



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



Διδακτορική Διατριβή

**“ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ  
ΕΠΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ”**

**ΑΡΝΤΙΑΝΑ ΜΟΥΣΤΑΚΗ**

(Βιολόγος – Ερευνήτρια)

Λάρισα 2013

© 2013 Αρντιάνα Μουστάκη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

## **Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Αναστάσιος Γερμενής  
**(Επιβλέπων)** Καθηγητής – Εργαστηριακή Ανοσολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Ματθαίος Σπελέτας  
Επίκουρος Καθηγητής – Εργαστηριακή Ανοσολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης  
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Γεώργιος Χατζηγεωργίου  
Καθηγητής Νευρολογίας - Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας - Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Ζωή Δανιήλ  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας - Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Δρ. Χρυσή Χατζόγλου  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας - Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



*Στην Οικογένειά μου,  
για την Αγάπη και τη Συμπράτασή της!*



## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

---

---

### Προσωπικά Στοιχεία

Όνοματεπώνυμο: Αρντιάνα Μουστάκη

Ημερομηνία γέννησης: 18 Ιανουαρίου 1980

e-mail: [amoustaki@upatras.gr](mailto:amoustaki@upatras.gr)

---

---

### Εκπαίδευση

2008-2013

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας

**Διδακτορική Διατριβή στην Ανοσολογία και Ανοσοθεραπεία του Καρκίνου**

«Γλυκοκορτικοειδή και Ανοσοποιητικό Σύστημα»

2005

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο της Αθήνας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας

**Πτυχίο Βιολογίας**

---

---

### Επαγγελματική Εμπειρία

2011 – 2013

**Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια**

Εργαστήριο Μοριακής Καρκινογένεσης του Αναπνευστικού

Πανεπιστήμιο Πάτρας, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Φυσιολογίας

“Ανοσολογική απόκριση του ξενιστή σε όγκους κατευθυνόμενους από το μεταλλαγμένο Kras”

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Γ.Τ. Σταθόπουλος

2007 – 2011

**Ερευνητικός συνεργάτης**

Αντικαρκινικό νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάβας»

Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου

“Φυσικά Φονικά κύτταρα και Ανοσολογία του Καρκίνου”

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Μ. Παπαμιχαήλ

---

2006 – 2007

**Ερευνητικός συνεργάτης**

Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Ινστιτούτο Ανοσολογίας

“Ρύθμιση Ανοσολογικής Απόκρισης από το BTLA”

Επιστημονικός Υπεύθυνος: D. Graf

---

**Σχετικές Ανακοινώσεις**

**Ardiana Moustaki**, Michael Papamichail and Sonia A Perez

**“GCs in combination with IL-15 generate NK cells with a distinct phenotypic and proliferative profile”**

8th International Conference on Innate Immunity, 2011, Chania, Crete, Greece

**Ardiana Moustaki**, Eleni G. Iliopoulou, Kimon V. Argyropoulos, Georges Stranjalis, Constantin N. Baxevanis, Damianos E. Sakas, Michael Papamichail, Sonia A. Perez

**“NK Cells and glucocorticoids in cancer immunotherapy”**

*Recent Advances in Cancer Immunotherapy with an Emphasis on Vaccines, 2008, Athens, Greece*

---

**Δημοσιεύσεις**

**Moustaki A**, Argyropoulos KV, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA.

**“Effect of the simultaneous administration of glucocorticoids and IL-15 on human NK cell phenotype, proliferation and function”** *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Dec;60(12):1683-95. doi: 10.1007/s00262-011-1067-6. Epub 2011 Jun 26.

Salagianni M, Lekka E, **Moustaki A**, Iliopoulou EG, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA.

**“NK cell adoptive transfer combined with Ontak-mediated regulatory T cell elimination induces effective adaptive antitumor immune responses”** *J Immunol.* 2011



---

*Mar 15;186(6):3327-35. doi: 10.4049/jimmunol.1000652. Epub 2011 Feb 11.*

Katsara O, Mahaira LG, Iliopoulou EG, **Moustaki A**, Antsaklis A, Loutradis D, Stefanidis K, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA.

**“Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells”** *Stem Cells Dev.* 2011 Sep;20(9):1549-61. doi: 10.1089/scd.2010.0280. Epub 2011 Feb 15.

Stathopoulos GT, Psallidas I, **Moustaki A**, Moschos C, Kollintza A, Karabela S, Porfyridis I, Vassiliou S, Karatza M, Zhou Z, Joo M, Blackwell TS, Roussos C, Graf D, Kalomenidis I.

**“A central role for tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 in malignant pleural effusion”** *J Natl Cancer Inst.* 2008 Oct 15;100(20):1464-76. doi: 10.1093/jnci/djn325. Epub 2008 Oct 7.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΡΝΤΙΑΝΑ ΜΟΥΣΤΑΚΗ: Γλυκοκορτικοειδή και Ανοσοποιητικό Σύστημα.

Επιπτώσεις στην Ανοσοθεραπεία του Καρκίνου.

(Υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Αναστάσιου Γερμενή)

Η έμφυτη ικανότητα των Φυσικών Φονικών κυττάρων (NK, Natural Killer cells) να στοχεύουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, η ελλιπής κατανόηση της δυναμικής και πλειοτροπικής φύσης των NK κυττάρων δεν έχει επιτρέψει έως τώρα το σχεδιασμό κατάλληλων ανοσοθεραπευτικών σχημάτων που να εκμεταλλεύονται επαρκώς τις φυσικές αντινεοπλασματικές ιδιότητες αυτού του κυτταρικού πληθυσμού. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη των ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των NK κυττάρων κρίνεται μεγάλης σημασίας για την επίτευξη αποτελεσματικών ανοσοθεραπευτικών παρεμβάσεων.

Τα γλυκοκορτικοειδή, φυσικά παρόντα όχι μόνο στο περιφερικό αίμα αλλά και σε ανατομικές θέσεις διαφοροποίησης λεμφοκυττάρων, περιγράφεται πως αναστέλλουν ή ευνοούν την ανοσολογική απόκριση. Στη μελέτη αυτή παρουσιάζουμε δεδομένα που υποστηρίζουν ότι γνωστά στην κλινική πράξη γλυκοκορτικοειδή ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων με IL-15 ανθρώπινων NK κυττάρων, χωρίς να επηρεάζουν την κυτταροτοξική τους δράση, την ικανότητα έκκρισης κυτταροκινών και την έκφραση υποδοχέων ενεργοποίησης. Επιπλέον, δείχνουμε ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν διαφορετική δράση στους δυο κύριους υποπληθυσμούς NK κυττάρων, όσον αφορά το δυναμικό πολλαπλασιασμού όσο και το δυναμικό μετανάστευσής τους. Τα γλυκοκορτικοειδή ενίσχυσαν επιλεκτικά τον πολλαπλασιασμό ενός πιο ανώριμου κυτταρικού πληθυσμού, ο οποίος μπορεί να χαρακτηριστεί ως  $CD16^{-}NKG2A^{+}KIR^{low/-}CD57^{-}CD94^{high}$ . Επιπλέον, η επιφανειακή έκφραση των υποδοχέων CXCR3 και CXCR4 ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στα ενεργοποιημένα με IL-15 και γλυκοκορτικοειδή NK κύτταρα, ευνοώντας το δυναμικό μετανάστευσής τους προς θέσεις φλεγμονής και προς το μυελό των οστών, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, τα  $CD16^{-}$  NK κύτταρα εκδήλωσαν αυξημένη ευαισθησία

στην επαγόμενη από την IL-15 απόπτωση, η οποία παρεμποδίστηκε παρουσία γλυκοκορτικοειδών. Η προστατευτική δράση αυτή των γλυκοκορτικοειδών συσχετιζόταν με αυξημένα επίπεδα έκφρασης των αντι-αποπτωτικών παραγόντων BCL2 και BCLxL, και μειωμένη έκφραση του αποπτωτικού παράγοντα BIM. Η συνέργεια αυτή μεταξύ της IL-15 και γλυκοκορτικοειδών ενδεχομένως να παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των κυκλοφορούντων NK κυττάρων. Η έκθεση των NK ακόμα και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών προκάλεσε ελάττωση του δυναμικού πολλαπλασιασμού των NK, φαινόμενο το οποίο μπορούσε να αντιστραφεί με τη σύγχρονη παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων IL-15. Τέλος, στη μελέτη αυτή παρουσιάζουμε ενδείξεις για το ρόλο των γλυκοκορτικοειδών στην επιτάχυνση του κυτταρικού κύκλου των ενεργοποιημένων με IL-15 CD16<sup>+</sup> NK κυττάρων.

Τα ευρήματα των μελετών αυτών καταδεικνύουν έναν νέο μηχανισμό ανοσοτροποποίησης από τα γλυκοκορτικοειδή, μηχανισμός ο οποίος μπορεί να αξιοποιηθεί για τον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό στρατηγικών NK-μεσολαβούμενων ανοσοθεραπευτικών παρεμβάσεων.

*Λέξεις κλειδιά:* Φυσικά Φονικά κύτταρα, Γλυκοκορτικοειδή, Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός, Απόπτωση, Ομοίωση

## ABSTRACT

ARDIANA MOUSTAKI: Glucocorticoids and Immune System.  
Implications in Cancer Immunotherapy.

(Supervised by Professor Dr. Anastasios Germenis)

The inherent ability of Natural Killer (NK) cell to directly target tumor cells renders them a powerful tool in cancer immunotherapy. However, our limited understanding of the dynamic and pleiotropic nature of NK cells has not allowed for the efficient exploitation of the anti-tumor features of these cells until now. Therefore, the identification and characterization of cell-intrinsic and cell-extrinsic factors, which regulate the development and function of NK cells, is of great importance for the development of successful NK-cell-based immunotherapies against human cancers.

Glucocorticoids, naturally present not only in peripheral blood but also within the sites of lymphocytes differentiation, have been reported either to stimulate or suppress immune responses. In the present study, we provide evidence supporting that common glucocorticoids used in clinical practice, promote proliferation of IL-15-activated human NK cell without impairing their cytotoxic activity, cytokine production potential and expression of activating receptors. Moreover, we present data supportive of the differential action of glucocorticoids on the two main subpopulations of NK cells, in terms of cell proliferation and homing capacity. Glucocorticoids preferentially induced the proliferation of a more immature cell population characterized as  $CD16^{-}NKG2A^{+}KIR^{low/-}CD57^{-}CD94^{high}$ . In addition, the surface expression of CXCR3 and CXCR4 was significantly increased on IL-15/GC stimulated NK cells favoring their migration capacity toward sites of inflammation and the bone marrow, respectively. Furthermore,  $CD16^{-}$  NK cells exhibited enhanced susceptibility to IL-15 induced apoptosis, which was prevented by the concurrent presence of glucocorticoids. This protective effect of glucocorticoids was correlated with elevated expression levels of anti-apoptotic factors BCL2 and BCLxL, and reduced levels of the pro-apoptotic factor BIM. The aforementioned synergistic effect of glucocorticoids and IL-15 might play a significant role in the homeostasis of

peripheral NK cells. The pre-exposure of NK cells to even physiological levels of glucocorticoids impaired their proliferation potential, yet the presence of minimal amounts of IL-15 during the pre-exposure period could counteract the inhibitory effect of glucocorticoids. Finally, we provide evidence for the role of glucocorticoids in the acceleration of cell cycle progression of IL-15 stimulated CD16<sup>+</sup> NK cells.

These findings underline a novel mechanism of immune-modulation mediated by glucocorticoids, which might have implications for development of more efficient NK-cell-based immunotherapeutic strategies.

*Keywords:* Natural Killer cells, Glucocorticoids, Cell Proliferation, Apoptosis, Homeostasis

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο «Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου» του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» υπό την επιστημονική ευθύνη του Δρ. Μ. Παπαμιχαήλ και της Δρ. Σ. Περέζ, και την επίβλεψη του Δρ. Α. Γερμενή. Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό πρόγραμμα «Περιφέρεια Αττικής» (No20, MIS code 59605GR). Πλησιάζοντας στο τέλος αυτής της ερευνητικής προσπάθειας νοιώθω υποχρεωμένη να ευχαριστήσω όλους όσους συντέλεσαν στην εκτέλεση και την επιτυχή έκβαση αυτής της διατριβής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Μ. Παπαμιχαήλ για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διατριβή μου στο «Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου», τη διάθεση υλικοτεχνικής υποδομής για την εκτέλεση της ερευνητικής εργασίας, καθώς και για τη βοήθεια και τις παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ επιθυμώ να εκφράσω για τη Δρ. Σ. Περέζ για την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας. Ιδιαίτερα πολύτιμη ήταν η συμβολή της στην κατανόηση του θεωρητικού υποβάθρου του θέματος, την εξοικείωση με τις πειραματικές μεθόδους και τεχνικές καθώς και τη συγγραφή της διατριβής αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και ειδικά τον επιβλέποντα καθηγητή, το Δρ. Α. Γερμενή, για την ανάθεση του θέματος και τη συμπαράσταση και στήριξή του.

Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη του Κέντρου Ανοσολογίας, που ήταν δίπλα μου κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και συνέβαλαν ποικιλοτρόπως στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής.

*Αρντιάνα Μουστάκη*





## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	xv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	xvii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	xxi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ/ΣΥΜΒΟΛΩΝ.....	xxiii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Εισαγωγή .....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Ανασκόπηση της Βιβλιογραφίας .....	5
2.1 Φυσικά Φονικά Κύτταρα: Ανασκόπηση του Ρόλου, της Ποικιλομορφίας και των Λειτουργιών τους .....	5
2.1.1 Οντογένεση των Ανθρώπινων NK κυττάρων.....	7
2.1.2 Λειτουργικά Ποικιλόμορφοι Κυτταρικοί Υποπληθυσμοί των NK στον Άνθρωπο	11
2.1.3 Υποδοχείς των NK κυττάρων.....	13
2.1.4 Λειτουργικά Χαρακτηριστικά των NK .....	17
2.1.5 NK κύτταρα ως Αποδέκτες των Σημάτων των Κυτταροκινών .....	21
2.1.6 NK κύτταρα και Χημειοκίνες: Ρύθμιση της Μεταναστευτικής τους Ικανότητας ..	26
2.2 NK Κύτταρα στην Ανοσοθεραπεία του Καρκίνου.....	36
2.2.1 Αποκρίσεις των NK Κυττάρων στους Όγκους.....	36
2.2.2 Μοριακές Αλληλεπιδράσεις στις αντι-Καρκινικές Αποκρίσεις των NK Κυττάρων .....	37
2.2.3 Δραστικοί Μηχανισμοί που Συμμετέχουν στις αντι-Καρκινικές Αποκρίσεις των NK Κυττάρων .....	39
2.2.4 Ενεργοποίηση των NK Κυττάρων που Οδηγεί σε Ενισχυμένη αντι-Καρκινική Δράση .....	40
2.2.5 Τροποποίηση της Σηματοδότησης των NK Υποδοχέων με Σκοπό την Προώθηση της Κυτταροτοξικής Δράσης των NK Κυττάρων.....	41
2.2.6 Μεσολαβούμενες από τα NK Κύτταρα αντι-Καρκινικές Αποκρίσεις στο Πλαίσιο Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Αρχέγονων Κυττάρων .....	41

2.2.7 Παθητική Ανοσοθεραπεία με τη Χρήση Βραχυπρόθεσμα Ενεργοποιημένων <i>ex vivo</i> NK Κυττάρων .....	42
2.2.8 Παθητική Ανοσοθεραπεία με τη Χρήση NK Κυτταρικών Σειρών ή Ενεργοποιημένων <i>ex vivo</i> Πρωτογενών NK Κυττάρων .....	43
2.2.9 Μελλοντικές Δυνατότητες και Στρατηγικές για την Αποτελεσματικότερη Παθητική NK Ανοσοθεραπεία .....	44
2.2.10 Ανθρώπινοι Καρκίνοι Δεκτικοί στη Στόχευση από τα NK Κύτταρα .....	44
2.3 Γλυκοκορτικοειδή ως Τροποποιητές των Ανοσολογικών Αποκρίσεων .....	46
2.3.1 Γλυκοκορτικοειδή και Απόπτωση .....	47
2.3.2 Επίδραση των Γλυκοκορτικοειδών στα T Λεμφοκύτταρα.....	48
2.3.3 Επίδραση των Γλυκοκορτικοειδών στα Δενδριτικά Κύτταρα.....	50
2.3.4 Επίδραση των Γλυκοκορτικοειδών στα Φυσικά Φονικά Κύτταρα.....	51
2.3.5 Τα Γλυκοκορτικοειδή ως Θετικοί Ρυθμιστές των Ανοσολογικών Αποκρίσεων ...	51
2.3.6 Γλυκοκορτικοειδή και Ανοσοθεραπεία του Καρκίνου .....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Μεθοδολογία της Έρευνας .....	55
3.1 Διαχωρισμός και Απομόνωση PBMC .....	55
3.2 Απομόνωση CD56 <sup>+</sup> /NK κυττάρων .....	56
3.3 Καλλιέργεια CD56 <sup>+</sup> /NK κυττάρων .....	57
3.4 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυτταρικών Σειρών .....	58
3.5 Ανοσοφθορισμός και Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry) .....	58
3.6 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας (με CFSE).....	61
3.7 Δοκιμασία Αποκοκκίωσης/Κινητοποίησης του δείκτη CD107 .....	62
3.8 Μέτρηση Ικανότητας Πολλαπλασιασμού .....	63
3.9 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Εκκρινόμενων Κυτταροκινών .....	63
3.10 Δοκιμασία Έκκρισης IFN-γ .....	64
3.11 Μέτρηση του Ρυθμού Απόπτωσης .....	65
3.12 Απομόνωση NK Υποπληθυσμών με Κυτταροδιαχωριστή Ροής .....	66
3.13 Ποσοτικοποίηση των Επιπέδων Έκφρασης Γονιδίων με PCR Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR).....	67
3.14 Μελέτη του Κυτταρικού Κύκλου – Μέθοδος Παλμού/Παρακολούθησης με BrdU ...	75
3.15 Στατιστική Ανάλυση.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Αποτελέσματα.....	77

4.1 Τα GC Ενισχύουν τον Πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων Ενεργοποιημένων με IL-15 .....	77
4.2 Τα Ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK κύτταρα Είναι Ανθεκτικά στην Επαγόμενη από Ενεργοποίηση Απόπτωση .....	79
4.3 Το Λειτουργικό Δυναμικό των Ενεργοποιημένων με IL-15/GC NK κυττάρων .....	80
4.4 Τα Ενεργοποιημένα με IL-15 NK κύτταρα Αποκτούν ένα Διακριτό Ανοσοφαινοτυπικό Προφίλ .....	86
4-5 Τα ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK κύτταρα εκφράζουν διαφορετικούς υποδοχείς χημειοκινών .....	89
4.6 Η Έκφραση του CD16 Καθορίζει Δυο Πληθυσμούς NK κυττάρων με Διαφορετικό Δυναμικό Πολλαπλασιασμού .....	92
4.7 Δυναμικό Πολλαπλασιασμού Απομονωμένων NK Υποπληθυσμών .....	96
4.8 NK κύτταρα προ-Εκτεθειμένα σε GC Παρουσιάζουν Μειωμένο Δυναμικό Πολλαπλασιασμού .....	98
4.9 Το Ισοζύγιο των Σημάτων Προερχόμενων από την IL-15 και τα GC Ρυθμίζει την Ομοίωση των NK κυττάρων .....	100
4.10 Η Ενισχυμένη Επιβίωση των NK Παρουσία IL-15 και HC Αντικατοπτρίζεται στα Επίπεδα Γονιδιακής Έκφρασης των Μελών της Οικογένειας BCL2 .....	102
4.11 Τα CD16 <sup>-</sup> NK κύτταρα Είναι πιο Ευαίσθητα στην Επαγόμενη από την IL-15 Απόπτωση .....	104
4.12 Η Ταυτόχρονη Διέγερση των NK με IL-15 και GC δεν Επηρεάζει την Ενεργοποίηση των Παραγόντων STAT5, ERK1/2, AKT και NFκB .....	105
4.13 Αντίθετη Δράση της IL-15 και GC στη Ρύθμιση της Έκφρασης του Γονιδίου GILZ .....	107
4.14 Επίδραση των GC στον Κυτταρικό Κύκλο των Ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων – Προκαταρκτικά δεδομένα .....	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	117
5.1 Παρόμοια Ενισχυτική Δράση των GC στον Πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων ....	117
5.2 Η IL-15 και τα GC Ευνοούν τον Πολλαπλασιασμό των CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> NK κυττάρων .....	118
5.3 Τα GC Συμμετέχουν στη Διατήρηση της Ομοιότητας των NK κυττάρων .....	119
5.4 Τα GC Προστατεύουν τα Ενεργοποιημένα NK κύτταρα από την Απόπτωση μέσω Ενισχυμένης Έκφρασης του BCL2 και Αναστολής Έκφρασης του BIM .....	120
5.5 Τα GC Επιταχύνουν τη Φάση-S των Ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων .....	121

5.6 Ανάπτυξη NK κυττάρων Ενεργοποιημένων <i>ex vivo</i> με IL-15 και HC στο Πλαίσιο της Παθητικής Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου .....	123
5.7 Γενικά Συμπεράσματα .....	124
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Βιβλιογραφία .....	127

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 2-1 Στάδια οντογένεσης των NK <i>in vivo</i> .....	9
Εικόνα 2-2 Στάδια διαφοροποίησης των NK .....	10
Εικόνα 2-3 Φαινοτυπική και λειτουργική διαφοροποίηση των CD56 <sup>bright</sup> vs. CD56 <sup>dim</sup> .....	12
Εικόνα 2-4 Αλληλεπίδραση των NK με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού .....	23
Εικόνα 2-5 Ανατομική Εντόπιση των ώριμων NK κυττάρων .....	27
Εικόνα 2-6 Παραδείγματα Χημειοκινών που Απαιτούνται για τη Μετανάστευση των NK κυττάρων.....	34
Εικόνα 3-1 Συγκριτική Δραστικότητα Γλυκοκορτικοειδών.....	58
Εικόνα 3-2 Θεωρητικός Διπλασιασμός και Πειραματική Συσσώρευση του DNA-στόχου κατά την PCR. 72	
Εικόνα 3-3 Ορισμός του Κατωφλιού Φθορισμού και των Τιμών Ct .....	73
Εικόνα 4-1 Κινητική αύξησης των NK παρουσία IL-15 & GC.....	78
Εικόνα 4-2 Τα GC ενισχύουν το δυναμικό πολλαπλασιασμού των NK .....	79
Εικόνα 4-3 Τα ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK είναι ανθεκτικά στην επαγόμενη από την ενεργοποίηση απόπτωση .....	80
Εικόνα 4-4 Κυτταρολυτική δράση των NK.....	81
Εικόνα 4-5 Δυναμικό αποκοκκίωσης των NK.....	82
Εικόνα 4-6 Περιεκτικότητα των NK σε Περφορίνη και Granzyme B.....	83
Εικόνα 4-7 Έκκριση κυτταροκινών .....	83
Εικόνα 4-8 Ικανότητα παραγωγής IFN-γ.....	84
Εικόνα 4-9 Έκφραση υποδοχέων NCR.....	84
Εικόνα 4-10 Έκφραση NCR υποδοχέων (MFI).....	85
Εικόνα 4-11 Έκφραση δεικτών διαφοροποίησης.....	87
Εικόνα 4-12 Έκφραση δεικτών διαφοροποίησης (συγκεντρωτικά δεδομένα) .....	88
Εικόνα 4-13 Έκφραση υποδοχέων χημειοκινών.....	90
Εικόνα 4-14 Έκφραση υποδοχέων χημειοκινών (συγκεντρωτικά αποτελέσματα) .....	91
Εικόνα 4-15 Η έκφραση του CD16 προσδιορίζει υπο-πληθυσμούς με διαφορετικό δυναμικό πολλαπλασιασμού .....	93
Εικόνα 4-16 Τα GC ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των NKG2A <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> NK.....	94
Εικόνα 4-17 Τα GC ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των CD94 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> NK.....	95
Εικόνα 4-18 Τα GC ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των CD57 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> NK .....	95
Εικόνα 4-19 Τα GC ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των CD158 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> και των CD158 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> NK κυττάρων .....	96
Εικόνα 4-20 Τα GC ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των CD117 <sup>+</sup> NK κυττάρων .....	96
Εικόνα 4-21 Δυναμικό Αύξησης Απομονωμένων NK Υποπληθυσμών .....	97
Εικόνα 4-22 Φαινοτυπικός Χαρακτηρισμός Απομονωμένων CD16 <sup>-</sup> NK κυττάρων .....	98
Εικόνα 4-23 Μειωμένος πολλα-πλασιασμός των NK κυττάρων προ-εκτεθειμένων σε HC.....	99
Εικόνα 4-24 Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των NK ρυθμίζεται από τη συνδυασμένη δράση των GC και της IL-15 .....	101
Εικόνα 4-25 Η επιβίωση των NK ρυθμίζεται από τη συνδυασμένη δράση των GC και της IL-15.....	102
Εικόνα 4-26 Συγκριτικά πρότυπα έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την απόπτωση.....	103
Εικόνα 4-27 Αυξημένη έκφραση BCL2 παρουσία IL-15 και HC .....	103
Εικόνα 4-28 Διαφορική επίδραση της HC στην απόπτωση των NK υποπληθυσμών .....	105
Εικόνα 4-29 Η ενεργοποίηση του STAT5 και ERK1/2 παρουσία GC.....	106
Εικόνα 4-30 Τα ενεργοποιημένα CD16 <sup>-</sup> NK παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης STAT5, ERK1/2, AKT και NFκB.....	107
Εικόνα 4-31 Αντίθετη Δράση της IL-15 και της HC στην Έκφραση του GILZ.....	108

<i>Εικόνα 4-32 Η ΗC αναστέλλει τη μαζική εισροή/συσσώρευση των ενεργοποιημένων NK κυττάρων στη φάση-S του κυτταρικού κύκλου.....</i>	<i>110</i>
<i>Εικόνα 4-33 Μειωμένα Επίπεδα Έκφρασης Κυκλινών E παρουσία ΗC .....</i>	<i>111</i>
<i>Εικόνα 4-34 Η ΗC επιταχύνει την πρόοδο των ενεργοποιημένων NK κυττάρων από τη φάση-S του κυτταρικού κύκλου .....</i>	<i>112</i>
<i>Εικόνα 4-35 Η ΗC επιταχύνει την πρόοδο των ενεργοποιημένων NK κυττάρων από τη φάση-S του κυτταρικού κύκλου .....</i>	<i>113</i>
<i>Εικόνα 4-36 Διαφορική έκφραση των γονιδίων <math>p21^{Waf1/Cip1}</math> και MYC στα ενεργοποιημένα παρουσία ΗC NK κύτταρα .....</i>	<i>114</i>
<i>Εικόνα 4-37 Η ΗC παρεμποδίζει την επαγόμενη από την IL-15 υπερέκφραση του παράγοντα <math>p21^{Waf1/Cip1}</math> .....</i>	<i>114</i>
<i>Εικόνα 4-38 Έκφραση του γονιδίου MYC σε υποποληθυσμούς των NK .....</i>	<i>115</i>

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ/ΣΥΜΒΟΛΩΝ

Σύντμηση	Αγγλικός Όρος	Ελληνικός Όρος
<b>AKT</b>	v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog	Ομόλογο του Ιικού Ογκογονιδίου του Θυμώματος των Τρωκτικών v-AKT
<b>B2M</b>	Beta-2 Microglobulin	β2-μικροσφαιρίνη
<b>BCL2</b>	B-Cell Lymphoma 2	B-λέμφωμα 2, γονίδιο
<b>BCLxL</b>	B-Cell Lymphoma-Extra Large	B-λέμφωμα 2-XL, γονίδιο
<b>BIM</b>	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death	Διαμεσολαβητής Κυτταρικού Θανάτου κατόπιν Αλληλεπίδρασης με BCL2
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridine	Βρωμοδεοξουριδίνη
<b>CD</b>	Cluster Designation	Χαρακτηρισμός Ομάδας
<b>cDNA</b>	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester	Ηλεκτριμιδυλικός Εστέρας Καρβοξυφλουοροσκεΐνης
<b>c-Kit</b>	v-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	Ομόλογο του Ιικού Ογκογονιδίου του Σαρκώματος των Αιλουροειδών v-Kit Hardy-Zuckerman 4
<b>CTL</b>	Cytotoxic T Lymphocyte	Κυτταροτοξικά Τ Λεμφοκύτταρο
<b>DC</b>	Dendritic Cell	Δενδριτικό Κύτταρο
<b>Dex</b>	Dexamethasone	Δεξαμεθαζόνη
<b>DNAM-1</b>	DNAX Accessory Molecule-1	DNAX Βοηθητικό Μόριο-1
<b>ERK</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase	Κινάση Ρυθμιζόμενη από Εξωκυττάρια Σήματα
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting	Διαλογέας Κυττάρων Ενεργοποιημένος από Φθορισμό
<b>FAS</b>	Apoptosis Stimulating Fragment	Θραύσμα Επαγωγής της Απόπτωσης
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum	Εμβρυικός Ορός Μόσχου

<b>Flt3</b>	fms-related tyrosine kinase 3	Fms-σχετιζόμενη Κινάση της Τυροσίνης 3
<b>GC</b>	Glucocorticoid	Γλυκοκορτικοειδές
<b>GILZ</b>	Glucocorticoid Induced Leucine Zipper protein	Επαγόμενη από Γλυκοκορτικοειδή Πρωτεΐνη με δομικό μοτίβο "Φερμουάρ" Λευκίνης
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	Παράγοντας Διέγερσης Κοκκιοκυτταρικών και Μονοκυτταρικών Αποικιών
<b>HC</b>	Hydrocortisone	Υδροκορτιζόνη
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen	Αντιγόνο Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων
<b>HPC</b>	Hematopoietic Progenitor Cell	Αιμοποιητικό Προγονικό Κύτταρο
<b>HSCT</b>	Hematopoietic Stem Cell Transplantation	Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Αρχέγονων Κυττάρων
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1	Διακυτταρικό Μόριο Προσκόλλησης 1
<b>IFN</b>	Interferon	Ιντερφερόνη
<b>IL</b>	Interleukin	Ιντερλευκίνη
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif	Τυροσινο-βασιζόμενο Ενεργοποιητικό Μοτίβο των Ανοσο-υποδοχέων
<b>ITIM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif	Τυροσινο-βασιζόμενο Ανασταλτικό Μοτίβο των Ανοσο-υποδοχέων
<b>KIR</b>	Killer Ig-like Receptor	Ανοσοσφαιρινικός Υποδοχέας Θανάτωσης
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte Function-associated Antigen 1	Λειτουργικό Αντιγόνο Λεμφοκυττάρων 1
<b>LIR</b>	Leukocyte Ig-like Inhibitory Receptor	Ανοσοσφαιρικός Ανασταλτικός Υποδοχέας των Λευκοκυττάρων
<b>LPAM</b>	Lymphocyte Peyer's patch Adhesion Molecule	Μόριο Προσκόλλησης Λεμφοκυττάρων των Πλακών Peyer
<b>MCP</b>	Monocyte Chemotactic Proteins	Χημειοτακτική Πρωτεΐνη των Μονοκυττάρων



<b>MeP</b>	Methylprednisolone	Μεθυλπρεδνιζολόνη
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
<b>MIP</b>	Macrophage Inflammatory Protein	Φλεγμονώδης Πρωτεΐνη Μακροφάγων
<b>mRNA</b>	Messenger RNA	Αγγελιοφόρο RNA
<b>NCR</b>	Natural Cytotoxic Receptors	Υποδοχείς Φυσικής Κυτταροτοξικότητας
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Πυρηνικός Παράγοντας του Ενισχυτή της Καππα Ελαφριάς Αλυσίδας των Ενεργοποιημένων Β Λεμφοκυττάρων
<b>NK</b>	Natural Killer cell	Φυσικό Φονικό κύτταρο
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell	Μονοπύρηνια Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών
<b>PFA</b>	Paraformaldehyde	Παραφορμαλεϋδη
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction	Ποσοστική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
<b>SFI</b>	Specific Fluorescent Intensity	Ειδική Ένταση Φθορισμού
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription	Μεταγωγέας Σήματος και Ενεργοποιητής της Μεταγραφής
<b>TCR</b>	T Cell Receptor	Υποδοχέας των Τ λεμφοκυττάρων
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor	Αυξητικός Παράγοντας Μετασηματισμού
<b>TIL</b>	Tumor Infiltrating Lymphocytes	Λεμφοκύτταρα που διηθούν κακοήθεις Όγκους
<b>TLR</b>	Toll-like Receptors	Υποδοχέας Τύπου Toll
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων
<b>TRAIL</b>	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand	Πρόσδεμα Επαγωγής της Απόπτωσης Σχετιζόμενο με τον TNF
<b>Treg</b>	Regulatory T cell	Ρυθμιστικά Τ Λεμφοκύτταρα
<b>T<sub>H</sub></b>	T Helper cell	Βοηθητικά Τ Λεμφοκύτταρα



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Εισαγωγή

Τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK, Natural Killer cells) είναι δραστικά λεμφοκύτταρα της έμφυτης ανοσίας, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των ικών μολύνσεων και της ανάπτυξης των όγκων<sup>1</sup>. Η αντι-ική και αντι-καρκινική δράση των NK κυττάρων δεν οφείλεται μονάχα στην ικανότητά τους να σκοτώσουν τα κύτταρα-στόχους, αλλά επίσης και στις ρυθμιστικές τους ιδιότητες στην εκκίνηση και τροποποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων, μέσω των εκκρινόμενων κυτταροκινών και χημειοκινών<sup>2,3</sup>. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα NK κύτταρα επιδεικνύουν ανοσολογική μνήμη, μια ιδιότητα των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας<sup>4</sup>.

Τα NK κύτταρα αποτελούν έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό από άποψη φαινοτυπική, λειτουργική, πολλαπλασιαστικού δυναμικού και κατανομής στους ιστούς. Στο περιφερικό αίμα του ανθρώπου έχουν χαρακτηριστεί δυο κύριοι υποπληθυσμοί, οι οποίοι διακρίνονται βάσει της έκφρασης του υποδοχέα CD16 και της επιφανειακής πυκνότητας έκφρασης του δείκτη CD56: (α) ο επικρατής (~90%) CD56<sup>dim</sup>(CD16<sup>+</sup>) πληθυσμός που παρουσιάζει έντονη κυτταροτοξική δραστικότητα, και (β) ο σχετικά ανώριμος CD56<sup>bright</sup>(CD16<sup>-</sup>) πληθυσμός που παρουσιάζει υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και παραγωγής κυτταροκινών<sup>5</sup>. Τα CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK είναι εξελικτικά πιο ώριμα κύτταρα και θεωρείται ότι προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων<sup>6</sup>. Οι παραπάνω δυο υποπληθυσμοί μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω βάσει επιπρόσθετων φαινοτυπικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών<sup>7,8</sup>. Ο χαρακτηρισμός των εγγενών και εξωγενών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των NK προς λειτουργικά καθορισμένους υποπληθυσμούς, αποτελεί προϋπόθεση για την πιο αποτελεσματική εκμετάλλευση της πλειοτροπικής και δυναμικής φύσης αυτών των κυττάρων στην καταπολέμηση των ικών/παρασιτικών μολύνσεων, αυτοάνοσων ασθενειών και του καρκίνου.

Πρόσφατα, η απομόνωση και η *ex vivo* ανάπτυξη πρωτογενών NK κυττάρων έχουν καταστήσει δυνατή την αξιοποίηση αυτών των κυττάρων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου<sup>9,10</sup>. Ωστόσο, η απόκτηση επαρκούς αριθμού ενεργοποιημένων NK κυττάρων παραμένει ένας περιοριστικός παράγοντας σε τέτοιου είδους θεραπείες. Επίσης, οι ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, μέσω χορήγησης γλυκοκορτικοειδών (GC, Glucocorticoids), αποτελούν ένα ακόμα εμπόδιο στην εφαρμογή παθητικών ανοσοθεραπευτικών σχημάτων.

Τα GC αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια στεροειδών ορμονών που συμμετέχει στη διαμόρφωση των ανοσολογικών αποκρίσεων<sup>11</sup>. Η πιο επιφανής δράση των GC, η οποία αποτελεί τη βάση της φαρμακολογικής τους χρήσης ως αντι-φλεγμονώδη, είναι η ανοσοκαταστολή<sup>12</sup>. Τα GC εκδηλώνουν τις αντι-φλεγμονώδεις τους ιδιότητες κυρίως μέσω επαγωγής της απόπτωσης<sup>13-15</sup>, της ρύθμισης της παραγωγής κυτταροκινών<sup>16</sup>, της αναστολής της έκφρασης επιφανειακών μορίων πρόσδεσης<sup>17</sup>, την παρεμπόδιση της υπερέκφρασης του προσδέματος CD40 στα ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα<sup>18</sup>, και της άμεσης καταστολής των πρώιμων σηματοδοτικών γεγονότων από τον υποδοχέα TCR<sup>19</sup>.

Συχνά τα GC χορηγούνται σε καρκινοπαθείς, σε συνδυασμό με άλλες θεραπευτικές αγωγές, για την αντιμετώπιση ποικιλίας συμπτωμάτων. Το δυναμικό των GC να καταστειλούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις θεωρείται μειονέκτημα στην παθητική ανοσοθεραπεία με NK κύτταρα. Όμως, παρότι τα GC θεωρείται να μεταδίδουν κατασταλτικά σήματα, η δράση τους στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι μάλλον διττή. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός των παραγόντων που καθορίζουν τη δράση των GC στα επιμέρους κυτταρικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ιδιαίζουσας σημασίας για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Ο διττός ρόλος των GC έχει δειχθεί αρχικά από την δράση της δεξαμεθαζόνης (Dex, dexamethasone), ενός συνθετικού GC, σε υβριδωματικά T κύτταρα καθώς και σε πρωτογενή T λεμφοκύτταρα. Έτσι, παρότι η Dex επάγει την απόπτωση και στα δυο είδη κυττάρων, μπορεί επίσης να ανταγωνιστεί την επαγόμενη από άλλα ερεθίσματα (π.χ. αντι-CD3) απόπτωση<sup>20</sup>. Η ισχυρή υπερέκφραση του γονιδίου του IL-7Rα υποδοχέα που προκαλείται από τα GC στα T λεμφοκύτταρα, αποτελεί ένα άλλο παράδειγμα θετικής επίδρασης των GC στο ανοσολογικό σύστημα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η IL-7 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων<sup>21</sup>. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα GC

μπορούν να επιταχύνουν την επαγόμενη από τη δέσμευση του TCR υποδοχέα μιτογένεση των λεμφοκυττάρων<sup>22</sup>. Ο Hinrichs *et al* έχουν αναφέρει ότι η Dex δεν παρουσιάζει καμιά επίπτωση στον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των ενεργοποιημένων pmel-1-ειδικών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων, και μάλιστα αυτά τα κύτταρα μπορούν να μεταμοσχευθούν επιτυχώς σε ποντίκια που φέρουν B16 όγκους μελανώματος και λαμβάνουν Dex<sup>23</sup>. Επιπλέον, σε μια κλινική δοκιμή εμβολιασμού ασθενών με καρκίνο του προστάτη παρατηρήθηκε μια συνέργεια στις ανοσοαποκρίσεις μεταξύ ενεργού εμβολιασμού και της χορήγησης GC<sup>24</sup>. Επιπρόσθετα, μελέτες υποστηρίζουν τη θετική επίδραση των GC στη διαφοροποίηση των ανώριμων πρόδρομων NK κυττάρων προς λειτουργικά ώριμα NK<sup>25-27</sup>. Και τέλος, έχει αναφερθεί ότι η υδροκορτιζόνη (HC, hydrocortisone) σε συνδυασμό με την IL-15 ενισχύει σημαντικά τον πολλαπλασιαστικό δυναμικό των περιφερικών CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK κυττάρων χωρίς να επιφέρει καμιά επίπτωση στη λειτουργική τους δράση<sup>28</sup>. Μάλιστα, τα κύτταρα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε μια κλινική μελέτη φάσης I για την παθητική ανοσοθεραπεία ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα<sup>29</sup>, καθώς και σε ένα προκλινικό μοντέλο μεταστατικού καρκίνου του πνεύμονα<sup>30</sup>. Και στις δυο περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί ότι τα ενεργοποιημένα παρουσία της IL-15 και HC NK κύτταρα έχουν σημαντικό αντικαρκινικό δυναμικό.

Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία οι οποίες υποστηρίζουν την ανασταλτική δράση των GC σε ανθρώπινα NK κύτταρα. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η μεθυλπρεδνιζολόνη (MeP, methylprednisolone) αναστέλλει τόσο την ικανότητα πολλαπλασιασμού όσο και τη λειτουργική δράση των ενεργοποιημένων με IL-2 ή IL-15 NK κυττάρων<sup>31,32</sup>. Επιπρόσθετα, NK από ασθενείς, που λαμβάνουν φαρμακολογικές δόσεις GC, παρουσιάζουν μειωμένο λειτουργικό και πολλαπλασιαστικό δυναμικό<sup>32</sup>. Από την άλλη μεριά, είναι γνωστό ότι τα κυκλοφορούντα NK κύτταρα εκτίθενται συνεχώς σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις κορτιζόλης, που κυμαίνονται μεταξύ  $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  M ή και σε υψηλότερες τιμές κατά τη διάρκεια στρεσογόνων καταστάσεων<sup>33</sup>, αλλά συγχρόνως διατηρούν τη λειτουργική τους ακεραιότητα.

Υπό το πρίσμα αυτών των αντικρουόμενων δημοσιευμάτων, στην εργασία αυτή θα προσπαθήσουμε να διαλευκάνουμε τα παρακάτω ερωτήματα:

- Μπορεί οι βιβλιογραφικές αποκλίσεις να οφείλονται σε διαφορετική βιολογική δράση των χρησιμοποιούμενων συνθετικών GC;

- Πώς ανταποκρίνονται οι υποπληθυσμοί των NK κυττάρων στην ενεργοποίηση με IL-15 και GC;
- Ποιός ο ρόλος των GC στην ομοίωση των NK κυττάρων;
- Πώς τα GC επηρεάζουν την απόπτωση των ενεργοποιημένων NK κυττάρων και ποιοι παράγοντες εμπλέκονται στη ρύθμισή της;
- Ποιά είναι η επίδραση των GC στον κυτταρικό κύκλο των NK κυττάρων και ποιοί είναι οι μεσολαβητές της δράσης αυτής;
- Τί αντίκτυπο θα μπορούσε να έχει η χρήση των ενεργοποιημένων με IL-15 και GC NK κυττάρων στην παθητική ανοσοθεραπεία του καρκίνου;

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Ανασκόπηση της Βιβλιογραφίας

### 2.1 Φυσικά Φονικά Κύτταρα: Ανασκόπηση του Ρόλου, της Ποικιλομορφίας και των Λειτουργιών τους

Τα Φυσικά Φονικά κύτταρα (Natural Killer cells, NK) αντιπροσωπεύουν τον τρίτο μεγαλύτερο πληθυσμό λεμφοκυττάρων στα θηλαστικά και είναι κρίσιμα για τις έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις<sup>34</sup>. Χαρακτηρίζονται από την έκφραση μιας ποικιλίας επιφανειακών υποδοχέων, ανασταλτικών ή ενεργοποιητών, που καθορίζουν τη λειτουργία τους<sup>35</sup>. Πρόκειται για μεγάλα, κοκκιώδη λεμφοκύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών ή τους λεμφαδένες. Τα NK κύτταρα διαφοροποιούνται από τα T και B λεμφοκύτταρα μορφολογικά, φαινοτυπικά και βάσει των λειτουργικών ιδιοτήτων τους. Επίσης, σε αντίθεση με τα T και B λεμφοκύτταρα, δεν απαιτούν προηγούμενη ευαισθητοποίηση για να εκδηλώσουν τη δράση τους<sup>36</sup>. Τα NK κύτταρα απαντώνται στο αίμα ως κυκλοφορούντα κύτταρα και σε άλλα όργανα του σώματος ως μόνιμα κύτταρα<sup>37,38</sup>.

Οι βιολογικές λειτουργίες των NK μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: (1) *Κυτταροτοξικότητα* – Τα NK κύτταρα μπορούν να σκοτώσουν ορισμένα επιμολυσμένα από ιούς κύτταρα και μετασχηματισμένα κύτταρα ανεξάρτητα από την έκφραση των MHC υποδοχέων<sup>39</sup>. Τα NK διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό κυτταρολυτικών κοκκίων (εκκριτικά λυσοσωμάτια) που περιέχουν περφορίνη και διάφορα μεγαλοένζυμα (Granzyme). Μετά από την επαφή μεταξύ του NK κυττάρου και του κυττάρου-στόχου τα λυτικά κοκκία εκκρίνονται στη λεγόμενη ανοσολογική σύναψη για να προκαλέσουν λύση. Παρότι η εξαρτώμενη από τη περφορίνη κυτταροτοξικότητα αποτελεί τον κύριο μηχανισμό λύσης, τα NK κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν και άλλους μηχανισμούς μεσολαβούμενους από το FASL, TNF ή TRAIL; (2) *Έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών* – Τα NK είναι περισσότερο γνωστά για την ικανότητά τους να παράγουν IFN-γ, όμως παράγουν μια πληθώρα άλλων κυτταροκινών και χημειοκινών συμπεριλαμβανομένων των TNF-α,

GM-CSF, IL-5, IL-13, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b) και CCL5 (RANTES)<sup>40-42</sup>. Η κυτταροτοξικότητα και η έκκριση κυτταροκινών μεσολαβούνται από δυο διαφορετικούς υποπληθυσμούς των ανθρώπινων NK κύτταρων που χαρακτηρίζονται από την ένταση της έκφρασης του επιτόπου CD56 στην κυτταρική τους επιφάνεια; και (3) *Κυτταρική συν-διέγερση εξαρτώμενη από επαφή* – Τα NK κύτταρα εκφράζουν διάφορα προσδέματα με συν-διεγερτική δράση, όπως το CD40L (CD154) και OX40L, τα οποία τους επιτρέπουν να παρέχουν συν-διεγερτικά σήματα στα T ή B λεμφοκύτταρα<sup>43,44</sup>. Έτσι, τα NK λειτουργούν ως μια γέφυρα σε ένα κύκλωμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας. Τα δενδριτικά κύτταρα (DC, Dendritic Cells) ενεργοποιούν τα NK, τα οποία με τη σειρά τους συντελούν στην βέλτιστη διέγερση των T και B λεμφοκυττάρων.

Σύμφωνα με την επικρατούσα θεώρηση, η ενεργοποίηση και η καταστολή της δράσης των NK βασίζεται στη συντονισμένη δράση ειδικών υποδοχέων ενεργοποίησης και καταστολής. Το ισοζύγιο των ενεργοποιητικών και κατασταλτικών σημάτων που δέχεται το NK κύτταρο καθορίζει την τελική έκβαση της αλληλεπίδρασης των NK με τα κύτταρα-στόχους. Τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού προστατεύονται από την κυτταροτοξική δράση των NK, όταν σήματα που πυροδοτούνται από ενεργοποιητικούς υποδοχείς εξισορροπούνται από κατασταλτικά σήματα προερχόμενα από μόρια MHC τάξης I του εαυτού. Εάν, όμως, ένα κύτταρο-στόχος χάσει την έκφραση των μορίων MHC τάξης I (ως επακόλουθο του μετασχηματισμού ή επιμόλυνσης), τότε τα διεγερτικά σήματα προερχόμενα από το κύτταρο-στόχο επικρατούν, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των NK και την επακόλουθη λύση του κυττάρου-στόχου (missing-self recognition). Ο μετασχηματισμός και η επιμόλυνση μπορούν να επάγουν την υπερέκφραση διεγερτικών προσδεμάτων, έτσι ώστε η συνεχής καταστολή προερχόμενη από τους ανασταλτικούς υποδοχείς να καταβληθεί (induced-self recognition). Σε πολλές περιπτώσεις, αυτοί οι δυο μηχανισμοί αναγνώρισης λειτουργούν συνεργικά παρέχοντας στα NK κύτταρα τη μέγιστη ικανότητα να διακρίνουν τα υγιή κύτταρα του εαυτού από τα μετασχηματισμένα ή μολυσμένα κύτταρα-στόχους<sup>45</sup>.

Στο παρελθόν, η κύρια λειτουργία των NK κυττάρων είχε σχετιστεί αποκλειστικά με την ικανότητά τους να σκοτώσουν μολυσμένα από ιούς κύτταρα ή καρκινικά κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, όμως, έχει δειχθεί πως τα NK παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή έναντι ενδοκυττάρων παθογόνων, στην



απόρριψη μοσχευμάτων μυελού των οστών, στην αναπαραγωγή και στην μητρική (ανοσο)ανοχή του εμβρύου<sup>36</sup>.

### **2.1.1 Οντογένεση των Ανθρώπινων NK κυττάρων**

Τα NK κύτταρα πιστεύεται πως έχουν σχετικά μικρό χρόνο ημι-ζωής και ως εκ τούτου πρέπει να αναπληρώνονται συνεχώς προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόστασή τους<sup>46,47</sup>. Ενώ είναι ξεκάθαρο ότι τα NK κύτταρα προέρχονται από το ίδιο CD34<sup>+</sup> αιματοποιητικό προγονικό κύτταρο (HPC, hematopoietic progenitor cell) όπως τα B και T λεμφοκύτταρα, οι θέσεις στις οποίες συντελείται η ανάπτυξη και ωρίμανσή τους δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί πλήρως<sup>48,49</sup>, παρότι πρόσφατες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι, πέρα από το μυελό των οστών, και τα δευτερογενή λεμφοποιητικά όργανα (όπως οι λεμφαδένες) παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των NK<sup>50,51</sup>.

#### ***Ανάπτυξη των NK κυττάρων στο Μυελό των Οστών***

Η ανάπτυξη των NK συμβαίνει πρωταρχικά στο μυελό των οστών, το περιβάλλον του οποίου (άλλα αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και κύτταρα του στρώματος) προσφέρει τα κατάλληλα σήματα για την προώθηση της επιβίωσης, της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους σε ενδιάμεσους κυτταρικούς τύπους<sup>47,52</sup>. Ο μυελός των οστών είναι εμπλουτισμένος σε CD34<sup>+</sup> HPC, συμπεριλαμβανομένου και ενός κλάσματος των προδρομικών NK κυττάρων (των pre-NK)<sup>53</sup>. Τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταδιακή λειτουργική ωρίμανση των NK<sup>54</sup> κυρίως δημιουργώντας ένα μικρο-περιβάλλον από κυτταροκίνες κρίσιμες για την ανάπτυξη των NK. Η ιντερλευκίνη 15 (interleukin IL-15), η οποία παράγεται από τα κύτταρα του στρώματος, διευκολύνει τη διαφοροποίηση σε κυτταρολυτικά NK κύτταρα από CD34<sup>+</sup> HPC προερχόμενα από το εμβρυικό ήπαρ, το μυελό των οστών, το θύμο αδένα, το αίμα του ομφάλιου λώρου, το περιφερικό αίμα ενήλικα ή τους λεμφαδένες<sup>55-57</sup>.

Άλλοι παράγοντες, εκκρινόμενοι από τα κύτταρα του στρώματος, που ενισχύουν την ανάπτυξη των NK είναι το πρόσδεμα του υποδοχέα c-kit (c-kit ligand, KL) και το πρόσδεμα του υποδοχέα flt3 (flt3 ligand, FL). Οι παράγοντες αυτοί, έχουν

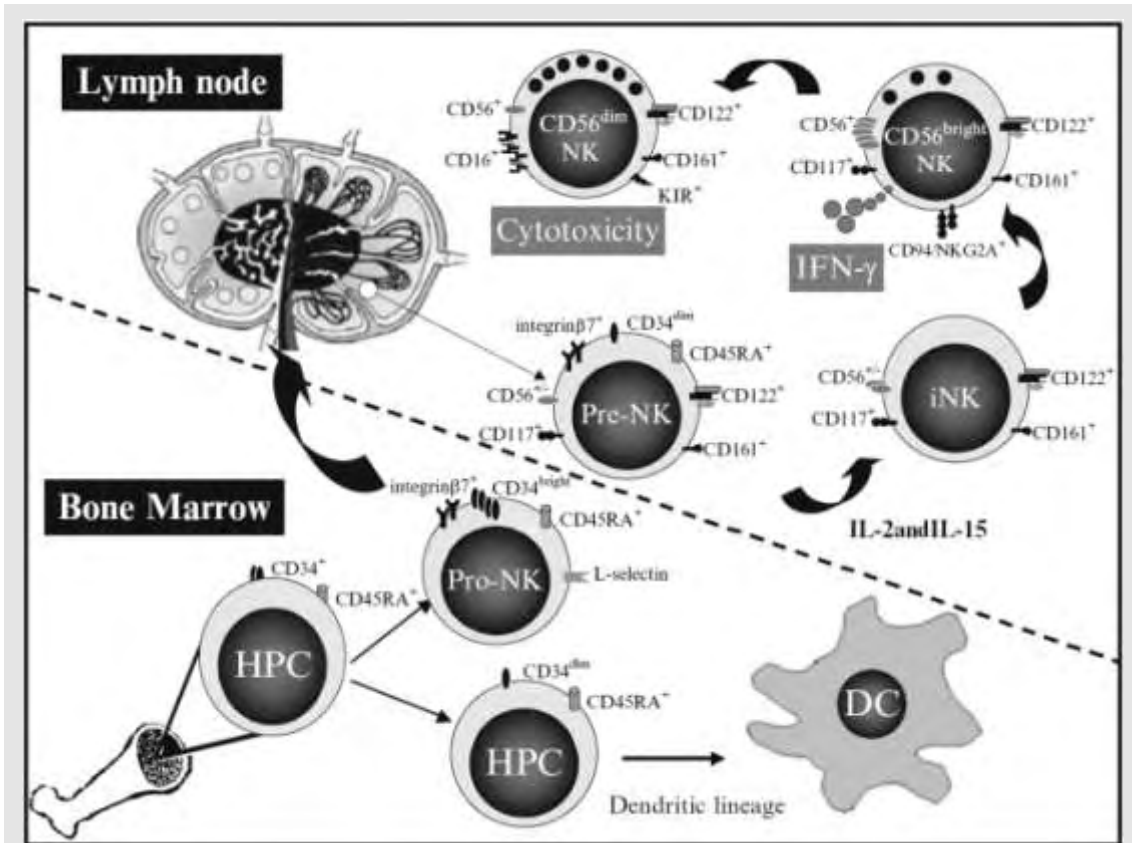
δειχθεί, να ενισχύουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των NK κυττάρων από τα πρόδρομα CD34<sup>+</sup> HPC σε συνδυασμό με την IL-15, ενώ από μόνοι τους δεν έχουν καμιά επίδραση στη διαφοροποίηση των NK<sup>56,58,59</sup>.

