 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων.
4. Κατόπιν επωάζουμε τη μεμβράνη με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα κορεσμού (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση).
5. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T, (3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
6. Επωάζουμε τη μεμβράνη με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα κορεσμού (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση).
7. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T (3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
8. Μετά την έκπλυση της μεμβράνης εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας με χρήση του ECL kit. Τα αντιδραστήρια A και B του kit αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση και στη συνέχεια επωάζουμε τη μεμβράνη στο μείγμα αυτό για 1 λεπτό.
9. Κατόπιν η μεμβράνη καλύπτεται με ζελατίνη και εκτίθεται σε κατάλληλο φιλμ εντός ειδικής κασέτας. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται κάθε φορά από τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης και την ειδικότητα του πρωτογενούς αντισώματος για αυτήν.
10. Ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης για περίπου 1-5 λεπτά περίπου.
11. Το φιλμ ξεπλένεται σε νερό βρύσης.
12. Το φιλμ μεταφέρεται σε διάλυμα σταθεροποίησης για να μονιμοποιηθεί, για 5-10 λεπτά.
13. Τέλος, ακολουθεί έκπλυση του φιλμ με νερό βρύσης.

#### **Δ. Αφαίρεση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping)**

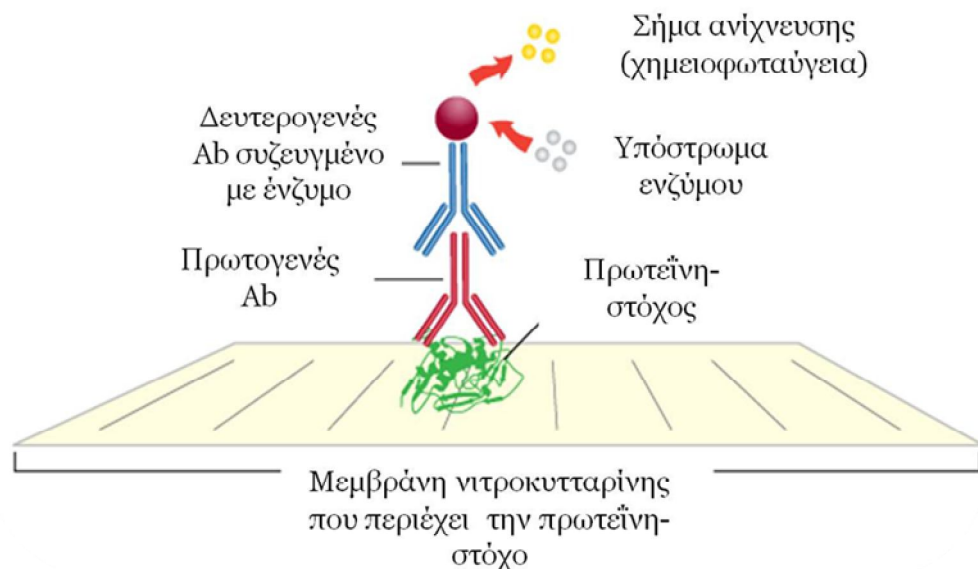
##### **Υλικά, αναλώσιμα και όργανα**

- Δις απεσταγμένο νερό
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα SDS
- Διάλυμα Tris
- Διάλυμα TBS-T

### Πρωτόκολλο εργασίας

Μετά την ολοκλήρωση του ανοσοστυπώματος, υπάρχει η δυνατότητα να αφαιρεθεί το αντίσωμα από τη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Η διαδικασία αυτή είναι χρήσιμη όταν τα υπό μελέτη δείγματα είναι σπάνια και δεν μπορούν να δημιουργηθούν πολλές πανομοιότυπες μεμβράνες λόγω περιορισμένης ποσότητας δειγμάτων. Επίσης, χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι μίας πρωτεΐνης-μάρτυρα, όπως η GADPH.

1. Παρασκευάζουμε το διάλυμα αποκόλλησης του αντισώματος, που αποτελείται από 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM Tris και 2% SDS.
2. Επωάζουμε τη μεμβράνη στο διάλυμα αποκόλλησης στους 45°C για 45 λεπτά.
3. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T, (3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
4. Η μεμβράνη στεγνώνεται καλά και φυλάσσεται στους 4°C έως ότου χρησιμοποιηθεί ξανά.



**Εικόνα 2.4.** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου του ανοσοστυπώματος κατά Western. Οι πρωτεΐνες ενός μείγματος αρχικά διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και στη συνέχεια μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Κατόπιν, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, που περιέχει την πρωτεΐνη-στόχο, επωάζεται με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα και μέσω ανίχνευσης του κατάλληλου σήματος (π.χ. χημειοφωταύγεια), καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση και η ημι-ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

## 2.8. Έλεγχος έκφρασης επιφανειακών δεικτών δενδριτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Με την κυτταρομετρία ροής είναι δυνατή η γρήγορη ανάλυση ενός συνόλου κυττάρων και η συλλογή πολλών δεδομένων ταυτόχρονα, ακόμα και όταν τα κύτταρα είναι διαθέσιμα σε πολύ περιορισμένο αριθμό. Οι πληροφορίες που μπορούν να συλλεχθούν αφορούν το μέγεθος και την πολυπλοκότητα/βαθμό ενεργοποίησης των κυττάρων ενός πληθυσμού, καθώς και την έκφραση τόσο εξωκυτταρικών δεικτών, όσο και ενδοκυτταρικών μορίων. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον των μορίων που θέλουμε να μελετήσουμε, συζευγμένα με φθοριοχρώματα, όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC) και η φυκοερυθρίνη (PE). Στη συνέχεια, ακτίνες laser, με διαφορετικά μήκη κύματος, διεγείρουν τα συζευγμένα φθοριοχρώματα, τα οποία, επακόλουθα, εκπέμπουν σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος το καθένα. Αυτή η χαρακτηριστική ακτινοβολία εκπομπής κάθε φθοριοχρώματος προσλαμβάνεται από ειδικούς ανιχνευτές και έτσι καθίσταται δυνατή η συλλογή πληροφοριών για την έκφραση των μελετώμενων μορίων σε ολόκληρο τον κυτταρικό πληθυσμό, αλλά και σε επιμέρους υποπληθυσμούς.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα δενδριτικών κυττάρων
- Διάλυμα DPBS – 0,5% (w/v) BSA (διάλυμα DPBS-BSA)
- Διάλυμα DPBS – 2% (v/v) παραφορμαλδεϋδη (PFA) (Sigma-Aldrich), (διάλυμα DPBS-PFA)
- Διάλυμα DPBS, εμπλουτισμένο με 2% FBS, 2 mM EDTA και 0,01% NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) (διάλυμα PFEA)
- Διάλυμα PFEA - 1% (v/v) ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG (GAMUNEX, Bayer, Germany) (διάλυμα GAMUNEX)
- Διάλυμα PFEA - μονοαζιδίου του αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 5 µg/mL (EMA, Invitrogen, Germany) (διάλυμα EMA)
- Αντισώματα τάξης IgG1
  - έναντι του μορίου CD14/PE (BD Biosciences, Germany)
  - έναντι του μορίου HLA-DR/FITC (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD80/FITC (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD83/PE (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD86/Pe-Cy5 (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD40/PE (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD11b/PE (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD11c/Pe-Cy7 (BioLegend, Germany)
  - έναντι των μορίων CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 – Lineage 1 cocktail/FITC (Lin-1, BD Biosciences)
- Αντίσωμα τάξης IgG2α έναντι του μορίου TLR-4/Brilliant Violet 421 (BioLegend)
- Σωλήνες πολυστυρενίου όγκου 5 mL (BD Biosciences)
- Κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur και LSRII (BD Biosciences)



### Πρωτόκολλο εργασίας

Στην ενότητα αυτή θα περιγραφεί μόνο το πρωτόκολλο εξωκυτταρικής σήμανσης, καθώς τα μελετώμενα μόρια εκφράζονται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων.

- Για την ανάλυση του φαινοτύπου των ώριμων δενδριτικών κυττάρων εργαζόμαστε ως εξής:
  1. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε συμβατούς με το κυτταρόμετρο σωλήνες (0,2–0,5x10<sup>6</sup> κύτταρα/σωλήνα) και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
  2. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος DPBS-BSA σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
  3. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε DPBS-BSA, 0,2–0,5x10<sup>6</sup> κύτταρα/50 μL διαλύματος.
  4. Προσθέτουμε τα αντισώματα (4 μL/1x10<sup>6</sup> κύτταρα) στους σωλήνες. Τοποθετούμε μέχρι τρία αντισώματα (συζευγμένα με τρία διαφορετικά φθοριοχρώματα) σε κάθε σωλήνα. Για την ανάλυση του φαινοτύπου των δενδριτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα: CD14/PE, HLA-DR/FITC, CD80/FITC, CD83/PE, CD86/PE-Cy5, CD40/PE και CD11b/PE
  5. Επωάζουμε για 30 λεπτά στον πάγο.
  6. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος DPBS-BSA σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
  7. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 200 μL διαλύματος DPBS-PFA.
  8. Προχωράμε αμέσως σε ανάλυση στο κυτταρόμετρο (FACSCalibur).
  
- Για την ανάλυση της έκφρασης του TLR-4 σε δενδριτικά κύτταρα εργαζόμαστε ως εξής:
  1. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε συμβατούς με το κυτταρόμετρο σωλήνες (0,2–0,5x10<sup>6</sup> κύτταρα/σωλήνα) και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
  2. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 50 μL διαλύματος PFEA, που περιέχει GAMUNEX και EMA σε τελικές συγκεντρώσεις 1% (v/v) και 0,1 μg/mL, αντίστοιχα.
  3. Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο, κάτω από λαμπτήρα Neon.
  4. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος PFEA σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
  5. Προσθέτουμε τις κατάλληλες ποσότητες από τα αντισώματα (5 μL/Lin-1, 10 μL/CD11c και 3 μL/TLR-4) και συμπληρώνουμε με διάλυμα PFEA μέχρι τα 50 μL ανά σωλήνα.
  6. Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.
  7. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος PFEA σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.

8. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε το βήμα 8.
9. Επαναιωρούμε το ίζημα σε 200 μL διαλύματος PFEA.
10. Προχωράμε αμέσως σε ανάλυση στο κυτταρόμετρο (LSRII).

## 2.9. Μέτρηση των παραγόμενων κυτταροκινών από τα δενδριτικά κύτταρα

Για τη βέλτιστη ενεργοποίηση των T κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα είναι απαραίτητο να παρέχουν ένα επιπλέον σήμα διέγερσης, πέραν του αντιγόνου και των συνδιεγερτικών μορίων, μέσω των κυτταροκινών που παράγουν. Το προφίλ των εκκρινόμενων κυτταροκινών (προ- ή αντιφλεγμονώδεις) από τα δενδριτικά κύτταρα καθορίζει και την ποιότητα της απάντησης των βοηθητικών κυττάρων, αν θα διαφοροποιηθούν, δηλαδή, προς T<sub>H</sub>1 ή T<sub>H</sub>2 τύπου κύτταρα. Επομένως, κρίθηκε σημαντικό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση των κυτταροκινών στα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν από τις καλλιέργειες των δενδριτικών κυττάρων. Για την εύκολη και γρήγορη ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων των κυτταροκινών, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits για τις IL-10, IL-12 και TNF-α.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- ELISA kit για την ανθρώπινη IL-10 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), που περιλαμβάνει:
  - πρότυπο διάλυμα ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL-10 (5.000 pg/mL)
  - διάλυμα πρότυπου διαλύτη
  - διάλυμα επώασης
  - μικροπλάκες 96 φρεατίων επιστρωμένες με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL-10
  - διάλυμα αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IL-10, συζευγμένο με βιοτίνη
  - διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με τον ένζυμο της υπεροξειδάσης (Streptavidin-HRP) (100x)
  - διαλύτης για το διάλυμα Streptavidin-HRP
  - διάλυμα εκπλύσεων (25x)
  - διάλυμα χρωμογόνου τετρα-μεθυλ-βενζιδίνης (TMB)
  - διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος
  - καλύμματα για τις μικροπλάκες
- ELISA kit για την ανθρώπινη IL-12 p40/p70 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), που περιλαμβάνει:
  - πρότυπο διάλυμα ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL-12 (5.000 pg/mL)
  - διάλυμα πρότυπου διαλύτη
  - μικροπλάκες 96 φρεατίων επιστρωμένες με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL-12
  - διάλυμα αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IL-12, συζευγμένο με βιοτίνη
  - διάλυμα Streptavidin-HRP (100x)
  - διαλύτης για το διάλυμα Streptavidin-HRP
  - διάλυμα εκπλύσεων (25x)
  - διάλυμα TMB
  - διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος
  - καλύμματα για τις μικροπλάκες
- ELISA kit για τον ανθρώπινο TNF-α (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), που περιλαμβάνει:

- πρότυπο διάλυμα ανθρώπινου ανασυνδυσασμένου TNF-α (5.000 pg/mL)
  - διάλυμα πρότυπου διαλύτη
  - διάλυμα επώασης
  - μικροπλάκες 96 φρεατίων επιστρωμένες με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου ανασυνδυσασμένου TNF-α
  - διάλυμα αντισώματος έναντι του ανθρώπινου TNF-α, συζευγμένο με βιοτίνη
  - διάλυμα Streptavidin-HRP (100x)
  - διαλύτης για το διάλυμα Streptavidin-HRP
  - διάλυμα εκπλύσεων (25x)
  - διάλυμα TMB
  - διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος
  - καλύμματα για τις μικροπλάκες
- Φωτόμετρο (Denley Wellscan ELISA reader, UK )

### Πρωτόκολλο εργασίας

- Για την μέτρηση της IL-10 εργαζόμαστε ως εξής:
  1. Με διαδοχικές αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος ανθρώπινης ανασυνδυσασμένης IL-10 σε επιθυμητούς όγκους του πρότυπου διαλύτη, ετοιμάζουμε τα διαλύματα εργασίας για την πρότυπη καμπύλη, με τις ακόλουθες αραιώσεις: 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 και 0 pg/mL.
  2. Αραιώνουμε το 100x διάλυμα Streptavidin-HRP, με τον αντίστοιχο διαλύτη, προσθέτοντας 10 μL του αρχικού διαλύματος σε 990 μL διαλύτη.
  3. Αραιώνουμε το 25x διάλυμα εκπλύσεων, προσθέτοντας ένα όγκο του διαλύματος σε 24 όγκους απιονισμένου νερού.
  4. Προσθέτουμε 50 μL του πρότυπου διαλύτη στα φρεάτια μάρτυρες (όπου δεν θα προστεθεί δείγμα προς μέτρηση ή πρότυπο διάλυμα IL-10), 50 μL των πρότυπων διαλυμάτων IL-10 και 50 μL δειγμάτων υπερκειμένων από τις καλλιέργειες των δενδριτικών κυττάρων, στα αντίστοιχα φρεάτια.
  5. Προσθέτουμε 50 μL του διαλύματος επώασης στα φρεάτια της πρότυπης καμπύλης και 50 μL του πρότυπου διαλύτη στα φρεάτια όπου έχουν προστεθεί τα υπερκείμενα των καλλιεργειών.
  6. Καλύπτουμε την μικροπλάκα και την αφήνουμε να επωαστεί για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
  7. Απομακρύνουμε πλήρως το περιεχόμενο των φρεατίων και γεμίζουμε εκ νέου τα φρεάτια με διάλυμα έκπλυσης 1x.
  8. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 7, τρεις φορές.
  9. Προσθέτουμε 100 μL του βιοτινυλιωμένου αντι-IL-10 αντισώματος σε όλα τα φρεάτια.
  10. Καλύπτουμε την μικροπλάκα και την αφήνουμε να επωαστεί για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
  11. Απομακρύνουμε πλήρως το περιεχόμενο των φρεατίων και γεμίζουμε εκ νέου τα φρεάτια με διάλυμα έκπλυσης 1x.

12. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 11 τρεις φορές.
  13. Προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  του 1x διαλύματος Streptavidin-HRP σε όλα τα φρεάτια.
  14. Καλύπτουμε την μικροπλάκα και την αφήνουμε να επωαστεί για 30 λεπτά.
  15. Απομακρύνουμε πλήρως το περιεχόμενο των φρεατίων και γεμίζουμε εκ νέου τα φρεάτια με διάλυμα έκπλυσης 1x.
  16. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 11 τρεις φορές.
  17. Προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  του διαλύματος TMB σε όλα τα φρεάτια.
  18. Καλύπτουμε τη μικροπλάκα και την αφήνουμε να επωαστεί για 30 λεπτά.
  19. Προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης σε όλα τα φρεάτια.
  20. Φωτομετρούμε τη μικροπλάκα στα 450 nm.
  21. Αποτυπώνουμε τις τιμές της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων IL-10 σε διάγραμμα. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, αντιστοιχούμε τις οπτικές πυκνότητες των προς μέτρηση δειγμάτων με τη συγκέντρωση της IL-10 την οποία περιέχουν.
- Αντίστοιχα εργαζόμαστε και για την μέτρηση της IL-12 και του TNF- $\alpha$

## 2.10. Διέγερση T λεμφοκυττάρων παρουσία συγκεκριμένων πεπτιδίων-αντιγόνων

Ένα ώριμο δενδριτικό κύτταρο, που φέρει στην επιφάνειά του τα απαραίτητα συνδιεγερτικά μόρια (CD80/86) και παράγει τις κατάλληλες κυτταροκίνες (IL-12), είναι θεωρητικά ικανό να διεγείρει CD4+ και CD8+ T κύτταρα. Η ικανότητά του αυτή μπορεί να διερευνηθεί πειραματικά *in vitro*, με τη βοήθεια των καλλιιεργειών ενεργοποίησης T κυττάρων (T cell stimulation cultures), παρουσία συγκεκριμένων πεπτιδίων-αντιγόνων. Για την εύρεση του βέλτιστου πρωτοκόλλου ενεργοποίησης πρέπει να συνυπολογιστούν αρκετοί παράγοντες. Αρχικά, πρέπει να γίνει σωστή επιλογή των πεπτιδίων-αντιγόνων και των δοτών από τους οποίους θα απομονωθούν τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν, με βάση τον τύπο των T κυττάρων που θέλουμε να ενεργοποιήσουμε (παρθένα κύτταρα ή κύτταρα μνήμης). Από το γεγονός αυτό θα εξαρτηθεί και ο αριθμός των συνολικών διεγέρσεων, τα μεταξύ τους χρονικά διαστήματα, αλλά και ο τύπος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν σε κάθε διέγερση. Επομένως, για την *in vitro* διέγερση παρθένων ως προς ένα αντιγόνο T κυττάρων, πρέπει να επιλεγθούν κύτταρα δοτών που δεν έχουν έρθει σε επαφή με το επιλεγμένο αντιγόνο. Επιπλέον, δεδομένου ότι πρόκειται για παρθένα κύτταρα, απαιτούνται περισσότερες από μία διεγέρσεις, παρουσία «επαγγελματιών» αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων για να επιτευχθεί έκπτυξη αντιγονοειδικών T κυτταρικών σειρών/κλώνων. Αντιθέτως, για την διέγερση T κυττάρων μνήμης, μία ή δύο ενεργοποιήσεις επαρκούν για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και την έκπτυξή τους.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα ώριμων δενδριτικών κυττάρων
- Εναιώρημα αυτόλογων λεμφοκυττάρων (μη προσκολλώμενα μονοπύρηννα, § 2.4)
- Εναιώρημα αυτόλογων μονοπύρηννων
- Πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, το HER-2/neu<sub>9369</sub> [HER-2(9<sub>369</sub>)] με αλληλουχία KIFGSLAFL και το HER-2/neu<sub>15776</sub> [HER-2(15<sub>776</sub>)] με αλληλουχία GVGSPYVSRLLGICL (συντέθηκαν από τον Καθ. H. Kalbacher, Πανεπιστήμιο Tuebingen)
- Μείγμα πεπτιδίων από την αλληλουχία των πρωτεϊνών IE-1 και pp65 του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV), μήκους 15 αμινοξέων το καθένα, με αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες (JPT Peptides Technologies GmbH)
- X-VIVO 15
- RPMI-1640
- Διάλυμα αλάτων HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Lonza)
- Διάλυμα DPBS
- Διάλυμα DPBS - 5% (v/v) FBS (διάλυμα DPBS-FBS)
- Διάλυμα PFEA

- Διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), συγκέντρωσης 5 mM σε DMSO (CellTrace CFSE Proliferation Kit, Molecular Probes, Invitrogen)
- Ανθρώπινη ανασυνδυασμένη IL-2 (Proleukin; Novartis Pharmaceuticals, UK Ltd)
- Golgi-Plug (1000x) (BD Biosciences)
- Αντίσωμα τάξης IgG1 έναντι του μορίου CD107a/FITC (BD Biosciences)

### **Πρωτόκολλο εργασίας**

- Για την διέγερση παρθένων T κυττάρων, επιλέχθηκαν ως αντιγόνα δύο ανοσογονικά πεπτίδια-επίτοποι της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, το HER-2/neu 9<sub>369</sub> [(HER-2(9<sub>369</sub>) με αλληλουχία KIFGSLAFL] και το HER-2/neu 15<sub>776</sub> [HER-2(15<sub>776</sub>) με αλληλουχία GVGSPYVSRLLGICL]. Τα πεπτίδια αυτά προσδένονται στα HLA-A2 και HLA-DR4 αλληλόμορφα των MHC μορίων τάξης I και II, αντίστοιχα και ως εκ τούτου μπορούν να ενεργοποιήσουν CD8+ και CD4+ T κύτταρα, αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, οι δότες που επιλέχθηκαν για αυτή την πειραματική διαδικασία είχαν τυποποιηθεί ως προς τα αλληλόμορφα τα οποία εκφράζουν και ήταν διπλά θετικοί για τα HLA-A2 και HLA-DR4. Θα περιγραφούν δύο πρωτόκολλα διέγερσης παρθένων T κυττάρων τα οποία δοκιμάστηκαν για την εύρεση του ιδανικού, που διαφέρουν τόσο στον αριθμό των διεγέρσεων, όσο και στον τύπο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τις διεγέρσεις.

### **Πρωτόκολλο 3 διεγέρσεων**

#### *Ημέρα 0 (1<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα (προερχόμενα από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος με τη διαδικασία που περιγράψαμε § 2.4) σε σωλήνες φυγοκέντρου.
2. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος HBSS σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
3. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωσή τους.
4. Επωάζουμε τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 παρουσία των HER-2(9<sub>369</sub>) και HER-2(15<sub>776</sub>), σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL το καθένα, για 5-6 ώρες στους 37°C.
5. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος HBSS σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
6. Επαναιωρούμε τα δενδριτικά κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15, σε τελική συγκέντρωση 1x10<sup>5</sup> κύτταρα/mL.
7. Παράλληλα, εκτιμούμε τη βιωσιμότητα του εναιωρήματος των μη προσκολλώμενων μονοπύρηνων/λεμφοκυττάρων και ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους σε 1x10<sup>6</sup> κύτταρα/mL.
8. Σε πλάκα καλλιέργειας 24 ή 48 φρεατίων (ανάλογα με τον αριθμό των διαθέσιμων κυττάρων), προσθέτουμε ίσους όγκους από το κάθε εναιώρημα, με

τελικό όγκο 2 mL ανά φρεάτιο (ή 1 mL για τις πλάκες 48 φρεατίων), ρυθμίζοντας την αναλογία δενδριτικών κυττάρων:λεμφοκυττάρων σε 1:10.

9. Μεταφέρουμε στον κλίβανο και επωάζουμε για τουλάχιστον 72 ώρες.
10. Παράλληλα, την ημέρα αυτή απομονώνουμε και πάλι μονοκύτταρα του ίδιου δότη και ξεκινάμε τη διαδικασία διαφοροποίησής τους σε δενδριτικά κύτταρα, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τη δεύτερη διέγερση των λεμφοκυττάρων.

#### *Ημέρες 3 και 5*

Ανανεώνουμε το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, αφαιρώντας τον μισό όγκο του θρεπτικού υλικού από κάθε φρεάτιο χωρίς να ανακινήσουμε την πλάκα και προσθέτοντας ίσο όγκο φρέσκου θρεπτικού υλικού X-VIVO 15, εμπλουτισμένου με 80 IU/mL IL-2 (ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 40 IU/mL).

#### *Ημέρα 7 (2<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα (βήμα 10) και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1-6 της ημέρας 0.
2. Συλλέγουμε τα λεμφοκύτταρα, που έχουν ήδη διεγερθεί μία φορά, τα μεταφέρουμε σε σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
3. Επαναιωρούμε σε X-VIVO 15, προσδιορίζουμε την βιωσιμότητα και ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL.
4. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 8-10 της ημέρας 0.

#### *Ημέρες 10 και 12*

Επαναλαμβάνουμε τα βήματα της ημέρας 3.

#### *Ημέρα 14 (3<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2-5 της ημέρας 0. Παράλληλα, κρατάμε μία ποσότητα ώριμων δενδριτικών κυττάρων χωρίς να την επωάσουμε με τα πεπτίδια της HER-2/neu, καθώς αυτά τα «αφόρτωτα» δενδριτικά κύτταρα θα αποτελέσουν τον αρνητικό μάρτυρα της δοκιμασίας μας.
2. Συλλέγουμε τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα και τα φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
3. Επαναιωρούμε σε 200  $\mu$ L θρεπτικού υλικού X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε την βιωσιμότητα και τον αριθμό τους.
4. Με βάση των αριθμό των λεμφοκυττάρων, υπολογίζουμε τον αριθμό των «φορτωμένων» και «αφόρτωτων» δενδριτικών κυττάρων που θα χρειαστούμε (έτσι ώστε να επιτύχουμε αναλογία δενδριτικών κυττάρων:λεμφοκυττάρων 1:10). Και στις δύο κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων, ρυθμίζουμε τα κύτταρα σε τελικό όγκο 100  $\mu$ L θρεπτικού υλικού X-VIVO 15.
5. Σε μικροπλάκα 96 φρεατίων, με πυθμένα σχήματος U, προσθέτουμε σε 2 φρεάτια 100  $\mu$ L του εναιωρήματος των λεμφοκυττάρων.



6. Προσθέτουμε στη συνέχεια το εναιώρημα των «αφόρτωτων» δενδριτικών κυττάρων στο ένα φρεάτιο (αρνητικός μάρτυρας) και το εναιώρημα των «φορτωμένων» στο δεύτερο φρεάτιο.
7. Συμπληρώνουμε με 100  $\mu\text{L}$  θρεπτικού υλικού X-VIVO 15, που περιέχουν 0,3  $\mu\text{L}$  Golgi-Plug, έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο να είναι 300  $\mu\text{L}$  και η τελική αραίωση του Golgi-Plug 1x. Στο σημείο αυτό να τονίσουμε ότι η προσθήκη του Golgi-Plug είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς το διάλυμα αυτό περιέχει την δραστική ουσία μπρεφελδίνη Α (brefeldin A), η οποία προκαλεί αναστολή της έκκρισης των παραγόμενων πρωτεϊνών/κυτταροκινών μέσω του συστήματος Golgi, έτσι ώστε να γίνει δυνατή η ανίχνευσή τους ενδοκυτταρικά με κυτταρομετρία ροής σε επόμενο βήμα. Σε περίπτωση που θέλουμε να εκτιμήσουμε και την κυτταροτοξική ικανότητα των διεγερμένων T κυττάρων, στο σημείο αυτό προστίθεται και κατάλληλη ποσότητα του αντισώματος έναντι του CD107a σε κάθε φρεάτιο. Το μόριο αυτό αποτελεί δείκτη της αποκοκκίωσης των κυτταροτοξικών κυττάρων και ως εκ τούτου είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής τους ικανότητας.
8. Μεταφέρουμε την πλάκα στον κλίβανο και αφήνουμε να επωαστεί για μέγιστο χρονικό διάστημα 12 ωρών.
9. Τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί εκτίμηση της παραγωγής κυτταροκινών με ενδοκυτταρική χρώση και κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται σε επόμενη ενότητα (§2.11).

#### **Πρωτόκολλο 4 διεγέρσεων**

Στο πρωτόκολλο αυτό, για τις 3 πρώτες διεγέρσεις ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Η εκτίμηση, όμως, της ενδοκυτταρικής παραγωγής των κυτταροκινών γίνεται μετά από μία τέταρτη διέγερση με αυτόλογα μονοπύρρηνα, εκ των οποίων τα μονοκύτταρα θα αναλάβουν το ρόλο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Για να ξεχωρίσουμε, όμως, τα λεμφοκύτταρα που συμπεριλαμβάνονται στα μονοπύρρηνα από τα ήδη διεγερθέντα λεμφοκύτταρα, πριν συνεπιάσουμε τα δύο κυτταρικά εναιωρήματα, σημαίνουμε τα μονοπύρρηνα ενδοκυτταρικά με την φθορίζουσα χρωστική CFSE. Αυτό είναι απαραίτητο, καθώς στην ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την εκτίμηση των παραγόμενων κυτταροκινών από τα διεγερμένα T κύτταρα, πρέπει να εξαιρεθούν τα μη διεγερμένα λεμφοκύτταρα. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

##### *Ημέρες 0-12*

Εργαζόμαστε όπως και στο προηγούμενο πρωτόκολλο.

##### *Ημέρα 14 (3<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα, φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά και επαναιωρούμε σε τελική συγκέντρωση  $1 \times 10^5$  κύτταρα/mL.
2. Συλλέγουμε τα λεμφοκύτταρα, που έχουν διεγερθεί δύο φορές, φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά και επαναιωρούμε σε τελική συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL.
3. Σε πλάκα καλλιέργειας 24 (ή 48) φρεατίων, προσθέτουμε ίσους όγκους από το κάθε εναιώρημα, με τελικό όγκο 2 mL ανά φρεάτιο (ή 1 mL για τις πλάκες 48

φρεατίων), επιτυγχάνοντας αναλογία δενδριτικών κυττάρων:λεμφοκυττάρων 1:10.

4. Μεταφέρουμε στον κλίβανο και επωάζουμε για τουλάχιστον 72 ώρες.

*Ημέρες 17 και 19*

Ανανεώνουμε το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, αφαιρώντας τον μισό όγκο του θρεπτικού υλικού από κάθε φρεάτιο χωρίς να ανακινήσουμε την πλάκα και προσθέτοντας ίσο όγκο φρέσκου θρεπτικού υλικού X-VIVO 15, εμπλουτισμένου με 80 IU/mL IL-2 (ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 40 IU/mL).

*Ημέρα 21 (4<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα και τα φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
2. Επαναιωρούμε σε 200  $\mu$ L θρεπτικού υλικού X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε την βιωσιμότητα και τον αριθμό τους.
3. Αποψύχουμε αυτόλογα μονοπύρηνα (βλ. διαδικασία απόψυξης, §2.3).
4. Ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους σε 0,5-10x10<sup>6</sup> κύτταρα/mL σε DPBS-FBS.
5. Αραιώνουμε το αρχικό διάλυμα των 5 mM CFSE 1:100 σε DPBS, ώστε η νέα συγκέντρωση να είναι 50  $\mu$ M.
6. Για κάθε 1 mL εναιωρήματος κυττάρων που θέλουμε να σημάνουμε προσθέτουμε 110  $\mu$ L του διαλύματος CFSE, συγκέντρωσης 50  $\mu$ M, ώστε η τελική συγκέντρωσή του μέσα στο εναιώρημα να είναι 5  $\mu$ M.
7. Αναδεύουμε αμέσως και επωάζουμε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προσθέτουμε δεκαπλάσιο (10x) όγκο διαλύματος DPBS-FBS και φυγοκεντρούμε αμέσως σε 300xg για 5 λεπτά σε 20°C.
9. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 8 δύο φορές.
10. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15.
11. Φυγοκεντρούμε σε 300xg για 5 λεπτά σε 20°C.
12. Επαναιωρούμε σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωση του εναιωρήματος.
13. Επωάζουμε τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15, παρουσία των HER-2(9<sub>369</sub>) και HER-2(15<sub>776</sub>), σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu$ g/mL το καθένα, για 5-6 ώρες στους 37°C, ενώ παράλληλα κρατάμε και μία ποσότητα «αφόρτωτων» μονοπύρηνων, που θα αποτελέσουν τον αρνητικό μάρτυρα για τη δοκιμασία μας.
14. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος HBSS σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
15. Επαναιωρούμε τα μονοπύρηνα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 και εκτιμούμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωσή τους.
16. Με βάση των αριθμό των λεμφοκυττάρων, υπολογίζουμε τον αριθμό των «φορτωμένων» και «αφόρτωτων» μονοπύρηνων που θα χρειαστούμε (έτσι ώστε να επιτύχουμε αναλογία μονοπύρηνων:λεμφοκυττάρων 2:1). Και στις δύο

κατηγορίες μονοπύρηνων, ρυθμίζουμε τα κύτταρα σε τελικό όγκο 100  $\mu\text{L}$  θρεπτικού υλικού X-VIVO 15.

17. Σε μικροπλάκα 96 φρεατίων, με πυθμένα σχήματος U, προσθέτουμε σε 2 φρεάτια, 100  $\mu\text{L}$  του εναιωρήματος των λεμφοκυττάρων.
  18. Προσθέτουμε στη συνέχεια το εναιώρημα των «αφόρτωτων» μονοπύρηνων στο ένα φρεάτιο (αρνητικός μάρτυρας) και το εναιώρημα των «φορτωμένων» στο δεύτερο φρεάτιο.
  19. Συμπληρώνουμε με 100  $\mu\text{L}$  θρεπτικού υλικού X-VIVO 15, που περιέχουν 0,3  $\mu\text{L}$  Golgi-Plug, έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο να είναι 300  $\mu\text{L}$  και η τελική αραιώση του Golgi-Plug 1x. Σε περίπτωση που θέλουμε να εκτιμήσουμε και την κυτταροτοξική ικανότητα των διεγερμένων T κυττάρων, στο σημείο αυτό προστίθεται και κατάλληλη ποσότητα του αντισώματος έναντι του CD107a σε κάθε φρεάτιο.
  20. Μεταφέρουμε την πλάκα στον κλίβανο και αφήνουμε να επωαστεί για μέγιστο χρονικό διάστημα 12 ωρών.
  21. Τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί εκτίμηση της παραγωγής κυτταροκινών με ενδοκυτταρική χρώση και κυτταρομετρία ροής.
- Για τη διέγερση των T κυττάρων μνήμης, επιλέχθηκαν ως αντιγόνα μείγματα πεπτιδίων που προέρχονται από την αλληλουχία των πρωτεϊνών pp65 και IE-1 του ανθρώπινου CMV. Αυτά τα μείγματα περιλαμβάνουν πεπτίδια μήκους 15 αμινοξικών καταλοίπων, με αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες, κατάλληλα σχεδιασμένα για να μπορούν να παρουσιαστούν απ'ευθείας σε μόρια MHC τάξης II, αλλά και σε μόρια MHC τάξης I μετά από επεξεργασία. Επίσης, λόγω της πληθώρας των αλληλουχιών που συναντώνται στα μείγματα αυτά δεν υπάρχει περιορισμός ως προς τα αλληλόμορφα που πρέπει να εκφράζουν τα κύτταρα ενός δότη, καθώς υπάρχουν μοτίβα που μπορούν να προσδεθούν επιτυχώς σε όλα τα αλληλόμορφα των MHC μορίων. Οι δότες που επιλέχθηκαν για να μελετήσουμε την ενεργοποίηση T κυττάρων μνήμης είχαν προσβληθεί ήδη από τον ιό CMV και επομένως διέθεταν πληθυσμούς T κυττάρων μνήμης που μπορούσαν να αναγνωρίσουν τα πεπτίδια-αντιγόνα τα οποία χρησιμοποιήσαμε σε αυτή τη δοκιμασία. Επιπλέον, επειδή τα κύτταρα μνήμης έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούνται γρήγορα σε επόμενη επαφή με το ίδιο αντιγόνο, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε περιελάμβανε μόνο 2 διεγέρσεις: η πρώτη έγινε παρουσία δενδριτικών κυττάρων και η δεύτερη παρουσία μονοκυττάρων, μετά το πέρασ 10 ημερών. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε ήταν αναλυτικά το εξής:

*Ημέρα 0 (1<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα σε σωλήνες φυγοκέντρου.
2. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος HBSS σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
3. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωσή τους.

4. Επωάζουμε τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 παρουσία του πεπτιδικού μείγματος των πρωτεϊνών IE-1 και pp65, σε τελική συγκέντρωση 10 µg/mL το καθένα, για 5-6 ώρες στους 37°C.
5. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος HBSS σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
6. Επαναιωρούμε τα δενδριτικά κύτταρα σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15, σε τελική συγκέντρωση  $1 \times 10^5$  κύτταρα/mL.
7. Παράλληλα, εκτιμούμε τη βιωσιμότητα του εναιωρήματος των μη προσκολλώμενων μονοπύρηνων/λεμφοκυττάρων και ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL.
8. Σε πλάκα καλλιέργειας 24 φρεατίων (ή 48, ανάλογα με τον αριθμό των διαθέσιμων κυττάρων), προσθέτουμε ίσους όγκους από το κάθε εναιώρημα, με τελικό όγκο 2 mL ανά φρεάτιο (ή 1 mL για τις πλάκες 48 φρεατίων), επιτυγχάνοντας έτσι αναλογία δενδριτικών κυττάρων:λεμφοκυττάρων 1:10.
9. Μεταφέρουμε στον κλίβανο και επωάζουμε για τουλάχιστον 72 ώρες.

*Ημέρες 4, 6 και 8*

Ανανεώνουμε το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, αφαιρώντας τον μισό όγκο του θρεπτικού υλικού από κάθε φρεάτιο χωρίς να ανακινήσουμε την πλάκα και προσθέτοντας ίσο όγκο φρέσκου X-VIVO 15, εμπλουτισμένου με 80 IU/mL IL-2 (ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 40 IU/mL).

*Ημέρα 10 (2<sup>η</sup> διέγερση)*

1. Συλλέγουμε τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα και τα φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
2. Επαναιωρούμε σε 200 µL θρεπτικού υλικού X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα και τον αριθμό τους.
3. Αποψύχουμε αυτόλογα μονοπύρηνια (βλ. διαδικασία απόψυξης, §2.3) και τα σημαίνουμε ενδοκυτταρικά με τη χρωστική CFSE, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
4. Επαναιωρούμε σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 και προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωση των μονοπύρηνων.
5. Επωάζουμε τα μονοπύρηνια σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 παρουσία του πεπτιδικού μείγματος των πρωτεϊνών IE-1 και pp65, σε τελική συγκέντρωση 10 µg/mL το καθένα, για 5-6 ώρες στους 37°C.
6. Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος HBSS σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 200xg για 5 λεπτά.
7. Επαναιωρούμε τα μονοπύρηνια σε θρεπτικό υλικό X-VIVO 15 και εκτιμούμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωσή τους.
8. Με βάση τον αριθμό των λεμφοκυττάρων, υπολογίζουμε τον αριθμό των «φορτωμένων» και «αφόρτωτων» μονοπύρηνων που θα χρειαστούμε (έτσι ώστε να επιτύχουμε αναλογία μονοπύρηνων:λεμφοκυττάρων 2:1). Και στις δύο κατηγορίες μονοπύρηνων, ρυθμίζουμε τα κύτταρα σε τελικό όγκο 100 µL θρεπτικού υλικού X-VIVO 15.

9. Σε μικροπλάκα 96 φρεατίων, με πυθμένα σχήματος U, προσθέτουμε σε 2 φρεάτια, 100  $\mu\text{L}$  του εναιωρήματος των λεμφοκυττάρων.
10. Προσθέτουμε στη συνέχεια το εναιώρημα των «αφόρτωτων» μονοπύρηνων στο ένα φρεάτιο (αρνητικός μάρτυρας) και το εναιώρημα των «φορτωμένων» στο δεύτερο φρεάτιο.
11. Συμπληρώνουμε με 100  $\mu\text{L}$  θρεπτικού υλικού X-VIVO 15, που περιέχουν 0,3  $\mu\text{L}$  Golgi-Plug, έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο να είναι 300  $\mu\text{L}$  και η τελική αραιώση του Golgi-Plug 1x.
12. Μεταφέρουμε την πλάκα στον κλίβανο και αφήνουμε να επωαστεί για μέγιστο χρονικό διάστημα 12 ωρών.
13. Τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί εκτίμηση της παραγωγής κυτταροκινών με ενδοκυτταρική χρώση και κυτταρομετρία ροής.

## 2.11. Έλεγχος παραγωγής κυτταροκινών από ενεργοποιημένα T κύτταρα με ενδοκυτταρική χρώση και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής

Η επιτυχημένη ενεργοποίηση των T κυττάρων παρουσία αντιγόνων οδηγεί σε παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, οι οποίες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη μιας ανοσολογικής απάντησης. Οι κυτταροκίνες δεν είναι μόρια που συντίθενται εκ των προτέρων, αλλά αντίθετα παράγονται ταχύτατα και εκκρίνονται ως αποτέλεσμα κυτταρικής ενεργοποίησης. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση/εκτίμησή τους πρέπει να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ενεργοποίησή των κυττάρων που τις παράγουν. Η ενδοκυτταρική χρώση κυτταροκινών (intracellular cytokine staining, ICS) είναι μία ιδιαίτερα χρήσιμη και ευρέως διαδομένη μέθοδος που βασίζεται στην κυτταρομετρία ροής και η οποία ανιχνεύει την παραγωγή και συσσώρευση των κυτταροκινών στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετά την κυτταρική ενεργοποίηση. Αυτό καθίσταται εφικτό με τη χρήση της μπρεφελδίνης A, η οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι μία ουσία που αποτρέπει την έκκριση των κυτταροκινών και οδηγεί στη συσσώρευσή τους εντός του κυττάρου και συγκεκριμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το σημαντικό πλεονέκτημα της ενδοκυτταρικής χρώσης, έναντι άλλων μεθόδων ανίχνευσης κυτταροκινών όπως η ELISA, είναι ότι μπορεί να συνδυαστεί και με πρωτόκολλα εξωκυτταρικής χρώσης, καθιστώντας δυνατό τον προσδιορισμό του τύπου των κυττάρων που εκκρίνουν την κάθε κυτταροκίνη, μέσω της χρήσης κατάλληλων μορίων-δεικτών για την ταυτοποίηση του ανοσοφαινοτύπου τους.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα ενεργοποιημένων T κυττάρων
- Διάλυμα PFEA
- Διάλυμα μονιμοποίησης και διάτρησης των κυττάρων Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences)
- Διάλυμα διάτρησης και έκπλυσης των κυττάρων Perm/Wash™, αραιώσης 10x (BD Biosciences)
- Διάλυμα GAMUNEX
- Διάλυμα EMA
- Αντισώματα τάξης IgG1
  - έναντι του μορίου CD4/PerCp (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου CD8/APC-H7 (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου IFN-γ/Pe-Cy7 (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου TNF-α/Brilliant Violet 421 (BioLegend)
  - έναντι του μορίου IL-4/APC (BD Biosciences)
  - έναντι του μορίου IL-10/PE (eBioscience)
  - έναντι του μορίου IL-17/PerCp-Cy5.5 (eBioscience)
- Αντίσωμα τάξης IgG2a έναντι του μορίου IL-2/Alexa 700 (BioLegend)
- Αντίσωμα τάξης IgG2b έναντι του μορίου CD3/E fluor (eBioscience)
- Σωλήνες πολυστυρενίου όγκου 5 mL

- Κυτταρόμετρο ροής LSRII

### **Πρωτόκολλο εργασίας**

1. Μετά το πέρας των 12 ωρών από την τελευταία διέγερση, μεταφέρουμε τα κύτταρα σε συμβατούς με το κυτταρόμετρο σωλήνες ( $0,5 - 2 \times 10^6$  κύτταρα/σωλήνα) και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
2. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 50  $\mu$ L διαλύματος PFEA, που περιέχει GAMUNEX και EMA σε τελικές συγκεντρώσεις 1% (v/v) και 0,1  $\mu$ g/mL, αντίστοιχα.
3. Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο, κάτω από λαμπτήρα Neon.
4. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος PFEA σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
5. Προσθέτουμε τις κατάλληλες ποσότητες από τα αντισώματα για την εξωκυτταρική χρώση (5  $\mu$ L/CD3, 10  $\mu$ L/CD4 και 3  $\mu$ L/CD8) και συμπληρώνουμε με διάλυμα PFEA μέχρι τα 50  $\mu$ L, ανά σωλήνα. Το CD107a είχε προστεθεί από την αρχή της 12ωρης επώασης.
6. Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.
7. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος PFEA σε κάθε σωλήνα και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
8. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε το βήμα 8.
9. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα σε 100  $\mu$ L διαλύματος Cytofix/Cytoperm™ ανά σωλήνα. Το διάλυμα αυτό περιέχει φορμαλδεΐδη και σαπονίνη, για να επιτευχθεί η μονιμοποίηση και η διάτρηση των κυττάρων, αντίστοιχα.
10. Επωάζουμε για 15 λεπτά στον πάγο σε σκοτάδι.
11. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος Perm/Wash™, αραίωσης 1x σε απεσταγμένο νερό και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
12. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 11.
13. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα σε 1 mL διαλύματος Perm/Wash™ αραίωσης 1x για 15 λεπτά στον πάγο. Επειδή η επαγόμενη από τη σαπονίνη διάτρηση των κυττάρων είναι μία αναστρέψιμη διαδικασία, είναι ιδιαίτερα σημαντικό τα κύτταρα να βρίσκονται καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε διάλυμα που περιέχει σαπονίνη, όπως το Perm/Wash™.
14. Φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
15. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στη συνέχεια προσθέτουμε τις κατάλληλες ποσότητες από τα αντισώματα για την ενδοκυτταρική σήμανση (5  $\mu$ L/IFN- $\gamma$ , 4  $\mu$ L/TNF- $\alpha$ , 0,5  $\mu$ L/IL-2, 1  $\mu$ L/IL-10, 4  $\mu$ L/IL-10, 3  $\mu$ L/IL-17) και συμπληρώνουμε με διάλυμα Perm/Wash™ μέχρι τα 50  $\mu$ L σε κάθε σωλήνα.
16. Επωάζουμε για 30 λεπτά στον πάγο.
17. Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος Perm/Wash™, αραίωσης 1x και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.

18. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 17.
19. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε 150  $\mu\text{L}$  διαλύματος PFEA.
20. Προχωράμε αμέσως σε ανάλυση στο κυτταρόμετρο (LSRII).



## 2.12. Δοκιμασία ελέγχου της κυτταροτοξικότητας

Με την δοκιμασία αυτή είναι δυνατή η εκτίμηση της κυτταρομεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας, της ικανότητας, δηλαδή, κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζουν και να λύουν κύτταρα τα οποία «αντιλαμβάνονται» ως κύτταρα-στόχους. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στη συνεπώαση κυττάρων-τελεστών και ενδοκυτταρικά σημασμένων με ραδιενεργό χρώμιο κυττάρων-στόχων. Ως κύτταρα-τελεστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν τύποι κυττάρων των οποίων την κυτταροτοξικότητα επιθυμούμε να μελετήσουμε, όπως NK και τα CD8+ T κύτταρα, απομονωμένα σε «καθαρούς» πληθυσμούς ή σε εναιωρήματα μονοπύρηνων, αλλά και σε ολικά σπληνοκύτταρα απομονωμένα από πειραματόζωα. Τα κύτταρα-στόχοι που επιλέγονται για τη δοκιμασία εξαρτώνται άμεσα από τον τύπο των κυττάρων-τελεστών που θα μελετηθούν. Αναλυτικότερα, για τη μελέτη της NK κυτταροτοξικότητας πρέπει να επιλεχθούν κύτταρα-στόχοι ευαίσθητα σε λύση από NK κύτταρα που δεν θα εκφράζουν MHC μόρια. Αντίθετα, για τη μελέτη της CD8+ T κυτταροτοξικότητας, η οποία περιορίζεται από MHC μόρια τάξης I, θα χρησιμοποιηθούν κύτταρα-στόχοι που εκφράζουν τα αντιγόνα έναντι των οποίων διεγέρθηκαν τα κύτταρα-τελεστές μέσω MHC μορίων. Μετά τη συνεπώαση των δύο κυτταρικών εναιωρημάτων για το επιθυμητό χρονικό διάστημα, το υπερκείμενο υλικό της καλλιέργειας αφαιρείται και ακολουθεί μέτρηση της ραδιενέργειας, η οποία είναι ανάλογη του ραδιενεργού χρωμίου που απελευθερώθηκε στο υπερκείμενο της καλλιέργειας και επομένως ανάλογη του ποσοστού των κυττάρων-στόχων που λύθηκαν.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα ενεργοποιημένων T κυττάρων ή ολικών σπληνοκυττάρων απομονωμένων από μύες
- Εναιώρημα ανθρώπινης ή ποντικίσιας κυτταρικής σειράς προς χρήση ως κύτταρα-στόχοι
- Συνθετικό πεπτίδιο HER-2(9<sub>369</sub>)
- Συνθετικό πεπτίδιο του τμήματος 369-377 της τυροσινάσης, [tyrosinase(9<sub>369-377</sub>), tyr(9<sub>369</sub>)] (συντέθηκε από τον Καθ. H. Kalbacher, Πανεπιστήμιο Tuebingen)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- FBS
- Διάλυμα 0,1 N HCl (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα ραδιενεργού άλατος χρωμίου Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (1 mCi/mL, Amersham Biosciences)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των ανθρώπινων MHC μορίων τάξης I (κλώνος W6/32), προσφορά του Καθ. S. Stevanovic, Πανεπιστήμιο Tuebingen
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U
- Σωλήνες πολυστυρενίου μίας χρήσης 7,5 x 3,0 mm (Greiner, Bio-One)
- Συσκευή συνεχούς κυκλικής κίνησης

- Μετρητής γ-ακτινοβολίας (1275 Mini-gamma, LKB Wallac)

### **Πρωτόκολλο εργασίας**

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των παρθένων CD8+ T κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν με αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα, παρουσία του πεπτιδίου HER-2(9<sub>369</sub>), είναι απαραίτητο τα κύτταρα-στόχοι να εκφράζουν το πεπτίδιο αυτό μέσω HLA-A2 μορίων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούμε κύτταρα της καρκινικής σειράς T2, τα οποία εκφράζουν το αλληλόμορφο HLA-A2, τα οποία «φορτώνουμε» με το πεπτίδιο HER-2(9<sub>369</sub>) πριν τη συνεπώαση με τα κύτταρα-τελεστές. Το πρωτόκολλο για την διαδικασία αυτή ήταν το εξής:

#### **Φόρτωμα T2 κυττάρων**

1. Συλλέγουμε κύτταρα καλλιέργειας T2 και τα μεταφέρουμε σε σωλήνα φυγοκέντρου.
2. Φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
3. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
4. Εκτιμούμε τη βιωσιμότητα και ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL.
5. Επωάζουμε τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων με το πεπτίδιο HER-2(9<sub>369</sub>) ή το πεπτίδιο tyr(9<sub>369</sub>), σε τελική συγκέντρωση 10 µg/mL για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και σε συσκευή συνεχούς κυκλικής κίνησης.
6. Φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
7. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, επαναιωρούμε το ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρούμε ξανά στα 300xg για 5 λεπτά.
8. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα αυτά θα χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα-στόχοι και θα χρωμιωθούν με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

#### **Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας**

1. Ενδοκυτταρική σήμανση των κυττάρων-στόχων με ραδιενεργό χρώμιο:
  - Μεταφέρουμε επαρκή ποσότητα της καλλιέργειας των κυττάρων-στόχων σε σωλήνα falcon. Τα κύτταρα είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση (αν τα κύτταρα δεν βρίσκονται σε εναιώρημα, πρέπει να προηγηθεί η αποκόλλησή τους από τις φλάσκες καλλιέργειας με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα §2.3).
  - Προσδιορίζουμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Μόνο κυτταρικά εναιωρήματα με >95% βιωσιμότητα μπορούν να ενσωματώσουν σταθερά σημαντική ποσότητα χρωμίου, αλλά και να παραμείνουν ζωντανά (> 75%) μετά το πέρας της διαδικασίας χρωμίωσης.
  - Φυγοκεντρούμε τον απαραίτητο όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος που περιέχει  $1 \times 10^6$  κύτταρα-στόχους στα 300xg για 5 λεπτά.
  - Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε 20 µL FBS.

- Προσθέτουμε στο πυκνό κυτταρικό ελαιώρημα 15 - 25  $\mu\text{L}$  διαλύματος ραδιενεργού άλατος του χρωμίου (ενεργότητας 5 mCi/mL) ανά  $1 \times 10^6$  κύτταρα-στόχους.
  - Επωάζουμε στους 37°C για 60-90 λεπτά, αναδεύοντας το ελαιώρημα κάθε 15 λεπτά περίπου.
  - Προσθέτουμε στο σωλήνα περίσσεια πλήρους θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
  - Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα-στόχους σε 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
  - Επωάζουμε στους 37°C για 30 λεπτά, αναδεύοντας το ελαιώρημα κάθε 15 λεπτά περίπου.
  - Προσθέτουμε στο σωλήνα περίσσεια πλήρους θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
  - Αποχύνουμε το υπερκείμενο, επαναιωρούμε τα κύτταρα-στόχους σε 1 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση και τη βιωσιμότητά τους.
  - Ρυθμίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων-στόχων στα 50.000 κύτταρα/mL.
2. Συλλέγουμε τα κύτταρα-τελεστές που βρίσκονται σε καλλιέργεια ή μετά από την απομόνωσή τους από τον σπλήνα, στην περίπτωση ολικών σπληνοκυττάρων.
  3. Εκτιμούμε τη βιωσιμότητα της καλλιέργειας και με πλήρες θρεπτικό υλικό ρυθμίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων-τελεστών ανάλογα με την αναλογία τελεστών:στόχους που θέλουμε να επιτύχουμε (π.χ. για αναλογία 10:1 ρυθμίζουμε τη συγκέντρωση στα  $0,5 \times 10^6$  κύτταρα/mL). Στα συγκεκριμένα πειράματα, για τα CD8+ T κύτταρα επιλέχθηκαν οι αναλογίες 5:1, 10:1, 20:1 και 40:1 και για τα ολικά σπληνοκύτταρα ποντικών 50:1. Αξίζει να σημειώσουμε ότι κάθε φορά τροποποιείται μόνο ο αριθμός των κυττάρων-τελεστών, ενώ τα κύτταρα-στόχοι παραμένουν σταθερά στα 5.000 ανά φρεάτιο.
  4. Σε μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων, προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος κυττάρων-τελεστών και 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος κυττάρων-στόχων (δηλαδή 50.000 κύτταρα-τελεστές και 5.000 κύτταρα-στόχους για την αναλογία 10:1). Σε πειράματα παρεμπόδισης κυτταροτοξικότητας με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι των μορίων MHC τάξης I, το αντίσωμα προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για όλη την διάρκεια της επώασης.
  5. Παράλληλα, τοποθετούμε σε 10 φρεάτια 100  $\mu\text{L}$  ελαιώρηματος κυττάρων-στόχων, και στα πρώτα πέντε προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  πλήρους θρεπτικού υλικού και στα υπόλοιπα πέντε φρεάτια 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0,1 N HCl.
  6. Επωάζουμε στους 37°C για 18 ώρες.
  7. Φυγοκεντρούμε τη μικροπλάκα στα 300xg για 5 λεπτά.
  8. Μεταφέρουμε 100  $\mu\text{L}$  υπερκείμενου από κάθε φρεάτιο σε πλαστικό σωλήνα συμβατό με τον μετρητή γ-ακτινοβολίας και μετράμε τη ραδιενέργεια (σε κρούσεις ανά λεπτό, cpm) (**Εικόνα 2.5**).

9. Το % ποσοστό της κυτταροτοξικότητας που παρουσίασαν τα κύτταρα-τελεστές υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

% ποσοστό κυτταροτοξικότητας =

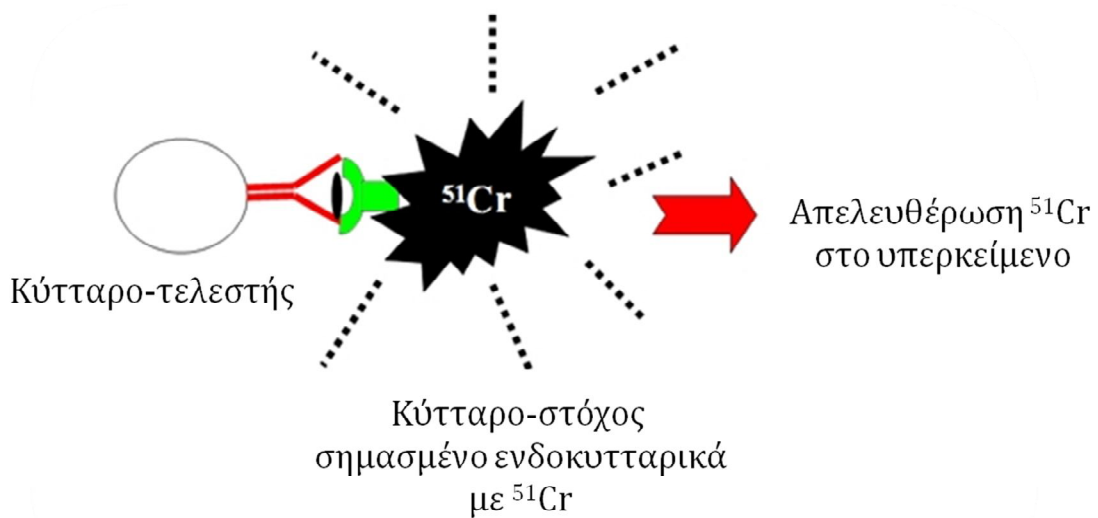
$$\frac{(\text{cpm φρεατίου}^1 - \text{cpm αυθόρμητης έκλυσης}^2)}{(\text{cpm ολικής λύσης}^3 - \text{cpm αυθόρμητης έκλυσης}^2)}$$

όπου:

<sup>1</sup> = φρεάτιο στο οποίο έχουν συνεπωαστεί κύτταρα-τελεστές και κύτταρα-στόχοι,

<sup>2</sup> = φρεάτιο στο οποίο κύτταρα-στόχοι έχουν επωαστεί παρουσία μόνο θρεπτικού υλικού,

<sup>3</sup> = φρεάτιο στο οποίο κύτταρα-στόχοι έχουν επωαστεί με διάλυμα 0,1 N HCl.



**Εικόνα 2.5.** Σχηματική απεικόνιση της πρότυπης δοκιμασίας απελευθέρωσης  $^{51}\text{Cr}$ . Τα επιθυμητά κύτταρα-στόχοι σημαίνονται ενδοκυτταρικά με  $^{51}\text{Cr}$  και συνεπάζονται με τα κύτταρα-τελεστές για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Λύση των κυττάρων-στόχων από τα κύτταρα-τελεστές θα οδηγήσει σε απελευθέρωση του  $^{51}\text{Cr}$  στο υπερκείμενο της καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το υπερκείμενο συλλέγεται και μετρείται σε μετρητή γ-ακτινοβολίας για την εκτίμηση των κρούσεων ανά λεπτό (cpm).

### 2.13. Δοκιμασία ελέγχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Οι δοκιμασίες ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτρέπουν τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται απουσία ή παρουσία ενός ή περισσότερων διεγερτικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα ένα αντιγόνο ή μία κυτταροκίνη. Η δοκιμασία ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης είναι μία απλή, αξιόπιστη και ίσως η πιο διαδεδομένη δοκιμασία εκτίμησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μέθοδος βασίζεται στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού (τριτιωμένης) θυμιδίνης στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες του DNA κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται μετρητής β-ακτινοβολίας για να μετρηθεί η ραδιενέργεια που ενσωματώθηκε στο DNA των κυττάρων, με σκοπό τον προσδιορισμό της έκτασης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκλήθηκε από τον εξεταζόμενο διεγερτικό παράγοντα. Σύμφωνα με τη μέθοδο, κύτταρα-διεγέρτες συνεπάζονται για 5 μέρες με κύτταρα-απαντητές, παρουσία ή απουσία αντιγόνου, σε επιθυμητή αναλογία, και στο τέλος της επώασης προστίθεται η θυμιδίνη. Έτσι λοιπόν μπορούμε να εκτιμήσουμε τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων που επάγεται παρουσία κυττάρων-διεγερτών (π.χ. δενδριτικά κύτταρα) και παρουσία του αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε για τη διέγερσή τους.

#### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα ώριμων δενδριτικών κυττάρων
- Συνθετικό πεπτίδιο HER-2(15776)
- Συνθετικό πεπτίδιο του τμήματος 448-462 της τυροσινάσης, [tyrosinase(15<sub>448-462</sub>), tyr(15<sub>448</sub>)], που προσδένεται σε HLA-DR4 αλληλόμορφα (συντέθηκε από τον Καθ. H. Kalbacher, Πανεπιστήμιο Tuebingen)
- RPMI-1640
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των ανθρώπινων MHC μορίων τάξης II (κλώνος L243), προσφορά του Καθ. S. Stevanovic, Πανεπιστήμιο Tuebingen
- Διάλυμα ραδιενεργού τριτιωμένης ([<sup>3</sup>H]μεθυλ)-θυμιδίνης (1 mCi/mL, Amersham Biosciences)
- Φίλτρα με ίνες γυαλιού (Sigma-Aldrich)
- Υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid, Sigma-Aldrich)
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U
- Ημιαυτόματος συλλέκτης κυττάρων (Skatron Inc.)
- Μετρητής β-ακτινοβολίας (Packard)

#### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Επωάζουμε τα δενδριτικά κύτταρα με το πεπτίδιο HER-2(15776) ή το tyr(15<sub>448</sub>) σε τελική συγκέντρωση 50 μg/mL, για 5-6 ώρες, ώστε να «φορτώσουμε» τα

δενδριτικά κύτταρα με τα αντιγόνα αυτά, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Παράλληλα κρατάμε και μία ποσότητα δενδριτικών κυττάρων χωρίς να τα επωάσουμε με αντιγόνα, τα οποία θα αποτελέσουν και τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος. Τα δενδριτικά κύτταρα θα δράσουν ως κύτταρα-διεγέρτες. Ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους σε  $2 \times 10^5$  κύτταρα/mL.

2. Συλλέγουμε τα T κύτταρα από τις καλλιέργειες ενεργοποίησης και τα μεταφέρουμε σε σωλήνα φυγοκέντρου.
3. Φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά.
4. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
5. Παρατηρούμε τη βιωσιμότητα και ρυθμίζουμε τη συγκέντρωσή τους με πλήρες θρεπτικό υλικό σε  $2 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Τα κύτταρα αυτά θα αποτελέσουν τα κύτταρα-απαντητές.
6. Σε μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων, προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο 100  $\mu$ L διαλύματος κυττάρων-απαντητών και 100  $\mu$ L διαλύματος κυττάρων-διεγερτών, δηλαδή 200.000 και 20.000 κύτταρα, αντίστοιχα σε κάθε φρεάτιο, επιτυγχάνοντας τελική αναλογία απαντητών προς διεγέρτες 10:1. Για την μελέτη άλλων αναλογιών, τροποποιούμε μόνο τον αριθμό των απαντητών που προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο κρατώντας σταθερό τον αριθμό των κυττάρων-διεγερτών.
7. Στη μικροπλάκα τοποθετούμε σε τρία φρεάτια μόνο 100  $\mu$ L διαλύματος κυττάρων-απαντητών και σε άλλα τρία φρεάτια μόνο 100  $\mu$ L διαλύματος κυττάρων-διεγερτών, συμπληρώνοντας μέχρι τον τελικό όγκο των 200  $\mu$ L με πλήρες θρεπτικό υλικό.
8. Επωάζουμε στους 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για 5 ημέρες. Σε πειράματα παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι των μορίων MHC τάξης II, το αντίσωμα προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 5  $\mu$ g/mL για όλη την διάρκεια της επώασης.
9. Τις τελευταίες 18 ώρες της καλλιέργειας, σε κάθε φρεάτιο προσθέτουμε 50  $\mu$ L RPMI-1640 (χωρίς ορό) που περιέχουν 1  $\mu$ Ci ραδιενεργού θυμιδίνης.
10. Συλλέγουμε το περιεχόμενο των φρεατίων σε φίλτρα με ίνες γυαλιού, με τη βοήθεια συλλέκτη κυττάρων και αφήνουμε τα φίλτρα μέχρι να στεγνώσουν.
11. Μεταφέρουμε τα φίλτρα σε ειδικά σωληνάρια, προσθέτουμε το υγρό σπινθηρισμού και μετράμε τη ραδιενέργεια (σε κρούσεις ανά λεπτό, cpm) σε μετρητή β-ακτινοβολίας.
12. Εκφράζουμε τα αποτελέσματα υπολογίζοντας το δείκτη διέγερσης (stimulation index, SI), ως εξής:

Δείκτης διέγερσης =  $\text{cpm}(\text{κυττάρων-απαντητών συνεπωασμένων με κύτταρα-διεγέρτες παρουσία αντιγόνων}) / \text{cpm}(\text{κυττάρων-απαντητών συνεπωασμένων με κύτταρα-διεγέρτες απουσία αντιγόνων})$

## 2.14. Εκχύλιση πεπτιδίων δεσμευμένων στην κυτταρική επιφάνεια

Τα αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται μέσω των μορίων MHC τάξης I και II στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων μπορούν να εκχυλιστούν και να απομονωθούν ακολουθώντας ένα εύκολο πρωτόκολλο. Τα κύτταρα επωάζονται σε χαμηλό pH, με τη βοήθεια κιτρικού οξέος και έτσι τα πεπτίδια αποκολλώνται από τα μόρια MHC και εκχυλίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα. Για την αφαλάτωση του διαλύματος, χρησιμοποιούμε πακεταρισμένη ρητίνη χρωματογραφίας C18 και στη συνέχεια με διάλυμα 80% (v/v) ακετονιτριλίου εκλούουμε τα πεπτίδια. Για τη συμπύκνωση του διαλύματος και απομάκρυνση του τοξικού διαλύτη, το διάλυμα λυοφιλοποιείται υπό κενό. Τέλος, για την επιλογή μόνο των μικρομοριακών πεπτιδίων χρησιμοποιείται ειδικό φίλτρο. Το τελικό μείγμα που προκύπτει (acid wash extract, AWE) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκπτυξη T κλώνων, ειδικών για την πατρική καρκινική σειρά, καθώς περιέχει το σύνολο των MHC-περιοριζόμενων επιφανειακών αντιγόνων που εκφράζει η καρκινική σειρά (Baxevanis et al., 2000).

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα κυττάρων προς απομόνωση των επιφανειακών τους πεπτιδίων
- Διάλυμα HBSS
- Ακετονιτρίλιο (Sigma-Aldrich)
- Απεσταγμένο νερό
- Κιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich)
- Όξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma-Aldrich)
- NaCl
- Στήλη χρωματογραφίας Sep-Pac C18 (Waters)
- Σύριγγες 5 mL (Greiner, Bio-One)
- Φίλτρα διαχωρισμού μορίων διακριτικής ικανότητας (cut-off) 10 kDa (Amicon Bioseparations, Millipore)
- Στατώ και τσιμπίδα στήριξης
- Λυοφιλοποιητής (SC110, Savant Instruments Inc.)

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Παρασκευάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως, σύστασης 0,131 M κιτρικό οξύ, 0,066 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,15M NaCl pH 3,0, προσθέτοντας σε 100 mL απεσταγμένου νερού 2,75 g κιτρικού οξέως, 0,94 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και 0,88 g NaCl.
2. Μεταφέρουμε την κυτταρική καλλιέργεια που μας ενδιαφέρει σε σωλήνα φυγοκέντρου και φυγοκεντρούμε στα 300xg για 5 λεπτά. Φροντίζουμε ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται πάντα σε λογαριθμική φάση αύξησης.
3. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε περίσσεια διαλύματος HBSS. Φυγοκεντρούμε ξανά στα 300xg για 5 λεπτά.

4. Απορρίπτουμε και απομακρύνουμε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο του κυτταρικού ιζήματος. Επαναιωρούμε περίπου  $2 \times 10^8$  κύτταρα/5 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέως.
5. Ανακινούμε μηχανικά συνεχώς το σωλήνα για 5 λεπτά. Εναλλακτικά, μπορούμε να αναδεύουμε με πιπέττα pasteur.
6. Φυγοκεντρούμε στα 300xg για 3 λεπτά.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα και το φυγοκεντρούμε ξανά στα 2.500xg για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C, προς απομάκρυνση των μεγάλων αδιάλυτων συστατικών του.
8. Προσαρμόζουμε στην άκρη εισόδου της στήλης με υλικό χρωματογραφίας Sep-Pac C18 μία σύριγγα των 5 mL έχοντας απομακρύνει το έμβολο και τη σταθεροποιούμε στο στατώ στήριξης.
9. Ενεργοποιούμε και εξισορροπούμε το υλικό της στήλης, αφήνοντας να περάσουν αβίαστα 10 mL καθαρής αιθανόλης, 20 mL απεσταγμένου νερού και 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος.
10. Επιστοιβάζουμε στη στήλη και αφήνουμε να περάσει αβίαστα το διάλυμα εκχύλισης της κυτταρικής καλλιέργειας.
11. Προσθέτουμε στη στήλη 5 mL διαλύματος ακετονιτριλίου 80% (v/v) και κατόπιν 2 mL απεσταγμένου νερού και με τη βοήθεια του εμβόλου της σύριγγας εκλούουμε τα προσκολληθέντα στο υλικό της στήλης πεπτίδια σε καθαρό σωλήνα. Στο τέλος, αφήνουμε να περάσουν άλλα 2 mL απεσταγμένου νερού.
12. Φυγοκεντρούμε το σωλήνα σε φυγοκεντρικό λυοφιλητή υπό κενό μέχρι τελικής ξήρανσης (για περίπου 3-4 ώρες).
13. Επαναιωρούμε το ξηρό υλικό σε 2 mL HBSS.
14. Επιστοιβάζουμε το διάλυμα σε φίλτρα διαχωρισμού μορίων διακριτικής ικανότητας (cut-off) των 10 kDa. Φυγοκεντρούμε στα 2.500xg για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία 4°C και απομονώνουμε τα μικρού (<10 kDa) μοριακού βάρους πεπτίδια σε νέο σωλήνα.
15. Μοιράζουμε το υλικό σε δείγματα μικρότερου όγκου και αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία -20°C, σημειώνοντας την αναλογία των κυττάρων/mL τελικού πεπτιδικού εκχυλίσματος.



## 2.15. *In vivo* πρωτόκολλα ενοφθαλμισμού πειραματόζων και ανοσοθεραπευτικών χορηγήσεων

Όσο διεξοδική και αν είναι η μελέτη της ανοσοενισχυτικής δράσης ενός μορίου *in vitro*, τα αποτελέσματά της πρέπει να επιβεβαιωθούν και *in vivo* σε ένα κατάλληλα επιλεγμένο μοντέλο μελέτης, καθώς το πολύπλοκο φυσιολογικό περιβάλλον ενός οργανισμού, το οποίο απουσιάζει από τα *in vitro* πειράματα, μπορεί να επηρεάσει την *in vivo* δραστηριότητα ενός μορίου. Για την καλύτερη αποτύπωση, λοιπόν, μίας νόσου έχουν αναπτυχθεί διακριτές φυλές ποντικών, κάθε μία κατάλληλη για τη διεξαγωγή διαφορετικής μελέτης, με βάση το γενετικό της υπόβαθρο. Ο ενοφθαλμισμός ποντικών συγκεκριμένων φυλών με συγγενικά κύτταρα καρκινικών σειρών οδηγεί στην ανάπτυξη συμπαγών όγκων στα πειραματόζωα, δημιουργώντας ένα μοντέλο, χρήσιμο για την *in vivo* μελέτη της δράσης ενός μορίου, με *in vitro* επιβεβαιωμένη ικανότητα να ενισχύει το κυτταρομεσολαβητικό, χυμικό ή/και φυσικό σκέλος της ανοσίας. Τα μοντέλα αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα λόγω της ευελιξίας τους, καθώς η επιθετικότητα του αναπτυσσόμενου όγκου που θα σχηματιστεί μπορεί να προσαρμοσθεί στις ανάγκες κάθε έρευνας, επιλέγοντας κατάλληλα τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων που θα ενοφθαλμιστούν. Ενοφθαλμισμός μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων, συνήθως, θα οδηγήσει στην ήπια ανάπτυξη του όγκου (σύστημα κατάλληλο για μακράς διάρκειας χορηγήσεις), ενώ χορήγηση μεγάλου αριθμού καρκινικών κυττάρων θα δώσει ένα πιο επιθετικό μοντέλο ανάπτυξης (κατάλληλο για μελέτη ραγδαία αναπτυσσόμενων τύπου καρκίνου και μεταστάσεων). Όσον αφορά το υπό μελέτη μόριο, μπορεί να χορηγηθεί στα πειραματόζωα, στην επιθυμητή δόση και μέσω της επιθυμητής οδού, αλλά η χρονική στιγμή της έναρξης της χορήγησής του θα καθορίσει αν θα μελετηθεί η προστατευτική ή η θεραπευτική του δράση έναντι του αναπτυσσόμενου όγκου. Η χορήγηση του μορίου πριν τη χορήγηση των καρκινικών κυττάρων θα ελέγξει την προστατευτική ικανότητα του παράγοντα να ενισχύει μη ειδικά τις βασικές λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι του όγκου, καθώς τα κύτταρα δεν θα έχουν έρθει πρωτίτερα σε επαφή με τα αντιγόνα που θα εκφράζονται στην επιφάνεια του όγκου. Αντίθετα, όταν η χορήγηση του παράγοντα γίνει παρουσία σχηματισμένου όγκου, θα μελετηθεί η θεραπευτική ικανότητά του να ενισχύει την ενεργοποίηση και την έκπτυξη κυτταροτοξικών κυττάρων, που θα οδηγήσει σε ύφεση της ανάπτυξης του όγκου.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Πειραματόζωα της φυλής C57BL/6 (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ)
- Ατελές ανοσοενισχυτικό τύπου Freund's (IFA, Sigma-Aldrich)
- Πλαστικές σύριγγες όγκου 1 mL, μίας χρήσης (Greiner, Bio-One)
- Διάλυμα DPBS
- Κύτταρα της σειράς B16.F1 (μελάνωμα ποντικού)
- Εκχύλισμα επιφανειακών πεπτιδίων (AWE) της σειράς B16.F1 (§ 2.14)
- Διάλυμα κυτταροκίνης GM-CSF ποντικού (Invitrogen)
- ΠροΤα

- Συνθετικό πεπτίδιο προΤα(100-109)
- Ψηφιακός χάρακας τύπου vernier

### **Πρωτόκολλο εργασίας**

Για την επιλογή του κατάλληλου αριθμού καρκινικών κυττάρων με τον οποίο θα ενοφθαλμίζαμε τα ζώα στο ανοσοθεραπευτικό μοντέλο, προηγήθηκε κινητική μελέτη μέσω της χορήγησης διαφορετικών αριθμών B16.F1 κυττάρων σε ζώα της φυλής C57BL/6.

### **Πρωτόκολλο**

1. Διαχωρίζουμε τα πειραματόζωα σε 5 ομάδες με βάση τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων με τον οποίο τα ενοφθαλμίσουμε:
  - Ομάδα 1:  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ζώο
  - Ομάδα 2:  $5 \times 10^5$  κύτταρα/ζώο
  - Ομάδα 3:  $1 \times 10^5$  κύτταρα/ζώο
  - Ομάδα 4:  $5 \times 10^4$  κύτταρα/ζώο
  - Ομάδα 5:  $1 \times 10^4$  κύτταρα/ζώο

Σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα επαναιωρούνται σε διάλυμα DPBS όγκου 0,2 mL και ενοφθαλμίζονται υποδόρια στη ράχη, πάνω από το δεξί άνω άκρο.

2. Ακολουθεί η καταγραφή της πορείας ανάπτυξης των όγκων κάθε 2-3 ημέρες, οπότε και μετρείται η μεγάλη και η μικρή διάμετρος των όγκων με χάρακα τύπου vernier, καταγράφοντας παράλληλα την επιβίωση των πειραματόζωων σε κάθε ομάδα.

### **Ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο ετερόχρονης χορήγησης**

1. Την ημέρα 0 του πρωτοκόλλου, ενοφθαλμίζουμε όλα τα πειραματόζωα με 0,2 mL DPBS που περιέχει  $5 \times 10^4$  καρκινικά κύτταρα της σειράς B16.F1, υποδόρια στη ράχη, πάνω από το δεξί άνω άκρο. Ψηλαφούμε τα πειραματόζωα ανά 2-3 ημέρες ώστε να ανιχνεύσουμε την ανάπτυξη συμπαγούς όγκου.
2. Την ημέρα 21, έχοντας παρατηρήσει την ύπαρξη ψηλαφίσιμου όγκου στα περισσότερα ζώα, κατανέμουμε τα πειραματόζωα σε 5 διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με τον ανοσοενισχυτικό παράγοντα που θα λάβουν. Οι παράγοντες χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά στα ποντίκια σε τελικό όγκο 0,5 mL DPBS. Αναλυτικά, οι ομάδες ήταν οι εξής:
  - Ομάδα ελέγχου (Α): χορήγηση DPBS
  - Ομάδα GM-CSF (Β): χορήγηση 100 ng GM-CSF
  - Ομάδα προΤα (Γ): χορήγηση προΤα στη δόση των 350 ng ανά ποντίκι
  - Ομάδα προΤα(100-109) (Δ): χορήγηση προΤα(100-109) στη δόση των 100 ng ανά ποντίκι
  - Ομάδα προΤα(100-109) (Ε): χορήγηση προΤα(100-109) στη δόση των 200 ng ανά ποντίκι

3. Την ημέρα 23, επαναλαμβάνουμε το κύκλο χορηγήσεων της ημέρας 21.
4. Την ημέρα 24, ενίουμε υποδόρια στη βάση της ουράς όλα τα πειραματόζωα με 0,2 mL 1:1 μίγματος IFA και εκχυλίσματος AWE (το 0,1 mL εκχυλίσματος AWE περιείχε πεπτίδια από  $20 \times 10^6$  κύτταρα B16, §2.14).
5. Τις ημέρες 27, 29 και 30 επαναλαμβάνουμε τον κύκλο χορηγήσεων των ημερών 12, 14 και 15, αντίστοιχα.
6. Η πορεία εξέλιξης των όγκων παρατηρείται κάθε 2-3 ημέρες, οπότε και μετρείται η μεγάλη και η μικρή διάμετρος των όγκων με χάρακα τύπου vernier, καταγράφοντας παράλληλα την επιβίωση των πειραματόζωων σε κάθε ομάδα. Το μέγεθος του όγκου σε  $\text{cm}^3$  υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο :

$$\text{Μέγεθος όγκου (σε cm}^3\text{)} = \text{μήκος} \times \text{πλάτος}^2 / 2,$$

όπου ως μήκος και πλάτος μετρείται η μεγάλη και μικρή διάμετρος του όγκου σε cm, αντίστοιχα.

### **Ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο σύγχρονης χορήγησης**

1. Την ημέρα 0 του πρωτοκόλλου, ενοφθαλμίζουμε όλα τα πειραματόζωα με 0,2 mL DPBS που περιέχει  $5 \times 10^4$  καρκινικά κύτταρα της σειράς B16.F1, υποδόρια στη ράχη, πάνω από το δεξί άνω άκρο.
2. Την ημέρα 0, επίσης, γίνεται η χορήγηση των ανοσοθεραπευτικών παραγόντων και τα πειραματόζωα διακρίνονται σε 5 διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με τον ανοσοενισχυτικό παράγοντα που θα λάβουν. Οι παράγοντες χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά στα ποντίκια σε τελικό όγκο 0,5 mL. Αναλυτικά, οι ομάδες ήταν οι εξής:
  - Ομάδα ελέγχου (Α): χορήγηση DPBS
  - Ομάδα GM-CSF (B): χορήγηση 100 ng GM-CSF
  - Ομάδα προΤα (Γ): χορήγηση προΤα στη δόση των 350 ng ανά ποντίκι
  - Ομάδα προΤα(100-109) (Δ): χορήγηση προΤα(100-109) στη δόση των 100 ng ανά ποντίκι
  - Ομάδα προΤα(100-109) (Ε): χορήγηση προΤα(100-109) στη δόση των 200 ng ανά ποντίκι
3. Την ημέρα 2, επαναλαμβάνουμε το κύκλο χορηγήσεων της ημέρας 0.
4. Την ημέρα 3, ενίουμε υποδόρια στη βάση της ουράς όλα τα πειραματόζωα με 0,2 mL 1:1 μίγματος IFA και εκχυλίσματος AWE (το 0,1 mL εκχυλίσματος AWE περιείχε πεπτίδια από  $20 \times 10^6$  κύτταρα B16).
5. Τις ημέρες 6, 8 και 9 επαναλαμβάνουμε τον κύκλο χορηγήσεων των ημερών 12, 14 και 15, αντίστοιχα.
6. Η πορεία εξέλιξης των όγκων παρατηρείται κάθε 2-3 ημέρες, οπότε και μετρείται η μεγάλη και η μικρή διάμετρος των όγκων με χάρακα τύπου vernier, καταγράφοντας παράλληλα την επιβίωση των πειραματόζωων σε κάθε ομάδα. Το μέγεθος του όγκου σε  $\text{cm}^3$  υπολογίζεται όπως και παραπάνω.

## 2.16. Απομόνωση σπληνοκυττάρων ποντικού για *ex-vivo* ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε ήδη στην προηγούμενη ενότητα, η χορήγηση ενός παράγοντα με ανοσοενισχυτική δράση σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου ή, ιδανικά, ακόμα και σε υποστροφή του. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα υποδηλώνει την εκδήλωση ογκοδραστικών απαντήσεων από το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου, είτε ειδικών, οι οποίες μεσολαβούνται από ενεργοποιημένα ογκοειδικά κυτταροτοξικά T κύτταρα, ή/και μη ειδικών, μεσολαβούμενες από NK κύτταρα. Για την επιβεβαίωση, όμως αυτής της υπόθεσης, απαιτείται απομόνωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου και *ex vivo* έλεγχος της κυτταροτοξικής τους ικανότητας.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Πειραματόζωα της φυλής C57BL/6 (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ)
- Πλαστικές σύριγγες όγκου 2,5 mL, μίας χρήσης (Greiner, Bio-One)
- Τρυβλία Petri (Greiner, Bio-One)
- Διάλυμα DPBS
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- FBS
- Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων που περιέχει 0,0185 gr EDTA, 0,401 gr NH<sub>4</sub>Cl και 0,042 gr NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (όλα από την Sigma-Aldrich).

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Μία ημέρα πριν την απομόνωση γίνεται αποστείρωση συριγγών με βαμβάκι, ομογενοποιητή και σερ ανατομίας.
2. Το ζώο θανατώνεται.
3. Αφαιρούμε το σπλήνα, ο οποίος βρίσκεται κάτω από τις πλευρές, στο αριστερό τμήμα του ζώου.
4. Τέμνουμε το σπλήνα σε μικρά τεμάχια εντός τρυβλίου Petri με ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού.
5. Με πλαστική πιπέττα pasteur μεταφέρουμε τον τεμαχισμένο σπλήνα στον ομογενοποιητή.
6. Προσθέτουμε αρκετό πλήρες θρεπτικό υλικό για να διευκολυνθεί η ομογενοποίηση, προσέχοντας όμως να μην υπερχειλίσουμε τον ομογενοποιητή.
7. Με τη βοήθεια του εμβόλου, ομογενοποιούμε το σπλήνα κάνοντας περιστροφικές κινήσεις.
8. Μεταφέρουμε το ομογενοποίημα στη σύριγγα με το βαμβάκι, ώστε να διηθηθεί εντός σωλήνα falcon 50 mL.
9. Συμπληρώνουμε με πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 μέχρι τα 30 mL.

10. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 300xg για 5 λεπτά στους 4°C.
11. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 3 mL διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων.
12. Επωάζουμε για 4 λεπτά στον πάγο.
13. Προσθέτουμε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 μέχρι τα 30 mL και με προσοχή προσθέτουμε 1 mL FBS στον πυθμένα του σωλήνα falcon.
14. Φυγοκεντρούμε σε 300xg για 5 λεπτά.
15. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
16. Εκτιμούμε τη βιωσιμότητα και τη συγκέντρωση των κυττάρων, τα οποία είτε χρησιμοποιούνται άμεσα σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας, είτε κρυοσυντηρούνται για μετέπειτα χρήση.

## 2.17. Επαγωγή συνθηκών κυτταρικού θανάτου

Γνωρίζουμε τουλάχιστον μία συνθήκη παραγωγής του τμήματος προΤα(100-109) σε συνθήκες κυτταρικού θανάτου (Evstafieva et al., 2000). Συγκεκριμένα κατά την απόπτωση, η προΤα υπόκειται σε πέψη από τις ενεργοποιημένες κασπάσες 3 και 7 και έτσι παράγεται το τμήμα προΤα(100-109). Επομένως, ήταν σημαντικό να ελέγξουμε και άλλες συνθήκες κυτταρικού θανάτου που πιθανά επάγουν την παραγωγή αυτού του ανοσοδραστικού τμήματος της προΤα, όπως η νέκρωση και η όγκωση. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν την προΤα, οδηγήθηκαν στους 3 τύπους κυτταρικού θανάτου, ακολουθώντας 3 διαφορετικά πρωτόκολλα, και κατόπιν συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα υπερκείμενα προκειμένου να αναλυθούν σε επόμενο βήμα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και φασματομετρία μάζας.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Κύτταρα καλλιέργειας HeLa
- RPMI-1640
- Διάλυμα κυτταροκίνης TNF-α ανθρώπου
- NaCl
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Χλωριούχο κάλιο (KCl, Sigma-Aldrich)
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich)
- Θειικό μαγνήσιο (MgSO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα HEPES
- Φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο στο καπάκι
- Cryovials συνολικού όγκου 2 mL
- Πλάκες 6 φρεατίων

### Πρωτόκολλο εργασίας

- Για την επαγωγή απόπτωσης εργαζόμαστε ως εξής:
  1. Κύτταρα καλλιέργειας HeLa συλλέγονται και εκτιμάται η βιωσιμότητα και η συγκέντρωσή τους.
  2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 300xg για 5 λεπτά.
  3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού χωρίς ορό, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 5x10<sup>6</sup> κύτταρα/mL.
  4. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πλάκες 6 φρεατίων.
  5. Σε συγκεκριμένα φρεάτια προστίθεται TNF-α, σε τελική συγκέντρωση 10 ng/mL. Όλα τα κύτταρα επωάζονται για 18 ώρες.

6. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνται σε 300xg για 5 λεπτά.
  7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και φυγοκεντρείται εκ νέου σε 1000xg για 5 λεπτά.
  8. Συλλέγεται το υπερκείμενο των αποπτωτικών κυττάρων σε cryovials και διατηρείται στους -80°C.
- Για την επαγωγή νέκρωσης εργαζόμαστε ως εξής:
1. Κύτταρα καλλιέργειας HeLa συλλέγονται και εκτιμάται η βιωσιμότητα και η συγκέντρωσή τους.
  2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 300xg για 5 λεπτά.
  3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού χωρίς ορό, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση  $5 \times 10^6$  κύτταρα/mL.
  4. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε cryovials και υπόκεινται σε 4 διαδοχικούς κύκλους ψύξης (-80°C) –απόψυξης (37°C), ελέγχοντας την κυτταρική λύση στο φωτονικό μικροσκόπιο.
  5. Μετά το πέρας των κύκλων, τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνται σε 300xg για 5 λεπτά.
  6. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και φυγοκεντρείται εκ νέου σε 1000xg για 5 λεπτά.
  7. Συλλέγεται το υπερκείμενο των αποπτωτικών κυττάρων σε cryovials και διατηρείται στους -80°C.
- Για την επαγωγή όγκωσης εργαζόμαστε ως εξής:
1. Αρχικά παρασκευάζεται υπότονο διάλυμα NaCl (200 mOsm σε αντίθεση με τα 335 mOsm του ισότονου διαλύματος) το οποίο περιέχει: 95 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM  $\text{MgSO}_4$  και 10 mM HEPES.
  2. Κύτταρα καλλιέργειας HeLa συλλέγονται και εκτιμάται η βιωσιμότητα και η συγκέντρωσή τους.
  3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 300xg για 5 λεπτά.
  4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο υπότονου διαλύματος, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση  $5 \times 10^6$  κύτταρα/mL.
  5. Τα κύτταρα επωάζονται σε φλάσκες καλλιέργειας για 20 ώρες.
  6. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνα τύπου falcon και φυγοκεντρώνται σε 300xg για 5 λεπτά.
  7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και φυγοκεντρείται εκ νέου σε 1000xg για 5 λεπτά.
  8. Συλλέγεται το υπερκείμενο των ογκωτικών κυττάρων σε cryovials και διατηρείται στους -80°C.

## 2.18. Ανάλυση υπερκειμένων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC)

Για να ανιχνεύσουμε το προΤα(100-109) σε αποπτωτικά, νεκρωτικά και ογκωτικά υπερκείμενα, επιλέξαμε να αναλύσουμε τα υπερκείμενα αυτά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Με αυτόν τον τύπο χρωματογραφίας, τα διάφορα πεπτίδια εκλούνται από τη στήλη σε διαφορετικά χρονικά σημεία, συναρτήσει τόσο του φορτίου τους, όσο και του μήκους τους. Για την τελική ταυτοποίηση του πεπτιδίου προΤα(100-109) στα εκλούόμενα κλάσματα, απαιτείται ανάλυση με φασματομετρία μάζας.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Υπερκείμενα αποπτωτικών, νεκρωτικών και ογκωτικών κυττάρων
- Συνθετικό πεπτίδιο προΤα(100-109)
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA; Sigma-Aldrich)
- Ακετονιτρίλιο
- Σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 1,5 mL
- Στήλη χρωματογραφίας Nucleosil 100 CP (4 x 250 mm) (HPLC Technologies)
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) (Erpendorf Biotronik)

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Ενίουμε το κάθε υπερκείμενο στον υγρό χρωματογράφο αντίστροφης φάσης εξοπλισμένο με στήλη Nucleosil 100 CP εξισορροπημένη με 0,025% (v/v) τριφθοροξικό οξύ.
2. Ο διαχωρισμός των πεπτιδίων πραγματοποιείται με γραμμική κλίση ακετονιτριλίου 4-50% (v/v) σε 60 λεπτά, καταγράφοντας συγχρόνως την οπτική απορρόφηση στα 214 nm.
3. Σε νέα σωληνάρια τύπου erpendorf, συλλέγουμε δείγματα από το σημείο εξόδου της στήλης όγκου 50-100  $\mu$ L, σε χρονικό σημείο που αντιστοιχεί στο χρόνο έκλυσης του συνθετικού πεπτιδίου προΤα(100-109).
4. Ποσότητα από τα δείγματα αυτά θα αναλυθούν με φασματομετρία μάζας.



## 2.19. Φασματομετρία μάζας τύπου MALDI-TOF

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την τελική ταυτοποίηση του προΤα(100-109) σε υπερκείμενα κυττάρων που έχουν οδηγηθεί σε διαφορετικούς τύπους θανάτου, είναι απαραίτητη η ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε φασματόμετρο μάζας συζευγμένο με laser, με παράλληλη χρήση χημικών ενώσεων ως στρώμα (matrix) που διευκολύνουν την αποδέσμευση και τον ιονισμό των πεπτιδίων προς ανάλυση (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI). Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε, καθώς είναι μία ηπιότερη τεχνική ιονισμού. Κατά την μέθοδο αυτή, μία δέσμη laser διεγείρει και ιονίζει μόρια του δείγματος που έχουν συνκρυσταλλοποιηθεί με μόρια στρώματος. Τα ιόντα που προκύπτουν επιταχύνονται σε ηλεκτρικό πεδίο και διαχωρίζονται μεταξύ τους ανάλογα με το χρόνο «πτήσης» τους (time of flight, TOF) από το σημείο ιονισμού τους μέχρι τον ανιχνευτή που θα συλλέξει και θα αναπαράγει το κατάλληλο σήμα. Τα πεπτίδια στην MALDI-TOF φασματομετρία ιονίζονται κυρίως προς παραγωγή πρωτονιωμένων παραγώγων [πεπτίδιο + H]<sup>+</sup>, και κατά συνέπεια ο παρατηρούμενος λόγος μάζας προς φορτίο (m/z) κάθε σήματος στα πεπτιδικά φάσματα είναι ανάλογος της μάζας των πεπτιδίων στο δείγμα.

### Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Υπερκείμενα αποπτωτικών, νεκρωτικών και ογκωτικών κυττάρων, ύστερα από ανάλυση με RP-HPLC
- Πρότυπο πεπτιδικό διάλυμα βαθμονόμησης (Peptide Calibration Standard II; Bruker Daltonik)
- α-κυανο-4-υδροξυκιναμικό οξύ (matrix) (Sigma-Aldrich)
- Νιτροκυτταρίνη (nitrocellulose) (Cat. No. 435236, Sigma-Aldrich)
- Ατσάλινη πλάκα-στόχος φασματομέτρου μάζας (Bruker Daltonik)
- Φασματόμετρο μάζας MALDI- TOF (Bruker Reflex IV, Bruker Daltonik)

### Πρωτόκολλο εργασίας

1. Παρασκευάζουμε το διάλυμα στρώματος αναμειγνύοντας α-κυανο-4-υδροξυκιναμικό οξύ και νιτροκυτταρίνη, σε αναλογία 1:1.
2. Στην πλάκα-στόχο του φασματόμετρου, σε αριθμό φρεατίων ίσο με αυτό των δειγμάτων μας, επιστρώνουμε 0,75 μL διαλύματος στρώματος.
3. Προσθέτουμε ανά φρεάτιο 0,75 μL των δειγμάτων μας.
4. Παράλληλα, σε ένα φρεάτιο επιστρώνουμε 0,75 μL στρώμα και 0,75 μL πρότυπο πεπτιδικό διάλυμα βαθμονόμησης.
5. Ξηραίνουμε την πλάκα-στόχο υπό κενό.
6. Τοποθετούμε την πλάκα-στόχο εντός του φασματόμετρου μάζας και προχωρούμε στην ανάλυση.
7. Ρυθμίζουμε την τάση επιτάχυνσης (accelerating voltage) για τα παραγόμενα πεπτιδικά ιόντα στα 20 kV.

8. Πριν τη συλλογή φασμάτων από τα δείγματα προς ανάλυση, συλλέγουμε φάσματα από το φρεάτιο με το πρότυπο πεπτιδικό διάλυμα βαθμονόμησης και, με βάση την ακριβή μάζα των πεπτιδίων που περιέχονται, ελέγχουμε την ακρίβεια των πεπτιδικών κορυφών που αναγνωρίζονται (external calibration).
9. Προχωρούμε στα φρεάτια με τα δείγματα και συλλέγουμε φάσματα πεπτιδικών κορυφών μάζας 700 – 2750 m/z, μετά από σύνολο 300 διεγέρσεων ιονισμού με laser.
10. Από το τελικό φάσμα πεπτιδικών κορυφών (= πεπτιδικό αποτύπωμα) κάθε δείγματος, με τη χρήση λογισμικού προσδιορίζουμε την ακριβή μάζα κάθε πεπτιδικής κορυφής στο φάσμα. Κατόπιν γίνεται σύγκριση και αντιπαραβολή των πεπτιδικών μαζών που παρατηρήθηκαν στο φάσμα, με τις θεωρητικές πεπτιδικές κορυφές που θα προέκυπταν από τον ιονισμό του πεπτιδίου προΤα(100-109). Στη σύγκριση αυτή θέτουμε ως όρια ανοχής  $\pm 0,2$  Da απόκλισης από την θεωρητικά υπολογισμένη μάζα των πεπτιδίων.

3

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### **3.1. Μελέτη του μηχανισμού δράσης της προθυμοσίνης α και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου προΤα(100-109) σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα**

Έχει ήδη πειραματικά τεκμηριωθεί ότι η προΤα ασκεί και έναν εξωκυτταρικό ρόλο, στα πλαίσια του οποίου παρουσιάζει πλειοτροπική δράση ενισχύοντας τις δραστικότητες του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει δειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση των ΜΗC μορίων τάξης II σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (Baxevanis et al., 1992a) και επάγει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή IL-2 από αυτά (Voutsas et al., 2000). Παράλληλα, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας, τόσο ολόκληρο το μόριο της προΤα, όσο και το ανοσοδραστικό της τμήμα, προΤα(100-109), αυξάνουν τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την οξειδωτική έκρηξη ουδετερόφιλων υγιών δοτών και καρκινοπαθών (Samara et al., 2013a), ενισχύουν την κυτταροτοξικότητα των NK και LAK κυττάρων υγιών δοτών και καρκινοπαθών (Skopeliti et al., 2009) και επάγουν την *in vitro* ωρίμανση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων (Skopeliti et al., 2009).

Παρά την εκτενή μελέτη της ανοσολογικής δράσης της προΤα, μέχρι πρόσφατα λίγα ήταν τα πειραματικά δεδομένα που σκιαγραφούσαν τον πιθανό μηχανισμό δράσης της. Αρχικά είχε προταθεί, ότι η προΤα δρα προσδενόμενη σε υψηλής ή χαμηλής συγγένειας, ειδικούς για το μόριο υποδοχείς στην επιφάνεια λεμφοβλαστών, ενώ αργότερα αναφέρθηκαν τρεις εταίροι πρόσδεσης του μορίου (Cordero et al., 1994; Cordero et al., 1995). Καμία, ωστόσο, από τις προαναφερθείσες προσπάθειες δεν συνοδεύτηκε από την επιτυχή απομόνωση ενός συγκεκριμένου υποδοχέα ή, έστω, τον προσδιορισμό ενός ενδοκυτταρικού μονοπατιού σηματοδότησης που ενεργοποιείται ειδικά από την προΤα. Χρησιμοποιώντας πρωτεομική ανάλυση, δείξαμε για πρώτη φορά ότι μετά από επίδραση της προΤα σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, ενεργοποιούνται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά των TLRs, υποθέτοντας ότι τουλάχιστον ένας υποδοχέας αυτής της οικογένειας μεσολαβεί τη δράση της προΤα (Skopeliti et al., 2007). Πράγματι, ο TLR-4 αναγνωρίστηκε λίγο αργότερα ως ο υποδοχέας ο οποίος ενεργοποιείται από την προΤα σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού (Mosoian et al., 2010). Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, στα πλαίσια της μελέτης της δράσης της προΤα σε ανθρώπινα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, θέσαμε ως πρώτο στόχο να διερευνήσουμε αν ο ίδιος

υποδοχέας, δηλ. ο TLR-4, εμπλέκεται στην κυτταρική ενεργοποίηση και στην επαγωγή της ωρίμανσης των ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων, που αποτελούν τα κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, μελετήσαμε, αρχικά, τα επίπεδα επιφανειακής έκφρασης του TLR-4 και, κατόπιν, τις μεταβολές των επιπέδων έκφρασης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-προσαρμογέων του υποδοχέα, σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, ύστερα από επίδραση τόσο με προΤα, όσο και με το καρβοξυτελικό της θραύσμα προΤα(100-109).

### 3.1.1. Επίδραση των πεπτιδίων στην έκφραση του TLR-4

Οι TLRs διαδραματίζουν ρόλο ιδιαίτερης σημασίας στην έναρξη και ενορχήστρωση μιας ανοσολογικής απάντησης, έχοντας την ικανότητα να αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα που σχετίζονται τόσο με παθογόνα (PAMPs), όσο και με καταστάσεις κινδύνου (DAMPs) και να ενεργοποιούν, αρχικά, το φυσικό σκέλος της ανοσίας και στη συνέχεια και το ειδικό. Εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά, μονοκύτταρα και μακροφάγα), γεγονός που καθιστά τα κύτταρα αυτά πρότυπα συστήματα για τη μελέτη της έκφρασης και της λειτουργίας των υποδοχέων αυτών. Από τους 10 υποδοχείς που έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής σε ανθρώπινα κύτταρα, ο TLR-4 συνιστά τον πλέον μελετημένο υποδοχέα, λόγω της ικανότητάς του να αναγνωρίζει κυρίως τον LPS των Gram- βακτηρίων. Εκτός από τον LPS, που αποτελεί τον πρότυπο συνδέτη του, ο TLR-4 προσδένει και ενεργοποιείται από ποικίλα μόρια με χαρακτηριστικά παραδείγματα μέλη της οικογένειας των HSPs, αλλά και την πρωτεΐνη HMGB1 (Tsan and Gao, 2009, Kawai and Akira, 2010).

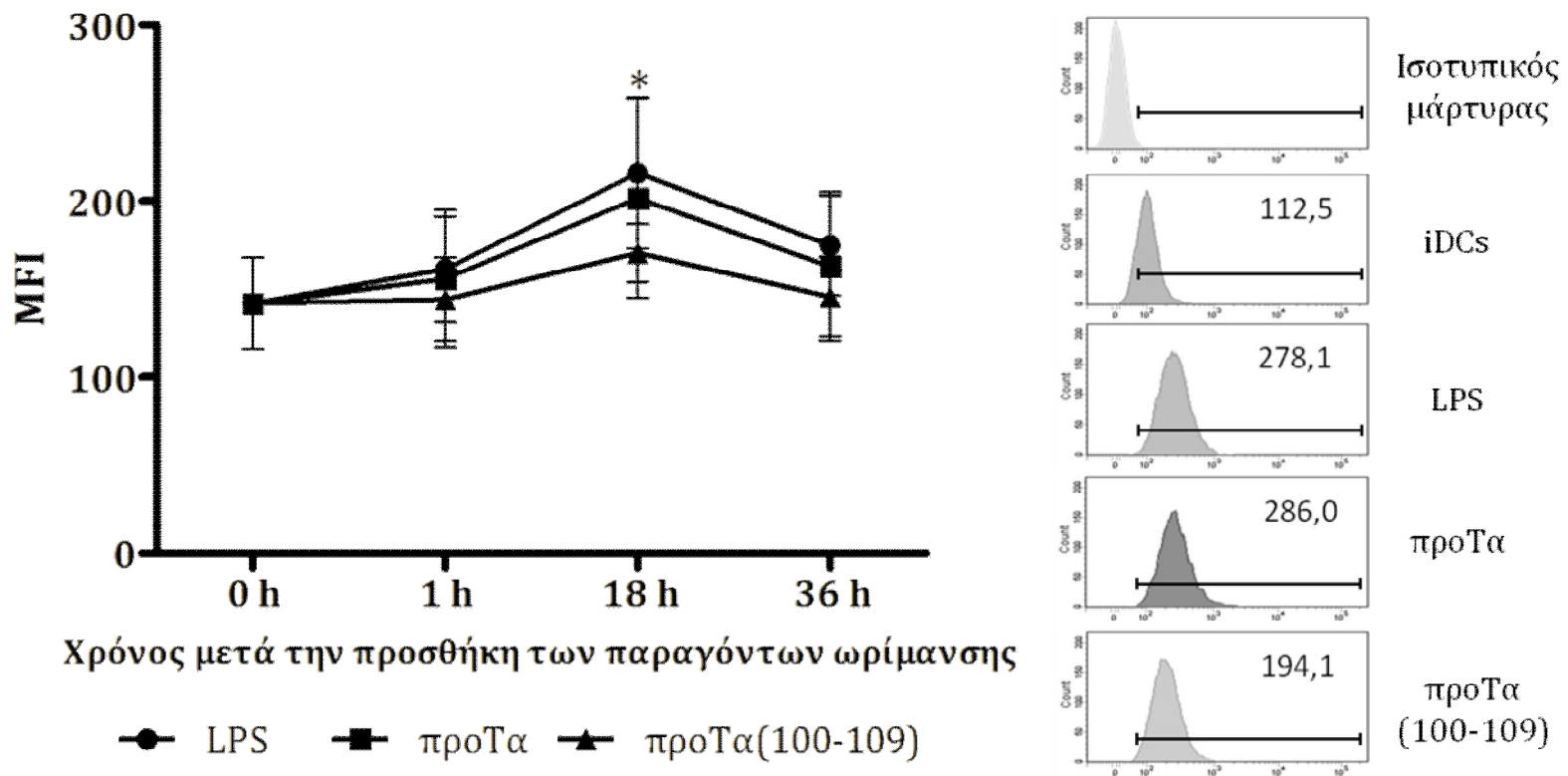
Δεδομένου του ρόλου τους, η έκφραση των TLRs έχει συσχετιστεί στενά με την ικανότητα απάντησης του ανοσοποιητικού συστήματος σε παθογόνα. Συγκεκριμένα για τον TLR-4, η καταστολή της έκφρασης του σε διαγονιδιακά ζώα έχει συνδεθεί με ιδιαίτερη ευαισθησία σε μολύνσεις από Gram- βακτήρια, ενώ, αντίθετα, η υπερέκφρασή του δείχθηκε να υποβοηθά την επιβίωση των ζώων ύστερα από μόλυνση με *Salmonella typhimurium* (Bihl et al., 2003). Σύμφωνα μάλιστα με *in vitro* μελέτες, η παρουσία του LPS επάγει την παροδική αύξηση της έκφρασης του TLR-4 σε μονοκύτταρα και ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (Visintin et al., 2001).

Υποθέτοντας ότι η προΤα και το καρβοξυτελικό της θραύσμα δρουν ως συνδέτες του TLR-4 και σε ανθρώπινα κύτταρα, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα

σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό διαφοροποιήσαμε *in vitro* μονοκύτταρα περιφερικού αίματος σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, ακολουθώντας ένα ευρέως διαδεδομένο πρωτόκολλο διαφοροποίησής τους, δηλ. επωάζοντας τα μονοκύτταρα με GM-CSF και IL-4 για 5 ημέρες (Sallusto and Lanzavecchia, 1994, Skopeliti et al., 2009, Kis-Toth et al., 2013). Στη συνέχεια, ενεργοποιήσαμε τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα με LPS, προΤα(100-109) ή το ακέραιο μόριο της προΤα για 1, 18 και 36 ώρες και μελετήσαμε την έκφραση του TLR-4 με κυτταρομετρία ροής, ενώ ανώριμα δενδριτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τη δοκιμασία αυτή.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση ένταση φθορισμού (MFI) και παρουσιάζονται διαγραμματικά στην **Εικόνα 3.1**. Παρατηρούμε ότι η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων παρουσία LPS οδήγησε σε αύξηση της επιφανειακής έκφρασης του TLR-4, μόλις μία ώρα μετά την προσθήκη του παράγοντα (MFI 161,3). Η μέγιστη έκφραση του TLR-4 σημειώθηκε στις 18 ώρες μετά την προσθήκη του LPS (215,9), ενώ στις 36 ώρες, τα επίπεδα της έκφρασης μειώθηκαν και ήταν συγκρίσιμα με αυτά των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων (174,7 για τον LPS και 141,8 για τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα). Η προΤα και το προΤα(100-109) σε μικρότερο, όμως, βαθμό, παρουσίασαν ένα παρόμοιο πρότυπο παροδικής αύξησης της έκφρασης του TLR-4, με αυτό του LPS. Αναλυτικότερα, η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων με προΤα οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TLR-4 τόσο στη 1 ώρα (155,9), όσο και στις 18 ώρες (201,6), ενώ συγκρίσιμα ήταν και τα επίπεδα έκφρασης του TLR-4 για τα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν παρουσία του προΤα(100-109) (144,2 για τη 1 ώρα και 170,7 για τις 18 ώρες). Τέλος, αντίστοιχα χαμηλά ήταν τα επίπεδα έκφρασης του TLR-4 στις 36 ώρες, όπου καταγράφηκαν χαμηλά MFIs συγκρίσιμα με αυτά των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων [162,9 για την προΤα και 145,6 για το προΤα(100-109)].

Το γεγονός ότι το πρότυπο παροδικής αύξησης της έκφρασης του TLR-4 που προκλήθηκε από την προΤα και το προΤα(100-109) ήταν παρόμοιο με αυτό του LPS, που αποτελεί και τον πρότυπο συνδέτη του υποδοχέα αυτού, ήταν μία πρώτη ένδειξη πως και τα τρία μόρια, πιθανά, δρουν με παρόμοιο τρόπο, σηματοδοτώντας δηλ. καταρροϊκά του TLR-4. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, διερευνήσαμε αν η αυξημένη έκφραση του TLR-4, συνοδεύεται και από αντίστοιχη ενδοκυτταρική ενεργοποίηση επαγόμενη από τη διέγερση του TLR-4.



**Εικόνα 3.1.** Έκφραση του TLR-4 σε δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν παρουσία LPS, προΤα ή προΤα(100-109). Α) Ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (0 h), διαφοροποιημένα από ανθρώπινα μονοκύτταρα, ωρίμασαν παρουσία LPS, προΤα ή προΤα(100-109) για 1, 18 και 36 ώρες (h) και αναλύθηκαν για την επιφανειακή έκφραση του TLR-4 με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα είναι οι μέσες τιμές MFI ± SD από 4 δότες. \* p<0,05. Β) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα της έκφρασης του TLR-4 σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (iDCs) και σε δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν παρουσία LPS, προΤα ή προΤα(100-109) για 18 ώρες. Οι τιμές MFI είναι ενδεικτικές ενός πειράματος από τα 4 που εκτελέστηκαν.



### **3.1.2. Επίδραση των πεπτιδίων στην ενδοκυτταρική ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης καταρροϊκά του TLR-4**

Εκτός του εξωκυτταρικού τμήματός τους που είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των παθογόνων, οι TLRs διαθέτουν και μία ενδοκυτταρική περιοχή που φέρει μοτίβα TIR, απαραίτητα για την έναρξη της ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος. Τα πρώιμα γεγονότα τα οποία έπονται της ενεργοποίησης ενός TLR, περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μοτίβων TIR των υποδοχέων και των ανάλογων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-προσαρμογέων (Akira and Takeda, 2004). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του TLR-4 από τον πρότυπο συνδέτη του LPS, οδηγεί σε επικείμενη ενεργοποίηση δύο μονοπατιών σηματοδότησης, του μονοπατιού που εξαρτάται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα MyD88 και του μονοπατιού που εξαρτάται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα TRIF (Baxevanis et al., 2013).

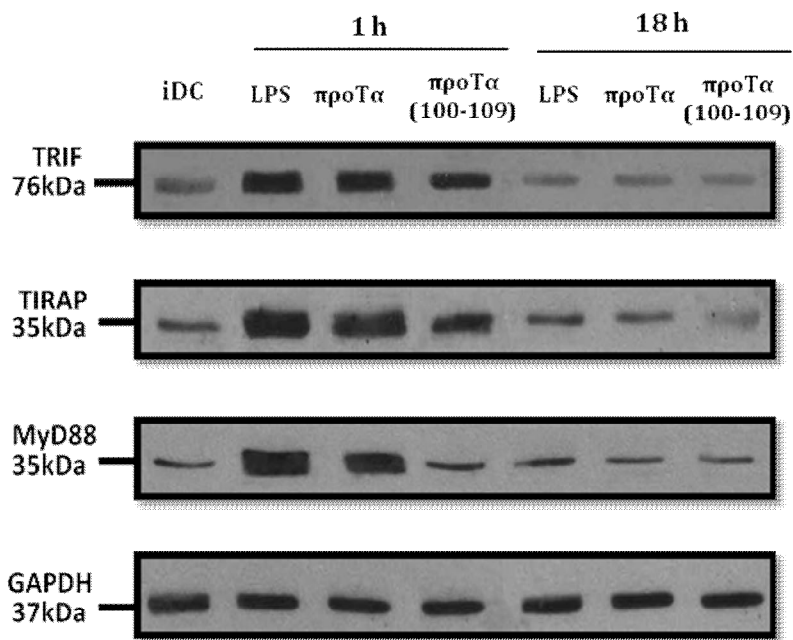
Για να διαπιστώσουμε, λοιπόν, αν η προΤα και το ανοσοδραστικό της πεπτίδιο, μπορούν να επάγουν και ενδοκυτταρική ενεργοποίηση αντίστοιχη με αυτή ενός γνωστού συνδέτη του TLR-4 όπως ο LPS, μελετήσαμε με ανοσοστύπωμα κατά Western τις μεταβολές των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά του υποδοχέα αυτού, ύστερα από επίδραση με τα δύο πεπτίδια.

Έχει ήδη δειχθεί, από ερευνητικές προσπάθειες του εργαστηρίου μας, ότι επίδραση της προΤα σε ανθρώπινα μονοκύτταρα αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης IRAK-4 (Skoreliti et al., 2007). Η συγκεκριμένη, όμως, κινάση αποτελεί σημείο σύγκλισης μονοπατιών σηματοδότησης καταρροϊκά πολλών TLRs (Baxevanis et al., 2013) και τυχόν μεταβολή της έκφρασής της μετά από επίδραση με προΤα ή προΤα(100-109) δεν θα αποτελούσε σαφή ένδειξη ενεργοποίησης καταρροϊκά του TLR-4. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε τη συνδυαστική έκφραση 3 πρωτεϊνών-προσαρμογέων που ενεργοποιούνται αναρροϊκά της IRAK-4 και συγκεκριμένα της TRIF, που αποτελεί προσαρμογέα των TLR-3 και -4, της TIRAP, ενός προσαρμογέα κοινού για τους TLR-2 και -4, και της MyD88, ενός μορίου που υπερεκφράζεται μετά από ενεργοποίηση όλων των TLRs, εκτός του 3 (Baxevanis et al., 2013). Επιλέξαμε ειδικά αυτούς τους τρεις προσαρμογείς, καθώς ο συνδυασμός επαγωγής της έκφρασής τους είναι μοναδικός της ενεργοποίησης του TLR-4.

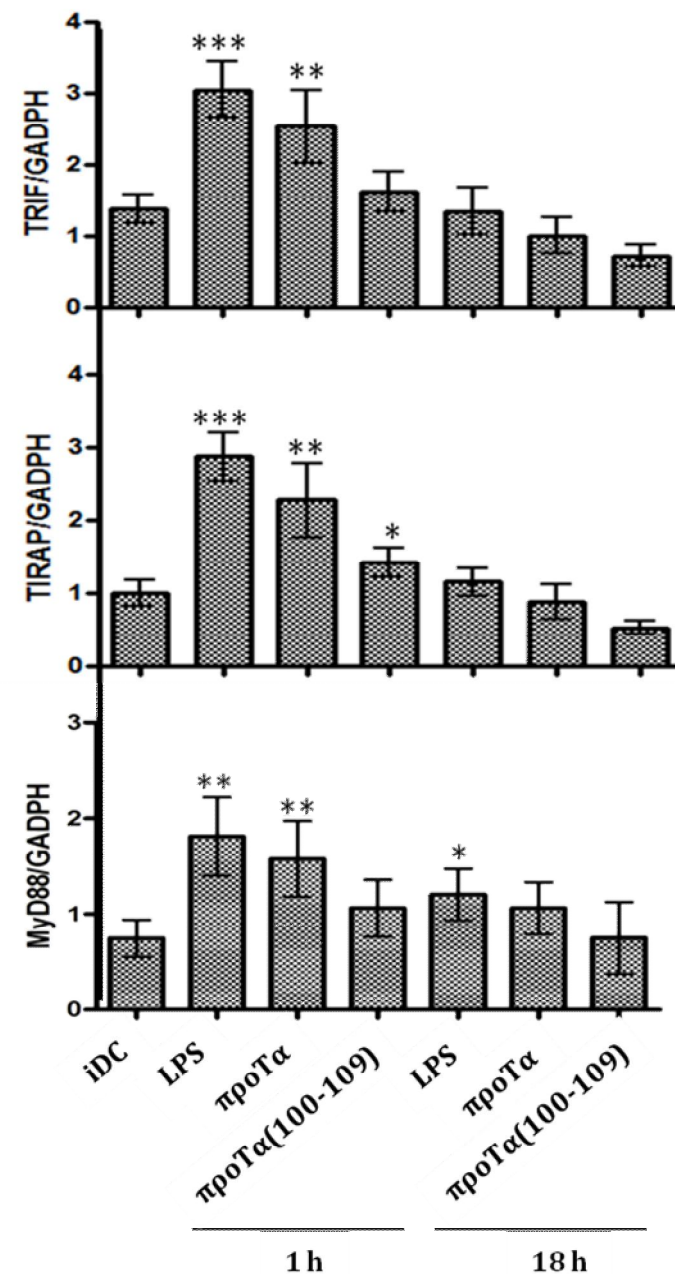
Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν με ανοσοστύπωμα κατά Western απομονώθηκαν από ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και από δενδριτικά κύτταρα που είχαν ωριμάσει παρουσία LPS, προΤα ή προΤα(100-109) για 1 και 18 ώρες (**Εικόνα 3.2**). Κατόπιν πυκνομέτρησης κάθε πρωτεϊνικής ζώνης που ανιχνεύθηκε στο ανοσοστύπωμα (**Εικόνα 3.2A**), υπολογίστηκε η σχετική έκφραση των τριών μελετώμενων πρωτεϊνών ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης GAPDH, που αποτέλεσε το μάρτυρα ισοφόρτωσης του πειράματος.

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 3.2B**, η προσθήκη LPS οδήγησε σε σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης και των τριών μελετώμενων πρωτεϊνών στη 1 ώρα (3,1 για την TRIF, 2,9 για την TIRAP και 1,8 για τη MyD88), η οποία σε όλες τις περιπτώσεις συνοδεύτηκε και από στατιστική σημαντικότητα. Στις 18 ώρες μετά την προσθήκη LPS, η σχετική έκφραση και των τριών προσαρμογέων μειώθηκε (1,4 για την TRIF, 1,2 για την TIRAP και 1,2 για τη MyD88) και τα επίπεδά τους ήταν συγκρίσιμα με αυτά των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων (1,4 για την TRIF, 1,0 για την TIRAP και 0,7 για τη MyD88). Μία παρόμοια τάση αυξημένης έκφρασης και των τριών πρωτεϊνών σημειώθηκε 1 ώρα μετά την προσθήκη τόσο της προΤα (2,5 για την TRIF, 2,3 για την TIRAP και 1,6 για τη MyD88), όσο και του προΤα(100-109) (1,6 για την TRIF, 1,4 για την TIRAP και 1,0 για τη MyD88), αν και στην τελευταία περίπτωση, τα παρατηρούμενα επίπεδα έκφρασης ήταν χαμηλότερα. Όπως και με την προσθήκη του LPS, 18 ώρες μετά τη διέγερση των δενδριτικών κυττάρων με προΤα ή προΤα(100-109), η σχετική έκφραση των πρωτεϊνών TRIF, TIRAP και MyD88 μειώθηκε σημαντικά και τα επίπεδα των τριών προσαρμογέων ήταν συγκρίσιμα με αυτά που καταγράφηκαν για τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα.

Βασιζόμενοι, λοιπόν, στα αποτελέσματα της επιφανειακής έκφρασης του TLR-4 και της ενδοκυτταρικής έκφρασης των σχετιζόμενων με τον TLR-4 πρωτεϊνών-προσαρμογέων, συμπεραίνουμε ότι τα ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα, και πιθανά παρουσία προΤα(100-109), αυξάνουν παροδικά την επιφανειακή έκφραση του TLR-4 και διεγείρονται μέσω τουλάχιστον ενός κοινού ενδοκυτταρικού μονοπατιού σηματοδότησης καταρροϊκά της ενεργοποίησης του υποδοχέα αυτού.



**Εικόνα 3.2.** Αυξημένη έκφραση των TLR-4-σχετιζόμενων πρωτεϊνών-προσαρμογέων σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα ωριμασμένα με proTA ή proTA(100-109). Α) Αντιπροσωπευτικά ανοσοοστυπώματα της έκφρασης των πρωτεϊνών TRIF, TIRAP και MyD88 σε ολικά εκχυλίσματα ανώριμων δενδριτικών κυττάρων (iDCs) και δενδριτικών κυττάρων που ωρίμασαν παρουσία LPS, proTA ή proTA(100-109) για 1 και 18 ώρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί το φόρτωμα ίσων ποσοτήτων πρωτεΐνης σε όλες τις πειραματικές ομάδες. Β) Πυκνομέτρηση των ζωνών των πρωτεϊνών TRIF, TIRAP και MyD88 που ανιχνεύθηκαν στα ανοσοοστυπώματα και παρουσίαση των αποτελεσμάτων ως σχετική έκφραση της κάθε πρωτεΐνης προς την έκφραση της GAPDH. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι από 4 ανεξάρτητα πειράματα  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , σε σύγκριση με τα iDCs.



### 3.2. Μελέτη του φαινοτύπου ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προθυμοσίνης α ή του πεπτιδίου προΤα(100-109)

Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τα πλέον αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην ανώριμη μορφή τους διακρίνονται από αυξημένη ικανότητα δέσμευσης και επεξεργασίας των αντιγόνων, ενώ όταν αποκτήσουν τον ώριμο φαινότυπό τους είναι ικανά να διεγείρουν επιτυχώς T κυτταρικές αποκρίσεις, μέσω ενός συνόλου επιφανειακών μορίων τα οποία εκφράζουν. Συγκεκριμένα, τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στην παρουσίαση των αντιγόνων στα T κύτταρα (MHC μόρια τάξης I/II), μορίων προσκόλλησης (CD11b), καθώς και συνδιεγερτικών/συνοδών μορίων (CD80, CD86, CD83 και CD40) (Palucka et al., 2008).

