



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

&

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥ
Γ.Ν.Α. "ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ"

**ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ - ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ IN VITRO ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ ΜΕ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ
ΣΩΜΑΤΙΑ Ή ΟΛΙΚΟ RNA ΜΥΕΛΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ Βασιλείου Σπυριδούλας: 26-1-2004

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 534^α/8-6-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας –Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βασιλακόπουλος Θεόδωρος Λέκτορας Εντατικής Θεραπείας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 6-7-2004

«Ανοσοβιολογία των δενδριτικών κυττάρων-Συγκριτική μελέτη in vitroδιέγερσης δενδριτικών κυττάρων ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα με αποπτωτικά σωμάτια ή ολικό RNA μωλωματικών κυττάρων »

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 708^α/8-3-2011

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργούλης Αναστάσιος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντόπουλος Σταύρος	Καθηγητής Παθολογίας –Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	τ. Καθηγητής Παθολογίας -Αιματολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βασιλακόπουλος Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας –Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Τσιάρα Σταυρούλα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-4-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Σημείωμα

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής που έκαναν δυνατή την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον κο Κ. Μπουραντά, Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω αυτή τη διδακτορική διατριβή υπο την επίβλεψή του. Του είμαι πραγματικά ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την υπομονή του. Το ίδιο ισχύει και για τον κο Σ. Κωνσταντόπουλο, Καθηγητή Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη συνεργασία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον κο Θ. Βασιλακόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή στην Κλινική Εντατικής Θεραπείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με τον οποίο είχα την τύχη να συνεργαστώ αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη γραμματεία της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία. Ιδιαίτερος ευχαριστώ την κα Μάνου, γραμματέα του κου Μπουραντά, που υπήρξε πάντα εξυπηρετική όλα αυτά τα χρόνια.

Χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αιματολογική και Λεμφωμάτων Κλινική του Γ.Π.Ν.Α. "Ο Ευαγγελισμός", όπου εκπονήθηκε το πειραματικό μέρος αυτής της διατριβής. Ευχαριστώ θερμά τον κο Ε. Νικηφοράκη, απερχόμενο διευθυντή της κλινικής, για τη φιλοξενία, την εμπιστοσύνη και τη στήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Παρομοίως, είμαι υπόχρεη και στον κο Ν. Χαρχαλάκη, νέο διευθυντή της κλινικής, του οποίου η υποστήριξη υπήρξε πολύτιμη. Το ίδιο ισχύει και για τον κο Δ. Καρακάση, αναπληρωτή διευθυντή της κλινικής. Ευχαριστώ απο καρδιάς τον κο Ι. Μπαλταδάκη, επιμελητή Α΄ του τμήματος, για τη συνεργασία, την επιστημονική υποστήριξη και τις ερευνητικές κατευθύνσεις που μου υπέδειξε. Του είμαι πραγματικά ευγνώμων για την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Ιδιαίτερος ευχαριστώ και την κα Σ. Δελήμπαση, επιμελήτρια Α΄, η οποία συνέλεγε τα δείγματα των ασθενών παρα τον καθημερινό φόρτο εργασίας. Παρομοίως ευχαριστώ και τους νεαρούς αιματολόγους του τμήματος, Κ. Λιάπη και Α. Μανάκα, για τη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων και στην καταγραφή των κλινικών

δεδομένων των ασθενών. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Κ. Λιάπη για την ανάγνωση του κειμένου και τις χρήσιμες παρατηρήσεις του. Ευχαριστώ απο καρδιάς την κα Μ. Καρατζά, βιοχημικό, υπεύθυνη του εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής και Κυτταροκαλλιιεργειών, για τη φιλοξενία, τη συνεργασία και την υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Το ίδιο ισχύει και για την κα Μ. Παπαγεωργίου, παρασκευάστρια του εργαστηρίου, για την αρμονική συνύπαρξη και τη συμπαράσταση. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις βιολόγους του τμήματος, κ.κ. Μ. Γαροφαλάκη και Ε. Τζιότζιου του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Ζ. Πουλοπούλου του εργαστηρίου Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, για τη φιλοξενία και την επιστημονική υποστήριξη. Ευχαριστώ επίσης την τεχνολόγο κα Ε. Μπίκα και την παρασκευάστρια κα Ε. Νικολού για την πάντα εξυπηρετική τους διάθεση και τη βοήθειά τους. Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την κα Α. Ψαρρά, χημικό, υπεύθυνη Κυτταρομετρίας Ροής του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Γ.Π.Ν.Α. “Ο Ευαγγελισμός”, για την ανάγνωση του κειμένου, τις πολύ χρήσιμες διορθώσεις και τη βοήθειά της στη στατιστική ανάλυση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την ηθική συμπαράσταση και την οικονομική στήριξη. Παρομοίως ευχαριστώ τον προσωπικό μου φίλο κο Κ. Καλατζή για τη συμπαράσταση και τη βοήθειά του στην επεξεργασία των εικόνων και τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, είμαι ευγνώμων σε όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη, χωρίς τους οποίους θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση αυτής της διατριβής. Τους ευχαριστώ μέσα απο την καρδιά μου.

Σπυριδούλα Δ. Βασιλείου

Πρόλογος

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) είναι νόσημα ανίατο με τη συμβατική χημειοθεραπεία. Η αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων προσφέρει σημαντική αύξηση της επιβίωσης των ασθενών, αλλά όχι εκρίζωση της νόσου. Για το λόγο αυτό είναι επιτακτική η ανάπτυξη εναλλακτικών θεραπειών.

Η κυτταρική ανοσοθεραπεία αποσκοπεί στην παραγωγή και χορήγηση στον ασθενή κυττάρων με ειδική δράση έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων, με σκοπό την επίτευξη ύφεσης ή την πρόληψη της υποτροπής του όγκου μετά από χημειοθεραπεία. Τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ) είναι τα ισχυρότερα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του οργανισμού και είναι ιδανικά για ανοσοθεραπεία διότι:

α. Μπορούν να παραχθούν σε ικανοποιητικούς αριθμούς στο εργαστήριο με ειδικές καλλιέργειες.

β. Είναι δυνατό στη συνέχεια να διεγερθούν με αντιγόνα των όγκων ή με ολόκληρα νεοπλασματικά κύτταρα.

γ. Η χορήγησή τους στον ασθενή είναι απόλυτα ασφαλής.

δ. Τα διεγερμένα ΔΚ μπορούν να ενεργοποιήσουν *in vivo* ειδικά Τ-λεμφοκύτταρα έναντι αντιγόνων του όγκου με ενδεχόμενο αποτέλεσμα την υποστροφή του όγκου.

Τα ΔΚ των ασθενών με μυέλωμα, όπως και των ασθενών με άλλες κακοήθειες, είναι *in vivo* λειτουργικά ανεπαρκή λόγω της παρουσίας διαφόρων κυτταροκινών με ανασταλτική δράση. Η κατάσταση αυτή μπορεί να παρακαμφθεί με τη διέγερση των δενδριτικών κυττάρων *ex vivo* αρχικά και τη χορήγησή τους μετά στον ασθενή. Σε διάφορες πειραματικές μελέτες, έχει καταστεί δυνατή η φόρτιση των ΔΚ *in vitro* με αντιγόνα του ΠΜ. Τα διεγερμένα ΔΚ μπορούν να ενεργοποιήσουν στη συνέχεια *in vitro* ή *in vivo* Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν ειδική κυτταροτοξική δράση έναντι των μυελωματικών κυττάρων.

Οι μέχρι τώρα προσπάθειες ανοσοθεραπείας σε ασθενείς με ΠΜ δεν είχαν τα αναμενόμενα κλινικά αποτελέσματα. Αυτό αποδίδεται σε δύο κύριους λόγους. Αφενός, στη χρησιμοποίηση ως αντιγόνου για τη διέγερση των ΔΚ της παραπρωτεΐνης του ΠΜ, η οποία είναι ασθενές αντιγόνο και συχνά δεν εκφράζεται στην επιφάνεια των μυελωματικών κυττάρων. Αφετέρου δε, στην ανεπαρκή ωρίμανση των ΔΚ *in vitro*, πριν από τη χορήγησή τους στους ασθενείς. Η

ωρίμανση των ΔΚ, που μπορεί να γίνει στο εργαστήριο με την προσθήκη ειδικών παραγόντων ή κυτταροκινών, θεωρείται πλέον απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόκληση ειδικής κυτταροτοξικής ανοσιακής απάντησης.

Ο σκοπός του ερευνητικού αυτού έργου ήταν η παραγωγή ΔΚ στο εργαστήριο με καλλιέργεια μονοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών με ΠΜ . Στη συνέχεια, μελετήθηκε η διέγερση των ΔΚ *in vitro* με εναλλακτικά αντιγόνα των μυελωματικών κυττάρων του ίδιου του ασθενούς. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως τρόποι φόρτισης των ΔΚ: α. αποπτωτικά σωμάτια μυελωματικών κυττάρων και β. ολικό RNA μυελωματικών κυττάρων. Τέλος ελέγχθηκε η ενεργοποίηση ειδικών Τ-λεμφοκυττάρων από τα ΔΚ με χρήση ειδικών δοκιμασιών.

Στο βαθμό που θα καταστεί δυνατή η παραγωγή ΔΚ με ικανότητα ενεργοποίησης *in vitro* Τ-λεμφοκυττάρων με ισχυρή και ειδική κυτταροτοξική δράση έναντι των μυελωματικών κυττάρων, είναι δυνατόν να διερευνηθεί η δυνατότητα χορήγησης διεγερμένων ΔΚ σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα με σκοπό τη βελτίωση της ύφεσης ή την πρόληψη της υποτροπής μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α: ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

<i>Γενικά</i>	7
1. <i>Ετερογένεια των ΔΚ</i>	11
2. <i>Πρόσληψη αντιγόνου, μετανάστευση και ωρίμανση</i>	13
<i>Χημειοταξία των πρόδρομων ΔΚ</i>	14
<i>Πρόσληψη αντιγόνου</i>	14
<i>Ενεργοποίηση/ωρίμανση των ΔΚ</i>	17
<i>Μετανάστευση των ΔΚ που φέρουν αντιγόνο</i>	19
3. <i>Επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου</i>	21
3.1 <i>Παρουσίαση από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I</i>	
<i>Ενδογενής MHC I οδός παρουσίασης</i>	21
<i>Διασταυρούμενη παρουσίαση (cross presentation) εξωγενών αντιγόνων</i>	22
3.2 <i>Παρουσίαση από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II</i>	25
3.3 <i>Τα αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια CD1</i>	27
4. <i>Αντιγονοπαρουσίαση και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων</i>	
<i>Διέγερση των T λεμφοκυττάρων</i>	29
<i>Μόρια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ΔΚ-T κυττάρων</i>	30
<i>Διαφορετικές κατηγορίες ΔΚ κινητοποιούν διαφορετικές ανοσιακές απαντήσεις</i>	31
<i>Πλαστικότητα της λειτουργίας των ΔΚ</i>	32
<i>Τα T-κύτταρα ρυθμίζουν τη διάρκεια ζωής των ΔΚ</i>	33
5. <i>Τα ΔΚ στη ρύθμιση των B λεμφοκυττάρων</i>	35
6. <i>Τα ΔΚ στη ρύθμιση των NK λεμφοκυττάρων</i>	37
7. <i>ΔΚ και ανοσιακή ανοχή</i>	39
8. <i>Τα ΔΚ στην ανοσολογία και ανοσοθεραπεία του καρκίνου</i>	41
<i>Πηγές ΔΚ για ανοσοθεραπευτική χρήση</i>	44
<i>Επιλογή αντιγόνων</i>	46
<i>Οδοί χορήγησης των ΔΚ</i>	48
<i>Κλινικές μελέτες με ΔΚ</i>	49

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

Γενικά	53
1. Επιδημιολογία	55
2. Παθογένεση	55
3. Γενετικοί παράγοντες.....	59
4. Διάγνωση	61
5. Αντιμετώπιση της νόσου	
Μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων	61
Νεότερες θεραπείες στόχευσης.....	63
6. Ανοσοθεραπεία στο ΠΜ.....	65
Αλληλεπιδράσεις του ΠΜ με το ανοσοποιητικό σύστημα	67
Τα ΔΚ στο ΠΜ	70
Τα Τ κύτταρα στο ΠΜ και η αναστροφή της επαγόμενης από τον όγκο ανοσοκαταστολής.....	72
Τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα στο ΠΜ.....	74
Τα ΝΚ κύτταρα στο ΠΜ	75
Τα ΝΚΤ κύτταρα στο ΠΜ	76
Τα γδ Τ κύτταρα στο ΠΜ	77
Τα Th17 κύτταρα στο ΠΜ	77
Tumor Associated Antigens (TAAs) στο ΠΜ	77
Ιδιότυπος	78
<i>Mucin-1</i>	79
<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>	79
<i>Preferentially expressed antigen of melanoma</i>	80
<i>Cancer-testis antigens</i>	80
Άλλα αντιγόνα.....	80
Αντινεοπλασματικά εμβόλια στο ΠΜ	81
Εμβολιασμός με ΔΚ στο ΠΜ	82
Ανοσογονιδιακή θεραπεία στο ΠΜ	83
Χυμική ανοσοθεραπεία στο ΠΜ	86
Προοπτικές βελτίωσης των στρατηγικών ανοσοθεραπείας του ΠΜ	87
7. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	89

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή ασθενών	95
Συλλογή μυελωματικών κυττάρων	95
Καλλιέργεια ΔΚ.....	96
Κρυοκαταψύξεις και αποψύξεις κυττάρων	97
Προετοιμασία κυττάρων για κυτταρομετρία ροής.....	97
Προσδιορισμός συγκέντρωσης κυτταροκινών	98
<i>In vitro</i> μεταγραφή του GFP mRNA	99
Διέγερση των ΔΚ με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων	101
Διέγερση των ΔΚ με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων.....	101
Δοκιμασίες μέτρησης κυτταρικού πολλαπλασιασμού	103
<i>In vitro</i> διέγερση ειδικών Τ λεμφοκυττάρων	104
Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας	105
Δοκιμασία ELISpot.....	106
Στατιστική ανάλυση.....	107

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καλλιέργεια ΔΚ από υγιείς δότες και ασθενείς με ΠΜ.....	109
Έλεγχος λειτουργικότητας των ΔΚ ασθενών με ΠΜ	111
Διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων.....	113
Πρόκληση ειδικού πολλαπλασιασμού αυτόλογων λεμφοκυττάρων από τα διεγερμένα με αποπτωτικά σωματίδια ώριμα ΔΚ των ασθενών	115
Βελτιστοποίηση των συνθηκών του electroporation	116
Διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων	120
Παραγωγή κυτταροκινών από τα ώριμα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ.....	121
<i>In vitro</i> διέγερση ειδικών Τ λεμφοκυττάρων	123
Ειδική κυτταροτοξική δράση των <i>in vitro</i> διεγερμένων CD8 CTLs των ασθενών	125

Ανίχνευση ειδικών Th1/Tc1 κυττάρων εντος των <i>in vitro</i> διεγερμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των ασθενών	128
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Είναι δυνατή η παραγωγή λειτουργικών ΔΚ <i>in vitro</i> από ασθενείς με ΠΜ	133
Η διέγερση ΔΚ ασθενών με ΠΜ είναι εφικτή <i>in vitro</i> με τη μέθοδο της φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων	135
Η διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων είναι δυνατή με τη μέθοδο της ηλεκτρικής διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης (electroporation).....	139
Η επαγωγή T-λεμφοκυττάρων με ειδική δράση έναντι του ΠΜ επιτυγχάνεται <i>in vitro</i> και με τις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ ασθενών με ΠΜ	143
Παράγοντες που σχετίζονται με την ανοσιακή ανταπόκριση των ασθενών στη διέγερση των ΔΚ <i>in vitro</i>	147
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	151
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	153
ABSTRACT	155
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	157

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α: ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

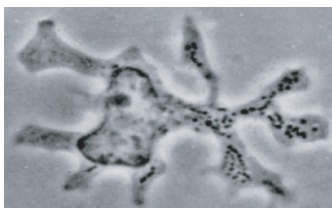
Γενικά

Η άμυνα του ξενιστή βασίζεται στη συνδυασμένη δράση της μη αντιγονοειδικής φυσικής ανοσίας και της αντιγονοειδικής επίκτητης ανοσίας. Τα βασικά χαρακτηριστικά του φυσικού ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών περιλαμβάνουν: α. την ικανότητα της γρήγορης αναγνώρισης παθογόνων μικροοργανισμών ή βλάβης των ιστών και β. την ικανότητα της μετάδοσης του σήματος κινδύνου στα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας. Το φυσικό ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει φαγοκύτταρα, φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK), το συμπλήρωμα και ιντερφερόνες (IFNs). Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας χρησιμοποιούν μια ποικιλία υποδοχέων για να αναγνωρίζουν μοτίβα κοινά μεταξύ παθογόνων παραγόντων, π.χ. βακτηριακός πολυσακχαρίτης (LPS), υδατάνθρακες και δίκλωνο ιικό RNA. Η εξελικτική πίεση οδήγησε στην ανάπτυξη της επίκτητης ανοσίας, βασικά χαρακτηριστικά της οποίας είναι: α. η ικανότητα του ανασυνδυασμού γονιδίων της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που επιτρέπει τη δημιουργία μιας τεράστιας ποικιλίας αντιγονοειδικών κλώνων και β. η ανοσιακή μνήμη. Όμως, αυτό το εξαιρετικά ισχυρό και εξειδικευμένο σύστημα κατευθύνεται και ρυθμίζεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ), που περιλαμβάνουν τα μακροφάγα, τα Β λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ).

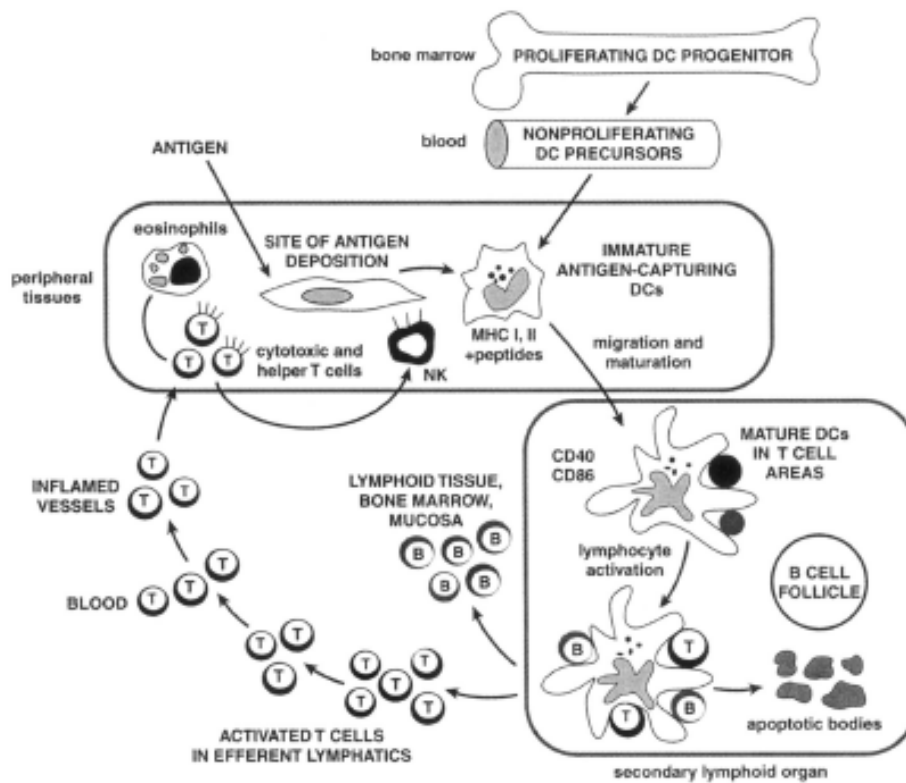
Τα ΔΚ αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1868 σαν κύτταρα Langerhans (LCs) της επιδερμίδας και έπειτα στο σπλήνα ποντικού το 1973 από τους Steinman και Cohn(6). Ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας της χαρακτηριστικής μορφής τους με δενδριτικές προεκβολές (εικόνα 1) και παρέμειναν αινιγματικά εξαιτίας της σπανιότητας και των δυσκολιών στην απομόνωσή τους. Στα σημεία επαφής με το περιβάλλον (δέρμα και βλεννογόνοι) τα κύτταρα αυτά αποτελούν το 1-2% του συνολικού αριθμού κυττάρων(9). Χάρη στην ανάπτυξη μεθόδων που επιτρέπουν την *in vitro* παραγωγή ΔΚ, έχει συσσωρευτεί ένας πλούσιος όγκος πληροφοριών

σχετικά με τη βιολογία τους. Τα ΔΚ είναι τα ισχυρότερα ΑΠΚ γιατί είναι τα μόνα με την ικανότητα να επάγουν πρωτογενείς ανοσιακές απαντήσεις, επιτρέποντας έτσι την δημιουργία ανοσιακής μνήμης. Από τα προγονικά κύτταρα στο μυελό των οστών προκύπτουν οι πρόδρομοι που κυκλοφορούν στο αίμα και εγκαθίστανται στους ιστούς σαν άωρα ΔΚ, όπου λειτουργούν σαν αισθητήρια όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος (1,2,3,4,5). Μετά από βλάβη των ιστών, τα άωρα ΔΚ προσλαμβάνουν το αντιγόνο και ακολούθως μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπου επιλέγουν σπάνια αντιγονοειδικά T- κύτταρα, επάγοντας έτσι ανοσιακές αποκρίσεις. Τα ΔΚ παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD4 T βοηθητικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια ρυθμίζουν τα δραστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, που περιλαμβάνουν τα αντιγονοειδικά CD8 κυτταροτοξικά T- κύτταρα και τα B -κύτταρα, όπως επίσης και τα μη αντιγονοειδικά μακροφάγα, ηωσινόφιλα και NK. Επιπλέον, τα ΔΚ κατευθύνουν τα δραστικά κύτταρα στα σημεία τραυματισμού των ιστών.