### *Ανάπτυξη των NK κυττάρων στους Λεμφαδένες*

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι οι λεμφαδένες μπορεί να αποτελούν μια επιπλέον σημαντική θέση για τη διαφοροποίηση των NK. Οι λεμφαδένες είναι φυσικά και επιλεκτικά εμπλουτισμένοι σε CD34<sup>dim</sup>CD45RA<sup>+</sup> HPC πρόδρομα κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε CD56<sup>bright</sup> NK κύτταρα παρουσία της IL-2 ή IL-15<sup>60</sup>. Επιπρόσθετα, αυτά τα CD34<sup>dim</sup>CD45RA<sup>+</sup> HPC πρόδρομα κύτταρα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης μορίων πρόσδεσης, όπως η L-σελεκτίνη (CD62L) και η α4/β7-ιντεγκρίνη (LPAM), γνωστών ως υποδοχέων επικοισμού (homing receptors). Επίσης, μέσα στους λεμφαδένες τα CD34<sup>dim</sup>CD45RA<sup>+</sup> HPC κύτταρα συν-εντοπίζονται μαζί με τα CD56<sup>bright</sup> NK στις παραθυλακικές περιοχές, οι οποίες είναι εμπλουτισμένες σε T λεμφοκύτταρα<sup>58,60</sup>. Η ενδογενής IL-2 προερχόμενη από τα T λεμφοκύτταρα μπορεί να πυροδοτήσει τα CD56<sup>bright</sup> NK κύτταρα να εκκρίνουν IFN-γ<sup>61</sup>. Με δεδομένο πως μόνο ο CD56<sup>bright</sup> υποπληθυσμός των NK εκφράζει μόνιμα τον υποδοχέα υψηλής συγγένειας της IL-2 (CD25)<sup>62</sup>, μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει γιατί στους λεμφαδένες τα CD34<sup>+</sup> HPC κύτταρα διαφοροποιούνται επιλεκτικά σε CD56<sup>bright</sup> NK και όχι σε CD56<sup>dim</sup> NK κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ασθενώς ως απόκριση σε υψηλές δόσεις της IL-2<sup>63</sup>.

Στην *Εικόνα 2-1* παριστάνεται ο μηχανισμός ανάπτυξης και διαφοροποίησης των NK, όπως αυτός προτάθηκε από τους Freud *et al*<sup>64</sup>. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των NK πραγματοποιούνται στο μυελό των οστών υπό την επίδραση παραγόντων προερχόμενων από τα κύτταρα του στρώματος, οι οποίοι καθοδηγούν την πρόωμη διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> HPC σε CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>α4/β7<sup>+</sup> NK πρόδρομα κύτταρα. Τα τελευταία, εκφράζοντας μόρια πρόσδεσης, μεταναστεύουν ταχέως στους λεμφαδένες, όπου υπό την επίδραση της IL-2, εκκρινόμενης από τα T λεμφοκύτταρα, διαφοροποιούνται σε CD56<sup>bright</sup> NK, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε CD56<sup>dim</sup> NK. Το ταξίδι από το μυελό των οστών στους λεμφαδένες φαίνεται να είναι σημαντικό για τη διαφοροποίηση των NK, καθώς το περιφερικό

αίμα φαίνεται να είναι περισσότερο εμπλουτισμένο σε pre-NK κύτταρα συγκριτικά με το μυελό των οστών<sup>60</sup>.



### Εικόνα 2-1 Στάδια οντογένεσης των NK in vivo

Τα NK προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (Bone Marrow) και ολοκληρώνουν τη διαφοροποίησή τους στους λεμφαδένες (Lymph Nodes). Καθώς τα NK κύτταρα προοδεύουν από το στάδιο 1 στο στάδιο 3, η διαφοροποίησή τους περιορίζεται αποκλειστικά στο NK γενεαλογικό μονοπάτι, και χάνουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε T λεμφοκύτταρα ή δενδριτικά κύτταρα (DC). Στα στάδια 3-5, τα NK υφίστανται λειτουργική ωρίμανση προς  $CD56^{bright}$  και  $CD56^{dim}$ .<sup>65</sup>

### Στάδια διαφοροποίησης των NK

Τα αναπτυξιακά στάδια των NK, παρότι όχι πλήρως καθορισμένα, έχουν προσδιοριστεί βάσει της διαφορικής κινητικής έκφρασης ορισμένων μορίων επιφανείας. Οι Freud *et al.*<sup>64</sup> βασισμένοι στο γεγονός ότι (α) πάνω από το 90% των

NK που βρίσκονται στους λεμφαδένες εκφράζουν τουλάχιστον τους δείκτες CD34, CD117 και/ή CD94, (β) το CD34 και το CD94 είναι ανεξάρτητοι αντιγονικοί δείκτες, υποδηλώνοντας ότι τα ενδιάμεσα στάδια διαφοροποίησης των NK πρώτα θα χάσουν την έκφραση του CD34 και μετά θα αποκτήσουν το δείκτη CD94, (γ) η λειτουργική ωρίμανση των NK (κυτταροτοξικότητα και έκκριση IFN- $\gamma$ ) καθώς και η έκφραση του δείκτη CD56 συμβαίνουν στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης<sup>66,67</sup>, έχουν προτείνει μια σειρά μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση των διακριτών σταδίων ανάπτυξης των NK, όπως παριστάνεται στην *Εικόνα 2-2*. Πρέπει να σημειώσουμε πως μόνο τα ανώριμα NK (iNK, immature NK) είναι αποκλειστικά δεσμευμένα (committed) προς διαφοροποίηση σε NK κύτταρα, καθώς έχει βρεθεί ότι τα CD34<sup>dim</sup>CD117<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup> και τα CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+/-</sup>CD94<sup>-</sup> υπό τις κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκυτταρικά DC (pDC, plasmacytoid DC)<sup>60</sup> και T λεμφοκύτταρα<sup>64</sup>, αντίστοιχα.

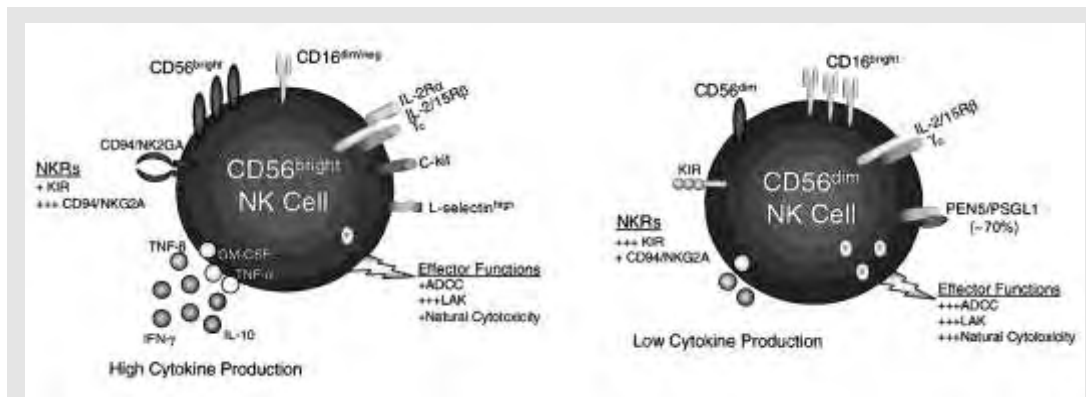
Stage 1 (Pro-NK)	Stage 2 (Pre-NK)	Stage 3 (iNK)	Stage 4 (CD56 <sup>brigh</sup> )	Stage 5 (CD56 <sup>dim</sup> )
CD34 (+)	CD34(+)	CD34 (-)	CD34(-)	CD34 (-)
CD117 (-)	CD117 (+)	CD117 (+)	CD117 (+/-)	CD117 (-)
CD94 (-)	CD94 (-)	CD94 (-)	CD94 (+)	CD94 (+/-)
CD16 (-)	CD16 (-)	CD16 (-)	CD16(-)	CD16 (+)

### ***Εικόνα 2-2 Στάδια διαφοροποίησης των NK***

*Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους κύριους υποπληθυσμούς των NK κατά τη διαδικασία οντογένεσής τους<sup>65</sup>. Η εικόνα δείχνει τους σημαντικότερους δείκτες.*

### 2.1.2 Λειτουργικά Ποικιλόμορφοι Κυτταρικοί Υποπληθυσμοί των NK στον Άνθρωπο

Μετά την ολοκλήρωση της λειτουργικής ωρίμανσής τους, τα NK εγκαθίστανται στα λεμφοειδή όργανα της περιφέρειας και μέσω του αίματος και της λέμφου κυκλοφορούν σε ολόκληρο το σώμα. Τα ώριμα NK αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό κλάσμα των κυκλοφορούντων NK κυττάρων στον άνθρωπο<sup>68</sup>. Δυο κύριοι υποπληθυσμοί των NK μπορούν να προσδιοριστούν με βάση τη διαφορική έκφραση του CD16 (FcγRIII) και του CD56 (N-CAM) στην επιφάνεια των κυκλοφορούντων CD3<sup>-</sup> λεμφοκυττάρων: τα CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK κύτταρα αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 90% των NK του αίματος, ενώ το υπόλοιπο 10% χαρακτηρίζεται ως CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK<sup>69</sup>. Φαινοτυπικά τα CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK εκφράζουν CD94/NKG2A, CCR7, CD62L, CD25, και CD117 αλλά τα περισσότερα στερούνται της έκφρασης των KIR υποδοχέων, ενώ τα CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK είναι CD94/NKG2A<sup>+/-</sup> και KIR<sup>+</sup> αλλά δεν εκφράζουν CCR7, CD62L, CD25, ή CD117<sup>63,70-76</sup> (Εικόνα 2-3). Αυτοί οι δύο υποπληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορετική λειτουργία καθώς τα CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες και μεγαλύτερη ποικιλία κυτταροκινών (IFN-γ, GM-CSF, IL-13, TNF-α και IL-10) απ' ό,τι τα CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK<sup>5,71,77</sup>. Αντίθετα, τα CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK διαθέτουν άφθονα κυτταροπλασματικά αποθέματα περφορίνης και μεγαλοενζύμων και παρουσιάζουν αυξημένη κυτταροτοξικότητα<sup>69,74,77</sup>. Ο λειτουργικός αυτός διαχωρισμός των δύο υποπληθυσμών είναι σχετικός με δεδομένο πως και οι δυο διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν κυτταροκίνες και να κυτταρολύουν NK-ευαίσθητα κύτταρα-στόχους<sup>69</sup>.



**Εικόνα 2-3 Φαινοτυπική και λειτουργική διαφοροποίηση των  $CD56^{bright}$  vs.  $CD56^{dim}$**

Σχηματική απεικόνιση των σημαντικότερων φαινοτυπικών και λειτουργικών διαφορών ανάμεσα στα  $CD56^{bright}$  (αριστερά) και  $CD56^{dim}$  (δεξιά) NK κυττάρων<sup>5</sup>.

Το κατά πόσο αυτοί οι δύο καλά καθορισμένοι υποπληθυσμοί των NK συνδέονται μεταξύ τους με μια σχέση «προδρόμου – προϊόντος» ή είναι αποτέλεσμα ανεξάρτητων μονοπατιών διαφοροποίησης των NK κυττάρων, είναι ακόμα υπό συζήτηση. Μια σειρά από ενδείξεις, ωστόσο, υποστηρίζει ότι τα  $CD56^{bright}CD16^{-}$  NK αποτελούν πρόδρομο των  $CD56^{dim}CD16^{+}$  NK κυττάρων. Πρώτον, έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό των  $CD56^{bright}CD16^{-}$  NK είναι αυξημένο στο αίμα των ασθενών αμέσως μετά από τη μεταμόσχευση μυελού των οστών και μειώνεται σταδιακά με το χρόνο καθώς ο  $CD56^{dim}$  υποπληθυσμός γίνεται πιο επικρατής<sup>78-80</sup>. Δεύτερον, το μήκος των τελομερών, που ως γνωστόν ελαττώνεται με τις κυτταρικές διαιρέσεις και την κυτταρική γήρανση, είναι σημαντικά μικρότερος στα  $CD56^{dim}CD16^{+}$  NK σε σύγκριση με των  $CD56^{bright}CD16^{-}$  NK κυττάρων του ίδιου δότη<sup>81</sup>. Τρίτον, μεταμόσχευση των  $CD56^{bright}CD16^{-}$  NK κυττάρων σε NOD/SCID ποντίκια οδηγεί κυρίως στην παραγωγή  $CD56^{dim}CD16^{+}$  NK<sup>6</sup>. Το τελευταίο έχει επιπλέον παρατηρηθεί και *in vitro* (παρότι σε μικρότερη ένταση) όπου τα  $CD56^{bright}CD16^{-}$  NK υιοθετούν το φαινότυπο των  $CD56^{dim}CD16^{+}$  NK κατόπιν συν-καλλιέργειας με ινοβλάστες<sup>6</sup>. Παρά τις παρατηρήσεις αυτές, το ενδεχόμενο της ύπαρξης ενός κοινού πρόδρομου κυττάρου, που μπορεί να δώσει γέννηση στους δύο αυτούς υποπληθυσμούς, δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Η κατανόηση των μηχανισμών και παραγόντων που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των  $CD56^{bright}CD16^{-}$  NK προς  $CD56^{dim}CD16^{+}$  NK *in vivo* μπορεί να

βοηθήσει στην προσαρμογή των ανθρώπινων ανοσοθεραπειών έναντι ορισμένων ασθενειών, για παράδειγμα τροποποιώντας τη σχετική αναλογία των «κυτταροτοξικών» έναντι «εκκριτικών» NK κυττάρων.

### **2.1.3 Υποδοχείς των NK κυττάρων**

Όπως προαναφέρθηκε, τα NK είναι λεμφοκύτταρα καλά εξοπλισμένα για την εξόντωση των καρκινικών και μολυσμένων από ιούς κυττάρων. Η σύνθετη «μηχανή θανάτωσης» των NK ρυθμίζεται από σήματα που δέχονται τα NK τόσο από ανασταλτικούς όσο και από διεγερτικούς υποδοχείς. Οι ανασταλτικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των φυσιολογικών κυττάρων του οργανισμού ως μέσο προστασίας των υγιών κυττάρων από πιθανή επίθεση από τα NK. Οι κλασικοί ανασταλτικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν μόρια MHC τάξης I, αλλά σε πρόσφατες έρευνες έχουν ταυτοποιηθεί ανασταλτικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν προσδέματα μη-MHC. Οι διεγερτικοί υποδοχείς, από την άλλη, αναγνωρίζουν μόρια προερχόμενα από παθογόνους οργανισμούς, ή επαγόμενα από το stress, καθώς και μια σειρά μη χαρακτηρισμένων κυτταρικών προσδεμάτων. Παρακάτω, εξετάζονται οι κυριότεροι εξ' αυτών των υποδοχέων.

#### ***Ανασταλτικοί Υποδοχείς των NK κυττάρων***

Όλοι οι καλά χαρακτηρισμένοι ανασταλτικοί υποδοχείς των NK περιέχουν στην κυτταροπλασματική ουρά τους ένα ή περισσότερα ανασταλτικά μοτίβα ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Κατόπιν της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με το αντίστοιχο πρόσδεμα, τα κατάλοιπα της τυροσίνης στα ITIM φωσφορυλιώνονται και προσελκύουν στην μεμβράνη ειδικές φωσφατάσες οι οποίες παρεμποδίζουν την επαγωγή διεγερτικών σημάτων<sup>82</sup>.

Οι υποδοχείς των NK κυττάρων μπορούν να αναγνωρίσουν κλασικές και μη πρωτεΐνες MHC τάξης I. Ωστόσο, υποδοχείς για τις πρωτεΐνες MHC τάξης II δεν έχουν ταυτοποιηθεί ως τώρα. Οι κύριοι MHC-ειδικοί υποδοχείς των NK κυττάρων ανήκουν είτε στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Ig) (η οποία συμπεριλαμβάνει τους υποδοχείς KIR και LIR) ή στην οικογένεια των λεκτινών C-τύπου. Ένα σημαντικό γνώρισμα των ανασταλτικών υποδοχέων των NK στο σύνολό τους είναι πως εκφράζονται σε ένα ποικιλόμορφο τρόπο, έτσι ώστε κάθε NK κύτταρο να

εκφράζει πολλαπλούς υποδοχείς σε ένα σύνθετο συνδυαστικό ρεπερτόριο με αποτέλεσμα τη δημιουργία διάφορων υποπληθυσμών NK κυττάρων ικανών να αντιληφθούν την απώλεια ενός μόνο μορίου MHC<sup>83</sup>.

*Υποδοχείς KIR (Killer Ig-like Receptors)* – είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I που ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και αποτελούν την πιο πολυμορφική ομάδα υποδοχέων των NK. Ανάλογα με τον αριθμό των ανοσοσφαιρινικών δομών που κατέχουν στο εξωκυττάριο τμήμα τους χωρίζονται σε KIR3D (με 3 δομές Ig) και KIR2D (με 2 δομές Ig)<sup>83</sup>. Οι ανασταλτικοί υποδοχείς KIR, παρότι όλοι αλληλεπιδρούν με μόρια MHC τάξης I, παρουσιάζουν αλληλομορφική ειδικότητα αναγνώρισης/δέσμευσης. Οι υποδοχείς KIR3D αναγνωρίζουν HLA-A3 και -A11 και μερικές HLA-B πρωτεΐνες, ενώ οι υποδοχείς KIR2D δεσμεύουν κυρίως αλληλόμορφους HLA-C<sup>84</sup>.

*Υποδοχείς LIR (Leukocyte Ig-like Inhibitory Receptors)* – ανήκουν κι αυτοί στην πρωτεϊνική οικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Δύο μόνο γονίδια LIR κωδικοποιούν ανασταλτικούς υποδοχείς (LIR1 και LIR2) εκ των οποίων μόνο ο LIR1 εκφράζεται στα NK<sup>85</sup>. Σε αντίθεση με τους KIR, ο υποδοχέας LIR1 δεσμεύεται με χαμηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες MHC τάξης I. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση ενός ευρέος φάσματος MHC μορίων συμπεριλαμβανομένων των HLA-A, HLA-B, HLA-C και των μη κλασικών HLA-G μορίων<sup>86</sup>.

*Λεκτίνες C-τύπου (CD94/NKG2A)* – είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου II. Η πρωτεΐνη CD94 σχηματίζει ετεροδιμερή με διάφορα μέλη της οικογένειας NKG2, τα οποία εκφράζονται επιλεκτικά στα NK και μια υπο-ομάδα των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTL, Cytotoxic T Lymphocytes)<sup>87</sup>. Ο διμερισμός της CD94 με την NKG2A (που διαθέτει μια ITIM δομή στην κυτταροπλασματική της ουρά) οδηγεί στη δημιουργία ενός άλλου ανασταλτικού υποδοχέα, που παρουσιάζει περιορισμένο πολυμορφισμό: το ετεροδιμερές CD94/NKG2A αναγνωρίζει ένα μόνο μη κλασικό μόριο MHC τάξης I, το HLA-E<sup>88</sup>.

Παρότι τα μόρια MHC τάξης I είναι σημαντικά για την ανοχή των NK έναντι κυττάρων του εαυτού, υπάρχουν κι άλλα μόρια, μη MHC, τα οποία μπορούν να στείλουν ανασταλτικά σήματα στα NK μέσω ειδικών υποδοχέων. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότεροι εξ αυτών των υποδοχέων.



*Υποδοχέας CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-related cell Adhesion Molecule 1)* – είναι μια πρωτεΐνη τύπου-ανοσοσφαιρίνης που περιέχει δύο δομές ITIM. Έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε ασθενείς με έλλειψη της πρωτεΐνης TAP2, οι οποίοι παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης μορίων MHC τάξης I<sup>89</sup>, και κατά την εγκυμοσύνη<sup>90</sup>. Πιστεύεται πως η υπερέκφραση αυτή αποτελεί έναν εναλλακτικό δρόμο αναγνώρισης του εαυτού από τα NK κύτταρα.

*Υποδοχέας KLRG1 (Killer cell Lectin-like Receptor G1)* – είναι μια λεκτινή C-τύπου που εκφράζεται σε μια υπο-ομάδα των NK κυττάρων. Ο υποδοχέας KLRG1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τρία μέλη της οικογένειας των καντερινών (cadherin)<sup>91</sup>: την E-, N-, και R-καντερίνη.

*Υποδοχέας CD161 ή NKR-P1A (NK-cell-Receptor Protein 1A)* – είναι ένα ομοδιμερές που ανήκει στην οικογένεια λεκτινών C-τύπου. Στον άνθρωπο εκφράζεται μόνο στα ανώριμα NK κύτταρα<sup>92</sup> και η έκφρασή του ρυθμίζεται από την IL-12. Η διασύνδεση του NKR-P1A με το πρόσδεμά του, το LLT1 (Lectin-like Transcript 1)<sup>93</sup>, οδηγεί σε καταστολή της κυτταροτοξικής δράσης των NK.

Άλλοι υποδοχείς με ανασταλτική δράση είναι (1) ο IRp60 (Inhibitory receptor p60)<sup>94</sup>, (2) ο LAIR-1 (Leukocyte-associated Ig-like Receptor)<sup>95</sup> και (3) οι SIGLEC7 & 9 (Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins)<sup>96</sup>, ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τη φυσιολογική τους δράση *in vivo* καθώς και τα προσδέματά τους.

### ***Διεγερτικοί Υποδοχείς των NK κυττάρων***

Για πολλά χρόνια η δράση των NK κυττάρων θεωρούταν να ελέγχεται μόνο από ανασταλτικούς μηχανισμούς, δηλαδή η εξόντωση των κυττάρων-στόχων ήταν αναπόφευκτη απουσία ανασταλτικών σημάτων. Σήμερα, όμως, είναι καλά τεκμηριωμένη η απαίτηση για διεγερτικά σήματα προκειμένου τα NK να εκδηλώσουν την κυτταροτοξική τους δράση.

Σε αντίθεση με τους ανασταλτικούς υποδοχείς, οι διεγερτικοί υποδοχείς των NK σηματοδοτούν μέσω πρωτεϊνών-προσαρμογέων (όπως οι CD3ζ, FcεRIγ, DAP10 και DAP12), οι οποίες διαθέτουν στην κυτταροπλασματική τους ουρά μια δομή ενεργοποίησης ITAM (Immunodominant Tyrosine based Activation Motif)<sup>97</sup>. Επίσης, ορισμένοι διεγερτικοί υποδοχείς, έχει βρεθεί, να λειτουργούν ως συν-διεγερτικοί υποδοχείς μειώνοντας το κατώφλι ενεργοποίησης του κύριου υποδοχέα με τον οποίο

συνεργάζονται<sup>98</sup>. Παρακάτω περιγράφονται οι κυριότεροι διεγερτικοί υποδοχείς που έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο.

*Υποδοχέας NKG2D* – είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II που εκφράζεται σε όλα τα NK κύτταρα, όπως και στα CD8<sup>+</sup> T και γδ T λεμφοκύτταρα<sup>99</sup>. Η έκφρασή του αυξάνεται μετά από διέγερση με IL-15 ή TNF-α, και μειώνεται παρουσία TGF-β<sup>100</sup>. Ο υποδοχέας αυτός απαντά ως ομοδιμερές και συνδέεται με την πρωτεΐνη-προσαρμογέα DAP10<sup>101</sup>. Η δέσμευση του NKG2D οδηγεί σε άμεση ενεργοποίηση των NK ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων διεγερτικών σημάτων. Διάφορα προσδέματα έχουν ταυτοποιηθεί για τον υποδοχέα NKG2D στον άνθρωπο συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών MICA, MICB και ULBP1-5<sup>99</sup>. Τα προσδέματα αυτά αποτελούν πρωτεΐνες επαγόμενες από το stress, και η έκφρασή τους στα κύτταρα έχει βρεθεί να αυξάνεται μετά από οξειδωτικό stress<sup>102</sup>, γενotoξικό stress<sup>103</sup> και ιική μόλυνση<sup>104</sup>.

*Υποδοχείς NCR (Natural Cytotoxic Receptors)* – ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, και συμπεριλαμβάνουν τους NKp46, NKp44 και NKp30. Οι υποδοχείς NKp46 και NKp30 εκφράζονται σε ενεργοποιημένα και ηρεμούντα NK κύτταρα, ενώ ο NKp44 εκφράζεται στα NK μόνο κατόπιν ενεργοποίησης<sup>50</sup>. Έχει προταθεί ότι υπάρχει μια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών υποδοχέων NCR, γιατί η δέσμευση μόνο του ενός NCR οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος και των άλλων υποδοχέων<sup>98</sup>. Έτσι οι υποδοχείς NCR φαίνεται να δρουν ως μια λειτουργική μονάδα. Όσον αφορά στο ρόλο τους, οι NCR εμπλέκονται στην αναγνώριση και εξόντωση καρκινικών κυττάρων<sup>105-107</sup>. Επιπλέον, ο NKp30 έχει βρεθεί να αναγνωρίζει ένα άγνωστο πρόσδεμα στα ανώριμα DC<sup>108</sup> προκαλώντας έτσι είτε την εξόντωση ή την ωρίμανση των αυτόλογων ανώριμων DC κυττάρων.

*Υποδοχέας NKp80* – είναι ένα ομοδιμερές που ανήκει στην οικογένεια των λεκτινών C-τύπου. Το πρόσδεμά του, το AIICL (Activation Induced C-type Lectin)<sup>109</sup>, εκφράζεται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα κοκκιοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση των NK μέσω του NKp80 οδηγεί σε έκκριση κυτταροκινών και πιστεύεται πως παίζει ρόλο στην έναρξη των ανοσοαποκρίσεων.

*Υποδοχέας FcγRIIIa (CD16)* – ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, και σηματοδοτεί μέσω των πρωτεϊνών CD3ζ και FcεRγ<sup>97,110</sup>. Ο CD16 είναι ένας IgG

υποδοχέας χαμηλής συγγένειας που μεσολαβεί την αντισωμομεσολαβούμενη κυτταροτοξική δράση των NK. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι αποτελεί τον πιο ισχυρό διεγερτικό υποδοχέα στα φρέσκα απομονωμένα ανθρώπινα NK κύτταρα, ικανό να πυροδοτήσει ισχυρή κυτταροτοξική δράση και παραγωγή κυτταροκινών<sup>98</sup>.

*Διεγερτικοί Υποδοχείς KIR* – αντίθετα με τους ανασταλτικούς KIR, διαθέτουν μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά η οποία συνδέεται με την πρωτεΐνη-προσαρμογέα DAP12<sup>84</sup>. Τα προσδέματα που αναγνωρίζονται από τους διεγερτικούς υποδοχείς KIR δεν είναι καλά χαρακτηρισμένα και η δέσμευση τους με μόρια MHC τάξης I είναι χαμηλής συγγένειας. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η σύνδεση των KIR με τα μόρια MHC τάξης I εξαρτάται από την παρουσία συγκεκριμένων πεπτιδίων στα τελευταία<sup>111</sup>.

*Υποδοχέας 2B4 (CD244)* – αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση υποδοχέα καθώς στο ποντίκι έχει βρεθεί να έχει διπλή δράση, είτε ενεργοποιητική ή ανασταλτική, ενώ στον άνθρωπο έχει δειχθεί να έχει μόνο διεγερτική δράση. Ο 2B4 μαζί με το πρόσδεμά του, το CD48, είναι μέλη της CD2-οικογένειας (μια υπο-ομάδα της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών). Εκφράζεται σε όλα τα NK, όπως επίσης και στα CD8<sup>+</sup> T και γδ T λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα και τα βασεόφιλα<sup>84</sup>. Ο 2B4 υποδοχέας διαθέτει στην κυτταροπλασματική ουρά του 4 δομές ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) που καθορίζουν τη δράση του<sup>112</sup>.

*Υποδοχέας DNAM-1 (CD226)* – ανήκει και αυτός στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, και εκφράζεται σε όλα τα NK, τα T λεμφοκύτταρα, μια υπο-ομάδα των B λεμφοκυττάρων, τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια<sup>84</sup>. Η αλληλεπίδραση του DNAM-1 με τα προσδέματά του, το CD155 και CD112, στα καρκινικά κύτταρα προάγει την κυτταροτοξικότητα και την παραγωγή κυτταροκινών στα NK<sup>113</sup>. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η αλληλεπίδραση του DNAM-1 με τα προσδέματά του συνεισφέρει στη λύση των ώριμων και ανώριμων DC<sup>114</sup>.

## 2.1.4 Λειτουργικά Χαρακτηριστικά των NK

### *Έκκριση Κυτταροκινών από τα NK κύτταρα*

Τα NK, παρότι αρχικά αναγνωρίστηκαν ως εκτελεστικά λεμφοκύτταρα, παίζουν σημαντικό ανοσορυθμιστικό ρόλο. Είναι γνωστό ότι τα NK εκκρίνουν κυτταροκίνες

και χημειοκίνες που συμβάλλουν στην εκκαθάριση των παθογόνων. Επιπλέον, τα NK απαντούν σε μια πληθώρα κυτταροκινών, προερχόμενων από μια σειρά κυτταρικών τύπων, ενεργοποιώντας διάφορους ανοσοτροποποιητικούς μηχανισμούς. Επίσης, οι αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις των NK με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ελέγχονται από διαλυτούς μεσολαβητές που εκκρίνονται στην περιοχή της ανοσολογικής σύναψης, συμβάλλοντας έτσι στην τροποποίηση τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας<sup>3,115</sup>.

Τα NK παράγουν μια σειρά κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των αιμοποιητικών παραγόντων IL-13 και GM-CSF, του TNF-α και των ρυθμιστικών κυτταροκινών TGF-β και IFN-γ<sup>116</sup>. Η παραγωγή της IFN-γ από τα NK έχει δειχθεί να παίζει κρίσιμο ρόλο στην αποτελεσματική εκκαθάριση των μολύνσεων, τόσο ιικών όσο και βακτηριακών. Η IFN-γ είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη που επάγει την ενεργοποίηση των μακροφάγων, συμβάλλει στην αντι-ιική και αντι-βακτηριακή ανοσία, προωθεί την αυτοφαγία, ενισχύει την αντιγονοπαρουσίαση, ενορχηστρώνει την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας, συγχρονίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ λεμφοκυττάρων και ενδοθηλίου, ρυθμίζει το ισοζύγιο T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> αποκρίσεων, και ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση<sup>117</sup>. Ως γενικός κανόνας, η IL-12, η οποία παράγεται κατά τα αρχικά στάδια των μολύνσεων, προάγει τα NK να παράγουν IFN-γ. Παρότι η IFN-γ είναι η πιο άφθονα παραγόμενη από τα NK κυτταροκίνη, και οι άλλες κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες των NK κυττάρων, όπως η τροποποίηση των φλεγμονωδών και αλλεργικών ανοσοαποκρίσεων, η λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, η αιμοποίηση έξω από το μυελό των οστών και η διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων. Ο CD56<sup>bright</sup> υποπληθυσμός των NK είναι η πρωταρχική πηγή παραγωγής των ανοσορρυθμιστικών κυτταροκινών των NK<sup>5</sup>.

Τα σήματα που επάγουν την έκκριση κυτταροκινών από τα NK περιλαμβάνουν:

- *Φλεγμονώδεις Μεσολαβητές*, όπως κυτταροκίνες και μονοκίνες (κυτταροκίνες εκκρινόμενες από μονοκύτταρα και μακροφάγα) που παράγονται από τον ξενιστή μετά από μόλυνση. Το ρεπερτόριο καθώς και η ποσότητα των μεσολαβητών αυτών καθοδηγούν τα CD56<sup>bright</sup> NK κύτταρα να παράγουν κυτταροκίνες είτε τύπου 1 ή τύπου 2<sup>118,119</sup>. Για παράδειγμα, παρότι είτε η IL-12 ή η IL-15 έχουν την ικανότητα να διεγείρουν T<sub>H1</sub> και T<sub>H2</sub>

ανοσοαποκρίσεις, οι σχετικές ποσότητες της καθεμιάς και η παρουσία άλλων μονοκινών (π.χ. IL-1 ή IL-18) μπορούν να διαμορφώσουν την κυρίαρχη απόκριση των CD56<sup>bright</sup> προς έκκριση συγκεκριμένων κυτταροκινών<sup>5</sup>. Παρομοίως, η παρουσία και η σχετική αφθονία άλλων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου της IL-4, IL-10 και IL-12, μπορεί να τροποποιήσει την παραγωγή κυτταροκινών από τα NK. Για παράδειγμα, η παραγωγή της IFN- $\gamma$  ως απόκριση στην IL-2 καταστέλλεται σημαντικά από την IL-4<sup>120</sup> ενώ ενισχύεται παρουσία της IL-12<sup>121</sup>. Συνεπώς, το ρεπερτόριο των κυτταροκινών που είναι παρούσες στο μικροπεριβάλλον της φλεγμονής καθορίζει την παραγωγή των Th1 ή Th2 κυτταροκινών από τα CD56<sup>bright</sup> NK, και επιπλέον τροποποιεί το ρυθμό έκκρισής τους. Προφανώς, η ανταπόκριση στους διάφορους φλεγμονώδεις μεσολαβητές εξαρτάται επίσης από τους παρόντες NK υποπληθυσμούς και την έκφραση των σχετικών υποδοχέων στην επιφάνεια των NK.

- *Προσδέματα των υποδοχέων TLR (Toll-like Receptors).* Τα ανθρώπινα NK κύτταρα, ανεξάρτητα από την κατάσταση ενεργοποίησής τους, εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς TLR2<sup>122</sup>, TLR3<sup>123</sup> και TLR9<sup>123</sup> που τα καθιστούν ικανά να αποκριθούν τόσο σε ιικής όσο σε βακτηριακής προέλευσης παράγοντες. Για παράδειγμα, η αναγνώριση λιποπρωτεϊνών στην επιφάνεια του *Mycobacterium bovis* από τον TLR2 οδηγεί τα NK προς έκκριση IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$ , και προς αποδοτικότερη κυτταροτοξική δράση<sup>124</sup>. Παρομοίως, η διέγερση του TLR3 από ιικό dsRNA ή CpG μπορεί να ενεργοποιήσει τα NK προς έκκριση IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$ , παρουσία της IL-12 προερχόμενης από τα μυελοειδή DC. Επιπλέον, κάτω από αυτές τις συνθήκες τα NK ενεργοποιούν την κυτταρολυτική τους μηχανή και αποκτούν την ικανότητα να σκοτώνουν ανώριμα μυελοειδή DC.
- *Αλληλεπίδραση με Κύτταρα-Στόχους.* Όπως προαναφέρθηκε, η διασύνδεση των διεγερτικών υποδοχέων των NK με τα ανάλογα προσδέματα στα κύτταρα-στόχους, πυροδοτεί μέσω των ITAM πρωτεϊνών-προσαρμογέων μια αλληλουχία κυτταροπλασματικών αντιδράσεων με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση της εκκριτικής και κυτταροτοξικής δράσης των NK<sup>84</sup>.

### ***Κυτταροτοξική Δράση των NK κυττάρων***

Τα NK κύτταρα οφείλουν το όνομά τους στην έμφυτη ικανότητα τους να σκοτώσουν κύτταρα-στόχους. Στους στόχους της κυτταροτοξικής δράσης των NK, πέρα από τα μολυσμένα και τα μετασχηματισμένα κύτταρα, συμπεριλαμβάνονται και αυτόλογα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα T λεμφοκύτταρα<sup>125</sup> και τα μακροφάγα<sup>126</sup>.

Το κυρίαρχο μοντέλο που περιγράφει το μηχανισμό που χρησιμοποιούν τα NK για να εκδηλώσουν την κυτταρολυτική τους δράση, είναι αυτό της εξωκυττάρωσης κοκκίων<sup>127</sup>. Μετά την αναγνώριση του NK κυττάρου με το στόχο του μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέων-προσδεμάτων, επακόλουθες αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων πρόσδεσης (π.χ. LFA-1 και ICAM-1) σηματοδοτούν τη δημιουργία της ανοσολογικής σύναψης. Η ανοσολογική σύναψη παρέχει μια πλατφόρμα για έντονη σηματοδότηση από το ένα κύτταρο στο άλλο αλλά και μια φυσικά καθορισμένη περιοχή για την ακριβή στόχευση της κυτταροτοξικής μηχανής και κυτταροκινών προς το κύτταρο-στόχο<sup>128</sup>. Εάν το κύτταρο-στόχος ενεργοποιήσει επαρκώς τους διεγερτικούς υποδοχείς των NK ή αποτύχει να παρουσιάσει το κατάλληλο MHC μόριο του «εαυτού» προκειμένου να καταστείλει την ενεργοποίηση του NK κυττάρου, τότε το τελευταίο θα ενεργοποιηθεί επιτυχώς ώστε να ξεκινήσει μια μη αναστρέψιμη, μονόδρομη κυτταρολυτική απάντηση. Σ' αυτό το σημείο, μέσα στο NK κύτταρο, λυτικά κοκκία (προ-σχηματισμένα) κινητοποιούνται προς το σημείο της ανοσολογικής σύναψης, όπου συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη για να ελευθερώσουν το λυτικό περιεχόμενό τους στο διακυτταρικό χώρο. Τα μονομερή της περφορίνης, παρουσία ιόντων  $Ca^{+2}$ , πολυμερίζονται και διεισδύουν στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, σχηματίζοντας έτσι πόρους. Ο σχηματισμός των πόρων περφορίνης οδηγεί σε μια προσωρινή εισροή ιόντων  $Ca^{+2}$  στο κύτταρο-στόχο, το οποίο απαντά στον κίνδυνο του οσμωτικού shock με κινητοποίηση των λυσοσωμικών και ενδοσωμικών κυστιδίων και ενεργοποίηση της πινοκύτωσης με σκοπό την επιδιόρθωση της πλασματικής μεμβράνης<sup>129</sup>. Κατά αυτόν τον τρόπο μόρια μεγαλοενζύμων και άλλων λυτικών συστατικών εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχου, όπου σηματοδοτούν την έναρξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου<sup>130</sup>.

Ένας δεύτερος μηχανισμός κυτταρολυτικής δράσης των NK χρησιμοποιεί τους λεγόμενους φονικούς-υποδοχείς. Αυτός ο μηχανισμός είναι λιγότερο σημαντικός για την άμυνα του ξενιστή έναντι παθογόνων οργανισμών *in vivo* αλλά παίζει

σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων όπως και στην ομοιόσταση. Πολλοί φονικοί-υποδοχείς και τα προσδέματά τους ανήκουν στην οικογένεια του υποδοχέα TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) και της κυτοκίνης TNF, αντίστοιχα. Το πρόσδεμα FasL (Fas Ligand) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα NK και τα CTL κύτταρα. Τα NK εκφράζουν διαρκώς FasL το οποίο βρίσκεται πακεταρισμένο σε κυτταροπλασματικά κυστίδια. Ο υποδοχέας του FasL, ο Fas (CD95) εκφράζεται ευρέως σε διάφορους ιστούς. Η διασύνδεση FasL-Fas οδηγεί σε τριμερισμό του υποδοχέα Fas γεγονός που σηματοδοτεί την απόπτωση στα κύτταρα-στόχους. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν βρεθεί να αυξάνουν την έκφραση του Fas ως απόκριση στην εκκρινόμενη από τα NK IFN- $\gamma$ , καθιστώντας τα ευαίσθητα στην Fas-εξαρτώμενη θανάτωση<sup>131</sup>. Από την άλλη μεριά όμως, άλλα καρκινικά κύτταρα υπερ-εκφράζουν το πρόσδεμα FasL επιφέροντας έτσι την απαλοιφή των NK<sup>132</sup> και των διεισδυσάντων TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes)<sup>133</sup>. Παρά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα, η επικρατούσα άποψη υποστηρίζει πως το FasL παίζει ρόλο στην ανοσο-διαφυγή παρά στην ανοσο-προστασία. Ένα άλλο γνωστό φονικό-πρόσδεμα που εκφράζεται από τα NK και τα CTL, είναι και το TRAIL (TNF-related Apoptosis-inducing Ligand). Το TRAIL υπερεκφράζεται στα NK μετά από διέγερση με προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, IL-2, IL-15 και IFNs<sup>134</sup>.

### **2.1.5 NK κύτταρα ως Αποδέκτες των Σημάτων των Κυτταροκινών**

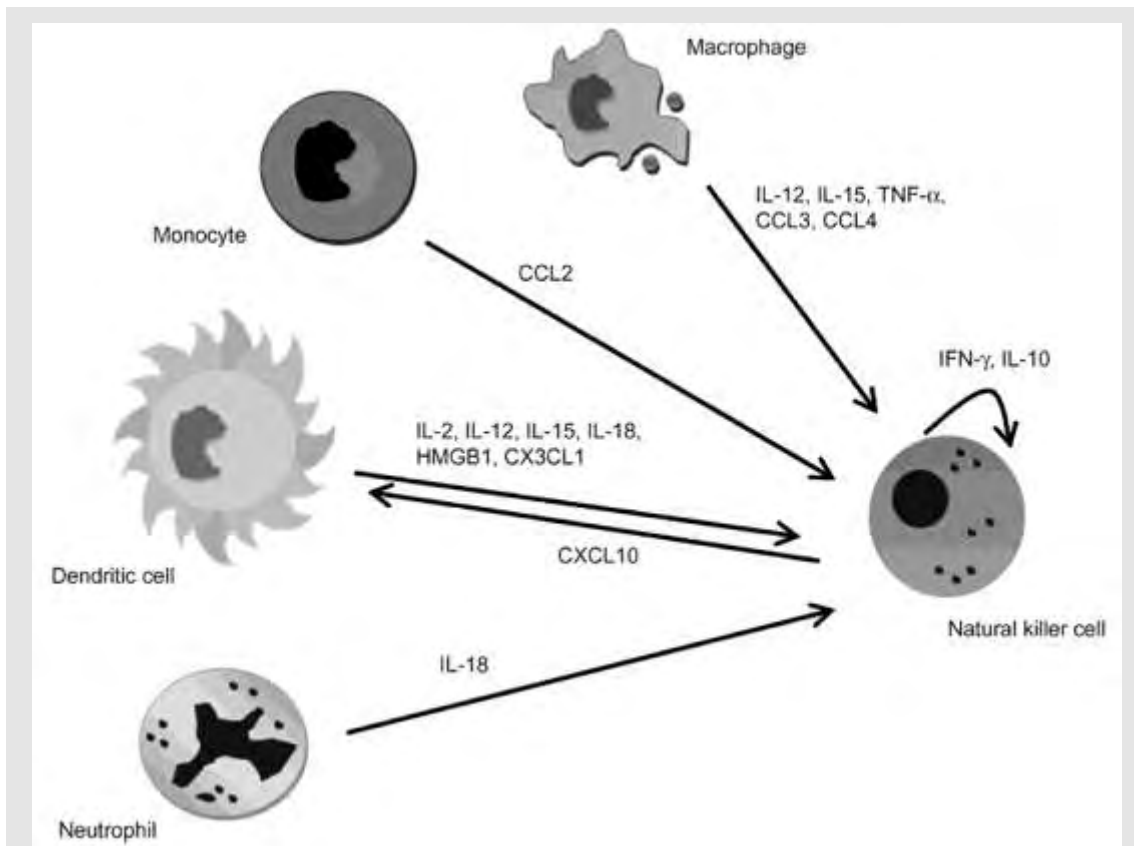
Η απόκριση των NK κυττάρων στα σήματα των κυτταροκινών που παραβρίσκονται στο μικροπεριβάλλον τους φαίνεται να εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: τον ειδικό συνδυασμό και την αφθονία των εκκρινόμενων κυτταροκινών, την έκφραση των αντίστοιχων υποδοχέων στα ίδια τα NK, τα γειτονικά κύτταρα τους στρώματος και άλλα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, τη δυνατότητα δημιουργίας επαφών με άλλα κύτταρα καθώς και την παθολογική κατάσταση υπό εξέταση (αν είναι φλεγμονώδης, μολυσματική, αυτοάνοση ή κακοήθης μετασχηματισμός). Οι ιντερλευκίνες IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 και IL-27, όπως και οι ιντερφερόνες τύπου I, όλες φαίνεται να παίζουν ρόλο στη διέγερση του πολλαπλασιασμού, στην ενεργοποίηση της λειτουργικής δράσης και στη διατήρηση της ομοιόστασης των υποπληθυσμών των περιφερικών NK κυττάρων. Πολλές και διάφορες χημειοκίνες

είναι αναγκαίες για την επιστράτευση των NK στις θέσεις εντοπισμού των εκάστοτε παθήσεων. Άλλες κυτταροκίνες, όπως οι TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-4, IL-7 και IL-10, παρουσιάζουν συμπληρωματική ή και αντίθετη λειτουργική δράση στη ρύθμιση της ανάπτυξης και λειτουργίας των NK. Η δράση των κυτταροκινών πάνω στα NK μπορεί να είναι αυτοκρινής (IFN- $\gamma$  και IL-10), παρακρινής (π.χ. τα εκκρινόμενα από τα DC IL-12, IL-15 και HMGB1) ή ενδοκρινής (π.χ. έκκριση χημειοκινών στην κυκλοφορία από απομακρυσμένα κύτταρα).

### ***Κύτταρα που Επηρεάζουν τη Συμπεριφορά των NK***

Τα NK κύτταρα συμμετέχουν σε ένα εκτενές δίκτυο αλληλεπιδράσεων με ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων μέσω έκκρισης κυτταροκινών όπως και άμεσων επαφών κύτταρο με κύτταρο. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η σχέση NK-DC δεδομένου ότι η εκτεταμένη αμφίδρομη επικοινωνία ανάμεσα σ' αυτά τα δυο είδη κυττάρων είναι απαραίτητη για την αμοιβαία ρύθμιση της λειτουργίας τους. Τα DC εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες IFN- $\alpha$  και  $\beta$ , IL-2, IL-15, IL-12 και IL-18, οι οποίες έχουν δειχθεί να διεγείρουν τα NK<sup>135-137</sup>. Επίσης, τα NK συν-εντοπίζονται με τα DC σε περιοχές πλούσιες με T λεμφοκύτταρα στους περιφερικούς λεμφαδένες<sup>138</sup>. Πέρα από τα προερχόμενα από τα μονοκύτταρα DC του περιφερικού αίματος, και άλλες κατηγορίες των DC καθώς και τα υπερκείμενα των *in vitro* καλλιιεργειών τους έχουν δειχθεί να αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των NK, την κυτταροτοξικότητά τους, την έκκριση της IFN- $\gamma$  και την έκφραση του CD56<sup>139</sup>.





**Εικόνα 2-4 Αλληλεπίδραση των NK με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού**

Σήματα κυτταροκινών προερχόμενων από μονοκύτταρα (monocytes), μακροφάγα (macrophages), δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells) και ουδετερόφιλα (neutrophils) επιδρούν στην ενεργοποίηση και λειτουργική δράση των NK. Επιπρόσθετα, ορισμένα σήματα προερχόμενα από τα ίδια τα NK παρουσιάζουν αυτοκρινή δράση. Από το σχήμα αυτό λείπουν οι πολύ σημαντικές αλληλεπιδράσεις των NK με κύτταρα του στρώματος και του ενδοθηλίου, που παράγουν και εκκρίνουν χημειοκίνες<sup>140</sup>.

Η έκκριση της IL-12 από τα DC στο χώρο της ανοσολογικής σύναψης με τα NK, φαίνεται να είναι ουσιώδης για την έκκριση της IFN- $\gamma$  από τα NK, ενώ η έκκριση της IL-15 από τα DC είναι αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των NK<sup>138</sup>. Στον άνθρωπο, η έκκριση της IL-12 από τα DC (προερχόμενα από CD14<sup>+</sup> μονοκύτταρα) συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση του CD40, μαζί με έκφραση του CD40L στα CD56<sup>+</sup> κύτταρα, υπονοώντας ότι η επικοινωνία NK-DC οδηγεί σε αμφίδρομη διέγερση των δυο κυτταρικών τύπων<sup>141</sup>. Επιπλέον, η έκκριση IL-18 από τα πλασματοκυτταρικά DC έχει βρεθεί να παίζει καταλυτικό ρόλο στην

ενεργοποίηση της λειτουργικής δράσης των NK απέναντι σε κύτταρα μολυσμένα από HSV-1 (Herpes Simplex Virus type 1)<sup>142</sup>.

Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα επίσης παράγουν IL-12, IL-15 και TNF- $\alpha$ , που συνδέονται με τη διέγερση των NK<sup>143,144</sup>. Τα ουδετερόφιλα παράγουν IL-18 σε απόκριση στη μόλυνση από *Legionella*, γεγονός που επάγει την έκκριση IFN- $\gamma$  από τα NK και συμβάλλει στην βακτηριακή εξάλειψη<sup>145</sup>. Τα T λεμφοκύτταρα στους λεμφαδένες εκκρίνουν IL-2, η οποία ενεργοποιεί περαιτέρω τα CD56<sup>bright</sup> NK που συνευρίσκονται στην ίδια περιοχή<sup>61</sup>. Αυτού του είδους η «στιχομυθία» μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ουσιώδης για την ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης και αποτελεσματικής ανοσοαπόκρισης (Εικόνα 1-4).

### ***Ιντερλευκίνες που Επιδρούν στα NK κύτταρα***

**IL-2.** Σε υπερ-φυσιολογικές δόσεις προκαλεί ενεργοποίηση των NK, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, την κυτταροτοξικότητα και την έκκριση της IFN- $\gamma$ <sup>146</sup>. Τα CD56<sup>bright</sup> NK κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υψηλής-συγγένειας υποδοχέα της IL-2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) ενώ τα CD56<sup>dim</sup> NK εκφράζουν την ενδιάμεσης-συγγένειας υποδοχέα της IL-2 (IL-2R $\beta\gamma_c$ )<sup>61</sup>. Η απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για την IL-2<sup>147</sup> ή την ειδική υπομονάδα του υποδοχέα της, την IL-2R $\alpha$ <sup>148</sup>, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των NK. Από την άλλη, η αποσιώπηση της έκφρασης της  $\beta$ <sup>149,150</sup> ή της  $\gamma_c$  αλυσίδας<sup>151,152</sup> του υποδοχέα της IL-2 οδηγεί σε μειωμένο αριθμό των κυκλοφορούντων NK κυττάρων με μειωμένο λειτουργικό δυναμικό. Πρέπει να σημειώσουμε ότι η  $\beta$  αλυσίδα αποτελεί δομικό συστατικό του υποδοχέα της IL-15 ενώ η  $\gamma_c$  αλυσίδα συμμετέχει επίσης στη σύσταση των υποδοχέων της IL-4, IL-7, IL-9 και IL-15. Συνολικά τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της δράσης της IL-15 (και όχι της IL-2) στην ανάπτυξη των NK.

**IL-12.** Λειτουργεί συνεργιστικά με την IL-2 για να ενισχύσει την κυτταροτοξικότητα των NK καθώς και την έκκριση της IFN- $\gamma$ <sup>153</sup>. Η IL-12 δε φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη βλαστογένεση ή τον πολλαπλασιασμό των NK. Έχει βρεθεί να επάγει την υπερ-έκφραση του υποδοχέα της IL-18 σε λεμφοκύτταρα, δημιουργώντας έτσι τις προϋποθέσεις για μια συνεργιστική δράση με την IL-18 με σκοπό την αυξημένη παραγωγή της IFN- $\gamma$ <sup>154</sup>. Η IL-12 έχει βρεθεί να ρυθμίζει θετικά την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα μεγαλοένζυμα και την περφορίνη<sup>155</sup>,

ενώ επίσης ρυθμίζει την έκφραση των υποδοχέων TRAIL και NKG2D στην επιφάνεια των NK<sup>156</sup>. Στον άνθρωπο, η IL-12 επάγει κατά προτίμηση την ενεργοποίηση της NK1 υποομάδας των NK (μια εναλλακτική κατηγοριοποίηση των NK σύμφωνα με το προφίλ των εκκρινόμενων κυτταροκινών σε αντιστοιχία με τους T<sub>H1</sub> και T<sub>H2</sub> υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων) η οποία εκκρίνει IL-10 και IFN- $\gamma$  και εκφράζει υψηλότερα επίπεδα CD95 (Fas), γεγονός που την καθιστά πιο ευαίσθητη στην επαγόμενη από το FasL απόπτωση<sup>157</sup>. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-12 έχει αντι-νεοπλασματική δράση, η οποία οφείλεται πρωταρχικά στην αυξημένη παραγωγή της IFN- $\gamma$  (που οδηγεί σε ενισχυμένη κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία) καθώς και στον αυξημένο αριθμό των κυκλοφορούντων NK και NKT κυττάρων<sup>158</sup>.

**IL-15.** Είναι ένας κρίσιμος διαμεσολαβητής της ομοιόστασης των περιφερικών NK κυττάρων<sup>159</sup> που δεν έχει κάποια επίδραση στον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό *per se*<sup>160</sup>. Ο μηχανισμός δράσης της IL-15 βασίζεται στη διατήρηση της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 στα NK κύτταρα<sup>160,161</sup>. Η IL-15 επίσης αυξάνει την κυτταροτοξικότητα και τη σύνθεση και έκκριση της IFN- $\gamma$ <sup>162</sup>. Ο υποδοχέας της IL-15 συγκροτείται από την IL-2/IL-15R  $\beta$ -αλυσίδα και την κοινή  $\gamma c$ -αλυσίδα, σε συνδυασμό με την ειδική για τον IL-15 υποδοχέα  $\alpha$ -αλυσίδα<sup>163</sup>. Προκειμένου να σηματοδοτήσει μέσα στο κύτταρο, η IL-15 πρέπει να δεσμευτεί πρώτα με την υπομονάδα IL-15R- $\alpha$ , η οποία είναι πανταχού παρούσα, και κατόπιν να trans-παρουσιαστεί μέσω επαφών κύτταρο με κύτταρο στα αντιτιθέμενα κύτταρα τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους την  $\beta$  και  $\gamma c$  αλυσίδα του IL-15 υποδοχέα<sup>164</sup>. Η έλλειψη της IL-15R- $\alpha$  αλυσίδας οδηγεί σε σημαντική μείωση του συνολικού αριθμού των NK<sup>165</sup>.

**IL-18.** Ενισχύει την κυτταροτοξικότητα των NK και την παραγωγή της IFN- $\gamma$ , δρώντας συνεργιστικά με την IL-12<sup>166</sup>. Επίσης ενισχύει την έκφραση του FasL στην κυτταρική επιφάνεια των NK<sup>167</sup>. Η IL-18 φαίνεται να επάγει τη ωρίμανση των NK με ένα «βοηθητικό» φαινότυπο που παρουσιάζει αυξημένη αποκριτικότητα στις σχετιζόμενες με τους λεμφοκύτταρους χημειοκίνες και βελτιωμένη ικανότητα παραγωγής IFN- $\gamma$  σε απόκριση στα DC και Th1 σήματα<sup>168</sup>. Αυτά τα NK κύτταρα εκφράζουν CD83, CCR7 και CD25. Επιπλέον, η IL-18 επάγει την παραγωγή και έκκριση της HMGB1 (High-mobility group protein B1) από τα NK, που οδηγεί στην ωρίμανση των DC και στην προαγωγή της φλεγμονής<sup>169</sup>.

