



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επιδράσεις επιγενετικών φαρμάκων στα
CD3+ CD8+ κυτταρολυτικά κύτταρα
ασθενών με καρκίνο**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Π. ΜΠΟΥΚΑΣ

Μοριακός Βιολόγος και Γενετιστής

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

ΛΑΡΙΣΑ 2017

© 2017 Κωνσταντίνος Μπούκας

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/1232, άρθρο 202, παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής

*Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
(επιβλέπων)*

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής

*Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
(επιβλέπων)*

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας

Πασχάλης - Αδάμ Μολυβδάς

Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας

Ευθυμία Πετεινάκη

Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ματθαίος Σπελέτας

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Αποστολία Χατζηευθυμίου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Στον Αλεξανδρόπουλο Γεώργιο

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
1. Επιγενετική.....	15
1.1 DNA μεθυλίωση.....	15
1.1.1 5' μεθυλοκυτοσίνη και CpG νησίδες	15
1.1.2 DNA μεθυλίωση – DNMTs	17
1.2 Τροποποιήσεις ιστονών.....	17
1.2.1 Ακετυλίωση των ιστονών	17
1.2.2 HDACs.....	18
2. Επιγενετική και ανοσιακό σύστημα	19
2.1 Καθορισμός της γενεαλογικής σειράς μέσω μεθυλίωσης του DNA.....	20
2.2 Καθορισμός της γενεαλογικής σειράς μέσω τροποποίησης ιστονών.....	21
2.3 Επιγενετική ρύθμιση του V(D)J ανασυνδυασμού	21
2.4 Επιγενετική ρύθμιση του αλληλικού αποκλεισμού.....	22
3. Επιγενετική της μνημονικής T-κυτταρικής απάντησης	23
3.1 Επιγενετική ρύθμιση στα T-κύτταρα μνήμης.....	23
3.2 DNA μεθυλίωση και μεταγραφή στα T-κύτταρα μνήμης.....	23
3.2.1 Τροποποιήσεις ιστονών και γονιδιακή έκφραση στα μνημονικά T-κύτταρα ...	24
3.2.2 Τροποποιήσεις ιστονών και γονιδιακή έκφραση στα CD4+ μνημονικά T-κύτταρα	25
3.2.3 Τροποποιήσεις ιστονών και γονιδιακή έκφραση στα CD8+ μνημονικά T-κύτταρα	25
4. Επιγενετική θεραπεία	27
4.1 Αναστολείς των DNMTs.....	27
4.1.1 Νουκλεοσιδικά ανάλογα	27
4.1.1.1 Αζακυτιδίνη και 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη.....	27
4.1.1.2 Ζεμπουλαρίνη.....	30
4.1.1.3 Κλινικά αποτελέσματα	30
4.1.2 Μη νουκλεοσιδικά ανάλογα.....	31
4.1.2.1 Φλαβονοειδή.....	31
4.1.2.2 Υδρολαζίνη.....	31
4.1.2.3 Προκαΐναμίδη και Προκαΐνη.....	32
4.1.2.4 RG108	33
4.1.2.5 MG98	33
4.1.2.6 Άλλα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα	34
4.2 Αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών	34
4.2.1 Υδροξαμικά	34
4.2.2 Κυκλικά πεπτίδια	35
4.2.3 Αλειφατικά οξέα.....	35
5. Επιδράσεις των επιγενετικών παραγόντων στα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος	36
5.1 NK	36
5.2 Δενδριτικά κύτταρα.....	37
5.3 T-κύτταρα	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
1. ΥΛΙΚΑ.....	42
1.1 Πεπτίδο-ειδικοί CD8+ T-κυτταρικοί κλώνοι	42
1.2 Καρκινικές σειρές και EBV μετασχηματισμένα κύτταρα	42
1.3 Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) και βλάστες.....	43
1.4 Επιγενετικά φάρμακα	43
1.5 Ορός	43
1.6 Πεπτίδια και HLA πολυμερή	43
1.7 Αναλώσιμα υλικά	44
2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός	50
2.2 Μοριακές Μέθοδοι.....	51
2.2.1 Εκχύλιση ολικού γενωμικού DNA (gDNA).....	51

2.2.2	Ανάλυση μεθυλίωσης ολικού γονιδιώματος.....	51
2.2.2.1	Τροποποίηση του DNA με Bisulfite.....	51
2.2.2.2	PCR για ALU στοιχεία	53
2.2.2.3	Πέψη με το ένζυμο περιορισμού MboI	54
2.2.3	Εκχύλιση RNA.....	55
2.2.4	Σύνθεση μορίων cDNA	55
2.2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	56
2.2.6	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	57
2.2.7	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.....	57
2.2.8	Ανάλυση του TCR με PCR	59
2.3	Κυτταρικές Μέθοδοι	61
2.3.1	Παρασκευή ορού.....	61
2.3.2	Απομόνωση Μονοπύρηνων κυττάρων του Περιφερικού Αίματος	62
2.3.3	Ψύξη κυττάρων	62
2.3.4	Απόψυξη Κυττάρων	62
2.3.5	Παραγωγή βλαστών PBMC με τη χρήση PHA-L.....	63
2.3.6	Καλλιέργεια καρκινικών σειρών και EBV Β-κυττάρων	64
2.3.7	Ακτινοβόληση Καρκινικών Σειρών και EBV Β-Κυττάρων.....	65
2.3.8	Καλλιέργεια CD8 T κλώνων	65
2.3.9	Κυτταρομετρική ανάλυση μορίων επιφανείας.....	67
2.3.10	Κυτταρομετρική ανάλυση ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών.....	68
2.3.11	Μέτρηση κυτταροκινών με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία.....	69
2.3.12	Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με BrdU	70
2.3.13	Ανάλυση απόπτωσης.....	72
2.3.14	Έλεγχος κυτταροτοξικότητας.....	73
3.	Προτυποποίηση τεχνικών και δοκιμασιών.	75
3.1	Καθορισμός του βέλτιστου χρόνου μέτρησης IFN-g	75
3.2	Καθορισμός ενεργότητας της IL-2 με δοκιμασία CTLL2.....	77
3.3	Προτυποποίηση συνθηκών καλλιέργειας με PHA-L και IL-2.....	80
3.4	Προτυποποίηση της ανάλυσης κυτταρικού κύκλου με BrdU.....	83
3.5	Προτυποποίηση δοκιμασίας απόπτωσης	86
4.	Προτυποποίηση συστήματος καλλιέργειας.....	88
4.1	Καθορισμός υποτοξικής συγκέντρωσης φαρμάκων	88
4.1.1	5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη	89
4.1.2	Τριχοστατίνη Α	91
4.2	Καθορισμός συστήματος αντιγονοπαρουσίασης.....	95
4.3	Καθορισμός χρόνου προσθήκης φαρμάκων και έλεγχος συνέργειας	98
4.4	Καθορισμός της κατάστασης των κλώνων πριν την προσθήκη των φαρμάκων (κύτταρα σε ηρεμία ή διεγερμένα).....	102
4.5	Σύστημα καλλιέργειας για τη μελέτη της επίδρασης φαρμάκων	106
4.5.1	Καλλιέργεια κλώνων παρουσία 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνης.....	106
4.5.2	Καλλιέργεια κλώνων παρουσία τριχοστατίνης Α.....	107
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	110
1.	Επίδραση της 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνης σε πεπτιδο-ειδικούς T κυτταρολυτικούς κλώνους,	111
1.1	Επίδραση στον αντι-IL4.A2 κυτταρολυτικό κλώνο	111
1.2	Επίδραση στον αντι-MAGE 3.A2 κυτταρολυτικό κλώνο.....	118
2.	Επίδραση της τριχοστατίνης Α σε πεπτιδο-ειδικούς T-κυτταρολυτικούς κλώνους, ..	122
2.1	Επίδραση στον αντι-MAGE3.A1 κλώνο.....	122
2.2	Επίδραση στον αντι-MAGE3.A2 κλώνο.....	126
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	141
	ABSTRACT.....	142
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	143

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Μπούκας Κωνσταντίνος του Παναγιώτη
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 24 Μαρτίου 1984
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμος
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Σκαλτσοδήμου 10, Αγρίνιο, 30100
Τηλ: 26410-45265 – Κιν: 6974653497
Email: kmroukas@gmail.com
ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΥΠΑΓΩΓΗ: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής
Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας
Βιόπολις, 41110, Λάρισα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2001 - 2006 Bachelor of Science
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
2005 - 2006 Διπλωματική Εργασία: "Έκφραση του p53 στον καρκίνο του πνεύμονα"
(προαπαιτούμενο)
2006 - 2011 Υποψήφιος Διδάκτωρ
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
2011 - 2012 Υποχρεωτική θητεία στον Ελληνικό Στρατό
Βοηθός Μικροβιολογικού Εργαστηρίου στο 404 Στρατιωτικό Νοσοκομείο,
Λάρισα
2016 έως και σήμερα Προετοιμασία άρθρου διατριβής και συγγραφή διατριβής.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Απομόνωση και ποσοτικοποίηση DNA και RNA, σύνθεση cDNA, PCR, allele specific PCR, MSP PCR, RT PCR, Real time PCR, ανάλυση ολικής μεθυλίωσης γονιδιώματος, RFLP, Gel extraction, SDS-PAGE και αλληλούχιση DNA.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Καλλιέργεια κυττάρων (πρωτογενείς και κυτταρικές σειρές), απομόνωση PBMC, Ψύξη και απόψυξη κυττάρων, καλλιέργεια και ενεργοποίηση CTL σειρών και κλώνων απομονωμένων από περιφερικό αίμα, μικτή καλλιέργεια λεμφοκυττάρων-πεπτιδίων (MLPC), απομόνωση και καθιέρωση καρκινικών κυτταρικών σειρών από συμπαγείς όγκους, μικροσκοπία, παραγωγή βλαστών, ELISA, κυτταρομετρία ροής για καθορισμό έκφρασης επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών, ανάλυση κυτταρικού κύκλου και κινητική με τη χρήση BrdU, ανάλυση με τετραμερή, δοκιμασία απόπτωσης, δοκιμασία CTLL-2, δοκιμασία κυτταρικής λύσης με ραδιενεργό χρώμιο ⁵¹Cr και μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων.

ΆΛΛΑ

Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση SOPs, σχεδιασμός εκκινήτων για PCR και Real time PCR, ανάπτυξη διαγνωστικών πρωτοκόλλων για σπάνιες γενετικές ασθένειες.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Ανοσολογία, Επιγενετική, Ανοσολογία του καρκίνου, Ανοσοανεπάρκειες, Αναπτυξιακή Βιολογία και Μοριακή Βιολογία.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Εκπαίδευση και επίβλεψη φοιτητών Ιατρικής κατά τη διάρκεια του κύκλου σπουδών τους από το εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣΑγγλικά
Γερμανικά

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕΣInternet based Databases, Microsoft Office, FileMaker Pro, Adobe
Illustrator, UviDocMw, RotorGene, Chromas, Oligo and Primer 3.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. 5-aza-2'-deoxycytidine has an immunomodulatory effect on antitumor peptide-specific CD8+ CTL clones derived from cancer patients. **Boukas K** et al. (προετοιμασία).
2. Azithromycin reduces the viability of human bronchial smooth muscle cells. Stamatiou R, **Boukas K**, Paraskeva E, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A. J Antibiot (Tokyo). 2010 Feb;63(2):71-5. [IF 2.237, 9 citations].
3. Hereditary angioedema in Greek families caused by novel and recurrent mutations. Speletas M, **Boukas K**, Papadopoulou-Alataki E, Tsitsami E, Germenis AE. Hum Immunol. 2009 Nov;70(11):925-9. [IF 2.311, 13 citations].
4. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. Stamatiou R, Paraskeva E, **Boukas K**, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Eur Respir J. 2009 Sep;34(3):721-30. [IF 10.659, 29 citations].
5. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: implications for immunotherapy. Karanikas V, Tsochas S, **Boukas K**, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gourgoulisanis KI, Germenis AE. Cancer Biol Ther. 2008 Mar;7(3):345-52. [IF 3.294, 17 citations].
6. Clinical Immunology Quiz. Speletas M, **Boukas K**, Loules G, Germenis AE. Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(1):135.

ΒΡΑΒΕΙΑ

1. Research Excellence Award - 4th International Greek Biotechnology Forum. Athens 2008. For the best scientific announcement: "New horizons in Oncology Immunotherapy".
2. Research Excellence Award - 5th International Greek Biotechnology Forum. Athens 2009. For the best scientific announcement: "*Epigenetic Drugs Alter the Function of Anti-Tumor Specific CD8+ T cells*".

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. Speletas M, **Boukas K**, Moldovan D, Psarros F, Tsitsami E, Germenis AE. Hereditary angioedema: The mutation spectrum of SERPING1/C1NH gene in Greek and Romanian patients. International Immunology 22 (Suppl. 1):iii58, 2010.
2. **Boukas K**, Germenis AE, Karanikas V. Epigenetic drugs alter the function of anti-tumor specific CD8+ T cells. 5th International Greek Biotechnology Forum (IGBF). Athens, 8-9 May 2009.
3. Chatsidis G, **Boukas K**, Hadjigeorgiou G, Germenis AE, Karanikas V. The effect of valproic acid (VPA) on activated T lymphocytes. 5th International Greek Biotechnology Forum (IGBF). Athens, 8-9 May 2009.
4. Speletas M, **Boukas K**, Papadopoulou-Alataki E, Tsitsami E, Germenis AE: A double nucleotide substitution leading to a stop codon responsible for hereditary angioedema. 6th International C1-INH Deficiency Workshop. Budapest, 22-24 May 2009.
5. Karanikas V, Tsochas S, **Boukas K**, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gorgoulisanis KI, Germenis AE. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy. 4th International Greek Biotechnology Forum. Athens, 2-3 February 2008.
6. Karanikas V, Tsochas S, **Boukas K**, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gorgoulisanis KI, Germenis AE. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy. International Society for Cellular Oncology (ISCO 2008). Amsterdam, 5-8 March 2008.
7. Germenis AE, Tsitsami E, Kalala F, **Boukas K**, Speletas M, Karanikas V. A methodological model for uncovering immunoepigenetic (side?)-effects of epigenetic drugs. Conference on Translational Research in Paediatric Rheumatology. Genova, 31 May 2008.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ανοσιακό σύστημα παρέχει επιτήρηση, απάντηση και έλεγχο έναντι των παθογόνων. Η λειτουργία του ανοσιακού συστήματος σε ότι αφορά τον καρκίνο έγκειται στην παραγωγή μιας ανοσιακής απάντησης με σκοπό την καταστροφή των ταχέως εξαλασσόμενων κυττάρων. Οι διεργασίες του ανοσιακού συστήματος με τις οποίες επάγονται δραστικά ανοσοκύτταρα τα οποία είναι ικανά να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν ένα διαφοροποιημένο αντιγονικό προφίλ είναι γνωστές ως ανοσοεπιτήρηση του καρκίνου.

Είναι πλέον αποσαφηνισμένο ότι ο επιγενετικός προγραμματισμός είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό των ανοσοκυττάρων. Τα ανοσοκύτταρα ως μοναδική εξαίρεση όσον αφορά την επιγενετική έχουν ένα χαρακτηριστικό, οφείλουν να αλλάζουν το λειτουργικό τους προφίλ ώστε να ικανοποιούν κάθε στιγμή τις ανάγκες του ανοσιακού συστήματος να εκτελεί τις λειτουργίες του. Ένας κύριος μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται το παραπάνω είναι οι επιγενετικές τροποποιήσεις. Όσον αφορά τα CD8+ T-κύτταρα, έχει χαρακτηριστεί σε μεγάλο βαθμό η επιγενετική ρύθμιση της διαφοροποίησής τους. Ειδικότερα, η DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 (DNMT1) είναι κρίσιμης σημασίας, κατά τη διάρκεια της θυμικής ανάπτυξης, για την επιβίωση των διπλά αρνητικών και τη διαφοροποίηση των διπλά θετικών κυττάρων. Επίσης, οι μεταπτώσεις από δραστικά σε μνημονικά T-κύτταρα συνοδεύονται από επιγενετικές τροποποιήσεις που υπαγορεύουν την γονιδιακή έκφραση τόσο των «δραστικών» όσο και των ομοιοστατικών γονιδίων. Η ανάλυση της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των CD8+ T-κυττάρων αποκάλυψε τις δυναμικές αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA κατά τη φλεγμονή και τη συσχέτιση της πρώτης με τη γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι έπειτα από ενεργοποίηση, τα μνημονικά CD8+ T-κύτταρα διατηρούν χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης στους γονιδιακούς τόπους της *IFNG* και της *IL-2* αλλά και ότι η απομεθυλίωση στον γονιδιακό τόπο της *IFNG* επισυμβαίνει πολύ πιο γρήγορα στα μνημονικά σε σχέση με τα παρθένα T-κύτταρα.

Στον καρκίνο εκτός από τις γενετικές μεταλλάξεις παρατηρείται και μια σειρά επιγενετικών αλλαγών. Ένα από τα πρώτα ευρήματα στο επιγένωμα των καρκινικών κυττάρων ήταν η παρατήρηση της μείωσης της ολικής μεθυλίωσης του γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων συνοδευόμενη από αύξηση της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων και επακόλουθη αποσιώπηση της έκφρασής τους. Πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν αποδειχθεί ότι είναι ογκοκατασταλτικά και χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα: p16, p21, p27, RARβ2 και το ARH1. Η αύξηση της μεθυλίωσης στον ανάρου αυτών των γονιδίων φαίνεται να προκαλείται από την DNMT1. Σε αντίθεση με τις γενετικές μεταλλάξεις, οι επιγενετικές αλλαγές είναι από τη φύση τους αντιστρέψιμες και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο ξεκίνησαν οι προσπάθειες για επιγενετικές θεραπείες του καρκίνου με επιγενετικά φάρμακα. Κάποια επιγενετικά φάρμακα έχουν πάρει έγκριση από τον FDA

και τον EMA για την θεραπεία ασθενειών όπως τα MDS και η AML αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι δεν αποτελούν φάρμακα πρώτης γραμμής και ότι η θεραπευτική προσέγγιση είναι συνδυαστική με άλλες θεραπείες. Οι δύο σημαντικότερες κατηγορίες φαρμάκων είναι οι αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTi) και οι αναστολείς των απόακετυλασών (HDACi).

Μέχρι τώρα όλες οι ερευνητικές εργασίες που μελετούσαν την επίδραση των επιγενετικών φαρμάκων, εστίαζαν στην επίδραση τους στα καρκινικά κύτταρα. Ελεγχόταν η αλλαγή που προκαλούταν στην έκφραση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Από την πλευρά του ανοσιακού ο κύριος έλεγχος αφορούσε την πιθανή αύξηση της αντιγονικότητας των καρκινικών κυττάρων μέσω αποκατάστασης ή και αύξησης της αντιγονοπαρουσίασης. Πέρα από τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης δραστικών κυττάρων με κύτταρα στόχους παρουσία φαρμάκου, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η επίδραση αυτών των φαρμάκων και στα ίδια τα ανοσοκύτταρα τα οποία έχουν ως στόχο τη λύση των καρκινικών κυττάρων και συγκεκριμένα στους πεπτιδο-ειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους. Από τη στιγμή που τα επιγενετικά φάρμακα χορηγούνται σε ασθενείς με κακοήθειες, υποθέσαμε ότι δεν επηρεάζουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και θελήσαμε να ελέγξουμε τις επιγενετικές επιδράσεις τους σε κύτταρα που είναι μέρος της ειδικής ανοσιακής απάντησης έναντι του καρκίνου. Τέτοιες επαγόμενες αλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάζουν τις λειτουργίες των δραστικών κυτταρολυτικών κυττάρων με σημαντικότερη αυτών την ικανότητα λύσης των καρκινικών κυττάρων στόχων. Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι μέχρι τώρα δεν υπήρχε ένα πειραματικό σύστημα που θα επέτρεπε τον έλεγχο που θελήσαμε να κάνουμε. Ένας από τους λόγους που δεν υπάρχουν τέτοια δεδομένα στη βιβλιογραφία είναι και η πειραματική δυσκολία του εγχειρήματος.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το υλικό της μελέτης που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε από την τράπεζα κυττάρων της Μονάδας Ανοσολογίας του Καρκίνου του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αναστάσιο Γερμενή που με δέχθηκε στο εργαστήριο, που μου έδωσε την ευκαιρία αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε ώστε να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή. Τον ευχαριστώ επίσης για την αδιάκοπη καθοδήγηση, για τις συμβουλές και για τη στήριξη που παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για το χρόνο που αφιέρωσε συζητώντας και παρέχοντας λύση σε προβλήματα που παρουσιαζόταν.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Βάιο Καρανίκα ο οποίος με δίδαξε και με καθοδήγησε ακούραστα σε όλα τα βήματα αυτής της ερευνητικής μου προσπάθειας. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την ανοσολογία του καρκίνου. Τον ευχαριστώ επίσης για την εκμάθηση τεχνικών, για τις τεχνικές συμβουλές, για την καθοδήγηση που παρείχε, για τη στήριξη του και για την προθυμία του να είναι διαθέσιμος ανα πάσα στιγμή. Κυρίως όμως τον ευχαριστώ για την εκμάθηση του επιστημονικού τρόπου σκέψης και του τρόπου προσέγγισης των ερευνητικών προβλημάτων. Τέλος θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις αμέτρητες ώρες που αφιέρωσε συζητώντας προβλήματα, αποτελέσματα και προοπτικές μοιράζοντας τη γνώση του. Χωρίς τη βοήθεια του, η ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήταν αδύνατη.

Ευχαριστώ θερμά για τη συμβολή τους και τα αλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή Πνευμονολογίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη και τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Γεώργιο Νταλέκο.

Θέλω ακόμη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα για την εκμάθηση τεχνικών μοριακής βιολογίας αλλά και για τις συμβουλές του στα πειραματικά προβλήματα που παρουσιάστηκαν. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης για το χρόνο που αφιέρωσε σε επιστημονικές συζητήσεις αλλά και για τη στήριξη που έδειξε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας για την καλή συνεργασία που είχαμε. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Φανή Καλαλά για τις γνώσεις κυτταρομετρίας ροής που μου πρόσφερε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Φαίη Σούκου, τον Στέφανο Τσόχα, την Μαρία Ζαμανάκου, τον Γιώργο Χατσιόδη, τον Γεδεών Λουλέ, την Νίκη Αργέντου, την Αντιγόνη Μαμάρα, την Αγγελική Μπάρδα, την Λίτσα Καραμούτη, την Κυριακή Λιαδάκη, την Φωτεινή Μπαρδάκα, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Ως πράξη ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Παναγιώτη και Λαμπρινή Μπούκα για την υπομονή και την αγόγγυστη υποστηρικτή τους. Χωρίς την οικονομική και ψυχολογική στήριξή τους, θα ήταν αδύνατο να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τα αδέρφια μου Αλέξανδρο και Ευάγγελο Μπούκα για τη συμπαράσταση που μου έδειξαν.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

5-aza-Cdr, DAC
5mC (5 methyl cytosine)
7-AAD (7-aminoactinomycin D)
Ag (antigen)
AICD (activation induced cell death)

AML (acute myeloid leukemia)
APC (allophycocyanin)
APCs (antigen presenting cells)
BFA (brefeldin A)
BrdU (bromodeoxyuridine)
CCR6 (C-C chemokine receptor type 6)
CGI (CpG islands)
CpG
CTLs (cytolytic T Lymphocytes)
Dach1 (dachshund homolog 1)
DC (dendritic cell)
DMSO (dimethylsulphoxide)
DNMTs (DNA methyltransferase)
DNMTi (DNA methyltransferase inhibitor)

EBV (Epstein-Barr virus)
EBV-B (EBV-transformed B cells)

FBS (fetal bovine serum)
FITC (fluorescein isothiocyanate)
GZMB (granzyme B)
H3K4
H3K4m3
HATs (histone acetyltransferases)
HDACs (histone deacetylases)
HDACi (histone deacetylase inhibitors)

HLA (human leukocyte antigen)

HS (human serum)
hTERT (human telomerase reverse transcriptase)

ID2 (DNA-binding protein inhibitor ID-2)
Idc
IL (interleukin)
IFN (interferon)
mAb (monoclonal antibody)
MAGE3 (melanoma-associated antigen 3)
MBDP (methyl-binding domain protein)

MDS (myelodysplastic syndromes)
MFI (mean fluorescence intensity)
MHC (major histocompatibility complex)
MLPC (mixed lymphocyte-peptide culture)

NK-κύτταρα (natural killer cells)
NKT-κύτταρα (NK T cells)
NSCLC(non small cell lung carcinoma)

PBMC (peripheral blood mononuclear cells)

PCR (polymerase chain reaction)
Pdcd1 (programmed cell death protein 1)

Pou2af1 (POU domain class 2-associating factor 1)

5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη
5' μεθυλοκυτοσίνη
7-άμινο-ακτινομυκίνη D
αντιγόνο
κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση
Οξεία Μυελογενής λευχαιμία
αλλοφυκοκυανίνη
αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
μπρεφελνίνη A
βρωμοδεοξουριδίνη
μοτίβο C-C τύπου 6
CpG νησίδες
Δινουκλεοτίδιο κυτοσίνης-γουανίνης
κυτταρολυτικά T-κύτταρα
ομόλογο 1 του dachshund
δενδριτικό κύτταρο
διμέθυλο-σουλφοξείδιο
DNA μεθυλοτρανσφεράση
αναστολέας των DNA
μεθυλοτρανσφερασών
ιός Epstein-Barr
B-κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε κακοήγη εξαλλαγή μετά από διαμόλυνση με EBV
εμβρυικός βόειος ορός
ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη
κοκκίενζυμο B
λυσίνη 4 της ιστόνης 3
τριμεθυλιωμένη H3K4
ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών
αποακετυλάσες των ιστονών
Αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών
ανθρώπινο αντιγόνο των λευκοκυττάρων
ανθρώπινος ορός
ανθρώπινη ανάστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης
αναστολέας της DNA σύνδεσης 2
θρεπτικό υλικό Iscove's
ιντερλευκίνη
ιντερφερόνη
μονοκλωνικό αντίσωμα
αντιγόνο σχετιζόμενο με μελάνωμα3
πρωτείνες με επικράτεια σύνδεσης μεθυλίου
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
μέση ένταση φθορισμού
μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
μικτή καλλιέργεια λεμφοκυττάρων-πεπτιδίων
φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
φυσικά κυτταροκτόνα T-κύτταρα
μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα
μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος 1
σχετιζόμενος με επικράτεια POU
τάξης 2 παράγοντας 1

PE (phycoerythrin)	φυκοερυθρίνη
PHA (phytohaemagglutinin)	φυτοαιμαγλουτινίνη
PHA-E (erythroagglutinin)	ερυθρό-αγγλουτινίνη
PHA-L (leucoagglutinin)	λευκό-αγγλουτινίνη
PHD (plant homeodomain)	δάκτυλος ομοιοεπικράτειας
PRC2 (polycomb repressive complex)	σύμπλοκο καταστολής Polycomb2
PRF1 (perforin 1)	περφορίνη
PTCL (peripheral T-cell lymphoma)	λεμφώματα περιφερικών T-κυττάρων
RORC (RAR-related orphan receptor C)	ορφανός υποδοχέας C
T_{CM} (central memory T cells)	κεντρικά μνημονικά T-κύτταρα
T_{EFF} (effector T cells)	δραστικά T-κύτταρα
T_{EM} (effector memory T cells)	δραστικά μνημονικά T-κύτταρα
T_{EMRA} (terminally differentiated effector T cells)	τελικώς διαφοροποιημένα δραστικά T-κύτταρα
TAA (tumor-associated antigen)	σχετιζόμενο με τον όγκο αντιγόνο
TCR (T cell receptor)	υποδοχέας του T-κυττάρου
Th1 (T-helper 1)	T βοηθητικά κύτταρα τύπου 1
Th2 (T helper 2)	T βοηθητικά κύτταρα τύπου 2
TILs (tumor infiltrating cells)	κύτταρα που διηθούν τον όγκο
TNF (tumor necrosis factor)	παράγοντας νέκρωσης των όγκων
Tregs (regulatory T cells)	T ρυθμιστικά κύτταρα
TSA (trichostatin A)	τριχοστατίνη A

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Επιγενετική

Η προέλευση του όρου «επιγενετική» αποδίδεται στον Αριστοτέλη, ο οποίος πρότεινε ότι οι άνθρωποι αναπτύσσονται από την αλληλεπίδραση δύο δυνάμεων. Από τη μία της φύσης (ή προσχηματισμός) και από την άλλη της ανατροφής την οποία και ονόμασε «επιγένεση» [1]. Στις αρχές του 1940, ο Βρετανός βιολόγος Conrad H. Waddington διαμόρφωσε τη θεωρία ότι η αλληλεπίδραση της φύσης και της ανατροφής είναι μία καθοριστική δύναμη που οδηγεί στη δημιουργία σταθερών φαινοτύπων. Μέσω πειραμάτων σε αναπτυσσόμενα έμβρυα όρνιθας έφτασε στο συμπέρασμα ότι οι φαινότυποι παράγονται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στα γονίδια και στο περιβάλλον τους και καθόρισε την επιγενετική ως τις «...αλληλεπιδράσεις γονιδίων με το περιβάλλον τους, οι οποίες δίνουν οντότητα στον φαινότυπο...» [2,3]. Οι παρατηρήσεις του Waddington έγιναν πριν από την ανακάλυψη του γενετικού κώδικα και σήμερα με τον όρο «επιγενετικό χαρακτηριστικό» περιγράφεται ένας σταθερός και κληρονομήσιμος φαινότυπος που προέρχεται από αλλαγές σε ένα χρωμόσωμα, οι οποίες δεν αλλάζουν την αλληλουχία του DNA [4]. Παρόμοια, ονομάζουμε «επιγενετικές αλλαγές» τις κληρονομήσιμες και αντιστρέψιμες αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης οι οποίες επισυμβαίνουν χωρίς να οφείλονται σε μεταβολές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA και «επιγενετική» τη μελέτη των πρώτων. Οι επιγενετικές αλλαγές περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τις τροποποιήσεις των ιστονών και την σχετιζόμενη με RNA αποσιώπηση.

1.1 DNA μεθυλίωση

1.1.1 5' μεθυλοκυτοσίνη και CpG νησίδες

Το 1948, ο Rollin Hotchkiss ανακάλυψε για πρώτη φορά μια τροποποιημένη κυτοσίνη σε υλικό από θύμο νεαρού μοσχариού με χρωματογραφία χαρτιού. Υπέθεσε ότι το κλάσμα που παρατήρησε ήταν η 5' μεθυλοκυτοσίνη (5mC) επειδή διαχωριζόταν από την κυτοσίνη με τον ίδιο τρόπο που η μεθυλο-ουρακίλη (θυμίνη) διαχωριζόταν από την ουρακίλη και πρότεινε ότι η παρουσία αυτής της τροποποιημένης κυτοσίνης ήταν φυσιολογική στο DNA [5]. Παρά το γεγονός ότι πολλοί ερευνητές είχαν προτείνει ότι η DNA μεθυλίωση επηρέαζε τη γονιδιακή ρύθμιση και τη διαφοροποίηση, η συσχέτιση αυτή περιγράφηκε στη δεκαετία του 80 [6,7]. Αυτή τη στιγμή είναι αναγνωρισμένο ότι η μεθυλίωση του DNA είναι ο κύριος επιγενετικός παράγοντας που επηρεάζει τη γονιδιακή ρύθμιση.

Η πλειοψηφία της DNA μεθυλίωσης επισυμβαίνει σε κυτοσίνες οι οποίες προηγούνται μιας γουανίνης, το λεγόμενο «δινουκλεοτίδιο κυτοσίνης-γουανίνης» (CpG). Το δινουκλεοτίδιο αυτό υποεκπροσωπείται στο γονιδίωμα των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, ενώ η αναμενόμενη συχνότητα εμφάνισης στο γονιδίωμα είναι 6,25%, η παρατηρούμενη

συχνότητα είναι μικρότερη του 1%. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την αυθόρμητη απαμίνωση της μεθυλιωμένης κυτοσίνης προς θυμίνη, μια διαδικασία που με το πέρασ του χρόνου (γενεών) έχει οδηγήσει στη σταδιακή ελλάτωση της παρατηρούμενης συχνότητας [8]. Τα διάσπαρτα CpG, τα οποία είναι περίπου 28 εκατομμύρια στο ανθρώπινο γονιδίωμα, είναι μεθυλιωμένα σε ποσοστό 60-80% [9]. Εξαιρέση αποτελούν περιοχές στις οποίες παρατηρείται μεγάλη συχνότητα εμφάνισης των CpG και οι οποίες ονομάζονται «CpG νησίδες» (CGI) και περιέχουν λιγότερο από το 10% των συνολικών CpG. Δεν υπάρχει ένας απόλυτος ορισμός για την περιγραφή μιας περιοχής ως CGI, παρόλο που κάποιες ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να θέσουν κάποια κριτήρια ορισμού [10,11]. Ένας ικανοποιητικός ορισμός των CGI καθορίζεται από τα παρακάτω κριτήρια: μέγεθος μεγαλύτερο ή ίσο των 500bp, περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη μεγαλύτερη από 55% και ο λόγος των παρατηρούμενων προς τα αναμενόμενα CpG δινουκλεοτίδια να είναι μεγαλύτερος του 0,6.

Οι CGI καλύπτουν περίπου το 0,7% του ανθρώπινου γονιδιώματος (αριθμός που εξαρτάται από τον ορισμό) αλλά όπως προαναφέρθηκε περιέχουν, το 7% των CpG [12,13]. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές αυτές είναι κατά βάση αμεθυλιώτες και με αυτό τον τρόπο διαφεύγουν τη μεγάλη διαφορά μεταξύ της παρατηρούμενης και αναμενόμενης συχνότητας που χαρακτηρίζουν τα CpG. Το παραπάνω επιτυγχάνεται μέσω του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA που μπορεί να αναγνωρίσει με ακρίβεια αταίριαστες βάσεις και να διορθώσει το προϊόν της απαμίνωσης της κυτοσίνης (ουρακίλη) αλλά όχι το προϊόν απαμίνωσης της μεθυλοκυτοσίνης. Το 60% των υποκινητών των ανθρώπινων γονιδίων, συγκεκριμένα των σημείων έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site), περιέχουν CGI και αφορούν περιοχές οι οποίες είναι «ανθεκτικές» σε μεθυλίωση. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια είναι γονίδια που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα ανεξαρτήτως ιστού αλλά και γονίδια τα οποία είναι ρυθμιστές της διαφοροποίησης [9].

Στον παραπάνω «κανόνα», υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι στοχευμένη CGI μεθυλίωση είναι ιστοειδική κατά τη διαφοροποίηση [14]. Εξαιρέση αποτελούν, επίσης, και CpG σε περιοχές που υφίστανται γονεϊκή αποτύπωση καθώς και CpG γονιδίων που βρίσκονται στο απενεργοποιημένο χρωμόσωμα των θηλέων.

1.1.2 DNA μεθυλίωση – DNMTs

Η πλειοψηφία της DNA μεθυλίωσης επισυμβαίνει στο δινοκλεοτίδιο CpG. Όλες οι αλλαγές στη μεθυλίωση ρυθμίζονται από ειδικά ένζυμα, τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Οι DNMT1, DNMT3a και DNMT3b είναι τρία ένζυμα με καταλυτικό ενεργό κέντρο τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία αλλά και τη διατήρηση των μοτίβων μεθυλίωσης [14]. Η DNMT1 δρα ως μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης, προσθέτοντας μεθυλομάδες στη θυγατρική αλυσίδα κατά τον διπλασιασμό του DNA. Όταν τα κατάλοιπα CpG μεθυλιώνονται από την DNMT1, τότε στρατολογούνται πρωτεΐνες με επικράτεια σύνδεσης μεθυλίου (MBDP, methyl-binding domain protein) και αποσκακευλάσες των ιστονών (HDACs), εμποδίζοντας τη μεταγραφή και αποσιωπώντας το γονίδιο. Απαλειφή του γονιδίου DNMT1 έχει ως αποτέλεσμα τη συνολική απομεθυλίωση του γονιδιώματος και εμβρυϊκό θάνατο. Οι DNMT3a και DNMT3b είναι υπεύθυνες για την de novo μεθυλίωση και παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε αναπτυσσόμενα έμβρυα. Οι DNMT3a και DNMT3b καθορίζουν τη μεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια των εμβρυϊκών σταδίων και προσθέτουν καινούριες μεθυλομάδες σε προηγουμένως αμεθυλιωτο DNA [15].

1.2 Τροποποιήσεις ιστονών

Εκτός από τη μεθυλίωση στις CGI νησίδες του DNA, υπάρχουν και άλλοι τρόποι διαμόρφωσης της γονιδιακής έκφρασης. Αυτές είναι οι χημικές τροποποιήσεις των ιστονών. Το γενωμικό DNA είναι πακεταρισμένο γύρω από τις ιστόνες και σχηματίζεται το σύμπλοκο που ονομάζεται χρωματίνη. Η δομική μονάδα της χρωματίνης ονομάζεται νουκλεόσωμα και αποτελείται από 146 ζεύγη βάσεων DNA τυλιγμένα γύρω από ένα οχταμερές το οποίο αποτελείται από 4 κύριες ιστόνες, τις H2A, H2B, H3 και H4. Οι αμινοτελικές ουρές εξέχουν από τη σφαιρική περιοχή των ιστονών και είναι επιδεκτικές σε τροποποιήσεις όπως: ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση και ουβικουιτίνωση [16]. Η τροποποίηση των ιστονών μπορεί μετέπειτα να επηρεάσει διαδικασίες στο DNA όπως η μεταγραφή, η επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA και η οργάνωση των χρωμοσωμάτων.

Σε αντίθεση με την μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορεί να είναι είτε ενεργοποιητικές είτε κατασταλτικές στην έκφραση των γονιδίων. Παραδείγματος χάρη, η μεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4) ενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση ενώ η μεθυλίωση της H3K9, η τριμεθυλίωση της H3K27 και η τριμεθυλίωση της H3K20 αποσιωπούν τη γονιδιακή έκφραση [17].

1.2.1 Ακετυλίωση των ιστονών

Μια πολύ σημαντική τροποποίηση των ιστονών είναι η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών (κυρίως στην ιστόνη H3), η οποία καθορίζει εάν η χρωματίνη είναι στην «ανοικτή» ή «κλειστή» διαμόρφωση. Οι ακετυλιωμένες λυσίνες των ιστονών παρέχουν μια «ανοικτή» διαμόρφωση που είναι προσβάσιμη από το

σύμπλοκο της μεταγραφής, ενώ οι αποακετυλιωμένες λυσίνες χαρακτηρίζουν την «κλειστή» διαμόρφωση της χρωματίνης και αναστέλλουν τη μεταγραφή [18].

Η ακετυλίωση και η αποακετυλίωση των ιστονών ρυθμίζεται από τα ένζυμα ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs) και από τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Υπάρχει πληθώρα HATs και HDACs από τις οποίες αξιοσημείωτες είναι οι: HAT p300, CBP, PCAF και ο GCN5. Οι HAT p300 και CBP ρυθμίζουν την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων, ενώ οι PCAF και GCN5 επιτελούν ακετυλώσεις σε όλο το γονιδίωμα αλλά και μη ιστονικές ακετυλώσεις. Οι HAT p300 και PCAF συχνά επάγουν αυξημένη μεταγραφή γονιδίων σε διαταραχές της φλεγμονής των αεραγωγών, όπως το άσθμα και η COPD, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση γονιδίων σχετιζόμενα με τη φλεγμονή [19].

1.2.2 HDACs

Οι HDACs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενζύμων είναι να αποακετυλιώνουν συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών επάγοντας τη δημιουργία ετεροχρωματίνης η οποία είναι μεταγραφικά ανενεργή. Οι τροποποιήσεις τόσο των HATs όσο και των HDACs είναι αντιστρέψιμες και καθορίζουν τη ρύθμιση της μεταγραφής.

Υπάρχουν τέσσερις τάξεις HDACs: I, II, III και IV. Οι HDACs της τάξης I απομακρύνουν ακετυλομάδες από συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης στο νουκλεόσωμα και η τροποποίηση αυτή επηρεάζει πόσο «σφιχτά» είναι τυλιγμένο το DNA γύρω από αυτή τη δομή. Με τον τρόπο αυτό οι τροποποιήσεις από HDAC μπορούν να επάγουν γονιδιακή αποσιώπηση. Επίσης εμπλέκονται και στην περαιτέρω καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής σε μεθυλιωμένα CpG στον ανάρου των υποκινητών αποσιωπημένων γονιδίων. Συγκεκριμένα, τα μεθυλιωμένα CpG στρατολογούν τις MBDP οι οποίες με τη σειρά τους στρατολογούν HDACs στην ιστόνη οι οποίες καταστέλλουν ακόμη περισσότερο τη μεταγραφή. Οι HDACs της τάξης III εμπλέκονται σε μεταβολικές διαδικασίες ενώ για την τάξη IV δε γνωρίζουμε πολλά πράγματα [20].

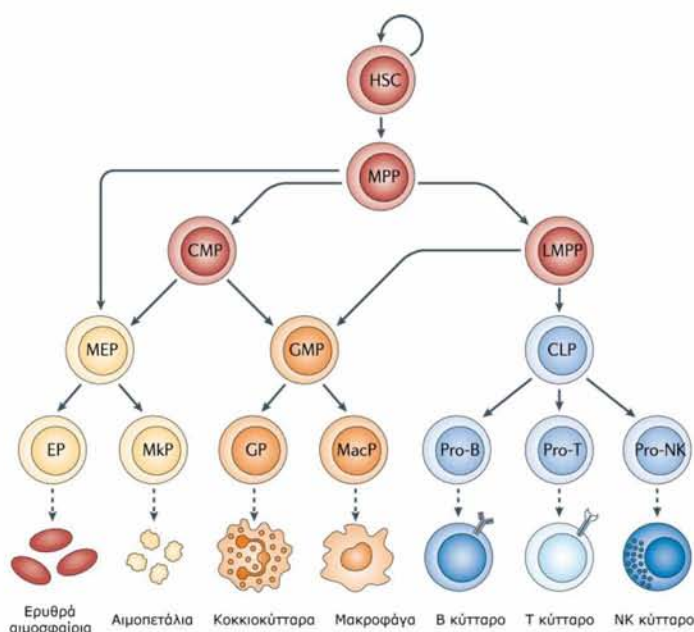
2. Επιγενετική και ανοσιακό σύστημα

Το ανοσιακό σύστημα είναι ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης από τη στιγμή που τα διακριτά στάδια της κυτταρικής διαφοροποίησης των ανοσοκυττάρων μπορούν να απομονωθούν και επειδή οι παράγοντες που καθορίζουν τη διαφοροποίηση είναι μελετημένοι σε μεγάλο βαθμό. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι αυτή η πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία ελέγχεται αλλά και διατηρείται από επιγενετικούς μηχανισμούς. Δεδομένα από τη χρήση καινούριων τεχνικών έχουν αποκαλύψει ότι οι επιγενετικοί «διακόπτες» λειτουργούν σε πολλά διαφορετικά επίπεδα συμπεριλαμβανομένων των τροποποιήσεων των ιστονών, της θέσης του νουκλεοσώματος, της μεθυλίωσης του DNA και του πυρηνικού εντοπισμού. Η συνολική επίδραση των *cis*-δρώντων επιγενετικών παραγόντων είναι να σταθεροποιεί τα αποτελέσματα των *trans*-δρώντων παραγόντων και αυτό με τη σειρά του να καθορίζει την ικανότητα που έχει ένα κύτταρο για διαφοροποίηση αλλά και τη μετακίνηση του προς τα διαφορετικά στάδια της διαδικασίας της διαφοροποίησης.

Το αιμοποιητικό σύστημα είναι οργανωμένο με ιεραρχικό τρόπο και περιλαμβάνει κάποια κομβικά σημεία κυτταρικής διαφοροποίησης τα οποία χαρακτηρίζονται από ενδιάμεση δυναμική διαφοροποίησης προς άλλες γενεαλογικές σειρές (εικόνα 1) [21]. Υπάρχει η άποψη ότι το δίκτυο αυτό είναι σχεδιασμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε τα ενδιάμεσα στάδια διαφοροποίησης (που έχουν μερική δυναμική διαφοροποίησης) να λειτουργούν ως ένας κόμβος ο οποίος είναι προγραμματισμένος ώστε να μπορεί να παρέχει, αενάως, με κύτταρα τις γενεαλογικές σειρές στον κατάρου του γενεαλογικού δικτύου όποτε είναι ανάγκη. Το προαναφερθέν σύστημα έχει και επιγενετική βάση και μερικά από τα επιγενετικά ίχνη που καθορίζουν ή επηρεάζουν τη διαφοροποίηση θα αναφερθούν παρακάτω.

Εικόνα 1: Γενεαλογία της διαφοροποίησης στο αιμοποιητικό.

HSC: αιμοποιητικό εμβρυονικό κύτταρο,
MPP: πολυδύναμος πρόγονος.
CMP: κοινό μυελικό προγονικό κύτταρο.
LMPP: ειδικό για τη λεμφική σειρά πολυδύναμο προγονικό κύτταρο.
MEP: πρόγονος των μεγακαρυοκυττάρων-ερυθρών.
GMP: πρόγονος μακροφάγων-κοκκιοκυττάρων.
CLP: κοινό λεμφικό προγονικό κύτταρο.
EP: πρόγονος των ερυθρών.
MkP: πρόγονος των μεγακαρυοκυττάρων.
GP: πρόγονος των κοκκιοκυττάρων.
MacP: πρόγονος των μακροφάγων.
NK: φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα.



2.1 Καθορισμός της γενεαλογικής σειράς μέσω μεθυλίωσης του DNA

Για κάθε στάδιο της αιμοποίησης έχει γίνει ανάλυση ολικού γονιδιώματος για ανίχνευση προτύπων μεθυλίωσης χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών [22]. Από αυτά τα πειράματα βρέθηκε ότι υπάρχει ένας επιγενετικός προγραμματισμός που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι πολλά γονίδια τα οποία ήταν αρχικά μεθυλιωμένα στα HSC και στα MPP, υφίστανται επιλεκτική απομεθυλίωση ανάλογα με τη γενεαλογία αλλά και ιστο-ειδικά. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το *Lck*, το οποίο υφίσταται απομεθυλίωση στα T-κύτταρα και κωδικοποιεί μια κινάση της οικογένειας SRC η οποία είναι υπεύθυνη για την έναρξη της σηματοδότησης από τον υποδοχέα του T-κυττάρου (TCR). Επίσης παρατηρήθηκε ότι επιλεκτική απομεθυλίωση υφίσταται και ο σχετιζόμενος με την τάξη 2 ΡΟΥ επικράτεια παράγοντας 1 (*Pou2af1*), ο οποίος κωδικοποιεί έναν συνενεργοποιητή, ειδικό για τα B-κύτταρα. Ανιχνεύθηκε πλήθος γονιδίων που απομεθυλιώνονται στα GMP, όπως η μυελοπεροξειδάση (*Mpo*) η οποία κωδικοποιεί ένα ένζυμο απαραίτητο για την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των ουδετερόφιλων αλλά και ο CXC-υποδοχέας χημειοκινών 2 (*Cxcr2*), ο οποίος κωδικοποιεί ένα υποδοχέα χημειοκινών απαραίτητων για την χημειοταξία των τελευταίων [23].

Εκτός από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις απομεθυλίωσης, παρατηρήθηκε και *de novo* μεθυλίωση σε μία ομάδα γονιδίων κατά τη διάρκεια της ειδικής για κάθε σειρά διαφοροποίησης. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το ομόλογο 1 του *dachshund* (*Dach1*), το οποίο βρίσκεται σε «ανοιχτή» χρωματινική διαμόρφωση στα MPP και στα GMP και αποσιωπείται στα CLP και στα διπλά αρνητικά θυμοκύτταρα, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να συνεισφέρει στη μυελοποίηση [24].

Πρόσφατα ευρήματα αποκαλύπτουν ότι η μεθυλίωση του DNA έχει έναν άμεσο ρόλο στη ρύθμιση της αυτο-ανανέωσης των HSC και τη δέσμευση τους προς την λεμφική σειρά και όχι προς τη μυελική. Για να καθοριστεί ο ρόλος της μεθυλίωσης στην αιμοποίηση αντικαταστάθηκε το γονίδιο *Dnmt1*, σε κύτταρα HSC, από ένα υπομορφικό αλληλίο που εκφράζει χαμηλά επίπεδα του ενζύμου. Το αποτέλεσμα ήταν ότι αυτά τα εμβρυονικά κύτταρα όχι μόνο έχασαν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται αλλά επέδειξαν και ανώμαλο πρότυπο διαφοροποίησης με τη διαφοροποίηση υπέρ της μυελικής σειράς να επικρατεί [25,26]. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι υπάρχει μία ομάδα γονιδίων τα οποία, φυσιολογικά, υφίστανται απομεθυλίωση για να ενεργοποιηθεί η μυελική διαφοροποίηση και για αυτό το λόγο πρέπει να παραμείνουν «σιωπηλά» στη λεμφική σειρά. Στα υπομορφικά για το *Dnmt1* κύτταρα, τα γονίδια αυτά μπορεί να υποβάλλονται σε πρόωρη απομεθυλίωση και μεταγραφική ενεργοποίηση, οδηγώντας τα με αυτό τον τρόπο προς μυελική διαφοροποίηση.

2.2 Καθορισμός της γενεαλογικής σειράς μέσω τροποποίησης ιστονών

Όπως και με τη μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών έχουν βρεθεί ότι ρυθμίζουν την καταστολή γονιδίων και ότι έχουν βασικό ρόλο στον καθορισμό της γενεαλογίας. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί ο έλεγχος της μεταγραφής από το σύμπλοκο καταστολής Polycomb. Το σύμπλοκο καταστολής Polycomb 2 (PRC2) μεσολαβεί την καταστολή μέσω της ενζυματικής ενεργότητας, ενός των συστατικών του, της μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών EZH2 η οποία προωθεί την μεθυλίωση της H3K27. Η μεθυλίωση της H3K27 έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του PRC1 το οποίο μεσολαβεί τον τοπικό σχηματισμό ετεροχρωματίνης [27,28]. Υπάρχει η πεποίθηση ότι το νουκλεοτιδικό περιεχόμενο είναι σημαντικό για τη στρατολόγηση του συμπλόκου Polycomb σε συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές.

Στα εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα, πολλές από αυτές τις αλληλουχίες έχουν δισθενή χρωματινική κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριμεθυλιωμένης H3K4 (H3K4m3) που σχετίζεται με την ενεργοποίηση καθώς και H3K27m3 η οποία σχετίζεται με την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης [29,30]. Υπάρχει η άποψη ότι αυτή η δομή παρέχει έναν ευέλικτο σκελετό που επιτρέπει σε αυτά τα γονίδια είτε να ενεργοποιηθούν χάνοντας την κατασταλτική H3K27m3 διαμόρφωση είτε να υποβληθούν σε περαιτέρω καταστολή χάνοντας την H3K4m3. Έχει περιγραφεί ότι και τα αιμοποιητικά εμβρυονικά κύτταρα ενηλίκων περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό «δισθενών» νουκλεοτιδικών αλληλουχιών οι οποίες, με την προαγωγή της γενεαλογικής δέσμευσης, υποβάλλονται σε περαιτέρω τροποποιήσεις. Με τον τρόπο αυτό, μειώνεται ο αριθμός των «δισθενών» γονιδιακών τόπων στους διαφοροποιημένους κυτταρικούς τύπους [31,32]. Εναλλακτικά, είναι πιθανό ότι τα HSCs περιέχουν από μόνα τους έναν αριθμό υποπληθυσμών που περιέχουν διαφορετική σήμανση ιστονών σε τέτοιους γονιδιακούς τόπους. Κύρια ρυθμιστικά γονίδια των αιμοποιητικών κυττάρων όπως το Pax5 και ο Ebf1 έχουν ξεκάθαρα μία «δισθενή» κατάσταση μεθυλίωσης των ιστονών στα HSCs, ενώ ρυθμιστικά γονίδια που εμπλέκονται με τη διαφοροποίηση μη-αιμοποιητικών γενεαλογιών (Sox3, Myod1) είναι σεσημασμένα αποκλειστικά με H3K27m3 παρόλο που ήταν σε «δισθενή» κατάσταση στα εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα [33]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα γονίδια που καθορίζουν την αιμοποιητική γενεαλογία είναι ειδικά «διεγερμένα» στα HSCs προς τη μετέπειτα ενεργοποίησή τους κατά τη διαφοροποίηση.

2.3 Επιγενετική ρύθμιση του V(D)J ανασυνδυασμού

Οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης που παρέχουν αυξημένη προσβασιμότητα από μεταγραφικούς παράγοντες προηγούνται του V(D)J ανασυνδυασμού, τόσο στα B όσο και στα T-κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές επιτυγχάνονται βάση ενός προκαθορισμένου προγράμματος, ειδικού για κάθε γονιδιακό τόπο, γονιδιακού ανασυνδυασμού. Στο γονιδιακό τόπο της βαριάς αλύσου των ανοσοσφαιρινών, η αυξημένη προσβασιμότητα

επέρχεται πρώτα στην περιοχή που περιλαμβάνει τα τμήματα των D και J και μόνο έπειτα από τον ανασυνδυασμό αυτής της περιοχής γίνεται προσβάσιμη η περιοχή V για τον V(D)J ανασυνδυασμό [34,35]. Επιπλέον, εντός της περιοχής D, η προτίμηση για συγκεκριμένα D τμήματα καθορίζεται από την προ-σήμανση με ιστονικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με την ενεργή κατάσταση [36].

Η ίδια στρατηγική φαίνεται ότι καθορίζει και την προσβασιμότητα τμημάτων του γονιδιακού τόπου IGK της ελαφριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών. Η IGK J (J_k) περιοχή περιέχει ακετυλιωμένες ιστόνες και μεθυλιωμένη H3K4 που σχετίζονται με την μεταγραφή (της βλαστικής σειράς) τόσο στα pro-B κύτταρα, όσο και στα large pre-B κύτταρα, πολύ πριν την έναρξη του ανασυνδυασμού στο μικρό πληθυσμό των pre-B κυττάρων [37,38]. Εντυπωσιακή είναι η ανακάλυψη ότι το RAG2 περιέχει ένα δάκτυλο ομοιοεπικράτειας (PHD) που αναγνωρίζει τη μεθυλιωμένη H3K4, μία αλληλεπίδραση η οποία διεγείρει την ενζυματική ενεργότητα των πρωτεϊνών RAG. Μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκειες και οι οποίες ακυρώνουν την παραπάνω αναγνώριση βλάπτουν σοβαρά την ικανότητα V(D)J ανασυνδυασμού *in vivo* [39,40]. Μελέτες *in vivo* έχουν δείξει ότι το RAG2 συνδέεται στα τμήματα του γονιδίου J και στα παρακείμενα του γονιδίου D σε σημεία που συμπίπτουν με την κατανομή της τριμεθυλιωμένης H3K4, υποδεικνύοντας ότι ο συγκεκριμένος επιγενετικός δείκτης μπορεί να καθορίζει και τη σειρά με την οποία συμβαίνει ο ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών [41].

2.4 Επιγενετική ρύθμιση του αλληλικού αποκλεισμού (allelic exclusion)

Η παραγωγή του αντιγονικού υποδοχέα σε κυτταρικούς κλώνους της λεμφικής σειράς γίνεται από τον ανασυνδυασμό και τη μεταγραφή ενός μόνο αλληλίου. Οι αρχικές μελέτες είχαν προτείνει ότι ο μηχανισμός του ανασυνδυασμού αλληλεπιδρά με ένα αλλήλιο με στοχαστικό τρόπο και ότι αυτό οδηγεί στη παραγωγή μιας μοναδικής πρωτεΐνης υποδοχέα η οποία μετέπειτα λειτουργεί ως σήμα αναστολής του ανασυνδυασμού στο δεύτερο αλλήλιο [42]. Ένα άλλο μοντέλο που προτάθηκε ήταν ότι το ένα αλλήλιο σε κάθε κύτταρο είναι προεπιλεγμένο προς ανασυνδυασμό. Πράγματι αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται από έναν αξιοσημείωτο όγκο αποτελεσμάτων τα οποία και δείχνουν ότι το κάθε αλλήλιο επισημαίνεται κατά προτίμηση επιγενετικά πριν τον ανασυνδυασμό [43,44,45].

Στην περίπτωση του γονιδιακού τόπου της β-αλυσίδας του T-κυτταρικού υποδοχέα, ένα αλλήλιο είτε συνδέεται με το πυρηνικό έλασμα, είτε σχετίζεται με ετεροχρωματίνη ενώ το άλλο αλλήλιο είναι διαθέσιμο για ανασυνδυασμό [46]. Όσον αφορά τη B κυτταρική σειρά, είναι γνωστό ότι ένα IGK αλλήλιο «πακετάρεται» με ακετυλιωμένες ιστόνες σε πολύ πρώιμο στάδιο της λεμφικής ανάπτυξης ενώ το άλλο αλλήλιο σχετίζεται με ετεροχρωματίνη [37,43] μέσω *cis*-δρώντων στοιχείων τα οποία αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Ikaros [47]. Τέλος, έχει δειχθεί ότι μόνο το «ενεργό» αλλήλιο υφίσταται, μετέπειτα, απομεθυλίωση για την έναρξη του πρώτου γεγονότος ανασυνδυασμού [48].

3. Επιγενετική της μνημονικής T-κυτταρικής απάντησης

3.1 Επιγενετική ρύθμιση στα T-κύτταρα μνήμης

Εκτιμάται ότι τα διακριτά και διατηρούμενα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης ελέγχονται από επιγενετικές αλλαγές σε επίπεδο χρωματίνης [49,50]. Η φύση και ο σκοπός των επιγενετικών αλλαγών κατά τη διάρκεια της T-κυτταρικής μνήμης βρίσκονται αυτή την περίοδο υπό εντατική μελέτη [51]. Οι χημικές τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών είναι οι περισσότερο μελετημένες επιγενετικές αλλαγές. Η διαμόρφωση της χρωματίνης είναι δυναμική και παρουσιάζει διαφορές ανά περιοχές (ή και γονίδια) των χρωμοσωμάτων [52,53,54]. Η χρωματίνη απαντάται σε δύο βασικές καταστάσεις: μία «ανοιχτή» χρωματινική κατάσταση (ευχρωματίνη) η οποία είναι προσβάσιμη σε πρωτεΐνες που συνδέονται στο DNA (όπως μεταγραφικοί παράγοντες, μεταγραφικοί ενεργοποιητές ή καταστολείς καθώς και RNA πολυμεράση) και έτσι διευκολύνει τη μεταγραφή και μία «κλειστή» χρωματινική κατάσταση (ετεροχρωματίνη) η οποία στερείται προσβασιμότητας από τον μηχανισμό της μεταγραφής και λόγω αυτού σχετίζεται με τη γονιδιακή αποσιώπηση. Αρκετοί επιγενετικοί δείκτες έχουν ταυτιστεί και συνδεθεί με συγκεκριμένες χρωματινικές καταστάσεις και με τα επίπεδα της μεταγραφής [49].

3.2 DNA μεθυλίωση και μεταγραφή στα T-κύτταρα μνήμης

Η μεθυλίωση των CGI των γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες και τους υποδοχείς τους, μόρια τελεστές και τους ρυθμιστές τους, είναι στόχος μελέτης εδώ και πολλά χρόνια για τα T-κύτταρα μνήμης. Στα CD4+ T-κύτταρα μνήμης, έχει παρατηρηθεί ότι τα γονίδια του υποδοχέα χημειοκινών με μοτίβο C-C τύπου 6 (CCR6) και του RAR σχετιζόμενου ορφανού υποδοχέα C (RORC) καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν συνδέτες για την P και E-σελεκτίνη είναι υπομεθυλωμένα σε αντίθεση με τα παρθένα CD4+ T-κύτταρα όπου αυτοί οι γονιδιακοί τόποι είναι υπερμεθυλωμένοι [55,56,57]. Αντίστοιχα παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση CCR6 και RORC σε μνημονικά T-κύτταρα σε σχέση με τα παρθένα T-κύτταρα. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι μετά από ενεργοποίηση τα CD8+ T-κύτταρα μνήμης παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης στους γονιδιακούς τόπους της ιντερφερόνης γ (*IFNG*) και της ιντερλευκίνης 2 (*IL-2*) και συνακολούθως υψηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα IFNG και IL2 [58,59]. Επιπλέον, κατόπιν ενεργοποίησης, παρατηρείται ταχύτατη απομεθυλίωση στους υποκινητές των προαναφερθέντων γονιδίων στα CD8+ T-κύτταρα μνήμης και όχι στα παρθένα CD8+ T-κύτταρα [60]. Παρόμοιες δυναμικές αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA ανιχνεύθηκαν στο γονιδιακό τόπο του υποδοχέα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 (*Pdcd1*), ενός βασικού ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της εξάντλησης, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των CD8+ T-κυττάρων από παρθένα σε δραστικά και έπειτα σε μνημονικά, έπειτα από ιική μόλυνση [61].

Καθώς η κατάσταση μεθυλίωσης ενός ήρεμου μνημονικού T-κυττάρου είναι σταθερή και μεταφέρεται από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά κατά την κυτταρική διαίρεση, το χαρακτηριστικό της αυξημένης ή βασικού επιπέδου έκφρασης διατηρείται στους απογόνους των T-κυττάρων μνήμης. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η κατάσταση μεθυλίωσης ενός γονιδίου σχετιζόμενο με τον κυτταρικό θάνατο (*Noxa*) επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης των μνημονικών CD4+ T-κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η καταστολή της έκφρασης του *Noxa*, μέσω της μεθυλίωσης του DNA, είναι απαραίτητη για την επιβίωση αυτών των κυττάρων [62].