Έχουν περιγραφεί τέσσερα στάδια ανάπτυξης των ΔΚ: α. προγονικά κύτταρα στο μυελό των οστών β. πρόδρομα ΔΚ που περιπολούν στο αίμα, στη λέμφο και στους λεμφικούς ιστούς και που εκκρίνουν τεράστιες ποσότητες κυτταροκινών, π.χ. IFNα, όταν αναγνωρίσουν παθογόνους παράγοντες, περιορίζοντας έτσι την εξάπλωση της λοίμωξης γ. άωρα ΔΚ των ιστών, που έχουν υψηλή ικανότητα πρόσληψης αντιγόνου και δ. ώριμα ΔΚ, που απαντώνται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και εκφράζουν υψηλά επίπεδα συνδιεγερτικών μορίων, όντας έτσι ειδικευμένα στην παρουσίαση των αντιγόνων (εικόνα 2). Τα ΔΚ αποτελούν ένα περίπλοκο σύστημα κυττάρων τα οποία, κάτω από διαφορετικές μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες, μπορούν να προκαλέσουν αντίθετες ανοσιακές απαντήσεις, όπως ανοσία η ανοχή. Στην ενότητα αυτή θα δοθούν γενικά στοιχεία που αφορούν στην ανάπτυξη και στις ανοσορυθμιστικές λειτουργίες των ΔΚ.



Εικόνα 1: μία από τις πρώτες απεικονίσεις των ΔΚ σε σπλήνα ποντικού [από J. Exp. Med. 1973, (6)]



Εικόνα 2: ο κύκλος ζωής ενός ΔΚ, η πρόσληψη των αντιγόνων και η παρουσίασή τους στα επιλεγμένα αντιγονοειδικά λεμφοκύτταρα. Τα πρόδρομα ΔΚ της κυκλοφορίας εισέρχονται στους περιφερικούς ιστούς σαν άωρα ΔΚ, όπου προσλαμβάνουν αντιγόνα (π.χ. μικροβιακά προϊόντα). Μετά την πρόσληψη του αντιγόνου, τα άωρα ΔΚ φεύγουν από τους ιστούς και μεταναστεύουν στα λεμφικά όργανα, όπου, αφού ωριμάσουν, παρουσιάζουν τα αντιγονικά πεπτίδια σε σύμπλεγμα με τα MHC μόρια της επιφάνειάς τους, επιλέγοντας έτσι τα σπάνια αντιγονοειδικά λεμφοκύτταρα της κυκλοφορίας. Αυτά τα T κύτταρα ενεργοποιούνται και επάγουν την τελική ωρίμανση των ΔΚ, η οποία ενισχύει την έκπτυξη και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα μεταναστεύουν στον τραυματισμένο ιστό χάρη στην ικανότητά τους για επιλεκτική διάσχιση φλεγμαινόντων επιθηλίων. Τα T βοηθητικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, ενώ τα κυτταροτοξικά T κύτταρα λύουν τα μολυσμένα κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα B κύτταρα διαφοροποιούνται σε B λεμφοβλάστες κατόπιν επαφής με τα T κύτταρα και τα ΔΚ, έπειτα μεταναστεύουν σε διάφορα σημεία όπου ωριμάζουν προς πλασματοκύτταρα, τα οποία παράγουν αντισώματα που θα ανενεργοποιήσουν τον αρχικό παθογόνο παράγοντα. Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα Th2 κύτταρα ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα, τα οποία διηθούν το σημείο τραυματισμού των ιστών. Τα NK κύτταρα, ένα από τα βασικά συστατικά στοιχεία της φυσικής ανοσίας, δρουν σε διαφορετικά στάδια της ανοσιακής απάντησης μέσω έκκρισης κυτταροκινών και κυτταροτοξικής δραστηριότητας [από J. Clin. Immunol. (3)]

1. Ετερογένεια των ΔΚ

Τα ΔΚ προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Σε σταθερές συνθήκες (κατάσταση μη φλεγμονής, steady-state), τα ΔΚ απαντώνται σαν πρόδρομα ΔΚ (precursor DCs, pre-DCs), που χρειάζονται ένα μικροβιακό ή φλεγμονώδες ερέθισμα για να αποκτήσουν τη μορφολογία και τη λειτουργικότητα των ΔΚ, και σαν συμβατικά ΔΚ (conventional DCs, cDCs), που έχουν ήδη τη μορφολογία και τη λειτουργία των ΔΚ.

Τουλάχιστον τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανθρώπινων πρόδρομων ΔΚ έχουν αναγνωριστεί στο αίμα (24): CD14+CD11c+ ΔΚ μυελικής προέλευσης, CD14-CD11c+ ΔΚ μυελικής προέλευσης και CD14-CD11c-IL-3Ra+ πλασματοκυτταροειδή ΔΚ. Το αν ένα πρόδρομο κύτταρο θα διαφοροποιηθεί σε ΔΚ ή σε μακροφάγο εξαρτάται από το περιβάλλον που συναντά αφού διασχίσει το ενδοθήλιο των αγγείων. Έχει αποδειχτεί ότι η αλληλεπίδραση των μονοκυττάρων με ινοβλάστες μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκκριση ιντερλευκίνης 6 (IL-6) από τους ινοβλάστες, που με τη σειρά της κατευθύνει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς μακροφάγα. Εναλλακτικά, τα μονοκύτταρα μπορεί να συναντήσουν μαστοκύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), IL-4, IL-13, TNFα, οι οποίες ευνοούν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ΔΚ.

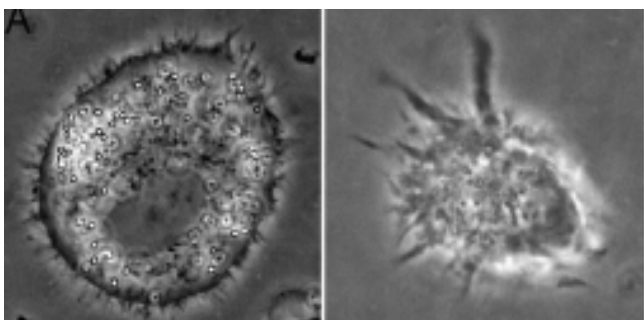
Τα CD14-CD11c-IL-3Ra(CD123)+ πρόδρομα κύτταρα διαφοροποιούνται σε άωρα πλασματοκυτταροειδή ΔΚ ανταποκρινόμενα στην IL-3, μη εξαρτώμενα από τον GM-CSF. Αυτά τα ΔΚ έχουν έναν μη τυπικό φαινότυπο επιφανείας, δεν παρουσιάζουν μυελικούς δείκτες όπως CD11c, CD11b και CD33, είναι δηλαδή πιθανώς λεμφικής προέλευσης, και θεωρούνταν αρχικά ότι κατευθύνουν τα CD4 T λεμφοκύτταρα προς Th2 απαντήσεις (έκκριση IL-4, IL-10), δηλαδή προς χυμικές ανοσιακές αποκρίσεις, για αυτό και είναι γνωστά σαν ΔΚ τύπου 2 (DC2). Τα CD123+ ΔΚ είναι μία σημαντική πηγή ιντερφερόνης τύπου 1 κατόπιν προσβολής από ιό (13,14). Τα CD11c+ μυελικά ΔΚ θεωρήθηκαν αρχικά ότι κατευθύνουν τα T-κύτταρα προς Th1 απαντήσεις (έκκριση IFNγ, IL-2, TNFα), για αυτό και είναι γνωστά ως DC1. Το σύστημα παραγωγής ΔΚ φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη

ευελιξία από ό,τι αρχικά θεωρούνταν, καθώς τόσο μυελικά όσο και λεμφικά ΔΚ μπορούν να προκύψουν είτε από μυελικά είτε από λεμφικά προγονικά κύτταρα (57).

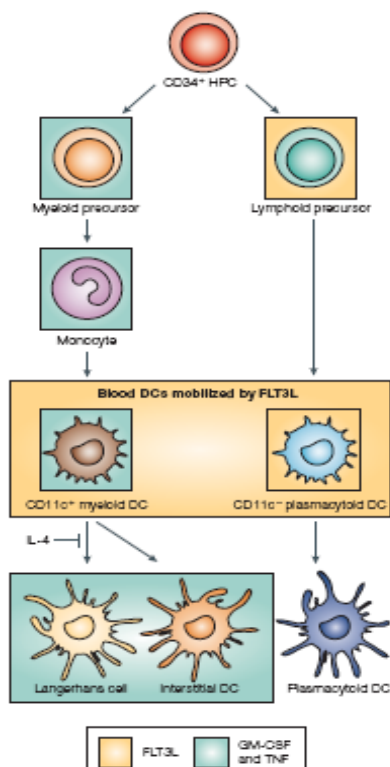
Η χρήση αυξητικών παραγόντων όπως G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) και Flt3 ligand μπορεί να αυξήσει το ποσοστό των δύο παραπάνω τύπων ΔΚ στο περιφερικό αίμα *in vivo*. *In vitro*, ανθρώπινα ΔΚ μπορούν να παραχθούν από CD34 προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος κατόπιν καλλιέργειας με διάφορους συνδυασμούς κυτταροκινών, όπως TNF α , GM-CSF, Flt3 ligand, CD40 ligand, SCF (stem cell factor) ή TGF β (transforming growth factor β). Εναλλακτικά, τα ΔΚ μπορούν να παραχθούν από CD14 μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, μετά από καλλιέργεια παρουσία GM-CSF και IL-4 (ή IL-13). Αυτά τα κύτταρα έχουν τα χαρακτηριστικά άωρων ΔΚ και μπορούν να ωριμάσουν περαιτέρω με χρήση παραγόντων φλεγμονής όπως TNF α , IL-1 β , LPS, CD40 ligation κ.α (εικόνα 3).

Τα ανθρώπινα ΔΚ χαρακτηρίζονται από την επιφανειακή έκφραση μεγάλου αριθμού μορίων MHCII (major histocompatibility complex class II) και από την απουσία χαρακτηριστικών δεικτών όπως CD14 (για μονοκύτταρα-μακροφάγα), CD3 (για τα T- λεμφοκύτταρα), CD19, CD20 και CD24 (για τα B λεμφοκύτταρα), CD56 (για τα NK κύτταρα) και CD66b (για τα κοκκιοκύτταρα). Ο δείκτης επιφανείας CD1a εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα άωρα ΔΚ. Τα ώριμα ΔΚ εκφράζουν υψηλά επίπεδα του χαρακτηριστικού δείκτη CD83, όπως επίσης και μορίων συνδιέγερσης (CD80/B7.1, CD86/B7.2, CD40) και προσκόλλησης, όπως CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58 και CD102.

Στην εικόνα 4 φαίνονται οι διαφορετικές υποομάδες των ΔΚ του ανθρώπου.



Εικόνα 3: χαρακτηριστική μορφολογία άωρων (αριστερά) και ώριμων, μετά από προσθήκη LPS (δεξιά) ΔΚ προερχόμενων από μονοκύτταρα (moDCs), με μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων. Μεγέθυνση X1000. (από J. Transl. Med. 2007, 5:19)



Εικόνα 4: υποομάδες των ανθρώπινων ΔΚ. Ο πληθυσμός των ΔΚ του περιφερικού αίματος, ο οποίος μπορεί να κινητοποιηθεί με Flt3-L, περιέχει CD11c⁺ μυελικά ΔΚ και CD11c⁻ πλασματοκυτταροειδή ΔΚ. Μέχρι τώρα, οι περισσότερες μελέτες έχουν διεξαχθεί με ΔΚ που παράγονται από την καλλιέργεια μονοκυττάρων με GM-CSF και IL-4. Αυτή η απλή διαδικασία παράγει έναν ομοιογενή πληθυσμό κυττάρων που θυμίζει τα διάμεσα (interstitial) ΔΚ και είναι απαλλαγμένος από κύτταρα Langerhans. Αυτά τα ΔΚ είναι άωρα και απαιτούν εξωγενείς παράγοντες για την ωρίμανσή τους. Τα ΔΚ μπορούν επίσης να παραχθούν με καλλιέργεια CD34 προγονικών κυττάρων ή μονοκυττάρων με GM-CSF και TNF. Με αυτόν τον τρόπο, παράγονται δύο πληθυσμοί ΔΚ: κύτταρα Langerhans, που ίσως έχουν μεγαλύτερη απόδοση στη διέγερση CTLs, και διάμεσα ΔΚ, που θυμίζουν τα moDCs. Η προσθήκη IL-4 σε CD34 στελεχιαία κύτταρα, παρουσία GM-CSF και TNF, εμποδίζει τη διαφοροποίηση κυττάρων Langerhans. Τα γαλάζια πλαίσια υποδεικνύουν τους τύπους κυττάρων που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε καλλιέργεια με GM-CSF και TNF. Τα πορτοκαλί πλαίσια υποδεικνύουν τους κυτταρικούς τύπους που μπορούν να διαφοροποιηθούν με καλλιέργεια ή κινητοποίηση με Flt3-L [από Nature Rev. Immunol.(37)].

2. Πρόσληψη αντιγόνου, μετανάστευση και ωρίμανση

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ΔΚ σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης είναι η κινητικότητά τους, η οποία ρυθμίζεται στενά από τις χημειοκίνες και την έκφραση των αντίστοιχων υποδοχέων στην επιφάνεια των ΔΚ. Τα ΔΚ μεταναστεύουν από το μυελό των οστών προς τους περιφερικούς ιστούς, όπου η συνάντησή τους με αντιγόνα επάγει τη μετανάστευσή τους προς τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Εκεί, τα φέροντα αντιγόνο ΔΚ επιλέγουν τα λεμφοκύτταρα με την αντίστοιχη αντιγονική ειδικότητα. Η εκλεκτική μετανάστευση των ΔΚ και η παραμονή τους στα μη λεμφικά και στα λεμφικά όργανα βρίσκεται υπο το στενό έλεγχο της έκφρασης των σωστών υποδοχέων χημειοκινών κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης.

Χημειοταξία των πρόδρομων ΔΚ

Τα νεοπαραχθέντα πρόδρομα ΔΚ μεταναστεύουν μέσω του αίματος από το μυελό των οστών προς τους περιφερικούς ιστούς υπο την επίδραση των χημειοκινών CCL2 και CXCL12, τους υποδοχείς των οποίων (CCR2, CXCR4) φέρουν στην επιφάνειά τους(58). Τα ΔΚ συγκεντρώνονται ταχέως (μέσα σε μία ώρα) στα σημεία εναπόθεσης αντιγόνου, όπως έχει φανεί σε βρογχικά επιθήλια μετά από εισπνοή αντιγόνου. Παρουσία φλεγμονής, τα ΔΚ ελαττώνουν την έκφραση των παραπάνω υποδοχέων και αυξάνουν την έκφραση του CCR6, του οποίου ο συνδέτης (MIP-3α) φαίνεται να είναι η ισχυρότερη χημειοκίνη που κατευθύνει τη μετανάστευση των ΔΚ προς τα φλεγμαίνοντα επιθήλια. Τα άωρα ΔΚ εκφράζουν επίσης τους υποδοχείς CCR1, CCR5 και CXCR2, των οποίων οι συνδέτες (CCL3, CCL5, CXCL8 και CCL20), έχουν αυξημένη έκφραση κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης, τα ΔΚ εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες προσκόλλησης(1). Για παράδειγμα, η έκφραση του μορίου E-cadherin εξασφαλίζει την παραμονή των κυττάρων Langerhans στην επιδερμίδα. Η επαφή με το αντιγόνο έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης E-cadherin, επιτρέποντας έτσι τη μετανάστευση των LCs έξω από την επιδερμίδα. Η παραγωγή κολλαγενάσης τύπου IV από τα LCs μπορεί να διευκολύνει το πέρασμά τους δια μέσου των βασικών μεμβρανών. Παρομοίως, η ελαστάση των ανθρώπινων μακροφάγων, που αποδομεί διάφορα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, εκφράζεται σε υψηλό βαθμό από τα ΔΚ και μπορεί έτσι να συνεισφέρει στη μετανάστευσή τους.

Πρόσληψη αντιγόνου

Τα ΔΚ των ιστών “αιχμαλωτίζουν” παθογόνους μικροοργανισμούς, μολυσμένα και νεκρά κύτταρα ή προϊόντα που προέρχονται από αυτά για αντιγονοπαρουσίαση. Πολλές φορές, η αναγνώριση και πρόσληψη του παθογόνου παράγοντα συνοδεύεται από την ενεργοποίηση/ωρίμανση των ΔΚ(9).

Ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέα: τα άωρα ΔΚ του ποντικού εκφράζουν υποδοχείς για το σταθερό τμήμα των ανοσοσφαιρινών (FcRs): FcγRI (CD64), FcγRIII (CD16) και FcγRII (CD32). Στον άνθρωπο, τα ΔΚ που παράγονται από μονοκύτταρα (moDCs) εκφράζουν κυρίως FcγRII (CD32) και FcαR (CD89). Τα LCs εκφράζουν FcγRI και FcεRI (CD23). Τα ΔΚ του αίματος εκφράζουν FcγRII και FcγRI. Τα άωρα ΔΚ εκφράζουν τους υποδοχείς συμπληρώματος CR3 και CR4, όχι όμως CR1 και CR2.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins, hsps) εξέρχονται από νεοπλασματικά ή μολυσμένα κύτταρα και ενεργοποιούν αντιγονοειδικές T λεμφοκυτταρικές απαντήσεις *in vivo*. Οι hsp70 και gp96 προσδένονται σε ΑΠΚ και εισέρχονται στα κύτταρα μέσω ειδικών μεμβρανικών υποδοχών. Πρόσφατα, το CD91, ο υποδοχέας α2 μακροσφαιρίνης, αναγνωρίστηκε ως υποδοχέας gp96 και hsp70 σε ΑΠΚ ποντικού.

Οι υποδοχείς scavenger (SRs) είναι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης χημικά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Οι SRs παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή γιατί εμπλέκονται στην ενδοκυττάρωση διαφόρων βακτηρίων. Οι SRs κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη δομή τους, και τα ΔΚ εκφράζουν τουλάχιστον έναν, το CD36, που εμπλέκεται στην πρόσληψη αποπτωτικών σωμάτων. Έχουν πρόσφατα αναγνωριστεί και άλλοι SRs στα ΔΚ για πρόσδεση βακτηρίων, όπως *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*.