**IL-21.** Προάγει την ανάπτυξη και ωρίμανση των NK κυττάρων από CD34<sup>+</sup> προγονικά κύτταρα<sup>170</sup> από το μυελό των οστών και το αίμα του ομφάλιου λώρου<sup>25</sup>. Επάγει τον πολλαπλασιασμό των CD56<sup>bright</sup> NK κυττάρων και ενισχύει την κυτταροτοξική δράση των CD56<sup>dim</sup> NK<sup>171</sup>. Από μόνη της δεν επάγει την παραγωγή κυτταροκινών. Έχει βρεθεί να ρυθμίζει θετικά την έκφραση της περφορίνης, των μεγαλοενζύμων, του CD107a και της IFN- $\gamma$ <sup>172</sup>. Η IL-21 παρουσιάζει συνεργιστική δράση με τον υποδοχέα Fc $\gamma$  στην ενίσχυση της κυτταρολυτικής δράσης των NK<sup>173</sup>. Επίσης, παρουσία της IL-2 προκαλεί υπερ-έκφραση των NKG2A, CD25, CD86 και CD69 μορίων<sup>174</sup>. Η IL-21 δρα συνεργιστικά με την IFN- $\alpha$  στην αύξηση της κυτταροτοξικότητας των NK<sup>175</sup>.

**IL-27.** Ανήκει στην οικογένεια της ιντερλευκίνης IL-12. Σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα καρκίνου έχει βρεθεί πως η υπερέκφραση της IL-27 από τα καρκινικά κύτταρα προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη του όγκου, κυρίως μέσω δράσης των NK μεσολαβούμενης από την IFN- $\gamma$ <sup>176,177</sup>.

**IFN- $\alpha/\beta$ .** Οι ιντερφερόνες τύπου I ρυθμίζουν αρνητικά την έκκριση της IL-12 και παρεμποδίζουν την απόκριση των NK κυττάρων στην IL-12<sup>178</sup>. Καταστέλλουν την έκκριση της IFN- $\gamma$  ενώ επάγουν και ενεργοποιούν την κυτταροτοξικότητα, τη βλαστογένεση και τον πολλαπλασιασμό των NK<sup>153</sup>. Οι ιντερφερόνες τύπου I αυξάνουν την έκφραση της IL-15 και έμμεσα αυξάνουν τα επίπεδα της MIP-1 $\alpha$  στο ήπαρ<sup>137</sup>.

Τα NK κύτταρα έχουνδειχθεί να ανταποκρίνονται σε μια σειρά χημειοκινών και να εκφράζουν πολλαπλούς υποδοχείς χημειοκινών. Οι χημειοκίνες αποτελούν σήματα ζωτικής σημασίας για τη μετανάστευση των NK κυττάρων στις θέσεις της φλεγμονής ή της μόλυνσης, και η παρεμπόδιση αυτών των σημάτων οδηγεί σε εξασθενημένη ανοσολογική απάντηση, σε ανάπτυξη κακοήθειας, ή σε ανεξέλεγκτη αυτοανοσία. Η ομάδα αυτή των κυτταροκινών θα εξεταστεί πιο λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.

### **2.1.6 NK κύτταρα και Χημειοκίνες: Ρύθμιση της Μεταναστευτικής τους Ικανότητας**

Όπως έχει προαναφερθεί τα NK κύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών και μεταναστεύουν σε διάφορα όργανα, όπου «αναπαύονται» μέχρι να αντιληφθούν

κάποιο σήμα κινδύνου (Εικόνα 2-5). Η θεώρηση αυτή όμως είναι υπεραπλουστευμένη καθώς σήμερα έχει επαρκώς τεκμηριωθεί το γεγονός ότι τα NK κύτταρα υφίστανται ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό. Συνεπώς, υπάρχει μια συνεχής ανακύκλωση των NK κυττάρων<sup>160</sup>, η οποία αυξάνεται ουσιωδώς σε καταστάσεις λεμφοπενίας<sup>165</sup>. Επιπλέον, τα NK κύτταρα εκφράζουν μια σειρά υποδοχέων των χημειοκινών<sup>179</sup> και απαντούν στα σήματα των χημειοκινών<sup>180</sup>. Εκτεταμένες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση των χημειοκινών εκείνων που υποβοηθούν τα NK να μεταναστεύουν ως απάντηση σε μολυσματικές, ογκογενετικές και φλεγμονωειδείς προκλήσεις.

Organ	Specific location	Special features
Lymph node	Medulla & T zone	CD56 <sup>bright</sup> in human CD27 <sup>high</sup> in mouse
Spleen	Red pulp (marginal zone)	Mixed populations Migrate to white pulp after activation
Gut	Intraepithelial, lamina propria & cryptopatches	Low cytotoxicity & IFN- $\gamma$ Resemble LTi cells Some make IL-22, and some can participate in Th2 responses
Lung	Bronchoalveolar space, lung interstitium	Locally regulated by alveolar macrophages
Liver	Sinusoids	Express TRAIL CD16 <sup>-</sup> in human Lower activation threshold Regulated by Kupffer cells
Thymus	Cortex & medulla	IL7R $\alpha$ , GATA-3 <sup>+</sup> , CD16 <sup>-</sup> , CD11b/Ly49 <sup>low</sup> Low cytotoxicity, high IFN- $\gamma$

LTi, lymphoid tissue inducer cell

**Εικόνα 2-5 Ανατομική Εντόπιση των ώριμων NK κυττάρων**

### CC Χημειοκίνες

Τα μόρια των χημειοκινών περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια ή δυο συντηρημένες κυστεΐνες (cysteines, C), οι οποίες μπορεί να είναι παρακείμενες (CC

χημειοκίνες) ή να διαχωρίζονται από αμινοξέα (CXC ή CX<sub>3</sub>C χημειοκίνες, όπου X = οποιοδήποτε αμινοξύ)<sup>181</sup>. Οι χημειοκίνες αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, όμως μια συγκεκριμένη χημειοκίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με περισσότερους υποδοχείς. Ένας υποδοχέας μπορεί να δεσμεύει είτε μια CC χημειοκίνη [CC-receptor (R)] ή μια CXC χημειοκίνη (CXCR), αλλά ποτέ και τους δυο τύπους.

Σύμφωνα μ' αυτό, οι μονοκυτταρικές χημειοτακτικές πρωτεΐνες (MCP, monocyte chemotactic proteins) MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8) και MCP-3 (CCL7) μοιράζονται έναν κοινό υποδοχέα, τον CCR2, ο οποίος εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενεργοποιημένα με IL-2 NK κύτταρα<sup>182</sup>. Παρότι και οι τρεις χημειοκίνες μπορούν να επάγουν *in vitro* χημειόταξη των NK, η CCL2 έχει βρεθεί να παρουσιάζει τις πιο ισχυρές χημειοτακτικές ιδιότητες<sup>183</sup>.

Η φυσιολογική σημασία της **CCL2** έχει δειχθεί σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου, όπου καρκινικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν CCL2 ήταν ανίκανα να προκαλέσουν μεταστάσεις στον πνεύμονα σε σχέση με τα CCL2<sup>-</sup> καρκινικά κύτταρα<sup>184</sup>. Αυτό το φαινόμενο, όμως, παρατηρήθηκε μόνο σε NK-επαρκείς αλλά όχι σε NK-ανεπαρκείς ξενιστές, υποδηλώνοντας ότι η CCL2 μπορεί να επάγει την NK-μεσολαβούμενη αναστολή της ανάπτυξης των μεταστατικών όγκων<sup>184</sup>.

Επίσης, σε ποντικίσιο μοντέλο ασπεργίλλωσης έχει δειχθεί ότι η μόλυνση με *Aspergillus fumigatus* οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα CCL2 τόσο στον πνεύμονα όσο και στο αίμα, και η απαλοιφή των NK κυττάρων συσχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία<sup>185</sup>. Η εξουδετέρωση της CCL2 οδήγησε αρχικά σε μείωση του αριθμού των NK που συσσωρεύονται στον πνεύμονα και τελικά σε μειωμένη ικανότητα απαλοιφής της μυκητιακής μόλυνσης. Το ίδιο φαινόμενο αναπαράχθηκε, όταν χρησιμοποιήθηκαν CCR2<sup>-</sup> NK κύτταρα<sup>185</sup>. Συμπερασματικά, υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή του συστήματος CCL2-CCR2 στη στρατολόγηση των NK στον πνεύμονα, τόσο κατά τη μετάσταση των όγκων όσο και κατά τη μυκητιακή μόλυνση.

Επιπρόσθετα των πνευμονικών μολύνσεων, η CCL2 έχει βρεθεί να εκφράζεται έντονα και στο ήπαρ ποντικών μολυσμένων με MCMV<sup>186</sup>. Η πηγή έκκρισης της CCL2 ήταν λευκοκύτταρα του ήπατος, και η παραγωγή της ήταν εξαρτώμενη από τις IFNα/β. Ποντίκια στα οποία απουσίαζε η CCL2 ή ο CCR2

εμφάνισαν ανεπαρκή συσσώρευση NK κυττάρων στο μολυσμένο ήπαρ, και αυτό συσχετίστηκε με αυξημένο ιικό φορτίο και εκτεταμένη ηπατική βλάβη.

Μια σημαντική διαφορά της CCL2 από τη CCL7 και CCL8 είναι ότι οι τελευταίες αλληλεπιδρούν επίσης με το CCR5 υποδοχέα, ο οποίος έχει και ένα εναλλακτικό πρόσδεμα, τη CCL5. Η CCL5 (ή αλλιώς RANTES: regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) αναγνωρίζεται επίσης από τους CCR1 και CCR3 υποδοχείς, και αποτελεί ένα δραστικό χημειοτακτικό παράγοντα των NK. Μεταμόσχευση καρκινικών κυττάρων θυμώματος που υπερεκφράζουν CCL5 σε συγγενικά ποντίκια προκάλεσε σημαντική μείωση στην ανάπτυξη του όγκου μαζί με αυξημένη εισροή NK κυττάρων<sup>187</sup>. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούσαν να αναπαραχθούν σε ποντίκια ανεπαρκή σε B και T λεμφοκύτταρα, υποδεικνύοντας έναν πιο επικρατή αντικαρκινικό ρόλο για άλλα λεμφοκύτταρα διαφορετικών των NK. Επίσης, μόλυνση CCR5<sup>-/-</sup> ποντικών με HSV-1 οδήγησε σε μειωμένη κινητοποίηση των NK προς τη σπλήνα, το στέλεχος του εγκεφάλου και το νωτιαίο μυελό<sup>188</sup>. Ένα ενδιαφέρον εύρημα, που αναδεικνύει τη σύνθετη αλληλεπίδραση των χημειοκινών με τους διάφορους υποδοχείς, προέρχεται από ένα μοντέλο ηπατίτιδας (conA μεσολαβούμενης) σε CCR5-ανεπαρκή ποντίκια<sup>189</sup>. Τα ποντίκια αυτά εκδήλωσαν σοβαρά συμπτώματα λόγω της ανεξέλεγκτης μετανάστευσης των NK στο ήπαρ. Αποδείχθηκε ότι στο ήπαρ αυτών των ποντικών εκφράζονται σημαντικά αυξημένες ποσότητες CCL5, η οποία προσελκύει ενεργά τα NK κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που χρησιμοποιεί το CCR1 ως υποδοχέα.

Οι χημειοκίνες CCL3 (ή αλλιώς MIP-1α: macrophage inflammatory protein-1) και CCL4 (MIP-1β) επίσης δεσμεύονται με το CCR5, ενώ η CCL3 μπορεί να δράσει και μέσω του CCR1. Ομοίως με τη CCL2, τα επίπεδα έκφρασης της CCL3 στο ήπαρ αυξάνονται σημαντικά κατά τα πρώτα στάδια μόλυνσης με MCMV, και η παραγωγή της εξαρτάται από ιντερφερόνες τύπου I<sup>190</sup>. Πιστεύεται πως η δράση της CCL2 και της CCL3 στο ήπαρ είναι συνεργική αλλά όχι περιττή. Αυτές οι δυο χημειοκίνες φαίνεται να δρουν σε ακολουθία<sup>186</sup>, δηλαδή η CCL2, που εκφράζεται νωρίτερα από τη CCL3, μεσολαβεί την πρώιμη εισροή των NK στο ήπαρ αλλά για την επαρκή μετανάστευση των NK απαιτείται συνεχής παραγωγή της CCL3.

Η CCL3 έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στον πνεύμονα μετά από μόλυνση με *Klebsiella pneumoniae*, και η αύξηση αυτή συσχετίζεται με μειωμένο πολλαπλασιασμό βακτηρίων και με αυξημένο αριθμό NK κυττάρων στον πνεύμονα<sup>191</sup>. Επιπρόσθετα,

έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση του Rituximab (αντι-CD20 αντίσωμα) προκαλεί αυξημένη έκφραση της CCL3 και αυτό είναι προαπαιτούμενο για την αποτελεσματική εκρίζωση των όγκων<sup>192</sup>. Η δράση του Rituximab και της CCL3 μπορούσε να αντιστραφεί μετά από απαλοιφή λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων και των NK.

Τα NK κύτταρα, μετά από ενεργοποίηση με IL-2<sup>180</sup>, εκφράζουν επίσης τους CCR4 και CCR8 υποδοχείς, οι οποίοι μπορούν να επάγουν τη χημειόταξη των NK μέσω της δράσης της CCL17 (που δεσμεύει και τους δυο υποδοχείς), της CCL1 (που δεσμεύει το CCR8) και της CCL22 (που δεσμεύει το CCR4).

### **CXC Χημειοκίνες**

Εκ των CXC χημειοκινών, οι **CXCL9**, **CXCL10**, και **CXCL11** παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην κινητοποίηση των NK κυττάρων καθώς προκαλούν ισχυρή χημειοτακτική προσέλκυση. Πολλές φορές οι χημειοκίνες αυτές χρησιμοποιούνται εναλλακτικά μεταξύ τους, επειδή μοιράζονται έναν κοινό υποδοχέα, το CXCR3<sup>193</sup>.

Οι χημειοκίνες που δεσμεύονται στον υποδοχέα CXCR3 μπορούν να προκαλέσουν την ενεργή επιστράτευση των NK κυττάρων από το φαιό στο λευκό πολφό της σπλήνας κατά τη διάρκεια μια μολυσματικής πρόκλησης<sup>194,195</sup>, όπως επίσης και στους λεμφαδένες<sup>196</sup>. Μελέτη της *Leishmania major* στα ποντίκια έδειξε ότι ανθεκτικά στη μόλυνση αλλά όχι ευαίσθητα στελέχη εξέφραζαν ψηλά επίπεδα CXCL10 στους μολυσμένους λεμφαδένες, ενώ ένεση ανασυνδυασμένης CXCL10 πρωτεΐνης σε μολυσμένα ποντίκια προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας των NK στους λεμφαδένες<sup>197</sup>. Επιπρόσθετα, μόλυνση των DC με *M. tuberculosis* τα καθιστά χημειοτακτικά προς τα NK κύτταρα<sup>198</sup>. Αυτή η χημειοτακτική ιδιότητα των DC προς τα NK αποδόθηκε στην παραγωγή CXCL9 και CXCL10, και αργότερα αποδείχθηκε ότι η επαγωγή της CXCL10 εξαρτάται από τις IFN τύπου I.

Τα πλασματοκυτταρικά DC, τα οποία είναι τα κλασικά κύτταρα που παράγουν IFN τύπου I, μπορούν επίσης να προσελκύσουν τα NK κατόπιν της επιμόλυνσης τους με HSV, χρησιμοποιώντας ένα μηχανισμό βασισμένο στην παραγωγή της CXCL10<sup>199</sup>. Δείχθηκε ότι η IFN-α επιδρούσε με έναν αυτοκρινή τρόπο στα DC επάγοντας την έκφραση της CXCL10. Επίσης, όταν CXCL9 ή CXCL10 ανεπαρκή ποντίκια επιμολύνονται με HSV-2, παρουσιάζουν οξεία ελάττωση του



αριθμού των NK του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού που συνοδεύεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό του ιού και μειωμένη επιβίωση<sup>200</sup>.

Συνεπώς, υπάρχει μια στενή συσχέτιση μεταξύ της επιστράτευσης των NK στους μολυσμένους με παθογόνα ιστούς και της έκφρασης των προσδεμάτων του υποδοχέα CXCR3. Μια παρόμοια συσχέτιση έχει περιγραφεί και για την ογκο- και φλεγμονο-επαγόμενη κυτταρική διήθηση. Έτσι, όγκοι από CXCR3<sup>-/-</sup> ποντίκια έχουν μειωμένους αριθμούς NK κυττάρων ενώ CXCR3<sup>-/-</sup> NK κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα διήθησης σε όγκους, όταν μεταφέρονται σε αγρίου τύπου (wild type) δότες<sup>201</sup>. Πέρα από την επιστράτευση, η CXCL10 μπορεί επίσης να διεγείρει άμεσα την αντι-καρκινική ικανότητα των NK<sup>202</sup>.

Σε ένα πειραματικό μοντέλο πνευμονικής ίνωσης δείχθηκε ότι η ανεπάρκεια σε CXCR3 συνδέεται με επιτάχυνση της νόσου και με σημαντική μείωση του αριθμού των NK και CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων στους πνεύμονες<sup>203</sup>. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι τα NK κύτταρα από δέρμα ασθενών με ψωρίαση εκφράζουν τον CXCR3 υποδοχέα και είναι ικανά να μεταναστεύσουν προς διαβαθμιζόμενη συγκέντρωση CXCL10<sup>204</sup>. Επίσης σημαντικό είναι το εύρημα ότι τα ανθρώπινα NK κύτταρα της μήτρας εκφράζουν ψηλά επίπεδα CXCR3 και ότι το ενδομήτριο απαντά σε φυλετικές ορμόνες, όπως προγεστερόνη και οιστραδιόλη, με αυξημένη έκκριση CXCL10 και CXCL11, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επιστράτευση των NK στο ενδομήτριο κατά την εγκυμοσύνη πιθανά συμβαίνει μέσω του CXCR3 υποδοχέα<sup>205</sup>.

Επιπλέον των CXCR3 προσδεμάτων, και άλλα μέλη της CXCR οικογένειας των χημειοκινών εμπλέκονται στην κινητοποίηση των NK κυττάρων. Έχει δειχθεί σχετικά πρόσφατα ότι μαστοκύτταρα, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί προηγουμένως με ρεοϊό, εκκρίνουν ψηλά επίπεδα CXCL8<sup>206</sup>. Η CXCL8 δεσμεύεται τόσο στο CXCR1 όσο και στο CXCR3, και η έκκρισή της από τα μαστοκύτταρα είναι ικανή να προσελκύσει τα NK κύτταρα κυρίως δια αλληλεπίδρασης με τον CXCR1. Παρομοίως, η χημειοκίνη CXCL14 έχει βρεθεί να προάγει τη χημειόταξη των NK<sup>207</sup>. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως ενώ οι περισσότεροι ιστοί μπορούν να εκφράσουν CXCL14, ένας αριθμός καρκινικών κυττάρων αδυνατούν να εκφράζουν, υποδηλώνοντας ότι η αρνητική ρύθμιση της CXCL14 μπορεί να είναι ένας τρόπος παρεμπόδισης της κινητοποίησης των NK.

Η **CXCL12** (γνωστή και ως SDF-1α, stromal cell derived factor-1α) αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα CXCR4, ο οποίος εκφράζεται στα NK κύτταρα<sup>208,209</sup>. Έχει αναφερθεί ότι η μεταφορά ανθρώπινων NK κυττάρων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια οδηγεί στην μετανάστευσή τους στη σπλήνα και το μυελό των οστών, όμως μόνο η μετανάστευση προς το μυελό των οστών εξαρτάται από το CXCR4<sup>209</sup>. Συνεπώς, ο CXCR4 και η CXCL12 φαίνονται να ρυθμίζουν τον επικοινωνισμό των NK κυττάρων στο μυελό των οστών. Η CXCL12 εκφράζεται από το ενδοθήλιο του μυελού, τα κύτταρα του οποίου εκφράζουν επίσης το μόριο πρόσδεσης VCAM-1, το πρόσδεμα του οποίου, η ιντεγκρίνη α4β1 ή VLA-4 (very late antigen-4), εκφράζεται στην επιφάνεια των NK<sup>210</sup>. Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι η CXCL12 επάγει τη σταθερή πρόσδεση των NK κυττάρων στα VCAM-1<sup>+</sup> κύτταρα μέσω αλληλεπιδράσεων με το VLA-4, ενώ το *in vivo* μπλοκάρισμα του VLA-4 παρεμποδίζει την κινητοποίηση των NK προς το μυελό των οστών.

Στο ποντίκι, ο CXCR4 υποδοχέας εκφράζεται στα NK κύτταρα του αίματος, της σπλήνας και του μυελού των οστών ανεξάρτητα από το στάδιο διαφοροποίησής τους<sup>208</sup>. Ωστόσο τα ώριμα NK του μυελού παρουσιάζουν την ισχυρότερη απόκριση στην CXCL12, και όταν η σηματοδότηση μέσω του CXCR4 παρεμποδίζεται, ο αριθμός των NK του μυελού των οστών μειώνεται, ενώ των NK του αίματος και της σπλήνας αυξάνεται αναλόγως, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι CXCR4/CXCL12 αλληλεπιδράσεις μπορούν να προωθήσουν την κατακράτηση των NK κυττάρων στο μυελό των οστών<sup>208</sup>.

Ένα εύλογο ερώτημα είναι το πώς ρυθμίζεται η κινητοποίηση των NK από το μυελό των οστών. Σχετικά πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η κινητοποίηση αυτή δε ρυθμίζεται από χημειοκίνες αλλά από τον υποδοχέα S1P5 (Sphingosine 1-phosphate receptor 5)<sup>211</sup>. S1P5<sup>-/-</sup> ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένους αριθμούς NK κυττάρων στο αίμα, στη σπλήνα και τον πνεύμονα αλλά αυξημένους αριθμούς NK στο μυελό των οστών.

Επιπρόσθετα, η CXCL12 εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των φαρυγγικών αμυγδαλών [μια θέση MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue)] ενώ τα NK στις θέσεις αυτές εκφράζουν ψηλά επίπεδα CXCR4<sup>212</sup>. Επίσης, τα ανθρώπινα CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα του φθαρτού εκφράζουν CXCR4 και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύσουν προς τους τροφοβλάστες που εκκρίνουν CXCL12<sup>209</sup>.

Συμπερασματικά, υπάρχει μια πληθώρα πειραματικών δεδομένων που υποστηρίζουν την άμεση συσχέτιση της κινητοποίησης των NK κυττάρων τόσο σε καταστάσεις φλεγμονής όσο και σε steady-state, με τις CXC χημειοκίνες, και κυρίως με τα προσδέματα των υποδοχέων CXCR3 και CXCR4.

### *CX<sub>3</sub>CL1, fractalkine*

Η CX<sub>3</sub>CL1 αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση χημειοκίνης, όχι μόνο λόγω του μοναδικού C-x-x-x-C μοτίβου της, αλλά και επειδή συναντάται τόσο σε διαλυτή μορφή ως χημειοτακτικός παράγοντας όσο και σε διαμεμβρανική μορφή (σε ενδοθηλιακά κύτταρα) ως μόριο πρόσδεσης<sup>213</sup>. Οι δυο αυτές ιδιότητες απαιτούν την ύπαρξη του ειδικού υποδοχέα CX<sub>3</sub>CR1, ο οποίος εκφράζεται σε ψηλά επίπεδα στα NK κύτταρα<sup>214</sup>. Συνεπώς, η έκφραση της CX<sub>3</sub>CL1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την πρόσδεση των και την επακόλουθη λύση τους από τα NK.

Μελέτες που αποσκοπούσαν στη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της CX<sub>3</sub>CL1, έδειξαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της CX<sub>3</sub>CL1 και αντικαρκινικής απόκρισης. Έτσι, όταν καρκινικά κύτταρα λεμφώματος που υπερεκφράζουν CX<sub>3</sub>CL1 εισάγονται σε ποντίκια παρατηρείται σημαντική καταστολή στην ανάπτυξη του όγκου λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης των NK κυττάρων, τα οποία ελέγχουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω της παραγωγής της IFN-γ και περφορίνης<sup>215</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε πειράματα που χρησιμοποιούσαν μια κυτταρική σειρά καρκινώματος του πνεύμονα<sup>216</sup>. Επιπλέον, ποντίκια ανεπαρκή σε CX<sub>3</sub>CR1 αποδείχθηκαν ανίκανα να προσελκύσουν NK κύτταρα στον πνεύμονα τόσο παρουσία καρκινικής πρόκλησης όσο και υπό ομοιοστατική κατάσταση<sup>217</sup>.

Επιπρόσθετα της χημειοτακτικής ιδιότητας, ο υποδοχέας CX<sub>3</sub>CR1 εμπλέκεται και στην παραγωγή της IFN-γ από τα NK. Έτσι, όταν η έκφραση του CX<sub>3</sub>CR1 καταστέλλεται, τα NK κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα έκκρισης IFN-γ<sup>217</sup>, ενώ η παραγωγή της IFN-γ επάγεται κατόπιν επώασης με CX<sub>3</sub>CL1. Επίσης, η CX<sub>3</sub>CL1 που παράγεται από τα ώριμα DC συμμετέχει στην DC-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση των NK<sup>218</sup>. Η επίδραση της CX<sub>3</sub>CL1 μπορεί να τροποποιηθεί από την IL-15, καθώς έχει δειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση του CX<sub>3</sub>CR1 στα NK<sup>219</sup>.

Συμπερασματικά, η CX<sub>3</sub>CL1 και ο υποδοχέας της, CX<sub>3</sub>CR1, ρυθμίζουν τη μετανάστευση των NK προς τις καρκινικές εστίες καθώς και τη λειτουργική δράση των NK.

### ***Τα NK κύτταρα Κυκλοφορούν Ανάμεσα στα Όργανα του Σώματος***

Απ' όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, είναι φανερό ότι υπάρχει μια πληθώρα δεδομένων σχετικά με τη μετανάστευση των NK κυττάρων σε καταστάσεις ασθένειας. Για παράδειγμα, οι CC και CXC χημειοκίνες ρυθμίζουν την κινητοποίηση των NK προς διάφορα όργανα του σώματος που έχουν προσβληθεί από μολύνσεις ή καρκίνο (Εικόνα 2-6). Παρομοίως, οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους κωδικοποιούν για την εντόπιση των NK κυττάρων στα διάφορα όργανα του σώματος, ενώ απουσία κάποιου σήματος μόλυνσης/φλεγμονής, ο CXCR4 φαίνεται να ρυθμίζει την επιστράτευση και κατακράτηση των NK στο μυελό των οστών.

<b>Chemokine</b>	<b>Receptor</b>	<b>NK migratory capacity</b>
CCL2	CCR2	Lung (malignancy, fungal infection, chronic inflammation)
CCL3	CCR1, CCR5	Lung (bacterial infection, inflammation) Liver (viral infection) Placenta (pregnancy)
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	Spleen (viral infection) Liver (viral infection)
CCL21	CCR7	Lymph node (homeostasis)
CXCL9 CXCL10 CXCL11	CXCR3	Splenic white pulp (viral infection) Lymph node (homeostasis) Eye & brain (viral infection) Various tumour sites Lung (inflammation) Skin (psoriasis) Endometrium (pregnancy)
CXCL12	CXCR4	Bone marrow (homeostasis) Adenoids (homeostasis) Trophoblasts (pregnancy)
CX <sub>3</sub> CL1	CX <sub>3</sub> CR1	Various tumour sites

***Εικόνα 2-6 Παραδείγματα Χημειοκινών που Απαιτούνται για τη Μετανάστευση των NK κυττάρων***

Το γεγονός ότι τα NK κύτταρα είναι παρόντα σε πολλά όργανα του σώματος υποδηλώνει δυο εναλλακτικές υποθέσεις:

1. Τα NK κύτταρα εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και μεταναστεύουν σε διάφορα όργανα όπου αναπτύσσουν συγκεκριμένες λειτουργίες και φαινοτυπικές ιδιότητες που αποτυπώνονται από το τοπικό περιβάλλον. Στη συνέχεια, τα NK μπορούν να κινητοποιηθούν ξανά σε καταστάσεις ασθενειών που μεταβάλλουν την ισορροπία των εκκρινόμενων χημειοκινών.
2. Τα NK κύτταρα βρίσκονται σε μια συνεχή κινητοποίηση και κυκλοφορούν διαρκώς ανάμεσα στα διάφορα οργανικά διαμερίσματα του σώματος.

Ως τώρα, δεν είναι ακόμα βέβαιο ποιες από τις δυο υποθέσεις είναι αληθινή, ή εάν η αλήθεια βρίσκεται κάπου ενδιάμεσα. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί από την ομάδα του Vivier υποστηρίζουν τη δεύτερη υπόθεση. Έτσι, όταν σπληνικά NK κύτταρα μεταφέρθηκαν σε παινε συγγενικούς ξενιστές, βρέθηκαν να υπάρχουν σε όλα τα όργανα, όπου αναμένεται να εντοπιστούν τα NK και μάλιστα στις ίδιες αναλογίες με αυτές των NK του ξενιστή<sup>211</sup>. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα NK κύτταρα από μια συγκεκριμένη ανατομική θέση δεν περιορίζονται σε εκείνο το περιβάλλον αλλά μπορούν να ανακυκλωθούν μεταξύ διαφόρων οργάνων. Είναι πιθανό όμως, λόγω της άμεσης σύνδεσης της σπλήνας με το αίμα, τα σπληνικά NK να εμπεριέχουν μεγάλο ποσοστό ανώριμων κυττάρων (προερχόμενων από το μυελό των οστών) τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν παντού. Άρα, θα ήταν ενδιαφέρον αυτά τα πειράματα να επαναληφθούν με NK από διαφορετικά όργανα, καθώς υπάρχει ακόμα η πιθανότητα ορισμένα μικροπεριβάλλοντα να αποτυπώνουν τέτοιες μεταβολές στα NK κύτταρα, οι οποίες να επηρεάζουν την ικανότητα μετανάστευσής τους. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός, ότι, ενώ ορισμένοι υποπληθυσμοί των NK κυκλοφορούν συνεχώς ανάμεσα στα διάφορα όργανα, άλλοι πάλι είτε δεν μεταναστεύουν ή μεταναστεύουν μόνο σε καταστάσεις προσβολής του ξενιστή από παθογόνα, καρκίνο ή φλεγμονή.

## 2.2 NK Κύτταρα στην Ανοσοθεραπεία του Καρκίνου

Η ικανότητα των NK κυττάρων να αναγνωρίσουν κύτταρα-στόχους χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίησή τους σχετίζεται με την αναγνώριση διεγερτικών σημάτων επαγόμενων από το stress και την έλλειψη αναστολής από τα MHC μόρια του εαυτού. Η δράση των NK μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου<sup>220</sup>, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών κακοηθειών καθώς και ενός αριθμού συμπαγών όγκων, όπως το μελάνωμα, το νεφρικό καρκίνωμα, ο καρκίνος των ωοθηκών και το νευροβλάστωμα. Οι στρατηγικές ανοσοθεραπείας αποσκοπούν:

α) στην ενεργοποίηση των ενδογενών NK κυττάρων του καρκινοπαθή, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με τη χορήγηση κυτταροκινών/αυξητικών παραγόντων<sup>221-223</sup> αλλά και ανοσοτροποποιητικών ουσιών, όπως τα ανάλογα θαλιδομίδης<sup>224</sup> και ανοσοενισχυτικά DNA σύμπλοκα<sup>225</sup>.

β) στη στόχευση των καρκινικών κυττάρων από αλλογενή NK κύτταρα, στο πλαίσιο της αλλογενούς μεταμόσχευσης αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (SCT, Stem Cells Transplantation). Η χιμαιρική κατάσταση των ασθενών στις μεταμοσχεύσεις αυτές παρέχει μια κατάλληλη πλατφόρμα για την εκδήλωση αλλοαντιδράσεων, μεσολαβούμενων από τα NK, έναντι των καρκινικών κυττάρων.

γ) στην άμεση παθητική μεταφορά «έτοιμων να σκοτώσουν» αυτόλογων ή αλλογενών ενεργοποιημένων NK κυττάρων<sup>10</sup>.

### 2.2.1 Αποκρίσεις των NK Κυττάρων στους Όγκους

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν αποδείξει την ικανότητα των NK κυττάρων να αναγνωρίσουν και να λύουν *in vitro* διάφορους τύπους καρκινικών κυτταρικών σειρών, ανθρώπινης ή ποντικής προέλευσης<sup>226</sup>. Σε ορισμένες πειραματικές μελέτες σε ποντίκια έχει δειχθεί ο ρόλος των NK στην εξόντωση μεταμοσχευμένων όγκων<sup>227,228</sup>. Άμεσες ενδείξεις για τη στόχευση ανθρώπινων καρκίνων από τα NK έχουν προκύψει από *ex vivo* μελέτες των αλληλεπιδράσεων των NK με πρωτογενή καρκινικά κύτταρα<sup>229</sup>. Επίσης, δεδομένα από κλινικές μελέτες βασισμένες στη μεταμόσχευση αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT) ή στην παθητική μεταφορά NK κυττάρων επιβεβαιώνουν τον

αντι-καρκινικό ρόλο των NK<sup>10,230</sup>. Παρά την πληθώρα των μελετών που αποδεικνύουν τη δυνατότητα των NK να στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, οι ενδείξεις για την κλινική αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων σε καρκινοπαθείς NK κυττάρων, είναι ανεπαρκείς.

Ωστόσο, δεν είναι όλοι οι όγκοι ευαίσθητοι στη μεσολαβούμενη από τα NK λύση. Οι αιτίες της παρατηρούμενης αυτής αντίστασης είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν τόσο κάποια ειδικά χαρακτηριστικά των ίδιων των καρκινικών κυττάρων όσο και τροποποιήσεις των ιδιοτήτων των NK από τα καρκινικά κύτταρα<sup>231</sup>. Μερικά παραδείγματα των μηχανισμών διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση των NK είναι:

- Υπερέκφραση μορίων MHC τάξης I από ορισμένους μεταστατικούς όγκους και/ή απώλεια έκφρασης προσδεμάτων, που αναγνωρίζουν διεγερτικούς υποδοχείς των NK, σε άλλους όγκους<sup>232-234</sup>.
- Υπόεκφραση των διεγερτικών υποδοχέων των NK υπό την επίδραση του TGF-β<sup>100</sup>.
- Οι αλληλεπιδράσεις των NK με τα καρκινικά κύτταρα-στόχους μπορεί να οδηγήσουν στην καταστολή έκφρασης ειδικών διεγερτικών υποδοχέων, όπως για παράδειγμα η μειωμένη έκφραση του DNAM-1 κατόπιν αναγνώρισης των καρκινικών ωοθηκικών κυττάρων που εκφράζουν PVR<sup>229</sup>.
- Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να περιορίσουν τη δράση των NK μέσω επαγωγής και ενεργοποίησης των ανοσοανασταλτικών CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg κυττάρων. Τα Treg κύτταρα δρουν καταστέλλοντας τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό, την κυτταροτοξικότητα και την παραγωγή της IFN-γ από τα NK<sup>235,236</sup>.

### **2.2.2 Μοριακές Αλληλεπιδράσεις στις αντι-Καρκινικές Αποκρίσεις των NK Κυττάρων**

Οι υποδοχείς NCR (NKp46, NKp30 & NKp44) αντιπροσωπεύουν μια σημαντική ομάδα διεγερτικών υποδοχέων των NK κυττάρων<sup>237</sup>. Παρότι τα προσδέματα που ενεργοποιούν αυτούς τους υποδοχείς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν το σπουδαίο ρόλο των NCR υποδοχέων στη λύση

διάφορων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως μελάνωμα, καρκίνωμα, νευροβλάστωμα, μυελο- και λεμφο-βλαστική λευχαιμία, όπως και μετασχηματισμένα με EBV (Epstein-Barr virus) B λεμφοκύτταρα<sup>238</sup>. Άλλοι καλά χαρακτηρισμένοι διεγερτικοί υποδοχείς είναι ο NKG2D<sup>101</sup> και ο DNAM-1<sup>113</sup>. Τα προσδέματα του NKG2D υποδοχέα (MICA, MICB, ULBP) εκφράζονται από μια πληθώρα ανθρώπινων επιθηλιακών όγκων και λευχαιμικών κυτταρικών σειρών, και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων αυτών στην NK-μεσολαβούμενη λύση. Τα προσδέματα του DNAM-1 υποδοχέα (CD155 & CD112) έχουν βρεθεί να εκφράζονται σε καρκινώματα, μελανώματα και νευροβλαστώματα<sup>239</sup>. Ο υποδοχέας CD16 των NK κυττάρων συμμετέχει στην αναγνώριση των οψωνισμένων με αντισώματα παθογόνων μικροοργανισμών. Άλλοι υποδοχείς που λειτουργούν συνδιεγερτικά στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων και την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων είναι οι 2B4 (CD244), NTBA, NKp80, CD2, CD11a/CD18, και CD59<sup>240</sup>.

Η ενεργοποίηση των NK κυττάρων υπόκειται και σε αρνητικό έλεγχο από τους ανασταλτικούς υποδοχείς, οι οποίοι δεσμεύουν κλασικά και μη μόρια MHC τάξης I<sup>84</sup>. Τα μόρια αυτά εκφράζονται φυσιολογικά στα περισσότερα υγιή κύτταρα του οργανισμού, αλλά συχνά η έκφρασή τους ελαττώνεται ή καταστέλλεται πλήρως κατόπιν κυτταρικού μετασχηματισμού ή κατά την νεοπλασματική εξέλιξη<sup>241</sup>. Στον άνθρωπο, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, οι κύριοι ανασταλτικοί υποδοχείς είναι οι KIR και το διμερές CD94/NKG2A. Οι υποδοχείς KIR αναγνωρίζουν ομάδες των HLA-A, -B, και -C αλληλόμορφων<sup>242</sup>, ενώ οι υποδοχείς CD94/NKG2A,B αναγνωρίζουν HLA-E μόρια<sup>88</sup>. Τα άτομα διαφέρουν στον αριθμό και τον τύπο των κληρονομούμενων KIR γονιδίων, και κάθε NK κύτταρο εκφράζει ένα συγκεκριμένο συνδυασμό γονιδίων KIR. Δηλαδή, πολλά NK κύτταρα εκφράζουν μόνο λίγους από τους δυνατούς τύπους των υποδοχέων KIR. Τα περισσότερα NK κύτταρα, όμως, εκφράζουν τουλάχιστον έναν ανασταλτικό υποδοχέα, ο οποίος είναι ειδικός για ένα πρόσδεμα MHC τάξης I του εαυτού. Το πρότυπο αυτό έκφρασης των υποδοχέων KIR επιτρέπει στα NK κύτταρα να ανιχνεύσουν κύτταρα από τα οποία απουσιάζει ένα και μόνο μόριο MHC τάξης I<sup>242</sup>.

Η σχετική σημασία των διαφόρων διεγερτικών υποδοχέων των NK στην αναγνώριση των πρωτογενών ανθρώπινων όγκων είναι μερικώς γνωστή. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η αποτελεσματική ενεργοποίηση της



κυτταροτοξικής δράσης των ηρεμούντων NK κυττάρων απαιτεί συν-διέγερση από αρκετούς τύπους υποδοχέων<sup>98</sup>. Αντίθετα, η δέσμευση του υποδοχέα LFA-1 μόνο είναι ικανή να επάγει την κυτταροτοξική δράση των ενεργοποιημένων με IL-2 NK κυττάρων<sup>98</sup>. Μεταφράζοντας αυτά τα δεδομένα στο πλαίσιο της κυτταροτοξικότητας έναντι των καρκινικών κυττάρων, συμπεραίνουμε ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των NK κυττάρων μέσω έκφρασης μιας συστοιχίας προσδεμάτων, το κάθε ένα από τα οποία ξεχωριστά θα ήταν ανίκανο να πυροδοτήσει μια κυτταροτοξική απόκριση. Για τα NK κύτταρα ενεργοποιημένα με IL-2, ποσοτικά λιγότερες αλληλεπιδράσεις είναι επαρκείς για την αναγνώριση και εξόντωση των καρκινικών κυττάρων (με δεδομένο την απουσία ανασταλτικών σημάτων από τα MHC μόρια τάξης I). Σε ορισμένες καταστάσεις, τα διεγερτικά σήματα υπερισχύουν των αρνητικών σημάτων, όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση των NKG2D μεσολαβούμενης ενεργοποίησης από ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν μόρια MHC τάξης I<sup>243</sup>. Ο τελικός βαθμός ενεργοποίησης των NK εξαρτάται επίσης από την σχετική πυκνότητα των προσδεμάτων για την ενσωμάτωση των σημάτων από τους διεγερτικούς και τους ανασταλτικούς υποδοχείς.

### **2.2.3 Δραστικοί Μηχανισμοί που Συμμετέχουν στις αντι-Καρκινικές Αποκρίσεις των NK Κυττάρων**

Παρομοίως με τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα χρησιμοποιούν διάφορους δραστικούς μηχανισμούς για την εκδήλωση της αντι-καρκινικής τους δράσης. Οι δυο κύριοι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων-στόχων είναι η εξωκύττωση κυτταροτοξικών κοκκίων και το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου<sup>134</sup>. Η εξωκύττωση κυτταροτοξικών κοκκίων περιλαμβάνει την έκκριση περφορίνης και γρανενζύμων<sup>244</sup>. Το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου περιλαμβάνει κυρίως μέλη της οικογένειας του TNF, ανάμεσα στα οποία οι FasL, TNF- $\alpha$  και TRAIL παίζουν ρόλο κλειδί στην επαγωγή της απόπτωσης<sup>134</sup>. Από τους διαλυτούς μεσολαβητές εκκρινόμενους από τα NK, η IFN- $\gamma$  κατέχει κυρίαρχη θέση στις αντι-καρκινικές αποκρίσεις των NK, καθώς καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μεταβολική ενεργότητα των καρκινικών κυττάρων, και αναστέλλει την αγγειογένεση<sup>245</sup>. Η IFN- $\gamma$  είναι σημαντικός μεσολαβητής των T<sub>H</sub>1 ανοσολογικών αποκρίσεων και κατ' αυτόν τον τρόπο θεωρείται ότι εξουδετερώνει τους μηχανισμούς

διαφυγής καρκινικών κυττάρων, οι οποίοι μεσολαβούνται από κυτταροκίνες τύπου-2<sup>236</sup>.

#### **2.2.4 Ενεργοποίηση των NK Κυττάρων που Οδηγεί σε Ενισχυμένη αντι-Καρκινική Δράση**

Αρκετές κυτταροκίνες έχειδειχθεί να επιδρούν στη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των NK κυττάρων, όπως οι IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, και οι τύπου-1 IFN<sup>52</sup>. Ως συνέπεια της ενεργοποίησής τους από κυτταροκίνες, τα NK κύτταρα πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται, παράγουν κυτταροκίνες, και υπερεκφράζουν διάφορα δραστικά μόρια, όπως μόρια πρόσδεσης, NKp44, περφορίνη, γρανένζυμα, FasL και TRAIL. Οι επιδράσεις των επιμέρους κυτταροκινών πάνω στα NK περιγράφονται λεπτομερέστερα στην προηγούμενη ενότητα.

Οι κυτταροκίνες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη θεραπεία διάφορων ανθρώπινων καρκίνων και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μηχανισμοί δράσης βασίζονται στην άμεση ή έμμεση ενεργοποίηση των NK κυττάρων<sup>222</sup>. Αρκετές κλινικές μελέτες έχουν εκτιμήσει τις επιδράσεις της χορήγησης της IL-2 στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων σε καρκινοπαθείς<sup>221</sup>. Δυστυχώς, υψηλές δόσεις της IL-2 προκαλούν σημαντική τοξικότητα. Παρόλα αυτά, η IL-2 χρησιμοποιείται συχνά σε χαμηλότερες δόσεις με σκοπό τη διέγερση των NK κυττάρων *in vivo*. Πιο πρόσφατα, η κυτταροκίνη αυτή έχει χρησιμοποιηθεί μαζί με μονοκλωνικά αντισώματα για την ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων<sup>246</sup>. Από πολλές απόψεις, η IL-15 θεωρείται καλύτερη κυτταροκίνη. Η IL-15 είναι πιο αποτελεσματική από την IL-2 στην επέκταση του NK κυτταρικού διαμερίσματος<sup>247,248</sup>. Επίσης, προάγει την επιβίωση των NK και προστατεύει τα NK από την επαγόμενη από την ενεργοποίηση κυτταρικό θάνατο (AICD, Activation-Induced Cell Death). Όμως, προκειμένου να έχουμε αποτελεσματική αντι-καρκινική δράση *in vivo*, πιθανώς να απαιτούνται υψηλές δόσεις IL-15<sup>249</sup>. Η επίγνωση του ρόλου των πρώιμων αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων, όπως το πρόσδεμα c-kit και το πρόσδεμα Flt-3, και της συνέργειάς τους με την IL-15 στην ανάπτυξη των ανθρώπινων NK κυττάρων στο μυελό των οστών, θα επιτρέψει τη διεξαγωγή μελετών για επιπρόσθετους συνδυασμούς κυτταρικών για κλινική χρήση με σκοπό την

επέκταση των NK κυττάρων *in vivo*. Παρόλα αυτά, είναι αναγκαία μια καλύτερη γνώση του πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι κυτταροκίνες με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο για την επίτευξη της βέλτιστης ενεργοποίησης των NK κυττάρων, είτε από μόνες τους ή σε συνδυασμό με άλλες ανοσολογικές παρεμβάσεις<sup>222</sup>.

### **2.2.5 Τροποποίηση της Σηματοδότησης των NK Υποδοχέων με Σκοπό την Προώθηση της Κυτταροτοξικής Δράσης των NK Κυττάρων**

Ένας πιθανός τρόπος ενίσχυσης της κυτταροτοξικής/αντι-καρκινικής δράσης των NK, που τώρα έχει φτάσει στο στάδιο κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους, είναι το μπλοκάρισμα των ανασταλτικών υποδοχέων KIR με μονοκλωνικά αντισώματα<sup>250</sup>. Μια τέτοια προσέγγιση θα ήταν ιδανική για τη θεραπεία αιμοποιητικών καρκίνων που δεν επιδέχονται SCT. Προ-κλινικές μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η στρατηγική αυτή μπορεί να ενισχύσει την αντι-καρκινική δράση σε αυτόλογα και σε αλλογενή συστήματα<sup>251</sup>. Με την ίδια λογική προσέγγιση, η τροποποίηση των διεγερτικών προσδεμάτων στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα αναγνώρισης από τα NK κύτταρα. Τα NK, επίσης, μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά πριν την παθητική χορήγησή τους σε ασθενείς. Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η δημιουργία NK κυττάρων που να υπερ-εκφράζουν σταθερά έναν χμιαρικό υποδοχέα ο οποίος αναγνωρίζει ειδικά προσδέματα στα καρκινικά κύτταρα σε συνδυασμό με ένα συστατικό σηματοδότησης που πυροδοτεί την ενεργοποίηση των NK<sup>252,253</sup>.

### **2.2.6 Μεσολαβούμενες από τα NK Κύτταρα αντι-Καρκινικές Αποκρίσεις στο Πλαίσιο Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Αρχέγονων Κυττάρων**

Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (SCT, Stem Cells Transplantation) είναι μια καθιερωμένη θεραπευτική στρατηγική έναντι διαφόρων αιματολογικών κακοηθειών. Η σκόπιμη αναντιστοιχία μεταξύ των υποδοχέων KIR του δότη με τα προσδέματα HLA του δέκτη στις αιμοποιητικές SCT αποσκοπεί στην εκδήλωση της μοσχεύματος-έναντι-όγκου (GvT, graft-versus-tumor) επίδρασης από τα NK κύτταρα που αναπτύσσονται στους δέκτες. Στις πρωτοποριακές μελέτες του

Velardi και συνεργατών, ενήλικες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε απλοταυτόσημη SCT, έδειξαν να έχουν αυξημένη επιβίωση ελεύθεροι-νόσου και μειωμένη συχνότητα υποτροπών, όταν μια αναντιστοιχία KIR-πρόσδεμα υπερισχύει<sup>254,255</sup>. Αυτό το αποτέλεσμα συνέβη απουσία των T λεμφοκυττάρων του δότη, τα οποία είχαν απομακρυνθεί πριν τη μεταμόσχευση. Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα αιμοποιητικά μοσχεύματα που παρουσίαζαν NK αλλοαντίδραση έναντι του δέκτη, είχαν επίσης αυξημένη συχνότητα εμφύτευσης μυελού των οστών και μειωμένη συχνότητα κλινικά σημαντικής νόσου του μοσχεύματος-έναντι-ξενιστή (GvHD, Graft-versus-Host Disease). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα του δότη λύση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του ξενιστή, οδηγώντας έτσι στην αναστολή της έναρξης (priming) των αλλοαντιδραστικών T λεμφοκυττάρων του δότη<sup>256</sup>. Κλινικές μελέτες, που ακολούθησαν τις πρώτες αναφορές του Velardi και συνεργατών, συμφωνούν στην πλειοψηφία τους για τον ευεργετικό ρόλο της αναντιστοιχίας KIR-πρόσδεματος σε διαφορετικά σχήματα μεταμόσχευσης<sup>257</sup>.

### **2.2.7 Παθητική Ανοσοθεραπεία με τη Χρήση Βραχυπρόθεσμα Ενεργοποιημένων *ex vivo* NK Κυττάρων**

Λόγω των κλινικά αναξιόλογων αποτελεσμάτων από προηγούμενα πρωτόκολλα βασισμένα στη χρήση αυτόλογων «LAK» (Lymphokine Activated Killer cells) ή NK κυττάρων<sup>258,259</sup>, και λόγω των ενθαρρυντικών επιδράσεων που παρατηρήθηκαν στις απλοταυτόσημες, απεμπλουτισμένες από τα T λεμφοκύτταρα SCT, το ενδιαφέρον στράφηκε στο ενδεχόμενο χρήσης αλλογενών (και άρα δυνητικά αλλοαντιδραστικών) NK κυττάρων στην παθητική, κυτταρική ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Σε πρόσφατες μελέτες, ο Miller και συνεργάτες έγχυσαν απλοταυτόσημα NK κύτταρα μαζί με IL-2 σε 43 ασθενείς σε προχωρημένα στάδια καρκίνου<sup>10</sup>. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η λεμφαφαιρητική αγωγή υψηλής δόσης οδήγησε σε μακροπρόθεσμη επιβίωση και επέκταση των προερχόμενων από το δότη NK κυττάρων *in vivo*. Ο *in vivo* πολλαπλασιασμός συνοδεύτηκε με αυξημένα επίπεδα της ενδογενούς IL-15, η οποία πιθανά κινητοποιεί τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων. Τα κλινικά αποτελέσματα αυτού του πρωτοκόλλου κρίθηκαν ικανοποιητικά, διότι οι εγχύσεις αυτές όχι μόνο ήταν εφικτές και ανεκτές από τον οργανισμό χωρίς κάποια ιδιαίτερη

τοξικότητα, αλλά οδήγησαν σε πλήρη ύφεση της νόσου σε 5 από τους 19 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

### **2.2.8 Παθητική Ανοσοθεραπεία με τη Χρήση NK Κυτταρικών Σειρών ή Ενεργοποιημένων *ex vivo* Πρωτογενών NK Κυττάρων**

Παράλληλα, έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες παθητικής μεταφοράς NK-92 κυττάρων<sup>260</sup>. Η κυτταρική σειρά αυτή μπορεί να καλλιεργηθεί συνεχώς κάτω από GMP-συνθήκες (Good Manufacturing Practice)<sup>261</sup>, εκφράζει πολλούς διεγερτικούς υποδοχείς και χαμηλά επίπεδα KIR υποδοχέων, και παρουσιάζει σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι πολλών καρκινικών στόχων. Γενικά, οι εγχύσεις αυτών των κυττάρων είναι επαρκώς ανεκτές από τον οργανισμό και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν επιδείξει αντι-καρκινικές δράσεις. Επιπρόσθετα, η κυτταρική σειρά αυτή είναι εύκολα τροποποιήσιμη γενετικά, γεγονός που ανοίγει καινούργιες προοπτικές για μελλοντικές κλινικές μελέτες.

Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την *ex vivo* επέκταση των NK κυττάρων<sup>29,262,263</sup>. Μερικά από αυτά τα πρωτόκολλα επιτρέπουν την καλλιέργεια εμπλουτισμένων σε NK κυτταρικών πληθυσμών κάτω από GMP-συνθήκες. Χρησιμοποιώντας τέτοια πρωτόκολλα έχει δειχθεί πως είναι εφικτή η επέκταση NK κυττάρων από τους ίδιους τους καρκινοπαθείς, ενθαρρύνοντας έτσι το ενδεχόμενο χρήσης αυτόλογων NK κυττάρων για την παθητική ανοσοθεραπεία. Όμως, η παθητική μεταφορά αυτόλογων NK κυττάρων πιστεύεται ότι θα είναι πιο αποτελεσματική στις περιπτώσεις καρκίνων που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα μορίων MHC τάξης I. Τα πρωτόκολλα επέκτασης των NK *ex vivo* παρέχουν μεγαλύτερους αριθμούς NK κυττάρων προς χρήση, γεγονός που είναι επιθυμητό σε ορισμένες περιπτώσεις. Ωστόσο, για να είναι αποτελεσματικά τέτοια πρωτόκολλα, είναι σημαντικό η επέκταση των NK κυττάρων *ex vivo* να μην οδηγεί σε φαινοτυπικές αλλαγές, αποκλίσεις από την αναπτυξιακή γραμμή ή/και επιλεκτική επέκταση ορισμένων υποπληθυσμών τέτοιες που να επηρεάζουν την αντι-καρκινική δράση των NK. Μια άλλη πτυχή που πρέπει να ληφθεί υπόψη σε τέτοιες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις είναι πως οι *in vitro* χειρισμοί δεν πρέπει να προκαλούν μεταβολές στην ικανότητα των κυττάρων να αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα και στην ικανότητα μετανάστευσης των NK προς επιθυμητές θέσεις στον οργανισμό.

### **2.2.9 Μελλοντικές Δυνατότητες και Στρατηγικές για την Αποτελεσματικότερη Παθητική NK Ανοσοθεραπεία**

Καθώς τα αυτόλογα NK κύτταρα καταστέλλονται από τα μόρια MHC τάξης I του εαυτού, τα αλλογενή NK κύτταρα μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να αποτελούν μια καλύτερη επιλογή για χρήση στο πλαίσιο της παθητικής, κυτταρικής ανοσοθεραπείας. Η τελευταία επιλογή έχει εφαρμογή ιδιαίτερος σε καταστάσεις, όπου τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα μορίων MHC τάξης I σε συνδυασμό με χαμηλά ή μέτρια επίπεδα έκφρασης διεγερτικών προσδεμάτων. Η αλλοαντίδραση των NK εξαρτάται από τα «απόντα» προσδέματα των KIR υποδοχέων στα κύτταρα-στόχους του δέκτη. Παρότι η αλλοαντίδραση των NK κυττάρων μπορεί να προβλεφθεί με γενετικούς αλγορίθμους βάσει της KIR- και HLA-γονοτύπησης, ο αριθμός των αλλοαντιδραστικών NK κυττάρων σε ένα δεδομένο δότη ποικίλει σημαντικά, από 0% μέχρι 62% των συνολικών NK<sup>264</sup>. Άρα, η πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας μια ανοσοθεραπευτικής παρέμβασης πρέπει να βασιστεί στην εκτίμηση του ρεπερτορίου των NK και στην επιλογή του δότη με την μεγαλύτερη υποπληθυσμό αλλοαντιδραστικών NK κυττάρων.