Είναι εμφανές ότι η μεθυλίωση του DNA έχει ένα βασικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των μνημονικών T-κυττάρων. Ωστόσο, το πλήρες εύρος της συμμετοχής της μεθυλίωσης του DNA στη διαφορική έκφραση των γονιδίων των μνημονικών T-κυττάρων απομένει να καθοριστεί. Από μια πρόσφατη ανάλυση ολικού γονιδιώματος, των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA κατά τη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων, παρατηρήθηκε μια σημαντική αλλαγή στη μεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της διαφοροποίησης ενώ αντίστοιχα παρατηρήθηκαν μικρότερες αλλαγές στα τελευταία στάδια της διαφοροποίησης [63]. Είναι έτσι πιθανό ότι οι αλλαγές στην κατάσταση μεθυλίωσης, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης ενός T-κυττάρου από παρθένο σε μνημονικό, μπορεί να είναι περιορισμένες σε γονίδια «κλειδιά» για τη λειτουργία των μνημονικών T-κυττάρων, όπως οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες καθώς και οι ρυθμιστές τους.

3.2.1 Τροποποιήσεις ιστονών και γονιδιακή έκφραση στα μνημονικά T-κύτταρα

Παρόμοια με τη μεθυλίωση του DNA, η ακετυλίωση των ιστονών έχει μελετηθεί σε γονίδια κυτταροκινών κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των CD4+ μνημονικών T-κυττάρων [64,65]. Η υπερακετυλίωση των ιστονών έχει συνδεθεί με την ενεργή διαμόρφωση χρωματίνης και συναντάται στους υποκινητές των γονιδίων της *IFNG* και της ιντερλευκίνης 4 (*IL4*) στα μνημονικά T βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (Th1) και τύπου 2 (Th2) αντίστοιχα [66,67]. Ομοίως, παρατηρείται υπερακετυλίωση των ιστονών στους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες (όπως η *IFNG*), δραστικά μόρια [όπως το κοκκιοένζυμο B (*GZMB*) και η περφορίνη (*PRF1*)] και στους ρυθμιστές αυτών στα CD8+ μνημονικά T-κύτταρα [68,69,70]. Ακόμη πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι τεχνητή πρόκληση υπερακετυλίωσης ή υποακετυλίωσης στους προαναφερθέντες γονιδιακούς τόπους επιφέρει αύξηση ή μείωση αντίστοιχα, της έκφρασής τους στα CD8+ T-κύτταρα. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η ακετυλίωση των ιστονών σε αυτούς τους δραστικούς γονιδιακούς τόπους είναι απαραίτητη για την επαυξημένη έκφραση των προϊόντων τους στα μνημονικά T-κύτταρα, παρέχοντας έτσι απόδειξη ότι η κατάσταση ακετυλίωσης των ιστονών ρυθμίζει τη δράση των μνημονικών T-κυττάρων.

3.2.2 Τροποποιήσεις ιστονών και γονιδιακή έκφραση στα CD4+ μνημονικά T-κύτταρα

Αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης και της μεθυλίωσης των ιστονών σε όλο το γονιδίωμα [συγκεκριμένα της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4) και της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27)] έδειξαν μια συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με την κατανομή της μεθυλίωσης των ιστονών. Συγκεκριμένα η H3K4m3 συνδέεται θετικά και η H3K27m3 αρνητικά με την έκφραση των γονιδίων [71,72]. Κατά τη διαφοροποίηση ενός παρθένου CD4+ T-κυττάρου σε δραστικό αλλάζει η κατάσταση της χρωματίνης στο γονιδιακό τόπο που κωδικοποιεί τον ειδικό για κάθε υπότυπο μεταγραφικό παράγοντα, που κατευθύνει τη διαφοροποίηση προς την κατεύθυνση του συγκεκριμένου υποτύπου δραστικών T-κυττάρων (και οι οποίοι είναι: ο TBX21 για τα Th1, ο GATA3 για τα Th2, ο RORC για τα Th17 και ο FOXP3 για τα ρυθμιστικά T-κύτταρα), με τέτοιο τρόπο ώστε η αρχικά «κλειστή» διαμόρφωση της χρωματίνης (υψηλά επίπεδα H3K27m3 και χαμηλά επίπεδα H3K4m3) να δίνει τη θέση της στην «ανοιχτή» (υψηλά επίπεδα H3K4m3 και χαμηλά επίπεδα H3K27m3) που επιτρέπει την προσπέλαση από τον μεταγραφικό μηχανισμό [72,73]. Στα μνημονικά CD4+ T-κύτταρα, έχει παρατηρηθεί μεθυλίωση των ιστονών H3 και H4 στους γονιδιακούς τόπους της IL-4 και IL-13 καθώς και ταυτόχρονη μεθυλίωση της H3K4 στον γονιδιακό τόπο *GATA-3* ο οποίος κωδικοποιεί τον κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή της IL-4 και καθορίζει το επίπεδο έκφρασής της [67,74]. Τέλος, η παραγωγή των Th2 σχετιζόμενων κυτταροκινών επηρεάζεται από τη μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών HRX (η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *MLL* και καταλύει τη μεθυλίωση των ιστονών H3 και H4). Στα CD4+ T μνημονικά κύτταρα, η μειωμένη έκφραση της HRX έχει ως επακόλουθο μειωμένα επίπεδα διμεθυλίωσης της ιστόνης H3K4 στους γονιδιακούς τόπους *GATA3* και *IL-4* και συνεπώς μειωμένη έκφραση του *GATA-3* και της IL-4 [75]. Αθροιστικά, τα παραπάνω ευρήματα καταδεικνύουν ότι η μεθυλίωση των ιστονών επηρεάζει την «ανοιχτή» και «κλειστή» χρωματινική κατάσταση και έτσι ρυθμίζει τη διαφορική έκφραση γονιδίων «κλειδίων» στα μνημονικά CD4+ T-κύτταρα.

3.2.3 Τροποποιήσεις ιστονών και γονιδιακή έκφραση στα CD8+ μνημονικά T-κύτταρα

Αναλύσεις μεθυλίωσης των ιστονών ολικού γονιδιώματος (συγκεκριμένα της H3K4me3 και της H3K27m3) στα μνημονικά CD8+ T-κύτταρα σε ανθρώπους [71] και σε ποντίκια [76], έχουν δείξει ότι γονίδια που σχετίζονται με δραστικές λειτουργίες (όπως τα *PRDM1*, *KLRG1*, *Ifng* και *GzmB*) έχουν υψηλά επίπεδα H3K4m3 και χαμηλά επίπεδα H3K27m3. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι ορισμένα γονίδια «κλειδιά» [όπως ο αναστολέας της DNA σύνδεσης 2 (*ID2*)] για την επιβίωση των μνημονικών CD8+ T-κυττάρων έπειτα από ενεργοποίηση [77], έχουν «ανοιχτή» διαμόρφωση χρωματίνης παρόλο που παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα mRNA στα ηρεμούντα μνημονικά CD8+ T-κύτταρα (μία κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται ως «κατάσταση ετοιμότητας» [71]. Αυτά τα ευρήματα

θέτουν μία μοριακή βάση για την άμεση και αυξημένη έκφραση γονιδίων που βρίσκονται σε κατάσταση «ετοιμότητας» που παρατηρείται έπειτα από την ενεργοποίηση των μνημονικών T-κυττάρων. Επιπροσθέτως, η «δισθενής» χρωματίνη (η οποία περιλαμβάνει τροποποιήσεις ιστονών που σχετίζονται τόσο με «ανοιχτή» όσο και με «κλειστή» χρωματινική διαμόρφωση) βρίσκεται πρώτα απ' όλα στα αρχέγονα κύτταρα και πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των πρώτων έπειτα από σήματα διαφοροποίησης [78,79]. Η «δισθενής» χρωματίνη έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς γονιδιακούς τόπους και στα μνημονικά T-κύτταρα. Για παράδειγμα, στο γονιδιακό τόπο *KIAA1804* (ο οποίος σχετίζεται με τη σηματοδότηση του TLR4) υπάρχει η «δισθενής» χρωματινική κατάσταση η οποία αλλάζει σε «ανοιχτή» χρωματινική κατάσταση και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το προαναφερθέν γονίδιο εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα έπειτα από ενεργοποίηση των μνημονικών CD8+ T-κυττάρων [71,80]. Με αυτόν τον τρόπο, έχει προταθεί ότι γονίδια που βρίσκονται σε «δισθενή» χρωματινική κατάσταση στα μνημονικά T-κύτταρα θα μπορούσαν πιο γρήγορα να αναλάβουν μια «ανοιχτή» χρωματινική διαμόρφωση και να σηματοδοτήσουν την έναρξη της μεταγραφής ως επακόλουθο της ενεργοποίησης των T-κυττάρων σε σχέση με γονίδια που βρίσκονται υπό «κλειστή» χρωματινική διαμόρφωση.

Είναι σαφές ότι οι προαναφερθείσες επιγενετικές καταστάσεις παρέχουν έναν τρόπο για να ρυθμιστεί η γονιδιακή έκφραση που οδηγεί την λειτουργία των ηρεμούντων μνημονικών κυττάρων έπειτα από αντιγονική ενεργοποίηση. Μέχρι τώρα δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν οι συγκεκριμένες καταστάσεις είναι αμετάβλητες ιδιότητες των μνημονικών T-κυττάρων ή μπορούν να αλλάξουν και είναι εύλογο ότι οι παραλλαγές αυτών των επιγενετικών καταστάσεων θα μπορούσαν να είναι μία πηγή της ετερογένειας που παρατηρείται στους υποπληθυσμούς των μνημονικών T-κυττάρων. Στη φάση της διαφοροποίησης των CD4+ T-κυττάρων υπάρχει συσσώρευση ενδείξεων για την πλαστικότητα που χαρακτηρίζει τους υποπληθυσμούς των βοηθητικών T-κυττάρων [81,82].

4. Επιγενετική θεραπεία

4.1 Αναστολείς των DNMTs

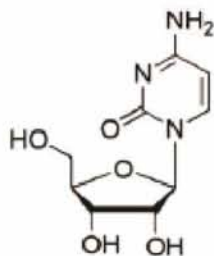
Όπως προαναφέρθηκε, η υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά σε καρκίνους. Όμως η υπερμεθυλίωση είναι ένα αντιστρεπτό φαινόμενο και η απομεθυλίωση των παραπάνω αποτελεί μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για τη θεραπεία. Έχουν περιγραφεί πολλοί αναστολείς των DNMTs και μπορούν να χωριστούν αδρά σε δύο κατηγορίες: τα νουκλεοσιδικά ανάλογα τα οποία είναι γνωστά εδώ και πολλά χρόνια και έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και τα μη-νουκλεοσιδικά ανάλογα, η δομή των οποίων ποικίλει ανάλογα με τον μηχανισμό που αναστέλλουν (Εικόνα 4[83]).

4.1.1 Νουκλεοσιδικά ανάλογα

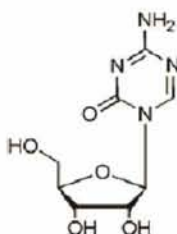
4.1.1.1 Αζακυτιδίνη και 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη

Τα πρώτα μόρια που χαρακτηρίστηκαν ως αναστολείς των DNMTs (DNMTi) χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως αντιμεταβολίτες και κυτταροτοξικοί παράγοντες σε θεραπείες λευχαιμιών [84]. Το 1977 και το 1978, ο Κωνσταντινίδης και συν. έφεραν στο φως τις απομεθυλιωτικές τους ιδιότητες, οι οποίες οδηγούσαν τη διαφοροποίηση των 10T1/2 κυττάρων (κλωνική εμβρυονική κυτταρική σειρά από ποντίκι) σε λειτουργικά ραβδωτά μυϊκά κύτταρα. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω μελέτες ήταν η 5'-αζακυτιδίνη (αζακυτιδίνη) και η 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (ντεσιταμπίνη), δύο ανάλογα κυτιδίνης στα οποία το άτομο του άνθρακα στην 5η θέση έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο αζώτου το οποίο είναι συνδεδεμένο με μια ριβόζη και μια δεοξυριβόζη αντίστοιχα [85,86] (Εικόνα 4). Την ανακάλυψη αυτή ακολούθησε η σύνθεση πολλών διαφορετικών αναλόγων, δύο από τα οποία είναι η 5,6-δίυδρο-5-αζακυτιδίνη και η 5-φθόρο-2'-δεοξυκυτιδίνη [87]. Τα ανάλογα αυτά μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων από τη μεταφοράση hCNT1 και υφίστανται φωσφορυλίωση η οποία ακολουθείται από μετατροπή στην ενεργή τριφωσφορική μορφή τους. Τα ανάλογα νουκλεοτιδίων ριβόζης (όπως η αζακυτιδίνη) ενσωματώνονται τόσο στο RNA, όσο και στο DNA (μετά από δέοξυ-μετατροπή) ενώ τα ανάλογα νουκλεοτιδίων δεοξυριβόζης ενσωματώνονται μόνο στο DNA. Για να έχουν δράση οι παραπάνω ουσίες, πρέπει να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα, διαδικασία που συμβαίνει στην φάση S του κυτταρικού κύκλου όπου αντιγράφεται το DNA. Η παραπάνω ιδιότητα τους δίνει κάποια ειδικότητα για κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα, όπως τα καρκινικά [88]. Από τη στιγμή που τα νουκλεοσιδικά ανάλογα ενσωματώνονται στο DNA αναγνωρίζονται από τις DNMT και όπως και για τις φυσιολογικές κυτοσίνες, σχηματίζεται ενδιάμεση ομοιοπολική σύνδεση ανάμεσα στην καταλυτική κυστεΐνη του ενζύμου και στην έκτη θέση του αναλόγου της κυτοσίνης (Εικόνα 5[83]).

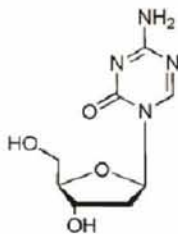
Κυτιδίνη



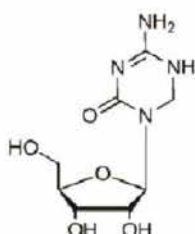
Νουκλεοσιδικά ανάλογα



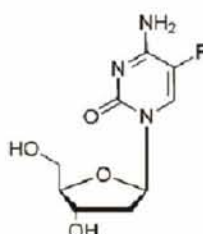
5-αζακυτιδίνη



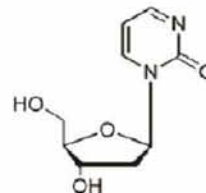
5-αζα-5,6-διυδροκυτιδίνη



5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη



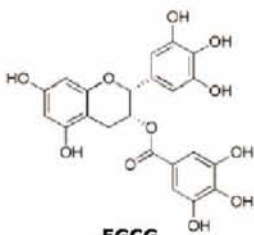
5-φθόριο-2'-δεοξυκυτιδίνη



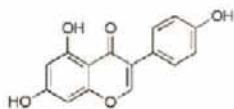
Ζεμπουλαρίνη

Μη Νουκλεοσιδικά ανάλογα

Φλαβονοειδή

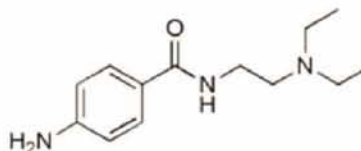


EGCG
(επιγαλοκατεχίνη)

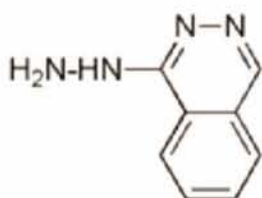


Γκενιστεΐνη

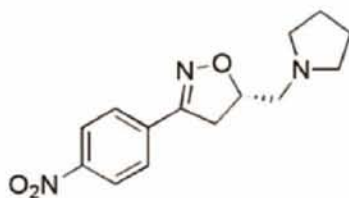
Προκαΐναμιδη



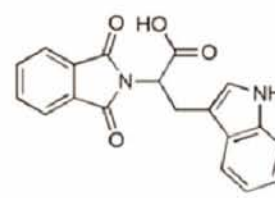
Διάφορα



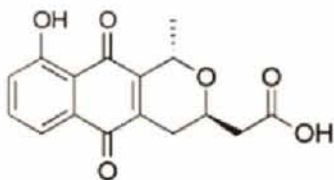
Υδραλαζίνη



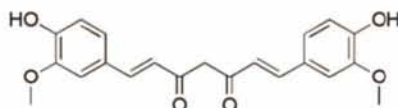
Οξαζολίνη



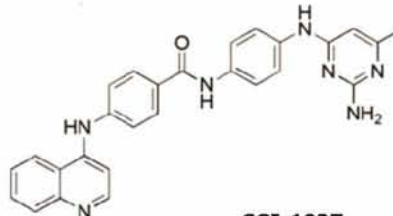
RG108



Νανομυκίνη Α



Κουρκουμίνη



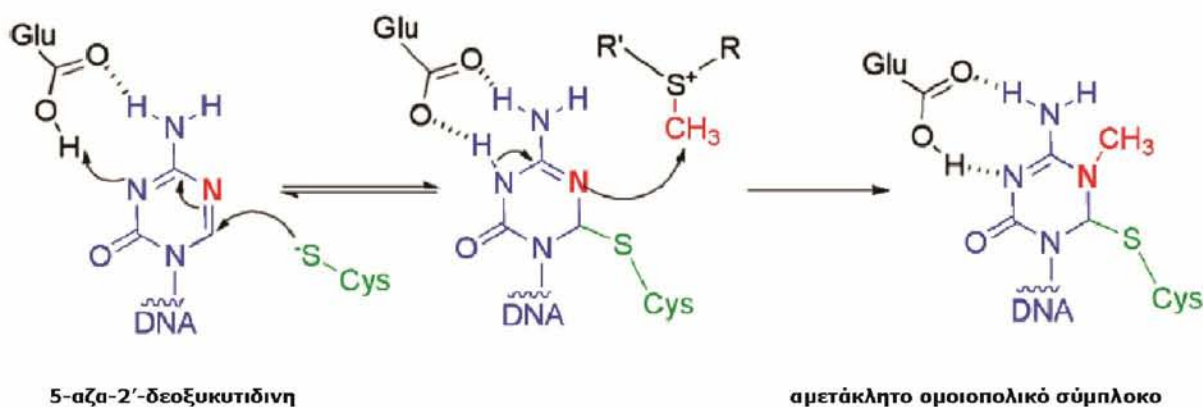
SGI-1027

Εικόνα 4: Νουκλεοσιδικά και μη νουκλεοσιδικά ανάλογα.

Εντούτοις, σε αντίθεση με την κυτοσίνη, η αντίδραση β-εξασθένισης (διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού) δε μπορεί να συμβεί εξαιτίας της παρουσίας του ατόμου του αζώτου στην πέμπτη θέση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα αμετάκλητο ομοιοπολικό σύμπλοκο [89]. Τέλος, η παγίδευση του ενζύμου πυροδοτεί την πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Ο ίδιος μηχανισμός χαρακτηρίζει και την 5-φθόρο-2'-δεοξυκυτιδίνη.

Η χορήγηση των νουκλεοσιδικών αυτών αναλόγων γινόταν στη μέγιστη ανεκτή δόση με πολλές παρενέργειες όπως η μυελοκαταστολή. Βρέθηκε όμως ότι τα φάρμακα αυτά διατηρούν και σε χαμηλές δόσεις την απομεθυλιωτική τους ικανότητα και για αυτό χρησιμοποιούνται πλέον σε μειωμένες δόσεις με μείωση των παρενεργειών [90].

Η ντεσιταμπίνη έχει μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με την αζακυτιδίνη [91], πράγμα ευνόητο, αν σκεφτούμε ότι τα ανάλογα ριβονουκλεοτιδίων εκτός από το ότι αναστέλλουν τις DNMT ενσωματώνονται και στο RNA, μειώνοντας το ποσοστό ενσωμάτωσης στο DNA και διαταράσσοντας την πρωτεϊνσύνθεση. Το παραπάνω εξηγεί και γιατί η ντεσιταμπίνη έχει και λιγότερες δευτερεύουσες επιδράσεις από την αζακυτιδίνη αφού η τελευταία μπορεί να ενσωματωθεί όχι μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα αλλά και σε ηρεμούντα κύτταρα [92].



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης της αζακυτιδίνης και της 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνης.

4.1.1.2 Ζεμπουλαρίνη

Η ζεμπουλαρίνη είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο που έχει εγγενή ικανότητα αναστολής της απαμίνωσης και αναστέλλει τις DNMTs με ελαφρώς διαφορετικό τρόπο από αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω [93]. Έχει αποδειχθεί ότι οι DNMTs συνδέονται με μεγαλύτερη συγγένεια σε DNA που έχει ενσωματώσει ζεμπουλαρίνη σε σχέση με μη τροποποιημένο DNA και σε σχέση με DNA που έχει ενσωματώσει 5-φθόρο-2'-δεοξυκυτιδίνη. Ωστόσο, το ομοιοπολικό ενδιάμεσο σύμπλοκο δεν είναι αμετάκλητο αλλά αναστρέψιμο και ευαίσθητο στη θερμότητα [94]. Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης με μία DNMT, έπειτα από τη δημιουργία του ομοιοπολικού ενδιάμεσου συμπλόκου στην έκτη θέση του δακτυλίου της ζεμπουλαρίνης, η απουσία αμινομάδας στην τέταρτη θέση της ζεμπουλαρίνης εμποδίζει την ενεργοποίηση της πέμπτης θέσης και δεν επιτρέπει τη μεθυλίωση. Με τον τρόπο αυτό, σταθεροποιείται το σύμπλοκο DNMT-DNA και καθυστερείται ο διαχωρισμός τους. Συγκρινόμενη με τα άλλα νουκλεοσιδικά ανάλογα, η ζεμπουλαρίνη χρησιμοποιείται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για να επιτύχουμε το ίδιο επίπεδο απομεθυλίωσης σε κύτταρα. Από την άλλη επιδεικνύει χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα. Τέλος, πρέπει να σημειώσουμε ότι δεν έχουν δημοσιευτεί πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη της ζεμπουλαρίνης κλινικά.

4.1.1.3 Κλινικά αποτελέσματα

Από όλα τα νουκλεοσιδικά ανάλογα – αναστολείς των DNMTs που περιγράφηκαν, η 5'-αζακυτιδίνη και η 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη εγκρίθηκαν από τον FDA το 2004 και το 2006 για τη θεραπεία MDS και AML αντίστοιχα με μια την 5'-αζακυτιδίνη να έχει έγκριση και για τη θεραπεία της Χρόνιας Μυελομονοκυτταρικής Λευχαιμίας (CMML) [95]. Οι εμπορικές ονομασίες των σκευασμάτων είναι: Dacogen για τη ντεσιταμπίνη (5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη) και Vidaza για την 5'-αζακυτιδίνη. Περαιτέρω κλινικές μελέτες σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα βρίσκονται σε εξέλιξη. Η αζακυτιδίνη και η ντεσιταμπίνη βρίσκονται στη φάση II κλινικών μελετών για συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος, καρκίνο του προστάτη και των ωοθηκών, και σε συνδυασμό με HDACi σε μελέτες έναντι μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και μεταστατικών μελανωμάτων [93,96]. Παρόλη την υψηλή δραστηριότητά τους, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, η αστάθειά τους σε φυσιολογικό περιβάλλον και πάνω από όλα η υψηλή τοξικότητά τους περιορίζουν τη χρήση τους [92]. Παρόλα αυτά, πρόσφατα, ο συνδυασμός χαμηλής δόσης αζακυτιδίνης και του HDACi etinostat, έδειξε πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα σε ασθενείς με μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [97].

4.1.2 Μη νουκλεοσιδικά ανάλογα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ανακύψει πρόσφατα για τα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα, των οποίων ο μηχανισμός δράσης δεν βασίζεται στην ενσωμάτωση στο DNA. Για τις περισσότερες από αυτές τις ουσίες έχει βρεθεί ήδη μια άλλη βιολογική δράση απέναντι άλλων στόχων που δεν είναι DNMTs [Εικόνα 4]. Σε αυτή την κατηγορία εμπίπτουν η υδραλαζίνη, η προκαΐναμίδη, το EGCG και η ψαμπαπλίνη A [93].

4.1.2.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι οργανικά παρασκευάσματα φυτικής κυρίως προέλευσης τα οποία και εξυπηρετούν πολυάριθμες λειτουργίες. Το πιο καλά μελετημένο φλαβονοειδές είναι η επιγκαλοκατεχίνη-3-0-gallate(όλη) (EGCG). Η EGCG είναι η κύρια πολυφαινόλη του πράσινου τσαγιού και οι προληπτικές αντικαρκινικές της ιδιότητες αλλά και οι στόχοι της (πρωτεϊνικές κινάσες και υψηλής δραστηριότητας υπεροξειδία του υδρογόνου) αναφέρονται στην βιβλιογραφία εδώ και πολλά χρόνια [98,99,100].

Ένα άλλο γνωστό μόριο αυτής της κατηγορίας είναι η γκενιστεΐνη. Η γκενιστεΐνη θεωρείται πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας εξαιτίας της *in vitro* δράσης που έχει έναντι ενζύμων όπως οι κινάσες τυροσίνης, το πρωτοογκογονίδιο HER-2, η τοποϊσομεράση I και II, η κινάση ιστιδίνης πρωτεϊνών. Είναι επίσης γνωστό ότι προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη μετάβαση από τη φάση G2 προς την M [101,102].

Προσφάτως, η γκενιστεΐνη και η EGCG χαρακτηρίστηκαν ως κυτταρικοί αναστολείς των DNMTs, αφού φάνηκε ότι μπορούν να απομεθυλιώσουν τους υποκινητές των RARb, p16^{INK4A} και του MGMT πράγμα που οδηγεί σε επανέκφραση αυτών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [103,104,105]. Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται σε έμμεση αναστολή των DNMTs. Ειδικότερα, αποτελούν υπόστρωμα για μια μεθυλοτρανσφεράση (COMT) που είναι SAM εξαρτώμενη και καθώς μεθυλιώνει τα φλαβονοειδή, η συγκέντρωση του SAH αυξάνεται. Η ενδοκυττάρια ισορροπία SAM:SAH διαταράσσεται και το SAH όντας ικανός αναστολέας των DNMTs δεν επιτρέπει στις DNMTs να μεθυλιώσουν [106,107].

Τα δύο αυτά φλαβονοειδή θεωρούνται ως χημειοπροστατευτικά παρά θεραπευτικά φάρμακα, παρόλο που ο μεταβολισμός τους μειώνει δραστικά την βιοδιαθεσιμότητά τους και μειώνει τη δραστηριότητά τους [101].

4.1.2.2 Υδραλαζίνη

Η υδραλαζίνη χρησιμοποιείται στη θεραπεία της υπέρτασης και οι δευτερεύουσες επιδράσεις της επέτρεψαν την ανακάλυψη της δράσης που έχει ως αναστολέας των DNMTs. Παρόλο που χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια, ο μηχανισμός δράσης της

παραμένει άγνωστος. Όταν χορηγείται σε ασθενείς, η υδραλαζίνη επάγει τον ερυθρωματώδη λύκο [108] και αυτή η αυτοάνοση νόσος συνδυάζεται με υπομεθυλίωση των T-κυττάρων, κάτι που έχει επιβεβαιωθεί σε καλλιέργειες με T-κύτταρα [109]. Έχει προταθεί ότι η δράση της οφείλεται στη σύνδεσή της στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά η δραστηριότητά της ως αναστολέας των DNMTs είναι αμφισβητήσιμη. Κάποιες μελέτες *in vitro* δεν έδειξαν ειδική αναστολή των DNMTs από την υδραλαζίνη. Ειδικότερα, έγινε σύγκριση της δράσης της υδραλαζίνης, της προκαΐναμίδης και της ντεσιταμπίνης σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (T24, PC3 και HT29) μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας παρουσία των φαρμάκων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρείται υπομεθυλίωση μετά από προσθήκη υδραλαζίνης ή προκαΐναμίδης [110]. Έχει προταθεί ότι η δράση αναστολής των DNMTs της υδραλαζίνης είναι ειδική για πολύ συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές αλλά και για τα T-κύτταρα.

Παρόλα αυτά, η κατανάλωση προκαθορισμένων δόσεων κατά της υπέρτασης (από 50 έως 150mg/ημέρα) είχε ως αποτέλεσμα την απομεθυλίωση υποκινητών και επανέναρξη της μεταγραφής ογκοκατασταλτικών γονιδίων χωρίς να προκαλεί ολική απομεθυλίωση του γονιδιώματος [111]. Η υδραλαζίνη έχει δοκιμαστεί σε μελέτη φάσης I σε ασθενείς που είχαν αναπτύξει καρκίνο των ωοθηκών με αποτέλεσμα σε μερικές περιπτώσεις την απομεθυλίωση και επανενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (DAPK1 και MGMT) και μία ήπια συνολικά ανοχή από τους ασθενείς [112]. Επιπλέον, η υδραλαζίνη δοκιμάστηκε σε φάση III σε ασθενείς με καρκίνο του εγκεφάλου ή των ωοθηκών και σε φάση II έναντι όγκων ανθεκτικών σε χημειοθεραπείες. Τέλος, δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με βαλπροϊκό, έναν αναστολέα των HDAC, σε φάση II για τη θεραπεία των MDS [113].

4.1.2.3 Προκαΐναμίδα και Προκαΐνη

Η προκαΐναμίδα και το εστερικό της ανάλογο, η προκαΐνη, έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία 30 χρόνια ως αντιαρρυθμιακοί και αναισθητικοί παράγοντες αντίστοιχα. Η πρώτη συσχέτισή τους με τη μεθυλίωση ήρθε με την ανακάλυψη ότι η προκαΐναμίδα και η προκαΐνη παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε CpG [114]. Δύο μοριακές μελέτες πιθανολογικής απεικόνισης μοντέλου, πρότειναν ότι η προκαΐναμίδα συνδέεται και στη DNMT1 [115,116]. Μια συστηματική μελέτη που έγινε πάνω στις ανθρώπινες DNMTs, έδειξε ότι η προκαΐναμίδα αναστέλλει με μεγαλύτερη προτίμηση την DNMT1 παρουσία ενός ημιμεθυλιωμένου υποστρώματος ($K_i=7.2\pm 0.6\mu\text{M}$) σε σχέση με την DNMT3a/3B παρουσία αμεθυλιώτου υποστρώματος ($K_i > 1000\mu\text{M}$) [117]. Αυτή η αναστολή γίνεται με ανταγωνιστικό τρόπο παρόμοιο με τα δύο «φυσιολογικά» υποστρώματα: SAM και ημιμεθυλιωμένα CpG, κάτι που υποδηλώνει μια μείωση της συγγένειας του ενζύμου για αυτούς τους δύο παράγοντες. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε με λεπτομέρεια ότι η διαφορά στην αναστολή μεταξύ ημιμεθυλιωμένου και αμεθυλιώτου DNA, δεν είναι εξαιτίας της διαφορετικής συγγένειας του ενζύμου για τα διάφορα

υποστρώματα. Τέλος η παραπάνω μελέτη έδειξε ότι η αναστολή που παρατηρήθηκε συνδέεται με την απώλεια της ενζυματικής επεξεργασίας και ότι η προκαϊναμίδη προωθεί την αποδέσμευση του ενζύμου από το DNA μειώνοντας τη συγγένεια της DNMT1 για ημιμεθυλιωμένο DNA. In vivo, η DNMT1 κινείται κατά μήκος του DNA μαζί με τη διχάλα της αντιγραφής και η αποδέσμευσή της από το DNA μπορεί να οδηγεί σε απώλεια μεθυλίωσης σε κάποιες αλληλουχίες [117].

Όπως αναφέρθηκε και για την υδραλαζίνη, δεν παρατηρήθηκε κάποια απομεθυλίωση έπειτα από προσθήκη υδραλαζίνης ή προκαϊναμίδης σε τρεις κυτταρικές σειρές (T24, PC3 και HT29) [110]. Πρόσφατα μια ερευνητική ομάδα σχεδίασε και συνέθεσε συνενώσεις προκαϊναμίδης με αναστολείς των DNMTs (συγκεκριμένα το RG108), με την προκαϊναμίδη σε αυτή την περίπτωση να δρα ως συνδέτης στο DNA που οδηγεί έναν ανταγωνιστικό αναστολέα των DNMTs σε περιοχές πλούσιες σε CpG. Κάποιες από τις συνενώσεις βρέθηκαν να είναι έως και 50 φορές πιο δραστικές σε σχέση με τις αρχικές ουσίες [118].

4.1.2.4 RG108

Το RG108 είναι ένας αναστολέας των DNMTs ο οποίος έχει βρεθεί ότι αναστέλλει in vitro τη μεθυλίωση του DNA σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (HCT116 και NALM6) σε συγκέντρωση 100nM. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι στην καρκινική κυτταρική σειρά HCT116 το RG108 μπορεί να επανενεργοποιήσει ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το p16^{INK4A} και το TIMP3, των οποίων η έκφραση καταστέλλεται από τη μεθυλίωση των υποκινητών τους. Η ανάλυση αλληλούχισης έπειτα από επίδραση με bisulfate στο γονιδίωμα κυττάρων που είχαν εκτεθεί στο RG108 έδειξε απομεθυλίωση των υποκινητών αυτών των γονιδίων έπειτα από προσθήκη της ουσίας. Αυτές οι μελέτες έδειξαν επίσης ότι σε αντίθεση με άλλους αναστολείς των DNMTs, το RG108 δεν είναι κυτταροτοξικό [119]. Σύμφωνα με τους ερευνητές, το RG108 εμποδίζει το υπόστρωμα να εισέλθει στο ενεργό κέντρο (καταλυτικό θύλακα) του ενζύμου. Συγκεκριμένα, ένα καρβονύλιο του RG108 τοποθετείται στη θέση 6 της κυτοσίνης και αυτό εμποδίζει τη δημιουργία του ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στην κυτοσίνη και τη θειόλη (ρίζα SH) της καταλυτικής κυστεΐνης. Σημαντικό είναι τέλος ότι ενώ στην παραπάνω μελέτη παρατηρήθηκε ότι το RG108 αναστέλλει τη DNMT1 κατά 34% σε συγκέντρωση 1mM, άλλες μελέτες έχουν μετρήσει ένα IC₅₀ πάνω από 250mM, γεγονός που δημιουργεί ερωτήματα για την ενδοκυττάρια ικανότητα του RG108 να αναστέλλει τις DNMTs [118].

4.1.2.5 MG98

Το MG98 είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο μήκους 20 βάσεων το οποίο συνδέεται ειδικά στην 3' αμετάφραστη περιοχή της ανθρώπινης DNMT1 και με αυτό τον τρόπο εμποδίζει τη μεταγραφή της [120]. Ο παράγοντας αυτός έχει επιδείξει την ικανότητα να αναστέλλει την έκφραση της DNMT1 χωρίς να επηρεάζει την DNMT3 καθώς και να επαναφέρει την

έκφραση του p16^{INK4A} σε καρκινικές κυτταρικές σειρές [121]. Σε κλινικές δοκιμές η επανέκφραση των WIT1, ER και p15^{INK4b} που είναι κοινώς υπερμεθυλιωμένα στον καρκίνο, δεν ήταν σταθερή και δεν σχετίστηκε με τα επίπεδα της DNMT1 και αυτό αμφισβητεί την άμεση σχέση του MG98 με την επανέκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [122]. Τέλος, το MG98 δεν έχει λάβει έγκριση από τον FDA κυρίως εξαιτίας της τοξικότητάς του.

4.1.2.6 Άλλα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα

Υπάρχουν και άλλα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα τα οποία δεν αναφέρθηκαν παραπάνω. Ονομαστικά, παρατίθενται κάποια από αυτά: οξαζολίνες και ίσοξαζολίνες, η ψαμπαπλίνη A, η ναναομυκίνη A, η κOURKΟΥΜΙΝΗ και το SGI-1027.

4.2 Αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών

Όπως προαναφέρθηκε, οι επιγενετικές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων είναι καλά μελετημένες και υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στη λεπτομερή κατανόηση των επιγενετικών μηχανισμών στον καρκίνο. Για παράδειγμα, η απώλεια της ακετυλίωσης της λυσίνης 16 της ιστόνης 4 (H4K16) και η τριμεθυλίωση της λυσίνης 20 της ιστόνης 4 (H4K20) είναι διακριτά χαρακτηριστικά πολλών τύπων καρκίνου. Οι αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών είναι ελπιδοφόροι παράγοντες για τη θεραπεία του καρκίνου. Παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα, εξαιτίας της σχετικής ανθεκτικότητας των φυσιολογικών κυττάρων στον επαγόμενο από HDACi κυτταρικό θάνατο, ενώ ένα ευρύ φάσμα μετασχηματισμένων κυττάρων είναι ευαίσθητα στον επαγόμενο απο HDACi κυτταρικό θάνατο.

Οι HDACi μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τη δομή τους, τα υδροξαμικά, τα κυκλικά πεπτιδία, τα αλειφατικά οξέα και τα βενζαμίδια [123,124,125,126].

4.2.1 Υδροξαμικά

Η τριχοστατίνη A (TSA) είναι το πρώτο φυσικό υδροξαμικό με την ικανότητα να αναστέλλει τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDAC) [127]. Η TSA αναστέλλει HDAC τάξης I και II, που περιέχουν ψευδάργυρο στο καταλυτικό τους κέντρο. Παρόλη τη γενικευμένη κατανομή των HDAC στη χρωματίνη, οι HDACi τροποποιούν την έκφραση ενός σχετικά μικρού ποσοστού γονιδίων (2-10%) σε μετασχηματισμένα κύτταρα. Μελέτες με επίδραση TSA σε λεμφικές κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι η TSA επηρεάζει την έκφραση μόνο του 2% από τα 340 εκφραζόμενα γονίδια [128]. Πρόσφατες μελέτες με τη χρήση μικροσυστοιχειών DNA έδειξαν ότι επηρεάζεται το 7-10% των γονιδίων σε ένα πλήθος κυτταρικών σειρών με διαφορετική προέλευση [129,130]. Σε αυτές τις μελέτες ο αριθμός των γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξανόταν ήταν περίπου ίδιος με αυτόν των γονιδίων των οποίων η έκφραση μειωνόταν έπειτα από επίδραση με HDACi. Η επίλυση της

κρυσταλλικής δομής της σύνδεσης υδροξαμικού (TSA) με HDAC έδειξε την άμεση αλληλεπίδραση του καταλοίπου του υδροξαμικού οξέος με το ιόν ψευδαργύρου του HDAC στη βάση του ενεργού κέντρου [131,132]. Η TSA δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές έπειτα από τις 27 Μαΐου 2013.

4.2.2 Κυκλικά πεπτίδια

Η κατηγορία των κυκλικών πεπτιδίων είναι μια δομικά περίπλοκη ομάδα HDACi η οποία και περιλαμβάνει το φυσικό προϊόν «δεψιπεπίδιο» (Romidepsin, FK-228), την απικιδίνη και την ομάδα πεπτιδίων που περιέχουν υδροξαμικό οξύ. Τα προαναφερθέντα μόρια είναι όλα δραστικά σε συγκεντρώσεις nM [133]. Το δεψιπεπίδιο πέρασε από κλινικές δοκιμές φάσης 2, που περιελάμβαναν και δοκιμές σε δερματικά T λεμφώματα (CTCL) [126] καθώς και λεμφώματα περιφερικών T κυττάρων (PTCL) [134]. Όσον αφορά τα CTCL, είχε παρατηρηθεί απάντηση στους 10 από τους 28 ασθενείς που αξιολογήθηκαν και συγκεκριμένα 3 πλήρεις απαντήσεις και 7 μερικές απαντήσεις με συνολικό ποσοστό απάντησης 36%. Οι παρενέργειες περιελάμβαναν μυελοτοξικότητα, ναυτία, εμέτους και καρδιακές αρρυθμίες. Τον Νοέμβριο του 2009 πήρε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία των CTCL και τον Ιούνιο του 2011 για τη θεραπεία PTCLs.

4.2.3 Αλειφατικά οξέα

Τα αλειφατικά οξέα, όπως το βαλπροϊκό οξύ, είναι ασθενέστεροι αναστολείς των αποακετυλασών σε σχέση με τα υδροξαμικά οξέα και τα κυκλικά πεπτίδια. Το βαλπροϊκό οξύ έχει κάποια θεραπευτική δράση ως μονοθεραπεία και σε συνδυασμό με all-trans ρετινοϊκό οξύ σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα [135]. Κλινικές δοκιμές με οξικό φαινύλιο (phenyl acetate) έχουν δείξει μικρή αντικαρκινική δράση [136].

5. Επιδράσεις των επιγενετικών παραγόντων στα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος

5.1 NK

Η μεθυλίωση του DNA διαφοροποιεί τη γονιδιακή έκφραση στα NK κύτταρα και επηρεάζει τη φυσική ανοσία. Ειδικότερα, η κατάσταση μεθυλίωσης των γονιδίων διαφόρων υποδοχέων επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη δραστικότητα των NK κυττάρων. Η ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης σε όλο το γονιδίωμα ενεργοποιημένων NK κυττάρων έδειξε ότι ο ενεργοποιημένος φαινότυπος των NK κυττάρων σχετιζόταν με υπομεθυλίωση των CpG στο 81% των γονιδιακών τόπων που είναι σημαντικοί για τη δράση τους σε αντίθεση με τα μη ενεργοποιημένα NK κύτταρα που επιδείκνυαν χαμηλότερο βαθμό μεθυλίωσης [137]. Οι υποδοχείς KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor) είναι μία σημαντική οικογένεια υποδοχέων των NK κυττάρων με ανασταλτική αλλά και ενεργοποιητική δράση, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή ανοχή. Οι κύριοι συνδέτες των KIRs είναι τα μόρια MHC τάξης I. Η μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων KIR έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση των KIRs ενώ η απομεθυλίωση των πρώτων ενεργοποιεί την έκφρασή τους [138].

Οι επιδράσεις των απομεθυλιωτικών παραγόντων στη δραστικότητα των NK κυττάρων έχουν μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια τόσο *in vitro* όσο και *ex-vivo*. Κάποιες μελέτες έχουν επίσης διερευνήσει την επίδραση τέτοιων παραγόντων στη γονιδιακή έκφραση των NK κυττάρων και έχουν αξιολογήσει τον αντίκτυπο των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης στη δραστικότητά τους. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των επιδράσεων των απομεθυλιωτικών παραγόντων δε φαίνεται να υπάρχει ομοφωνία στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία. Δύο μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της αζακυτιδίνης στη δραστικότητα των NK κυττάρων έδειξαν ότι η *in-vitro* έκθεση των NK κυττάρων σε αζακυτιδίνη, μειώνει την κυτταροτοξικότητα των NK έναντι στην κυτταρική σειρά K562 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στην υπερέκφραση ανασταλτικών KIR και στη μειωμένη παραγωγή περφορίνης και κοκκιοενζύμου B. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν παρατηρήθηκε η ίδια ανασταλτική επίδραση στη δραστικότητα των NK *in vivo*, όταν μελετήθηκαν τα NK κύτταρα από ασθενείς με MDS που λάμβαναν αντίστοιχες δόσεις αζακυτιδίνης [138,139].

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η *in vitro* χορήγηση χαμηλών δόσεων αζακυτιδίνης αυξάνει την έκφραση των KIRs από τα NK κύτταρα υγιών δωτών και ασθενών με MDS. Σε αντίθεση όμως με τις προαναφερθέντες μελέτες, έδειξε ότι αυξάνεται η NK διαμεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα έναντι των K562 κυττάρων. Παράλληλα με την κυτταροτοξικότητα, παρατηρήθηκε και αύξηση της παραγωγής IFN- γ και αύξηση της αποκοκκιοποίησης [140]. Μια αντίστοιχη μελέτη για τη 5-aza-CdR έδειξε ότι η χορήγηση

του υπομεθυλιωτικού παράγοντα σε αυξανόμενες δόσεις σε NK κύτταρα, αυξάνει την έκφραση των KIRs με γραμμικό δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, έγινε έλεγχος της έκφρασης και άλλων σημαντικών υποδοχέων των NK κυττάρων συμπεριλαμβανομένου των NKp44 και του NKG2D για τους οποίους παρατηρήθηκε μια γραμμική αύξηση και μείωση της έκφρασης αντίστοιχα, έπειτα από έκθεση σε αυξανόμενες δόσεις 5-aza-CdR. Επίσης, η 5-aza-CdR φάνηκε ότι αυξάνει σημαντικά την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων και την παραγωγή IFN- γ ενώ η αζακυτιδίνη μείωνε τις αντίστοιχες λειτουργίες [141].

Σε μια πρόσφατη κλινική δοκιμή, σε ασθενείς με AML στους οποίους χορηγούνταν ένα πειραματικό αντι-CD33 μονοκλωνικό αντίσωμα παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη χορήγηση 5-aza-CdR είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της εξαρτώμενης από αντισώματα κυτταρο-μεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Η έκφραση του NKG2D αυξήθηκε σημαντικά έπειτα από χορήγηση 5-aza-CdR και η *in vitro* χρήση blocking αντισώματος αναιρέσε την αύξηση του ADCC [142].

5.2 Δενδριτικά κύτταρα

Η χαρτογράφηση της 5mC σε ολικό γονιδίωμα και η αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδιακών τόπων έπειτα από επίδραση με bisulfite αποκάλυψαν ότι η ανάπτυξη και η ωρίμανση των DCs σχετίζεται με σημαντική μείωση της DNA μεθυλίωσης. Η μείωση αυτή μπορεί να αποδοθεί στη μείωση της έκφρασης των DNMT1, 3A και 3B [143]. Το γεγονός αυτό οδήγησε την έρευνα προς τη διερεύνηση της ικανότητας των απομεθυλιωτικών παραγόντων να διαμορφώνουν άμεσα τον φαινότυπο και τη λειτουργία των DCs. Παρόλο που η επίδραση των απομεθυλιωτικών παραγόντων στα DCs δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αζακυτιδίνη επηρεάζει διάφορα χαρακτηριστικά των DCs.

In vitro μελέτες σε DCs προερχόμενα από PBMC έδειξαν ότι η αζακυτιδίνη αυξάνει την έκφραση του CD40 και του CD86 σε ώριμα DCs [144]. Τα DCs αυξάνουν την έκφραση του CD40 κατά τη διαδικασία της ωρίμανσής τους και η σύνδεση του CD40 των DCs στον συνδέτη του, το CD40L των αντιγονο-ειδικών CD4+ T βοηθητικών κυττάρων επιτρέπει τη μελλοντική ενεργοποίηση των CTLs [145]. Επίσης παρατηρήθηκε η αζακυτιδίνη προκαλεί σημαντική μείωση στην έκκριση IL-10 και IL-27. Επιπλέον, *in vivo* πειράματα της ίδιας ομάδας έδειξαν σημαντική μείωση του αριθμού των CD4+ T-κυττάρων που εκκρίνουν IL-4 και ταυτόχρονη αύξηση των CD4+ T-κυττάρων που εκκρίνουν IL-17 και IL-21 [144]. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ενδεικτικά μιας Th17 απάντησης και υποδεικνύουν ότι η αζακυτιδίνη μπορεί να επηρεάζει τα DCs διαφοροποιώντας την πόλωση των T-κυττάρων.

5.3 T-κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε και στα κεφάλαια 2 και 3, ο φαινότυπος και η λειτουργία των T-κυττάρων διαμορφώνεται μέσω επιγενετικών αλλαγών. Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται χαρακτηριστικά μόρια των T-κυττάρων που βρίσκονται υπό επιγενετικό έλεγχο και οι επιδράσεις των επιγενετικών παραγόντων στην έκφρασή τους.

Το CD28 είναι ένα κρίσιμο συνδιεγερτικό μόριο, απαραίτητο για την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των T-κυττάρων. Η μειωμένη έκφραση του CD28 έχει συσχετιστεί με τη γήρανση και με την εξασθενημένη CD4+ T-κυτταρική απάντηση στους ηλικιωμένους. Η σύγκριση των CD4+CD28+ με τα CD4+CD28- T-κύτταρα έχει αποκαλύψει διακριτές διαφορές στο επιγένωμα τους και συνολικά αυξημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο φλεγμονόσωμα και στη σηματοδότηση μέσω TCR από τα CD4+CD28- T-κύτταρα [146].

Τα Tregs διαχωρίζονται από τα CD4+ T-κύτταρα από την υπομεθυλίωση του γονιδιακού τόπου του FOXP3 και την επακόλουθη έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα. Μελέτη ανάλυσης της DNA μεθυλίωσης στο ολικό γονιδίωμα των Tregs έχει αποκαλύψει την απομεθυλίωση των CpG σε γνωστές περιοχές σύνδεσης του FOXP3. Ειδικότερα έχει δειχθεί ότι στα Tregs, η έκφραση του TIGIT, ενός ανασταλτικού υποδοχέα, σχετίζεται με υποθυλιωμένο γονιδιακό τόπο του TIGIT και ικανότητα σύνδεσης του FOXP3 [147].

Επιπλέον, η έκφραση του PD-1 (programmed death-1) είναι και αυτή υπό επιγενετικό έλεγχο. Το PD-1 είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας στην επιφάνεια των T-κυττάρων και ρυθμίζει την ενεργοποίηση των CD8+ και των CD4+ T-κυττάρων [148]. Παρόλο που ο βαθμός μεθυλίωσης του γονιδιακού τόπου του PD-1 ποικίλει στα ανοσοκύτταρα, τα T-κύτταρα παρουσιάζουν μια γενική υπομεθυλίωση στον συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο σε σχέση με τους άλλους υποπληθυσμούς. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι στις χρόνιες ιικές λοιμώξεις, ο γονιδιακός τόπος του PD-1 είναι υπομεθυλιωμένος στα «εξαντλημένα» CD8+ T-κύτταρα [149]. Στον καρκίνο έχει βρεθεί ότι υπάρχει σταθερή έκφραση του PD-1 υποδοχέα των CD8+ T-κυττάρων που διηθούν τον όγκο αλλά και σταθερή σύνδεση του PD-1 με τους συνδέτες του οδηγώντας τα TILs προς εξάντληση και διευκολύνοντας την ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων [150,151].

Σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες στους οποίους χορηγούνται απομεθυλιωτικοί παράγοντες έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στη μεθυλίωση του γονιδιακού τόπου του PD-1 η οποία συνδέθηκε με αύξηση στον αριθμό των mRNA μεταγράφων και με παράλληλη άυξηση της επιφανειακής πρωτεϊνικής έκφρασης του PD-1 [152,153]. Στα CD8+ T-κύτταρα ασθενών με MDS και AML βρέθηκε ότι ο υποκινητής του PD-1 υπόκειται σε παρειτέρω υπομεθυλίωση έπειτα από αγωγή με αζακυτιδίνη. Σε AML κυτταρικές σειρές

παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα στον υποκινητή του PD-1 έπειτα από επίδραση με 5-aza-CdR [153]. Σε μια μικρή ομάδα ασθενών με AML και MDS στους οποίους είχε χορηγηθεί αζακυτιδίνη μαζί με vorinostat (HDACi) παρατηρήθηκε επίσης υπομεθυλίωση του PD-1 τόσο στους ασθενείς που αποκρινόταν κλινικά, όσο και στους ασθενείς που δεν αποκρινόταν [153]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στην υπόθεση ότι η μειωμένη μεθυλίωση στο γονιδιακό τόπο του PD-1 έπειτα από αγωγή με απομεθυλιωτικούς παράγοντες συνεισφέρει στην εξάντληση των T-κυττάρων και σε φτωχά κλινικά αποτελέσματα.

Για την αποτελεσματική αναγνώριση του αντιγόνου από τα T-κύτταρα και την ενεργοποίησή τους χρειάζεται εκτός από την αντιγονοπαρουσίαση από τα σύμπλοκα MHC και ένα κρίσιμο δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα το οποίο δίνεται από τα μόρια CD80 και CD86. Η μείωση της επιφανειακής έκφρασης του CD80 είναι ένας από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για να ανοσοδιαφεύγουν [154,155]. Σε ένα μοντέλο ποντικού για λέμφωμα, η 5-aza-CdR φάνηκε ότι προκάλεσε την αύξηση της επιφανειακής έκφρασης του CD80 και ως επακόλουθο παρατηρήθηκε η άυξηση της κυτταρολυτικής ικανότητας των CD8+ T-κυττάρων που παράγουν IFN-g. Επίσης σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν CD80 έχει δειχθεί ότι η 5-aza-CdR προκαλεί υπομεθυλίωση του υποκινητή του CD80 με αποτέλεσμα την επιφανειακή έκφραση του CD80 [156]. Η ίδια επίδραση έχει περιγραφεί και σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέος εντέρου [155].

Ο υποδοχέας CTLA-4 ρυθμίζει τις T-κυτταρικές απαντήσεις και αποτελεί σημείο ανοσιακού ελέγχου. Σε αντίθεση με τα συνδιεγερτικά σήματα που επιτυγχάνονται με τη σύνδεση του CD80 και του CD86 στον υποδοχέα CD28 των T-κυττάρων, η σύνδεση του CD80 στον υποδοχέα CTLA-4 έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή ανασταλτικού σήματος που εξασθενεί τη δραστηριότητα των T-κυττάρων. Το CD80 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα CTLA-4 σε σχέση με το CD28 [157]. Σε μοντέλο ποντικού για καρκίνο των ωοθηκών παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση 5-aza-CdR αύξανε τον αριθμό των TILs αλλά και τη δραστηριότητά τους. Η επίδραση αυτή φάνηκε να αυξάνει με ταυτόχρονη χορήγηση αντι-CTLA-4 αντισώματος [158].

Η χορήγηση απομεθυλιωτικών παραγόντων επηρεάζει και τα ποσοστά των υποπλυθησμών των T-κυττάρων in vivo και in vitro. Σε μια ομάδα 68 ασθενών με MDS, έπειτα από μακροχρόνια παρακολούθηση, φάνηκε ότι οι ασθενείς που αποκρίθηκαν στη θεραπεία με αζακυτιδίνη είχαν χαμηλότερα ποσοστά κυκλοφορούντων Treg συγκρινόμενα με τα ποσοστά που είχαν πριν τη θεραπεία [159]. In vitro συγκριτικές μελέτες σε CD4+ T-κύτταρα έδειξαν ότι η επίδραση με αζακυτιδίνη προκάλεσε μειωμένη ικανότητα για πολλαπλασιασμό, μειωμένη ανασταλτική ικανότητα και αυξημένη παραγωγή IL-17. Επίσης παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση του υποκινητή του *FOXP3* και αυξημένη παραγωγή *FOXP3* [159]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μελέτη της GVHD σε πειραματικό

μοντέλο ποντικού. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η 5-aza-CdR και η αζακυτιδίνη προκαλούσε αυξημένη έκφραση FOXP3 από τα Tregs αλλά η κατασταλτική δράση των επαγόμενων Tregs ήταν ανεξάρτητη από την έκφραση του FOXP3 [160]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε μια μελέτη με διαφορετική ομάδα ασθενών με MDS παρατηρήθηκε ότι η αζακυτιδίνη αυξάνει παροδικά τον πληθυσμό των FOXP3+ Tregs και μειώνει τον πληθυσμό των Th17 βοηθητικών κυττάρων [161]. Σε μια μικρή ομάδα ασθενών με υποτροπιάζουσα AML, η αγωγή με αζακυτιδίνη βρέθηκε να αυξάνει το ποσοστό των CD4+CD25+FOXP3+ Tregs και να μειώνει τους πληθυσμούς των Th1 και CD8+ T-κυττάρων. Επίσης παρατηρήθηκε μειωμένη κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από CD8+ T-κύτταρα, μειωμένη παραγωγή IFN-g και αυξημένη μεταγραφή των IL-10 και TGF-b [162].

Επί του παρόντος, οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες έχουν την έγκριση του FDA για τη θεραπεία των ασθενών με MDS και έχουν έναν καλά χαρακτηρισμένο βοηθητικό ρόλο στη θεραπεία ασθενών με AML οι οποίοι είναι απίθανο να βοηθηθούν από εισαγωγική χημειοθεραπεία εξαιτίας μεγάλης ηλικίας, εξαιτίας χαμηλής σωματικής ικανότητας ή επειδή δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία διάσωσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει πιθανές άμεσες επιδράσεις των απομεθυλιωτικών παραγόντων σε υποπληθυσμούς των ανοσοκυττάρων όπως στα NK, στα DCs και στα T-κύτταρα. Συνοπτικά, στα NK κύτταρα οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες διαφοροποιούν την επιφανειακή έκφραση ανασταλτικών και ενεργοποιητικών υποδοχέων με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα την αύξηση της έκφρασης των KIRs και τη μείωση της έκφρασης του ενεργοποιητικού υποδοχέα NKG2D. Η επίδραση στην κυτταροτοξικότητα και στις δραστικές λειτουργίες των NK δεν έχει αποσαφηνιστεί. Στα δενδριτικά κύτταρα οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD40 και CD86. Στους υποπληθυσμούς των T-κυττάρων η μεθυλίωση έχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των αναστολέων των σημείων ανοσιακού ελέγχου: PD-1, CTLA4 και TIGIT, στη ρύθμιση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD28 και CD80 αλλά και στην ανάπτυξη των ρυθμιστικών T-κυττάρων μέσω του FOXP3.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1 Πεπτίδο-ειδικοί CD8+ T-κυτταρικοί κλώνοι

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 3 πεπτίδο-ειδικοί CD8+ T-κυτταρικοί κλώνοι οι οποίοι απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο. Δύο κλώνοι απομονώθηκαν από ασθενείς με μελάνωμα και ένας κλώνος από ασθενή με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι κλώνοι που απομονώθηκαν από ασθενείς με μελάνωμα παρουσίαζαν ειδικότητα έναντι ενός σχετιζόμενου με το μελάνωμα αντιγόνου, το MAGE-A3 (MAGE3), το οποίο εκφράζεται φυσιολογικά και στους όρχεις. Συγκεκριμένα, ο κλώνος PAGI 563A/28 απομονώθηκε από ασθενή με μελάνωμα και ήταν ειδικός για ένα πεπτίδιο του MAGE3 με αλληλουχία FLWGPRALV το οποίο παρουσιάζεται από το HLA-A2. Ο κλώνος JOFR 561E/46 απομονώθηκε από ασθενή με μελάνωμα και ήταν ειδικός για ένα πεπτίδιο του MAGE-3 με αλληλουχία EVDPIGHLY, το οποίο παρουσιάζεται από το HLA-A1.

Ο κλώνος που απομονώθηκε από ασθενή με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρουσίαζε ειδικότητα έναντι της πρωτεϊνικής καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT). Ειδικότερα, ο κλώνος POFIG 027B263/26 αναγνώριζε το πεπτίδιο ILAKFLHWL, το οποίο παρουσιάζεται από το HLA-A2.

Οι παραπάνω κλώνοι απομονώθηκαν από μέλη της μονάδας Ανοσολογίας του Καρκίνου, του τομέα Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, του τμήματος της Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι πεπτίδο-ειδικοί CD8+ T-κυτταρικοί κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την προτυποποίηση των πειραμάτων όσο και για την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορά την επίδραση των επιγενετικών φαρμάκων στα CD3+ CD8+ T-κυτταρολυτικά κύτταρα ασθενών με καρκίνο.

1.2 Καρκινικές σειρές και EBV μετασχηματισμένα κύτταρα

Στις καλλιέργειες των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTL) χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αλλά και ως κύτταρα-τροφοί, καρκινικές σειρές και B-κύτταρα μετασχηματισμένα με τον ιό Epstein-Barr (EBV). Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως κύτταρα στόχοι όταν πραγματοποιούταν έλεγχος της κυτταροτοξικής ικανότητας των CTL. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η GERL και η DAJU 2.7 οι οποίες έχουν προέλευση από μελάνωμα, ενώ τα EBV μετασχηματισμένα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η σειρά DAJU EBV και η ROSI EBV. Τα χαρακτηριστικά τους, συμπεριλαμβανομένου των HLA τους και του τρόπου ανάπτυξής τους, συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Καρκινικές σειρές και EBV μετασχηματισμένα B-κύτταρα.

Σειρά	Προέλευση	HLA-αλληλία	Τρόπος ανάπτυξης	Χρόνος διαίρεσης
GERL	Μελάνωμα	A1/ A2	Προσκολλημένα	40-45 ώρες
DAJU 2.7	Μελάνωμα	A1/ A2	Προσκολλημένα	40-45 ώρες
DAJU EBV	EBV B κύτταρα	A1/ A2	Σε εναιώρημα	40-45 ώρες
ROSI EBV	EBV B κύτταρα	A24/ A24	Σε εναιώρημα	60-70 ώρες

1.3 Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) και βλάστες

Τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-τροφοί σε κάποιες από τις καλλιέργειες των κλώνων, όταν αυτό απαιτούταν. Εναλλακτικά δημιουργούνταν βλάστες με την προσθήκη φυτοαιμαγλουτινίνης-L (PHA-L), που χρησιμοποιούταν ως κύτταρα τροφοί ή ως κύτταρα για την προτυποποίηση των πειραμάτων.

1.4 Επιγενετικά φάρμακα

Για να μελετήσουμε την επίδραση των επιγενετικών παραγόντων στα CD3+ CD8+ κυτταρολυτικά κύτταρα ασθενών με καρκίνο, χρησιμοποιήθηκαν δύο επιγενετικά φάρμακα με διαφορετική δράση. Το πρώτο ήταν ένας απομεθυλιωτικός παράγοντας, η 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-aza-CdR, DAC) (Sigma-Aldrich, Cat A3656), η οποία είναι αναστολέας των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs) και έχει πάρει έγκριση από τον FDA για την θεραπεία των MDS και AML.

Ο δεύτερος παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας ακετυλιωτικός παράγοντας η τριχοστατίνη A (TSA) (Sigma Cat T8552-1MG), η οποία είναι αναστολέας των αποακετυλασών των ιστονών και βρίσκεται στο στάδιο των προκλινικών δοκιμών.

1.5 Ορός

Για τις καλλιέργειες των κλώνων χρησιμοποιήθηκε ορός ανθρώπινης προέλευσης (HS), ο οποίος παρασκευάστηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας από πλάσματα που συλλέχθηκαν στο Δρακοπούλειο κέντρο. Για τις καλλιέργειες των καρκινικών κυτταρικών σειρών και EBV μετασχηματισμένων B χρησιμοποιήθηκε εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS).