Οι λεκτίνες τύπου C προσδένουν τους συνδέτες τους με τρόπο εξαρτώμενο από το ασβέστιο. Τα ΔΚ εκφράζουν διάφορες διαμεμβρανικές λεκτίνες τύπου C, όπως τον MMR (macrophage mannose receptor) και το DEC205. Ο MMR προσδένει διάφορους μονοσακχαρίτες όπως επίσης και μια μεγάλη ποικιλία από αντιγόνα παθογόνων παραγόντων, πχ από ζυμομύκητες. Εκφράζεται στα moDCs, όπου εμπλέκεται στην πρόσληψη του αντιγόνου και στη μεταφορά του στα ενδοσώματα και λυσοσώματα. Ο MMR εκφράζεται επίσης στα ΔΚ του αίματος και στα διάμεσα ΔΚ, όχι όμως στα LCs. Ο DEC205 του ποντικού περιγράφηκε πρώτα στα ώριμα ΔΚ, στα LCs και σε θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Σε αντίθεση με τον MMR, που ανακυκλώνεται μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και των πρώιμων ενδοσωμάτων, ο DEC205 ακολουθεί ένα ασυνήθιστο ενδοκυττάριο μονοπάτι μετά την πρόσληψη του αντιγόνου περνώντας μέσα από όψιμα ενδοκυτταρικά τμήματα. Στους

ανθρώπους, ο DEC205 έχει αναφερθεί στα ΔΚ του αίματος και η λειτουργία του είναι υπο μελέτη.

Τα μόρια DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin) και Langerin είναι δύο λεκτίνες με ειδικότητα για τη μαννόζη που εκφράζονται αποκλειστικά στα διάμεσα ΔΚ και στα LCs, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με το DC-SIGN, που εμπλέκεται κυρίως σε διαδικασίες προσκόλλησης, το Langerin προκαλεί το σχηματισμό ενός μοναδικού ενδοκυτταρικού τμήματος των LCs, των κοκκίων Birbeck.

Φαγοκυττάρωση και μακροπινοκυττάρωση: σωματιδιακά και διαλυτά αντιγόνα ενδοκυτταρώνονται αποδοτικά μέσω φαγοκυττάρωσης και μακροπινοκυττάρωσης, αντίστοιχα. Και οι δύο διαδικασίες εξαρτώνται από την ακτίνη, απαιτούν αναδιάταξη της μεμβράνης και καταλήγουν στο σχηματισμό μεγάλων ενδοκυττάρων κενοσωμάτων. Η φαγοκυττάρωση γίνεται γενικά μέσω υποδοχέα, ενώ η μακροπινοκυττάρωση είναι ένας τύπος ενδοκυττάρωσης υγρής φάσης που εξαρτάται από τον κυτταρικό σκελετό. Στα άωρα ΔΚ, η μακροπινοκυττάρωση είναι συνεχής και αποτελεί ένα κρίσιμο μονοπάτι πρόσληψης αντιγόνου που τους επιτρέπει να παίρνουν δείγματα από μεγάλες ποσότητες περιβάλλοντος υγρού με τρόπο γρήγορο και μη ειδικό. Η φαγοκυττάρωση, αντίθετα, ξεκινά με την πρόσδεση συγκεκριμένων υποδοχέων, ενεργοποιώντας ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος που απαιτείται για τον πολυμερισμό της ακτίνης και την αποτελεσματική εγκόλπωση του αντιγόνου.

Έχει αναφερθεί ότι τα άωρα ΔΚ φαγοκυτταρώνουν σχεδόν όλα τα βακτήρια: GRAM⁺ κόκκους (*Streptococcus aureus* και *Streptococcus gordonii*), GRAM⁺ βάκιλλους (*Listeria monocytogenes*) και GRAM⁻ (*Salmonella typhimurium* και *Escherichia coli*), και μυκοβακτήρια (*Mycobacterium tuberculosis*). Τα άωρα ΔΚ φαγοκυτταρώνουν επίσης τους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida albicans*. Τέλος, τα ΔΚ σπληνός ποντικού ενδοκυτταρώνουν παράσιτα όπως *Leishmania (L.) major*, *L.donovani* και *L.mexicana*.

Τα άωρα ΔΚ ενδοκυτταρώνουν επίσης αποπτωτικά και νεκρωτικά σωμάτια. *In vitro*, η απόπτωση επάγεται από προσβολή από ιό, ακτινοβολία με ακτίνες χ, γ ή υπεριώδεις, στέρση ορού στο θρεπτικό υλικό, χρήση Fas ή Trail συνδετών και επεξεργασία με Brefeldin A. Η νέκρωση επιτυγχάνεται γενικώς με κύκλους κατάψυξης-απόψυξης ή με θέρμανση των κυττάρων στους 50⁰C. Τα ανθρώπινα

moDCs φαγοκυττάρωνουν αποπτωτικά και νεκρωτικά σωμάτια από T και B κυτταρικές σειρές, αποπτωτικά μονοκύτταρα μολυσμένα από ιό ή από καρκινικές κυτταρικές σειρές, πχ μελάνωμα και αδenoκαρκίνωμα του νεφρού. Η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών επιθηλιακών κυττάρων από LCs ποντικού παρατηρήθηκε με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε κατάλληλες τομές. Επιπλέον, ανοσοϊστοχημεία σε λεμφαδένες αρουραίου φανέρωσε μεταφορά αποπτωτικών σωματίων από την επιδερμίδα στις T λεμφοκυτταρικές περιοχές των λεμφαδένων μέσω ΔΚ.

Οι υποδοχείς που διεξάγουν την εγκόλπωση των θανόντων κυττάρων έχουν αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό. Τα μακροφάγα χρησιμοποιούν υποδοχείς συμπληρώματος, το CD14, ιντεγκρίνες (συμπεριλαμβανομένων των ανβ3 και ανβ5, που δρουν συνεργιστικά με το CD36) και scavenger υποδοχείς. Στα ΔΚ, η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων γίνεται μέσω ενός συμπλέγματος που περιλαμβάνει τα CD36, ανβ5 ή ανβ3.

Ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης στα ΔΚ: η αποδοτική ενδοκυττάρωση των αντιγόνων είναι χαρακτηριστικό των άωρων ΔΚ. Κατά την ωρίμανση, τα ΔΚ μειώνουν την ικανότητα ενδοκυττάρωσης, περιορίζοντας έτσι το εύρος των αντιγόνων που θα μπορούν να παρουσιάσουν αφού φύγουν από τους περιφερικούς ιστούς. Η μείωση της ικανότητας για ενδοκυττάρωση συμβαίνει μέσω δύο ανεξάρτητων μηχανισμών: ελάττωση της επιφανειακής έκφρασης των περισσότερων αντιγονικών υποδοχέων (πχ MMR, FcR) και ελάττωση της μακροπινοκυττάρωσης και της φαγοκυττάρωσης.

Ενεργοποίηση/ωρίμανση των ΔΚ

Το αντιγόνο/παθογόνος παράγοντας ωθεί το άωρο ΔΚ προς φαινοτυπικές και λειτουργικές αλλαγές που κορυφώνονται στην πλήρη μετάβασή του από κύτταρο που προσλαμβάνει αντιγόνο σε ΑΠΚ. Η ωρίμανση των ΔΚ συνδέεται στενά με την μετανάστευσή τους από τους περιφερικούς ιστούς στα λεμφικά όργανα. Είναι μια συνεχής διαδικασία που αρχίζει στην περιφέρεια με την επαφή με το αντιγόνο και ολοκληρώνεται κατά την αλληλεπίδραση ΔΚ-T κυττάρων. Τα ΔΚ ανταποκρίνονται σε δύο τύπους σημάτων: άμεση αναγνώριση παθογόνων παραγόντων (μέσω

υποδοχέων αναγνώρισης ειδικών μοτίβων) και έμμεση αναγνώριση της λοίμωξης (μέσω φλεγμονωδών κυτταροκινών, ενδοκυττάρων συστατικών και συνεχιζόμενων ανοσιακών αποκρίσεων). Ανταποκρινόμενα σε αυτά τα σήματα, τα ΔΚ ενεργοποιούνται για να εισέλθουν σε ένα ενιαίο αναπτυξιακό πρόγραμμα που ονομάζεται ωρίμανση και που μεταμορφώνει τα ΔΚ σε αποτελεσματικούς διεγέρτες των Τ-κυττάρων(1,9).

Πέντε τύποι υποδοχέων έχουν αναφερθεί να προκαλούν την ωρίμανση των ΔΚ: α. Toll-like υποδοχείς (TLRs), β. υποδοχείς κυτταροκινών, γ. υποδοχείς της οικογένειας TNF, δ. FcRs και ε. αισθητήρες κυτταρικού θανάτου.

α. τα ΔΚ ωριμάζουν ανταποκρινόμενα σε διάφορα συστατικά παθογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων συστατικών του βακτηριακού τοιχώματος (όπως λιποπολυσακχαρίτης, LPS), μη μεθυλιωμένα CpG μοτίβα και δίκλωνο RNA. Τα περισσότερα από αυτά τα μόρια αναγνωρίζονται από μία μεγάλη οικογένεια επιφανειακών υποδοχέων (TLRs). Σε διαφορετικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, διαφορετικά παθογόνα μοτίβα αναγνωρίζονται ειδικά από έναν ή συνδυασμούς TLRs. Για παράδειγμα, ο TLR4 ρυθμίζει απαντήσεις σε GRAM-βακτήρια προσδεδεμένος στο LPS, ο TLR2 εμπλέκεται σε απαντήσεις σε διαφορετικά συστατικά του GRAM+ βακτηριακού τοιχώματος (πεπτιδογλυκάνες) και σε βακτηριακές λιποπρωτεΐνες, ο TLR5 αναγνωρίζει τη φλαγγελίνη από GRAM+ και GRAM- βακτήρια και ο TLR9 προσδένει μη μεθυλιωμένα CpG μοτίβα. Τα ΔΚ εκφράζουν υποδοχείς αυτής της οικογένειας, όπως TLR2, TLR3 και TLR4. Ο TLR2 επάγει την ωρίμανση των ΔΚ μετά από επαφή με βακτηριακές πεπτιδογλυκάνες, λιποπεπτίδια και λιποπρωτεΐνες μυκοπλάσματος.

β. τα ΔΚ ανιχνεύουν τον κίνδυνο και τις λοιμώξεις έμμεσα μέσω διαμεσολαβητών φλεγμονής, όπως TNFα, IL-1β, PGE₂, των οποίων η έκκριση επάγεται από παθογόνους παράγοντες.

γ. τα CD4 κύτταρα επάγουν την ωρίμανση των ΔΚ τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Πρόσδεση του CD40 των ΔΚ από το CD40 ligand των Τ-κυττάρων προκαλεί ωρίμανση των ΔΚ, αλλά υπάρχουν και μηχανισμοί ανεξάρτητοι από το CD40. Πρόσδεση του Fas και του OX40 ligand στα ΔΚ από τους Fas ligand και OX40, αντίστοιχα, στα Τ-κύτταρα μπορεί να προκαλέσει ωρίμανση.

δ. τα ΔΚ μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν μέσω υποδοχέων ανοσοσφαιρινών. Δέσμευση των περισσότερων FcRs, συμπεριλαμβανομένων των FcγRI, FcγRII και FcγRIII, από ανοσοσύμπλοκα ή αντισώματα επάγει την ωρίμανση των ΔΚ.

ε. ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να αποτελέσει σήμα κινδύνου για τα ΔΚ. Μελέτες έχουν δείξει ότι νεκρωτικά και αποπτωτικά σωμάτια μπορούν να επάγουν *in vitro* την ωρίμανση ΔΚ ανθρώπου και ποντικού. Η φύση των στοιχείων που ενεργοποιούν τα ΔΚ είναι υπο μελέτη. Νουκλεοτίδια, όπως ATP και UTP μπορεί να δρουν μέσω πουρινεργικών υποδοχέων. Hsps όπως gp96, hsp70 και hsp90 εξέρχονται από νεκρωτικά κύτταρα και μπορεί να προκαλούν ωρίμανση των ΔΚ. Αν και το CD91 έχει αναγνωριστεί ως υποδοχέας των παραπάνω πρωτεϊνών, ο ρόλος του στην ενεργοποίηση των ΔΚ χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Η διαδικασία της ωρίμανσης συνδέεται με αρκετά συντονισμένα γεγονότα όπως: α. απώλεια των υποδοχέων φαγοκυττάρωσης/ενδοκυττάρωσης, β. αύξηση της έκφρασης των μορίων συνδιέγερσης CD40, CD80 και CD86, γ. αλλαγές στη μορφολογία, δ. αλλαγές στα λυσοσώματα με ελάττωση της έκφρασης του CD68 και αύξηση του DC-LAMP (lysosome associated membrane protein) και ε. αλλαγές στα MHCII τμήματα. Οι μορφολογικές αλλαγές που συνοδεύουν την ωρίμανση των ΔΚ περιλαμβάνουν απώλεια δομών προσκόλλησης, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και επίτευξη υψηλής κινητικότητας.

Μετανάστευση των ΔΚ που φέρουν αντιγόνο

Μοντέλα αλλογενούς μεταμόσχευσης δέρματος, όπως και ενέσεις σημασμένων ΔΚ, δείχνουν ότι τα ΔΚ φεύγουν από την περιφέρεια μέσω της λέμφου (1). Προϊόντα παθογόνων, όπως LPS, και η τοπική παραγωγή TNFα ή IL-1, και τα δύο μεσολαβητές της ωρίμανσης των ΔΚ, επάγουν τη μετανάστευσή τους από την περιφέρεια προς την Τ λεμφοκυτταρική περιοχή των λεμφικών οργάνων. Αυτή η μετανάστευση περιλαμβάνει επίσης τη συνδυασμένη δράση αρκετών χημειοκινών. Μετά την πρόσληψη του αντιγόνου, φλεγμονώδη ερεθίσματα μειώνουν την ανταπόκριση των άωρων ΔΚ στην MIP-3α (και στις άλλες χημειοκίνες που είναι ειδικές για τα άωρα ΔΚ) είτε μέσω ελάττωσης της έκφρασης των αντίστοιχων υποδοχέων είτε μέσω ελάττωσης της ευαισθησίας του υποδοχέα. Συνεπώς, τα ΔΚ

ξεφεύγουν από την τοπική επίδραση της MIP-3α. Κατά την ωρίμανση, τα ΔΚ αυξάνουν την έκφραση των υποδοχέων CCR7 και CCR8(58), αποκτώντας έτσι ευαισθησία στις χημειοκίνες CCL1, CCL19 και CCL21, οι οποίες εκφράζονται συνεχώς στα λεμφικά αγγεία και στους λεμφαδένες. Έτσι τα ΔΚ που ωριμάζουν αφήνουν τους φλεγμαίνοντες ιστούς και, μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας, κατευθύνονται προς τις κατάλληλες περιοχές των λεμφαδένων, ανταποκρινόμενα στις CCL19 και CCL21 που παράγονται από κύτταρα διάσπαρτα στην Τ λεμφοκυτταρική περιοχή. Τα νεοαφιχθέντα ΔΚ μπορούν και τα ίδια να γίνουν παραγωγοί CCL19 και CCL21, επιτρέποντας έτσι την ενίσχυση του χημειοτακτικού σήματος. Δεδομένου ότι αυτές οι δύο χημειοκίνες προσελκύουν ώριμα ΔΚ και παρθένα Τ λεμφοκύτταρα, είναι πιθανό να παίζουν κρίσιμο ρόλο στη συνάντηση των ΔΚ με τα αντιγονοειδικά Τ-κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της επαφής με τα Τ-κύτταρα, τα ΔΚ λαμβάνουν επιπλέον σήματα ωρίμανσης από τα μόρια CD40 ligand, RANK/TRANCE, 4-1BB και OX-40 ligand, επάγοντας έτσι την έκκριση άλλων χημειοκινών, πχ IL-8.

3. Επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου

Τα CD8 και τα CD4 λεμφοκύτταρα εκφράζουν κλωνικά κατανεμημένους υποδοχείς που αναγνωρίζουν αντιγονικούς επιτόπους (πεπτίδια) σχετιζόμενα με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) τάξης I και II, αντίστοιχα. Η αποδόμηση των αντιγόνων και η φόρτιση των MHC με αντιγονικά πεπτίδια γίνεται ενδοκυττάρια στα ΑΠΚ. Τα τελευταία 30 χρόνια, η διαδικασία αυτή αναλύθηκε διεξοδικά (9). Η αυστηρή τμηματοποίηση της βιογένεσης των MHC I και II έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσίαση εξωγενών αντιγόνων από MHC II μέσω της ενδοκυτταρικής οδού, και την επιλεκτική παρουσίαση ενδογενών, αλλά όχι εξωγενών, αντιγόνων από MHC I μόρια μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Αυτό το μοντέλο εξηγεί την επιλεκτική δράση των CD8 κυτταροτοξικών κυττάρων έναντι κυττάρων μολυσμένων από ιό, που εκφράζουν ενδογενή ιικά αντιγόνα, αλλά όχι έναντι γειτονικών κυττάρων που έχουν ενσωματώσει ανενεργό ιό ή έναντι αποπτωτικών μολυσμένων κυττάρων. Αυτό το μοντέλο είναι, ωστόσο, σε αντίθεση με μελέτες που έγιναν περισσότερο από 20 χρόνια πριν και έδειξαν ότι η ενεργοποίηση CD8 CTLs *in vivo* μπορεί να συμβεί και μετά από παρουσίαση εξωγενών αντιγόνων από MHC I μόρια. Πρόσφατα πειράματα σε ΔΚ συμφιλίωσαν αυτά τα δύο μοντέλα δείχνοντας ότι, εκτός από τα MHC II, εξωγενή αντιγόνα μπορούν επίσης να παρουσιαστούν από MHC I μόρια, φαινόμενο που είναι γνωστό σαν διασταυρούμενη παρουσίαση (cross presentation) (8).

3.1 Παρουσίαση από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I

Ενδογενής MHC I οδός παρουσίασης

Τα μόρια MHC I εκφράζονται στην επιφάνεια της μεγάλης πλειοψηφίας των κυττάρων του σώματος. Στον άνθρωπο, αντιστοιχούν στα μόρια HLA A, B και C (7). Τα πεπτίδια που παρουσιάζονται έχουν μήκος 8-10 αμινοξέα και παράγονται από την αποδόμηση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών σημασμένων με ομπικιτίνη

από το πρωτεάσωμα. Τα πεπτίδια που προκύπτουν μεταφέρονται στο ΕΔ από εξειδικευμένους πρωτεϊνικούς μεταφορείς (transporters associated with antigen processing, TAP) και προσδένονται σε νέα MHC I μόρια υπο τον έλεγχο ενός συμπλέγματος που αποτελείται από διάφορους μοριακούς συνοδούς του ΕΔ (καλνεξίνη, καλρετικουλίνη κ.α.). Μόλις συνδεθούν με τα πεπτίδια, τα MHC I μεταφέρονται γρήγορα μέσω του συμπλόκου Golgi στην κυτταρική μεμβράνη. Όπως και άλλα κύτταρα, έτσι και τα ΔΚ παρουσιάζουν εαυτά ή ιϊκής προέλευσης ενδογενή αντιγόνα. Μελέτες στα ΔΚ έδειξαν ότι η σύνθεση και η διάρκεια ημιζωής των MHC I μορίων αυξάνονται με την επαγωγή ωρίμανσης, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα MHC II. Είναι ενδιαφέρον ότι, σε αντίθεση με τα MHC II μόρια, τα MHC I συνεχίζουν να συνθέτονται και να μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου σε ώριμα ΔΚ, κάτι που δείχνει τις λειτουργικές διαφορές στη ρύθμιση της αντιγονοπαρουσίασης για τα CD4 και CD8 κύτταρα. Επιπλέον, τα ΔΚ εκφράζουν συνεχώς χαμηλά επίπεδα του ανοσοπρωτεασώματος, που αποτελεί τον κύριο τύπο πρωτεασώματος στα ώριμα ΔΚ. Αυτή η αλλαγή στη σύνθεση του πρωτεασώματος μπορεί να αυξάνει την αποδοτικότητα της παρουσίασης ορισμένων επιτόπων, μειώνοντας παράλληλα την παρουσίαση άλλων.