Για τη βελτιστοποίηση των λειτουργιών των δενδριτικών κυττάρων και την πιο αποτελεσματική ωρίμανσή τους, μία πλειάδα παραγόντων ωρίμανσης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως *in vivo*, ανάμεσα στους οποίους συγκαταλέγονται βακτηριακά προϊόντα (LPS), συστατικά μικροοργανισμών (dsRNA, CpG DNA), καθώς και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNF-α, IL-1β) (Gilboa, 2007).

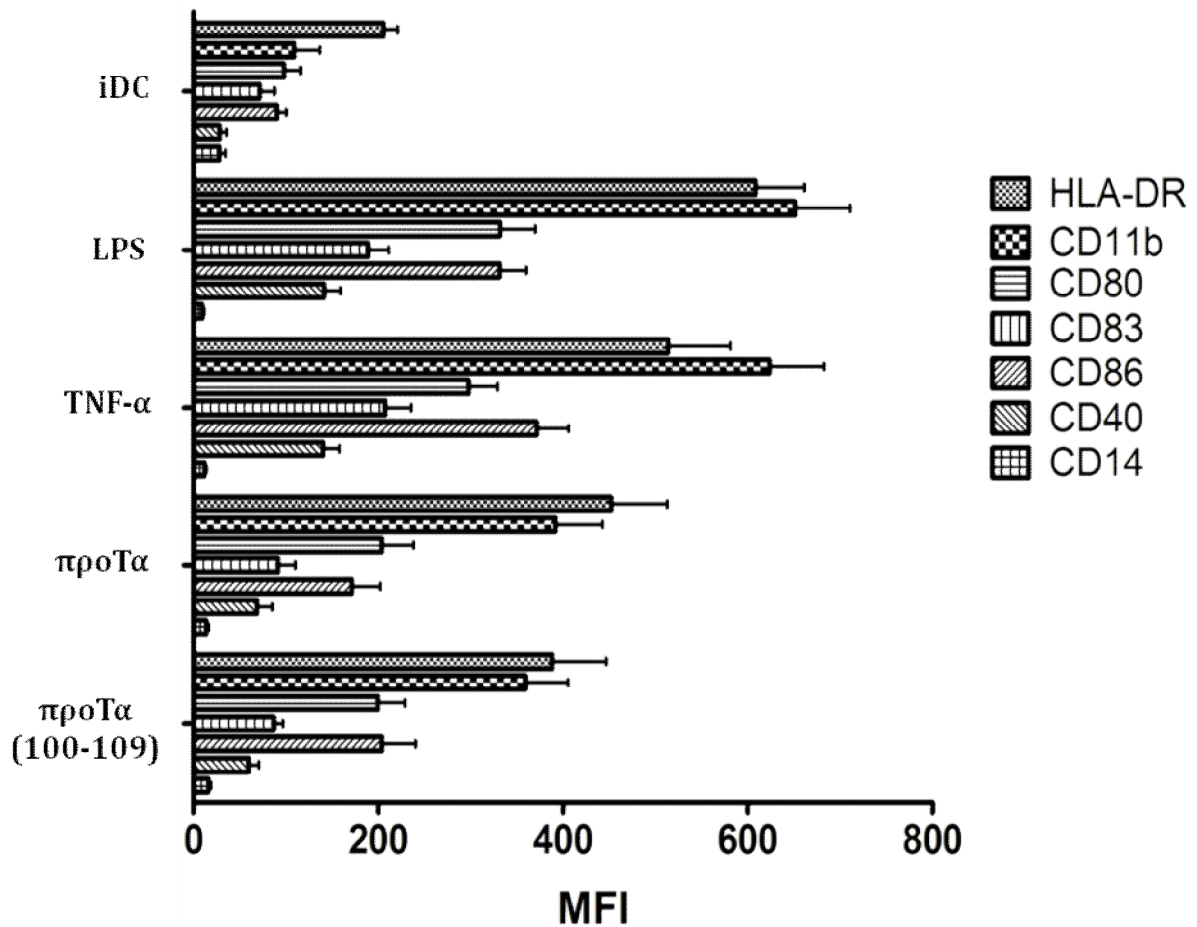
Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109), αποκτούν έναν ώριμο ανοσοφαινότυπο, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης καθιερωμένων επιφανειακών δεικτών των δενδριτικών κυττάρων σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που επάγονται παρουσία LPS (Skopeliti et al., 2009). Αν και ο LPS είναι εξαιρετικά αποτελεσματικός παράγοντας ωρίμανσης, η χορήγησή του σε ανθρώπους συνοδεύεται από τοξικότητα (Thompson et al., 2005). Αντίθετα, ο παράγοντας ωρίμανσης TNF-α έχει εγκριθεί για κλινική χρήση και χρησιμοποιείται ευρέως σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα που βασίζονται στα δενδριτικά κύτταρα (Ridgway, 2003; Escobar et al., 2005; Burgdorf et al., 2008). Για το λόγο αυτό στα πλαίσια της παρούσας μελέτης θελήσαμε να συγκρίνουμε την ικανότητα των προΤα και προΤα(100-109) να ενεργοποιούν ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα τόσο με αυτήν του LPS όσο και του TNF-α. Για το σκοπό αυτό, τα 4 μόρια [LPS, TNF-α, προΤα και προΤα(100-109)] μελετήθηκαν παράλληλα ως προς την ικανότητά τους να επάγουν: α) την αύξηση της έκφρασης καθιερωμένων επιφανειακών δεικτών σε δενδριτικά κύτταρα και β) την παραγωγή και έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από αυτά.

### 3.2.1. Επίδραση των πεπτιδίων στην έκφραση επιφανειακών μορίων-δεικτών

Για να ελέγξουμε την επιφανειακή έκφραση συγκεκριμένων μορίων-δεικτών στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων ακολουθήσαμε το ίδιο πρωτόκολλο διαφοροποίησης μονοκυττάρων σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα που περιγράφηκε πριν. Στη συνέχεια, ενεργοποιήσαμε τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα για 48 ώρες με LPS, TNF- $\alpha$ , προΤα ή το πεπτίδιο προΤα(100-109) και τα επίπεδα έκφρασης των μορίων HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD11b, CD40 και CD14 αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής.

Στην **Εικόνα 3.3**, παρατηρούμε ότι τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία LPS αύξησαν σημαντικά την επιφανειακή έκφραση των μορίων HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD86 και CD40 (μέση τιμή MFI 608,3, 651,2, 331,6, 188,8, 331,4 και 142,2, αντίστοιχα), σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των δενδριτικών κυττάρων που ωρίμασαν παρουσία TNF- $\alpha$  (513,8, 623,6, 298,0, 207,4, 371,7 και 139,8, αντίστοιχα). Ομοίως, και οι δύο παράγοντες οδήγησαν σε μείωση της έκφρασης του μορίου CD14 (9,3 για τον LPS και 11,7 για τον TNF- $\alpha$ , συγκριτικά με το 27,8 των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων), επιβεβαιώνοντας την ήδη γνωστή τους δράση ως παράγοντες ωρίμανσης (Gilboa, 2007).

Τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με προΤα ή προΤα(100-109) παρουσίασαν παρόμοιο φαινότυπο με τα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν παρουσία LPS και τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Skopeliti et al., 2009). Επιπλέον, παρουσίασαν και επίπεδα έκφρασης συγκρίσιμα με αυτά που σημειώθηκαν παρουσία TNF- $\alpha$  για όλα τα μελετώμενα μόρια. Αναλυτικότερα, η έκφραση των HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD86 και CD40 αυξήθηκε τόσο παρουσία προΤα (451,9, 391,8, 203,5, 91,2, 171,3 και 68,5, αντίστοιχα), όσο και του πεπτιδίου προΤα(100-109) (388,3, 359,0, 199,5, 86,5, 203,8 και 59,6, αντίστοιχα), σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης των μορίων στα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (205,4, 109,0, 97,8, 71,3, 89,9 και 28,6, αντίστοιχα). Αντίθετα, η έκφραση του μορίου CD14 μειώθηκε και στις δύο περιπτώσεις ενεργοποίησης [13,6 για την προΤα και 15,8 για το προΤα(100-109)].



**Εικόνα 3.3.** Η προΤα και το πεπτίδιο προΤα(100–109) επάγουν τη δημιουργία φαινοτυπικά ώριμων δενδριτικών κυττάρων. Μονοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, μετά από επώαση 5 ημερών με GM-CSF και IL-4 και επώαστηκαν για 48 ώρες με διάφορους παράγοντες ωρίμανσης. Η έκφραση των επιφανειακών μορίων HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD86, CD40 και CD14 σε ανώριμα (iDCs) και δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με LPS, TNF-α, προΤα ή το πεπτίδιο προΤα(100–109) παρουσιάζεται ως μέση τιμή MFI  $\pm$  SD από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

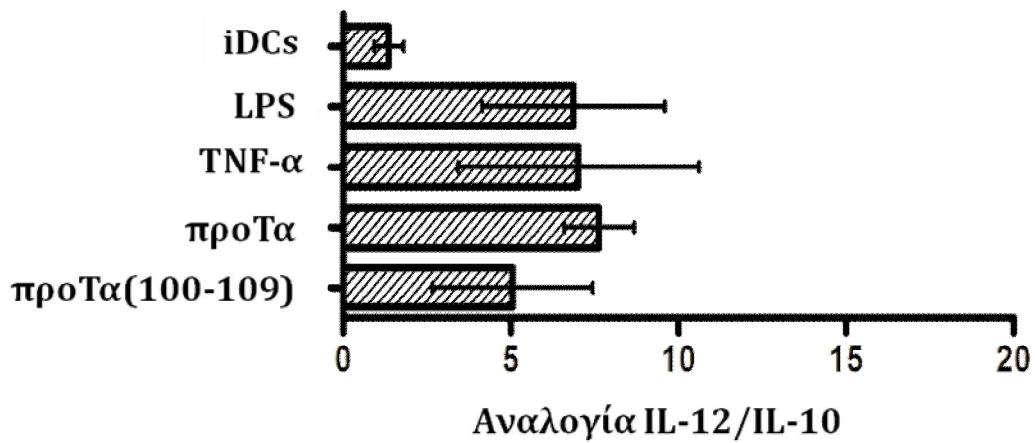
### 3.2.2. Επίδραση των πεπτιδίων στην έκκριση κυτταροκινών

Σε συνδυασμό με τον φαινότυπό τους, τα ώριμα και ανοσολογικά λειτουργικά δενδριτικά κύτταρα είναι επίσης ικανά να παράγουν και να εκκρίνουν τις κατάλληλες κυτταροκίνες (Palucka et al., 2008), μέσω των οποίων παρέχουν στα T κύτταρα το τρίτο σήμα διέγερσης. Επομένως, για τον πλήρη προσδιορισμό της ανοσολογικής επάρκειας των δενδριτικών κυττάρων είναι απαραίτητο η μελέτη του φαινοτύπου να συμπληρωθεί από το πρότυπο των κυτταροκινών που αυτά εκκρίνουν.

Για το σκοπό αυτό, μονοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, που στη συνέχεια ωρίμασαν για 48 ώρες παρουσία LPS, TNF- $\alpha$ , προΤα ή του ανοσοδραστικού της δεκαπεπτιδίου. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα των IL-10 και IL-12 που περιέχουν, με εμπορικά διαθέσιμες ανοσοδοκιμασίες ELISA. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από 5 υγιείς δότες, εκφράστηκαν ως αναλογία IL-12/IL-10, καθώς το ισοζύγιο μεταξύ των δύο αυτών κυτταροκινών έχειδειχθεί ότι καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τον τύπο προς τον οποίο θα διαφοροποιηθούν τα βοηθητικά T κύτταρα (Karsenber, 2003). Κυτταρικά περιβάλλοντα πλούσια σε IL-12 επάγουν κυρίως ανοσοαπαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1, ενώ αντίθετα, η παρουσία IL-10 επάγει κυρίως T<sub>H</sub>2 τύπου διαφοροποίηση.

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 3.4**, τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα παράγουν παρόμοιες ποσότητες IL-12 και IL-10, με αποτέλεσμα η μέση τιμή της αναλογίας τους να είναι 1,4. Αντιθέτως, τα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν υπό πρότυπες συνθήκες (παρουσία LPS ή TNF- $\alpha$ ) παρήγαγαν κυρίως IL-12, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της κυτταροκίνης αυτής να υπερβαίνει αυτήν της IL-10 κατά 6,9 και 7,0 φορές, παρουσία LPS και TNF- $\alpha$ , αντίστοιχα. Αντίστοιχα υψηλές αναλογίες IL-12/IL-10 σημειώθηκαν στα υπερκείμενα των πειραματικών ομάδων τόσο της προΤα (7,6), όσο και του πεπτιδίου προΤα(100-109). Αν και στην τελευταία περίπτωση η αναλογία IL-12/IL-10 ήταν χαμηλότερη (5,0) και πάλι ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι και τα δύο πεπτίδια, όταν χρησιμοποιούνται ως παράγοντες ωρίμανσης δενδριτικών κυττάρων, είναι ικανά να ωθήσουν τη διαφοροποίηση των T κυττάρων προς τον προφλεγμονώδη τύπο ανοσοαπαντήσεων T<sub>H</sub>1, αντίστοιχα με τους παράγοντες ωρίμανσης LPS και TNF- $\alpha$ .



**Εικόνα 3.4.** Πρότυπο εκκρινόμενων κυτταροκινών από ανώριμα και ώριμα δενδριτικά κύτταρα. Η συγκέντρωση των κυτταροκινών IL-12 και IL-10 στα υπερκείμενα ανώριμων δενδριτικών κυττάρων (iDCs) και δενδριτικών κυττάρων που ωρίμασαν για 48 ώρες παρουσία LPS, TNF-α, proTA ή proTA(100-109) εκφράζεται ως αναλογία IL-12/IL-10. Τα δεδομένα αφορούν τις μέσες τιμές  $\pm$  SD από 5 υγιείς δότες.



### 3.3. Μελέτη της λειτουργικότητας ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προθυμοσίνης α ή προΤα(100-109)

Ένα ώριμο δενδριτικό κύτταρο που εκφράζει υψηλά επίπεδα ΜHC μορίων (1ο σήμα διέγερσης), φέρει στην επιφάνειά του τα απαραίτητα συνδιεγερτικά μόρια (CD80/86, 2ο σήμα διέγερσης) και παράγει τις κατάλληλες κυτταροκίνες (IL-12, 3ο σήμα διέγερσης), είναι θεωρητικά ανοσοϊκανό να διεγείρει επαρκώς αντιγονοειδικές CD4+ και CD8+ T κυτταρικές απαντήσεις (Kalinski et al., 2011). Για το λόγο αυτό, ως επόμενο στόχο θέσαμε να διερευνήσουμε αν τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109), εκτός από φαινοτυπικά ώριμα, είναι και λειτουργικά ανοσοϊκανά και μπορούν να ενεργοποιούν *in vitro* αυτόλογα T κύτταρα ειδικά για συγκεκριμένο αντιγόνο. Επιλέξαμε να ελέγξουμε τη λειτουργικότητα των δενδριτικών κυττάρων σε δύο πειραματικά συστήματα καλλιέργειών που αφορούν την *in vitro* ενεργοποίηση και έκπτυξη των βασικότερων T κυτταρικών υποπληθυσμών: i) των T κυττάρων μνήμης και ii) των παρθένων (χωρίς εμπειρία αντιγόνου) T κυττάρων.

Αρχικά, σχεδιάσαμε πρωτόκολλο *in vitro* διέγερσης των T κυττάρων μνήμης. Οι παράμετροι που συνυπολογίσαμε ήταν:

- (1) Ανάκτηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων μνήμης από περιφερικό αίμα ανθρώπου, άρα οι δότες θα έπρεπε να έχουν έρθει σε επαφή με ένα γνωστό και ανιχνεύσιμο στο περιφερικό αίμα παθογόνο, όπως πχ. ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) (Sester et al., 2002, Lee et al., 2008, Snyder et al., 2011). Τα κύτταρα μνήμης έχουν ήδη υποστεί κλωνική επιλογή ως συνέπεια της πρώτης τους επαφής με αντιγόνα του ιού *in vivo* και συνεπώς έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε αντιγονοειδικά κύτταρα-τελεστές ταχύτατα μετά από επόμενη επαφή τους με τα ίδια ιικά αντιγόνα (Veiga-Fernandes et al., 2000). Παράλληλα, ως κύτταρα μνήμης, διαθέτουν και χαμηλότερες «απαιτήσεις» σε συνδιεγερτικά σήματα για την έκπτυξή τους (Fontenot et al., 2003, Croft et al., 1994). Έτσι, μπορούμε να επιτύχουμε ακόμα και παρουσία χαμηλού διεγερτικού σήματος/ερεθίσματος (stimulus) την *in vitro* έκπτυξη T κυττάρων μνήμης μετά από λίγους (συνήθως 1-2) κύκλους ενεργοποιήσεων (Trivedi et al., 2005) με δενδριτικά κύτταρα ωριμασμένα με προΤα ή προΤα(100-109), και
- (2) η φύση/ο τύπος των αντιγόνων που θα χρησιμοποιούνταν για τη διέγερση των T κυττάρων μνήμης. Στην περίπτωση του CMV είναι ήδη γνωστοί πολλοί

ανοσοεπικρατείς επίτοποι των επιφανειακών του πρωτεϊνών (McLaughlin-Taylor et al., 1994, Lim et al., 2009), οι οποίοι είναι εμπορικά διαθέσιμοι ως συνθετικά πεπτίδια, ενώ η επιβεβαίωση της λοίμωξης ενός δότη από τον CMV γίνεται εύκολα, με ταυτοποίηση αντιγόνων του ιού σε δείγμα πλάσματος.

Για την *in vitro* διέγερση παρθένων T κυττάρων, επιλέξαμε ένα αντίστοιχο πρωτόκολλο, όπου τα παρθένα T κύτταρα:

- (1) προέρχονταν από το περιφερικό αίμα υγιών δοτών και η ενεργοποίησή τους έγινε με τουλάχιστον 3 κύκλους διέγερσης και
- (2) οι ανοσογονικοί επίτοποι που χρησιμοποιήσαμε προέρχονταν από καρκινικές πρωτεΐνες, όπως π.χ. η HER-2/neu.

Γνωρίζοντας την ανάγκη ανακάλυψης νέων ανοσοενισχυτικών μορίων που μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα των αντικαρκινικών εμβολίων (Tefit and Serra, 2011, Dang et al., 2012), το πρωτόκολλο ενεργοποίησης των παρθένων T κυττάρων ήταν ο πρωταρχικός στόχος μας, δηλ. η διερεύνηση της ικανότητας της προΤα και του προΤα να δρουν ανοσοενισχυτικά ωριμάζοντας δενδριτικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να επάγουν ογκοειδικές αντικαρκινικές T κυτταρικές απαντήσεις. Η επιλογή, όμως, ογκοειδικών πεπτιδίων ως αντιγόνα και για τις *in vitro* καλλιέργειες ενεργοποίησης T κυττάρων μνήμης απαιτούσε την απομόνωση των κυττάρων από καρκινοπαθείς που εξέφραζαν τα αντιγόνα στους πρωτοπαθείς τους όγκους και στον οποίων το περιφερικό αίμα θα ανιχνεύονταν ικανά ποσοστά ογκοειδικών T κυττάρων μνήμης. Ωστόσο, αφ'ενός η πλειοψηφία των καρκίνων δεν εγείρουν ικανοποιητικές T κυτταρικές απαντήσεις (Idenoue et al., 2005, Prado-Garcia et al., 2012, Soliman, 2013) και αφ'ετέρου τα όποια T κύτταρα μνήμης αναπτύσσονται εναντίον των ογκοειδικών αντιγόνων δεν επιβιώνουν ή δεν είναι μακροπρόθεσμα λειτουργικά (Whiteside, 2006, Prado-Garcia et al., 2012). Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τη δύσκολη πρόσβαση σε δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο, κατέστησαν αδύνατη τη χρήση ογκοειδικών αντιγόνων για τη διέγερση T κυττάρων μνήμης. Συνεπώς, περιορίσαμε αρχικά τη μελέτη μας στη χρήση ικτών πεπτιδίων ως αντιγόνα διέγερσης για το σύστημα μνήμης, και στη συνέχεια ογκοειδικών αντιγόνων για το σύστημα των παρθένων T κυττάρων. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της επιλογής μας είναι ότι η δράση των προΤα και προΤα(100-109) ως ανοσοενισχυτικά μόρια που επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων δοκιμάστηκε παράλληλα με δύο διαφορετικής φύσης αντιγόνα, ικά και καρκινικά.

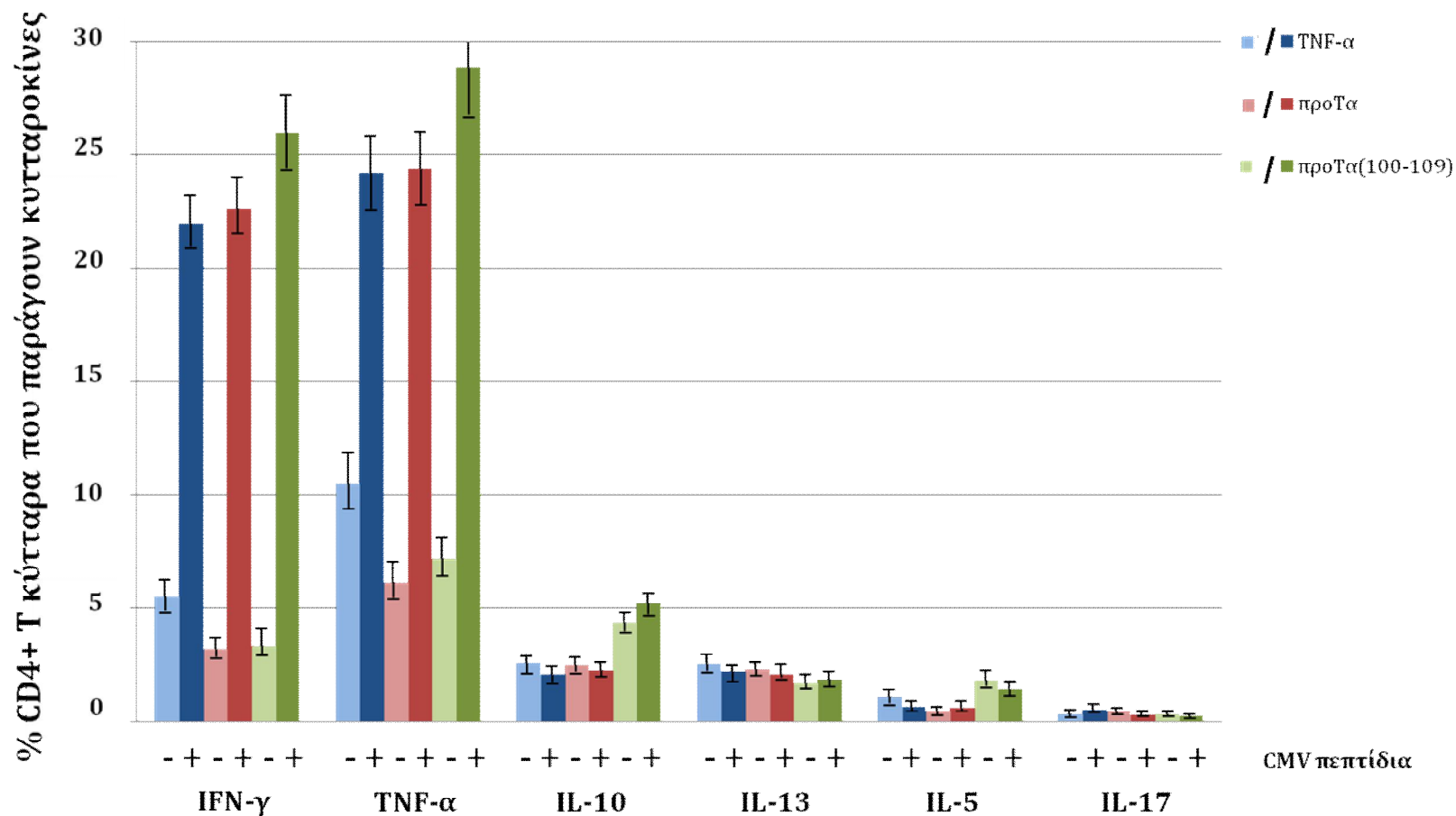
### 3.3.1 Η προθυμοσίνη α και το πεπτιδίο προΤα(100-109) ενεργοποιούν Τ κύτταρα μνήμης

Για τη διέγερση των Τ κυττάρων μνήμης, επιλέχθηκαν αντιγόνα από δύο πρωτεΐνες του ανθρώπινου CMV, τις IE1 και pp65. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μείγμα αντιγονικών πεπτιδίων και από τις δύο πρωτεΐνες, μήκους 15 αμινοξέων το καθένα με αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες, τα οποία έχουν αποδεδειγμένη ικανότητα διέγερσης Τ κυττάρων μνήμης *in vitro* (Sinclair et al., 2004, Zandvliet et al., 2010). Για την έκπτυξη αντιγονοειδικών Τ κυττάρων μνήμης, απομονώθηκαν αρχικά μονοκύτταρα από μονοπύρηνια περιφερικού αίματος δοτών θετικών για τον CMV (όπως ταυτοποιήθηκαν με ELISA και PCR στο εργαστήριο του Καθηγητή G. Pawelec του Πανεπιστημίου Tuebingen). Στη συνέχεια, τα μονοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία ωρίμασαν παρουσία TNF-α, προΤα ή προΤα(100-109).

Την ημέρα 0 του πρωτοκόλλου, τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα και των τριών πειραματικών ομάδων χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση αυτόλογων Τ κυττάρων, παρουσία του μίγματος των πεπτιδίων-αντιγόνων του CMV. Ακολούθησε η έκπτυξη των ειδικών ως προς τα αντιγόνα Τ κυτταρικών σειρών, οι οποίες επαναδιεγέρθηκαν την ημέρα 10 με αυτόλογα μονοπύρηνια παρουσία του ίδιου μίγματος αντιγόνου και μπρεφελδίνης Α, ώστε να κατασταλεί η εξωκυττάρωση των παραγόμενων κυτταροκινών. Μετά από 12 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ενδοκυτταρική παραγωγή των κυτταροκινών IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-5, IL-13 και IL-17.

Τα αποτελέσματα από 2 διαφορετικούς CMV θετικούς δότες (**Εικόνα 3.5**) έδειξαν ότι τα βοηθητικά Τ κύτταρα μνήμης που ενεργοποιήθηκαν με TNF-α-, προΤα- ή προΤα-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα απουσία πεπτιδίων του CMV παράγαν σε σχετικά χαμηλά ποσοστά τις κυτταροκίνες IFN-γ (μέση τιμή 5,47, 3,20 και 3,31%, αντίστοιχα) και TNF-α (10,47, 6,10 και 7,17% αντίστοιχα). Τα ποσοστά αυτά αυξήθηκαν σημαντικά και στις 3 πειραματικές ομάδες όταν τα CD4+ Τ κύτταρα διεγέρθηκαν με δενδριτικά κύτταρα φορτωμένα με CMV πεπτιδία (21,93, 22,63 και 25,96% για την IFN-γ και 24,19, 24,35 και 28,86% για τον TNF-α, αντίστοιχα). Αντίθετα, αντίστοιχη σημαντική αύξηση δεν καταγράφηκε για την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Συγκεκριμένα, τα βοηθητικά Τ κύτταρα που διεγέρθηκαν με TNF-α ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα

ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά θετικά για τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-10, IL-13 και IL-5, τόσο απουσία (2,54, 2,52 και 1,09%, αντίστοιχα), όσο και παρουσία (2,08, 2,18 και 0,61%, αντίστοιχα) CMV πεπτιδίων στην καλλιέργεια. Συγκρίσιμα ήταν και τα ποσοστά των CD4+ T κυττάρων που παρήγαγαν IL-10, IL-13 και IL-5 στην ομάδα της προΤα (2,49, 2,31 και 0,46%, αντίστοιχα) και του προΤα(100-109) (4,34, 1,67 και 1,81%, αντίστοιχα), απουσία πεπτιδίων του CMV, ενώ και πάλι η προσθήκη αντιγόνου στην καλλιέργεια δεν οδήγησε σε αύξηση των ποσοστών αυτών [2,26, 2,08 και 0,59% για τα προΤα- και 5,20, 1,83 και 1,37% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, αντίστοιχα]. Τέλος, απουσία αντιγόνου, η παραγωγή της IL-17 ήταν εξίσου χαμηλή και στις 3 πειραματικές ομάδες [0,31% για τα TNF-α-, 0,42% για τα προΤα- και 0,32% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα] και δεν μεταβλήθηκε μετά την προσθήκη CMV πεπτιδίων στην καλλιέργεια [0,50% για τα TNF-α-, 0,29% για τα προΤα- και 0,22% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα].

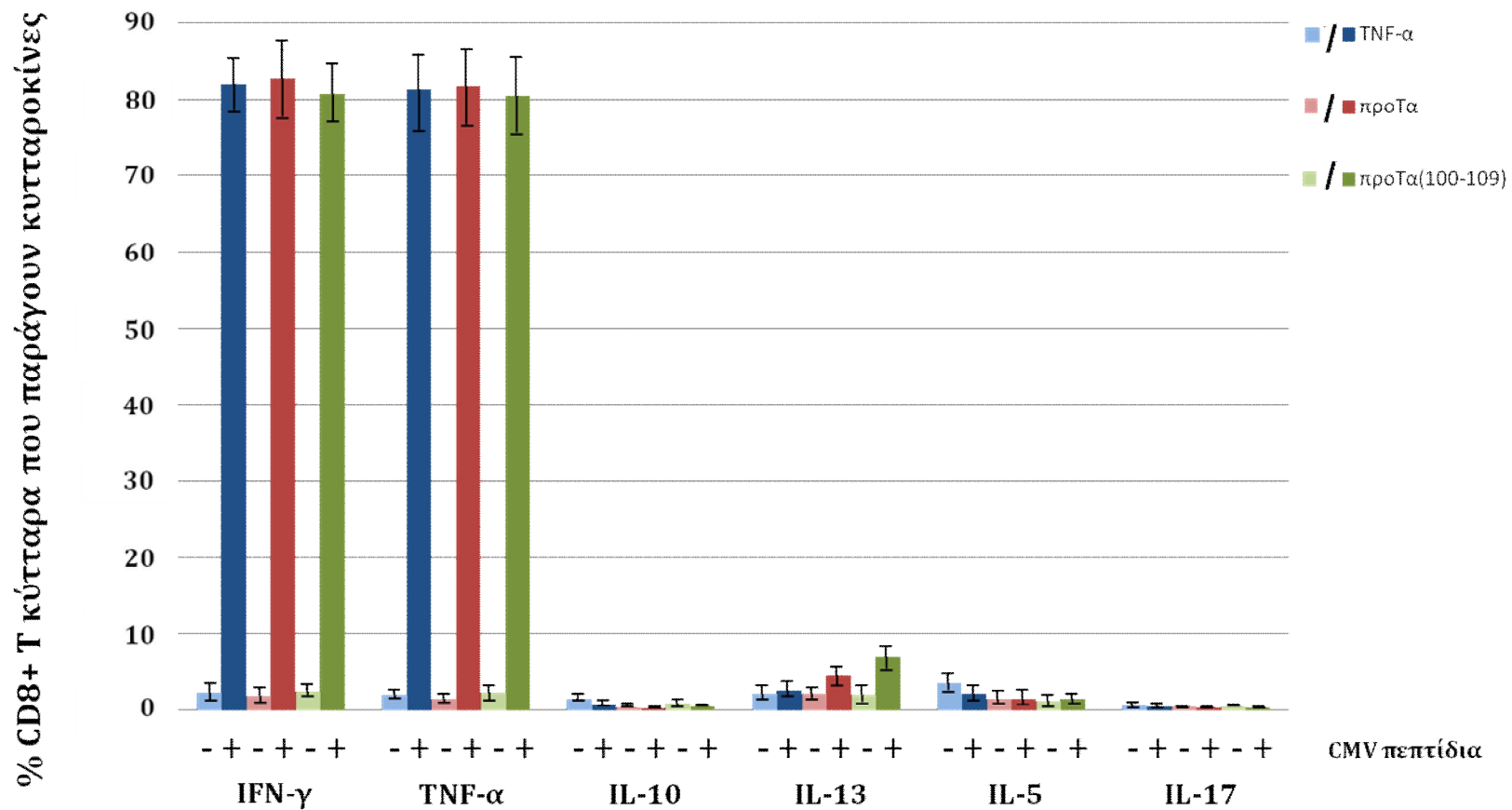


**Εικόνα 3.5.** Βοηθητικά T κύτταρα μνήμης που διεγέρθηκαν παρουσία δενδριτικών κυττάρων, ωριμασμένων με προΤα ή το πεπτιδίδια προΤα(100-109), παράγουν κυρίως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Μονοκύτταρα CMV θετικών δοτών διαφοροποιήθηκαν σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, ωρίμασαν παρουσία TNF-α, προΤα ή προΤα(100-109) και διεγείρουν αυτόλογα T κύτταρα παρουσία πεπτιδίων-αντιγόνων των πρωτεϊνών IE1 και pp65 του ανθρώπινου CMV. Τα ποσοστά των CD4+ T κυττάρων που παράγουν ενδοκυτταρικά IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-13, IL-5 και IL-17 προσδιορίστηκαν στο σύνολο των επιλεγμένων (gated) CD4+ T κυττάρων. Τα αποτελέσματα αφορούν τις μέσες τιμές ± SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων μνήμης, που προέρχονταν από τις ίδιες καλλιέργειες ενεργοποίησης (**Εικόνα 3.6**).

Αναλυτικότερα, τα CD8+ Τ κύτταρα που διεγέρθηκαν παρουσία αφόρτων δενδριτικών κυττάρων και των 3 πειραματικών ομάδων ήταν σε χαμηλά ποσοστά θετικά για τις κυτταροκίνες IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  [2,32 και 1,96% για τα TNF- $\alpha$ -, 1,92 και 1,44% για τα προΤα- και 2,43 και 2,31% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, αντίστοιχα], ποσοστά τα οποία αυξήθηκαν σημαντικά παρουσία των CMV πεπτιδίων [81,91 και 81,22% για τα TNF- $\alpha$ -, 82,80 και 81,66% για τα προΤα- και 80,75 και 80,42% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, αντίστοιχα]. Αντίστοιχα με τα βοηθητικά, τα CD8+ Τ κύτταρα που διεγέρθηκαν με TNF- $\alpha$ -ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παράγαγαν σε χαμηλό ποσοστό τους τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-10, IL-13, IL-5 και την IL-17, τόσο απουσία (1,41, 2,13, 3,56 και 0,64%, αντίστοιχα), όσο και παρουσία (0,77, 2,55, 2,07 και 0,44%, αντίστοιχα) των CMV πεπτιδίων. Η παραγωγή των κυτταροκινών IL-10, IL-13, IL-5 και IL-17 ήταν χαμηλή απουσία αντιγόνου τόσο για την ομάδα της προΤα (0,39, 2,14, 1,38 και 0,55%, αντίστοιχα), όσο και του προΤα(100-109) (0,83, 2,03, 1,12 και 0,48%, αντίστοιχα) και δεν μεταβλήθηκε σημαντικά από την προσθήκη CMV πεπτιδίων στην καλλιέργεια [(0,14, 4,51, 1,40 και 0,28% για τα προΤα- και 0,42, 6,97, 1,43 και 0,34% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, αντίστοιχα].

Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα ως προς το πρότυπο των παραγόμενων από τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα μνήμης κυτταροκινών, υποδεικνύουν ότι, όπως και ο TNF- $\alpha$ , τόσο το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) όσο και η ακέραια προΤα επάγουν *in vitro* ανοσολογικές απαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1 από τα βοηθητικά Τ κύτταρα μνήμης και ενισχύουν το κυτταρομεσολαβητικό σκέλος της ανοσίας, με αύξηση της δραστηριότητας των κυτταροτοξικών CD8+ Τ λεμφοκυττάρων μνήμης.



**Εικόνα 3.6.** Κυτταροτοξικά T κύτταρα μνήμης που διεγέρθηκαν παρουσία δενδριτικών κυττάρων, ωριμασμένων με προTa ή το πεπτίδιο προTa(100-109), παράγουν κυρίως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν ίδιες με αυτές που αναφέρονται στη λεζάντα της Εικόνας 3.5 και τα ποσοστά των CD8+ T κυττάρων που παράγουν ενδοκυτταρικά IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-13, IL-5 και IL-17 προσδιορίστηκαν στο σύνολο των επιλεγμένων (gated) CD8+ T κυττάρων. Τα αποτελέσματα αφορούν τις μέσες τιμές ± SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

### 3.3.2 Η προθυμοσίνη α και το πεπτίδιο (100-109) ενεργοποιούν παρθένα T κύτταρα

Η λειτουργικότητα των δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) ελέγχθηκε και σε καλλιέργειες ενεργοποίησης παρθένων T κυττάρων παρουσία ογκοειδικών αντιγόνων. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, θελήσαμε να διερευνήσουμε την ικανότητα των συγκεκριμένων δενδριτικών κυττάρων να ενεργοποιούν παρθένα T κύτταρα παρουσία πεπτιδίων-επιτόπων ενός εαυτού TAA, τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσιάζουν χαμηλή ανοσογονικότητα.

Ως ογκοειδικά αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια από την αλληλουχία της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, η οποία εκφράζεται φυσιολογικά σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα και υπερεκφράζεται σε καρκίνους διαφόρων τύπων, κυρίως του μαστού και των ωοθηκών. Για αυτό και αποτελεί στόχο πολλών προσπαθειών ανοσοθεραπείας του καρκίνου (Mittendorf et al., 2008, Khoo et al., 2006). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν δύο επίτοποι που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές με πεπτιδικά εμβόλια, οι HER-2(9<sub>369</sub>) και HER-2(15<sub>776</sub>) που προσδένονται στα HLA-A2 και HLA-DR4 αλληλόμορφα των MHC μορίων τάξης I και II, αντίστοιχα, και συνεπώς, μπορούν να ενεργοποιήσουν CD8+ και CD4+ T κύτταρα, αντίστοιχα (Robbins, 2005, Salazar et al., 2004). Για το λόγο αυτό, οι δότες που επιλέχθηκαν για αυτή την πειραματική διαδικασία ήταν διπλά θετικοί για τα HLA-A2 και HLA-DR4 αλληλόμορφα. Επίσης, γνωρίζοντας ότι η HER-2/neu υπερεκφράζεται σε γυναικολογικούς, κυρίως, καρκίνους προτιμήθηκαν υγιείς δότες αρσενικού φύλου ως δότες T κυττάρων, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ύπαρξης προενεργοποιημένων για τους επιτόπους αυτούς πληθυσμών T κυττάρων στο περιφερικό τους αίμα.

Δεδομένου ότι επρόκειτο για ενεργοποίηση παρθένων T κυττάρων και προκειμένου να εκπτυχθούν ικανοποιητικά αντιγονοειδικές T κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήσαμε πρωτόκολλο που περιελάμβανε περισσότερες από δύο διεγέρσεις με «επαγγελματικά» αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Yee et al., 2002). Έτσι, τα παρθένα T κύτταρα διεγέρθηκαν τρεις φορές, ανά διαστήματα 7 ημερών, με αυτόλογα ώριμα δενδριτικά κύτταρα ωριμασμένα με TNF-α, προΤα ή προΤα(100-109) και μία τέταρτη φορά με αυτόλογα μονοπύρηννα, και στη συνέχεια ελέγχθηκαν ενδοκυτταρικά για την παραγωγή των κυτταροκινών TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 και IL-17.



Στους **Πίνακες 3.1** και **3.2** παρατίθενται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ενδοκυτταρικής χρώσης για τον ένα δότη από τους 2 που ελέγχθηκαν, για τα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα.

Από την ανάλυση των CD4+ T κυττάρων, παρατηρούμε πως, παρά τα χαμηλά ποσοστά HER-2/neu θετικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν, η παρουσία αντιγόνου στις καλλιέργειες διέγερσης (+HER-2/neu πεπτίδια) και των τριών πειραματικών ομάδων οδήγησε σε αύξηση των ποσοστών των θετικών κυττάρων για συγκεκριμένες κυτταροκίνες, γεγονός που υποδηλώνει την ανάπτυξη αντιγονοειδικών απαντήσεων. Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.1**, προσθήκη των επιτόπων της HER-2/neu, οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής των κυτταροκινών IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και IL-2 από τα βοηθητικά T κύτταρα, ανεξαρτήτως του παράγοντα ωρίμανσης που χρησιμοποιήθηκε. Αντιθέτως, αντίστοιχη αύξηση των ποσοστών των θετικών κυττάρων δεν παρατηρήθηκε για τις κυτταροκίνες IL-4, IL-10 και IL-17.

Παρόμοια τάση αύξησης των ποσοστών των θετικών κυττάρων για τις κυτταροκίνες IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και IL-2 παρατηρήθηκε και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα CD8+ T κύτταρα που διεγέρθηκαν παρουσία των επιτόπων της HER-2/neu και στις τρεις πειραματικές ομάδες (**Πίνακας 3.2**). Σε αντίθεση, τα ποσοστά των θετικών για την IL-4 κυττάρων ήταν οριακά και δεν μεταβλήθηκαν από την προσθήκη αντιγόνου στις καλλιέργειες διέγερσης.

Συνολικά, λοιπόν, παρατηρήσαμε ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν με προΤα ή προΤα(100-109) ήταν εξίσου ικανά με τα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν υπό πρότυπες συνθήκες (με TNF- $\alpha$ ) να διεγείρουν ογκοειδικές απαντήσεις από αυτόλογα παρθένα T λεμφοκύτταρα. Αν και τα ποσοστά των θετικών κυττάρων για όλες τις κυτταροκίνες ήταν ιδιαίτερα χαμηλά, διαπιστώνουμε ότι το προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών (υψηλότερη παραγωγή προφλεγμονωδών και χαμηλότερη παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών παρουσία αντιγόνου) από τα T κύτταρα είναι παρόμοιο με αυτό του πειραματικού συστήματος των κυττάρων μνήμης. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε και την πρώτη ένδειξη ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα(100-109) ή προΤα είναι ικανά να επάγουν προφλεγμονώδεις ανοσοαπαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1 ανεξαρτήτως των αντιγόνων τα οποία παρουσιάζουν (ικκά ή ογκοειδικά).

**Πίνακας 3.1.** Ποσοστά CD4+ T κυττάρων θετικών για τις κυτταροκίνες IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10 και IL-17 στο σύνολο των επιλεχθέντων (gated) CD4+ T κυττάρων που εκπύχθηκαν *in vitro* απουσία ή παρουσία αντιγόνου

Συνθήκες ωρίμανσης DC	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-10	IL-17
<i>Πρότυπες συνθήκες</i>						
TNF- $\alpha$ χωρίς πεπτίδια <sup>1</sup>	0,04% <sup>3</sup>	0,04%	0,04%	0,02%	0,08%	0,03%
TNF- $\alpha$ + HER-2/neu πεπτίδια <sup>2</sup>	0,35%	1,73%	1,11%	0,72%	0,09%	0,06%
<i>Πειραματικές συνθήκες</i>						
προΤα χωρίς πεπτίδια <sup>1</sup>	0,01%	0,04%	0,03%	0,02%	0,08%	0,03%
προΤα + HER-2/neu πεπτίδια <sup>2</sup>	0,20%	0,57%	0,17%	0,07%	0,20%	0,04%
προΤα(100-109) χωρίς πεπτίδια <sup>1</sup>	0,01%	0,05%	0,05%	0,01%	0,20%	0,02%
προΤα(100-109) + HER-2/neu πεπτίδια <sup>2</sup>	0,07%	0,24%	0,08%	0,04%	0,23%	0,02%

<sup>1</sup> T κύτταρα που διεγέρθηκαν με TNF- $\alpha$ - (πρότυπα), προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα απουσία πεπτιδίων της HER-2/neu

<sup>2</sup> T κύτταρα που διεγέρθηκαν με TNF- $\alpha$ - (πρότυπα), προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παρουσία των πεπτιδίων της HER-2/neu

<sup>3</sup> ποσοστό T κυττάρων θετικών για την κυτταροκίνη στο σύνολο των επιλεχθέντων (gated) CD4+ T κυττάρων

**Πίνακας 3.2.** Ποσοστά CD8+ T κυττάρων θετικών για τις κυτταροκίνες IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 και IL-4 στο σύνολο των επιλεγθέντων (gated) CD8+ T κυττάρων που εκπύχθηκαν *in vitro* απουσία ή παρουσία αντιγόνου.

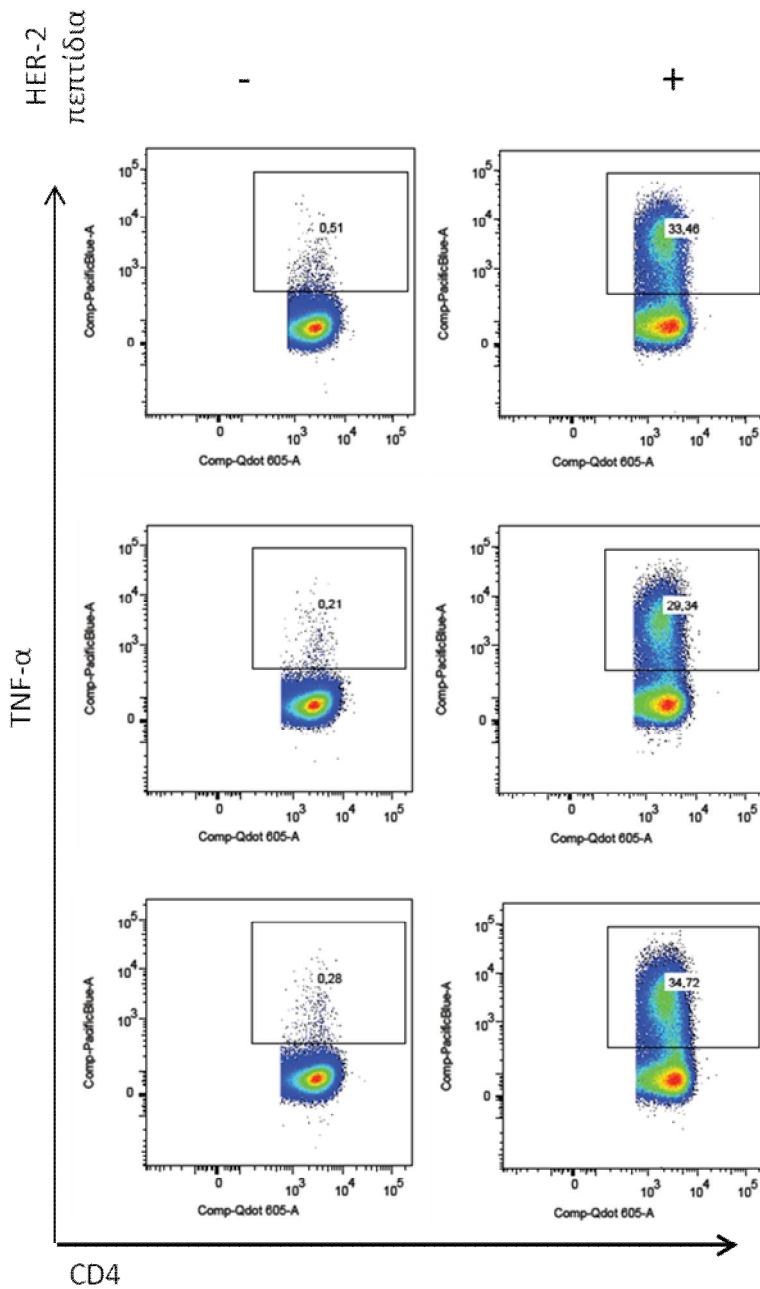
Συνθήκες ωρίμανσης DC	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4
<i>Πρότυπες συνθήκες</i>				
TNF- $\alpha$ χωρίς πεπτίδια <sup>1</sup>	1,86% <sup>3</sup>	0,01%	0,09%	0,00%
TNF- $\alpha$ + HER-2/neu πεπτίδια <sup>2</sup>	1,81%	12,54%	5,20%	0,00%
<i>Πειραματικές συνθήκες</i>				
προΤα χωρίς πεπτίδια <sup>1</sup>	0,09%	0,03%	0,06%	0,01%
προΤα + HER-2/neu πεπτίδια <sup>2</sup>	0,80%	7,51%	2,32%	0,01%
προΤα(100-109) χωρίς πεπτίδια <sup>1</sup>	0,07%	0,02%	0,06%	0,02%
προΤα(100-109) + HER-2/neu πεπτίδια <sup>2</sup>	0,25%	2,53%	0,65%	0,02%

<sup>1,2</sup> όπως στον Πίνακα 3.1

<sup>3</sup> ποσοστό T κυττάρων θετικών για την κυτταροκίνη στο σύνολο των επιλεγθέντων (gated) CD8+ T κυττάρων

Προκειμένου να αυξήσουμε την αντιγονοειδική απαντητικότητα των T κυττάρων και συνεπώς να ανιχνεύσουμε υψηλότερα ποσοστά CD4+ και CD8+ T κυττάρων στις καλλιέργειες διέγερσης, βελτιστοποιήσαμε το πρωτόκολλο διέγερσης μειώνοντας τον αριθμό των συνολικών διεγέρσεων. Είναι γνωστό ότι η υπερβολική διέγερση των λεμφοκυττάρων οδηγεί σε μείωση της απαντητικότητας και της βιωσιμότητάς τους (Mehrotra et al., 2003). Υποθέτοντας συνεπώς ότι τα T κύτταρα εξαντλούνται μετά από 4 κύκλους διέγερσης, εφαρμόσαμε ένα πρωτόκολλο 3 συνολικά διεγέρσεων ανά 7 ημέρες με αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα των ίδιων πειραματικών ομάδων [δηλ. δενδριτικών κυττάρων που έχουν ωριμάσει παρουσία TNF- $\alpha$ , προΤα ή προΤα(100-109)] και εντός 12 ωρών μετά την 3η διέγερση, τα T κύτταρα ελέγχθηκαν ως προς την ενδοκυτταρική παραγωγή των προαναφερθέντων κυτταροκινών, αλλά και την έκφραση του επιφανειακού μορίου CD107, που είναι χαρακτηριστικός δείκτης επαγωγής της CD8+ T κυτταροτοξικότητας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των CD4+ T κυττάρων ενός αντιπροσωπευτικού δότη από τους 3 συνολικά που ελέγχθηκαν για την παραγωγή της κυτταροκίνης TNF- $\alpha$  (**Εικόνα 3.7**), ένα μικρό μόνο ποσοστό (0,51%) των βοηθητικών T κυττάρων που διεγέρθηκαν τρεις φορές με πρότυπα δενδριτικά (TNF- $\alpha$ -ωριμασμένα), είναι θετικά και, επομένως, παρήγαγαν την κυτταροκίνη TNF- $\alpha$ , απουσία των πεπτιδίων της HER-2/neu. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σημαντικά (33,46%), όταν τα CD4+ T κύτταρα διεγέρθηκαν παρουσία των πεπτιδίων της HER-2/neu, πριν την ενδοκυτταρική τους χρώση, γεγονός που αποδεικνύει ότι η παραγωγή των κυτταροκινών είναι αντιγονοειδική. Σημαντική αύξηση των θετικών για τον TNF- $\alpha$ , CD4+ T κυττάρων παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που τα T κύτταρα διεγέρθηκαν με δενδριτικά κύτταρα ωριμασμένα με προΤα. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των θετικών κυττάρων στην ομάδα αυτή αυξήθηκε από 0,21% (απουσία) σε 29,34% (παρουσία πεπτιδίων), ενώ αυξημένα ήταν και τα ποσοστά που καταγράφηκαν για την πειραματική ομάδα του πεπτιδίου προΤα(100-109) (0,28 και 34,72%, αντίστοιχα).

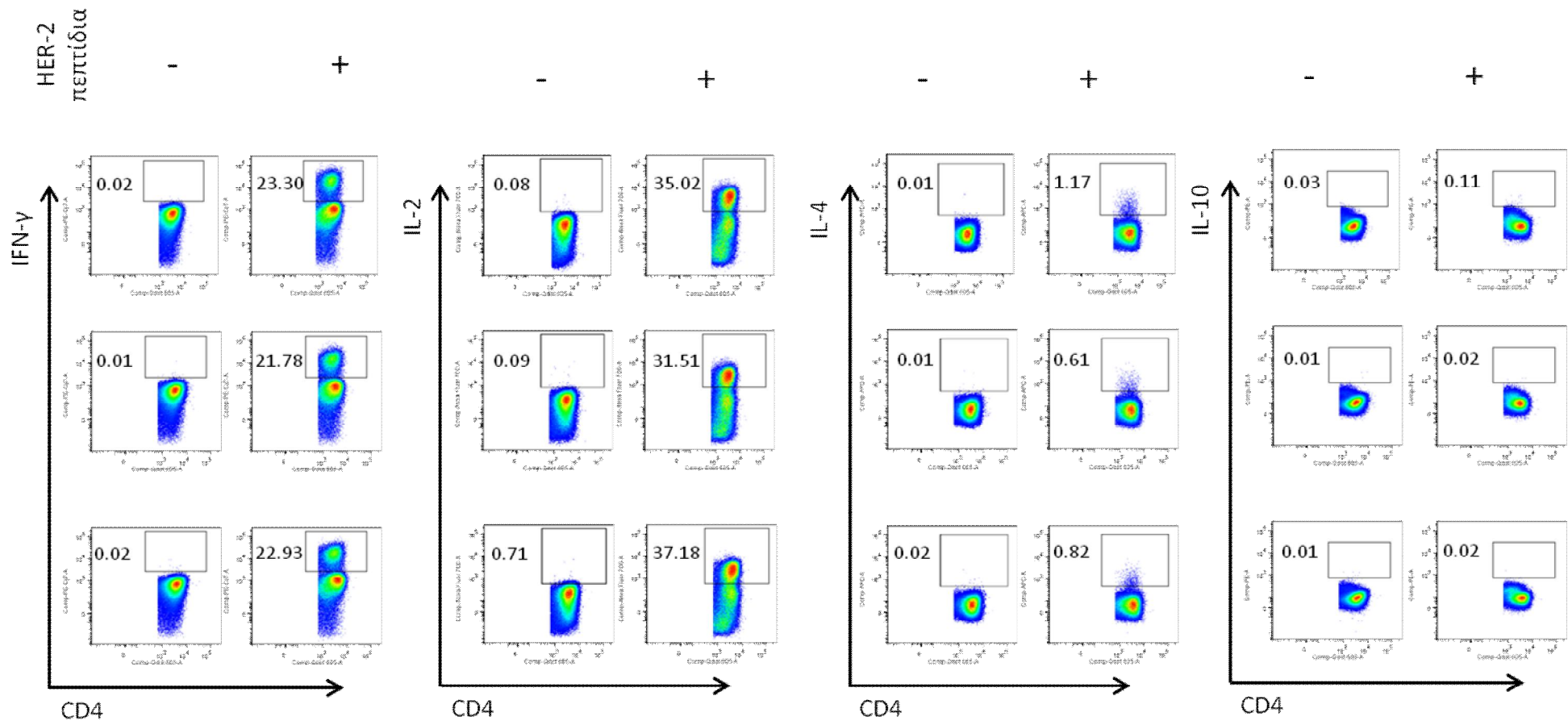


**Εικόνα 3.7.** Βοηθητικά T κύτταρα που διεγέρθηκαν με δενδριτικά κύτταρα, ωριμασμένα με προΤα ή το πεπτίδιο προΤα(100-109), παράγουν TNF-α παρουσία αντιγόνου. Μονοκύτταρα HLA-A2+/DR4+ δοτών διαφοροποιήθηκαν σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και ωρίμασαν για 48 ώρες με TNF-α (πρώτη σειρά), προΤα (δεύτερη σειρά) ή προΤα(100-109) (τρίτη σειρά), φορτώθηκαν με τα πεπτιδία/επιτόπους HER-2(9<sub>369</sub>) και HER-2(15<sub>776</sub>) και χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση αυτόλογων T κυττάρων. Με πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής, τα CD4+ T κύτταρα αναλύθηκαν για την ενδοκυτταρική παραγωγή TNF-α, απουσία (-) ή παρουσία (+) των πεπτιδίων HER-2/νευ. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ποσοστά των θετικών κυττάρων στα επιλεγμένα (gated) CD4+ T κύτταρα. Αποτελέσματα από έναν αντιπροσωπευτικό δότη από τους 3 που αναλύθηκαν.

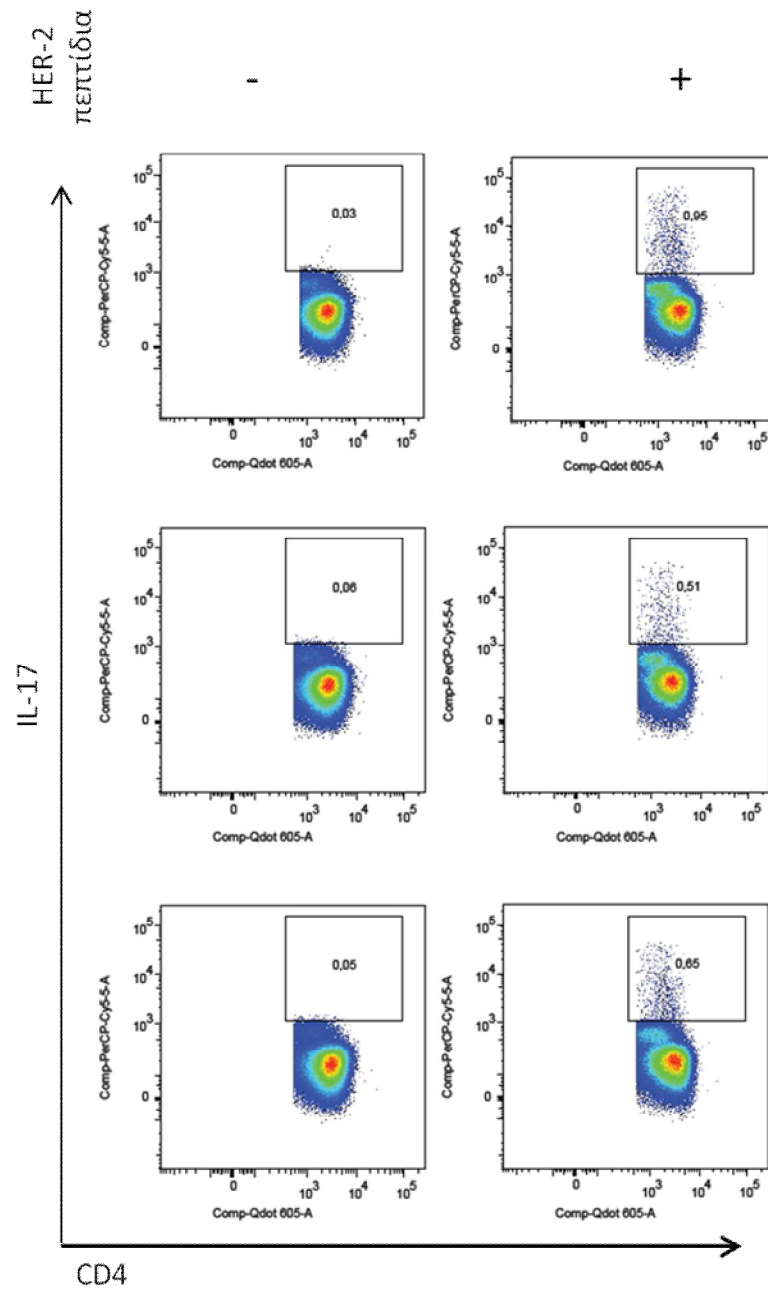
Εκτός από την κυτταροκίνη TNF- $\alpha$ , τα βοηθητικά T κύτταρα αναλύθηκαν και ως προς την παραγωγή IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 και IL-17. Αναλυτικότερα, παρουσία «αφόρτωτων» πρότυπων δενδριτικών κυττάρων, μόνο ένα μικρό ποσοστό (0,02%) των CD4+ T κυττάρων παρήγαγαν IFN- $\gamma$ , ποσοστό το οποίο αυξήθηκε σημαντικά (23,30%) όταν τα πρότυπα δενδριτικά κύτταρα ήταν «φορτωμένα» με τα πεπτίδια της HER-2/neu (**Εικόνα 3.8**). Ανάλογη αύξηση του ποσοστού των θετικών για την IFN- $\gamma$  κυττάρων σημειώθηκε και στις πειραματικές ομάδες όπου τα CD4+ T κύτταρα διεγέρθηκαν με δενδριτικά κύτταρα ωριμασμένα με προΤα (21,78%) ή προΤα(100-109) (22,93%) παρουσία των πεπτιδίων της HER-2/neu, σε σύγκριση με τα ποσοστά που καταγράφηκαν απουσία των πεπτιδίων (0,01 και 0,02%, αντίστοιχα).