1.6 Πεπτίδια και HLA πολυμερή

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 9μερή με ικανότητας παρουσίασης-σύνδεσης από τα HLA-A1 , -A2, που παρασκευάστηκαν με τη μεθοδολογία F-mos σε λυοφιλοποιημένη μορφή και σε καθαρότητα >90% (Abgent, San Diego, USA). Τα πεπτίδια διαλύονταν σε DMSO σε συγκέντρωση 10 mg/ml και διατηρούνταν στους -20 °C μέχρι τη

χρήση τους. Τα ειδικά πεπτίδια ελέγχου περιλαμβάνουν τα πεπτίδια του αντιγόνου MAGE3, NH₃-EVDPIGHLY-COOH και NH₃-FLWGPRALV-COOH, τα οποία παρουσιάζονται από τα HLA-A1 και -A2 αντίστοιχα καθώς και το πεπτίδιο της hTERT, NH₃-ILAKFLHWL-COOH το οποίο παρουσιάζεται από το HLA-A2. Μη ειδικά πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν ως πεπτίδια μάρτυρες και αυτά ήταν τα EBV πεπτίδια του αντιγόνου PB1, NH₃-VSDGGPNLY-COOH, και του αντιγόνου BMLF, NH₃-GLCTLVAML-COOH τα οποία παρουσιάζονται από τα HLA-A1 και -A2 αντίστοιχα.

Τα HLA-πολυμερή είναι τεχνητά HLA μόρια που αποτελούνται από τέσσερα ή περισσότερα πανομοιότυπα HLA μόρια τάξης I, καθένα από τα οποία παρουσιάζει το πεπτίδιο ενδιαφέροντος, τα οποία συνδέονται μέσω βιοτίνης σε μόριο αβιδίνης. Στο σύμπλεγμα προσδένεται φθοριόχρωμα συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη.

Τα HLA-πολυμερή έχουν μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία και κατά πολύ μεγαλύτερη συνάφεια με τον αντίστοιχο TCR από το άθροισμα της συγγένειας των μονομερών που το αποτελούν. Ως αποτέλεσμα, η μη ειδική σύνδεση είναι πολύ χαμηλή. HLA-πολυμερή παρασκευάστηκαν για καθένα από τα παραπάνω πεπτίδια (συνολικά 4), προτυπώθηκαν για κυτταρομετρική χρήση, όπως περιγράφεται από τους Karanikas και συν. [163], από το Ludwig Institute for Cancer Research (Brussels, Belgium) και προσφέρθηκαν ευγενώς από τον Prof. P. Coulie. Τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων ελέγχου ήταν συνδεδεμένα με το φθοριόχρωμα φυκοερυθρίνη (PE), ενώ τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων-μαρτύρων ήταν συνδεδεμένα με φθοριόχρωμα αλλοφυκοκυανίνη και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Τα HLA πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των πεπτιδοειδικών CD8+ T κλώνων που καλλιεργούνταν καθώς και το επίπεδο έκφρασης TCR ειδικού για το πεπτίδιο ενδιαφέροντος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Καρκινικές σειρές και EBV μετασηματισμένα B κύτταρα.

Αντιγόνο	Πεπτίδιο	HLA-πολυμερές
MAGE-A3	EVDPIGHLY	HLA-A1-PE
MAGE-A3	FLWGPRALV	HLA-A2-PE
hTERT	ILAKFLHWL	HLA-A2-PE
BMLF1	GLCTLVAML	HLA-A2-APC
PB1	VSDGGPNLY	HLA-A1-APC

1.7 Αναλώσιμα υλικά

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια, και υλικά που περιγράφονται στους πίνακες 3-9.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες κλώνων

Κυτταροκίνη	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
IL-2	Recombinant Human IL-2	202-IL	R&D Sustems
IL-4	Recombinant Human IL-4	204-IL	R&D Sustems
IL-7	Recombinant Human IL-4	207-IL	R&D Sustems

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων της ενδοκυττάριας χρώσης κυτταροκινών

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
IL-2	FITC	340448	BD Biosciences, Eu
IL4	PE	559333	BD Biosciences
IL10	PE	559337	BD Biosciences
IFNg	FITC	340449	BD Biosciences

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων των επιφανειακών αντιγόνων που μελετήθηκαν

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
CD3	ECD	IM2705U	BD Biosciences, USA
CD4	PE	A07751	BD Biosciences
CD8	FITC	A07758	BD Biosciences
CD28	FITC	1236	immunotech
CD45	ECD	A07714	Beckman Coulter, USA
CD45RA	FITC	A07786	Beckman Coulter, USA
CD45RO	ECD	IM2712U	Beckman Coulter, USA
CD57	FITC	IM0466U	Beckman Coulter, USA
CCR7	APC	FAB197A	R&D Systems, USA

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
1-μέθυλο-τρυπτοφάνη	1-Methyl-DL-tryptophan 97%	860646	Sigma-Aldrich, Germany
2-μερκαπτεθανόλη	2ME, 50mM	31350-010	Gibco, USA
BFA	Fast Immune Brefeldin A solution	347688	BD Biosciences, USA
DMSO	Dimethylsulfoxide	D5879	Sigma-Aldrich, Germany
DNάση	Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, 100 mg/mL	DN25	Sigma-Aldrich, Germany
EDTA	UltraPure EDTA, 0,5M	15575-038	Gibco, USA
Kit Luminex	Fidis Human Extracellular Protein	MXHB0001	Diagnostic Solutions, Australia
Kit αλληλούχισης	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	4336917	Applied Biosystems
Kit ανάλυσης TCR	IOTest Beta Mark	IM3497	Beckman Coulter, USA
Kit εκχύλισης RNA	Rnase Free Dnase Set	79254	Qiagen, Eu
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QIAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Eu
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	PCR Purification Kit	28106	Qiagen, Eu
Kit μαγνητικού διαχωρισμού CD8	CD8 positive selection kit, EasySep	18053	Stem Cell Techn, Canada
Kit HLA τυποποίησης (PCR-SSP)	Protrans SSP kits, Protrans, HLA-A alleles	200070	Protrans, Germany
Kit HLA τυποποίησης (PCR-SSO)	Tepnel, Lifecodes kit, HLA-A alleles	628410-50	Gen-Probe, USA
SYBR Green	platinum SYBR Green qPCR, Supermix-UDG	11733-046	Invitrogen, Eu
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, Eu
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Αναστολέας RNAσών	RNAsin Rnase Inhibitor, 2,500 U/mL	27632304	Promega, Eu
Αντίστροφη Μεταγραφάση	M-MLV reverse transcriptase	28025-013	Invitrogen, Eu
Απορρυπαντικό TritonX	TritonX	X-100	Sigma-Aldrich, Germany
Βοδινός ορός	Heat inactivated FBS, Gibco	12319018	Invitrogen, Eu
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	161-0433	BioRad, USA
Διάλυμα CaCl ₂	Calcium Chloride 10%	-	DEMO S.A, Greece
Διάλυμα HBSS	HBSS	14175-053	Gibco, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer,	15581-028	Invitrogen, Eu

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Διάλυμα TRI	TRI Reagent Solution	AM9738	Ambion, USA
Διάλυμα PBS	10x PBS	70013-065	Gibco, USA
Διάλυμα αμινοξέων	MEM aminoacids	11140-035	Gibco, USA
Διάλυμα αντιβιοτικών	PSG	10378-016	Gibco, USA
Διάλυμα διαπερατότητας	Fixation/permeabilization solution	00-5521	eBioscience, USA
Διάλυμα διαχωρισμού	Robosep Buffer, EasySep	20104	Stem Cell Techn, Canada
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, USA
Διάλυμα τρυψίνης	Trypsin, 0.25% (1x) with EDTA 4Na, liquid	25200-056	Invitrogen, Eu
Εκκινητής θυμιδίνης	Oligo dt 15 primer	C110A	Promega, Eu
Ηπαρίνη	Heparin Leo	-	LEO Pharma, Denmark
Θρεπτικό μέσο	Iscoves (IMDM)	21980-065	Gibco, USA
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805	Invitrogen, Eu
Νερό ελεύθερο Ρησών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, Eu
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, Eu
Τρυβλία με άγαρ	Gelose Count Tact	43501	bioMérieux, France
Τυχαίοι εκκινητές	Primer Random p(dN) ROCHE	14292421	Roche, Eu
Φικόλη	Ficoll Histopaque	1077-1	Sigma-Aldrich, Germany
Χλωροφόρμιο	Acid phenol Chloroform	9720	Ambion, USA
Χρώμιο 51	Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	NEZ03002MC	Perkin Elmer, Greece
Χρωστική	Trypan Blue	15250-061	Gibco, USA

Πίνακας 8: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Πλάκα μέτρησης Neubauer	Counting chamber Neubauer	3390054	Fischer Scientific, Eu
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510	Bioline, Israel
Βαμβακορόρος στυλεός	Sterile cotton swabs, Portagerm	41999	Copan, Italy
Γυάλινες πιπέτες Pasteur	Pasteur glass pipette	3411020	Hirschmann, USA
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, Eu
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125	Nalgene, Denmark
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, USA
Ξύστρο	Cell scraper	3010	Costar, Eu
Πιάτο Petri	Cell Culture Dish, 100 mm x20 mm	430167	Corning, USA
Πιάτο Petri	Cell Culture Dish,60mmx15mm,	430196	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας F96	96 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates,	3596	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M24	24 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates	3524	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M48	48well Cell Culture Cluster, flat bottom	3548	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M6	6 well Cell Culture Cluster	3516	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας U96	96well Cell Culture Cluster, round bottom	3799	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας V96	96well Cell Culture Cluster, V- bottom	3894	Corning, USA
Πιπέτα μεταφοράς 3 mL	3 mL transfer pipet, Polyethylene, Individually packaged,sterile	357575	BD Falcon, USA
Ρύγχη Robosep	Robosep tip racks	3520105	Stem Cell Techn, Canada
Ρύγχη πιπέτας 10 µL	10 µL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 µL, με φίλτρο	100 µL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 µL	1000 µL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL	200 µL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA

Πίνακας 8: (συνέχεια)

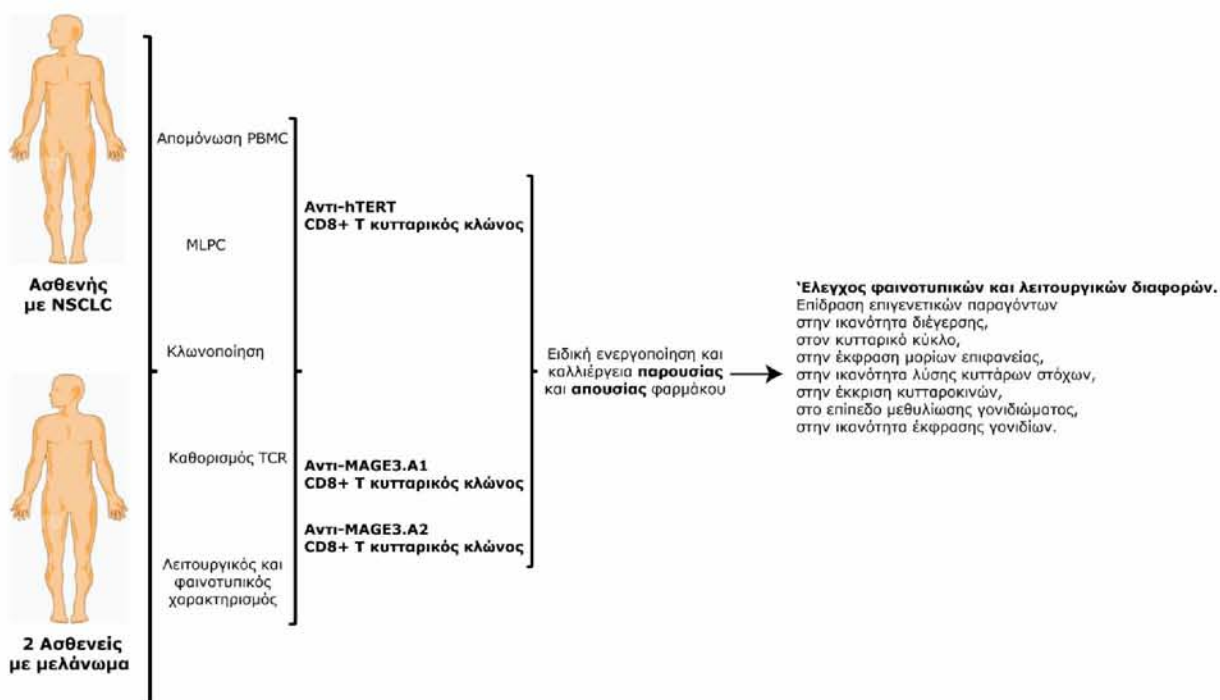
Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Ρύγχη πιπέτας 200 µL, με φίλτρο	200 µL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 µL, με φίλτρο	30 µL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σύστημα φιλτραρίσματος 250 mL	250 mL Filter System	430767	Corning, USA
Σύστημα φιλτραρίσματος 500 mL	500 mL Filter System	430769	Corning, USA
Σωληνάρια πολυστυρενίου 5 mL	FACS tube, EasySep	3520105	Stem Cell Techn, Canada
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes- sterile,	430791	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 50 mL	50 mL centrifuge tubes- sterile	430291	Corning, USA
Φιαλίδιο χρώσης	Titertube, microtubes bulk	223-9391	BioRad, USA
Φιαλίδιο ψύξης 2 mL	2 mL self-standing Cryogenic Vials, round bottom, sterile	431386	Corning, USA
Φίλτρο 100 µm	Cell strainer, 100 µm	352360	BD Falcon, Eu
Φλάσκες ακτινοβόλησης	Irradiation flasks, 25 cm ² Tissue culture flask	831810	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	175 cm ² flask	431080	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	75 cm ² cell culture flask	430641	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	25 cm ² cell culture flask	430639	Corning, USA

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την προσέγγιση της ερευνητικής υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκαν 3 πεπτιδο-ειδικοί CD8+ T-κυτταρικοί κλώνοι που αναγνώριζαν πεπτίδια καρκινικών αντιγόνων και οι οποίοι απομονώθηκαν από ασθενείς με NSCLC (1 κλώνος) και μελάνωμα (2 κλώνοι). Οι κλώνοι απομονώθηκαν από μέλη του τομέα Ανοσολογίας του Καρκίνου, του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας έπειτα από απομόνωση των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος, μικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια με πεπτίδια, απομόνωση CD8+ T-κυτταρικών σειρών και κλωνοποίηση με συνεχόμενες αραιώσεις. Τέλος έγινε καθορισμός του TCR καθώς και λειτουργικός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός.

Οι 3 κλώνοι που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της ερευνητικής υπόθεσης, καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν έπειτα από ειδική ενεργοποίηση και καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία των επιγενετικών παραγόντων. Στο τέλος έγινε έλεγχος των φαινοτυπικών και λειτουργικών διαφορών και εκτιμήθηκε η επίδραση των επιγενετικών φαρμάκων στην ικανότητα διέγερσης, στον κυτταρικό κύκλο, στην έκφραση μορίων επιφανείας, στην ικανότητα λύσης κυττάρων στόχων, στην έκκριση κυτταροκινών, στο επίπεδο μεθυλίωσης γονιδιώματος και στο επίπεδο έκφρασης γονιδίων. Ο πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης συνοψίζεται στην Εικόνα 1.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Πλάνο μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την προσέγγιση της ερευνητικής υπόθεσης

2.2 Μοριακές Μέθοδοι

2.2.1 Εκχύλιση ολικού γενωμικού DNA (gDNA)

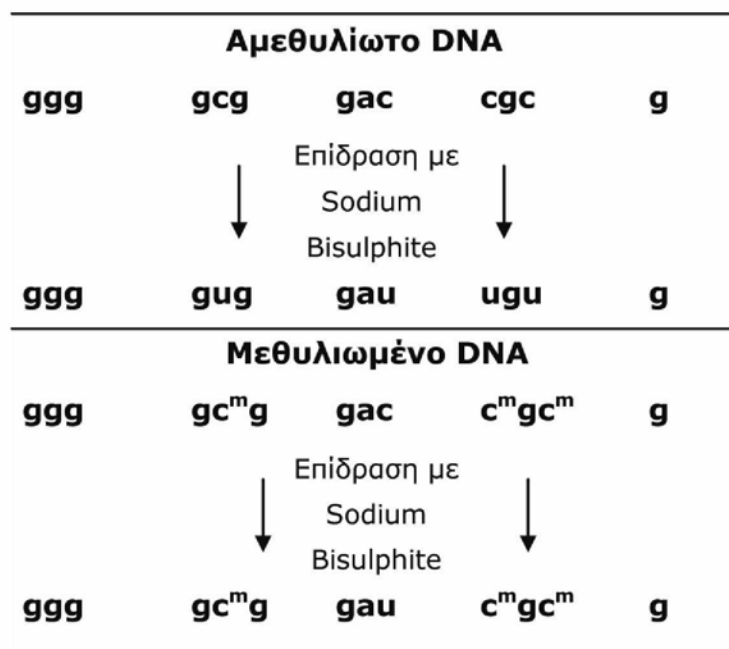
Η απομόνωση ολικού DNA έγινε με τη χρήση του πακέτου της Qiagen, QIAamp DNA blood mini kit το οποίο περιέχει πρωτεάση, Buffer AL, QIamp spin columns, Buffer AW1, Buffer AW2 και Buffer AE. Σε σωληνάρια ελεύθερα RNAσών, που περιείχαν τα ιζήματα των κυττάρων προστέθηκαν 20μl πρωτεάσης και 200μl Buffer AL. Τα δείγματα ανακινούνταν ισχυρά για 15 δευτερόλεπτα και επωαζόταν σε υδατόλουτρο για 20 λεπτά στους 56°C. Μετά την επώαση ακολουθούσε ελαφριά oligοδευτερόλεπτη φυγοκέντρηση και προσθήκη 200μl 100% αιθανόλης σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα μεταφερόταν στις στήλες φυγοκέντρησης του πακέτου και φυγοκεντρούνταν στις 8000 στροφές ανά λεπτό (σ.α.λ) για 1 λεπτό. Γινόταν αλλαγή του σωληναρίου συλλογής, προσθήκη 500μl του Buffer AW1 και φυγοκέντρηση στις 8000σ.α.λ για 1 λεπτό. Έπειτα αλλαζόταν το σωληνάριο συλλογής, προσθέτονταν 500μl του Buffer AW2 και οι στήλες φυγοκεντρούνταν στις 14000σ.α.λ για 3 λεπτά. Οι στήλες μεταφέρóταν σε σωληνάρια ελεύθερα DNAσών και RNAσών και προστεθήκαν 30 ή 100μl διάλυμα εξαγωγής ή RNase, DNase-free H₂O. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C.

2.2.2 Ανάλυση μεθυλίωσης ολικού γονιδιώματος

2.2.2.1 Τροποποίηση του DNA με Bisulfite

Η τροποποίηση του ολικού DNA έγινε με τη χρήση του πακέτου της Serological Corporation, CpGenome DNA Modification Kit της (Αρ.καταλόγου S7820), υδροξειδίου του νατρίου (Sigma, Αρ.καταλόγου S-8263), σωληνάρια erppendorf ελεύθερα DNAσών και RNAσών (Ambion, Αρ.καταλόγου 12400) και σωληνάρια PCR λεπτού τοιχώματος 0.2ml (Corning, Αρ.καταλόγου 6571).

Με την αντίδραση bisulfite, οι αμεθυλιώτες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες ενώ η 5' μεθυλοκυτοσίνη παραμένει ως έχει. Συγκεκριμένα, όλες οι αμεθυλιώτες κυτοσίνες απαμινώνονται και με επίδραση άλατος σουλφονικού οξέος μετατρέπονται σε ουρακίλες ενώ οι 5' μεθυλοκυτοσίνες παραμένουν αναλλοίωτες. Με αυτό τον τρόπο, η αλληλουχία του επεξεργασμένου DNA θα διαφέρει ανάλογα με το αν το DNA ήταν αρχικά μεθυλιωμένο ή αμεθυλιώτο. Οι αρχικά συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA δεν θα είναι πλέον συμπληρωματικές έπειτα από την χημική μετατροπή της κυτοσίνης. Η παραπάνω διαδικασία αναπαρίσταται στην εικόνα 2.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Επίδραση της αντίδρασης bisulfite σε μεθυλιωμένο και αμεθυλιώτο DNA

Για την αντίδραση bisulfite χρειαζόταν 1μg cDNA το οποίο ποσοτικοποιούνταν με φωτομέτρηση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3. Σε σειρά σωληνάρια erpendorf, προσεθόταν 7μl από NaOH συγκέντρωσης 3M σε 1μg DNA που βρισκόταν σε εναιώρημα 100μl H₂O και ακολούθησε ανάμειξη. Τα δείγματα επωαζόταν για 10 λεπτά στους 50°C. Στη συνέχεια προσθέτονταν 550μl, προσφάτως προετοιμασμένου, αντιδραστήριου τροποποίησης DNA I και ακολουθούσε έντονη ανακίνηση και επώαση των δειγμάτων στους 50°C για όλη τη νύχτα, προστατευμένα από το φώς.

Το αντιδραστήριο τροποποίησης DNA III προετοιμάζόταν και επαναδιαλυόταν με έντονη ανακίνηση και πέρασμα μέσα από ακρορύγχιο πιπέτας 1ml 10 φορές ώστε να διαλυθούν τυχόν ενυπάρχοντα συσσωματώματα. 5 μl αντιδραστήριου τροποποίησης DNA III προσθέτονταν στα διαλύματα DNA μέσα στα σωληνάρια. Έπειτα προσθέτονταν 750μl αντιδραστήριου τροποποίησης DNA II και ακολουθούσε σύντομη ανακίνηση και επώαση σε RT για 5-10 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε 5000g για 10 δευτερόλεπτα ώστε να δημιουργηθεί το ίζημα του αντιδραστήριου τροποποίησης DNA III και το υπερκείμενο απομακρυνόταν. Μέσα στα σωληνάρια με το ίζημα προσθέτονταν 1ml αιθανόλης 70% και ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 5000g για 10 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο απομακρυνόταν. Το τελευταίο βήμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Έπειτα από την απομάκρυνση της αιθανόλης μετά την τρίτη φυγοκέντρηση, το δείγμα φυγοκεντρούνταν σε υψηλή ταχύτητα για 2 λεπτά και το εναπομείναν υπερκείμενο απομακρύνονταν με πιπέτα.

Για τη συμπλήρωση της διαδικασίας τροποποίησης του DNA, προσθέτονταν 50μl διαλύματος, 20mM NaOH σε 90% αιθανόλη, στα δείγματα και ακολουθούσε σύντομη

έντονη ανακίνηση για την επαναδιάλυση του ιζήματος και επώαση για 5 λεπτά σε RT. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνταν ξανά σε 5000g για 30 δευτερόλεπτα, προσθέτονταν 1ml 90% αιθανόλης και ανακινούνταν έντονα. Επαναφυγοκεντρούνταν, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνονταν άλλη μια φορά. Μετά το δεύτερο πλύσιμο, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε υψηλή ταχύτητα για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν προσεκτικά με ακρορύγχιο πιπέτας και στα δείγματα επιτρεπόταν να στεγνώσουν για 20 λεπτά σε RT. Ακολουθούσε προσθήκη 25μl EB buffer ή εναλλακτικά H₂O ελεύθερο DNAσών και RNAσών και τα δείγματα ανακινούνταν έντονα μέχρι του σημείου που το ίζημα να έχει επαναδιαλυθεί πλήρως. Η διαδικασία συνεχιζόταν με επώαση για 15 λεπτά στους 60°C, ώστε να εκχυλιστεί το DNA και τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε υψηλή ταχύτητα για 3 λεπτά. Τέλος το υπερκείμενο μεταφερόταν με προσοχή σε σωληνάρια και το τροποποιημένο DNA αποθηκευόταν στους -80°C. Αποφευγόταν η μεταφορά του αντιδραστηρίου τροποποίησης DNA III (ίζημα).

2.2.2.2 PCR για ALU στοιχεία

Τα στοιχεία ALU είναι αλληλουχίες του DNA γεμάτες επαναλήψεις και είναι διάσπαρτες στο γονιδίωμα. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 1.4 εκατομμύρια από αυτές τις αλληλουχίες στο ανθρώπινο γονιδίωμα και οι οποίες φυσιολογικά είναι υπό καθεστώς βαρύτητας μεθυλίωσης και υπολογίζεται ότι παραπάνω από το 1/3 της μεθυλίωσης του DNA επισυμβαίνει σε τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Χρησιμοποιώντας PCR ενισχύθηκαν τα στοιχεία ALU σε δείγματα γενωμικού DNA τροποποιημένου ή μη με αντίδραση bisulfite χρησιμοποιώντας μείγματα αντίδρασης PCR, εκκινητές και συνθήκες που περιγράφονται στους πίνακες 9 και 10. Συγκεκριμένα σε σωληνάρια PCR τοποθετούνταν 22μl μείγματος αντίδρασης PCR, 6μl μείγματος Taq πολυμεράσης και 2μl τροποποιημένου με bisulfite DNA και τα σωληνάρια τοποθετούνταν στον κυκλοποιητή. Ακολουθούσε πέψη με το ένζυμο περιορισμού MboI (επόμενη ενότητα) και διακρίναμε το ποσοστό μεθυλίωσης του κάθε δείγματος. Το ποσοστό μεθυλίωσης των στοιχείων ALU μας δείχνει σε μεγάλο βαθμό το ποσοστό της ολικής μεθυλίωσης του γονιδιώματος, όπως έχει περιγραφεί [164].

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση των στοιχείων ALU.

Στάδιο	Συνθήκες (30 κύκλοι)
Αρχική αποδιάταξη	94° για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94° για 60 δευτερόλεπτα
Αναδιάταξη	52° για 60 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72° για 60 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72° για 5 λεπτά

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση μείγματος PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος Μείγματος (μl)
PCR buffer 10x	50
MgCl ₂	50
dNTPs	40
5' gATCTTTTATTTAAAAATATAAAAAATTAgt 3' ID#OR257004-7 (50pmol/μl)	10
5' gAT CCC AAA CTA AAA TAC AAT AA 3' ID#OR257004-8(50pmol/μl)	10
RNase-free H ₂ O	200

2.2.2.3 Πέψη με το ένζυμο περιορισμού MboI

Το ποσοστό μεθυλίωσης κάθε δείγματος DNA μπορεί να εκτιμηθεί με βάση το ποσοστό πέψης από το ένζυμο MboI, του προϊόντος από ALU PCR του επιθυμητού δείγματος και του αντίστοιχου τροποποιημένου με bisulfite. Το ένζυμο περιορισμού MboI στοχεύει σε μία μόνο θέση κοπής που περιέχει μεθυλοκυτοσίνες. Το άθικτο προϊόν πέψης αντιστοιχεί σε αμεθυλιώτο (ή μεταλλαγμένο) DNA, ενώ τα προϊόντα πέψης αντιστοιχούν σε μεθυλιωμένο DNA (στο σημείο κοπής) που έχουν αναγνωρισθεί από το ένζυμο και έχουν υποστεί πέψη. Το προϊόν από την PCR για ALU στοιχεία είναι 152bp και τα προϊόντα πέψης από το MboI είναι 125 και 27bp.

Το μείγμα του ενζύμου προετοιμαζόταν όπως φαίνεται στον πίνακα 11. Για κάθε δείγμα προς ανάλυση, τοποθετούνταν σε σωληνάριο eppendorf, 9μl του μείγματος του ενζύμου περιορισμού MboI και 6μl από το προϊόν ALU PCR του δείγματος προς εξέταση αλλά και το προϊόν ALU PCR του τροποποιημένου με bisulfite δείγματος και ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 2 ώρες. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε γέλη αгарόζης 3.5% και ακολουθούσε ποσοτικοποίηση με μέτρηση των εικονοστοιχείων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα UniDocMw 10.01 της Uvitech.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση μείγματος ενζύμου περιορισμού MboI.

Αντιδραστήριο	Όγκος για μείγμα 20 δειγμάτων (μl)
10xNB4	30
MboI	5
RNase-free H ₂ O	150

2.2.3 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση RNA έγινε με τη χρήση TRI. Τα κύτταρα αποθηκεύονταν σε μορφή ιζήματος στους -80°C . Μόλις αποψύχονταν τοποθετούνταν απευθείας σε TRI ($5-10 \times 10^6$ κύτταρα/ml). Έπειτα ομογενοποιούνταν με ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 30 δευτερόλεπτα και εισαγωγή του δείγματος 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G. Ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση (12000 g ; 10 λεπτά; 4°C). Το υπερκείμενο συλλεγόταν και μεταφερόταν σε νέο σωληνάριο με προσθήκη 100μL χλωροφορμίου. Τα δείγματα ανακινούνταν με αναστροφή του σωληναρίου, επώάζονταν σε RT για 8 λεπτά και φυγοκεντρούνταν (12000 g ; 10 λεπτά; 4°C). Η υδάτινη φάση συλλεγόταν πάλι με μεγάλη προσοχή και μεταφερόταν σε νέα σωληνάρια με προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης. Ακολουθούσε ανακίνηση του σωληναρίου για 10", επώαση σε RT για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση (12000 g ; 8 λεπτά; 20°C). Το υπερκείμενο απομακρυνόταν με αναστροφή των σωληναρίων και το ίζημα επαναδιαλυόταν σε 1 ml αιθανόλης 75% (Scharlau). Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν (7600 g ; 5 λεπτά; 4°C), το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα σωληνάρια παρέμεναν ανοικτά σε RT για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμιστεί η εναπομένουσα αιθανόλη. Προσθέτονταν 30 μl νερό ελεύθερο RNAσών και τα δείγματα τοποθετούνταν απευθείας σε πάγο.

Μία μικρή ποσότητα RNA (2 μl) χρησιμοποιούνταν για ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση. Ως τυφλό δείγμα τοποθετούνταν σε κυβέτες UVette, νερό ελεύθερο RNAσών. Σε παρόμοια κυβέτα τοποθετούνταν το άγνωστο δείγμα σε αραιώση 1/50 και υπολογιζόταν η συγκέντρωσή του. Επαλήθευση της συγκέντρωσης και έλεγχος της ποιότητας του δείγματος για την παρουσία γενωμικού DNA γινόταν και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% με 5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Γινόταν 4 διαδοχικές αραιώσεις του RNA γνωστής ποσότητας και διαδοχικές αραιώσεις του αγνώστου δείγματος. Με βάση την ένταση των ζωνών του 18sRNA επιβεβαιωνόταν η συγκέντρωση με μέτρηση των εικονοστοιχείων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα UniDocMw 10.01 της Uvitech. Εφόσον η συγκέντρωση του δείγματος υπερέβαινε τα 100ng/μL γινόταν προσαρμογή της συγκέντρωσης με νερό RNase-free και τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C .

2.2.4 Σύνθεση μορίων cDNA

Προκειμένου να μετατραπούν τα μόρια mRNA σε συμπληρωματικά μόρια DNA (complementary DNA, cDNA), απαιτείται η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Qiagen, Omniscript RT, που περιλάμβανε: 10xRT buffer, διάλυμα dNTPs, Omniscript RT και H_2O ελεύθερο DNAσών και RNAσών. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή και αναστολέας των RNAσών. Τα δείγματα RNA και τα αντιδραστήρια αποψύχονταν και διατηρούνταν σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Αρχικά προετοιμάζονταν το μείγμα αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον πίνακα 12.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση cDNA

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
10xRT buffer	2.5
dNTP mix	2.5
RNAsin	0.31
Omniscript RT	1.25
RNase-free H ₂ O	4.44

Σε σωληνάρια PCR τοποθετούνταν 3.5 μL νερό, 4 μL τυχαία εξαμερή και 6.5 μL RNA. Τα σωληνάρια τοποθετούνταν στους 72 °C για 2 λεπτά και στη συνέχεια προσθέτονταν 11 μL μείγματος αντιδραστηρίων. Τα δείγματα επωάζονταν στους 42°C για 60 λεπτά και στη συνέχεια για 10 λεπτά στους 65 °C, για την αδρανοποίηση των ενζύμων. Τέλος προσθέτονταν 25 μL H₂O και τα δείγματα αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Qiagen Taq Mastermix, το οποίο περιέχει το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, PCR buffer, dNTPs και H₂O ελεύθερο DNAσών και RNAσών. Οι αντιδράσεις έγιναν σε σωληνάρια της Corning και σε θερμοκυκλοποιητές MJ Research PTC-200. Τα αντιδραστήρια για τη σύνθεση μείγματος PCR και μείγματος Taq πολυμεράσης φαίνονται στον Πίνακα 13 και 14. Για κάθε αντίδραση προσθέτονταν 22μl μείγματος PCR, 6μl μείγματος Taq πολυμεράσης και 2μl δείγματος DNA ή cDNA σε τελικό όγκο 30μl.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση μείγματος PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος Μείγματος (μl)
PCR buffer 10x	50
MgCl ₂	50
dNTPs	40
Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	10
Οπίσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	10
RNase-free H ₂ O	200

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση μείγματος Taq πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος Μείγματος (μl)
Taq Polymerase	2.2
RNase-free H ₂ O	50

2.2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Προκειμένου να απεικονιστούν τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR, τα δείγματά φορτωνόταν σε πηκτή αгарόζης με πυκνότητα 2% που περιείχε 5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνταν χρωστική 5x Nucleic acid sample buffer ή εναλλακτικά 10x Blue Juice Gel Loading Buffer και ποσοτικός μάρτυρας DNA.

2.2.7 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR)

Για την qRT PCR χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Invitrogen, Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε σωληνάρια 0.1ml και σε κυκλοποιητή Rotor Gene RG-6000. Για κάθε γονίδιο χρησιμοποιούνταν διπλά δείγματα και υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων για κάθε δείγμα. Η qRT-PCR, αποδίδει επακριβώς τον αριθμό των αντιγράφων σε κάθε δείγμα, εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ευρύ φάσμα ποσοτικοποίησης. Είναι μια πολύ αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης, ιδιαίτερα για χαμηλό αριθμό μεταγράφων, για περιορισμένη ποσότητα δείγματος και για τη διασαφήνιση μικρών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης mRNA.

Αρχικά προετοιμαζόταν το μείγμα της Real Time PCR που περιείχε Platinum SYBR Green, μείγμα εκκινητών και H₂O, όπως περιγράφεται στον πίνακα 15. Για κάθε αντίδραση τοποθετούταν σε σωληνάρια 0.1ml, 23μl από το μείγμα της Real Time PCR και 2μl cDNA και τα δείγματα τοποθετούταν στον κυκλοποιητή. Οι συνθήκες της Real Time PCR και οι εκκινητές που χρησιμοποιούνταν, αναγράφονται στον πίνακα 16. Η έκφραση των γονιδίων κανονικοποιήθηκε ως προς την έκφραση β2-μικροσφαιρίνης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση μείγματος της Real Time PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος Μείγματος ανά δείγμα (μl)
Platinum SYBR Green	12.5
Μείγμα εκκινητών	1
RNase-free H ₂ O	9.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Μείγματα εκκινητών και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την Real Time PCR.

Γονίδιο	Αριθμός Καταλόγου	Συνθήκες		
		Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση
B2M	PPH01094E	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
FOXP3	PPH00029B	95°C, 15sec	60°C, 15sec	72°C, 15sec
SMAD2	PPH01949E	95°C, 15sec	58°C, 15sec	72°C, 15sec
SMAD3	PPH01921B	95°C, 10sec	58°C, 10sec	72°C, 30sec
SMAD4	PPH00134A	95°C, 10sec	58°C, 10sec	72°C, 30sec
SMAD7	PPH01905A	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
TGFb1	PPH00508A	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
TGFb2		95°C, 15sec	53°C, 15sec	72°C, 15sec
TGFb3	PPH00531E	95°C, 10sec	58°C, 10sec	72°C, 30sec
TGFbR1 (ALK5)	PPH00237B	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
IFNG	PPH00380B	95°C, 10sec	58°C, 10sec	72°C, 30sec
TNF	PPH00341A	95°C, 30sec	55°C, 30sec	72°C, 30sec
IL1b	PPH00171A	95°C, 10sec	57°C, 10sec	72°C, 30sec
IL10	PPH00572A	95°C, 10sec	55°C, 10sec	72°C, 30sec
CASP3	PPH0017B	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
TNFSF10 (TRAIL)	PPH00242E	95°C, 10sec	55°C, 10sec	72°C, 20sec
FAS	PPH00141B	95°C, 10sec	55°C, 10sec	72°C, 20sec
FASLG	PPH00142B	95°C, 10sec	55°C, 10sec	72°C, 30sec
PD-L1	F-5' GGT GGT GCC GAC TAC AA 3' (OR 252294-3) R-5' TAG CCC TCA GCC TGA CAT 3' (OR 252294-4)	95°C, 10sec	58°C, 10sec	72°C, 20sec
PD-L2		95°C, 30sec	55°C, 30sec	72°C, 30sec
PD-1		95°C, 30sec	55°C, 30sec	72°C, 30sec
PERF1	PPH07126A	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
GZMB	PPH02594A	95°C, 15sec	60°C, 60sec	
TNF		95°C, 15sec	60°C, 60sec	

2.2.8 Ανάλυση του TCR με PCR

Η ανάλυση της αλυσίδας του TCR με PCR πραγματοποιούνταν σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γινόταν η ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TCR και στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιούνταν αλληλούχιση ολόκληρης της β αλυσίδας. Η ταυτοποίηση της Vβ περιοχής πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο mRNA σε δείγματα κλώνων από ασθενείς με NSCLC και μελάνωμα. Ειδικότερα, από τα παγωμένα ιζήματα κυττάρων από κλώνο, απομονώνονταν RNA και ακολουθούσε σύνθεση cDNA, το οποίο χρησιμοποιούνταν σε multiplex PCR ώστε να διευκρινιστεί η Vβ περιοχή του TCR με βάση επιλεγμένους εκκινητές που παρατίθενται στον πίνακα 18. Οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στον πίνακα 17.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορούνταν σε πηκτή αгарόζης με πυκνότητα 2% παρουσίας βρωμιούχου αιθιδίου. Με βάση το μέγεθος της ζώνης και την ομάδα των εκκινητών από την οποία ανιχνεύονταν προϊόν, επαναλαμβάνονταν η PCR με κάθε εκκινητή ξεχωριστά και ακολουθούσε ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TCR ανάλογα με τον εκκινητή που παρήγαγε προϊόν. Καθώς τα κύτταρα του κλώνου έχουν προέλθει από ένα αρχικό κύτταρο και φέρουν τον ίδιο TCR στην ηλεκτροφόρηση αναμέναμε ένα μοναδικό προϊόν για κάθε κλώνο.

Στο δεύτερο στάδιο της ανάλυσης του TCR πραγματοποιούνταν αλληλούχιση ολόκληρης της β αλυσίδας στα δείγματα όπου είχε αποκαλυφθεί η Vβ περιοχή του TCR. Αρχικά, ενισχυόταν το τμήμα Vβ-Cβ με PCR στις συνθήκες που αναφέρονται στον πίνακα 18 και ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%. Το προϊόν εξαγόταν από την πηκτή και καθαριζόταν με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθούσε αντίδραση Sanger με τη χρήση του BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, καθαρισμός με BigDye X-Terminator Purification Kit και αλληλούχιση του προϊόντος σε συσκευή ABI 310. Η αλληλουχία που προέκυπτε συγκρινόταν με τις αλληλουχίες των περιοχών V-D-J-C της β αλυσίδας που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων ImMunoGeneTics και διαπιστωνόταν έτσι η πλήρης σύσταση της β αλυσίδας του TCR.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17. Συνθήκες για την multiplex PCR καθορισμού της Vβ αλυσίδας του TCR.

Στάδιο	Συνθήκες (35 κύκλοι)
Αρχική αποδιάταξη	94° για 5 λεπτά
Αποδιάταξη	94° για 45 δευτερόλεπτα
Αναδιάταξη	70° για 60 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72° για 90 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72° για 10 λεπτά

ΠΙΝΑΚΑΣ 18. Εκκινητές για την ανίχνευση της Vβ περιοχής του TCR.

Ομάδα	Όνομα	Αλληλουχία	Μέγεθος (bp)
A	Vβ3	CCT-GGA-GCT-TGG-TGA-CTC-TGC	300
A	Vβ4	ACC-TGA-ATG-CCC-CAA-CAG-CTC	350
A	Vβ30	CCT-CCA-GCT-GCT-CTT-CTA-CTC	410
A	Vβ6 (εκτός 6-4)	GGT-ATC-GAC-AAG-ACC-CAG-GCA	450
A	Vβ2	AAG-TGA-TCT-TGC-GCT-GTG-TCC-CCA	500
B	Vβ7(1 & 9)	TGC-AGA-GAG-GCC-TAA-GGG-ATC	350
B	Vβ11	GAT-CGA-TTT-TCT-GCA-GAG-AGG-CTC	350
B	Vβ20	CAC-ATA-CGA-GCA-AGG-CGT-CGA	380
B	Vβ7(2 & 3)	GTG-TGA-TCC-AAT-TTC-AGG-TCA-TAC-TG	480
B	Vβ 15	CAG-TTT-GGA-AAG-CCA-GTG-ACC-C	500
C	Vβ14	CTG-CAG-AAC-TGG-AGG-ATT-CTG-G	310
C	Vβ23	CTC-AAT-GCC-CCA-AGA-ACG-CAC	350
C	Vβ10(1 & 2)	GGT-ATC-GAC-AAG-ACC-TGG-GAC-AT	440
C	Vβ5(1 & 3)	TGC-TCC-CCT-ATC-TCT-GGG-CA	470
C	Vβ28	GGA-GAG-AAA-GTT-TTT-CTG-GAA-TGT-GTC	500
D	5(4,5,6,7 & 8)	AGC-TCT-GAG-CTG-AAT-GTG-AAC-GCC	320
D	Vβ24	CTC-TCG-ACA-GGC-ACA-GGC-TAA-AT	350
D	Vβ 6-4	GTG-TCT-CCA-GAG-CAA-ACA-CAG-ATG-A	360
D	Vβ13	CTA-TCC-CTA-GAC-ACG-ACA-CTG-TC	470
D	Vβ7(4,6,7 & 8)	GGT-GTG-ATC-CAA-TTT-CGG-GTC-ATG	480
E	Vβ25	CAG-GCC-CTC-ACA-TAC-CTC-TCA	310
E	Vβ12	GAT-CCA-GCC-CTC-AGA-ACC-CAG	320
E	Vβ29	TTC-CCA-TCA-GCC-GCC-CAA-ACC-TAA	350
E	Vβ10(3)	CTC-TGA-GAT-GTC-ACC-AGA-CTG-AG	480
E	Vβ17	GCG-ATC-CAT-CTT-CTG-GTC-ACA-TG	480
F	Vβ19	CTC-ACT-GTG-ACA-TCG-GCC-CAA-AA	320
F	Vβ9	GCA-CAA-CAG-TTC-CCT-GAC-TTG-C	340
F	Vβ16	GAA-AGA-TTT-TCA-GCT-AAG-TGC-CTC-CC	360
F	Vβ27	CAA-AGT-CTC-TCG-AAA-AGA-GAA-GAG-GAA-T	360
F	Vβ18	CAG-CCC-AAT-GAA-AGG-ACA-CAG-TC	480

2.3 Κυτταρικές Μέθοδοι

2.3.1 Παρασκευή ορού

Οι παρτίδες του ορού (HS, human serum) παρασκευάζονταν από πλάσμα που προήλθε από κέντρα αιμοδοσίας και αποθηκεύονταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το πλάσμα είχε ελεγχθεί για HBV, HCV, HIV, HTLV I, HTLV II και σύφιλη και ήταν γνωστής ομάδας αίματος. Αρχικά παρασκευάζονταν μία ποσότητα ορού για κάθε ομάδα αίματος χωριστά (PS), από τουλάχιστον δύο ασκούς της κάθε ομάδας (A, B, O και AB).

Οι ασκοί αφηνόταν σε θερμοκρασία 4°C για 24 ώρες και την επόμενη ημέρα τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 30 λεπτά για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του κάθε ασκού τοποθετούνταν σε μπουκάλια 250mL και προσθέτονταν χλωριούχο ασβέστιο (Calcium Chloride 10%) σε αναλογία 1/27. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 1 με 2 ώρες μέχρι να παρατηρηθεί πήξη του υλικού. Με τη χρήση ξέστρου από βαμβάκι πραγματοποιούνταν ο διαχωρισμός του ορού από το ινωδογόνο, το οποίο μετατρέπεται σε ινώδες και σχηματίζει το πήγμα. Ο ορός που παρασκευαζόταν με αυτή τη διαδικασία περνούσε από φίλτρο 100μm και συγκεντρωνόταν σε φιαλίδια 50mL. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1800σ.α.λ για 10 λεπτά, ο ορός συλλεγόταν σε μπουκάλι 1L και ακολουθούσε επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά με συχνή ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετούνταν άμεσα σε παγωμένο νερό και αποθηκεύονταν στους 4°C μέχρι να διαπιστωθεί η στειρότητα της διαδικασίας.

Για τον έλεγχο της στειρότητας λαμβάνονταν δύο δείγματα των 500μL από κάθε PS. Μία σταγόνα τοποθετούνταν για καλλιέργεια σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (Gelose Count Tact), ενώ δείγματα των 200μL αναμιγνύονταν με 1,8mL SF-IDc και τοποθετούνταν σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας M24. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 48 ώρες και ελεγχόνταν για την παρουσία επιμόλυνσης. Εφόσον όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά ακολουθούσε η παρασκευή του ορού. Για την παρασκευή της κάθε παρτίδας του ορού αναμιγνύονταν σε μπουκάλι 1L, 500mL ορού ομάδας A, 300mL ορού ομάδας AB, 100mL ορού ομάδας O και 100mL ορού ομάδας A. Η ποσότητα αυτή διαμοιραζόταν σε 10 μπουκάλια των 125mL. Το υλικό αυτό τοποθετούνταν στους 4°C για 24 h και στη συνέχεια λαμβάνονταν διπλά δείγματα των 500μL από το καθένα για έλεγχο στειρότητας. Τέλος, τα μπουκάλια των 125mL αποθηκεύονταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους. Για την απόψυξη ποσότητας ορού, το μπουκάλι των 125mL τοποθετούνταν στους 4°C για 24 ώρες. Η ποσότητα μεταφερόταν σε φιαλίδια 50mL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3500σ.α.λ. για 15 λεπτά στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Αφαιρούνταν η ποσότητα λίπους από την επιφάνεια των σωληναρίων, το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέα σωληνάρια και επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Ο ορός μεταφερόταν σε νέο σωληνάρια 50 mL και αποθηκεύονταν στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, έτοιμος προς χρήση.

2.3.2 Απομόνωση Μονοπύρηνων κυττάρων του Περιφερικού Αίματος

Για την αιμοληψία χρησιμοποιούσαν ηπαρινισμένη σύριγγα, 2-5U ηπαρίνης ανά mL αίματος, και γινόταν αιμοληψία 60-120mL φλεβικού αίματος. Εν συνεχεία, το ολικό αίμα μεταφέρονταν με αργή έγχυση πάνω από την στοιβάδα της φικόλης, χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνεια της, σε αναλογία 30mL αίματος ανά 20mL φικόλης. Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) γινόταν με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας και διαδοχικές πλύσεις. Το ολικό αίμα τοποθετημένο πάνω στη στοιβάδα της φικόλης φυγοκεντρούνταν στα 400g για 30λεπτά, στους 20°C με χαμηλή επιτάχυνση. Μετά την πρώτη φυγοκέντρηση, η στοιβάδα των μονοπύρηνων (buffy coat) συλλέγονταν και μεταφερόταν σε νέο αποστειρωμένο. Η στοιβάδα των PBMC φυγοκεντρούνταν 3 φορές ακόμη χρησιμοποιώντας διάλυμα 1xPBS με 1 mM EDTA και 1%HS για 8min στους 4°C με σταδιακή μείωση της ταχύτητας περιστροφής (370g, 300g και 210g αντίστοιχα) με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος από αιμοπετάλια και φικόλη. Στην συνέχεια, τα κύτταρα μετρούνταν με τη χρήση αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και χρωστικής Trypan Blue, και ακολουθούσε η τελευταία φυγοκέντρηση (300g, 8min, 4°C).

2.3.3 Ψύξη κυττάρων

Για τη φύλαξη των PBMCs χρησιμοποιούσαν διάλυμα 50% θερμικά αδραντοποιημένου ανθρώπινου ορού (HS), 40% θρεπτικού υλικού Iscove's, (IDc), και 10% DMSO. Η εναιώρηση των απομονωμένων κυττάρων στο ψυκτικό διάλυμα γινόταν με βάση τον αριθμό των κυττάρων, συνήθως 10-20x10⁶ PBMCs ή 2-4x10⁶ T κλώνου ανά κρυσταλλίδιο, και με μεγάλη προσοχή ειδικά για την προσθήκη του πρώτου ml του ψυκτικού διαλύματος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετούνταν σε ειδικό δοχείο που περιείχε ισοπροπανόλη, ώστε να επιτευχθεί σταδιακή και όχι απότομη μείωση της θερμοκρασίας, και μεταφερόταν σε ψυγείο -80 °C, όπου και παρέμεναν για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα αποθηκεύονταν, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, στους -196°C σε δοχείο υγρού αζώτου (LN₂).

2.3.4 Απόψυξη Κυττάρων

Για την απόψυξη, τα PBMCs αρχικά ανακινούνταν σε υδατόλουτρο 37 °C για περίπου 2 λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί σχεδόν ολική τήξη και αμέσως μεταφερόταν σε 20ml ζεστού (37°C) θρεπτικού μέσου 10% FBS-IDc (ή HS-IDc). Αμέσως φυγοκεντρούνταν στα 400 g για 6 λεπτά στους 21°C. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε ζεστό θρεπτικού μέσου 10% FBS-IDc (ή HS-IDc). Τα κύτταρα παρέμεναν στο πλήρες θρεπτικό μέσο 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ανακάμψουν. Έπειτα ακολουθούσε χρώση μικρής ποσότητας κυττάρων με την χρωστική Trypan Blue και καταμέτρηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Υπολογιζόταν πέρα από τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων, ο αριθμός των νεκρών (βιωσιμότητα) αλλά και το ποσοστό ανάκτησης κυττάρων.

2.3.5 Παραγωγή βλαστών PBMC με τη χρήση PHA-L

Το PHA (Phaseolus vulgaris agglutinin) αποτελείται από 2 μοριακά είδη, την ερυθρό-αγγλουτινίνη (PHA-E) η οποία έχει χαμηλή μιτογονική ενεργότητα για τα λευκά και υψηλή ερυθρό-αγγλουτινική ενεργότητα και την λευκό-αγγλουτινίνη (PHA-L) η οποία έχει υψηλή μιτογονική και λευκό-αγγλουτινική ενεργότητα και χαμηλή ερυθρό-αγγλουτινική ενεργότητα. Το PHA, διεγείρει κυρίως τα T-κύτταρα προς ενεργοποίηση με διασταυρούμενη σύνδεση του υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR). Αυτά τα T-κύτταρα (κυρίως CD4) μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα διεγέρτες ή ως στόχοι σε λειτουργικές δοκιμασίες. Εν συντομία, τα PBMCs διεγείρονταν με PHA και υψηλή δόση IL-2 για 7 ημέρες. Σε αυτό το διάστημα προσθέτονταν ανά τακτά διαστήματα φρέσκο μιτογόνο και κυτταροκίνη. Στο τέλος κάθε κύκλου ενεργοποίησης, τα κύτταρα ήταν έτοιμα προς χρήση ή αποθήκευση.

Ειδικότερα, την πρώτη ημέρα χρησιμοποιούνταν είτε φρέσκα απομονωμένα κύτταρα ή αποψυγμένα όπως έχει περιγραφεί. Την ημέρα 1, 1×10^6 PBMC συλλέγονταν και πλενόταν μία φορά με 10ml 10% HS-IDc. Ακολούθως τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 2ml 10% HS-IDc παρουσία 1μg/ml PHA-L και 100U/ml IL2, τοποθετούνταν σε 1 φρεάτιο καλλιέργειας M24 (ιδανικά 10×10^6 κύτταρα χρησιμοποιούνταν σε αυτό το στάδιο) και τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C με 8% CO₂. Την ημέρα 4, τα κύτταρα παρατηρούνταν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά, συλλεγόταν σε σωληνάριο falcon 50ml, πλενόταν με φυγοκέντρηση στα 400g για 6 λεπτά σε RT και επαναδιαλυόταν σε 10ml ζεστού θρεπτικού υλικού 10% HS-IDc. Ακολουθούσε μέτρηση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer με τη χρήση Trypan blue και ένα ακόμη στάδιο πύσης όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν, τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε ζεστό θρεπτικό υλικό 10% HS-IDc που περιείχε 1μg/ml PHA-L και 100U/ml IL2 σε τελική συγκέντρωση κυττάρων 1×10^6 /mL και κάθε 2ml διαλύματος που περιείχε κύτταρα τοποθετούνταν σε ένα φρεάτιο καλλιέργειας M24. Την ημέρα 4, τα κύτταρα ελέγχονταν μικροσκοπικά και παιρνόταν η απόφαση για αλλαγή 50% θρεπτικού υλικού ή διαίρεση των φρεατίων καλλιέργειας. Στην περίπτωση της αλλαγής 50% θρεπτικού υλικού, απομακρυνόταν 1ml θρεπτικού υλικού από τα φρεάτια και αντικαθιστούνταν από φρέσκο 10% HS-IDc που περιείχε 200U/ml IL2, ώστε να επιτύχουμε τελική συγκέντρωση 100U/mL. Την ημέρα 6, τα κύτταρα ελέγχονταν και ανάλογα με την κάλυψη της επιφάνειας του φρεατίου παιρνόταν η απόφαση αντίστοιχη με αυτή της ημέρας 6.

Την ημέρα 7 συλλεγόταν όλα τα κύτταρα, ακολουθούσε πύση με φυγοκέντρηση στα 400g, για 6 λεπτά σε RT και τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 10ml ζεστό 10% HS-IDc. Ακολουθούσε καταμέτρηση και καθορισμός της βιωσιμότητας % καθώς και ο χρόνος διαίρεσης. Ανάλογα με την ανάγκη για βλάστες, τα κύτταρα είτε χρησιμοποιούνταν είτε παγωνόταν ή ο κύκλος καλλιέργειας συνεχιζόταν για άλλες 7 ημέρες.

2.3.6 Καλλιέργεια καρκινικών σειρών και EBV B-κυττάρων

Οι καρκινικές σειρές και τα EBV μετασχηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιούνταν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για την ενεργοποίηση των ειδικών CD8+ T-κυτταρικών κλώνων αλλά και ως κύτταρα στόχοι σε λειτουργικές δοκιμασίες. Αρχικά, τα κύτταρα τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο σε συγκέντρωση $2-4 \times 10^6$ κύτταρα/κρυσταλλίδιο αποψυχόταν και ακολουθούσε επαναδιάλυση τους σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 1% FBS, ώστε να διαλυθεί το τοξικό για αυτά DMSO τουλάχιστον 0.5% v/v. Στη συνέχεια γινόταν καταμέτρηση του αριθμού των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην πλάκα Neubauer και υπολογισμός της βιωσιμότητας του δείγματος. Ακολουθούσε πλύση των κυττάρων και τοποθέτησή τους σε δύο φιάλες καλλιέργειας, με 1/3 και 2/3 των ανακτημένων κυττάρων αντίστοιχα. Οι φιάλες τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C με 8% CO₂.

Ανάλογα με το χρόνο διαίρεσής τους οι καλλιέργειες παρατηρούνταν και όταν κάλυπταν το 80% της επιφάνειας της φιάλης, γινόταν συλλογή των κυττάρων για περαιτέρω χρήση και επανακαλλιέργεια. Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε διάλυμα, όπως τα EBV μετασχηματισμένα B-κύτταρα, γινόταν συλλογή του θρεπτικού μέσου από την φιάλη, πλύση της φιάλης με ζεστό (37°C) PBS και φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 400g για 6 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 10% FBS-IDc και καταμετρούταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν μέσω προσκόλλησης στο πλαστικό της φιάλης ακολουθούσε διαφορετική διαδικασία για τη συλλογή των κυττάρων. Αρχικά συλλεγόταν το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο 50mL. Ακολουθούσε πλύση της φιάλης με 10ml PBS και προσθήκη διαλύματος 2 mM EDTA-PBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά στους 37 °C, ώστε να αποκολληθούν από την πλαστική επιφάνεια. Γινόταν ανακίνηση της φιάλης με χτύπημα από το πλάι και τα κύτταρα συλλεγόταν στο ίδιο φιαλίδιο των 50ml. Όταν τα κύτταρα δεν αποκολλούταν, γινόταν χρήση 0.25% Trypsin-Versene στο διάλυμα EDTA-PBS ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων. Ακολουθούσε πλύση με ζεστό PBS και φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 400g για 6 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 10% FBS-IDc και μετριόταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Κατάλληλος αριθμός κυττάρων συλλεγόταν για χρήση, $2-4 \times 10^6$ κύτταρα/κρυσταλλίδιο παγώνονταν και διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων (2×10^6 , 1×10^6 και 0.5×10^6) τοποθετούνταν σε νέες φιάλες για ανακαλλιέργεια. Η καλλιέργεια συνεχιζόταν μέχρις ότου σημειώνονταν μείωση του χρόνου διαίρεσης των κυττάρων κατά 10%. Στην περίπτωση αυτή η καλλιέργεια διακόπτονταν και γινόταν απόψυξη νέου φιαλιδίου.

2.3.7 Ακτινοβόληση Καρκινικών Σειρών και EBV B-Κυττάρων

Με την ακτινοβόληση επιτυγχάνεται ο κατακερματισμός του DNA, έτσι ώστε τα ακτινοβολημένα κύτταρα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) αλλά να μην έχουν την ικανότητα επιβίωσης, διαίρεσης και ανάπτυξης σε συνθήκες καλλιέργειας εις βάρος των CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων. Τα κύτταρα που ακτινοβολούνταν ήταν οι καρκινικές σειρές και τα EBV B-κύτταρα που χρησιμοποιούνταν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς και τα ετερόλογα PBMCs που χρησιμοποιούνταν ως κύτταρα τροφοί. Αρχικά τα κύτταρα συλλεγόταν, καταμετρούνταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών και ακολουθούσε πλύση στα 400 g για 6 λεπτά. Έπειτα τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 62mL 1% FBS-IDc και τοποθετούνταν σε ειδική φιάλη ακτινοβόλησης. Η ακτινοβόληση των κυττάρων πραγματοποιούνταν σε μαγνητικό επιταχυντή στα 100 Gray για 15 λεπτά. Με το πέρας της ακτινοβόλησης, τα κύτταρα συλλέγονταν από τη φιάλη και επαναμετρούνταν στη πλάκα Neubauer. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων τοποθετούνταν σε φρεάτια κυτταροκαλλιέργειας M6 και χρησιμοποιούνταν ως δείγμα ελέγχου της θνησιμότητας των ακτινοβολημένων κυττάρων καθώς και της στειρότητας της διαδικασίας. Τα υπόλοιπα κύτταρα φυγοκεντρώνταν στα 400 g για 6 λεπτά και παγώνονταν σε ψυκτικό διάλυμα που περιείχε 10% FBS σε συγκέντρωση 5×10^6 /κρυσταλλίδιο για κύτταρα που προορίζονταν για αντιγονοπαρουσιαστικά και 10×10^6 /κρυσταλλίδιο για κύτταρα τροφούς.

2.3.8 Καλλιέργεια CD8 T κλώνων

Οι CD8 T-κυτταρολυτικοί κλώνοι είναι πληθυσμοί οι οποίοι έχουν προέλθει από ένα αρχικό CD8 T ειδικό κύτταρο και ως εκ τούτου όλα τα κύτταρα φέρουν τα ίδια μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Σκοπός της παρακάτω καλλιέργειας ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των CTL, ώστε να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα παρουσίας φαρμάκου. Στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιούνταν δύο συστήματα αντιγονο-παρουσίασης, εναλλάξ σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης: ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα κατάλληλου HLA (αντιγονοπαρουσιαστικά) σε συνδυασμό με EBV B κύτταρα άσχετου HLA (κύτταρα-τροφοί) ή ακτινοβολημένα EBV B κύτταρα κατάλληλου HLA (αντιγονοπαρουσιαστικά) σε συνδυασμό με ακτινοβολημένα PBMCs άσχετου HLA (κύτταρα-τροφοί).

Την ημέρα 0 της καλλιέργειας, οι CD8+ T-κυτταρικοί κλώνοι μετρούνταν και τοποθετούνταν σε φρεάτια ανάλογα με τον αριθμό τους σε συγκέντρωση 0.6×10^6 κυττάρων ανά M24 φρεάτιο καλλιέργειας.

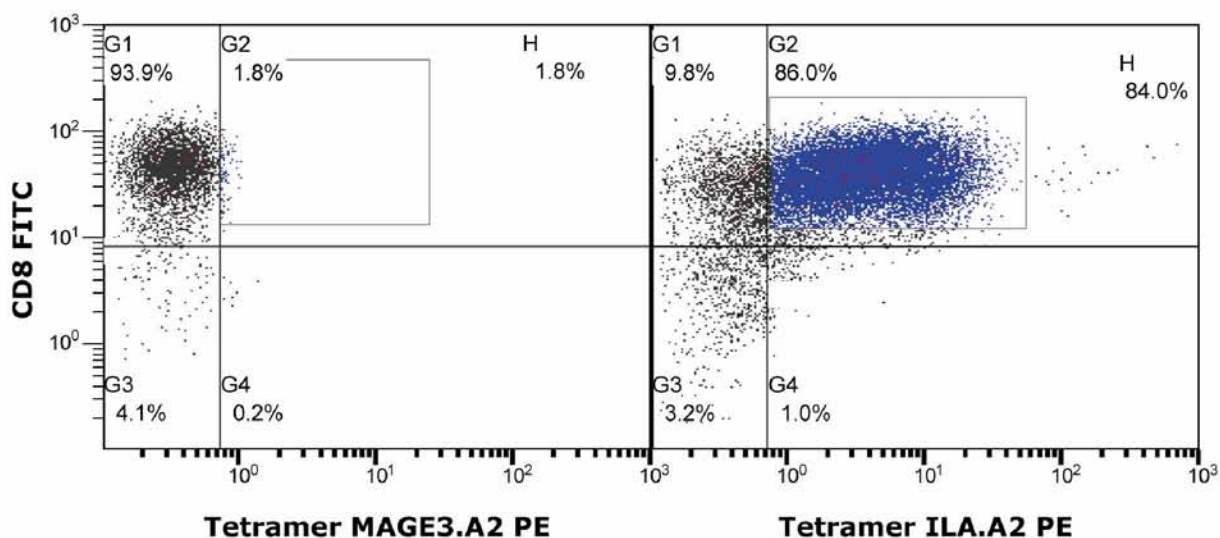
Τα κύτταρα διεγέρτες, αποψυχόταν, μετρούνταν και τοποθετούνταν σε φιαλίδια 15ml με 1%HS-IDc με μέγιστη συγκέντρωση 6×10^6 κύτταρα/ml. Ακολουθούσε η προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20μg/mL και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναδεύονταν κάθε 15 λεπτά. Με το πέρας της

επώασης τα κύτταρα διεγέρτες επαναμετρούνταν και επιλεγόταν ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια ($1-2 \times 10^5$ APCs ανά φρεάτιο M24). Τα κύτταρα τροφοί αποψυχόταν, μετρούνταν και επιλεγόταν ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια ($0.5-1 \times 10^6$ κύτταρα τροφοί ανά φρεάτιο M24).