Διασταυρούμενη παρουσίαση (cross presentation) εξωγενών αντιγόνων

Εξωγενή αντιγόνα που εισέρχονται στο ΔΚ από διάφορες οδούς μπορούν να παρουσιαστούν από μόρια MHC I (9). Η φαγοκυττάρωση είναι μία από τις βασικότερες οδούς που οδηγούν σε διασταυρούμενη παρουσίαση. Φαγοκυττάρωση βακτηρίων, αποπτωτικών σωματίων κυττάρων νεοπλασματικών ή προσβεβλημένων από ιό, νεκρωτικών κυττάρων ή λυμένων κυττάρων, όλα καταλήγουν σε διασταυρούμενη παρουσίαση. Το ίδιο συμβαίνει και με τα εξωσώματα, μικρά μεβρανικά κυστίδια που εκκρίνονται από καρκινικά και άλλα κύτταρα, περιέχουν αντιγόνα του όγκου και η πρόσληψή τους από ΔΚ οδηγεί σε διασταυρούμενη παρουσίαση. Επιπλέον, αποδοτική είναι και η πρόσληψη ανοσοσυμπλόκων, οψωνισμένων λιπιδωμάτων ή οψωνισμένων νεκρών κυττάρων μέσω FcR υποδοχέων, όπως και η πρόσληψη πεπτιδίων συνδεδεμένων

με hsps, όπως gp96, hsp90, hsp60 και hsp70. Σε κανονικές συνθήκες, οι hsps είναι συνδεδεμένες με ενδογενή πεπτίδια. Για παράδειγμα, η σύνδεση της gp96 με πεπτίδια γίνεται στο ΕΔ και εξαρτάται από τους TAP. Οι hsps απελευθερώνονται με τον κυτταρικό θάνατο και μπορούν να προσληφθούν από ΑΠΚ μέσω ειδικών υποδοχέων, πχ CD91. Τα συνδεδεμένα με τις hsps πεπτίδια μεταφέρονται στα MHC I και MHC II μόρια για παρουσίαση. Τέλος, αντιγόνα συνδεδεμένα με βακτηριακά προϊόντα, πχ τοξίνες, εισέρχονται στα κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων και μπορούν να προκαλέσουν διασταυρούμενη παρουσίαση.

Δύο βασικές ενδοκυττάρειες οδοί για τη διασταυρούμενη παρουσίαση έχουν αναφερθεί, η μία σχετιζόμενη με τα ενδοσώματα και η άλλη με το ΕΔ. Η ενδοσωματική οδός είναι γενικά ανθεκτική σε αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης και του πρωτεασώματος, είναι ανεξάρτητη από τους TAP και ευαίσθητη σε αναστολείς της λυσοσωματικής λειτουργίας. Αντιθέτως, η σχετιζόμενη με το ΕΔ οδός είναι ευαίσθητη σε αναστολείς πρωτεασώματος και απαιτεί την έκφραση TAP. Αυτό το μονοπάτι προϋποθέτει τη μεταφορά του αντιγόνου από τα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα.

Η ανεξάρτητη από τους TAP ενδοσωματική οδός προϋποθέτει την παρουσία MHC I μορίων στο μονοπάτι αυτό. Πράγματι, ανακυκλούμενα MHC I βρίσκονται σε ενδοσώματα και λυσοσώματα σε Β κύτταρα και ΔΚ. Στα ΔΚ, τα MHC I, όπως και τα MHC II, επαναδιανέμονται στην κυτταρική μεμβράνη με την επαγωγή ωρίμανσης. Αυτό το μονοπάτι έχει αναφερθεί για διάφορες μορφές αντιγόνων σε Β κύτταρα και μακροφάγα. Είναι πιθανό ότι το χαμηλό ενδοσωματικό pH επιτρέπει στα αντιγονικά πεπτίδια που παράγονται στα ενδοσώματα να πάρουν τη θέση των ενδογενών πεπτιδίων που είναι συνδεδεμένα με τα ανακυκλούμενα MHC I μόρια.

Η εξαρτώμενη από τους TAP οδός διασταυρούμενης παρουσίας έχει αναφερθεί σε ΔΚ σε διάφορα πειραματικά συστήματα. Αφορά διαλυτά αντιγόνα και αντιγόνα συνδεδεμένα με σφαιρίδια, αντισώματα και hsps. Η εξάρτηση της διασταυρούμενης παρουσίας από τους TAP οδήγησε την έρευνα στην αναζήτηση μεμβρανικών οδών μεταφοράς που συνδέουν τα ενδοσώματα με το κυτταρόπλασμα. Η ύπαρξη μιας τέτοιας οδού έχει αποδειχθεί σε μακροφάγα και ΔΚ. Πράγματι, τα ΔΚ έχουν ένα μοναδικό τέτοιο μονοπάτι που επιτρέπει την επιλεκτική μεταφορά προσληφθέντων αντιγόνων στο κυτταρόπλασμα. Το πιθανότερο είναι ότι, ανάλογα με το αντιγόνο, τον τύπο του κυττάρου και την οδό

πρόσληψής του, η φόρτιση των MHC I με πεπτίδια μπορεί να γίνεται στα ενδοσώματα, στο ΕΔ ή και στα δύο. Έχει πάντως φανεί ότι η διασταυρούμενη παρουσίαση *in vivo* είναι κυρίως TAP εξαρτώμενη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταφορά του αντιγόνου στο κυτταρόπλασμα μπορεί να απαιτείται για την επαγωγή CTL (cytotoxic T lymphocytes) αποκρίσεων *in vivo*. Αυτή η οδός εμπλέκεται σε ανοσιακές αποκρίσεις έναντι αντιγόνων μεταμόσχευσης, σωματιδιακών αντιγόνων, όγκων και ιών, όπως επίσης και στην ανάπτυξη ανοσιακής ανοχής.

3.2 Παρουσίαση από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II

Τα μόρια MHCII εκφράζονται κυρίως στα ΑΠΚ (μακροφάγα, Β κύτταρα και ΔΚ). Στον άνθρωπο, αντιστοιχούν στα HLA-D μόρια (7). Παρουσιάζουν πεπτιδία μεγαλύτερου μήκους, συνήθως 15-34 αμινοξέα, η σύνδεση των οποίων γίνεται μέσω διαφορετικής οδού. Μετά τη σύνθεσή τους στο ΕΔ, τρία α/β MHCII διμερή συνδέονται σε ένα τριμερές Ii (invariant chains) και φεύγουν από το ΕΔ περνώντας μέσα από το σύμπλοκο Golgi πριν μεταφερθούν στην ενδοσωματική οδό, υπο την επίδραση σημάτων που περιέχονται στην κυτταροπλασματική περιοχή του Ii. Μόλις φτάσουν στην περιοχή των ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων, τα σύμπλοκα συναντούν ένα όξινο και πλούσιο σε πρωτεάσες περιβάλλον, στο οποίο το Ii αποσυντίθεται από πρωτεολυτικά ένζυμα της οικογένειας της καθεψίνης. Τα διμερή MHCII γίνονται ικανά να προσδέσουν αντιγονικά πεπτιδία υπο τον έλεγχο δύο μη πολυμορφικών MHCII μορίων, HLA-DM/H2-M και HLA-DO/H2-O (στον άνθρωπο και στο ποντίκι). Μόλις συνδεθούν με τα πεπτιδία, τα MHCII μόρια αποκτούν πρόσβαση στην κυτταρική μεμβράνη. Η αποδόμηση των αντιγόνων στην ενδοσωματική οδό και η παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων απαιτεί αρκετές πρωτεάσες, μεταξύ των οποίων καθεψίνες και ασπαραγινιλικές ενδοπεπτιδάσες. Έτσι, τα MHCII μόρια προσδένουν κυρίως πεπτιδία προερχόμενα από εξωγενή αντιγόνα που εισέρχονται στην ενδοσωματική οδό, αν και υπάρχουν αρκετές αναφορές για ενδογενή αντιγόνα που παρουσιάζονται σε MHCII μόρια.

Βασικό χαρακτηριστικό των ΔΚ είναι η στενή ρύθμιση της επιφανειακής έκθεσης των συμπλεγμάτων MHCII με πεπτιδία κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του κυττάρου(9). Τα άωρα ΔΚ εκθέτουν πολύ λίγα MHCII συμπλέγματα στην επιφάνειά τους. Αρκετοί ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί συνεργάζονται για την επίτευξη αυτού του φαινοτύπου. Κατά πρώτον, η αποδόμηση των αντιγόνων είναι ανεπαρκής στα άωρα ΔΚ, και τα αντιγόνα μπορούν να παραμείνουν άθικτα στα λυσοσώματα για μέρες. Η διαθεσιμότητα αντιγονικών πεπτιδίων για φόρτωση στα MHCII είναι, λοιπόν, περιορισμένη. Η κακή αποδόμηση αντιγόνων στα άωρα ΔΚ οφείλεται στη χαμηλή δράση αρκετών πρωτεασών, συμπεριλαμβανομένης της καθεψίνης Β, μία από τις κυριότερες πρωτεάσες που εμπλέκονται στην

αποδόμηση των αντιγόνων στα ΔΚ. Κατά δεύτερον, ακόμα και αν κάποια αντιγονικά πεπτίδια σχηματίζονται στα ενδοσώματα και λυσοσώματα, πολύ λίγα MHCII μόρια είναι διαθέσιμα για να τα προσδέσουν στα άωρα ΔΚ. Η χαμηλή δραστικότητα της καθεψίνης S, της βασικής πρωτεάσης για την αποικοδόμηση του Ii στα ΔΚ, εμπλέκεται εδώ, και έχει προταθεί ένας ρόλος για τον αναστολέα της καθεψίνης S, την συστατίνη C, που εδράζει συγκεκριμένα στα λυσοσώματα μαζί με την καθεψίνη S, τα Ii και τα MHCII μόρια στα άωρα ΔΚ.

Όμως, αυτός ο τύπος ρυθμικής δεν είναι κοινός για όλα τα ΔΚ. Σε κάποιες περιπτώσεις, το Ii αποδομείται στα λυσοσώματα και τα MHCII διμερή φτάνουν στην κυτταρική επιφάνεια συνδεδεμένα είτε με αντιγονικά πεπτίδια είτε με το πεπτίδιο CLIP που προέρχεται από το Ii είτε χωρίς πεπτίδια. Από την επιφάνεια του κυττάρου, τα MHCII ανακυκλώνονται γρήγορα και μπορούν να συνδεθούν με νέα πεπτίδια στα ενδοσώματα πριν επιστρέψουν στην κυτταρική επιφάνεια ή κατευθύνονται στα λυσοσώματα, όπου τελικά θα αποικοδομηθούν. Αυτή η οδός έχει σαν αποτέλεσμα τη σύντομη παρουσία MHCII/πεπτιδίων στην επιφάνεια των άωρων ΔΚ, που προφανώς δεν επαρκεί για να ενεργοποιήσει τα T-κύτταρα.

Τα σήματα ωρίμανσης προκαλούν μία συνδυασμένη τροποποίηση όλων αυτών των γεγονότων. Η σύνθεση MHCII αυξάνεται παροδικά και η δραστικότητα των καθεψινών που εμπλέκονται στην αποδόμηση των αντιγόνων και του Ii αυξάνεται γρήγορα, ίσως εξαιτίας της μετακίνησής τους σε περισσότερο όξινα τμήματα των ενδοσωμάτων/λυσοσωμάτων. Συνεπώς, οι αριθμοί των πεπτιδίων και MHCII διμερών διαθέσιμων για το σχηματισμό συμπλόκων αυξάνονται ταυτοχρόνως. Τα σύμπλοκα MHCII/ πεπτιδίων σχηματίζονται λοιπόν γρήγορα και μεταφέρονται σε ενδοσωματικά κυστίδια, μαζί με συνδιεγερτικά και MHC I μόρια, πριν μεταφερθούν στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά την ωρίμανση, μειώνονται επίσης η ικανότητα ενδοκυττάρωσης και η μεταφορά MHCII από την επιφάνεια στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των συμπλεγμάτων MHCII/πεπτιδίων στην κυτταρική επιφάνεια. Αργότερα, μειώνεται η σύνθεση MHCII, και η σύνδεση πεπτιδίων με νεοσυντιθέμενα MHCII μόρια γίνεται μη αποδοτική, δίνοντας έτσι το βάρος στην παρουσίαση των αντιγόνων που το ΔΚ συνάντησε πριν ή κατά την επαγωγή της ωρίμανσης. Πάντως, πλήρως ώριμα ΔΚ μπορούν ακόμα να σχηματίσουν νέα σύμπλοκα MHC/πεπτιδίων χρησιμοποιώντας MHC μόρια που ανακυκλώνονται από την επιφάνεια.

Οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μπορούν να εμπλακούν στη ρύθμιση του MHCII μονοπατιού στα ΔΚ. Ο M-CSF προκαλεί γρήγορη και παρατεταμένη αύξηση της σύνθεσης MHCII και της μεταφοράς τους στην επιφάνεια στα άωρα ΔΚ του ανθρώπου, χωρίς όμως να τα σταθεροποιεί εκεί. Τα ΔΚ που προκύπτουν είναι, λοιπόν, ανεπαρκείς διεγέρτες των T-κυττάρων. Η IL-10 εμποδίζει την αύξηση στη δραστικότητα των πρωτεασών που προκαλούν τα σήματα ωρίμανσης αυξάνοντας το pH των ενδοσωμάτων, προκαλώντας έτσι μακράς διάρκειας αναστολή της επεξεργασίας και παρουσίασης των αντιγόνων από τα ώριμα ΔΚ. Συνεπώς, οι κυτταροκίνες του περιβάλλοντος των ΔΚ, όπου αυτά λαμβάνουν το σήμα κινδύνου, είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στον καθορισμό του προσανατολισμού της ανοσιακής απάντησης.

3.3 Τα αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια CD1

Εκτός από τα MHC τάξης I και II, τα ΔΚ εκφράζουν και μία τρίτη τάξη μορίων MHC που εμπλέκονται στην παρουσίαση αντιγόνων στα T-κύτταρα: τις πρωτεΐνες CD1(9). Πέντε γονίδια CD1 που κωδικοποιούν για συγγενικές μη πολυμορφικές πρωτεΐνες (CD1a, b, c, d και e) έχουν αναγνωρισθεί στον άνθρωπο, και μόνο δύο στο ποντίκι, και τα δύο ομόλογα του CD1d. Με βάση τις ομολογίες στις αλληλουχίες τους, τα CD1a, b, c και e κατατάχθηκαν σαν ομάδα 1 και το Cd1d σαν ομάδα 2. Ενώ τα CD1a, b και c εκφράζονται κυρίως από ΔΚ και θυμοκύτταρα, το CD1d εκφράζεται σε διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα (ΔΚ, θυμοκύτταρα, B κύτταρα της κυκλοφορίας, T-κύτταρα και μονοκύτταρα) και στο εντερικό επιθήλιο. Όπως και τα MHC I, τα CD1 σχετίζονται με τη β2 μικροσφαιρίνη.

Τα CD1 μόρια της ομάδας 1, συνδεδεμένα με γλυκολιπιδικά αντιγόνα ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης (πχ από μυκοβακτήρια), διεγείρουν T-κύτταρα διαφόρων φαινοτύπων: CD8⁺ κυτταροτοξικά κύτταρα, CD4⁺CD8⁻ T-κύτταρα και γ/δ T-κύτταρα. Η σύνδεση του CD1 με το αντιγόνο λαμβάνει χώρα κυρίως σε τμήματα του ενδοσωματικού μονοπατιού, όπου μεταφέρονται τα CD1 από την κυτταρική μεμβράνη. Κάθε μόριο CD1 επιβλέπει συγκεκριμένα ενδοσωματικά διαμερίσματα: πρῶιμα και ανακυκλούμενα ενδοσώματα για το CD1a, λυσοσώματα για το CD1b και μάλλον όλα τα διαμερίσματα για το CD1c. Τα CD1a, b και c έρχονται επίσης σε

επαφή με φαγοκυτταρωμένα μυκοβακτήρια σε φαγοσώματα διαφόρων σταδίων ωρίμανσης. Τέλος, η σύνδεση με το αντιγόνο για τα CD1b και c μπορεί να λάβει χώρα και στην επιφάνεια του ΔΚ.

Στον άνθρωπο και στο ποντίκι, το μόριο CD1d, συνδεδεμένο με το συνθετικό λιπίδιο α -galactosyl-ceramide (α -GalCer), ενεργοποιεί τα NKT κύτταρα, μια υποομάδα T-κυττάρων είτε CD4 είτε CD4-CD8- φαινοτύπου που εκφράζει έναν μη μεταβλητό TCR και τον NK1.1 υποδοχέα. Θεωρείται ότι το α -GalCer μιμείται ένα αντιγονικό λιπίδιο κυτταρικής προέλευσης, που συνδέεται με το CD1d στο ενδοσωματικό μονοπάτι. Άλλα T-κύτταρα, αρνητικά για τον μη μεταβλητό TCR και τον NK1.1, αναγνωρίζουν CD1d μόρια που έχουν σχηματίσει σύμπλοκα με ενδογενή λιπίδια μέσα στο ΕΔ. Πολύ υδροφοβικά πεπτίδια μπορούν επίσης να σχηματίζουν σύμπλοκα με το CD1d.

Υπάρχουν αρκετά δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία του CD1d στα ΔΚ. Στον άνθρωπο, NKT κύτταρα που διεγείρονται από το CD1d μυελικών ΔΚ προκαλούν λύση των ΔΚ, τροποποιώντας έτσι τη φυσιολογική ανοσιακή απόκριση. Στα ποντίκια, αλληλεπιδράσεις μεταξύ NKT κυττάρων και ΔΚ διεγερμένων με α -GalCer επάγει την παραγωγή IL-12 από τα ΔΚ και ενεργοποίηση των CD4 και CD8 κυττάρων (18,19).

Το πέμπτο CD1 γονίδιο κωδικοποιεί για διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης CD1e, καμία από τις οποίες δεν εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Μία ισομορφή συσσωρεύεται στο σύμπλοκο Golgi και μεταφέρεται στα όψιμα ενδοσώματα κατά την ωρίμανση των ΔΚ. Η λειτουργία του CD1e είναι υπο μελέτη.

4. Αντιγονοπαρουσίαση και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων

Διέγερση των T λεμφοκυττάρων

Η ικανότητα διέγερσης των παρθένων CD4 κυττάρων αποτελεί μοναδική και κρίσιμη λειτουργία των ΔΚ τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. ΔΚ φορτισμένα με διαλυτά αντιγόνα επάγουν ισχυρές αντιγονοειδικές απαντήσεις των T βοηθητικών κυττάρων (T helper cells, Ths) όταν ενίονται σε ποντίκια. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων ΔΚ-T κυττάρων στους λεμφαδένες με ανοσοϊστολογία υποδηλώνει άμεση παρουσίαση των αντιγόνων από τα ΔΚ. Υπάρχει όμως και ένα έμμεσο εναλλακτικό μονοπάτι όπου αποπτωτικά σωμάτια εξωγενών ΔΚ φαγοκυτταρώνονται, επεξεργάζονται και παρουσιάζονται από τα ΔΚ των λεμφαδένων. Η σχετική συνεισφορά των δύο αυτών οδών *in vivo* είναι υπο έρευνα. Παρουσία ελεύθερου αντιγόνου, τα διεγερμένα από ΔΚ Ths μπορούν να αλληλεπιδράσουν με B κύτταρα και να επάγουν την παραγωγή αντιγονοειδικών αντισωμάτων. Το εύρος των CD4 αποκρίσεων μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά *in vivo* με αυξημένους αριθμούς ΔΚ, όπως έχει φανεί με τη χρήση Flt3-L. Επιπλέον, η ισχυρή ανοσογονικότητα των ΔΚ μπορεί να καταργήσει την περιφερική ανοχή των T-κυττάρων έναντι διαλυτών αντιγόνων, ιϊκών αντιγόνων, όγκων και αντιγόνων μεταμόσχευσης, όπως επίσης και στα νεογένητα.