Μια προϋπόθεση για την επιβίωση των εγχυμένων κυττάρων είναι να μην απορριφθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη. Η απόρριψη των αλλογενών NK κυττάρων αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση για ειδικές NK ανοσοθεραπείες απουσία μυελοεκαθαριστικής αγωγής. Συνεπώς, κάποιο είδος προθεραπευτικής αγωγής (conditioning regimen) πρέπει να προηγηθεί της μεταφοράς των αλλογενών NK κυττάρων, όπως για παράδειγμα η χορήγηση κυκλοφωσφαμιδίου ή φλουδαραβίνης<sup>10</sup>. Πέρα από την πρόληψη της απόρριψης, τέτοιες αγωγές βοηθούν στην απαλοιφή των ανοσοκατασταλτικών Treg κυττάρων<sup>265</sup>. Επιπρόσθετα, υπάρχει μειωμένος ανταγωνισμός για αυξητικούς παράγοντες κατά τον ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό που ακολουθεί τη λεμφαφαίρεση και το κύμα των κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου της IL-15, μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την επέκταση *in vivo* των εγχυμένων NK κυττάρων<sup>10</sup>.

### **2.2.10 Ανθρώπινοι Καρκίνοι Δεκτικοί στη Στόχευση από τα NK Κύτταρα**

Είναι ήδη φανερό από *in vitro* μελέτες και από κλινικές μελέτες ότι ορισμένοι τύποι καρκίνων αποτελούν πιο κατάλληλους στόχους για ανοσοθεραπεία με NK κύτταρα. Η

παρουσία διεγερτικών προσδεμάτων σε ανθρώπινους όγκους αποτελεί προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των NK, και συνεπώς για την επίτευξη ικανοποιητικών κλινικών αποτελεσμάτων<sup>266</sup>. Το γεγονός αυτό απεικονίζεται στην ανεπάρκεια των NK κυττάρων να λύσουν λεμφοειδή λευχαιμικά κύτταρα σε αντίθεση με τα μυελοειδή, που ίσως οφείλεται στην απουσία έκφρασης του LFA-1 προσδέματος<sup>254</sup>. Παρομοίως, χαμηλή έκφραση των μορίων MHC τάξης I, ειδικά σε περιπτώσεις στις οποίες μια αναντιστοιχία KIR-προσδέματος υπολείπεται, είναι επίσης σημαντική. Οι περισσότερες ανοσοθεραπευτικές δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με σημαντικά μεγάλο καρκινικό φορτίο, στους οποίους οι συμβατές θεραπείες ήταν αναποτελεσματικές. Οι καλύτερες κλινικές συνθήκες για τις περισσότερες κυτταρικές θεραπείες, συμπεριλαμβανομένου και της βασιζόμενης στα NK ανοσοθεραπείας, είναι παρουσία ελάχιστου καρκινικού φορτίου<sup>267</sup>.

Η NK ανοσοθεραπεία έναντι μεγάλων συμπαγών καρκίνων παρουσιάζει ειδικά προβλήματα τα οποία περιλαμβάνουν όχι μόνο τον καρκινικό όγκο καθαυτό αλλά και την αναγκαιότητα διείσδυσης των NK στον όγκο. Παρά τις έως τώρα γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την κυκλοφορία των NK κυττάρων, λίγα είναι γνωστά για τους παράγοντες που προάγουν τη μετανάστευση και τη διήθηση των NK στους όγκους. Είναι γνωστό, όμως, ότι οι χημειοκίνες απαιτούνται για την προσέλκυση των NK κυττάρων στις καρκινικές θέσεις. Επίσης, τα NK εκφράζουν μια πληθώρα υποδοχέων δέσμευσης των χημειοκινών. Διαφορετικοί NK υποπληθυσμοί μπορούν να ταυτοποιηθούν βάσει του προφίλ έκφρασης των υποδοχέων των χημειοκινών και το πρότυπο έκφρασης αυτών πιθανά εξαρτάται και από το στάδιο ενεργοποίησης των NK<sup>42</sup>.

### 2.3 Γλυκοκορτικοειδή ως Τροποποιητές των Ανοσολογικών Αποκρίσεων

Η ανάπτυξη και η λειτουργία των κυττάρων που απαρτίζουν το ανοσολογικό σύστημα αποτελούν αντικείμενο ρύθμισης πολλών ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Οι πιο γνωστοί και καλά μελετημένοι ως προς τους στόχους τους, το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων, τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης και τις φυσιολογικές τους επιδράσεις, είναι οι κυτταροκίνες. Μια άλλη ομάδα ουσιών, που μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσολογικού, αποτελούν και οι παράγοντες του νευροενδοκρινικού συστήματος. Πληθώρα πειραματικών δεδομένων και παρατηρήσεων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, υποστηρίζουν πως οι παράγοντες αυτοί μπορούν και συμμετέχουν άμεσα στη διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης. Ίσως οι πιο καλά μελετημένοι μεσολαβητές σ' αυτήν την κατηγορία είναι τα στεροειδή, και ιδιαίτερα τα γλυκοκορτικοειδή (GC).

Τα GC είναι μικρές λιποφιλικές ουσίες οι οποίες μέσω της πρόσδεσής τους στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR, GC receptor)<sup>268</sup> συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και ο μεταβολισμός. Η γενικευμένη φύση αυτών των διαδικασιών καθιστά τα GC σημαντικά στην ανάπτυξη και λειτουργία σχεδόν όλων των ιστών του σώματος. Ίσως η πιο γνωστή δράση των GC είναι αυτή στο ανοσοποιητικό σύστημα: οι αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των GC αποτελούν τη βάση θεραπείας πολλών φλεγμονωδών διαταραχών και ορισμένων αιματολογικών κακοηθειών.

Τα GC παράγονται και εκκρίνονται στη συστηματική κυκλοφορία από το φλοιό των επινεφριδίων. Η έκκρισή τους βρίσκεται υπό τον έλεγχο του άξονα υποθαλάμου (CRH, corticotropin releasing hormone) – υπόφυσης (ACTH, adrenalcorticotropic hormone)<sup>269</sup>. Τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων ανταποκρίνονται στα υψηλά επίπεδα της κορτικοτροπίνης άμεσα με αυξημένη έκκριση GC καθώς και παραγωγή των αντίστοιχων βιοσυνθετικών ενζύμων. Τα επίπεδα των GC διατηρούνται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ενός αναδραστικού συστήματος ελέγχου. Το κυριότερο ερέθισμα αυξημένων επιπέδων ACTH, και κατ' επέκταση των GC, είναι οι εντασιογόνες καταστάσεις (stress) ένας όρος που καλύπτει ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων<sup>270,271</sup>.



Η δράση των GC δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωσή τους στο αίμα και τα επίπεδα έκφρασης του GR, αλλά και από τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό στους ιστούς-στόχους. Η κορτιζόλη μεταβολίζεται από το σύστημα των αφυδρογονασαών των 11-βήτα υδροξυστεροειδών (11-β HSD, 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase), το οποίο αποτελείται από δυο ισοένζυμα, την 11-beta HSD1 και την 11-beta HSD2<sup>272</sup>. Η διαφορετική έκφραση αυτών των δυο ισομορφών στους ιστούς καθορίζει και την τοπική συγκέντρωση της κορτιζόλης. Η 11-beta HSD1 εκφράζεται σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς (όπως το ήπαρ, ο λιπώδης ιστός, οι σκελετικοί μύες, το κεντρικό νευρικό σύστημα) και καταλύει τη μετατροπή της κορτιζόνης (βιολογικά ανενεργή) σε κορτιζόλη (βιολογικά ενεργή). Η 11-beta HSD2 καταλύει την αντίθετη αντίδραση και εκφράζεται σε ιστούς με αυξημένη δράση αλατοκορτικοειδών, όπως είναι τα νεφρά και το παχύ έντερο. Άλλες ανατομικές θέσεις, όπου η έκφραση της 11-beta HSD1 έχει συσχετιστεί με την αναγκαιότητα για επαρκή έκθεση σε GC, είναι τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών, τα κύτταρα του οφθαλμού, τα στρωματικά κύτταρα του λεμφαδένα, και ο πνεύμονας<sup>273</sup>. Ανάμεσα στους παράγοντες που ρυθμίζουν θετικά την έκφραση της 11-beta HSD1 συγκαταλέγονται και διάφορες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ <sup>274</sup>.

### 2.3.1 Γλυκοκορτικοειδή και Απόπτωση

Από παλιά ήταν γνωστό πως ανεπάρκεια επινεφριδίων στον άνθρωπο και η εκτομή τους σε πειραματόζωα προκαλεί υπερτροφία του θύμου αδένου, και ότι η επαγόμενη από το stress και τα φάρμακα εκφύλιση του θύμου μπορεί να προληφθεί με την αφαίρεση των επινεφριδίων. Ευρήματα ότι η χορήγηση ACTH στα ποντίκια προκαλεί μια αξιοσημείωτη μείωση της μάζας του θύμου και των λεμφαδένων ήρθαν να συμπληρώσουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις. Στις μέρες μας πλέον εκτιμάται ότι τα λεμφοκύτταρα, και ειδικότερα τα CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> θυμοκύτταρα<sup>275</sup>, είναι από τους λίγους τύπους κυττάρων που υφίστανται απόπτωση ως απόκριση στα κορτικοειδή. Μεταξύ των άλλων κυττάρων περιλαμβάνονται τα δενδριτικά κύτταρα<sup>276</sup>, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα<sup>277</sup>, καθώς και ορισμένες υποομάδες νευροκυττάρων<sup>278</sup>.

Στις μέρες μας καταβάλλονται τεράστιες προσπάθειες προκειμένου να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα GC προκαλούν απόπτωση. Παρά

τις, πολλές φορές, αντιφατικές μεταξύ τους επιστημονικές αναφορές είναι γενικά αποδεκτό ότι η επαγόμενη από τα GC απόπτωση στα θυμοκύτταρα: α) ενεργοποιεί το «μιτοχονδριακό» μονοπάτι το οποίο απαιτεί την έκφραση της Araf-1 και της κασπάσης-9 και καταστέλλεται από την Bcl-2<sup>279</sup> και Bcl-XL<sup>280</sup>, και β) προϋποθέτει την ενεργοποίηση γονιδιακής έκφρασης μέσω ενός GRE-εξαρτώμενου μηχανισμού<sup>281,282</sup>.

Η αποπτωτική δράση των GC, έχει αναφερθεί, ότι τροποποιείται με την παρουσία ιντερλευκινών (IL). Συγκεκριμένα, λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν εκτεθεί *in vitro* και *in vivo* σε IL-2 είναι ανθεκτικά στην επαγόμενη από τα GC απόπτωση<sup>283-285</sup>. Επίσης, η IL-2 και τα GC φαίνεται να επάγουν την έκφραση του υψηλής συγγένειας υποδοχέα IL-2R με συνεργειακό τρόπο. Ο μεταγραφικός παράγοντας STAT5 έχει αναφερθεί να μεσολαβεί στην επικοινωνία των δυο αυτών σημάτων<sup>286</sup>.

### 2.3.2 Επίδραση των Γλυκοκορτικοειδών στα T Λεμφοκύτταρα

Τα GC έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη λειτουργία όσο και στην ανάπτυξη/διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων<sup>11</sup>.

Η ανοσοκαταστολή είναι η πιο ευρέως αναγνωρίσιμη επίδραση των εξωγενώς χορηγούμενων γλυκοκορτικοειδών<sup>287</sup>. Τα GC αποτελούν τη βασική θεραπεία πολλών αυτοάνοσων και φλεγμονωδών καταστάσεων. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι τα GC καταστέλλουν τις αυξητικές αποκρίσεις σε μια ποικιλία μιτογόνων ερεθισμάτων, κυρίως μέσω αναστολής της έκκρισης αυξητικών παραγόντων από τα T λεμφοκύτταρα. Τέτοιοι παράγοντες, που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είναι οι λεμφοκίνες. Η παραγωγή μιας σειράς κυτταροκινών έχει βρεθεί να αναστέλλεται από τα GC, όπως η IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, GM-CSF, TNFα, και IFN-γ<sup>16,288</sup>. Δεδομένα από περιπτώσεις κυτταροκινών ο μοριακός μηχανισμός αναστολής των οποίων έχει διερευνηθεί, συνηγορούν υπέρ ενός μη γενομικού τρόπου αναστολής κρίσιμων για τη μεταγραφή παραγόντων. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας GR μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης με τον AP-1 παρεμποδίζει τον τελευταίο να δεσμευτεί στον υποκινητή του IL-2 γονιδίου<sup>289,290</sup>. Ωστόσο από τη βιβλιογραφία δεν λείπουν οι περιπτώσεις στις οποίες ο υποδοχέας GR συμμετέχει άμεσα στην αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου<sup>291</sup>.

Ένα παράδοξο σ' αυτό το ήδη πολύπλοκο σχήμα αλληλεπιδράσεων αποτελεί το γεγονός πως τα GC, ενώ παρεμποδίζουν την παραγωγή συγκεκριμένων κυτταροκινών, συγχρόνως αυξάνουν την έκφραση των υποδοχέων ορισμένων εξ' αυτών (π.χ. IL-1, IL-6, GM-CSF και IFN-γ)<sup>292</sup>. Άλλες επιδράσεις των GC είναι η μείωση της έκφρασης μορίων πρόσδεσης της κυτταρικής επιφάνειας (ICAM-1, E-σελεκτίνη)<sup>17,293</sup>, η παρεμπόδιση της επαγωγής του προσδέματος του CD40 στα ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα<sup>18</sup>, η παρεμβολή στη μεταγραφή του γρανενζύμου B<sup>294</sup>, ακόμα και η άμεση αναστολή των πρώιμων αντιδράσεων μεταγωγής σήματος του T-υποδοχέα (TCR, T-cell receptor)<sup>19</sup>. Η φυσιολογική σημασία όλων αυτών των επιδράσεων στην ανοσοκαταστολή *in vivo* δεν έχει εξακριβωθεί.

*Η διαφοροποίηση σε T<sub>H</sub> υποσειρές* είναι ένα σημαντικό βήμα στην επιλογή εκτελεστικών λειτουργιών σε μια ανοσολογική απόκριση. Τα CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> λεμφοκύτταρα υπάρχουν σε δυο τύπους με διακριτά πρότυπα απελευθέρωσης κυτταροκινών, τον T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>2 τύπο<sup>295</sup>. Οι T<sub>H</sub>1 κυτταροκίνες (IL-2, IFN-γ, TNF<sub>β</sub>) ενεργοποιούν αντιδράσεις κυτταροτοξικές, φλεγμονώδεις και αργοπορημένης υπερευαισθησίας ενώ οι T<sub>H</sub>2 κυτταροκίνες (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) σχετίζονται με τη ρύθμιση ισχυρών αντισωματικών και αλλεργικών αποκρίσεων. Η επιλογή μεταξύ T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>2 είναι κρίσιμη για την αποδοτικότητα της ανοσίας και ανάμεσα στους παράγοντες που συνεισφέρουν στην επιλογή αυτή περιλαμβάνονται και τα γλυκοκορτικοειδή.

Τα GC τείνουν να κατευθύνουν την αναπτυξιακή απόκριση προς την παραγωγή λεμφοκυττάρων τύπου T<sub>H</sub>2. Τα GC φαίνεται να παρεμβαίνουν στο ισοζύγιο των παραπάνω κυτταροκινών είτε ευνοώντας είτε αναστέλλοντας διαφορετικά την παραγωγή κυτταροκινών συγκεκριμένου τύπου κατά την αρχική φάση ενεργοποίησης των T<sub>H</sub> λεμφοκυττάρων<sup>296,297</sup>.

Το φαινόμενο του «*αμοιβαίου ανταγωνισμού*» πρωτοπεριγράφηκε σε μια σειρά πειραμάτων με στόχο τη συγκριτική μελέτη της επαγόμενης από τα GC και της επαγόμενης από τη διέγερση απόπτωσης σε T υβριδώματα<sup>20</sup>. Απροσδόκητα βρέθηκε ότι η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στα δυο αποπτωτικά σήματα οδηγεί τελικά σε επιβίωση, με άλλα λόγια τα σήματα αυτά αναιρούν το ένα το άλλο. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η επαγόμενη απ' τη διέγερση απόπτωση αυτών των κυττάρων οφείλεται στην αυξημένη έκφραση του προσδέματος Fas (FasL)<sup>298</sup> και τουλάχιστον τρεις μεταγραφικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί άμεσα για την ενεργοποίηση του

FasL: NF-AT<sup>299</sup>, Egr-2/Egr-3<sup>300,301</sup>, και NF-κB<sup>302,303</sup>. Φαίνεται πως τα GC παρεμποδίζουν την αυξημένη έκφραση του FasL μετά από διέγερση<sup>304,305</sup>. Έρευνες αναφέρουν τρεις υποψήφιους μεσολαβητές της δράσης αυτής των GC: το GILZ<sup>306</sup>, το GITR<sup>307</sup> και το Nur77<sup>308</sup>.

Πρέπει να σημειώσουμε ότι το φαινόμενο του «αμοιβαίου ανταγωνισμού» δεν περιορίζεται μόνο σε T υβριδοματικά κύτταρα. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε ανιγγο-ειδικές T κυτταρικές σειρές<sup>309</sup>, και σε CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T κύτταρα απομονωμένα από HIV φορείς<sup>310,311</sup>. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη με πιθανές προεκτάσεις στην ανοσοθεραπεία αναφέρει πως *in vivo* χορήγηση δεξαμεθαζόνης σε ένα μοντέλο καρκίνου (B16 μελανώματος) που υφίσταται παθητική κυτταρική ανοσοθεραπεία, ενώ προκάλεσε ισχυρή μείωση λεμφοκυττάρων στο δέκτη, δεν είχε καμιά επίπτωση στην επιβίωση και κυτταροτοξική δράση των μεταμοσχευμένων ενεργοποιημένων CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων<sup>23</sup>.

### 2.3.3 Επίδραση των Γλυκοκορτικοειδών στα Δενδριτικά Κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην έναρξη της T-κυτταρομεσολαβούμενης ανοσίας λόγω της εξειδίκευσής τους στην πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα. Πληθώρα δημοσιευμάτων πιστοποιούν τις επιπτώσεις των GC τόσο στη διαφοροποίηση των DC από μονοκύτταρα όσο και στην τελική ωρίμανσή τους<sup>312</sup>. Συγκεκριμένα μονοκύτταρα/δενδριτικά κύτταρα που διαφοροποιούνται παρουσία GC παρουσιάζουν: 1) εξασθενημένη αντιγγο-παρουσιαστική λειτουργία λόγω αναστολής έκφρασης ορισμένων συνδιεγερτικών μορίων (CD40, CD86, CD56)<sup>313</sup>, 2) αυξημένη ενδοκυτταρική δραστηριότητα ως συνέπεια της υπερέκφρασης μορίων εμπλεκόμενων στην σύλληψη του αντιγόνου (CD32, MR, CD16, CD11b), και 3) μειωμένη ικανότητα έκκρισης κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α)<sup>312</sup>. Η δράση αυτή των γλυκοκορτικοειδών πάνω στα δενδριτικά κύτταρα συμπληρώνει την ήδη γνωστή εικόνα τους ως ανοσοκατασταλτικά.

### 2.3.4 Επίδραση των Γλυκοκορτικοειδών στα Φυσικά Φονικά Κύτταρα

Όπως αναλύθηκε λεπτομερέστερα σε προηγούμενες ενότητες, τα φυσικά φονικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν μια μοναδική υποομάδα λεμφοκυττάρων που έχουν την ικανότητα αναγνώρισης και καταστροφής ορισμένων νεοπλαστικών κυττάρων καθώς και μολυσμένων από ιούς κυττάρων. Επιπρόσθετα οι κυτταροκίνες (IFN- $\gamma$ , TNF, GM-CSF) που εκκρίνονται από ενεργοποιημένα NK κύτταρα διεγείρουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις ενώ συγχρόνως συμβάλλουν στην κινητοποίηση των επίκτητων ανοσοαντιδράσεων. Έχει αναφερθεί ότι τα GC αναστέλλουν άμεσα την κυτταρική λειτουργία των NK<sup>314,315</sup>. Συγκεκριμένα, η έκθεση ηρεμούντων και ενεργοποιημένων NK κυττάρων σε GC προκαλεί καταστολή της κυτταροτοξικής τους δράσης και μάλιστα η καταστολή αυτή φαίνεται να συσχετίζεται με την μειωμένη έκφραση των NCR υποδοχέων (NKp30, NKp44 και NKp46)<sup>32</sup>. Εκτός απ' αυτές τις *in vitro* παρατηρήσεις, υπάρχει μια σειρά μελετών *in vivo* που συνδέουν την παρατηρούμενη μείωση τόσο στον αριθμό όσο και στην κυτταροτοξική δράση των περιφερικών NK με διάφορες εντασιογόνες παθολογικές καταστάσεις και τη λήψη γλυκοκορτικοειδών, ως ανοσοκατασταλτικά<sup>316,317</sup>.

### 2.3.5 Τα Γλυκοκορτικοειδή ως Θετικοί Ρυθμιστές των Ανοσολογικών Αποκρίσεων

Παρότι τα GC έχουν θεωρηθεί να έχουν ανοσοκατασταλτική δράση, ο ρόλος τους στη διαμόρφωση των ανοσοαποκρίσεων είναι μάλλον διττός. Υπό ορισμένες συνθήκες τα GC μπορούν να ενισχύουν τις ανοσολογικές απαντήσεις. Μερικά παραδείγματα που φανερώνουν αυτή τη θετική επίδραση των GC, αναφέρονται παρακάτω.

- Ίσως το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα του διπλού ρόλου των GC είναι η επίδραση της δεξαμεθαζόνης (Dex, dexamethasone) σε υβριδωματικά και φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα. Ενώ η Dex προκαλεί απόπτωση και στους δυο τύπους κυττάρων, παράλληλα μπορεί να ανταγωνίζεται την απόπτωση που προκαλούν άλλα σήματα, όπως το CD3<sup>20</sup>.
- Η ισχυρή υπερέκφραση του γονιδίου του IL-7Ra υποδοχέα που προκαλείται από τα GC στα T λεμφοκύτταρα, αποτελεί ένα άλλο παράδειγμα θετικής

επίδρασης των GC στο ανοσολογικό σύστημα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η IL-7 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων<sup>21</sup>.

- Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα GC μπορούν να επιταχύνουν την επαγόμενη από τη δέσμευση του TCR υποδοχέα μιτογένεση των λεμφοκυττάρων<sup>22</sup>.
- Ο Hinrichs και συνεργάτες έχουν αναφέρει ότι η Dex δεν παρουσιάζει καμιά επίπτωση στον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των ενεργοποιημένων pmel-1-ειδικών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων, και μάλιστα αυτά τα κύτταρα μπορούν να μεταμοσχευθούν επιτυχώς σε ποντίκια που φέρουν B16 όγκους και λαμβάνουν Dex<sup>23</sup>.
- Σε μια κλινική δοκιμή εμβολιασμού ασθενών με καρκίνο του προστάτη παρατηρήθηκε μια συνέργεια στις ανοσοαποκρίσεις μεταξύ ενεργού εμβολιασμού και της χορήγησης GC<sup>24</sup>.
- Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η υδροκορτιζόνη (HC, hydrocortisone) σε συνδυασμό με την IL-15 ενισχύει σημαντικά τον πολλαπλασιαστικό δυναμικό των περιφερικών CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> κυττάρων χωρίς να επιφέρει καμιά επίπτωση στη λειτουργική τους δράση<sup>28</sup>.
- Επιπρόσθετα, μελέτες υποστηρίζουν τη θετική επίδραση των GC στη διαφοροποίηση των ανώριμων πρόδρομων NK κυττάρων προς λειτουργικά ώριμα NK<sup>25-27</sup>.

Το συλλογικό συμπέρασμα που προκύπτει από τον τεράστιο αυτό όγκο βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με τη δράση των GC στις ανοσολογικές αποκρίσεις είναι πως εάν πρέπει να αποδοθεί ένας λειτουργικός ρόλος στα GC, θα πρέπει κανείς πρώτα να ορίσει τις συνθήκες υπό τις οποίες βρίσκεται το πειραματικό του σύστημα. Με άλλα λόγια η κυτταρική απόκριση στα GC εξαρτάται τόσο από τα εξωγενή σήματα που λαμβάνει όσο και από την κατάσταση διαφοροποίησης/ενεργοποίησης στην οποία ήδη βρίσκεται το κύτταρο. Μια τέτοια θεώρηση αντιπροσωπεύει πιο πειστικά τη φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου *in vivo*.

### 2.3.6 Γλυκοκορτικοειδή και Ανοσοθεραπεία του Καρκίνου

Τα GC παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (T λεμφοκύτταρα, NK και DC) τα οποία έχουν κυρίαρχη θέση στην ανοσολογία του καρκίνου και χρησιμοποιούνται στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου<sup>220,318,319</sup>. Οι στρατηγικές ανοσοθεραπείας που ακολουθούνται βασίζονται είτε στην ενεργοποίηση ειδικών και μη μηχανισμών ανοσίας κατά του καρκίνου (Ενεργητική Ανοσοποίηση, όπως εμβολιασμός με καρκινικά αντιγόνα ή με καρκινικά κύτταρα ενισχυμένα ως προς την ικανότητα πυροδότησης μιας ισχυρής κυτταρικής ανοσίας) είτε στην παθητική χορήγηση *ex vivo* ενεργοποιημένων κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων ή αντισωμάτων με αντι-νεοπλασματική δράση.

Μια από τις δυσκολίες που πρέπει να λάβει κανείς υπόψη κατά τη σχεδίαση μιας αποτελεσματικής ανοσοθεραπευτικής προσέγγισης είναι το ιδιαίτερα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον, όπου θα γίνει η ανοσοπαρέμβαση. Σ' αυτήν την κατάσταση μεταξύ άλλων συμβάλλουν και τα αυξημένα επίπεδα GC στους ασθενείς με καρκίνο είτε αυτά παράγονται ενδογενώς λόγω ψυχολογικού ή φυσιολογικού stress<sup>320</sup> είτε χορηγούνται φαρμακολογικά για την αντιμετώπιση παρενεργειών της νόσου ή της συμβατικής θεραπείας (π.χ. φλεγμονή, οίδημα). Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η διαφορετική συγκέντρωση ενεργών γλυκοκορτικοειδών στους διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους<sup>272</sup>.

Με βάση όλα τα παραπάνω είναι αναγκαίο να προσδιοριστούν επακριβώς οι συνθήκες δράσης των GC (ανοσοκαταστολή/ανοσοδιέγερση, απόπτωση/επιβίωση) στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να εφαρμοστούν για την αποτελεσματικότερη ανοσοπαρέμβαση σε ασθενείς με καρκίνο.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Μεθοδολογία της Έρευνας

### 3.1 Διαχωρισμός και Απομόνωση PBMC

Τα μονοπύρρηνα κύτταρα διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας. Η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική ειδική πυκνότητα των κυτταρικών συστατικών του αίματος σε σχέση με το μέσο διαχωρισμού (Ficoll: ένα υδατικό διάλυμα πολυμερούς με πυκνότητα 1,077 g/mL). Συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, όταν έρχονται σε επαφή με το Ficoll, σχηματίζουν συσσωματώματα, γεγονός που αυξάνει το ρυθμό καθίζησης. Αντίθετα, τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια δεν είναι αρκετά πυκνά ώστε να διεισδύσουν το στρώμα του Ficoll. Έτσι, μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα καθιζάνουν στον πάτο του σωλήνα ενώ τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια σχηματίζουν ένα πυκνό υπόλευκο στρώμα πάνω από το Ficoll.

Πρωτόκολλο: (η εκτέλεση της όλης διαδικασίας γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός κι αν η μετέπειτα χρήση των κυττάρων απαιτεί τη συντήρησή τους στους 4°C)

- Λήψη περιφερικού αίματος σε κατάλληλο δοχείο με αντιπηκτικό μέσο (ηπαρίνη ή EDTA).
- Το αίμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα (1xPBS + 2 mM EDTA) σε αναλογία 1:1.
- Το αραιωμένο αίμα επιστρώνεται προσεκτικά σε ίσο όγκο Ficoll.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400 x g (χωρίς φρένο) για 25 min.
- Συλλογή των κυττάρων της μεσόφασης (μεταξύ Ficoll και πλάσματος) με μια πιπέτα Pasteur και μεταφορά σε ένα νέο σωληνάριο.

- Ακολουθεί μια έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα στα 200 x g, για 10 min, για την απομάκρυνση των αιμοπεταλίων, και μια δεύτερη στα 400 x g για 5 min.

### 3.2 Απομόνωση CD56<sup>+</sup>/NK κυττάρων

Τα CD56<sup>+</sup> κύτταρα απομονώνονται από PBMC μέσω μιας διαδικασίας θετικής ανοσο-επιλογής. Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνολογία των μαγνητικών μικροσφαιριδίων επικαλυμμένων με ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (MACS, Magnetic Cell Sorting; Miltenyi Biotec, Germany), που επιτρέπουν τη στόχευση ενός συγκεκριμένου πληθυσμού κυττάρων μέσα σε ένα ετερογενές μείγμα. Περιληπτικά τα κύρια βήματα είναι τα ακόλουθα (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή):

- ✓ *Μαγνητική Σήμανση.* Τα κύτταρα-στόχοι επωάζονται με τα ανοσο-σφαιρίδια (επικαλυμμένα με αντι-CD56) σε κατάλληλη αναλογία και ορισμένο τελικό όγκο, για 25 min στους 4°C.
- ✓ *Μαγνητικός Διαχωρισμός.* Μετά από απομάκρυνση των αδέσμευτων ανοσο-σφαιριδίων, τα σημασμένα κύτταρα διέρχονται από μια στήλη στερεωμένη σε έναν ισχυρό μαγνήτη. Τα σημασμένα κύτταρα συγκρατούνται στο πλέγμα της στήλης λόγω της μαγνητικής δύναμης που δέχονται, ενώ τα μη σημασμένα διαπερνούν τη στήλη ελεύθερα. Η στήλη εκπλένεται ωστόσο να μην παρατηρηθούν άλλα κύτταρα στο έπλυμα.
- ✓ *Έκλυση Σημασμένων Κυττάρων.* Για την ανάκτηση του θετικού κυτταρικού κλάσματος, η στήλη απομακρύνεται από το μαγνήτη και τα κύτταρα εκλύονται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Η απομόνωση καθαρών NK κυττάρων (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) από PBMC βασίζεται στην απομάκρυνση των υπολοίπων κυτταρικών πληθυσμών (B και T λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα) και στην μετέπειτα επιλογή των CD56<sup>+</sup> κυττάρων. Συγκεκριμένα:

- ✓ *Σήμανση των ανεπιθύμητων κυτταρικών πληθυσμών με αντισώματα.* Τα PBMC επωάζονται με τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα (αντι-CD14-FITC, αντι-CD19-FITC, αντι-CD3-FITC, αντι-CD4-FITC) στους 4°C, για 30 min. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 200 μL για 100x10<sup>6</sup> PBMC, και τα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1/10. Ακολουθεί

απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων με έκπλυση (3x) με 50 mL ρυθμιστικό διάλυμα.

- ✓ Στόχευση των ανεπιθύμητων κυτταρικών πληθυσμών με μαγνητικά σφαιρίδια. Τα σημασμένα με αντισώματα PBMC επωάζονται με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντι-IgG πολυκλωνικά αντισώματα, σε κατάλληλη αναλογία και τελικό όγκο, για 25 min, στους 4°C.
- ✓ Μαγνητικός διαχωρισμός των ανεπιθυμητων κυτταρικών πληθυσμών. Μετά την απομάκρυνση των αδέσμευτων ανοσο-σφαιριδίων, τα σημασμένα κύτταρα διέρχονται από μια στήλη αρνητική επιλογής, όπου συγκρατούνται με μαγνητικές δυνάμεις.
- ✓ Το αρνητικό κλάσμα των κυττάρων (CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>) συλλέγεται μετά από ήπια έκπλυση της στήλης. Τα εμπλουτισμένα σε NK κύτταρα καταμετρούνται και σημαίνονται με αντι-CD56 μαγνητικά σφαιρίδια, όπως προηγουμένως.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης, η καθαρότητα των απομονωμένων κυττάρων εκτιμάται με κυτταρομετρία ροής.

### 3.3 Καλλιέργεια CD56<sup>+</sup>/NK κυττάρων

Τα απομονωμένα CD56<sup>+</sup>/NK κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο μέσο καλλιέργειας σε συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL, τοποθετούνται σε πλάκα καλλιέργειας σε πυκνότητα  $1 \times 10^6$  κύτταρα/cm<sup>2</sup> και επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών με 95% υγρασία στους 37°C, με παροχή 5% CO<sub>2</sub>. Το μέσο καλλιέργειας συνίσταται από α-MEM (Life Technologies, Scotland) εμπλουτισμένο με 20% FBS (Fetal Bovine Serum; Biosera, UK), 2 mM L-γλουταμίνη (Life Technologies), 50 μg/mL γενταμικίνη και 30 ng/mL ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-15 (CellGenix, Germany). Η συγκέντρωση των GC που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτήν τη μελέτη [HC (Pfizer, Belgium NV), MeP (Vianex, Greece) και Dex (Vianex)], προσδιορίστηκε βάσει της γλυκοκορτικοειδούς δραστηριότητάς τους, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3-1*. Το μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 3-4 μέρες, και η συγκέντρωση των κυττάρων προσαρμόζεται στα  $0,25-0,5 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίζεται

χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο και αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων με Trypan Blue.

**Εικόνα 3-1 Συγκριτική Δραστικότητα Γλυκοκορτικοειδών**

	HC	MeP	Dex
Γλυκοκορτικοειδής Δραστικότητα	1	5	30
Αλατοκορτικοειδής Δραστικότητα	++	-	-
Διάρκεια Δράσης, ώρες ( $t_{1/2}$ ) <sup>a</sup>	8	18–40	36–54
Ισοδύναμη Συγκέντρωση (M) <sup>b</sup>	$1 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-7}$

<sup>a</sup> Τα στοιχεία αναφέρονται στην από του στόματος χορήγηση.

<sup>b</sup> Η ισοδύναμη συγκέντρωση υπολογίστηκε βάσει της σχετικής τους γλυκοκορτικοειδούς δραστικότητας.

### 3.4 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυτταρικών Σειρών

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές K562 (ερυθρομυελοβλαστικά λευχαιμικά κύτταρα) και Daudi (B λεμφοβλάστες λεμφώματος Burkitt) καλλιεργήθηκαν σε μέσο καλλιέργειας RPMI-1640 (Life Technologies) εμπλουτισμένο με 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνη και 50 μg/mL γενταμικίνη, σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειών με 95% υγρασία στους 37°C, με παροχή 5% CO<sub>2</sub>. Το μέσο καλλιέργειας ανανεώνονταν 2-3 φορές εβδομαδιαίως διατηρώντας τη συγκέντρωση των κυττάρων μεταξύ  $0,3-1,0 \times 10^6$  κύτταρα/mL.

### 3.5 Ανοσοφθορισμός και Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry)

Η τεχνική αυτή μας επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων κυτταρικών πληθυσμών βάσει της έκφρασης συγκεκριμένων μοριακών δεικτών είτε στην επιφάνεια των κυττάρων ή ενδοκυττάρια. Βασίζεται στην ικανότητα ανίχνευσης και ανάλυσης κάθε μεμονωμένου κυττάρου ως προς διάφορες παραμέτρους, όπως το μέγεθος κυττάρου,

η πολυπλοκότητα επιφάνειας και ο βαθμός ενδοκυττάριας κοκκίωσης, και η έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων (μετά από σήμανση με ειδικά προς αυτά αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα).

Γενικό πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού επιφανειακών αντιγόνων:

- Συλλογή κυττάρων και έκπλυση (1x) με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού (1xPBS + 2% FBS + 0,1%  $N_3Na$ ).
- Επώαση κυττάρων με το/τα κατάλληλο/α αντίσωμα/τα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε αντίδραση ανοσοφθορισμού πραγματοποιείται σε 50  $\mu L$  τελικό όγκο, και περιλαμβάνει: 1)  $< 10^6$  κύτταρα, και 2) το κάθε αντίσωμα στη βέλτιστη αραίωση (η οποία έχει προσδιοριστεί μετά από τιτλοδότηση του αντισώματος).
- Έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού για απομάκρυνση των αδέσμευτων αντισωμάτων. Εάν τα κύτταρα δεν αναλυθούν άμεσα σε κυτταρομετρητή ροής, φυλάσσονται σε διάλυμα 1% PFA στους 4°C.

Πρωτόκολλο ταυτόχρονης ανίχνευσης επιφανειακών και ενδοκυττάρων αντιγόνων μετά από διαπερατοποίηση των κυττάρων με μεθανόλη:

- Συλλογή κυττάρων και έκπλυση (1x) με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού.
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 2% PFA (σε 1xPBS) για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού.
- Διαπερατοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 90% μεθανόλης (σε 1xPBS) για 30 min στους 4°C ή στους -20°C για τουλάχιστον 16h.
- Έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού.
- Επώαση των κυττάρων με τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα για 45 min, σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως. Προσοχή!!! Πρέπει να επιλεγούν κλώνοι αντισωμάτων που να αναγνωρίζουν επιτόπους, η διαμόρφωση των οποίων δεν τροποποιείται μετά την επεξεργασία των κυττάρων με μεθανόλη. Επίσης, η επεξεργασία των κυττάρων με μεθανόλη πρέπει να προηγείται της ανοσοαντίδρασης, γιατί τα φθοριοχρώματα είναι ευαίσθητα στις αλκοόλες.
- Έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού.

Πρωτόκολλο ταυτόχρονης ανίχνευσης επιφανειακών και ενδοκυττάρων αντιγόνων μετά από διαπερατοποίηση των κυττάρων με απορρυπαντικό:

- Σήμανση των κυττάρων με αντισώματα έναντι δεικτών επιφανείας, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 2% PFA (σε 1xPBS) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού.
- Διαπερατοποίηση των κυττάρων με διάλυμα που περιέχει σαπονίνη (BD Perm/Wash buffer) για 30 min, στους 4°C.
- Επώαση με αντισώματα έναντι ενδοκυττάρων στόχων για 40 min, στους 4°C. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διάλυμα Perm/Wash.
- Έκπλυση (2x) των κυττάρων με διάλυμα Perm/Wash.

Τα αντισώματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή για την ανάλυση των κυττάρων με FACS, αναφέρονται παρακάτω:

(από BD Biosciences)

FITC-συζευγμένα αντι-CD244 (clone 2-69), -CD62L (clone Dreg 56), -Granzyme B (clone ICRF44), -CD107a (clone H4A3), -CD107b (clone H4B4); PE-συζευγμένα Annexin V, anti-CD56 (clone B159), -NKp46 (clone 9E2/NKp46), -NKG2D (clone 1D11), DNAM-1 (clone DX11), -CD94 (clone HP-3D9), -CD57 (clone NK-1), -CD158a (clone HP-3E4), -CD158b (clone CH-L), -CCR7 (clone 3D12), -CXCR1 (clone 5A12), -CXCR3 (clone 1C6/CXCR3), -CXCR4 (clone 12G5), -perforin (clone δG9), -phospho-ERK1/2 (T202/Y204), -phospho-STAT5 (Y694), -NF-κB p65 (pS529, clone K10-895.12.50), -phospho-Akt (pS473, clone M89-61); PerCP-συζευγμένο αντι-CD3 (clone SK7); 7-AAD (Amino-actinomycin D).

(από Beckman-Coulter)

PE-συζευγμένα αντι-NKG2A (clone Z199), -NKp30 (clone Z25), -NKp44 (clone Z231), PE-Cy5-συζευγμένα αντι-CD56 (clone NKH-1) και -CD16 (clone 3G8).

(από eBioscience)

FITC-συζευγμένο αντι-CD16 (clone CB16), PE-συζευγμένο αντι-CD16 (clone CB16), και allophycocyanin (APC)-συζευγμένο αντι-CD3 (clone UCHT1).

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν σε μηχανήμα κυτταρομετρίας ροής (FACSCalibur; BD Biosciences) εξοπλισμένο με 2 laser και 4 ανιχνευτές, μετά από κατάλληλη ρύθμιση της έντασης των φωτοπολλαπλασιαστών και διόρθωση του μη ειδικού σήματος (προερχόμενο από την αλληλεπικάλυψη των φασμάτων εκπομπής των διαφόρων φθοριοχρωμάτων). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε σε κατάλληλο λογισμικό, FCS3 Express (De Novo Software). Ο ορισμός της θετικότητας (δηλαδή του ποσοστού των κυττάρων θετικών προς ένα δείκτη) σε ένα συγκεκριμένο κανάλι έγινε βάσει του αυτοφθορισμού δειγμάτων σημασμένων με όλα τα φθοριοχρώματα εκτός από το προς μελέτη φθοριόχρωμα (FMO, Fluorescence Minus One). Στην περίπτωση κατά την οποία ένας δείκτης παρουσιάζει καθολική έκφραση, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης πραγματοποιείται υπολογίζοντας την ειδική ένταση φθορισμού (SFI, Specific Fluorescence Intensity), η οποία προκύπτει από τη γεωμετρική μέση ένταση φθορισμού του ειδικού αντισώματος μετά από αφαίρεση της γεωμετρικής μέσης έντασης φθορισμού του κατάλληλου δείγματος FMO.

### **3.6 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας (με CFSE)**

Η κυτταροτοξική ικανότητα των καλλιιεργημένων CD56<sup>+</sup> κυττάρων μετρήθηκε έναντι της NK-ευαίσθητης κυτταρικής σειράς, K562. Η τεχνική που ακολουθήθηκε βασίζεται στην διπλή σήμανση με φθορίζουσες ουσίες, που επιτρέπει τη διάκριση των κυττάρων στόχων (K562) από τα κύτταρα-εκτελεστές (CD56<sup>+</sup>), και των ζωντανών από τα νεκρά/αποπτωτικά κύτταρα.

Πρωτόκολλο:

- ο Προετοιμασία κυττάρων-στόχων. Δύο μέρες πριν την εκτέλεση του πειράματος τα K562 ανακαλλιιεργούνται σε πυκνότητα  $0,2 \times 10^6$  ανά mL θρεπτικού μέσου, ώστε να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Ακολουθεί σήμανση με CFSE (Molecular Probes, The Netherlands):  $2 \times 10^6$  κύτταρα επαναιωρημένα σε 1 mL 1xPBS + 5%FBS επωάζονται με CFSE (τελική συγκέντρωση 1μM) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με PBS+FBS, επαναιωρούνται σε 10% α-MEM, και αφήνονται να «ξεκουραστούν» στους 37°C για μισή ώρα.

- Εν τω μεταξύ τα κύτταρα προς δοκιμασία (CD56<sup>+</sup>) μετριοούνται, επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο 10% α-MEM και επιστρώνονται σε μια πλάκα μικροτιλοδότησης U-σχήματος.
- Τα κύτταρα-εκτελεστές και στόχοι αναμειγνύονται σε διάφορες αναλογίες (5/1, 2.5/1 και 1.25/1) και επωάζονται για 4 h στους 37°C σε κλίβανο CO<sub>2</sub>.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα κύτταρα σημαίνονται με 7-AAD (τελική αραίωση 1/20) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ένα πλύσιμο με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού και μονιμοποίηση με 1% PFA. Τα δείγματα αναλύονται κυτταρόμετρο μέσα σε μία ώρα.

Τα νεκρά κύτταρα-στόχοι ορίζονται ως CFSE<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup> σημασμένα κύτταρα. Το ποσοστό κυτταροτοξικότητας υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{\text{πειραματικό \% νεκρών στόχων} - \text{αυθόρμητο \% νεκρών στόχων}}{100 - \text{αυθόρμητο \% νεκρών στόχων}} \times 100\%$$

### 3.7 Δοκιμασία Αποκοκκίωσης/Κινητοποίησης του δείκτη CD107

Η δοκιμασία κινητοποίησης κυτταρολυτικών κοκκίων επιτρέπει την ανίχνευση κυτταρολυτικών NK κυττάρων. Οι γλυκοπρωτεΐνες CD107 καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια (προς τον αυλό) της εξωτερικής μεμβράνης των λυτικών κοκκίων, αλλά δεν είναι ανιχνεύσιμες στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ηρεμούντων NK κυττάρων. Κατόπιν ενεργοποίησης των NK κυττάρων, π.χ. από ένα καρκινικό κύτταρο, τα λυτικά κοκκία μετακινούνται προς τη θέση επαφής με το κύτταρο στόχο, όπου συντήκονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα την έκλυση κυτταροτοξικών μορίων και την προσωρινή έκθεση των CD107 μορίων στην επιφάνεια των NK κυττάρων. Σ' αυτό το στάδιο, τα NK κύτταρα που πραγματοποιούν αποκοκκίωση είναι ανιχνεύσιμα μέσω ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας κατάλληλα συζευγμένα αντι-CD107 μονοκλωνικά αντισώματα<sup>321</sup>.

Το δυναμικό αποκοκκίωσης των ενεργοποιημένων NK κυττάρων μετρήθηκε έναντι της NK-ευαίσθητης καρκινικής κυτταρικής σειράς, K562, και της LAK-ευαίσθητης σειράς, Daudi. Εν συντομία, καλλιεργημένα για 10 μέρες CD56<sup>+</sup> κύτταρα



και κύτταρα-στόχοι αναμειγνύονται σε αναλογία 1/1 και συν-επώζονται για 4 h, στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών. Στο μείγμα προστίθενται αντι-CD107 μονοκλωνικά αντισώματα (αντι-CD107a-FITC και αντι-CD107b-FITC σε αναλογία 1/1) σε τελική αραίωση 1/20. Το τελευταίο 3-ωρο της επώασης προστίθεται μονενσίνη (eBioscience) σε τελική συγκέντρωση 2 μM, με σκοπό την εξουδετέρωση του όξινου pH των λυτικών κοκκίων και προστασία των φθοριοχρωμάτων. Στο τέλος της δοκιμασίας, τα κύτταρα συλλέγονται και σημαίνονται με αντι-CD3-APC και αντι-CD56-PE πριν την κυτταρομετρική ανάλυση.

### 3.8 Μέτρηση Ικανότητας Πολλαπλασιασμού

Το δυναμικό πολλαπλασιασμού των NK κυττάρων και των διάφορων υποπληθυσμών μετρήθηκε βάσει της CFSE μεθόδου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) να σημάνει ομοιοπολικά ενδοκυττάρια μόρια (μακράς διάρκειας ζωής) με τη φθορίζουσα χρωστική ουσία, carboxylfluorescein. Μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, η ίση κατανομή αυτών των φθοριζόντων μορίων στα θυγατρικά κύτταρα οδηγεί σε μείωση της έντασης φθορισμού των θυγατρικών κυττάρων κατά το ήμισυ. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση έως 8 κυτταρικών διαιρέσεων πριν ο φθορισμός του CFSE μειωθεί στα επίπεδα των μη σημασμένων κυττάρων.

Περίληπτικά, το πρωτόκολλο σήμανσης των κυττάρων με CFSE περιλαμβάνει επώαση φρέσκων απομονωμένων CD56<sup>+</sup> κυττάρων με CFSE σε τελική συγκέντρωση 5 μM σε 1xPBS παρουσία προστατευτικών πρωτεϊνών (5% FBS), για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το αδέσμευτο CFSE απομακρύνεται μετά από έκπλυση (3x) των κυττάρων με PBS. Ο πολλαπλασιασμός των NK κυττάρων εκτιμήθηκε βάσει της αραίωσης του CFSE μετά από πολυπαραμετρική, κυτταρομετρική ανάλυση<sup>322</sup>.

### 3.9 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Εκκρινόμενων Κυτταροκινών

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκκρισης κυτταροκινών, NK κύτταρα ενεργοποιημένα για 10 μέρες επώαστηκαν για επιπλέον 48 h με IL-15 (30 ng/mL), IL-12 (2 ng/mL; R&D Systems) και IL-18 (100 ng/mL; MBL International, MA)<sup>323</sup>

απουσία ή παρουσία GC. Τα υπερκείμενα των κυτταρικών καλλιιεργειών συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και παγώθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$ , του GM-CSF, του TNF- $\alpha$ , και της IL-10 ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση μιας εμπορικά διαθέσιμης ανοσοδοκιμασίας πολλαπλής ανάλυσης κυτταροκινών (Fluorokine MAP Multiplex Human Cytokine Panel; R&D Systems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συλλογή των δεδομένων έγινε σε κατάλληλο αναλυτή (Lifematch Fluoroanalyzer), ο οποίος χρησιμοποιεί τη τεχνολογία xMAP της Luminex, ενώ για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Luminex 100 IS 2.2.

Αρχή λειτουργίας της ανοσοδοκιμασίας: Φθόριο-κωδικοποιημένα μικροσφαιρίδια έχουν προ-επικαλυφθεί με αντισώματα ειδικά για συγκεκριμένο αναλύτη. Τα μικροσφαιρίδια αυτά αναμειγνύονται με τα προς ανάλυση δείγματα (καθώς και με πρότυπα διαλύματα των αντίστοιχων κυτταροκινών) και τα ακινητοποιημένα αντισώματα δεσμεύουν τους αναλύτες-στόχους. Μετά από απομάκρυνση των αδέσμευτων ουσιών, προστίθεται ένα μείγμα βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων ειδικών ως προς τους αναλύτες που μας ενδιαφέρουν. Μετά από έκπλυση των αδέσμευτων αντισωμάτων, προστίθεται στρεπταβιδίνη συζευγμένη με τη φθορίζουσα ουσία φυκοερυθρίνη, PE. Μετά την τελική έκπλυση, τα μικροσφαιρίδια επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα είναι έτοιμα προς ανάλυση. Ο αναλυτής διαθέτει ένα σύστημα διπλού-laser: η μια δέσμη laser είναι ειδική για τα μικροσφαιρίδια και προσδιορίζει ποιος αναλύτης ανιχνεύεται κάθε φορά, ενώ η άλλη δέσμη laser καθορίζει το μέγεθος του σήματος που προέρχεται από τη φυκοερυθρίνη, το οποίο είναι ευθέως ανάλογο της ποσότητας του δεσμευμένου στα μικροσφαιρίδια αναλύτη.

### **3.10 Δοκιμασία Έκκρισης IFN- $\gamma$**

Η έκκριση της IFN- $\gamma$  από τα NK κύτταρα προσδιορίστηκε σε ενεργοποιημένα για 10 μέρες CD56<sup>+</sup> κύτταρα τα οποία επώαστηκαν για επιπλέον 24 h με IL-15 (30 ng/mL), IL-12 (2 ng/mL) και IL-18 (100 ng/mL) απουσία ή παρουσία GC. Για την εκτίμηση των επιπέδων έκκρισης της IFN- $\gamma$  χρησιμοποιήθηκε μια εμπορικά διαθέσιμη ανοσοδοκιμασία (IFN- $\gamma$  secretion assay kit, Miltenyi) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η δοκιμασία βασίζεται στην ικανότητα ενός αντισωματικού συμπλόκου-παγίδα να προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια των λευκοκυττάρων (μέσω του anti-CD45 τμήματος) και συγχρόνως να δεσμεύει τα εκκρινόμενα μόρια της IFN- $\gamma$  (μέσω του anti-IFN- $\gamma$  τμήματος). Έτσι, μετά τη δέσμευση του αντιδραστηρίου σύλληψης στην επιφάνεια των κυττάρων, τα τελευταία επωάζονται για μικρό χρονικό διάστημα στους 37°C, ώστε να συνεχιστεί η έκκριση των κυτταροκινών. Η εκκρινόμενη IFN- $\gamma$  παγιδεύεται από το αντιδραστήριο σύλληψης στα θετικά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα, ακολούθως, σημαίνονται με ένα δεύτερο αντίσωμα anti-IFN- $\gamma$ , το οποίο είναι συζευγμένο με φυκοερυθρίνη ώστε να επιτρέπει την ανίχνευσή τους με κυτταρομετρία ροής. Πριν την ανάλυση τα κύτταρα σημαίνονται και με anti-CD3-FITC προκειμένου να αποκλειστούν τα NKT.

### 3.11 Μέτρηση του Ρυθμού Απόπτωσης

Η απόπτωση μπορεί να οριστεί ως μια φυσιολογική διαδικασία κυτταρικής αυτό-καταστροφής κατευθυνόμενη από το γονιδίωμα. Αναφέρεται συχνά και ως «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος» (PCD, programmed cell death) ή τύπου I PCD. Τα κλασικά αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν βάσει ενός χαρακτηριστικού προτύπου μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών αλλαγών. Μια από αυτές τις αλλαγές είναι και η έκθεση των καταλοίπων φωσφατιδυλσερίνης (PS, phosphatidylserine)<sup>324</sup>.

Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα κατάλοιπα PS βρίσκονται στην εσωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, τα κατάλοιπα PS μεταπηδούν στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης. Γενικά, αλλά όχι πάντοτε, αυτό είναι ένα πρώιμο γεγονός κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και θεωρείται ότι μεταδίδει σήματα στα γειτονικά κύτταρα ότι ένα κύτταρο είναι έτοιμο να φαγοκυτταρωθεί. Η Annexin-V είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται ειδικά στα κατάλοιπα PS και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων. Επειδή η Annexin-V δεσμεύεται τόσο στα πρώιμα αποπτωτικά όσο και στα όψιμα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα (τα οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα αποπτωτικών και νεκρωτικών γεγονότων), τα κύτταρα προς ανάλυση πρέπει να σημανθούν επιπροσθέτως και με μια χρωστική που επιτρέπει την διάκριση νεκρών κυττάρων, όπως το 7-AAD, PI, DAPI<sup>325-327</sup>.

Πρωτόκολλο σήμανσης αποπτωτικών κυττάρων με Annexin-V και 7-AAD:

- Σήμανση των κυττάρων με αντισώματα έναντι αντιγόνων επιφανείας (αν αυτό είναι απαραίτητο για τη διάκριση υποπληθυσμών), όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης Annexin-V [10x Annexin-V ρυθμιστικό διάλυμα: 0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl<sub>2</sub>. Το διάλυμα αραιώνεται σε συγκέντρωση 1x με ddH<sub>2</sub>O πριν τη χρήση και η περίσσεια απορρίπτεται μετά το τέλος της διαδικασίας] σε συγκέντρωση 1x10<sup>6</sup> κύτταρα/mL. 100μL του κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρονται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθήκη Annexin-V-PE (αραίωση 1/20) και 7-AAD (αραίωση 1/20), και επώαση της αντίδρασης για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης Annexin-V. Η συλλογή των δεδομένων στον κυτταρομετρητή πρέπει να γίνει μέσα σε 1 ώρα. Τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα ορίζονται ως Annexin-V<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup> ενώ τα πρόιμα αποπτωτικά ως Annexin-V<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>.