Ο απαραίτητος αριθμός APCs και κυττάρων τροφών τοποθετούνταν σε φιαλίδια 15 ή 50ml και ακολουθούσε πλύση στα 400 g για 6 λεπτά στους 21°C, επαναδιάλυση σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου 10% HS-IDc και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας κυτταροκινών ώστε η τελική συγκέντρωση στα φρεάτια καλλιέργεια να είναι: 50U/ml IL-2, 10ng/ml IL-4, 10ng/ml IL-7 και 100μM 1-μεθυλοτροπτοφάνης (MW). Τέλος, τα κύτταρα διεγέρτες προσθέτονταν στα φρεάτια που περιείχαν τους CD8+ T-κυτταρικούς κλώνους και τα πιάτα τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO₂).

Την ημέρα 3 και 5, μετά τη διέγερση, γινόταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc που περιείχε 100 U/mL IL-2 και 200 μM 1MW, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση στο φρεάτιο καλλιέργειας των 50U/ml IL-2 και 100μM MW. Ανάλογα με την ανάπτυξη των κυττάρων και την πυκνότητα που παρατηρούταν, όταν χρειαζόταν γινόταν διαίρεση των κυττάρων σε νέα φρεάτια.

Την ημέρα 7, συλλεγόταν μία μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιούνταν χρώση με το ειδικό και με μη ειδικό MHC-πολυμερές για να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου με αποτελέσματα ανάλογα με αυτά που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3. Στη συνέχεια τα κύτταρα είτε χρησιμοποιούνταν για το λειτουργικό και φαινοτυπικό χαρακτηρισμό είτε παγωνόταν ένα ποσοστό αυτών ή ακολουθούσε άλλος ένα κύκλος ενεργοποίησης διάρκειας 7 ημερών και έπειτα τα κύτταρα συλλέγονταν, μετρούνταν και παγωνόταν.



ΕΙΚΟΝΑ 3: Κυτταρομετρική ανάλυση έπειτα από χρώση με ειδικό (ILA.A2) και μη ειδικό (MAGE3.A2) τετραμερές για κλώνο ειδικό για το πεπτιδίο ILAKFLHWL που παρουσιάζεται από HLA.A2.

2.3.9 Κυτταρομετρική ανάλυση μορίων επιφανείας

Η φαινοτυπική ανάλυση των κλώνων λάμβανε χώρα την ημέρα 7 της καλλιέργειας του κλώνου με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που φαίνονται στον πίνακα 19 και 20. Μικρός αριθμός κυττάρων ($15-20 \times 10^3$) συλλεγόταν από την καλλιέργεια και χωρίζονταν σε τρία φιαλίδια χρώσης. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις σε 1% HS-PBS στις 4000σ.α.λ για 4 min ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό. Στο πρώτο φιαλίδιο γινόταν χρώση με τετραμερές ώστε να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου στην καλλιέργεια. Για τη χρώση με το τετραμερές το ίζημα των κυττάρων ανακινούνταν έντονα και προσθέτονταν 60μl από μείγμα που περιείχε συγκέντρωση κάθε τετραμερούς 8.3nM, ώστε να επιτρέπει μία τελική συγκέντρωση 5nM μετά την προσθήκη 30μl διαλύματος που περιείχε τα υπόλοιπα αντισώματα και που τις περισσότερες φορές αυτό ήταν το CD8-FITC που χρησιμοποιούνταν σε συγκέντρωση 1/30. Το φιαλίδιο για την χρώση τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 30 λεπτά, στο σκοτάδι. Έπειτα προσθέτονταν τα 30μl του διαλύματος που περιείχε το CD8-FITC αντίσωμα και ακολουθούσε μια περαιτέρω επώαση στους 37°C για 30 λεπτά, στο σκοτάδι. Στο συνολικό όγκο υπολογιζόταν και τα 10μl εναπομείναντος 1% HS-PBS μετά τις πλύσεις. Στο φιαλίδιο με τα κύτταρα, τα τετραμερή και τα αντισώματα προσθέτονταν 900μl 1%HS-PBS και επακολουθούσε πλύση στις 4000σ.α.λ για 4 min σε RT. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 200μl 1%HS-PBS και 200μl 1% FA-PBS. Το διάλυμα μεταφερόταν σε FACs φιαλίδια (RIA) και «έτρεχε» στο κυτταρόμετρο FC500.

Στο δεύτερο φιαλίδιο προσθέτονταν τα αντισώματα αντι-CD45RA-FITC, CD45RO-ECD (Beckman Coulter), CCR7-PE (RD systems), και CD8-PC5 (Beckman Coulter) και στο τρίτο φιαλίδιο τα αντισώματα αντι-CD28-PE, CD57-FITC και CD8-PC5 (Beckman Coulter). Όλα τα αντισώματα προσθέτονταν σε αραιώση 1/20, εκτός από το CD45RO-ECD το οποίο προσθέτονταν σε αραιώση 1/10. Τα κύτταρα επωάζονταν στους 4°C για 30 λεπτά και ακολουθούσε πλύση με 1% HS-PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 1% FA-PBS. Η ανάλυση γινόταν με βάση το CD8+ πληθυσμό και μελετούνταν η συνέκφραση των μορίων CD45RO και CCR7 ή CD45RA και CCR7 στο ένα φιαλίδιο και η έκφραση των μορίων CD28 και CD57 στο δεύτερο. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

FITC	PE	ECD	PC5
CD8	πολυμερές		
CD45RA	CD45RO	CCR7	CD8
CD57	CD28		CD8

Πολλές φορές υπήρχε η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης επιφανειακών μορίων για τους CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους. Συγκεκριμένα θέλαμε να μελετήσουμε την ταυτόχρονη έκφραση των CD28, CD122, CD57, CD95, CCR7, CD127, CD69, CD178, CD62L, CD25 και CD27. Η ανάλυση των παραπάνω έγινε με την χρήση τεσσάρων μειγμάτων μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 20 και το κάθε αντίσωμα χρησιμοποιούταν σε τελική συγκέντρωση 1/10. Συγκεκριμένα τα κύτταρα συλλεγόταν από την καλλιέργεια, τοποθετούνταν σε φιαλίδια 15ml τύπου falcon και ακολουθούσε πλύση με 1%HS-PBS στις 1500σ.α.λ για 6 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν, τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 4ml 1%HS-PBS και διαμοιράζονταν σε 4 φιαλίδια FACS/RIA τύπου erpendorf. Ακολουθούσε πλύση με 1%HS-PBS, το υπερκείμενο απομακρυνόταν, τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 100μl μείγματος μονοκλωνικών αντισωμάτων (βλ. πίνακα 20) και επωαζόταν στους 4°C για 30 λεπτά. Τέλος προσθέτονταν 1ml 1%HS-PBS, ακολουθούσε πλύση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε 200μl 1% FA-PBS, έτοιμα για κυτταρομετρική ανάλυση.

Πίνακας 20. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

FITC	PE	PC5	PC7
CD28	CCR7	CD62L	CD8
CD122	CD127	CD25	CD8
CD57	CD69		CD8
CD95	CD178	CD27	CD8

2.3.10Κυτταρομετρική ανάλυση ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση μεταβολικών ουσιών που εμποδίζουν την μεταφορά των πρωτεϊνών έξω από το κύτταρο. Με αυτό τον τρόπο, οι κυτταροκίνες συγκεντρώνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο σύμπλεγμα Golgi μέσα στο κύτταρο. Αν στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιηθούν και καταστούν διαπερατά με τη χρήση ήπιων απορρυπαντικών, τα αντισώματα μπορούν να αποκτήσουν πρόσβαση σε αυτές τις θέσεις και να ανιχνεύσουν την κυτταροκίνη. Τα T-κύτταρα μπορούν να σημανθούν ταυτόχρονα και με άλλους δείκτες και με αυτόν τον τρόπο να χαρακτηριστούν περαιτέρω.

Η διαδικασία ξεκινούσε δύο ή τρεις ημέρες μετά τη τελευταία ενεργοποίηση του κλώνου. Τα κύτταρα (~1x10⁶ κύτταρα) διατηρούνταν σε κατάσταση ηρεμίας με σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της IL-2 στην καλλιέργεια. Τα κύτταρα συλλεγόταν και ακολουθούσε πλύση, επαναδιάλυση σε 10% HS-IDc και καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια χωρίζονταν σε δύο φρεάτια M48, ένα για την ειδική και

ένα για τη μη ειδική ενεργοποίηση και τοποθετούνταν στους 37 °C έως ότου ετοιμαστούν τα κύτταρα διεγέρτες.

Τα καρκινικά κύτταρα συλλεγόταν από την καλλιέργεια ή αποψυχόταν, σε αριθμό 2×10^6 , και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια των 15ml σε 1% HS-IDc. Ακολουθούσε η προσθήκη του ειδικού και του μη ειδικού πεπτιδίου αντίστοιχα και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρούνταν και επιλεγόταν ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την ενεργοποίηση των CTL (αναλογία 10 CTL:1 καρκινικό). Ακολουθούσε πλύση στα 400 g για 6 λεπτά στους 21°C, επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc και προσθήκη IL-2 σε τελική συγκέντρωση 10 U/mL. Τα καρκινικά κύτταρα προσθέτονταν στα CTL και επωάζονταν για 60 min στους 37 °C, 8% CO₂. Κύτταρα διεγέρτες τοποθετούνταν επίσης σε ξεχωριστά φρεάτια για να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Μετά την επώαση προσθέτονταν με προσοχή η ουσία μπρεφελντίνη (BFA, BD) σε αραιώση 1/500, και τα κύτταρα παρέμεναν στο θάλαμο επώασης για άλλες 18 έως 20 ώρες.

Την επόμενη μέρα τα κύτταρα συλλέγονταν σε φιαλίδια χρώσης και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τελείως το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε διάλυμα χρώσης και η πλύση επαναλαμβάνονταν στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και το ίζημα επαναδιαλύονταν σε ειδικό διάλυμα που προκαλούσε οπές στην μεμβράνη των κυττάρων και τοποθετούνταν για 20 λεπτά στους 4 °C. Στην συνέχεια προσθέτονταν το διάλυμα πλύσης και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά. Τα κύτταρα διαλύονταν σε διάλυμα πλύσης και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια για τη χρώση με τις διαφορετικές κυτταροκίνες. Η πλύση επαναλαμβάνονταν στις ίδιες συνθήκες και στο διάστημα αυτό προετοιμάζονταν για τη χρώση το μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων που περιελάμβανε τα: αντι-IFN-g-FITC (1/5), αντι-CD69-PE (1/10), αντι-CD8-PC5 (1/10) και αντι-CD45-PC7 (1/10. Ακολουθούσε επαναδιάλυση των κυττάρων στο μίγμα των αντισωμάτων και επώαση για 30 λεπτά στους 4°C. Τέλος, τα κύτταρα πλένονταν με διάλυμα πλύσης στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, επαναδιαλύονταν σε διάλυμα χρώσης και αναλύονταν στο κυτταρόμετρο.

Η ανάλυση πραγματοποιούνταν στον CD8⁺CD45⁺CD69⁺ πληθυσμό και ελεγχόταν η έκφραση των κυτταροκινών από τα κύτταρα του κλώνου που ενεργοποιούνταν ειδικά σε σχέση με τη μη ειδική διέγερση.

2.3.11 Μέτρηση κυτταροκινών με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία

Η ικανότητα των κλώνων να παράγουν κυτταροκίνες επαληθεύθηκε και μετρήθηκε ποσοτικά με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία. Χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο αυτή το kit Human Extracellular Protein Buffer Reagent Kit (FIDIS) και αναλυτής Luminex100.

Η διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων ήταν όμοια με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης, με τη διαφορά πως τα CTL επωάζονταν για 18 ώρες με τα APC κύτταρα απουσία BFA. Με τον τρόπο αυτό οι κυτταροκίνες που παράγονταν εκκρίνονταν

στο θρεπτικό μέσο. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα συλλέγονταν σε φιαλίδια 15 ml και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1600σ.α.λ για 5 λεπτά. Το θρεπτικό μέσο συλλέγονταν και αποθηκεύονταν στους -80 °C σε κλάσματα των 500μl, ενώ τα κύτταρα μεταφερόταν σε φιαλίδια τύπου erpendorf και παγωνόταν ως ίζημα σε LN₂. Για την ανάλυση των δειγμάτων με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία τα δείγματα αποψύχονταν και 50μl χρησιμοποιούνταν σαν διπλότυπα για τον έλεγχο της παραγωγής κυτταροκινών, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

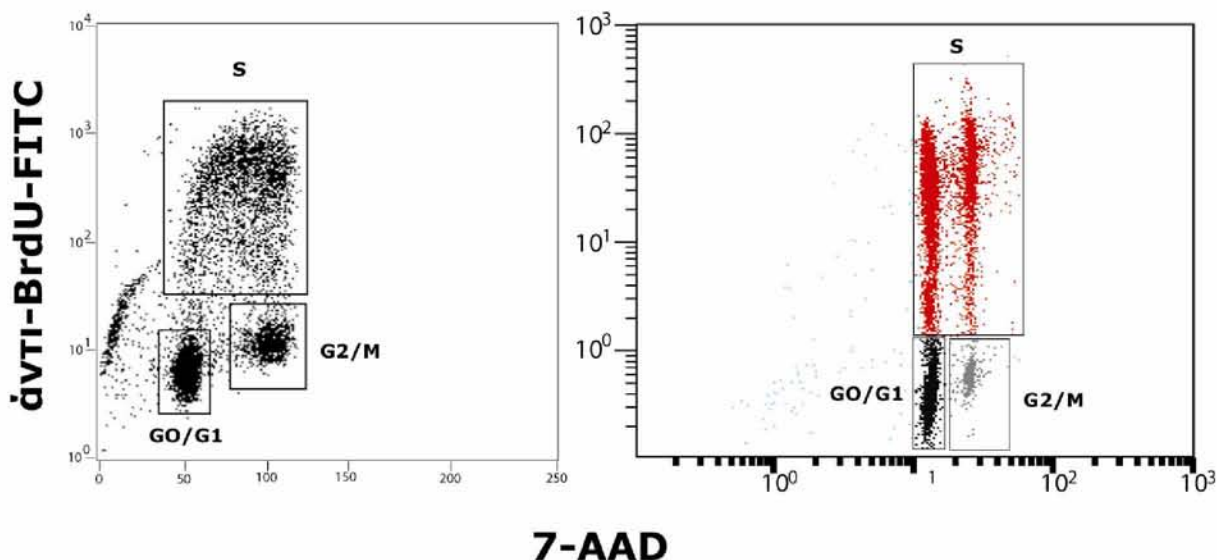
2.3.12 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με BrdU

Η ανάλυση κυτταρικού κύκλου έγινε με τη χρήση του πακέτου της BD FITC BrdU Flow kit (Αρ. Καταλόγου 557891) που περιέχει anti-BrdU-FITC, BD Cytotfix/Cytoperm Buffer, BD Perm/Wash Buffer (10x), BD Cytoperm Plus Buffer, BrdU 10mg/ml, DNase και 7-AAD. Η βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) είναι ένα ανάλογο της θυμιδίνης το οποίο την αντικαθιστά κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Το BrdU μπορεί να είναι στόχος μονοκλωνικών αντισωμάτων και έτσι η παρουσία του μπορεί να ανιχνευθεί. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χρωστικές που βάφουν στοιχειομετρικά το DNA, στη προκειμένη περίπτωση μαζί με την 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-AAD). Με το BrdU είναι δυνατή η ανίχνευση των κυττάρων που περνάνε από την S φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ με το 7-AAD είναι δυνατό να ξεχωρίσουμε τα κύτταρα που βρίσκονται στην G1 από αυτά που βρίσκονται στη G2 και στην M γιατί τα πρώτα περιέχουν τη μισή ποσότητα DNA σε σχέση με τα τελευταία και άρα βάφονται και αντίστοιχα από το 7-AAD.

Από την προτυποποίηση των πειραμάτων βρέθηκε ότι για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων, η προσθήκη BrdU σε τελική συγκέντρωση 10μM την ημέρα 4 μετά την ειδική ενεργοποίηση και παραμονή του για 24 ώρες στην καλλιέργεια είναι αρκετή συνθήκη για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου.

Συγκεκριμένα, το BrdU προσθέτονταν την ημέρα 4 μετά την ειδική ενεργοποίηση σε τελική συγκέντρωση 10μM. Προσθέτονταν 20μl από το διάλυμα BrdU συγκέντρωσης 1mM σε κάθε φρεάτιο καλλιέργειας M24 (τελικού όγκου 2ml). Η προσθήκη του BrdU γινόταν με μεγάλη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η διατάραξη των κυττάρων με οιοδήποτε τρόπο που θα μπορούσε να επηρεάσει τα φυσιολογικά πρότυπα του κύκλου τους. Για τη συλλογή των κυττάρων, απομακρυνόταν τα 3/4 της ποσότητας του υπερκειμένου και τα κύτταρα συλλεγόταν σε φιαλίδια τύπου erpendorf. Τα κύτταρα πλένονταν με προσθήκη 1ml 1%HS-PBS και φυγοκεντρούταν στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε διάλυμα που περιείχε το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD8-PC7, το οποίο χρησιμοποιούταν σε τελική συγκέντρωση 1/10. Ακολουθούσε επώαση για 30 λεπτά στους 4°C, πλύση με προσθήκη 1ml 1%HS-PBS και φυγοκέντρηση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά.

Το υπερκείμενο απομακρυνόταν από κάθε φιαλίδιο και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 100μl Cytotfix/Cytoperm Buffer και επώαζονταν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε προσθήκη 1ml 1x BD Perm/Wash Buffer, φυγοκέντρηση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναδιάλυση σε 100μl Cytoperm Plus Buffer και επώαση για 10λεπτά στον πάγο. Έπειτα προσθέτονταν 1ml 1x BD Perm/Wash Buffer, ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναδιάλυση σε 100μl BD Cytotfix/Cytoperm Buffer και επώαση για 5 λεπτά σε RT. Η διαδικασία συνεχιζόταν με πλύση με προσθήκη 1ml 1x BD Perm/Wash Buffer, φυγοκέντρηση στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα 100μl DNάσης, αραιωμένης σε συγκέντρωση 300μg/ml με 1xDPBS, και επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Ακολούθως προσθέτονταν 1ml 1x BD Perm/Wash Buffer, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα δείγματα επαναδιαλύονταν σε 90μl διαλύματος που περιείχε αντι-BrdU-FITC σε συγκέντρωση 1/5 με 1%HS-PBS και επώαζονταν για 20λεπτά σε RT. Στα δείγματα προσθέτονταν 1ml of 1x BD Perm/Wash Buffer, φυγοκεντρούνταν στις 4000σ.α.λ για 4 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 20μl διαλύματος 7-AAD. Προσθέτονταν 200μl 1%HS-PBS και τα δείγματα ετοιμάζονταν για κυτταρομετρική ανάλυση όπου παρατηρούταν η συνέκφραση BrdU και 7-AAD. Η ανάλυση για το 7-AAD έγινε τόσο γραμμικά όσο και λογαριθμικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.



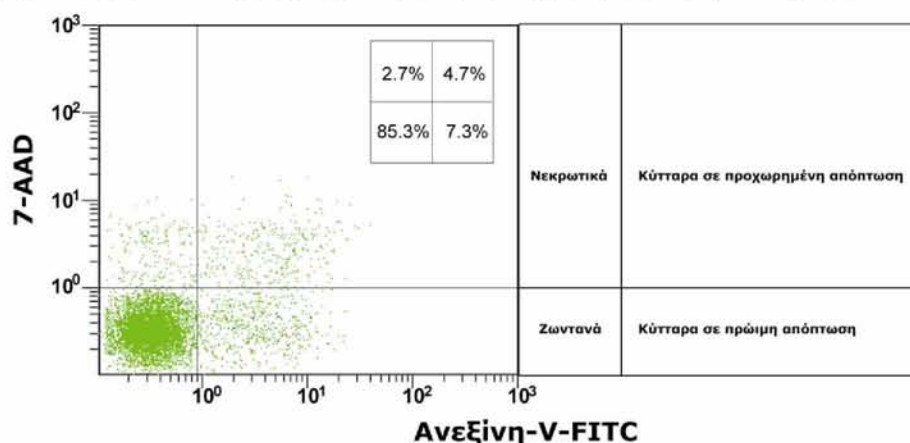
ΕΙΚΟΝΑ 4: Κυτταρομετρική ανάλυση κυτταρικού κύκλου γραμμικά σε κυτταρόμετρο BD και λογαριθμικά σε FC500.

2.3.13 Ανάλυση απόπτωσης

Για την ανάλυση της απόπτωσης των CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Beckman Coulter, Annexin kit/7AAD-kit (PNIM3614, FI05013). Η ανεξίνη-V είναι μέλος της οικογενείας των ανεξινών, πρωτεϊνών εξαρτώμενες από ασβέστιο, που συνδέονται σε φωσφολιπίδια, και έχουν μεγάλη συγγένεια για διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων που περιέχουν φωσφατιδυλσερίνη (PS). Η αναστροφή της PS από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της κυτταρικής διπλοστοιβάδας είναι ένα από τα πρώτα σημάδια της απόπτωσης και συμβαίνει πιο γρήγορα ακόμη και από πυρηνικές διεργασίες που σχετίζονται με την απόπτωση. Η ανεξίνη συνδεδεμένη με φθοριόχρωμα, στη προκειμένη περίπτωση το FITC, επιτρέπει την κυτταρομετρική ανίχνευση κυττάρων που έχουν επιφανειακή PS.

Το 7-AAD είναι μία χρωστική που συνδέεται στοιχειομετρικά στο DNA. Για να φθάσει όμως στο DNA θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα εισόδου στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό μπορεί να συμβεί μόνο όταν τα κύτταρα έχουν διαταραγμένη την κυτταρική διπλοστοιβάδα, κάτι που συμβαίνει στα κύτταρα σε προχωρημένη διαδικασία απόπτωσης (late apoptosis) και με τα νεκρά κύτταρα. Έτσι με κυτταρομετρική ανάλυση 7-AAD μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα ζωντανά και τα κύτταρα σε πρώιμο στάδιο απόπτωσης (early apoptotic) από κύτταρα νεκρά και σε προχωρημένο στάδιο απόπτωσης.

Για την ανάλυση απόπτωσης, περίπου 1×10^6 κύτταρα συλλεγόταν από την καλλιέργεια σε φιαλίδια τύπου falcon των 15ml, προσθέτονταν σε αυτά 1%HS-PBS μέχρι τα 15ml και φυγοκεντρούνταν στις 1500σ.α.λ για 6 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν, τα κύτταρα διαχωριζόταν σε 2 φιαλίδια κυτταρομετρικής ανάλυσης, ακολουθούσε πλύση με 1%HS-PBS, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα δείγματα επαναδιαλυόταν σε 100μl κρύου 1x Binding Buffer σε συγκέντρωση κυττάρων από 1×10^6 έως 1×10^7 . Έπειτα προσθέτονταν 10μl ανεξίνης-V συνδεδεμένη με το φθοριόχρωμα FITC, τα κύτταρα ανακινούνταν ελαφρώς και ακολουθούσε επώαση στον πάγο για 15 λεπτά με τα δείγματα προστατευμένα από το φώς. Στο τέλος, χωρίς στάδιο πλύσης, προσθέτονταν 380μl κρύου 1x Binding buffer καθώς και 10μl 7-AAD και τα δείγματα αναλυόταν στο κυτταρομέτρο FC500. Αντιπροσωπευτική εικόνα παρατίθεται στην Εικόνα 5.



ΕΙΚΟΝΑ 5: Κυτταρομετρική ανάλυση απόπτωσης σε CD8 T-κυτταρολυτικούς κλώνους.

2.3.14 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

Τα ενεργοποιημένα CD8 T-κύτταρα λύουν οποιοδήποτε κύτταρο παρουσιάζει στην επιφάνειά του το ειδικό πεπτιδίο που αναγνωρίζουν, συνδεδεμένο στο σύμπλοκο ΜΗC. Συνεπώς, η λειτουργικότητα των CTL μπορεί να καθοριστεί μετρώντας τη θανάτωση κυττάρων στόχων από τα κυτταρολυτικά T-κύτταρα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η δοκιμασία της απελευθέρωσης ^{51}Cr . Όλα τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ενσωματώσουν, χωρίς να απελευθερώνουν αυτόματα, μέσω της αντλίας K-Na, ραδιενεργά σεσημασμένο χρωμικό άλας του νατρίου ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$). Όταν αυτά τα σεσημασμένα κύτταρα θανατωθούν από τα CTL μετά από αλληλεπίδρασή τους, το ραδιενεργό χρωμικό άλας απελευθερώνεται στο υπερκείμενο και μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση μετρητών ακτίνων γ.

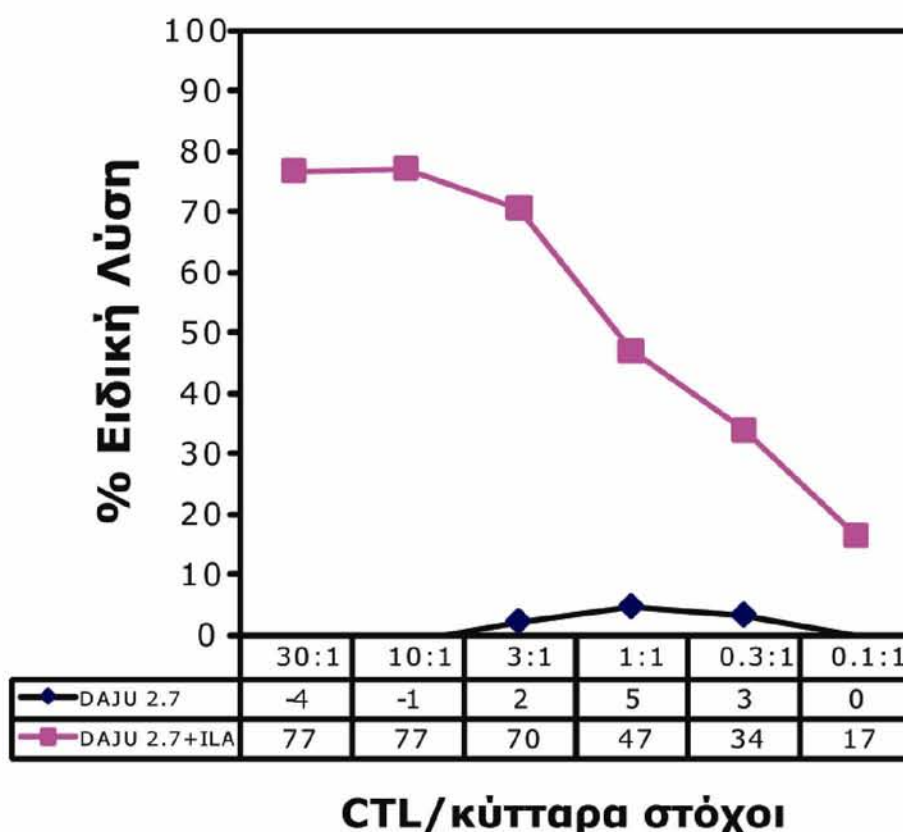
Με αυτή την τεχνική καταμετρήθηκε η λυτική ικανότητα των CTL που απομονώθηκαν. Αρχικά, τα κύτταρα στόχοι ($\sim 2 \times 10^6$ /ανάλυση) συλλέγονταν από την καλλιέργεια σε φιαλίδια 15 mL και ακολουθούσε πλύση με 10% HS-IDc (1600 rpm; 6 λεπτά). Αφαιρούνταν όσο δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύονταν σε αντίστοιχο όγκο θρεπτικού μέσου 50% HS-IDc με αυτόν που αντιστοιχούσε σε 2 mCi ^{51}Cr με βάση τον χρόνο ημιζωής του. Στη συνέχεια προσθέτονταν το χρώμιο (^{51}Cr , Perkin Elmer) και τα κύτταρα επωάζονταν για 1 ώρα στους 37 °C, έτσι ώστε αυτό να εισέλθει στο εσωτερικό τους μέσω της αντλίας Na-Ka. Τα κύτταρα καλύπτονταν με φύλλα μολύβδου και αναδεύονταν κάθε 15 λεπτά. Ακολουθούσαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε τελικό όγκο 10 mL ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια Cr που δεν απορροφήθηκε από τα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνταν σε πλάκα Neubauer και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια με συγκέντρωση 5×10^4 /mL. Στο πρώτο προσθέτονταν το ειδικό πεπτιδίο σε συγκέντρωση 5 μg/mL ενώ στο δεύτερο δεν προσθέτονταν πεπτιδίο. Τα κύτταρα στόχοι επωάζονταν με το πεπτιδίο για 15 λεπτά σε RT. Στο διάστημα αυτό προετοιμάζονταν τα CTL. Στην 1^η σειρά πλάκας 96 φρεατίων σχήματος V (Corning), τοποθετούνταν 60×10^3 κυτταρολυτικά/φρεάτιο και ακολουθούσαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις 3/1. Με το πέρας της επώασης προσθέτονταν τα κύτταρα στόχοι σε αναλογίες 30:1, 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1 και 0.1:1. Οι πλάκες φυγοκεντρούνταν (800rpm; 6 min), και ακολουθούσε επώαση (4 ώρες, 37 °C, 8% CO_2). Σε χωριστά φρεάτια τοποθετούνταν επίσης κύτταρα στόχοι τα οποία θανατώνονται πλήρως με τη χρήση απορρυπαντικού 1% TritonX-IDc (X-100, Sigma) (μέγιστη λύση) και κύτταρα στόχοι στα οποία δεν πραγματοποιούνταν καμία επέμβαση (ελάχιστη λύση). Τα δείγματα αυτά αποκάλυπταν τις τιμές της μέγιστης και ελάχιστης απελευθέρωσης χρωμίου.

Με το πέρας της 4ωρης επώασης συλλεγόνταν με προσοχή το 50% του υπερκειμένου από κάθε φρεάτιο και υπολογιζόταν η λύση σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ ειδική λύση} = \frac{\text{πειραματική τιμή} - \text{ελάχιστη τιμή λύσης}}{\text{μέγιστη τιμή λύσης} - \text{ελάχιστη τιμή λύσης}} \times 100$$

Θετικό θεωρούνταν ένα τεστ όταν η τιμή της ειδικής λύσης ήταν >10% και υπήρχε διαφορά τουλάχιστον 1SD ανάμεσα στα κύτταρα στόχους που επωάζωταν με το ειδικό πεπτίδιο σε σχέση με αυτά που δεν επωάζωταν με πεπτίδιο. Επίσης, για να θεωρηθεί έγκυρο το αποτέλεσμα απαραίτητη προϋπόθεση ήταν τα κύτταρα στόχοι να παρουσίαζαν αυτόματη απελευθέρωση ^{51}Cr <15%. Αντιπροσωπευτική εικόνα λυτικής ικανότητας ενός CD8+ T-κυτταροτοξικού παρατίθεται στην εικόνα 6.

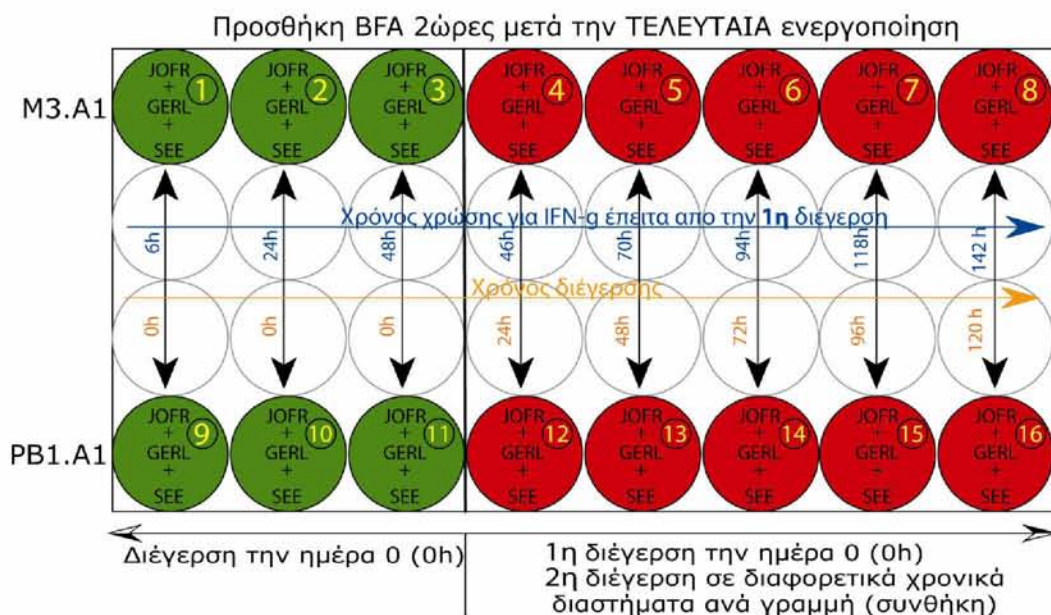
ΕΙΚΟΝΑ 6: Αποτέλεσμα δοκιμασίας λυτικής ικανότητας CD8 T-κυτταρολυτικού κλώνου έναντι καρκινικών κυττάρων που φέρουν το ειδικό για αυτόν πεπτίδιο.



3. Προτυποποίηση τεχνικών και δοκιμασιών.

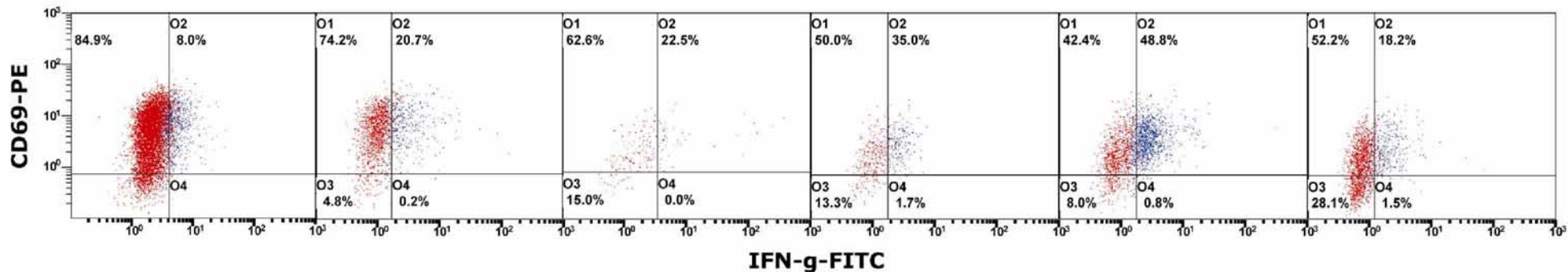
3.1 Καθορισμός του βέλτιστου χρόνου μέτρησης IFN-g

Η παραγωγή IFN-g μετά από ειδική ενεργοποίηση είναι θεμελιώδους σημασίας για τους CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους. Για τον καθορισμό του χρόνου που πρέπει να παρέλθει μετά την 1^η ενεργοποίηση του κλώνου για να την σύντομη επανενεργοποίηση του κλώνου αλλά και του ελάχιστου χρόνου που πρέπει να παρέλθει για να είναι ανιχνεύσιμη η παραγωγή IFN-g, χρησιμοποιήθηκε ο αντι-MAGE3.A1 κλώνος. Τα κύτταρα αποψύχτηκαν, ενεργοποιούνταν ειδικά με το πεπτίδιο να παρουσιάζεται από την καρκινική σειρά GERL και την χρήση των SEE ως κυττάρων-τροφών. Μετά το πέρας μία εβδομάδας, τα κύτταρα συλλεγόταν και επανακαλλιεργούνταν σε M24 φρεάτια καλλιέργειας. Χρησιμοποιούνταν 8 διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας τα οποία παρατίθενται στην εικόνα 7. Ο κλώνος ενεργοποιήθηκε ειδικά με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα συστήματα με το ειδικό πεπτίδιο M3.A1 και με το μη ειδικό πεπτίδιο PB1.A1. Για τα 3 πρώτα συστήματα μετρήθηκε η ικανότητα παραγωγής IFN-g έπειτα από 6, 24 και 48ώρες αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα 5 συστήματα υποβαλόταν σε δεύτερη σύντομη ενεργοποίηση με το πεπτίδιο να παρουσιάζεται από τη σειρά GERL, 48, 72, 96, 120 και 144 ώρες αντίστοιχα μετά την πρώτη ενεργοποίηση. Δύο ώρες μετά την τελευταία ενεργοποίηση προστέθηκε μπρεφελντίνη A (BFA) σε όλες τις συνθήκες και έπειτα από διαφορετικά χρονικά διαστήματα, τα κύτταρα συλλεγόταν και με ενδοκυττάρια χρώση ελεγχόταν η ικανότητα παραγωγής IFN-g. Η παραπάνω σειρά πειραμάτων απέδειξε ότι οι κλώνοι είναι ικανοί για τη μέγιστη παραγωγή IFN-g στο σύστημα 7, όταν δηλαδή υποβληθούν σε σύντομη ενεργοποίηση 5 ημέρες μετά την πρώτη ενεργοποίηση, με προσθήκη BFA 2 ώρες μετά την σύντομη ενεργοποίηση και όταν αναλυθούν κυτταρομετρικά 20 ώρες μετά την προσθήκη BFA. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρατίθενται στις εικόνες 7-8.

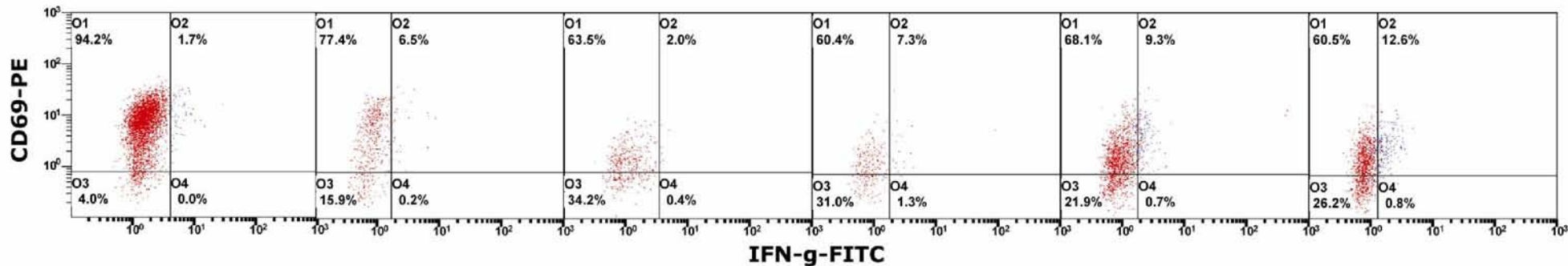


ΕΙΚΟΝΑ 7: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του βέλτιστου χρόνου μέτρησης IFN-g.

MAGE3.A1



PB1.A1



Συνθηκη 1

Συνθηκη 2

Συνθηκη 5

Συνθηκη 6

Συνθηκη 7

Συνθηκη 8

ΕΙΚΟΝΑ 8: Κυτταρομετρική ανάλυση των κλώνων σε διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας για τον καθορισμό του βέλτιστου χρόνου μέτρησης IFN-g.

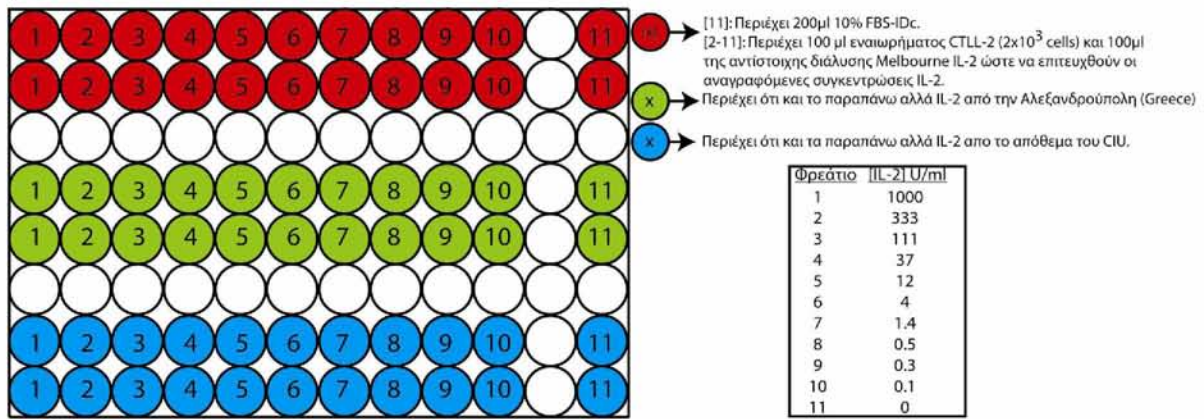
3.2 Καθορισμός ενεργότητας της IL-2 με δοκιμασία CTLL2

Κατά τη διάρκεια της μεγάλης σειράς πειραμάτων που αφορούσαν την καλλιέργεια των πεπτιδοειδικών CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων, χρειάστηκε να μετρηθεί η ενεργότητα της IL-2, όποτε γινόταν παραλαβή καινούριας παρτίδας IL-2 ή όποτε αποψυχόταν αρχικό απόθεμα. Για να επιτευχθεί αυτό γινόταν χρήση της κυτταρικής σειράς CTLL2.

Τα CTLL2 είναι λεμφοβλαστική σειρά κυτταροτοξικών T-κυττάρων απομονωμένη από ποντίκι C57BL/6 και των οποίων η ανάπτυξη εξαρτάται πλήρως από την ύπαρξη IL-2 στο θρεπτικό μέσο. Απουσία IL-2, τα CTLL2 υφίστανται κατακερματισμό του DNA και απόπτωση. Διπλές καλλιέργειες κυττάρων τοποθετούνταν σε φρεάτιο καλλιέργειας F96 για 3 ημέρες παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-2 από διαφορετικές παρτίδες. Οι συγκεντρώσεις IL-2 που ελέγχθηκαν κυμαίνονταν από 1000 έως 0.1 Units/ml με διαδοχικές αραιώσεις 1/3 καθώς και μια συνθήκη απουσία IL-2.

Για τη δοκιμασία CTLL2, χρησιμοποιήθηκε IL-2 γνωστής ενεργότητας (units) και συγκρίθηκε με IL-2 άγνωστης ενεργότητας με γνώμονα την ικανότητά τους να διατηρούν ζωντανά και διαιρούμενα τα CTLL2. Η ικανότητα αυτή μετρήθηκε με τέσσερις τρόπους. Πρώτον, τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα μετρούταν μετά από χρώση με Trypan Blue και εναπόθεση σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Επίσης ο απόλυτος αριθμός ζωντανών κυττάρων μετρούταν με τη χρήση του αιματολογικού αναλυτή. Το ποσοστό ζωντανών και νεκρών κυττάρων καθοριζόταν με κυτταρομετρική ανάλυση έπειτα από χρώση με 7-AAD. Τέλος μετρούταν το ποσοστό των κυττάρων που είχε άθικτο DNA με δημιουργία οπών στην επιφάνεια των κυττάρων χρησιμοποιώντας ήπιο απορρυπαντικό και μετέπειτα χρώση με 7-AAD. Τα κύτταρα που ήταν θετικά στη χρώση με 7-AAD θεωρήθηκε ότι είχαν άθικτο DNA και τα αρνητικά κύτταρα ότι είχαν κατατετηγμένο, από τη στιγμή που όλα τα ζωντανά κύτταρα αναμένονται να είναι θετικά στην ενδοκυττάρια χρώση με 7-AAD, έπειτα από δημιουργία οπών στην κυτταρική μεμβράνη. Τα αποτελέσματα τοποθετούνταν σε γράφημα το οποίο είχε λογαριθμικά στον οριζόντιο άξονα την συγκέντρωση της IL-2 και στον κάθετο τον απόλυτο αριθμό ή το ποσοστό των κυττάρων. Από το γράφημα υπολογίστηκε η μέση ενεργότητα (EC_{50}).

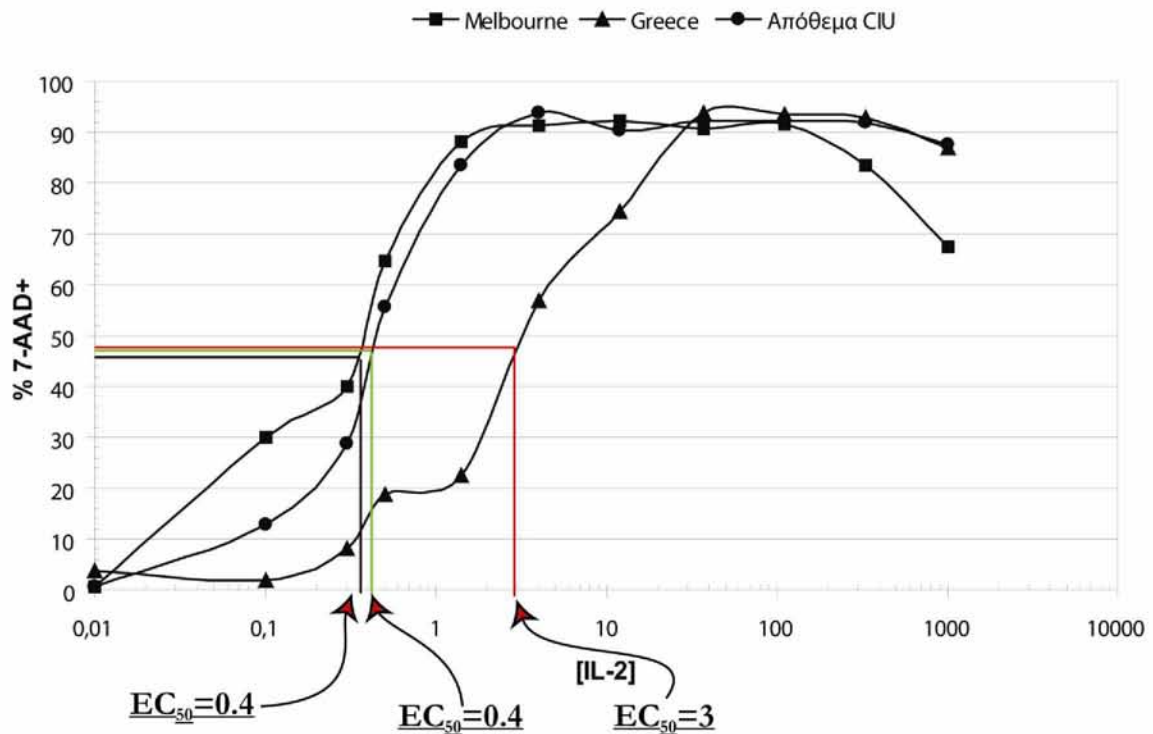
Στο συγκεκριμένο παράδειγμα συγκρίθηκε η ενεργότητα της IL-2 που χρησιμοποιούσαν από τη μονάδα ανοσολογίας του καρκίνου (CIU) με IL-2 η οποία είχε αποκτηθεί από την Αλεξανδρούπολη (Greece) και από την Μελβούρνη (Melbourne). Αποδείχθηκε ότι η παρτίδα IL-2 του CIU είχε παρόμοια ενεργότητα με αυτή της Μελβούρνης και 7.5 έως 10 φορές παραπάνω ενεργότητα από αυτή που αποκτήθηκε από την Αλεξανδρούπολη. Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρατίθενται στις εικόνες 9-12.



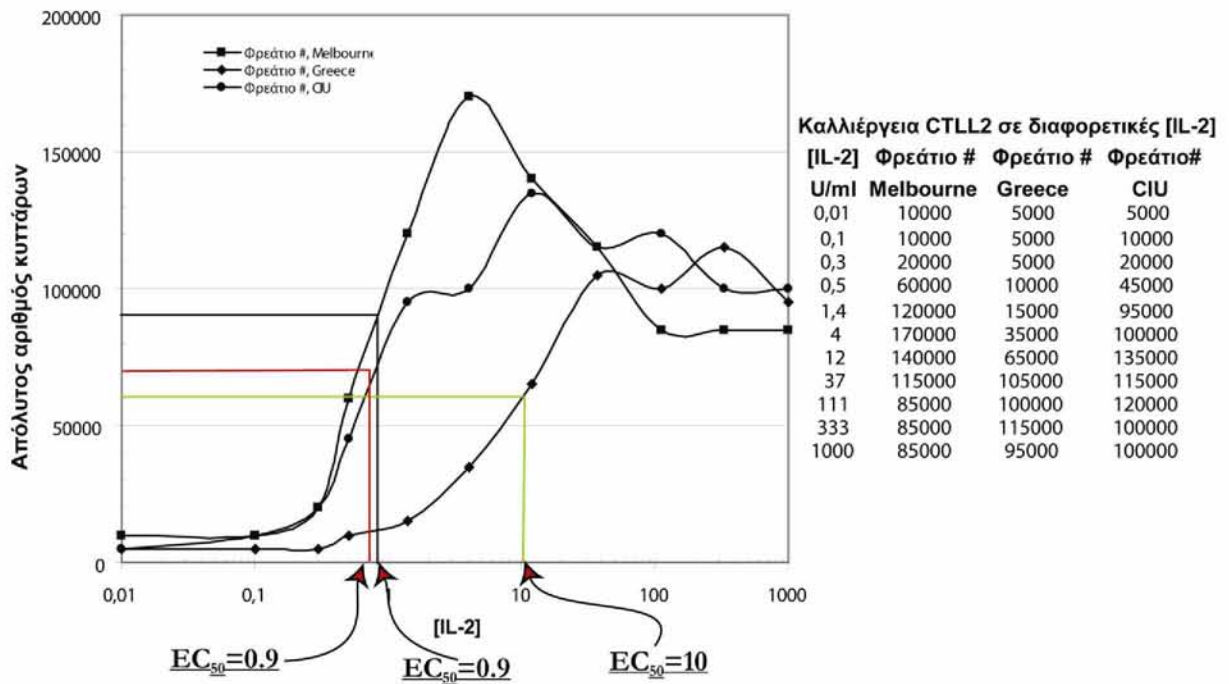
ΕΙΚΟΝΑ 9: Πειραματικός σχεδιασμός της δοκιμασίας CTLL2.

Καλλιέργεια CTLL2 σε διαφορετικές [IL-2]

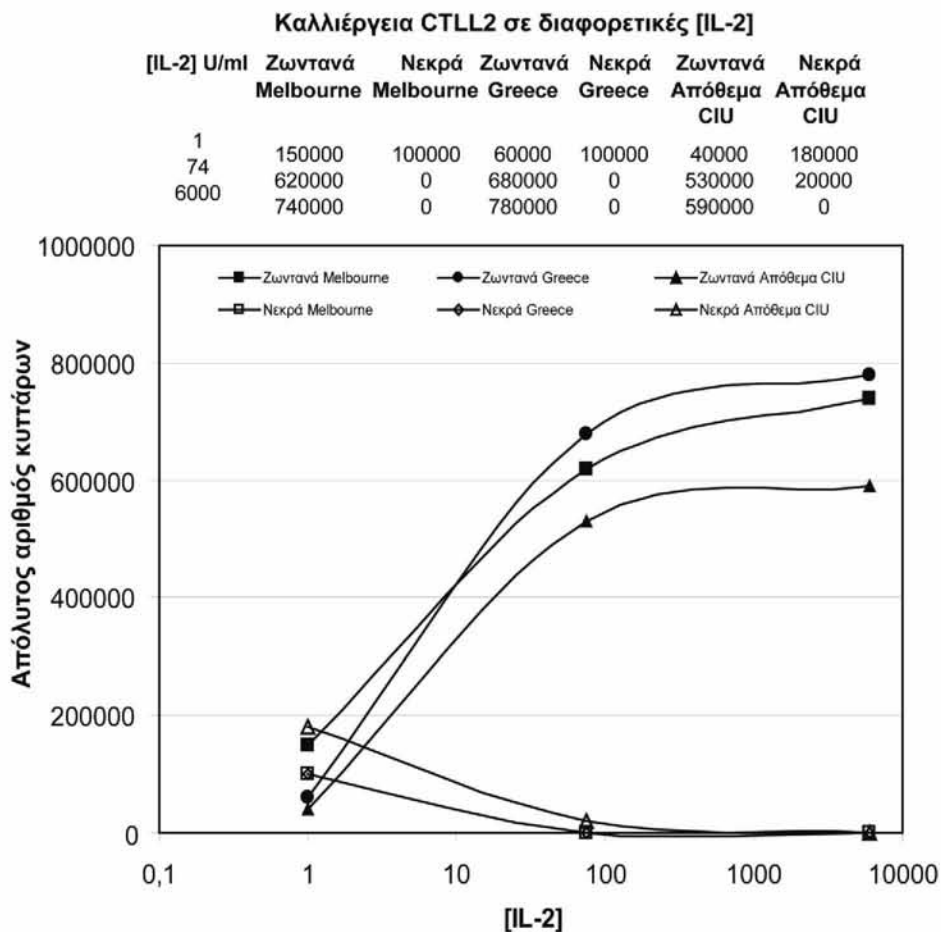
[IL-2] U/ml	7-AAD+ κύτταρα (%)	7-AAD+ κύτταρα (%)	7-AAD+ κύτταρα (%)
	(ακεραιότητα του DNA) Melbourne	(ακεραιότητα του DNA) Greece	(ακεραιότητα του DNA) Απόθεμα CIU
0,01	0,5	3,7	0,5
0,1	30,1	1,8	12,9
0,3	40	8,1	28,9
0,5	64,6	18,6	55,7
1,4	88	22,5	83,5
4	91,3	56,8	93,6
12	92,3	74,4	90,3
37	90,5	93,6	92,3
111	91,6	93,4	92,3
333	83,5	92,9	91,8
1000	67,4	86,8	87,5



ΕΙΚΟΝΑ 10: Αποτελέσματα κυτταρομετρικής ανάλυσης CTLL2 καλλιεργημένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαφορετικών παρτίδων IL-2 μετά από τη δημιουργία επιφανειακών πόρων και χρώση με 7-AAD για τον καθορισμό της ακεραιότητας του DNA.



ΕΙΚΟΝΑ 11: Αποτελέσματα μέτρησης του απολύτου αριθμού των ζωντανών CTLL2 καλλιεργημένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαφορετικών παρτίδων IL-2, στον αιματολογικό αναλυτή.



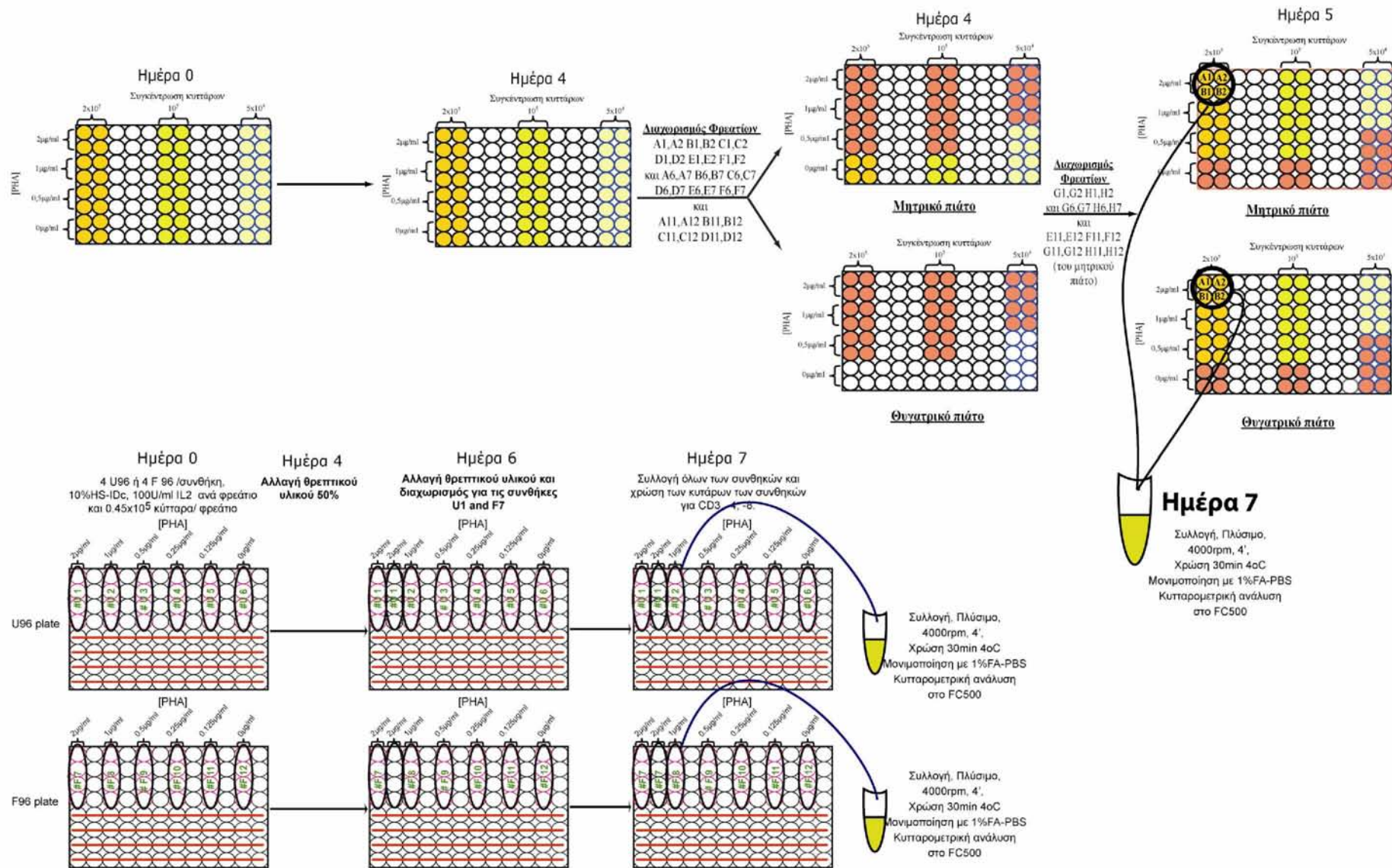
ΕΙΚΟΝΑ 12: Αποτελέσματα μέτρησης του απολύτου αριθμού των ζωντανών και νεκρών CTLL2 καλλιεργημένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαφορετικών παρτίδων IL-2, σε αντικειμενοφόρο πλάκα μετά από χρώση με Trypan Blue.

3.3 Προτυποποίηση συνθηκών καλλιέργειας με PHA-L και IL-2

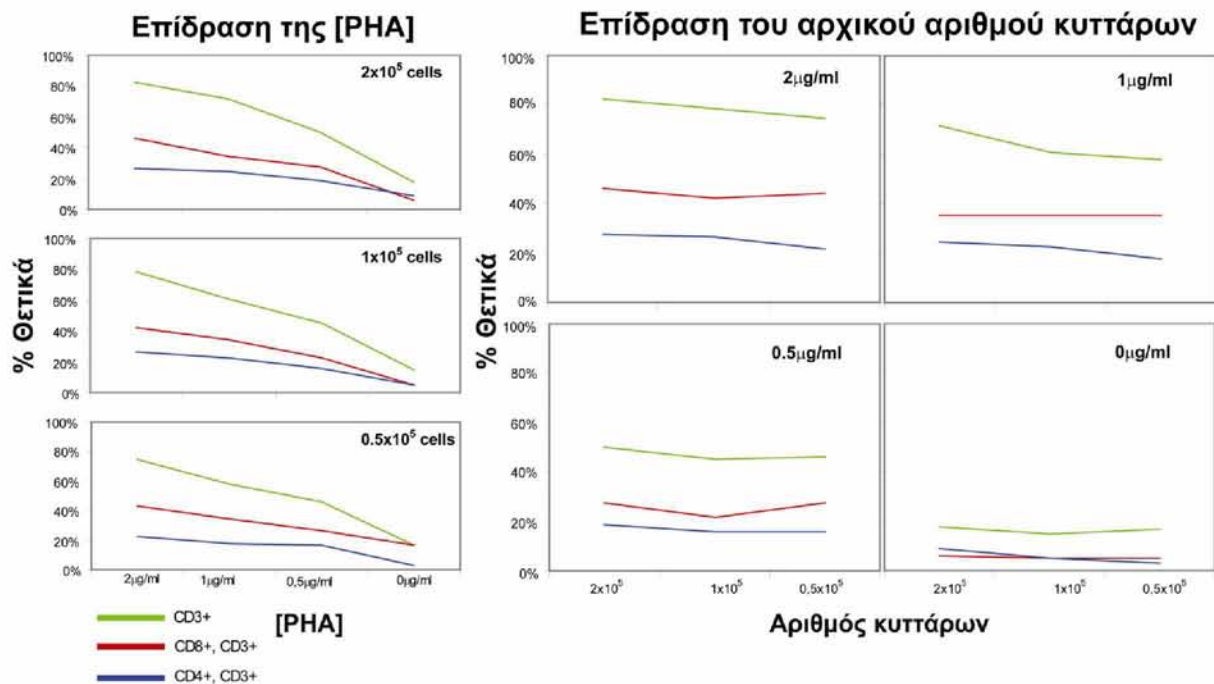
Για την εκπόνηση των πειραμάτων αυτής της διατριβής υπήρξε η ανάγκη για χρήσης PHA-L βλαστών PBMC τόσο για την προτυποποίηση των πειραμάτων όσο και των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν όσο και για τις καλλιέργειες των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων ως κύτταρα τροφοί (ακτινοβολημένα). Για να δημιουργήσουμε PHA-L βλάστες από PBMC, έπρεπε να καθοριστεί η συγκέντρωση του PHA-L στην καλλιέργεια, ο αρχικός αριθμός των κυττάρων ανά φρεάτιο, εάν τα φρεάτια θα ήταν στρογγυλού ή επίπεδου πυθμένα αλλά και τον τύπο των κυττάρων στα οποία το PHA-L έχει μεγαλύτερη επίδραση. Για να καθοριστούν τα παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν PMBC τα οποία αποψύχτηκαν και τοποθετούνταν σε φρεάτια καλλιέργεια τύπου U96 και F96 σε συγκεντρώσεις των 2×10^5 , 1×10^5 και 5×10^4 , παρουσία διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων PHA-L, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 και 0 μg/ml και σταθερής συγκέντρωσης IL-2 100U/ml. Όλες οι συνθήκες καλλιέργειας (36 διαφορετικές) έλαβαν χώρα σε τετραπλότυπους. Η καλλιέργεια είχε συνολική διάρκεια 7 ημερών. Την ημέρα 4 και 5 γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού ή και διαχωρισμός ανάλογα με το ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου από κύτταρα. Την ημέρα 7 τα κύτταρα κάθε συνθήκης (36 διαφορετικές) συλλεγόταν και ένα μικρό ποσοστό χρησιμοποιούταν για τη μέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα μετά από χρώση με Trypan Blue. Τα υπόλοιπα κύτταρα χρησιμοποιούνταν για κυτταρομετρική ανάλυση έπειτα από χρώση με CD8-FITC, CD3-ECD και CD4-PE.