Τα ΔΚ είναι εξίσου σημαντικά στη διέγερση παρθένων CD8 κυττάρων. *In vitro*, τα ΔΚ μπορούν να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό αλλογενών CD8 κυττάρων απευθείας, απουσία βοήθειας από CD4. Μπορούν επίσης να επάγουν αντιγονοειδικά CTLs από παρθένα πρόδρομα κύτταρα. Ισχυρές CTL απαντήσεις μπορούν να διεγερθούν *in vivo* σε ποντίκια από ένεση ΔΚ: α. αλλογενών β. φορτισμένων με πεπτίδια γ. φορτισμένων με πρωτεΐνες δ. διαμολυσμένων με DNA ε. που εκφράζουν ιϊκά αντιγόνα και στ. φορτισμένων με RNA. Αν και τα ΔΚ μπορούν να ενεργοποιήσουν τα CD8 άμεσα, συχνά χρειάζονται τη βοήθεια των CD4 κυττάρων. Στο παραδοσιακό μοντέλο ενεργοποίησης, τα CD4 και CD8 θεωρούνταν ότι αναγνώριζαν το αντιγόνο στο ίδιο ΑΠΚ. Όμως, στο τρέχον μοντέλο, τα ΑΠΚ αποκτούν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν CTLs από τα Ths,

μέσω των CD40-CD40 ligand αλληλεπιδράσεων. Έτσι, το ενεργοποιημένο ΔΚ γίνεται γέφυρα μεταξύ ενός CD4 βοηθητικού και ενός CD8 κυτταροτοξικού κυττάρου. Εκτός από τη διέγερση, τα ΔΚ φαίνονται απαραίτητα για την επιβίωση των παρθένων CD4 και για τη διατήρηση ανοσιακής μνήμης.

Μόρια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ΔΚ-T κυττάρων

Παραμένει αδιευκρίνιστο το αν η μοναδική ικανότητα των ΔΚ να διεγείρουν T-κύτταρα οφείλεται στην έκφραση μορίων ειδικών για τα ΔΚ ή στη μεγάλη πυκνότητα των μορίων που εμπλέκονται στις ΔΚ-T αλληλεπιδράσεις(1-9). Τα μόρια MHC και τα σύμπλοκα MHC/πεπτιδίων είναι 10-100 φορές περισσότερα στα ΔΚ σε σχέση με τα άλλα ΑΠΚ, Β κύτταρα και μακροφάγα. Η αναγνώριση των συμπλόκων MHC/πεπτιδίων στα ΔΚ από τους αντιγονοειδικούς TCRs των T κυττάρων αποτελεί το "σήμα 1" στην αλληλεπίδραση ΔΚ-T. Η πρόσδεση ΔΚ-T υποβοηθείται από διάφορα μόρια προσκόλλησης, όπως ιντεγκρίνες β1 και β2 και μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (CD2, CD50, CD54 και CD58). Ο κρίσιμος παράγοντας που αποτελεί το "σήμα 2", που απαιτείται για τη διατήρηση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων, είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ συνδιεγερτικών μορίων των ΔΚ και των συνδετών τους, που εκφράζονται στα T-κύτταρα. Τα CD80 και CD86 (B7.1 και B7.2, αντιστοίχως) προσδένουν τα CD28 και CTLA-4 στα T-κύτταρα, και μάλιστα με μεγαλύτερη συγγένεια για το CTLA-4. Το CD28 εκφράζεται συνεχώς και διευκολύνει την αρχική φάση διέγερσης των T-κυττάρων, ενώ το CTLA-4 είναι επαγόμενο και εμπλέκεται στο μετριασμό των T αποκρίσεων.

Τα T-κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα ΔΚ μέσω του CD40-L. Η σήμανση μέσω του CD40 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των CD80 και CD86 στα ΔΚ, στην απελευθέρωση κυτταροκινών (IL-1, TNF, IL-12, χημειοκίνες) και στην αύξηση της έκφρασης του OX40 ligand, ο οποίος σηματοδοτεί τα παρθένα T-κύτταρα να εκφράσουν IL-4 και να αυξήσουν την έκφραση του υποδοχέα χημειοκινών CXCR5, του οποίου ο συνδέτης οδηγεί τα B κύτταρα στα λεμφοζύδια. Έκφραση του OX40-L διαγονιδίου στα ΔΚ οδηγεί σε συσσώρευση CD4 κυττάρων στα λεμφοζύδια των B κυττάρων. Τα ώριμα ΔΚ εκφράζουν επίσης τον 4-1BB ligand, ο οποίος

συμπληρώνει τη δράση του OX40-L. Ο 4-1BB είναι ένας συνδιεγέρτης που εκφράζεται κυρίως στα ενεργοποιημένα CD4 και CD8 κύτταρα. Τα σήματα του 4-1BB επάγουν κυρίως τον πολλαπλασιασμό των CD8 και την παραγωγή IFN- γ (όχι όμως IL-4), οδηγώντας σε *in vivo* κυτταροτοξικές απαντήσεις στο GVHD (graft versus host disease) και στην απόρριψη αλλογενών μοσχευμάτων. Το αν τα ΔΚ εκφράζουν τα OX40-L και 4-1BB-L ταυτοχρόνως ή όχι παραμένει υποδιευρεύνηση. Πρόσδεση του RANK, ενός μέλους της οικογένειας των TNFR, από τον συνδέτη του (RANKL/TRANCE) που εκφράζεται στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6 και IL-12 από τα ΔΚ. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη επιβίωση των ΔΚ, λόγω αναστολής της απόπτωσής τους, και κατ' επέκταση ενισχυμένο T λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το TRANCE φάνηκε ότι είναι υπεύθυνο για την ανεξάρτητη από το CD40-L ενεργοποίηση των Ths κατά τη διάρκεια ιϊκής προσβολής, κάτι που υποδηλώνει έναν σημαντικό ρόλο αυτού του μορίου στις λοιμώξεις. Τέλος, τα ΔΚ μπορούν να ενεργοποιηθούν και ανεξάρτητα από τα CD4. Προϊόντα παθογόνων, όπως LPS και ιοί, που προκαλούν ωρίμανση των ΔΚ, μπορούν και να τους δώσουν την ικανότητα επαγωγής CTL απαντήσεων. Η έκφραση του CD40-L από κάποια αποπτωτικά σωματίδια μπορεί επίσης να δώσει το σήμα που επιτρέπει στα ΔΚ να παρακάμψουν την ανάγκη για βοήθεια από τα Ths.

Διαφορετικές κατηγορίες ΔΚ κινητοποιούν διαφορετικές ανοσιακές απαντήσεις

Τα ΔΚ έχουν ένα κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό του τύπου της ανοσιακής απόκρισης. Υπάρχουν στοιχεία ότι ξεχωριστές υποομάδες ΔΚ ή "προδιαθετημένα" ΔΚ μπορούν να δώσουν στα T-κύτταρα διαφορετικά σήματα που καθορίζουν την τάξη της ανοσιακής απόκρισης (37). Έτσι, στα ποντίκια, τα σπληνικά CD8 α^+ DCs επάγουν τα παρθένα T-λεμφοκύτταρα να παράξουν Th1 κυτταροκίνες με διαδικασία που περιλαμβάνει την IL-12, ενώ τα σπληνικά CD8 α^- DCs επάγουν την παραγωγή Th2 κυτταροκινών από τα CD4. Επιπλέον, αυτή η καθοδήγηση των T υποομάδων εξαρτάται επίσης και από το σήμα που λαμβάνει ένα ΔΚ, όπως φαίνεται από την παραγωγή IL-12 και την καθοδήγηση προς Th1

όταν τα ΔΚ ενεργοποιούνται με LPS από την *E.coli*, και την απουσία IL-12 και καθοδήγηση προς Th2 όταν ο ίδιος τύπος ΔΚ εκτίθεται σε LPS από *Porphyromonas gingivalis*. Στον άνθρωπο, moDCs ενεργοποιημένα με CD40-L προάγουν Th1 απαντήσεις μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από την IL-12, ενώ πλασματοκυτταροειδή ΔΚ (pDCs) ενεργοποιημένα με IL-3 και CD40-L εκκρίνουν αμελητέες ποσότητες IL-12 και προάγουν Th2 απαντήσεις. Έτσι, τόσο η κατηγορία του ΔΚ όσο και τα σήματα ωρίμανσης στα οποία εκτίθεται είναι σημαντικά για την καθοδήγηση των T-κυττάρων. Αυτή είναι μία σημαντική παράμετρος στους εμβολιασμούς για τον καρκίνο, όπου η ανοσία τύπου 1 (με έκκριση IFN- γ) είναι επιθυμητή, ενώ η ανοσία τύπου 2 (με έκκριση IL-4, IL-10) θεωρείται ίσως και βλαβερή.

Πλαστικότητα της λειτουργίας των ΔΚ

Τα ΔΚ και οι πρόδρομοί τους έχουν αξιολογούμενη πλαστικότητα στη λειτουργία τους (37). Για παράδειγμα, τα pDCs αποτελούν ένα από τα πρώτα φράγματα στην εισβολή των ιών, λειτουργώντας, μέσω της έκκρισης IFN τύπου I, σαν μέρος της φυσικής ανοσίας. Στη συνέχεια, αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε ΔΚ που μπορούν να παρουσιάσουν αντιγόνα στα T-κύτταρα, λειτουργώντας έτσι σαν μέλη του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα μονοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε προς μακροφάγα, που λειτουργούν σαν νεκροφάγοι, είτε προς ΔΚ που επάγουν ειδικές ανοσιακές αποκρίσεις. Διαφορετικές κυτταροκίνες καθορίζουν την *in vitro* διαφοροποίηση μονοκυττάρων προς ΔΚ με διαφορετικούς φαινότυπους και λειτουργίες. Έτσι, μετά από ενεργοποίηση (πχ με GM-CSF), τα μονοκύτταρα που συναντούν IL-4 γίνονται IL-4-DCs, ενώ μετά από συνάντηση με IFN α , TNF ή IL-15, τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε IFN α -DCs, TNF-DCs και IL-15-DCs αντιστοίχως. Εάν, *in vivo*, όλα τα ΔΚ των ιστών (διάμεσα ΔΚ) προέρχονται από μονοκύτταρα, αυτό παραμένει αδιευκρίνιστο, όμως τα μυελικά ΔΚ που απομονώνονται από περιφερικό αίμα ανθρώπου μπορούν επίσης να δώσουν διαφορετικούς τύπους ΔΚ μετά από έκθεση σε διαφορετικές κυτταροκίνες. Καθένας από αυτούς τους τύπους ΔΚ έχει τόσο κοινές όσο και μοναδικές βιολογικές λειτουργίες, που καθορίζονται από τον συνδυασμό της

έκφρασης μορίων επιφανείας και της έκκρισης κυτταροκινών. Για παράδειγμα, ενώ τα IL-4-DCs είναι ένας ομοιογενής πληθυσμός άωρων κυττάρων που δεν περιέχει LCs, τα TNF-DCs είναι ετερογενή και περιλαμβάνουν τόσο CD1a⁺ LCs όσο και CD14⁺ διάμεσα ΔΚ. *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι LCs και διάμεσα ΔΚ που παράγονται από καλλιέργειες CD34 αιμοποιητικών κυττάρων διαφέρουν στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν λεμφοκύτταρα: τα διάμεσα ΔΚ επάγουν τη διαφοροποίηση των παρθένων B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη, ενώ τα LCs φαίνονται να είναι ιδιαίτερα αποδοτικά στην ενεργοποίηση των CTLs. Διαφέρουν επίσης στις κυτταροκίνες που εκκρίνουν (μόνο τα διάμεσα ΔΚ παράγουν IL-10) και στην ενζυμική τους δραστηριότητα, που μπορεί να είναι θεμελιώδης για την επιλογή των πεπτιδίων που παρουσιάζονται στα T-κύτταρα. Πράγματι, διαφορετικά ένζυμα είναι πιθανό να αποδομούν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο σε διαφορετικές ομάδες πεπτιδίων, όπως έχει πρόσφατα αποδειχτεί για την Nef πρωτεΐνη του HIV. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσίαση διαφορετικών συμπλόκων MHC/πεπτιδίου και, συνεπώς, στην επαγωγή διαφορετικού ρεπερτορίου αντιγονοειδικών T-κυττάρων. Έτσι, αυτά τα ξεχωριστά ΔΚ είναι πιθανό να επάγουν ξεχωριστά δραστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού, επιτρέποντας έτσι την ευρεία ανοσιακή απάντηση που απαιτείται για την αντιμετώπιση διαρκώς εξελισσόμενων μικροοργανισμών και όγκων.

Τα T-κύτταρα ρυθμίζουν τη διάρκεια ζωής των ΔΚ

Τα T-κύτταρα που δέχονται την αντιγονική πληροφορία μπορούν, στη συνέχεια, να ρυθμίσουν τη διάρκεια ημιζωής των φορτισμένων με αντιγόνο ΔΚ με διάφορους μηχανισμούς(9). Αυτό το είδος ρύθμισης μπορεί να έχει κρίσιμη επίδραση στη δυναμική της διέγερσης των T-κυττάρων *in vivo*. Πράγματι, η δέσμευση των CD4 για πολλαπλασιασμό απαιτεί περίπου 10 ώρες συνεχούς σηματοδότησης παρουσία συνδιέγερσης. Αντιθέτως, τα CD8 απαιτούν μόνο μία σύντομη έκθεση στο αντιγόνο και σε συνδιέγερση για να δεσμευτούν για πολλαπλασιασμό. Είναι εντυπωσιακό ότι, μετά τη δέσμευση, τα T-κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται χωρίς να χρειάζονται περαιτέρω διέγερση. Η διάρκεια ημιζωής των φερόντων αντιγόνο ΔΚ μπορεί, λοιπόν, να αποτελεί κρίσιμη παράμετρο της

διέγερσης των T-κυττάρων. Η παράταση της ημιζωής των ΔΚ με χρήση του TRANCE έχει αποτέλεσμα να φτάνουν αυξημένοι αριθμοί ΔΚ στους λεμφαδένες και να προκαλούν εντονότερη επαγωγή T-κυττάρων. ΔΚ φορτισμένα *ex vivo* με αντιγόνο εξαφανίζονται γρήγορα από τους λεμφαδένες μετά από την αλληλεπίδραση με τα αντιγονοειδικά παρθένα CD4. Όμως, η αλληλεπίδραση ΔΚ-CD4 μπορεί επίσης να καθυστερήσει την προκαλούμενη από LPS απόπτωση σπληνικών ΔΚ. Όσον αφορά τα CD8 κύτταρα, η κινητική της απόκτησης της λυτικής λειτουργίας (γρηγορότερη για τα κύτταρα μνήμης σε σχέση με τα παρθένα) είναι παράλληλη με την κινητική εξαφάνισης των φερόντων αντιγόνο ΔΚ. Εάν η εξαφάνιση των ΔΚ μέσω των CTLs περιορίζει την επαγωγή περαιτέρω ανοσιακών αποκρίσεων, δεν εμποδίζει την επανεργοποίηση CTL αποκρίσεων μνήμης.

Η διάρκεια ημιζωής των ΔΚ ρυθμίζεται από σήματα των T-κυττάρων μέσω:

α. υποδοχέων κυτταροκινών: τα Th2 κύτταρα που επάγονται από DC2 εκκρίνουν IL-4 και IL-10 που αναστέλλουν συνεργιστικά τον επαγόμενο από IL-3 πολλαπλασιασμό των DC2, ενώ η IL-4 αυξάνει την ωρίμανση των moDCs.

β. μορίων MHCII: τα ώριμα ΔΚ είναι πολύ επιρρεπή στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από δέσμευση των MHCII.

γ. RANK/TRANCE-L: η πρόσδεση του RANK-R/TRANCE προωθεί την επιβίωση των μυελικών ΔΚ, αυξάνοντας την ικανότητά τους να ενεργοποιούν T-κύτταρα.

δ. TNFR: η σηματοδότηση μέσω του TNFR2 παίζει κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση των LCs και των μυελικών ΔΚ, όπως και στη μετανάστευση των LCs, ενώ ο TNFR1 εμπλέκεται στην εξαρτώμενη από τον NF-κB ωρίμανση των ανθρώπινων moDCs και των μυελικών ΔΚ του ποντικού.

ε. υποδοχέων θανάτου: η ωρίμανση των ΔΚ επιφέρει ανθεκτικότητα στα σήματα θανάτου από τους Fas ή TRAIL, σε συνδυασμό με αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης cFLIP, αναστολέα της κασπάσης 8.

στ. της οδού perforin/granzyme: αν και τα ΔΚ εκφράζουν αναστολείς πρωτεασών που εμποδίζουν τη δράση του granzyme B, μπορούν να λυθούν από CTLs *in vitro* μέσω της οδού της περφορίνης και *in vivo* από άγνωστους μηχανισμούς ανεξάρτητους της περφορίνης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα Th1 αλλά όχι τα Th2 κύτταρα προκαλούν την έκφραση ενός τέτοιου αναστολέα πρωτεάσης στα ΔΚ.

5. Τα ΔΚ στη ρύθμιση των Β λεμφοκυττάρων

Η ενεργοποίηση των Β κυττάρων ξεκινά με τη δέσμευση του BCR (B-cell receptor) από ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Τα Β κύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν και να ανταποκρίνονται τόσο σε διαλυτά όσο και σε συνδεδεμένα με μεμβράνη αντιγόνα, αν και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα δεύτερα είναι πιο σημαντικά για την ενεργοποίηση των Β κυττάρων *in vivo* (46). Μετά την αντιγονική διέγερση, τα Β κύτταρα επεξεργάζονται και παρουσιάζουν το αντιγόνο σε MHCII μόρια, παίρνοντας έτσι βοήθεια από τα ειδικά CD4 για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Η διαφοροποίηση των Β κυττάρων γίνεται σε δύο διαφορετικές οδούς. Από τη μία, διαφοροποιούνται προς πλασματοβλάστες εκτός των λεμφοζιδίων, που είναι σημαντικοί για τη γρήγορη παραγωγή αντισωμάτων και τις πρώιμες προστατευτικές ανοσιακές αποκρίσεις. Από την άλλη, τα ενεργοποιημένα Β κύτταρα μπορούν να εισέλθουν στα βλαστικά κέντρα, όπου διαφοροποιούνται προς πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν αντίσωμα μεγάλης ειδικότητας μετά από ωρίμανση συγγένειας, ή προς Β κύτταρα μνήμης, που προσφέρουν προστασία διάρκειας από επόμενη προσβολή από το αντιγόνο.

Τα ΔΚ μπορούν να ενεργοποιήσουν απευθείας παρθένα Β κύτταρα και Β κύτταρα μνήμης (1). Το βλαστικό κέντρο (germinal centre, GC) είναι το μικροπεριβάλλον όπου αναπτύσσεται η Β κυτταρική μνήμη. Εκεί, τα Β κύτταρα πολλαπλασιάζονται και υφίστανται σωματική μεταλλαγή, αλλαγή ισοτύπου, επιλογή συγγένειας και διαφοροποίηση σε Β κύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα. Το βλαστικό κέντρο περιέχει επίσης Τ κύτταρα, λεμφοζιδιακά ΔΚ (follicular DCs, fDCs) και GCDCs. Είναι πλέον σαφές ότι τα GCDCs έχουν αρκετές διαφορές από τα fDCs σε φαινότυπο και λειτουργία. Τα GCDCs διεγείρουν, με τρόπο εξαρτώμενο από την IL-12, τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων από CD40 Β κυττάρων του βλαστικού κέντρου και οδηγούν τη διαφοροποίησή τους προς πλασματοκύτταρα. Επιπλέον, τα GCDCs επάγουν την ανεξάρτητη από IL-10 αλλαγή ισοτύπου προς IgG1. Έτσι, οι υποομάδες των ΔΚ έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν απευθείας Β κυτταρικές απαντήσεις.