### 3.12 Απομόνωση NK Υποπληθυσμών με Κυτταροδιαχωριστή Ροής

Η απομόνωση υποπληθυσμών των NK κυττάρων (CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>) έγινε με τη βοήθεια κυτταροδιαχωριστή (BD FACSAria III). Οι κυτταροδιαχωριστές (cell sorters) αξιοποιούν τις αρχές της κυτταρομετρίας ροής με την πρόσθετη δυνατότητα του επιλεκτικού διαχωρισμού κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η συλλογή των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού BD FACSDiva Software v4.1.

Τα προς διαχωρισμό κύτταρα ήταν εμπλουτισμένα σε CD56 περιφερικά PBMC. Η διαδικασία σήμανσης των προς διαχωρισμό κυττάρων με τα κατάλληλα αντισώματα είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως για την κυτταρομετρική ανάλυση αντιγόνων επιφανείας, με μικρές παραλλαγές που αποσκοπούν κυρίως στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C. Το ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοφθορισμού αντικαθίσταται από στείρο ρυθμιστικό διάλυμα κυτταροδιαχωρισμού, το οποίο περιλαμβάνει: 1x PBS, 2% FBS, 25 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA. Μετά το

τέλος της σήμανσης, τα κύτταρα φιλτράρονται σε πλέγμα 70μm για την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων και επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα κυτταροδιαχωρισμού, σε συγκέντρωση  $10 \times 10^6$ /mL. Η συλλογή των κυττάρων από τον κυτταροδιαχωριστή γίνεται σε σωληνάρια από πολυστυρένιο, τα οποία έχουν επικαλυφθεί εσωτερικά με FBS για τουλάχιστον 4 h ή σε σωληνάρια από πολυπροπυλένιο.

### **3.13 Ποσοτικοποίηση των Επιπέδων Έκφρασης Γονιδίων με PCR Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR)**

NK κύτταρα καλλιεργημένα υπό τις παραπάνω συνθήκες, συλλέχτηκαν στα αναγραφόμενα χρονικά σημεία, και συντηρήθηκαν ως κυτταρικό ίζημα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

*Απομόνωση Ολικού Κυτταρικού RNA:* το ολικό κυτταρικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο kit, το RNAqueous-Micro Kit (Ambion, Austin, TX), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει (1) τη λύση του δείγματος με ένα διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ένα ισχυρό χυοτροπικό αντιδραστήριο που διασπά τα κύτταρα ενώ συγχρόνως απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες, (2) τη δέσμευση του κυτταρικού ομογενοποιημένου σε ένα φίλτρο διοξειδίου του πυριτίου (μικρής διαμέτρου που επιτρέπει την έκλυση του δεσμευμένου RNA σε πολύ μικρό όγκο, χωρίς απώλειες), (3) την έκλυση του RNA με ddH<sub>2</sub>O, και (4) απομάκρυνση του γενωμικού DNA μετά από επώαση με DNase I.

*Αντίστροφη Μεταγραφή και Σύνθεση 1<sup>ov</sup> Κλώνου cDNA:* 0.5 μg ολικού κυτταρικού RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση μονοκλωνικού cDNA με τη χρήση τυχαίων εξαμερών εκκινητών (random primers, Invitrogen, Carlsbad, CA) και μιας αντίστροφης μεταγραφάσης, ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγμα RNA.....	0.5 μg
Random Primers.....	0.3 μg
ddH <sub>2</sub> O.....	< 12 μL
<i>70°C για 5 min (αποδιάταξη)</i>	
<i>Άμεση μεταφορά σε πάγο για τουλάχιστον 5 min</i>	
RT ρυθμιστικό διάλυμα 5x.....	1x
dNTP mix.....	0.5 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	1.5M
RTase.....	1 μL
ddH <sub>2</sub> O.....	< 8μL
<i>25°C για 5 min (υβριδοποίηση)</i>	
<i>42°C για 60 min (επιμήκυνση)</i>	
<i>70°C για 15min (απενεργοποίηση)</i>	

*PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR:* η ποσοτική PCR πραγματοποιήθηκε σε ένα μηχάνημα Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) χρησιμοποιώντας το Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω:

Δείγμα cDNA.....	10 ng*
SYBR green mix.....	1x
5' Εκκινητής.....	0.2 μM
3' Εκκινητής.....	0.2 μM
ddH <sub>2</sub> O.....	< 20 μL

*\*Η ποσότητα αναφέρεται στο αρχικό ολικό RNA*

Κύκλος	Βήμα	T (°C)	t (min:s)
Αποδιάταξη (Hold)	1°	95	05:00
Πολυμερισμός (Cycling) [x35]	1°	95	00:20
	2°	59	00:20
	3°	72	00:20
	4° (*)	xx	00:15
<b>Τήξη (Melt)</b>			
Αύξηση από 70°C έως 99°C			
Βήμα αύξησης: 0.3°C ανά κύκλο			
Αναμονή:	45 s στον 1° κύκλο		
	5 s στους επόμενους κύκλους		

*\*Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται απόκτηση του σήματος φθορισμού εξαρτάται από το σημείο τήξης (T<sub>m</sub>) του εκάστοτε παραγόμενου προϊόντος PCR.*

Οι εκκινήτες για την ποσοτική PCR σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια ενός κατάλληλου λογισμικού, το PerlPrimer<sup>328</sup>. Στον Πίνακα I φαίνονται όλοι οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή.

**Πίνακας I.** Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτήν τη μελέτη

Γονίδιο	Κοινό Όνομα	Πρόσθιος Εκκινητής (5'-3')	Αντίστροφος Εκκινητής (5'-3')
TSC22D3	Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)	CCATAGACAACAAGATCGAACAG	AGACAGGACTGGAACCTCTC
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	CTGTGGATGACTGAGTACCT	AGCCAGGAGAAATCAAACAG
BCLxL	BCL2-like 1 (transcript variant 1)	ACTTACCTGAATGACCACCT	ATTTCCGACTGAAGAGTGAG
BCL2L11	BCL2 interacting mediator of cell death (BIM)	AGTGCAATGGCTTCCATGAG	CCCTCCTTGCATAGTAAGCGT
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAGCATGACAGATTTCTACCAC	AGACTAAGGCAGAAGATGTAGAG
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CAACCGACGATTCTTCTACTC	TCGAGCTGTTTACGTTTGAC
CCND2	Cyclin D2	CCACCGACTTTAAGTTTGCC	CTTTGAGACAATCCACGTCTG
CCND3	Cyclin D3	TGTGCTACAGATTATACCTTTGCC	GCTTCGATCTGCTCCTGAC
CCNE1	Cyclin E1	AGGTTTCAGGGTATCAGTGG	CTGTGGGTCTGTATGTTGTG
CCNE2	Cyclin E2	TCAGAAATGTGTAGATTGGATGG	TTACTTCCTCCAGCATAGCC
B2M	Beta-2-microglobulin	GTCTGGGTTTCATCCATCCG	TCATCCAATCCAAATGCGGC



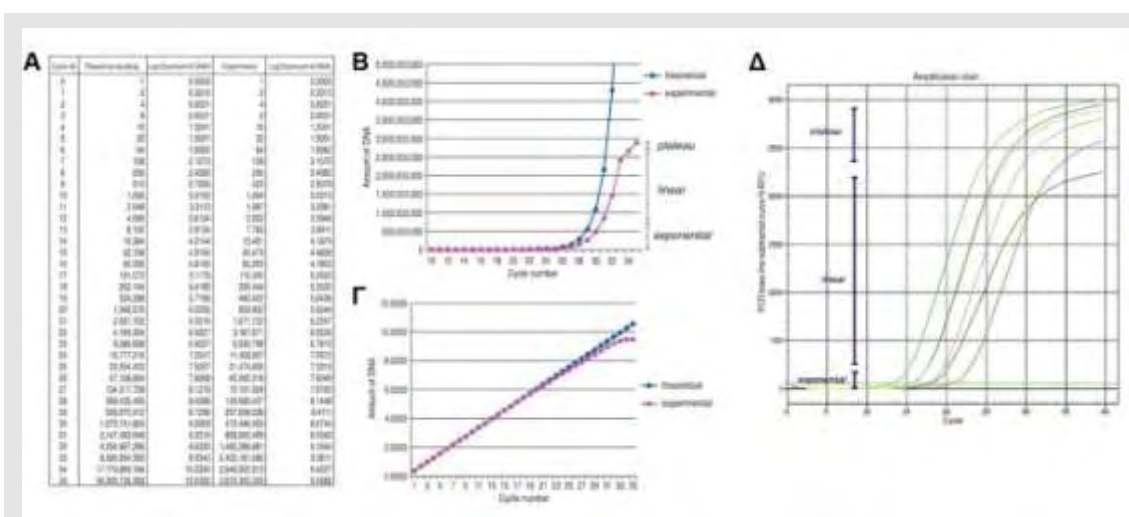
Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων υπολογίστηκαν βάσει της συγκριτικής  $\Delta\Delta C_i$  μεθόδου και αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του γονιδίου στόχου ομαλοποιημένη ως προς το ενδογενές γονίδιο αναφοράς,  $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης (B2M), σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς (φρέσκα απομονωμένα NK κύτταρα). Η αρχή λειτουργίας της ποσοτικής PCR καθώς και της  $\Delta\Delta C_i$  μεθόδου ανάλυσης περιγράφεται παρακάτω.

Η ποσοτική PCR βασίζεται στη σήμανση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης φθορισμού (η οποία είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος) που εκπέμπεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής του προϊόντος, μια αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε 3 φάσεις<sup>329</sup> (Εικόνα 3-2):

- 1) Την εκθετική ή λογαριθμική φάση (exponential growth or log phase), η οποία ξεκινάει μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμη πάνω από το θόρυβο του συστήματος. Σε κάθε κύκλο της φάσης αυτής πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος (με την προϋπόθεση ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι 100%). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής.
- 2) Τη γραμμική φάση (linear phase), κατά τη διάρκεια της οποίας η αντίδραση επιβραδύνεται και η απόδοση μειώνεται λόγω της κατανάλωσης των αντιδραστηρίων και του σημαντικού ανταγωνισμού των εκκινητών με το προϊόν που τείνει να αυτό-υβριδοποιείται. Στη φάση αυτή δεν πραγματοποιείται διπλασιασμός του προϊόντος στο τέλος του κάθε κύκλου και η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι εξαιρετικά μεταβλητή λόγω διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του ρυθμού κατανάλωσης των αντιδραστηρίων και της συσσώρευσης των προϊόντων. Ακόμα και επαναλήψεις του ίδιου δείγματος/αντίδρασης, οι οποίες είναι ταυτόσημες κατά τη λογαριθμική φάση, μπορεί να παρουσιάσουν μεταβλητότητα σ' αυτή τη φάση (Εικόνα 3-2, Δ)
- 3) Τη φάση «κορεσμού» (plateau phase), κατά την οποία η αντίδραση έχει σταματήσει και δεν παράγεται άλλο προϊόν.

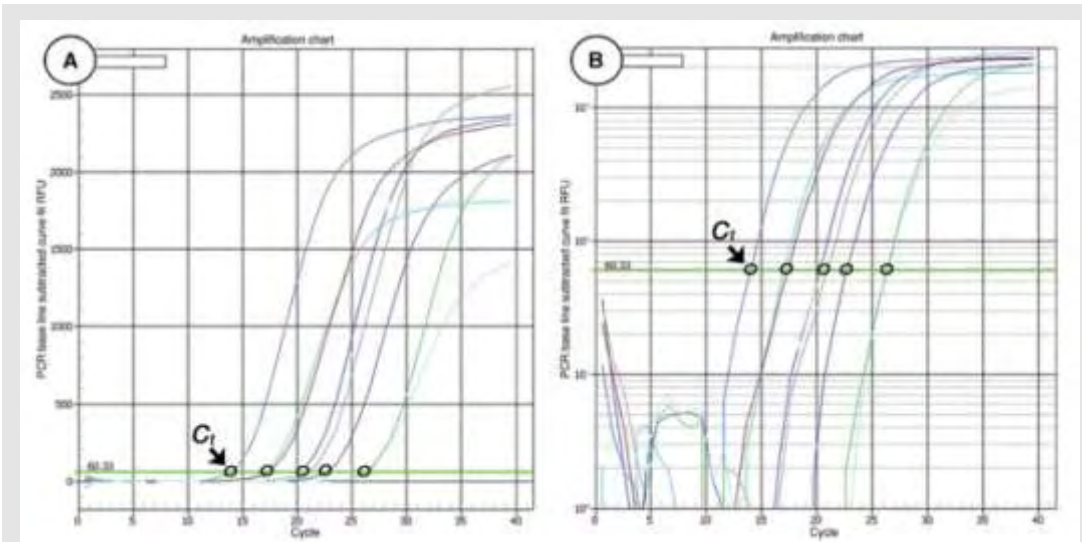
Η PCR πραγματικού χρόνου ποσοτικοποιεί την παραγωγή προϊόντος κατά τη λογαριθμική φάση της αντίδρασης, γιατί μόνο κατά τη λογαριθμική φάση η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας DNA στο δείγμα.

Το μέγεθος που χρησιμοποιείται ως ένδειξη της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος κατά τη λογαριθμική φάση της PCR είναι ο λεγόμενος «κύκλος κατώφλιού»,  $C_t$  (Cycle threshold). Ως κατώφλι ορίζεται το ελάχιστο σήμα φθορισμού που είναι στατιστικά σημαντικότερη πάνω από το υπόβαθρο της αντίδρασης (περίπου 3 φορές το SD του σήματος υποβάθρου). Ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο η καμπύλη φθορισμού της αντίδρασης τέμνει το κατώφλι ορίζεται ως  $C_t$  (Εικόνα 3-3). Οι τιμές  $C_t$  παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη σύγκριση μεταξύ δειγμάτων καθώς διαφορές στην αρχική ποσότητα του DNA μεταφράζονται σε διαφορές στις τιμές  $C_t$ , με το πιο εμπλουτισμένο σε DNA-στόχο δείγμα να παρουσιάζει μικρότερη τιμή  $C_t$ .



**Εικόνα 3-2 Θεωρητικός Διπλασιασμός και Πειραματική Συσσώρευση του DNA-στόχου κατά την PCR**

Ξεκινώντας από ένα μόριο, ο πίνακας (A) δείχνει τη συσσώρευση του DNA μετά από κάθε κύκλο υπό θεωρητικές συνθήκες διπλασιασμού (μπλε γραμμή) ή όπως παρατηρούνται σε μια πραγματική δοκιμασία (κόκκινη γραμμή). Τα δεδομένα του πίνακα (A) απεικονίζονται γραφικά σε γραμμική (B) και λογαριθμική (Γ) κλίμακα. (Δ) Γραφική παράσταση μιας ποσοτικής αντίδρασης PCR, όπως πραγματοποιήθηκε σε ένα μηχάνημα iQ5 της Bio-Rad. Είναι εμφανές ότι οι 3 φάσεις της PCR διαφέρουν στα 4 δείγματα όπως και στις επαναλήψεις του ίδιου δείγματος. άξονας x: αριθμός των κύκλων, άξονας y στο (B) και (Δ): ποσότητα DNA, άξονας y στο (Γ):  $\log_{10}$ [ποσότητα DNA]



### Εικόνα 3-3 Ορισμός του Κατωφλιού Φθορισμού και των Τιμών $C_t$

Παράδειγμα μιας πειραματικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου που δείχνει τις καμπύλες φθορισμού σε αριθμητική (A) και λογαριθμική (B) κλίμακα. Η γραμμή κατωφλιού χρησιμοποιείται προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα του DNA, και έχει προσδιοριστεί να αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση της αντίδρασης.

Η Μέθοδος  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  – Η εξίσωση που περιγράφει το λογαριθμικό πολλαπλασιασμό μιας αντίδρασης PCR είναι<sup>330</sup>:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n, \quad [1]$$

όπου  $X_n$  είναι ο αριθμός των μορίων-στόχων στον κύκλο  $n$  της αντίδρασης,  $X_0$  είναι ο αρχικός αριθμός των μορίων-στόχων.  $E_X$  είναι η απόδοση της αντίδρασης πολυμερισμού της αλληλουχίας-στόχου. Για  $C_t$  κύκλους η εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής:

$$X_t = X_0 \times (1 + E_X)^{C_t, X} = K_X, \quad [2]$$

όπου  $X_t$  είναι ο αριθμός των μορίων-στόχων στο σημείο του κατωφλιού,  $C_{t, X}$  είναι ο κύκλος κατωφλιού για την αλληλουχία-στόχο, και  $K_X$  είναι μια σταθερά. Μια αντίστοιχη εξίσωση μπορεί να γραφτεί για την ενδογενή αντίδραση αναφοράς (για το γονίδιο-ομαλοποιητή):

$$R_t = R_0 \times (1 + E_R)^{C_t, R} = K_R, \quad [3]$$

όπου  $R_t$  είναι ο αριθμός των μορίων αναφοράς στο σημείο του κατωφλιού,  $R_0$  είναι ο αρχικός αριθμός των μορίων αναφοράς,  $E_R$  είναι η απόδοση της αντίδρασης πολυμερισμού της αλληλουχίας αναφοράς,  $C_{t,R}$  είναι ο κύκλος κατωφλιού για το γονίδιο αναφοράς, και  $K_R$  μια σταθερά.

Ομαλοποιώντας την έκφραση της αλληλουχίας  $X$  προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς  $R$ , προκύπτει η σχέση:

$$\frac{X_t}{R_t} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{t,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{t,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K. \quad [4]$$

Υποθέτοντας ότι η απόδοση του γονιδίου-στόχου είναι ίση με την απόδοση του γονιδίου αναφοράς, τότε η εξίσωση [4] μεταμορφώνεται ως εξής:

$$E_X = E_R = E, \quad [5]$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{t,X} - C_{t,R}} = K,$$

ή

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_t} = K, \quad [6]$$

όπου το  $X_N$  ισούται με την ομαλοποιημένη αρχική ποσότητα του γονιδίου στόχου ( $X_0/R_0$ ) και το  $\Delta C_t$  ισούται με τη διαφορά των κύκλων κατωφλιού του γονιδίου στόχου από το γονίδιο αναφοράς ( $C_{t,X} - C_{t,R}$ ).

Μετά από αναδιάταξη η εξίσωση [6] μπορεί να γραφτεί ως:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_t}. \quad [7]$$

Το τελικό βήμα είναι να διαιρέσουμε το  $X_N$  ενός οποιουδήποτε δείγματος  $q$  με το  $X_N$  του δείγματος-βαθμονομητή ( $cb$ , calibrator):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{t,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{t,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_t}. \quad [8]$$

όπου,  $-\Delta \Delta C_t = -(\Delta \Delta C_{t,q} - \Delta \Delta C_{t,cb})$ .

Για αντιδράσεις οι οποίες έχουν βελτιστοποιηθεί σωστά, η απόδοση πλησιάζει κοντά στο 1 (100%), και ως εκ τούτου, η ποσότητα του γονιδίου-στόχου, ομαλοποιημένη ως προς την ενδογενή αντίδραση αναφοράς και σχετικά με το βαθμονομητή, δίνεται από τη σχέση:

$$\text{σχετική ποσότητα έκφρασης} = 2^{-\Delta\Delta C_t}. \quad [9]$$

Για να είναι έγκυροι οι υπολογισμοί βάσει της μεθόδου  $\Delta\Delta C_t$ , θα πρέπει η απόδοση της αντίδρασης πολυμερισμού του γονιδίου-στόχου να είναι ίδια με την απόδοση για το γονίδιο αναφοράς.

### **3.14 Μελέτη του Κυτταρικού Κύκλου – Μέθοδος Παλμού/Παρακολούθησης με BrdU**

Η μέθοδος αυτή (BrdU pulse/chase assay) αποσκοπεί στη μελέτη της κινητικής των κυτταρικών διαιρέσεων. Βασίζεται (α) στην παλμική σήμανση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση-S του κυτταρικού κύκλου με ένα ανάλογο θυμιδίνης, τη βρωμοδεοξουριδίνη (Bromodeoxyuridine, BrdU), και (β) στην παρακολούθηση των σημασμένων αυτών κυττάρων κατά την πρόοδό τους στις επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Κατά το στάδιο του παλμού, η βρωμοδεοξουριδίνη διαχέεται εύκολα μέσα στο κύτταρο, όπου ενσωματώνεται γρήγορα στη νουκλεοτιδική δεξαμενή του κυττάρου, έτοιμη να ενσωματωθεί στο DNA κατά την αντιγραφή του. Μετά την παλμική σήμανση και την απομάκρυνση της BrdU, τα σημασμένα κύτταρα αναλύονται σε τακτά χρονικά διαστήματα ως προς την κατανομή τους στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής. Προκειμένου να αναλυθεί το περιεχόμενο σε DNA των κυττάρων, τα τελευταία πρέπει να βαφτούν με μια φθορίζουσα χρωστική (π.χ 7-AAD, PI, DAPI) η οποία να δεσμεύεται στο DNA στοιχειομετρικά, έτσι ώστε η ένταση φθορισμού της να αντικατοπτρίζει επακριβώς την ποσότητα του DNA στο κύτταρο. Έτσι, η ποσότητα της φθορίζουσας ουσίας (και κατ' επέκταση η ένταση φθορισμού) η οποία δεσμεύεται σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση-G2/M (DNA περιεχόμενο = 4N) πρέπει να είναι διπλάσια απ' την ποσότητα που δεσμεύουν τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση-G0/G1 (DNA περιεχόμενο = 2N). Ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση-S ( $2N < \text{DNA περιεχόμενο} < 4N$ ) παρουσιάζουν ενδιάμεσες τιμές φθορισμού. Επειδή στην πράξη τα όρια μεταξύ G0/G1- και πρώιμων S-κυττάρων καθώς και μεταξύ G2/M- και όψιμων S-κυττάρων δεν είναι εύκολα διακριτά (λόγω παρεκκλίσεων τόσο κατά τη διαδικασία σήμανσης του DNA όσο και κατά τη συλλογή των δεδομένων στον κυτταρομετρητή), η διάκριση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου γίνεται με τη βοήθεια ειδικού

αλγορίθμου (ενσωματωμένο στο λογισμικό FCS Express 4) που αναλύει τα δεδομένα λαμβάνοντας υπόψη αυτήν την αλληλεπικάλυψη των επιμέρους φάσεων του κύκλου.

Ο ανοσοφθορισμός των κυττάρων με αντισώματα έναντι αντιγόνων επιφανείας, με αντι-BrdU αντίσωμα και με την DNA-ειδική φθορίζουσα ουσία έγινε με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου kit (FITC BrdU Flow Kit, BD Pharmingen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 3.15 Στατιστική Ανάλυση

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism V4 (Graphpad Software, CA). Η στατιστική σημαντικότητα για τη σύγκριση ολικών NK κυττάρων υπολογίστηκε βάσει ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One-way ANOVA) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measures), ενώ η στατιστική σημαντικότητα για τη σύγκριση των επιμέρους υποπληθυσμών των NK υπολογίστηκε βάσει ανάλυσης διακύμανσης κατά δυο παράγοντες (Two-way ANOVA) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τιμές πιθανότητας ( $P$ , probability)  $< 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Οι αστερίσκοι στα γραφήματα υποδεικνύουν:  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  και  $***P < 0.001$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Αποτελέσματα

### 4.1 Τα GC Ενισχύουν τον Πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων Ενεργοποιημένων με IL-15

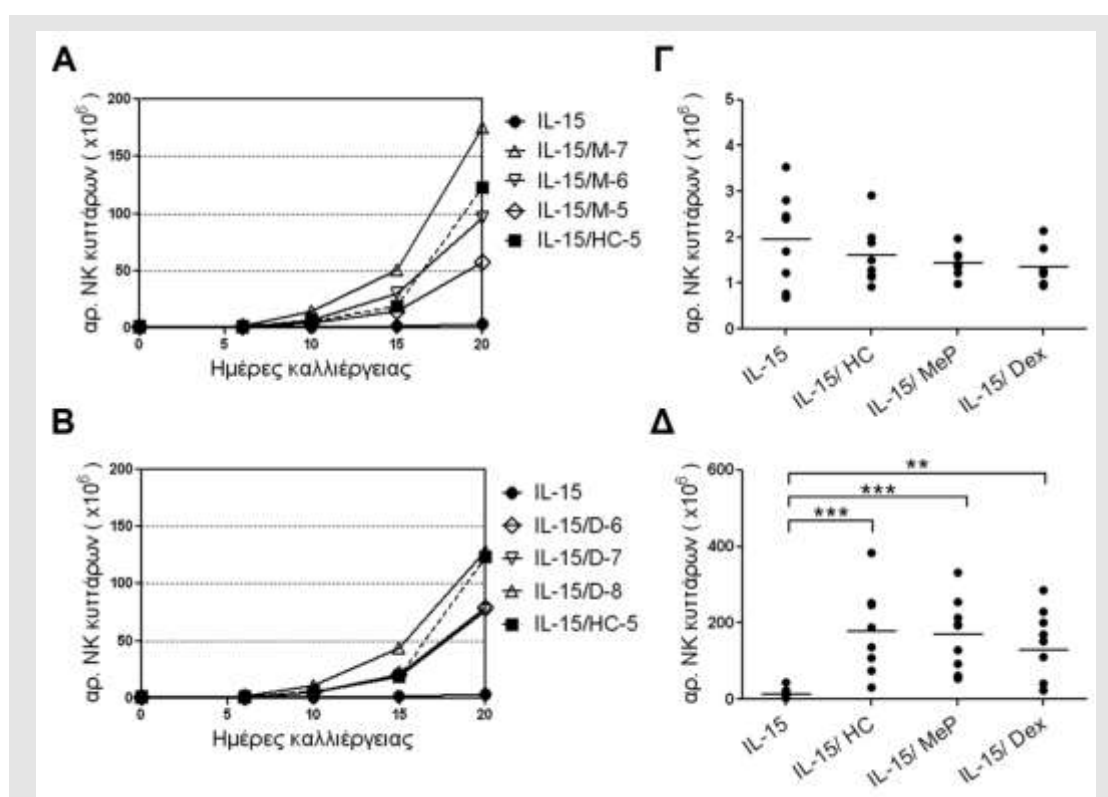
Όπως έχει δειχθεί προηγουμένως από Perez *et al.*<sup>28</sup>, ο πολλαπλασιασμός των NK κυττάρων ενεργοποιημένων με IL-15 ενισχύεται παρουσία HC. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που υποστηρίζουν την κατασταλτική δράση της MeP στον επαγόμενο από IL-2 και IL-15 πολλαπλασιασμό των NK<sup>31,32</sup>. Προκειμένου να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο μιας διαφορικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση των ενεργοποιημένων NK, πρωταρχικά εξετάσαμε την επίδραση της MeP και της Dex (δύο από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή στη ιατρική πράξη) στα NK κύτταρα.

Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4-1*, η MeP (A) και η Dex (B), παρομοίως με την HC, ενίσχυσαν τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων. Το εύρος επίδρασης κυμαίνεται από  $2 \times 10^{-5}$  μέχρι  $2 \times 10^{-7}$  M για την MeP, και από  $4 \times 10^{-6}$  μέχρι  $4 \times 10^{-8}$  M για την Dex. Σε όλα τα μετέπειτα πειραματικά σχήματα, τα τρία γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιήθηκαν σε ισοδύναμες μεταξύ τους συγκεντρώσεις οι οποίες είναι: HC =  $1 \times 10^{-5}$  M, MeP =  $2 \times 10^{-6}$  M, Dex =  $4 \times 10^{-7}$  M.

Λεπτομερέστερη ανάλυση των κινητικών αύξησης έδειξε πως τα NK κύτταρα, όταν ενεργοποιούνται παρουσία IL-15/GC, τείνουν να έχουν μειωμένο ρυθμό αύξησης συγκριτικά με όσα μεγαλώνουν παρουσία μόνο της IL-15, τις 5 πρώτες μέρες της ενεργοποίησης (*Εικόνα 4-1, Γ*). Όμως, μετά τη 10<sup>η</sup> μέρα ενεργοποίησης ο ρυθμός πολλαπλασιασμού αυξάνεται με αποτέλεσμα την 20<sup>η</sup> μέρα της καλλιέργειας παρουσία IL-15/GC ο συντελεστής αύξησης (GI, Growth Index) των κυττάρων να είναι 10 φορές μεγαλύτερος απ' ό τι απουσία GC (*Εικόνα 4-1, Δ*).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από πειράματα ιχνηλάτησης κυτταρικών διαιρέσεων μέσω σήμανσης των κυττάρων με CFSE. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι τα ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK κύτταρα, παρότι προσωρινά καθυστερούν να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο (βλ. *Εικόνα 4-2, Α*: 4<sup>η</sup>

και 6<sup>η</sup> μέρα ενεργοποίησης), παρουσιάζουν αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού την 8<sup>η</sup> μέρα με το 50% του κυτταρικού πληθυσμού να έχει ολοκληρώσει πάνω από 5 διαιρέσεις. Ενώ μόνο το 20% των ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων έχει περατώσει πάνω από 5 διαιρέσεις. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι είτε ο επαγόμενος από την IL-15 και τα GC αναπρογραμματισμός των NK κυττάρων απαιτεί περισσότερο χρόνο για να «υλοποιηθεί» ή ότι η ενεργοποίηση των NK παρουσία GC οδηγεί στην επιλεκτική αύξηση ενός μικρού υποπληθυσμού κυττάρων, ο οποίος αρχικά δεν είναι εμφανής.

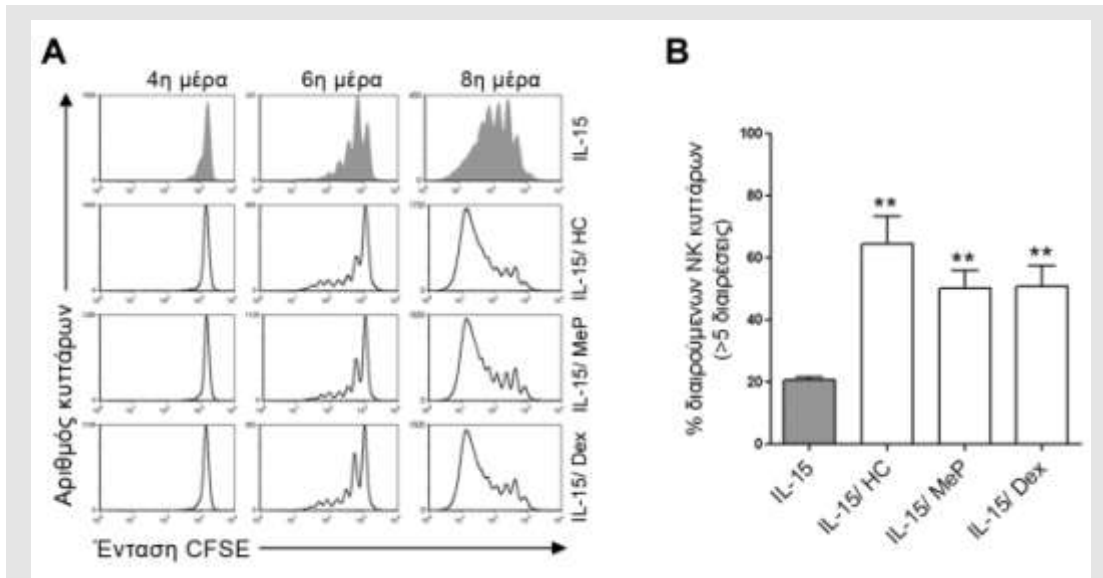


#### Εικόνα 4-1 Κινητική αύξησης των NK παρουσία IL-15 & GC

Περιφερικά CD56<sup>+</sup> κύτταρα από υγιείς δότες καλλιεργήθηκαν με IL-15 απουσία ή παρουσία GC. Κάθε 5 ημέρες πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των βιώσιμων CD56<sup>+</sup> κυττάρων καθώς και ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός του ποσοστού των NK κυττάρων (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) επί των συνολικών CD56<sup>+</sup>. Ο καθαρός αριθμός των NK κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε βάσει αυτών των δυο παραμέτρων. (A) και (B) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες αύξησης των NK ενεργοποιημένων με IL-15 απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων MeP (M-5,-6,-7: 2 x 10<sup>-5,-6,-7</sup> M) και Dex (D-6,-7,-8: 4 x 10<sup>-6,-7,-8</sup> M) αντίστοιχα. (Gamma) και (Delta) Συγκεντρωτικά



αποτελέσματα συντελεστών αύξησης των NK από 8 δότες μετά από 5 (Γ) και 20 (Δ) μέρες καλλιέργειας στις αναγραφόμενες συνθήκες.

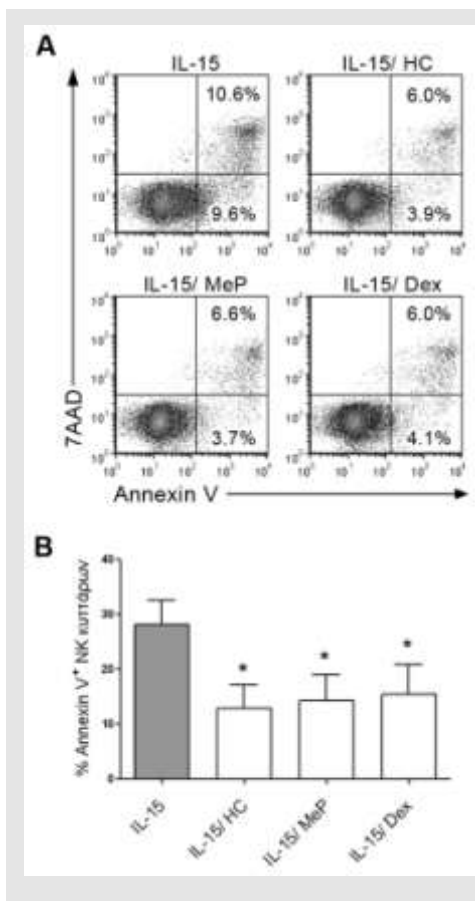


**Εικόνα 4-2 Τα GC ενισχύουν το δυναμικό πολλαπλασιασμού των NK**

(A) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την αραίωση του CFSE (μείωση της έντασης φθορισμού) καθώς τα NK κύτταρα διαιρούνται υπό τις αναγραφόμενες συνθήκες. (B) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται ως ποσοστό των ταχέως διαιρούμενων NK κυττάρων (> 5 διαιρέσεις) την 8<sup>η</sup> μέρα της καλλιέργειας.

#### 4.2 Τα Ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK κύτταρα Είναι Ανθεκτικά στην Επαγόμενη από Ενεργοποίηση Απόπτωση

Μια από τις βιολογικές ιδιότητες των GC είναι και η επαγωγή της απόπτωσης. Σε προηγούμενη εργασία όμως των Perez et.al. έχει δειχθεί ότι η HC προστατεύει τα NK κύτταρα από την επαγόμενη από ενεργοποίηση απόπτωση<sup>28</sup>. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η MeP και η Dex επίσης προστατεύουν τα NK από την επαγόμενη από την IL-15 απόπτωση. Το ποσοστό των Annexin V<sup>+</sup> (αποπτωτικών) κυττάρων μειώθηκε σχεδόν κατά 50% στα ενεργοποιημένα NK κύτταρα παρουσία GC (Εικόνα 4-3).



**Εικόνα 4-3 Τα ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK είναι ανθεκτικά στην επαγόμενη από την ενεργοποίηση απόπτωση**

Ο ρυθμός απόπτωσης των NK κυττάρων, ενεργοποιημένων για 10 μέρες με IL-15 απουσία ή παρουσία GC, εκτιμήθηκε μέσω σήμανσης των κυττάρων με AnnexinV/7-AAD. (A) Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα NK κυττάρων σημασμένων με AnnexinV και 7-AAD. Τα ποσοστά των πρώιμων (Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) και όψιμων (Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) αποπτωτικών κυττάρων παρουσιάζονται στο αντίστοιχο τεταρτοκύκλιο. (B) Συγκεντρωτικά ποσοστά των αποπτωτικών (Annexin V<sup>+</sup>) NK κυττάρων από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

### 4.3 Το Λειτουργικό Δυναμικό των Ενεργοποιημένων με IL-15/GC NK κυττάρων

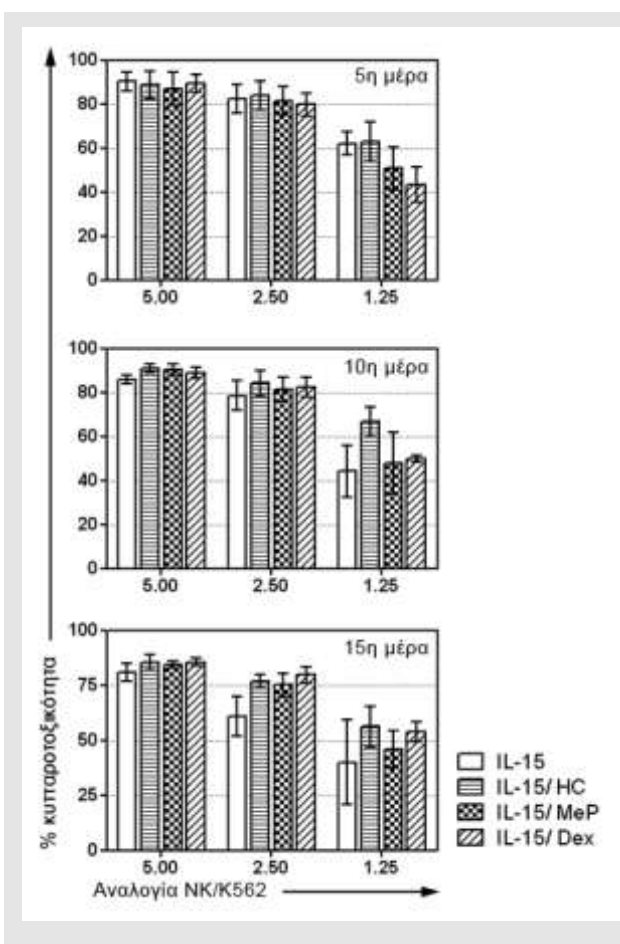
Η ακόλουθη σειρά πειραμάτων αποσκοπεί στη διερεύνηση του λειτουργικού δυναμικού των NK κυττάρων ενεργοποιημένων παρουσία GC.

Η κυτταροτοξική ικανότητα των ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων δεν επηρεάστηκε από την παρουσία των GC, όπως φαίνεται από το ποσοστό λύσης των K562 κυττάρων-στόχων (Εικόνα 4-4). Επίσης σε κυτταρικό επίπεδο τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία GC, έδειξαν να διατηρούν το ίδιο δυναμικό αποκοκκίωσης (Εικόνα 4-5) και παραγωγής λυτικών ουσιών (Εικόνα 4-6).

Επιπλέον προσδιορίστηκε και το δυναμικό έκκρισης κυτταροκινών. NK κύτταρα ενεργοποιημένα για 10 μέρες με IL-15 απουσία ή παρουσία GC, διεγέρθηκαν για επιπλέον 2 μέρες με IL-12 και IL-18, και μετρήθηκε η συγκέντρωση των κυτταροκινών στο υπερκείμενο. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4-7, τα GC δεν επηρέασαν την παραγωγή της IFN-γ, του GM-CSF και του TNF-α, ενώ προκάλεσαν

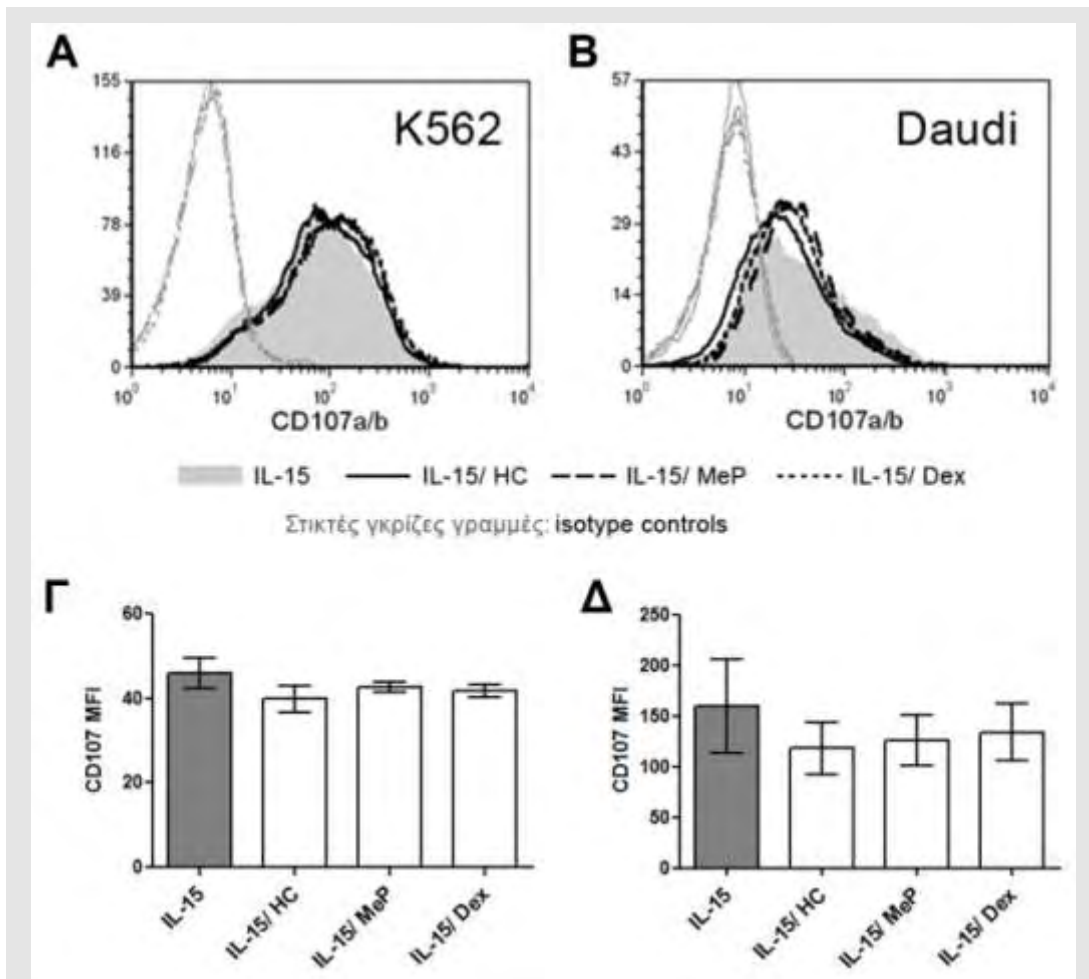
αυξημένη έκκριση της IL-10. Το δυναμικό έκκρισης της IFN- $\gamma$  μετρήθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο (Εικόνα 4-8).

Είναι γνωστό ότι η λειτουργία των NK ρυθμίζεται από ένα καλά εξισορροπημένο δίκτυο θετικών και αρνητικών σημάτων<sup>331</sup>. Ένας σημαντικός αριθμός υποδοχέων ενεργοποίησης (Natural Cytotoxicity Receptors, NCR), ικανών να πυροδοτήσουν την μεσολαβούμενη από τα NK κυτταρόλυση, έχει ταυτοποιηθεί ως τώρα<sup>332,333</sup>. Το προφίλ έκφρασης αυτών των υποδοχέων από ενεργοποιημένα NK κύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 4-9, 10. Με εξαίρεση τον υποδοχέα NKp46, η έκφραση του οποίου αυξάνεται παρουσία των GC, η έκφραση του NKp30, NKp44, NKG2D, CD244 (2B4), και DNAM-1 παραμένει ίδια στα NK κύτταρα ενεργοποιημένα παρουσία ή απουσία GC.



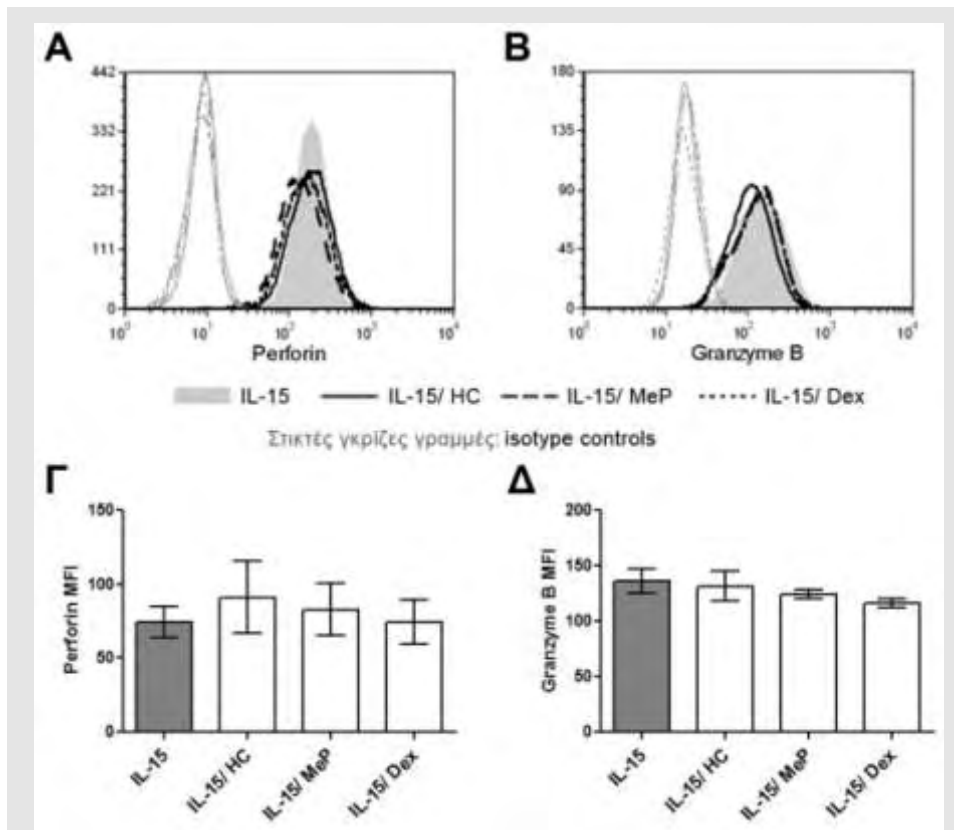
**Εικόνα 4-4 Κυτταρολυτική δράση των NK**

NK κύτταρα καλλιεργημένα με IL-15 απουσία ή παρουσία GC υποβλήθηκαν σε δοκιμασία κυτταροτοξικότητας έναντι καρκινικών κυττάρων στόχων K562 σε διάφορες αναλογίες. Μετά από 4 ώρες συνεπάωσης το ποσοστό νέκρωσης των κυττάρων στόχων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής βάσει του βαθμού πρόσληψης του 7-AAD. Το γράφημα παρουσιάζει συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



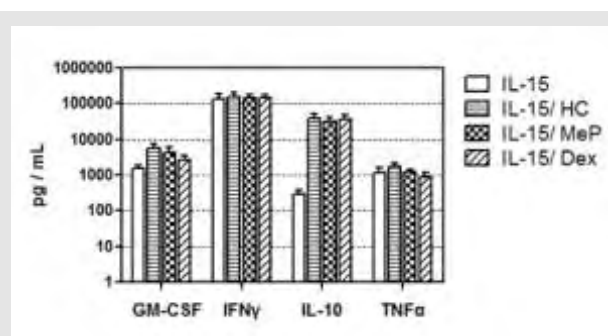
#### Εικόνα 4-5 Δυναμικό αποκοκκίωσης των NK

NK κύτταρα καλλιεργημένα για 10 μέρες με IL-15, απουσία ή παρουσία GC, συνεπώαστηκαν με καρκινικά κύτταρα, K562 (A, Γ) και Daudi (B, Δ) για 4 ώρες, παρουσία monensin και anti-CD107a/b-FITC μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ο ρυθμός αποκοκκίωσης των NK εκτιμήθηκε με κυτταρομετρία ροής βάσει του βαθμού πρόσδεσης/ενσωμάτωσης του anti-CD107a/b-FITC. (A) και (B) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα από ένα δότη. (Γ) και (Δ) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μέσης έντασης φθορισμού του (MFI, Mean Fluorescence Intensity) CD107 από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



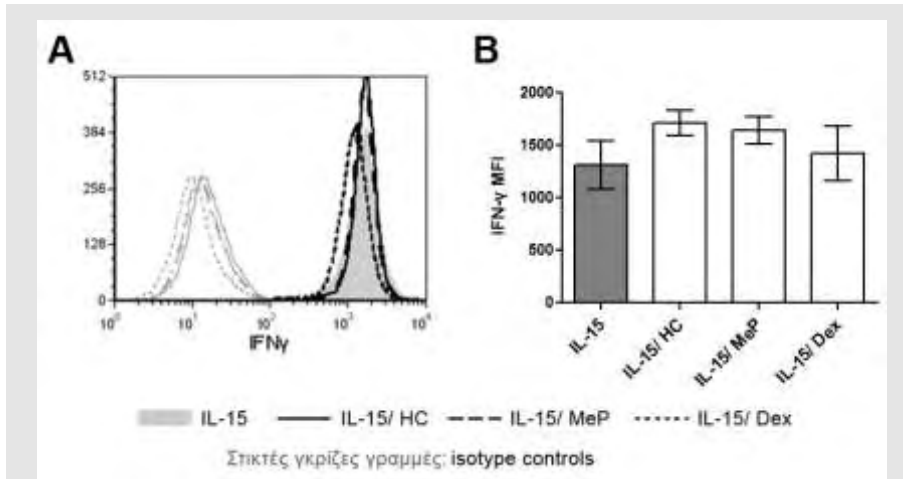
#### Εικόνα 4-6 Περιεκτικότητα των NK σε Περφορίνη και Granzyme B

Η περιεκτικότητα σε Περφορίνη και Granzyme B των NK κυττάρων, καλλιεργημένων για 10 μέρες με IL-15 απουσία ή παρουσία GC, μετρήθηκε με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. (A) και (B) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα από έναν δότη. (Γ) και (Δ) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



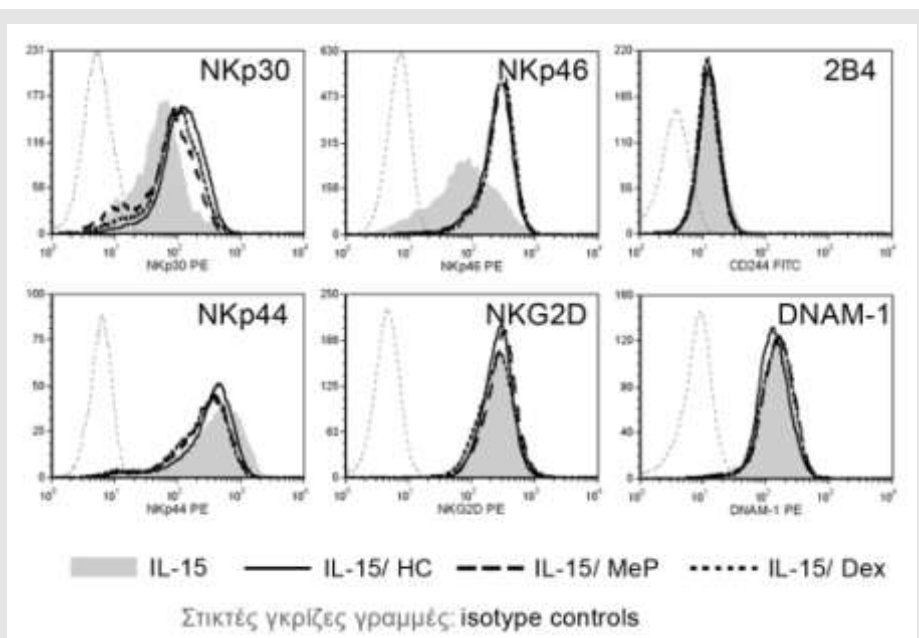
#### Εικόνα 4-7 Έκκριση κυτταροκινών

Η ικανότητα των NK να παράγουν και να εκκρίνουν κυτταροκίνες μετρήθηκε μετά από τη διέγερση τους με IL-12 και IL-18. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



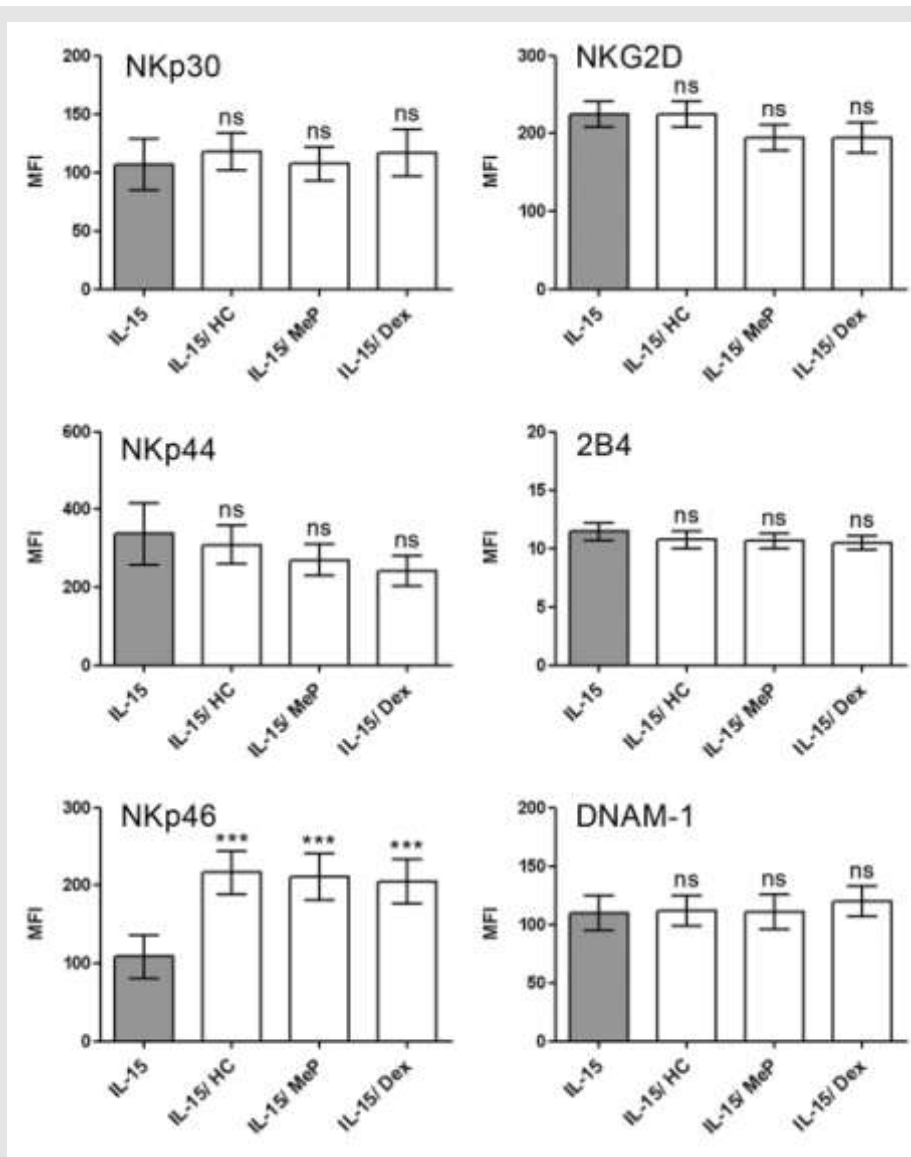
**Εικόνα 4-8 Ικανότητα παραγωγής IFN-γ**

NK κύτταρα καλλιεργημένα για 10 μέρες με IL-15 παρουσία ή απουσία GC, επωάστηκαν για ένα επιπλέον 24-ωρο με IL-12 & IL18. Η ποσότητα των εκκρινόμενων μορίων IFN-γ μετρήθηκε μέσω μια FACS βασιζόμενης δοκιμασίας. (A) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα από έναν δότη. (B) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



**Εικόνα 4-9 Έκφραση υποδοχέων NCR**

Επιφανειακή πυκνότητα NCR υποδοχέων σε NK κύτταρα ενεργοποιημένα για 10 μέρες με IL-15 απουσία ή παρουσία GC. Αντιπροσωπευτικά



**Εικόνα 4-10 Έκφραση NCR υποδοχέων (MFI)**

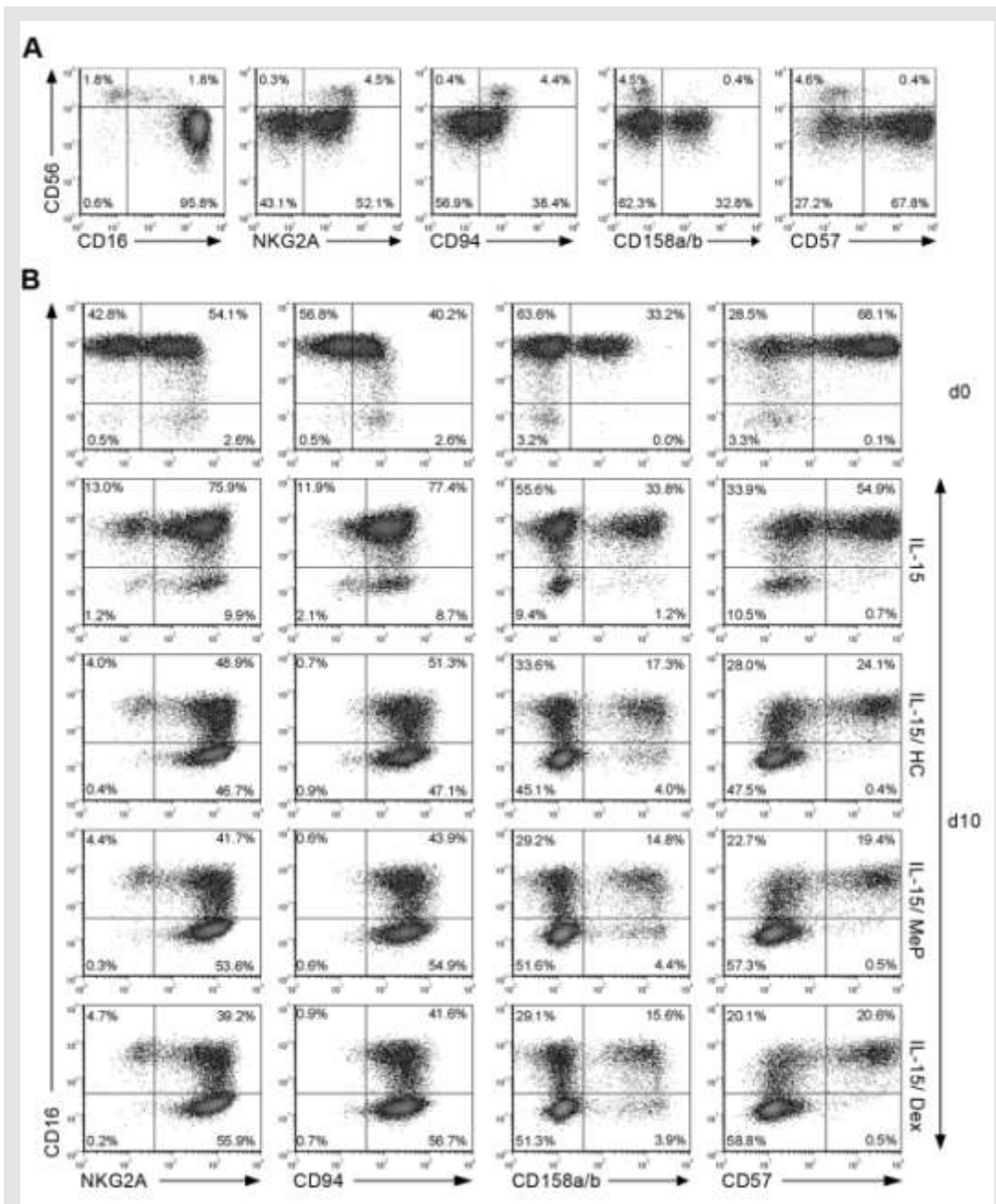
Μέση ένταση φθορισμού (MFI) των υποδοχέων NCR από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

#### 4.4 Τα Ενεργοποιημένα με IL-15 NK κύτταρα Αποκτούν ένα Διακριτό Ανοσοφαινοτυπικό Προφίλ

Τα NK κύτταρα αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό αποτελούμενο από διάφορους φαινοτυπικά διακριτούς υποπληθυσμούς οι οποίοι αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ωρίμανσης<sup>5,7,8,81,334</sup>. Τα ηρεμούντα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος διαχωρίζονται σε δυο κύριους υποπληθυσμούς βάσει της έντασης έκφρασης του επιφανειακού δείκτη CD56: 1) τον πιο ώριμο/διαφοροποιημένο CD56<sup>dim</sup> πληθυσμό, και 2) το σχετικά ανώριμο/αδιαφοροποίητο CD56<sup>bright</sup> πληθυσμό. Αυτοί οι υποπληθυσμοί χαρακτηρίζονται περαιτέρω από την έκφραση άλλων αντιγόνων επιφανείας: CD16, NKG2A, CD94, KIR και CD57. Με βάση τα δεδομένα αυτά μελετήθηκαν οι φαινοτυπικές μεταβολές που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των NK παρουσία GC. Ηρεμούντα και ενεργοποιημένα NK κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση αντιγόνων επιφανείας σχετιζόμενων με τη διαφοροποίηση. Η ανάλυση έγινε βάσει της παρουσίας ή όχι του δείκτη CD16, διότι ο διαχωρισμός των υποπληθυσμών βάσει του CD56 δεν είναι εφικτός, καθώς η έκφραση του CD56 αυξάνεται μετά από διέγερση των κυττάρων και στους δυο υποπληθυσμούς.