Από την παραπάνω σειρά πειραμάτων συμπεράναμε ότι ο παράγοντας ο οποίος επηρεάζει περισσότερο τον πολλαπλασιασμό των PBMC βλαστών είναι η συγκέντρωση του μιτογόνου PHA-L. Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα κύτταρα πολλαπλασιαζόταν με μεγαλύτερο ρυθμό όταν καλλιεργούνταν σε φρεάτια με κοίλο πυθμένα. Ο αρχικός αριθμός των κυττάρων φάνηκε να παίζει τον μικρότερο ρόλο. Αποφασίστηκε ότι το PHA-L θα χρησιμοποιούνταν σε συγκέντρωση 0.5 ή 1 μg/ml και ότι η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων θα ήταν 1 έως 2×10^5 . Τέλος ήταν εμφανές ότι το μιτογόνο PHA-L επηρεάζει περισσότερο την ανάπτυξη των CD3+ κυττάρων και ιδιαίτερα των CD3+ CD8+.

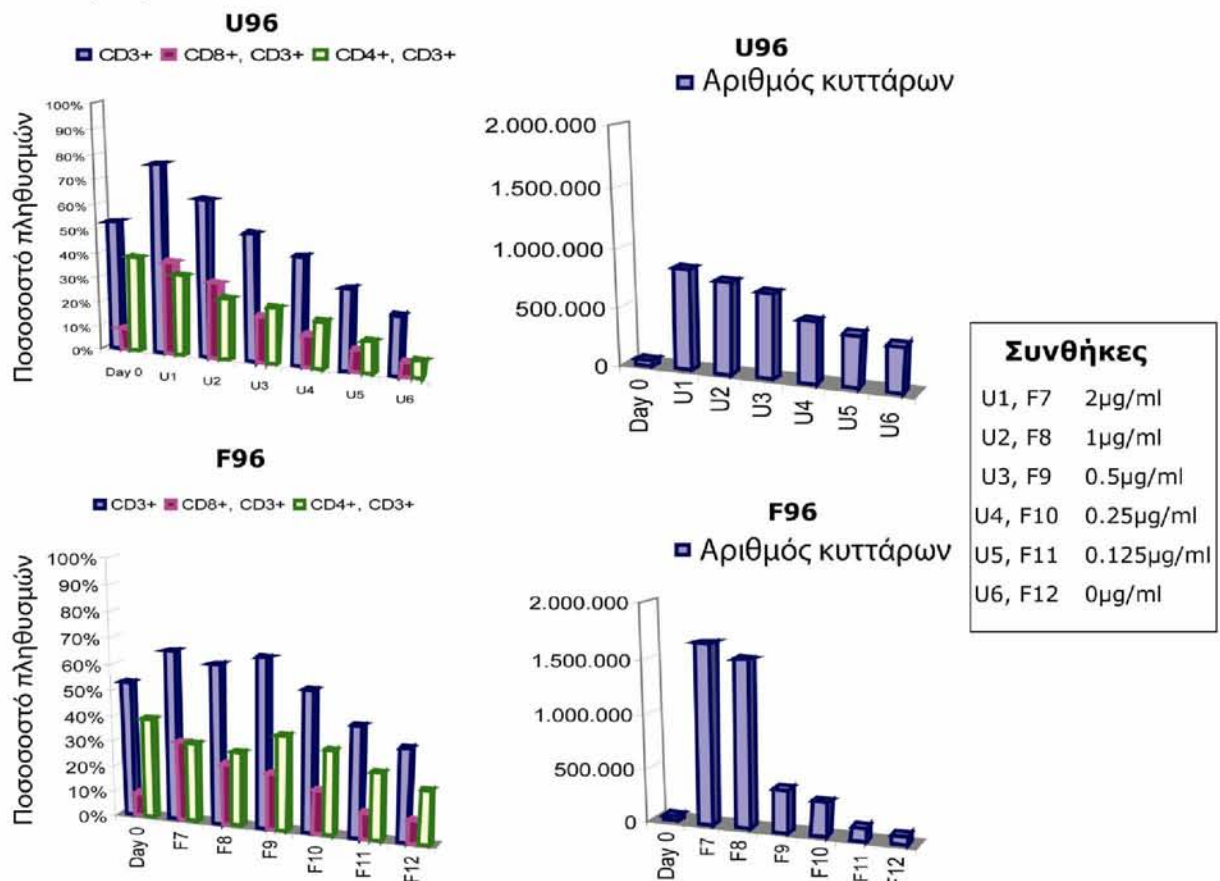
Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρατίθενται στις εικόνες 13-15.



ΕΙΚΟΝΑ 13: Πειραματικός σχεδιασμός για τη προτυποποίηση των συνθηκών καλλιέργειας με PHA-L και IL-2.



ΕΙΚΟΝΑ 14: Αποτελέσματα κυτταρομετρικής ανάλυσης που καταδεικνύουν την επίδραση της συγκέντρωσης του PHA-L και του αρχικού αριθμού κυττάρων στην ανάπτυξη των διαφορετικών υποπληθυσμών των PBMC.



ΕΙΚΟΝΑ 15: Αποτελέσματα κυτταρομετρικής ανάλυσης που καταδεικνύουν την επίδραση της συγκέντρωσης του PHA-L και του τύπου του φρεατίου στην ανάπτυξη των διαφορετικών υποπληθυσμών των PBMC.

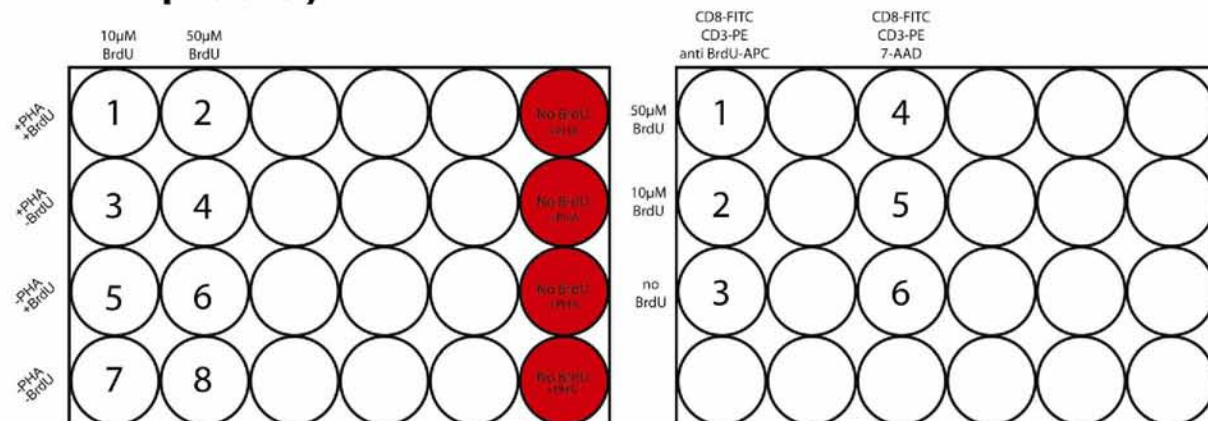
3.4 Προτυποποίηση της ανάλυσης κυτταρικού κύκλου με BrdU

Για την προτυποποίηση της ανάλυσης κυτταρικού κύκλου με την χρήση BrdU έγινε χρήση βλαστών PHA καθώς και EBV μετασχηματισμένων DAJU κυττάρων. Ειδικότερα χρησιμοποιούνταν διαφορετικές συγκεντρώσεις BrdU σε διαφορετικά χρονικά σημεία των καλλιεργειών και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Επίσης ελέγχθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός που θα επέτρεπε τόσο την παρατεταμένη προσθήκη του BrdU που επιτρέπει τον καθορισμό του ποσοστού των κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου όσο και την παροδική προσθήκη (για μικρά χρονικά διαστήματα) που θα επέτρεπε κινητική ανάλυση του κύκλου. Από τα πρώτα πειράματα προτυποποίησης συμπεράναμε ότι μια τελική συγκέντρωση 10 μ M BrdU στην καλλιέργεια ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων για 24 ώρες ήταν αρκετή για την ενσωμάτωση του BrdU στο DNA και επακόλουθη ανίχνευση του με αντι-BrdU αντίσωμα κυτταρομετρικά.

Ακολούθως έγινε χρήση του αντι-M3.A2 κλώνου (κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με μικρότερο ρυθμό από ότι τα παραπάνω) σε καλλιέργεια με BrdU. 10 μ M BrdU προστέονταν 1 ημέρα μετά την ενεργοποίηση και 2 ή και 4 μέρες μετά γινόταν η χρώση και η ανίχνευση με αντι-BrdU αντίσωμα. Από την παραπάνω σειρά πειραμάτων συμπεράναμε ότι και για την καλλιέργεια των πεπτιδοειδικών CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων, προσθήκη 10 μ M BrdU για 24 ώρες την ημέρα 4 μετά την ενεργοποίηση ήταν αρκετή για τον καθορισμό του ποσοστού των κυττάρων στη κάθε φάση του κύκλου. Τέλος, για την προτυποποίηση των ρυθμίσεων του κυτταρομέτρου έγινε χρήση 4 διαφορετικών χρώσεων, κύτταρα χωρίς χρώση, κύτταρα με αντι-BrdU-FITC και CD8-PC7, κύτταρα με 7-AAD και κύτταρα με αντι-BrdU-FITC, CD8-PC7 και 7-AAD. Το σήμα του 7-AAD αναλύθηκε στο FL4.

Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρατίθενται στις εικόνες 16-19.

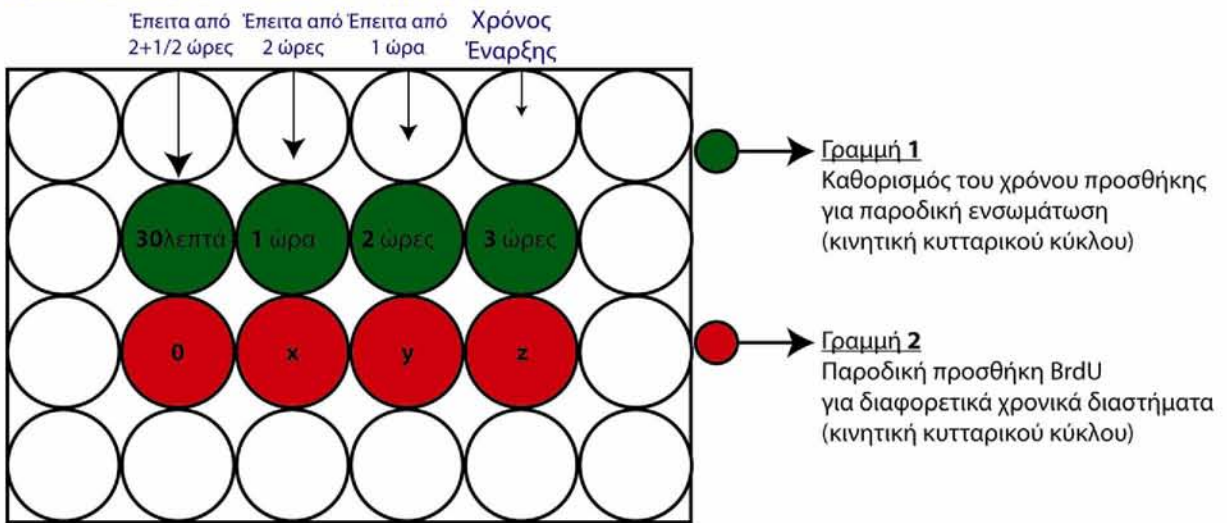
PHA βλάστες



ΕΙΚΟΝΑ 16: Πειραματικός σχεδιασμός προτυποποίησης σε PHA βλάστες με καθορισμό της συγκέντρωσης του BrdU.

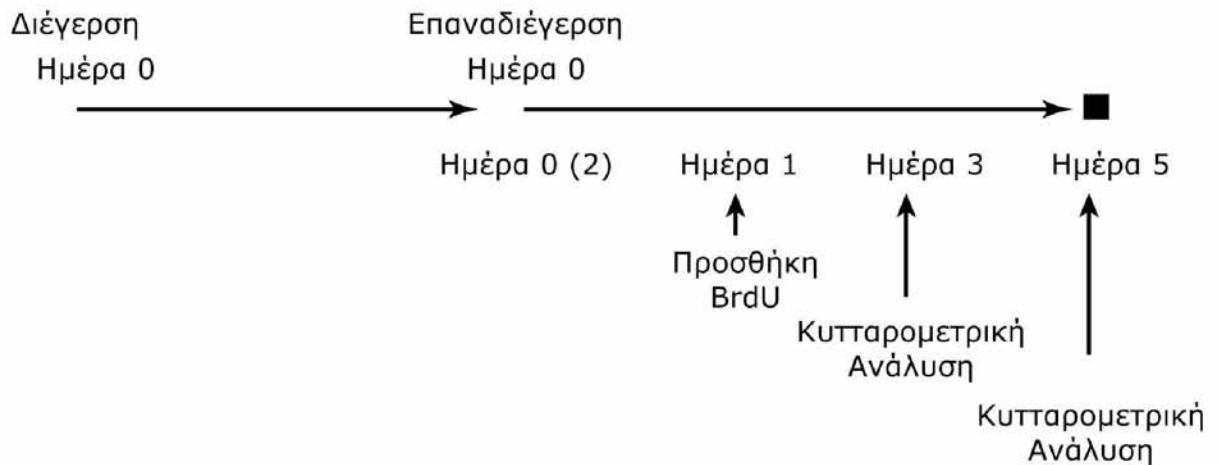
EBV μετασχηματισμένα DAJU

Χρόνος προσθήκης του BrdU για τη γραμμή 1



ΕΙΚΟΝΑ 17: Πειραματικός σχεδιασμός προτυποποίησης σε DAJU EBV κύτταρα για τον καθορισμό του χρόνου παροδικής προσθήκης του BrdU καθώς και του χρόνου παραμονής στην καλλιέργεια μέχρι την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου.

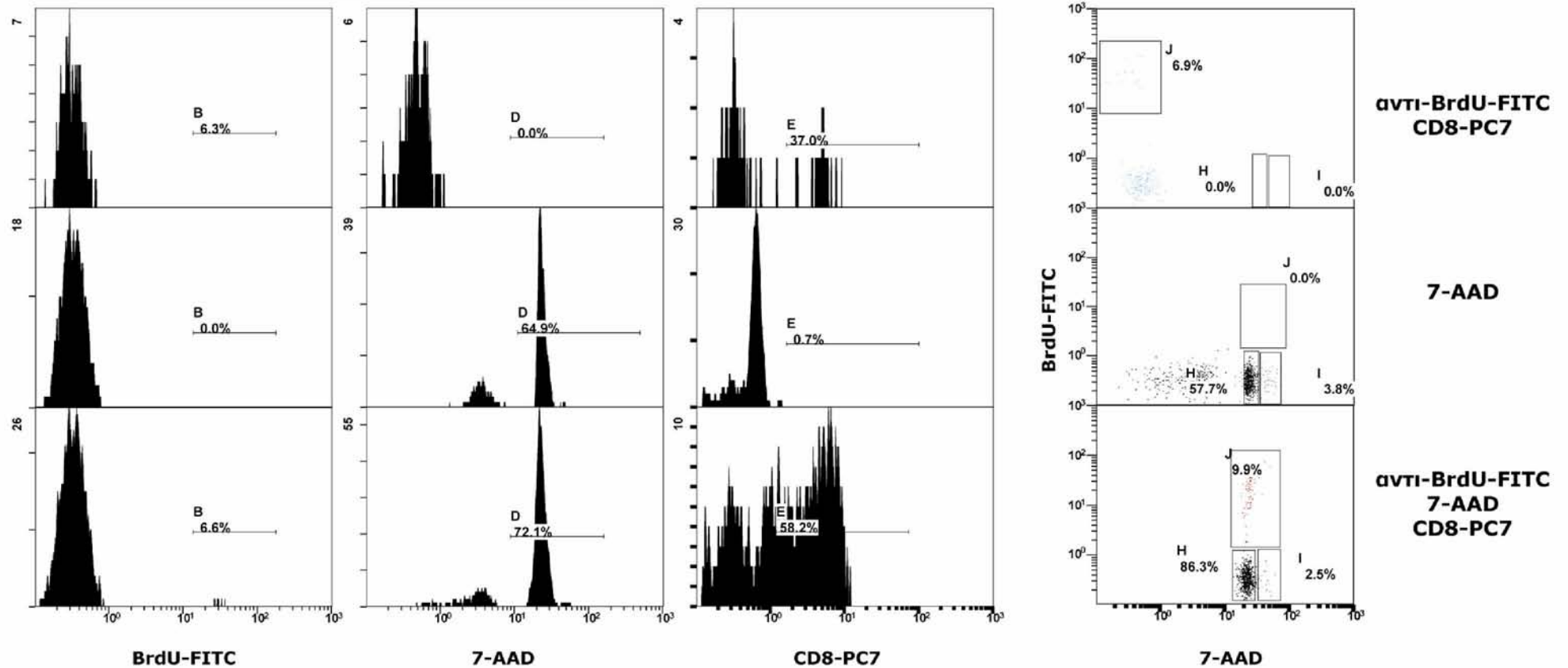
Αντι MAGE3.A2 CD8+ T κυτταρολυτικός κλώνος



ΕΙΚΟΝΑ 18: Πειραματικός σχεδιασμός προτυποποίησης στον αντι-MAGE3.A2 κυτταρολυτικό κλώνο για τον καθορισμό του χρόνου προσθήκης του BrdU καθώς και του χρόνου παραμονής στην καλλιέργεια μέχρι την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου.

Αντι MAGE3.A2 CD8+ T κυτταρολυτικός κλώνος

Τροτ (δυναμικός χρόνος διπλασιασμού) = 120 ώρες



ΕΙΚΟΝΑ 19: Τελικά αποτελέσματα προτυποποίησης στον αντι-MAGE3.A2 CD8+ T-κυτταρολυτικό κλώνο με διαφορετικές χρώσεις, έπειτα από τον καθορισμό των ρυθμίσεων του πρωτοκόλλου της κυτταρομετρικής ανάλυσης καθώς και ο υπολογισμός του δυναμικού χρόνου διπλασιασμού με την χρήση της μεθόδου της σχετικής κίνησης των BrdU θετικών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (Relative Method), από ενός σημείου μέτρησης.

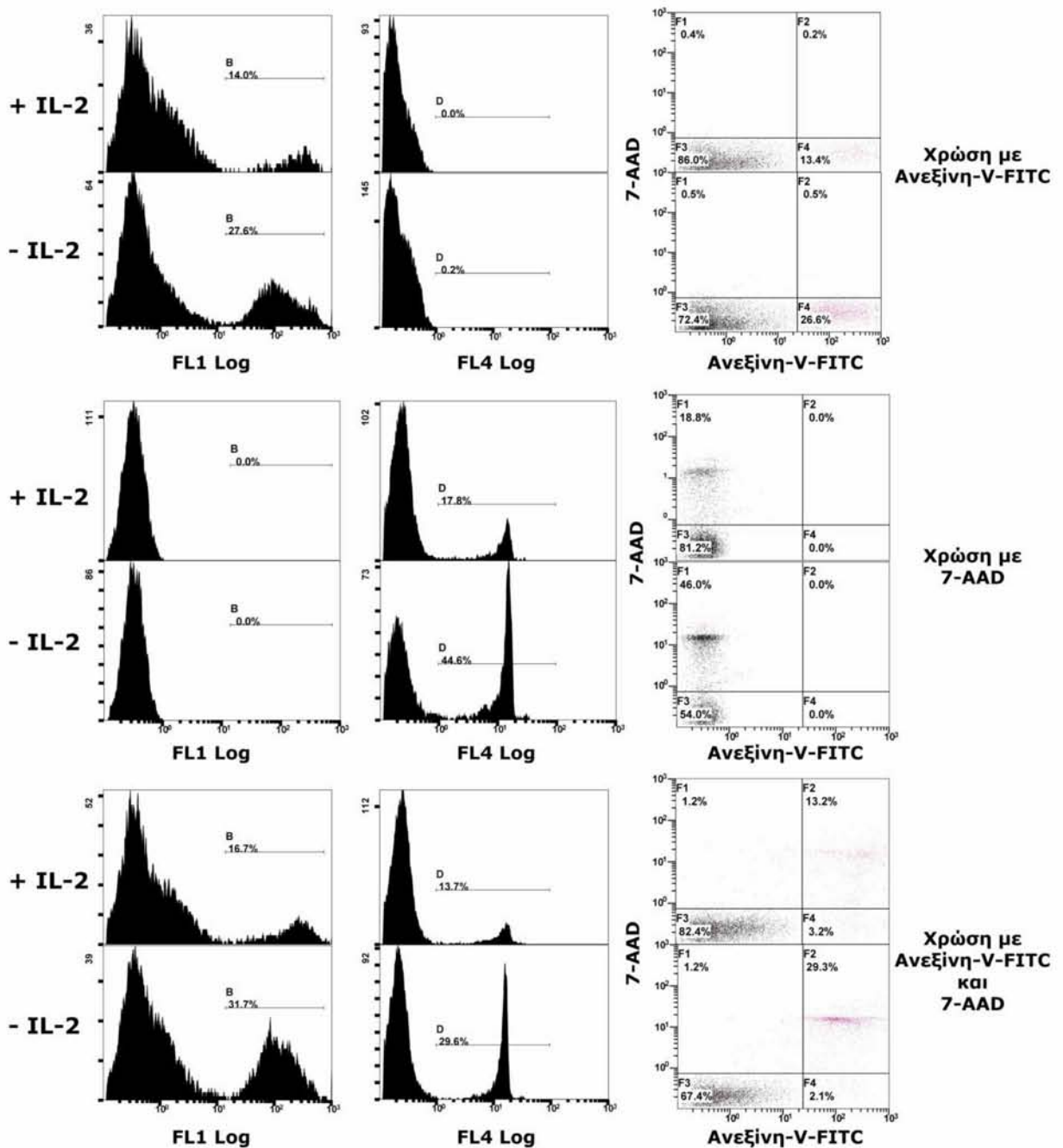
3.5 Προτυποποίηση δοκιμασίας απόπτωσης

Για την προτυποποίηση της δοκιμασίας απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκαν ΡΗΑ βλάστες από PBMCs. Οι βλάστες αποψύχτηκαν και διεγέρθηκαν με ΡΗΑ-L σε δύο συνθήκες, παρουσία και απουσία IL-2. Η συνθήκη καλλιέργειας απουσίας IL-2 είχε ως σκοπό την επιβολή απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου στους βλάστες, η βιωσιμότητα των οποίων εξαρτάται από την παρουσία IL-2 στο θρεπτικό μέσο. Την ημέρα 4, τα κύτταρα συλλέγονταν και γινόταν η αλλαγή του θρεπτικού υλικού με επανάληψη της αποστέρησης IL-2 για την αντίστοιχη συνθήκη.

Την ημέρα 7 τα κύτταρα συλλέγονταν και για κάθε συνθήκη έγινε διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 φιαλίδια σε ίσους αριθμούς. Ακολούθησε χρώση με τέσσερις διαφορετικούς συνδυασμούς, χρώση με ανεξίνη-V, χρώση με 7-AAD, χρώση με ανεξίνη-V και 7-AAD, και το τελευταίο φιαλίδιο μονιμοποιούνταν και αναλυόταν κυτταρομετρικά χωρίς την προσθήκη κάποιου δείκτη. Οι ρυθμίσεις του πρωτοκόλλου του κυτταρομέτρου ρυθμιζόταν ανάλογα με τα δείγματα μάρτυρες, ενώ το σήμα του 7-AAD αναλύθηκε στο FL4.

Αναμενόμενη ήταν η παρατήρηση της μείωσης του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων από 82.4 στο 67.4% και μία αύξηση στο ποσοστό των κυττάρων σε προχωρημένη απόπτωση από 13.2% στο 29.3% σε βλάστες που καλλιεργούνταν απουσία IL-2.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρατίθενται στην εικόνα 20.



ΕΙΚΟΝΑ 20: Τελικά αποτελέσματα προτυποποίησης της δοκιμασίας απόπτωσης σε PHA-L βλάστες που καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία IL-2, έπειτα από τον καθορισμό των ρυθμίσεων του πρωτοκόλλου της κυτταρομετρικής ανάλυσης.

4. Προτυποποίηση συστήματος καλλιέργειας

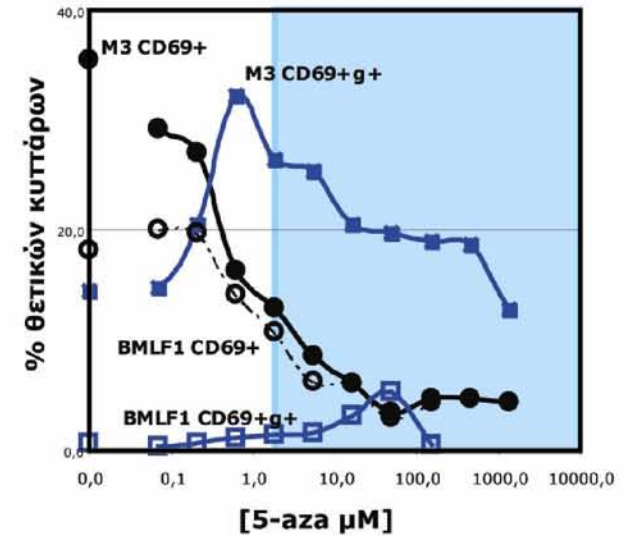
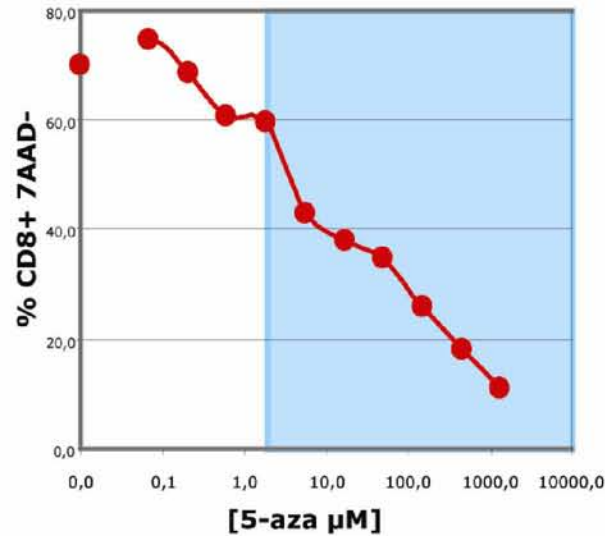
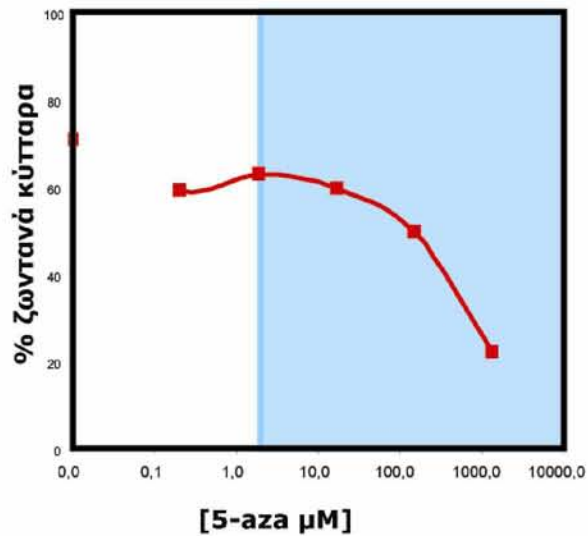
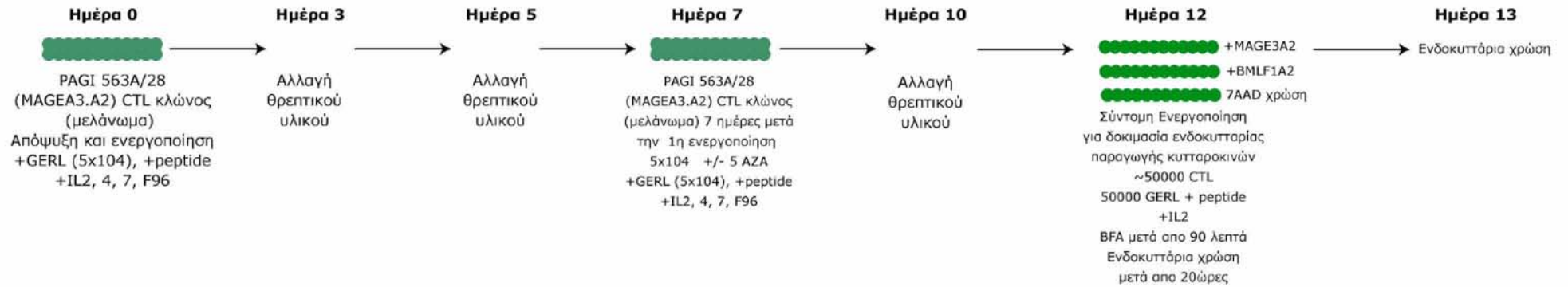
4.1 Καθορισμός υποτοξικής συγκέντρωσης φαρμάκων

Για τον καθορισμό της υποτοξικής συγκέντρωσης των φαρμάκων χρησιμοποιούνταν οι κλώνοι έναντι του αντιγόνου MAGE3, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από ασθενείς με μελάνωμα. Αποφασίστηκε ότι τα αρχικά πειράματα παρουσία φαρμάκου θα περιελάμβαναν τον έλεγχο παραγωγής IFN-g μετά από ειδική και μη ειδική ενεργοποίηση, από τη στιγμή που η παραπάνω ιδιότητα είναι βασική και θεμελιώδους σημασίας για τους CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους. Για την ενεργοποίηση των κλώνων, η προτυποποίηση άρχισε με ένα σύστημα αντιγονοπαρουσίασης που περιελάμβανε την παρουσίαση του πεπτιδίου στους κλώνους από καρκινικά κύτταρα μελανώματος, τη σειρά GERL, καθώς και τη χρήση ακτινοβολημένων ετερόλογων PBMCs ως κύτταρα τροφούς. Τα κύτταρα αποψυχόταν, διεγείρονταν ειδικά και μετά από 7 μέρες καλλιέργειας γινόταν επαναδιέγερση και προσθήκη ενός μόνο φαρμάκου σε διάφορες δόσεις. Την ημέρα 12 οι κλώνοι υποβαλλόταν σε σύντομη ενεργοποίηση και την επόμενη γινόταν ενδοκυττάρια χρώση για τον έλεγχο παραγωγής IFN-g. Οι δόσεις της 5-άζα-2' δεοξυκυτιδίνης που ελέγχθηκαν ήταν από 2000μM έως 33nM με διαδοχικές αραιώσεις 1/3. Για την τριχοστατίνη A οι δόσεις που ελέγχθηκαν ήταν από 60μM έως 1,02nM.

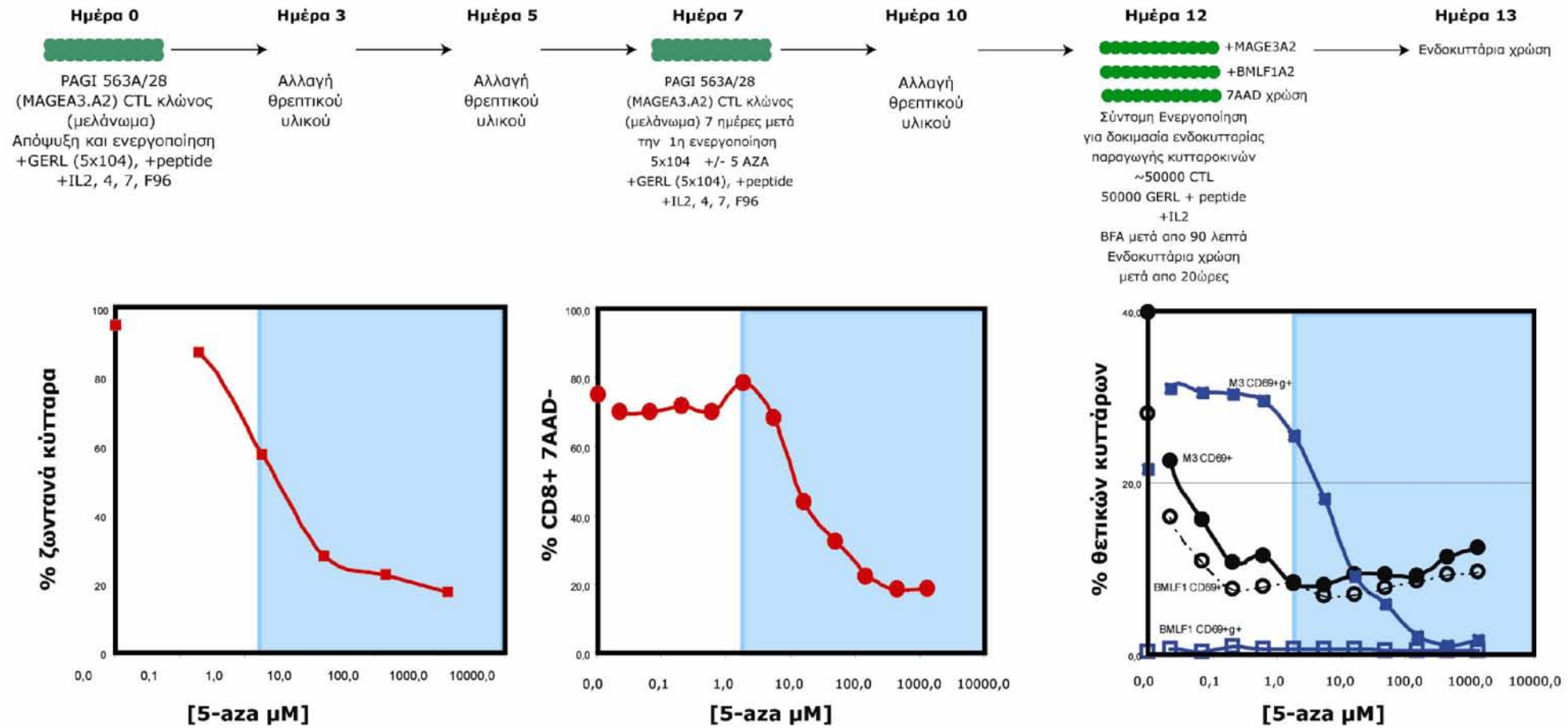
Από αυτή τη σειρά πειραμάτων συμπεράναμε ότι οι υποτοξικές δόσεις της 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνης είναι κάτω από τα 600nM και αποφασίστηκε ότι θα χρησιμοποιηθεί η δόση των 200nM για τα επόμενα πειράματα. Παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση στην έκκριση IFN-g παρουσία 5-aza-CdR. Επίσης συμπεράναμε ότι οι υποτοξικές δόσεις της τριχοστατίνης A είναι κάτω από τα 81nM και αποφασίστηκε ότι θα χρησιμοποιηθεί στις συγκεντρώσεις των 81, 27 και 9nM.

Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και τα αποτελέσματα της σειράς πειραμάτων που οδήγησαν στα παραπάνω συμπεράσματα παρατίθενται στις εικόνες 21-26.

4.1.1 5 αζα 2' δεοξυκυτιδίνη

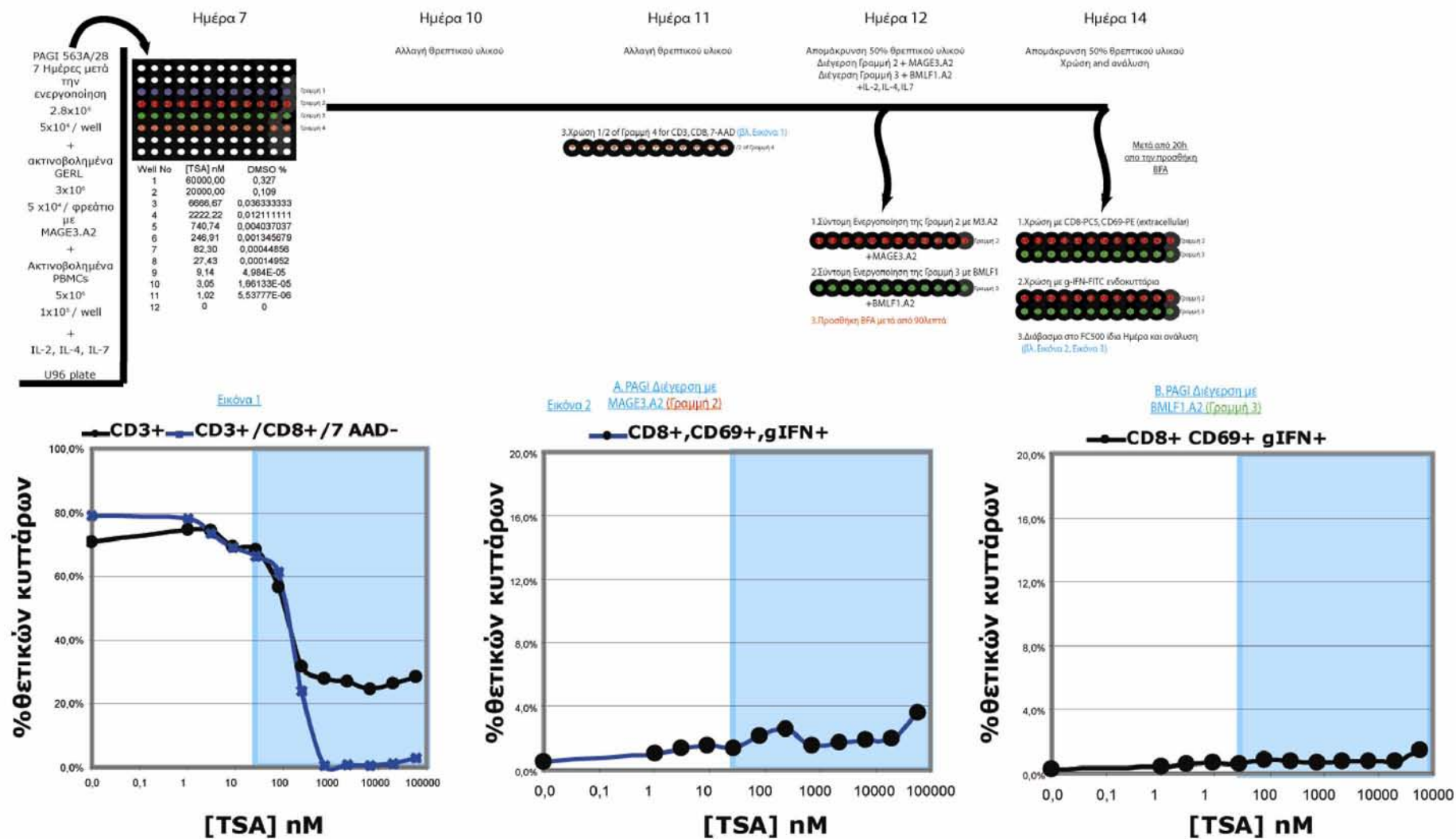


ΕΙΚΟΝΑ 21: Καλλιέργεια αντι M3.A2 κλώνου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων 5-aza-CdR σε F96.

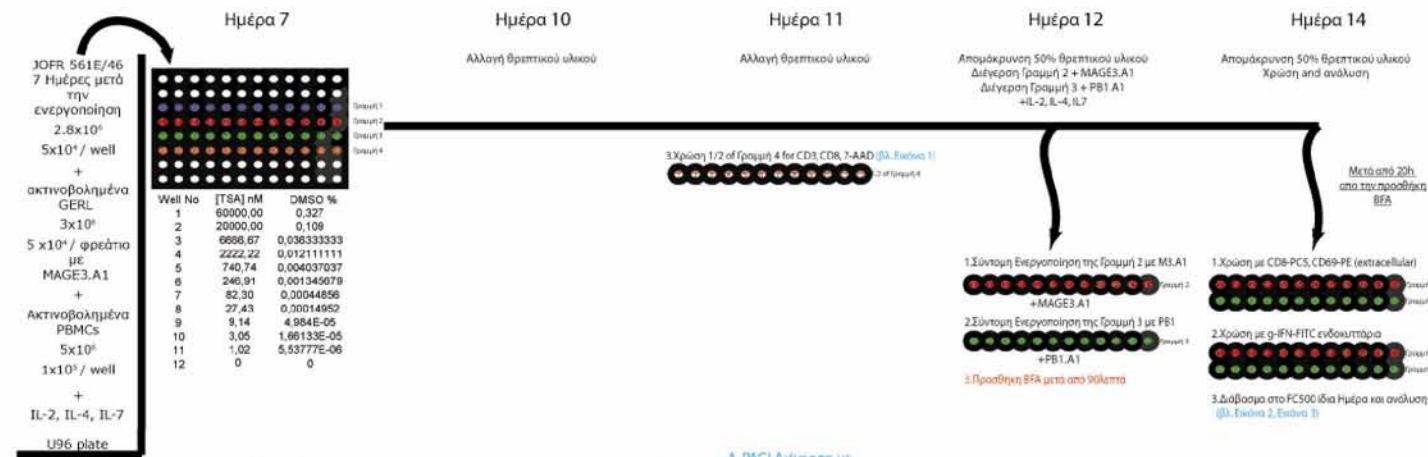


ΕΙΚΟΝΑ 22: Καλλιέργεια αντι M3.A2 κλώνου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων 5-aza-CdR σε U96.

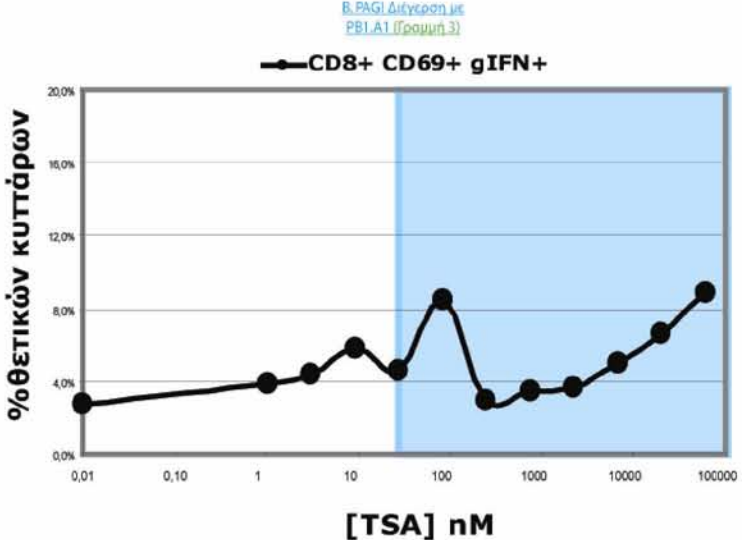
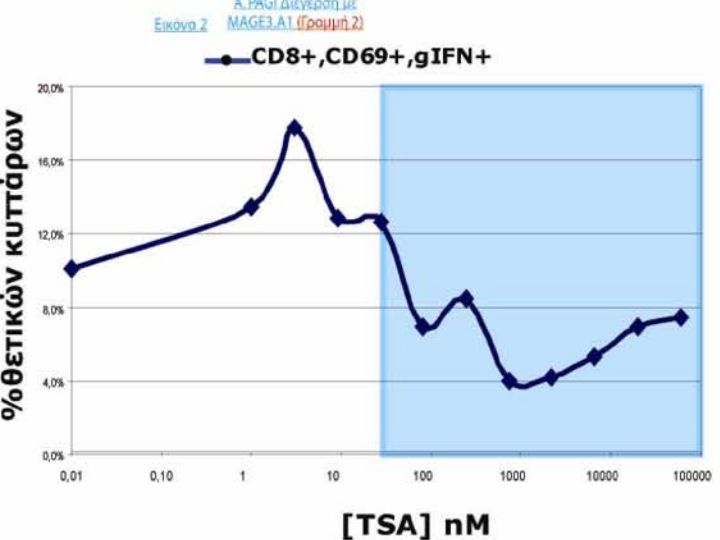
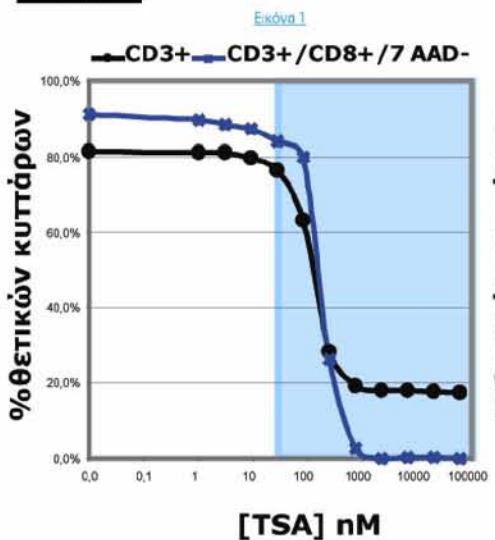
4.1.2 Τριχοστατίνη Α



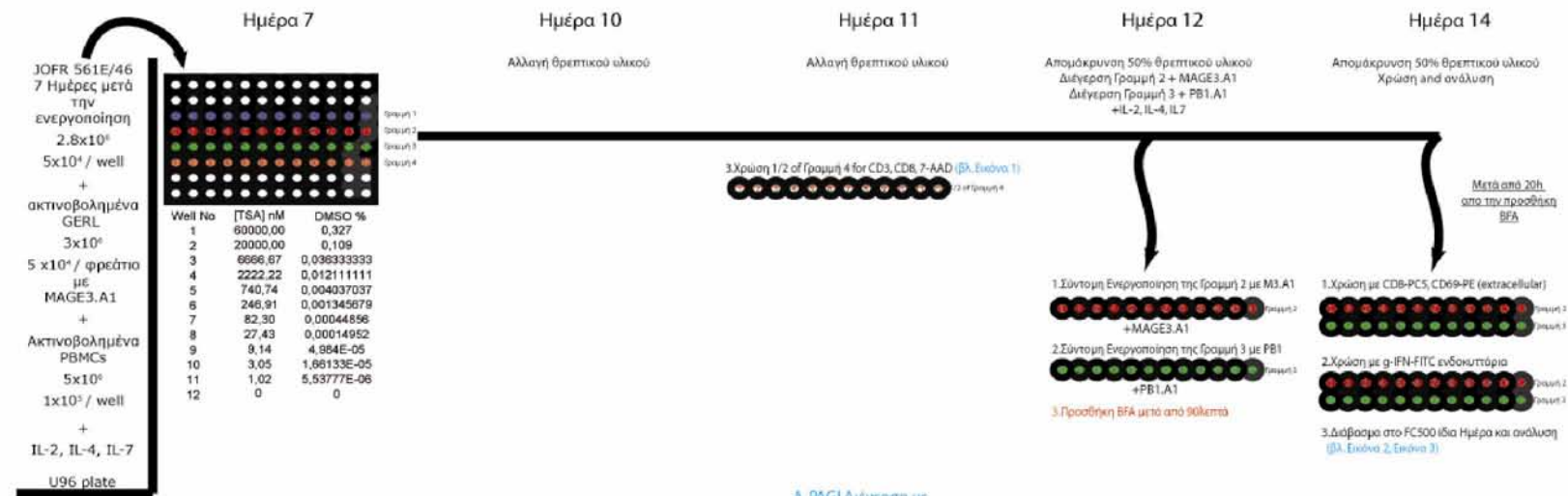
ΕΙΚΟΝΑ 23: Καλλιέργεια αντι M3.A2 κλώνου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TSA σε U96.



Well No	[TSA] nM	DMSO %
1	60000.00	0.327
2	20000.00	0.109
3	6666.67	0.036333333
4	2222.22	0.012111111
5	740.74	0.004037037
6	246.91	0.001345079
7	82.30	0.00044856
8	27.43	0.0014952
9	9.14	4.394E-05
10	3.05	1.66133E-05
11	1.02	5.53777E-06
12	0	0

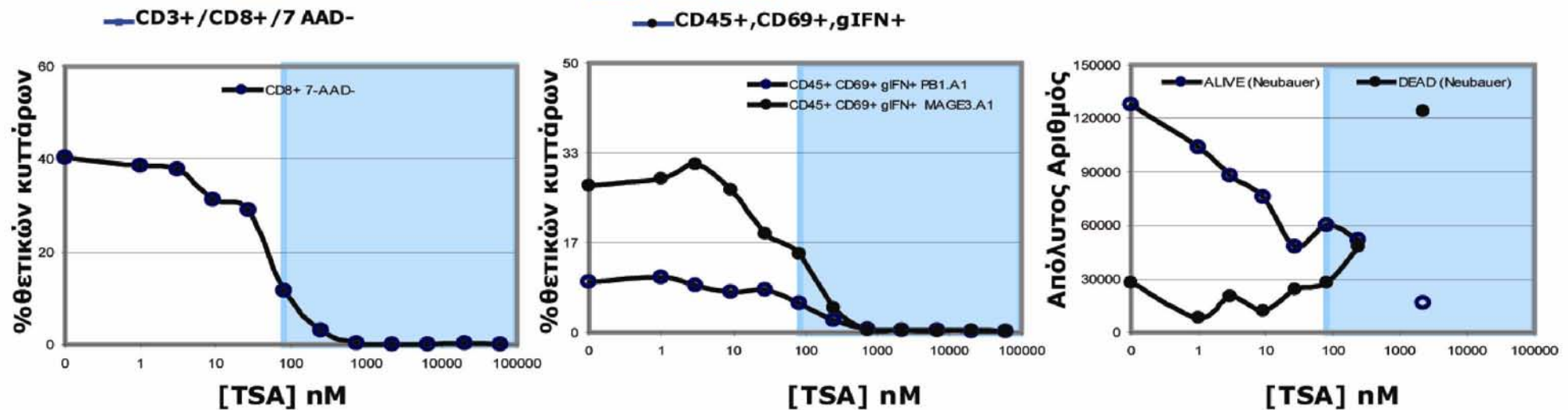


ΕΙΚΟΝΑ 24: Καλλιέργεια αντι M3.A1 κλώνου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TSA σε U96.



Εικόνα 1

Εικόνα 2
A. PAgI Διέγερση με MAGE3.A1 (Γραμμή 2)



ΕΙΚΟΝΑ 26: Καλλιέργεια αντι M3.A1 κλώνου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TSA σε U96.

4.2 Καθορισμός συστήματος αντιγονοπαρουσίασης

Για τον καθορισμό του βέλτιστου συστήματος αντιγονοπαρουσίασης χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος έναντι του MAGE3.A2 ο οποίος είχε απομονωθεί από ασθενή με μελάνωμα. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η 5-αζα-2' δεοξυκυτιδίνη ως το φάρμακο αναφοράς για αυτή τη σειρά πειραμάτων και ο κλώνος καλλιιεργήθηκε σε 3 διαφορετικές συνθήκες φαρμάκου, 0nM, 200nM και 200nM. Τα κύτταρα αποψυχόταν, διεγειρόταν ειδικά και μετά από 7 μέρες καλλιέργειας γινόταν επαναδιέγερση και προσθήκη του φαρμάκου την ημέρα 7 ή 8 ή 9. Την ημέρα 12 οι κλώνοι υποβαλλόταν σε σύντομη ενεργοποίηση. Ταυτόχρονα γινόταν χρώση με HLA τετραμερές αλλά και με CD57, CCR7, CD45RA, CD45RO, 7-AAD, CD45, CD62L, CD28 και CD127. Την ημέρα 13 γινόταν ενδοκυττάρια χρώση για τον έλεγχο παραγωγής IFN-g αλλά και για το κοκκιοένζυμο B, περφορίνη, CD62L, CD8 και CD45,

Ελέγχθηκε η ικανότητα 3 διαφορετικών συστημάτων να διεγείρουν τον αντι-M3.A2 κλώνο. Αυτά ήταν τα:

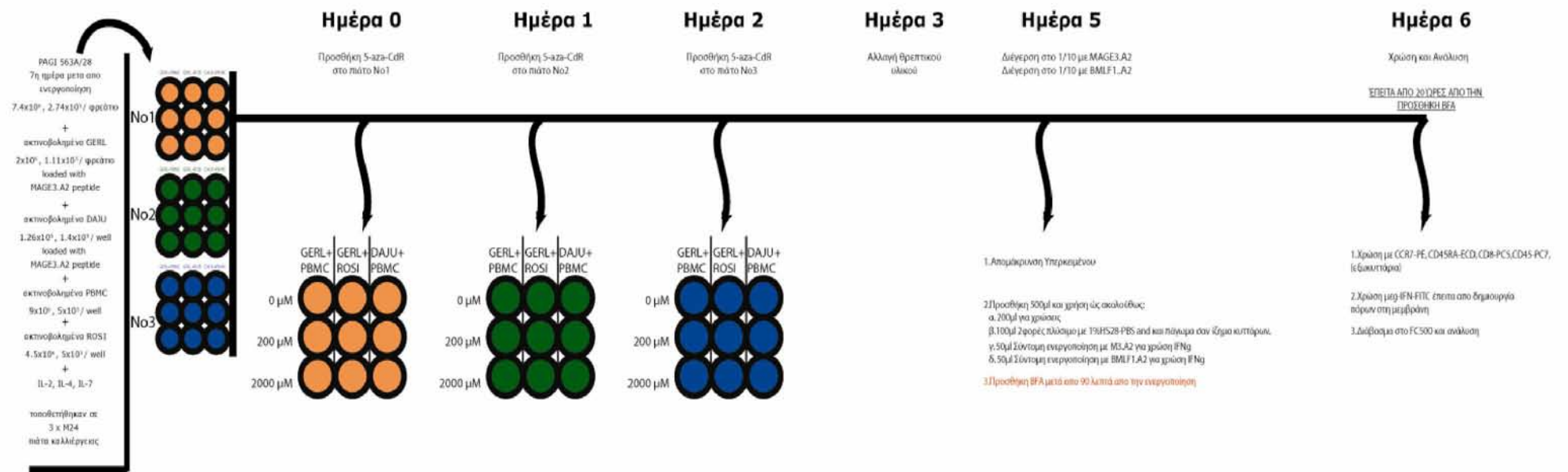
1. Η σειρά καρκινικών κυττάρων από μελάνωμα GERL ως αντιγονοπαρουσιαστικά και PBMCs ως κύτταρα-τροφοί.
2. Η σειρά καρκινικών κυττάρων από μελάνωμα GERL ως αντιγονοπαρουσιαστικά και EBV μετασχηματισμένα ROSI ως κύτταρα-τροφοί.
3. Η EBV μετασχηματισμένη σειρά DAJU ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και PBMCs ως κύτταρα-τροφοί.

Επίσης στην ίδια σειρά πειραμάτων ελέγχθηκε και η μνημονική κατάσταση του κλώνου καθώς και η όποια επίδραση του φαρμάκου σε αυτή.

Από αυτή τη σειρά πειραμάτων συμπεράναμε ότι το καλύτερο αντιγονοπαρουσιαστικό σύστημα ήταν ο συνδυασμός GERL και ROSI. Υπό το συγκεκριμένο σύστημα, ο κλώνος διατηρούταν σε κατάσταση δραστικού μνημονικού κυττάρου, παρήγαγε περισσότερη IFN-g έπειτα από ειδική ενεργοποίηση, είχε πιο έντονη επιφανειακή έκφραση TCR και περισσότερη έκφραση του υποδοχέα της IL-7 (CD127).

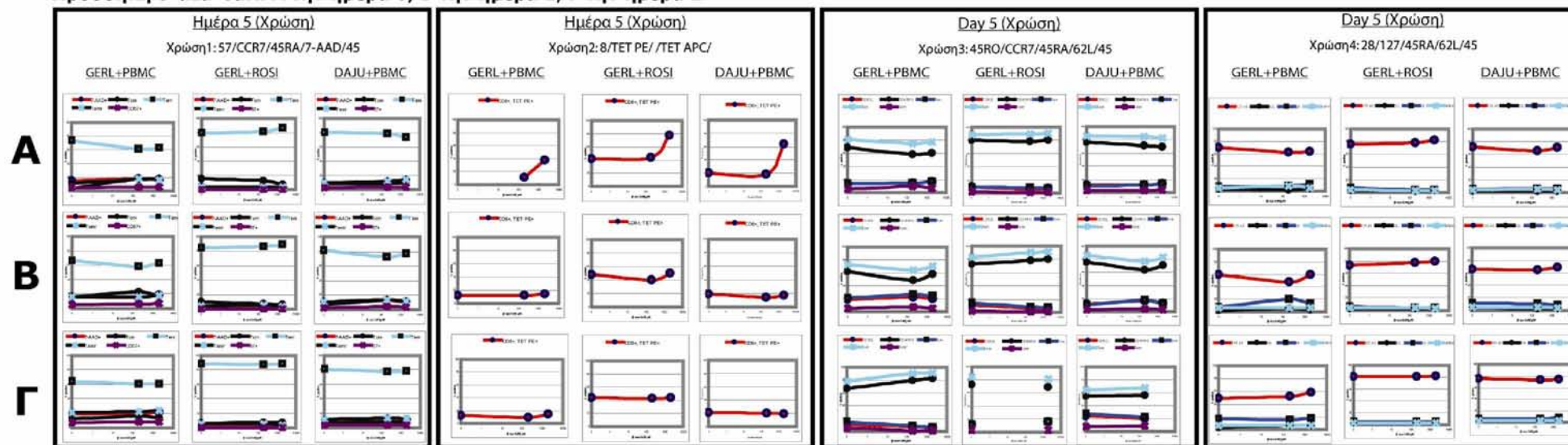
Το 5-aza-CdR δε φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στην μνημονική κατάσταση του κλώνου ή στην έκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ενώ η πλειοψηφία των κυττάρων του κλώνου φαίνεται να είναι μνημονικά δραστικά κύτταρα.

Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και τα αποτελέσματα της σειράς πειραμάτων που οδήγησαν στα παραπάνω συμπεράσματα παρατίθενται στις εικόνες 27-29.



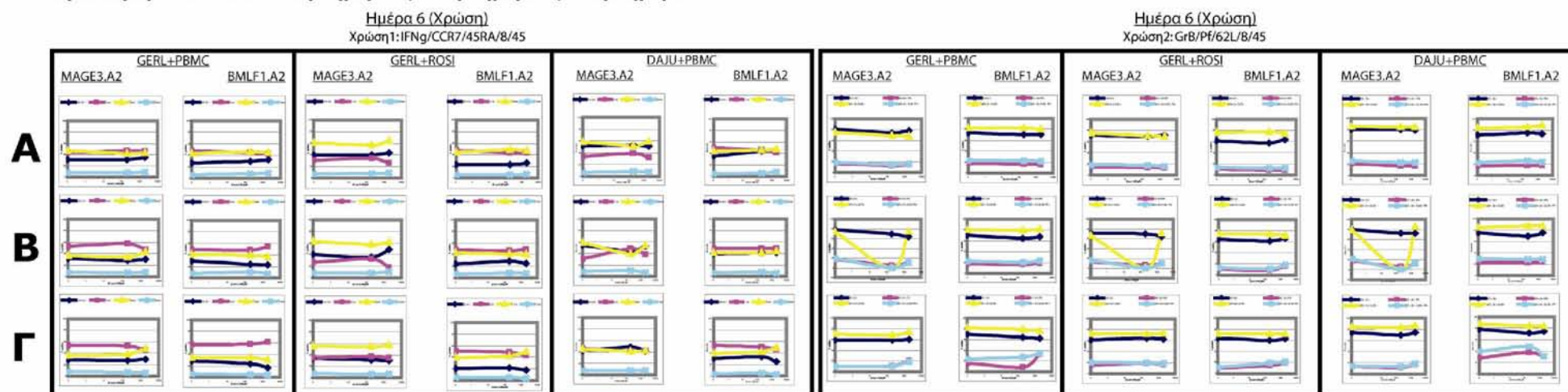
ΕΙΚΟΝΑ 27: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του βέλτιστου συστήματος αντιγονοπαρουσίασης με τη χρήση του αντι-M3.A2 κλώνου.

Προσθήκη 5-aza-CdR: Α την ημέρα 0, Β την ημέρα 1, Γ την ημέρα 2



ΕΙΚΟΝΑ 28: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του βέλτιστου συστήματος αντιγονοπαρουσίασης με τη χρήση του αντι-M3.A2 κλώνου.

Προσθήκη 5-aza-CdR: Α την ημέρα 0, Β την ημέρα 1, Γ την ημέρα 2



ΕΙΚΟΝΑ 29: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του βέλτιστου συστήματος αντιγονοπαρουσίασης με τη χρήση του αντι-M3.A2 κλώνου.

4.3 Καθορισμός χρόνου προσθήκης φαρμάκων και έλεγχος συνέργειας

Για τον καθορισμό του χρόνου προσθήκης των φαρμάκων και τον έλεγχο συνέργειας, χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος έναντι του MAGE3.A1 ο οποίος είχε απομονωθεί από ασθενή με μελάνωμα. Έπρεπε να καθοριστεί ο χρόνος που χρειάζεται για να παρατηρηθεί μια επίδραση παρουσία του φαρμάκου, η σειρά με την οποία θα χρησιμοποιούταν τα φάρμακα όταν θα χρησιμοποιούταν μαζί καθώς και το χρονικό διάστημα από την προσθήκη του πρώτου μέχρι την προσθήκη του δεύτερου. Τέλος έπρεπε να μελετηθεί η πιθανότητα συνέργειας στη δράση των φαρμάκων.

Αρχικά τα κύτταρα αποψυχόταν, διεγείρόταν ειδικά και μετά από 7 μέρες καλλιέργειας γινόταν επαναδιέγερση και προσθήκη του κάθε φαρμάκου την ημέρα 7 ή 8 ή 9. Για την ταυτόχρονη μελέτη δυο φαρμάκων, προστέθηκε το πρώτο φάρμακο την ημέρα 7 και το δεύτερο την ημέρα 8 ή 9 ή 10. Την ημέρα 12 οι κλώνοι υποβαλλόταν σε σύντομη ενεργοποίηση. Την ημέρα 13 γινόταν ενδοκυττάρια χρώση για παραγωγή IFN-g.