Για να παραχθεί μία χυμική ανοσιακή απόκριση, τα αντιγονοειδικά CD4 βοηθητικά κύτταρα και τα αντιγονοειδικά B κύτταρα πρέπει να αλληλεπιδράσουν. Στις περιοχές του φλοιού των δευτερογενών λεμφικών οργάνων, τα διαπλεκόμενα (interdigitating) ΔΚ επιλέγουν τα σπάνια αντιγονοειδικά T και B κύτταρα. Όπως έχει αποδειχθεί στον αρουραίο *in vivo*, τα ΔΚ μπορούν να προσλάβουν και να συγκρατήσουν μη επεξεργασμένο αντιγόνο και μετά να το μεταφέρουν στα παρθένα B κύτταρα. Αυτός θα μπορούσε να είναι ο ρόλος των GCDCs που βρίσκονται στα βλαστικά κέντρα και περιγράφηκαν αρχικά σαν "κύτταρα μεταφοράς αντιγόνων". Αυτά θα μπορούσαν να παρουσιάζουν το αντιγόνο ταυτόχρονα σε T και B κύτταρα (ménage a trois). Θα μπορούσε όμως να θεωρηθεί ότι ένα ενεργοποιημένο ΔΚ μπορεί να γίνει γέφυρα μεταξύ ενός CD4 βοηθητικού κυττάρου και ενός B κυττάρου, σε αναλογία με την ενεργοποίηση των CD8.

6. Τα ΔΚ στη ρύθμιση των NK λεμφοκυττάρων

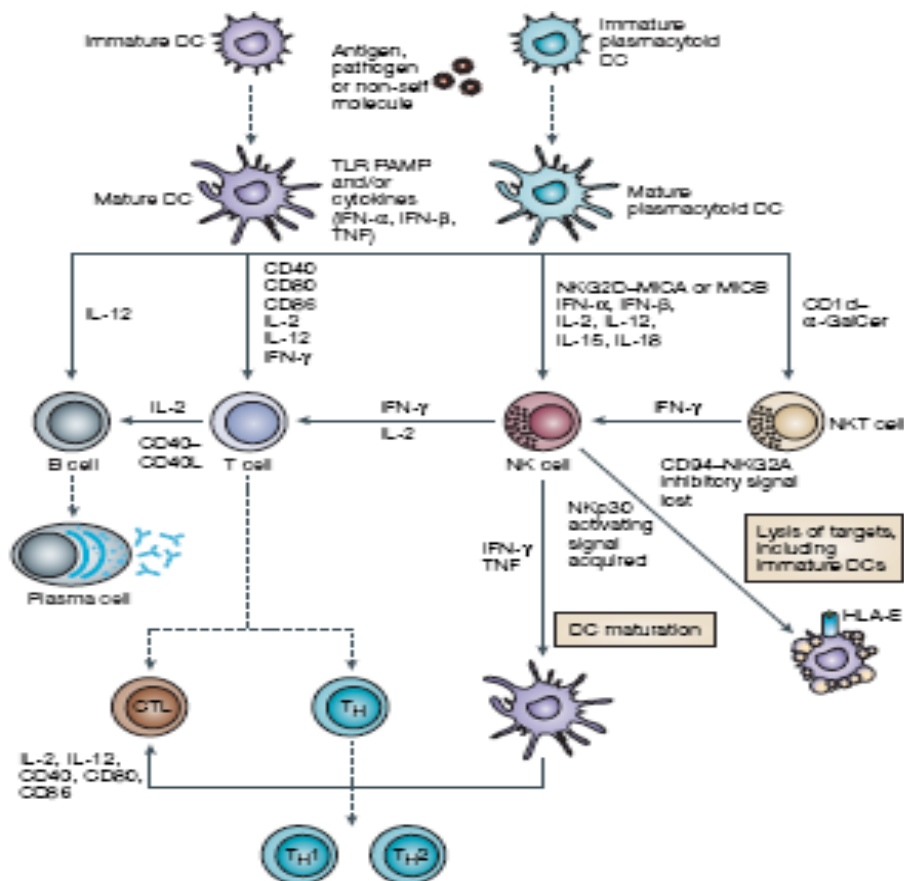
Τα NK κύτταρα (natural killer) είναι λεμφοκύτταρα της φυσικής ανοσίας που εμπλέκονται στην πρώιμη άμυνα εναντίον ξένων κυττάρων και αυτόλογων κυττάρων υπο στρεσογόνες συνθήκες, πχ μικροβιακή λοίμωξη και καρκινική εξαλλαγή. Μετά από διέγερση, τα NK κύτταρα εκκρίνουν τεράστιες ποσότητες κυτταροκινών όπως IFN- γ , TNF α και GM-CSF και χημειοκινών, όπως CCL3, CCL4 και CCL5. Τα NK είναι επίσης κυτταροτοξικά και προκαλούν απόπτωση των κυττάρων στόχων τους. Αναγνωρίζουν τους στόχους τους μέσω ενός συστήματος διεγερτικών και ανασταλτικών υποδοχέων, η ισορροπία μεταξύ των οποίων ελέγχει την ενεργοποίηση των NK.

Τα ΔΚ αποτελούν πηγή αρκετών κυτταροκινών που διεγείρουν τις λειτουργίες των NK, όπως IL-12, IL-18, IL-15 και ιντερφερόνες τύπου I. Επιπλέον, καλλιέργεια ενεργοποιημένων ανθρώπινων NK με άωρα moDCs σε χαμηλές αναλογίες NK:ΔΚ οδηγεί σε ωρίμανση των ΔΚ, παρουσία διαλυτών παραγόντων των NK (IFN- γ , TNF α). Αντιθέτως, υψηλές αναλογίες NK:ΔΚ έχουν σαν αποτέλεσμα την εξολόθρευση των άωρων ΔΚ από τα αυτόλογα NK. Τα ώριμα ΔΚ προστατεύονται από τη λύση από NK κύτταρα μέσω αύξησης της έκφρασης MHC I μορίων, κυρίως του HLA-E. Λύοντας άωρα ΔΚ, τα NK μπορούν ίσως να ρυθμίζουν την ομοίωση των ΔΚ και, συνεπώς, την ισορροπία μεταξύ ανοσιακής ανοχής και ανοσίας.

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ΔΚ-NK κυττάρων μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ανοσιακών αποκρίσεων έναντι των όγκων (15-17). Μία από τις βασικές δυσκολίες στην ανάπτυξη ανοσίας έναντι των καρκινικών κυττάρων είναι το ότι, καθώς προέρχονται από ιστούς του ξενιστή, δεν είναι συνήθως ανοσογονικά και δεν παρουσιάζουν τα σήματα κινδύνου που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των ΔΚ. Τα NK έχουν τη μοναδική ικανότητα να ανιχνεύουν αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα απουσία φλεγμονής, όντας έτσι ικανά για απόρριψη του όγκου. Εναλλακτικά, μπορούν να ενεργοποιήσουν κύτταρα της ειδικής ανοσίας για να εκριζώσουν τους όγκους. Τα NK μπορούν να διευκολύνουν αυτή τη διαδικασία παράγοντας IFN- γ και άλλες κυτταροκίνες που επιστρατεύουν ΔΚ, T και B κύτταρα. Η IFN- γ μπορεί απευθείας να διεγείρει την ανάπτυξη CTLs και να επάγει

τη δημιουργία ανοσιακής απόκρισης μνήμης ειδικής για τον όγκο. Δεδομένης της ανάγκης για ΔΚ για την ενεργοποίηση παρθένων T κυττάρων, είναι πολύ πιθανό οι αλληλεπιδράσεις ΔΚ/NK να έχουν κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία.

Στην εικόνα 5 φαίνονται συνοπτικά οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΔΚ και άλλων δραστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.



Εικόνα 5: αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΔΚ και άλλων δραστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα ΔΚ επηρεάζουν τις λειτουργίες των T, B, NK και NKT κυττάρων. Τα ΔΚ επεξεργάζονται αντιγόνα και τα παρουσιάζουν υπο τη μορφή συμπλεγμάτων MHC/πτεπτιδίων στα T κύτταρα. Παρουσία καταλλήλων σημάτων από συνδιεγερτικά μόρια (CD40, CD80, CD86) και κυτταροκίνες (IFN-γ, IL-2 και IL-12), τα ΔΚ επάγουν την ενεργοποίηση των παρθένων T κυττάρων και την παραγωγή CD4 Ths και CD8 CTLs. Οι απαντήσεις των Ths μπορούν να έχουν Th1 ή Th2 προσανατολισμό ανάλογα με τα περιβαλλοντικά σήματα που λαμβάνουν τα ΔΚ, συμπεριλαμβανομένων αυτών που προέρχονται από την αναγνώριση μικροβιακών συστατικών από τους TLRs. Τα ΔΚ μπορούν επίσης να επηρεάσουν τις λειτουργίες των B κυττάρων μέσω σύνθετων αλληλεπιδράσεων, που περιλαμβάνουν σήματα προερχόμενα από T κύτταρα (CD40 ligation, IL-2) που έχουν αλληλεπιδράσει με ενεργοποιημένα ΔΚ. Αλληλεπίδραση μεταξύ των ΔΚ και των NKT κυττάρων επίσης λαμβάνει χώρα. Συνδέτες των NKT, όπως το α-GalCer, παρουσιάζονται στα NKT από CD1d μόρια στην επιφάνεια των ΔΚ. Η επιλεκτική στόχευση του α-GalCer στα ΔΚ επάγει μία εντονότερη και παρατεταμένη ανταπόκριση των NKT κυττάρων. Αντιστοίχως, τα NKT μπορούν να προωθήσουν την ωρίμανση των ΔΚ. Τα ΔΚ επηρεάζουν τις λειτουργίες των NK κυττάρων και μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίησή τους μέσω οδών που περιλαμβάνουν κυτταρική επαφή (NKG2D-MICA/MICB) και κυτταροκίνες (IFN-α, IFN-β, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18). Τα σήματα που προέρχονται από τα ΔΚ επάγουν κυτταρική λύση και έκκριση κυτταροκινών από τα NK. Αντιστοίχως, τα NK κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τις λειτουργίες των ΔΚ συμμετέχοντας στην ωρίμανση και στην εκκαθάριση των ΔΚ. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν οδούς κυτταρικής διαφοροποίησης, ενώ οι συμπαγείς γραμμές δείχνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΔΚ και των άλλων δραστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. [Από Nature Rev. Immunol. (15)]

7. ΔΚ και ανοσιακή ανοχή

Η μία πλευρά της βιολογίας των ΔΚ συνοψίζεται στην ιδέα ότι τα προϊόντα παθογόνων παραγόντων ρυθμίζουν την ποιότητα των ειδικών ανοσιακών αποκρίσεων επιδρώντας στα ΔΚ. Η άλλη πλευρά αφορά στον πρόσφατα ανακαλυφθέντα κρίσιμο ρόλο των κυττάρων αυτών στην διατήρηση της αυτοανοχής και στην αποφυγή της αυτοανοσίας απουσία τέτοιων μικροβιακών σημάτων. Ο θύμος αδένας είναι, ως γνωστόν, η βασική τοποθεσία όπου εξουδετερώνονται τα αυτοαντιδραστικά Τ κύτταρα. Ένα από τα πιο αναπάντεχα ευρήματα των τελευταίων ετών ήταν ο ρόλος του AIRE (autoimmune regulator protein) στην προώθηση της θυμικής έκφρασης αντιγόνων που παραδοσιακά θεωρούνταν ιστοειδικά, με αποτέλεσμα τη διαγραφή των αντίστοιχων αυτοδραστικών θυμοκυττάρων(18). Η έλλειψη αυτής της οδηγούμενης από το AIRE εκτοπικής έκφρασης αντιγόνων μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αυτοανοσία. Όμως, ακόμα και με τη φυσιολογική δράση του AIRE, αυτοδραστικά κύτταρα σαφέστατα δραπέτεύουν στην περιφέρεια. Παρόλα αυτά, η σοβαρή νόσος εξαιτίας αυτοδραστικότητας δεν είναι συνήθης, πιθανώς χάρη σε μεταθυμικούς μηχανισμούς που κρατούν αυτή τη δραστηριότητα υπο έλεγχο.

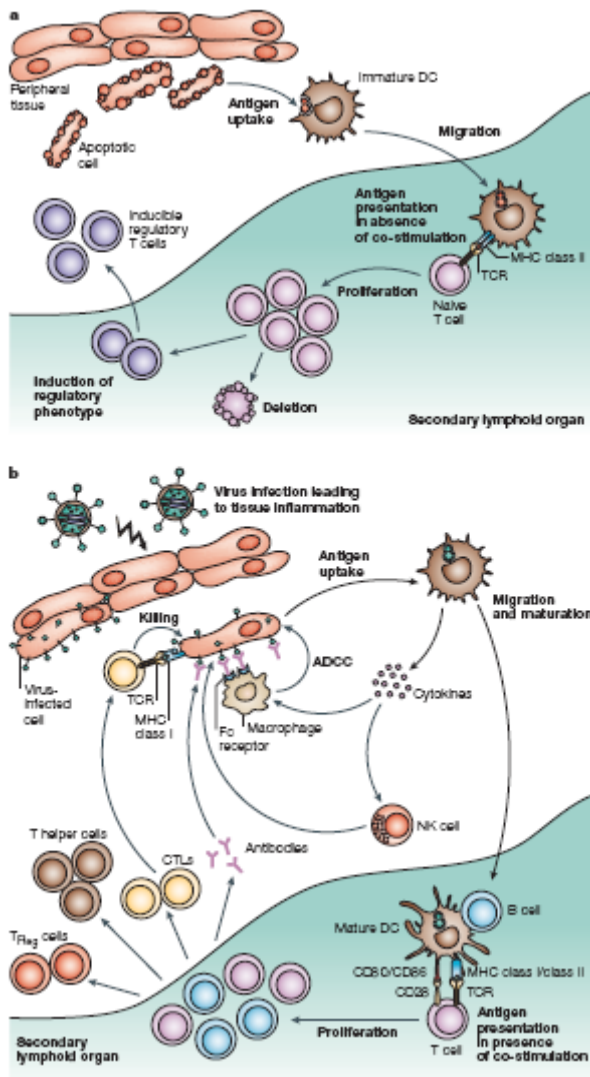
Τα ΔΚ είναι σημαντικό μέρος αυτής της διαδικασίας περιφερικού ελέγχου, όπως προτάθηκε πρώτα από την ομάδα του Steinman (10). Η ικανότητα επαγωγής ανοσιακής ανοχής δεν είναι χαρακτηριστική για μία υποομάδα ΔΚ και δεν περιορίζεται στα άωρα ΔΚ, όπως είχε αρχικά θεωρηθεί. Τα προκαλούντα ανοσιακή ανοχή ΔΚ παρουσιάζουν αντιγόνα στα αντιγονοειδικά Τ κύτταρα αλλά αδυνατούν να μεταδώσουν επαρκή συνδιεγερτικά σήματα (ή μεταδίδουν ανασταλτικά σήματα) για την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων. Αυτό μπορεί να εκδηλωθεί σαν θάνατος των Τ κυττάρων, ανενεργοποίηση ή παραγωγή και έκπτυξη ρυθμιστικών Τ κυττάρων (11,12).

Τα ΔΚ που επάγουν ανοσιακή ανοχή είναι άωρα, ανθεκτικά στην ωρίμανση ή εναλλακτικά ενεργοποιημένα ΔΚ με χαμηλή έκφραση επιφανειακών MHC, χαμηλή αναλογία συνδιεγερτικών προς ανασταλτικών σημάτων και μειωμένη ικανότητα έκφρασης Th1 κυτταροκινών, όπως IL-12. Για την ανάπτυξη τέτοιων κυττάρων, τα

in vitro παραχθέντα ΔΚ υπόκεινται σε επεξεργασία με διάφορους αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, οι οποίοι στοχεύουν τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των ΔΚ με διάφορους μηχανισμούς. Περιλαμβάνουν τις κυτταροκίνες IL-10 και TGFβ1, επαγωγείς του cAMP όπως PGE₂, ισταμίνη, β₂ αγωνιστές, νευροπεπτίδια, μεταβολίτες της βιταμίνης D₃ και κλινικά εγκεκριμένα ή πειραματικά ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως κορτικοστεροειδή, κυκλοσπορίνη, ασπιρίνη, tacrolimus, rapamycin κ.α. Όλα αυτά τα μόρια εμποδίζουν την ωρίμανση/ενεργοποίηση των ΔΚ ή αναστέλλουν την ικανότητά τους να παράγουν IL-12. Επιπλέον, κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες εμποδίζουν την μετατόπιση στον πυρήνα μελών της οικογένειας NF-κΒ, που απαιτείται για τη διαφοροποίηση των ΔΚ.

Η ικανότητα των ΔΚ για επαγωγή ανοσιακής ανοχής τα καθιστά γοητευτικά θεραπευτικά εργαλεία για τη βελτίωση ή πρόληψη της απόρριψης μοσχευμάτων και για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων ασθενειών. Τόσο η θεραπεία με *in vitro* παραχθέντα ΔΚ όσο και η *in situ* στόχευση των ΔΚ έχουν δείξει σημαντική προοπτική για την προώθηση της ανοχής κατά τη μεταμόσχευση. Αντιθέτως, η πρόκληση ανοσιακής ανοχής αποτελεί έναν από τους προβληματισμούς που σχετίζονται με τη χρήση ΔΚ στα πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας των όγκων και την επιλογή των κατάλληλων παραγόντων διέγερσης, όπως θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα.

Στην εικόνα 6 συνοψίζονται οι δράσεις των ΔΚ κατά την επαγωγή ανοσίας και ανοσιακής ανοχής.



Εικόνα 6: τα άωρα και τα ώριμα ΔΚ έχουν διαφορετικές λειτουργίες. α. Τα άωρα ΔΚ επάγουν ανοχή. Τα ΔΚ των ιστών “γεύονται” συνεχώς το περιβάλλον τους, προσλαμβάνουν αντιγόνα και μεταναστεύουν σε μικρούς αριθμούς στους λεμφαδένες. Απουσία φλεγμονής, τα ΔΚ παραμένουν άωρα, και τα αντιγόνα παρουσιάζονται στα Τ κύτταρα στους λεμφαδένες χωρίς συνδιέγερση, οδηγώντας είτε σε απαλοιφή των Τ κυττάρων είτε σε επαγωγή ρυθμιστικών Τ κυττάρων. β. Τα ώριμα ΔΚ επάγουν ανοσία. Η φλεγμονή των ιστών οδηγεί σε ωρίμανση των ΔΚ και σε μετανάστευση μεγάλων αριθμών ώριμων ΔΚ στους λεμφαδένες. Τα ώριμα ΔΚ εκφράζουν σύμπλοκα MHC/πεπτιδίων στην επιφάνειά τους, όπως επίσης και τα κατάλληλα συνδιεγερτικά μόρια. Αυτό επιτρέπει τη διέγερση CD4 Ths και CD8 CTLs, την ενεργοποίηση των Β κυττάρων και την έγερση μιας ειδικής ανοσιακής απόκρισης. Για τον έλεγχο της ανοσιακής απάντησης, εγείρονται επίσης πληθυσμοί CD4⁺CD25⁺ Tregs. ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. [απο Nature Rev. Immunol. (37)].