Τα ποσοστά των CD4+ T κυττάρων που παρήγαγαν IL-2 αυξήθηκαν, επίσης, σημαντικά ύστερα από διέγερση με δενδριτικά κύτταρα και των τριών πειραματικών ομάδων παρουσία των πεπτιδίων της HER-2/neu (35,02% για την ομάδα του TNF- $\alpha$ , 31,51% για την ομάδα της προΤα και 37,18% για την ομάδα του προΤα(100-109), συγκριτικά με τα 0,08, 0,09 και 0,71% των αντίστοιχων μαρτύρων, απουσία των HER-2/neu πεπτιδίων).

Αντιθέτως, η παραγωγή των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-4 και IL-10 ήταν ιδιαίτερα χαμηλή ακόμα και όταν τα βοηθητικά T κύτταρα διεγέρθηκαν παρουσία «φορτωμένων» δενδριτικών κυττάρων, ανεξαρτήτως του παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε για την ωρίμανσή τους (**Εικόνα 3.8**). Συγκεκριμένα, το ποσοστό των CD4+ T κυττάρων που παρήγαγαν IL-4 αυξήθηκε από 0,01% (απουσία πεπτιδίων) σε 1,17% των συνολικών T κυττάρων που διεγέρθηκαν παρουσία πρότυπων «φορτωμένων» δενδριτικών κυττάρων, από 0,01% σε 0,61% και από 0,02% σε 0,82% για τις πειραματικές ομάδες της προΤα και του προΤα(100-109), αντίστοιχα. Επιπλέον, τα IL-10 θετικά CD4+ T κύτταρα αυξήθηκαν από 0,03% σε 0,11% για τα πρότυπα, από 0,01% σε 0,02% για τα προΤα- και από 0,01% σε 0,02% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, απουσία και παρουσία των HER-2/neu πεπτιδίων, αντίστοιχα.



**Εικόνα 3.8.** Τα κύτταρα που διεγέρθηκαν με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες τύπου T<sub>H</sub>1, παρουσία πεπτιδίων της HER-2/neu. Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα των ίδιων καλλιιεργειών ενεργοποίησης με αυτών της Εικόνας 3.7, ελέγχθηκαν με πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής για την ενδοκυτταρική παραγωγή IFN-γ, IL-2, IL-4 και IL-10 απουσία (-) ή παρουσία (+) των πεπτιδίων HER-2/neu. Πρώτη σειρά: δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με TNF-α, δεύτερη σειρά: δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με προΤα, τρίτη σειρά: δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με προΤα(100-109). Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ποσοστά των θετικών κυττάρων στα επιλεγμένα (gated) CD4+ T κύτταρα για την κάθε κυτταροκίνη. Αποτελέσματα από έναν αντιπροσωπευτικό δότη από τους 3 που αναλύθηκαν.



**Εικόνα 3.9.** Τα κύτταρα που διεγέρθηκαν με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα παράγουν οριακές ποσότητες IL-17 παρουσία πεπτιδίων της HER-2/neu. Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα των ίδιων καλλιιεργειών ενεργοποίησης με αυτών της Εικόνας 3.7, ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ενδοκυτταρική παραγωγή IL-17 απουσία (-) ή παρουσία (+) των πεπτιδίων HER-2/neu. Η παράθεση των αποτελεσμάτων είναι αντίστοιχη με αυτήν που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.7.

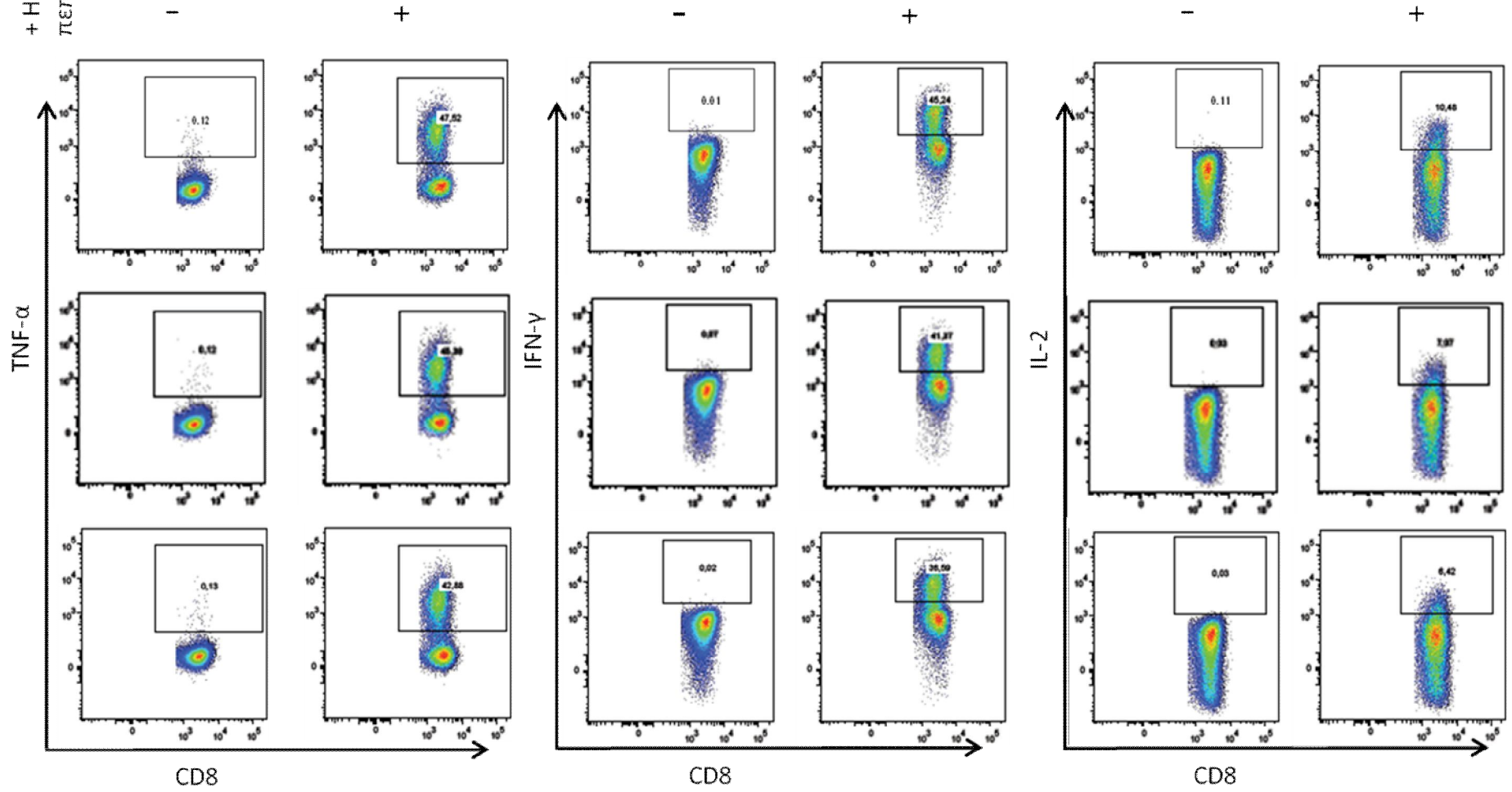


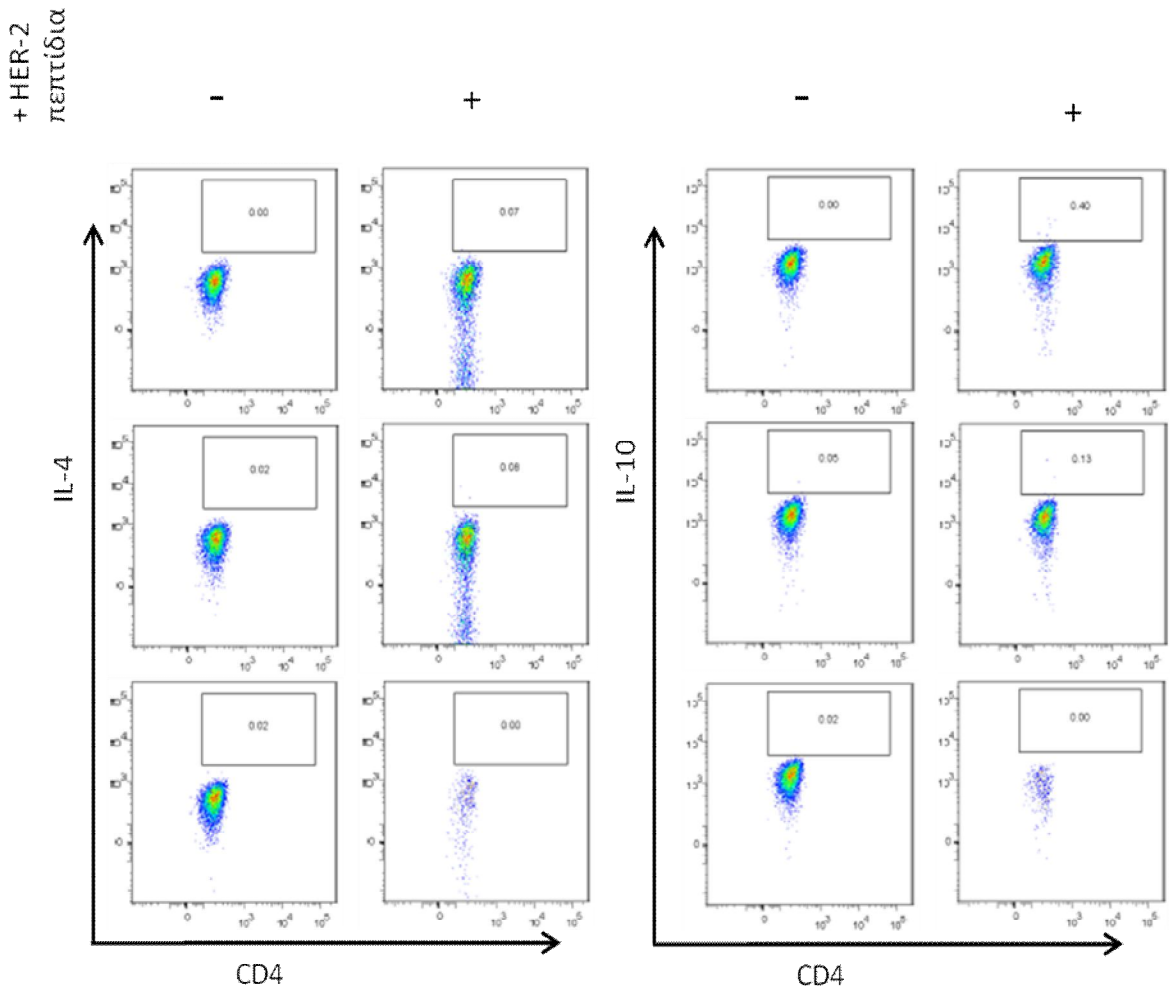
Επιπλέον, ένα παρόμοιο πρότυπο οριακής αύξησης παρουσία αντιγόνου παρουσίασε και η παραγωγή της IL-17 (**Εικόνα 3.9**) από τα βοηθητικά T κύτταρα και των τριών πειραματικών ομάδων (0,95% για τα πρότυπα, 0,51% για προΤα-και 0,65% για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, συγκριτικά με τα ποσοστά 0,03, 0,06 και 0,05% των αντίστοιχων μαρτύρων, απουσία των HER-2/neu πεπτιδίων). Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με προΤα ή προΤα(100-109) είναι ανοσοϊκανά και μπορούν, παρουσία συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων, να ευνοούν την *in vitro* παραγωγή προφλεγμονωδών (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ), έναντι αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-4, IL-10) και της IL-17, από τα διεγερμένα CD4+ T λεμφοκύτταρα, προάγοντας ανοσοαπαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1.

Ωστόσο, μία επιτυχής κυτταρομεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση απαιτεί τη συνεργασία T<sub>H</sub>1-βοηθητικών και κυτταροτοξικών T κυττάρων (Bevan, 2004). Για το λόγο αυτό ερευνήσαμε αν τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν με προΤα ή το πεπτίδιο προΤα(100-109) μπορούν να επάγουν και αντιγονοειδικές T κυτταροτοξικές απαντήσεις.

CD8+ T κύτταρα που προέρχονταν από τις προαναφερθείσες καλλιέργειες ενεργοποίησης ελέγχθηκαν για την ενδοκυτταρική παραγωγή των κυτταροκινών TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 και IL-10. Από την ανάλυση (**Εικόνα 3.10**) παρατηρήσαμε ότι τα CD8+ T κύτταρα που διεγέρθηκαν με «αφόρτωτα» πρότυπα δενδριτικά κύτταρα δεν παρήγαγαν καμία από τις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν (0,12% για τον TNF- $\alpha$ , 0,01 % για την IFN- $\gamma$ , 0,11% για την IL-2, 0,00% για τις IL-4 και IL-10). Παρουσία των HER-2/neu πεπτιδίων, τα ποσοστά των κυττάρων που παρήγαγαν τις τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξήθηκαν σημαντικά (47,52% για τον TNF- $\alpha$ , 45,24% για την IFN- $\gamma$  και 10,48% για την IL-2) σε αντίθεση με τα ποσοστά των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (0,07% για την IL-4 και 0,40% για την IL-10). Αντίστοιχο πρότυπο αυξημένης παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών παρατηρήθηκε και στις άλλες δύο πειραματικές ομάδες. Αναλυτικότερα, παρουσία αντιγόνου τα CD8+ T κύτταρα που διεγέρθηκαν με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα ήταν σε μεγάλο ποσοστό τους θετικά για τις κυτταροκίνες TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 [45,38, 41,37 και 7,07% για την προΤα, 42,88, 35,59 και 6,42%, για το προΤα(100-109), αντίστοιχα], συγκριτικά με τα ποσοστά που καταγράφηκαν απουσία αντιγόνου [0,21, 0,01 και 0,09% για την προΤα, 0,13, 0,02 και

0,03%, για το προΤα(100-109), αντίστοιχα]. Αντίθετα, η παραγωγή των κυτταροκινών IL-4 και IL-10 παρέμεινε σε οριακά επίπεδα ακόμα και παρουσία των HER-2/neu πεπτιδίων τόσο για την προΤα (0,02 και 0,05% απουσία πεπτιδίων, 0,08 και 0,13% παρουσία πεπτιδίων για την IL-4 και την IL-10, αντίστοιχα), όσο και για το προΤα(100-109) (0,02 και 0,02% απουσία πεπτιδίων, 0,00 και 0,00% παρουσία πεπτιδίων για την IL-4 και την IL-10, αντίστοιχα).

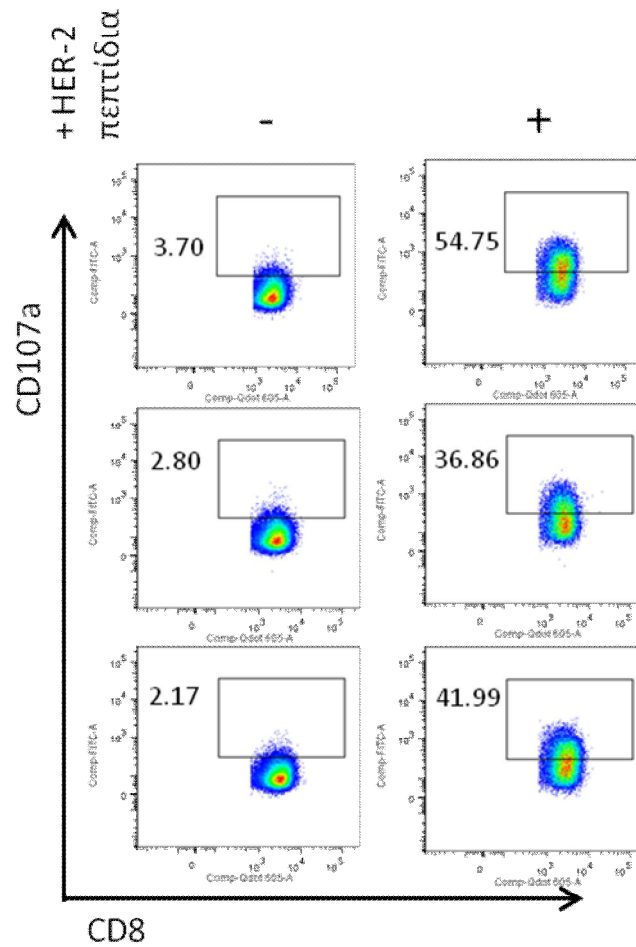
**A**+ HER-2  
πεπτιδία

**B**

**Εικόνα 3.10.** CD8<sup>+</sup> T κύτταρα που διεγέρθηκαν με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες παρουσία πεπτιδίων της HER-2/neu. Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα των ίδιων καλλιιεργειών ενεργοποίησης με αυτών της Εικόνας 3.7 ελέγχθηκαν με πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής για την ενδοκυτταρική παραγωγή (A) TNF-α, IFN-γ, IL-2 και (B) IL-4 και IL-10, απουσία (-) ή παρουσία (+) των πεπτιδίων HER-2/neu. Πρώτη σειρά: δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με TNF-α, δεύτερη σειρά: δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με προΤα, τρίτη σειρά: δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν με προΤα(100-109). Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ποσοστά των θετικών κυττάρων στα επιλεγμένα (gated) CD8<sup>+</sup> T κύτταρα για την κάθε κυτταροκίνη. Αποτελέσματα από έναν αντιπροσωπευτικό δότη από τους 3 που αναλύθηκαν.

Η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και από αυτόν τον υποπληθυσμό υποδηλώνει ότι τα προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα είναι ικανά να επάγουν και τη διαφοροποίηση των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων προς T<sub>C</sub>1-τύπου κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη ικανότητα λύσης κυττάρων-στόχων. Κρίθηκε, επομένως, σημαντικό τα συγκεκριμένα κύτταρα να ελεγχθούν και ως προς την κυτταροτοξική τους ικανότητα.

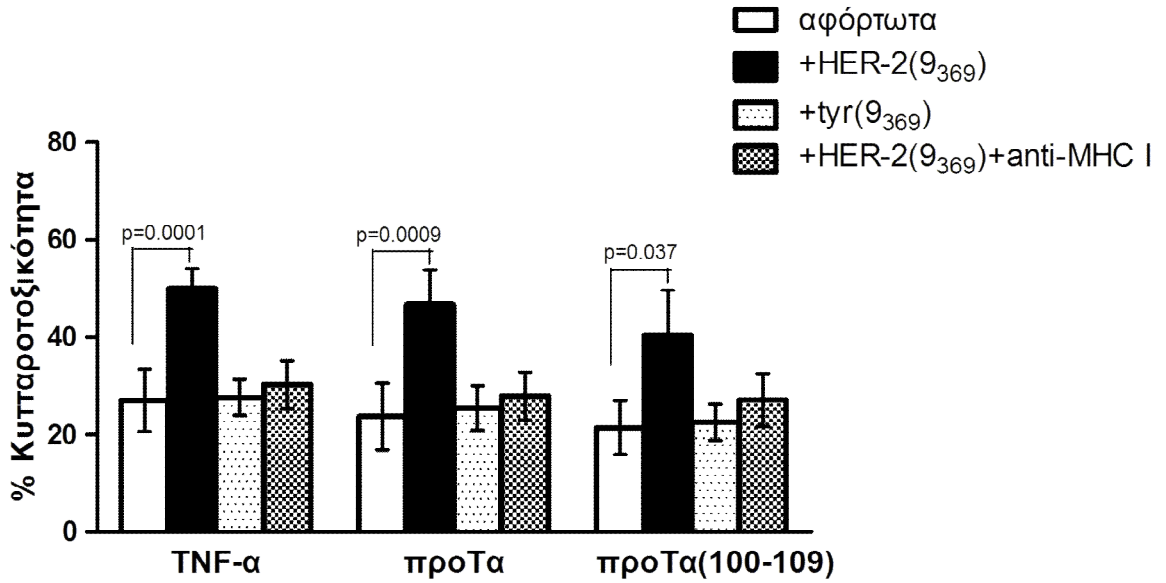
Για το σκοπό αυτό, τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα των ίδιων καλλιιεργειών ενεργοποίησης μελετήθηκαν και ως προς την επιφανειακή έκφραση του μορίου CD107a με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής. Το μόριο αυτό αποτελεί δείκτη αποκοκκίωσης και η έκφρασή του είναι ενδεικτική της κυτταροτοξικής ικανότητας του πληθυσμού που το εκφράζει (Rubio et al., 2003). Απουσία των HER-2/neu πεπτιδίων, ένα χαμηλό ποσοστό (3,70%) των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων που διεγέρθηκαν από τα TNF-α-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα εξέφραζε στην επιφάνειά του το CD107a (**Εικόνα 3.11**), ποσοστό το οποίο αυξήθηκε σημαντικά (54,75%), όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν παρουσία φορτωμένων δενδριτικών κυττάρων. Παρόμοια αύξηση στην έκφραση του CD107a παρατηρήθηκε και στα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα που διεγέρθηκαν με τα προΤα- ή τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παρουσία των HER-2/neu πεπτιδίων (36,86 και 41,99%, αντίστοιχα, συγκριτικά με το 2,80 και 2,17%, απουσία αντιγόνου στην καλλιέργεια). Από τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) μπορούν να ενεργοποιήσουν επαρκώς και τα κυτταροτοξικά T κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια, είναι ικανά να εξωκυτταρώνουν κυτταροτοξικά μόρια προκειμένου να λύσουν κύτταρα-στόχους που εκφράζουν τους αντιγονικούς επιτόπους HER-2(9<sub>369</sub>) και HER-2(15<sub>776</sub>) έναντι των οποίων διεγέρθηκαν.



**Εικόνα 3.11.** CD8+ T κύτταρα που διεγέρθηκαν με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα είναι κυτταροτοξικά παρουσία πεπτιδίων της HER-2/neu. Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα των ίδιων καλλιιεργειών ενεργοποίησης με αυτών της Εικόνας 3.7, ελέγχθηκαν με πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής για την επιφανειακή έκφραση του μορίου CD107a απουσία (-) ή παρουσία (+) των πεπτιδίων HER-2/neu. Η παράθεση των αποτελεσμάτων είναι αντίστοιχη με αυτήν που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.10.

Η κυτταροτοξική ικανότητα των CD8+ T κυττάρων, καθώς και η ειδικότητά τους να αναγνωρίζουν και να λύουν κύτταρα-στόχους που εκφράζουν τον ανοσοεπικρατή επίτοπο HER-2(9<sub>369</sub>) επιβεβαιώθηκε με την πρότυπη μέθοδο απελευθέρωσης <sup>51</sup>Cr. Κύτταρα της λευχαιμικής σειράς T2 που εκφράζουν το HLA-A2 αλληλόμορφο, φορτώθηκαν με τον επίτοπο HER-2(9<sub>369</sub>) ή έναν μη σχετιζόμενο επίτοπο προερχόμενο από την τυροσινάση, με ικανότητα πρόσδεσης στο και παρουσίασης από το HLA-A2 αλληλόμορφο, το εννεαπεπτίδιο tyr(9<sub>369</sub>) (Robbins, 2005), σημάνθηκαν ενδοκυτταρικά με <sup>51</sup>Cr και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-στόχοι. T κύτταρα που είχαν διεγερθεί τρεις φορές με TNF-α-, προTα- ή προTα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παρουσία των HER-2/neu πεπτιδίων, συλλέχθηκαν από τις καλλιέργειες ενεργοποίησης και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-τελεστές. Τα κύτταρα-τελεστές συνεπώαστηκαν με τα κύτταρα-στόχους για 18 ώρες και στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό κυτταροτοξικότητας σε κάθε πειραματική ομάδα (**Εικόνα 3.12**).

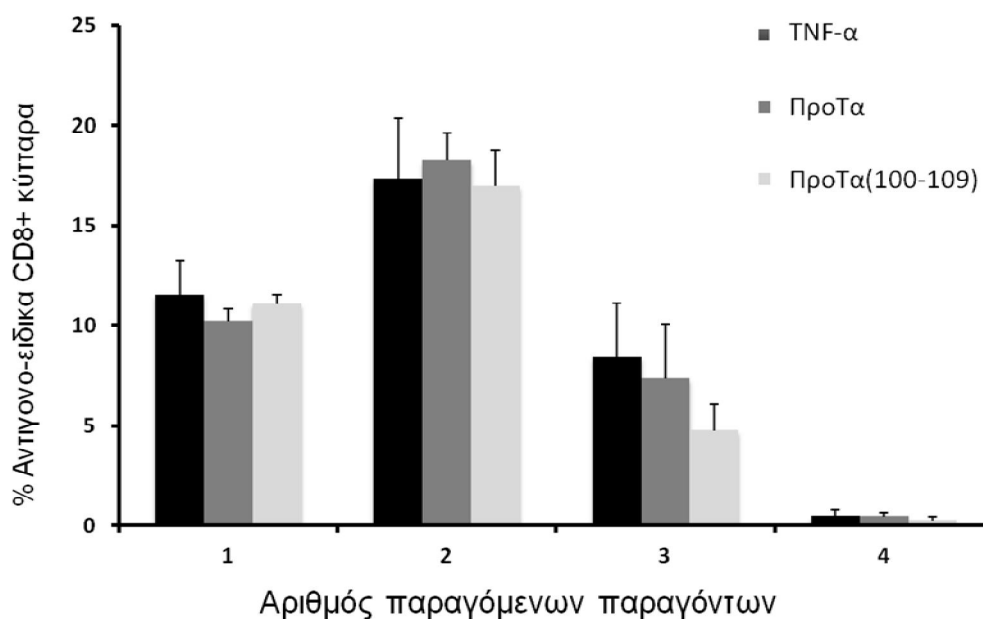
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση τιμή της CD8+ T-μεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας έναντι των αφόρτων T2 κυττάρων-στόχων δεν ξεπέρασε το 30% σε όλες τις πειραματικές ομάδες [26,9% για τα TNF-α-, 23,7% για τα προTα- και 21,4% για τα προTα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα]. Αντίθετα, όταν οι στόχοι T2 παρουσίαζαν τον επίτοπο HER-2(9<sub>369</sub>), ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό τους λύθηκε επιτυχώς από τα CD8+ T κύτταρα και στις τρεις πειραματικές ομάδες [49,9% για τα TNF-α-, 46,6% για τα προTα- και 40,4% για τα προTα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα]. Η CD8+ T-μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα που καταγράφηκε εναντίον των tyr(9<sub>369</sub>)-φορτωμένων T2 στόχων ήταν χαμηλή και σε καμία πειραματική ομάδα δεν ξεπέρασε το 30% [27,5% για τα TNF-α-, 25,4% για τα προTα- και 22,5% για τα προTα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα]. Για να αποδείξουμε ότι η ειδική για τον ανοσογονικό επίτοπο HER-2(9<sub>369</sub>) T κυτταροτοξικότητα είναι και MHC τάξης I-περιοριζόμενη, προσθέσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) που δεσμεύεται στα MHC μόρια τάξης I, σε όλη τη διάρκεια της συνεπώασης των CD8+ T κυττάρων και των κυττάρων-στόχων (Sun et al., 2006). Πράγματι, η παρουσία του mAb, οδήγησε σε σημαντική μείωση της παρατηρούμενης κυτταροτοξικότητας [30,2% για τα TNF-α-, 27,8% για τα προTα- και 27,1% για τα προTα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα], υποδεικνύοντας ότι τα κυτταροτοξικά T κύτταρα που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες ενεργοποίησης, εκτός από αντιγονοειδικά, είναι και MHC τάξης I-περιοριζόμενα.



**Εικόνα 3.12.** Τ κύτταρα που διεγέρθηκαν με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παρουσία HER-2/neu πεπτιδίων είναι αντιγονοειδικά και MHC τάξης I-περιοριζόμενα. Τ κύτταρα που διεγέρθηκαν με TNF-α-, προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-τελεστές (E) εναντίον αφόρτων, HER-2(9<sub>369</sub>)- και tyr(9<sub>369</sub>)-φορτωμένων T2 στόχων (T). anti-MHC I = μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται στα MHC τάξης I μόρια και προστέθηκε σε όλη τη διάρκεια της συνεπάσης E και T, σε τελική συγκέντρωση 5 μg/mL. Σε όλες τις δοκιμασίες η αναλογία E:T ήταν 10:1. Τα δεδομένα υποδεικνύουν μέση % κυτταροτοξικότητα ± SD από 2-5 δότες.



Βασιζόμενοι σε πρόσφατες έρευνες οι οποίες συσχετίζουν την πολυλειτουργικότητα των T κυττάρων με υψηλή παραγωγή IFN- $\gamma$  και με την ποιότητα των αναπτυσσόμενων ανοσολογικών απαντήσεων (Han et al., 2012, Lachman et al., 2011), πραγματοποιήσαμε ανάλυση της πολυλειτουργικότητας των HER-2(9<sub>369</sub>)-ειδικών CD8<sup>+</sup> T κυττάρων που εκπτύχθηκαν στις καλλιέργειες ενεργοποίησης. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό FlowJo για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής αναλύσαμε την ικανότητα των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και IL-2) και να ασκούν κυτταροτοξική δράση (έκφραση του CD107a). Υπολογίζοντας το ποσοστό των αντιγονοειδικών CD8<sup>+</sup> T κυττάρων που παράγουν οποιονδήποτε έναν (δηλ. κύτταρα που παράγουν IFN- $\gamma$  ή TNF- $\alpha$  ή IL-2 ή εκφράζουν το CD107a και χαρακτηρίζονται ως 1+), οποιονδήποτε συνδυασμό 2 (2+), οποιονδήποτε συνδυασμό 3 (3+) ή και τους 4 (4+) προαναφερθέντες παράγοντες, παρατηρήσαμε ότι το 11%, κατά προσέγγιση, ανήκε στην κατηγορία 1+ και στις 3 πειραματικές ομάδες [11,55% για τα TNF- $\alpha$ -, 10,21% για τα προT $\alpha$ -, 11,08% για τα προT $\alpha$ (100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, **Εικόνα 3.13**]. Τα κυτταροτοξικά 2+ κύτταρα αποτέλεσαν την πλειοψηφία των αντιγονοειδικών T κυττάρων, ανεξαρτήτως του παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε για την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων με τα οποία διεγέρθηκαν [17,32% για τα TNF- $\alpha$ -, 18,23% για τα προT $\alpha$ -, 16,95% για τα προT $\alpha$ (100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα]. Σε όλες τις πειραματικές ομάδες ανιχνεύθηκαν, επίσης, και 3+ CD8<sup>+</sup> T κύτταρα σε αυξημένα ποσοστά [8,44% για τα TNF- $\alpha$ -, 7,32% για τα προT $\alpha$ -, 4,76% για τα προT $\alpha$ (100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα], ενώ ελάχιστα ήταν τα 4+ αντιγονοειδικά CD8<sup>+</sup> T κύτταρα [0,58% για τα TNF- $\alpha$ -, 0,42% για τα προT $\alpha$ -, 0,24% για τα προT $\alpha$ (100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα]. Συμπερασματικά, λοιπόν, τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προT $\alpha$  ή προT $\alpha$ (100-109) είναι ικανά να επάγουν πολυλειτουργικά (2+, 3+) αντιγονοειδικά CD8<sup>+</sup> T κύτταρα, σε επίπεδα αντίστοιχα με τα πρότυπα (TNF- $\alpha$ -ωριμασμένα) δενδριτικά κύτταρα.



**Εικόνα 3.13.** Τα αντιγονοειδικά CD8+ T κύτταρα, διεγερμένα με προΤα- ή προΤα(100-109) δενδριτικά κύτταρα, είναι πολυλειτουργικά. Υπολογίστηκαν τα ποσοστά των κυττάρων που παρήγαγαν IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 ή/και CD107a στο σύνολο των αντιγονοειδικών CD8+ T κυττάρων, που προέρχονταν από καλλιέργειες στις οποίες είχαν ενεργοποιηθεί 3 φορές από δενδριτικά κύτταρα, ωριμασμένα με TNF- $\alpha$ , προΤα ή προΤα(100-109) παρουσία HER-2/neu πεπτιδίων. Τα δεδομένα υποδεικνύουν τη μέση τιμή των ποσοστών των αντιγονοειδικών CD8+ T κυττάρων  $\pm$  SD από 3 δότες.

Τέλος, προχωρήσαμε σε έλεγχο της ειδικότητας και του MHC τάξης II-περιορισμού του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων, παρουσία του πεπτιδίου HER-2(15<sub>776</sub>), με τη μέθοδο ενσωμάτωσης τριτωμένης θυμιδίνης. Δενδριτικά κύτταρα που είχαν ωριμάσει παρουσία TNF- $\alpha$ , προΤα ή προΤα(100-109), φορτώθηκαν με τον επίτοπο HER-2(15<sub>776</sub>) ή ένα μη σχετιζόμενο επίτοπο, προερχόμενο από την τυροσινάση με ικανότητα πρόσδεσης στο και παρουσίασης από το αλληλόμορφο HLA-DR4, το δεκαπενταπεπτίδιο tyr(15<sub>448</sub>) (Robbins, 2005). Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως κύτταρα-διεγέρτες για τη δοκιμασία πολλαπλασιασμού, ενώ ως κύτταρα-απαντητές χρησιμοποιήθηκαν τα T κύτταρα των καλλιεργειών ενεργοποίησης.

Τα T κύτταρα που διεγέρθηκαν με τα δενδριτικά κύτταρα της προΤα ή του προΤα(100-109) παρουσίασαν έντονη ικανότητα πολλαπλασιασμού παρουσία του επιτόπου HER-2(15<sub>776</sub>), όπως φάνηκε και από τους αντίστοιχους δείκτες διέγερσης (S.Is) (2,64 και 2,26, αντίστοιχα), οι οποίοι ήταν συγκρίσιμοι με των TNF- $\alpha$ -

ωριμασμένων κυττάρων (3,09, **Πίνακας 3.3**). Αντίθετα, τα ίδια κύτταρα και από τις 3 πειραματικές ομάδες παρουσίασαν χαμηλά S.Is παρουσία των tyr(15<sub>448</sub>)-φορτωμένων δενδριτικών κυττάρων (1,20 για τα TNF-α-, 1,31 για τα προΤα-, 1,05 και για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα, αντίστοιχα). Επιπλέον, προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού για τα MHC τάξης II μόρια σε όλη τη διάρκεια της συνεπάωσης κυττάρων-διεγερτών και απαντητών, μείωσε σημαντικά τα S.Is και των 3 πειραματικών ομάδων (0,87 για τα TNF-α-, 0,93 για τα προΤα- και 0,98 για τα προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα T κύτταρα που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες ενεργοποίησης είναι αντιγονοειδικά και η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους είναι HER-2(15<sub>776</sub>)-ειδική και MHC τάξης II-περιοριζόμενη.

**Πίνακας 3.3.** T κύτταρα διεγερμένα με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα εμφανίζουν έντονη πολλαπλασιαστική ικανότητα παρουσία του επιτόπου HER-2(15<sub>776</sub>).

Ωρίμανση DCs με	Φόρτωμα DCs με	Δείκτης Διέγερσης (S.I) ± SD*
TNF-α	HER-2(15 <sub>776</sub> )	3,09 ± 0,52
	tyr(15 <sub>448</sub> )	1,20 ± 0,13
	HER-2(15 <sub>776</sub> ) + anti-MHC τάξης II	0,87 ± 0,15
προΤα	HER-2(15 <sub>776</sub> )	2,64 ± 0,59
	tyr(15 <sub>448</sub> )	1,31 ± 0,23
	HER-2(15 <sub>776</sub> ) + anti-MHC τάξης II	0,93 ± 0,20
προΤα(100-109)	HER-2(15 <sub>776</sub> )	2,26 ± 0,65
	tyr(15 <sub>448</sub> )	1,05 ± 0,25
	HER-2(15 <sub>776</sub> ) + anti-MHC τάξης II	0,98 ± 0,20

\* Μέσες τιμές ± SD από 2-5 δότες.

### 3.4. Μελέτη της ανοσοενισχυτικής δράσης της προθυμοσίνης $\alpha$ και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου προΤα(100-109) *in vivo*

Η ιδιότητα της προΤα να δρα ως επαγωγικός παράγοντας των λεμφοκυτταρικών αποκρίσεων οδήγησε, σύντομα μετά την απομόνωσή της, και στον *in vivo* έλεγχο της δραστηριότητας του μορίου σε ανοσοϊκανά, αλλά και σε ανοσοανεπαρκή ζώα. Οι πρώτες *in vivo* χορηγήσεις σε φυσιολογικά ποντίκια, αλλά και σε φυλές ποντικών ευάλωτων σε μολύνσεις, έδειξαν ότι η προΤα πράγματι ενισχύει τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι ευκαιριακών παθογόνων (Pan et al., 1986). Μία σημαντική παθολογία που προκαλεί λεμφοκυτταρικές ανεπάρκειες είναι και ο καρκίνος, γι' αυτό και οι *in vivo* μελέτες που ακολούθησαν εστιάστηκαν στην αντικαρκινική δράση της προΤα. Έτσι, διερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης προΤα σε DBA/2 ποντίκια που είχαν ενοφθαλμιστεί με συγγενικά λευχαιμικά κύτταρα L1210. Η χορήγηση της προΤα είχε ευεργετική δράση, καθώς παρεμπόδισε την εξέλιξη της δημιουργίας ασκίτη, αυξάνοντας την έκκριση TNF- $\alpha$  από τα περιτοναϊκά μακροφάγα των ποντικών και τα ποσοστά των ενεργοποιημένων NK, LAK και αντιλευχαιμικών T κυτταροτοξικών κυττάρων (Papanastasiou et al., 1992, Baxevanis et al., 1994, Baxevanis et al., 1995).

Σε συνέχεια των παραπάνω πειραμάτων και με βάση τα *in vitro* δεδομένα μας, όπου δείξαμε ότι η προΤα και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο, προΤα(100-109): (1) επάγουν τη δημιουργία φαινοτυπικά ώριμων και λειτουργικά ανοσοϊκανών δενδριτικών κυττάρων και (2) ενεργοποιούν αντιγονοειδικές κυτταρικές αποκρίσεις, μεσολαβούμενες από T<sub>H</sub>1-βοηθητικά και από T<sub>C</sub>1-κυτταροτοξικά T κύτταρα, θέσαμε ως επόμενο στόχο να διερευνήσουμε την *in vivo* δραστηριότητα της προΤα και του πεπτιδίου προΤα(100-109) σε ένα μοντέλο καρκίνου σε ποντίκια. Χρησιμοποιήσαμε δύο πρωτόκολλα θεραπευτικής χορήγησης των πεπτιδίων: (α) ένα ετερόχρονο, όπου η προΤα και το προΤα(100-109) ενέθηκαν σε ζώα με σχηματισμένους (ψηλαφητούς) όγκους, και (β) ένα σύγχρονο, όπου τα πεπτίδια ενέθηκαν στα ζώα συγχρόνως με τα καρκινικά κύτταρα.

### 3.4.1. Επιλογή του κατάλληλου *in vivo* καρκινικού μοντέλου

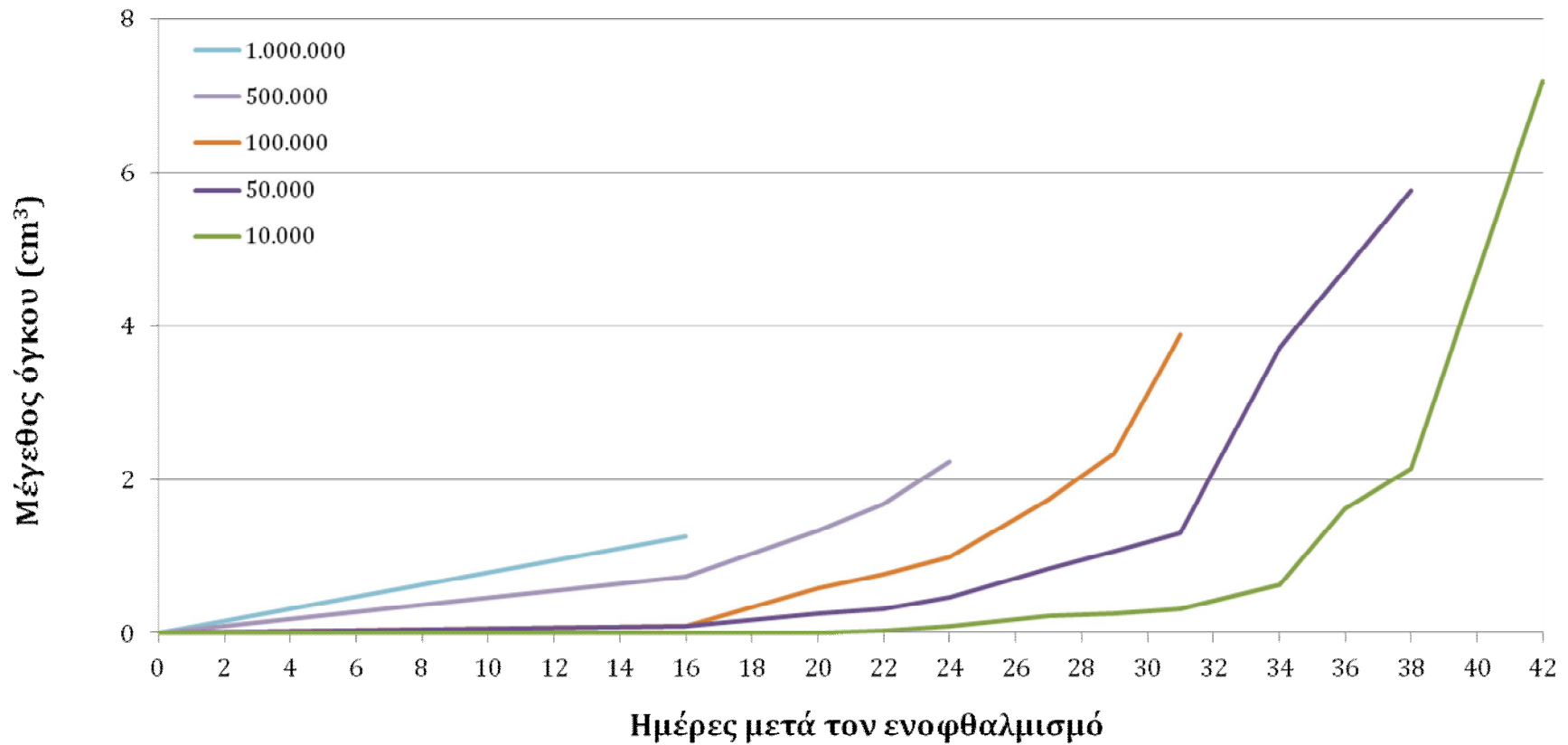
Για τη μελέτη μας επιλέξαμε ένα *in vivo* μοντέλο μελανώματος που αποτελεί έναν ιδιαίτερα αντιγονικό και ανοσογονικό τύπο καρκίνου, καθώς πολλά καρκινικά αντιγόνα έχουν κλωνοποιηθεί από μελάνωμα (van den Bruggen et al., 1991, Gaugler et al., 1994, Kawakami et al., 1994), ενώ πρωτόκολλα θεραπευτικών αντικαρκινικών εμβολιασμών με τα αντιγόνα αυτά έχουν δώσει αξιοσημείωτα θετικά αποτελέσματα στον άνθρωπο (Boon et al., 2006). Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάπτυξη μοντέλου μελανώματος *in vivo* είναι ο ενοφθαλμισμός ανοσοανεπαρκών ζώων με κύτταρα σειρών ανθρώπινου μελανώματος (Teicher, 2010). Παρόλο που προσομοιάζει περισσότερο την ανάπτυξη μελανώματος στον άνθρωπο, ένα τέτοιο *in vivo* μοντέλο εμφανίζει και βασικούς περιορισμούς, καθώς δεν είναι δυνατή η μελέτη της ανάπτυξης/ενίσχυσης ειδικών ανοσολογικών απαντήσεων σε ανοσοανεπαρκή ζώα και συνεπώς, τέτοια μοντέλα είναι ιδανικά για τη δοκιμή παθητικών πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του καρκίνου (adoptive immunotherapy). Για τους λόγους αυτούς επιλέξαμε να ενοφθαλμίσουμε κύτταρα της μελανωματικής σειράς ποντικού B16.F1 σε συγγενικά, ανοσοϊκανά ζώα της φυλής C57BL/6. Το συγκεκριμένο μοντέλο διαθέτει και άλλα πλεονεκτήματα, καθώς η υποδόρια χορήγηση των B16.F1 κυττάρων οδηγεί σε σχηματισμό συμπαγών όγκων, οι οποίοι μπορούν εύκολα να παρακολουθηθούν και να μετρηθούν ως προς το ρυθμό ανάπτυξής τους (Zhang et al., 2013). Παράλληλα τα κύτταρα B16 είναι πλούσια σε επιφανειακά αντιγονικά πεπτίδια (Johnston et al., 1994), γεγονός το οποίο εκμεταλλευτήκαμε για την παραγωγή ενός εκχύλισματος (acid wash extract, AWE), το οποίο περιείχε τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων μέσω MHC μορίων (Baxevanis et al., 2000, Baxevanis et al., 2002; Gritzapis et al., 2005). Το σύνολο αυτών των πεπτιδίων αποτελεί την αντιγονική ταυτότητα των κυττάρων B16.F1 και για το λόγο αυτό το εκχύλισμα AWE χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ογκοειδικών πεπτιδικών αντιγόνων στη μελέτη μας.

Μία ακόμα παράμετρος που έπρεπε να ληφθεί υπόψη για το σωστό σχεδιασμό του *in vivo* πρωτοκόλλου ήταν ο ρυθμός αύξησης του αναπτυσσόμενου όγκου που θα σχηματιστεί. Ενοφθαλμισμός μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων οδηγεί, συνήθως, στο σχηματισμό όγκων με ήπια ανάπτυξη, ένα σύστημα κατάλληλο για μακράς διάρκειας χορηγήσεις. Αντίθετα, ενοφθαλμισμός με μεγάλο αριθμό καρκινικών

κυττάρων δημιουργεί ένα πιο επιθετικό μοντέλο ανάπτυξης όγκων, κατάλληλο για μελέτη ραγδαία αναπτυσσόμενων τύπων καρκίνου και μεταστάσεων.

Για την εύρεση, επομένως, του κατάλληλου αριθμού καρκινικών κυττάρων τα οποία θα χορηγούσαμε στα ζώα, πραγματοποιήσαμε αρχικά κινητική μελέτη, όπου ενοφθαλμίσαμε διαφορετικό αριθμό B16.F1 κυττάρων σε ζώα της φυλής C57BL/6. Διαχωρίσαμε πέντε ομάδες πειραματόζωων (Ομάδες 1-5), οι οποίες την ημέρα 0 (που ορίζεται ως ημέρα έναρξης του πρωτοκόλλου και είναι η ημέρα χορήγησης των καρκινικών κυττάρων) έλαβαν υποδόρια  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  και  $1 \times 10^4$  κύτταρα/ζώο, αντίστοιχα. Τα πειραματόζωα παρακολούθηθηκαν ως προς την ανάπτυξη των όγκων τους και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.14**.

Παρατηρούμε ότι τα ζώα τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με  $1 \times 10^6$  ή  $5 \times 10^5$  κύτταρα, παρουσίασαν ένα ραγδαίο πρότυπο ανάπτυξης του όγκου, με αποτέλεσμα να αποβιώσουν σε σύντομο χρόνο, έως την ημέρα 16 και την ημέρα 24, αντίστοιχα. Τα ζώα που έλαβαν  $1 \times 10^5$  κύτταρα παρουσίασαν ηπιότερη ανάπτυξη του όγκου, η οποία ωστόσο δεν παρέτεινε σημαντικά την επιβίωσή τους, καθώς τα ζώα απεβίωσαν έως την ημέρα 31, έχοντας αναπτύξει μεγάλης μάζας όγκους ( $\sim 4 \text{ cm}^3$ ). Αντίθετα, οι δόσεις  $5 \times 10^4$  και  $1 \times 10^4$  κυττάρων/ζώο οδήγησαν σε ηπιότερη ανάπτυξη του όγκου, οδηγώντας σε παρατεταμένη επιβίωση των πειραματόζωων (έως τις ημέρες 38 και 42, αντίστοιχα). Επιλέχθηκε, τελικά, η δόση των  $5 \times 10^4$  κυττάρων/ζώο για τη μελέτη μας, ως μία ενδιάμεση δόση ενός ήπιου, αλλά συγχρόνως όχι ιδιαίτερα μακρόχρονου *in vivo* πρωτοκόλλου.



**Εικόνα 3.14.** Κινητική υποδόριας χορήγησης αυξανόμενου αριθμού κυττάρων B16.F1 σε ποντίκια. Ποντίκια της φυλής C57BL/6 ενοφθαλμίστηκαν με διαφορετικές ποσότητες ( $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^4$ ) συγγενικών κυττάρων B16.F1 και παρακολούθηθηκαν ως προς την ανάπτυξη των όγκων τους. Το μέγεθος του όγκου υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: μέγεθος όγκου (σε  $\text{cm}^3$ ) = μήκος x πλάτος<sup>2</sup>/2. Η κάθε καμπύλη αφορά τη μέση τιμή του μεγέθους του όγκου (σε  $\text{cm}^3$ ) από 5 ζώα. Τα SDs σε κάθε χρονικό σημείο παραλείφθηκαν για λόγους ευκρίνειας και οι τιμές τους ήταν σε όλες τις περιπτώσεις  $\leq 15\%$  της μέσης τιμής.

### 3.4.2. Ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο ετερόχρονης χορήγησης καρκινικών κυττάρων και ανοσοενισχυτικών παραγόντων

Στο πρωτόκολλο αυτό μελετήθηκε η επίδραση των θεραπευτικών χορηγήσεων της προΤα και του πεπτιδίου προΤα(100-109) σε ζώα στα οποία είχαν ήδη αναπτυχθεί ψηλαφητοί συμπαγείς όγκοι. Αναλυτικότερα, την ημέρα 0 χορηγήσαμε υποδόρια στην περιοχή της ράχης  $5 \times 10^4$  B16.F1 κύτταρα/ποντίκι. Τα ζώα παρακολουθήθηκαν για την ανάπτυξη όγκων και όταν οι όγκοι ήταν ψηλαφητοί (ημέρα 21), τα ποντίκια έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά τα ανοσοενισχυτικά μόρια GM-CSF, προΤα ή προΤα(100-109) σε δύο κύκλους χορηγήσεων. Ο πρώτος κύκλος ξεκίνησε την ημέρα 21 και περιελάμβανε την χορήγηση δύο δόσεων (τις ημέρες 21 και 23) των ανοσοενισχυτικών παραγόντων στοχεύοντας στην ενεργοποίηση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του ζώου, καθώς τόσο τα δύο πεπτίδια προΤα και προΤα(100-109) *in vitro* (Skopeliti et al., 2009), όσο και ο GM-CSF *in vitro* και *in vivo* (Zarei et al., 2009) είναι ικανά να ωριμάζουν δενδριτικά κύτταρα. Μία ημέρα μετά τη δεύτερη δόση του ανοσοενισχυτικού χορηγήθηκε το εκχύλισμα AWE, με σκοπό τα ήδη ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα να εγείρουν ογκοειδικές απαντήσεις, παρουσία των πεπτιδικών αντιγόνων που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα αυτό. Συγκεκριμένα και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, χορηγήθηκε εκχύλισμα από  $20 \times 10^6$  κύτταρα B16.F1 ανά ζώο (Baxevanis et al., 2000, Baxevanis et al., 2002). Βασιζόμενοι στο *in vitro* πρωτόκολλο ενεργοποίησης των T κυττάρων, σύμφωνα με το οποίο τα κύτταρα διεγείρονταν ανά διαστήματα 7 ημερών με ώριμα δενδριτικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε και δεύτερος κύκλος χορηγήσεων ανοσοενισχυτικών παραγόντων (ημέρες 27 και 29) και AWE (ημέρα 30) για την ενίσχυση της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος των ζώων και της επιλεκτικής έκπτυξης αντιγονοειδικών αποκρίσεων.

Τα ζώα έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά κατά ομάδες GM-CSF (100 ng/δόση/ζώο, Roda et al., 2012), προΤα (350 ng/δόση/ζώο, Papanastasiou et al., 1994) ή προΤα(100-109) σε τελικό όγκο 0,5 mL DPBS και AWE σε τελικό όγκο 0,2 mL σε DPBS. Με βάση προηγούμενη *in vivo* μελέτη του εργαστηρίου μας (Σκοπελίτη, 2008, Διδακτορική Διατριβή), το προΤα(100-109) χορηγήθηκε σε δόση 100 ng/ζώο, ενώ επίσης χορηγήθηκε και σε διπλάσια ποσότητα (200 ng/ζώο), για έλεγχο τυχόν αύξησης της ανοσοενισχυτικής του ικανότητας κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο. Συνεπώς,



ανάλογα με τον ανοσοενισχυτικό παράγοντα που έλαβαν τα πειραματόζωα κατανεμήθηκαν σε 5 ομάδες:

- Την ομάδα Α, που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, τα ζώα της οποίας έλαβαν DPBS, που αποτέλεσε το διαλύτη όλων των χορηγήσεων
- Την ομάδα Β που έλαβε GM-CSF (100 ng/δόση/ζώο)
- Την ομάδα Γ που έλαβε προΤα (350 ng/δόση/ζώο)
- Την ομάδα Δ που έλαβε προΤα(100-109) στη δόση των 100 ng/δόση/ζώο
- Την ομάδα Ε που έλαβε προΤα(100-109) στη δόση των 200 ng/δόση/ζώο

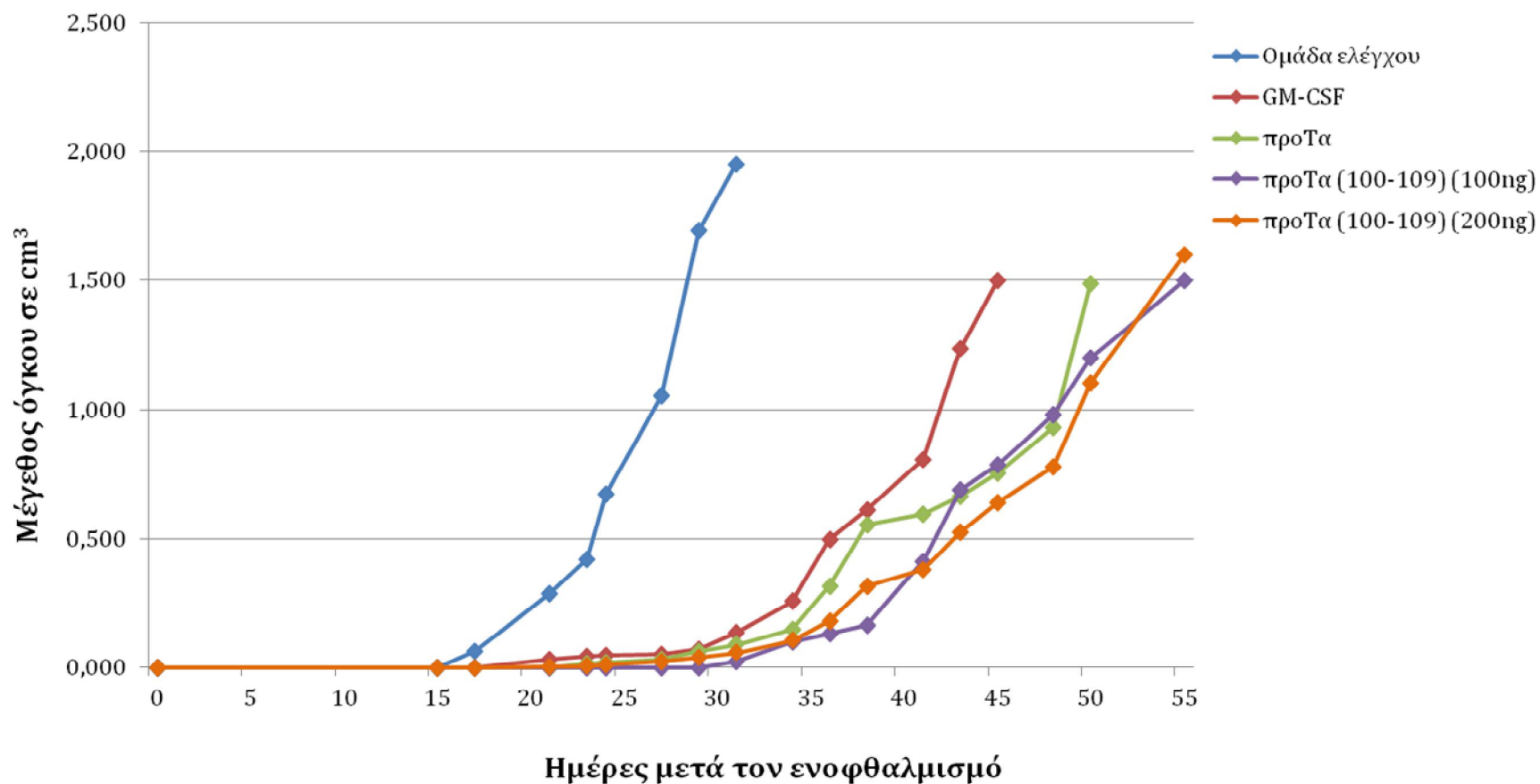
Το μέγεθος (σε  $\text{cm}^3$ ) του συμπαγούς όγκου στη ράχη των ζώων όλων των ομάδων καταγράφηκε μέχρι και 55 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων B16.F1 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.15**.

Αρχικά παρατηρούμε ότι η ομάδα ελέγχου, η οποία δεν έλαβε κανέναν ενισχυτικό παράγοντα παρουσίασε την πιο ραγδαία ανάπτυξη του καρκινικού φορτίου και αυτό είχε ως αποτέλεσμα, τα ζώα να θυσιαστούν για ηθικούς λόγους (αυξημένο μέγεθος όγκου) την ημέρα 31 του πειράματος.

Χορήγηση της προΤα και του πεπτιδίου προΤα(100-109) και στις δύο διαφορετικές δόσεις, ακολουθούμενο από τη χορήγηση του AWE, καθυστέρησε σημαντικά τον ρυθμό αύξησης του καρκινικού φορτίου κατά την πρόοδο του πειράματος, η οποία συνοδεύτηκε και από παράταση στην επιβίωση των πειραματόζωων. Αναλυτικότερα, την ημέρα 31, όταν τα ζώα-μάρτυρες έφεραν όγκους μεγέθους  $\sim 2 \text{ cm}^3$ , τα ζώα που έλαβαν προΤα έφεραν, κατά μέσο όρο, όγκους μεγέθους  $0,090 \text{ cm}^3$ . Αντίστοιχα ήταν και τα μέσα μεγέθη που καταγράφηκαν για τα ζώα των ομάδων που έλαβαν προΤα(100-109) στις δόσεις των 100 και 200 ng ( $0,023$  και  $0,058 \text{ cm}^3$ , αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι η χορήγηση διπλάσιας δόσης δεκαπεπτιδίου δεν συνοδεύτηκε και από αντίστοιχη ενίσχυση της δράσης του. Η ηπιότερη ανάπτυξη των όγκων οδήγησε και σε παρατεταμένη επιβίωση των πειραματόζωων κατά 19 ημέρες για την ομάδα της προΤα και κατά 24 ημέρες για τις ομάδες του πεπτιδίου προΤα(100-109), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Η κυτταροκίνη GM-CSF χορηγήθηκε ως μάρτυρας του πειράματος, καθώς χρησιμοποιείται συχνά σε κλινικές μελέτες για την προσέλκυση και ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων στα πλαίσια ανοσοθεραπευτικών αντικαρκινικών εμβολιασμών

(Chang et al., 2004). Η ανοσοενισχυτική της δράση στη συγκεκριμένη δόση και με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε, ωστόσο, δεν ξεπέρασε αυτήν της προΤα, ούτε και του πεπτιδίου προΤα(100-109), καθώς το παρατηρούμενο πρότυπο ανάπτυξης του όγκου ήταν λιγότερο ήπιο και η παράταση της επιβίωσης που σημειώθηκε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ήταν μικρότερη (14 ημέρες).



**Εικόνα 3.15.** Η θεραπευτική χορήγηση της προΤα και του πεπτιδίου προΤα(100-109) οδηγεί σε καθυστέρηση της ανάπτυξης συμπαγών όγκων και παράταση της επιβίωσης των πειραματόζων *in vivo*. Σε ποντίκια της φυλής C57BL/6 αναπτύχθηκαν συμπαγείς όγκοι μετά από ενοφθαλμισμό συγγενικών μελανωματικών κυττάρων B16.F1. Τα ζώα έλαβαν θεραπευτικά κατά ομάδες DPBS (ομάδα ελέγχου), GM-CSF, προΤα ή προΤα(100-109) σε δύο διαφορετικές δόσεις (100 και 200 ng). Η πορεία ανάπτυξης του μεγέθους των όγκων καταγράφηκε για συνολικά 55 ημέρες. Η κάθε καμπύλη αφορά τη μέση τιμή του μεγέθους του όγκου (σε cm<sup>3</sup>) από 10 ζώα. Τα SDs σε κάθε χρονικό σημείο παραλείφθηκαν για λόγους ευκρίνειας και οι τιμές τους ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ≤18% της μέσης τιμής.