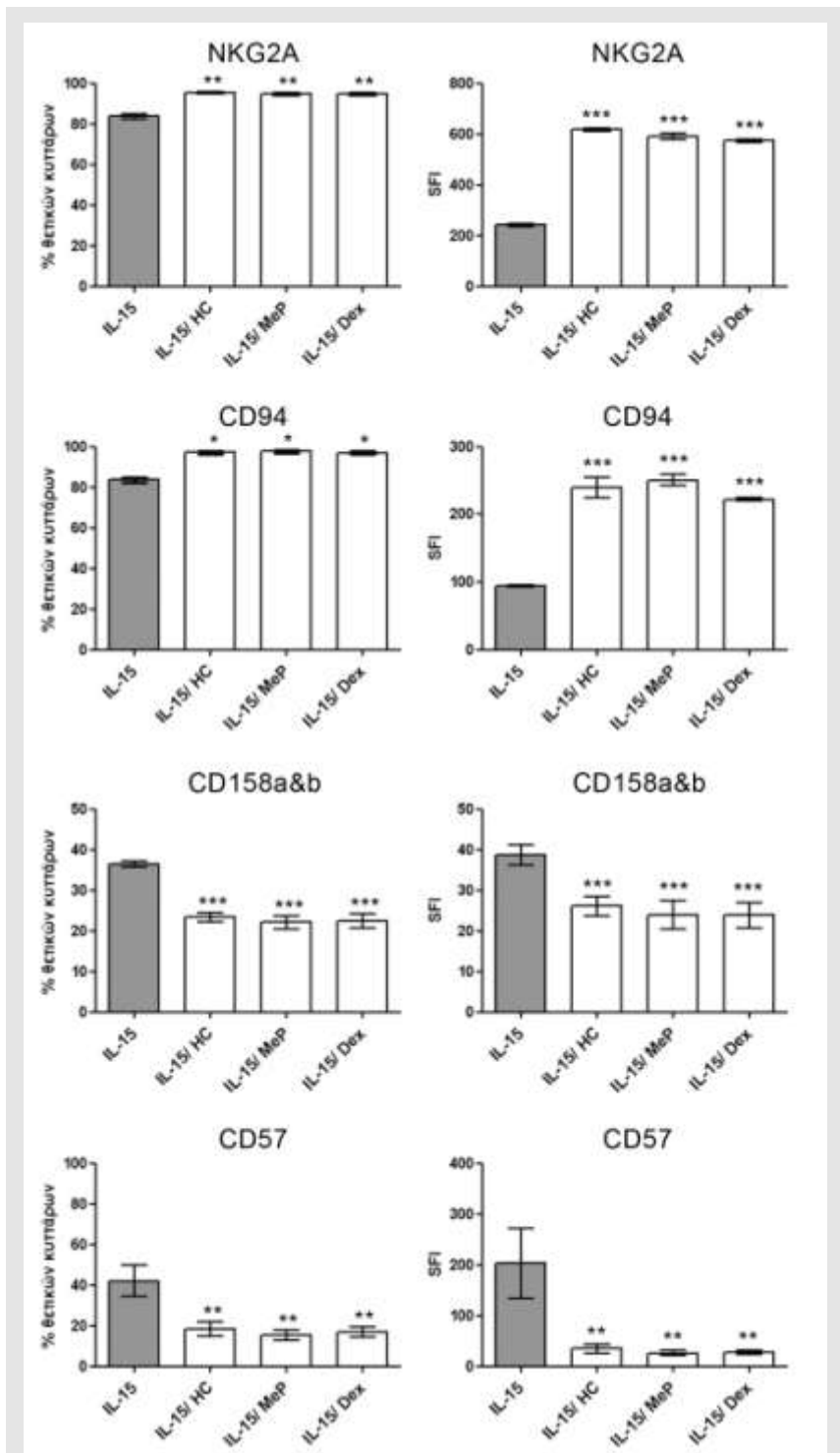
Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4-11*, η συχνότητα των CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά παρουσία της IL-15 και GC αντιπροσωπεύοντας περίπου το 50% του συνολικού πληθυσμού των NK ενεργοποιημένων για 10 μέρες (IL-15/HC: 51.97% ± 0.54, IL-15/MeP: 44.79% ± 0.76, IL-15/Dex: 43.09% ± 0.46). Ενώ παρουσία μόνο της IL-15 ο επικρατής υποπληθυσμός είναι CD16<sup>+</sup> (85.39% ± 2.03;  $P < 0.001$  συγκριτικά με τα IL-15/GC ενεργοποιημένα NK). Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα παρουσία GC NK κύτταρα εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα NKG2A και CD94, ενώ εμφανίζουν να έχουν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά κυττάρων θετικών για KIR (CD158a & CD158b) ή CD57, σε σύγκριση με NK ενεργοποιημένα μόνο με IL-15. Αυτές οι φαινοτυπικές ιδιότητες των ενεργοποιημένων NK παρουσία GC αντικατοπτρίζουν ένα προφίλ κυττάρων λιγότερο διαφοροποιημένων.





**Εικόνα 4-11 Έκφραση δεικτών διαφοροποίησης**

(A) Κυτταρομετρική ανάλυση ηρεμώντων NK κυττάρων από περιφερικό αίμα. Παρουσιάζεται η έκφραση των μορίων επιφανείας CD16, NKG2A, CD94, KIR, και CD57 έναντι της έκφρασης του αντιγόνου CD56. (B) Αντιπροσωπευτικός ανοσοφαίνοτυπος ηρεμώντων NK (άνω σειρά) ή καλλιεργημένων με IL-15 για 10 μέρες NK κυττάρων παρουσία ή απουσία GC. Τα σικτογράμματα δείχνουν την έκφραση του αντιγόνου της επιλογής έναντι της έκφρασης του CD16. Οι συχνότητες του κάθε υποπληθυσμού σημειώνονται στο αντίστοιχο τεταρτοκώκλιο.



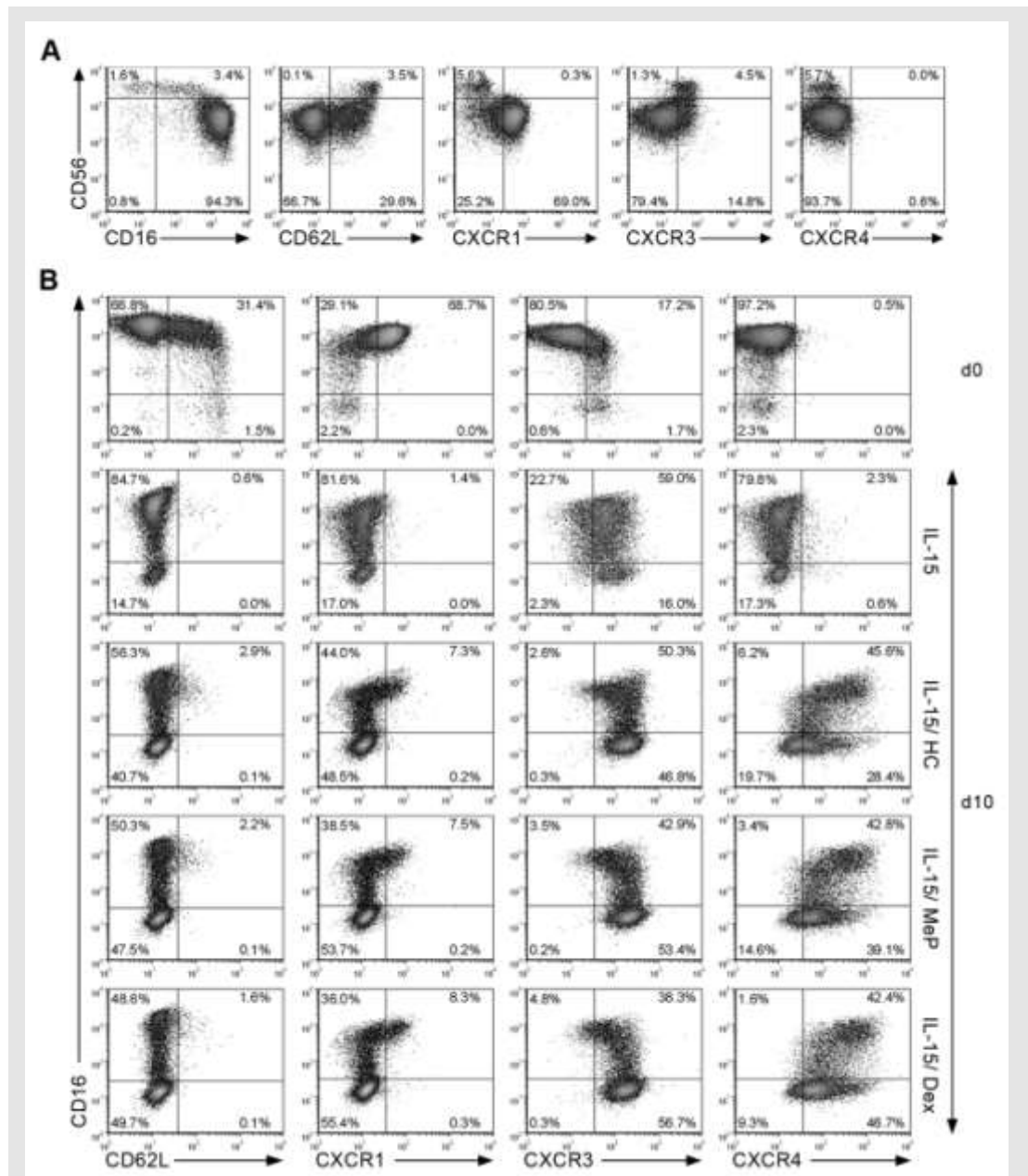
**Εικόνα 4-12 Έκφραση δεικτών διαφοροποίησης (συγκεντρωτικά δεδομένα)**

Έκφραση των αναγραφόμενων δεικτών επιφανείας σε ενεργοποιημένα για 10 μέρες NK κύτταρα εκφραζόμενη ως ποσοστό θετικών κυττάρων (αριστερά) και ειδική ένταση φθορισμού (SFI) (δεξιά). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν

μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

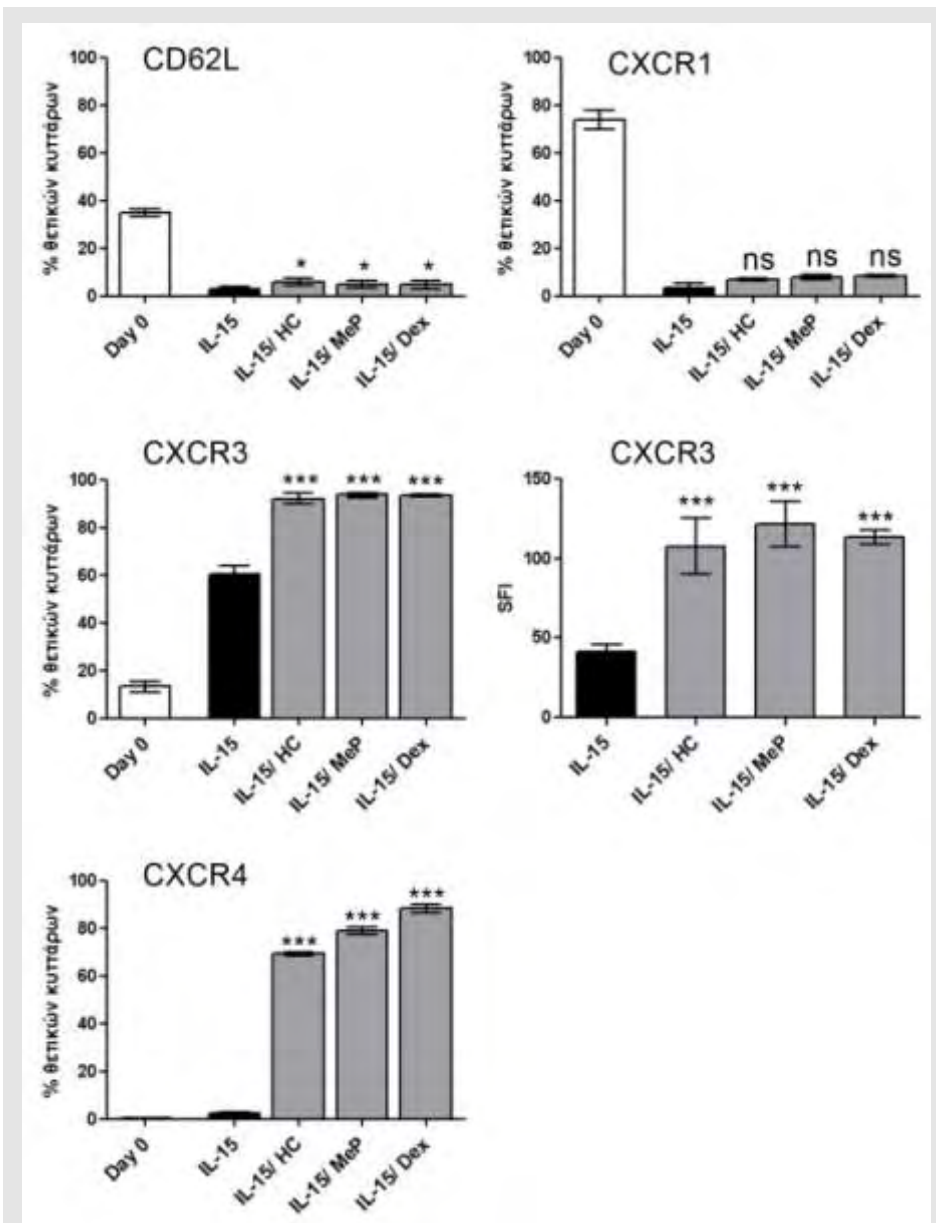
#### **4-5 Τα ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK κύτταρα εκφράζουν διαφορετικούς υποδοχείς χημειοκινών**

Η έκφραση υποδοχέων χημειοκινών, οι οποίοι καθορίζουν την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων, είναι ετερογενής ανάμεσα στους υποπληθυσμούς των NK<sup>179</sup>. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4-13* και *Εικόνα 4-14*, η έκφραση του CD62L και CXCR1 καταστέλλεται κατόπιν ενεργοποίησης των NK και στις δυο συνθήκες (με και χωρίς GC), παρότι η παρουσία GC επιβραδύνει την καταστολή αυτή. Η έκφραση του CXCR3 αυξήθηκε σημαντικά παρουσία GC. Επίσης, η έκφραση του υποδοχέα της CXCL12, ο CXCR4, απάγεται σημαντικά από τα GC ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό (3%) των NK ενεργοποιημένων μόνο με IL-15 εκφράζουν CXCR4.



**Εικόνα 4-13 Έκφραση υποδοχέων χημειοκινών**

Διακριτό προφίλ έκφρασης των υποδοχέων χημειοκινών στα NK κύτταρα καλλιεργημένα παρουσία IL-15 και GC. Η έκφραση ενός ρεπερτορίου υποδοχέων χημειοκινών προσδιορίστηκε σε απομονωμένα και *in vitro* καλλιεργημένα NK κύτταρα όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4-11.

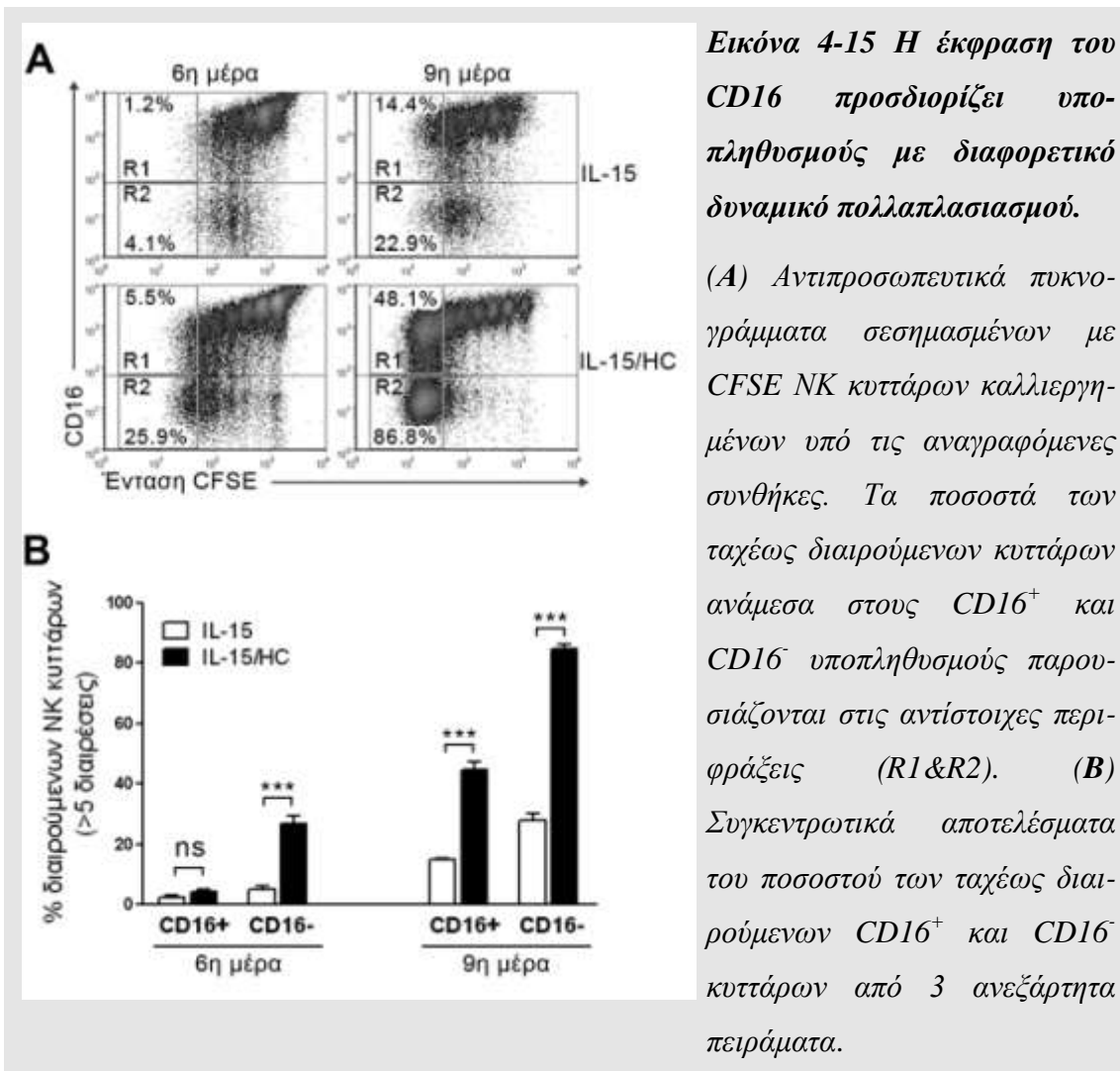


**Εικόνα 4-14 Έκφραση υποδοχέων χημειοκινών (συγκεντρωτικά αποτελέσματα)**

Έκφραση των αναγραφόμενων δεικτών επιφανείας σε ενεργοποιημένα για 10 μέρες NK κύτταρα με IL-15 παρουσία ή απουσία GC. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

#### **4.6 Η Έκφραση του CD16 Καθορίζει Δυο Πληθυσμούς NK κυττάρων με Διαφορετικό Δυναμικό Πολλαπλασιασμού**

Όπως περιγράφηκε στην ενότητα 4.4, τα ενεργοποιημένα με IL-15/GC NK κύτταρα παρουσιάζουν έναν ανοσοφαινότυπο χαρακτηριστικό των λιγότερο διαφοροποιημένων κυττάρων. Είναι γνωστό ότι τα CD16<sup>-</sup> αντιπροσωπεύουν πιο ανώριμα NK κύτταρα<sup>81</sup>. Τα αποτελέσματά μας (*Εικόνα 4-15*) έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός αυτού του υποπληθυσμού ευνοείται παρουσία GC: το ποσοστό των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων (>5 διαιρέσεις) ανάμεσα στα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα είναι σημαντικά ψηλότερο παρουσία IL-15/GC απ' ό τι παρουσία μόνο της IL-15. Αυτή η ανισορροπία στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων, λόγω διαφορετικής επίδρασης των GC, μπορεί να εξηγήσει τον σχετικά ανώριμο φαινότυπο που παρουσιάζουν τα NK παρουσία IL-15/GC (*Εικόνα 4-11*).

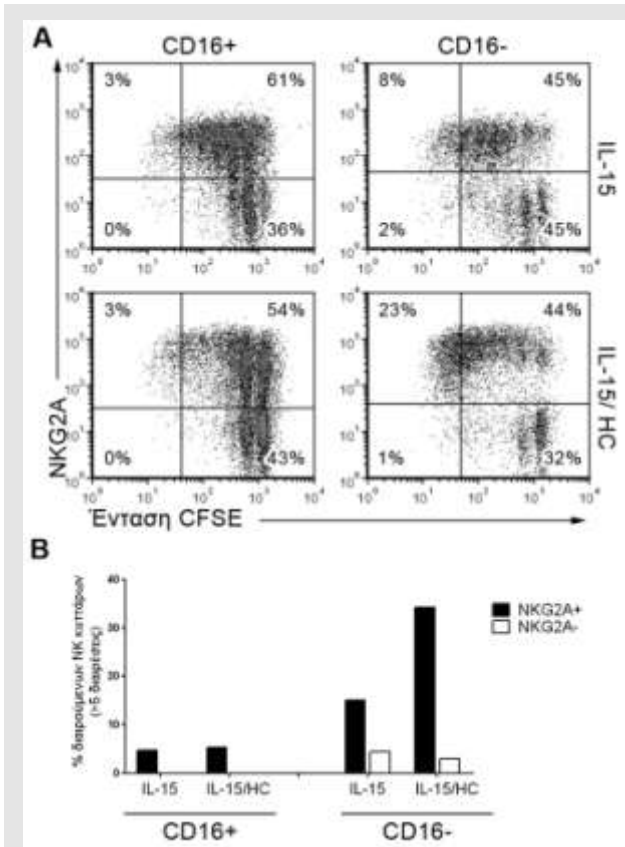


**Εικόνα 4-15 Η έκφραση του CD16 προσδιορίζει υποπληθυσμούς με διαφορετικό δυναμικό πολλαπλασιασμού.**

(A) Αντιπροσωπευτικά πυκνογράμματα σεσημασμένων με CFSE NK κυττάρων καλλιεργημένων υπό τις αναγραφόμενες συνθήκες. Τα ποσοστά των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων ανάμεσα στους CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup> υποπληθυσμούς παρουσιάζονται στις αντίστοιχες περιφράξεις (R1&R2). (B) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του ποσοστού των ταχέως διαιρούμενων CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup> κυττάρων από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Στην ακόλουθη σειρά πειραμάτων έγινε μια προσπάθεια ανοσοφαινοτυπικού χαρακτηρισμού του NK υποπληθυσμού, ο πολλαπλασιασμός του οποίου ευνοείται από τα GC. Όπως προαναφέρθηκε, η σταδιακή διαφοροποίηση των NK από τα CD56<sup>bright</sup> προς ώριμα CD56<sup>dim</sup> συνοδεύεται από την απώλεια των δεικτών CD94 και NKG2A, και τη σύγχρονη απόκτηση των υποδοχέων KIR και CD57<sup>8,334,335</sup>. Έτσι, οι δυο κύριοι υποπληθυσμοί των ενεργοποιημένων NK, CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup>, αναλύθηκαν περαιτέρω βάσει της έκφρασης αυτών των δεικτών διαφοροποίησης (Εικόνα 4-16, 4-17, 4-18, και 4-19).

Η ανάλυση έδειξε πως τα CD16<sup>-</sup> κύτταρα τα οποία ευνοούνται περισσότερο από την παρουσία της HC (όπως αυτό εκδηλώνεται από την ολοκλήρωση μεγαλύτερου αριθμού διαιρέσεων) είναι τα NKG2A<sup>+</sup> (Εικόνα 4-16), τα CD94<sup>+</sup> (Εικόνα 4-17), τα CD57<sup>-</sup> (Εικόνα 4-18) και τα CD117<sup>+</sup> (Εικόνα 4-20).

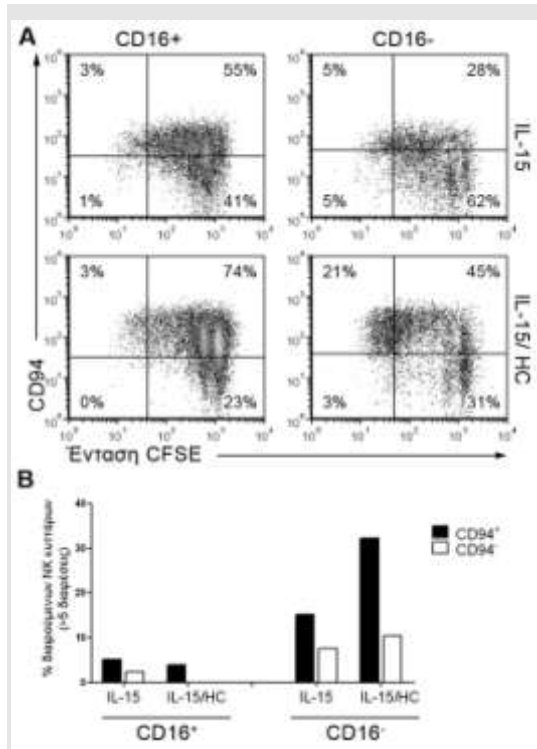


**Εικόνα 4-16 Τα GC εννοούν τον πολλαπλασιασμό των  $NKG2A^+CD16^-$  NK**

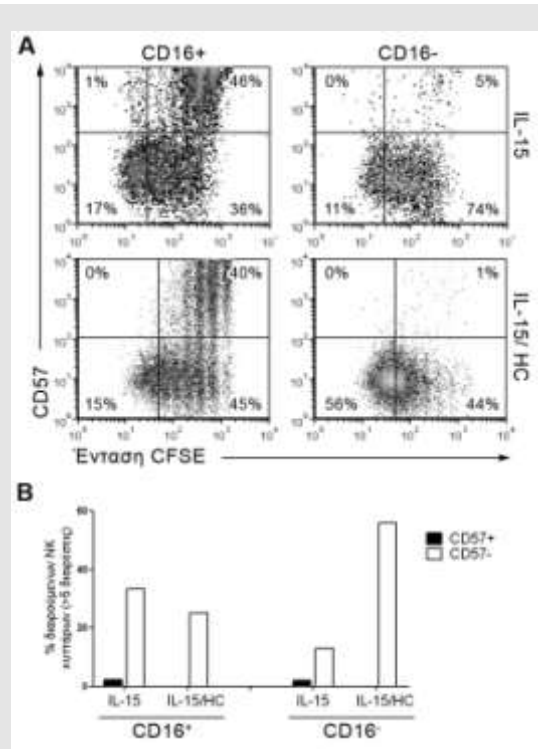
(A) Χαρακτηριστικά CFSE πυκνογράμματα ( $n=2$ ) που δείχνουν την κινητική πολλαπλασιασμού των  $CD16^+$  και  $CD16^-$  υποπληθυσμών έναντι της έκφρασης του  $NKG2A$ . Ο σταυρός διαχωρίζει τα κύτταρα οριζοντίως σε  $NKG2A^+$  ή  $NKG2A^-$  και καθέτως σε όσα έχουν ολοκληρώσει  $>5$  ή  $<5$  διαιρέσεις.

(B) Γραφική παράσταση των ποσοστών των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων ( $>5$  διαιρέσεις) ανάμεσα στα  $NKG2A^+$  ή  $NKG2A^-$  κύτταρα.

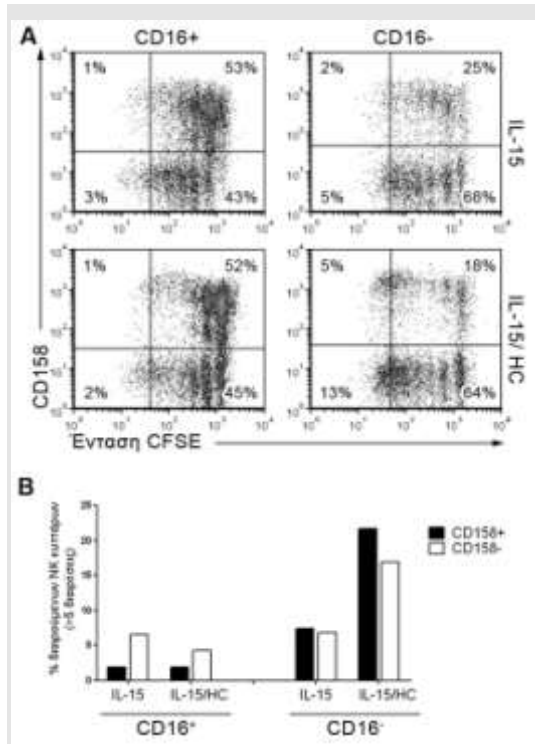




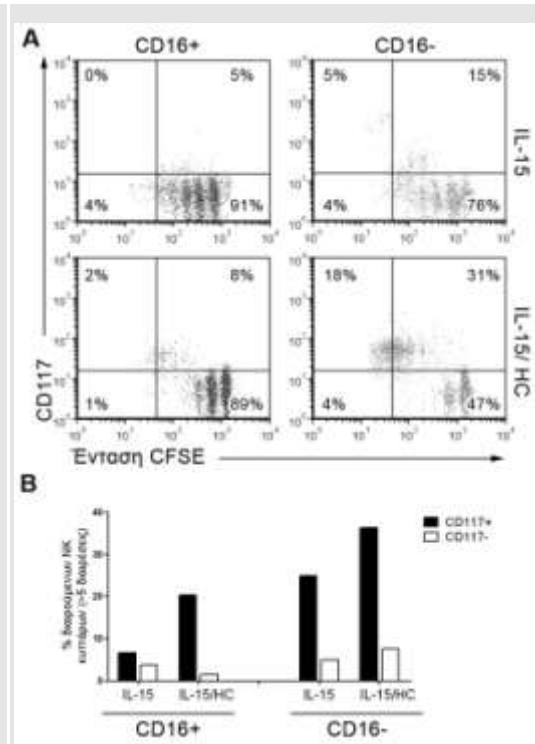
**Εικόνα 4-17 Τα GC εννοούν τον πολλαπλασιασμό των  $CD94^+CD16^+$  NK (για επεξηγήσεις βλέπε Εικόνα 4-16)**



**Εικόνα 4-18 Τα GC εννοούν τον πολλαπλασιασμό των  $CD57^+CD16^+$  NK (για επεξηγήσεις βλέπε Εικόνα 4-16)**



**Εικόνα 4-19** Τα GC ενοσούν τον πολλαπλασιασμό των  $CD158^+CD16^-$  και των  $CD158^-CD16^-$  NK κυττάρων (για επεξηγήσεις βλέπε Εικόνα 4-16)



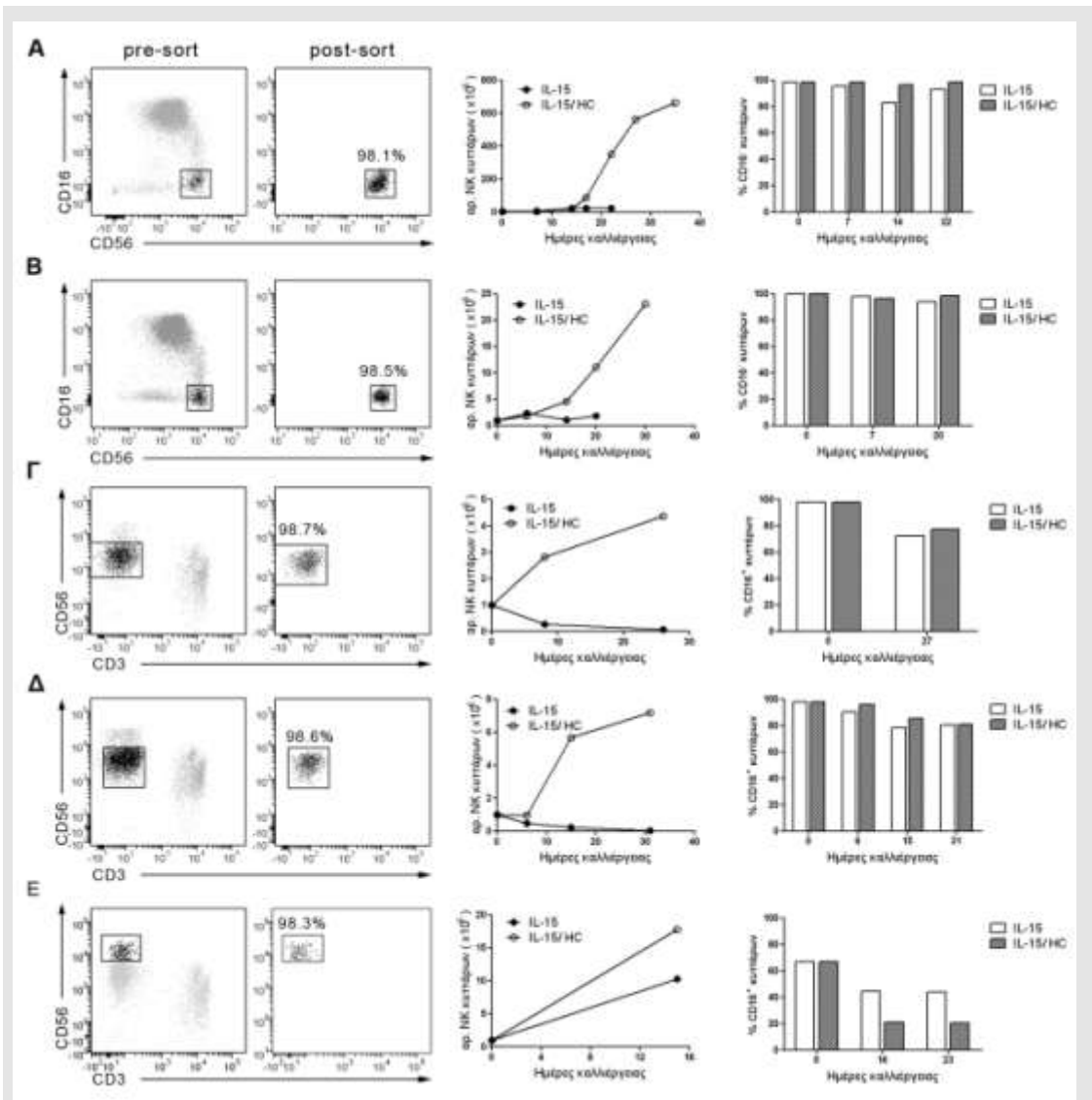
**Εικόνα 4-20** Τα GC ενοσούν τον πολλαπλασιασμό των  $CD117^+$  NK κυττάρων (για επεξηγήσεις βλέπε Εικόνα 4-16)

#### 4.7 Δυναμικό Πολλαπλασιασμού Απομονωμένων NK Υποπληθυσμών

Προκειμένου να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο καταστολής της έκφρασης του CD16 δείκτη από τα GC, προχωρήσαμε σε μελέτη απομονωμένων NK κυτταρικών υποπληθυσμών. Ο διαχωρισμός και η μετέπειτα ενεργοποίηση των  $CD56^{dim}CD16^+$  κυττάρων προκάλεσε ισχυρή απόπτωση στα κύτταρα αυτά, όπως έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία<sup>336,337</sup>. Συνεπώς, αρκεστήκαμε στο διαχωρισμό και τη μελέτη των  $CD56^{dim}$  και  $CD56^{bright}CD16^-$  κυτταρικών πληθυσμών.

Στην *Εικόνα 4-21* παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα απομονωμένων υποπληθυσμών, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν *in vitro* με IL-15, απουσία ή παρουσία HC. Λαμβάνοντας υπόψη (α) το χαμηλό ρυθμό αύξησης των  $CD56^{dim}$  καλλιέργειών σε σχέση με τις  $CD56^{bright}CD16^-$  (στις αντίστοιχες συνθήκες), και (β) το υψηλό ποσοστό (>80%) των  $CD16^+$  κυττάρων που διατηρούν οι  $CD56^{dim}$  καλλιέργειες, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο παρατηρούμενος αυξημένος πολλαπλασιασμός των

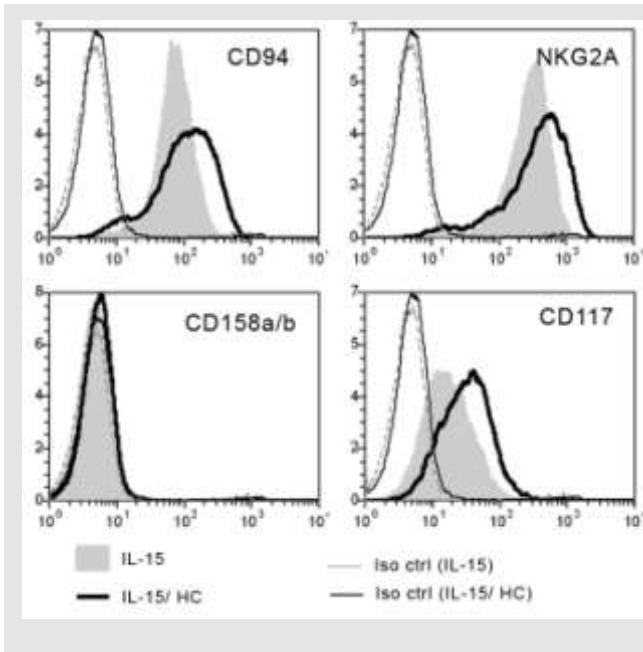
CD16<sup>-</sup> κυττάρων στις μεικτές καλλιέργειες (CD56<sup>+</sup>) παρουσία IL-15 και GC, δεν μπορεί να οφείλεται σε πολλαπλασιασμό των CD16<sup>+</sup> κυττάρων τα οποία χάνουν την έκφραση του CD16 δείκτη παρουσία GC. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα παρουσία HC CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα παρουσιάζουν ένα προφίλ λιγότερο διαφοροποιημένων κυττάρων (Εικόνα 4-22).



**Εικόνα 4-21 Δυναμικό Αύξησης Απομονωμένων NK Υποπληθυσμών**

Εμπλουτισμένα σε CD56 περιφερικά PBMC κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση επιμέρους NK υποπληθυσμών μέσω κυτταροδιαχωριστή: (A, B) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, (Γ, Δ) CD56<sup>dim</sup>, και (E) CD56<sup>bright</sup>. Η καθαρότητα των απομονωμένων πληθυσμών μετά το διαχωρισμό (post-sort) αναγράφεται πάνω από την αντίστοιχη περίφραξη (gate). Τα απομονωμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν in vitro

με IL-15, απουσία ή παρουσία HC. Ο ρυθμός αύξησης (μεσαία στήλη) και η σύσταση των καλλιιεργειών σε CD16<sup>+</sup> κύτταρα (δεξιά στήλη) μετρήθηκαν στα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα.

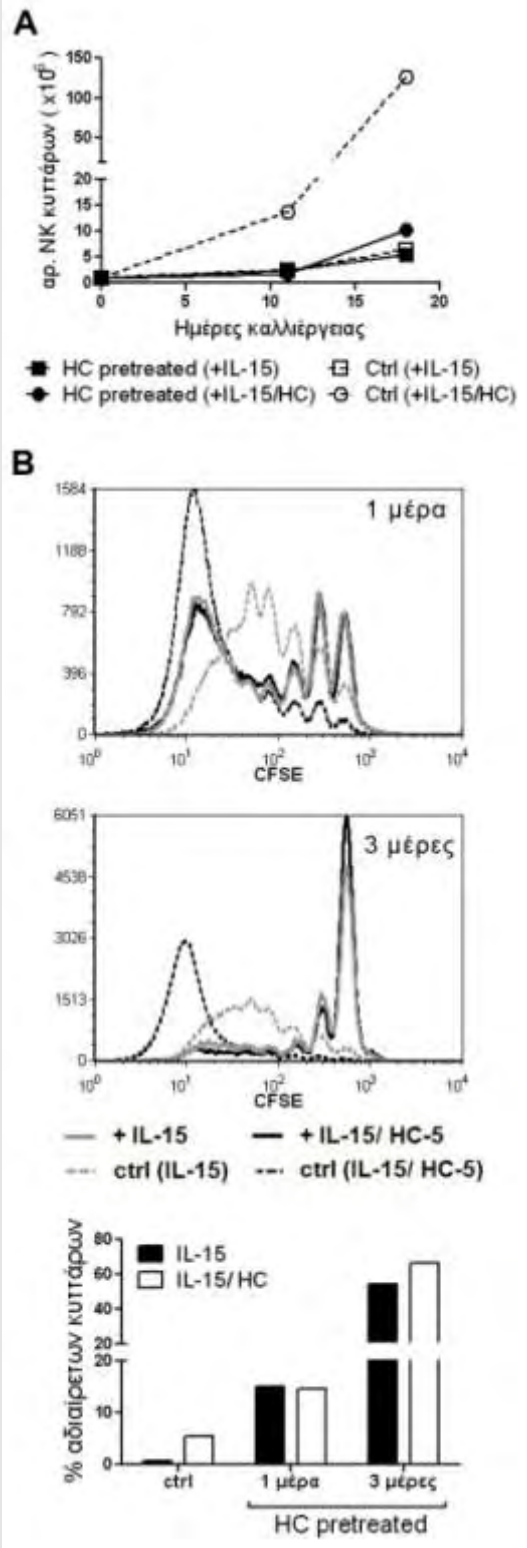


**Εικόνα 4-22 Φαινοτυπικός Χαρακτηρισμός Απομονωμένων CD16<sup>+</sup> NK κυττάρων**

Απομονωμένα με κυτταροδιαχωριστή ροής CD16<sup>+</sup> NK κύτταρα καλλιιεργήθηκαν με IL-15, παρουσία ή απουσία HC. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν το προφίλ έκφρασης των κυρίων μοριακών δεικτών διαφοροποίησης μετά από 20 μέρες καλλιιεργειας.

#### 4.8 NK κύτταρα προ-Εκτεθειμένα σε GC Παρουσιάζουν Μειωμένο Δυναμικό Πολλαπλασιασμού

Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι NK κύτταρα από ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με MeP παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού<sup>32</sup>. Με αφορμή αυτά τα δεδομένα εξετάσαμε το δυναμικό πολλαπλασιασμού NK κυττάρων απομονωμένων από υγιείς δότες, μετά από *in vitro* έκθεση σε φαρμακολογικές δόσεις GC. Η προ-επώαση των NK σε HC για 24 ώρες οδήγησε σε αξιοσημείωτη αναστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού ως απόκριση στην ενεργοποίηση με IL-15 (παρουσία HC) (Εικόνα 4-23, A). Η καταστολή αυτή αντικατοπτρίζεται και στο υψηλό ποσοστό των αδιαίρετων κυττάρων 8 μέρες μετά την ενεργοποίηση (Εικόνα 4-23, B). Όπως είναι αναμενόμενο, η καταστολή γίνεται πιο έντονη καθώς αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης στην HC.



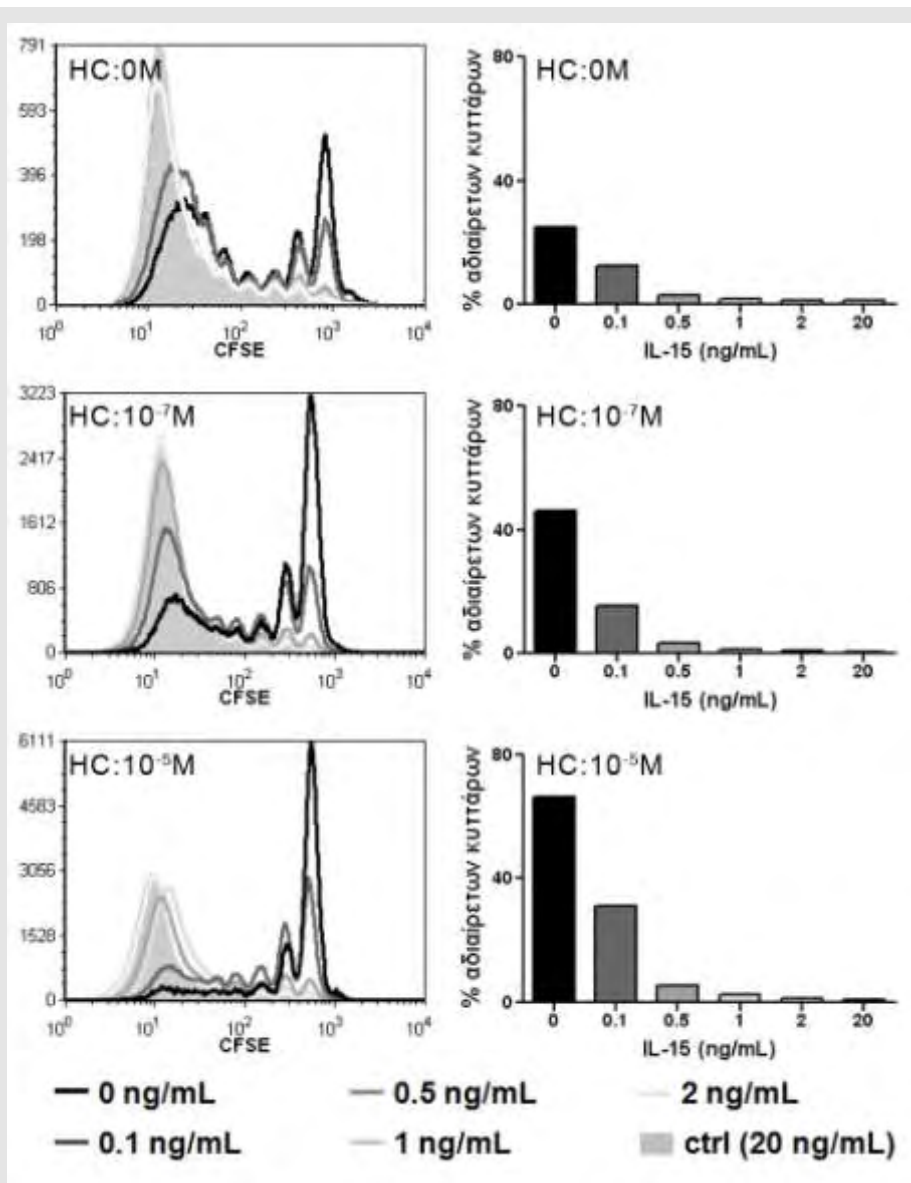
**Εικόνα 4-23 Μειωμένος πολλαπλασιασμός των NK κυττάρων προεκτεθειμένων σε HC**

(A) NK κύτταρα από υγιείς δότες προεπωάστηκαν για 24 ώρες με HC ( $10^{-5}$  M) ή με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (Ctrl) προτού διεγερθούν με IL-15 παρουσία ή απουσία HC. Το γράφημα παρουσιάζει το δυναμικό πολλαπλασιασμού ενός αντιπροσωπευτικού δότη. (B) NK κύτταρα από υγιείς δότες προεπωάστηκαν για 1 μέρα ή 3 μέρες με HC ( $10^{-5}$  M) προτού διεγερθούν με IL-15 παρουσία ή απουσία HC. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τα προφίλ πολλαπλασιασμού την 8<sup>η</sup> μέρα της ενεργοποίησης. Τα ποσοστά των αδιάσπαστων κυττάρων παρουσιάζονται στην κάτω γραφική παράσταση. Τα ιστογράμματα είναι αντιπροσωπευτικά ενός δότη (από τους 3 που εξετάστηκαν).