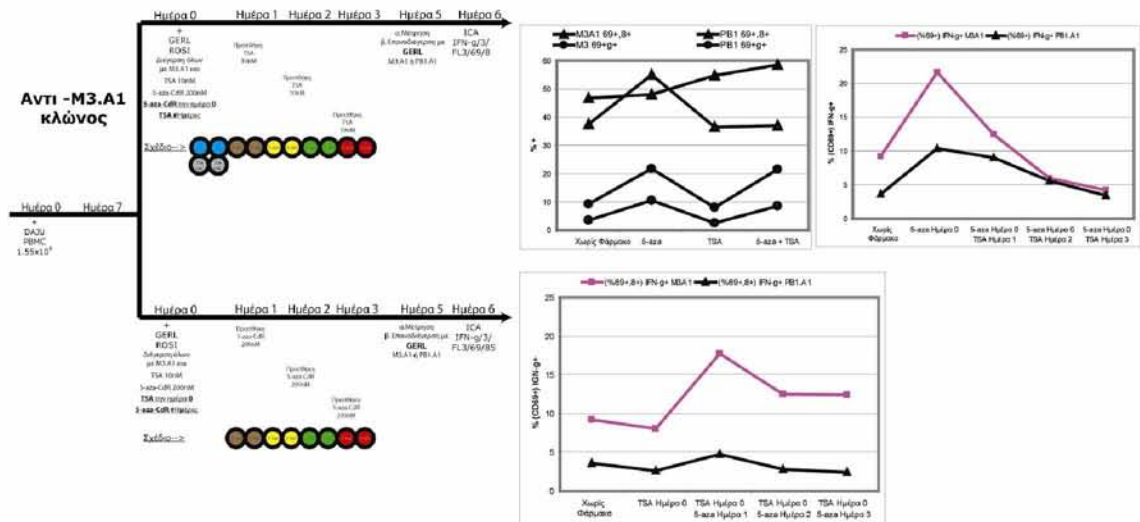
Από αυτή τη σειρά πειραμάτων συμπεράναμε ότι για το 5-aza-CdR, υπάρχει μια πολύ ήπια θετική επίδραση στην έκφραση του CD69 και την παραγωγή IFN-g καθώς και ότι δεν υπάρχει συνέργεια όταν τα φάρμακα χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα. Όσο για την TSA, συμπεράναμε ότι υπάρχει μια ήπια αρνητική επίδραση τόσο στην έκφραση του CD69 όσο και στην παραγωγή IFN-g. Επίσης η τριχοστατίνη φάνηκε να έχει αρνητική επίδραση στην θετική επίδραση του 5-aza-CdR (ακύρωση της επίδρασης ή αντιστάθμιση) και αυτό γίνεται εμφανές όταν χρησιμοποιείται 5-aza-CdR την ημέρα 7 και TSA την ημέρα 8 (4ημέρες πριν τη δοκιμασία).

Επίσης τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην απόφαση για την χρήση του 5-aza-CdR την ημέρα 0 της 2^{ης} ενεργοποίησης [ημέρα 7 ή αλλιώς ημέρα 0(2)].

Η TSA αποφασίστηκε να χρησιμοποιείται την ημέρα 1 της 2^{ης} ενεργοποίησης [ημέρα 8 ή αλλιώς ημέρα 1(2)].

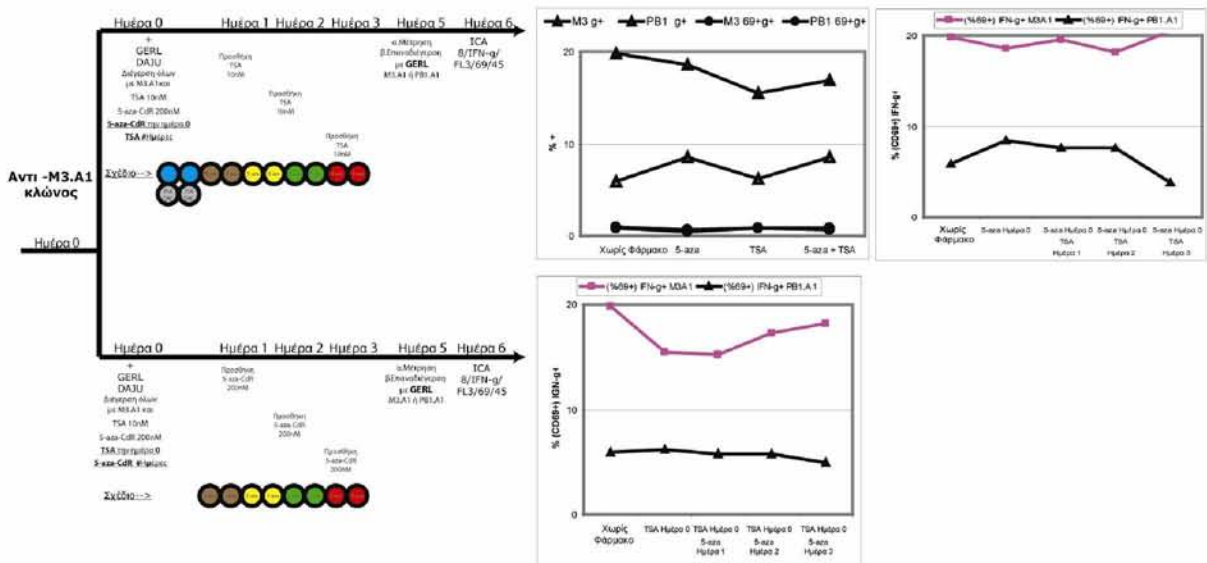
Το 5-aza-CdR χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 200nM και η TSA σε συγκέντρωση 10nM.

Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και τα αποτελέσματα της σειράς πειραμάτων που οδήγησαν στα παραπάνω συμπεράσματα παρατίθενται στις εικόνες 30-33.



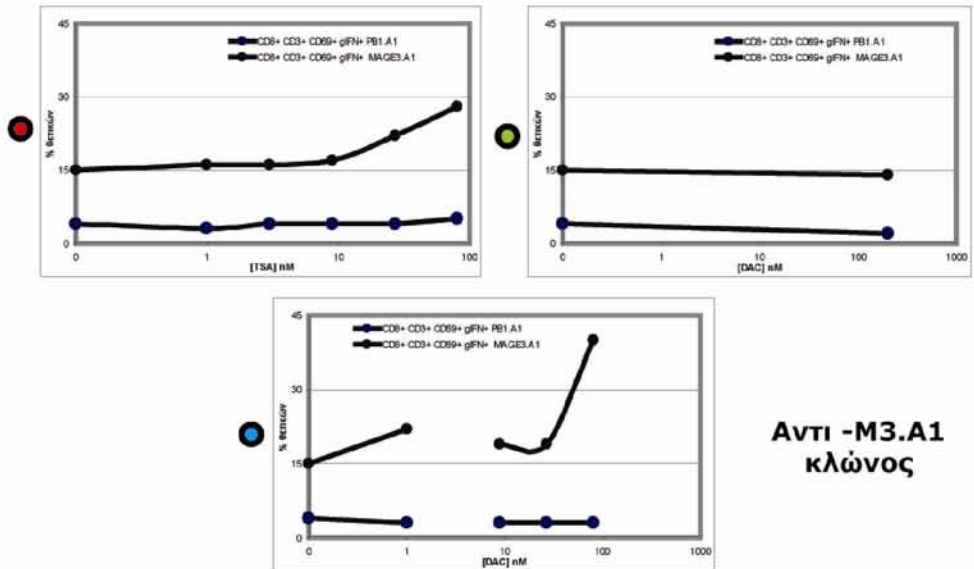
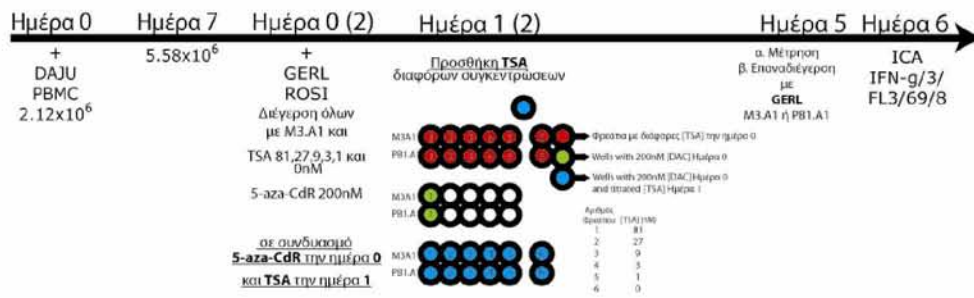
ΕΙΚΟΝΑ 31: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του χρόνου προσθήκης του κάθε φαρμάκου και έλεγχο της συνέργειας, με τη χρήση του αντι-M3.A1 κλώνου. Παρατίθενται 2 συστήματα.

1. Προσθήκη 5-aza-CdR την ημέρα 0 (2) και TSA την ημέρα 1(2), 2 (2) και 3(2).
2. Προσθήκη TSA την ημέρα 0 (2) και 5-aza-CdR την ημέρα 1(2), 2 (2) και 3(2).



ΕΙΚΟΝΑ 32: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του χρόνου προσθήκης του κάθε φαρμάκου και έλεγχο της συνέργειας, με τη χρήση του αντι-M3.A1 κλώνου. Παρατίθενται 2 συστήματα.

1. Προσθήκη 5-aza-CdR την ημέρα 0 (2) και TSA την ημέρα 1(2), 2 (2) και 3(2).
2. Προσθήκη TSA την ημέρα 0 (2) και 5-aza-CdR την ημέρα 1(2), 2 (2) και 3(2).



ΕΙΚΟΝΑ 33: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό του χρόνου προσθήκης του κάθε φαρμάκου και έλεγχο της συνέργειας, με τη χρήση του αντι-M3.A1 κλώνου. Παρατίθενται 3 συστήματα.

1. Προσθήκη 5-aza-CdR την ημέρα 0 (2).
2. Προσθήκη TSA την ημέρα 0.
3. Προσθήκη 5-aza-CdR την ημέρα 0 (2) και διαφόρων συγκεντρώσεων TSA την ημέρα 1(2).

4.4 Καθορισμός της κατάστασης των κλώνων πριν την προσθήκη των φαρμάκων (κύτταρα σε ηρεμία ή διεγερμένα)

Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι τα επιγενετικά φάρμακα μπορεί να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο κύτταρα τα οποία διεγείρονται ή είναι διεγερμένα σε σχέση με κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία, χρησιμοποιήθηκαν και οι 2 κλώνοι έναντι του MAGE3.

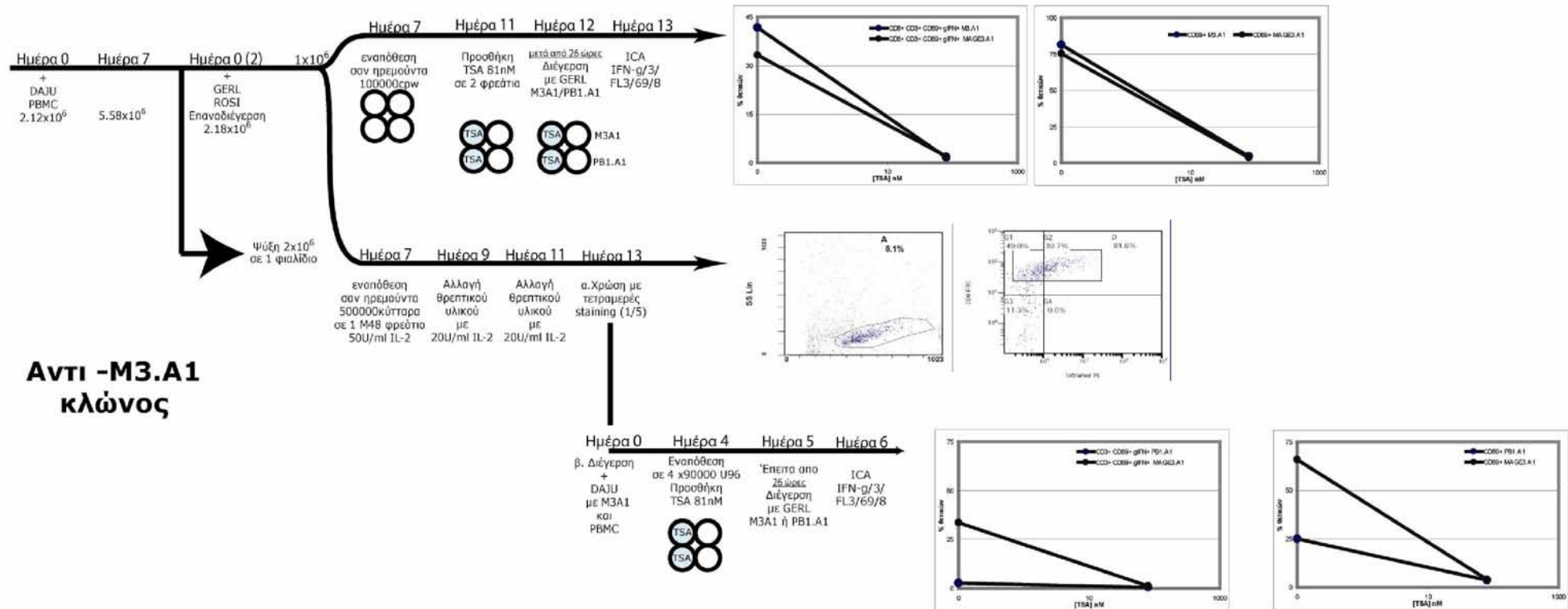
Πρώτα ελέγχθηκε η επίδραση της TSA σε ηρεμούντα κύτταρα. Τα κύτταρα διεγειρόταν ειδικά και έπειτα αφηνόταν σε κατάσταση ηρεμίας με προοδευτική μείωση της συγκέντρωσης της IL-2. Προστέθηκε TSA σε συγκέντρωση 81nM και μετά από 24 ώρες τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε ειδική διέγερση. Αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα είχαν χάσει την ικανότητα τους να ενεργοποιούνται με ένα τρόπο που μετέπειτα πειράματα έδειξαν ότι είναι δοσο-εξαρτώμενος. Μετά από αυτά τα αποτελέσματα ακυρώθηκε η απόφαση για χρήση της τριχοστατίνης A την ημέρα 1 μετά την ενεργοποίηση και αποφασίστηκε να χρησιμοποιείται μία ημέρα πριν την ενεργοποίηση.

Επίσης ελέγχθηκε και η επίδραση του 5-aza-CdR σε ηρεμούντα με το φάρμακο να προστίθεται 1, 2 ή 3 ημέρες πριν τη σύντομη ενεργοποίηση και να απομακρύνεται με συλλογή και πλύση των κυττάρων πριν τη σύντομη ενεργοποίηση.

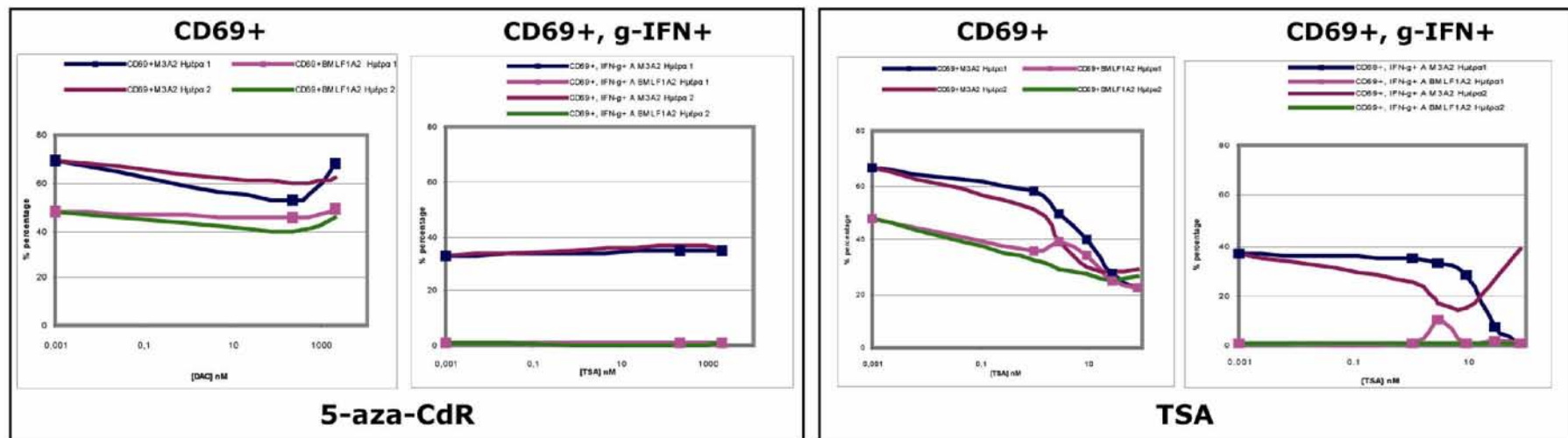
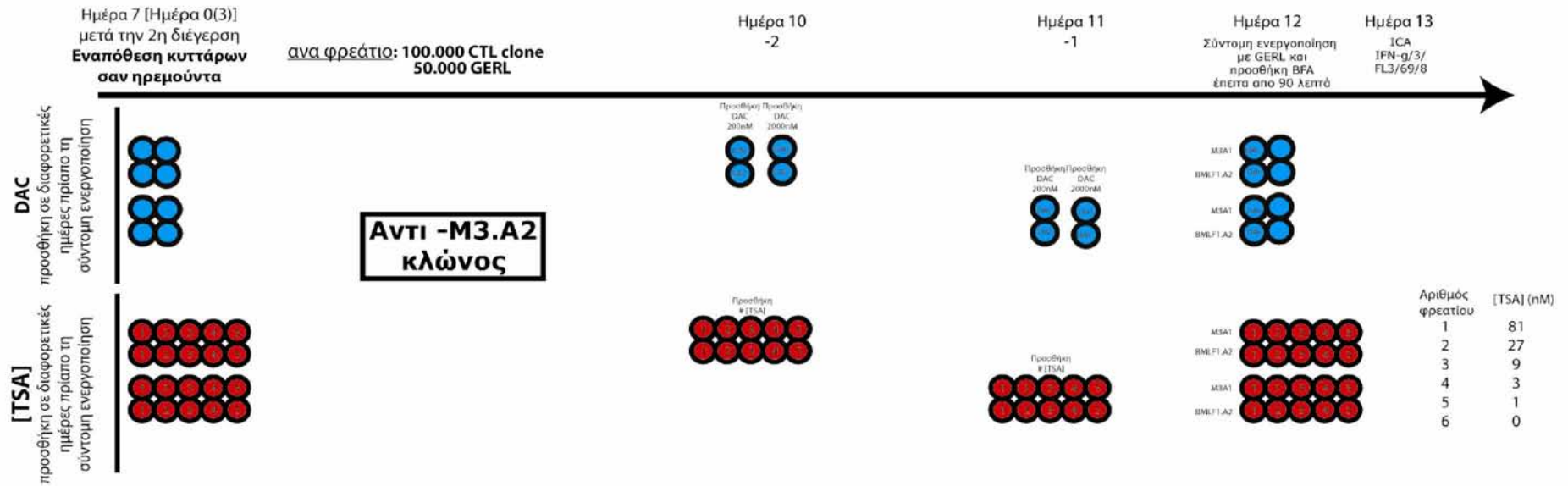
Τέλος μελετήθηκε και η ύπαρξη συνέργειας με την ταυτόχρονη προσθήκη των 2 φαρμάκων 1, 2 ή 3 ημέρες πριν τη σύντομη ενεργοποίηση.

Από αυτή τη σειρά πειραμάτων καταλήξαμε ότι για το 5-aza-CdR, δεν υπάρχει επίδραση ούτε στην έκφραση του CD69, ούτε ιδιαίτερη επίδραση στην παραγωγή IFN-g. Από την άλλη για την TSA εδείχθη ότι υπάρχει μία προφανής μείωση της τάξης του 80-90% στην έκφραση του CD69. Επίσης συμπεράναμε ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στον χρόνο που παρέρχεται από την, πριν την ενεργοποίηση, προσθήκη της TSA μέχρι τη στιγμή της ενεργοποίησης. Προσθήκη TSA 2 ημέρες πριν την ενεργοποίηση είχε παρόμοια αποτελέσματα. Τέλος παρατηρήσαμε ότι δεν υπήρχε κάποια συνέργεια ανάμεσα στα 2 φάρμακα όσον αφορά την επίδραση τους σε ηρεμούντα κύτταρα και ότι όταν χρησιμοποιούνταν ταυτόχρονα, η επίδραση της TSA επικρατούσε.

Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και τα αποτελέσματα της σειράς πειραμάτων που οδήγησαν στα παραπάνω συμπεράσματα παρατίθενται στις εικόνες 34-36.



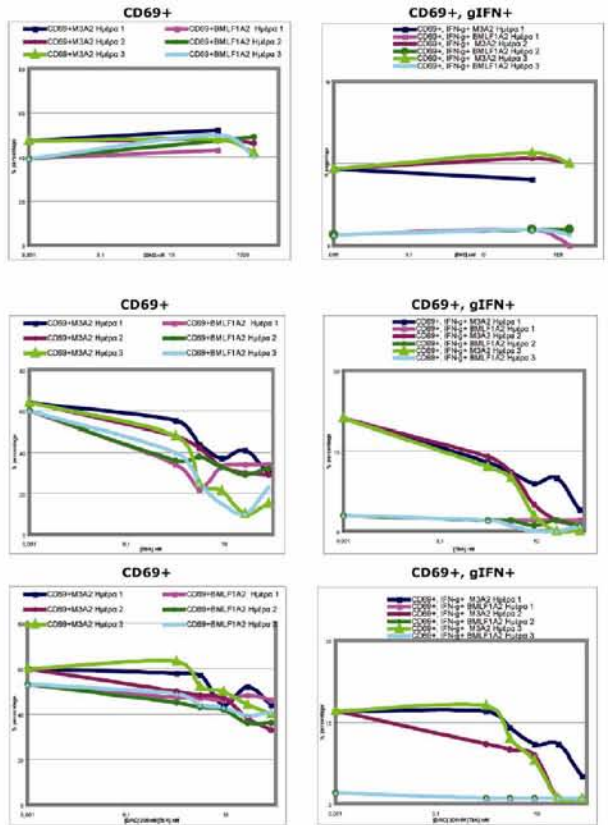
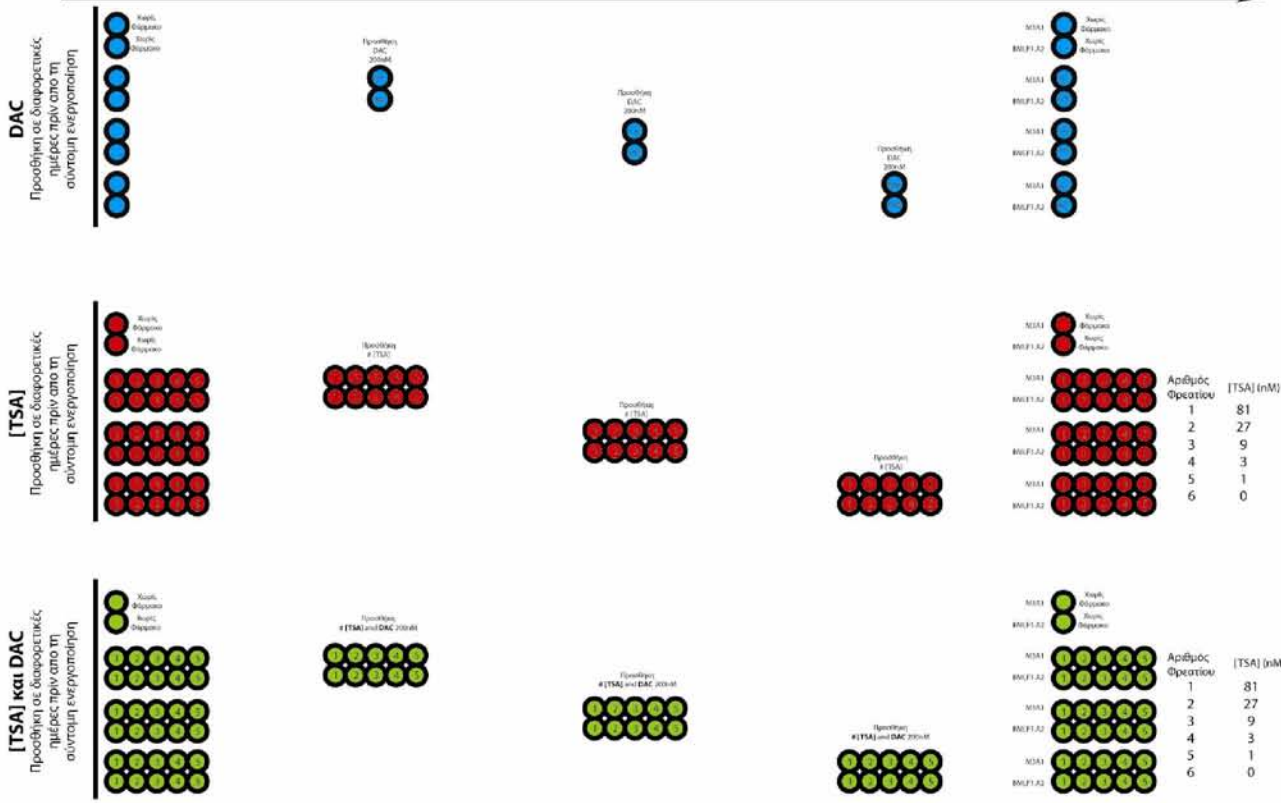
ΕΙΚΟΝΑ 34: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό της επίδρασης της τριχοστατίνης A σε ηρεμούντα κύτταρα του αντι M3.A1 κλώνου και αποτελέσματα.



ΕΙΚΟΝΑ 35: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό της επίδρασης της τριχοστατίνης A και του 5-aza-CdR σε ηρεμούντα κύτταρα του αντι M3.A2 κλώνου και αποτελέσματα.

Αντι -M3.A2 κλώνος

Ημέρα 7 [Ημέρα 0(3)]
μετά τη 2η διέγερση
Εναπόθεση κυττάρων
σαν ημεμούντα



ΕΙΚΟΝΑ 36: Πειραματικός σχεδιασμός για τον καθορισμό της επίδρασης της τριχοστατίνης A και του 5-aza-CdR σε ημεμούντα κύτταρα του αντι M3.A2 κλώνου και αποτελέσματα.

4.5 Σύστημα καλλιέργειας για τη μελέτη της επίδρασης φαρμάκων

Μετά τη σειρά πειραμάτων προτυποποίησης που περιγράφηκαν, καθορίστηκε το σύστημα καλλιέργειας που θα χρησιμοποιούταν για τη μελέτη της επίδρασης των επιγενετικών παραγόντων στους πεπτιδο-ειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους. Από τα πειράματα προτυποποίησης δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη συνέργεια των φαρμάκων και αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν ξεχωριστά με περισσότερη έμφαση να δίνεται στην επίδραση της 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνης. Τα συστήματα καλλιέργειας είναι διαφορετικά για το κάθε φάρμακο και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω τόσο για το 5-aza-CdR, όσο και για την τριχοστατίνη A.

4.5.1 Καλλιέργεια κλώνων παρουσία 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνης

Για τη μελέτη της επίδρασης του 5-aza-CdR στους CD8 T-κυτταρολυτικούς κλώνους, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καλλιέργειας που περιγράφεται στην εικόνα 37. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0, οι κλώνοι αποψυχόταν, σε τέτοιους αριθμούς ώστε να υπάρχουν τουλάχιστο 15×10^6 κύτταρα την ημέρα 7, και ενεργοποιούταν με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έφεραν το ειδικό πεπτιδίο παρουσία κυττάρων τροφών, IL-2, IL-4, IL-7 και MW. Την ημέρα 4 τα κύτταρα ελέγχονταν και γινόταν αλλαγή θρεπτικού υλικού ή διαίρεση των φρεατίων όταν αυτό ήταν απαραίτητο. Την ημέρα 7, τα κύτταρα συλλεγόταν, μετρούταν, χωριζόταν σε 7 διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας σε κατάλληλους αριθμούς, ενεργοποιούταν ειδικά και γινόταν προσθήκη 200nM υποτοξικής δόσης 5-aza-CdR. Την ημέρα 11, στο σύστημα που αφορούσε την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου προστίθετο BrdU. Την ημέρα 12, τα κύτταρα συλλεγόταν και το φάρμακο απομακρυνόταν. Ακλουθούσε ανάλυση κυτταρικού κύκλου με BrdU, ψύξη κυττάρων σε ίζημα για μοριακές αναλύσεις, σύντομη ενεργοποίηση κλώνου με ειδικό και μη ειδικό πεπτιδίο για δοκιμασία παραγωγής κυτταροκινών, φαινοτυπική κυτταρομετρική ανάλυση, ανάλυση απόπτωσης αλλά και ειδική ενεργοποίηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων ($\sim 4 \times 10^6$) απουσία φαρμάκου για ακόμη ένα κύκλο ενεργοποίησης 7 ημερών ώστε να καθοριστεί αν η όποια επίδραση του 5-aza-CdR επιμένει ή φθίνει απουσία του φαρμάκου. Την ημέρα 13 συλλεγόταν το υπερκείμενο από τα κύτταρα που είχαν υποστεί σύντομη ενεργοποίηση την προηγούμενη ημέρα και γινόταν ανάλυση έκκρισης κυτταροκινών με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία. Επίσης την ημέρα 13 γινόταν και δοκιμασία κυτταροτοξικότητας σε κλώνο που βρισκόταν παρουσία φαρμάκου από την ημέρα 7. Την ημέρα 16 γινόταν αλλαγή θρεπτικού μέσου ή διαίρεση όταν ήταν απαραίτητο για το σύστημα καλλιέργειας που αφορούσε τον έλεγχο της παρατεταμένης δράσης του φαρμάκου. Την ημέρα 17 για το τελευταίο σύστημα γινόταν σύντομη ειδική ενεργοποίηση του κλώνου με ειδικό και μη ειδικό πεπτιδίο για δοκιμασία παραγωγής κυτταροκινών. Την ημέρα 18 γινόταν συλλογή υπερκείμενου και μέτρηση κυτταροκινών αλλά και ψύξη του ιζήματος των εναπομεινάντων κυττάρων για όποια μοριακή ανάλυση επέτρεπε ο αριθμός

τους. Τέλος την ημέρα 18 γινόταν κυτταρομετρική φαινοτυπική ανάλυση αλλά και δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας.

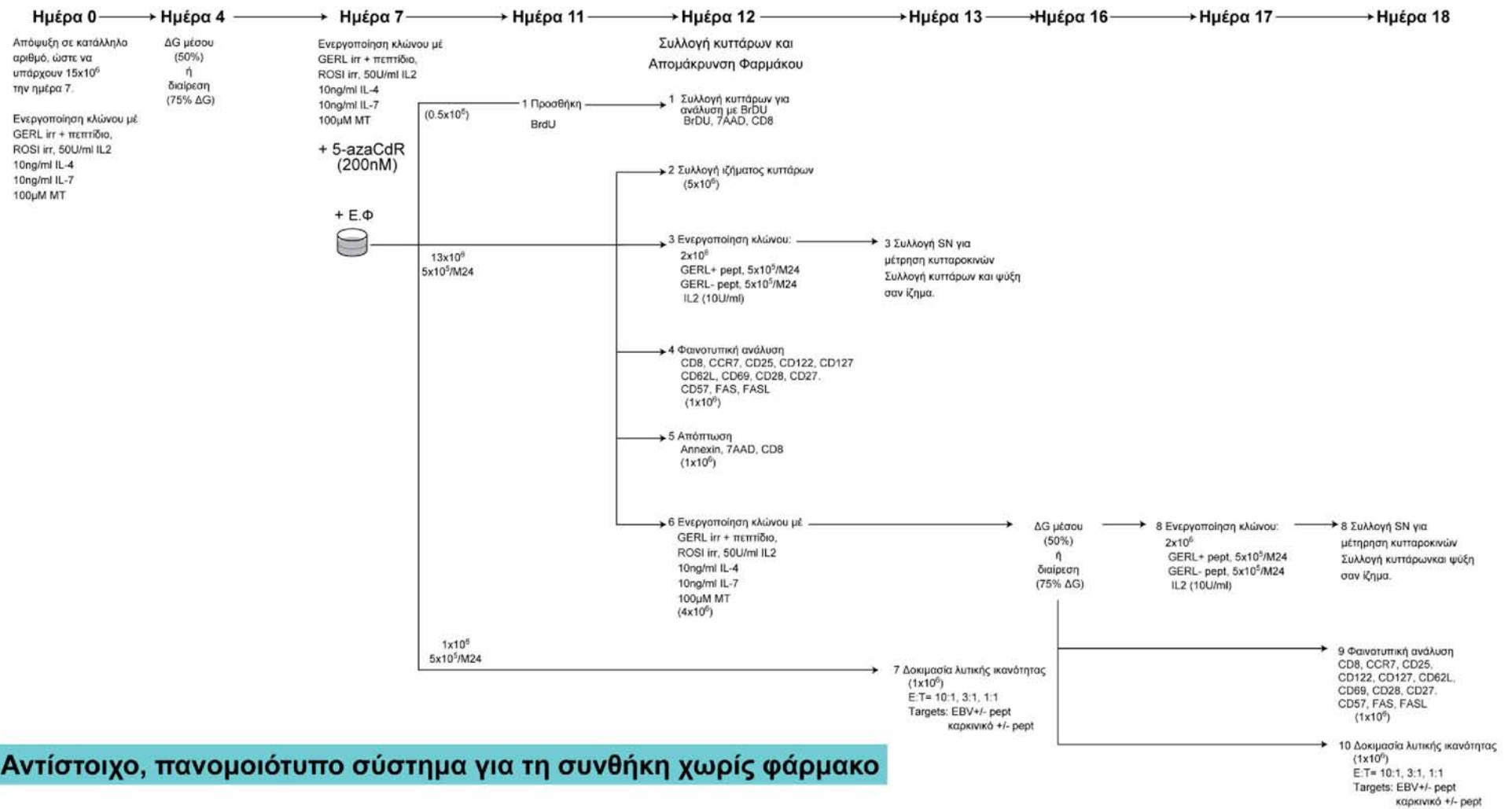
Κάθε φορά, παράλληλα με το παραπάνω σύστημα, βρισκόταν σε καλλιέργεια ένα αντίστοιχο σύστημα καλλιέργειας απουσίας φαρμάκου, το οποίο ήταν πανομοιότυπο και χρονικά παράλληλο. Οι αναλύσεις για τα 2 αυτά συστήματα γινόταν την ίδια στιγμή.

4.5.2 Καλλιέργεια κλώνων παρουσία τριχοστατίνης A

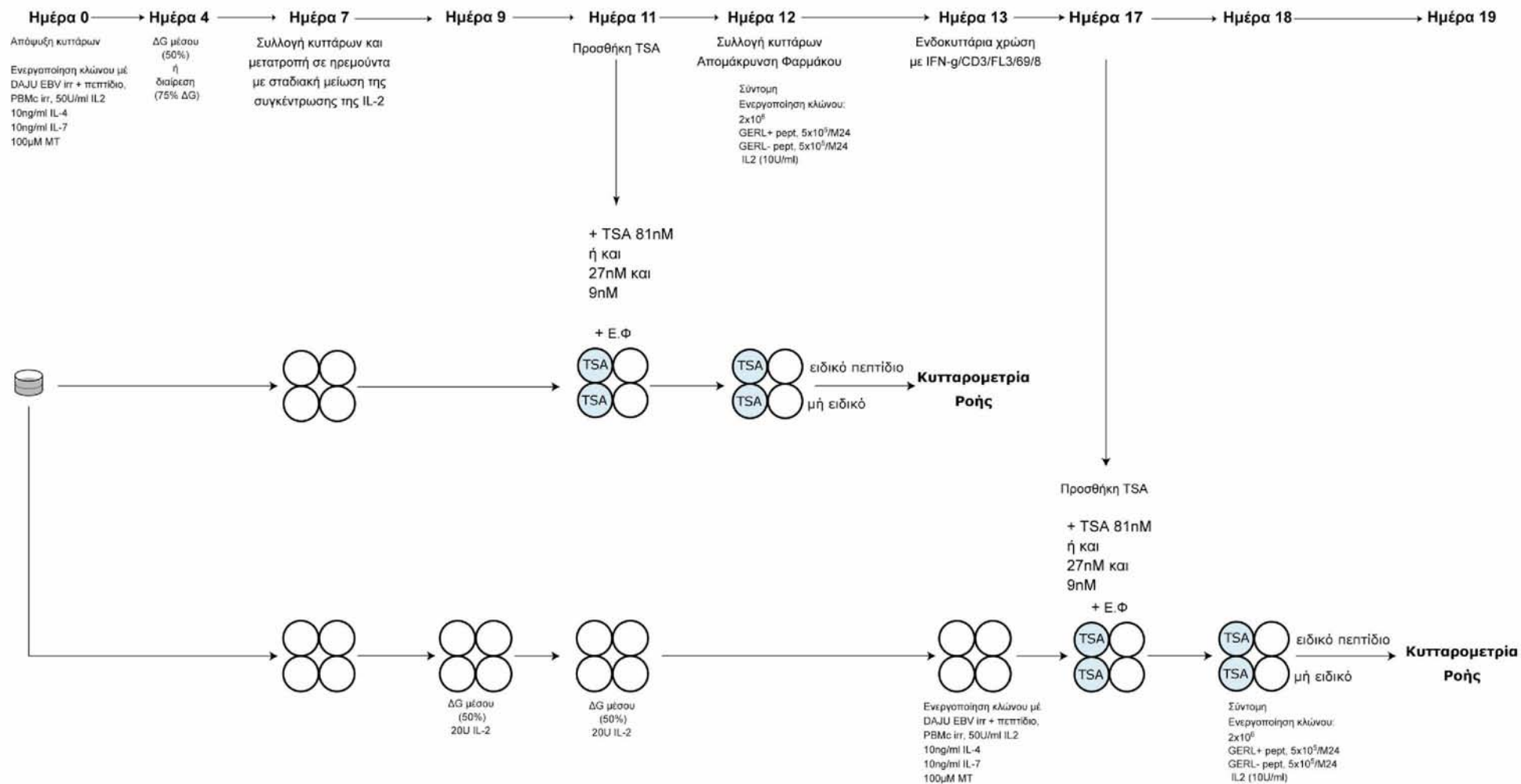
Για τη μελέτη της επίδρασης της TSA στους CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καλλιέργειας που περιγράφεται στην εικόνα 38. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0, οι κλώνοι αποψυχόταν, και ενεργοποιούνταν με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έφεραν το ειδικό πεπτίδιο παρουσία κυττάρων τροφών, IL-2, IL-4, IL-7 και MW. Την ημέρα 4 τα κύτταρα ελέγχονταν για αλλαγή θρεπτικού ή διαίρεση όταν αυτό ήταν απαραίτητο και την ημέρα 7 τα κύτταρα συλλεγόταν και τοποθετούνταν σε καλλιέργεια με σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της IL-2.

Παράλληλα έλαβε χώρα σύστημα καλλιέργειας που θα έλεγχε την επίδραση της TSA σε παρατεταμένη καλλιέργεια μιας περαιτέρω εβδομάδας. Την ημέρα 11 γινόταν προσθήκη υποτοξικής δόσης TSA 81nM ή και 27 και 9nM για να διαπιστωθεί ένα η όποια επίδραση ήταν δόσο-εξαρτώμενη. Την ημέρα 12, τα κύτταρα συλλεγόταν και απομακρύνονταν το φάρμακο. Ακολουθούσε σύντομη ειδική ενεργοποίηση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έφεραν το ειδικό ή ένα μη ειδικό πεπτίδιο προσθετόταν μπρεφελντίνη A. Την ημέρα 13 πραγματοποιούνταν ενδοκυττάρια χρώση για τον έλεγχο της ικανότητας έκκρισης IFN- γ και ικανότητας ενεργοποίησης.

Την ημέρα 17 προσθέτονταν TSA στα κύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Την ημέρα 18, τα κύτταρα συλλεγόταν και απομακρύνονταν το φάρμακο. Ακολουθούσε προσθήκη μπρεφελντίνης A και την επόμενη μέρα ενδοκυττάρια χρώση για τον έλεγχο παραγωγής IFN- γ και ικανότητας ενεργοποίησης.



ΕΙΚΟΝΑ 37: Σύστημα καλλιέργειας για τη μελέτη της επίδρασης της 5-άζα-2' δεοξυκυτιδίνης σε CD8 T-κυτταρολυτικούς κλώνους.



ΕΙΚΟΝΑ 38: Σύστημα καλλιέργειας για τη μελέτη της επίδρασης της τριχοστατίνης A σε CD8 T-κυτταρολυτικούς κλώνους

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίδραση της 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνης σε πεπτιδο-ειδικούς T κυτταρολυτικούς κλώνους.

1.1 Επίδραση στον αντι-ILA.A2 κυτταρολυτικό κλώνο

Το φάρμακο 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη αποδείχθηκε ότι έχει δραστική επίδραση στον αντιγονοειδικό CD8 T κυτταρολυτικό κλώνο με ειδικότητα έναντι του πεπτιδίου ILA της ανθρώπινης τελομεράσης που παρουσιάζεται από HLA.A2 και ο οποίος είχε απομονωθεί από ασθενή με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Ειδικότερα παρατηρήθηκε μείωση 47% στην ολική μεθυλίωση του DNA όπως φάνηκε από την ανάλυση της μεθυλίωσης των επαναλαμβανόμενων στοιχείων ALU. Η μείωση στην ολική μεθυλίωση δεν φαίνεται να επιμένει απουσία του φαρμάκου και συγκεκριμένα μετά από 6 μέρες απουσία του 5-aza-CdR, φάνηκε ότι η διαφορά στην ολική μεθυλίωση ανάμεσα στα κύτταρα στα οποία είχαμε επιδράσει με το φάρμακο και σε κύτταρα στα οποία δεν είχαμε επιδράσει με το φάρμακο ήταν μόνο 8%.

Επίσης φάνηκε ότι οι υποτοξικές δόσεις του φαρμάκου δεν είχαν καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στον κυτταρικό τους κύκλο, όπως αυτό φάνηκε με ανάλυση βρωμοδεοξουριδίνης. Η ανάλυση της απόπτωσης επιβεβαίωσε ότι οι δόσεις του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υποτοξικές και δεν προωθούσαν τα κύτταρα προς απόπτωση. Το ποσοστό των CD8+ κυττάρων που ήταν σε πρώιμη και προχωρημένη απόπτωση ήταν μόνο 5 και 4% αντίστοιχα.

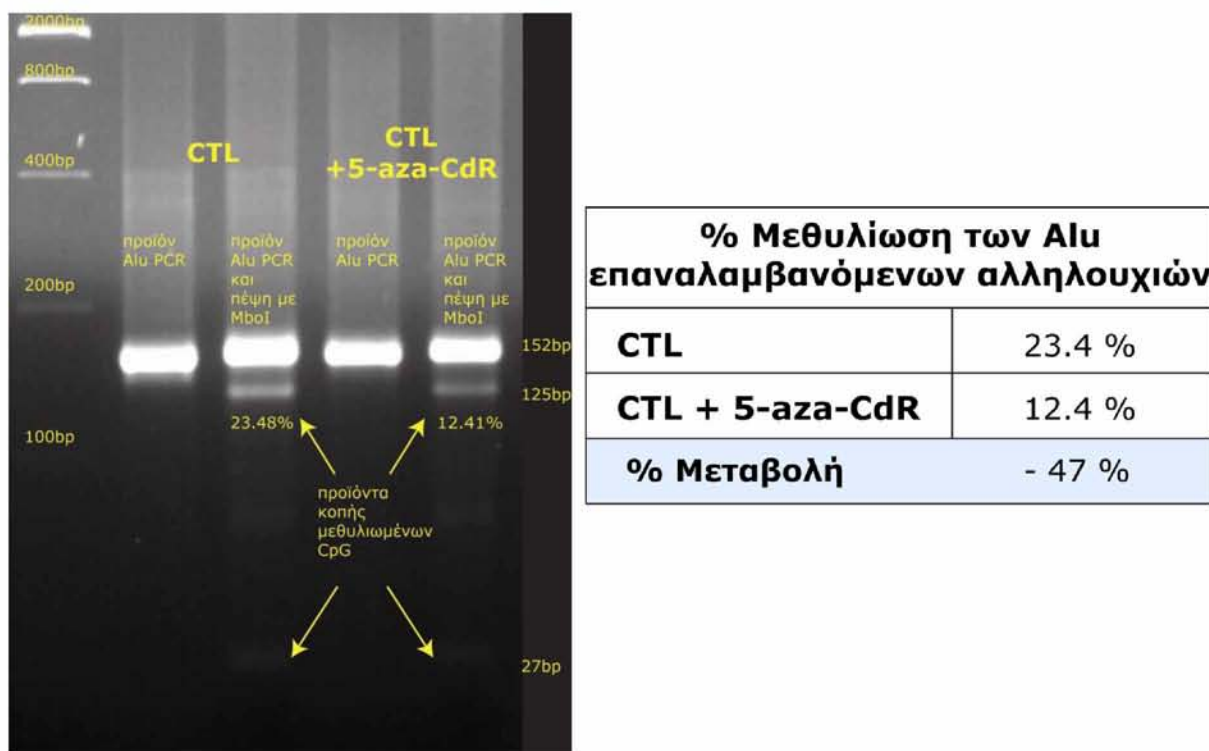
Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει επίδραση του φαρμάκου στην έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τον ανοσοφαινότυπο και τη λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση 8x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου FOXP3, αύξηση 5.3x για το FAS, αύξηση 3.9x για το FASLG, αύξηση 4.2x για το PD-L1 και αύξηση 4.3x για το PD-L2. Παρατηρήθηκαν και μεταβολές στην έκφραση και των άλλων γονιδίων που ελέγχθηκαν, όπως τα PERFORIN, GRANZYMEB, IFNG, IL1B, IL10, TNF, TNFSF10, TGFb1, TGFb3, TGFbR1, PD-1, SMAD2, SMAD3, SMAD4 και SMAD7 αλλά το εύρος αυτών δε θεωρήθηκε αρκετό για αξιολόγηση.

Όσον αφορά την έκφραση επιφανειακών μορίων παρατηρήθηκε αύξηση 47% στην έκφραση του υποδοχέα κυτταρικού θανάτου FAS (CD95). Η μεταβολή αυτή δε φαίνεται να παραμένει έπειτα από την απομάκρυνση του φαρμάκου, επακόλουθη ενεργοποίηση και επανακαλλιέργεια 7 ημερών. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στην παρατεταμένη καλλιέργεια ανάμεσα στα κύτταρα στα οποία είχαμε επιδράσει με το φάρμακο και σε κύτταρα στα οποία δεν είχαμε επιδράσει με το φάρμακο ήταν μόνο 9.3%.

Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση 18.5% και 23.1% στην ικανότητα του κλώνου να παράγει IL-5 και IL-10 έπειτα από ειδική σύντομη ενεργοποίηση παρουσία του φαρμάκου, η συγκέντρωση των οποίων μετρήθηκε στο υπερκείμενο.

Η πιο σημαντική και αξιοσημείωτη επίδραση του 5-aza-CdR ήταν η μείωση της λυτικής ικανότητας των αντικαρκινικών CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων έναντι στόχων, καρκινικών κυττάρων, που παρουσίαζαν το ειδικό για αυτούς πεπτιδιο. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση που φθάνει μέχρι και το 70%. Ακόμη πιο ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση ότι η μείωση αυτή παραμένει ακόμη και μετά την απομάκρυνση του φαρμάκου και μάλιστα παραμένει στα ίδια επίπεδα αφού παρατηρήσαμε μείωση μέχρι και 90% στην λυτική ικανότητα σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για άλλες 7 μέρες μετά την απομάκρυνση του 5-aza-CdR.

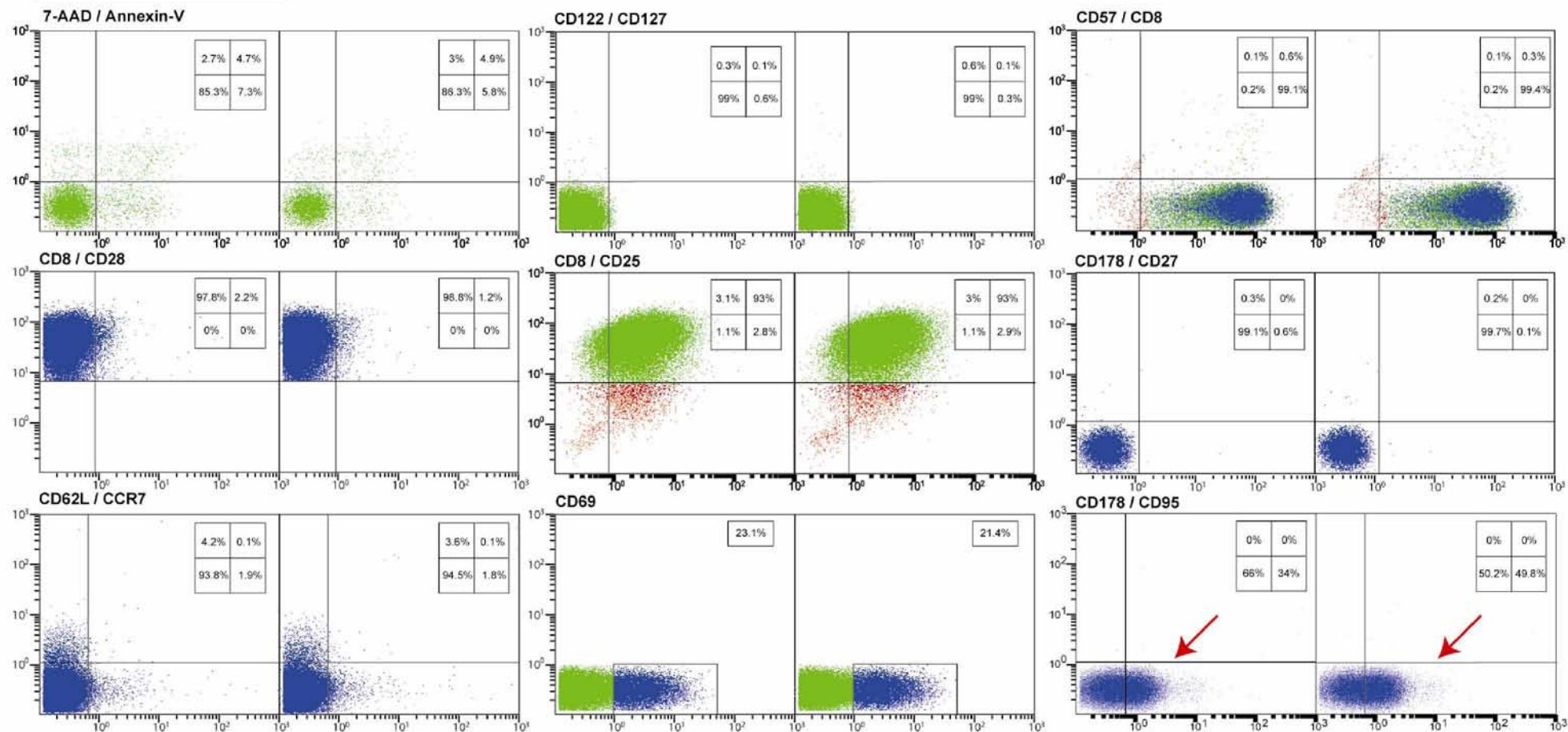
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αποκάλυψαν την επίδραση του 5-aza-CdR στον συγκεκριμένο κλώνο παρατίθενται στις εικόνες 39-46 και στον πίνακα 21.



ΕΙΚΟΝΑ 39: Ανάλυσης ολικής μεθυλίωσης σε γενωμικό DNA κλώνου σε καλλιέργεια παρουσία ή απουσία 5-aza-CdR.

Χωρίς Φάρμακο	200nM 5-aza-CdR
--------------------------	----------------------------

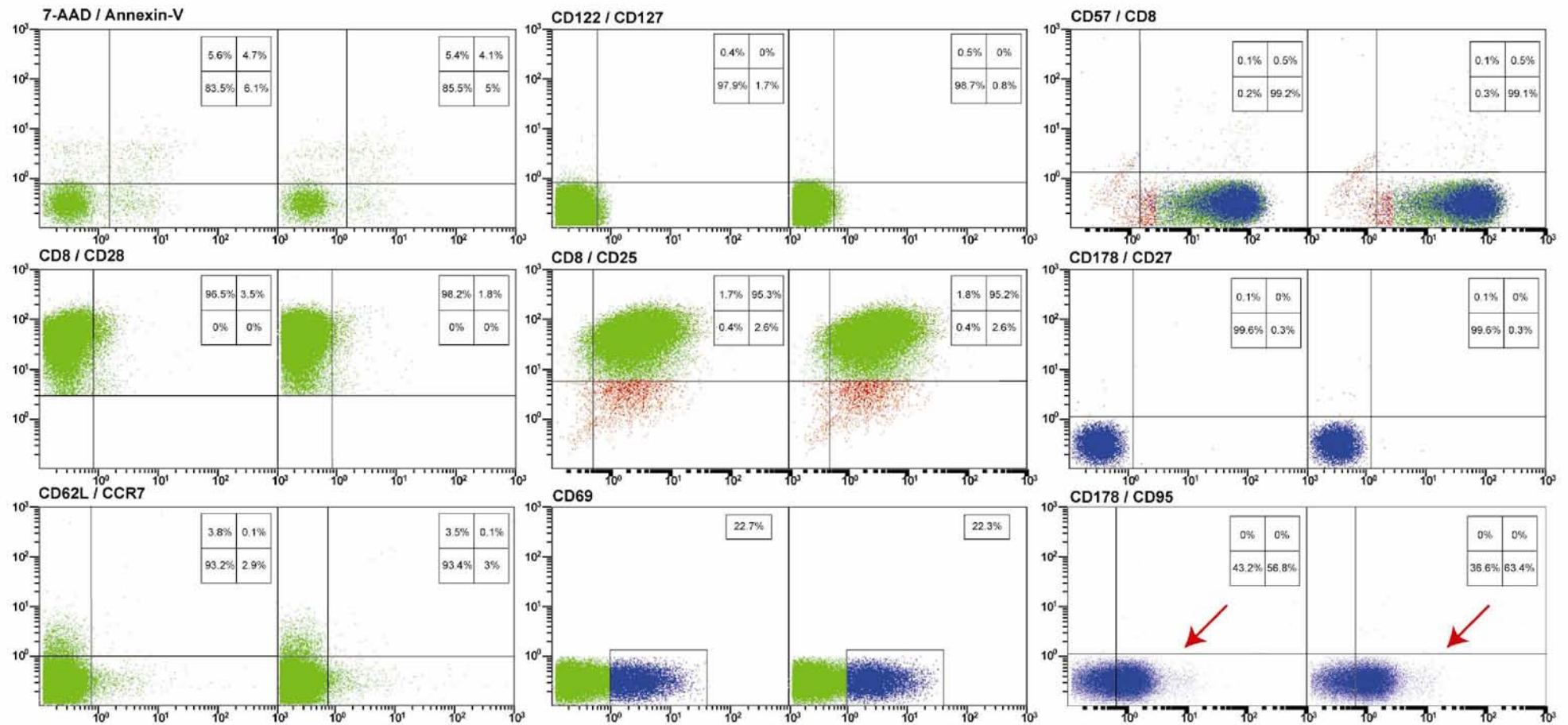
Ο τίτλος του κάθε σκιστογράμματος αντιστοιχεί σε ονομα γ/χ άξονα



ΕΙΚΟΝΑ 40: Κυτταρομετρική ανάλυση μορίων επιφανείας του κλώνου την ημέρα 12 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.

Χωρίς Φάρμακο	200nM 5-aza-CdR
------------------	--------------------

Ο τίτλος του κάθε σικτογράμματος αντιστοιχεί σε ονομα γ/χ άξονα



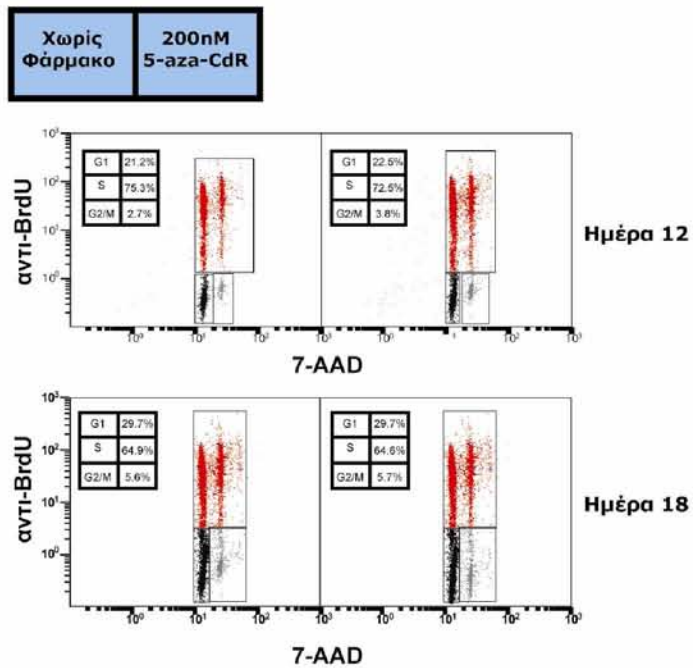
ΕΙΚΟΝΑ 41: Κυτταρομετρική ανάλυση μορίων επιφάνειας του κλώνου την ημέρα 18 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.

	ΗΜΕΡΑ 12				ΗΜΕΡΑ 18			
	Χωρίς Φάρμακο		5-aza-CdR		Χωρίς Φάρμακο		5-aza-CdR	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
Χρώση 1								
CD28	2,20	1,57	1,20	1,74	3,50	1,42	1,80	1,58
CCR7	1,90	4,11	1,80	2,94	2,90	3,77	3,00	2,95
CD62L	4,20	0,26	3,60	0,26	3,80	2,24	3,50	2,92
CD8	94,60	48,60	94,60	49,40	97,70	47,30	97,73	48,00
Χρώση 2								
CD122	0,30	0,24	0,60	0,25	0,40	1,32	0,50	1,12
CD127	0,60	0,61	0,30	0,61	1,70	0,69	0,80	0,70
CD25	93,00	3,60	93,00	3,76	95,30	3,62	95,20	3,61
CD8	96,10	54,60	96,00	54,90	95,90	54,80	95,90	54,90
Χρώση 3								
CD57	0,60	3,90	0,30	6,36	0,50	5,79	0,52	8,04
CD69	23,10	3,43	21,40	3,67	22,68	3,37	22,30	3,61
CD8	94,40	51,70	94,00	53,00	98,46	51,80	98,40	53,20
Χρώση 4								
CD95	33,20	1,39	49,90	1,47	56,80	1,38	63,40	1,49
CD178	0,30	0,29	0,20	0,41	0,05	2,94	0,06	3,19
CD27	0,60	1,12	0,10	16,50	0,28	1,10	0,29	1,41
CD8	99,20	52,60	99,50	52,20	97,40	52,60	97,48	52,30

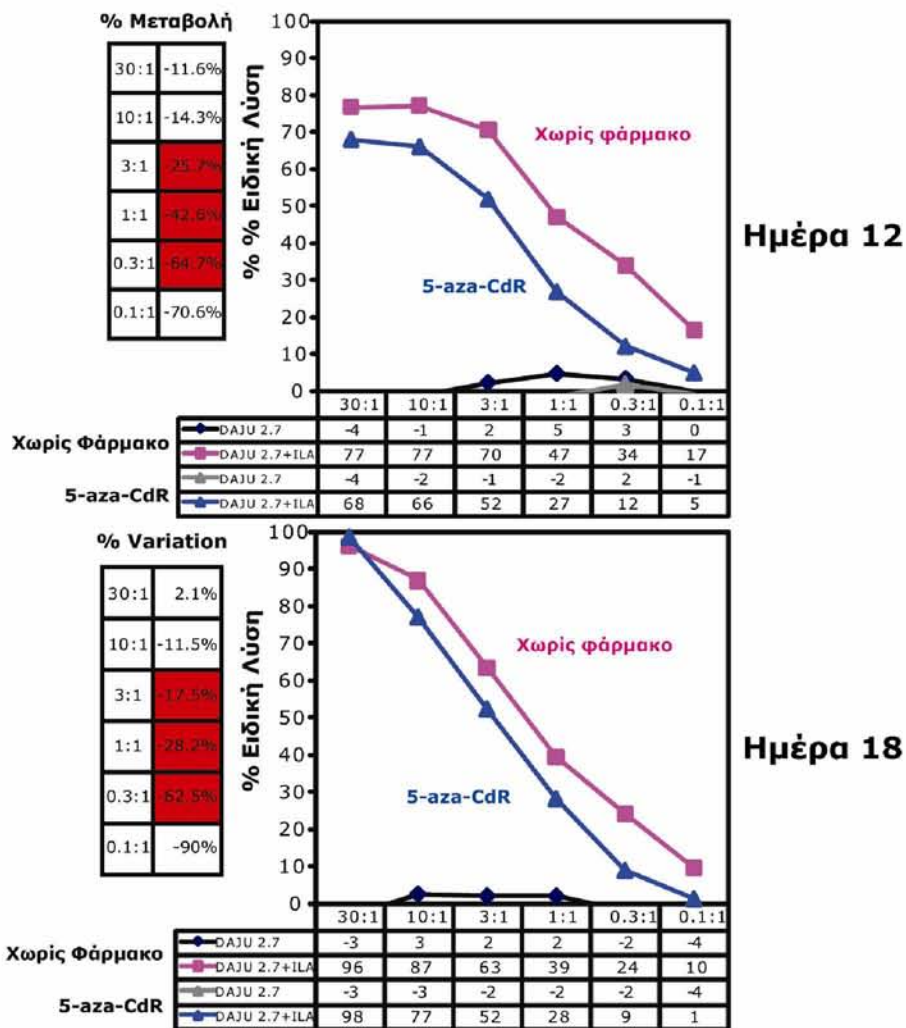
ΕΙΚΟΝΑ 42. Κυτταρομετρική ανάλυση με ποσοστά πληθυσμών και μέση ένταση φθορισμού

Δείγματα Υπερκείμενου	IFN γ		IL5		TNF α		IL10	
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD
Κλώνος +ILA -DAC	21	4	1457	229	2	N/A	337	79
Κλώνος +M3A2 -DAC	2	N/A	55	3	2	N/A	2	N/A
Κλώνος +ILA +DAC	18	1	1726	10	2	N/A	415	5
Κλώνος +M3A2 +DAC	2	N/A	39	11	2	N/A	2	N/A
% Μεταβολή	- 14.3 %		+18.5 %		0 %		+23.1 %	

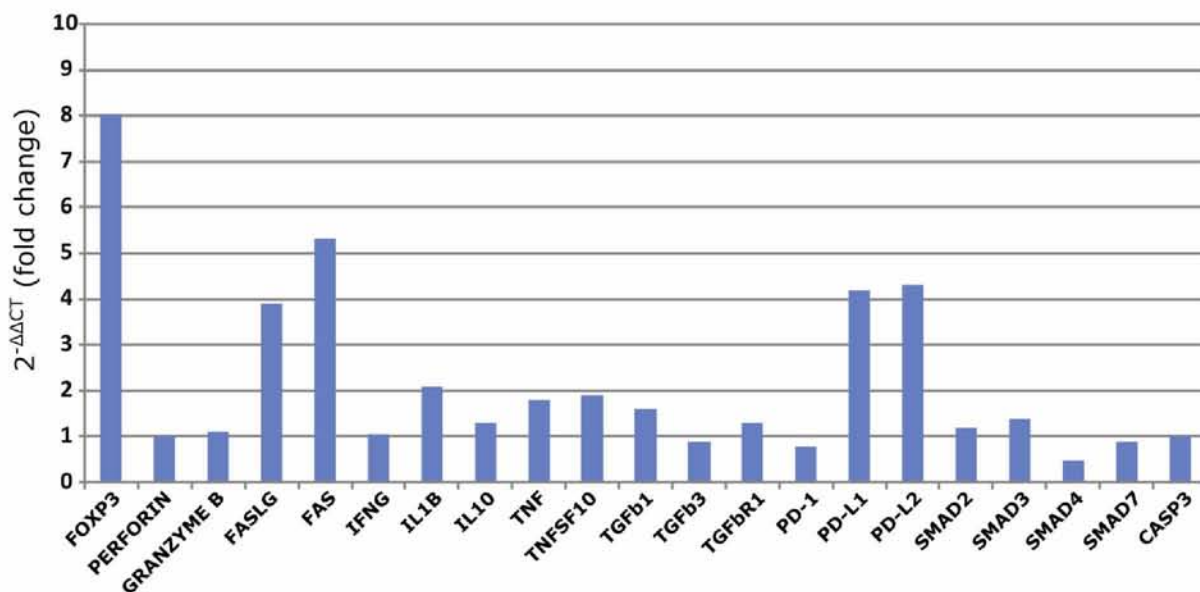
ΕΙΚΟΝΑ 43. Αποτελέσματα μέτρησης με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία των παραγόμενων κυτταροκινών στο υπερκείμενο (pg/ml).