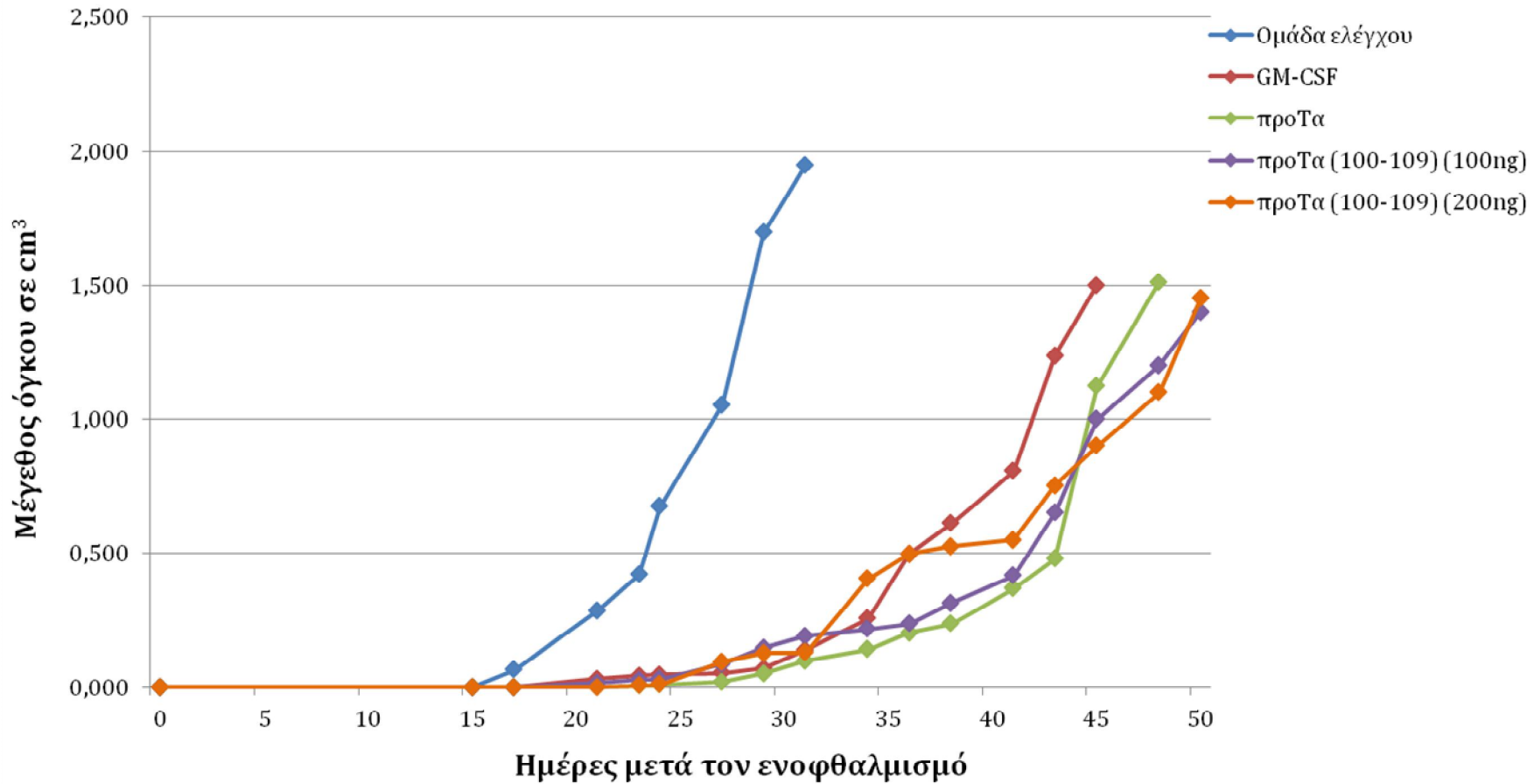
### 3.4.3. Ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο σύγχρονης χορήγησης καρκινικών κυττάρων και ανοσοενισχυτικών παραγόντων

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η χορήγηση των ανοσοθεραπευτικών παραγόντων συγχρόνως με τα καρκινικά κύτταρα B16.F1 θα οδηγούσε νωρίς σε επαγωγή ογκοειδικών απαντήσεων από το ανοσοποιητικό σύστημα και συνεπώς σε καθυστέρηση της ανάπτυξης ψηλαφητού όγκου στα ζώα. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο σύγχρονης χορήγησης καρκινικών κυττάρων και προΤα ή προΤα(100-109), βασισμένο σε μία ήδη δημοσιευμένη μελέτη (Baxevanis et al., 1995). Αναλυτικότερα, τα πειραματόζωα ενοφθαλμίστηκαν στην αρχή του πρωτοκόλλου με  $5 \times 10^4$  B16.F1 κύτταρα (ημέρα 0). Την ημέρα 0, επίσης, καθώς και την ημέρα 2, τα ζώα έλαβαν ως ανοσοενισχυτικά μόρια, προΤα ή το πεπτίδιο προΤα(100-109) και ακολούθησε (την ημέρα 3) η χορήγηση του εκχυλίσματος AWE με σκοπό την παρουσίαση του αντιγόνου από τα ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Αντίστοιχα με το πρωτόκολλο ετερόχρονης χορήγησης, πραγματοποιήθηκε και δεύτερος κύκλος χορήγησης των παραγόντων (ημέρες 6, 8) και AWE (ημέρα 9) για τη βέλτιστη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Λόγω του αυξημένου αριθμού πειραματόζωων που απαιτήθηκαν και για τα δύο πρωτόκολλα χορηγήσεων, στο μοντέλο της σύγχρονης χορήγησης, ως αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες ομάδες του μοντέλου ετερόχρονης χορήγησης.

Ανάλογα με τον ανοσοενισχυτικό παράγοντα που έλαβαν τα πειραματόζωα κατανεμήθηκαν σε 3 ομάδες:

- Την ομάδα προΤα - Α που έλαβε 350 ng προΤα/δόση/ζώο
- Την ομάδα προΤα(100-109) - Β που έλαβε 100 ng προΤα(100-109)/δόση/ζώο
- Την ομάδα προΤα(100-109) - Γ που έλαβε 200 ng προΤα(100-109)/δόση/ζώο

Το μέγεθος (σε  $\text{cm}^3$ ) του συμπαγούς όγκου στη ράχη των ζώων όλων των ομάδων καταγράφηκε μέχρι και 50 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων B16.F1 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.16**.



**Εικόνα 3.16.** Η θεραπευτική χορήγηση της προΤα και του πεπτιδίου προΤα(100-109) οδηγεί σε καθυστέρηση της ανάπτυξης συμπαγών όγκων και παράταση της επιβίωσης των πειραματοζώων *in vivo*. Σε ποντίκια της φυλής C57BL/6 χορηγήθηκαν συγγενικά μελανωματικά κύτταρα B16.F1 και τα ζώα έλαβαν συγχρόνως θεραπευτικά κατά ομάδες προΤα ή προΤα(100-109) σε δύο διαφορετικές δόσεις. Η πορεία ανάπτυξης του μεγέθους των όγκων καταγράφηκε για συνολικά 50 ημέρες. Η κάθε καμπύλη αφορά τη μέση τιμή του μεγέθους του όγκου (σε cm<sup>3</sup>) από 10 ζώα. Τα SDs σε κάθε χρονικό σημείο παραλείφθηκαν για λόγους ευκρίνειας και οι τιμές τους ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ≤15% της μέσης τιμής.

Από τις καμπύλες ανάπτυξης των όγκων των πειραματόζων παρατηρούμε συνολικά την επανάληψη του μοτίβου που καταγράφηκε στο ετερόχρονο πρωτόκολλο χορήγησης. Συγκεκριμένα, τα πειραματόζωα που έλαβαν προΤα ή το πεπτιδίο προΤα(100-109) και στις δύο συγκεντρώσεις, παρουσίασαν καθυστέρηση στην εμφάνιση των όγκων τους, ενώ ταυτόχρονα η ανάπτυξη των καρκινικών όγκων ήταν ηπιότερη από αυτή των ζώων-μαρτύρων. Ως αποτέλεσμα, σημειώθηκε και σε αυτό το μοντέλο παρατεταμένη επιβίωση κατά 17 ημέρες για τα πειραματόζωα της ομάδα της προΤα και κατά 19 ημέρες για τα ζώα των ομάδων του πεπτιδίου προΤα(100-109), σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Συνολικά, αν και η επιβίωση των ζώων αυτού του πρωτοκόλλου χορήγησης ήταν λίγο συντομότερη από αυτήν που καταγράφηκε για το ετερόχρονο πρωτόκολλο, οι παρατηρηθείσες διαφορές δεν ήταν σημαντικές, πιθανά λόγω του περιορισμένου αριθμού των κύκλων ανοσοθεραπείας (συνολικά 2) που χορηγήθηκαν στα ποντίκια ή/και των μεσοδιαστημάτων μεταξύ των κύκλων, παράμετροι που ήταν πανομοιότυπες μεταξύ των δύο, ετερόχρονου και σύγχρονου, πρωτοκόλλων.

### **3.5. *Ex vivo* μελέτη της ανοσοενισχυτικής δράσης της προθυμοσίνης α και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου προΤα(100-109) σε σπληνοκύτταρα ζώων**

Η χορήγηση ενός παράγοντα με ανοσοενισχυτική δράση σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου, όπως παρατηρήθηκε με τη χορήγηση της προΤα και του πεπτιδίου προΤα(100-109) και στα δύο ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Αυτή η καθυστέρηση της αύξησης του καρκινικού φορτίου υποδηλώνει, πιθανά, την *in vivo* επαγωγή αντικαρκινικών απαντήσεων από το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου, οι οποίες μπορεί να είναι ειδικές (μεσολαβούμενες από κυτταροτοξικά Τ κύτταρα), ή μη ειδικές, μεσολαβούμενες από NK/LAK κύτταρα (Georgaki et al., 2009). Για τον έλεγχο της επαγωγής αντικαρκινικών απαντήσεων *in vivo*, απαιτείται απομόνωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου και *ex vivo* έλεγχος της κυτταροτοξικής τους ικανότητας.

Για το σκοπό αυτό σπληνοκύτταρα συγκεκριμένων ζώων (3 από κάθε ομάδα) και από τα δύο πρωτόκολλα χορηγήσεων, απομονώθηκαν και στη συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους με την πρότυπη δοκιμασία απελευθέρωσης  $^{51}\text{Cr}$ . Ως

στόχοι για τη δοκιμασία αυτή επιλέχθηκαν καρκινικά κύτταρα των ποντικίστων σειρών YAC-1 (κύτταρα T λεμφώματος), P815 (κύτταρα μαστοκυτώματος) και της συγγενικής σειράς B16.F1. Οι στόχοι αυτοί επιλέχθηκαν για να μελετηθεί το εύρος τόσο των μη ειδικών, όσο και των ειδικών ανοσολογικών απαντήσεων που αναπτύχθηκαν στα ζώα, καθώς τα κύτταρα YAC-1 είναι ευαίσθητα σε λύση από NK κύτταρα, τα κύτταρα P815 είναι ευαίσθητα σε λύση από LAK κύτταρα και τα συγγενικά B16.F1 είναι ευαίσθητα σε λύση κυρίως από ογκοειδικά κυτταροτοξικά T κύτταρα.

Χωρίς πρόσθετη διέγερση *ex vivo*, τα σπληνοκύτταρα που απομονώθηκαν από τα ζώα και των δύο πρωτόκολλων χορήγησης χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-τελεστές εναντίον κυττάρων-στόχων, σημασμένων ενδοκυτταρικά με  $^{51}\text{Cr}$ . Στη συνέχεια υπολογίστηκε η % κυτταροτοξικότητα και τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.17**.

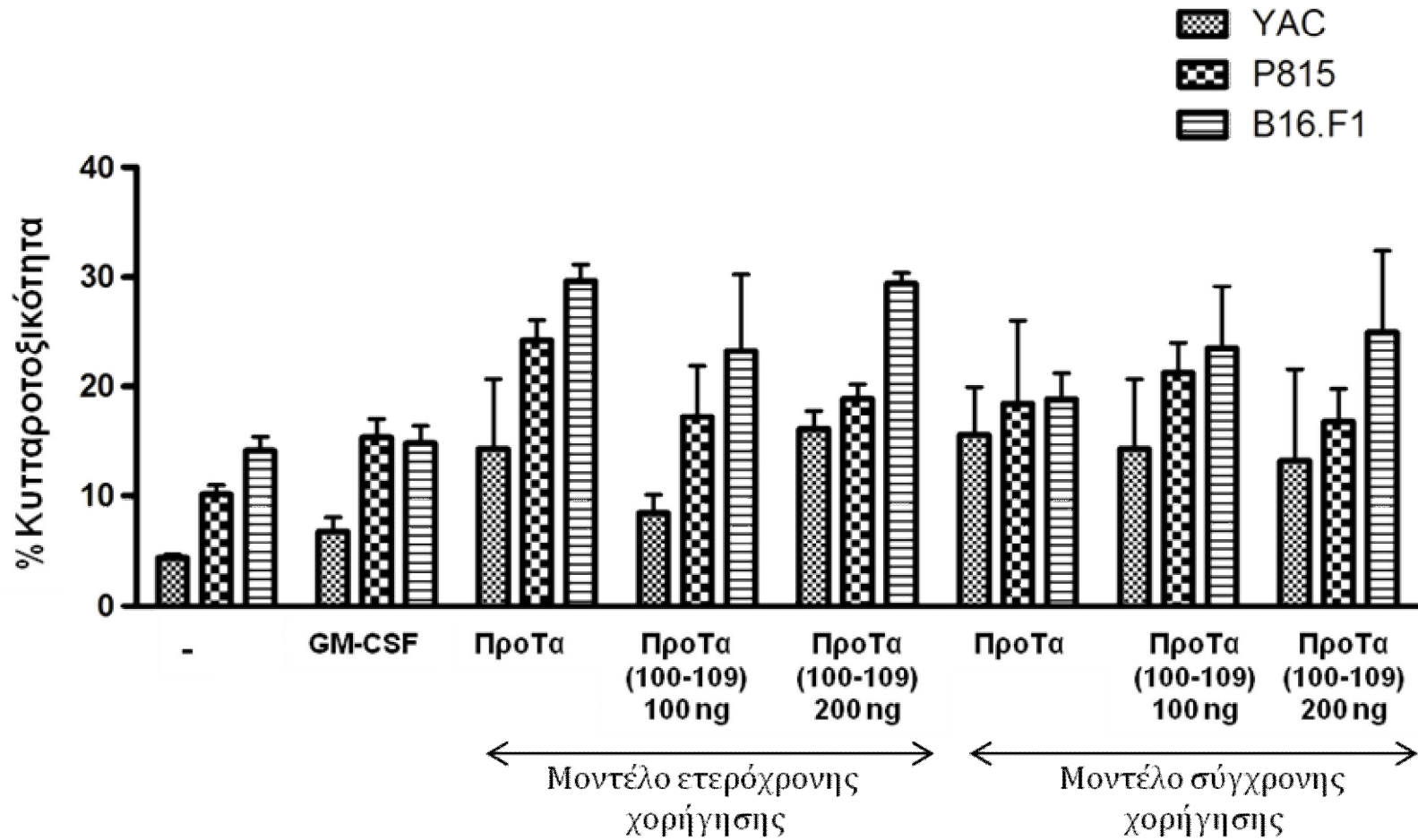
Τα σπληνοκύτταρα των ζώων της ομάδας ελέγχου (που έλαβαν DPBS), παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας εναντίον και των τριών κυττάρων-στόχων (4,4, 10,1 και 14,1% έναντι των YAC-1, P815 και B16.F1, αντίστοιχα), ποσοστά που συνάδουν με το αυξημένο καρκινικό τους φορτίο. Αντίθετα, τα σπληνοκύτταρα των ζώων που έλαβαν θεραπευτικά προΤα έλυσαν αποτελεσματικά τα συγγενικά B16.F1 κύτταρα-στόχους (29,7%), ενώ αντίστοιχα ήταν και τα ποσοστά της μέσης κυτταροτοξικότητας των σπληνοκυττάρων των ζώων που έλαβαν προΤα(100-109) στις δόσεις των 100 και 200 ng (23,3 και 29,4%, αντίστοιχα). Τα ίδια σπληνοκύτταρα εμφάνισαν και αυξημένη κυτταροτοξικότητα εναντίον των LAK-ευαίσθητων P815 κυττάρων-στόχων [24,2, 17,3 και 19,0% για τα ζώα που έλαβαν προΤα, 100 και 200ng προΤα(100-109), αντίστοιχα], ενώ παρουσίασαν και σχετική αύξηση της NK δραστηριότητάς τους, καθώς έλυσαν και τα YAC-1 κύτταρα-στόχους [14,3, 8,5 και 16,1% για τα ζώα που έλαβαν προΤα, 100 και 200ng προΤα(100-109), αντίστοιχα]. Ομοίως, τα σπληνοκύτταρα των ζώων των ομάδων του πρωτοκόλλου σύγχρονης χορήγησης, που έλαβαν προΤα ή προΤα(100-109), παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα κυτταροτοξικότητας σε σύγκριση με τα κύτταρα των ζώων-μαρτύρων. Αναλυτικότερα, για την ομάδα της προΤα, τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας που σημειώθηκαν ήταν 18,9, 18,5 και 15,6% εναντίον των B16.F1, των P815 και των YAC-1 κυττάρων, αντίστοιχα, ενώ συγκρίσιμα ήταν και τα ποσοστά λύσης των κυττάρων-στόχων που καταγράφηκαν για τις δύο ομάδες που έλαβαν προΤα(100-109) [23,5 και 25,0%

εναντίον των B16.F1, 21,2 και 16,8% εναντίον των P815 και 14,3 και 13,2% εναντίον των YAC-1, για τα ζώα που έλαβαν 100 και 200 ng προΤα(100-109), αντίστοιχα].

Τα σπληνοκύτταρα των ζώων που έλαβαν GM-CSF, παρουσίασαν οριακά αυξημένη μη ειδική κυτταροτοξικότητα εναντίον των NK και LAK ευαίσθητων κυττάρων-στόχων (6,8 και 15,3% έναντι των YAC-1 και P815, αντίστοιχα) και παρόμοια επίπεδα ειδικής κυτταροτοξικότητας (14,8% έναντι των B16.F1) συγκριτικά με τα σπληνοκύτταρα των ζώων της ομάδας ελέγχου. Η κυτταροτοξικότητά τους όμως, ήταν σαφώς χαμηλότερη σε όλες τις περιπτώσεις από την αντίστοιχη των ζώων που έλαβαν προΤα ή το ανοσοδραστικό της πεπτίδιο, κάτι που οφείλεται είτε στις χαμηλές δόσεις GM-CSF που χρησιμοποιήσαμε ή/και στα μεσοδιαστήματα χορήγησης του GM-CSF στα ποντίκια.

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η θεραπευτική αντικαρκινική *in vivo* χορήγηση της προΤα και του δεκαπεπτιδίου της προΤα(100-109), ενισχύουν σε σημαντικό βαθμό την μη ειδική-κυτταροτοξικότητα (μεσολαβούμενη από NK και LAK κύτταρα), ενώ ταυτόχρονα επάγουν την *in vivo* ενίσχυση ειδικών αντικαρκινικών απαντήσεων, που μεσολαμβάνονται από ογκοειδικά κυτταροτοξικά T κύτταρα.





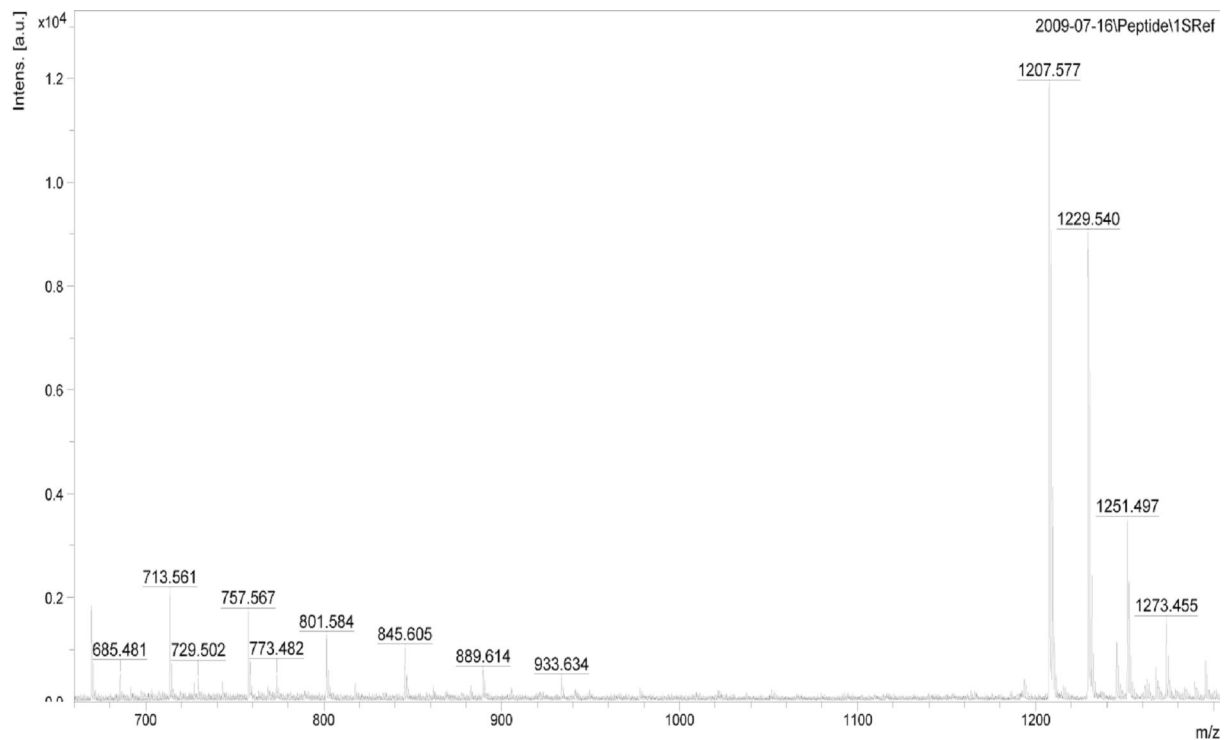
**Εικόνα 3.17.** Η προΤα και το πεπτίδιο προΤα(100-109) επάγουν ογκοειδικές απαντήσεις *in vivo*. Σπληνοκύτταρα από συγκεκριμένα ζώα κάθε ομάδας και των δύο πρωτοκόλλων του μοντέλου του μελανώματος (ετερόχρονης και σύγχρονης χορήγησης, Εικόνες 3.15 και 3.16) απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-τελεστές (E) σε δοκιμασία κυτταροτοξικότητας εναντίον των κυττάρων-στόχων (T) YAC-1, P815 και B16.F1. Σε όλες τις δοκιμασίες η αναλογία E:T ήταν 100:1. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η μέση ειδική κυτταροτοξικότητα  $\pm$  SD από σπληνοκύτταρα 3 διαφορετικών ζώων/ομάδα.

### 3.6. Μελέτη των συνθηκών παραγωγής και εξωκυττάρωσης του ανοσοδραστικού πεπτιδίου προΤα(100-109) υπό συνθήκες κυτταρικού θανάτου

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η προΤα αποτελεί στόχο των κασπασών 3 και 7, οι οποίες ενεργοποιούνται ενδοκυτταρικά υπό συνθήκες προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Evstafieva et al., 2000). Το κύριο σημείο δράσης των κασπασών αυτών κατά μήκος της αλληλουχίας της προΤα εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου και συγκεκριμένα μετά το κατάλοιπο του ασπαρτικού οξέος που βρίσκεται στη θέση 99. Σε συνθήκες απόπτωσης, η θραυσματοποίηση της προΤα από τις κασπάσες δημιουργεί δύο διακριτά πεπτίδια, τα προΤα(1-99) και προΤα(100-109). Το πρώτο δεν έχει τη δυνατότητα να επιστρέψει στον πυρήνα του κυττάρου, καθώς από την αλληλουχία του απουσιάζει πλέον το σήμα πυρηνικού εντοπισμού [αα(101-105)] και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα (Evstafieva et al., 2000; Evstafieva et al., 2003). Το δεύτερο, μικρότερο σε μήκος πεπτίδιο προΤα(100-109), δεν έχει μέχρι σήμερα εντοπιστεί στο εσωτερικό του κυττάρου. Δύο ενδεχόμενα θα μπορούσαν να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό: (α) το πεπτίδιο προΤα(100-109) που παράγεται υπόκειται σε περαιτέρω πέψη από ενεργοποιημένες πεπτιδάσες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανιχνευθεί, ή (β) εξωκυττάρωνεται με έναν άγνωστο, ως τώρα μηχανισμό.

Προκειμένου να διερευνήσουμε το πρώτο ενδεχόμενο, κύτταρα της ανθρώπινης σειράς HeLa, τα οποία είναι γνωστό ότι εκφράζουν υψηλά επίπεδα προΤα (Enkemann et al., 2000b), οδηγήθηκαν σε απόπτωση μετά από επώαση με TNF-α (10 ng/mL). Στη συνέχεια συλλέχθηκε το υπερκείμενο της καλλιέργειας των αποπτωτικών κυττάρων (εξωκυττάριο μέσο) και σε αυτό προστέθηκε συγκεκριμένη και γνωστή ποσότητα (1 μg) συνθετικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109). Το δείγμα επώαστηκε στους 37°C για 18 ώρες και στη συνέχεια αναλύθηκε με RP-HPLC. Τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στο χρόνο έκλουσης του πεπτιδίου προΤα(100-109) συλλέχθηκαν από το σημείο εξόδου τους από τη στήλη και αναλύθηκαν περαιτέρω με φασματομετρία μάζας τύπου MALDI-ToF για την ανίχνευση του πεπτιδίου προΤα(100-109). Παράλληλα, δείγμα συνθετικού πεπτιδίου ίδιας ποσότητας προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, τόσο για την RP-HPLC, όσο και για την MALDI-ToF ανάλυση.

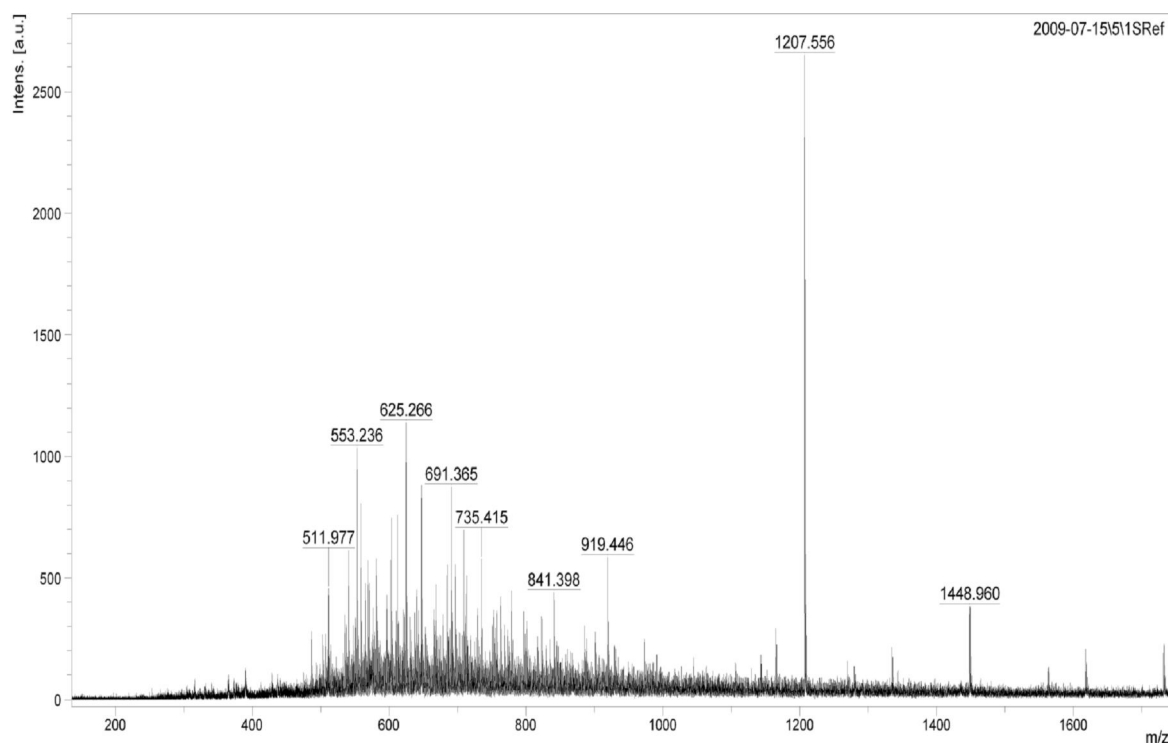
Από την φασματομετρική ανάλυση του συνθετικού πεπτιδίου προΤα(100-109) (μάρτυρας) προέκυψε φάσμα (**Εικόνα 3.18**) στο οποίο ταυτοποιήθηκε κορυφή μοριακής μάζας 1207,577, η οποία αντιστοιχεί στο πεπτίδιο προΤα(100-109), καθώς το θεωρητικό μοριακό του βάρος είναι 1207,26. Παράλληλα, ανιχνεύθηκαν και άλλες τρεις κορυφές, με μοριακά βάρη 1229,540, 1251,497 και 1273,455, που αντιστοιχούν στο ακέραιο πεπτίδιο με ένα, δύο και τρία άτομα Na, αντίστοιχα.



**Εικόνα 3.18.** Φάσμα μοριακών μαζών διαλύματος του συνθετικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) μετά από MALDI-ToF ανάλυση. Η κορυφή με ένδειξη 1207,577 αντιστοιχεί στο ακέραιο προΤα(100-109) (θεωρητική μοριακή μάζα: 1207,26).

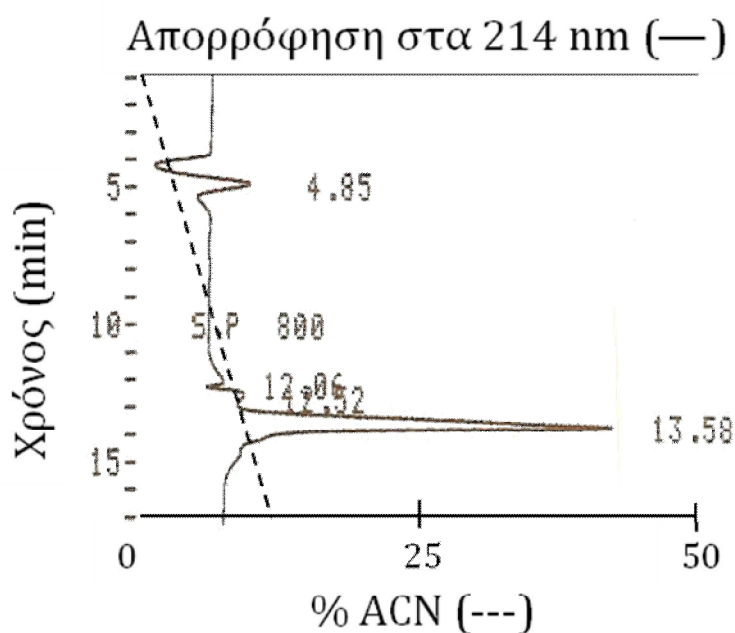
Αντίστοιχη φασματομετρική ανάλυση του δείγματος αποπτωτικού υπερκειμένου των κυττάρων HeLa στο οποίο είχε προστεθεί ποσότητα συνθετικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) και είχε προεπωαστεί, αποκάλυψε την ύπαρξη κορυφής με μοριακή μάζα 1207,566, η οποία αντιστοιχούσε στο δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) (**Εικόνα 3.19**). Έτσι, επιβεβαιώνεται η μη περαιτέρω θραυσματοποίηση του πεπτιδίου προΤα(100-109) από εξωκυτταρικές πρωτεάσες που υπάρχουν στο υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων HeLa, ακόμα και κάτω από συνθήκες που ευνοούν τη δράση τους (επάωση για 18 ώρες στους 37°C).

Έχοντας ανιχνεύσει το ακέραιο πεπτίδιο, όταν αυτό προστίθεται εξωγενώς και σε μεγάλες (πολλαπλάσιες των φυσιολογικά παραγόμενων) ποσότητες σε αποπτωτικά υπερκείμενα, θέσαμε ως επόμενο στόχο να εξετάσουμε αν το φυσικό πεπτίδιο προΤα(100-109) που παράγεται κατά την απόπτωση των κυττάρων HeLa εξωκυτταρώνεται και μπορεί να ανιχνευτεί σε υπερκείμενα αποπτωτικών κυττάρων.



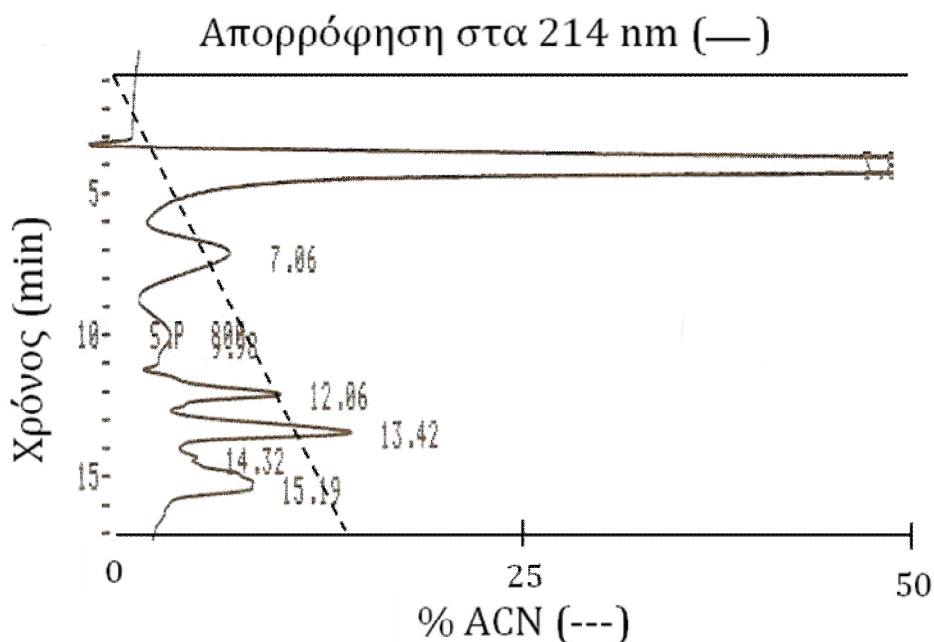
**Εικόνα 3.19.** Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) δεν υφίσταται περαιτέρω πέψη από ενεργοποιημένες πεπτιδάσες υπό αποπτωτικές συνθήκες. Συνθετικό δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) προστέθηκε στο εξωκυττάριο μέσο (υπερκείμενο καλλιέργειας) αποπτωτικών κυττάρων HeLa, επώαστηκε για 18 ώρες στους 37°C και μετά από κλασμάτωση με RP-HPLC αναλύθηκε και με φασματομετρία μάζας MALDI-ToF. Η κορυφή με ένδειξη 1207,556 αντιστοιχεί στο ακέραιο προΤα(100-109) (θεωρητική μοριακή μάζα: 1207,26).

Υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων HeLa στο οποίο είχε προστεθεί εξωγενώς ποσότητα (1  $\mu\text{g}$ ) συνθετικού πεπτιδίου προΤα(100-109) αναλύθηκε αρχικά με RP-HPLC για να προσδιοριστεί ο χρόνος έκλουσής του. Στη συνέχεια, τα κλάσματα τα οποία εκλούστηκαν από τη στήλη στον προσδιορισμένο χρόνο συλλέχθηκαν από το σημείο εξόδου για περαιτέρω ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Από την RP-HPLC ανάλυση, ο χρόνος έκλυσης του συνθετικού πεπτιδίου προΤα(100-109) προσδιορίστηκε στα 13,58 λεπτά, σε γραμμική κλίση ακετονιτριλίου 4-50% (v/v) σε 60 λεπτά (**Εικόνα 3.20**). Η ανάλυση των αντίστοιχων κλασμάτων με MALDI-ToF φασματομετρία αποκάλυψε την ύπαρξη κορυφής που αντιστοιχούσε στη θεωρητική μοριακή μάζα του πεπτιδίου, επιβεβαιώνοντας ότι η κορυφή που παρατηρήθηκε στο χρωματογράφημα αντιστοιχούσε στο προΤα(100-109).

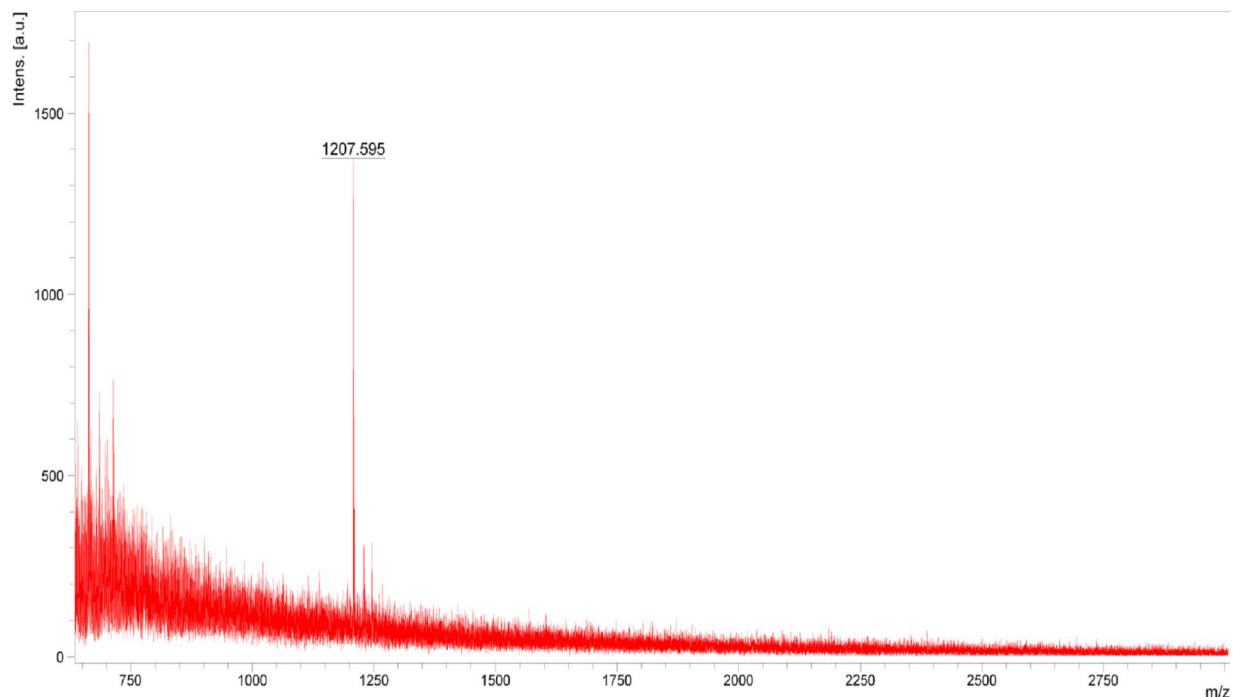


**Εικόνα 3.20.** Το συνθετικό πεπτίδιο προΤα(100-109) εκλούεται από τη στήλη χρωματογραφίας στα 13,58 λεπτά (10,41% ACN). Ποσότητα (1  $\mu\text{g}$ ) συνθετικού πεπτιδίου προΤα(100-109) προστέθηκε εξωγενώς σε υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων HeLa και αναλύθηκε με RP-HPLC για τον προσδιορισμό του χρόνου έκλυσης του πεπτιδίου προΤα(100-109).

Σε επόμενο βήμα αναλύθηκε ποσότητα αποπτωτικού υπερκειμένου (χωρίς την εξωγενή προσθήκη πεπτιδίου) με RP-HPLC (**Εικόνα 3.21**), ενώ το κλάσμα το οποίο αντιστοιχούσε στο χρόνο έκλυσης του προΤα(100-109), συλλέχθηκε και αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας. Η MALDI-ToF ανάλυση του αποπτωτικού υπερκειμένου έδειξε ότι το πεπτίδιο προΤα(100-109) είναι ανιχνεύσιμο στο εξωκυττάριο μέσο αποπτωτικών κυττάρων HeLa, καθώς ταυτοποιήθηκε κορυφή με μοριακή μάζα 1207,595, αντίστοιχη της θεωρητικής μοριακής μάζας του προΤα(100-109) (**Εικόνα 3.22**). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι μετά την ενδοκυτταρική παραγωγή του υπό αποπτωτικές συνθήκες, το δεκαπεπτίδιο πιθανά εξωκυττάρωνεται, με μηχανισμό που δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί.



**Εικόνα 3.21.** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του αποπτωτικού υπερκειμένου. Υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων HeLa συλλέχθηκε και αναλύθηκε με RP-HPLC. Το κλάσμα που αντιστοιχούσε στην κορυφή με χρόνο έκλυσης 13,42 λεπτά (10,19% ACN) [~χρόνος έκλυσης του προΤα(100-109)], συλλέχθηκε και αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας.



**Εικόνα 3.22.** Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) είναι παρόν ενδογενώς στο υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων. Υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων αναλύθηκε αρχικά με RP-HPLC και το κλάσμα που αντιστοιχούσε στο χρόνο έκλουσης του πεπτιδίου προΤα(100-109) συλλέχθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας MALDI-ToF. Η κορυφή με ένδειξη 1207,595 αντιστοιχεί στο ακέραιο προΤα(100-109) (θεωρητική μοριακή μάζα: 1207,26).

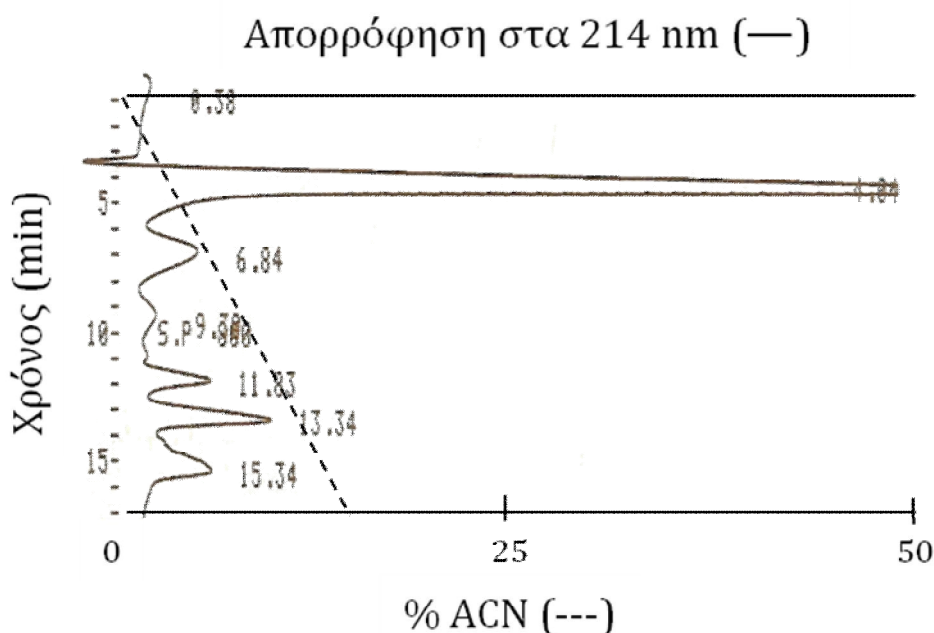
Στη συνέχεια, θέλοντας να διερευνήσουμε αν το φαινόμενο της παραγωγής και της εξωκυττάρωσης του πεπτιδίου προΤα(100-109) υπό αποπτωτικές συνθήκες είναι ειδικό μόνο για το συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού θανάτου, υπερκείμενα νεκρωτικών και ογκωτικών κυττάρων HeLa αναλύθηκαν με τις ίδιες τεχνικές.

Για την επαγωγή νέκρωσης, κύτταρα της σειράς HeLa υποβλήθηκαν σε διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης, ενώ αντίστοιχος αριθμός κυττάρων οδηγήθηκε σε κυτταρικό θάνατο με όγκωση, μειώνοντας την ωσμωμοριακότητα του θρεπτικού μέσου με τη βοήθεια υπότονου διαλύματος NaCl (200 mOsM σε αντίθεση με τα 335 mOsM του ισοωσμωτικού διαλύματος). Και στις δύο περιπτώσεις συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών και αναλύθηκαν με RP-HPLC και MALDI-ToF φασματομετρία μάζας.

Κατά την RP-HPLC ανάλυση του υπερκειμένου των νεκρωτικών κυττάρων (**Εικόνα 3.23**), παρατηρήθηκε κορυφή με χρόνο έκλουσης 13,34 λεπτά, η οποία συλλέχθηκε και αναλύθηκε περαιτέρω με φασματομετρία μάζας. Παρά το γεγονός ότι η

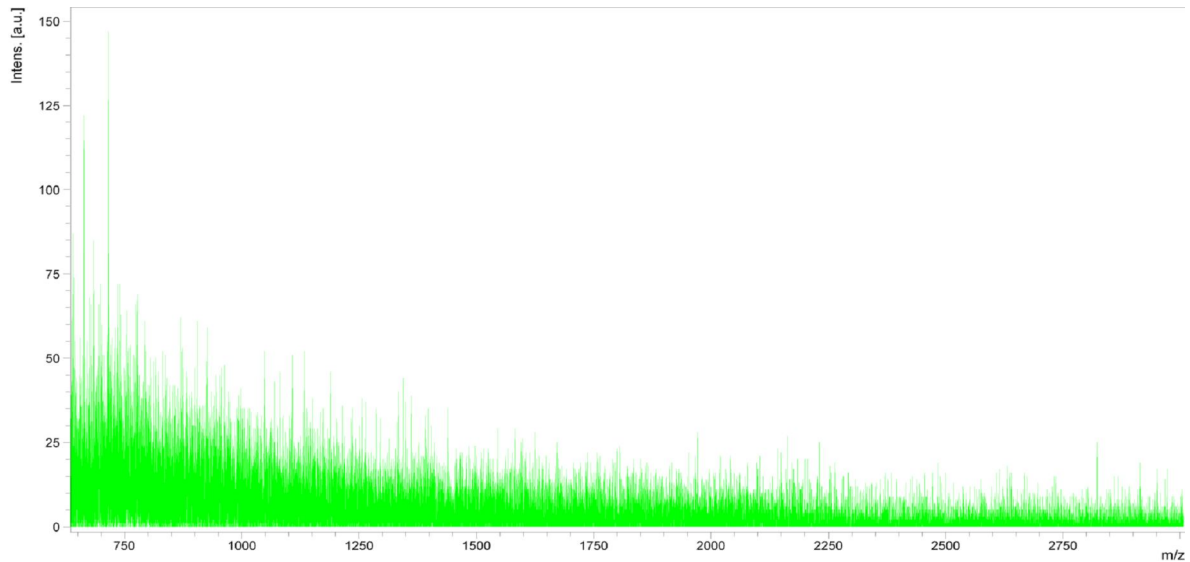
παρατηρούμενη κορυφή είχε χρόνο έκλουσης αντίστοιχο με αυτόν του πεπτιδίου προΤα(100-109), με την ανάλυση MALDI-ToF δεν ταυτοποιήθηκε κορυφή με μοριακή μάζα αντίστοιχη του πεπτιδίου προΤα(100-109) (**Εικόνα 3.24**), υποδεικνύοντας ότι το πεπτίδιο προΤα(100-109) δεν παράγεται ή/και δεν εξωκυτταρώνεται υπό νεκρωτικές συνθήκες.

Αντίστοιχα, κατά την RP-HPLC ανάλυση του υπερκειμένου των ογκωτικών κυττάρων, ανιχνεύθηκε κορυφή με χρόνο έκλουσης παρόμοιο με αυτό του πεπτιδίου προΤα(100-109) (13,98 λεπτά, **Εικόνα 3.25**). Όπως και στην περίπτωση του νεκρωτικού υπερκειμένου, η MALDI-ToF ανάλυση έδειξε ότι το πεπτίδιο προΤα(100-109) δεν είναι παρόν στο υπερκείμενο των ογκωτικών κυττάρων HeLa (**Εικόνα 3.26**).

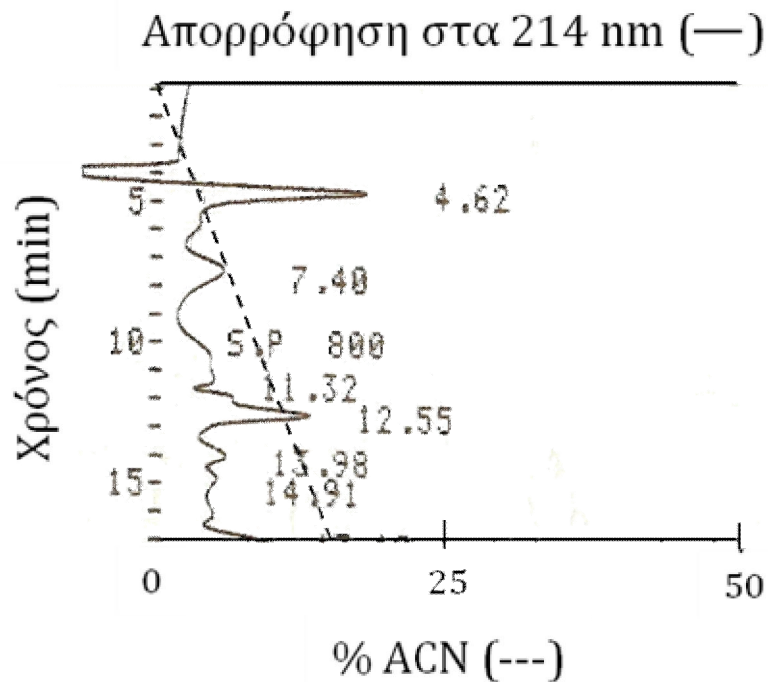


**Εικόνα 3.23.** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του υπερκειμένου νεκρωτικών κυττάρων. Υπερκείμενο νεκρωτικών κυττάρων συλλέχθηκε και αναλύθηκε με RP-HPLC. Το κλάσμα που αντιστοιχούσε στην κορυφή με χρόνο έκλουσης 13,34 λεπτά (10,13% ACN) [~χρόνος έκλουσης του προΤα(100-109)], συλλέχθηκε και αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας.

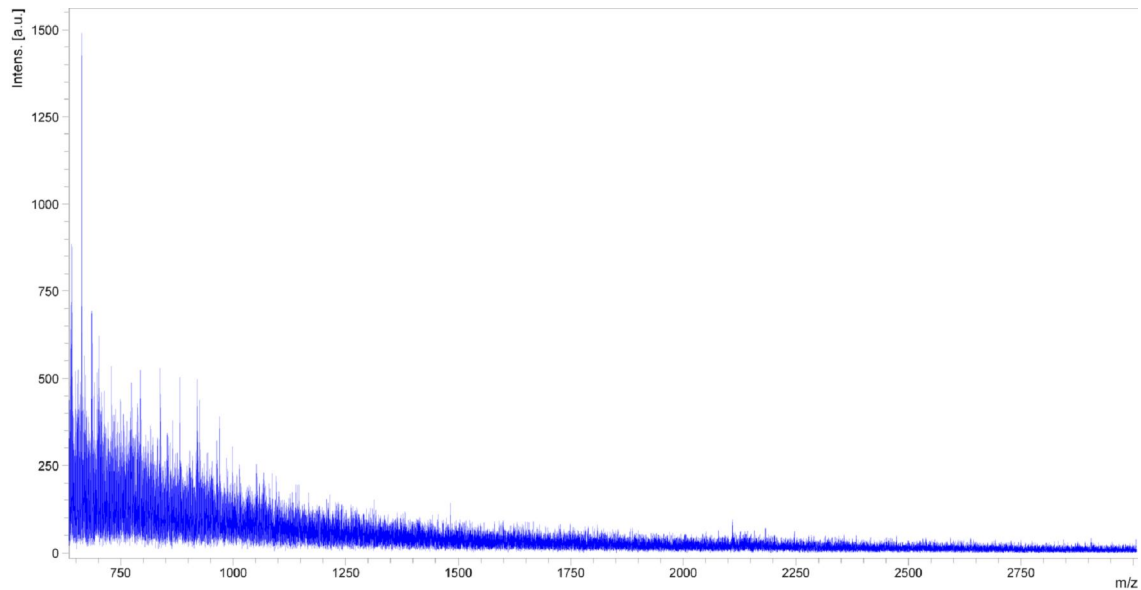




**Εικόνα 3.24.** Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) δεν είναι παρόν στο υπερκείμενο νεκρωτικών κυττάρων. Υπερκείμενο νεκρωτικών κυττάρων αναλύθηκε αρχικά με RP-HPLC και το κλάσμα που αντιστοιχούσε στο χρόνο έκλυσης του πεπτιδίου προΤα(100-109) συλλέχθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας MALDI-ToF.



**Εικόνα 3.25.** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του υπερκειμένου ογκωτικών κυττάρων. Υπερκείμενο ογκωτικών κυττάρων συλλέχθηκε και αναλύθηκε με RP-HPLC. Το κλάσμα που αντιστοιχούσε στην κορυφή με χρόνο έκλυσης 13,98 λεπτά (10,60% ACN) [~χρόνος έκλυσης του προΤα(100-109)], συλλέχθηκε και αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας.



**Εικόνα 3.26.** Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) δεν είναι παρόν στο υπερκείμενο ογκωτικών κυττάρων. Υπερκείμενο ογκωτικών κυττάρων αναλύθηκε αρχικά με RP-HPLC και το κλάσμα που αντιστοιχούσε στο χρόνο έκλυσης του πεπτιδίου προΤα(100-109) συλλέχθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας MALDI-ToF.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η παραγωγή και η εξωκυττάρωση του προΤα(100-109) φαίνεται να συμβαίνει αποκλειστικά υπό αποπτωτικές συνθήκες, καθώς το ενδογενώς παραγόμενο δεκαπεπτίδιο ανιχνεύθηκε μόνο στο εξωκυττάριο μέσο των αποπτωτικών κυττάρων HeLa. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς συμβάλλουν στην αποσαφήνιση του μηχανισμού της ανοσοενισχυτικής (και γενικότερα της βιολογικής) δράσης του ακέραιου μορίου της προΤα αλλά και των θραυσμάτων της, βοηθώντας, επιπλέον, και στη σύνδεση των δύο διακριτών ρόλων που την χαρακτηρίζουν.

**4**

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



Η προΤα απομονώθηκε πρώτη φορά το 1984 από θύμο αδένα αρουραίου (Haritos et al., 1984a). Η ερευνητική ομάδα των Haritos και συνεργατών, της έδωσαν το όνομα «προθυμοσίνη α», καθώς αποτελούσε το πρόδρομο μόριο των ήδη γνωστών α-θυμοσινών Τα1 και Τα11 (Haritos et al., 1984a). Μετά από μελέτη των ιδιοτήτων της, το ισοηλεκτρικό σημείο της προΤα προσδιορίστηκε στο 3,55, γεγονός που την καθιστά ένα ιδιαίτερα όξινο πολυπεπτίδιο (Haritos et al., 1984a). Στην πρωτοταγή της δομή εμπεριέχεται αλληλουχία NLS (Manrow et al., 1991) και έτσι, υποκυτταρικά η προΤα εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, όπου ελέγχει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Karetsou et al., 2002). Η προΤα είναι απαραίτητη για την κυτταρική επιβίωση (Eschenfeldt and Berger, 1986) και αυτό εξηγεί, κατά ένα ποσοστό, την υψηλή εξελικτική συντηρητικότητα που εμφανίζει μεταξύ των θηλαστικών (Hannappel and Huff, 2003).

Συγχρόνως, το πολυπεπτίδιο ασκεί και έναν εξωκυτταρικό ανοσοενισχυτικό ρόλο, ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς σε κυτταρικό επίπεδο. Στο πλαίσιο αυτό, η προΤα έχει δειχθεί να ενισχύει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των T κυττάρων, μέσω της αύξησης της παραγωγής IL-2 και της έκφρασης του αντίστοιχου υποδοχέα (Baxevanis et al., 1990, Cordero et al., 1991). Είναι, επίσης, ικανή να ενισχύει τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες των μακροφάγων (Salvin et al., 1987, Papanastasiou et al., 1992), αλλά και να διεγείρει μονοκύτταρα, επάγοντας την αύξηση της έκφρασης των μορίων HLA-DR (Baxevanis et al., 1990b, Baxevanis et al., 1992) και της έκκρισης κυτταροκινών, όπως η IL-1β (Garbin et al., 1997, Skopeliti et al., 2007). Επιπλέον, τόσο το ακέραιο μόριο όσο και το καρβοξυτελικό ανοσοδραστικό τμήμα της προΤα, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), ενισχύουν την NK και LAK κυτταροτοξικότητα συνεργιστικά με την IL-2 (Skopeliti et al., 2009) και επάγουν την ωρίμανση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων (Skopeliti et al., 2009) *in vitro*.

Παρά το μεγάλο όγκο των δεδομένων που αφορούν την ανοσοενισχυτική δράση της προΤα, ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυτή ασκείται, παρέμενε μέχρι πρόσφατα ιδιαίτερα ασαφής. Οι αρχικές προσπάθειες για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του πολυπεπτιδίου υπέδειξαν ότι το μόριο προσδένεται σε ειδικές θέσεις στην επιφάνεια λεμφοβλαστών, ωστόσο απέτυχαν να ταυτοποιήσουν έναν ειδικό υποδοχέα για την προΤα (Cordero et al., 1994, Cordero et al., 1996, Pineiro et al., 2001). Χρησιμοποιώντας μία διαφορετική προσέγγιση, την πρωτεομική ανάλυση κυτταρικών

εκχυλισμάτων, κατέστη για πρώτη φορά δυνατή η σκιαγράφιση ενός πιθανού τρόπου δράσης του μορίου (Skopeliti et al., 2007). Εστιάζοντας στην αναγνώριση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-στόχων της προΤα, ύστερα από επίδραση του μορίου σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, αποκαλύφθηκε ότι η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων από την προΤα επάγεται καταρροϊκά των TLRs. Η βασικότερη ένδειξη για τη διέγερση ενός τουλάχιστον υποδοχέα τέτοιου τύπου, υπήρξε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης IRAK-4, η οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχει σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά πολλών TLRs (Akira and Takeda, 2004). Πράγματι, λίγο αργότερα, ο TLR-4 αναγνωρίστηκε ως ο υποδοχέας ο οποίος ενεργοποιείται από την προΤα σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού, ενεργοποίηση η οποία οδηγεί σε παραγωγή κυτταροκινών τόσο μέσω του MyD88-, όσο και του TRIF-εξαρτώμενου μονοπατιού (TNF- $\alpha$  και IFN- $\beta$ , αντίστοιχα) (Mosoian et al., 2010).

Ο TLR-4 εκφράζεται σε πληθώρα κυττάρων και ειδικά σε κύτταρα του φυσικού σκέλους του ανοσοποιητικού συστήματος (Baxevanis et al., 2013). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη πλειοτροπική δράση της προΤα, ενώ ένας αντίστοιχος TLR-4-εξαρτώμενος τρόπος δράσης θα μπορούσε να προταθεί και για το ανοσοδραστικό της τμήμα προΤα(100-109). Υπέρ αυτού συνηγορούν παλαιότερα, αλλά και πλέον πρόσφατα δεδομένα που δείχνουν την ικανότητα των δύο πεπτιδίων να επάγουν την ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων (Skopeliti et al., 2009) και να ενισχύουν τις βασικές λειτουργίες ουδετερόφιλων περιφερικού αίματος (Samara et al., 2013a), να ενεργοποιούν, δηλαδή, δύο κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν TLR-4 (Sabroe et al., 2005, Schreiber et al., 2010).

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής που έχει ως στόχο τη μελέτη της ικανότητας της προΤα και του προΤα(100-109) να δρουν ως ανοσοενισχυτικά μόρια, θελήσαμε αρχικά να διαλευκάνουμε το μηχανισμό δράσης μέσω του οποίου τα δύο πεπτίδια επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, των κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Βασιζόμενοι στα δεδομένα που υποστηρίζουν τον TLR-4-εξαρτώμενο μηχανισμό δράσης τους (Skopeliti et al., 2007, Mosoian et al., 2010, Samara et al., 2013a), διερευνήσαμε αν ο ίδιος υποδοχέας εμπλέκεται στην κυτταρική ενεργοποίηση των ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων.