#### 4.9 Το Ισοζύγιο των Σημάτων Προερχόμενων από την IL-15 και τα GC Ρυθμίζει την Ομοιόσταση των NK κυττάρων

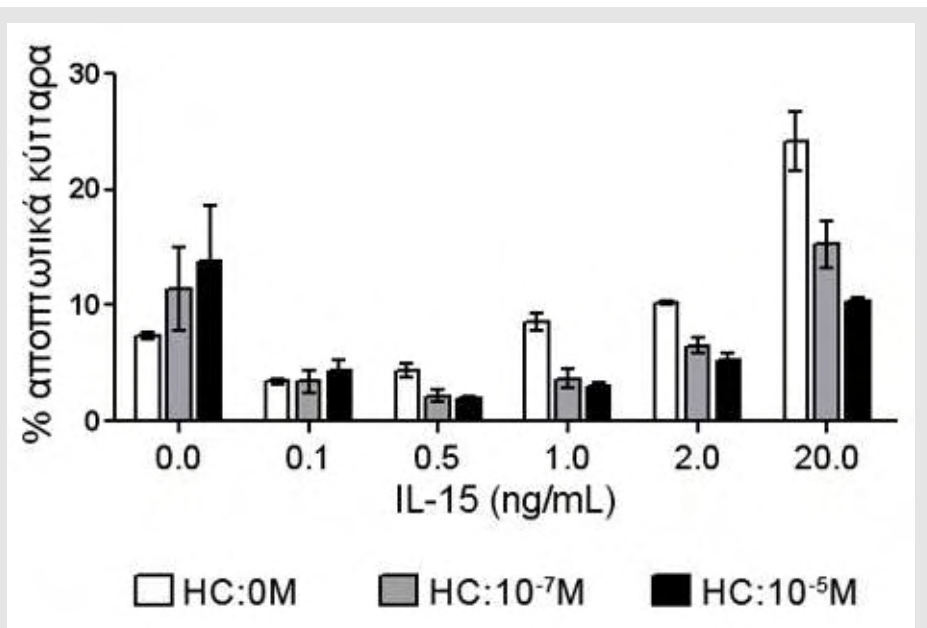
Είναι γνωστό ότι τα NK που κυκλοφορούν στο αίμα είναι διαρκώς εκτεθειμένα στη κορτιζόλη, η συγκέντρωση της οποίας σε φυσιολογικές συνθήκες κυμαίνεται μεταξύ  $10^{-7} - 10^{-6}$  M ενώ σε στρεσογόνες συνθήκες φτάνει σε υψηλότερα επίπεδα<sup>270</sup>. Παρόλα αυτά τα NK παραμένουν πλήρως λειτουργικά και «έτοιμα» να ανταποκριθούν σε επακόλουθα διεγερτικά σήματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Είναι αξιοπερίεργο το πώς τα NK μπορούν να αντιμετωπίσουν τα ανοσοκασταλικά σήματα της κορτιζόλης. Με δεδομένο ότι η ομοιόσταση των NK *in vivo* εξαρτάται από την παρουσία της IL-15<sup>338</sup>, υποθέσαμε ότι πιθανά η IL-15 εξισορροπεί τη δράση της κορτιζόλης. Έτσι εξετάσαμε την επιβίωση και την ικανότητα πολλαπλασιασμού των NK προεκτεθειμένων για 3 μέρες σε HC [ $10^{-7}$  M (φυσιολογική συγκέντρωση) ή  $10^{-5}$  M (φαρμακολογική συγκέντρωση)] παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της IL-15. Κατόπιν εκτιμήθηκε η απόπτωση των NK βάσει της πρόσδεσης/πρόσληψης της Annexin V/7-AAD, καθώς και η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους μετά από διέγερση με IL-15/HC για 8 επιπρόσθετες μέρες.

Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4-23* και *Εικόνα 4-24*, απουσία οποιουδήποτε σήματος ενεργοποίησης, τα GC – ακόμα και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις – μπορούν να μειώσουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των NK κυττάρων *in vitro*. Καθώς η συγκέντρωση και η διάρκεια επώασης με τα GCs αυξάνονται, τα κύτταρα χάνουν τελείως την ικανότητά τους να ανταποκριθούν στη διέγερση με IL-15, όπως αυτό εκδηλώνεται από τα αυξημένα ποσοστά των αδιαίρετων κυττάρων (*Εικόνα 4-24*). Η σύγχρονη παρουσία μικρών ποσοτήτων της IL-15, όχι μόνο προστατεύει τα κύτταρα από την GC-επαγόμενη απόπτωση αλλά επίσης εξασφαλίζει τη λειτουργική τους ακεραιότητα. Πιο ισχυρή ενεργοποίηση (IL-15  $\geq 0.5$  ng/mL) των NK οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση (επαγόμενη από την ενεργοποίηση) με ένα εξαρτώμενο-από-τη-δόση τρόπο (*Εικόνα 4-25*). Ωστόσο, τα GC προστατεύουν αυτά τα κύτταρα από την απόπτωση μειώνοντας σημαντικά το ρυθμό απόπτωσής τους.



**Εικόνα 4-24 Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των NK ρυθμίζεται από τη συνδυασμένη δράση των GC και της IL-15**

NK κύτταρα προ-επώαστηκαν για 3 μέρες είτε απουσία (HC:0M) ή παρουσία HC (HC:10<sup>-7</sup>M; HC:10<sup>-5</sup>M) με αυξανόμενες δόσεις IL-15. Έπειτα διεγέρθηκαν με υψηλή συγκέντρωση IL-15 (20 ng/mL) και HC (10<sup>-5</sup>M). Στην αριστερή στήλη απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά προφίλ πολλαπλασιασμού μετά από 8 μέρες διέγερσης. Τα ποσοστά των αδιαίρετων κυττάρων παρουσιάζονται με γραφικό τρόπο στη δεξιά στήλη.



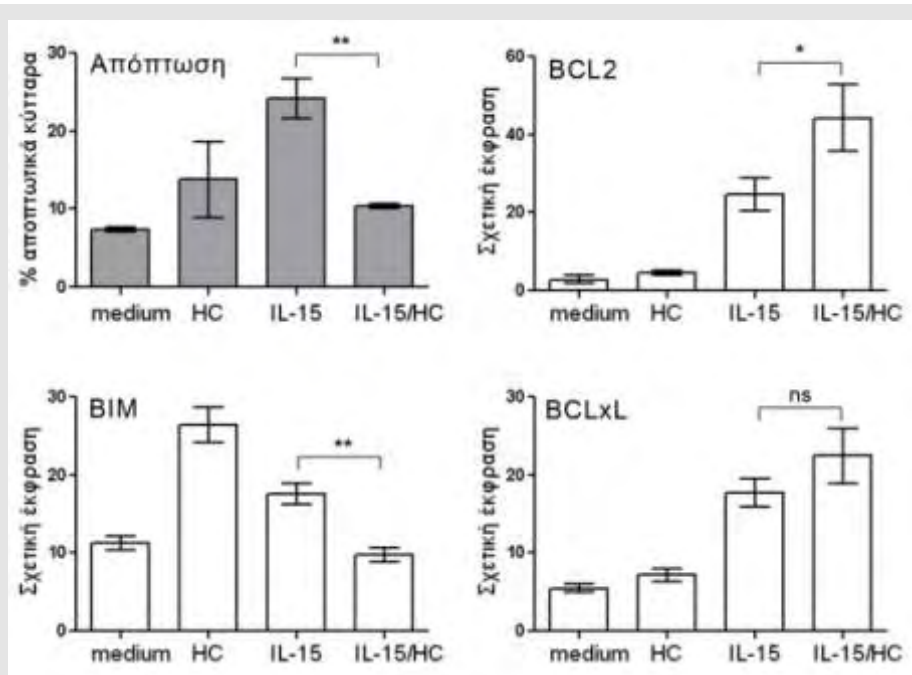
**Εικόνα 4-25 Η επιβίωση των NK ρυθμίζεται από τη συνδυασμένη δράση των GC και της IL-15**

NK κύτταρα προ-επωάστηκαν για 3 μέρες είτε απουσία (HC:0M) ή παρουσία HC (HC:10<sup>-7</sup>M; HC:10<sup>-5</sup>M) με αυξανόμενες δόσεις IL-15. Την 3<sup>η</sup> μέρα ο βαθμός απόπτωσης μετρήθηκε βάσει της πρόσδεσης της Annexin V.

#### 4.10 Η Ενισχυμένη Επιβίωση των NK Παρουσία IL-15 και HC Αντικατοπτρίζεται στα Επίπεδα Γονιδιακής Έκφρασης των Μελών της Οικογένειας BCL2

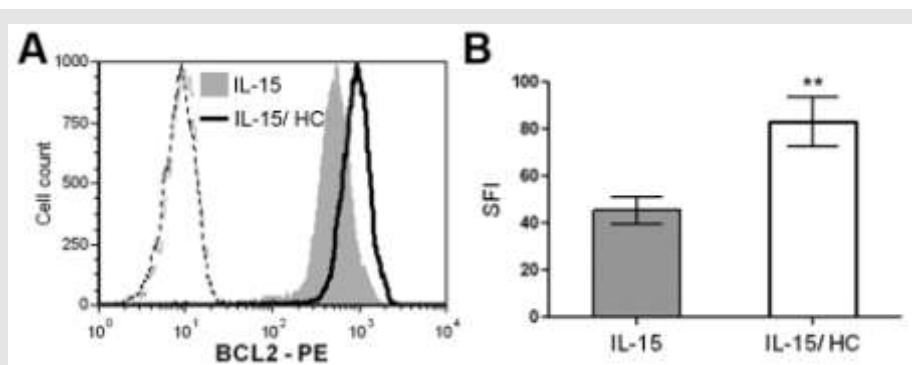
Είναι γνωστό ότι η απόπτωση και κατ' επέκταση η ομοιόσταση των NK ρυθμίζονται άμεσα από τα μέλη της γονιδιακής οικογένειας του BCL2<sup>161,339-341</sup>. Προκειμένου να διερευνήσουμε τους αποπτωτικούς μηχανισμούς που πυροδοτούνται από την IL-15 και τα GC, μετρήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των αντι-αποπτωτικών γονιδίων, BCL2 και BCLxL, καθώς και του προ-αποπτωτικού γονιδίου BIM (Εικόνα 4-26). Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του BCL2 mRNA σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα επίπεδα του BIM mRNA δικαιολογούν την μειωμένη απόπτωση που παρατηρείται στα ενεργοποιημένα με IL-15 και HC NK κύτταρα σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα μόνο με IL-15. Η έκφραση του BCL2 μετρήθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 4-27).





**Εικόνα 4-26 Συγκριτικά πρότυπα έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την απόπτωση**

Απομονωμένα NK κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 3 μέρες υπό τις αναγραφόμενες συνθήκες. Τα επίπεδα έκφρασης των μεταγραφημάτων του BIM, BCL2 και BCLxL μετρήθηκαν με ποσοτική PCR. Ο ρυθμός της απόπτωσης προσδιορίστηκε βάσει της πρόσδεσης της Annexin V. Παρουσιάζονται συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

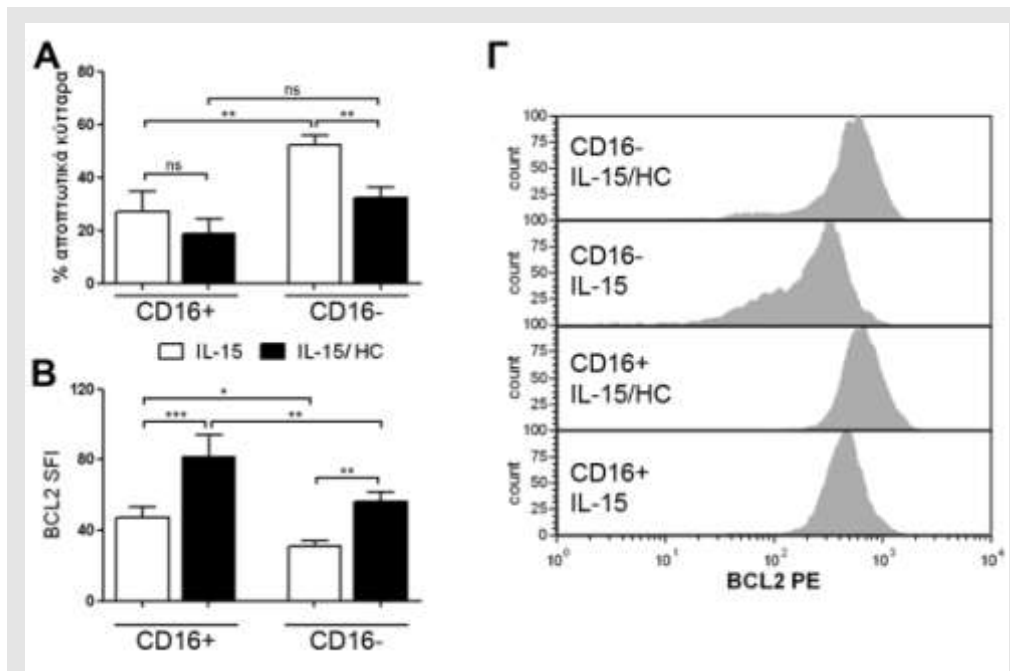


**Εικόνα 4-27 Αυξημένη έκφραση BCL2 παρουσία IL-15 και HC**

Ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης της BCL2 πρωτεΐνης σε NK κύτταρα ενεργοποιημένα για 3 μέρες με IL-15, απουσία ή παρουσία HC. (A) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα από ένα δότη. (B) Συγκεντρωτικά

#### **4.11 Τα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα Είναι πιο Ευαίσθητα στην Επαγόμενη από την IL-15 Απόπτωση**

Ανάλυση των δυο κύριων υποπληθυσμών των NK, CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup>, έδειξε ότι τα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην επαγόμενη από την ενεργοποίηση (IL-15) απόπτωση, σε σχέση με τα CD16<sup>+</sup>. Το ποσοστό των Annexin V<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων είναι σχεδόν διπλάσιο εκείνων των CD16<sup>+</sup> (Εικόνα 4-28, A). Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της BCL2 πρωτεΐνης στα CD16<sup>-</sup> κύτταρα δικαιολογούν εν μέρει τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσής τους (Εικόνα 4-28, B). Ωστόσο, όταν τα NK ενεργοποιήθηκαν παρουσία IL-15 και HC, η απόπτωση και των δυο πληθυσμών μειώθηκε, με μεγαλύτερη έμφαση στα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα. Παράλληλα, η παρουσία της HC προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της BCL2 και στους δυο υποπληθυσμούς. Πρέπει να σημειωθεί ότι, παρά τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της BCL2 στα CD16<sup>+</sup> NK παρουσία IL-15/HC, η επιβίωσή τους δε βελτιώθηκε σημαντικά, σε σχέση με τα αντίστοιχα CD16<sup>+</sup> ενεργοποιημένα μόνο με IL-15, υποδηλώνοντας ότι και άλλοι παράγοντες ρυθμίζουν το μηχανισμό απόπτωσης των CD16<sup>+</sup> κυττάρων υπό αυτές τις συνθήκες.



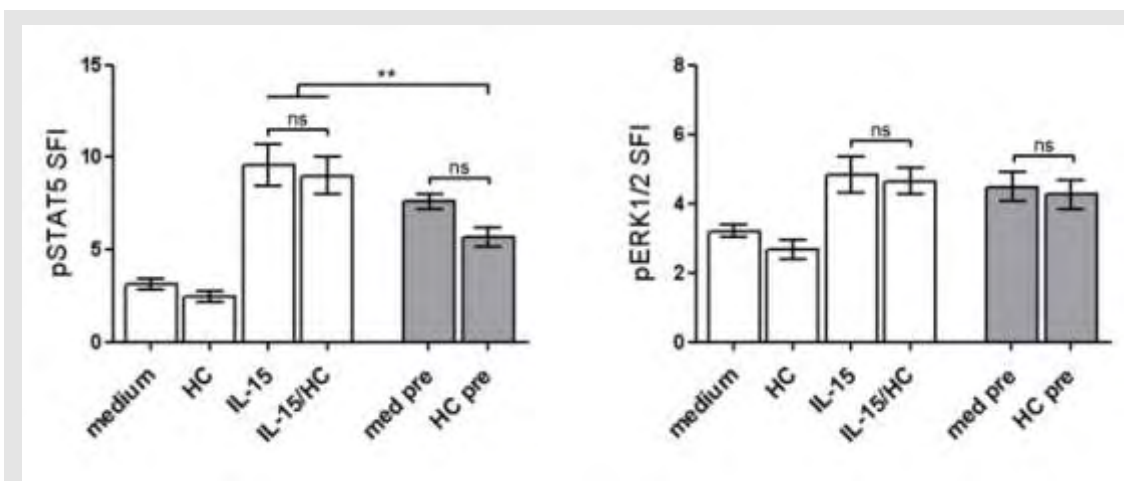
**Εικόνα 4-28 Διαφορική επίδραση της HC στην απόπτωση των NK υποπληθυσμών**

Ανάλυση NK κυττάρων ( $n=3$ ) καλλιεργημένων για 3 μέρες με IL-15, απουσία ή παρουσία HC, ως προς το ποσοστό των Annexin V<sup>+</sup> κυττάρων (A) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης της BCL2 (B) στους 2 επιμέρους υποπληθυσμούς τους (CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup>). (Γ) Χαρακτηριστικά ιστογράμματα έκφρασης της πρωτεΐνης BCL2.

#### 4.12 Η Ταυτόχρονη Διέγερση των NK με IL-15 και GC δεν Επηρεάζει την Ενεργοποίηση των Παραγόντων STAT5, ERK1/2, AKT και NFκB

Η διέγερση των λεμφοκυττάρων από κυτταροκίνες ή παράγοντες αύξησης σηματοδοτεί την ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ελέγχουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους<sup>342-344</sup>. Έτσι στην επόμενη σειρά πειραμάτων εξετάσαμε τα επίπεδα ενεργοποίησης του STAT5, ERK1/2, AKT και NFκB. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4-29*, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του STAT5 και ERK1/2 αυξήθηκαν σημαντικά στα ενεργοποιημένα με IL-15 NK κύτταρα. Ωστόσο καμιά διαφορά δεν παρατηρήθηκε όταν αυτά ενεργοποιήθηκαν παρουσία HC. Επιπρόσθετα, NK προ-επωασμένα με HC μπορούσαν να φωσφορυλιώσουν τους παράγοντες αυτούς σε επίπεδα παρόμοια με τα κύτταρα μάρτυρες (medium pre),

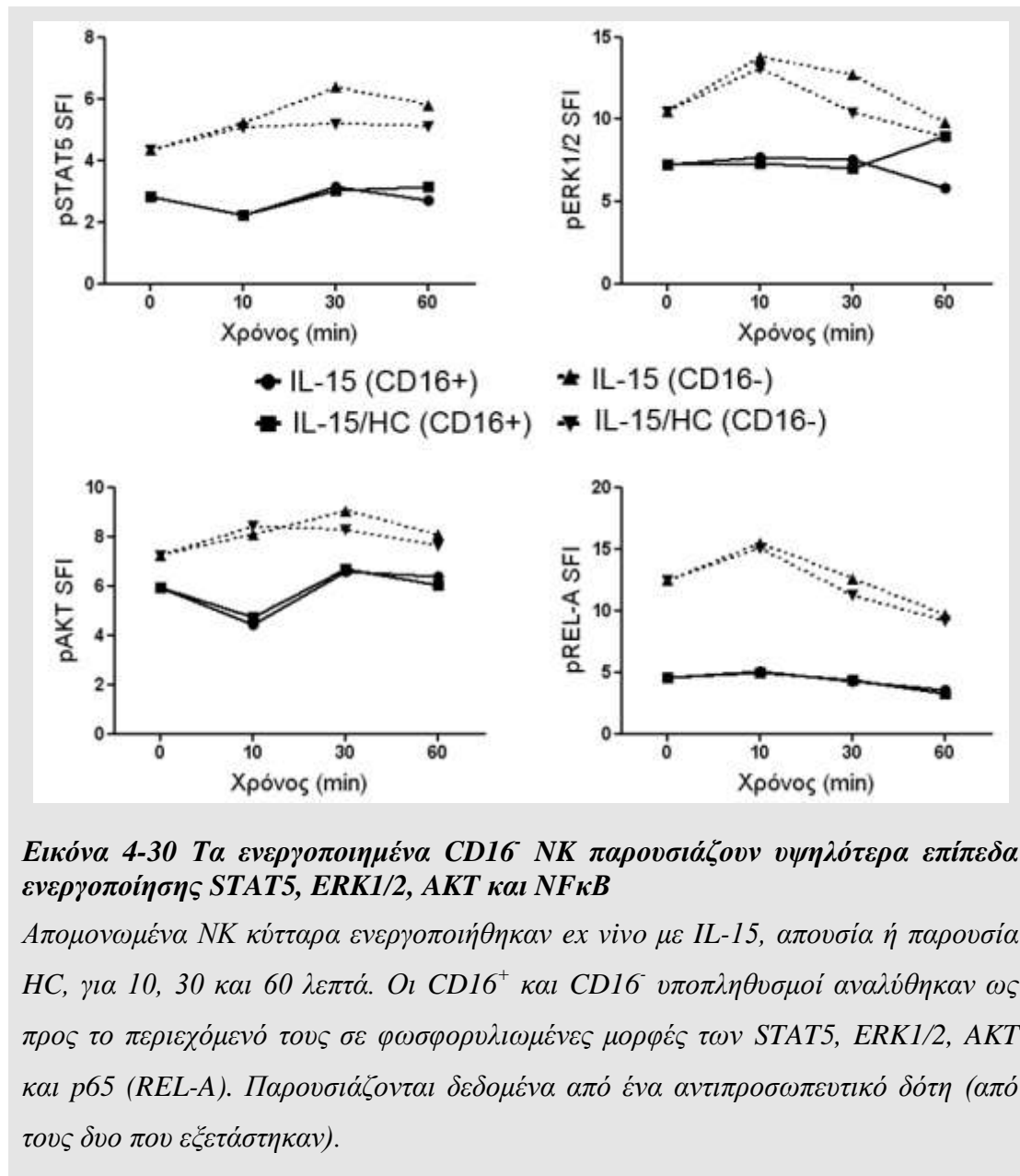
κατόπιν ενεργοποίησης με IL-15/HC. Όμως, η προ-επώαση των NK με HC προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης STAT5 συγκριτικά με τα ενεργοποιημένα κύτταρα (IL-15+/-HC).



#### **Εικόνα 4-29 Η ενεργοποίηση του STAT5 και ERK1/2 παρουσία GC**

NK κύτταρα επωάστηκαν είτε 1) για 3 μέρες με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (*medium*) ή HC ή IL-15 ή IL-15/HC (λευκές μπάρες), είτε 2) για 2 μέρες με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (*med pre*) ή HC (*HC pre*) και κατόπιν ενεργοποιήθηκαν με IL-15/HC για επιπλέον 24 ώρες (γκρι μπάρες). Τα ενδοκυττάρια επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERK1/2 και STAT5 μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (SFI: *Specific Fluorescent Intensity*). Παρουσιάζονται αποτελέσματα από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

Με δεδομένο ότι τα GC επηρεάζουν διαφορετικά τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των NK υποπληθυσμών, επιπλέον εξετάσαμε τα επίπεδα ενεργοποίησης ενδοκυττάρων μορίων σηματοδότησης στα CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα (Εικόνα 4-30). Η ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα ενεργοποίησης του STAT5, ERK1/2, AKT1 και NFκB [p65 (ή αλλιώς REL-A) υπομονάδα του ετεροδιμερούς συμπλόκου NFκB] είναι υψηλότερα στα πιο αδιαφοροποίητα CD16<sup>-</sup> NK, ωστόσο καμιά διαφορά δεν παρατηρήθηκε όταν αυτά ενεργοποιήθηκαν παρουσία HC.



**Εικόνα 4-30 Τα ενεργοποιημένα CD16<sup>+</sup> NK παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης STAT5, ERK1/2, AKT και NFκB**

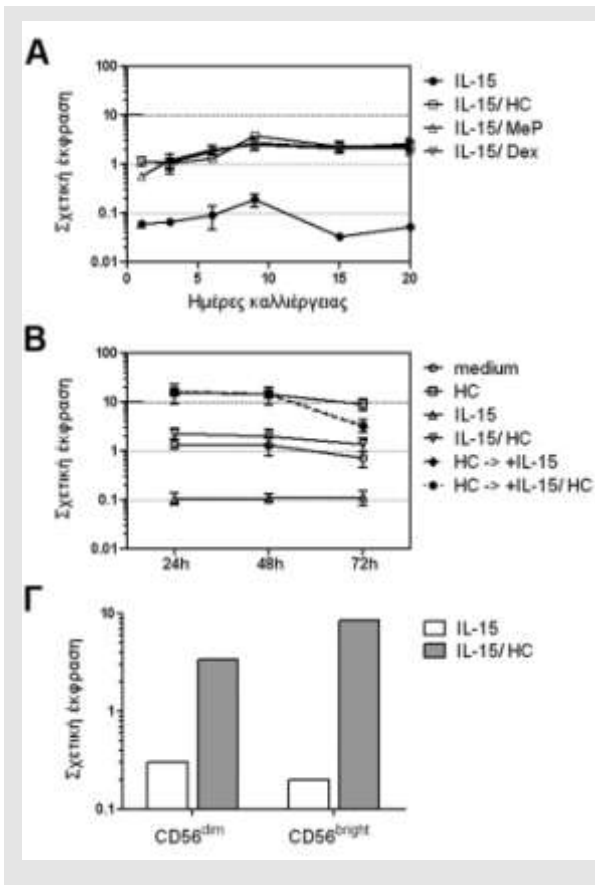
Απομονωμένα NK κύτταρα ενεργοποιήθηκαν *ex vivo* με IL-15, απουσία ή παρουσία HC, για 10, 30 και 60 λεπτά. Οι CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup> υποπληθυσμοί αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε φωσφορυλιωμένες μορφές των STAT5, ERK1/2, AKT και p65 (REL-A). Παρουσιάζονται δεδομένα από ένα αντιπροσωπευτικό δότη (από τους δυο που εξετάστηκαν).

#### 4.13 Αντίθετη Δράση της IL-15 και GC στη Ρύθμιση της Έκφρασης του Γονιδίου GILZ

Ένα από τα γονίδια-στόχους του υποδοχέα των GC είναι και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη GILZ (Glucocorticoid Induced Leucine Zipper protein). Η πρωτεΐνη GILZ έχει δειχθεί να μεσολαβεί τις ανοσο-κατασταλτικές και αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις των GC<sup>345-347</sup>. Από την άλλη, όμως, έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης GILZ προστατεύει επιλεκτικά τα T κύτταρα από την αντι-CD3 επαγόμενη απόπτωση<sup>306,348</sup>. Προκειμένου να εξετάσουμε το ενδεχόμενο

συμμετοχής του γονιδίου GILZ στην παρατηρούμενη διαφορική επίδραση των GC στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των NK κυττάρων ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησής των τελευταίων (Εικόνα 4-23, 4-24), μετρήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του GILZ mRNA.

Έτσι, σύμφωνα και με προηγούμενη δημοσίευση<sup>28</sup>, NK κύτταρα ενεργοποιημένα *ex vivo* παρουσία GC παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του GILZ mRNA (Εικόνα 4-31, A). Επιπρόσθετα, τα GC και η IL-15 έδειξαν να έχουν αντίθετη δράση στην έκφραση του GILZ mRNA (Εικόνα 4-31, B). Συγκεκριμένα, η HC προκάλεσε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του GILZ mRNA 10 φορές πάνω από τα επίπεδα αναφοράς (20% αMEM, medium), ενώ η IL-15 προκάλεσε μείωση κατά 10 φορές. Όμως, τα επίπεδα έκφρασης του GILZ mRNA σε NK κύτταρα, τα οποία εκτέθηκαν συγχρόνως και στα δυο σήματα (HC & IL-15), ήταν παρόμοια με τα επίπεδα αναφοράς, υποδηλώνοντας ότι τα δύο αυτά σήματα «ανταγωνίζονται» το ένα το άλλο στην ενεργοποίηση του γονιδίου GILZ.



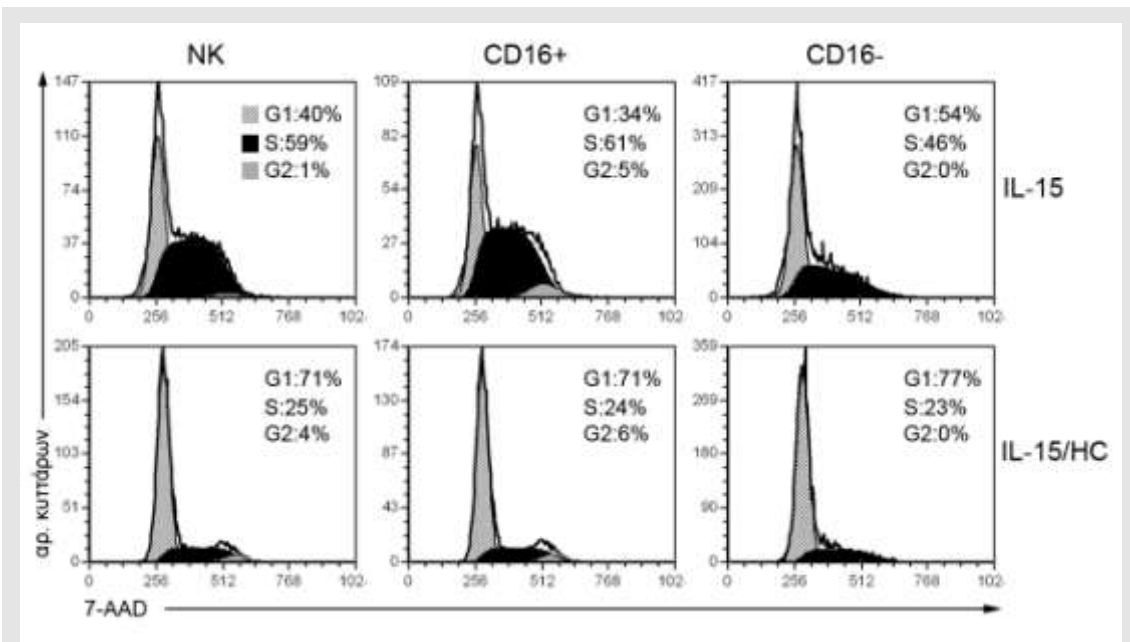
**Εικόνα 4-31 Αντίθετη Δράση της IL-15 και της HC στην Έκφραση του GILZ**

(A) Απομονωμένα NK κύτταρα ( $n=3$ ) καλλιεργήθηκαν για 20 μέρες με IL-15 απουσία ή παρουσία GC και αναλύθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης του GILZ με qPCR. (B) Επίπεδα έκφρασης του GILZ σε NK κύτταρα ( $n=3$ ) που καλλιεργήθηκαν κάτω από τις αναγραφόμενες συνθήκες. (C) Επίπεδα έκφρασης του GILZ σε απομονωμένους NK υποπληθυσμούς μετά από 3 μέρες καλλιέργειας. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί σε σχετικές τιμές βάσει της  $\Delta\Delta C_t$  μεθόδου.

Προηγουμένως, έχουμε δείξει ότι NK κύτταρα προ-εκτεθειμένα σε HC παρουσιάζουν μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού, όταν ενεργοποιούνται εκ των υστέρων με IL-15. Αυτή η GC-επαγόμενη ανέργεια δε φαίνεται να ρυθμίζεται από τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GILZ, διότι ο ρυθμός έκφρασής του επανέρχεται σύντομα στα επίπεδα αναφοράς μετά την προσθήκη της IL-15 (Εικόνα 4-31, Β). Επιπρόσθετα, το GILZ mRNA υπερ-εκφράζεται σε παρόμοια επίπεδα στους δυο κύριους υποπληθυσμούς των NK κυττάρων, όταν αυτά ενεργοποιούνται παρουσία GC (Εικόνα 4-31, Γ).

#### **4.14 Επίδραση των GC στον Κυτταρικό Κύκλο των Ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων – Προκαταρκτικά δεδομένα**

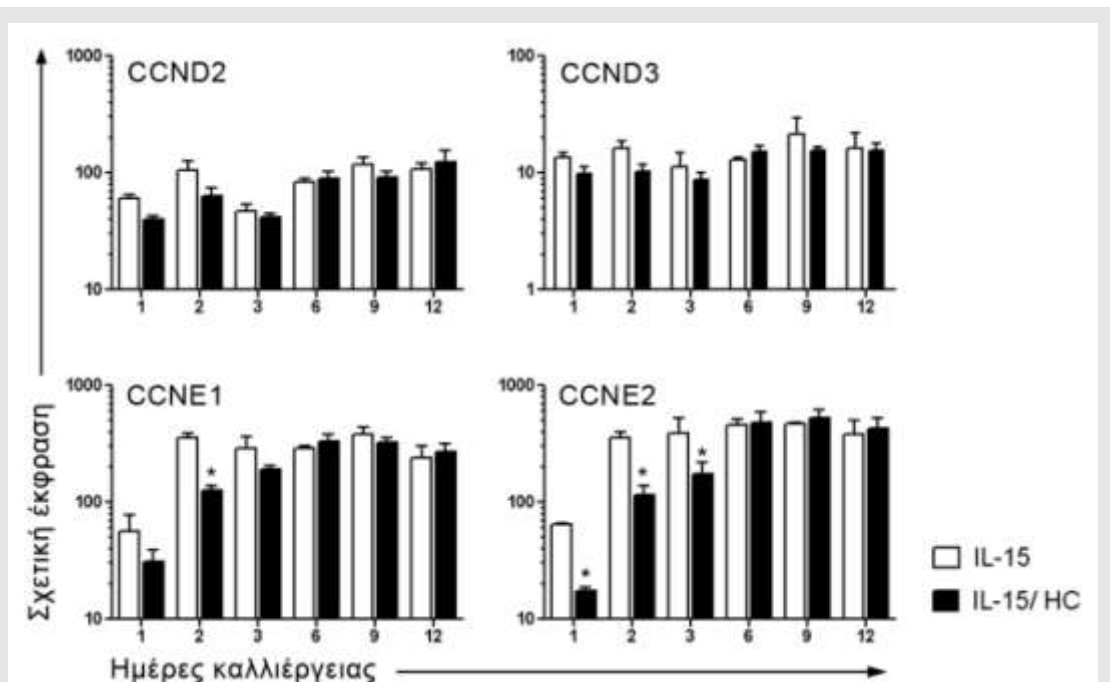
Με δεδομένο τη διαφορική δράση των GC στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των δυο κύριων υποπληθυσμών των NK κυττάρων, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης των GC στον κυτταρικό κύκλο αυτών των δυο υποπληθυσμών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-32, κατά την τρίτη μέρα επώασης με IL-15 το ποσοστό των κυττάρων το οποίο βρίσκεται στη φάση-S του κύκλου, τόσο στο σύνολο των NK κυττάρων όσο και στους δυο επιμέρους υποπληθυσμούς, είναι σχεδόν διπλάσιο των αντίστοιχων κυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί παρουσία HC. Η κατανομή αυτή των κυττάρων μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη εισροή των ενεργοποιημένων με IL-15/HC NK κυττάρων στη φάση-S ή/και σε παρατεταμένη παραμονή των ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων στη φάση-S. Ήδη γνωρίζουμε από προηγούμενα πειράματα (Εικόνα 4-15, Α) ότι κατά την 6<sup>η</sup> μέρα ένα σημαντικό ποσοστό των ενεργοποιημένων με IL-15/HC NK κυττάρων (CD16<sup>+</sup> ή CD16<sup>-</sup>) δεν έχει εκτελέσει καμία κυτταρική διαίρεση. Αντίθετα, τα αδιαίρετα κύτταρα αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό των NK κυττάρων ενεργοποιημένων απουσία HC. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με το παρατηρούμενο υψηλό ποσοστό των ενεργοποιημένων με IL-15/HC NK κυττάρων στη φάση-G1 του κυτταρικού κύκλου. Επιπρόσθετα, η αυξημένη συσσώρευση των NK κυττάρων στη φάση-G1 αντικατοπτρίζεται και στα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων των κυκλινών E (Εικόνα 4-33), οι οποίες απαιτούνται για τη μετάβαση από τη φάση-G1 στη φάση-S του κύκλου<sup>349</sup>.



**Εικόνα 4-32 Η HC αναστέλλει τη μαζική εισροή/συσσώρευση των ενεργοποιημένων NK κυττάρων στη φάση-S του κυτταρικού κύκλου**

NK κύτταρα, καλλιεργημένα για 3 μέρες με IL-15 απουσία ή παρουσία HC, αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε DNA, βάσει της στοιχειομετρικής δέσμευσης του 7-AAD με το κυτταρικό DNA. Η διάκριση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου έγινε με τη βοήθεια ειδικού αλγορίθμου (FCS Express 4).

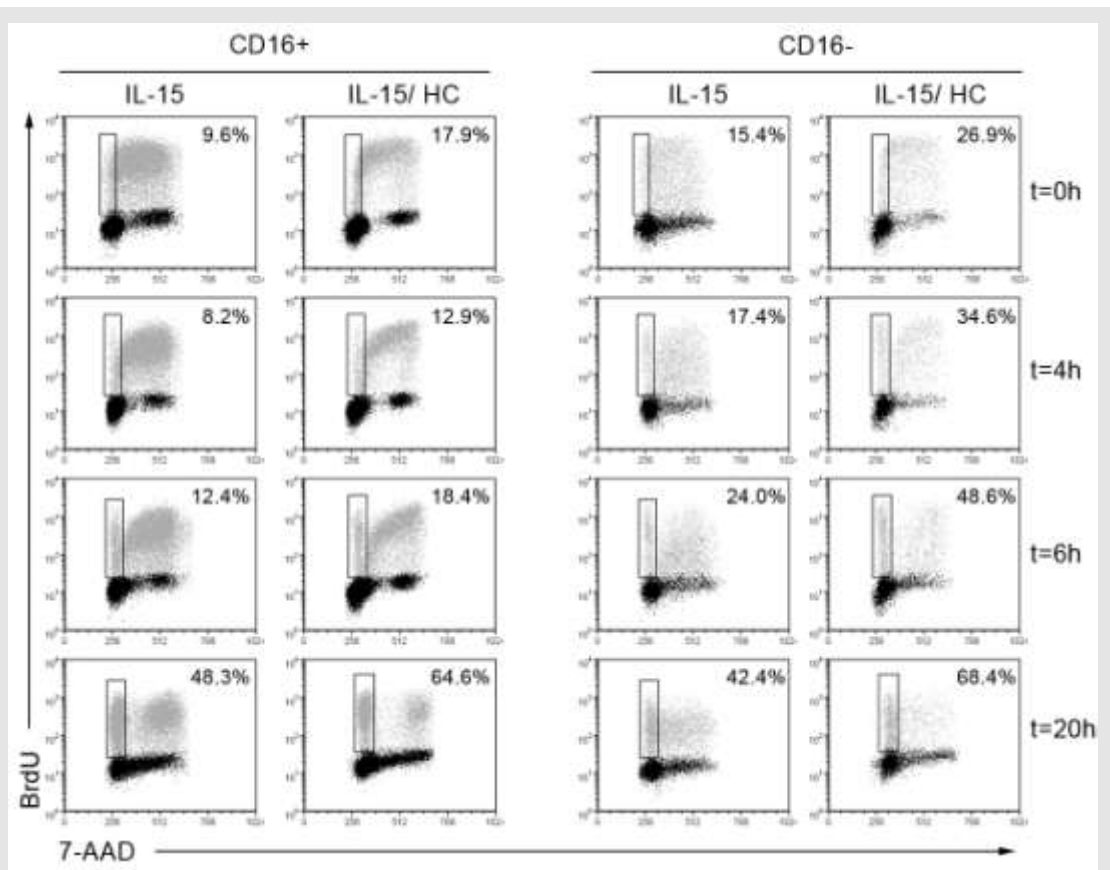




**Εικόνα 4-33 Μειωμένα Επίπεδα Έκφρασης Κυκλινών E παρουσία HC**

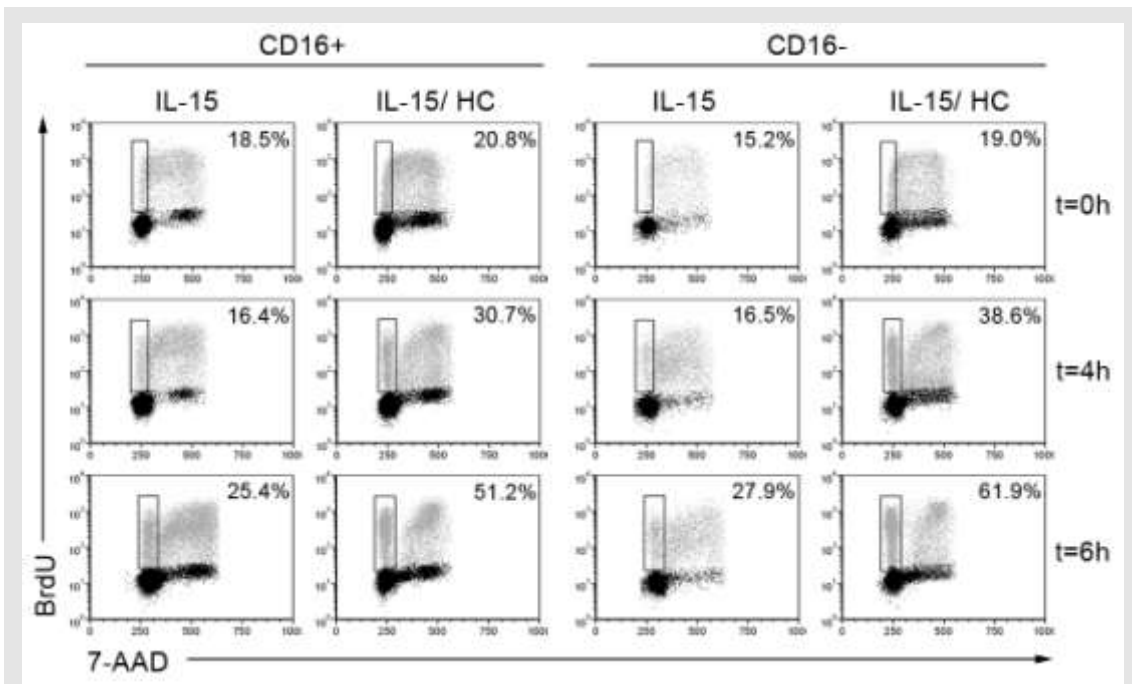
Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης μεταγράφων των κυκλινών D2, D3, E1 και E2 σε NK κύτταρα καλλιεργημένα *ex vivo* με IL-15 ή IL-15/Hc, στα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα, μετρήθηκαν με ποσοτική PCR. Παρουσιάζονται συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Προκειμένου να εξετάσουμε την κινητική των κυττάρων που διέρχονται από τη φάση-S του κυτταρικού κύκλου, παρακολούθησαμε την πορεία κυττάρων που βρίσκονται στη φάση-S μετά από σήμανσή τους με BrdU. Η ταχύτητα με την οποία τα κύτταρα διέρχονται από και ολοκληρώνουν τη φάση-S αντικατοπτρίζεται και στο ποσοστό των κυττάρων που συσσωρεύονται στη φάση-G1 μετά από ένα επιτυχημένο κύκλο μίτωσης. Ανάλυση αυτών των πειραμάτων έδειξε ότι η HC προκάλεσε σημαντική επιτάχυνση της φάσης-S του κυτταρικού κύκλου των NK, τόσο στο CD16<sup>+</sup> όσο και στο CD16<sup>-</sup> κλάσμα (Εικόνα 4-34, 4-35). Τα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα, ανεξάρτητα από τις συνθήκες καλλιέργειας, φαίνεται να ολοκληρώνουν τις κυτταρικές διαιρέσεις σε συντομότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με τα CD16<sup>+</sup> NK κύτταρα στις αντίστοιχες συνθήκες.



**Εικόνα 4-34 Η ΗC επιταχύνει την πρόοδο των ενεργοποιημένων NK κυττάρων από τη φάση-S του κυτταρικού κύκλου**

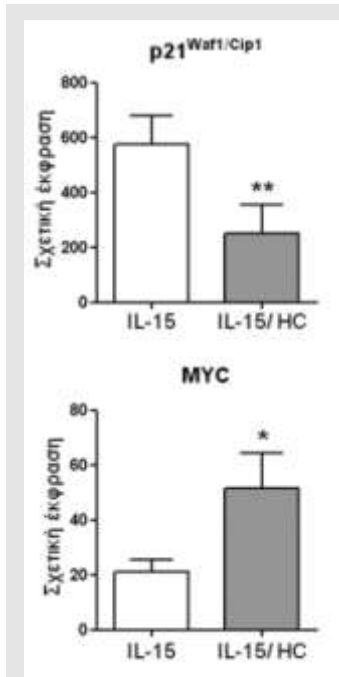
NK κύτταρα, ενεργοποιημένα για 3 μέρες με IL-15 παρουσία ή απουσία ΗC, επωάστηκαν για 2 ώρες με BrdU. Στο τέλος του παλμού, το BrdU απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα συνέχισαν να καλλιεργούνται υπό τις αρχικές συνθήκες. Στα αναγραφόμενα χρονικά σημεία (όπου t=0h αντιστοιχεί στο πέρας του παλμού με BrdU) ένα δείγμα των κυττάρων αναλύθηκε ως προς το ενσωματωμένο BrdU και το περιεχόμενο σε DNA. Τα ποσοστά σε κάθε στικτόγραμμα αντιστοιχούν στο ποσοστό των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων που βρίσκονται στη φάση-G1 (περίφραξη) του κυτταρικού κύκλου. (Σημείωση: το ποσοστό των G1 κυττάρων στο τέλος του παλμού με BrdU, t=0h, είναι υπερεκτιμημένο λόγω του μεγάλου ποσοστού των πρώιμων S κυττάρων που εμφανίζονται στην G1 περίφραξη.)



**Εικόνα 4-35 Η HC επιταχύνει την πρόοδο των ενεργοποιημένων NK κυττάρων από τη φάση-S του κυτταρικού κύκλου**

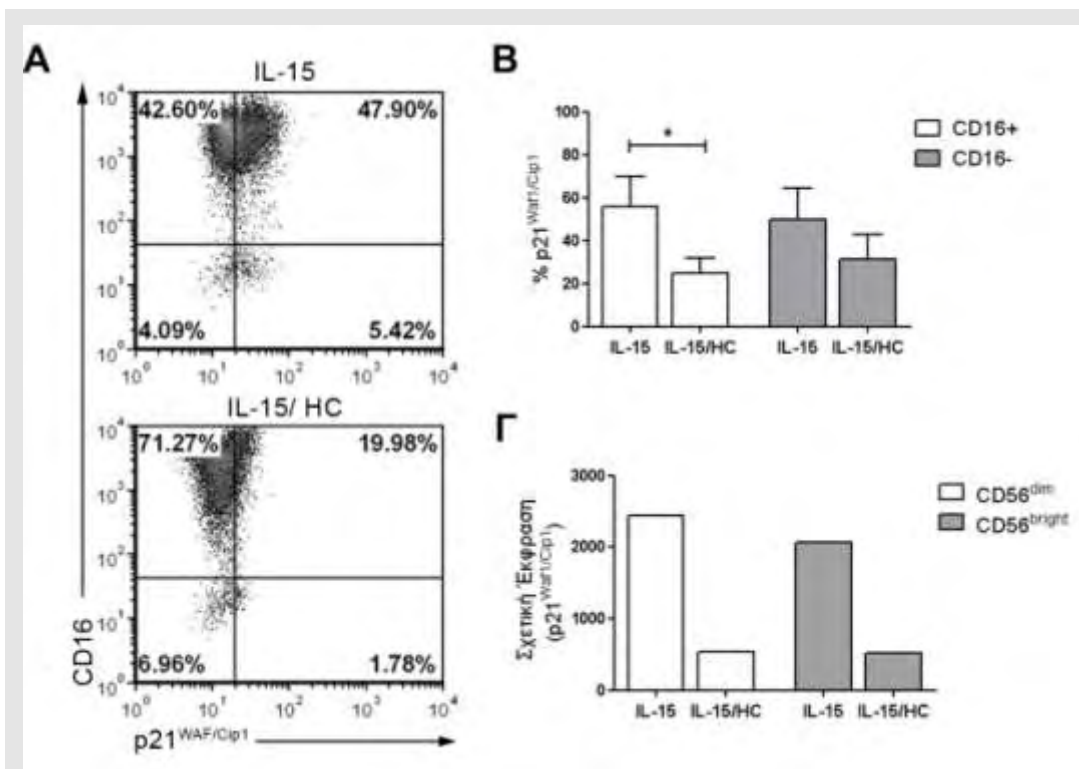
NK κύτταρα, ενεργοποιημένα για 9 μέρες με IL-15 παρουσία ή απουσία HC, αναλύθηκαν ως προς την ταχύτητα ολοκλήρωσης κυτταρικών διαιρέσεων όπως στην Εικόνα 4-34.

Ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών,  $p21^{Waf1/Cip1}$ , και ο μεταγραφικός παράγοντας, MYC, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, και η υπερέκφρασή τους έχει συσχετιστεί με επιβράδυνση<sup>350</sup> και επιτάχυνση<sup>351</sup> της φάσης-S, αντίστοιχα. Στο πειραματικό μας σύστημα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης μεταγράφων  $p21^{Waf1/Cip1}$  και αυξημένα επίπεδα έκφρασης μεταγράφων MYC σε NK κύτταρα ενεργοποιημένα παρουσία HC (Εικόνα 4-36). Το πρότυπο έκφρασης αυτών των δυο παραγόντων συμφωνεί με την παρατηρούμενη επιτάχυνση της φάσης-S του κυτταρικού κύκλου στα ενεργοποιημένα με IL-15 και HC NK κύτταρα (Εικόνα 4-34, 4-35). Μελέτη της έκφρασης αυτών των δυο γονιδίων στους δυο κύριους υποπληθυσμούς των NK κυττάρων έδειξε να έχουν παρόμοιο τρόπο ρύθμισης (Εικόνα 4-37, 4-38). Η έκταση αυτής της ρύθμισης στους επιμέρους υποπληθυσμούς, ωστόσο, χρειάζεται να μελετηθεί πιο λεπτομερώς.



**Εικόνα 4-36 Διαφορική έκφραση των γονιδίων  $p21^{Waf1/Cip1}$  και  $MYC$  στα ενεργοποιημένα παρούσα ΗC NK κύτταρα**

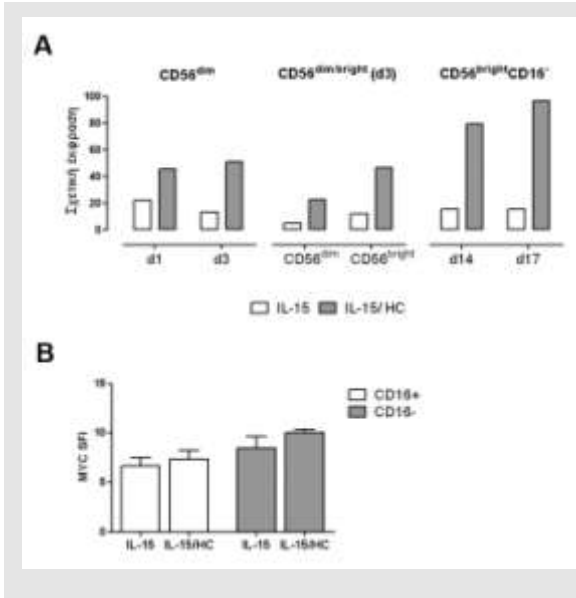
Τα επίπεδα έκφρασης του  $p21^{Waf1/Cip1}$  και  $MYC$  mRNA μετρήθηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε NK κύτταρα ( $n=4$ ) καλλιεργημένα για 3 μέρες με  $IL-15$ , απουσία ή παρουσία ΗC.



**Εικόνα 4-37 Η ΗC παρεμποδίζει την επαγόμενη από την  $IL-15$  υπερέκφραση του παράγοντα  $p21^{Waf1/Cip1}$**

NK κύτταρα, καλλιεργημένα για 3 μέρες με  $IL-15$  απουσία ή παρουσία ΗC, αναλύθηκαν ως προς την ενδοκυττάρια έκφραση της πρωτεΐνης  $p21^{Waf1/Cip1}$ . (A) Αντιπροσωπευτικά διπαραμετρικά στικτογράμματα από ένα δότη. (B)

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3 πειράματα. (Γ) Σχετική έκφραση του  $p21^{Waf1/Cip1}$  mRNA σε απομονωμένους NK υποπληθυσμούς από ένα δότη.



**Εικόνα 4-38 Έκφραση του γονιδίου MYC σε υποπληθυσμούς των NK**

(A) Επίπεδα έκφρασης του MYC mRNA σε απομονωμένους NK υποπληθυσμούς καλλιεργημένους υπό τις αναγραφόμενες συνθήκες. Παρουσιάζονται δεδομένα από 3 διαφορετικά πειράματα. (B) Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MYC σε CD16<sup>+</sup> και CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα (n=3), ενεργοποιημένα για 3 μέρες με IL-15, παρουσία ή απουσία HC.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Συζήτηση – Συμπεράσματα

### 5.1 Παρόμοια Ενισχυτική Δράση των GC στον Πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων

Στην παρούσα εργασία δείχνουμε ότι η MeP και η Dex έχουν παρόμοια δράση με την HC στα ενεργοποιημένα ανθρώπινα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος<sup>28</sup>. Συγκεκριμένα, NK κύτταρα καλλιεργημένα με IL-15 παρουσία GC έδειξαν να έχουν αυξημένο ρυθμό αύξησης σε σχέση με τα ίδια κύτταρα καλλιεργημένα μόνο με IL-15. Η ενεργοποίηση αυτή παρουσία GC δεν επέφερε καμία σημαντική επίπτωση στη λειτουργική δράση των NK κυττάρων, όπως αυτή αξιολογήθηκε βάσει της κυτταροτοξικής δραστηριότητας, της παραγωγής/έκκρισης κυτταροκινών και της έκφρασης ενεργοποιητικών υποδοχέων.

Λεπτομερέστερη ανάλυση της κινητικής αύξησης των καλλιεργειών των NK κυττάρων με IL-15/GC συγκριτικά με την IL-15 έδειξε ότι τα NK της πλειοψηφίας των δοτών αρχικά απάντησαν στη συνδυασμένη χορήγηση της IL-15 με GC με μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η παροδική αυτή αρχική (5-7 ημέρες) φάση ακολουθήθηκε από μια φάση ενισχυμένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η αρχική φάση αναστολής δεν οφειλόταν σε κυτταρικό θάνατο, διότι τα GC προστατεύουν τα NK κύτταρα από την επαγόμενη από την IL-15 απόπτωση. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με ήδη δημοσιευμένα δεδομένα από τους Chiosone *et al*<sup>31</sup> που υποστηρίζουν την κατασταλτική δράση της MeP σε συνδυασμό με την IL-15 στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την έκφραση ενεργοποιητικών υποδοχέων των NK κυττάρων καλλιεργημένα για χρονικά διαστήματα λίγων ημερών.

Η παροδική υστέρηση στην κυτταρική αύξηση κατά τις πρώτες μέρες καλλιέργειας των NK παρουσία IL-15/GC ήταν ενδεικτική της παρουσίας ενός αριθμητικά μικρού υποπληθυσμού των NK που ανταποκρίνεται στα συγκεκριμένα ερεθίσματα.