ΕΙΚΟΝΑ 44: Ανάλυση κυτταρικού κύκλου την ημέρα 12 και 18 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.



ΕΙΚΟΝΑ 45: Λυτική ικανότητα του κλώνου την ημέρα 12 και 18 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.



ΕΙΚΟΝΑ 46: Σχετική γονιδιακή έκφραση με τη χρήση της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta CT}$ σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του 5-aza-CdR.

Γονίδιο	2 ^{-ΔΔCT}
FOXP3	8
PERFORIN	1
GRANZYME B	1,13
FASLG	3,9
FAS	5,3
IFNG	1,05
IL1b	2,1
IL10	1,3
TNF	1,8
TNFSF10	1,9
TGFb1	1,6
TGFb3	0,9
TGFbR1	1,3
PD-1	0,8
PD-L1	4,2
PD-L2	4,3
SMAD2	1,2
SMAD3	1,4
SMAD4	0,49
SMAD7	0,9

ΠΙΝΑΚΑΣ 21: Σχετική έκφραση γονιδίων κανονικοποιημένη σε σχέση με την έκφραση με της β2-μικροσφαιρίνης. Παρατίθενται οι τιμές του $2^{-\Delta\Delta CT}$, που αντιπροσωπεύει τον λόγο της μεταβολής.

1.2 Επίδραση στον αντι-MAGE 3.A2 κυτταρολυτικό κλώνο

Το φάρμακο 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη αποδείχθηκε ότι έχει δραστική επίδραση και στον αντιγονοειδικό CD8+ T-κυτταρολυτικό κλώνο με ειδικότητα έναντι του πεπτιδίου FLWGPRALV του αντιγόνου MAGE3 που παρουσιάζεται από HLA.A2 και ο οποίος είχε απομονωθεί από ασθενή με μελάνωμα.

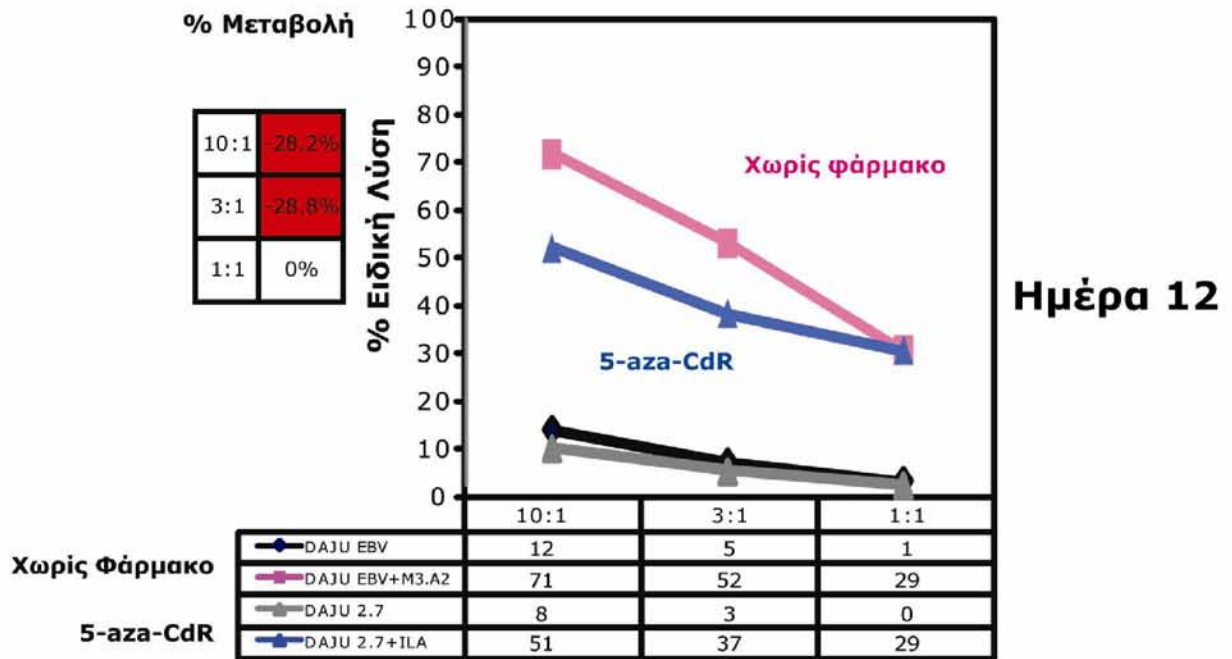
Ειδικότερα φάνηκε ότι οι υποτοξικές δόσεις του φαρμάκου δεν είχαν καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στον κυτταρικό τους κύκλο, όπως αυτό φάνηκε με ανάλυση βρωμοδεοξουριδίνης. Η ανάλυση της απόπτωσης επιβεβαίωσε ότι οι δόσεις του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υποτοξικές και δεν προωθούσαν τα κύτταρα προς απόπτωση. Το ποσοστό των CD8+ κυττάρων που ήταν σε πρώιμη και σε προχωρημένη απόπτωση ήταν λιγότερο από 8%.

Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει επίδραση του φαρμάκου στην έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τον ανοσοφαινότυπο και την λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση 15.2x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου FOXP3, αύξηση 8x για την IFNG, αύξηση 6x για τον TNF, αύξηση 5.7 για το TGFb3, αύξηση 4.1x για το TGFbR1, αύξηση 3.7x για το PD-L1 και αύξηση 4.3x για το PD-L2. Παρατηρήθηκαν και μεταβολές στην έκφραση και των άλλων γονιδίων που ελέγχθηκαν, όπως τα TNFSF10, TGFb1, TGFb3, TGFbR1, PD-1, SMAD4 και SMAD7 αλλά το εύρος αυτών δε θεωρήθηκε αρκετό για αξιολόγηση.

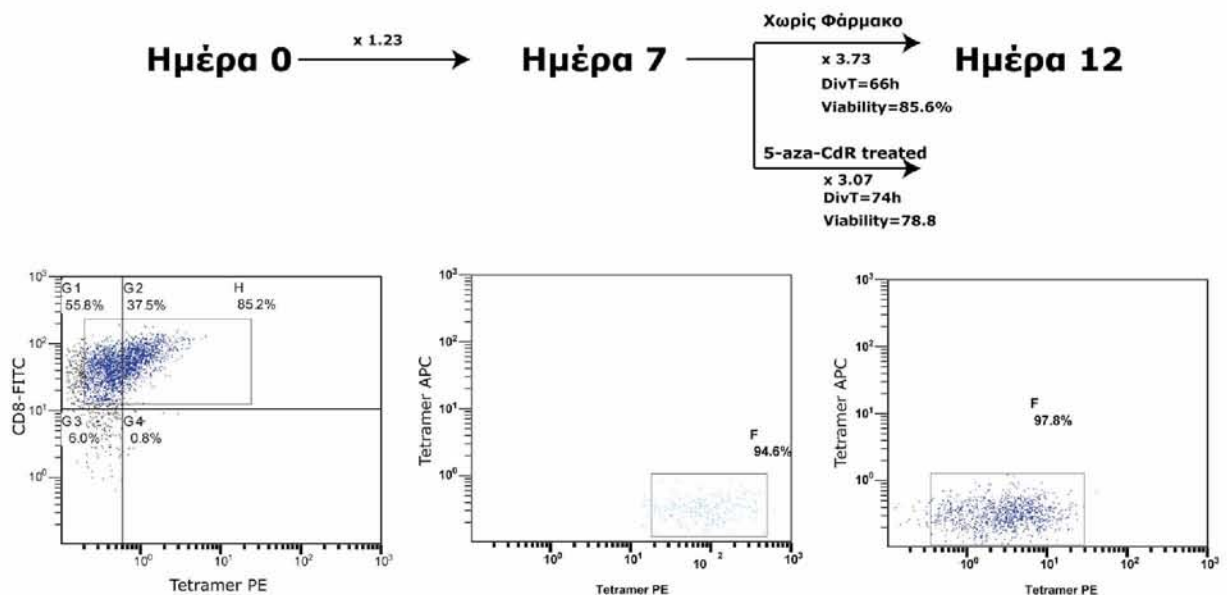
Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση 50% στην ικανότητα του κλώνου να παράγει IFN- γ έπειτα από ειδική σύντομη ενεργοποίηση παρουσία του φαρμάκου και επακόλουθη ενδοκυττάρια χρώση.

Η πιο σημαντική και αξιοσημείωτη επίδραση του 5-aza-CdR ήταν η μείωση της λυτικής ικανότητας των αντικαρκινικών CD8+ T κυτταρολυτικών κλώνων έναντι στόχων, καρκινικών κυττάρων, που παρουσίαζαν το ειδικό για αυτούς πεπτίδιο. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση που φθάνει το 28.8%.

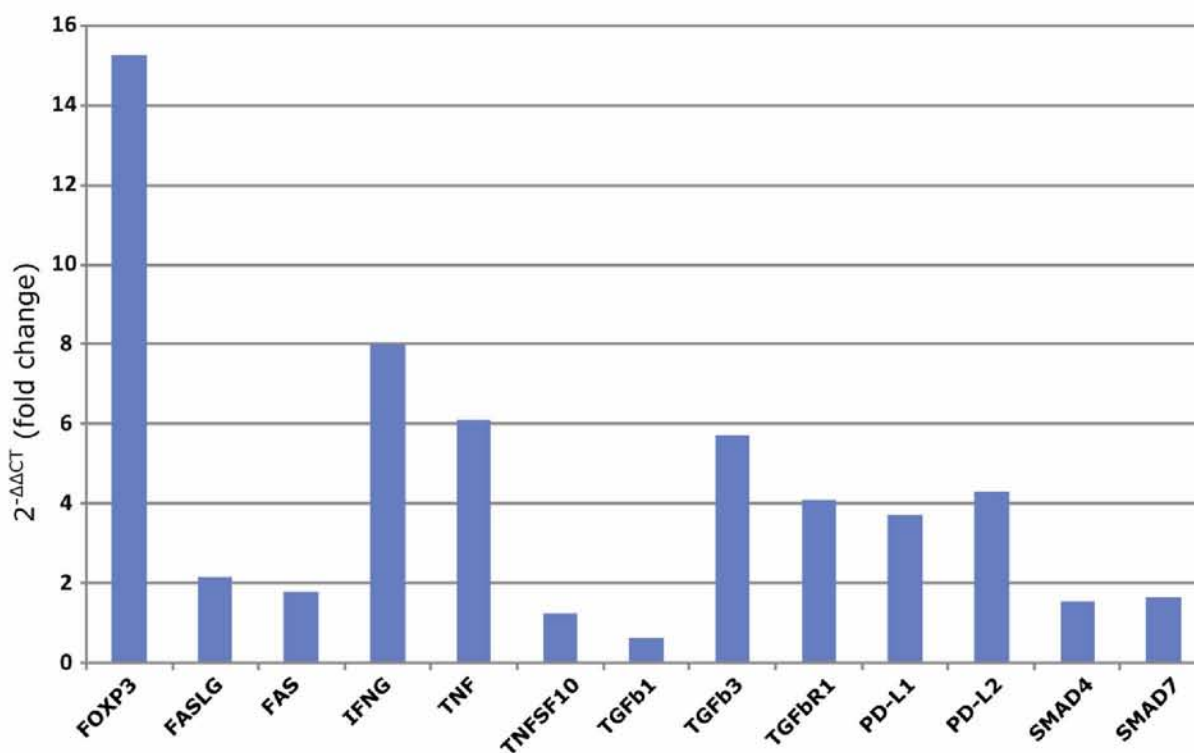
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αποκάλυψαν την επίδραση του 5-aza-CdR στον συγκεκριμένο κλώνο παρατίθενται στις εικόνες 47-51 και στον πίνακα 22.



ΕΙΚΟΝΑ 47: Λυτική ικανότητα του κλώνου την ημέρα 12 και 18 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.



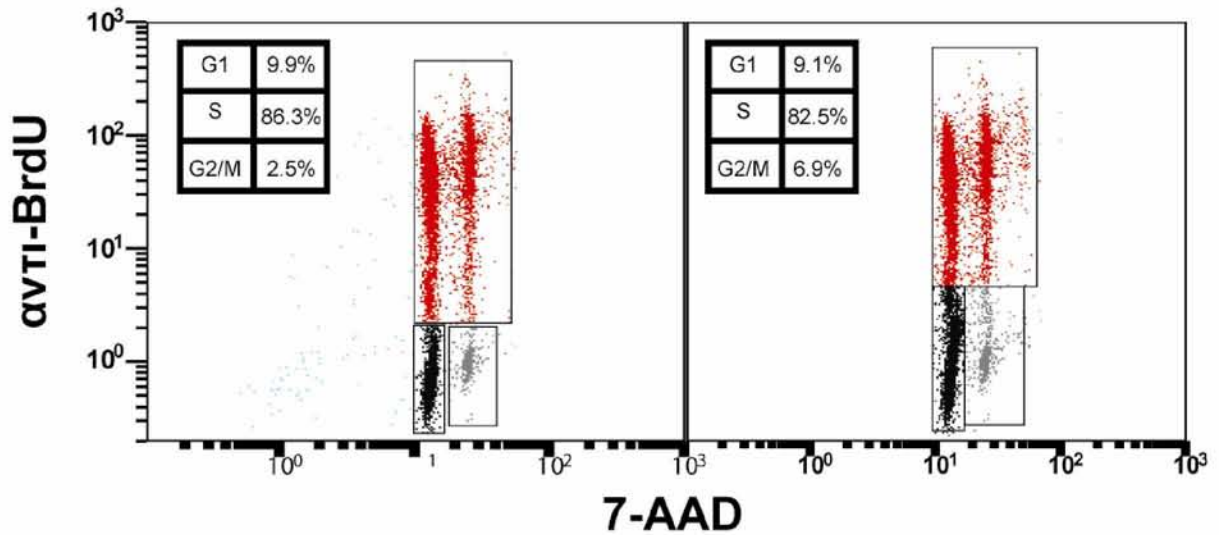
ΕΙΚΟΝΑ 48: Επίπεδα έκφρασης επιφανειακού ειδικού TCR του κλώνου την ημέρα 12 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR, όπως μελετήθηκε μετά από χρώση με ειδικό και μη ειδικό HLA τετραμερές.



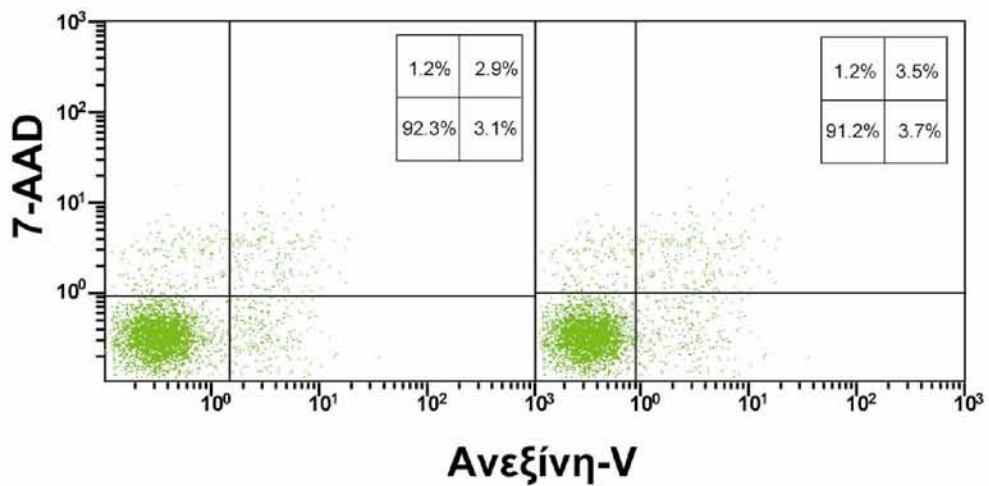
ΕΙΚΟΝΑ 49: Σχετική γονιδιακή έκφραση με τη χρήση της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta CT}$ σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του 5-aza-CdR.

Γονίδιο	$2^{-\Delta\Delta CT}$
FOXP3	15,2
FASLG	2,2
FAS	1,8
IFNG	8,0
TNF	6,1
TGFb1	1,2
TGFb3	0,7
TGFbR1	5,7
PD-L1	4,1
PD-L2	3,7
SMAD4	4,3
SMAD7	1,6

ΠΙΝΑΚΑΣ 22: Σχετική έκφραση γονιδίων κανονικοποιημένη σε σχέση με την έκφραση με της β2-μικροσφαιρίνης. Παρατίθενται οι τιμές του $2^{-\Delta\Delta CT}$, που αντιπροσωπεύει τον λόγο της μεταβολής.



ΕΙΚΟΝΑ 50: Ανάλυση κυτταρικού κύκλου την ημέρα 12 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.



ΕΙΚΟΝΑ 51: Ανάλυση απόπτωσης την ημέρα 12 παρουσία και απουσία 5-aza-CdR.

2. Επίδραση της τριχοστατίνης Α σε πεπτιδο-ειδικούς Τ-κυτταρολυτικούς κλώνους.

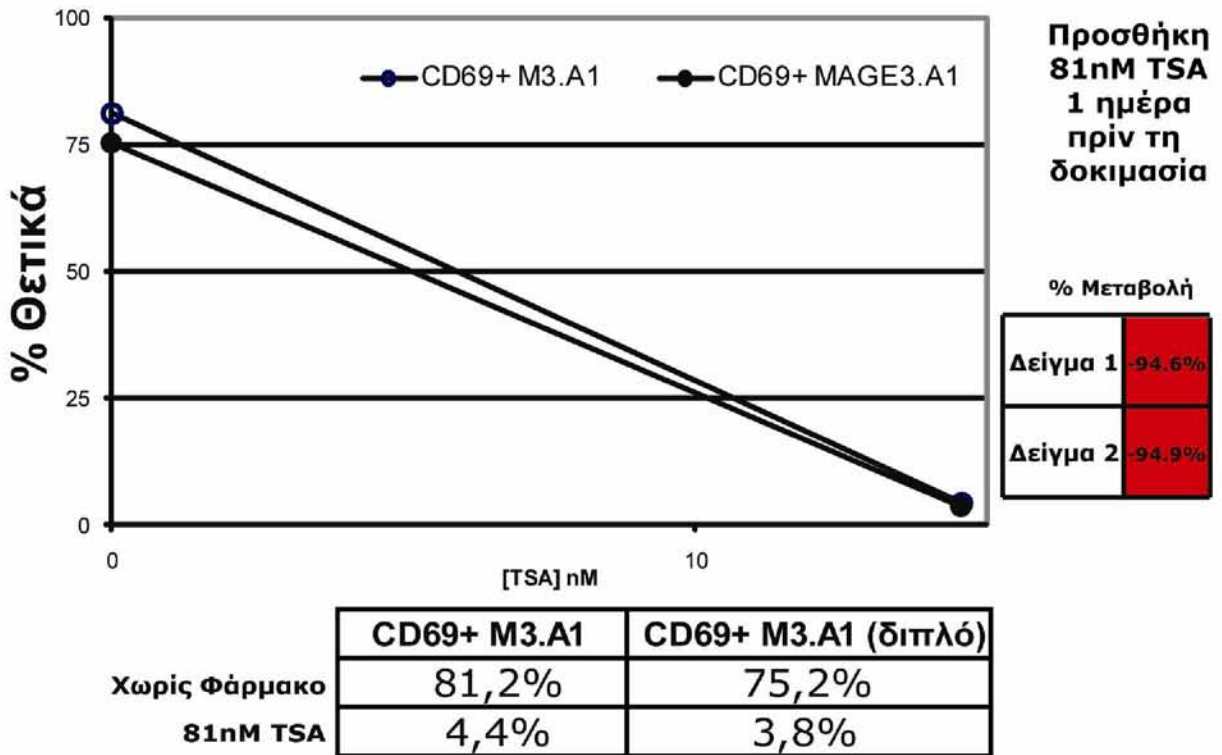
2.1 Επίδραση στον αντι-MAGE3.A1 κλώνο

Η TSA φάνηκε ότι έχει δραματική επίδραση στον αντιγονο ειδικό CD8+ Τ-κυτταρολυτικό κλώνο με ειδικότητα έναντι του πεπτιδίου EVDPIGHLY του αντιγόνου MAGE3 που παρουσιάζεται από HLA.A1 και ο οποίος είχε απομονωθεί από ασθενή με μελάνωμα.

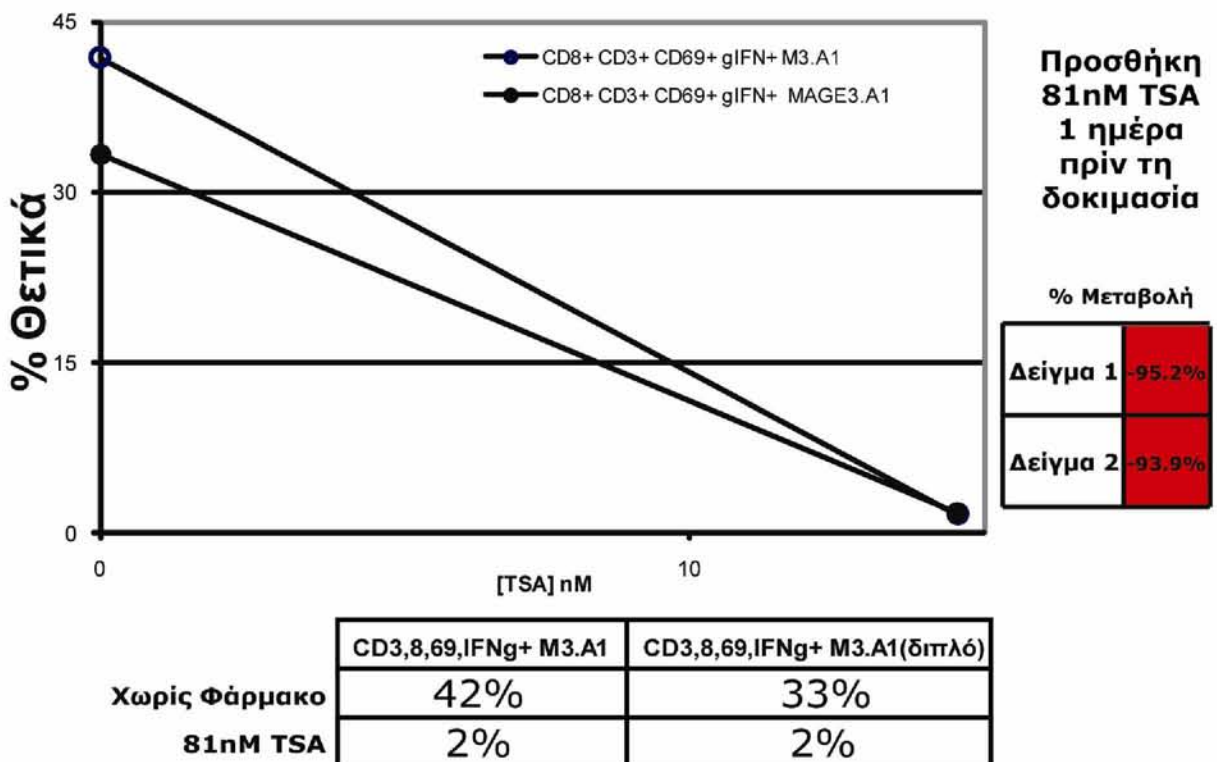
Ειδικότερα φάνηκε ότι οι υποτοξικές δόσεις του φάρμακου μειώνουν την ικανότητα του κλώνου να ενεργοποιηθεί μετά από ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έφεραν το ειδικό για τον κλώνο πεπτιδιο. Η μείωση αυτή έφτανε στο 95% όταν προσθέτονταν 81nM TSA 24 ώρες πριν την διέγερση, με τον κλώνο να μην είναι ικανός να ενεργοποιηθεί και να παράγει IFN-g. Το ποσοστό του CD69 (πολύ πρώιμος δείκτης ενεργοποίησης) βρέθηκε να μειώνεται από το 82% στο 4%. Επανάληψη της διαδικασίας έπειτα από 2 εβδομάδες έδειξαν ότι η μεταβολή που παρατηρήθηκε επαναλαμβάνεται.

Αξιοσημείωτο είναι ότι η μεταβολή που παρατηρήθηκε, αποδείχθηκε ότι είναι δόσοεξαρτώμενη για τις υποτοξικές συγκεντρώσεις της TSA. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι έπειτα από ειδική διέγερση, απουσία φαρμάκου, το ποσοστό του CD8+ CD69+ πληθυσμού ανερχόταν στο 53.8%. Προσθήκη 9nM και 27nM TSA 24 ώρες πριν τη διέγερση προκαλούσε μείωση του ποσοστού του CD8+ CD69+ πληθυσμού στο 9.1% και 1.2% αντίστοιχα. Το ποσοστό του CD8+ CD69+ IFN-g+ πληθυσμού μειωνόταν από 33.8% στο 5.9% και 0.8% μετά την επίδραση με 9nM και 27nM TSA αντίστοιχα.

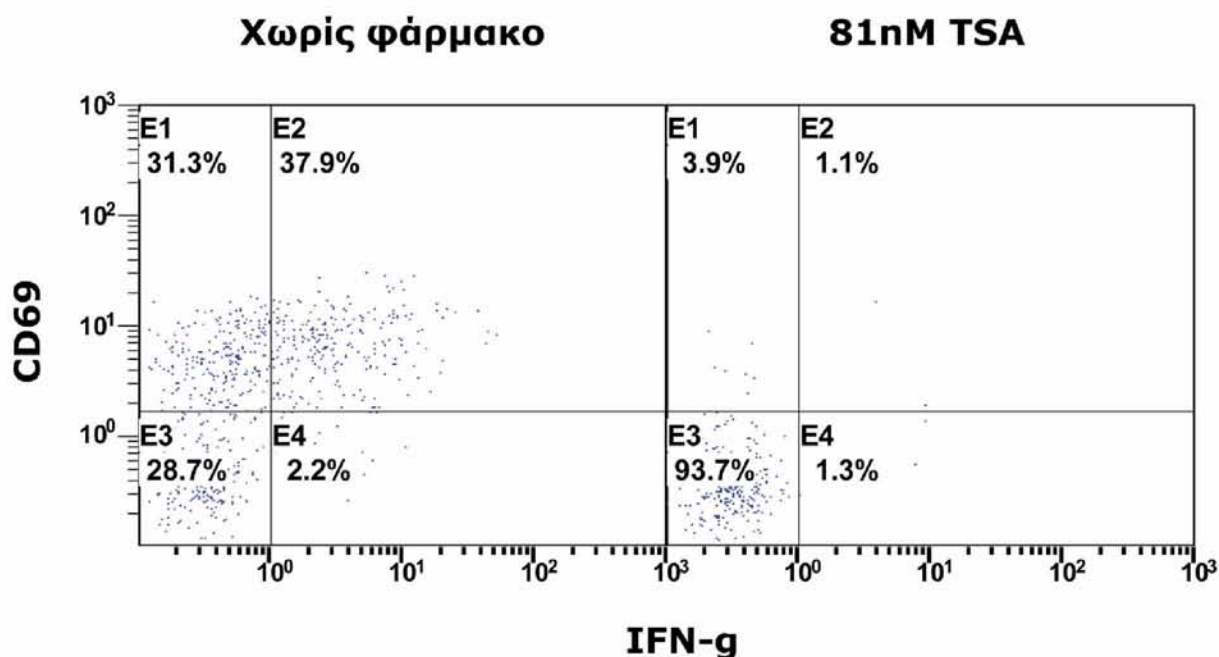
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αποκάλυψαν την επίδραση της TSA στον συγκεκριμένο κλώνο παρατίθενται στις εικόνες 52-57.



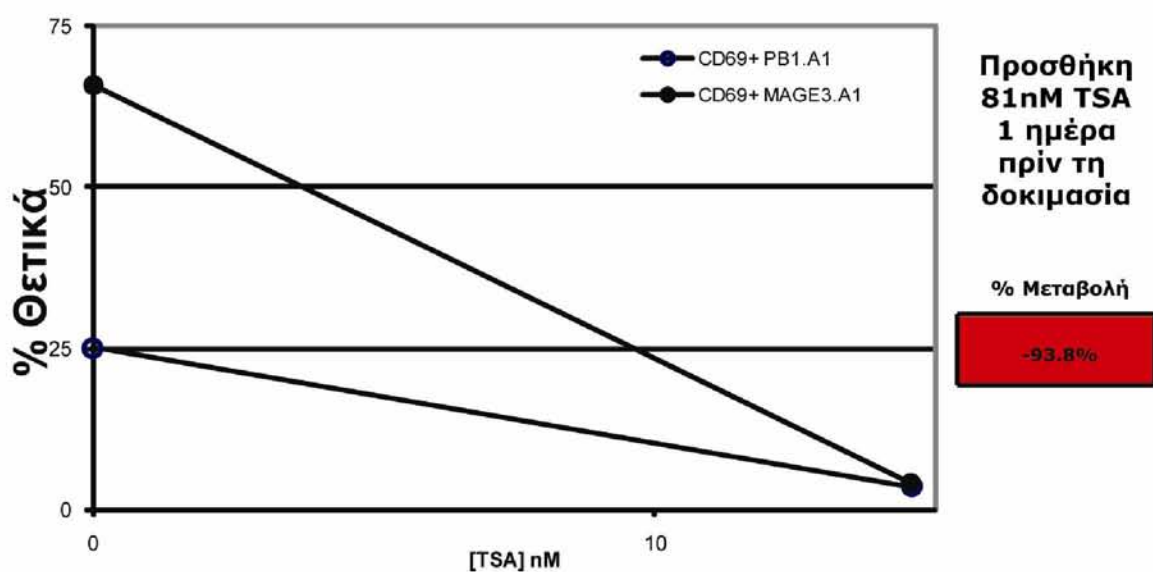
ΕΙΚΟΝΑ 52: Ικανότητα ενεργοποίησης του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η ανάλυση έγινε σε διπλά δείγματα.



ΕΙΚΟΝΑ 53: Ικανότητα ενεργοποίησης και παραγωγής IFN-g του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η ανάλυση έγινε σε διπλά δείγματα.

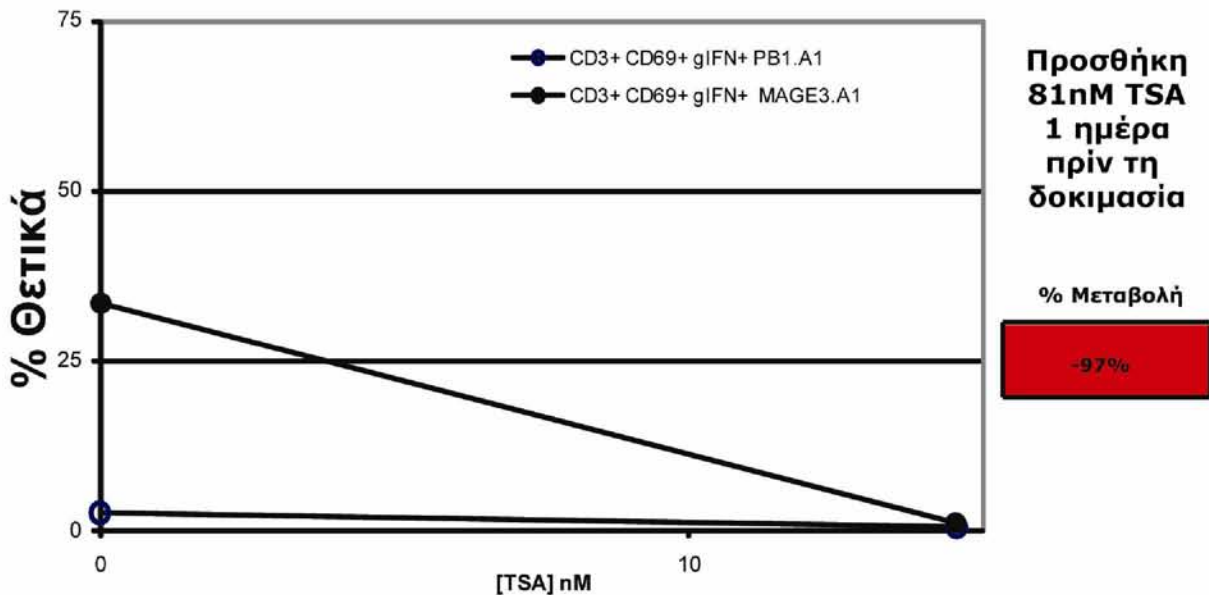


ΕΙΚΟΝΑ 54: Ικανότητα ενεργοποίησης και παραγωγής IFN-g του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική και μη ειδική διέγερση με APCs σε παρατεταμένη καλλιέργεια (4 εβδομάδες). Αντιπροσωπευτικό σικτιόγραμμα CD69-PC5 έναντι IFN-g-FITC σε οριοθετημένο CD8+ πληθυσμό, δείγματος διεγερμένου με το ειδικό πεπτιδίο παρουσιασμένο από καρκινικά κύτταρα GERL.



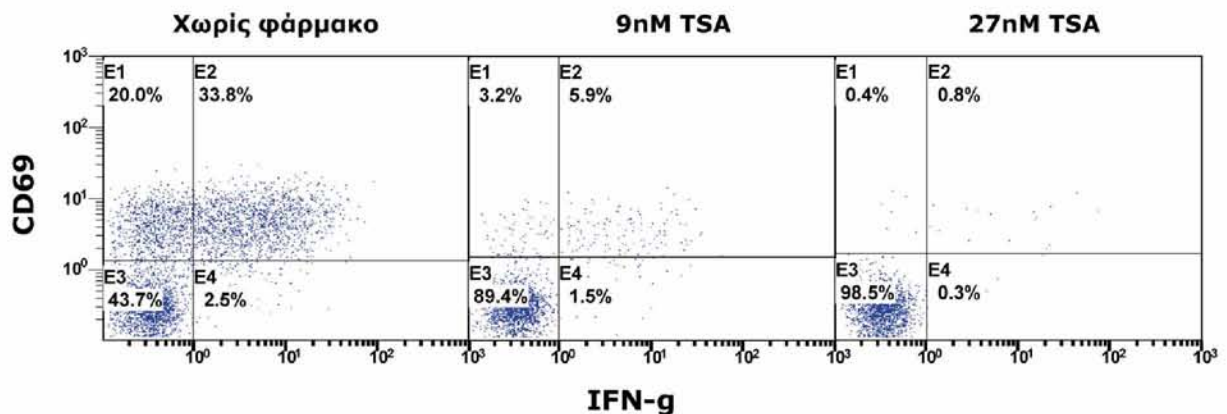
	CD3,8,69 +	
Χωρίς Φάρμακο	25.1%	GERL + PB1
	66%	GERL + M3.A1
81nM TSA	3.6%	GERL + PB1
	4.1%	GERL + M3.A1

ΕΙΚΟΝΑ 55: Ικανότητα ενεργοποίησης του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική και μη ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε παρατεταμένη καλλιέργεια (4 εβδομάδες).



	CD3,8,69,IFNg +	
Χωρίς Φάρμακο	3%	GERL + PB1
	34%	GERL + M3.A1
81nM TSA	1%	GERL + PB1
	1%	GERL + M3.A1

ΕΙΚΟΝΑ 56: Ικανότητα ενεργοποίησης και παραγωγής IFN-g του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική και μη ειδική διέγερση με APCs σε παρατεταμένη καλλιέργεια (4 εβδομάδες).



ΕΙΚΟΝΑ 57: Προσθήκη της TSA 24 ώρες πριν την ειδική διέγερση με πεπτιδιο παρουσιασμένο από καρκινικά κύτταρα μελανώματος, σε υποτοξικές συγκεντρώσεις 9 και 27nM είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη μείωση της ικανότητας ενεργοποίησης και παραγωγής IFN-g, όπως φαίνεται από το σπικτόγραμμα του CD69 έναντι της IFN-g, οριοθετημένα στον CD8+ πληθυσμό.

2.2 Επίδραση στον αντι-MAGE3.A2 κλώνο

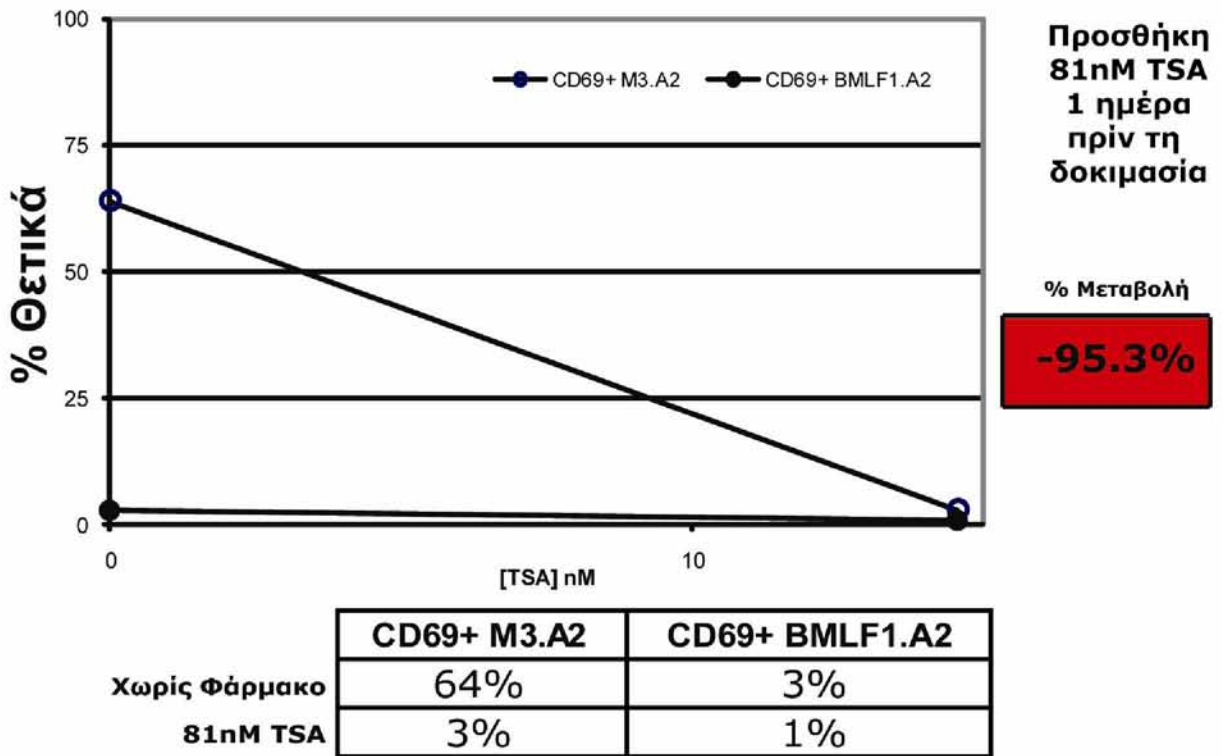
Η TSA φάνηκε ότι έχει δραματική επίδραση και στον αντιγονειδικό CD8+ T-κυτταρολυτικό κλώνο με ειδικότητα έναντι του πεπτιδίου FLWGPRALV του αντιγόνου MAGE3 που παρουσιάζεται από HLA.A2 και ο οποίος είχε απομονωθεί από ασθενή με μελάνωμα.

Ειδικότερα φάνηκε ότι οι υποτοξικές δόσεις του φάρμακου μειώνουν την ικανότητα του κλώνου να ενεργοποιηθεί μετά από ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έφεραν το ειδικό για τον κλώνο πεπτίδιο. Η μείωση αυτή έφτανε στο 95.3% όταν προσθέτονταν 80nM TSA 24 ώρες πριν την διέγερση, με τον κλώνο να μην είναι ικανός να ενεργοποιηθεί και να παράγει IFN-g. Το ποσοστό του CD69 (πολύ πρώιμος δείκτης ενεργοποίησης) βρέθηκε να μειώνεται από το 64% στο 3%.

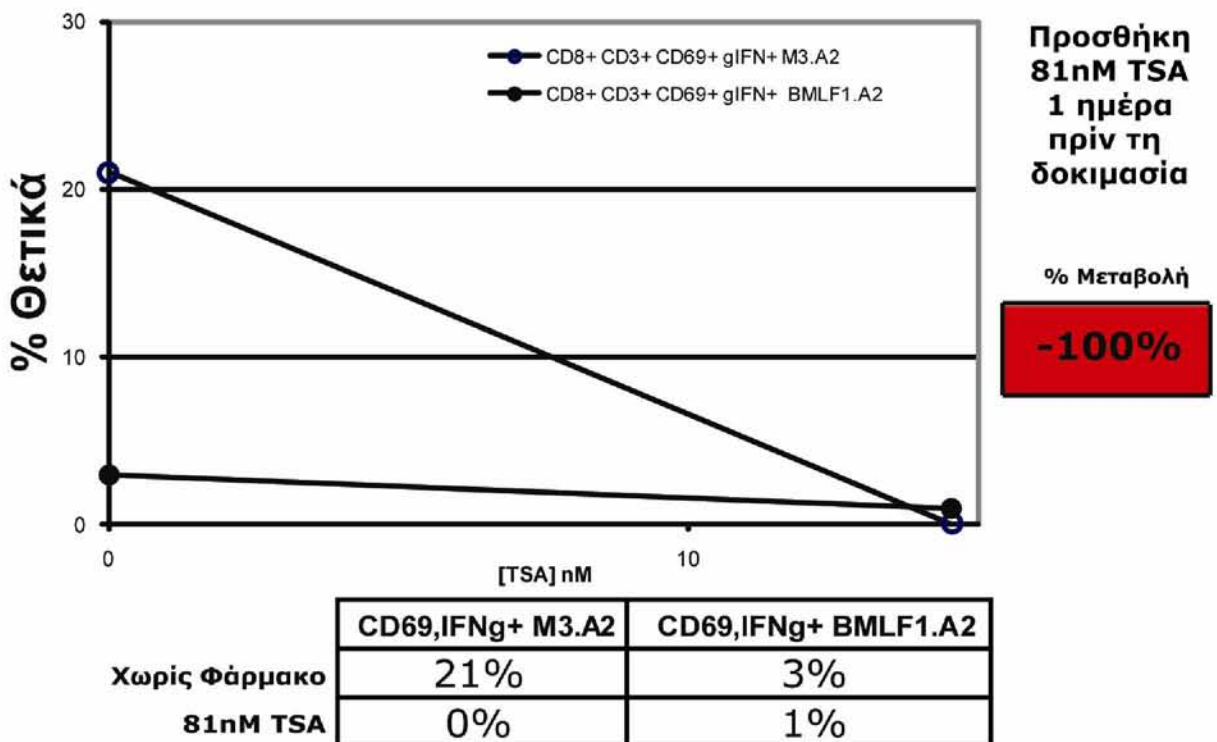
Αξιοσημείωτο είναι ότι η μεταβολή που παρατηρήθηκε, αποδείχθηκε ότι είναι δόσο-εξαρτώμενη για τις υποτοξικές συγκεντρώσεις της TSA. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι έπειτα από ειδική διέγερση, απουσία φαρμάκου, το ποσοστό του CD8+ CD69+ πληθυσμού ανερχόταν στο 58%, προσθήκη 9nM και 27nM TSA 24ώρες πριν τη διέγερση προκαλούσε μείωση του ποσοστού του CD8+ CD69+ πληθυσμού στο 24% και 9% αντίστοιχα. Το ποσοστό του CD8+ CD69+ IFN-g+ πληθυσμού μειωνόταν από 43% στο 18% και 5% μετά την επίδραση με 9nM και 27nM TSA αντίστοιχα.

Επίσης μεμονωμένα πειράματα έδειξαν ότι η προσθήκη της TSA 3, 2 και 1 ημέρα πριν τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας, μειώνει την κυτταρολυτική ικανότητα του κλώνου έως και 48.3%.

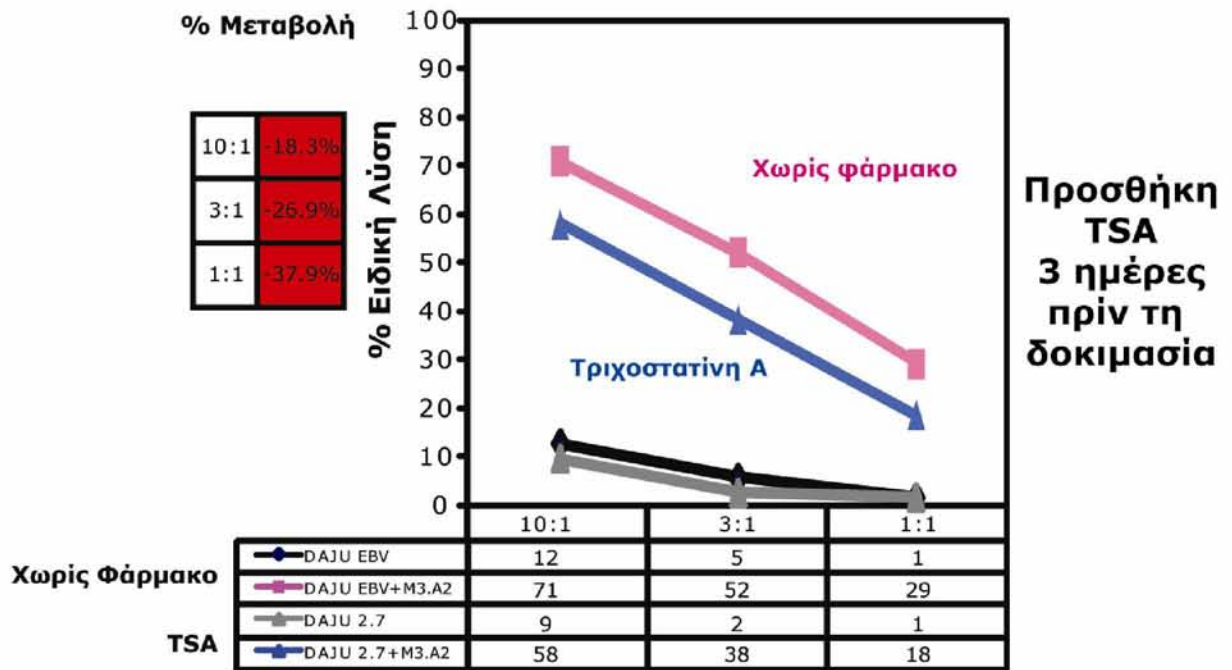
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αποκάλυψαν την επίδραση της TSA στον συγκεκριμένο κλώνο παρατίθενται στις εικόνες 58-64.



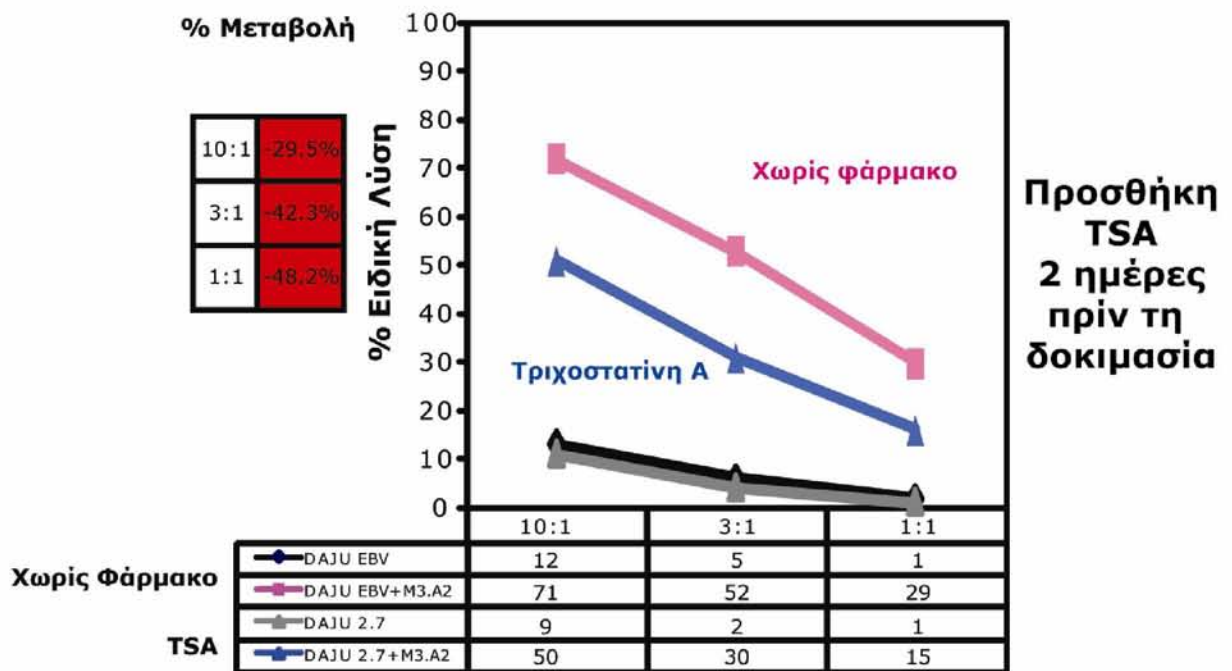
ΕΙΚΟΝΑ 58: Ικανότητα ενεργοποίησης του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική και μη ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.



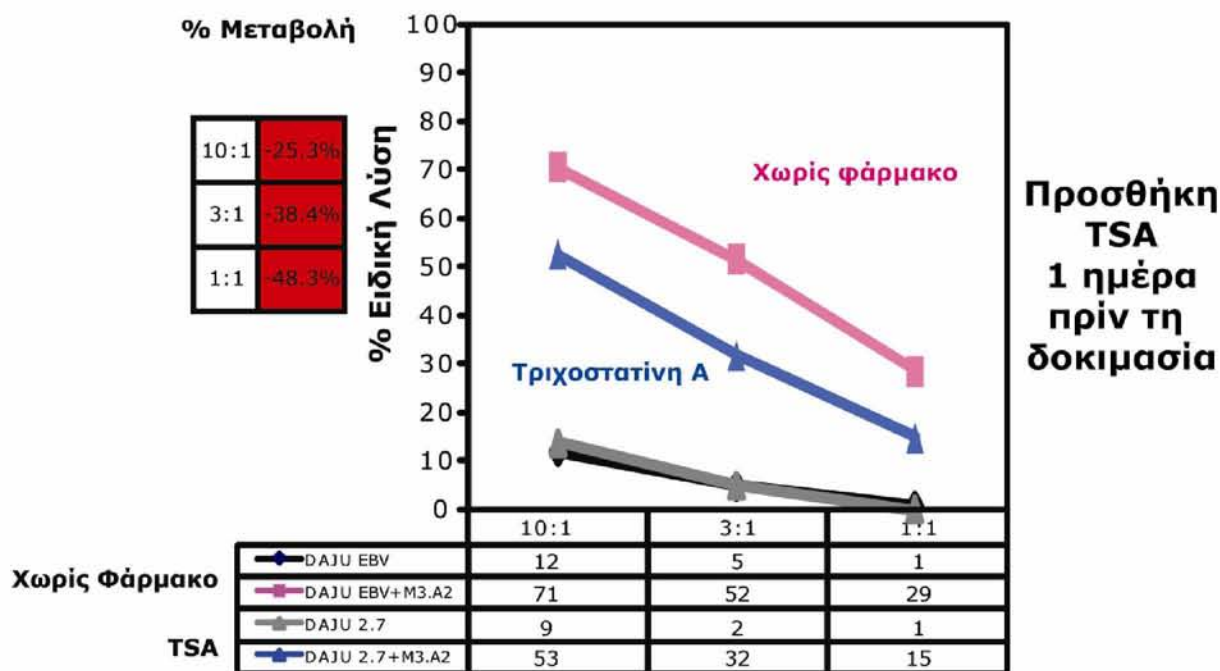
ΕΙΚΟΝΑ 59: Ικανότητα ενεργοποίησης και παραγωγής IFN-g του κλώνου μετά την προσθήκη TSA 24 ώρες πριν την ειδική και μη ειδική διέγερση με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.



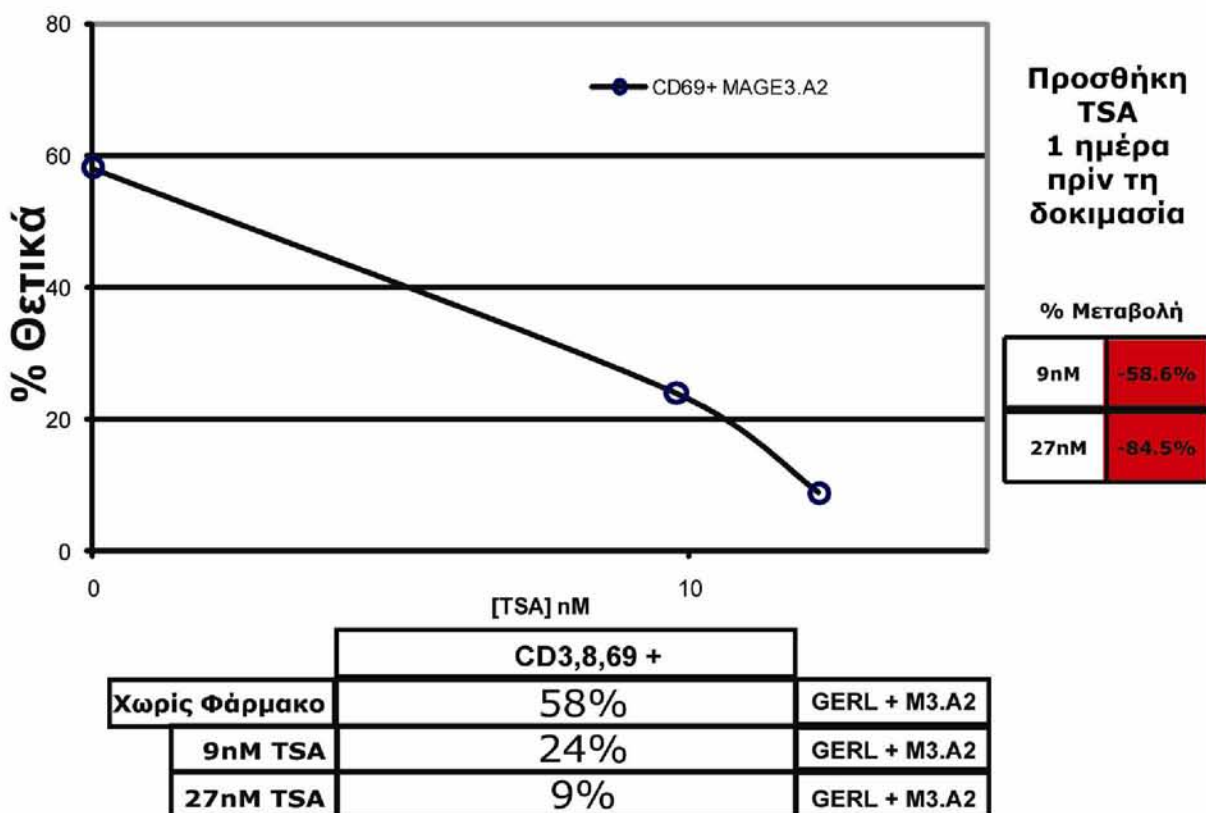
ΕΙΚΟΝΑ 60: Λυτική ικανότητα του κλώνου μετά από προσθήκη υποτοξικής δόσης TSA 3 ημέρες πριν τη δοκιμασία.



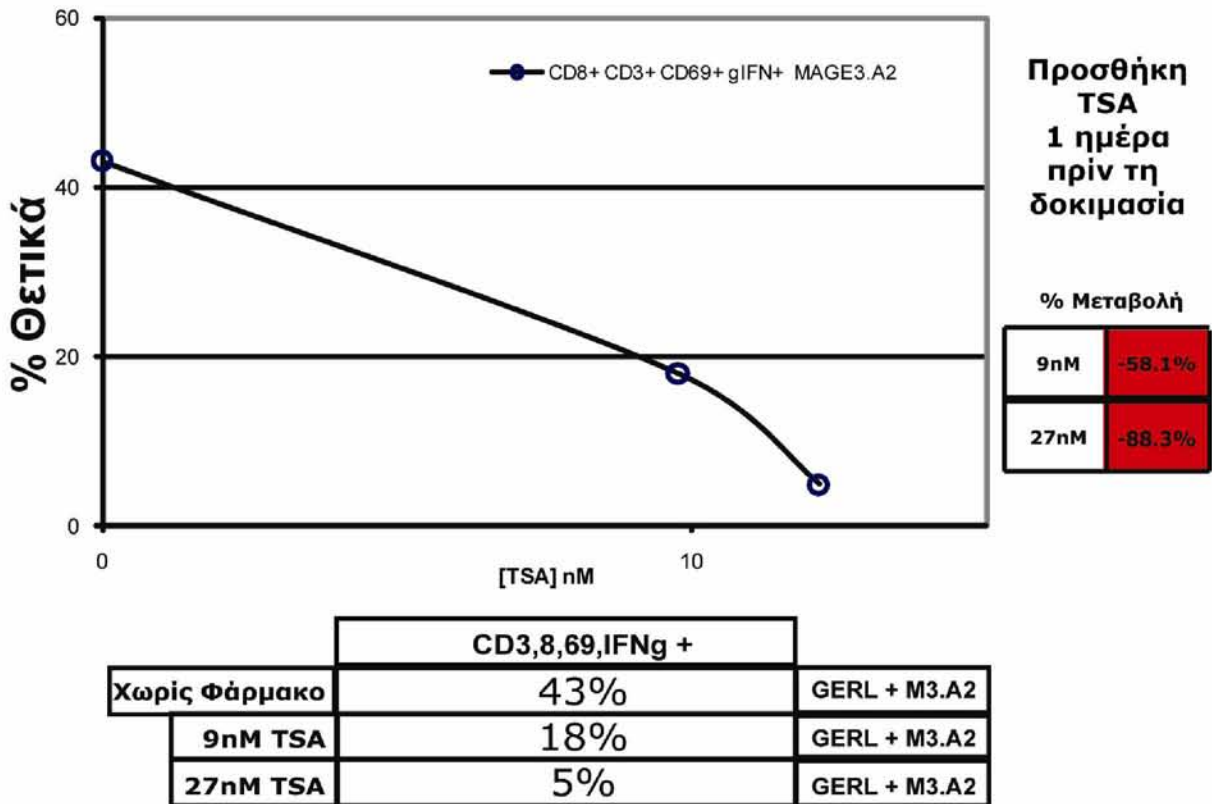
ΕΙΚΟΝΑ 61: Λυτική ικανότητα του κλώνου μετά από προσθήκη υποτοξικής δόσης TSA 2 ημέρες πριν τη δοκιμασία



ΕΙΚΟΝΑ 62: Λυτική ικανότητα του κλώνου μετά από προσθήκη υποτοξικής δόσης TSA 1 ημέρα πριν τη δοκιμασία.



ΕΙΚΟΝΑ 63: Προσθήκη της TSA 24 ώρες πριν την ειδική διέγερση με πεπτιδίο παρουσιασμένο από καρκινικά κύτταρα μελανώματος, σε υποτοξικές συγκεντρώσεις 9 και 27nM είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη μείωση της ικανότητας ενεργοποίησης.



ΕΙΚΟΝΑ 64: Προσθήκη της TSA 24 ώρες πριν την ειδική διέγερση με πεπτίδιο παρουσιασμένο από καρκινικά κύτταρα μελανώματος, σε υποτοξικές συγκεντρώσεις 9 και 27nM είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη μείωση της ικανότητας ενεργοποίησης και παραγωγής IFN-g.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση των επιγενετικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου, πάνω στους επιγενετικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων και κατ'επέκταση την ικανότητα του ανοσιακού συστήματος να καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα αποτελεί αντικείμενο θερμού ενδιαφέροντος. Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε με στόχο να μελετήσουμε την επίδραση επιγενετικών φαρμάκων σε πεπτιδο-ειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους, ειδικούς για καρκινικά αντιγόνα, απομονωμένους από ασθενείς με καρκίνο.