Γνωρίζοντας ότι η προσθήκη LPS, ο οποίος συνιστά τον πρότυπο συνδέτη του TLR-4 (Yamamoto and Akira, 2010), οδηγεί σε παροδική αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα αυτού σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (Visintin et al., 2001, Nagata et al., 2012), διερευνήσαμε αν αντίστοιχες μεταβολές παρατηρούνται και παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) (**Εικόνα 3.1**). Πράγματι, σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες, η προσθήκη LPS οδήγησε σύντομα (μέσα σε 1 h) σε αυξημένη επιφανειακή έκφραση του TLR-4, η οποία ήταν μέγιστη στις 18 h, ενώ συγκρίσιμο ήταν και το πρότυπο της έκφρασης του TLR-4 παρουσία προΤα και προΤα(100-109). Το γεγονός αυτό αποτέλεσε και την πρώτη ένδειξη ότι η επαγόμενη από τα δύο πεπτίδια, ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης του TLR-4. Για να επιβεβαιώσουμε το εύρημα αυτό, εξετάσαμε στη συνέχεια αν η αύξηση της έκφρασης του TLR-4 συνοδεύεται και από αντίστοιχη ενδοκυτταρική ενεργοποίηση. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε με ανοσοστύπωμα κατά Western την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών καταρροϊκά του TLR-4, καθώς οι ποσοτικές μεταβολές σε πρωτεϊνικό επίπεδο μπορούν να αποτυπώσουν επιτυχώς τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται ύστερα από επίδραση με προΤα και προΤα(100-109). Αναλυτικότερα, μελετήθηκε η έκφραση τριών πρωτεϊνών-προσαρμογέων του TLR-4, των MyD88, TRIF και TIRAP (Baxevanis et al., 2013, Kawai και Akira, 2010), καθώς ο συνδυασμός επαγωγής της έκφρασής τους είναι μοναδικός της ενεργοποίησης του TLR-4 (**Εικόνα 1.2**). Πράγματι, η επίδραση με προΤα ή προΤα(100-109) σε δενδριτικά κύτταρα οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης και των τριών πρωτεϊνών, η οποία ήταν συγκρίσιμη με αυτή που καταγράφηκε παρουσία LPS (**Εικόνα 3.2**). Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, η ανοσοενισχυτική δράση των προΤα και προΤα(100-109) μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον TLR-4 και ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά αυτού, και έρχονται σε συμφωνία με ήδη υπάρχοντα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η προΤα ενεργοποιεί τόσο το MyD88- όσο και το TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι σε μακροφάγα ποντικού (Mosoian et al., 2010).

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των δύο μονοπατιών σηματοδότησης καταρροϊκά του TLR-4 δεν συμβαίνει συγχρόνως, αλλά διαδοχικά, και σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Αρχικά, ο TLR-4 μετά την πρόσδεση ενός συνδέτη του, ενεργοποιεί μέσω των πρωτεϊνών-προσαρμογέων MyD88 και TIRAP, ένα μονοπάτι σηματοδότησης (MyD88-εξαρτώμενο) από την κυτταρική μεμβράνη, το οποίο

καταλήγει στην πρώιμη ενεργοποίηση του NF-κB και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Zanoni and Granucci, 2010). Στη συνέχεια, ο TLR-4 ενδοκυτταρώνεται (μαζί με το συνδέτη του) και μεταφέρεται στα ενδοσώματα, όπου μέσω των πρωτεϊνών-προσαρμογέων TRAM και TRIF, ενεργοποιεί ένα δεύτερο μονοπάτι σηματοδότησης (TRIF-εξαρτώμενο) που οδηγεί στην όψιμη ενεργοποίηση του NF-κB και την παραγωγή IFN τύπου I (Kagan et al., 2008). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ενδοκυττάρωση του TLR-4 συμβαίνει σε ιδιαίτερα σύντομο χρονικό διάστημα (~15 λεπτά) μετά την προσθήκη του συνδέτη του LPS (Husebye et al., 2006, Aksoy et al., 2012), και εξαρτάται από την παρουσία του μορίου CD14 (Zanoni et al., 2011).

Σε συμφωνία με τις αναφορές αυτές, σε προκαταρκτικές μελέτες κινητικής της έκφρασης του TLR-4 που πραγματοποιήσαμε, καταγράψαμε μικρή μείωση της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, σύντομα (15-30 λεπτά) μετά την προσθήκη LPS, η οποία πιθανά υποδηλώνει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα (Παράρτημα I, **Εικόνα 7.2A**). Ακόμα μικρότερη, έως οριακή, μείωση της έκφρασης του TLR-4 καταγράψαμε κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα μετά από ενεργοποίηση των ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων με προΤα και προΤα(100-109). Πιθανά, το γεγονός ότι τα διαφοροποιημένα από ανθρώπινα μονοκύτταρα, ώριμα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα το μόριο CD14 (Jiang et al., 2005, Jarnjak-Jankovic et al., 2007) που μεσολαβεί την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα, να εξηγεί τα ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα ενδοκυττάρωσης που παρατηρήθηκαν. Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, μελετήσαμε την κινητική έκφρασης του TLR-4 σε κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD14, όπως τα ανθρώπινα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα (Παράρτημα I, **Εικόνα 7.1**). Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν, ότι η προσθήκη LPS, αλλά και προΤα ή προΤα(100-109) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και σε διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα μακροφάγα, οδήγησε σύντομα σε σημαντική μείωση της έκφρασης του TLR-4 (Παράρτημα I, **Εικόνα 7.2**). Αν και η συγκεκριμένη μελέτη δεν αποτελούσε στόχο της παρούσας διατριβής, τα δεδομένα αυτά παρέχουν έμμεσες ενδείξεις ότι τόσο η προΤα όσο και το δεκαπεπτίδιο της μπορούν να δρουν ως συνδέτες του TLR-4 και να επάγουν την ενδοκυττάρωσή του, με τρόπο αντίστοιχο αυτού του πρότυπου συνδέτη LPS. Παράλληλα υποδεικνύουν ότι ο βαθμός της ενδοκυττάρωσης του TLR-4 που μπορούμε να ανιχνεύσουμε με κυτταρομετρία ροής εξαρτάται από την παράλληλη επιφανειακή έκφραση του μορίου CD14 που διαφέρει μεταξύ διαφορετικών



κυτταρικών υποπληθυσμών. Αν και η διαδικασία όπως και ο χρόνος ενδοκυττάρωσης του TLR-4/CD14 μετά από σύνδεση του LPS έχει εκτενώς μελετηθεί σε κύτταρα ποντικού (Aksoy et al., 2012, Zanoni et al., 2011), δεν υπάρχουν διαθέσιμα στη βιβλιογραφία αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα σε ανθρώπινα κύτταρα. Παρόλ' αυτά, αξίζει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με δεδομένα για τον τρόπο δράσης της προΤα που είχαν δημοσιευθεί πριν από αρκετά χρόνια και τα οποία ήταν μέχρι πρότινος αρκετά ασαφή, όπου είχε δειχθεί ότι σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, η προΤα ενδοκυττάρωνεται μαζί με τον υποδοχέα της εντός ~10 λεπτών από την προσθήκη της (Cordero et al., 1994).

Ο τρόπος με τον οποίο η προΤα αλληλεπιδρά με τον TLR-4 μένει να εξακριβωθεί. Η προΤα είναι μία ιδιαίτερα αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη (Pan et al., 1986), με ακανόνιστη/τυχαία τριτοταγή δομή (Gast et al., 1995, Gast et al., 2003). Πιθανά, στην αλληλεπίδραση προΤα – TLR-4 να συμμετέχουν και άλλα μόρια, όπως για παράδειγμα η MD-2, η οποία έχει δειχθεί ότι αποτελεί απαραίτητο συστατικό του συμπλόκου LPS-TLR-4 (Nagai et al., 2002, Viriyakosol et al., 2001). Μάλιστα, έχει ήδη προταθεί ότι η αλληλεπίδραση της αρνητικά φορτισμένης περιοχής της προΤα με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της MD-2 και του TLR-4, σε συνδυασμό με την ακανόνιστη ευέλικτη δομή της προΤα, της επιτρέπουν να αποκτά μία διάταξη στο χώρο παρόμοια με αυτή του σημείου πρόσδεσης του LPS, επιτρέποντας την ενεργοποίηση του TLR-4 (Mosoian et al., 2010). Αναφορικά με το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), αν και το μικρό του μέγεθος φαινομενικά δυσχεραίνει την πιθανή αλληλεπίδρασή του με έναν υποδοχέα όπως ο TLR-4, η ικανότητά του να πολυμερίζεται και να υιοθετεί δομή β-πτυχωτών φύλλων (Skoreliti et al., 2009), δηλ. τη δευτεροταγή δομή που απαρτίζει τον πυρήνα δόμησης ινιδίων αμυλοειδούς (Hiramatsu et al., 2005), θα μπορούσε να εξηγήσει τον TLR-4-εξαρτώμενο τρόπο δράσης του.

Στα πλαίσια των αντικαρκινικών εμβολίων έχει ήδη δοκιμασθεί η αποκλειστική χορήγηση TAAs (πεπτιδικά εμβόλια) με σκοπό την επαγωγή ισχυρών αντικαρκινικών απαντήσεων και την εξάλειψη των όγκων (Mittendorf et al., 2007, Slingluff et al., 2008, Apostolopoulos et al., 2006, Mittendorf et al., 2008). Δεδομένου, όμως ότι η στρατηγική αυτή δε συνοδεύτηκε από τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Rosenberg et al., 2004), σε πολλά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έχει ήδη δοκιμαστεί η χορήγηση TAAs σε συνδυασμό με ένα όχημα, όπως τα *ex vivo* διαφοροποιημένα και ωριμασμένα, κυρίως αυτόλογα, δενδριτικά κύτταρα (Galluzzi et al., 2012, Cranmer et al., 2004, Ridgway,

2003). Αυτές οι ανοσοθεραπευτικές προσπάθειες παρουσίασαν βελτιωμένη ικανότητα επαγωγής αντικαρκινικών αποκρίσεων, οι οποίες οδήγησαν τελικά και σε παράταση της επιβίωσης των ασθενών (Trepriakas et al., 2010, Lacy et al., 2009, Perroud et al., 2011, Thomas-Kaskel et al., 2006, Schwaab et al., 2009, Lee et al., 2005, Burgdorf et al., 2008). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων αντικαρκινικών εμβολίων αποτελεί το Sipuleucel-T, το πρώτο ανοσοθεραπευτικό εμβόλιο για τον καρκίνο του προστάτη βασιζόμενο σε δενδριτικά κύτταρα το οποίο εγκρίθηκε για ευρεία κλινική χρήση στον άνθρωπο (Cheever and Higano, 2011). Επειδή το κόστος τέτοιου τύπου κυτταρικών αντικαρκινικών εμβολίων είναι συχνά περιοριστικό, αλλά και η συλλογή των κυττάρων από τους ασθενείς επίπονη (Tacke and Figdor, 2011), πολλές ερευνητικές προσπάθειες βασιζόμενες στην ίδια αρχή, δηλ. τη χρήση ενός οχήματος για τη βελτιστοποίηση της αντικαρκινικής δράσης των πεπτιδικών εμβολίων, εστιάζονται πλέον και στην *in vivo* στόχευση και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Kreutz et al., 2013).

Για τη βελτιστοποίηση της ανοσοενισχυτικής δράσης των δενδριτικών κυττάρων πολλοί συνδέτες των TLRs έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη (Baxevanis et al., 2013). Μία ξεχωριστή κατηγορία τέτοιων συνδετών συνιστούν τα μόρια που φέρουν στην αλληλουχία τους μοριακά μοτίβα παθογόνων μικροοργανισμών, τα επονομαζόμενα PAMPs, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το MPLA, έναν προσδέτη του TLR-4 (Cluff, 2010), το imiquimod, έναν προσδέτη του TLR-7 (Feyerabend et al., 2009), τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια CpG που σηματοδοτούν μέσω του TLR-9 (Karbach et al., 2010) και το poly-I:C που προσδέεται στον TLR-3 (Wieckowski et al., 2011). Όλα τα προαναφερθέντα μόρια έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τους TLRs στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των δενδριτικών κυττάρων και στη συνέχεια, να οδηγούν στην ωρίμανσή τους (Vaccheli et al., 2012). Αντίστοιχα, είναι ήδη πειραματικά τεκμηριωμένο ότι η προΤα και το προΤα(100-109), ως προτεινόμενοι συνδέτες του TLR-4, ενεργοποιούν τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και επάγουν την τελική διαφοροποίησή τους σε ώριμα δενδριτικά κύτταρα με τον χαρακτηριστικό ώριμο ανοσοφαινότυπο (Skopeliti et al., 2009). Αναλυτικότερα, επίδραση με προΤα και προΤα(100-109) οδήγησε σε σημαντική αύξηση της επιφανειακής έκφρασης χαρακτηριστικών μορίων-δεικτών των δενδριτικών κυττάρων (HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD86, CD40) σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που σημειώθηκαν παρουσία LPS και τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν εκ νέου στην παρούσα διδακτορική διατριβή

**(Εικόνα 3.3).** Επιπλέον, δείχθηκε ότι τα δύο πεπτίδια, λειτουργώντας ως παράγοντες ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, ήταν εξίσου αποτελεσματικά με τον TNF- $\alpha$ , ο οποίος σε αντίθεση με τον LPS που είναι τοξικός, χρησιμοποιείται ευρέως ως παράγοντας ωρίμανσης σε κλινικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου που βασίζονται στα δενδριτικά κύτταρα (Ridgway, 2003; Escobar et al., 2005; Burgdorf et al., 2008).

Εκτός, όμως, από την αποτελεσματική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, οι συνδέτες των TLRs επάγουν την παραγωγή και έκκριση κυρίως προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα (Mailliard et al., 2004, Navabi et al., 2009). Μάλιστα, έχει προταθεί πως συγκεκριμένοι TLR συνδέτες υπερέχουν ως παράγοντες ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων έναντι των καθιερωμένων και ευρέως χρησιμοποιούμενων παραγόντων, όπως για παράδειγμα το cocktail των κυτταροκινών TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ /IL-6/PGE2. Ο κυριότερος λόγος είναι ότι η ενεργοποίηση με συνδέτες των TLRs, δεν «εξαντλεί» τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cell exhaustion) και οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή IL-12 από αυτά (Kalinski et al., 1999, Langenkamp et al., 2000). Στα πλαίσια, λοιπόν, της μελέτης της δράσης των προΤα και προΤα(100-109) ως συνδετών του TLR-4 και ως παραγόντων ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, μελετήσαμε το πρότυπο των κυτταροκινών που εκκρίνουν τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία των δύο πεπτιδίων. Δείξαμε ότι υπερκείμενα *in vitro* καλλιιεργειών των συγκεκριμένων κυττάρων περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις IL-12 και χαμηλότερες συγκεντρώσεις IL-10, με αποτέλεσμα το ισοζύγιο των δύο κυτταροκινών (IL-12/IL-10) να είναι αυξημένο και συγκρίσιμο με αυτό που καταγράφηκε παρουσία των καθιερωμένων παραγόντων ωρίμανσης LPS και TNF- $\alpha$  (**Εικόνα 3.4**). Αντίστοιχα υψηλή ήταν και η συγκέντρωση του TNF- $\alpha$  που ανιχνεύθηκε στα υπερκείμενα των ίδιων καλλιιεργειών (Παράρτημα I, **Εικόνα 7.3**), υποδεικνύοντας, συνολικά, ότι τα προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παράγουν κυρίως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και έτσι είναι ικανά να ωθήσουν τη διαφοροποίηση των T κυττάρων προς τον τύπο ανοσοαπαντήσεων T<sub>H</sub>1. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι προεπάση των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TLR-4 πριν επιδράσουν σε αυτά οι παράγοντες ωρίμανσης, οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή κυρίως IL-12 στις πειραματικές ομάδες του LPS, της προΤα και του προΤα(100-109), αλλά όχι των TNF- $\alpha$ -ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων (Παράρτημα I, **Εικόνα 7.3**). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η παραγωγή

της κυτταροκίνης IL-12 από τα προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα εξαρτάται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον TLR-4 (Hovden et al., 2012).

Συνοψίζοντας τα υπάρχοντα δεδομένα από τη βιβλιογραφία και κυρίως αυτά που παρουσιάσαμε μέχρι τώρα στην παρούσα διατριβή, παρατηρούμε ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) διαθέτουν ανοσοενισχυτικές ιδιότητες κατάλληλες για την αποτελεσματική ενεργοποίηση Τ κυττάρων (Palucka et al., 2011). Συγκεκριμένα εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων MHC μέσω των οποίων παρουσιάζονται τα αντιγόνα (1<sup>ο</sup> σήμα διέγερσης), αλλά και συνδιεγερτικών μορίων (CD80/CD86, 2<sup>ο</sup> σήμα διέγερσης), ενώ παράγουν και μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως η IL-12, που είναι γνωστό ότι δρα ως το 3<sup>ο</sup> απαιτούμενο σήμα για τη διέγερση των Τ κυττάρων (Navabi et al., 2009, Kalinski et al., 2011). Επομένως στη συνέχεια, ελέγξαμε αν αυτά τα δενδριτικά κύτταρα εκτός από φαινοτυπικά ώριμα είναι και λειτουργικά ανοσοϊκανά, και μπορούν να παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα Τ κύτταρα, ενεργοποιώντας αντιγονοειδικές ανοσοαπαντήσεις. Επιλέξαμε να μελετήσουμε την *in vitro* λειτουργικότητα των δενδριτικών κυττάρων σε δύο πειραματικά συστήματα που αφορούν τους δύο κυριότερους Τ λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, δηλαδή εκτιμήσαμε την ικανότητα τους να διεγείρουν: α) Τ κύτταρα μνήμης και β) παρθένα (χωρίς εμπειρία αντιγόνου, antigen-inexperienced) Τ κύτταρα.

Για τη διέγερση των Τ κυττάρων μνήμης επιλέχθηκαν αντιγονικά πεπτίδια από τις πρωτεΐνες του ανθρώπινου ιού CMV, pp65 και IE1, καθώς: α) μείγματα των συγκεκριμένων πεπτιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως *in vitro* και αποδεδειγμένα οδηγούν στην έκπτυξη Τ κυττάρων μνήμης (Sinclair et al., 2004, Zandvliet et al., 2010) και β) πληθυσμοί Τ κυττάρων ειδικών για τα πεπτίδια αυτά, ανιχνεύονται σε ικανοποιητικούς αριθμούς στο περιφερικό αίμα CMV+ δοτών (Sester et al., 2002, Snyder et al., 2011). Τα Τ κύτταρα μνήμης που εκπύχθηκαν στις καλλιέργειες ύστερα από δύο κύκλους ενεργοποίησης με δενδριτικά κύτταρα ωριμασμένα με προΤα ή προΤα(100-109) παρουσία του μείγματος των CMV πεπτιδίων, αναλύθηκαν ως προς το πρότυπο των κυτταροκινών που παράγουν. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έγινε ύστερα από ενδοκυτταρική χρώση με φθορίζοντα αντισώματα ειδικά για την κάθε κυτταροκίνη (ICS) (Singh et al., 2012, Weide et al., 2012). Η μέθοδος ενδοκυτταρικής χρώσης των κυτταροκινών προτιμήθηκε, καθώς παρακάμπτει βασικούς περιορισμούς που

χαρακτηρίζουν την καθιερωμένη εκτίμηση των κυτταροκινών με ανοσοδοκιμασία ELISA: α) με τη μέθοδο ICS εκτιμάται η παραγωγή κυτταροκινών στο εσωτερικό των κυττάρων, πριν την έκκρισή τους στο υπερκείμενο της καλλιέργειας όπου σε σημαντικό βαθμό μπορεί να αποικοδομούνται λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής τους (Morelli et al., 2001), β) η ICS μπορεί να συνδυαστεί και με τη σήμανση εξωκυτταρικών επιφανειακών δεικτών, καθιστώντας δυνατή τη σύγχρονη αξιολόγηση των T κυτταρικών υποπληθυσμών (CD4+, CD8+) ξεχωριστά ως προς τις κυτταροκίνες που παράγουν (Pala et al., 2000), γ) είναι δυνατή η εκτίμηση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα στο ίδιο κύτταρο (Foster et al., 2007) και δ) με την πολυχρωματική ICS που χρησιμοποιήσαμε και εμείς στα πειράματά μας, δεν απαιτείται ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός κυττάρων για να λάβουμε μία σαφή εικόνα των επαγόμενων ανοσολογικών απαντήσεων (Pala et al., 2000).

Από τα αποτελέσματα της ενδοκυτταρικής χρώσης παρατηρήσαμε πως τα βοηθητικά T κύτταρα μνήμης που διεγέρθηκαν παρουσία προTα- και προTα(100-109)-ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων διαφοροποιήθηκαν προς T<sub>H</sub>1 κύτταρα, καθώς παρουσία αντιγόνου, παρήγαγαν προφλεγμονώδεις (IFN-γ, TNF-α και IL-2) και όχι αντιφλεγμονώδεις (IL-10, IL-13 και IL-5) κυτταροκίνες ή IL-17 (**Εικόνα 3.5**) (Vukmanovic-Stejic et al., 2000). Αντίστοιχο ήταν και το πρότυπο των παραγόμενων κυτταροκινών από τα κυτταροτοξικά T κύτταρα (**Εικόνα 3.6**), υποδεικνύοντας τη διαφοροποίησή τους προς T<sub>C</sub>1-τύπου κύτταρα (Vukmanovic-Stejic et al., 2000).

Προσαρμόζοντας το πρωτόκολλο διέγερσης των T κυττάρων μνήμης στις υψηλότερες «απαιτήσεις» των παρθένων T κυττάρων για σήματα ενεργοποίησης, επιλέξαμε να πραγματοποιήσουμε περισσότερους κύκλους διέγερσης με δενδριτικά κύτταρα (συνολικά 3-4), ώστε να επάγουμε την έκπτυξη αντιγονοειδικών T κυττάρων (Yee et al., 2002), αποφεύγοντας συγχρόνως, την υπερβολική ενεργοποίηση των T κυττάρων, την εξάντλησή τους και τη μείωση της βιωσιμότητάς τους (Mehrotra et al., 2003). Για τη διέγερση των παρθένων T κυττάρων επιλέχθηκαν ογκοειδικά πεπτιδια-επίτοποι από την αλληλουχία της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, τα HER-2(9<sub>369</sub>) και HER-2(15<sub>776</sub>), καθώς: α) η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου (μαστού, ωοθηκών, στομάχου, προστάτη, πνεύμονα) και αποτελεί στόχο πολλών προσπαθειών ανοσοθεραπείας με πεπτιδικά εμβόλια (Mittendorf et al., 2008, Khoo et al., 2006) και β) τα συγκεκριμένα πεπτιδικά είναι ανοσοεπικρατή, έχουν χρησιμοποιηθεί

και σε κλινικές μελέτες καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα και του προστάτη, και είναι γνωστή η ικανότητά τους να επάγουν *in vitro* και *in vivo* τη διέγερση των T κυττάρων (Salazar et al., 2004, Peoples et al., 2005, Mittendorf et al., 2012, Gates et al., 2009). Αντίστοιχα με τα T κύτταρα μνήμης, διέγερση των παρθένων T κυττάρων με προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα οδήγησε σε αντιγονοειδική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α, IFN-γ, IL-2) τόσο από τα CD4+ (**Εικόνες 3.7, 3.8**), όσο και από τα CD8+ T κύτταρα (**Εικόνα 3.10A**). Αντίθετα, η παραγωγή των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-4, IL-10) και της IL-17 δε μεταβλήθηκε και παρέμεινε ιδιαίτερα χαμηλή και στους δύο T κυτταρικούς υποπληθυσμούς, ακόμα και παρουσία ογκοειδικών πεπτιδίων στην καλλιέργεια (**Εικόνες 3.8, 3.9** για τα CD4+ T κύτταρα, **Εικόνα 3.10B** για τα CD8+ T κύτταρα).

Συνολικά, λοιπόν, η μελέτη της λειτουργικότητας των προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων σε καλλιέργειες διέγερσης T κυττάρων μνήμης και παρθένων, μας επέτρεψε να ελέγξουμε πιο αναλυτικά την ικανότητά τους να κατευθύνουν και να ενισχύουν αντιγονοειδικές ανοσοαπαντήσεις. Συγκεκριμένα, τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία των δύο πεπτιδίων δείχθηκε ότι είναι ικανά να ενεργοποιούν βοηθητικά και κυτταροτοξικά T κύτταρα *in vitro* και να επάγουν τη διαφοροποίησή τους προς T<sub>H</sub>1 και T<sub>C</sub>1-τύπου κύτταρα, αντίστοιχα, ανεξαρτήτως του T κυτταρικού πληθυσμού που διεγείρεται (κύτταρα μνήμης ή παρθένα), αλλά και της φύσεως του αντιγόνου (ιικά ή καρκινικά). Αυτό υποδεικνύει ότι τα δύο μόρια δρουν ανοσοενισχυτικά και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια παρασκευής εμβολίων εναντίον τόσο του καρκίνου, όσο και μολυσματικών ασθενειών.

Συγκεκριμένα ανοσοενισχυτικά μόρια έχουν ήδη λάβει έγκριση και έχουν χορηγηθεί ευρέως σε ανθρώπους μαζί με εμβόλια έναντι μολυσματικών ασθενειών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα άλατα αλουμινίου (alum), συστατικό πολλών εγκεκριμένων εμβολίων (π.χ. έναντι των ιών της ηπατίτιδας A και B, του HPV και των βακτηριακών στελεχών *Streptococcus pneumoniae* και *Neisseria meningitidis*) (Tritto et al., 2009), καθώς είναι μη τοξικά, ασφαλή και επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων (Brewer, 2006, Bryan, 2007). Στην κλινική πράξη, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί γαλακτώματα νερού-λαδιού σε εμβόλια εναντίον στελεχών του ιού της γρίπης (Ott et al., 1995, Galli et al., 2009) και συστήματα ανοσοενισχυτικών, όπως το ASO<sub>4</sub>, σε εμβόλια εναντίον των ιών της γρίπης, της ηπατίτιδας B (Fendrix<sup>®</sup>,

GlaxoSmithKline) και του HPV (Cervarix<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline) (Didierlaurent et al., 2009, Baras et al., 2008, Reed SG et al., 2009). Η χρήση των προαναφερθέντων ανοσοενισχυτικών μορίων συνοδεύτηκε από ιδιαίτερα επιτυχημένα αποτελέσματα, αφήνοντας πολύ στενά «περιθώρια» για την ανακάλυψη και την πιθανή χρήση νέων μορίων στα πλαίσια των εμβολίων έναντι μολυσματικών ασθενειών. Αντιθέτως, η ανάγκη ανακάλυψης νέων ανοσοενισχυτικών μορίων για τη βελτιστοποίηση των αντικαρκινικών εμβολίων εξακολουθεί να υφίσταται και μάλιστα είναι επιτακτική (Tefit and Serra, 2011, Dang et al., 2012). Για το λόγο αυτό, πρωταρχικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της προΤα και του προΤα να δρουν ανοσοενισχυτικά ωριμάζοντας δενδριτικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να επάγουν ογκοειδικές αντικαρκινικές Τ κυτταρικές απαντήσεις. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, η μελέτη αυτή κατέστη δυνατή μόνο στο πειραματικό σύστημα διέγερσης παρθένων Τ κυττάρων και όχι στο σύστημα των Τ κυττάρων μνήμης, καθώς: α) η πλειοψηφία των καρκίνων δεν εγείρουν ικανοποιητικές Τ κυτταρικές απαντήσεις και άρα δεν επάγουν την παραγωγή κυττάρων μνήμης (Idenoue et al., 2005, Prado-Garcia et al., 2012, Soliman, 2013) και β) τα όποια Τ κύτταρα μνήμης πιθανά αναπτυχθούν εναντίον των ογκοειδικών αντιγόνων, δεν επιβιώνουν ή δεν είναι μακροπρόθεσμα λειτουργικά (Whiteside, 2006, Prado-Garcia et al., 2012). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η αδυναμία απομόνωσής τους από το περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο σε ικανά ποσοστά, αλλά και η δύσκολη *in vitro* διέγερση και έκπτυξή τους παρουσία ογκοειδικών πεπτιδίων.

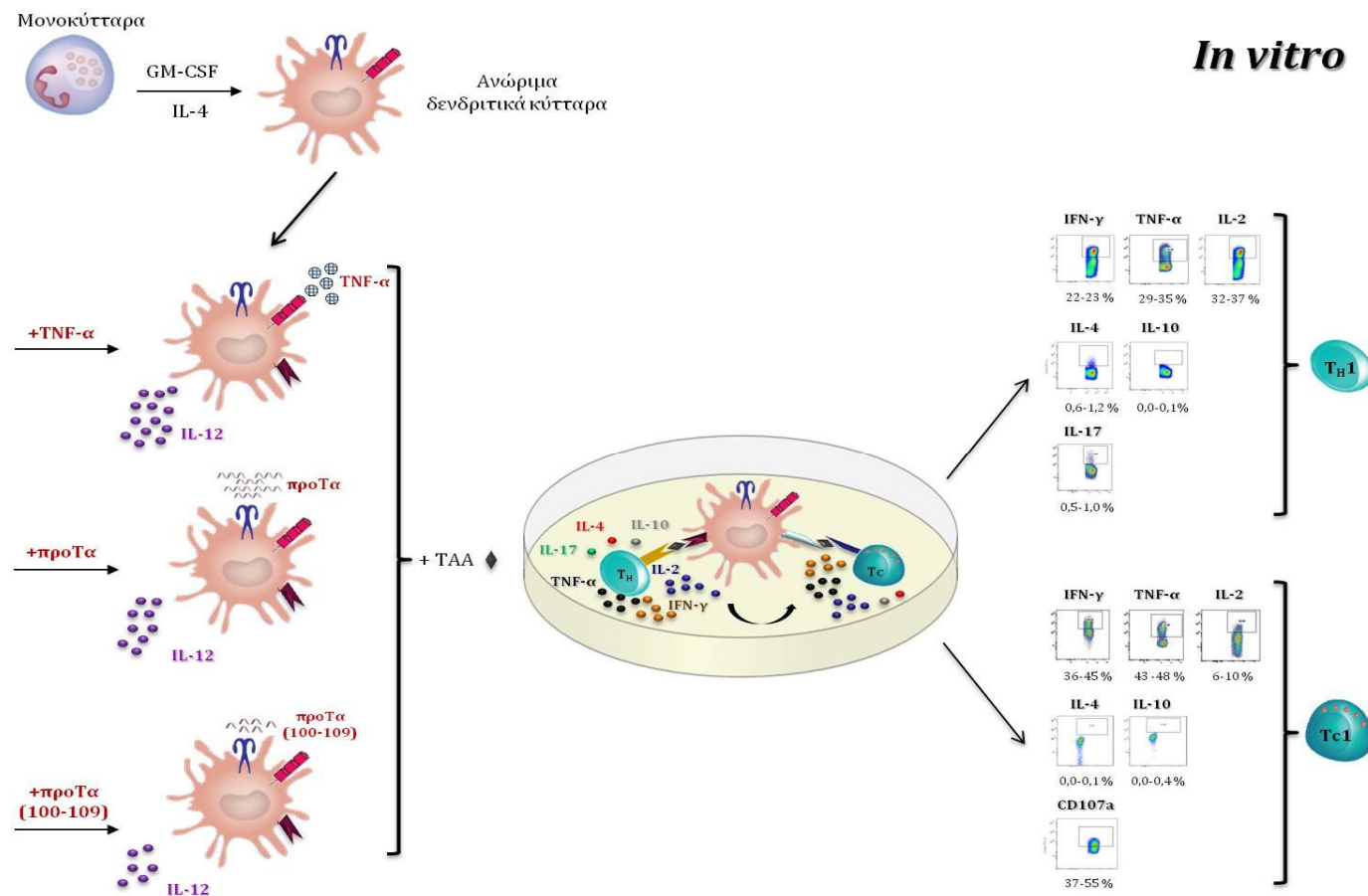
Συνεπώς, εστιάζοντας στην αναλυτικότερη μελέτη των ογκοειδικών Τ κυτταρικών σειρών που εκπύχθηκαν στο πειραματικό σύστημα της διέγερσης των παρθένων Τ κυττάρων, προχωρήσαμε σε έλεγχο της ειδικότητάς τους ως προς την κυτταροτοξική τους ικανότητα και το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό. Χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές μεθόδους εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας, την επιφανειακή έκφραση του δείκτη αποκοκκίωσης CD107a (Rubio et al., 2003) και την πρότυπη μέθοδο απελευθέρωσης <sup>51</sup>Cr (Skopeliti et al., 2006) και λάβαμε συγκρίσιμα αποτελέσματα (**Εικόνες 3.11** και **3.12**, αντίστοιχα). Τα CD8<sup>+</sup> Τ κύτταρα που εκπύχθηκαν παρουσία των προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων ήταν αντιγονοειδικά, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζουν και να λύουν ειδικά κύτταρα-στόχους που εξέφραζαν και παρουσίαζαν στην επιφάνειά τους, τους επιτόπους της HER-2/neu που χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερσή τους. Επιπλέον, με τη χρήση μονοκλωνικού

αντισώματος έναντι των MHC τάξης I μορίων, διαπιστώθηκε ότι η παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα είναι όχι μόνο αντιγονοειδική, αλλά και MHC τάξης I-περιοριζόμενη (**Εικόνα 3.12**). Χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό (FlowJo), τα αντιγονοειδικά CD8+ T κύτταρα αναλύθηκαν και ως προς την πολυλειτουργικότητά τους, δηλαδή την ικανότητά τους να παράγουν περισσότερες από μία προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) ή/και να ασκούν κυτταροτοξική δράση (έκφραση CD107a). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν, ότι η πλειοψηφία των αντιγονοειδικών κυτταροτοξικών T κυττάρων που εκπύχθηκαν παρουσία των προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένων δενδριτικών ήταν πολυλειτουργικά και μάλιστα τα ποσοστά τους ήταν συγκρίσιμα με εκείνα που προσδιορίστηκαν παρουσία των πρότυπων (TNF- $\alpha$ -ωριμασμένων) δενδριτικών κυττάρων (**Εικόνα 3.13**). Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς η πολυλειτουργικότητα των CD8+ T κυττάρων έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή IFN- $\gamma$  και με ιδιαίτερα αποτελεσματικές ανοσολογικές απαντήσεις (Darrah et al., 2007, Precopio et al., 2007, Almeida et al., 2007, Han et al., 2012, Lachman et al., 2011). Τέλος, με τη μέθοδο ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης εκτιμήθηκε και η ειδικότητα του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων (Skopeliti et al., 2006). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικής ικανότητας, ο πολλαπλασιασμός των T κυττάρων που διεγέρθηκαν παρουσία των προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων, ήταν άμεσα εξαρτώμενος από την παρουσία αντιγόνου, αλλά και MHC τάξης II-περιοριζόμενος, καθώς προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος έναντι των MHC τάξης II μορίων μείωσε σημαντικά το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των T κυττάρων (**Πίνακας 3.3**).

Συνολικά, λοιπόν, (**Εικόνα 4.1**) η προΤα και το προΤα(100-109) δρουν ανοσοενισχυτικά ωριμάζοντας ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα που διαφοροποιούνται από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, τα οποία στη συνέχεια είναι ικανά:

1. Να ενισχύουν την ανοσογονικότητα καρκινικών επιτόπων προερχόμενων από μία εαυτή πρωτεΐνη (HER-2/neu), που αποτελεί ένα από τα βασικά ζητούμενα στην ανάπτυξη νέων βελτιωμένων πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του καρκίνου (Rosenberg et al., 2004),
2. Να οδηγούν στην έκπτυξη T<sub>H</sub>1 βοηθητικών T κυτταρικών σειρών, οι οποίες είναι ογκοειδικές, αφού πολλαπλασιάζονται έντονα μόνο παρουσία των αντιγόνων με τα οποία διεγέρθηκαν, και MHC τάξης II-περιοριζόμενες, και





**Εικόνα 4.1.** Η προΤα και το προΤα(100-109) ενισχύουν τις κυτταρομεσολαβητικές απαντήσεις *in vitro*. Τα δύο πεπτίδια, ενεργοποιώντας τον TLR-4 επάγουν *in vitro* την ωρίμανση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια υπερεκφράζουν MHC τάξης II και συνδιεγερτικά μόρια και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-12). Εκτός από φαινοτυπικά ώριμα, τα συγκεκριμένα δενδριτικά κύτταρα είναι και λειτουργικά ανοσοϊκανά και διεγείρουν, παρουσία ογκοειδικών πεπτιδίων, τόσο βοηθητικά ( $T_H$ ) όσο και κυτταροτοξικά ( $T_C$ ) T κύτταρα, τα οποία παράγουν κυτταροκίνες. Η ανάλυση των παραγόμενων κυτταροκινών έδειξε αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών και οριακή παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα  $T_H$  κύτταρα, υποδεικνύοντας τη διαφοροποίησή τους προς τύπου  $T_H1$  κύτταρα. Αντίστοιχα, τα  $T_C$  κύτταρα παρήγαγαν κυρίως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και παρουσίασαν κυτταροτοξική δράση, γεγονός που υποδεικνύει τη διαφοροποίησή τους προς τύπου  $T_C1$  κύτταρα. Παρόμοια εικόνα λήφθηκε και ύστερα από διέγερση T κυττάρων μνήμης παρουσία ιικών πεπτιδίων.

3. Να οδηγούν στην έκπτυξη T<sub>C</sub>1 κυτταροτοξικών T κυτταρικών σειρών, οι οποίες επίσης είναι ογκοειδικές, αφού λύουν καρκινικά κύτταρα-στόχους που εκφράζουν τα αντιγόνα με τα οποία διεγέρθηκαν, και MHC τάξης I-περιοριζόμενες. Η διαπίστωση αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς η ενίσχυση της μη ειδικής κυτταροτοξικότητας σε ασθενείς με καρκίνο, έχει σχετιστεί με αυξημένη τοξικότητα και εμφάνιση βαριών φαινομένων αυτοανοσίας (Eklund and Kuzel, 2005).

Αντίστοιχα με την προΤα και το προΤα(100-109), πολυάριθμοι συνδέτες των TLRs, όπως το poly I:C, το MPLA και το Resiquimod, έχουν αποδεδειγμένη ικανότητα να ωριμάζουν ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα τα οποία στη συνέχεια επάγουν ανοσοαπαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1 και ενισχύουν την CTL κυτταροτοξικότητα *in vitro* (Mailliard et al., 2004, Ten Brinke et al., 2007, Ten Brinke et al., 2010, Vanderlocht et al., 2010, Lichtenegger et al., 2012). Συνεπώς, πολλοί συνδέτες των TLRs, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το CpG, το imiquimod, το MPLA και το poly-I:C, χρησιμοποιούνται στην κλινική ως παράγοντες που επάγουν την *ex vivo* ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων πριν την αυτόλογη μεταμόσχευσή τους σε ασθενείς με καρκίνο, (Akiyama et al., 2012, Adams et al., 2003), ενώ παράλληλα χορηγούνται και *in vivo* στα πλαίσια ανοσοθεραπευτικών αντικαρκινικών εμβολιασμών σε συνδυασμό με TAAs (Vasteenkiste, 2007, Feyerabend et al., 2009, Karbach et al., 2010). Πριν τη χορήγησή τους, όμως, σε ασθενείς, οι συνδέτες των TLRs δοκιμάστηκαν σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου με αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, η χορήγηση poly-I:C αύξησε τον αριθμό των ενεργοποιημένων T και NK κυττάρων και μείωσε τον αριθμό των Treg κυττάρων που διηθούσαν τον όγκο, οδηγώντας έτσι σε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε ένα μοντέλο καρκίνου του προστάτη (Chin et al., 2010). Επιπλέον, η χορήγηση συνδετών των TLR-7/8 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσοαπαντήσεων τύπου T<sub>H</sub>1 και αύξηση των ογκοειδικών κυτταροτοξικών κυττάρων, προστατεύοντας τα ζώα από μεταστάσεις σε μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα και του παχέος εντέρου (Wang et al., 2010). Τέλος, η χορήγηση CpG οδήγησε στην επαγωγή μακρόχρονης αντικαρκινικής ανοσίας, η οποία προστατεύει τα ζώα σε επόμενες χορηγήσεις μελανωματικών κυττάρων (Nierkens et al., 2011).

Συνεπώς, σε συνέχεια των *in vitro* πειραμάτων μας εστίασαμε στη διερεύνηση της *in vivo* δραστηριότητας της προΤα και του πεπτιδίου της προΤα(100-109) σε ένα μοντέλο μελανώματος σε ποντίκια, χρησιμοποιώντας ένα θεραπευτικό πρωτόκολλο

ανοσοθεραπείας σε συνδυασμό με ογκοειδικά αντιγόνα. Η θεραπευτική αλλά και η προφυλακτική χορήγηση της προΤα έχει ήδη μελετηθεί σε ένα *in vivo* μοντέλο λευχαιμίας σε ζώα της φυλής DBA/2, όπου παρουσίασε ευεργετική δράση, καθώς παρεμπόδισε την εξέλιξη της δημιουργίας ασκίτη, αυξάνοντας την έκκριση TNF-α από τα περιτοναϊκά μακροφάγα των ποντικών και τα ποσοστά των ενεργοποιημένων NK, LAK και αντιλευχαιμικών T κυτταροτοξικών κυττάρων (Papanastasiou et al., 1992, Baxevanis et al., 1994, Baxevanis et al., 1995). Στην παρούσα διατριβή για την *in vivo* μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα πειραματικό μοντέλο μελανώματος σε ποντίκια της φυλής C57BL/6, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με συγκεκριμένο αριθμό συγγενικών κυττάρων B16.F1 ( $5 \times 10^4$  κύτταρα/ζώο) που οδήγησε σε ένα ήπιο, αλλά συγχρόνως όχι ιδιαίτερα παρατεταμένο χρονικά *in vivo* πρωτόκολλο (**Εικόνα 3.14**). Η επίδραση της χορήγησης της προΤα και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου μελετήθηκε στα πλαίσια δύο αντικαρκινικών ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων, ένα ετερόχρονης και ένα σύγχρονης χορήγησης των ανοσοενισχυτικών παραγόντων και των καρκινικών κυττάρων.

Στο πρωτόκολλο της ετερόχρονης χορήγησης, οι ανοσοθεραπευτικοί παράγοντες GM-CSF (ως καθιερωμένος ανοσοενισχυτής που χρησιμοποιείται ευρέως σε πεπτιδικά αντικαρκινικά εμβόλια, Zarei et al., 2009), προΤα και προΤα(100-109) χορηγήθηκαν σε ζώα με ήδη ανεπτυγμένο όγκο. Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε σε δύο δόσεις ανά δύο ημέρες, με σκοπό τη βέλτιστη *in vivo* ενεργοποίηση/ωρίμανση των ήδη υπάρχοντων, αλλά και των νεο-αναπτυσσόμενων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Μία ημέρα μετά, όταν δηλ. η διαδικασία ωρίμανσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (~24-48 h) είχε ολοκληρωθεί, χορηγήσαμε το πεπτιδικό παρασκεύασμα AWE από τα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα B16.F1 ως εμβόλιο πολλαπλών επιτόπων (multi-epitope vaccine), με σκοπό την παροχή αντιγόνων, την πρόσληψή τους από τα ώριμα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τη βέλτιστη παρουσίασή τους στα T λεμφοκύτταρα. Η ανοσοενισχυτική δράση της προΤα και του προΤα(100-109) αξιολογήθηκε από την ικανότητά τους να καθυστερούν την αύξηση του καρκινικού φορτίου και να παρατείνουν την επιβίωση των πειραματόζων. Γνωρίζοντας εκ των προτέρων την αποτελεσματικότητα του παρασκευάσματος AWE στην *in vivo* ενεργοποίηση ειδικών κυτταροτοξικών κλώνων έναντι του ενοφθαλμιζόμενου όγκου σε ποντίκια (Baxevanis et al., 2000, Baxevanis et al., 2002; Gritzapis et al., 2005), παρατηρήσαμε ότι η συνδυαστική χορήγηση AWE με προΤα ή προΤα(100-109) στα ζώα

παρουσιάστηκε ιδιαίτερα ευεργετική, μειώνοντας το ρυθμό αύξησης του καρκινικού φορτίου και παρατείνοντας την επιβίωσή τους (**Εικόνες 3.15**). Ευεργετική ήταν επίσης και η χορήγηση GM-CSF, μίας κυτταροκίνης που χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές για την προσέλκυση και ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων (Chang et al., 2004), καθώς παρέτεινε την επιβίωση των πειραματόζων και οδήγησε σε ανάσχεση της ανάπτυξης του όγκου. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη δόση και στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, η επίδραση του GM-CSF δεν ξεπέρασε αυτήν της προΤα, ούτε και του πεπτιδίου προΤα(100-109). Πιθανά, αριθμητικά περισσότερες χορηγήσεις ή/και ποσοτικά μεγαλύτερες δόσεις GM-CSF να βοηθούσαν στην εκδήλωση της βέλτιστης ανοσοενισχυτικής δράσης της συγκεκριμένης κυτταροκίνης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι τρεις χορηγήσεις GM-CSF ανά εβδομάδα και για τρεις εβδομάδες στην ίδια δόση με αυτή που χρησιμοποιήσαμε (100 ng/ζώο), οδήγησαν σε σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου και των μεταστάσεων σε μοντέλο καρκίνου του μαστού σε ποντίκια (Eubank et al., 2009).

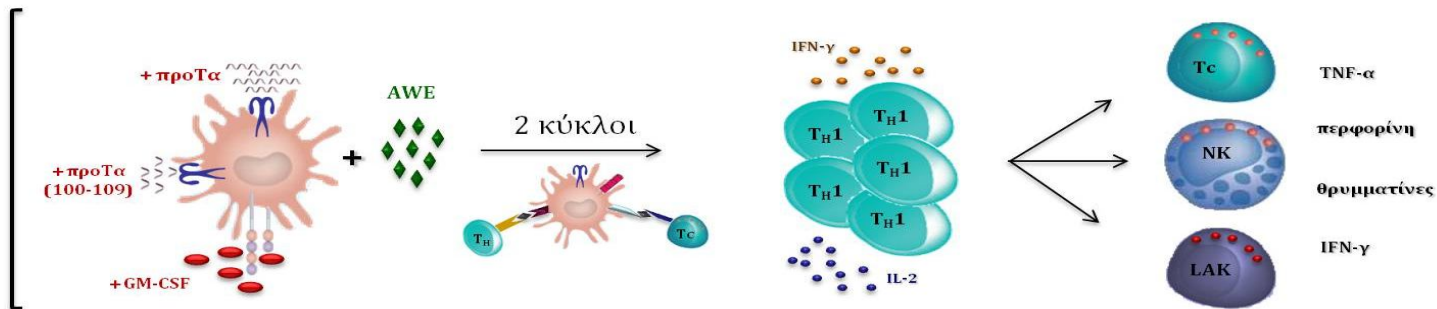
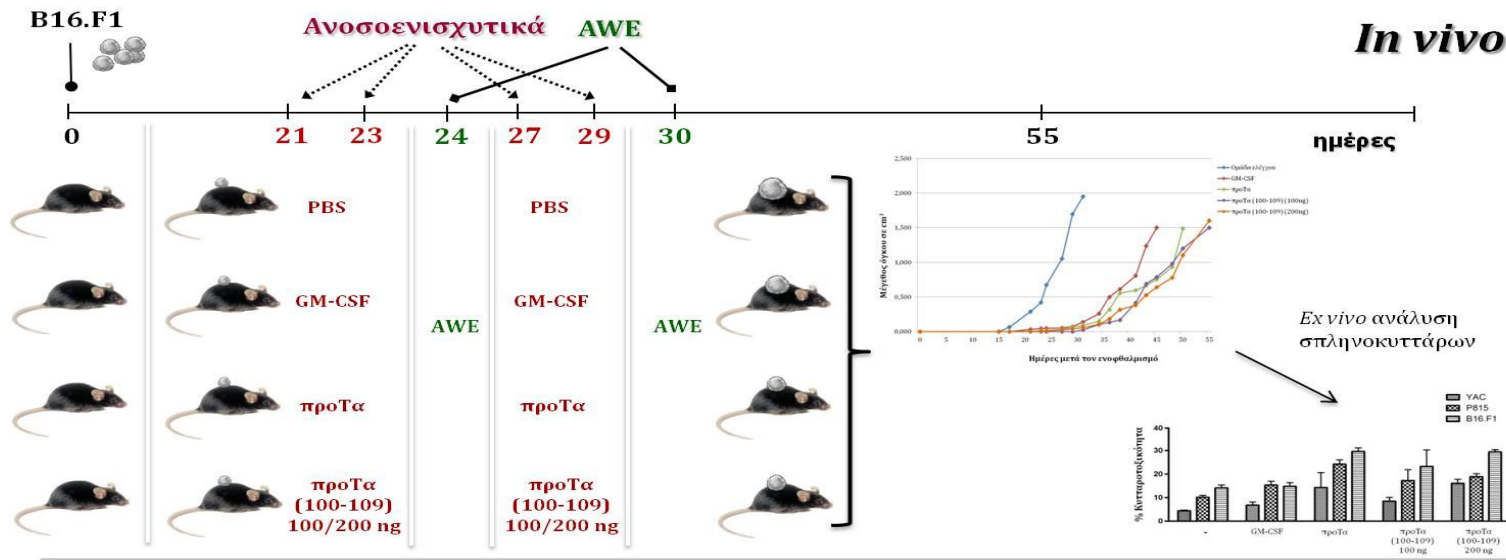
Στη συνέχεια, βασιζόμενοι σε μία ήδη δημοσιευμένη μελέτη (Baxevanis et al., 1995), διερευνήσαμε αν η σύγχρονη χορήγηση ανοσοθεραπευτικών παραγόντων και καρκινικών κυττάρων B16.F1 θα οδηγούσε νωρίς σε επαγωγή ογκοειδικών απαντήσεων από το ανοσοποιητικό σύστημα και συνεπώς σε ακόμα ηπιότερη ανάπτυξη του όγκου ή/και μεγαλύτερη παράταση της επιβίωσης των ζώων. Η σύγχρονη χορήγηση προΤα ή προΤα(100-109) και καρκινικών κυττάρων (σε συνδυασμό με το AWE) οδήγησε και πάλι σε παρατεταμένη επιβίωση και μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης του καρκινικού φορτίου, χωρίς να καταγραφούν ωστόσο αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων (**Εικόνα 3.16**). Πιθανά, αύξηση του αριθμού των κύκλων χορηγήσεων ή/και μείωση των χρονικών διαστημάτων μεταξύ των χορηγήσεων να οδηγούσε σε βελτίωση των αποτελεσμάτων. Τα σχετικά πειράματα είναι σε εξέλιξη.

Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, ότι η παρατηρούμενη ανάσχεση της εξάπλωσης του καρκίνου και στα δύο πρωτόκολλα χορηγήσεων ήταν αποτέλεσμα την *in vivo* έκπτυξης ογκοειδικών κυτταροτοξικών κλώνων, όπως επιβεβαιώθηκε από την *ex vivo* ανάλυση των σπληνοκυττάρων των πειραματόζων. Η ανοσοθεραπευτική χορήγηση της προΤα και του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε συνδυασμό με τα ογκοειδικά πεπτιδια-αντιγόνα που εμπεριέχονταν στο AWE οδήγησε στην επαγωγή ειδικών αντικαρκινικών

απαντήσεων, που μεσολαβούνται από ογκοειδικά κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (**Εικόνα 3.17**), επιβεβαιώνοντας την αντίστοιχη ικανότητα που είχαν επιδείξει τα δύο πεπτίδια *in vitro*. Παράλληλα, παρατηρήθηκε και σημαντική ενίσχυση της μη ειδικής κυτταροτοξικότητας, μεσολαβούμενης από NK και LAK κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά, μάλιστα, βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όπου η θεραπευτική χορήγηση της προΤα έχει αναφερθεί να οδηγεί στην κλωνική έκπτυξη ογκοειδικών βοηθητικών CD4<sup>+</sup> και κυτταροτοξικών CD8<sup>+</sup> Τ κυττάρων, αλλά και σε αυξημένα ποσοστά ενεργοποιημένων NK και LAK λεμφοκυττάρων (Baxevanis et al., 1994, Baxevanis et al., 1995).

Συνοψίζοντας τα μέχρι τώρα δεδομένα και σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές αναφορές, η προΤα είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων όπου, μέσω του κεντρικού της τμήματος, που δεν έχει μέχρι τώρα αναφερθεί να εκδηλώνει ανοσοδραστικότητα, εμπλέκεται σε ποικίλες ενδοκυτταρικές διαδικασίες, που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την απόπτωση (Karetsou et al., 2002, Jiang et al., 2003). Εξωκυτταρικά, η ίδια πρωτεΐνη παρουσιάζει πλειοτροπική δράση ενισχύοντας τις ανοσολογικές απαντήσεις (Ioannou et al., 2012). Στα πλαίσια της δράσης αυτής και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τόσο το ακέραιο μόριο της προΤα όσο και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) ωριμάζουν δενδριτικά κύτταρα διεγείροντας τον TLR-4, τα οποία παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και, παρουσία συγκεκριμένων αντιγονικών πεπτιδίων, είναι ικανά να διεγείρουν Τ κύτταρα μνήμης ή παρθένα και να επάγουν τη διαφοροποίησή τους σε T<sub>H</sub>1-βοηθητικά και T<sub>C</sub>1-κυτταροτοξικά Τ κύτταρα. Επιπλέον, όπως δείχθηκε στο πειραματικό μοντέλο μελανώματος, και τα δύο πεπτίδια χαρακτηρίζονται από *in vivo* ανοσοενισχυτική ικανότητα, καθώς η χορήγησή τους σε ποντίκια με υποδόριους όγκους μελανώματος οδήγησε σε παράταση της επιβίωσης των πειραματόζων και ανάσχεση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων τους, μέσω ενίσχυσης κυρίως των ογκοειδικών κυτταροτοξικών απαντήσεων (**Εικόνα 4.2**).

Αντίστοιχος διττός ρόλος, εντός και εκτός του κυττάρου έχει αναφερθεί και για ένα σύνολο πρωτεϊνών, γνωστών και ως «σήματα κινδύνου» (alarmins) ή DAMPS, με χαρακτηριστικά παραδείγματα συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των HSPs και την πρωτεΐνη HMGB1 (Butler and Overall, 2009, Bianchi, 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές



**Εικόνα 4.2.** Η προΤα και το προΤα(100-109) ενισχύουν τις κυτταρομεσολαβητικές απαντήσεις *in vivo*. Ζώα ενοφθαλμισμένα με μελανωματικά κύτταρα έλαβαν ανοσοενισχυτικά προΤα ή προΤα(100-109) σε συνδυασμό με ογκοειδικά αντιγόνα, σε δύο κύκλους και παρακολούθηθηκαν ως προς την ανάπτυξη των όγκων τους. Η *in vivo* χορήγηση των δύο πεπτιδίων ήταν ευεργετική, καθώς οδήγησε σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων και παράταση της επιβίωσης των πειραματόζωων, που οφείλονταν, όπως αποδείχθηκε με την *ex vivo* ανάλυση των σπληνοκυττάρων, στην ενίσχυση τόσο των ειδικών όσο και των μη ειδικών κυτταροτοξικών απαντήσεων. Υποθέτουμε, επομένως, πως τα δύο πεπτίδια επάγουν *in vivo* την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων των ζώων, τα οποία παρουσία των ογκοειδικών αντιγόνων του εκχυλίσματος AWE, ενεργοποιούν τα T<sub>H</sub> και T<sub>C</sub> κύτταρα. Επιπλέον, παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα T<sub>H</sub>1 κύτταρα, οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση και έκπτωση τόσο των ογκοειδικών T<sub>C</sub>1 κυτταροτοξικών κυττάρων, όσο και των μη ειδικών NK και LAK κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια παράγουν TNF-α, IFN-γ, περφορίνη και θρυμματίνες και μπορούν να λύουν επιτυχώς καρκινικά κύτταρα.

διαθέτουν ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο ενδοκυτταρικό ρόλο, τον οποίο ασκούν υπό φυσιολογικές συνθήκες, δρώντας ως πρωτεΐνες-συνοδοί και ως ρυθμιστές τις μεταγραφής, αντίστοιχα (Joly et al., 2010, Bianchi, 2007). Όμως, υπό συνθήκες κυτταρικού stress, οι πρωτεΐνες αυτές απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, μέσω μη κλασικών μονοπατιών έκκρισης, όπου δρουν ως μεσολαβητές της φλεγμονής ενισχύοντας τις ανοσολογικές απαντήσεις (Joly et al., 2010, Aguilera et al., 2011, Gauley and Pisetsky, 2009). Μάλιστα, η εξωκυτταρική τους δράση βασίζεται στην ενεργοποίηση TLRs, καθώς έχει αναφερθεί ότι οι HSP22, HSP60, HSP70 προσδέουν τον TLR-4 (Butler and Overall, 2009, Roelofs et al., 2006, Vabulas et al., 2001, Vabulas et al., 2002), ενώ η HMGB1 σηματοδοτεί μέσω των TLR-2, -4 και -9 (Park et al., 2004, Park et al., 2006, Yu et al., 2006, Tian et al., 2007). Καταρροϊκά των TLRs οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν και ωριμάζουν δενδριτικά κύτταρα *in vitro* και επάγουν ανοσοαπαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1, όταν χορηγούνται *in vivo* ως ανοσοενισχυτικά μόρια αντικαρκινικών εμβολίων (Messmer et al., 2004, Saenz et al., 2010, Wang et al., 2002, Wu et al., 2005).

Συνεπώς, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής που αποδίδουν στην προΤα έναν TLR-4-εξαρτώμενο εξωκυτταρικό ρόλο, μέσω του οποίου μπορεί να ωριμάζει δενδριτικά κύτταρα και να δρα ως ανοσοενισχυτικό μόριο *in vivo*, θα μπορούσαμε να προτείνουμε ότι η προΤα δρα ως «σήμα κινδύνου». Επιπλέον, σε αντιστοιχία με άλλα ανοσοδραστικά τμήματα τα οποία προέρχονται από την HMGB1 [Hr91; (Telusma et al., 2006)] ή την HSP70 [HSP70<sub>359-610</sub>, (Wang et al., 2002)] και σηματοδοτούν μέσω TLRs, το ανοσοδραστικό τμήμα της προΤα, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), είναι επίσης ικανό να δρα ενεργοποιώντας τον TLR-4 και να επάγει T<sub>H</sub>1-τύπου ανοσοαπαντήσεις. Ο εξωκυτταρικός ρόλος της προΤα ως «σήμα κινδύνου» έχει πλέον καταγραφεί, ενώ μέλη της οικογένειας των θυμοσινών έχουν ήδη προταθεί ότι διαθέτουν αντίστοιχο ρόλο (Bianchi, 2007).

Απαραίτητη προϋπόθεση για να δρα μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη ως DAMP είναι η εξωκυττάρωσή της υπό συνθήκες κυτταρικού θανάτου (Bianchi, 2007). Αντίστοιχα με την HMGB1, έχει αναφερθεί η εξωκυττάρωση της προΤα μέσω ενός μη κλασικού μονοπατιού, υπό συνθήκες νέκρωσης (Matsunaga and Ueda, 2010). Υπό αποπτωτικές συνθήκες, όμως, η προΤα είναι γνωστό ότι αποτελεί πρώιμο στόχο των κασπασών, αφού η απενεργοποίησή της είναι σημαντική για την αναστολή του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού και την πρόοδο της απόπτωσης (Evstafieva et al., 2000). Η πέψη από τις κασπάσες εντοπίζεται ειδικά στο καρβοξυτελικό της άκρο, όπου υπάρχει ένα επικαλυπτόμενο μοτίβο D-XX-D (όπου X οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο), με το κύριο σημείο πέψης του πολυπεπτιδίου να είναι στο D<sup>99</sup> (Enkemann et al., 2000b; Evstafieva et al., 2000). Αποτέλεσμα της πέψης είναι η δημιουργία δύο τμημάτων, του προΤα(1-99) και του προΤα(100-109). Το υπολειπόμενο πολυπεπτίδιο προΤα(1-99) χάνει την αλληλουχία NLS και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, όπου δε μπορεί πλέον να δράσει ως μεσολαβητής της απελίκωσης της χρωματίνης (Evstafieva et al., 2000; Evstafieva et al., 2003). Αυτό που αξίζει να σημειωθεί, είναι ότι σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν αναφέρεται η ανίχνευση του πεπτιδίου προΤα(100-109) στο κυτταρόπλασμα (Evstafieva et al., 2000). Υποθέτοντας ότι υπό συνθήκες απόπτωσης το δεκαπεπτίδιο πιθανά εξωκυτταρώνεται και δρα ως «σήμα κινδύνου», μία υπόθεση που θα μπορούσε να συνδέσει τους δύο διακριτούς ρόλους της προΤα, θέσαμε ως τελευταίο στόχο της διατριβής να διερευνήσουμε περαιτέρω την «τύχη» του πεπτιδίου προΤα(100-109) κατά την απόπτωση.