8. Τα ΔΚ στην ανοσολογία και ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Ο εμβολιασμός ενάντια στον καρκίνο βασίζεται στην υπόθεση ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναγνωρίζει αντιγόνα σχετιζόμενα με τους όγκους (tumour associated antigens, TAAs) και να καταστρέφει τα κακοήθη κύτταρα που τα εκφράζουν(41). Η πρώτη απόδειξη του ότι υπάρχουν αντιγόνα απόρριψης των όγκων χρονολογείται στα τέλη της δεκαετίας του 1980, όπου λεμφοκύτταρα που διηθούσαν όγκους ασθενών με μελάνωμα βρέθηκε ότι μπορούν να λύσουν HLA συμβατές κυτταρικές σειρές μελανώματος,

υποδηλώνοντας έτσι την ύπαρξη κοινών αντιγόνων του μελανώματος. Τα επόμενα χρόνια, κλωνοποιήθηκαν τα πρώτα γονίδια αντιγόνων όγκων (όπως τυροσινάση, gp100, MART και MAGE) και αναγνωρίστηκαν ανοσογονικοί επίτοποι. Αυτές, όπως και επόμενες μελέτες, έδειξαν ότι οι όγκοι συχνά αυξάνουν την έκφραση μορίων που φυσιολογικά είναι υπο καταστολή ή εκφράζονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα στους ενήλικους ιστούς. Τα λεμφοκύτταρα ικανά για αναγνώριση αυτών των αντιγόνων συνήθως υπάρχουν στην περιφέρεια, πιθανώς λόγω της μη παρουσίας αυτών των αντιγόνων κατά τη διάρκεια της θυμικής επιλογής ή λόγω χαμηλότερης συγγένειας του TCR(32). Όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις το ανοσοποιητικό σύστημα αποτυγχάνει να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα που τελικά γεννούν κλινικά σημαντικές κακοήθειες. Οι μηχανισμοί διαφυγής των όγκων περιλαμβάνουν την ανεπάρκειά τους σαν ΑΠΚ και την έλλειψη επαρκούς επαφής μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι αντισεπτασματικές ανοσιακές αποκρίσεις μπορούν να εκριζώσουν εγκατεστημένους όγκους, κυρίως σε ασθενείς με μελάνωμα ή νεφρικό καρκίνωμα. Διήθηση του πρωτογενούς όγκου από λεμφοκύτταρα έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση σε διαφορετικούς τύπων κακοηθειών. Παρομοίως, τα ανοσοσχετιζόμενα παρανεοπλασματικά σύνδρομα χαρακτηρίζονται από μία ανοσιακή απάντηση εναντίον αντιγόνων κοινών για τον όγκο και για φυσιολογικούς ιστούς (όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα) και έχουν συσχετιστεί με καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα, ακόμα και με αυθόρμητη ύφεση του όγκου. Όμως, τέτοιες αυθόρμητες ανοσιακές αποκρίσεις είναι σπάνιες και σε μεγάλο βαθμό απροσδιόριστες. Έτσι, ο στόχος της σύγχρονης ανοσοθεραπείας των όγκων είναι η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος για να μιμηθεί τέτοια γεγονότα απόρριψης και να βελτιωθεί το κλινικό αποτέλεσμα.

Ειδικότερα, η επαγωγή CD8 CTLs εναντίον καρκινικών επιτόπων *in vivo* είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα μιας ειδικής ανοσοθεραπευτικής προσέγγισης, δεδομένου ότι αυτά τα δραστικά κύτταρα είναι τα κυρίως υπεύθυνα για την απόρριψη των όγκων. Αυτά τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν μέσω του TCR πεπτιδικούς επιτόπους μήκους 8-11 αμινοξέων συνδεδεμένους σε HLA I μόρια. Σε συνάντηση με κύτταρα που εκφράζουν τον αντιγονικό στόχο, τα CTLs ενεργοποιούν το λυτικό τους μηχανισμό και σκοτώνουν τους στόχους. Η επαγωγή CD4 βοηθητικών

κυττάρων επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αντινεοπλασματική ανοσία και οι στρατηγικές ανοσοθεραπείας θα πρέπει να φροντίζουν να παρέχουν ανοσογονικούς επιτόπους και για αυτά τα λεμφοκύτταρα.

Η πρόσφατη πρόοδος στην κατανόηση του ανοσοποιητικού συστήματος άνοιξε καινούριες προοπτικές στην ανάπτυξη στρατηγικών ανοσοθεραπείας των όγκων. Συγκεκριμένα, η παροχή ανοσογονικών ΑΠΚ, όπως ΔΚ φορτισμένων με ΤΑAs θεωρείται μία από τις πλέον υποσχόμενες προσεγγίσεις της ειδικής ανοσοθεραπείας του καρκίνου και αξιολογείται σε πολλά κέντρα και για διαφορετικές κακοήθειες.

Δυστυχώς τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν ποικίλους μηχανισμούς για να αποφύγουν την ανίχνευσή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου των CD8 δραστικών κυττάρων για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, οι όγκοι έχουν εξελιχθεί ώστε να επεμβαίνουν στην αντιγονοπαρουσίαση ελαπώνοντας την έκφραση των ΤΑAs στα μόρια ΜHC. Επιπλέον, η ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει και να καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα εμποδίζεται από εκκρινόμενους από τον όγκο παράγοντες που επάγουν ανοχή. Ένα παράδειγμα είναι η IL-10, η οποία παράγεται είτε από κύτταρα του όγκου είτε από CD4⁺CD25⁺ Tregs και είναι, λοιπόν, συχνά παρούσα στο περιβάλλον του όγκου. Η IL-10 αναστέλλει επίσης την ωρίμανση των ΔΚ *in vitro*, και η αντιγονοπαρουσίαση από άωρα ΔΚ με χαμηλή έκφραση συνδιεγερτικών μορίων είναι γνωστό ότι επάγει Tregs που μπλοκάρουν την ενεργοποίηση φυσιολογικών CD25⁻ T κυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κυττάρων, ΔΚ του όγκου, T κυττάρων και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού που είναι παρόντα στον όγκο καθορίζουν εάν το ανοσοποιητικό σύστημα ενισχύει ή αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου.

Ποικίλλοι αριθμοί ΔΚ βρίσκονται στο εσωτερικό ή κοντά στους περισσότερους όγκους. Τείνουν όμως να είναι φαινοτυπικά και λειτουργικά άωρα και, αντι να επάγουν φλεγμονώδεις ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του όγκου, είναι πιθανότερο να προκαλέσουν ανοσιακή ανοχή (34). Έτσι, τα ΔΚ που απομονώνονται από τους όγκους έχουν χαμηλή έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και είναι συχνά ανίκανα να διεγείρουν T κύτταρα. Επιπρόσθετα, η παρουσίαση αντιγόνων από άωρα ΔΚ επάγει Tregs και οδηγεί σε ανενεργοποίηση ή απαλοιφή των T κυττάρων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα εμποδίζουν την ενεργοποίηση

των ΔΚ εκκρίνοντας διάφορες κυτταροκίνες, όπως IL-10, TGFβ και VEGF. Αυτή η αναστολή γίνεται μέσω αύξησης της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 στα ΔΚ σαν ανταπόκριση σε κυτταροκίνες του όγκου, π.χ. IL-10 και VEGF. Έχει ενδιαφέρον το ότι ο STAT-3 είναι επίσης υπεύθυνος για την παραγωγή αυτών των ανασταλτικών παραγόντων από τους όγκους, και μπλοκάρισμα της μεταγωγής σήματος μέσω του STAT-3 έχει σαν αποτέλεσμα τη δραματική αλλαγή του περιβάλλοντος του όγκου προς μία φλεγμονώδη κατάσταση. Επιπλέον, τα CD4⁺CD25⁺ Tregs αφθονούν σε πολλούς όγκους και αναστέλλουν ενεργά τόσο την ωρίμανση των ΔΚ όσο και την παραγωγή T δραστικών κυττάρων. Άρα λοιπόν αυτά τα δεδομένα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά το σχεδιασμό πρωτοκόλλων εμβολιασμού με ΔΚ.

Πηγές ΔΚ για ανοσοθεραπευτική χρήση

Διαφορετικές πηγές για την απομόνωση ή παραγωγή εμβολίων ΔΚ έχουν ερευνηθεί και χρησιμοποιηθεί στις πρώτες κλινικές δοκιμές(31). Οι πρώτες μελέτες πάνω στον εμβολιασμό με ΔΚ ξεκίνησαν το 1993 και χρησιμοποίησαν ολικά προϊόντα λευκαφαίρεσης αίματος με ακόλουθη φυγοκέντρηση σε κλίση συγκέντρωσης για να γίνει εμπλουτισμός για τα σπάνια πρόδρομα ΔΚ του περιφερικού αίματος πριν τη φόρτιση με αντιγόνα και την ωρίμανση. Λεπτομερείς *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα κύτταρα είναι πολύ αποδοτικά στην ενεργοποίηση παρθένων T κυττάρων και ενθαρρυντικά ανοσιακά και κλινικά αποτελέσματα εμβολιασμών στο Non-Hodgkin λέμφωμα ώθησαν την περαιτέρω χρήση τους για μελέτες στο ΠΜ και στον καρκίνο του προστάτη. Για να παρακαμφθεί το πρόβλημα της χαμηλής συχνότητας των ΔΚ στο αίμα, ακόμα και σε προϊόντα λευκαφαίρεσης, χρησιμοποιήθηκε η κινητοποίηση των ΔΚ με Flt3-L, κατόπιν πειραμάτων σε ποντίκια όπου η συστηματική χορήγηση Flt3-L οδήγούσε σε *in vivo* έκπτυξη των ΔΚ. Και στον άνθρωπο, σημαντική αύξηση του αριθμού των ΔΚ στο αίμα παρατηρείται μετά από χορήγηση Flt3-L.

Όπως όμως αναφέρθηκε προηγουμένως, το έντονα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που δημιουργούν οι όγκοι είναι πολύ πιθανό να καθιστά τα ΔΚ ανενεργά και επιρρεπή στην πρόκληση ανοσιακής ανοχής κυρίως και λιγότερο

ανοσίας. Ειδικά στο ΠΜ, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, έχει βρεθεί από διάφορες ομάδες ότι τα ΔΚ είναι λειτουργικά ανεπαρκή *in vivo*. Για αυτούς τους λόγους, η χρήση *in vitro* παραχθέντων ΔΚ αποτελεί ιδιαίτερα ελκυστική εναλλακτική, καθώς παρουσιάζει το βασικό πλεονέκτημα ότι τα ΔΚ αναπτύσσονται από πρόδρομα κύτταρα μακριά από τις ανοσοκατασταλτικές *in vivo* συνθήκες.

Λίγες δημοσιευμένες κλινικές δοκιμές υπάρχουν με χρήση ΔΚ παραχθέντων από CD34 προγονικά κύτταρα, εξαιτίας της προφανούς δυσκολίας της απομόνωσης των CD34 από ολικό αίμα ή προϊόντα λευκαφαίρεσης. Τα περισσότερα πρωτόκολλα χρησιμοποιούν ΔΚ παραχθέντα από μονοκύτταρα (moDCs), βασισμένα στην αρχική ανακάλυψη της ομάδας των Sallusto και Lanzavecchia(66,67), σύμφωνα με την οποία ο GM-CSF και η IL-4 είναι οι βασικές κυτταροκίνες για την παραγωγή ΔΚ. Η πλειοψηφία των πρωτοκόλλων βασίζεται σε αυτόν τον συνδυασμό κυτταροκινών για την ανάπτυξη moDCs *in vitro*. Υπάρχει διχογνωμία γύρω από τις βέλτιστες συνθήκες ωρίμανσης των αρχικά άωρων moDCs. Αρκετές ομάδες χρησιμοποιούν ένα "cocktail" κυτταροκινών ωρίμανσης"(TNF α , IL-1 β , IL-6, PGE $_2$ κ.α.), το οποίο δίνει έναν ομοιογενή πληθυσμό ώριμων ΔΚ με όλες τις τυπικές *in vitro* λειτουργίες των ΔΚ, έχει όμως το μειονέκτημα της προβληματικής διαθεσιμότητας κυτταροκινών για κλινική χρήση. Άλλες ομάδες έχουν υιοθετήσει την απλούστερη αλλά αποδοτική χρήση κλινικού βαθμού TNF α σαν μοναδική κυτταροκίνη για την πρόκληση ωρίμανσης των ΔΚ(68). Αυτά τα κύτταρα έχουν όλα τα μορφολογικά, φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ώριμων ΔΚ *in vitro* και *in vivo*.

Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν στη χρήση ώριμων ΔΚ για πρωτόκολλα εμβολιασμού, ώστε να αποφευχθεί η αντιγονοειδική αναστολή των Τ κυττάρων ή η επαγωγή Τ ρυθμιστικών κυττάρων από τα άωρα ΔΚ. Μία άλλη πιθανή αιτία της υπεροχής των ώριμων ΔΚ είναι η έλλειψη μεταναστευτικής ικανότητας των άωρων ΔΚ. Μία διαφορετική παράμετρος της *in vitro* παραγωγής moDCs είναι η χρήση ελεύθερων από ορό καλλιεργητικών μέσων ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη φόρτιση των ΔΚ με ξενοαντιγόνα που μπορεί να περιέχονται στα FCS/FBS (fetal calf/bovine serum) που χρησιμοποιήθηκαν στα αρχικά πρωτόκολλα. Η χρήση αυτόλογου ορού ή πλάσματος δεν φαίνεται να πλεονεκτεί έναντι της χρήσης AB ορού από υγιείς δότες ή της πλήρους απουσίας ανθρώπινου ορού. Ένα πιθανό μειονέκτημα της προσθήκης αυτόλογου ορού είναι η άγνωστη επίδραση που

μπορεί να έχουν στην ανάπτυξη των ΔΚ παράγοντες του ορού των ασθενών, π.χ. κυτταροκίνες πιθανώς ανασταλτικές.

Επιλογή αντιγόνων

Οι εμβολιασμοί έναντι του καρκίνου επιχειρούν να διεγείρουν CD8 CTLs ικανά να λύσουν κύτταρα του όγκου που παρουσιάζουν TAAs συνδεδεμένα με μόρια MHCI. Υπάρχουν αρκετές στρατηγικές για τη μεταφορά αντιγόνων στα ΔΚ κατά την *ex vivo* επεξεργασία τους, πριν τη χορήγησή τους στο δέκτη για παρουσίαση των αντιγόνων στα T κύτταρα. Τα ΔΚ μπορούν να φορτιστούν με συνθετικούς πεπτιδικούς επιτόπους προερχόμενους από γνωστά TAAs, όπως MUC1, Her-2/neu, survivin, τυροσινάση, τελομεράση, CEA, p53, MAGE, Melan-A/MART(32). Αν και τα περισσότερα από αυτά τα πεπτίδια έχουν σχεδιαστεί για να προσδένονται στο HLA-A2, το πιο κοινό HLA I μόριο μεταξύ των Καυκάσιων, έχουν αναγνωριστεί αρκετοί πεπτιδικοί επίτοποι που προσδένονται σε άλλα HLA I αλλήλια. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί πεπτίδια ειδικά για τα HLA II που είτε διεγείρουν μη ειδικά τα CD4 λεμφοκύτταρα είτε προέρχονται από αντιγόνα όγκων και επάγουν αντιγονοειδικά CD4 Ths. Πολλά από αυτά τα πεπτίδια είναι εμπορικά διαθέσιμα και έτοιμα για χρήση υπο GMP συνθήκες. Άρα λοιπόν, οι εμβολιασμοί με πεπτίδια είναι πιθανώς διαθέσιμοι για τους περισσότερους ασθενείς. Σε κάποιες μελέτες, τα πεπτίδια ενίονται κατευθείαν στους ασθενείς, χωρίς *ex vivo* επώαση με ΔΚ. Σε τέτοιες προσεγγίσεις, τα πεπτίδια ενίονται συνήθως μαζί με κυτταροκίνες, π.χ. GM-CSF, που ευνοεί τη μετανάστευση και την ενεργοποίηση των ΔΚ *in situ*. Σοβαρά μειονεκτήματα της χρήσης πεπτιδίων είναι: α. ο περιορισμός σε ασθενείς με συγκεκριμένα HLA I αλλήλια β. η ανάγκη προσδιορισμού της έκφρασης του αντιγόνου από τον όγκο του ασθενούς και γ. η πιθανότητα ότι, στοχεύοντας έναν ή λίγους αντιγονικούς επιτόπους, μπορεί να μην ανιχνευθούν τα καρκινικά κύτταρα που μειώνουν την έκφραση αυτών των αντιγόνων. Πάντως, η διαφυγή των όγκων μπορεί, μέχρι ενός βαθμού, να αποφευχθεί μέσω της έκπτυξης λεμφοκυττάρων ειδικών για επιτόπους διαφορετικούς από αυτούς του εμβολίου, φαινόμενο που ονομάζεται *epitope spreading* και έχει παρατηρηθεί σε κάποιες κλινικές μελέτες. Αυτό συμβαίνει όταν τα κύτταρα του όγκου λύονται από CTLs ειδικά για τους

επιτόπους του εμβολίου, και στη συνέχεια τα αντιγόνα που απελευθερώνονται από τα θανόντα κύτταρα προσλαμβάνονται από ΑΠΚ και επάγουν την έκπτυξη λεμφοκυτταρικών κλώνων με διαφορετικές ειδικότητες(31).

Μία άλλη προσέγγιση είναι η χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σαν αντιγόνα. Αυτές προσλαμβάνονται από τα ΔΚ, τα οποία τις επεξεργάζονται και τις παρουσιάζουν υπο μορφή ανοσογονικών πεπτιδίων συνδεδεμένων με μόρια HLA. Αυτή η προσέγγιση παρακάμπτει τον HLA περιορισμό των πεπτιδίων και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε ασθενείς με οζώδες λέμφωμα. Σε αυτή την περίπτωση, τα ΔΚ φορτίζονται *ex vivo* με τη μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη του λεμφώματος, τον ιδιότυπο, για επαγωγή αντινεοπλασματικής ανοσίας. Παρομοίως, έχει χρησιμοποιηθεί και ανασυνδυασμένη PAP (prostatic acid phosphatase) σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Μία εναλλακτική στρατηγική είναι η μεταφορά γονιδίων των TAAs στα ΔΚ, τα οποία μπορούν να μετασχηματιστούν από ανασυνδυασμένους ιούς (ρετροϊικοί ή αδενοϊικοί φορείς) ή να διαμολυνθούν με RNA που κωδικοποιεί για συγκεκριμένο καρκινικό αντιγόνο. Βέβαια η χρήση ιικών φορέων παρουσιάζει προβλήματα που σχετίζονται με την απόδοση του μετασχηματισμού, με πιθανές παθολογικές παρενέργειες του ιού στα ΔΚ και με την επαγωγή ισχυρών αντιϊικών ανοσιακών αποκρίσεων, γεγονός που δυσκολεύει τους επαναληπτικούς εμβολιασμούς. Ο μετασχηματισμός από ιούς μπορεί επίσης να μειώσει την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων από τα ΔΚ, επηρεάζοντας έτσι αρνητικά τη διέγερση των T κυττάρων(31).

Υπάρχουν και αρκετές άλλες προσεγγίσεις που, αντι να κάνουν χρήση ενός ή λίγων επιτόπων, χρησιμοποιούν ολόκληρο το υλικό του όγκου σαν πηγή αντιγόνων. Τέτοιες στρατηγικές χρησιμοποιούν υλικό από λυμένα κύτταρα του όγκου, νεκρά καρκινικά κύτταρα (αποπτωτικά ή νεκρωτικά σωμάτια), ΔΚ συγχωνευμένα με καρκινικά κύτταρα ή ολικό RNA του όγκου. Όλες αυτές οι μέθοδοι μπορούν να επάγουν ανοσία έναντι του αρχικού όγκου και αξιολογούνται για κλινική χρήση. Είναι σημαντικό ότι υλικά τέτοιου είδους αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το αντιγονικό ρεπερτόριο του όγκου, ούτως ώστε η επαγόμενη ανοσιακή απόκριση να στοχεύει ταυτόχρονα πολλά αντιγόνα του όγκου. Είναι πιθανό ότι θα συμβεί επιλεκτική έκπτυξη CTLs έναντι ανοσοεπικρατών επιτόπων σε κάποιες περιπτώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη συχνότητα λεμφοκυττάρων ειδικών για ορισμένους επιτόπους ή στην ισχυρή

ανοσογονικότητα ορισμένων πεπτιδίων. Ένα πιθανό πλεονέκτημα της χρήσης ολικού RNA του όγκου συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους που αναφέρθηκαν είναι ότι υπάρχουν τεχνικές για τον μη ειδικό πολλαπλασιασμό του mRNA. Αυτό επεκτείνει τη διαθεσιμότητα αυτής της μεθόδου και για περιπτώσεις όπου μικρά δείγματα όγκου, όπως βιοψίες, δεν θα επαρκούσαν για φόρτιση των ΔΚ με αποπτωτικά σωμάτια ή προϊόντα λύσης των κυττάρων. Επιπλέον, τα αντιγόνα που κωδικοποιούνται από το RNA μπορούν να παρουσιαστούν σε μόρια HLA I και II, επάγοντας έτσι τόσο CD8 όσο και CD4 λεμφοκύτταρα. Άρα λοιπόν, η χρήση ολικού RNA για τη διέγερση των ΔΚ φαίνεται σαν μία πολύ ενδιαφέρουσα προοπτική.