Για το σκοπό αυτό επιχειρήσαμε τη προτυποποίηση ενός πειραματικού μοντέλου με τη χρήση του οποίου θα μελετούσαμε την επίδραση των επιγενετικών φαρμάκων αποκλειστικά στους αντικαρκινικούς πεπτιδο-ειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους αποφεύγοντας την όποια επίδραση στα υπόλοιπα κύτταρα της μικτής καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε για την ειδική ενεργοποίηση. Στο σύστημα αυτό μελετήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι: κινητική κυτταρικού κύκλου, λυτική ικανότητα, δοκιμασία απόπτωσης, φαινοτυπική ανάλυση μορίων επιφανείας, ικανότητα παραγωγής IFN- γ έπειτα από ειδική ενεργοποίηση και μοριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης.

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήσαμε ήταν η 5-aza-CdR και η TSA. Η επιλογή αυτών των φαρμάκων έγινε για τους παρακάτω λόγους. Αρχικά, επιθυμούσαμε να χρησιμοποιήσουμε φάρμακα που επάγουν διαφορετικές επιγενετικές τροποποιήσεις. Η 5-aza-CdR είναι απομεθυλιωτικός ενώ η TSA είναι ακετυλιωτικός παράγοντας και αυτό επέτρεπε και τη διερεύνηση της συνεργικής τους δράσης. Επιπλέον, τα φάρμακα αυτά είναι τα πιο χαρακτηριστικά και από τα πιο μελετημένα φάρμακα των οικογενειών που ανήκουν και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα κλινικών μελετών. Τέλος, η 5-aza-CdR έχει πάρει έγκριση από τον FDA και τον EMA για την θεραπεία των MDS και της AML.

Η προτύπωση της μεθόδου που ακολουθήθηκε στη μελέτη μας, προκειμένου να συναχθούν το κατά το δυνατό πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, αντιμετώπισε μια σειρά προβλημάτων. Στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας αναφέρονται λεπτομερώς οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν και οι λύσεις που επιλέχθηκαν.

Τα δύο φάρμακα που χρησιμοποιήσαμε ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες επιγενετικών παραγόντων και ο διαφορετικός τρόπος δράσης των φαρμάκων δυσκολεύει την χρησιμοποίηση του ίδιου πειραματικού μοντέλου και για τα δύο. Από τη μία η TSA δρά άμεσα μέσω σύνδεσης στο καταλυτικό κέντρο των αποακετυλασών των ιστονών καταστέλλοντας τη δράση τους και προωθεί την ακετυλίωση. Από την άλλη η 5-aza-CdR είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο το οποίο πρέπει να ενσωματωθεί στο DNA του κυττάρου κατά την αντιγραφή για να επιφέρει τη δράση του. Έπειτα συνδέει σταθερά τις DNMTs με ομοιοπολικό δεσμό και κατά την κυτταρική διαίρεση προκαλείται μείωση των ελεύθερων για δράση DNMTs, προωθώντας εμμέσως την απομεθυλίωση. Αυτό σημαίνει ότι έπρεπε να εξασφαλίσουμε την ενσωμάτωση του φαρμάκου μέσω κυτταρικής διαίρεσης (ρυθμός

πολλαπλασιασμού 2x). Δημιουργήθηκε έτσι η ανάγκη για προτυποποίηση δύο πειραματικών μοντέλων ειδικά το καθένα για το κάθε φάρμακο.

Ένα άλλο πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε ήταν η επιλογή του συστήματος ενεργοποίησης των κλώνων. Μία επιλογή ήταν η χρησιμοποίηση μη ειδικής ενεργοποίησης με αντι-CD3 και αντι-CD28. Η επιλογή αυτή αποκλείστηκε γιατί αφενός είναι πολύ δυνατή ενεργοποίηση και αφετέρου δεν προσομοιάζει τις φυσιολογικές διαδικασίες ενεργοποίησης. Αποφασίσαμε να ενεργοποιήσουμε τους κλώνους μας χρησιμοποιώντας ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά, στα MHC των οποίων φορτώναμε τα ειδικά για τους κλώνους πεπτίδια, παρουσία IL-2, IL-4, IL-7 και MW. Έπρεπε επίσης να καθοριστεί πέρα από τη συγκέντρωση των φαρμάκων, ο χρόνος προσθήκης αυτών σε σχέση με τη στιγμή της ενεργοποίησης αλλά και η διάρκεια επώασης με το φάρμακο πριν τις λειτουργικές δοκιμασίες. Έγινε επίσης έλεγχος της σειράς με την οποία θα χρησιμοποιούταν τα φάρμακα για την περίπτωση ταυτόχρονης επώασης και με τα δύο. Η προτυποποίηση του πειραματικού μοντέλου διήρκησε πάνω από 12 μήνες.

Τέλος, ο αριθμός των κυττάρων που απαιτούνταν ήταν 30×10^6 κύτταρα, αριθμός τεράστιος για κλώνους. Οι κλώνοι θα έπρεπε ακόμη να έχουν αρκετή έκφραση TCR, όπως αυτή καθοριζόταν από την χρώση με τετραμερή. Η ταυτόχρονη ικανοποίηση όλων αυτών των προαπαιτούμενων ήταν δύσκολο να επιτευχθεί. Όσον αφορά την επώαση με 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη, στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η επίδραση του φαρμάκου σε δύο κλώνους. Οι δυο κλώνοι που χρησιμοποιήσαμε επιλέχθηκαν από μια πληθώρα πεπτιδο-ειδικών CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων της τράπεζας της Μονάδας Ανοσολογίας του καρκίνου του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, οι οποίοι είχαν απομονωθεί από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο. Συγκεκριμένα, αποψύχθηκαν και καλλιεργήθηκαν 26 κλώνοι οι οποίοι ελέγχθηκαν πλήρως για τα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Κάθε έλεγχος αποτελούταν από καλλιέργεια 14-21 ημερών και ταυτόχρονο χαρακτηρισμό. Από τους 26 κλώνους, μόνο 2 πληρούσαν τα επιθυμητά κριτήρια. Είναι προφανές ότι η συλλογή αποτελεσμάτων από ικανό αριθμό κλώνων που θα εξασφάλιζε τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων, είναι πολύ δύσκολη έως αδύνατη για τη συγκεκριμένη μελέτη.

5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη

Η 5-άζα-2'-δεοξυκυτιδίνη αποδείχθηκε ότι έχει συνολικά ανοσοδιαμορφωτική επίδραση πάνω στους, έναντι του καρκίνου, πεπτιδο-ειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους.

Το αξιοσημείωτο και σημαντικότερο αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε είναι η μείωση της λυτικής ικανότητας των αντικαρκινικών πεπτιδο-ειδικών CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων έναντι καρκινικών κυττάρων-στόχων που παρουσίαζαν το ειδικό για αυτούς

πεπτιδίο. Ακόμη πιο ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι η μειωμένη λυτική ικανότητα παραμένει ακόμη και μετά την απομάκρυνση του φαρμάκου. Συγκεκριμένα η επίδραση της 5-aza-CdR στον κλώνο με ειδικότητα για το ILA.A2 ήταν η μείωση της ειδικής λυτικής ικανότητας, σε σχέση με αμεταχείριστους κλώνους, κατά 25.7%, 42.6% και 64.7% για τις αναλογίες δραστικών κυττάρων/κύτταρα στόχους 3:1, 1:1 και 0.3:1 αντίστοιχα. Απομάκρυνση του φαρμάκου, καλλιέργεια και επανέλεγχος για τη λυτική ικανότητα έδειξε ότι η μείωση της λυτικής ικανότητας παραμένει και συγκεκριμένα ήταν 17.5%, 28.2% και 62.5 % για τις αναλογίες δραστικών κυττάρων/κύτταρα στόχους 3:1, 1:1 και 0.3:1 αντίστοιχα. Σε συμφωνία του προαναφερθέντος αποτελέσματος, η επίδραση της 5-aza-CdR στον κλώνο με ειδικότητα για το MAGE3.A2, ήταν η μείωση της ειδικής λυτικής ικανότητας κατά 28.2% και 28.8% για τις αναλογίες δραστικών κυττάρων/κύτταρα στόχους 10:1 και 3:1 αντίστοιχα. Η μείωση στη μεθυλίωση εξαιτίας του φαρμάκου δε φάνηκε να επιμένει έπειτα από την απομάκρυνση του φαρμάκου και την επανακαλλιέργεια για 6 ημέρες. Ειδικότερα, η μείωση στο ποσοστό μεθυλίωσης ανάμεσα στα κύτταρα στα οποία είχαμε επιδράσει με το φάρμακο και στα αμεταχείριστα κύτταρα ήταν μόνο 8%.

Η σημαντικότητα του συγκεκριμένου αποτελέσματος είναι προφανής. Πρώτον, δείχνουμε ότι επαγόμενες επιγενετικές αλλαγές μπορούν να έχουν μια τόσο σημαντική επίδραση σε αντικαρκινικούς πεπτιδοειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους και συγκεκριμένα μια μεγάλη μείωση της αντικαρκινικής λυτικής ικανότητας. Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι ο συγκεκριμένος επιγενετικός μηχανισμός μπορεί να εμπλέκεται και να εξηγεί εν μέρει την ικανότητα του καρκίνου να ανοσοδιαφεύγει διαμορφώνοντας το μικροπεριβάλλον του όγκου με τέτοιο τρόπο που να μειώνει την λυτική ικανότητα των λεμφοκυττάρων που τον διηθούν. Δεύτερον, πρέπει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο φάρμακο έχει την επίδραση που περιγράφουμε τη στιγμή που έχει πάρει έγκριση από τον FDA και από τον EMA και χορηγείται σε ασθενείς με AML. Στους ασθενείς με AML υπάρχει ανεπαρκής αντι-AML ανοσιακή απάντηση η οποία χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική έκφραση και ενεργοποίηση μορίων που αποτελούν σημεία ελέγχου του ανοσιακού (immune checkpoint molecules), όπως το CTL-4 και το PD1/PD-L1 [152,153,159]. Χαρακτηριστική είναι και η απορύθμιση της έκφρασης της υπεροικογένειας του TNF και των υποδοχέων του [165]. Τα αποτελέσματά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η χρήση του συγκεκριμένου φαρμάκου σε ασθενείς με AML, πέρα από ευργετικές δράσεις οι οποίες σχετίζονται κυρίως με την αύξηση της αντιγονικότητας έχει και επιβαρυντικό ρόλο στην αντι-AML ανοσιακή απάντηση. Ειδικότερα, η παρατηρούμενη επίδραση πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη σε προσπάθειες επίκτητης μεταφοράς ex-vivo ή in-vitro παραγόμενων δραστικών αντι-AML CTL τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε κλινικές μελέτες, όταν αυτές συνδυάζονται με ταυτόχρονη χορήγηση του φαρμάκου.

Η CD8+ CTL μεσολαβούμενη λύση επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο κύριων μηχανισμών: το σύστημα περφορίνης-κοκκιενζύμων και τη σύνδεση FAS-FASL. Η σύνδεση

του FASL στο FAS οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των κασπασών και επάγει την απόπτωση. Το FAS εκφράζεται παντού ενώ το FASL έχει πολύ περιορισμένη έκφραση και αυτή είναι στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα όπου το σύστημα FAS/FASL είναι ο μεσολαβητής του κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από ενεργοποίηση (AICD), μιας διαδικασίας που καταστρέφει τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα που δεν χρειάζονται έπειτα από μια ανοσιακή απάντηση. Αυτή η λειτουργία σχετίζεται και με τους ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς στους οποίους υπάρχει σταθερή έκφραση του FASL ώστε να επιτευχθεί η καταστροφή των T-κυττάρων που εκφράζουν FAS και εισέρχονται στον ιστό. Με έναν παρόμοιο τρόπο, ο καρκίνος χρησιμοποιεί το ίδιο σύστημα για να διαφύγει της ανοσοεπιτήρησης, αυξάνοντας την έκφραση του FASL και επάγοντας απόπτωση στα CTL που διηθούν τον όγκο. Παρόλα αυτά, η έκφραση FASL από τα καρκινικά κύτταρα, συχνά απαιτεί και την προστασία τους από FAS-διαμεσολαβούμενο θάνατο [166].

Η 5-aza-CdR φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά και το σύστημα FAS/FASL. Ειδικότερα, στον κλώνο με ειδικότητα για το ILA.A2, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση του FAS. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση κατά 5.3x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου *FAS* αλλά και αύξηση της επιφανειακής πρωτεϊνικής έκφρασης FAS κατά 47%. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταβολή αυτή δε φάνηκε να επιμένει, καθώς απομάκρυνση του φαρμάκου, ενεργοποίηση και επανακαλλιέργεια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του FAS μόνο κατά 9.3% στους κλώνους στους οποίους είχαμε επιδράσει με το φάρμακο σε σχέση με τους κλώνους στους οποίους δεν είχαμε επιδράσει με το φάρμακο. Είναι επίσης γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ο υποκινητής του FAS είναι υπο επιγενετικό έλεγχο [167] και η απομεθυλίωση που προκαλείται από το φάρμακο εξηγεί την αύξηση της έκφρασής του. Η αύξηση του FAS από τους κλώνους εξαιτίας της φαρμακευτικής επίδρασης υποδηλώνει μια κατάσταση όπου είναι πιο επιδεκτικοί σε FASL μεσολαβούμενο θάνατο. Ο θάνατος αυτός θα μπορούσε να προέλθει από AICD, όπου τα CTL στρέφονται το ένα έναντι του άλλου αλλά θα μπορούσε να επαχθεί και από καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν FASL. Συνοψίζοντας για το FAS, μπορούμε να πούμε ότι το φάρμακο επάγει έναν φαινότυπο στον κλώνο ο οποίος ευνοεί την ανοσοδιαφυγή του καρκίνου και εμποδίζει τα CTL να επιβιώσουν, να αναγνωρίσουν και να λύσουν τα καρκινικά κύτταρα στόχους.

Ακόμη, η 5-aza-CdR φάνηκε να επιδρά και στην έκφραση του FASL. Συγκεκριμένα, στον κλώνο με ειδικότητα για το ILA.A2 παρατηρήθηκε μια αύξηση 3.9x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου *FASL*, ενώ στον κλώνο με ειδικότητα για το M3.A2, παρατηρήθηκε μια αύξηση 2.2x. Η αύξηση του FASL ενισχύει την ικανότητά των κλώνων να λύουν τα καρκινικά κύτταρα στόχους, χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί όμως και ο θάνατος των ίδιων των CTL. Τα κύτταρα στόχοι θα μπορούσαν να είναι τα καρκινικά κύτταρα που έχουν διατηρήσει την έκφραση του FAS αλλά θα μπορούσαν να είναι και τα ίδια τα CTL που όπως φάνηκε παραπάνω υπερεκφράζουν FAS και είναι πιο επιδεκτικά σε AICD. Η μελέτη των μεταγραφικών παραγόντων c-Myc και NFAT αλλά και της σύνδεσης

των IRF1, IRF2 στον υποκινητή θα μπορούσε να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η αύξηση της έκφρασης του FASL αλλά και τις πιθανές επιδράσεις αυτής στα ίδια τα CTL. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι τα γονίδια *FAS* και *FASL* θεωρούνται παραδοσιακά ως ογκοκατασταλτικά.

Η IFN-g έχει αντικαρκινικές δράσεις και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση αυξάνοντας την αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων, προωθώντας τα λεμφοκύτταρα προς πολλαπλασιασμό και επάγοντας έναν αντι-αποπτωτικό φαινότυπο. Υπάρχει όμως και μια άλλη πλευρά στη δράση της IFN-g. Συγκεκριμένα φαίνεται να προωθεί την ανάπτυξη των Tregs και να έχει υπέρ-αποπτωτική δράση πάνω στα λεμφοκύτταρα ανάλογα με τους υποδοχείς που αυτά εκφράζουν. Χαρακτηριστική είναι η παρατήρηση, ότι αυξημένη έκφραση IFN-g εντός του όγκου, σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II αλλά και με ένα πιο επιθετικό φαινότυπο στο μελάνωμα [168]. Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά και στο γενικό μέρος, ο επιγενετικός έλεγχος της έκφρασης της IFN-g είναι καλά μελετημένος και η επίδραση του φαρμάκου στο μόριο αυτό ήταν αναμενόμενη.

Ειδικότερα, για τον κλώνο με ειδικότητα για το MAGE3.A2, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 8x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου *IFNG* αλλά και αύξηση της ενδοκυττάριας πρωτεϊνικής έκφρασης κατά 50%. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με την υπόθεση για επαγόμενη αμφομεθυλίωση του υποκινητή της *IFNG* λόγω του φαρμάκου αλλά η επίδραση που μπορεί να έχει αυτή η υπερέκφραση από τα CTL δεν μπορεί να ερμηνευθεί μονοδιάστατα. Όσον αφορά την παρακρινή δράση της εκκρινόμενης IFN-g μπορούμε να υποθέσουμε με ασφάλεια ότι η 5-aza-CdR αυξάνει και εμμέσως την αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων στόχων των CTL μέσω υπερέκφρασης από αυτά IFN-g. Αλλά όσον αφορά την αυτοκρινή της δράση δεν μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι προσδίδει στα CTL έναν φαινότυπο ανθεκτικό σε απόπτωση και ότι τα προωθεί προς πολλαπλασιασμό ή εάν τα κάνει περισσότερο επιδεκτικά σε απόπτωση. Η μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT θα μπορούσε να μας δώσει περισσότερες πληροφορίες για τη δράση της IFN-g στους μεταχειρισμένους με φάρμακο κλώνους και να μας βοηθήσει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι ο έλεγχος για απόπτωση σε κύτταρα στα οποία είχαμε επιδράσει με το φάρμακο, έδειξε ότι λιγότερο από το 4% των CTL βρισκόταν σε φάση πρώιμης απόπτωσης.

Ο TNF μπορεί να έχει διαφορετικές δράσεις ανάλογα με τον υποδοχέα στον οποίο συνδέεται, όπως απόπτωση, νέκρωση, διαφοροποίηση, ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων και μετανάστευση. Ο TNF έχει ανοσοδιεγερτική δράση και συνεισφέρει στην καταστροφή του όγκου από το ανοσιακό σύστημα. Όμως στα τελικά στάδια της καρκινογένεσης, ο TNF χρησιμοποιείται και από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα και τα βοηθά στη μετανάστευση, στην αγγειογένεση αλλά και τα βοηθά να διαφεύγουν την επαγόμενη απόπτωση [169]. Η έκφραση του TNF ελέγχεται και αυτή επιγενετικά και στον έλεγχο αυτό παίζουν ρόλο,

τόσο η ακετυλίωση των ιστονών όσο και η μεθυλίωση του DNA και αναμέναμε κάποια αλλαγή στην έκφραση του μορίου έπειτα από επίδραση με φάρμακο [170].

Συγκεκριμένα, για τον κλώνο με ειδικότητα για το *MAGE3.A2*, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 6.1x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου *TNF*, ενώ στον κλώνο με ειδικότητα για το *ILA.A2* παρατηρήθηκε αύξηση κατά 1.8x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου *TNF*, η οποία και δεν αξιολογήθηκε ως σημαντική. Σε καρκινικά κύτταρα στο αρχικό στάδιο της καρκινογένεσης, η επαγόμενη από την 5-aza-CdR παρατηρούμενη αύξηση έκφρασης *TNF* από τα CTL μπορεί να έχει μια κατασταλτική δράση έναντι του όγκου επάγοντας την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα, έπειτα από σύνδεση στον *TNFR1* υποδοχέα. Στα τελικά στάδια όμως, η σύνδεση με τον *TNFR2* οδηγεί τελικά σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα *NF-κB* και σε παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της κασπάσης 8, με αποτέλεσμα την αναστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του *TNFR1*, αποφυγή της απόπτωσης και τελικά ανοσοδιαφυγή. Έτσι δεν μπορούμε να υποθέσουμε με ασφάλεια το πιθανό αποτέλεσμα της παρατηρούμενης επίδρασης. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι συνολικά ο *TNF* θεωρείται ότι έχει κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Ο μεταγραφικός παράγοντας *FOXP3* θεωρείται ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας των Tregs. Φαίνεται ότι εκφράζεται όμως και από καρκινικά κύτταρα. Το 2008, ο Καρανίκας και συν., εξέτασαν τα επίπεδα mRNA καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του *FOXP3* σε 25 διαφορετικές καρκινικές σειρές και έδειξαν ότι η έκφραση του *FOXP3* δεν είναι περιορισμένη σε συγκεκριμένο τύπο καρκίνου αλλά χαρακτηρίζει πολλούς τύπους καρκίνου [171]. Η έκφραση του *FOXP3* ελέγχεται επιγενετικά και ταυτόχρονα πρέπει να σημειωθεί ότι έχει παρατηρηθεί σταθεροποίηση της έκφρασης του σε επαγόμενα από *TGF-β CD4+* Tregs, έπειτα από επίδραση με 5-αζακυτιδίνη [172]. Στον κλώνο έναντι του *MAGE* παρατηρήθηκε αύξηση κατά 15.2x στα mRNA μετάγραφα του γονιδίου *FOXP3*, ενώ στον ειδικό κλώνο έναντι της *hTERT* παρατηρήθηκε αύξηση κατά 8x, έπειτα από έκθεση σε φάρμακο. Η αύξηση της έκφρασης του *FOXP3* στα *CD8+* CTL έχει μεγάλη σημασία. Μπορεί να σημαίνει την επαγωγή ενός φαινοτύπου που προσομοιάζει αυτόν που έχουν τα *CD8+* T-ρυθμιστικά κύτταρα και συμβαδίζει με τη χαμηλή έκφραση *CD122*, την έλλειψη *CD28* και τη σταθερή υψηλή έκφραση *CD25* που παρατηρήσαμε. Πρέπει να τονιστεί ότι ο *FOXP3* δεν εκφράζεται σε όλα τα *CD8+* κατασταλτικά κύτταρα αλλά τελευταίες μελέτες φαίνεται να δείχνουν ότι η έκφρασή του από τα πρώτα είναι καλή ένδειξη για μια σταθερή κατασταλτική δράση. In vitro, φαίνεται να καταστέλουν τον πολλαπλασιασμό των δραστικών T-κυττάρων στον ίδιο ή και σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα *CD4+* Tregs. Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, ένας τέτοιος φαινότυπος μπορεί ακόμη και in vivo, σε καρκίνο του παχέος εντέρου και του προστάτη, να έχει πολύ ικανές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και να συνεισφέρει στην ανοσοδιαφυγή και στην εξέλιξη της νόσου [173,174].

Τριχοστατίνη Α

Ο άμεσος τρόπος δράσης της TSA μας επέτρεψε να προτυποποιήσουμε ένα σχετικά απλό σύστημα καλλιέργειας για το φάρμακο αυτό. Παρατηρήσαμε ότι η TSA δεν είχε καμία επίδραση στην ικανότητα ενεργοποίησης των CTL κλώνων όταν αυτή προστεθόταν τη στιγμή της ειδικής ενεργοποίησης ή έπειτα από αυτή. Επώαση όμως των κλώνων σε ήρεμη κατάσταση (χαμηλή δόση IL-2) με υποτοξικές δόσεις TSA για 24 ώρες και μέτεπειτα σύντομη ενεργοποίηση για έλεγχο ενεργοποίησης και έκκρισης ιντερφερόνης έδειξε μία δραματική μείωση (έως 95%) στην ικανότητα για ενεργοποίηση, όπως αυτή προσδιορίστηκε από την έκφραση του πολύ πρώιμου δείκτη ενεργοποίησης CD69.

Για τον CD8+ T-κυτταρολυτικό κλώνο με ειδικότητα για το MAGE3.A1, φάνηκε ότι οι υποτοξικές δόσεις TSA μειώνουν την ικανότητα του κλώνου να ενεργοποιηθεί μετά από ειδική διέγερση. Η μείωση αυτή έφτανε στο 95% όταν προσθέτονταν 81nM TSA 24 ώρες πριν τη διέγερση, με τον κλώνο να μην είναι ικανός να ενεργοποιηθεί και να παράγει IFN-g. Το ποσοστό του CD69 βρέθηκε να μειώνεται από το 82% στο 4%. Επανάληψη της διαδικασίας έπειτα από 2 εβδομάδες έδειξε ότι η μεταβολή που παρατηρήθηκε επαναλαμβάνεται. Αξιοσημείωτο είναι ότι η μεταβολή που παρατηρήθηκε ήταν δόσοεξαρτώμενη για τις υποτοξικές συγκεντρώσεις της TSA. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι έπειτα από ειδική διέγερση, απουσία φαρμάκου, το ποσοστό του CD8+ CD69+ πληθυσμού ανερχόταν στο 53.8%. Προσθήκη 9nM και 27nM TSA 24 ώρες πριν τη διέγερση προκαλούσε μείωση του ποσοστού του CD8+ CD69+ πληθυσμού στο 9.1% και 1.2% αντίστοιχα. Το ποσοστό του CD8+ CD69+ IFN-g+ πληθυσμού μειωνόταν από 33.8% στο 5.9% και 0.8% μετά την επίδραση με 9nM και 27nM TSA αντίστοιχα.

Για τον αντιγονειδικό CD8 T-κυτταρολυτικό με ειδικότητα για το MAGE3.A2 φάνηκε ότι οι υποτοξικές δόσεις TSA μειώνουν επίσης την ικανότητα του κλώνου να ενεργοποιηθεί μετά από ειδική διέγερση. Η μείωση αυτή έφτανε στο 95.3% όταν προσθέτονταν 80nM TSA 24 ώρες πριν τη διέγερση, με τον κλώνο να μην είναι ικανός να ενεργοποιηθεί και να παράγει IFN-g. Το ποσοστό του CD69 βρέθηκε να μειώνεται από το 64% στο 3%. Η μεταβολή που παρατηρήθηκε, αποδείχθηκε ότι είναι επίσης δόσο-εξαρτώμενη. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι έπειτα από ειδική διέγερση, απουσία φαρμάκου, το ποσοστό του CD8+ CD69+ πληθυσμού ανερχόταν στο 58%, προσθήκη 9nM και 27nM TSA 24ώρες πριν τη διέγερση προκαλούσε μείωση του ποσοστού του CD8+ CD69+ πληθυσμού στο 24% και 9% αντίστοιχα. Το ποσοστό του CD8+ CD69+ IFN-g+ πληθυσμού μειωνόταν από 43% στο 18% και 5% μετά την επίδραση με 9nM και 27nM TSA αντίστοιχα.

Επίσης μεμονωμένα πειράματα έδειξαν ότι η προσθήκη της τριχοστατίνης 3, 2 και 1 ημέρες πριν τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας, μειώνει την κυτταρολυτική ικανότητα του κλώνου έως και 48.3%.

Αποδείξαμε έτσι ότι επιγενετικές αλλαγές και με τη μορφή της ακετυλίωσης των ιστονών μπορούν να επηρεάσουν το επιγένωμα των πεπτιδο-ειδικών CD8+ T-κυτταρολυτικών κλώνων, κύτταρα που είναι μέρος της ειδικής ανοσιακής απάντησης έναντι του καρκίνου. Έπειτα από έκθεση σε TSA, η επαγόμενη αλλαγή που παρατηρήσαμε είναι μια δραματική και δόσο-εξαρτώμενη μείωση της ικανότητας για ενεργοποίηση και έκκριση IFN- γ μετά από ειδικό αντιγονικό ερέθισμα. Τέλος πολύ σημαντική ήταν και η παρατήρηση για μειωμένη λυτική ικανότητα των CTL κλώνων έπειτα από έκθεση σε φάρμακο. Είναι προφανές ότι οι επιγενετικές αλλαγές που μπορούν να προκληθούν στο επιγένωμα των κλώνων τους προσδίδει ένα φαινότυπο με ανικανότητα ειδικής ενεργοποίησης, ανίκανο να λύει τα καρκινικά κύτταρα στόχους και ανίκανο να παράγει μια σημαντική κυτταροκίνη για την T-μεσολαβούμενη αντικαρκινική απάντηση. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά στοιχεία που φέρουν την TSA να ενισχύει τη γονιδιακή μεταγραφή που οδηγείται από τον NF- κ B. Επίσης φαίνεται ότι η ακετυλίωση των ιστονών, ειδικά η υπερακετυλίωση της H3K9, σχετίζεται με τη διαφορική γονιδιακή έκφραση που παρατηρείται στους CD8+ T-κυτταρικούς πληθυσμούς ανάλογα με τη μνημονική κατάσταση [175]. Ο έλεγχος των μονοπατιών που ελέγχονται από τον NF- κ B αλλά και των προαναφερθέντων ιστονικών τροποποιήσεων θα μπορούσαν να εξηγήσουν τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η παρατηρούμενη επίδραση.

Συνοψίζοντας, είναι η πρώτη φορά στη βιβλιογραφία που αποδεικνύεται η ανοσοδιαμορφωτική δράση της 5-aza-CdR σε πεπτιδο-ειδικούς CD8 T-κλώνους. Από τη μία, η 5-aza-CdR βρέθηκε να μειώνει σε σημαντικό βαθμό την λυτική ικανότητα των αντικαρκινικών πεπτιδο-ειδικών CD8+ T κλώνων ασθενών με καρκίνο, ενώ την ίδια στιγμή βρέθηκε να αυξάνει την επιφανειακή έκφραση του FAS, κάνοντάς τους πιο επιδεκτικούς σε κυτταρικό θάνατο εξαρτώμενο από τη σύνδεση FAS-FASL. Το τελευταίο είναι σε συμφωνία με την παράλληλη αυξημένη έκφραση FOXP3, PDL-1 και PDL-2 και τα παραπάνω χαρακτηριστικά δημιουργούν έναν τροποποιημένο ανοσοφαινότυπο των κλώνων που υποδηλώνει μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης των στόχων έπειτα από έκθεση στο φάρμακο.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι δευτερογενή δεδομένα μιας προηγούμενης μελέτης [176] παρουσιάζουν ευρήματα που έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία όσον αφορά την άυξηση της αντιγονικότητας των κυττάρων στόχων (καρκινικές κυτταρικές σειρές) έπειτα από επίδραση με 5-aza-CdR και επίσης έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη ικανότητα λύσης των κυττάρων στόχων απο χαμηλής συνάφειας αντιγονοειδικούς κλώνους έναντι του αντιγόνου PRAME. Σε δευτερογενή πειράματα προσπάθησαν να ελέγξουν και τη λυτική ικανότητα μετά από επίδραση με φάρμακο στους δραστικούς κλώνους και στα κύτταρα στόχους. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι: «5-aza-2-deoxycytidine increases antigen-specific killing activity of CTL clones independent of its

effects on target cells». Πρέπει να αναφερθεί ότι το σύστημα καλλιέργειας ήταν διαφορετικό από αυτό που χρησιμοποιήσαμε και συγκεκριμένα η ενεργοποίηση ήταν μη ειδική (χωρίς αντιγονοπαρουσίαση) με τη χρήση άντι-CD3 και άντι-CD28, η συγκέντρωση του φαρμάκου ήταν 15 φορές υψηλότερη και ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τα κύτταρα στόχους (καρκινικά) και τέλος ο σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του φαρμάκου στην αντιγονικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών και στην ικανότητα λύσης αυτών από αντιγονοειδικούς κλώνους έναντι του PRAME.

Το ενδιαφέρον στους στόχους των φαρμάκων φαίνεται να αλλάζει από τους αυξητικούς παράγοντες και τα μόρια ενδοκυττάριας σηματοδότησης (ειδικά τις κινάσες) προς τη χρωματίνη, αλλαγές της οποίας είναι στον άναρ του μονοπατιών σηματοδότησης. Η στόχευση στη χρωματίνη δεν έχει μέχρι και πρόσφατα μεγάλη ακρίβεια και αυτό εξηγεί τα πλειοτροπικά αποτελέσματα της χρωματινικής τροποποίησης. Είναι όμως θετικό το γεγονός ότι δε χρειάζεται πρότερη γνώση των υπάρχοντων μεταλλάξεων ώστε να είναι αποτελεσματική. Τα επιγενετικά φάρμακα που στοχεύουν τις αντιστρέψιμες επιγενετικές αλλαγές φαίνεται ότι θα έχουν τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία [177]. Έτσι, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν ένα πιθανό τρόπο με τον οποίο θα μπορούσαν να σχεδιαστούν συνδυαστικές θεραπείες αλλά και να ελεγχθούν οι επιδράσεις τους στη CD8+ CTL μεσολαβούμενη αντικαρκινική ανοσιακή απάντηση.

Παιρετέρω μελέτες οι οποίες και θα συνέκριναν τις επιγενετικές τροποποιήσεις αλλά και την επίδραση του φαρμάκου ανάμεσα σε περιφερικά και διηθούντα τον όγκο κύτταρα CTL, θα μπορούσαν να αποδώσουν οποιεσδήποτε διαφορές στην ικανότητα του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος να «επάγει» επιγενετικές μεταβολές στα TIL και θα βοηθούσαν στην αποσαφήνιση των διαδικασιών της ανοσοδιαμόρφωσης από τον καρκίνο.

Τέλος, η μελέτη μας παρέχει ένα πειραματικό μοντέλο το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθούν οι επιγενετικές επιδράσεις και άλλων φαρμάκων σε πεπτιδο-ειδικούς CTL κλώνους ή κυτταρικές σειρές ανεξαρτήτως του τύπου του αντιγόνου. Το συγκεκριμένο μοντέλο παρέχει την ικανότητα ελέγχου ταυτόχρονης μελέτης πολλαπλών φαινοτυπικών λειτουργιών καθώς και γενετικών αλλαγών τόσο στο ολικό γονιδίωμα όσο και στην έκφραση μεμονωμένων γονιδίων.

Όλα τα παραπάνω συγκλίνουν στο ότι οι αλλαγές που συντελούνται στα CTL από τα επιγενετικά φάρμακα είναι πολυδιάστατες και είναι δύσκολο να προτείνει κανείς οριστικά συμπεράσματα. Εντούτοις, φαίνεται ότι όλες οι επιδράσεις που παρατηρήσαμε και ειδικά η μείωση της λυτικής ικανότητας οδηγούν σε ένα ανοσοδιαμορφωμένο φαινότυπο ανίκανο να λύσει τα καρκινικά κύτταρα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης των επιγενετικών φαρμάκων σε πεπτιδο-ειδικούς CD8+ T-κυτταρολυτικούς κλώνους, ειδικούς για καρκινικά αντιγόνα, απομονωμένους από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και μελάνωμα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 3 πεπτιδο-ειδικοί CD8+ CTL κλώνοι με ειδικότητα έναντι πεπτιδίων της hTERT και του MAGE οι οποίοι απομονώθηκαν από ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μελάνωμα αντίστοιχα. Ως αντιγονοπαρουσιαστικά και κύτταρα τροφοί χρησιμοποιήθηκαν 4 καρκινικές σειρές, B-κύτταρα μετασχηματισμένα με EBV και PBMC. Τα επιγενετικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η 5-aza-CdR και η TSA. Αναλύθηκε η επίδραση των φαρμάκων στη λυτική ικανότητα των CTL με τη δοκιμασία απελευθέρωσης ⁵¹Cr, στον κυτταρικό κύκλο με έλεγχο ενσωμάτωσης BrdU/7-AAD, στην ικανότητα για απόπτωση με Annexin/7-AAD, στην επιφανειακή και ενδοκυττάρια έκφραση πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής και στη γονιδιακή έκφραση με ποσοτική RT-Real Time PCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Τα επιγενετικά φάρμακα έχουν ανοσοδιαμορφωτική επίδραση στα αντικαρκινικά πεπτιδο-ειδικά CTL. Διαπιστώθηκε ότι η 5-aza-CdR μειώνει κατά 47% το ποσοστό της ολικής μεθυλίωσης του γενωμικού DNA και ότι οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο. Παρατηρήθηκε αύξηση κατά 47% στην επιφανειακή έκφραση FAS, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση των CD8, CD25, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD69, CD122, CD127 και CD178. Βρέθηκε σημαντική μείωση της κυτταρολυτικής ικανότητας (έως και 70%). Η μοριακή ανάλυση για τους κλώνους έναντι της hTERT και του MAGE αποκάλυψε ότι η 5-aza-CdR προκαλεί αύξηση της έκφρασης των: FOXP3 κατά 8x και 15.2x, του FASL κατά 3.9x και 2.2x, του FAS κατά 5.3x και 1.8x, του TNF κατά 1.8x και 6.1x, του PD-L1 κατά 4.2x και 4.1x και του PD-L2 κατά 4.3x και 4.7x αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για τα μόρια: PERFORIN, GRANZYMEB, IFNG, IL1b, IL10, TNFSF10, TGFb1, TGFb3, TGFbR1, PD-1, SMAD2, SMAD3, SMAD4 και SMAD7. Η TSA φάνηκε να μειώνει δραματικά την ικανότητα ενεργοποίησης των κλώνων (έως και 95.3%) με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο αλλά και την ικανότητα λύσης των κυττάρων στόχων (έως και 48.3%).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Οι αλλαγές που συντελούνται στα πεπτιδο-ειδικά έναντι του καρκίνου CTL από τα επιγενετικά φάρμακα είναι πολυδιάστατες και είναι δύσκολο να προτείνει κανείς οριστικά συμπεράσματα. Εντούτοις, φαίνεται ότι οι ανοσοδιαμορφωτικές επιδράσεις που παρατηρήσαμε και ειδικά η μείωση της ειδικής λυτικής ικανότητας των CTL οδηγούν σε ένα φαινότυπο με μειωμένη ικανότητα να λύει τα καρκινικά κύτταρα στόχους.

ABSTRACT

OBJECTIVE: This study aimed to investigate the effects of epigenetic drugs on antitumor peptide-specific CD8⁺ CTL clones isolated from patients with NSCLC and melanoma.

MATERIALS AND METHODS: Three peptide-specific CD8⁺ CTL clones against hTERT and MAGE, isolated from patients with NSCLC and melanoma respectively were enrolled in this study. Four cancer cell lines, EBV transformed B cells and PBMCs were used as antigen presenting and feeder cells. The CTL clones were cultured in the presence of 5-aza-CdR and TSA and the alterations in the phenotypic, lytic, functional characteristics as well as in gene expression were investigated. Lytic capability was determined by standard chromium release assay and cell cycle kinetics was analysed using BrdU uptake. Apoptosis assay was performed using Annexin/7-AAD and the extracellular and intracellular protein expression was determined using flow cytometry. Gene expression was performed using quantitative RT-Real Time PCR.

RESULTS: The epigenetic drugs had an immunomodulatory effect on antitumor peptide-specific CTL. It was confirmed that 5-aza-CdR decreased the global DNA methylation level of CTL by 47% and that the subtoxic concentrations did not affect the cell cycle. FAS cell surface expression was found to be increased by 47% whereas no significant change was observed in the expression of CD8, CD25, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD69, CD122, CD127 and CD178. CTL clones cultured in the presence of 5-aza-CdR exhibit a significant decrease in their cytolytic capabilities (up to 70%) that is maintained after drug removal and a subsequent cycle of stimulation and culture (up to 90%). The molecular analysis of the clones against hTERT and MAGE determined that 5-aza-CdR increased gene expression with a fold change of 8 and 15.2 for FOXP3, 3.9 and 2.2 for FASL, 5.3 and 1.8 for FAS, 1.8 and 6.1 for TNF, 4.2 and 4.1 for PD-L1, 4.3 and 4.7 for PD-L2 respectively. No significant differences were observed for PERFORIN, GRANZYMEB, IFNG, IL1b, IL10, TNFSF10, TGFb1, TGFb3, TGFbR1, PD-1, SMAD2, SMAD3, SMAD4 and SMAD7. TSA was found to dramatically decrease the clone activation capability (up to 95.3%) in a dose-dependent manner as well as the clone lytic capability (up to 48.3%).

CONCLUSION: The effects of epigenetic drugs on antitumor peptide-specific CD8⁺ CTL clones are multifaceted and it is difficult to produce definitive conclusions. However, the immunomodulatory effects observed with most prominent being a severely compromised lytic ability against targets presenting tumor peptides, lead to a phenotype with reduced ability to lyse target cancer cells.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Leperchey F, Barbet JP. *Morphologie* 1998, 82: 19–28.
- 2 Waddington CH. *Endeavour* 1942, 1: 18–20.
- 3 Waddington CH. *Organisers and Genes*. 1940, Cambridge, UK: Cambridge Univ Press.
- 4 Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009, 23: 781–783.
- 5 Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 1948, 175: 315–332.
- 6 Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975, 187: 226–232.
- 7 Compere SJ, Palmiter RD. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell* 1981, 25: 233–240.
- 8 Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1960, 8: 1499–1504.
- 9 Deaton AM, Bird AP. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011, 25: 1010–1022.
- 10 Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987, 196(2):261–82.
- 11 Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(6):3740–5.
- 12 Fazzari MJ and Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 2004, 5: 446–455.
- 13 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409: 860–921.
- 14 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002, 16: 6–21.
- 15 Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999, 99(3):247–57.
- 16 Ramirez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* 2005, 2(5):719–29.
- 17 Peng JC, Karpen GH. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol* 2007, 9(1):25–35.
- 18 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997, 389(6649):349–52.
- 19 Maurice T, Duclot F, Meunier J, Naert G, Givalois L, Meffre J, et al. Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 2008, 33(7):1584–602.
- 20 de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003, 370(Pt 3):737–49.
- 21 Cedar H, Bergman Y. Epigenetics of haematopoietic cell development. *Nat Rev Immunol* 2011, 11(7):478–88.
- 22 Ji H, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 2010, 467: 338–342.
- 23 Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, Sasaki H, et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genet* 2010, 42: 1093–1100.
- 24 Pillay LM, Forrester AM, Erickson T, Berman JN, Waskiewicz AJ. The Hox cofactors Meis1 and Pbx act upstream of gata1 to regulate primitive hematopoiesis. *Dev Biol* 2010, 340: 306–317.
- 25 Bröske AM, Vockentanz L, Kharazi S, Huska MR, Mancini E, Scheller M, et al. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nature Genet* 2009, 41: 1207–1215.
- 26 Trowbridge JJ, Snow JW, Kim J, Orkin SH. DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates haematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2009, 5: 442–449.
- 27 Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol* 2008, 20: 266–273.
- 28 Pietersen AM, Van Lohuizen M. Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol* 2008, 20: 201–207.
- 29 Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006, 125: 315–326.
- 30 Zhao XD, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, et al. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2007, 1: 286–298.
- 31 Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, et al. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009, 4: 80–93.
- 32 Weishaupt H, Sigvardsson M, Attema, JL. Epigenetic chromatin states uniquely define the developmental plasticity of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 2010, 115: 247–256.
- 33 Adli M, Zhu J, Bernstein BE. Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. *Nature Methods* 2010, 7: 615–618.
- 34 Maes J, Chappaz S, Cavelier P, O'Neill L, Turner B, Rougeon F, et al. Activation of V(D)J recombination at the IgH chain JH locus occurs within a 6-kilobase chromatin domain and is associated with nucleosomal remodeling. *J Immunol* 2006, 176: 5409–5417.
- 35 Morshead KB, Ciccone DN, Taverna SD, Allis CD, Oettinger MA. Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 11577–11582.

- 36 Chakraborty T, Chowdhury D, Keyes A, Jani A, Subrahmanyam R, Ivanova I, et al. Repeat organization and epigenetic regulation of the DH-C μ domain of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Mol Cell* 2007, 27: 842–850.
- 37 Goldmit M, Ji Y, Skok J, Roldan E, Jung S, Cedar H, et al. Epigenetic ontogeny of the Igk locus during B cell development. *Nature Immunol* 2005, 6: 198–203.
- 38 Xu CR, Feeney AJ. The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J Immunol* 2009, 182: 1362–1369.
- 39 Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, Sen R, Desiderio S. A plant homeodomain in RAG-2 that binds hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* 2007, 27: 561–571.
- 40 Matthews AG, Kuo AJ, Ramón-Maiques S, Han S, Champagne KS, Ivanov D, et al. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 2007, 450: 1106–1110.
- 41 Ji Y, Resch W, Corbett E, Yamane A, Casellas R, Schatz DG. The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. *Cell* 2010, 141: 419–431.
- 42 Coleclough C. Chance, necessity and antibody gene dynamics. *Nature* 1983, 303: 23–26.
- 43 Fitzsimmons SP, Bernstein RM, Max EE, Skok JA, Shapiro MA. Dynamic changes in accessibility, nuclear positioning, recombination, and transcription at the Igk locus. *J Immunol* 2007, 179: 5264–5273.
- 44 Sayegh C, Jhunjhunwala S, Riblet R, Murre C. Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev* 2005, 19: 322–327.
- 45 Hewitt SL, Yin B, Ji Y, Chaumeil J, Marszalek K, Tenthorey J, Salvagiotto G, et al. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nature Immunol* 2009, 10: 655–664.
- 46 Skok JA, Brown KE, Azuara V, Caparros ML, Baxter J, Takacs K et al. Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nature Immunol* 2001, 2: 848–854.
- 47 Liu Z, Widlak P, Zou Y, Xiao F, Oh M, Li S et al. A recombination silencer that specifies heterochromatin positioning and ikaros association in the immunoglobulin κ locus. *Immunity* 2006, 24: 405–415.
- 48 Mostoslavsky R, Singh N, Kirillov A, Pelanda R, Cedar H, Chess A, Bergman Y. κ chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev* 1998, 12: 1801–1811.
- 49 Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science* 2010, 330: 612–616.
- 50 Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007, 447:407–412.
- 51 Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009, 23: 781–783.
- 52 Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 2007, 130: 77–88.
- 53 Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 2007, 129: 823–837.
- 54 Zhang Z, Pugh BF. High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. *Cell* 2011, 144: 175–186.
- 55 Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hamann A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4+ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood* 2004, 104: 3243–3248.
- 56 Schmidl C, Hansmann L, Andreesen R, Edinger M, Hoffmann P, Rehli M. Epigenetic reprogramming of the RORC locus during in vitro expansion is a distinctive feature of human memory but not naive Treg. *Eur J Immunol* 2011, 41: 1491–1498.
- 57 Steinfelder S, Floss S, Engelbert D, Haeringer B, Baron U, Rivino L, et al. Epigenetic modification of the human CCR6 gene is associated with stable CCR6 expression in T cells. *Blood* 2011, 117: 2839–2846.
- 58 Fitzpatrick DR, Shirley KM, Kelso A. Stable epigenetic inheritance of regional IFN- γ promoter demethylation in CD44^{high} CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 1999, 162: 5053–5057.
- 59 Northrop JK, Thomas RM, Wells AD, Shen H. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN- γ loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J Immunol* 2006, 177: 1062–1069.
- 60 Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K, Shires J, Speck SH, Boss JM, et al. Rapid demethylation of the IFN- γ gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J. Immunol* 2006, 176: 4083–4093.
- 61 Yamashita M, Kuwahara M, Suzuki A, Hirahara K, Shinnakasu R, Hosokawa H, et al. Bmi1 regulates memory CD4T cell survival via repression of the Noxa gene. *J Exp Med* 2008, 205: 1109–1120.
- 62 Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8+ T cells. *Immunity* 2011, 35: 400–412.
- 63 Deaton AM, Webb S, Kerr AR, Illingworth RS, Guy J, Andrews R, et al. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res* 2011, 21: 1074–1086.
- 64 Fields PE, Kim ST, Flavell RA. Changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN- γ loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* 2002, 169: 647–650.
- 65 Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. TH cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunol* 2002, 3: 643–651.
- 66 Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human TH1 and TH2 lymphocytes. *Nature Immunol* 2003, 4: 78–86.
- 67 Yamashita M, Shinnakasu R, Nigo Y, Kimura M, Hasegawa A, Taniguchi M, et al. Interleukin (IL)-4-independent maintenance of histone modification of the IL-4 gene loci in memory Th2 cells. *J Biol Chem* 2004, 279: 39454–39464.

- 68 Fann M, Godlove JM, Catalfamo M, Wood WH 3rd, Chrest FJ, Chun N, et al. Histone acetylation is associated with differential gene expression in the rapid and robust memory CD8+ T cell response. *Blood* 2006, 108: 3363–3370.
- 69 Araki Y, Fann M, Wersto R, Weng NP. Histone acetylation facilitates rapid and robust memory CD8 T cell response through differential expression of effector molecules (eomesodermin and its targets: perforin and granzyme B). *J Immunol* 2008, 180: 8102–8108.
- 70 Northrop JK, Wells AD, Shen H. Chromatin remodeling as a molecular basis for the enhanced functionality of memory CD8 T cells. *J Immunol* 2008, 181: 865–868.
- 71 Araki Y, Wang Z, Zang C, Wood WH 3rd, Schones D, Cui K, et al. Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. *Immunity* 2009, 30: 912–925.
- 72 Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 2009, 30: 155–167.
- 73 Chang S, Aune TM. Dynamic changes in histone methylation ‘marks’ across the locus encoding interferon- γ during the differentiation of T helper type 2 cells. *Nature Immunol* 2007, 8: 723–731.
- 74 Nakata Y, Brignier AC, Jin S, Shen Y, Rudnick SI, Sugita M, et al. c-Myb, Menin, GATA-3, and MLL form a dynamic transcription complex that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development. *Blood* 2010, 116: 1280–1290.
- 75 Yamashita M, Hirahara K, Shinnakasu R, Hosokawa H, Norikane S, Kimura MY, et al. Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 2006, 24: 611–622.
- 76 Zediak VP, Johnnidis JB, Wherry EJ, Berger SL. Persistently open chromatin at effector gene loci in resting memory CD8+ T cells independent of transcriptional status. *J Immunol* 186: 2705–2709.
- 77 Cannarile MA, Lind NA, Rivera R, Sheridan AD, Camfield KA, Wu BB, et al. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nature Immunol* 2006, 7: 1317–1325.
- 78 Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006, 125: 315–326.
- 79 Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, et al. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009, 4: 80–93.
- 80 Seit-Nebi A, Cheng W, Xu H, Han J. MLK4 has negative effect on TLR4 signaling. *Cell Mol Immunol* 2012, 9: 27–33.
- 81 Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature Immunol* 2010, 11: 674–680.
- 82 Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, Handon R, Bible P, Elkahloun AG, et al. Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells. *Immunity* 2011, 35: 622–632.
- 83 Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM et al. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie* 2012 94(11):2280-96.
- 84 Sorm F and Vesely J. Effect of 5-aza-2-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 1968, 15: 339-343.
- 85 Constantinides PG, Jones PA, Gevers, W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 1977, 267: 364-366.
- 86 Constantinides PG, Taylor SM, Jones PA. Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides. *Dev Biol* 1978: 66: 57-71.
- 87 Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980, 20: 85-93.
- 88 Momparler, RL. Pharmacology of 5-Aza-2-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol.* 2005, 42: 9-16
- 89 Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984: 81 6993-6997.
- 90 Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa JP. Mechanisms of resistance to 5-aza-2- deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* 2009, 113: 659-667.
- 91 Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, et al. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One* 2010 5: 9001.
- 92 Gravina GL, Festuccia C, Marampon F, Popov VM, Pestell RG, Zani BM, et al. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Mol Cancer* 2010, 9: 305.
- 93 Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2010, 31: 536-546.
- 94 Champion C, Guianvarc’h D, Senamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, et al. Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One* 2010, 5: e12388.
- 95 Piekarz RL and Bates SE. Epigenetic modifiers: basic understanding and clinical development, *Clin Cancer Res* 2009, 15: 3918-3926.
- 96 Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2009, 625: 131-142.
- 97 Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2011, 1: 598-607.
- 98 Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 429-439.

- 99 Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2011, 82: 1807-1821.
- 100 Suh N and Pezzuto JM. Strawberry fields forever? *Cancer Prev Res*, 2012 5: 30-33.
- 101 Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* 2008, 269: 226-242.
- 102 Rusin A, Krawczyk Z, Gryniewicz G, Gogler A, Zawisza-Puchalka J, Szeja W. Synthetic derivatives of genistein, their properties and possible applications. *Acta Biochim Pol* 2010, 57: 23-34.
- 103 Duthie SJ. Epigenetic modifications and human pathologies: cancer and CVD. *Proc Nutr Soc* 2011, 70: 47-56.
- 104 Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr* 2007, 137: 223-228.
- 105 Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 7033-7041.
- 106 Li Y and Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem* 2010, 17: 2141-2151.
- 107 Lee WJ, Shim JY, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol* 2005, 68: 1018-1030.
- 108 Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5: 37-50.
- 109 Brueckner B, Kuck D, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 2007, 13: 17-22.
- 110 Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW, Liang G, Yang AS and Jones PA. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther* 2005, 4: 1515-1520.
- 111 Candelaria M, Gallardo-Rincon D, Arce C, Cetina L, Aguilar-Ponce JL, Arrieta O, et al. A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2007, 18: 1529-1538.
- 112 Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* 2005, 5: 44.
- 113 Candelaria M, Herrera A, Labardini J, Gonzalez-Fierro A, Trejo-Becerril C, Taja-Chayeb L, et al. Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial. *Ann Hematol* 2011, 90: 379-387.
- 114 A. Villar-Garea A, M.F. Fraga MF, J. Espada J, M. Esteller M. Procaine is a DNA demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 2003, 63: 4984-4989.
- 115 Singh N, Duenas-Gonzalez A, Lyko F, Medina-Franco JL. Molecular modeling and molecular dynamics studies of hydralazine with human DNA methyltransferase 1. *Chem Med Chem* 2009, 4: 792-799.
- 116 Yoo J and Medina-Franco JL. Homology modeling, docking and structure-based pharmacophore of inhibitors of DNA methyltransferase. *J Comput Aided Mol Des* 2011, 25: 555-567.
- 117 Lee BH, Yegnasubramanian S, Lin X, Nelson WG. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J Biol Chem* 2005, 280: 40749-40756.
- 118 Halby L, Champion C, Senamaud-Beaufort C, Ajjan S, Drujon T, Rajavelu A, et al. Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide. *ChemBioChem* 2012, 13: 157-165.
- 119 Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2006, 66: 2794-2800.
- 120 Amato RJ. Inhibition of DNA methylation by antisense oligonucleotide MG98 as cancer therapy. *Clin Genitourin Cancer* 2007, 5: 422-426.
- 121 Goffin J, Eisenhauer E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* 2002, 13: 1699-1716.
- 122 Klisovic RB, Stock W, Cataland S, Klisovic MI, Liu S, Blum W, et al. A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2008, 14: 2444-2449.
- 123 Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5: 769-784.
- 124 Dokmanovic M, Marks PA. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 2005, 96: 293-304.
- 125 Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003, 46:5097-5116.
- 126 Rasheed WK, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2007, 16: 659-678.
- 127 Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 1990, 265: 17174-17179.
- 128 Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* 1996, 5: 245-253.
- 129 Gray SG, Qian CN, Furge K, Guo X, Teh BT. Microarray profiling of the effects of histone deacetylase inhibitors on gene expression in cancer cell lines. *Int J Oncol* 2004, 24: 773-795.
- 130 Peart MJ, Smyth GK, Van Laar RK. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102: 3697-3702.
- 131 Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999, 401: 188-193.
- 132 Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101: 15064-15069.

-
- 133 Jose B ,Oniki Y, Kato T, Nishino N, Sumida Y, Yoshida M. Novel histone deacetylase inhibitors: cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14: 5343-5346.
 - 134 Piekarz RL, Sackett DL, Bates SE. Histone deacetylase inhibitors and demethylating agents: clinical development of histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 2007, 13: 30-9.
 - 135 Kuendgen A, Strupp C, Aivado M. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004, 104:1266-9.
 - 136 Chang SM, Kuhn JG, Ian Robins H. A study of a different dose-intense infusion schedule of phenylacetate in patients with recurrent primary brain tumors consortium report. *Invest New Drugs* 2003, 21: 429-33.
 - 137 Wiencke JK, Butler R, Hsuang G, Eliot M, Kim S, Sepulveda MA, et al. The DNA methylation profile of activated human natural killer cells. *Epigenetics* 2016, 11(5): 363-380.
 - 138 Gao XN, Lin J, Wang LL, Yu L. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. *Mol Immunol* 2009, 46(10): 2064-2070.
 - 139 Gang AO, Frosig TM, Brimnes MK, Lyngaa R, Treppendahl MB, Gronbaek K, et al. 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Blood Cancer J* 2014, 4: e197.
 - 140 Sohlberg E, Pfefferle A, Andersson S, Baumann BC, Hellstrom-Lindberg E, Malmberg KJ. Imprint of 5-azacytidine on the natural killer cell repertoire during systemic treatment for high-risk myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 2015, 6(33): 34178-34190.
 - 141 Kopp LM, Ray A, Denman CJ, Senyukov VS, Somanchi SS, Zhu S et al. Decitabine has a biphasic effect on natural killer cell viability, phenotype, and function under proliferative conditions. *Mol Immunol* 2013, 54(3-4): 296-301.
 - 142 Vasu S, He S, Cheney C, Gopalakrishnan B, Mani R, Lozanski G et al. Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood* 2016, 127(23): 2879-2889.
 - 143 Zhang X, Ulm A, Somineni HK, Oh S, Weirauch MT, Zhang HX et al. DNA methylation dynamics during ex vivo differentiation and maturation of human dendritic cells. *Epigenetics Chromatin* 2014, 7: 21.
 - 144 Frikeche J, Clavert A, Delaunay J, Brissot E, Grégoire M, Gaugler B, et al. Impact of the hypomethylating agent 5-azacytidine on dendritic cells function. *Experimental hematology* 2011, 39(11): 1056-1063.
 - 145 Levin N, Pato A, Cafri G, Eisenberg G, Peretz T, Margalit A, et al. Spontaneous Activation of Antigen-presenting Cells by Genes Encoding Truncated Homo-Oligomerizing Derivatives of CD40. *J Immunother* 2017, 40(2): 39-50.
 - 146 Suarez-Alvarez B, Rodriguez RM, Schlangen K, Raneros AB, Marquez-Kisinousky L, Fernandez AF, et al. Phenotypic characteristics of aged CD4+ CD28null T lymphocytes are determined by changes in the whole-genome DNA methylation pattern. *Aging Cell* 2017, 16(2): 293-303.
 - 147 Zhang Y, Maksimovic J, Naselli G, Qian J, Chopin M, Blewitt ME, et al. Genome-wide DNA methylation analysis identifies hypomethylated genes regulated by FOXP3 in human regulatory T cells. *Blood* 2013, 122(16): 2823-2836.
 - 148 Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008, 26: 677-704.
 - 149 Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* 2011, 35(3): 400-412.
 - 150 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006, 439(7077): 682-687.
 - 151 Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 2016, Mar 2;8(328):328rv4.
 - 152 Orskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, et al. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget* 2015, 6(11): 9612-9626.
 - 153 Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia* 2014, 28(6): 1280-1288.
 - 154 Tirapu I, Huarte E, Guiducci C, Arina A, Zaratiegui M, Murillo O, et al. Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoevasion mechanism of colon carcinoma. *Cancer Res* 2006, 66(4): 2442-2450.
 - 155 Scarpa M, Scarpa M, Castagliuolo I, Erroi F, Basato S, Brun P, et al. CD80 down-regulation is associated to aberrant DNA methylation in non-inflammatory colon carcinogenesis. *BMC Cancer* 2016, 16: 388.
 - 156 Wang LX, Mei ZY, Zhou JH, Yao YS, Li YH, Xu YH, et al. Low dose decitabine treatment induces CD80 expression in cancer cells and stimulates tumor specific cytotoxic T lymphocyte responses. *PLoS One* 2013, 8(5): e62924.
 - 157 Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001, 1(3): 220-228.
 - 158 Wang L, Amoozgar Z, Huang J, Saleh MH, Xing D, Orsulic S, et al. Decitabine Enhances Lymphocyte Migration and Function and Synergizes with CTLA-4 Blockade in a Murine Ovarian Cancer Model. *Cancer Immunol Res* 2015, 3(9): 1030-1041.
 - 159 Costantini B, Kordasti SY, Kulasekararaj AG, Jiang J, Seidl T, Abellan PP, et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2013, 98(8): 1196-1205.
 - 160 Choi J, Ritchey J, Prior JL, Holt M, Shannon WD, Deych E, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood* 2010, 116(1): 129-139.

-
- 161 Bontkes HJ, Ruben JM, Alhan C, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Azacitidine differentially affects CD4(pos) T-cell polarization in vitro and in vivo in high risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2012, 36(7): 921-930.
 - 162 Stubig T, Badbaran A, Luetkens T, Hildebrandt Y, Atanackovic D, Binder TM, et al. 5-azacytidine promotes an inhibitory T-cell phenotype and impairs immune mediated antileukemic activity. *Mediators Inflamm* 2014, 2014:418292.
 - 163 Karanikas V, Lurquin C, Colau D, van Baren N, De Smet C, Lethe B et al. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J Immunol* 2003, 171:4898-4904.
 - 164 Yang SA, Estecio M, Doshi K, Kondo Y, Tajara HE, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research* 2004, 32, 3: e38.
 - 165 Austina R, Smyth MJ, Lane SW. Harnessing the immune system in acute myeloid leukaemia. *Critical Rev in Oncol/Hematol* 2016, 103:62-77.
 - 166 Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol* 2008, 8: 74-80.
 - 167 Santourlidis S, Warskulat U, Florl AR, Maas S, Pulte T, Fischer J et al. Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (APT1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma. *Mol Carcinog* 2001, 32(1): 36-43.
 - 168 Brouckeban EB, Zwadlo G, Holzmann B, Macher E, Sorg C. Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *Int J Cancer* 1988, 41: 562-7.
 - 169 Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ* 2009, 49: 1-15.
 - 170 Falvo JV, Jasenosky LD, Kruidenier L, Goldfeld AE Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation. *Adv Immunol* 2013, 118:37-128.
 - 171 Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, TKerenidi T, et al. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med* 2008, 6: 19.
 - 172 Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008, 38(6): 1654-63.
 - 173 Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant J-C, Menegaux F, et al. Identification of CD8+ CD25+ Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009, 58: 520-9.
 - 174 Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 6947-58.
 - 175 Fann M, Godlove JM, Catalfamo M, Wood WH 3rd, Chrest FJ, Chun N et al. Histone acetylation is associated with differential gene expression in the rapid and robust memory CD8(+) T-cell response. *Blood* 2006, 108(10): 3363-70.
 - 176 Yan M, Himoudi N, B. Piku Basu, Wallace R, Poon E, Adams S et al (2011). Increased PRAME antigen-specific killing of malignant cell lines by low avidity CTL clones, following treatment with 5-Aza-2-Deoxycytidine. *Cancer Immunol Immunother* 2011, 60: 1243-1255.
 - 177 Jones PA, Issa JP, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet.* 2016, 17(10): 630-41