Δύο ενδεχόμενα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αδυναμία των παραπάνω μελετών να ανιχνεύσουν το δεκαπεπτίδιο στο κυτταρόπλασμα αποπτωτικών κυττάρων: (α) το πεπτίδιο προΤα(100-109) που παράγεται, να υπόκειται σε περαιτέρω πέψη από ενεργοποιημένες πεπτιδάσες με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμο, ή (β) να εξωκυτταρώνεται με έναν άγνωστο, ως τώρα μηχανισμό. Για τη διερεύνηση του πρώτου ενδεχομένου, συλλέξαμε υπερκείμενα αποπτωτικών κυττάρων HeLa στα οποία προστέθηκε εξωγενώς ποσότητα συνθετικού πεπτιδίου προΤα(100-109) και το δείγμα επώαστηκε για 18 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, με τη βοήθεια RP-HPLC και φασματομετρίας MALDI-ToF ανιχνεύθηκε κορυφή που αντιστοιχούσε στη θεωρητική μάζα του πεπτιδίου (**Εικόνα 3.19**), επιβεβαιώνοντας τη μη περαιτέρω θραυσματοποίησή του από εξωκυτταρικές πρωτεάσες που υπάρχουν στο υπερκείμενο αποπτωτικών κυττάρων, ακόμα και κάτω από συνθήκες που ευνοούν την εκδήλωση της δραστηότητάς τους. Πιθανά η ικανότητά του δεκαπεπτιδίου να πολυμερίζεται σε β-πτυχωτά φύλλα (Skopeliti et al., 2009), μία δομή ανθεκτική στην πρωτεόλυση (Lee et al., 2007), να μην επιτρέπει την περαιτέρω πέψη του υπό αποπτωτικές συνθήκες.

Έχοντας ανιχνεύσει το ακέραιο δεκαπεπτίδιο, όταν αυτό προστίθεται εξωγενώς σε αποπτωτικά υπερκείμενα σε πολλαπλάσιες των φυσιολογικά παραγόμενων



ποσοτήτων, θελήσαμε να εξετάσουμε αν το ενδογενές πεπτιδίο προΤα(100-109) που παράγεται κατά την απόπτωση των κυττάρων εξωκυτταρώνεται και μπορεί να ανιχνευτεί σε υπερκείμενα αποπτωτικών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας την ίδια αναλυτική προσέγγιση με τη βοήθεια RP-HPLC (**Εικόνα 3.21**) και MALDI-ToF (**Εικόνα 3.22**), κατέστη δυνατή η ανίχνευση κορυφής στο φασματογράφημα που αντιστοιχούσε στη θεωρητική μάζα του προΤα(100-109). Παρά το γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του δεκαπεπτιδίου για την πλήρη ταυτοποίηση του, τα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το προΤα(100-109) ήταν παρόν στο εξωκυττάριο μέσο των αποπτωτικών κυττάρων. Επιπλέον, η παραγωγή και εξωκυττάρωση του πεπτιδίου προΤα(100-109) δείχθηκε ότι είναι ειδική για τον συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού θανάτου, την απόπτωση, αφού δεν ανιχνεύθηκε κορυφή αντίστοιχης μοριακής μάζας στα φασματογραφήματα νεκρωτικών (**Εικόνα 3.24**) και ογκωτικών (**Εικόνα 3.26**) HeLa κυττάρων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα σκιαγραφείται ένας αντίστοιχος με την προΤα, ρόλος «σήματος κινδύνου» και για το προΤα(100-109) υπό συνθήκες απόπτωσης. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες αναφορές, κατά την απόπτωση δεν παρατηρείται εξωκυττάρωση του ακέραίου μορίου της προΤα, αλλά ούτε και του υπολειπόμενου προΤα(1-99). Αντίθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το προΤα(100-109) εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο, γεγονός που θα μπορούσε να δικαιολογηθεί και από το μικρότερο μέγεθος και από το ηπιότερο φορτίο του που του επιτρέπουν να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Περαιτέρω επιβεβαίωση της εξωκυτταρικής παρουσίας του προΤα(100-109) έγινε πρόσφατα στο εργαστήριό μας, με τη βοήθεια ειδικής και ευαίσθητης ανταγωνιστικού τύπου ανοσοδοκιμασίας ELISA, με την οποία ποσοτικοποιήθηκε το δεκαπεπτιδίο προΤα(100-109) στον ορό ποντικών μολυσμένων από βακτήρια (Samara et al., 2013b). Με τη συγκεκριμένη μελέτη, μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου προΤα(100-109) στον ορό συμπίπτει χρονικά με την αυξημένη κυτταρική απόπτωση που είναι γνωστό ότι επάγεται από παθογόνα βακτήρια (Timmer et al., 2009). Αν και δεν πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του αντιδρώντος προϊόντος, σύμφωνα με την *in silico* ανάλυση η αλληλουχία του δεκαπεπτιδίου είναι μοναδική και έτσι δεν είναι πιθανή η αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με άλλο παρόμοιο πεπτιδίο (Samara et al., 2013b). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι έχουν ήδη αναφερθεί αντίστοιχες προσεγγίσεις για

την ποσοτικοποίηση της HMGB1 σε βιολογικά υγρά και τη συσχέτιση των επιπέδων της με την πρόοδο διάφορων ασθενειών. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμες sandwich ELISA, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση της HMGB1 σε δείγματα ορού ή πλάσματος από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος (Wittwer et al., 2013), κακόηθες μεσοθηλίωμα (Tabata et al., 2013), ηπατίτιδα E (Majumdar et al., 2013) ή ελονοσία (Higgins et al., 2013) και οι υψηλές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της νόσου και με κακή πρόγνωση.

Συνοπτικά, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή με ήδη υπάρχοντα δεδομένα, προτείνουμε ένα μοντέλο δράσης της προΤα και του ανοσοδραστικού της δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) που συνάδει με τον πλειοτροπικό ανοσολογικό ρόλο της ακέραιας πρωτεΐνης και συνδέει τους δύο διακριτούς ρόλους της *in vivo*.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η προΤα εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου ρυθμίζει ενδοκυτταρικά πολλές σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η έκφραση γονιδίων (Eschenfeldt and Berger, 1986, Karetsou et al., 2002). Υπό μη φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα απαντώντας σε διάφορα ερεθίσματα οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση, διάφορα συστατικά του κυττάρου, ανάμεσα σε αυτά και η προΤα, απελευθερώνονται εξωκυτταρικά λόγω διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης. Εναλλακτικά, η προΤα μπορεί να εξωκυτταρωθεί και μέσω ενός μη κλασικού μονοπατιού έκκρισης, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Matsunaga and Ueda, 2010). Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης η προΤα μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου υπόκειται σε πέψη από τις κασπάσες 3 και 7, παράγοντας το ανοσοδραστικό πεπτίδιο προΤα(100-109) (Enkemann et al., 2000b; Evstafieva et al., 2000). Το δεκαπεπτίδιο αυτό στη συνέχεια εξωκυτταρώνεται και πολυμερίζεται σε β-πτυχωτά φύλλα (Skoreliti et al., 2009). Στον εξωκυττάριο χώρο, τόσο το ακέραιο μόριο όσο και το προΤα(100-109) διεγείρουν τον TLR-4 που εκφράζεται στην επιφάνεια κυττάρων της φυσικής ανοσίας και μέσω καταρροϊκών μονοπατιών που εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες MyD88 και TRIF (Mosoian et al., 2010), οδηγούν στην ενεργοποίησή τους. Αναλυτικότερα, η διέγερση του TLR-4 ενισχύει τη φαγοκυττάρωση και την παραγωγή TNF-α από τα μακροφάγα (Papanastasiou et al., 1992, Salvin et al., 1987), την παραγωγή οξειδωτικών ριζών και τη φαγοκυττάρωση των ουδετερόφιλων (Samara

et al., 2013a) και την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, η προΤα και το προΤα(100-109) αυξάνουν την έκφραση των MHC μορίων τάξης II και των συνδιεγερτικών μορίων (Baxevanis et al., 1992, Skopeliti et al., 2009), ενισχύοντας έτσι τη σύναψή τους με τα Τ κύτταρα (Skopeliti et al., 2007). Επιπλέον, επάγουν την παραγωγή κυρίως προφλεγμονωδών κυτταροκινών [IL-1β από τα μονοκύτταρα (Skopeliti et al., 2007) και IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα], με αποτέλεσμα την πόλωση των βοηθητικών Τ κυττάρων προς τύπου T<sub>H</sub>1 και των κυτταροτοξικών κυττάρων προς τύπου T<sub>C</sub>1. Τα βοηθητικά T<sub>H</sub>1 κύτταρα, παράγουν στη συνέχεια προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IFN-γ, TNF-α, IL-2), παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο τις ιδανικές συνθήκες για την ενίσχυση τόσο των ειδικών, όσο και των μη ειδικών κυτταροτοξικών απαντήσεων. Κατά συνέπεια, τα αντιγονοειδικά κυτταροτοξικά Τ κύτταρα και τα NK κύτταρα: α) παράγουν σε αυξημένα επίπεδα περφορίνη, η οποία απελευθερούμενη πολυμερίζεται στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων-στόχων προκαλώντας τη διάτρηση και το θάνατό τους (Trapani and Smyth, 2002), β) υπερεκφράζουν μόρια-προσκόλλησης (π.χ. CD2) για τη σταθερότερη αλληλεπίδραση τους με τα κύτταρα-στόχους (Skopeliti et al., 2007) και γ) εκκρίνουν κυτταροκίνες (TNF-α, IFN-γ) για την περαιτέρω ενίσχυση των ανοσολογικών απαντήσεων.

### **Τελικά συμπεράσματα**

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής οδήγησαν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

Η προΤα και το ανοσοδραστικό της τμήμα προΤα(100-109):

- σηματοδοτούν μέσω του TLR-4 και των μονοπατιών καταρροϊκά αυτού σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα,
- επάγουν *in vitro* την ωρίμανση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων, τα οποία: **α)** υπερεκφράζουν τα χαρακτηριστικά μόρια-δείκτες των δενδριτικών κυττάρων (HLA-DR, CD80, CD83, CD86), **β)** παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-12, TNF-α) και **γ)** επάγουν ογκοειδικές

ανοσολογικές απαντήσεις, οι οποίες μεσολαβούνται από T<sub>H</sub>1 βοηθητικά και T<sub>C</sub>1 κυτταροτοξικά T κύτταρα,

- διαθέτουν *in vivo* αντικαρκινική δραστηριότητα όταν χορηγούνται σε συνδυασμό με ογκοειδικά αντιγόνα, επάγοντας, κυρίως, ογκοειδικές T κυτταροτοξικές απαντήσεις, και
- απελευθερώνονται *in vivo* στον εξωκυττάριο χώρο υπό συνθήκες κυτταρικού θανάτου, όπου δρουν πιθανά ως «σήματα κινδύνου», επάγοντας και ενισχύοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις.

### **Μελλοντικοί στόχοι**

Μελλοντικά, ως συνέχεια των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής, θα προτείνουμε τους παρακάτω ερευνητικούς στόχους:

- τη διερεύνηση της ικανότητας της προΤα και του προΤα να επάγουν *in vivo* την ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων ποντικού, για την επιβεβαίωση της παρατηρηθείσας *in vitro* δραστηριότητάς τους και σταδιακά, της πιθανής τους χρήσης ως ανοσοενισχυτικά μόρια στα πλαίσια αντικαρκινικών εμβολίων που βασίζονται σε δενδριτικά κύτταρα,
- την ανίχνευση του πεπτιδίου προΤα(100-109) σε ανθρώπινα δείγματα ορού από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με σκοπό την επιβεβαίωση της δράσης του προΤα(100-109) ως «σήματος κινδύνου», και
- τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της προΤα και του προΤα(100-109) με τον TLR-4 με τη βοήθεια ανοσοκατακρήμνισης ή/και κρυσταλλογραφίας για την πλήρη ταυτοποίηση του TLR-4 ως του υποδοχέα που μεσολαβεί τη δράση των δύο πεπτιδίων.

# 5

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



- Adams M, Navabi H, Jasani B, Man S, Fiander A, Evans AS, Donninger C, Mason M. Dendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]:poly [C(12)U] (Ampligen R). *Vaccine* 2003; 21:787-90.
- Adams S, O'Neill DW, Nonaka D, Hardin E, Chiriboga L, Siu K, Cruz CM, Angiulli A, Angiulli F, Ritter E, Holman RM, Shapiro RL, Berman RS, Berner N, Shao Y, Manches O, Pan L, Venhaus RR, Hoffman EW, Jungbluth A, Gnjatich S, Old L, Pavlick AC, Bhardwaj N. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J Immunol* 2008; 181:776-84.
- Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D, Pereda C, Hevia D, García T, Salazar L, Ferreira A, Hermoso M, Mendoza-Naranjo A, Ferrada C, Garrido P, López MN, Salazar-Onfray F. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17:2474-83.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
- Akiyama Y, Oshita C, Kume A, Iizuka A, Miyata H, Komiyama M, Ashizawa T, Yagoto M, Abe Y, Mitsuya K, Watanabe R, Sugino T, Yamaguchi K, Nakasu Y.  $\alpha$ -type-1 polarized dendritic cell-based vaccination in recurrent high-grade glioma: a phase I clinical trial. *BMC Cancer* 2012; 12:623.
- Aksoy E, Taboubi S, Torres D, Delbauve S, Hachani A, Whitehead MA, Pearce WP, Berenjano-Martin I, Nock G, Filloux A, Beyaert R, Flamand V, Vanhaesebroeck B. The p110 $\delta$  isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol* 2013; 14:877.
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1755-66.
- Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 2007; 204:2473-85.
- Alvarez CV, Zalvide JB, Cancio E, Dieguez C, Regueiro BJ, Vega FV, Dominguez F. Regulation of prothymosin alpha mRNA levels in rat pituitary tumor cells. *Neuroendocrinology* 1993; 57:1048-56.
- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 791-8.

- Apostolopoulos V, Pietersz GA, Tsibanis A, Tsikkinis A, Drakaki H, Loveland BE, Piddlesden SJ, Plebanski M, Pouniotis DS, Alexis MN, McKenzie IF, Vassilaros S. Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]. *Breast Cancer Res* 2006; 8:R27.
- Baras B, Bouveret N, Devaster JM, Fries L, Gillard P, Sanger R, Hanon E. A vaccine manufacturer's approach to address medical needs related to seasonal and pandemic influenza viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 2008; 2:251-60.
- Baxevanis CN, Frillingos S, Seferiadis K, Reclos GJ, Arsenis P, Katsiyiannis A, Anastasopoulos E, Tsolas O, Papamichail M. Enhancement of human T lymphocyte function by prothymosin alpha: increased production of interleukin-2 and expression of interleukin-2 receptors in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1990a; 12:595-617.
- Baxevanis CN, Sfagos C, Anastasopoulos E, Reclos GJ, Papamichail M. Prothymosin-alpha enhances HLA-DR antigen expression on monocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1990b; 27:141-7.
- Baxevanis CN, Thanos D, Reclos GJ, Anastasopoulos E, Tsokos GC, Papamatheakis J, Papamichail M. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J Immunol* 1992; 148:1979-84.
- Baxevanis CN, Reclos GJ, Papamichail M. Prothymosin alpha restores depressed allogeneic cell-mediated lympholysis and natural-killer-cell activity in patients with cancer. *Int J Cancer* 1993; 53:264-8.
- Baxevanis CN, Gritzapis AD, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Tsolas O, Papamichail M. Induction of lymphokine-activated killer activity in mice by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38:281-6.
- Baxevanis CN, Gritzapis AD, Spanakos G, Tsitsilonis OE, Papamichail M. Induction of tumor-specific T lymphocyte responses in vivo by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40:410-8.
- Baxevanis CN, Spanakos G, Voutsas IF, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Mamalaki A, Papamichail M. Increased generation of autologous tumor-reactive lymphocytes by anti-CD3 monoclonal antibody and prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48:71-84.
- Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 2000; 164:3902-12.
- Baxevanis CN, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Katsoulas HL, Papamichail M. HER-2/neu-derived peptide epitopes are also recognized by cytotoxic CD3(+)/CD56(+) (natural killer T) lymphocytes. *Int J Cancer* 2002; 98:864-72.



- Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE. Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. *Immunotherapy* 2013; 5:497-511.
- Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002; 23: 509-12.
- Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:595-602.
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81:1-5.
- Bihl F, Salez L, Beaubier M, Torres D, Larivière L, Laroche L, Benedetto A, Martel D, Lapointe JM, Ryffel B, Malo D. Overexpression of Toll-like receptor 4 amplifies the host response to lipopolysaccharide and provides a survival advantage in transgenic mice. *J Immunol* 2003; 170:6141-50.
- Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10:499-511.
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:175-208.
- Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006; 102:10-5.
- Bryan JT. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine* 2007; 25:3001-6.
- Brody JD, Ai WZ, Czerwinski DK, Torchia JA, Levy M, Advani RH, Kim YH, Hoppe RT, Knox SJ, Shin LK, Wapnir I, Tibshirani RJ, Levy R. In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *J Clin Oncol* 2010; 28:4324-32.
- Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* 2009; 32:1-11.
- Burgdorf SK, Fischer A, Myschetzky PS, Munksgaard SB, Zocca MB, Claesson MH, Rosenberg J. Clinical responses in patients with advanced colorectal cancer to a dendritic cell based vaccine. *Oncol Rep* 2008; 20:1305-11.
- Bustelo XR, Otero A, Gómez-Márquez J, Freire M. Expression of the rat prothymosin alpha gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration. *J Biol Chem* 1991; 266:1443-7.
- Butler GS, Overall CM: Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:935-48.
- Cannavo A, Rengo G, Liccardo D, Pironti G, Scimia MC, Scudiero L, De Lucia C, Ferrone M, Leosco D, Zambrano N, Koch WJ, Trimarco B, Esposito G. Prothymosin alpha protects cardiomyocytes against ischemia-induced apoptosis via preservation of Akt activation. *Apoptosis*. 2013 Jul 16. [Epub ahead of print]

- Carey KA, Segal D, Klein R, Sanigorski A, Walder K, Collier GR, Cameron-Smith D. Identification of novel genes expressed during rhabdomyosarcoma differentiation using cDNA microarrays. *Pathol Int* 2006; 56:246-55.
- Chang DZ, Lomazow W, Joy Somberg C, Stan R, Perales MA. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: an adjuvant for cancer vaccines. *Hematology* 2004; 9:207-15.
- Cheever MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev* 2008; 222:357-68.
- Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 2011; 17:3520-6.
- Chin AI, Miyahira AK, Covarrubias A, Teague J, Guo B, Dempsey PW, Cheng G. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res* 2010; 70:2595-603.
- Cluff CW. Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results. *Adv Exp Med Biol* 2010; 667:111-23.
- Cordero OJ, Sarandeses CS, López JL, Cancio E, Regueiro BJ, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances interleukin 2 receptor expression in normal human T-lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13:1059-65.
- Cordero OJ, Sarandeses CS, López JL, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 1992; 11:277-85.
- Cordero OJ, Sarandeses C, Nogueira M. Prothymosin alpha receptors on peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett* 1994; 341:23-7.
- Cordero OJ, Sarandeses C, Nogueira M. Prothymosin alpha receptors on lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15:731-7.
- Cordero OJ, Sarandeses CS, Nogueira M. Binding of 125I-prothymosin alpha to lymphoblasts through the non-thymosin alpha 1 sequence. *Life Sci* 1996; 58:1757-70.
- Costopoulou D, Leondiadis L, Czarnecki J, Ferderigos N, Ithakissios DS, Livaniou E, Evangelatos GP. Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J Immunoassay* 1998; 19:295-316.
- Cranmer LD, Trevor KT, Hersh EM. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:275-306.
- Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 1994; 152:2675-85.
- Dang Y, Wagner WM, Gad E, Rastetter L, Berger CM, Holt GE, Disis ML. Dendritic cell-activating vaccine adjuvants differ in the ability to elicit antitumor immunity due to

- an adjuvant-specific induction of immunosuppressive cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18:3122-31.
- Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 2007; 13:843-50.
- Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, Clerici M, Greco M, Villa ML. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89:1463-72.
- Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, Kielland A, Vosters O, Vanderheyde N, Schiavetti F, Larocque D, Van Mechelen M, Garçon N. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 2009; 183:6186-97.
- Dominguez F, Magdalena C, Cancio E, Roson E, Paredes J, Loidi L, Zalvide J, Fraga M, Forteza J, Regueiro BJ, et al. Tissue concentrations of prothymosin alpha: a novel proliferation index of primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A:893-7.
- Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005; 35:2184-90.
- Eckert K, Garbin F, Maurer HR, Büttner P, Garbe C, Czarnecki J. Prothymosin alpha 1 modulates lymphokine-activated killer cell activity and IL-2 production by peripheral blood lymphocytes from melanoma patients in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17:555-61.
- Eckert K, Grünberg E, Immenschuh P, Garbin F, Kreuser ED, Maurer HR. Interleukin-2-activated killer cell activity in colorectal tumor patients: evaluation of in vitro effects by prothymosin alpha1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997a; 123:420-8.
- Eckert K, Grünberg E, Garbin F, Maurer HR. Preclinical studies with prothymosin alpha1 on mononuclear cells from tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997b; 19:493-500.
- Eilers M, Schirm S, Bishop JM. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 1991; 10:133-41.
- Eklund JW, Kuzel TM. Interleukin-2 in the treatment of renal cell carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Treat Res* 2005; 126:263-87.
- Enkemann SA, Ward RD, Berger SL. Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of prothymosin-alpha. *J Histochem Cytochem* 2000a; 48:1341-55.

- Enkemann SA, Wang RH, Trumbore MW, Berger SL. Functional discontinuities in prothymosin alpha caused by caspase cleavage in apoptotic cells. *J Cell Physiol* 2000b; 182:256-68.
- Eschenfeldt WH, Berger SL. The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:9403-7.
- Escobar A, López M, Serrano A, Ramirez M, Pérez C, Aguirre A, González R, Alfaro J, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:555-68.
- Eubank TD, Roberts RD, Khan M, Curry JM, Nuovo GJ, Kuppusamy P, Marsh CB. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. *Cancer Res* 2009; 69:2133-40.
- Evstafieva AG, Belov GA, Kalkum M, Chichkova NV, Bogdanov AA, Agol VI, Vartapetian AB. Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett* 2000; 467:150-4.
- Evstafieva AG, Belov GA, Rubtsov YP, Kalkum M, Joseph B, Chichkova NV, Sukhacheva EA, Bogdanov AA, Pettersson RF, Agol VI, Vartapetian AB. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res* 2003; 284:211-23.
- Feyerabend S, Stevanovic S, Gouttefangeas C, Wernet D, Hennenlotter J, Bedke J, Dietz K, Pascolo S, Kuczyk M, Rammensee HG, Stenzl A. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *Prostate* 2009; 69:917-27.
- Fontenot AP, Gharavi L, Bennett SR, Canavera SJ, Newman LS, Kotzin BL. CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4+ T cells. *J Clin Invest* 2003; 112:776-84.
- Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2007 Aug;Chapter 6:Unit 6.24.
- Fraga M, García-Caballero T, Domínguez F, Pérez-Becerra E, Beiras A, Forteza J. Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423:449-52.
- Fujii S, Takayama T, Asakura M, Aki K, Fujimoto K, Shimizu K. Dendritic cell-based cancer immunotherapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009; 57:189-98.
- Galli G, Medini D, Borgogni E, Zedda L, Bardelli M, Malzone C, Nuti S, Tavarini S, Sammicheli C, Hilbert AK, Brauer V, Banzhoff A, Rappuoli R, Del Giudice G, Castellino F. Adjuvanted H5N1vaccine induces early CD4+T cell response that predicts long-

- term persistence of protective antibody levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:3877–82.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautès-Fridman C, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012; 1:1111-34.
- Garbin F, Eckert K, Büttner P, Garbe C, Maurer HR. Prothymosin alpha augments deficient antitumor activity of monocytes from melanoma patients in vitro. *Anticancer Res* 1994; 14:2405-11.
- Garbin F, Eckert K, Immenschuh P, Kreuser ED, Maurer HR. Prothymosin alpha 1 effects, in vitro, on the antitumor activity and cytokine production of blood monocytes from colorectal tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19:323-32.
- Gast K, Damaschun H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR, Müller-Frohne M, Zirwer D, Czarnecki J, Damaschun G. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry* 1995; 34:13211-8.
- Gast K, Zirwer D, Damaschun G. Are there temperature-dependent structural transitions in the "intrinsically unstructured" protein prothymosin alpha? *Eur Biophys J* 2003; 31:586-94.
- Gates JD, Carmichael MG, Benavides LC, Holmes JP, Hueman MT, Woll MM, Ioannides CG, Robson CH, McLeod DG, Ponniah S, Peoples GE. Longterm followup assessment of a HER2/neu peptide (E75) vaccine for prevention of recurrence in high-risk prostate cancer patients. *J Am Coll Surg* 2009; 208:193-201.
- Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethé B, Bresseur F, Boon T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179:921-30.
- Gauley J, Pisetsky DS. The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity* 2009; 42:299-301.
- Georgaki S, Skopeliti M, Tsiatas M, Nicolaou KA, Ioannou K, Husband A, Bamias A, Dimopoulos MA, Constantinou AI, Tsitsilonis OE. Phenoxodiol, an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2009; 13:3929-38.
- Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, Fourneau MA, Colau B, Suzich J, Losonksy G, Martin MT, Dubin G, Wettendorff MA. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006; 24:5937-49.
- Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007; 117:1195-203.
- Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Targeted Oncology* 2012; 7:29-54.

- Goldstein AL. History of the discovery of the thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1112:1-13.
- Gritzapis AD, Perez SA, Baxevanis CN, Papamichail M. Pooled peptides from HER-2/neu-overexpressing primary ovarian tumours induce CTL with potent antitumour responses in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2005; 92:72-9.
- Haining WN, Davies J, Kanzler H, Drury L, Brenn T, Evans J, Angelosanto J, Rivoli S, Russell K, George S, Sims P, Neuberger D, Li X, Kutok J, Morgan J, Wen P, Demetri G, Coffman RL, Nadler LM. CpG oligodeoxynucleotides alter lymphocyte and dendritic cell trafficking in humans. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5626-34.
- Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H. Novel neuroprotective action of prothymosin  $\alpha$ -derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem* 2013a; 125:713-23.
- Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H. Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides* 2013b; 43:68-75.
- Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:1607-12.
- Hannappel E, Huff T. The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: structure and function. *Vitam Horm* 2003; 66:257-96.
- Hansen M, Hjortø GM, Donia M, Met Ö, Larsen NB, Andersen MH, thor Straten P, Svane IM. Comparison of clinical grade type 1 polarized and standard matured dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2013; 31:639-46.
- Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984a; 81:1008-11.
- Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984b; 81:1391-3.
- Haritos AA. Alpha-thymosins: relationships in structure, distribution, and function. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1987; 14:123-52.
- Heidecke H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR. Prothymosin alpha 1 effects in vitro on chemotaxis, cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19:413-20.
- Higgins SJ, Xing K, Kim H, Kain DC, Wang F, Dhabangi A, Musoke C, Cserti-Gazdewich CM, Tracey KJ, Kain KC, Liles WC. Systemic release of high mobility group box 1 (HMGB1) protein is associated with severe and fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* 2013; 12:105.

- Hiramatsu H, Goto Y, Naiki H, Kitagawa T. Structural model of the amyloid fibril formed by beta(2)-microglobulin #21-31 fragment based on vibrational spectroscopy. *J Am Chem Soc* 2005; 127:7988-9.
- Hovden AO, Karlsen M, Jonsson R, Appel S. The bacterial preparation OK432 induces IL-12p70 secretion in human dendritic cells in a TLR3 dependent manner. *PLoS One* 2012; 7:e31217.
- Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* 2013; 4:82.
- Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 2006; 25:683-92.
- Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H, Yamamoto M, Kurotaki T, Tsuruma T, Asanuma H, Kanaseki T, Ikeda H, Kashiwagi K, Okazaki M, Sasaki K, Sato T, Ohmura T, Hata F, Yamaguchi K, Hirata K, Sato N. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1474-82.
- Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 3:Unit 3.7.
- Ioannou K, Samara P, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:599-614.
- Jäger E, Höhn H, Necker A, Förster R, Karbach J, Freitag K, Neukirch C, Castelli C, Salter RD, Knuth A, Maeurer MJ. Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *Int J Cancer* 2002; 98:376-88.
- Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Saebøe-Larsen S, Kvalheim G, Gaudernack G. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer* 2007; 7:119.
- Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 2003; 299:223-6.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105:4120-6.
- Jin Y, Cao C, Li P, Liu X, Huang W, Li C, Ma Q. Boosting immune response to hepatitis B DNA vaccine by coadministration of Prothymosin alpha-expressing plasmid. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12:1364-9.

- Johnston D, el Rouby S, Bystryn JC. Identification of melanoma cell surface antigens immunogenic in mice. *Cancer Biother* 1994; 9:29-38.
- Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010; 2:238-47.
- Jou YC, Tung CL, Tsai YS, Shen CH, Syue-Yi C, Shiau AL, Tsai HT, Wu CL, Tzai TS. Prognostic relevance of prothymosin-alpha expression in human upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2009; 74:951-7.
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 2008; 9:361-8.
- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 1999; 162:3231-6.
- Kalinski P, Edington H, Zeh HJ, Okada H, Butterfield LH, Kirkwood JM, Bartlett DL. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines or autologous transplants? *Immunol Res* 2011; 50:235-47.
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF; IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:411-22.
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; 13:552-9.
- Kapsenberg ML: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:984-93.
- Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE, Vartapetian AB. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1089-99.
- Karbach J, Gnjatic S, Bender A, Neumann A, Weidmann E, Yuan J, Ferrara CA, Hoffmann E, Old LJ, Altorki NK, Jäger E. Tumor-reactive CD8+ T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and Montanide ISA-51: association with survival. *Int J Cancer* 2010; 126:909-18.
- Karetsou Z, Kretsovali A, Murphy C, Tsolas O, Papamarcaki T. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep* 2002; 3:361-6.
- Kashat L, So AK, Masui O, Wang XS, Cao J, Meng X, Macmillan C, Ailles LE, Siu KW, Ralhan R, Walfish PG. Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res* 2010; 9:5757-69.



- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:373-84.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:3515-9.
- Khan H, Cino EA, Brickenden A, Fan J, Yang D, Choy WY. Fuzzy complex formation between the intrinsically disordered prothymosin  $\alpha$  and the Kelch domain of Keap1 involved in the oxidative stress response. *J Mol Biol* 2013; 425:1011-27.
- Khoo S, Ponniah S, Peoples GE. HER2/neu vaccines in breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)* 2006; 2:217-23.
- Kis-Toth K, Bacskai I, Gogolak P, Mazlo A, Szatmari I, Rajnavolgyi E. Monocyte-derived dendritic cell subpopulations use different types of matrix metalloproteinases inhibited by GM6001. *Immunobiology* 2013. doi:pii: S0171-2985(13)00125-3. 10.1016/j.imbio.2013.06.012. [Epub ahead of print]
- Kreutz M, Tacke PJ, Figdor CG. Targeting dendritic cells--why bother? *Blood* 2013; 121:2836-44.
- Lacy MQ, Mandrekar S, Dispenzieri A, Hayman S, Kumar S, Buadi F, Dingli D, Litzow M, Wettstein P, Padley D, Kabat B, Gastineau D, Rajkumar SV, Gertz MA. Idiotype-pulsed antigen-presenting cells following autologous transplantation for multiple myeloma may be associated with prolonged survival. *Am J Hematol* 2009; 84:799-802.
- Lachmann R, Bajwa M, Vita S, Smith H, Cheek E, Akbar A, Kern F. Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. *J Virol* 2012; 86:1001-9.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000; 1:311-6.
- Lee WC, Wang HC, Hung CF, Huang PF, Lia CR, Chen MF. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother* 2005; 28:496-504.
- Lee S, Fernandez EJ, Good TA. Role of aggregation conditions in structure, stability, and toxicity of intermediates in the Abeta fibril formation pathway. *Protein Sci* 2007; 16:723-32.
- Lee LY, Ha do LA, Simmons C, de Jong MD, Chau NV, Schumacher R, Peng YC, McMichael AJ, Farrar JJ, Smith GL, Townsend AR, Askonas BA, Rowland-Jones S, Dong T. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest* 2008; 118:3478-90.

- Letsas KP, Frangou-Lazaridis M, Skyrilas A, Tsatsoulis A, Malamou-Mitsi V. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Int* 2005; 55:694-702.
- Letsas KP, Vartholomatos G, Tsepi C, Tsatsoulis A, Frangou-Lazaridis M. Fine-needle aspiration biopsy-RT-PCR expression analysis of prothymosin alpha and parathymosin in thyroid: novel proliferation markers? *Neoplasma* 2007; 54:57-62.
- Leys CM, Nomura S, LaFleur BJ, Ferrone S, Kaminishi M, Montgomery E, Goldenring JR. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery* 2007; 141: 41-50.
- Lichtenegger FS, Mueller K, Otte B, Beck B, Hiddemann W, Schendel DJ, Subklewe M. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells. *PLoS One* 2012; 7:e44266.
- Lim JB, Kim HO, Jeong SH, Ha JE, Jang S, Lee SG, Lee K, Stroncek D. Identification of HLA-A\*2402-restricted HCMV immediate early-1 (IE-1) epitopes as targets for CD8+ HCMV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Transl Med* 2009; 7:72.
- López-Rodríguez JL, Cordero OJ, Sarandeses C, Viñuela J, Nogueira M. Interleukin-2 killer cells: in vitro evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13:175-82.
- Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P.  $\alpha$ -type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004; 64:5934-7.
- Magdalena C, Dominguez F, Loidi L, Puente JL. Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 82:584-90.
- Majumdar M, Ratho R, Chawla Y, Singh MP. High levels of circulating HMGB1 as a biomarker of acute liver failure in patients with viral hepatitis E. *Liver Int* 2013. doi: 10.1111/liv.12197. (Epub ahead of print).
- Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, Berger SL. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem* 1991; 266:3916-24.
- Markova OV, Evstafieva AG, Mansurova SE, Moussine SS, Palamarchuk LA, Pereverzev MO, Vartapetian AB, Skulachev VP. Cytochrome c is transformed from anti- to pro-oxidant when interacting with truncated oncoprotein prothymosin alpha. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1557:109-17.
- Matsunaga H, Ueda H. Stress-induced non-vesicular release of prothymosin- $\alpha$  initiated by an interaction with S100A13, and its blockade by caspase-3 cleavage. *Cell Death Differ* 2010; 17:1760-72.
- McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:20-7.

- McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, Greenberg PD, Riddell SR. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 1994; 43:103-10.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* 2006; 281:24756-68.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.
- Mehrotra S, Stevens R, Zengou R, Chakraborty NG, Butterfield LH, Economou JS, Dorsky DI, Mukherji B. Regulation of melanoma epitope-specific cytolytic T lymphocyte response by immature and activated dendritic cells, in vitro. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5607-14.
- Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ, Chiorazzi N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004; 173: 307-13.
- Mittendorf EA, Peoples GE, Singletary SE. Breast cancer vaccines: promise for the future or pipe dream? *Cancer* 2007; 110:1677-86.
- Mittendorf EA, Holmes JP, Ponniah S, Peoples GE. The E75 HER2/neu peptide vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:1511-21.
- Mittendorf EA, Clifton GT, Holmes JP, Clive KS, Patil R, Benavides LC, Gates JD, Sears AK, Stojadinovic A, Ponniah S, Peoples GE. Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer* 2012; 118:2594-602.
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:240-73.
- Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT, Colvin BL, Logar AJ, Takayama T, Falo LD, Thomson AW. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 2001; 98:1512-23.
- Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, Jessup JM, Steele GD Jr, Chen LB. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene* 1993; 8:2821-6.
- Mosoian A, Teixeira A, High AA, Christian RE, Hunt DF, Shabanowitz J, Liu X, Klotman M. Novel function of prothymosin alpha as a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary macrophages. *J Virol* 2006; 80:9200-6.

- Mosoian A, Teixeira A, Burns CS, Sander LE, Gusella GL, He C, Blander JM, Klotman P, Klotman ME. Prothymosin- $\alpha$  inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:10178-83.
- Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn JR, Kurtzman SK, Ergin MT, Ozols J, Meehan J, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8078-82.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3:667-72.
- Nagata A, Takezako N, Tamemoto H, Ohto-Ozaki H, Ohta S, Tominaga S, Yanagisawa K. Soluble ST2 protein inhibits LPS stimulation on monocyte-derived dendritic cells. *Cell Mol Immunol* 2012; 9:399-409.
- Navabi H, Jasani B, Reece A, Clayton A, Tabi Z, Donninger C, Mason M, Adams M. A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. *Vaccine*. 2009; 27:107-15.
- Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:163-9.
- Nierkens S, den Brok MH, Garcia Z, Togher S, Wagenaars J, Wassink M, Boon L, Ruers TJ, Figdor CG, Schoenberger SP, Adema GJ, Janssen EM. Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res* 2011; 71:6428-37.
- Niture SK, Jaiswal AK. Prothymosin- $\alpha$  mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* 2009; 284:13856-68.
- Ojima E, Inoue Y, Miki C, Mori M, Kusunoki M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *J Gastroenterol* 2007; 42:730-6.
- Ott G, Barchfeld GL, Van NG. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine* 1995; 13:1557-62.
- Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000; 243:107-24.
- Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother* 2008; 31:793-805.
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med* 2011; 269:64-73.

- Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S, Salvin SB, Horecker BL. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986; 250:197-201.
- Panneerselvam C, Haritos AA, Caldarella J, Horecker BL. Prothymosin alpha in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:4465-9.
- Papamarcaki T, Tsolas O. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett* 1994; 345:71-5.
- Papanastasiou M, Baxevanis CN, Papamichail M. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment: I. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35:145-50.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004 279:7370-7.
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C917-24.
- Pavlov NA, Cherny DI, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Amyloid fibrils from the mammalian protein prothymosin alpha. *FEBS Lett* 2002; 517:37-40.
- Pawlikowski M, Winczyk K. Immunohistochemical detection of prothymosin alpha in pituitary adenomas--a new marker of tumor recurrence? *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47:559-62.
- Perroud MW Jr, Honma HN, Barbeiro AS, Gilli SC, Almeida MT, Vassallo J, Saad ST, Zambon L. Mature autologous dendritic cell vaccines in advanced non-small cell lung cancer: a phase I pilot study. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30:65.
- Peoples GE, Gurney JM, Hueman MT, Woll MM, Ryan GB, Storrer CE, Fisher C, Shriver CD, Ioannides CG, Ponniah S. Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23:7536-45.
- Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC, Restifo NP, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother* 2003; 26:349-56.
- Piacentini M, Evangelisti C, Mastroberardino PG, Nardacci R, Kroemer G. Does prothymosin-alpha act as molecular switch between apoptosis and autophagy? *Cell Death Differ* 2003; 10:937-9.

- Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides* 2000; 21:1433-46.
- Piñeiro A, Begoña Bugia M, Pilar Arias M, Cordero OJ, Nogueira M. Identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes. *Biol Chem* 2001; 382:1473-82.
- Prado-Garcia H, Romero-Garcia S, Aguilar-Cazares D, Meneses-Flores M, Lopez-Gonzalez JS. Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012:741741.
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, Asher TE, Douek DC, Harari A, Pantaleo G, Bailer R, Graham BS, Roederer M, Koup RA. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 2007; 204:1405-16.
- Qi X, Wang L, Du F. Novel small molecules relieve prothymosin alpha-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 2010; 49:1923-30.
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009; 30:23-32.
- Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* 2003; 21:873-86.
- Robbins PF: Tumor associated antigens. In *Analyzing T cell responses*. Edited by Nagorsen D, Marincola FM. Netherlands: Springer; 2005:9-42.
- Roda JM, Wang Y, Sumner LA, Phillips GS, Marsh CB, Eubank TD. Stabilization of HIF-2 $\alpha$  induces sVEGFR-1 production from tumor-associated macrophages and decreases tumor growth in a murine melanoma model. *J Immunol* 2012; 189:3168-77.
- Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006; 176:7021-7.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10:909-15.
- Rubio V, Stuge TB, Singh N, Betts MR, Weber JS, Roederer M, Lee PP. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 2003; 9:1377-82.
- Sabroe I, Dower SK, Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 7:S421-6.
- Saenz R, Souza Cda S, Huang CT, Larsson M, Esener S, Messmer D. HMGB1-derived peptide acts as adjuvant inducing immune responses to peptide and protein antigen. *Vaccine* 2010; 28:7556-62.

- Salazar LG, Fikes J, Southwood S, Ishioka G, Knutson KL, Gooley TA, Schiffman K, Disis ML. Immunization of cancer patients with HER-2/neu-derived peptides demonstrating high-affinity binding to multiple class II alleles. *Clin Cancer Res* 2003; 9:5559-65.
- Salgado FJ, Piñeiro A, Canda-Sánchez A, Lojo J, Nogueira M. Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol Membr Biol* 2005; 22:163-76.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179:1109-18.
- Salvin SB, Horecker BL, Pan LX, Rabin BS. The effect of dietary zinc and prothymosin alpha on cellular immune responses of RF/J mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43:281-8.
- Samara P, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin  $\alpha$  is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int Immunopharmacol* 2013a; 15:50-7.
- Samara P, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ, Voelter W, Tsitsilonis O. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin  $\alpha$ (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *J Immunol Methods* 2013b; 395:54-62.
- Sasaki H, Sato Y, Kondo S, Fukai I, Kiriyaama M, Yamakawa Y, Fujii Y. Expression of the prothymosin alpha mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001a; 168:191-5.
- Sasaki H, Nonaka M, Fujii Y, Yamakawa Y, Fukai I, Kiriyaama M, Sasaki M. Expression of the prothymosin-a gene as a prognostic factor in lung cancer. *Surg Today* 2001b; 31:936-8.
- Sburlati AR, Manrow RE, Berger SL. Human prothymosin alpha: purification of a highly acidic nuclear protein by means of a phenol extraction. *Protein Expr Purif* 1990; 1:184-90.
- Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, Grabbe S, Rittgen W, Edler L, Sucker A, Zimpfer-Rechner C, Berger T, Kamarashev J, Burg G, Jonuleit H, Tüttenberg A, Becker JC, Keikavoussi P, Kämpgen E, Schuler G; DC study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 2006; 17:563-70.

- Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59:1573-82.
- Schwaab T, Schwarzer A, Wolf B, Crocenzi TS, Seigne JD, Crosby NA, Cole BF, Fisher JL, Uhlenhake JC, Mellinger D, Foster C, Szczepiorkowski ZM, Webber SM, Schned AR, Harris RD, Barth RJ Jr, Heaney JA, Noelle RJ, Ernstoff MS. Clinical and immunologic effects of intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccine with Aldesleukin (Interleukin 2) and IFN- $\alpha$ 2a therapy in metastatic renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15:4986-92.
- Segade F, Gómez-Márquez J. Prothymosin alpha. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:1243-8.
- Sester M, Sester U, Gärtner B, Kubuschok B, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H. Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J Virol* 2002; 76:3748-55.
- Shackleton M, Davis ID, Hopkins W, Jackson H, Dimopoulos N, Tai T, Chen Q, Parente P, Jefford M, Masterman KA, Caron D, Chen W, Maraskovsky E, Cebon J. The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immunol* 2004; 4:9.
- Sinclair E, Black D, Epling CL, Carvidi A, Josefowicz SZ, Brecht BM, Jacobson MA. CMV antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell IFN $\gamma$  expression and proliferation responses in healthy CMV-seropositive individuals. *Viral Immunol* 2004; 17:445-54.
- Singh SK, Meyering M, Ramwadhoebe TH, Stynenbosch LF, Redeker A, Kuppen PJ, Melief CJ, Welters MJ, van der Burg SH. The simultaneous ex vivo detection of low-frequency antigen-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses using overlapping peptide pools. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:1953-63.
- Skopeliti M, Voutsas IF, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Bamias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Voelter W, Tsitsilonis OE. The immunologically active site of prothymosin alpha is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:1247-57.
- Skopeliti M, Kratzer U, Altenberend F, Panayotou G, Kalbacher H, Stevanovic S, Voelter W, Tsitsilonis OE. Proteomic exploitation on prothymosin alpha-induced mononuclear cell activation. *Proteomics* 2007; 7:1814-24.
- Skopeliti M, Iconomidou VA, Derhovanessian E, Pawelec G, Voelter W, Kalbacher H, Hamdrakas SJ, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol* 2009; 46:784-92.
- Slingluff CL Jr, Petroni GR, Olson W, Czarkowski A, Grosh WW, Smolkin M, Chianese-Bullock KA, Neese PY, Deacon DH, Nail C, Merrill P, Fink R, Patterson JW, Rehm PK.



- Helper T-cell responses and clinical activity of a melanoma vaccine with multiple peptides from MAGE and melanocytic differentiation antigens. *J Clin Oncol* 2008; 26:4973-80.
- Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, Allan JE, Hill AB. Sustained CD8+ T Cell Memory Inflation after Infection with a Single-Cycle Cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 2011; 7:e1002295.
- Soliman H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. *Cancer Control*. 2013; 20:17-21.
- Speiser DE, Liénard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005; 115:739-46.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.
- Subramanian C, Hasan S, Rowe M, Hottiger M, Orre R, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol* 2002; 76:4699-708.
- Sun Y, Stevanovic S, Song M, Schwantes A, Kirkpatrick CJ, Schadendorf D, Cichutek K. The kinase insert domain-containing receptor is an angiogenesis-associated antigen recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2006; 107:1476-83.
- Suzuki S, Takahashi S, Takahashi S, Takeshita K, Hikosaka A, Wakita T, Nishiyama N, Fujita T, Okamura T, Shirai T. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate* 2006; 66:463-9.
- Svane IM, Pedersen AE, Johansen JS, Johnsen HE, Nielsen D, Kamby C, Ottesen S, Balslev E, Gaarsdal E, Nikolajsen K, Claesson MH. Vaccination with p53 peptide-pulsed dendritic cells is associated with disease stabilization in patients with p53 expressing advanced breast cancer; monitoring of serum YKL-40 and IL-6 as response biomarkers. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:1485-99.
- Szabo P, Panneerselvam C, Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Weksler D, Whittington E, Macera MJ, Grzeschik KH, Selvakumar A, Horecker BL. Prothymosin alpha gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 1993; 90:629-34.
- Tabata C, Shibata E, Tabata R, Kanemura S, Mikami K, Nogi Y, Masachika E, Nishizaki T, Nakano T. Serum HMGB1 as a prognostic marker for malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer* 2013; 13:205.
- Tacke PJ, Figdor CG. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Semin Immunol* 2011; 23:12-20.

- Tefit JN, Serra V. Outlining novel cellular adjuvant products for therapeutic vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10:1207-20.
- Teicher BA. *Tumor Models in Cancer Research. Cancer Drug Discovery and Development*, Springer 2011.
- Telusma G, Datta S, Mihajlov I, Ma W, Li J, Yang H, Newman W, Messmer BT, Minev B, Schmidt-Wolf IG, Tracey KJ, Chiorazzi N, Messmer D. Dendritic cell activating peptides induce distinct cytokine profiles. *Int Immunol* 2006; 18:1563-73.
- Ten Brinke A, Karsten ML, Dieker MC, Zwaginga JJ, van Ham SM. The clinical grade maturation cocktail monophosphoryl lipid A plus IFN $\gamma$  generates monocyte-derived dendritic cells with the capacity to migrate and induce Th1 polarization. *Vaccine* 2007; 25:7145-52.
- Ten Brinke A, van Schijndel G, Visser R, de Gruijl TD, Zwaginga JJ, van Ham SM. Monophosphoryl lipid A plus IFN $\gamma$  maturation of dendritic cells induces antigen-specific CD8 $^{+}$  cytotoxic T cells with high cytolytic potential. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59:1185-95.
- Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R, Robbel C, Schultze-Seemann W, Waller CF, Veelken H. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006; 119:2428-34.
- Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT, Mitchell TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4 $^{+}$  T cells. *J Leukoc Biol* 2005; 78:1273-80.
- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007; 8:487-96.
- Timmer AM, Timmer JC, Pence MA, Hsu LC, Ghochani M, Frey TG, Karin M, Salvesen GS, Nizet V. Streptolysin O promotes group A Streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 2009; 284:862-71.
- Töpfer K, Kempe S, Müller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, Schackert G, Temme A. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:918471.
- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:735-47.
- Trepiakas R, Berntsen A, Hadrup SR, Bjørn J, Geertsen PF, Straten PT, Andersen MH, Pedersen AE, Soleimani A, Lorentzen T, Johansen JS, Svane IM. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: results from a phase I/II trial. *Cytotherapy* 2010; 12:721-34.

- Tripathi SC, Matta A, Kaur J, Grigull J, Chauhan SS, Thakar A, Shukla NK, Duggal R, Choudhary AR, Dattagupta S, Sharma MC, Ralhan R, Siu KW. Overexpression of prothymosin alpha predicts poor disease outcome in head and neck cancer. *PLoS One* 2011; 6:e19213.
- Tritto E, Mosca F, De GE. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 2009; 27:3331-4.
- Trivedi D, Williams RY, O'Reilly RJ, Koehne G. Generation of CMV-specific T lymphocytes using protein-spanning pools of pp65-derived overlapping pentadecapeptides for adoptive immunotherapy. *Blood* 2005; 105:2793-801.
- Tsai YS, Jou YC, Lee GF, Chen YC, Shiau AL, Tsai HT, Wu CL, Tzai TS. Aberrant prothymosin-alpha expression in human bladder cancer. *Urology* 2009; 73:188-92.
- Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009; 85:905-10.
- Tsitsiloni OE, Yialouris PP, Sekeri-Pataryas K, Haritos AA. Prothymosin alpha is not a nuclear polypeptide. *Experientia* 1989; 45:332-4.
- Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W, et al. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:9504-7.
- Tsitsilonis OE, Bekris E, Voutsas IF, Baxevanis CN, Markopoulos C, Papadopoulou SA, Kontzoglou K, Stoeva S, Gogas J, Voelter W, Papamichail M. The prognostic value of alpha-thymosins in breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:1501-8.
- Tzai TS, Tsai YS, Shiau AL, Wu CL, Shieh GS, Tsai HT. Urine prothymosin-alpha as novel tumor marker for detection and follow-up of bladder cancer. *Urology* 2006; 67:294-9.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner HL. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001; 276:31332-9.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H: HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277:15107-12.
- Vacchelli E, Galluzzi L, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautès-Fridman C, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012; 1:894-907.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-7.

- Vanderlocht J, Van Elssen CH, Senden-Gijsbers BL, Meek B, Cloosen S, Libon C, Bos GM, Germeraad WT. Increased tumor-specific CD8+ T cell induction by dendritic cells matured with a clinical grade TLR-agonist in combination with IFN-gamma. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23:35-50.
- Vansteenkiste J. Final results of a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled Phase II study to assess the efficacy of MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy in Stage IB/II non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings* 2007; Part I 25 (Suppl 18).
- Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B. Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 2000; 1:47-53.
- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2001; 276:38044-51.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:249-55.
- Voutsas IF, Baxevanis CN, Gritzapis AD, Missitzis I, Stathopoulos GP, Archodakis G, Banis C, Voelter W, Papamichail M. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49:449-58.
- Voutsas IF, Pistamaltzian N, Tsiatas ML, Skopeliti M, Katsila T, Mavrothalassiti I, Spyrou S, Dimopoulos MA, Tsitsilonis OE, Bamias A. Ovarian malignant ascites-derived lymphocytes stimulated with prothymosin  $\alpha$  or its immunoactive decapeptide lyse autologous tumour cells in vitro and retard tumour growth in SCID mice. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1706-14.
- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; 95:231-40.
- Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J Immunol* 2002; 169:2422-9.
- Wang D, Precopio M, Lan T, Yu D, Tang JX, Kandimalla ER, Agrawal S. Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Mol Cancer Ther* 2010; 9:1788-97.
- Weide B, Zelba H, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Di Giacomo AM, Maio M, Aarntzen EH, de Vries IJ, Sucker A, Schadendorf D, Büttner P, Garbe C, Pawelec G. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J Clin Oncol* 2012; 30:1835-41.
- Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 2006; 16:3-15.

- Wieckowski E, Chatta GS, Mailliard RM, Gooding W, Palucka K, Banchereau J, Kalinski P. Type-1 polarized dendritic cells loaded with apoptotic prostate cancer cells are potent inducers of CD8(+) T cells against prostate cancer cells and defined prostate cancer-specific epitopes. *Prostate* 2011; 71:125-33.
- Wittwer C, Boeck S, Heinemann V, Haas M, Stieber P, Nagel D, Holdenrieder S. Circulating nucleosomes and immunogenic cell death markers HMGB1, sRAGE and DNase in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Int J Cancer* 2013. doi: 10.1002/ijc.28294. (Epub ahead of print)
- Wu CG, Boers W, Reitsma PR, van Deventer SJ, Chamuleau RA. Overexpression of prothymosin alpha, concomitant with c-myc, during rat hepatic carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997a; 232:817-21.
- Wu CG, Habib NA, Mitry RR, Reitsma PH, van Deventer SJ, Chamuleau RA. Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997b; 76:1199-204.
- Wu Y, Wan T, Zhou X, Wang B, Yang F, Li N, Chen G, Dai S, Liu S, Zhang M, Cao X. Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8+ CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2005; 65:4947-54.
- Yamamoto M, Akira S. Lipid A receptor TLR4-mediated signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 2010, 667:59-68.
- Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka H, Chiyomaru T, Nohata N, Kinoshita T, Fuse M, Seki N, Nakagawa M. Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer. *Int J Oncol* 2012; 40:1821-30.
- Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res* 2004; 92:13-27.
- Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:16168-73.
- Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006; 26:174-9.
- Zandvliet ML, van Liempt E, Jedema I, Veltrop-Duits LA, Willemze R, Guchelaar HJ, Falkenburg JH, Meij P. Co-ordinated isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells recognizing a broad repertoire of cytomegalovirus pp65 and IE1 epitopes for highly specific adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2010; 12:933-44.
- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011; 147:868-80.
- Zanoni I, Granucci F. Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology* 2010; 215:709-12.

- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011; 147:868-80.
- Zarei S, Schwenter F, Luy P, Aurrand-Lions M, Morel P, Kopf M, Dranoff G, Mach N. Role of GM-CSF signaling in cell-based tumor immunization. *Blood* 2009; 113: 6658-68.
- Zhang XH, Qiao EQ, Gao Z, Yuan HQ, Cai PF, Li XM, Gu YH. Efficacy of combined axitinib with dacarbazine in a B16F1 melanoma xenograft model. *Oncol Lett* 2013; 6:69-74.
- Καππά Ν, Williams E, Ιωάννου Κ, Σαμαρά Π, Τσιτσιλώνη Ο. Η προθυμοσίνη α ως καρκινικός βιοδείκτης και ανοσοθεραπευτικό μόριο. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2013; 30:406-19.
- Σκοπελίτη Μ. Μελέτη της δράσης της Προθυμοσίνης α στην επαγωγή ανοσολογικών απαντήσεων από κυτταρικούς υποπληθυσμούς *in vitro* και *in vivo*. Διδακτορική Διατριβή 2008.

6

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**





Η προθυμοσίνη α (προΤα) απομονώθηκε πρώτη φορά το 1984 από θύμο αδένα αρουραίου. Είναι μία πυρηνική, κυρίως, πρωτεΐνη με διπλό διακριτό ρόλο. Ενδοκυτταρικά συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου, ενώ εξωκυτταρικά δρα πλειοτροπικά, επάγοντας και ενισχύοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Στα πλαίσια του ανοσορυθμιστικού της ρόλου, τόσο η ακέραια πρωτεΐνη όσο και το καρβοξυτελικό ανοσοδραστικό της τμήμα προΤα(100-109), επάγουν τη φαινοτυπική ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων, που συνιστούν τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της προΤα και του προΤα(100-109) να δρουν ως ανοσοενισχυτικά μόρια ενεργοποιώντας δενδριτικά κύτταρα, εστιάζοντας:

- I. Στην αναγνώριση της επιφανειακής θέσης πρόσδεσης/υποδοχέα, αλλά και των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται καταρροϊκά αυτής και μεσολαβούν τη δράση της προΤα και του δεκαπεπτιδίου της προΤα(100-109) σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα,
- II. Στην αναλυτικότερη μελέτη του φαινοτύπου, αλλά κυρίως της λειτουργικότητας των δενδριτικών κυττάρων που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) και του τύπου των T κυτταρικών ανοσοαπαντήσεων που επάγουν *in vitro*,
- III. Στη διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης της προΤα και του προΤα(100-109) σε ένα *in vivo* μοντέλο μελανώματος σε ποντίκια και στον *ex vivo* έλεγχο των επαγόμενων από τα δύο πεπτίδια ανοσολογικών απαντήσεων, και
- IV. Στην προσπάθεια συσχέτισης των δύο διακριτών ρόλων (ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού) της προΤα και τη μελέτη της πιθανότητας το ακέραιο μόριο ή/και το ανοσοδραστικό δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) να δρουν εξωκυτταρικά ως «σήματα κινδύνου».

Αρχικά, λαμβάνοντας υπόψη πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η προΤα σηματοδοτεί μέσω υποδοχέων τύπου Toll (TLR) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και προσδένεται στον TLR-4 σε μακροφάγα ποντικού, θελήσαμε να εξετάσουμε αν ο ίδιος υποδοχέας ενεργοποιείται και στα ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα. Με κυτταρομετρία ροής, μελετήσαμε την επιφανειακή έκφραση του TLR-4 σε δενδριτικά κύτταρα διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου, μετά από ωρίμανσή τους με LPS, προΤα ή προΤα(100-109) για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Παρατηρήσαμε ότι και οι τρεις παράγοντες

ωρίμανσης οδήγησαν σε συγκρίσιμη παροδική αύξηση της έκφρασης του TLR-4 στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Με τη βοήθεια ανάλυσης κατά Western, παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη έκφραση του TLR-4 συνοδεύτηκε και από αντίστοιχη ενδοκυτταρική ενεργοποίηση, καθώς τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών-προσαρμογέων του TLR-4, MyD88, TIRAP και TRIF, βρέθηκαν αυξημένα ύστερα από επίδραση με LPS, προΤα και προΤα(100-109). Τα δεδομένα αυτά αποτελούν μία πρώτη ένδειξη ότι η ικανότητα της προΤα και του προΤα(100-109), όπως του LPS, να ωριμάζουν ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον TLR-4, επάγοντας την ενεργοποίηση των MyD88- και TRIF-εξαρτώμενων μονοπατιών σηματοδότησης καταρροϊκά αυτού.

Στη συνέχεια, ελέγξαμε αν τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) εκφράζουν χαρακτηριστικά μόρια-δείκτες των δενδριτικών κυττάρων και παράγουν επαγωγικές, για τα T λεμφοκύτταρα, κυτταροκίνες. Σε συμφωνία με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα, η προΤα και το προΤα(100-109) αύξησαν την έκφραση των μορίων HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD86 και CD40 στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που επάγονται από τον LPS. Τα επίπεδα αυτά ήταν συγκρίσιμα και με αυτά που επάγονται παρουσία TNF-α, ενός παράγοντα ωρίμανσης ευρέως χρησιμοποιούμενου σε κλινικές δοκιμές που βασίζονται στα δενδριτικά κύτταρα. Επιπλέον, ανάλυση των υπερκειμένων καλλιέργειας έδειξε ότι τα δενδριτικά κύτταρα που ωρίμασαν παρουσία των δύο πεπτιδίων, σε αντιστοιχία με τα πρότυπα (LPS- ή TNF-α-ωριμασμένα) δενδριτικά κύτταρα, παρήγαγαν κυρίως την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-12, υποδεικνύοντας την ικανότητά τους να προάγουν ανοσοαπαντήσεις τύπου T<sub>H</sub>1.