## 5.2 Η IL-15 και τα GC Ευνοούν τον Πολλαπλασιασμό των CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων

Ένας υποψήφιος πληθυσμός για την επιλεκτική δράση των GC θα μπορούσε να ήταν ο CD56<sup>bright</sup>, ο οποίος θεωρείται να είναι εξελικτικά πιο πρώιμος σε σύγκριση με τον CD56<sup>dim</sup> πληθυσμό, καθώς έχει βρεθεί ότι η διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων προς CD56<sup>bright</sup> NK κύτταρα να ευνοείται παρουσία GC<sup>25-27,352</sup>. Πράγματι, και στο δικό μας πειραματικό σύστημα ο πολλαπλασιασμός των CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων ενισχύθηκε σημαντικά έναντι των CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, παρουσία IL-15/HC.

Επιπρόσθετες φαινοτυπικές αναλύσεις έδειξαν ότι η επέκταση και των δυο υποπληθυσμών (CD16<sup>+</sup> & CD16<sup>-</sup>) παρουσία IL-15/HC συσχετίζεται ανεξάρτητα με αυξημένες συχνότητες NKG2A<sup>+</sup> κυττάρων, χαμηλότερες συχνότητες CD158a/b<sup>+</sup> (KIR2DL1/S1 και KIR2DL2/L3) και CD57<sup>+</sup> κυττάρων, και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD94, σε σχέση με τους αντίστοιχους υποπληθυσμούς ενεργοποιημένους με IL-15. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η σταδιακή διαφοροποίηση των NK από τα CD56<sup>bright</sup> προς ώριμα CD56<sup>dim</sup> συνοδεύεται από την απώλεια των δεικτών CD94 και NKG2A, και τη σύγχρονη απόκτηση των υποδοχέων KIR<sup>334,335</sup>. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι NK κύτταρα που εκφράζουν το δείκτη επιφανείας CD57 αντιπροσωπεύουν έναν άκρως διαφοροποιημένο πληθυσμό με πολύ περιορισμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό<sup>8</sup>. Άρα τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι τα GC ενισχύουν επιλεκτικά τον πολλαπλασιασμό ενός λιγότερο διαφοροποιημένου πληθυσμού που μπορεί να χαρακτηριστεί ως CD16<sup>-</sup>NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>low/-</sup>CD57<sup>-</sup>CD94<sup>high</sup>.

Οι δυο κύριοι υποπληθυσμοί των NK κυττάρων παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση υποδοχέων των χημειοκινών, γεγονός που καθορίζει και τη διαφορετική τους μεταναστευτική ικανότητα<sup>179</sup>. Το μόριο πρόσδεσης CD62L<sup>353,354</sup> εκφράζεται στην επιφάνεια της πλειοψηφίας των CD56<sup>bright</sup> κυττάρων και σε ένα ποσοστό των CD56<sup>dim</sup>. Κατόπιν ενεργοποίησης με IL-15, ανεξάρτητα από την παρουσία GC, η έκφραση του CD62L χάνεται και στους δυο υποπληθυσμούς. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για NK κύτταρα ενεργοποιημένα με IL-2<sup>353</sup>. Ο υποδοχέας CXCR1, ο οποίος εκφράζεται από μεγάλο ποσοστό των CD56<sup>bright</sup> NK κυττάρων, έχει βρεθεί να ρυθμίζεται αρνητικά από την IL-2 και IL-15<sup>209</sup>. Τα



αποτελέσματα μας συμφωνούν μ' αυτό, και επιπλέον έδειξαν ότι τα GC επιβραδύνουν τη διαδικασία της υπο-ρύθμισης.

Οι υποδοχείς CXCR3 και CXCR4 εκφράζονται σε χαμηλά ποσοστά στα ηρεμούντα NK κύτταρα<sup>209</sup>. Η ενεργοποίηση των τελευταίων με IL-2 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του CXCR3 και μειωμένη έκφραση του CXCR4, παρομοίως με τα δικά μας αποτελέσματα σε ενεργοποιημένα με IL-15 περιφερικά NK κύτταρα. Παρουσία των GC, όμως, παρατηρήθηκε επιπλέον αύξηση στην έκφραση του CXCR3 και ισχυρή επαγωγή έκφρασης του CXCR4. Η επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 από τη Dex έχει προηγουμένως αναφερθεί για τα T λεμφοκύτταρα<sup>355</sup>.

### 5.3 Τα GC Συμμετέχουν στη Διατήρηση της Ομοιόστασης των NK κυττάρων

Η ομοιόσταση των λεμφοκυττάρων βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής νέων κυττάρων από το μυελό των οστών και του πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των ήδη υπαρχόντων κυττάρων. Η διατήρηση της ομοιόστασης των NK κυττάρων της περιφέρειας επιτυγχάνεται κυρίως μέσω ρύθμισης της επιβίωσης<sup>164</sup>. Η IL-15, πιθανότατα μέσω trans-παρουσίασης από τον υποδοχέα IL-15Ra από πληθώρα κυτταρικών τύπων, αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα στην επιβίωση των NK<sup>338,339,356</sup>. Στην παρούσα εργασία δείχνουμε ότι τα GC συνεργάζονται με την IL-15, με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, για να προστατεύουν τα NK κύτταρα από την απόπτωση διατηρώντας παράλληλα τη λειτουργική τους ακεραιότητα.

Είναι γνωστό πως τα κυκλοφορούντα NK κύτταρα εκτίθενται συνεχώς σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις κορτιζόλης που κυμαίνονται μεταξύ  $10^{-7} - 10^{-6} \text{ M}^{33}$ . Σε εντασιογόνες καταστάσεις οι τιμές αυτές μπορούν να αυξηθούν πάνω από 10 φορές<sup>270</sup>. Η αύξηση της παραγωγής/έκκρισης των GC κατά το οξύ stress έχει αναφερθεί να ενισχύει την ανοσία μέσω μηχανισμών που πυροδοτούνται από τη συνέργεια ιντερλευκινών και GC<sup>357</sup>. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αναφορές ότι τα NK από ασθενείς, που λαμβάνουν φαρμακολογικές δόσεις GC, παρουσιάζουν μειωμένο λειτουργικό και πολλαπλασιαστικό δυναμικό<sup>32</sup>. Σύμφωνα με τα δικά μας δεδομένα, σε απουσία οποιουδήποτε σήματος ενεργοποίησης, τα GC – ακόμα και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις – μειώνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των NK κυττάρων *in vitro*. Ωστόσο, η σύγχρονη παρουσία μικρών

ποσοτήτων της IL-15, όχι μόνο προστατεύει τα κύτταρα από την GC-επαγόμενη απόπτωση αλλά επίσης εξασφαλίζει τη λειτουργική τους ακεραιότητα. Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι η συνέργεια μεταξύ αυτών των δύο σημάτων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίσει ο οργανισμός μια λειτουργική επάρκεια σε NK κύτταρα, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Όντως, *in vivo* τα NK κύτταρα, τα οποία εκτίθενται συνεχώς σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις GC, λαμβάνουν διεγερτικά σήματα από σύμπλοκα IL-15/IL-15Rα που εκφράζονται σε μια πληθώρα κυττάρων. Στην περίπτωση, όμως, της παρατεταμένης χορήγησης φαρμακολογικών δόσεων GC, τα διεγερτικά σήματα της IL-15 (ή/και άλλων κυτταροκινών) αδυνατούν να «αντισταθμίσουν» την ανοσοκατασταλτική δράση των GC, με δεδομένο τη χαμηλή συγκέντρωση της κυτταροκίνης στο σώμα<sup>10</sup>.

Επίσης τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η επαγόμενη από τα GC ανέργεια των NK κυττάρων δε ρυθμίζεται στο επίπεδο έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GILZ ή ενεργοποίησης των παραγόντων STAT5, ERK1/2 & AKT. Ωστόσο, παρότι τα επίπεδα έκφρασης ή ενεργοποίησης αυτών των παραγόντων επανέρχονται σύντομα στα επίπεδα αναφοράς κατόπιν διέγερσης των κυττάρων με IL-15, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα αυτά τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος να συμμετέχουν στη διαμόρφωση του μοριακού μηχανισμού που καθορίζει την ανέργεια των NK κυττάρων.

#### **5.4 Τα GC Προστατεύουν τα Ενεργοποιημένα NK κύτταρα από την Απόπτωση μέσω Ενισχυμένης Έκφρασης του BCL2 και Αναστολής Έκφρασης του BIM**

Η ομοίωση των NK κυττάρων επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της ρύθμισης της επιβίωσης<sup>164,338</sup>. Η IL-15 έχει αναδειχθεί να παίζει κυρίαρχο ρόλο στην προστασία των NK από την απόπτωση ρυθμίζοντας την έκφραση μελών της οικογένειας του αντι-αποπτωτικού παράγοντα BCL2<sup>161,339,340</sup>.

Τα δικά μας δεδομένα, σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία<sup>161</sup>, υποστηρίζουν την αναγκαιότητα της IL-15 στη διατήρηση υψηλών επιπέδων έκφρασης του αντι-αποπτωτικού παράγοντα BCL2. Ενδιαφέρουσα, ωστόσο, ήταν η παρατήρηση ότι τα GC ενίσχυσαν περαιτέρω την επαγόμενη από την IL-15 έκφραση του BCL2, δικαιολογώντας έτσι την παρατηρούμενη βελτιωμένη επιβίωση των NK κυττάρων παρουσία IL-15 και GC. Στην εργασία αυτή, επίσης, δείχνουμε ότι τα

CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην επαγόμενη από την IL-15 απόπτωση σε σχέση με τα CD16<sup>+</sup>. Η ευαισθησία αυτή πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης του BCL2 στα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα ήταν σημαντικά χαμηλότερα απ' ό τι στα CD16<sup>+</sup>.

Ο παράγοντας BCL-xL (B-cell leukemia XL) είναι ένας άλλος μεσολαβητής της αντι-αποπτωτικής δράσης της IL-15 στα NK κύτταρα<sup>341</sup>. Επίσης, έχει προταθεί ότι η μειωμένη έκφραση του BCL-xL ευθύνεται για την παρατηρούμενη αυξημένη απόπτωση των θυμοκυττάρων σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερ-εκφράζουν GILZ<sup>358</sup>. Στο δικό μας σύστημα, το πρότυπο έκφρασης του BCL-xL στα NK κύτταρα παρομοιάζει εκείνο του BCL2, υποδεικνύοντας και πάλι τη σημασία της IL-15 στην προαγωγή της έκφρασης αυτών των δυο γονιδίων. Η αυξημένη έκφραση του BCL-xL στα ενεργοποιημένα παρουσία GC NK κύτταρα δεν ήταν στατιστικά σημαντική, η βιολογική της σημασία όμως μένει να διερευνηθεί.

Ο προ-αποπτωτικός παράγοντας BIM έχει αναφερθεί να μεσολαβεί την επαγόμενη από τα GC απόπτωση<sup>359</sup>. Πράγματι, η έκθεση των NK κυττάρων σε HC οδήγησε σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου BIM. Από την άλλη μεριά, η IL-15 έχει δειχθεί να παρεμποδίζει τη συγκέντρωση του BIM σε ενεργοποιημένα ποντικίσια NK κύτταρα (προερχόμενα από τη σπλήνα), προστατεύοντάς τα από την απόπτωση<sup>340</sup>. Τα δικά μας αποτελέσματα, όμως, έδειξαν αυξημένη έκφραση του γονιδίου BIM σε ενεργοποιημένα με IL-15 ανθρώπινα περιφερικά NK κύτταρα σε σύγκρισή τόσο με τα ηρεμούντα NK όσο και με τα καλλιεργημένα σε θρεπτικό υλικό χωρίς IL-15. Το πρότυπο αυτό έκφρασης συμφωνεί απόλυτα με την παρατηρούμενη αυξημένη απόπτωση της πρώτης ομάδας. Όταν τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν παρουσία GC παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των μεταγράφων του γονιδίου BIM, καταδεικνύοντας τον παράγοντα BIM ως έναν από τους μεσολαβητές την προστατευτικής δράσης των GC στην επιβίωση των ενεργοποιημένων NK κυττάρων.

## **5.5 Τα GC Επιταχύνουν τη Φάση-S των Ενεργοποιημένων με IL-15 NK κυττάρων**

Στην παρούσα εργασία δείχνουμε ότι τα GC (+IL-15) ευνοούν τον πολλαπλασιασμό ενός μικρού υποπληθυσμού, τόσο στα CD16<sup>-</sup> όσο και στα CD16<sup>+</sup> NK κύτταρα, που φέρει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά λιγότερο διαφοροποιημένων κυττάρων. Το

φαινόμενο αυτό είναι περισσότερο εμφανές στα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα, τα οποία αποτελούν έναν πιο πρόδρομο πληθυσμό. Το διαφορετικό δυναμικό πολλαπλασιασμού αυτών των 2 υποπληθυσμών σε διάφορα μιτωτικά σήματα έχει επισημανθεί στη βιβλιογραφία<sup>6,360</sup>. Ανάλυση της κινητικής του κυτταρικού κύκλου έδειξε ότι τα διαιρούμενα NK κύτταρα παρουσία IL-15 και GC ολοκληρώνουν την αντιγραφή του DNA πολύ πιο γρήγορα απ' ό,τι τα αντίστοιχα κύτταρα παρουσία μόνο της IL-15.

Ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21<sup>WAF1/CIP1</sup> έχει βρεθεί, όχι μόνο να παρεμβαίνει στη μετάβαση G1-S, αλλά επίσης να μπλοκάρει άμεσα την αντιγραφή του DNA αναστέλλοντας το πυρηνικό αντιγόνο των διαιρούμενων κυττάρων, PCNA (Proliferating-cell Nuclear Antigen)<sup>361</sup> ή παρεμποδίζοντας τη δράση των CDK (Cyclin-Dependent Kinases)<sup>350</sup>. Στο δικό μας σύστημα, η δράση των GC στον κυτταρικό κύκλο συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του αναστολέα p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Συγκεκριμένα, τα GC ανέστειλαν την επαγόμενη από την IL-15<sup>362</sup> αυξημένη έκφραση του p21<sup>WAF1/CIP1</sup> και στους δυο υποπληθυσμούς των NK κυττάρων. Το εάν η στατιστικά μη σημαντική μείωση του p21<sup>WAF1/CIP1</sup> στα CD16<sup>-</sup> κύτταρα παρουσιάζει κάποια βιολογική σημασία μένει να διευκρινιστεί. Ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο της ύπαρξης ενός διαφορετικού μηχανισμού ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου σ' αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό.

Ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας επαγόμενος από  $\gamma_c$  κυτταροκίνες, ο οποίος αλληλεπιδρά άμεσα με την αντιγραφική μηχανή του κυττάρου, είναι και το προϊόν του πρωτο-ογκογονιδίου MYC<sup>363</sup>. Έχει αναφερθεί ότι η υπερ-έκφραση του MYC προκαλεί επιτάχυνση της φάσης-S του κυτταρικού κύκλου<sup>351</sup>. Προκαταρκτικά αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση αυτού του παράγοντα, έδειξαν αυξημένη έκφραση μεταγράφων MYC σε NK κύτταρα ενεργοποιημένα με IL-15/HC, τόσο στο σύνολό τους όσο και στους 2 επιμέρους υπο-πληθυσμούς. Μάλιστα, η υπερ-έκφραση αυτή φαίνεται να είναι πιο έντονη στα CD56<sup>bright</sup> NK κύτταρα. Μια πιο συστηματική και λεπτομερής μελέτη στο ρόλο του MYC στην ενεργοποίηση των NK θα αποκαλύψει αν ο παράγοντας αυτός συμμετέχει στη διαφορετική ρύθμιση των NK παρουσία GC.

Τα έως τώρα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι τα GC ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό ενός υποπληθυσμού τόσο στα CD16<sup>-</sup> όσο και στα CD16<sup>+</sup> ενεργοποιημένα NK κύτταρα. Η πρόοδος αυτών των πληθυσμών – προνομιούχων της

δράσης των GC – στον κυτταρικό κύκλο φαίνεται να ακολουθεί παρόμοια κινητική. Η αριθμητική επικράτηση των CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων στις καλλιέργειες με IL-15 και GC (σε αντίθεση με τη διατήρηση των CD16<sup>+</sup> NK κυττάρων στις καλλιέργειες με IL-15) πιθανότατα να οφείλεται και (α) στο γεγονός ότι τα CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην επαγόμενη από την IL-15 απόπτωση απ' ό,τι τα CD16<sup>+</sup>, και (β) τα CD16<sup>+</sup> NK κύτταρα φέρουν μικρότερα τελομερή απ' ό,τι τα CD16<sup>-</sup>, με αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός του πρώιμου CD16<sup>+</sup> κυτταρικού υποπληθυσμού παρουσία IL-15/GC να οδηγεί πιο γρήγορα σε κυτταρική γήρανση (cellular senescence)<sup>81,364</sup>.

## **5.6 Ανάπτυξη NK κυττάρων Ενεργοποιημένων *ex vivo* με IL-15 και HC στο Πλαίσιο της Παθητικής Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου**

Η *ex vivo* ανάπτυξη ανθρώπινων NK κυττάρων με IL-15 και GC επιτρέπει την ανάκτηση μεγάλων αριθμών ενεργοποιημένων NK κυττάρων. Το γεγονός αυτό καθιστά το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ιδιαίτερα χρήσιμο στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου μέσω παθητικής μεταφοράς κυττάρων. NK κύτταρα καλλιεργημένα με IL-15 και HC υπό GMP συνθήκες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε μια κλινική μελέτη φάσης I σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα<sup>29</sup>. Δεδομένα από προκλινικές μελέτες σε ένα ποντικίσιο μεταστατικό μοντέλο καρκίνου έχουν δείξει ότι η χορήγηση *ex vivo* ενεργοποιημένων με IL-15/HC NK κυττάρων προκάλεσε σημαντική μείωση του καρκινικού φορτίου ενώ συγχρόνως πυροδότησε και επίκτητες αντι-καρκινικές ανοσολογικές απαντήσεις<sup>30</sup>.

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 2.2.8, είναι σημαντικό η ανάπτυξη των NK κυττάρων *ex vivo* να μην οδηγεί σε φαινοτυπικές αλλαγές, αποκλίσεις από την αναπτυξιακή γραμμή ή/και επιλεκτική επέκταση ορισμένων υποπληθυσμών, τέτοιες που να επηρεάζουν την αντι-καρκινική δράση των NK.

Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι τα GC ευνοούν την ανάπτυξη των CD16<sup>-</sup> NK κυττάρων. Ο υποδοχέας CD16 είναι ένας σημαντικός διαμεσολαβητής της εξαρτώμενης από αντισώμα κυτταροτοξικότητας (ADCC, Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) η οποία αποτελεί το βασικό μηχανισμό καταστροφής καρκινικών κυττάρων στις βασιζόμενες στα αντισώματα αντι-καρκινικές ανοσοθεραπείες. Προς αυτήν την κατεύθυνση θα ήταν χρήσιμο να αναπτυχθεί ένα πρωτόκολλο καλλιέργειας NK κυττάρων εμπλουτισμένων σε CD16<sup>+</sup> κύτταρα. Η

αξιοποίηση λεμφοβλαστικών κυτταρικών σειρών LCL (Lymphoblastoid Cell Line) ως κύτταρα στρώματος ενδεχομένως να φέρει επιθυμητά αποτελέσματα<sup>365</sup>.

Η αποτελεσματικότητα της παθητικής μεταφοράς κυττάρων ως μέσο αντικαρκινικής ανοσοθεραπείας εξαρτάται και από την ικανότητα των χορηγούμενων κυττάρων να μεταναστεύσουν προς και να διατηρηθούν στις εστίες των όγκων. Συνεπώς, είναι σημαντικό τα καλλιεργημένα *ex vivo* NK κύτταρα να φέρουν κατάλληλους υποδοχείς επικοινωνίας. Η έκφραση του υποδοχέα CXCR3 από τα NK θεωρείται απαραίτητο προσόν για τη διείσδυσή τους στους όγκους<sup>201</sup>. Επιπρόσθετα, ορισμένες αιμοποιητικές και μη κακοήθειες «κατοικούν» ή μεταναστεύουν σε θέσεις όπου παράγεται η χημειοκίνη CXCL12, κυρίως στο μυελό των οστών<sup>366,367</sup>. Άρα, η αυξημένη έκφραση των δυο αυτών υποδοχέων, CXCR3 και CXCR4, από τα NK κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί με IL-15 και GC, τα καθιστά ικανά να μεταναστεύσουν στις εστίες των πρωτογενών ή δευτερογενών όγκων.

## 5.7 Γενικά Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μας οδηγούν στα παρακάτω γενικά συμπεράσματα:

Ο ρόλος των GC στο ανοσολογικό σύστημα είναι διττός και εξαρτάται από την ταυτόχρονη ύπαρξη άλλων παραγόντων, όπως σημάτων διέγερσης ή/και πολλαπλασιασμού, σταδίου διαφοροποίησης, σηματοδότησης άλλων μοριακών μονοπατιών κλπ. Τόσο τα δικά μας δεδομένα, όσο και δεδομένα που αφορούν στα T λεμφοκύτταρα ως προς τα GC, αλλά και πολλά άλλα παραδείγματα πλειοτροπικής βιολογικής δράσης πληθώρας ουσιών, υποστηρίζουν σαφώς τα συμπεράσματά μας.

Τα GC φαίνεται να έχουν ένα σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στην διαφοροποίηση των NK κυττάρων (όπως έχει δειχθεί προηγούμενα), αλλά και στην ομοιόστασή τους στην περιφέρεια και πιθανά σε άλλους ιστούς. Περαιτέρω πειράματα *in vivo* χρειάζονται για την τεκμηρίωση της υπόθεσής μας αυτής.

Τα ευρήματά μας μπορούν να αξιοποιηθούν στην ανάπτυξη ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων, τόσο για την *in vivo* ενίσχυση της ανάπτυξης των ενδογενών NK κυττάρων (ή την προστασία τους στις περιπτώσεις θεραπευτικής

χρήσης των GC), όσο και στην παθητική μεταφορά *ex vivo* ενεργοποιημένων και ανεπτυγμένων NK κυττάρων.

Με δεδομένο ότι τα GC είναι ενεργά συστατικά του οργανισμού με σημαντική διακύμανση ανάλογα με την ώρα, διάθεση, επίπεδο stress κλπ, η πιο συστηματική μελέτη της επίδρασής τους, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, σε άλλους πληθυσμούς του ανοσολογικού συστήματος ανοίγει ένα σημαντικό κεφάλαιο έρευνας.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Βιβλιογραφία

1. Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:176-186.
2. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006;20:123-137.
3. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9:503-510.
4. Sun JC, Lopez-Verges S, Kim CC, Derisi JL, Lanier LL. NK cells and immune "memory". *J Immunol.* 2011;186:1891-1897.
5. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001;97:3146-3151.
6. Chan A, Hong DL, Atzberger A, et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol.* 2007;179:89-94.
7. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010;116:3853-3864.
8. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood.* 2010;116:3865-3874.
9. Arai S, Klingemann HG. Natural killer cells: can they be useful as adoptive immunotherapy for cancer? *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5:163-172.
10. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 2005;105:3051-3057.
11. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function\*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:309-345.
12. Rook GA. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1999;13:567-581.
13. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol.* 1984;132:38-42.
14. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:60-72.
15. Perandones CE, Illera VA, Peckham D, Stunz LL, Ashman RF. Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen T cells. *J Immunol.* 1993;151:3521-3529.
16. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol.* 1996;60:563-572.
17. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9991-9995.
18. Bischof F, Melms A. Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes. *Cell Immunol.* 1998;187:38-44.

19. Baus E, Andris F, Dubois PM, Urbain J, Leo O. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. *J Immunol.* 1996;156:4555-4561.
20. Zacharchuk CM, Mercep M, Chakraborti PK, Simons SS, Jr., Ashwell JD. Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol.* 1990;145:4037-4045.
21. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, et al. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol.* 2002;168:2212-2218.
22. Wieggers GJ, Labeur MS, Stec IE, Klinkert WE, Holsboer F, Reul JM. Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth. *J Immunol.* 1995;155:1893-1902.
23. Hinrichs CS, Palmer DC, Rosenberg SA, Restifo NP. Glucocorticoids do not inhibit antitumor activity of activated CD8+ T cells. *J Immunother.* 2005;28:517-524.
24. Naito M, Itoh K, Komatsu N, et al. Dexamethasone did not suppress immune boosting by personalized peptide vaccination for advanced prostate cancer patients. *Prostate.* 2008;68:1753-1762.
25. Perez SA, Mahaira LG, Sotiropoulou PA, et al. Effect of IL-21 on NK cells derived from different umbilical cord blood populations. *Int Immunol.* 2006;18:49-58.
26. Perez SA, Sotiropoulou PA, Gkika DG, et al. A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood.* 2003;101:3444-3450.
27. Vitale C, Cottalasso F, Montaldo E, Moretta L, Mingari MC. Methylprednisolone induces preferential and rapid differentiation of CD34+ cord blood precursors toward NK cells. *Int Immunol.* 2008;20:565-575.
28. Perez SA, Mahaira LG, Demirtzoglou FJ, et al. A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival. *Blood.* 2005;106:158-166.
29. Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, et al. A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1781-1789.
30. Salagianni M, Lekka E, Moustaki A, et al. NK Cell Adoptive Transfer Combined with Ontak-Mediated Regulatory T Cell Elimination Induces Effective Adaptive Antitumor Immune Responses. *J Immunol.* 2011;186:3327-3335.
31. Chiossone L, Vitale C, Cottalasso F, et al. Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. *Blood.* 2007;109:3767-3775.
32. Vitale C, Chiossone L, Cantoni C, et al. The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects down-regulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2004;34:3028-3038.
33. Jacobs D. S. FPR, Horvat R. T., Kasten B. L., Tilzer L. L. *Laboratory Test Handbook with Key Word Index.* Hudson, OH: Lexi-Comp INC; 1994.
34. Huntington ND, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:703-714.
35. Biassoni R. Natural killer cell receptors. *Adv Exp Med Biol.* 2008;640:35-52.
36. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol.* 2006;118:1-10.
37. Stein-Streilein J. Allergic contact dermatitis induced by intratracheal administration of hapten. *J Immunol.* 1983;131:1748-1753.
38. Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med.* 1981;153:569-582.
39. Hokland M, Kuppen PJ. Natural killer cells: from "disturbing" background to central players of immune responses. *Mol Immunol.* 2005;42:381-383.

40. Dorner BG, Smith HR, French AR, et al. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2004;172:3119-3131.
41. Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood.* 2002;99:1273-1281.
42. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2002;71:173-183.
43. Blanca IR, Bere EW, Young HA, Ortaldo JR. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. *J Immunol.* 2001;167:6132-6139.
44. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol.* 2004;173:3716-3724.
45. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:520-531.
46. Blum KS, Pabst R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett.* 2007;108:45-51.
47. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:405-429.
48. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995;3:459-473.
49. Miller JS, Alley KA, McGlave P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood.* 1994;83:2594-2601.
50. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112:461-469.
51. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev.* 2006;214:56-72.
52. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003;3:413-425.
53. Srour EF, Brandt JE, Briddell RA, Leemhuis T, van Besien K, Hoffman R. Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells.* 1991;17:287-295.
54. Roth C, Rothlin C, Riou S, Raulet DH, Lemke G. Stromal-cell regulation of natural killer cell differentiation. *J Mol Med (Berl).* 2007;85:1047-1056.
55. Jaleco AC, Blom B, Res P, et al. Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34+ cells into T cells. *J Immunol.* 1997;159:694-702.
56. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1996;87:2632-2640.
57. Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med.* 1994;180:569-576.
58. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood.* 2001;97:14-32.
59. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 1998;91:1101-1134.
60. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, et al. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity.* 2005;22:295-304.

61. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101:3052-3057.
62. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22:633-640.
63. Voss SD, Daley J, Ritz J, Robertson MJ. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J Immunol*. 1998;160:1618-1626.
64. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2006;203:1033-1043.
65. Vicente P.C. Peixoto de Toledo RS-A, Danielle Marquete, Vitelli-Avelar VP-Me, Denise Silveira-Lemos, Ana, Carolina Campi-Azevedo MiCA, André'a Teixeira-, Carvalho aOAM-F. *Natural Killer Cells - At the Forefront of Modern Immunology*: Springer; 2010.
66. Loza MJ, Perussia B. Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation? *Nat Immunol*. 2001;2:917-924.
67. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*. 1998;188:2375-2380.
68. Whiteside TL, Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1:125-133.
69. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
70. Andre P, Spertini O, Guia S, et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3400-3405.
71. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990;171:1509-1526.
72. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, et al. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol*. 2001;166:6477-6482.
73. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol*. 1998;161:400-408.
74. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*. 2001;31:3121-3127.
75. Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, William DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J Exp Med*. 1993;178:1079-1084.
76. Nagler A, Lanier LL, Phillips JH. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med*. 1990;171:1527-1533.
77. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*. 1989;143:3183-3191.
78. Chklovskaja E, Nowbakht P, Nissen C, Gratwohl A, Bargetzi M, Wodnar-Filipowicz A. Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood*. 2004;103:3860-3868.
79. Gottschalk LR, Bray RA, Kaizer H, Gebel HM. Two populations of CD56 (Leu-19)+/CD16+ cells in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1990;5:259-264.

80. Jacobs R, Stoll M, Stratmann G, Leo R, Link H, Schmidt RE. CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood*. 1992;79:3239-3244.
81. Romagnani C, Juelke K, Falco M, et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol*. 2007;178:4947-4955.
82. Yu MC, Su LL, Zou L, et al. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9:898-907.
83. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:619-648.
84. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-274.
85. Colonna M, Navarro F, Bellon T, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med*. 1997;186:1809-1818.
86. Colonna M, Nakajima H, Cella M. Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *J Leukoc Biol*. 1999;66:718-722.
87. Carretero M, Palmieri G, Llano M, et al. Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol*. 1998;28:1280-1291.
88. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391:795-799.
89. Markel G, Lieberman N, Katz G, et al. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol*. 2002;168:2803-2810.
90. Markel G, Wolf D, Hanna J, et al. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J Clin Invest*. 2002;110:943-953.
91. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006;203:289-295.
92. Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol*. 1994;153:2417-2428.
93. Rosen DB, Cao W, Avery DT, et al. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol*. 2008;180:6508-6517.
94. Cantoni C, Bottino C, Augugliaro R, et al. Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *Eur J Immunol*. 1999;29:3148-3159.
95. Meyaard L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol*. 2008;83:799-803.
96. Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol*. 2001;22:337-342.
97. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:308-314.
98. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006;107:159-166.
99. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:737-744.
100. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4120-4125.

101. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285:727-729.
102. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6879-6884.
103. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005;436:1186-1190.
104. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2:255-260.
105. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1999;190:1505-1516.
106. Pessino A, Sivori S, Bottino C, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*. 1998;188:953-960.
107. Sivori S, Vitale M, Morelli L, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*. 1997;186:1129-1136.
108. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*. 2002;195:343-351.
109. Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*. 2006;7:1334-1342.
110. Vivier E, Morin P, O'Brien C, Druker B, Schlossman SF, Anderson P. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol*. 1991;146:206-210.
111. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13224-13229.
112. Sivori S, Parolini S, Falco M, et al. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol*. 2000;30:787-793.
113. Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 2003;198:557-567.
114. Pende D, Castriconi R, Romagnani P, et al. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood*. 2006;107:2030-2036.
115. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:189-220.
116. Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:279-291.
117. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101.
118. Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol*. 1998;18:275-303.
119. Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today*. 1992;13:379-381.
120. Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol*. 1992;4:563-569.

121. Wang KS, Frank DA, Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*. 2000;95:3183-3190.
122. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130:65-74.
123. Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10116-10121.
124. Marcenaro E, Ferranti B, Falco M, Moretta L, Moretta A. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol*. 2008;20:1155-1167.
125. Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H. Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity*. 2007;26:593-604.
126. Spielman J, Lee RK, Podack ER. Perforin/Fas-ligand double deficiency is associated with macrophage expansion and severe pancreatitis. *J Immunol*. 1998;161:7063-7070.
127. Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 1985;3:31-58.
128. McCann FE, Vanherberghen B, Eleme K, et al. The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses. *J Immunol*. 2003;170:2862-2870.
129. Keefe D, Shi L, Feske S, et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*. 2005;23:249-262.
130. Podack ER. How to induce involuntary suicide: the need for dipeptidyl peptidase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8312-8314.
131. Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol*. 2001;167:2068-2073.
132. Khar A, Varalakshmi C, Pardhasaradhi BV, Mubarak Ali A, Kumari AL. Depletion of the natural killer cell population in the peritoneum by AK-5 tumor cells overexpressing fas-ligand: a mechanism of immune evasion. *Cell Immunol*. 1998;189:85-91.
133. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, et al. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol*. 1998;160:5669-5675.
134. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42:501-510.
135. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity*. 2001;14:661-664.
136. Ferlazzo G, Munz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol*. 2004;172:1333-1339.
137. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol*. 2002;169:4279-4287.
138. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:16606-16611.
139. Munz C, Dao T, Ferlazzo G, de Cos MA, Goodman K, Young JW. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood*. 2005;105:266-273.
140. Tara J, Loux MTL, Herbert J, Zeh III. *Natural Killer Cells: Basic Science and Clinical Application*: Elsevier; 2010.

141. Bose A, Baral R. Natural killer cell mediated cytotoxicity of tumor cells initiated by neem leaf preparation is associated with CD40-CD40L-mediated endogenous production of interleukin-12. *Hum Immunol.* 2007;68:823-831.
142. Barr DP, Belz GT, Reading PC, et al. A role for plasmacytoid dendritic cells in the rapid IL-18-dependent activation of NK cells following HSV-1 infection. *Eur J Immunol.* 2007;37:1334-1342.
143. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med.* 1994;180:1395-1403.
144. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3725-3729.
145. Sporri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol.* 2008;181:7121-7130.
146. Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Seehra J, London L, Perussia B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med.* 1984;160:1147-1169.
147. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1995;25:3053-3059.
148. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity.* 1995;3:521-530.
149. Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med.* 1997;185:499-505.
150. Gilmour KC, Fujii H, Cranston T, Davies EG, Kinnon C, Gaspar HB. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood.* 2001;98:877-879.
151. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell.* 1993;73:147-157.
152. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:377-381.
153. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 1996;156:4746-4756.
154. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- $\gamma$  production. *J Immunol.* 1998;161:3400-3407.
155. Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol.* 1993;151:2511-2520.
156. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol.* 2008;69:490-500.
157. Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol.* 1998;161:5821-5824.
158. Schwartz Y, Avraham R, Benish M, Rosenne E, Ben-Eliyahu S. Prophylactic IL-12 treatment reduces postoperative metastasis: mediation by increased numbers but not cytotoxicity of NK cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107:211-223.



159. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:771-780.
160. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol.* 2004;172:864-870.
161. Ranson T, Vosshenrich CA, Corcuff E, Richard O, Muller W, Di Santo JP. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood.* 2003;101:4887-4893.
162. Gosselin J, Tomolu A, Gallo RC, Flamand L. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood.* 1999;94:4210-4219.
163. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:19-49.
164. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 $\alpha$  and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8 $^{+}$  T cell homeostasis. *J Exp Med.* 2004;200:825-834.
165. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC. In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J Exp Med.* 2003;197:967-976.
166. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity.* 1998;8:383-390.
167. Tsutsui H, Nakanishi K, Matsui K, et al. IFN- $\gamma$ -inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol.* 1996;157:3967-3973.
168. Mailliard RB, Alber SM, Shen H, et al. IL-18-induced CD83 $^{+}$ CCR7 $^{+}$  NK helper cells. *J Exp Med.* 2005;202:941-953.
169. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood.* 2005;106:609-616.
170. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature.* 2000;408:57-63.
171. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology.* 2007;122:486-495.
172. Strbo N, de Armas L, Liu H, Kolber MA, Lichtenheld M, Pahwa S. IL-21 augments natural killer effector functions in chronically HIV-infected individuals. *Aids.* 2008;22:1551-1560.
173. Roda JM, Parihar R, Lehman A, Mani A, Tridandapani S, Carson WE, 3rd. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. *J Immunol.* 2006;177:120-129.
174. Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology.* 2008;123:575-583.
175. Eriksen KW, Sondergaard H, Woetmann A, et al. The combination of IL-21 and IFN- $\alpha$  boosts STAT3 activation, cytotoxicity and experimental tumor therapy. *Mol Immunol.* 2009;46:812-820.
176. Liu L, Wang S, Shan B, et al. IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumour effects for human oesophageal carcinoma cells. *Scand J Immunol.* 2008;68:22-29.
177. Chiyo M, Shimozato O, Yu L, et al. Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated host animals. *Int J Cancer.* 2005;115:437-442.
178. Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol.* 2000;1:70-76.

179. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol.* 2006;177:7833-7840.
180. Inngjerdigen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood.* 2001;97:367-375.
181. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 1999;286:2098-2102.
182. Polentarutti N, Allavena P, Bianchi G, et al. IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences. *J Immunol.* 1997;158:2689-2694.
183. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* 1994;24:3233-3236.
184. Nokihara H, Yanagawa H, Nishioka Y, et al. Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 2000;60:7002-7007.
185. Morrison BE, Park SJ, Mooney JM, Mehrad B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest.* 2003;112:1862-1870.
186. Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol.* 2005;174:1549-1556.
187. Lavergne E, Combadiere C, Iga M, et al. Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. *J Immunol.* 2004;173:3755-3762.
188. Thapa M, Kuziel WA, Carr DJ. Susceptibility of CCR5-deficient mice to genital herpes simplex virus type 2 is linked to NK cell mobilization. *J Virol.* 2007;81:3704-3713.
189. Ajuebor MN, Wondimu Z, Hogaboam CM, Le T, Proudfoot AE, Swain MG. CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis. *Am J Pathol.* 2007;170:1975-1988.
190. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med.* 2002;195:517-528.
191. Zeng X, Moore TA, Newstead MW, Hernandez-Alcoceba R, Tsai WC, Standiford TJ. Intrapulmonary expression of macrophage inflammatory protein 1alpha (CCL3) induces neutrophil and NK cell accumulation and stimulates innate immunity in murine bacterial pneumonia. *Infect Immun.* 2003;71:1306-1315.
192. Cittera E, Leidi M, Buracchi C, et al. The CCL3 family of chemokines and innate immunity cooperate in vivo in the eradication of an established lymphoma xenograft by rituximab. *J Immunol.* 2007;178:6616-6623.
193. Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, et al. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem.* 1998;273:18288-18291.
194. Bekiaris V, Timoshenko O, Hou TZ, et al. Ly49H+ NK cells migrate to and protect splenic white pulp stroma from murine cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2008;180:6768-6776.
195. Gregoire C, Cognet C, Chasson L, et al. Intrasplenic trafficking of natural killer cells is redirected by chemokines upon inflammation. *Eur J Immunol.* 2008;38:2076-2084.
196. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol.* 2004;5:1260-1265.

197. Vester B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun*. 1999;67:3155-3159.
198. Lande R, Giacomini E, Grassi T, et al. IFN-alpha beta released by *Mycobacterium tuberculosis*-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol*. 2003;170:1174-1182.
199. Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol*. 2004;75:504-514.
200. Thapa M, Welner RS, Pelayo R, Carr DJ. CXCL9 and CXCL10 expression are critical for control of genital herpes simplex virus type 2 infection through mobilization of HSV-specific CTL and NK cells to the nervous system. *J Immunol*. 2008;180:1098-1106.
201. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res*. 2008;68:8437-8445.
202. Saudemont A, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood*. 2005;105:2428-2435.
203. Jiang D, Liang J, Hodge J, et al. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest*. 2004;114:291-299.
204. Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pita O, Girolomoni G, Cavani A. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol*. 2006;36:118-128.
205. Sentman CL, Meadows SK, Wira CR, Eriksson M. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol*. 2004;173:6760-6766.
206. Burke SM, Issekutz TB, Mohan K, Lee PW, Shmulevitz M, Marshall JS. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood*. 2008;111:5467-5476.
207. Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, et al. The chemokine CXCL14 (BRAX) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol*. 2006;34:1101-1105.
208. Bernardini G, Sciume G, Bosisio D, Morrone S, Sozzani S, Santoni A. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood*. 2008;111:3626-3634.
209. Beider K, Nagler A, Wald O, et al. Involvement of CXCR4 and IL-2 in the homing and retention of human NK and NK T cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID mice. *Blood*. 2003;102:1951-1958.
210. Franitza S, Grabovsky V, Wald O, et al. Differential usage of VLA-4 and CXCR4 by CD3+CD56+ NKT cells and CD56+CD16+ NK cells regulates their interaction with endothelial cells. *Eur J Immunol*. 2004;34:1333-1341.
211. Gregoire C, Chasson L, Luci C, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2007;220:169-182.
212. Mizrahi S, Yefenof E, Gross M, et al. A phenotypic and functional characterization of NK cells in adenoids. *J Leukoc Biol*. 2007;82:1095-1105.
213. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385:640-644.
214. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997;91:521-530.
215. Lavergne E, Combadiere B, Bonduelle O, et al. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res*. 2003;63:7468-7474.

216. Guo J, Chen T, Wang B, et al. Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1. *Immunol Lett.* 2003;89:1-7.
217. Giroux M, Yurchenko E, St-Pierre J, Piccirillo CA, Perreault C. T regulatory cells control numbers of NK cells and CD8alpha+ immature dendritic cells in the lymph node paracortex. *J Immunol.* 2007;179:4492-4502.
218. Pallandre JR, Krzewski K, Bedel R, et al. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood.* 2008;112:4420-4424.
219. Sechler JM, Barlic J, Grivel JC, Murphy PM. IL-15 alters expression and function of the chemokine receptor CX3CR1 in human NK cells. *Cell Immunol.* 2004;230:99-108.
220. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:329-339.
221. Rosenberg SA. Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J Sci Am.* 2000;6 Suppl 1:S2-7.
222. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev.* 2004;202:275-293.
223. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:155-168.
224. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, et al. Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *Br J Haematol.* 2005;128:192-203.
225. Fujii H, Trudeau JD, Teachey DT, et al. In vivo control of acute lymphoblastic leukemia by immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Blood.* 2007;109:2008-2013.
226. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003;90:127-156.
227. Ljunggren HG, Karre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med.* 1985;162:1745-1759.
228. Guimaraes F, Guven H, Donati D, et al. Evaluation of ex vivo expanded human NK cells on antileukemia activity in SCID-beige mice. *Leukemia.* 2006;20:833-839.
229. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 2007;67:8444-8449.
230. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev.* 2006;214:202-218.
231. Malmberg KJ. Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:879-892.
232. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;99:3661-3667.
233. Jager MJ, Hurks HM, Levitskaya J, Kiessling R. HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception. *Hum Immunol.* 2002;63:444-451.
234. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* 2002;169:4098-4102.
235. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005;202:1075-1085.
236. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol.* 2006;176:1582-1587.

237. Zambello R, Falco M, Della Chiesa M, et al. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Blood*. 2003;102:1797-1805.
238. Bottino C, Castriconi R, Moretta L, Moretta A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol*. 2005;26:221-226.
239. Chang CC, Ferrone S. NK cell activating ligands on human malignant cells: molecular and functional defects and potential clinical relevance. *Semin Cancer Biol*. 2006;16:383-392.
240. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006;214:73-91.
241. Mendez R, Ruiz-Cabello F, Rodriguez T, et al. Identification of different tumor escape mechanisms in several metastases from a melanoma patient undergoing immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56:88-94.
242. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:201-214.
243. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:11521-11526.
244. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:735-747.
245. Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, et al. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood*. 2002;99:1259-1266.
246. Roda JM, Joshi T, Butchar JP, et al. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6419-6428.
247. Ozdemir O, Ravindranath Y, Savasan S. Mechanisms of superior anti-tumor cytotoxic response of interleukin 15-induced lymphokine-activated killer cells. *J Immunother*. 2005;28:44-52.
248. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:595-601.
249. Kobayashi H, Dubois S, Sato N, et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*. 2005;105:721-727.
250. Sheridan C. First-in-class cancer therapeutic to stimulate natural killer cells. *Nat Biotechnol*. 2006;24:597.
251. Koh CY, Ortaldo JR, Blazar BR, Bennett M, Murphy WJ. NK-cell purging of leukemia: superior antitumor effects of NK cells H2 allogeneic to the tumor and augmentation with inhibitory receptor blockade. *Blood*. 2003;102:4067-4075.
252. Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*. 2005;106:376-383.
253. Uherek C, Tonn T, Uherek B, et al. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood*. 2002;100:1265-1273.
254. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94:333-339.
255. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295:2097-2100.
256. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285:412-415.

257. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol.* 2007;19:142-147.
258. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:177-186.
259. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985;313:1485-1492.
260. Arai S, Meagher R, Swearingen M, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy.* 2008;10:625-632.
261. Tam YK, Martinson JA, Doligosa K, Klingemann HG. Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy.* 2003;5:259-272.
262. Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. *Hum Immunol.* 2001;62:1092-1098.
263. Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy.* 2004;6:15-22.
264. Fauriat C, Andersson S, Bjorklund AT, et al. Estimation of the size of the alloreactive NK cell repertoire: studies in individuals homozygous for the group A KIR haplotype. *J Immunol.* 2008;181:6010-6019.
265. Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:383-393.
266. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol.* 2006;18:151-158.
267. Slavin S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy at the stage of minimal residual disease following high-dose chemotherapy supported by autologous stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 2005;114:214-220.
268. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 1995;83:851-857.
269. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol.* 1988;50:427-440.
270. Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M. How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:16-26.
271. Jones MT, Gillham B. Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic hormone. *Physiol Rev.* 1988;68:743-818.
272. Sandeep TC, Walker BR. Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:446-453.
273. Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology.* 2001;142:1371-1376.
274. Wamil M, Seckl JR. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target. *Drug Discov Today.* 2007;12:504-520.
275. Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, et al. CD4(+)/CD8(+)/TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol.* 2001;31:2293-2301.
276. Brokaw JJ, White GW, Baluk P, Anderson GP, Umemoto EY, McDonald DM. Glucocorticoid-induced apoptosis of dendritic cells in the rat tracheal mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:598-605.

277. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998;102:274-282.
278. Mitchell IJ, Cooper AJ, Griffiths MR, Barber DJ. Phencyclidine and corticosteroids induce apoptosis of a subpopulation of striatal neurons: a neural substrate for psychosis? *Neuroscience.* 1998;84:489-501.
279. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell.* 1991;67:879-888.
280. Grillot DA, Merino R, Nunez G. Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J Exp Med.* 1995;182:1973-1983.
281. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 1998;93:531-541.
282. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, et al. ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Biochem J.* 1997;322 ( Pt 3):909-917.
283. Fernandez-Ruiz E, Rebollo A, Nieto MA, et al. IL-2 protects T cell hybrids from the cytolytic effect of glucocorticoids. Synergistic effect of IL-2 and dexamethasone in the induction of high-affinity IL-2 receptors. *J Immunol.* 1989;143:4146-4151.
284. Nieto MA, Lopez-Rivas A. IL-2 protects T lymphocytes from glucocorticoid-induced DNA fragmentation and cell death. *J Immunol.* 1989;143:4166-4170.
285. Sher ER, Leung DY, Surs W, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest.* 1994;93:33-39.
286. Biola A, Lefebvre P, Perrin-Wolff M, Sturm M, Bertoglio J, Pallardy M. Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol.* 2001;15:1062-1076.
287. Plotz CM. Corticosteroids as immunosuppressive drugs: a brief perspective. *Transplant Proc.* 1975;7:5-6.
288. Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol.* 1993;149:39-49.
289. Paliogianni F, Raptis A, Ahuja SS, Najjar SM, Boumpas DT. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest.* 1993;91:1481-1489.
290. Vacca A, Felli MP, Farina AR, et al. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med.* 1992;175:637-646.
291. Zhang G, Zhang L, Duff GW. A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol.* 1997;16:145-152.
292. Almawi WY, Lipman ML, Stevens AC, Zanker B, Hadro ET, Strom TB. Abrogation of glucocorticoid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6, and IFN-gamma. *J Immunol.* 1991;146:3523-3527.
293. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 1995;9:401-412.
294. Wagnier A, Lafaurie C, Legros-Maida S, et al. Down-regulation of human granzyme B expression by glucocorticoids. Dexamethasone inhibits binding to the Ikaros and AP-1 regulatory elements of the granzyme B promoter. *J Biol Chem.* 1998;273:35326-35331.
295. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17:138-146.

296. Ramirez F. Glucocorticoids induce a Th2 response in vitro. *Dev Immunol.* 1998;6:233-243.
297. Visser J, van Boxel-Dezaire A, Methorst D, Brunt T, de Kloet ER, Nagelkerken L. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood.* 1998;91:4255-4264.
298. Ju ST, Panka DJ, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* 1995;373:444-448.
299. Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem.* 1997;272:31427-31434.
300. Mittelstadt PR, Ashwell JD. Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol Cell Biol.* 1998;18:3744-3751.
301. Mittelstadt PR, Ashwell JD. Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. *J Biol Chem.* 1999;274:3222-3227.
302. Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A, Ju ST. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol.* 1998;161:3469-3473.
303. Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1999;274:987-992.
304. Baumann S, Dostert A, Novac N, et al. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood.* 2005;106:617-625.
305. Yang Y, Mercep M, Ware CF, Ashwell JD. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med.* 1995;181:1673-1682.
306. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity.* 1997;7:803-812.
307. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:6216-6221.
308. Philips A, Maira M, Mullick A, et al. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5952-5959.
309. Pelfrey CM, Tranquill LR, Boehme SA, McFarland HF, Lenardo MJ. Two mechanisms of antigen-specific apoptosis of myelin basic protein (MBP)-specific T lymphocytes derived from multiple sclerosis patients and normal individuals. *J Immunol.* 1995;154:6191-6202.
310. Baumler CB, Bohler T, Herr I, Benner A, Krammer PH, Debatin KM. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood.* 1996;88:1741-1746.
311. Lu W, Salerno-Goncalves R, Yuan J, Sylvie D, Han DS, Andrieu JM. Glucocorticoids rescue CD4+ T lymphocytes from activation-induced apoptosis triggered by HIV-1: implications for pathogenesis and therapy. *Aids.* 1995;9:35-42.
312. Piemonti L, Monti P, Allavena P, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol.* 1999;162:6473-6481.
313. Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood.* 2000;95:3162-3167.
314. Callewaert DM, Moudgil VK, Radcliff G, Waite R. Hormone specific regulation of natural killer cells by cortisol. Direct inactivation of the cytotoxic function of cloned human NK cells without an effect on cellular proliferation. *FEBS Lett.* 1991;285:108-110.



315. Zhou J, Olsen S, Moldovan J, et al. Glucocorticoid regulation of natural cytotoxicity: effects of cortisol on the phenotype and function of a cloned human natural killer cell line. *Cell Immunol.* 1997;178:108-116.
316. Shakhar G, Blumenfeld B. Glucocorticoid involvement in suppression of NK activity following surgery in rats. *J Neuroimmunol.* 2003;138:83-91.
317. Witek-Janusek L, Gabram S, Mathews HL. Psychologic stress, reduced NK cell activity, and cytokine dysregulation in women experiencing diagnostic breast biopsy. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32:22-35.
318. McKee MD, Fichera A, Nishimura MI. T cell immunotherapy. *Front Biosci.* 2007;12:919-932.
319. Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:790-802.
320. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5:617-625.
321. Uhrberg M. The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia.* 2005;19:707-709.
322. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc.* 2007;2:2049-2056.
323. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol.* 1999;162:4511-4520.
324. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184:39-51.
325. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* 2000;243:167-190.
326. Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol.* 1998;33:525-533.
327. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1463-1467.
328. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics.* 2004;20:2471-2472.
329. Fraga D, Meulia, T. and Fenster, S. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques: John Wiley & Sons, Inc.;* 2008:10.13.11–10.13.34.
330. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
331. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008;9:495-502.
332. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today.* 2000;21:228-234.
333. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:197-223.
334. Yu J, Mao HC, Wei M, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood.* 2010;115:274-281.
335. Beziat V, Descours B, Parizot C, Debre P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One.* 2010;5:e11966.
336. Ortaldo JR, Mason AT, O'Shea JJ. Receptor-induced death in human natural killer cells: involvement of CD16. *J Exp Med.* 1995;181:339-344.

337. Warren HS, Kinnear BF. Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J Immunol.* 1999;162:735-742.
338. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, et al. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood.* 2002;100:3633-3638.
339. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest.* 1997;99:937-943.
340. Huntington ND, Puthalakath H, Gunn P, et al. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol.* 2007;8:856-863.
341. Zheng X, Wang Y, Wei H, Ling B, Sun R, Tian Z. Bcl-xL is associated with the anti-apoptotic effect of IL-15 on the survival of CD56(dim) natural killer cells. *Mol Immunol.* 2008;45:2559-2569.
342. Zambricki E, Shigeoka A, Kishimoto H, et al. Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *Am J Transplant.* 2005;5:2623-2631.
343. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, et al. Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J Immunol.* 2002;168:3155-3164.
344. Samson SI, Memet S, Vosshenrich CA, et al. Combined deficiency in I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\epsilon$  reveals a critical window of NF- $\kappa$ B activity in natural killer cell differentiation. *Blood.* 2004;103:4573-4580.
345. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, et al. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B. *Blood.* 2001;98:743-753.
346. Ayroldi E, Zollo O, Bastianelli A, et al. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest.* 2007;117:1605-1615.
347. Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7929-7941.
348. Delfino DV, Agostini M, Spinicelli S, Vacca C, Riccardi C. Inhibited cell death, NF- $\kappa$ B activity and increased IL-10 in TCR-triggered thymocytes of transgenic mice overexpressing the glucocorticoid-induced protein GILZ. *Int Immunopharmacol.* 2006;6:1126-1134.
349. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol.* 1995;15:2612-2624.
350. Ogryzko VV, Wong P, Howard BH. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 1997;17:4877-4882.
351. Robinson K, Asawachaicharn N, Galloway DA, Grandori C. c-Myc accelerates S-phase and requires WRN to avoid replication stress. *PLoS One.* 2009;4:e5951.
352. Grzywacz B, Kataria N, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Natural killer cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood.* 2011;in press.
353. Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, et al. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion. *J Immunother.* 2010;33:200-210.
354. Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood.* 2010;116:1299-1307.
355. Curnow SJ, Wloka K, Faint JM, et al. Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol.* 2004;172:7154-7161.
356. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med.* 2009;206:25-34.

357. Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16:300-317.
358. Delfino DV, Agostini M, Spinicelli S, Vito P, Riccardi C. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood*. 2004;104:4134-4141.
359. Sharma S, Lichtenstein A. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Blood*. 2008;112:1338-1345.
360. Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol*. 1992;22:1-6.
361. Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*. 1994;371:534-537.
362. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, et al. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*. 1994;372:570-573.
363. Bianchi T, Gasser S, Trumpp A, MacDonald HR. c-Myc acts downstream of IL-15 in the regulation of memory CD8 T-cell homeostasis. *Blood*. 2006;107:3992-3999.
364. Ouyang Q, Baerlocher G, Vulto I, Lansdorp PM. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:240-252.
365. Berg M, Lundqvist A, McCoy P, Jr., et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11:341-355.
366. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006;107:1761-1767.
367. Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K. Insights into minimal residual disease in cancer patients: implications for anti-cancer therapies. *Eur J Cancer*. 2010;46:1189-1197.