Η ικανότητά τους αυτή, επιβεβαιώθηκε με έλεγχο της λειτουργικότητάς τους *in vitro*. Αναλυτικότερα, προΤα- και προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για να διεγείρουν αυτόλογα T κύτταρα, τόσο μνήμης όσο και παρθένα, παρουσία ικών και ογκοειδικών πεπτιδίων-αντιγόνων, αντίστοιχα. Ο έλεγχος των παραγόμενων από τα βοηθητικά T κύτταρα κυτταροκινών με πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής, και στα δύο συστήματα μελέτης, αποκάλυψε την αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών (TNF-α, IFN-γ, IL-2) και τη μειωμένη παραγωγή αντιφλεγμονωδών (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) κυτταροκινών, επιβεβαιώνοντας την επαγωγή απαντήσεων τύπου T<sub>H</sub>1. Αντίστοιχο ήταν και το προφίλ των παραγόμενων από τα CD8+ T κύτταρα κυτταροκινών, υποδηλώνοντας τη διαφοροποίησή τους σε

T<sub>C</sub>1-τύπου κύτταρα. Επιπλέον, τα ογκοειδικά κυτταροτοξικά T κύτταρα που εκπύχθηκαν στις καλλιέργειες ενεργοποίησης των παρθένων T κυττάρων, ήταν πολυλειτουργικά και επέδειξαν αυξημένη αντιγονοειδική MHC τάξης I-περιοριζόμενη κυτταροτοξικότητα. Αντίστοιχα, οι εκπυχθείσες ογκοειδικές T κυτταρικές σειρές παρουσίασαν αντιγονοειδική MHC τάξης II-περιοριζόμενη ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Σε συνέχεια των *in vitro* αποτελεσμάτων, μελετήσαμε την *in vivo* ικανότητα του προΤα(100-109) και της προΤα να εγείρουν ογκοειδικές ανοσοαπαντήσεις σε ένα πειραματικό μοντέλο μελανώματος. Για την ανάπτυξη μελανωματικών όγκων στα ζώα χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα B16.F1, γνωρίζοντας ότι τα κύτταρα αυτά είναι αντιγονικά, ανοσογονικά και μπορούν να σχηματίσουν συμπαγείς όγκους όταν χορηγηθούν υποδόρια σε συγγενικά ποντίκια της φυλής C57BL/6. Η προΤα και το ανοσοδραστικό της πεπτίδιο χορηγήθηκαν στα ζώα, σε συνδυασμό με ογκοειδικά πεπτιδικά αντιγόνα που εκχυλίστηκαν από την ίδια κυτταρική σειρά, με σκοπό την ενεργοποίηση ειδικών απαντήσεων έναντι του όγκου. Αναπτύξαμε δύο πρωτόκολλα, ένα ετερόχρονης και ένα σύγχρονης χορήγησης ανοσοενισχυτικών παραγόντων και καρκινικών κυττάρων. Καταγράφοντας την πορεία ανάπτυξης των όγκων, παρατηρήσαμε ότι η προΤα και το πεπτίδιο προΤα(100-109) επέδειξαν ιδιαίτερα ευεργετική δράση, μειώνοντας το ρυθμό αύξησης του καρκινικού φορτίου και παρατείνοντας την επιβίωση των πειραματόζωων και στα δύο ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Μάλιστα, ο *ex vivo* έλεγχος των σπληνοκυττάρων που απομονώθηκαν από συγκεκριμένα ζώα όλων των ομάδων επιβεβαίωσε ότι η παρατηρούμενη ανάρτηση της ανάπτυξης των μελανωματικών κυττάρων οφειλόταν στην *in vivo* επαγωγή αντιγονοειδικών, αλλά και μη ειδικών κυτταροτοξικών απαντήσεων, μεσολαβούμενων από ενεργοποιημένα T και NK/LAK λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η προΤα ενδοκυτταρικά ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δρα αντιαποπτωτικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, εξωκυτταρικά, το ίδιο πολυπεπτίδιο και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο ενισχύουν τις κυτταρομεσολαβητικές απαντήσεις τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Σε μια προσπάθεια να συνδέσουμε τους δύο αυτούς ρόλους, μελετήσαμε τις συνθήκες παραγωγής και εξωκυττάρωσης του προΤα(100-109) προκειμένου να ασκήσει τον εξωκυτταρικό του ρόλο. Είναι γνωστό, ότι σε πρώιμα στάδια της απόπτωσης η προΤα μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου και υπόκειται πέψη από

τις ενεργοποιημένες κασπάσες 3 και 7 στο αμινοξύ (D) 99. Το τμήμα 1-99 της προΤα έχει εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, ενώ το προΤα(100-109) δεν έχει ανιχνευθεί μέχρι στιγμής ενδοκυτταρικά. Υποθέτοντας ότι είναι πιθανό τα δεκαπεπτίδιο να εξωκυτταρώνεται και αφού δείξαμε ότι το προΤα(100-109) παραμένει ακέραιο και δεν θραυματοποιείται περαιτέρω από ενεργοποιημένες κατά την απόπτωση πρωτεάσες, εξωκυττάριο υλικό αποπτωτικών κυττάρων HeLa αναλύθηκε με HPLC και φασματομετρία μάζας. Στα αποκτηθέντα φάσματα μάζας ανιχνεύθηκε κορυφή μοριακής μάζας αντίστοιχης της θεωρητικής μοριακής μάζας του προΤα(100-109), υποδεικνύοντας ότι το δεκαπεπτίδιο εξωκυτταρώνεται υπό συνθήκες απόπτωσης μέσω ενός αγνώστου, προς το παρόν, μηχανισμού. Μάλιστα, όπως επίσης δείξαμε, η εξωκυττάρωση αυτή σχετίζεται με την απόπτωση και όχι με άλλους τύπους κυτταρικού θανάτου, όπως η νέκρωση και η όγκωση.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζονται σημαντικά δεδομένα για την ανοσοενισχυτική δράση της προΤα και του προΤα(100-109). Μελετώντας την έκφραση του TLR-4, καθώς επίσης και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά αυτού, διαπιστώσαμε ότι ο υποδοχέας αυτός μεσολαβεί, τουλάχιστον εν μέρει, την επαγόμενη από τα δύο πεπτίδια ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα MHC μόρια τάξης II και συνδιεγερτικά μόρια, και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Από τη μελέτη της λειτουργικότητάς τους, αποδείχθηκε ότι εκτός από φαινοτυπικά ώριμα, τα συγκεκριμένα δενδριτικά κύτταρα είναι και ανοσοϊκανά, και μπορούν *in vitro* να ενεργοποιούν αντιγονοειδικά T κύτταρα, ανεξαρτήτως του τύπου τους (T κύτταρα μνήμης και παρθένα), αλλά και της φύσεως του αντιγόνου (υικά και ογκοειδικά). Οι ανοσοαπαντήσεις που επάγουν μεσολαβούνται από T<sub>H</sub>1- και T<sub>C</sub>1-τύπου T κύτταρα. Παράλληλα, τόσο η ακέραια πρωτεΐνη όσο και το ανοσοδραστικό της τμήμα ενίσχυσαν τις ογκοειδικές, κυρίως, απαντήσεις σε ένα *in vivo* μοντέλο μελανώματος, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού αύξησης του καρκινικού φορτίου και την παράταση της επιβίωσης των πειραματόζωων. Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα με τις πρώτες ενδείξεις για ειδική εξωκυττάρωση του πεπτιδίου προΤα(100-109) υπό αποπτωτικές συνθήκες, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίζουν την ικανότητα της προΤα και του προΤα(100-109) να δρουν ως «σήματα κινδύνου», ενισχύοντας και προάγοντας τις ανοσολογικές απαντήσεις *in vivo*. Αν η

υπόθεση αυτή επιβεβαιωθεί περαιτέρω, ανοίγονται νέες προοπτικές για την πιθανή χρήση των δύο πεπτιδίων ως ανοσοενισχυτικών μορίων για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας αντικαρκινικών, κυρίως, εμβολίων που βασίζονται στη χρήση καρκινικών αντιγόνων σε συνδυασμό με δενδριτικά κύτταρα.

Prothymosin  $\alpha$  (proT $\alpha$ ) was initially isolated from rat thymus in 1984. It is, in principle, a nuclear protein with a distinctive dual role. Intracellularly, it participates in the regulation of cell proliferation and cell death, while extracellularly proT $\alpha$  acts pleiotropically, inducing and enhancing immune responses. In the frame of its immunomodulatory role, both the intact molecule and its carboxyterminal immunoreactive peptide proT $\alpha$ (100-109) induce the phenotypic maturation of dendritic cells, which comprise the professional antigen-presenting cells of the immune system.

The purpose of the present PhD thesis was the investigation of the ability of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) to act as adjuvants *via* activating dendritic cells, focusing on:

- V. The identification of the surface binding site(s)/receptor(s) and the intracellular proteins that are activated downstream thereof and mediate the effect of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) on human dendritic cells,
- VI. The thorough analysis of the phenotype and functionality of the proT $\alpha$ - and proT $\alpha$ (100-109)-matured dendritic cells and the type of T cell responses that they induce *in vitro*,
- VII. The investigation of the anticancer activity of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) in an *in vivo* melanoma model in mice and the *ex vivo* analysis of the proT $\alpha$ - and proT $\alpha$ (100-109)-induced immune responses, and
- VIII. The association of the two distinct roles (intracellular and extracellular) of proT $\alpha$  and the investigation of the possibility that the intact molecule and/or its immunoreactive decapeptide proT $\alpha$ (100-109) can act extracellularly as «danger signals».

First, taking into consideration recent data reporting that proT $\alpha$  signals through Toll-like receptors (TLRs) on human monocytes and binds to TLR-4 on murine macrophages, we sought to investigate whether the same receptor is also activated in human dendritic cells. Using flow cytometry, we studied TLR-4 surface expression on dendritic cells differentiated from human peripheral blood monocytes upon their maturation with LPS, proT $\alpha$  or proT $\alpha$ (100-109) for specific time intervals. We observed that all three maturation factors led to a similar transient increase of TLR-4 expression on the dendritic cells' surface. Using Western blot analysis, we also observed that the increased TLR-4 expression was accompanied by an analogous intracellular activation, since the expression levels of the TLR-4 adaptor proteins, MyD88, TIRAP and TRIF, were found elevated upon stimulation with LPS, proT $\alpha$  or proT $\alpha$ (100-109). These data

comprise the first evidence that the ability of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) to mature human dendritic cells, similarly to LPS, is at least partially mediated by TLR-4, downstream of which the MyD88- and TRIF-dependent signalling pathways are activated.

Our next goal was to investigate whether dendritic cells that mature in the presence of proT $\alpha$  or proT $\alpha$ (100-109) express specific dendritic cell markers and produce T cell stimulating cytokines. In accordance with already published data, proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) enhanced HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD86 and CD40 surface expression on dendritic cells, to levels comparable to those achieved by LPS. These expression levels were also comparable to those induced in the presence of TNF- $\alpha$ , a maturation factor which has been widely used in dendritic cell-based clinical trials. Moreover, the analysis of dendritic cell culture supernatants showed that the proT $\alpha$ - and proT $\alpha$ (100-109)-matured dendritic cells, similarly to standard (LPS- or TNF- $\alpha$ -matured) dendritic cells, produced in principle the pro-inflammatory cytokine IL-12, indicating their ability to promote T<sub>H</sub>1-type of immune responses.

This ability was further verified by studying the functionality of these dendritic cells *in vitro*. In detail, proT $\alpha$ - and proT $\alpha$ (100-109)-matured dendritic cells were used to stimulate autologous T cells, both memory and naive, in the presence of viral and tumor-derived peptide-antigens, respectively. The assessment of helper T cell cytokine production *via* multi-color flow cytometry in both experimental systems, revealed enhanced production of pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) and reduced production of anti-inflammatory (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) cytokines, thus verifying the polarization toward T<sub>H</sub>1-type immune responses. The cytokine profile of CD8+ T cells was analogous, indicating their differentiation to T<sub>C</sub>1-type. Moreover, the tumor-specific cytotoxic T cells generated in the naive T cell stimulation cultures were polyfunctional and exhibited an antigen-specific MHC class I-restricted cytotoxicity. Similarly, the generated tumor-specific T cell lines exhibited an antigen-specific MHC class II-restricted proliferation ability.

In continuation to our *in vitro* results, we studied proT $\alpha$ 's and proT $\alpha$ (100-109)'s ability to induce tumor-reactive immune responses *in vivo* in a melanoma model. For the development of mouse melanoma tumors, we used B16.F1 cells, as these cells are known to be antigenic, immunogenic and can form solid tumors when inoculated subcutaneously in syngeneic C57BL/6 mice. Both proT $\alpha$  and its immunoreactive peptide

proT $\alpha$ (100-109) were administered to the animals in conjunction with B16.F1-derived tumor peptide-antigens, eluted from the same cancer cell line and anticipated to trigger the generation of tumor-reactive immune responses *in vivo*. We developed two protocols, one of heterochronous and one of simultaneous administration of immunoenhancing factors and cancer cells. By recording the development of the tumors, we observed that administration of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) was beneficial, as it reduced tumor growth rates and prolonged the overall survival of the animals in both immunotherapeutic protocols. Of interest, *ex vivo* analysis of splenocytes isolated from selected animals of all groups verified that the observed inhibition of melanoma cell growth was attributed to the *in vivo* induction of tumor antigen-specific, as well as of non-specific immune responses, mediated by activated T and NK/LAK cells, respectively.

According to the literature, intracellularly, proT $\alpha$  regulates cell proliferation and exerts an anti-apoptotic role. According to the findings of the present PhD thesis, the same polypeptide and its immunoreactive decapeptide proT $\alpha$ (100-109), extracellularly, enhance cell-mediated immune responses both *in vitro* and *in vivo*. In an attempt to link these two roles, we studied the conditions under which proT $\alpha$ (100-109) is produced and exocytosed in order to exert its extracellular role. It is already known that early during apoptosis, proT $\alpha$  is translocated to the cytoplasm, where it is truncated by activated caspases 3 and 7 at aminoacid (D) 99. ProT $\alpha$ 's fragment 1-99 has already been detected in the cytoplasm, while to date proT $\alpha$ (100-109) has not been intracellularly detected. Assuming that the decapeptide could be possibly released/excreted extracellularly, we first showed that proT $\alpha$ (100-109) remains intact and is not further cleaved by activated proteases during apoptosis. Further, the extracellular medium of apoptotic HeLa cells was collected and analyzed using RP-HPLC and mass spectrometry. In the mass spectras acquired, a peak corresponding to the theoretical molecular weight of proT $\alpha$ (100-109) was recorded, indicating that the decapeptide is exocytosed under apoptotic conditions, *via* an, as yet, unknown mechanism. Of interest, as we additionally showed, the extracellular release of proT $\alpha$ (100-109) is associated only with apoptosis and not with other types of cell death, such as necrosis or oncosis.

In summary, in the present PhD thesis, we present significant data on the immunoenhancing activity of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109). Studying the expression of TLR-4, as well as that of the intracellular proteins participating in signalling pathways downstream thereof, we verified that this receptor is mediating, at least partially, the



maturation of dendritic cells, induced by the two peptides. The proT $\alpha$ - and proT $\alpha$ (100-109)-matured dendritic cells express high levels of MHC class II and costimulatory molecules and produce pro-inflammatory cytokines. The assessment of their functionality showed that, apart from phenotypically mature, these dendritic cells are also functionally immunocompetent and can stimulate antigen-specific T cells *in vitro*, regardless of their cell type (memory and naive T cells) and/or the nature of the antigen (viral- and tumor-derived). The immune responses that they induce are mediated by T<sub>H</sub>1- and T<sub>C</sub>1-type T cells. In parallel, both intact proT $\alpha$  and its immunoreactive fragment proT $\alpha$ (100-109) enhanced, in principle, tumor-specific immune responses in an *in vivo* mouse melanoma model, leading to the reduction of tumor growth and the prolongation of the overall survival of the animals. Combining the afore presented data with the first evidence for the specific exocytosis of proT $\alpha$ (100-109) under apoptotic conditions, the results of the present PhD thesis support the ability of proT $\alpha$  and proT $\alpha$ (100-109) to act as «danger signals», inducing and promoting immune responses *in vivo*. If this hypothesis holds true, new perspectives are opened as for the potential use of the two peptides as adjuvants to improve, in principle, the efficacy of anticancer vaccines that are based on tumor antigens administered in conjunction with dendritic cells.



**7**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**



Στις σελίδες που ακολουθούν παρουσιάζεται, αρχικά, η διακύμανση των ποσοστών των θετικών για κάθε κυτταροκίνη ογκοειδικών CD4+ και CD8+ T κυττάρων, ύστερα από ενδοκυτταρική χρώση με φθορίζονται αντισώματα και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για τους 3 δότες που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες ενεργοποίησης παρθένων T κυττάρων. Συγκεκριμένα, στους **Πίνακες 7.1** και **7.2** παρουσιάζονται τα ποσοστά των CD4+ και CD8+ T κύτταρα, αντίστοιχα, τα οποία παράγουν IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10 και IL-17 και εκφράζουν το μόριο CD107a στην επιφάνειά τους.

Στη συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση του φαινοτύπου των μονοκυττάρων, των διαφοροποιημένων από μονοκύτταρα μακροφάγων και των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στα προκαταρκτικά πειράματα κινητικής της έκφρασης του TLR-4 (**Εικόνα 7.1**). Οι τρεις κυτταρικοί υποπληθυσμοί αναλύθηκαν ως προς την έκφραση του CD14, του TLR-4 και του CD206, το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά στα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα και όχι στα μονοκύτταρα.

Παρατίθενται, επίσης, τα ιστογράμματα και τα διαγράμματα της κινητικής της έκφρασης των μορίων CD14 και TLR-4 σε μονοκύτταρα, μακροφάγα και ανώριμα/ώριμα δενδριτικά κύτταρα μετά από επώασή τους με τους τρεις διαφορετικούς παράγοντες ωρίμανσης, LPS, προΤα και προΤα(100-109) (**Εικόνα 7.2**).

Τέλος, παρουσιάζονται αναλυτικά, ως απόλυτες τιμές, οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών TNF- $\alpha$ , IL-12 και IL-10 που ανιχνεύθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των ανώριμων και διαφορετικά ωριμασμένων δενδριτικών κυττάρων, τα οποία είχαν προεπωαστεί ή όχι με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TLR-4 (**Εικόνα 7.3**).

**Πίνακας 7.1.** Ποσοστά CD4+ T κυττάρων θετικών για τις κυτταροκίνες IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10 και IL-17 στο σύνολο των επιλεγθέντων (gated) CD4+ T κυττάρων που εκπύχθηκαν *in vitro* απουσία (-) ή παρουσία (+) αντιγόνου.

Διέγερση με	% των CD4+ T κυττάρων που παράγουν					
	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-17	IL-10
TNF- $\alpha$ -ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (-) <sup>1</sup>	0,02 – 0,21 <sup>3</sup>	0,35 – 6,23	0,08 – 0,16	0,00 -0,54	0,00 – 0,03	0,00 – 0,02
TNF- $\alpha$ -ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (+) <sup>2</sup>	9,07 – 23,30	0,93 – 58,58	28,64 – 54,21	0,95 – 2,21	0,12 – 1,46	0,04 – 0,12
προΤα-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (-) <sup>1</sup>	0,01 – 0,42	0,21 – 3,82	0,09 – 0,26	0,01- 0,37	0,04 – 0,33	0,01 – 0,02
προΤα-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (+) <sup>2</sup>	15,07 – 22,07	29,34 – 72,76	29,31 – 57,44	0,61 – 4,42	0,51 – 4,74	0,02 – 0,06
προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (-) <sup>1</sup>	0,02- 3,87	0,28 – 10,39	0,02 – 0,71	0,02 – 0,49	0,00 – 0,14	0,01 – 0,02
προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (+) <sup>2</sup>	4,93 – 22,93	23,30 – 34,72	7,14 – 37,18	0,00 – 1,64	0,17 – 0,65	0,01 – 0,04

<sup>1</sup> T κύτταρα που διεγέρθηκαν 3 φορές με TNF- $\alpha$ - (πρότυπα), προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα απουσία πεπτιδίων της HER-2/neu

<sup>2</sup> T κύτταρα που διεγέρθηκαν 3 φορές με TNF- $\alpha$ - (πρότυπα), προΤα- ή προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα παρουσία των πεπτιδίων της HER-2/neu

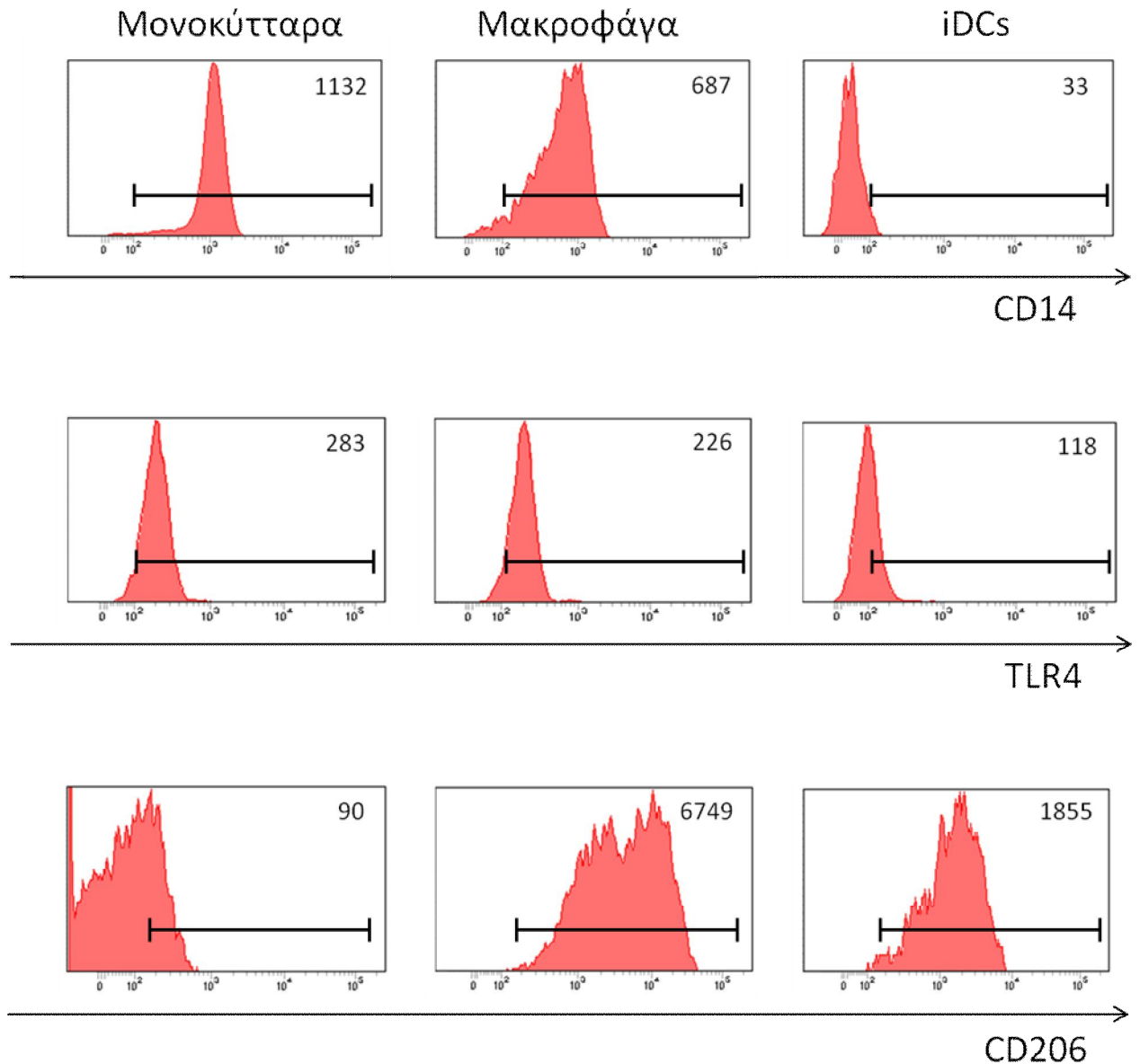
<sup>3</sup> ποσοστό T κυττάρων θετικών για την κυτταροκίνη στο σύνολο των επιλεγθέντων (gated) CD4+ T κυττάρων

**Πίνακας 7.2.** Ποσοστά CD8+ T κυττάρων θετικών για τις κυτταροκίνες IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-10 και IL-17 και το CD107a στο σύνολο των επιλεχθέντων (gated) CD8+ T κυττάρων που εκπύχθηκαν *in vitro* απουσία (-) ή παρουσία (+) αντιγόνου.

Διέγερση με	% των CD8+ T κυττάρων που παράγουν						
	IFN-γ	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-17	IL-10	CD107a
TNF-α-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (-) <sup>1</sup>	0,00 - 0,12 <sup>3</sup>	0,00 - 0,23	0,11 - 0,67	0,00	0,00	0,00	0,34 - 3,70
TNF-α-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (+) <sup>2</sup>	23,30 - 67,84	18,45 - 49,62	10,48 - 30,10	0,40 - 0,97	0,00 - 0,07	0,04 - 0,07	46,60 - 58,23
προΤα-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (-) <sup>1</sup>	0,00 - 0,12	0,12 - 0,36	0,03 - 0,53	0,01- 0,02	0,04 - 0,33	0,01 - 0,02	0,17 - 2,80
προΤα-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (+) <sup>2</sup>	21,78 - 64,15	23,03 - 46,65	7,07 - 26,14	0,04 - 0,10	0,00 - 0,02	0,02 - 0,13	36,86 - 62,34
προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (-) <sup>1</sup>	0,00- 0,02	0,13 - 0,19	0,02 - 1,13	0,01 - 0,02	0,00	0,00 - 0,02	0,50 - 2,17
προΤα(100-109)-ωριμασμένα δενδριτικά κύτταρα (+) <sup>2</sup>	28,41 - 37,93	26,62 - 42,88	6,42 - 11,19	0,00 - 0,01	0,00 - 0,02	0,00 - 0,02	17,24 - 41,99

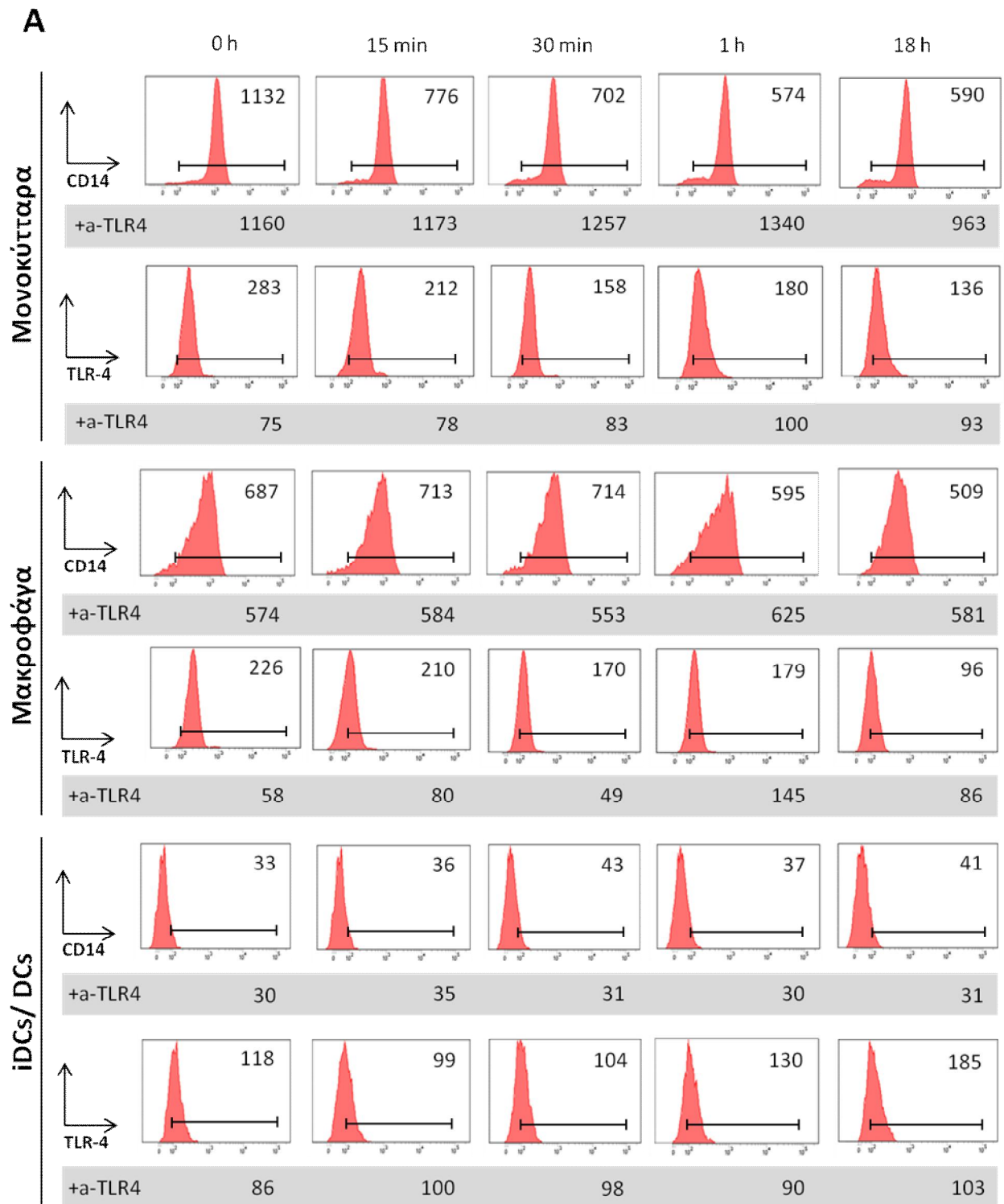
<sup>1,2</sup> όπως στον Πίνακα 7.1

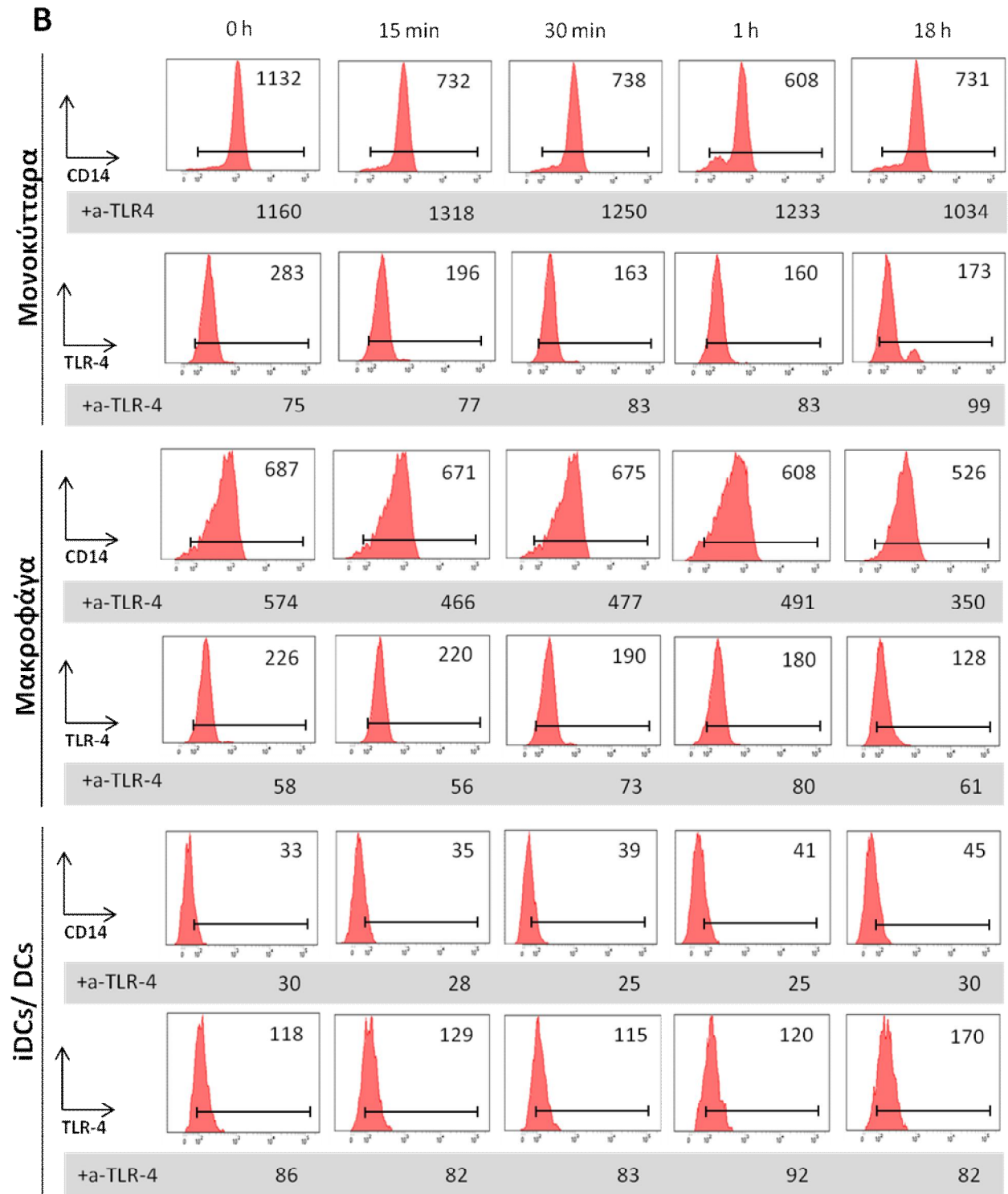
<sup>3</sup> ποσοστό T κυττάρων θετικών για την κυτταροκίνη στο σύνολο των επιλεχθέντων (gated) CD8+ T κυττάρων

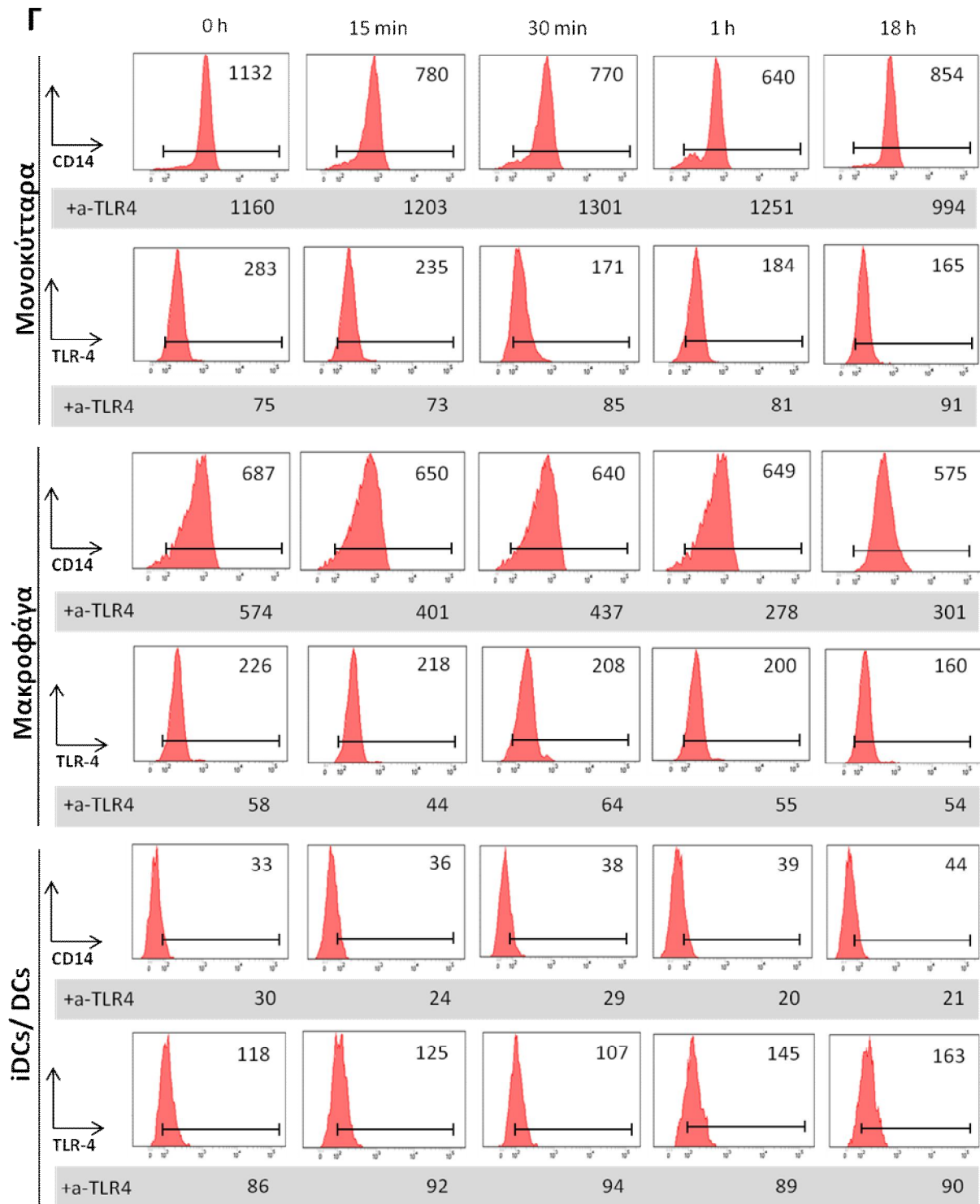


**Εικόνα 7.1.** Έκφραση των CD14, TLR-4 και CD206 σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, σε διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα μακροφάγα και σε διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα δενδριτικά κύτταρα. Τα μονοκύτταρα απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα υγιών δοτών, τα μακροφάγα διαφοροποιήθηκαν μετά από επώαση των μονοκυττάρων για 5 ημέρες παρουσία 100 ng/mL GM-CSF και τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 (Μέθοδοι). Τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση των μορίων CD14 (χαρακτηριστικός δείκτης των μονοκυττάρων), TLR-4 και CD206 (χαρακτηριστικός δείκτης των μακροφάγων) με κυτταρομετρία ροής. Τα ιστογράμματα αφορούν έναν αντιπροσωπευτικό δότη από τους 3 που ελέγχθηκαν και οι αριθμοί υποδεικνύουν τη μέση ένταση φθορισμού.

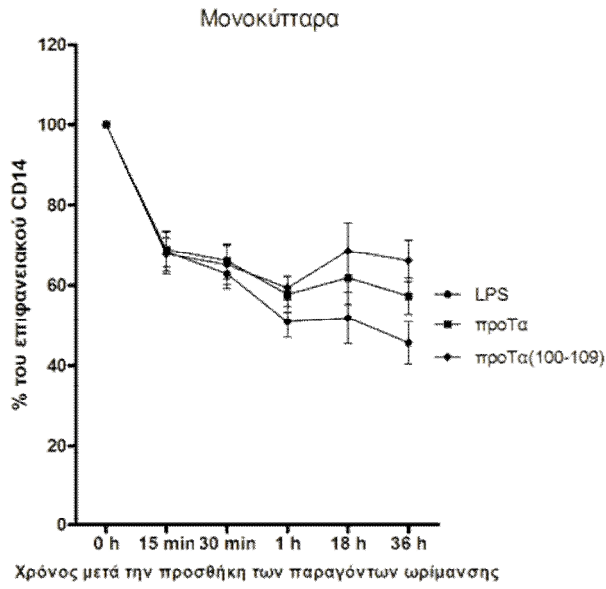




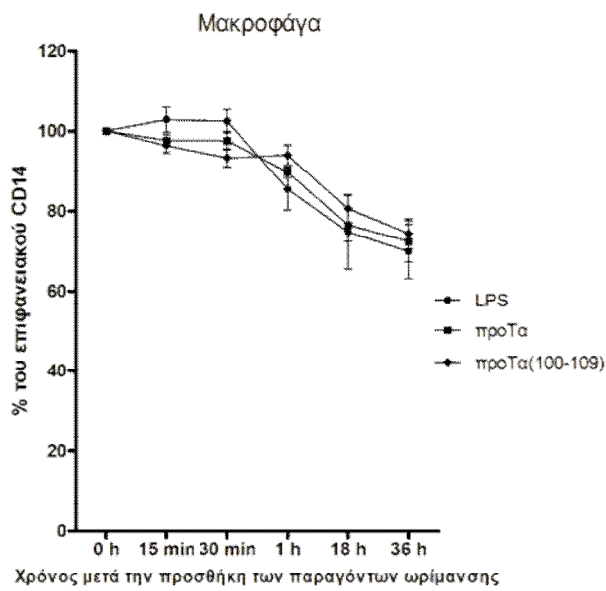




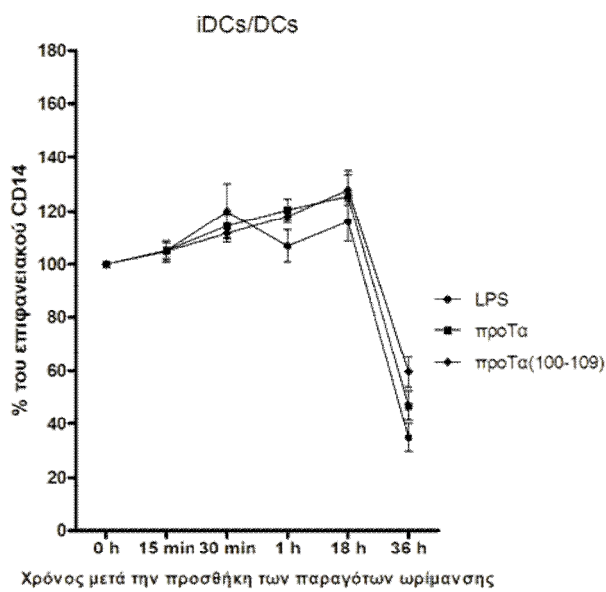
Δ



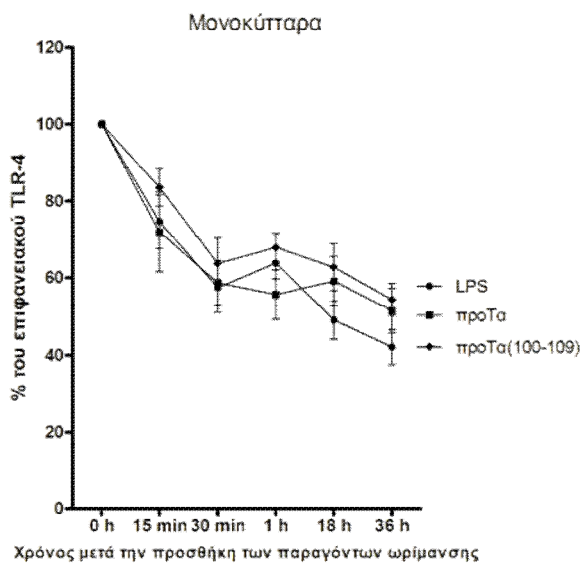
Ε



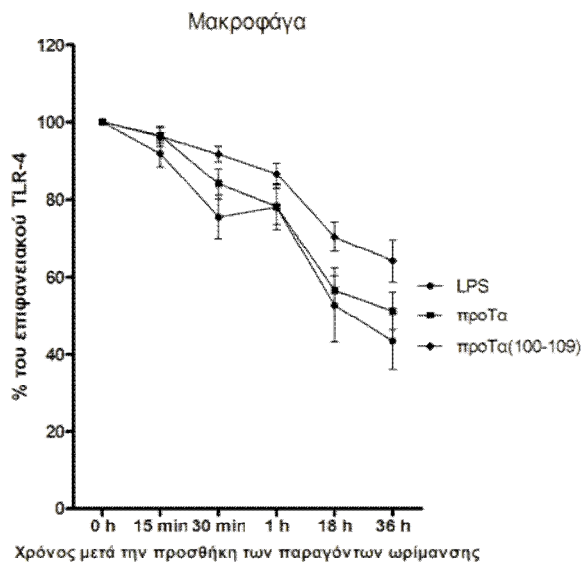
Ζ



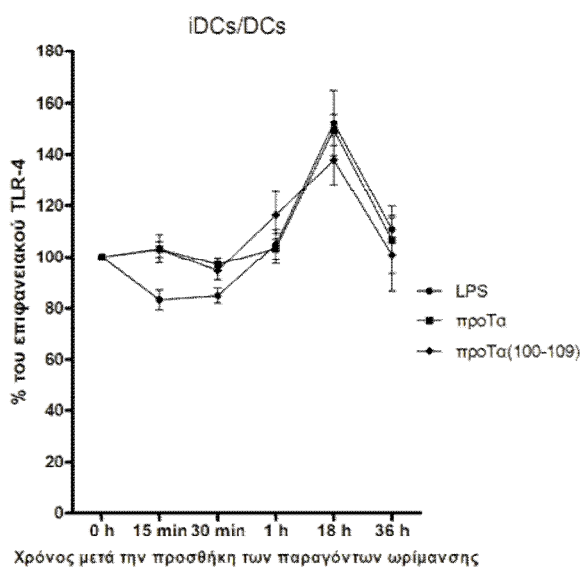
Η



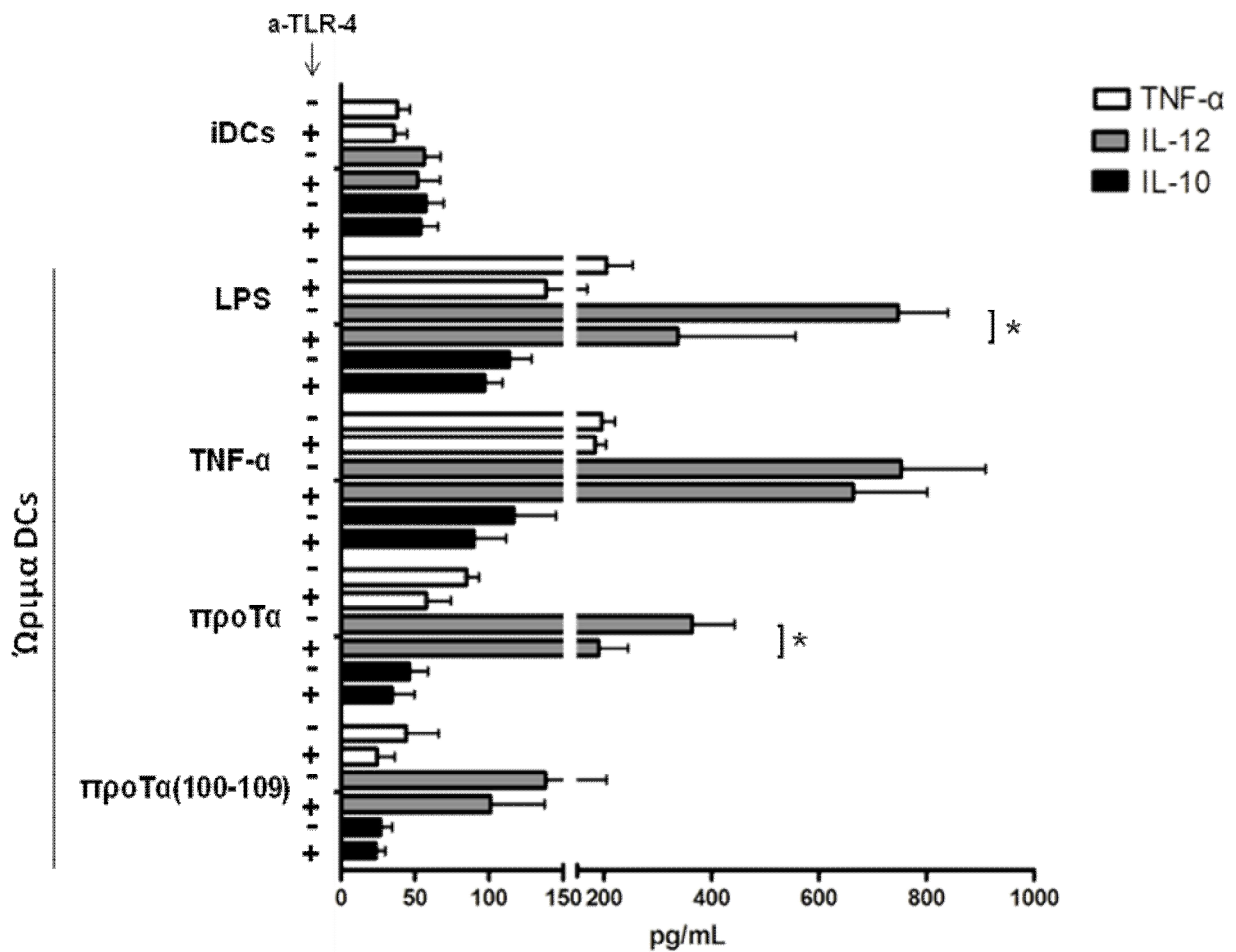
Θ



Ι



**Εικόνα 7.2.** Κινητική της επιφανειακής έκφρασης των CD14 και TLR-4 σε μονοκύτταρα, μακροφάγα και ανώριμα (iDCs)/ώριμα (DCs) δένδριτικά κύτταρα μετά από διέγερση με LPS, προΤα ή προΤα(100-109). Μονοκύτταρα, μακροφάγα και iDCs (0 h) διεγέρθηκαν παρουσία LPS (**A**), προΤα (**B**) ή προΤα(100-109) (**Γ**) για 15 min, 30 min, 1 h και 18 h και ελέγχθηκαν για την επιφανειακή έκφραση των μορίων CD14 και TLR-4 με κυτταρομετρία ροής. Οι τιμές των μέσων εντάσεων φθορισμού παρουσιάζονται μέσα στο ιστόγραμμα. Οι τιμές των μέσων εντάσεων φθορισμού παρουσία μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του TLR-4 (+α-TLR-4) παρουσιάζονται κάτω από κάθε ιστόγραμμα. Τα ιστογράμματα αφορούν έναν αντιπροσωπευτικό δότη από τους 3 που ελέγχθηκαν. Χρησιμοποιώντας την απώλεια της επιφανειακής έκφρασης ως μέτρηση για την ενδοκυττάρωση του TLR-4 και του CD14 για 0-36 h, τα αποτελέσματα και από τους τρεις δότες συνολικά παρουσιάζονται ως μέσες τιμές του ποσοστού έκφρασης του CD14 (**Δ, Ε, Ζ**) και του TLR-4 (**Η, Θ, Ι**)  $\pm$  SDs.



**Εικόνα 7.3.** Τα δενδριτικά κύτταρα που ωριμάζουν παρουσία προΤα ή προΤα(100-109) παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μέσω ενός TLR-4 εξαρτώμενου μηχανισμού. Υπερκείμενα καλλιεργειών ανώριμων δενδριτικών κυττάρων (iDCs) και δενδριτικών κυττάρων ωριμασμένων με LPS, TNF-α, προΤα ή προΤα(100-109) για 48 h αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε TNF-α, IL-12 και IL-10 με εμπορικά διαθέσιμες ELISA. Τα iDCs προεπεώστηκαν (+) ή όχι (-) με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TLR-4 (a-TLR-4) για 1 h πριν την επώασή τους με τους παράγοντες ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± SDs από 3 δότες. \*  $p < 0,05$ .





8

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**



Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν προκύψει ακόλουθες δημοσιεύσεις:

- **Ioannou K**, Samara P, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2012; 61:599-614.
- **Ioannou K**, Derhovanessian E, Tsakiri E, Samara P, Kalbacher H, Voelter W, Trougkos IP, Pawelec G, Tsitsilonis OE. Prothymosin  $\alpha$  and a prothymosin  $\alpha$ -derived peptide enhance TH1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunology*, 2013, 14:43.



## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**Κυριακή Ιωάννου**

**Ημερομηνία γέννησης:** 6 Σεπτεμβρίου, 1985

### **Εκπαίδευση:**

**06/2003:** Απολυτήριο Λυκείου, Αθήνα (18.6/20)

**09/2007:** Πτυχίο Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (7.0/10)

**11/2008-παρόν:** Υποψήφια Διδάκτορας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (επιβλέπουσα: Επικ. Καθηγήτρια Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη)

### **Επιστημονικές επισκέψεις:**

**10/2007 and 07/2011:** Επίσκεψη ανταλλαγής στο The Feinstein Institute for Medical Research, Νέα Υόρκη.

**2008-2013:** Επαναλαμβανόμενες επισκέψεις στο Eberhard Karls Universität Tübingen, Germany, υπό την επίβλεψη των Καθηγητών G. Pawelec, S. Stevanovic, W. Voelter και H. Kalbacher.

### **Βραβεία**

- **Υποτροφία FEBS** – 15<sup>ο</sup> FEBS Θερινό Σχολείο Ανοσολογίας, Ανοσοποιητικό σύστημα: Γονίδια, Υποδοχείς και Ρύθμιση, Hvar, Κροατία, Σεπτέμβριος 2009
- **Υποτροφία Υπουργείου Παιδείας** – Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. Σεπτέμβριος 2010-Αύγουστος 2013
- **3<sup>ο</sup> βραβείο για Βασική Έρευνα** – 37<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 2011

### **Πρωτότυπες Δημοσιεύσεις:**

- **Ιωάννου Κ:** Μελέτη της ανοσολογικής δράσης της προθυμοσίνης α και των ανοσοδραστικών της πεπτιδίων στις ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων. Προπτυχιακή Διπλωματική εργασία, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2007.

- Georgaki S, Skopeliti M, Tsiatas M, Nicolaou KA, **Ioannou K**, Husband A, Bamias A, Dimopoulos MA, Constantinou AI, Tsitsilonis OE. Phenoxodiol, an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009;13:3929-382.
- Pityhoutis P, Griva E, **Ioannou K**, Tsitsilonis OE, Papadopoulou-Daifoti Z. Chronic antidepressant treatment exerts sexually dimorphic immunomodulatory effects in an experimental model of major depression: do females lack an advantage? *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2009; 12:1157-63.
- **Ioannou K**, Samara P, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2012; 61:599-614.
- Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, **Ioannou K**, Ziogas AC, Rodolakis A, Vlahos G, Thomakos N, Haidopoulos D, Terpos E, Antsaklis A, Dimopoulos MA, Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *British Journal of Cancer*, 2012; 107:1869-75.
- Samara P, **Ioannou K**, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin  $\alpha$  is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils *in vitro*. *International Immunopharmacology*, 2013; 15: 50-57
- Samara P, Kalbacher H, **Ioannou K**, Radu DL, Livaniou E, Promponas V, Voelter W, Tsitsilonis OE. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin  $\alpha$ (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *Journal of Immunological Methods*, 2013; 95: 54-62.
- **Ioannou K**, Derhovanessian E, Tsakiri E, Samara P, Kalbacher H, Voelter W, Trougakos IP, Pawelec G, Tsitsilonis OE. Prothymosin  $\alpha$  and a prothymosin  $\alpha$ -derived peptide enhance TH1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunology*, 2013, 14:43.
- **Ioannou K**, Cheng KF, Crichlow GV, Birmipilis AI, Lolis EJ, Tsitsilonis OE, Al-Abed Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitor ISO-66 shows efficacy in melanoma and colon cancer models. *Biochemical Pharmacology* (submitted- BCP-D-13-01053).

### Peer-reviewed Conference Proceedings Papers

- **Ioannou K.**, Samara P., Kavrohorianou N., Bega C., Thyfronitis G, Haralambous S., Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin  $\alpha$  induces a Th1-type immune response in vitro and retards tumor growth in vivo. *Cytokine*, 2010; 52(1-2):47.
- **Ioannou K.**, Derhovanessian E., Samara E., Voutsas I., Voelter W., Kalbacher H., Pawelec G., Tsitsilonis O. Prothymosin  $\alpha$  and its carboxy-terminal decapeptide proT $\alpha$ (100-109) induce Th1-type tumor-specific immune responses. *European Journal of Cancer*, 2012; 48(5): 259-260.
- Janssen J., **Ioannou K.**, Tsitsilonis O.E., Pawelec G., Derhovanessian E. Impact of CMV infection on human dendritic cell TLR expression and function. *Immunology*, 2012; 137(1): 640-641.

### Παρουσιάσεις σε συνέδρια:

#### **Εθνικά Συνέδρια**

- Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο: 10 προφορικές παρουσιάσεις (2007-2013)
- Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών: 13 αναρτημένες ανακοινώσεις και προφορικές παρουσιάσεις (2007-2013)
- Ελληνικό Αντικαρκινικό Συνέδριο: 1 αναρτημένη ανακοίνωση (2007)
- 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας: 2 αναρτημένες ανακοινώσεις (2007)

#### **Διεθνή Συνέδρια**

- **Ioannou K.**, Samara P., Kalbacher H., Voelter W., Tsitsilonis O.E. Elucidation of the immunomodulatory effects and mode of action of prothymosin alpha and its immunoreactive carboxy-terminal decapeptide. Αναρτημένη ανακοίνωση, 15th FEBS Summer School on Immunology, Immune System: Genes, Receptors and Regulation, Hvar, Κροατία, Σεπτέμβριος 2009.
- Tsitsilonis O.E., **Ioannou K.**, Samara P., Skopeliti M., Voutsas I., Constantin C., Kalbacher H., Voelter W. Tumor immunotherapeutic strategies using novel immunomodulators. Προφορική παρουσίαση, 6<sup>ο</sup> Βαλκανικό Συνέδριο Ανοσολογίας της BAIS, Sibiu, Ρουμανία, Απρίλιος 2010.
- **Ioannou K.**, Samara P., Kavrohorianou N., Bega C., Thyfronitis G, Haralambous S., Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin  $\alpha$  induces a T<sub>H</sub>1-type immune

response in vitro and retards tumor growth in vivo. Προφορική παρουσίαση, 8<sup>ο</sup> συνέδριο των ICS και ISICR, Cytokines 2010, Σικάγο, Οκτώβριος 2010.

- **Ioannou K.**, Derhovanessian E., Samara E., Voutsas I., Voelter W., Kalbacher H., Pawelec G., Tsitsilonis O. Prothymosin  $\alpha$  and its carboxy-terminal decapeptide proT $\alpha$ (100-109) induce Th1-type tumor-specific immune responses. Αναρτημένη ανακοίνωση, 22<sup>ο</sup> διετές συνέδριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την Έρευνα του Καρκίνου, Βαρκελώνη, Ιούλιος 2012.
- Janssen J., **Ioannou K.**, Tsitsilonis OE., Pawelec G., Derhovanessian E. Impact of CMV infection on human dendritic cell TLR expression and function. Αναρτημένη ανακοίνωση, Ευρωπαϊκό Συνέδριο Ανοσολογίας, Γλασκώβη, Σεπτέμβριος 2012.
- **Ioannou K.**, Derhovanessian E., Tsakiri E., Samara P., Kalbacher H., Voelter W., Trougakos I., Pawelec G., Tsitsilonis O. Prothymosin  $\alpha$  and its carboxy-terminal decapeptide proT $\alpha$ (100-109) induce T<sub>H</sub>1-type tumor-reactive immune responses *via* Toll-like receptor-4 signaling. Προφορική παρουσίαση και αναρτημένη ανακοίνωση στο Συνέδριο INSPiRE: Progress in combination therapy of cancer using novel immunomodulators, Αθήνα, Νοέμβριος 2012.
- **Ioannou K.**, Samara P, Williams ED, Kappa N, Fortis S, Kavrohorianou A, Haralambous S, Tsitsilonis O. Αναρτημένη ανακοίνωση στο Συνέδριο INSPiRE: Ageing and Cancer cell biology: Convergent and divergent molecular mechanisms, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

#### Σεμινάρια:

- 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Σεμινάριο Πειραματικής Βιοϊατρικής Έρευνας, 20-22 Νοεμβρίου 2008, της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϊατρικής Έρευνας & Ζώων Εργαστηρίου.

#### Συμμετοχή σε επιστημονικά προγράμματα:

**Τίτλος:** In vitro ενίσχυση της κυτταροτοξικής ικανότητας ανθρωπίνων NK κυττάρων με κυτταροκίνες και χρησιμοποίησή τους σε in vivo μοντέλα κυτταρικής ανοσοθεραπείας του καρκίνου. **Χορηγός:** Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης – Κεντρικό Συμβούλιο Υγείας. **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη

**Τίτλος:** Επίδραση της Προθυμοσίνης  $\alpha$  στη λειτουργικότητα ανθρωπίνων ουδετερόφιλων και εφαρμογή τους σε in vivo πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου. **Χορηγός:** Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας, ΕΚΠΑ. **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη



**Τίτλος:** Συνδυαστική ανοσοθεραπεία για τη βελτιστοποίηση της αντικαρκινικής δράσης των NK κυττάρων. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς της in vitro και σε πειραματικό μοντέλο όγκου σε ζώα. **Χορηγός:** Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και Feinstein Institute for Medical Research (NY USA). **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη και Καθηγητής Υ. Al-Abed.

**Τίτλος:** Σύνθεση και χαρακτηρισμός ειδικών ψυχρών και ραδιοεπισημασμένων παραγώγων για την in vitro και in vivo μελέτη ανοσοδραστικών πεπτιδίων. **Χορηγός:** ΙΚΥ, ΙΚΥΔΑ 2008. **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Δρ. Ε. Λιβανίου, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

**Τίτλος:** Μελέτη της δράσης φυτικών ορμονών και δραστικών αναλόγων τους στα λεμφοκύτταρα. Εκτίμηση της δυνατότητας χρησιμοποίησής τους στην ενίσχυση των ανοσολογικών απαντήσεων καρκινοπαθών. **Χορηγός:** Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας, ΕΚΠΑ. **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη

**Τίτλος:** Ανοσολογικές απαντήσεις του καρβοξυτελικού δεκαπεπτιδίου της Προθυμοσίνης α. **Χορηγός:** ΙΚΥ, ΙΚΥΔΑ 2010/065. **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη.

**Τίτλος:** GerontoShield, Systems biology-driven approach to unravel and revert the mechanisms responsible for poor immune responses in the elderly. **Χορηγός:** Υπουργείο Έρευνας και Ανάπτυξης της Γερμανίας (BMBF). **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Καθηγητής C. Guzman.

**Τίτλος:** Integrating the emerging research potential of the University of Athens Cancer Research Group in the European Research area (INsPiRE). **Χορηγός:** EU FP7 Capacities REGPOT-CT-2011-284460. **Επιστημονικός υπεύθυνος:** Καθηγητής Χρ.Κίττας.