Οδοί χορήγησης των ΔΚ

Η καλύτερη οδός χορήγησης των *ex vivo* διεγερμένων ΔΚ που θα επάγει αποδοτικές ανοσιακές αποκρίσεις *in vivo* δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα(32). Διαφορετικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές οδούς χορήγησης. Τα ΔΚ έχουν ενεθεί ενδοδερμικά, υποδόρια, ενδοφλέβια και εντός των λεμφαδένων, και έχει επίσης προταθεί η ένεσή τους εντος του όγκου. Μελέτες στους ανθρώπους υποδεικνύουν ότι τα ΔΚ που ενέθηκαν ενδοφλέβια εντοπίζονται κατά προτίμηση στους πνεύμονες και, επακόλουθα, στο σπλήνα και στο ήπαρ. Αντιθέτως, ενδοδερμική ένεση μπορεί να οδηγήσει στη μετανάστευση των ΔΚ στους λεμφαδένες. Σύμφωνα με μία αναφορά, είναι πιθανότερο να διεγερθούν Th1 ανοσιακές αποκρίσεις από ενδοδερμική ένεση παρα από κάποια από τις άλλες μεθόδους. Παρομοίως, μια άλλη μελέτη αναφέρει ισχυρότερη ανοσία μετά από ενδοδερμική ένεση ΔΚ φορτισμένων με πεπτίδια παρα μετά από ενδοφλέβια ένεση. Πάντως, σημαντικές ανοσιακές αποκρίσεις έχουν επίσης παρατηρηθεί μετά από υποδόριες και ενδοφλέβιες ενέσεις. Είναι όμως γεγονός ότι το ποσοστό των ΔΚ που φτάνει στους λεμφαδένες είναι χαμηλό, μικρότερο από 10%. Έχει προταθεί ότι η μετανάστευση των ΔΚ από το σημείο της ένεσης στους λεμφαδένες και η επακόλουθη ανοσιακή απόκριση μπορεί να ενισχυθεί με προ της ένεσης τοπική χορήγηση παραγόντων φλεγμονής. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση του CCL21, συνδέτη του CCR7, στα τοπικά λεμφαγγεία, ευνοώντας έτσι τη

μετακίνηση των ΔΚ μέσω των λεμφαγγείων προς τους λεμφαδένες. Η ένεση των ΔΚ εντός των λεμφαδένων παρακάμπτει το στάδιο της μετανάστευσης και φέρνει τα ΔΚ σε άμεση επαφή με το λεμφικό ιστό. Έχουν αναφερθεί θετικά αποτελέσματα κλινικών μελετών που χρησιμοποίησαν αυτή την οδό χορήγησης των ΔΚ. Όμως, η ένεση εντός των λεμφαδένων συχνά απαιτεί περίπλοκα απεικονιστικά συστήματα, που την καθιστούν σαφώς πιο δύσχρηστη.

Ποικίλα προγράμματα χορήγησης των ΔΚ έχουν εφαρμοστεί στις κλινικές δοκιμές. Οι περισσότερες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει εβδομαδιαίες, ανα δύο εβδομάδες ή μηνιαίες ενέσεις, με τουλάχιστον δύο χορηγήσεις εμβολίων. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκαν κλινικές ανταποκρίσεις, χορηγήθηκαν ενισχυτικές ενέσεις για αρκετούς μήνες. Στην πραγματικότητα, δεν είναι σαφές εάν η αντικαρκινική ανοσία που επάγει ο εμβολιασμός θα διαρκούσε απουσία επιπλέον χορήγησης ΔΚ ή εάν είναι απαραίτητες οι επαναληπτικές ενέσεις. Διαφορετικοί αριθμοί ΔΚ έχουν δοκιμαστεί, από 1×10^6 έως 250×10^6 ανά εμβόλιο (31). Η διαθεσιμότητα των ΔΚ του περιφερικού αίματος ή των μονοκυττάρων αποτελεί πρακτικό περιορισμό για την παραγωγή ΔΚ, καθώς ούτε τα μονοκύτταρα ούτε τα ΔΚ του περιφερικού αίματος πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας. Κάποια δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αύξηση του αριθμού των ΔΚ μπορεί να βελτιώσει την έκβαση του εμβολιασμού, αν και άλλες μελέτες δεν βρήκαν καμία συσχέτιση μεταξύ της επαγόμενης ανοσιακής απάντησης και του αριθμού των ΔΚ που χρησιμοποιήθηκαν.

Κλινικές μελέτες με ΔΚ

Η πρώτη δημοσιευμένη κλινική αναφορά με *in situ* χρήση αυτόλογων ΑΠΚ στο ανθρώπινο μελάνωμα έγινε το 1995(30), και η πρώτη επιτυχημένη κλινική μελέτη με εμβολιασμό ΔΚ σε ασθενείς με Β-λέμφωμα δημοσιεύτηκε το 1996 από την ομάδα του Hsu(21). Μέσα στα επόμενα 6 χρόνια, ο αριθμός των εμβολιασμένων με ΔΚ ασθενών με κακοήθειες ξεπέρασε τους 1000(29), και είχαν δημοσιευτεί 98 κλινικές δοκιμές που αφορούσαν περισσότερες από 24 κακοήθειες, μεταξύ των οποίων καρκίνος του μαστού, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, λέμφωμα, μελάνωμα, ΠΜ, καρκίνος των ωοθηκών, του παγκρέατος, του

προστάτη, του νεφρού, νευροβλάστωμα κ.α(4,24,25,28,31,32). Περισσότερο από το 75% των μελετών αφορά 4 κακοήθειες, μελάνωμα, καρκίνος του προστάτη, καρκίνος του παχέος εντέρου και ΠΜ, πιθανώς εξαιτίας της διαθεσιμότητας συνθετικών αντιγόνων μεγάλης καθαρότητας για αυτούς τους τύπους καρκίνου (Mart1, Mage3, gp100 για το μελάνωμα, τροποποιημένη PAP ή PSA για τον καρκίνο του προστάτη, πεπτίδια από το Mart ή το CEA για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και ιδιότυπος για το ΠΜ).

Η μέχρι τώρα κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι τα ΔΚ μπορούν να χορηγηθούν με ασφάλεια, χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Υπάρχει ένα θεωρητικό πρόβλημα που σχετίζεται με τη χρήση ολόκληρων καρκινικών κυττάρων για τη διέγερση των ΔΚ, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει αυτοανοσία εξαιτίας της μη ελεγχόμενης παρουσίασης φυσιολογικών πρωτεϊνών του ξενιστή, που δεν αποτελούν αντιγόνα ειδικά για τον όγκο. Στην πραγματικότητα, οι αναφορές για αυτοάνοσες αντιδράσεις είναι σπάνιες. Δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η αυτοανοσία είναι συχνότερη μετά από εμβολιασμό με ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA ή DNA του όγκου και αποπτωτικά ή νεκρωτικά σωματίδια σε σχέση με ΔΚ φορτισμένα με συνθετικά πεπτίδια(29,37). Στις περισσότερες κλινικές μελέτες μπορούσε να ανιχνευθεί ανοσιακή απόκριση έναντι των αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό, κάτι που υποδηλώνει ότι τα φορτισμένα με αντιγόνα ΔΚ είναι ανοσογονικά *in vivo*. Παρ'όλα αυτά, κλινικές ανταποκρίσεις παρατηρήθηκαν σε μία μειοψηφία ασθενών. Πιθανές εξηγήσεις αυτού του φαινομένου θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο. Εδώ θα δοθούν μερικά στοιχεία για τις κλινικές δοκιμές εμβολιασμών με ΔΚ σε αιματολογικές κακοήθειες, που άπτονται περισσότερο της θεματολογίας αυτής της μελέτης.

Στις κακοήθειες των Β λεμφοκυττάρων, πεπτίδια προερχόμενα από τον ιδιότυπο, τη μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη που παράγουν τα νεοπλασματικά κύτταρα, αποτελούν γοητευτικά αντιγόνα του όγκου για κυτταρική θεραπεία(41). ΔΚ φορτισμένα με ιδιοτυπικές πρωτεΐνες και το μόριο-φορέα KLH (keyhole limpet hemocyanin) χρησιμοποιήθηκαν ήδη στη μελέτη του Hsu(21) σε ασθενείς με οζώδες λέμφωμα σε μία σειρά από 5 υποδόριους εμβολιασμούς. Στο 49% των ασθενών αναπτύχθηκε ειδική ανοσιακή απάντηση έναντι του ιδιοτύπου και η διάρκεια της ελεύθερης νόσου επιβίωσης, όπως και η συνολική επιβίωση, ήταν μεγαλύτερες στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ανοσιακά σε σχέση με τους

υπόλοιπους. Αργότερα αναφέρθηκε και μία παρόμοια κλινική δοκιμή, με την προσθήκη τοπικής ένεσης GM-CSF για την ενίσχυση του εμβολιασμού. Πολύ ενθαρρυντικό ποσοστό των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσίασε μοριακή ύφεση και ειδικά για τον όγκο CD4 και CD8 λεμφοκύτταρα. Μετά από αυτές τις πιλοτικές μελέτες, πολλές παρόμοιες κλινικές δοκιμές έχουν λάβει χώρα. Το πρώτο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από αυτές είναι ότι η παρασκευή ατομικών ιδιοτυπικών πρωτεϊνών είναι πολύ απαιτητική από τεχνική και οικονομική άποψη, παρόλο που η σαφής επαγωγή αποτελεσματικών ανοσιακών αποκρίσεων έχει αποδειχθεί περίπου στο 50% των ασθενών. Η πραγματική επίδραση σε κλινικές παραμέτρους όπως επιβίωση ή ελεύθερη υποτροπής επιβίωση παραμένει υπο μελέτη. Συνεχίζονται κλινικές μελέτες φάσης III. Για το ΠΜ, τη δεύτερη κακοήθεια των Β κυττάρων που έχει αποτελέσει στόχο των εμβολίων ΔΚ, θα γίνει εκτενής αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο.

Στην περίπτωση της λευχαιμίας, η κλινική ανταπόκριση των ασθενών στο DLI (donor leukocyte infusion) μετά από αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών αποδεικνύει ότι η ανοσοθεραπεία έχει θέση στη θεραπευτική αντιμετώπιση της νεοπλασίας αυτής (41). Ένας αυξανόμενος αριθμός αντιγόνων ειδικών για τη λευχαιμία (όπως οι χιμαιρικές πρωτεΐνες BCR-ABL, TEL-AML1, PML-RAR α), όπως επίσης και αντιγόνα που υπερεκφράζονται στις λευχαιμίες [πρωτεΐνωση 3 (Pr3), Wilms' tumour 1 protein (WT1), human telomerase reverse transcriptase (hTERT), survivin, cytochrome P4501B1(CYPB1), immature laminin receptor protein (OFA-iLRP), human neutrophil elastase (HNE), receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM), preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) και G250/CA9] έχουν αναγνωρισθεί και μπορεί να φανούν χρήσιμοι στόχοι για την ανοσοθεραπεία της μυελογενούς λευχαιμίας. Πεπτίδια του RHAMM με περιορισμό για HLA-A2 μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί για την ευαισθητοποίηση CD8 κυττάρων από ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), τα οποία στη συνέχεια ανταποκρίνονται σε ΑΠΚ φορτισμένα με τα πεπτίδια. Αντιθέτως, παρομοίως επεξεργασμένα CD8 Τ κύτταρα από υγιείς δότες ανταποκρίνονται λιγότερο συχνά στα ίδια ΑΠΚ, κάτι που υποδηλώνει ότι το RHAMM είναι υποσχόμενος ανοσοθεραπευτικός στόχος.

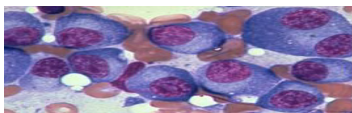
Το WT1 υπερεκφράζεται στους περισσότερους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της ΟΜΛ, και έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη

λευχαιμογένεση. 3 στους 18 ασθενείς με ΟΜΛ έχουν ειδικά για το WT1 αντισώματα στον ορό τους, ενώ CD8 κύτταρα ειδικά για τα WT1 και Pr3 εγείρονται αυθόρμητα σε ασθενείς με ΟΜΛ. Κλινικές δοκιμές φάσης I και II με χρήση πεπτιδίων ή mRNA του WT1 έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ένας πεπτιδικός επίτοπος του Pr3, που ονομάζεται PR1, έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες φάσης I και II σε ασθενείς με ΟΜΛ, χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σε συνδυασμό με GM-CSF. Ένα πολύ καλό ποσοστό ασθενών ανέπτυξε ειδικές ανοσιακές απαντήσεις και λιγότεροι ασθενείς είχαν κλινικές ανταποκρίσεις με μοριακή ύφεση. Από τα δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί μέχρι τώρα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο εμβολιασμός με ΔΚ είναι εφικτός στις λευχαιμίες. Καθώς πολλοί ασθενείς με ΧΜΛ παραμένουν θετικοί για το BCR-ABL παρά τη θεραπεία με αναστολείς του, όπως το imatinib, η δυναμική της ειδικής ανοσοθεραπείας θα πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο στο πλαίσιο της ενίσχυσης της συμβατικής θεραπείας.

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

Γενικά

Το πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) είναι μία αιματολογική κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό κακοήθων πλασματοκυττάρων (εικόνα 7), και τα τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι το μικροπεριβάλλον των νεοπλασματικών κυττάρων στο μυελό των οστών έχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Η πρώτη επιτυχημένη θεραπευτική αντιμετώπιση του ΠΜ, με συνδυασμό μελφαλάνης και πρεδνιζόνης, χρησιμοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και βελτιώθηκε περαιτέρω κατά τη δεκαετία του 1980 με συνδυασμό χημειοθεραπείας υψηλής δόσης και αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων. Όμως, μια νέα εποχή στην αντιμετώπιση του ΠΜ ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 με την εισαγωγή της θαλιδομίδης, του Bortezomib και της λεναλιδομίδης, ανάλογου της θαλιδομίδης, παραγόντων που στοχεύουν τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Αν και το όφελος αυτών των φαρμάκων φάνηκε πρώτα στην υποτροπιάζουσα και ανθεκτική νόσο, η χρήση τους έχει πλέον επεκταθεί και στο πλαίσιο της θεραπείας πρώτης γραμμής και αποτελεί πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση όχι μόνο για τους ασθενείς με ΠΜ, αλλά και για άλλες αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους (51). Όμως, το ΠΜ παρουσιάζει την τάση να υποτροπιάζει παρά την αρχική ανταπόκριση στους παράγοντες αυτούς, οι περισσότεροι δε ασθενείς τελικά υποκύπτουν στη νόσο. Για το λόγο αυτό, συνεχιζόμενες προκλινικές μελέτες προσπαθούν να προσδιορίσουν καλύτερα τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που χαρακτηρίζουν το ΠΜ και να αναγνωρίσουν θεραπευτικούς στόχους ώστε να ενισχυθούν οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας έναντι του όγκου, να παρακαμφθεί η ανθεκτικότητα στους φαρμακευτικούς παράγοντες και να βελτιωθεί η κλινική έκβαση των ασθενών.



Εικόνα 7: επίχρισμα μυελού των οστών από ασθενή με ΠΜ. Διακρίνονται τα πολυπληθή πλασματοκύτταρα, κάποια πολυπλοειδικά, με τους έκκεντρους πυρήνες.

1.Επιδημιολογία

Το ΠΜ είναι η δεύτερη πιο συχνή κακοήθεια του αίματος στις ΗΠΑ μετά τη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία, αποτελεί περίπου το 1% των νεοπλασιών και το 13% των αιματολογικών κακοηθειών (51). Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση είναι περίπου τα 62 χρόνια για τους άνδρες και τα 61 χρόνια για τις γυναίκες (εύρος 20-92), ενώ μόνο το 2% των ασθενών έχουν ηλικία μικρότερη από 40 χρονών. Περίπου 20.000 νέα περιστατικά εμφανίζονται κάθε χρόνο στις ΗΠΑ, με συχνότητα 7,1 ανα 100.000 στους άνδρες και 4,6 ανα 100.000 στις γυναίκες. Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει ανα την υφήλιο από 1 στους 100.000 στην Κίνα μέχρι περίπου 4 στους 100.000 στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες. Η ασθένεια είναι συχνότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες και με διπλάσια συχνότητα στον αφροαμερικανικό σε σχέση με τον Καυκάσιος καταγωγής πληθυσμό της Αμερικής. Οι λόγοι για αυτή την άνιση κατανομή μεταξύ φύλων και φυλών είναι προς το παρόν άγνωστοι. Η μέση επιβίωση μετά από συμβατική θεραπεία είναι 3-4 χρόνια, ενώ η χρήση χημειοθεραπείας υψηλής δόσης και αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων μπορεί να παρατείνει τη μέση επιβίωση στα 5-7 χρόνια. Νεότεροι θεραπευτικοί παράγοντες, μόνοι ή σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες θεραπείες, δοκιμάζονται συνεχώς προκειμένου να βελτιωθεί περαιτέρω η επιβίωση.

2. Παθογένεση

Το ΠΜ χαρακτηρίζεται από διήθηση του μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα, μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη, οστεολυτικές βλάβες, νεφρική νόσο και ανοσοανεπάρκεια. Ένα μοντέλο εξέλιξης της ασθένειας προτείνει ότι η MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined clinical significance) μπορεί να εξελιχθεί σε ασυμπτωματικό (smoldering) ΠΜ και τελικά σε συμπτωματικό μυελικό ΠΜ και σε εξωμυελική νόσο, γνωστή και σαν πλασματοκυτταρική λευχαιμία.

Ογκογενωμικές μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν λίγες διαφορές μεταξύ του MGUS και του ΠΜ, γεγονός που υποδεικνύει το βασικό ρόλο του μικροπεριβάλλοντος του

μυελού των οστών στην ανάπτυξη, τη διατήρηση και την εξέλιξη του ΠΜ. Άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μυελωματικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος του μυελού των οστών, ή μεταξύ των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας των μυελωματικών κυττάρων, διενεργούνται μέσω υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, για παράδειγμα ιντεγκρίνες, καδερίνες, σελεκτίνες, συνδεκάνες και μόρια προσκόλλησης της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Και οι δύο τύποι αλληλεπιδράσεων αυξάνουν άμεσα την ανάπτυξη, την επιβίωση, τη μετανάστευση και την ανθεκτικότητα των μυελωματικών κυττάρων και ρυθμίζουν τις λειτουργίες των κυττάρων του στρώματος του μυελού των οστών, ενισχύοντας π.χ. την έκκριση κυτταροκινών.

Το μη κυτταρικό τμήμα του μυελού των οστών αποτελείται από πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας και υγρό. Προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, π.χ. κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη, λαμίνη και βιτρονεκτίνη, επάγει την επιβίωση των κυττάρων, την ανθεκτικότητα σε φαρμακευτικούς παράγοντες και την παραγωγή και έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών. Το υγρό αποτελείται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως IL-6, VEGF, IGF1, TGFβ, μέλη της υπεροικογένειας TNF, CCL3, SCF, HGF και IL-10, που παράγονται και εκκρίνονται από κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανομένων των μυελωματικών κυττάρων, και ρυθμίζονται από αυτοκρινείς και παρακρινείς οδούς (36,50,51,52,53,62).

Στο κυτταρικό τμήμα του μυελού των οστών, τα μυελωματικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με αιμοποιητικά και μη κύτταρα, γεγονός που προκαλεί ανοσοκαταστολή και οστεολυτικές αλλοιώσεις. Τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών στέλνουν με τη σειρά τους σήματα (άμεσα μέσω κυτταρικών επαφών ή έμμεσα μέσω έκκρισης διαλυτών παραγόντων) που επηρεάζουν την ανάπτυξη, την επιβίωση, τη μετανάστευση και τη φαρμακευτική ανθεκτικότητα των μυελωματικών κυττάρων. Για παράδειγμα, η προσκόλληση των πλασματοκυττάρων στα κύτταρα του μυελού των οστών μέσω ιντεγκρινών προκαλεί αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, π.χ. CCND, αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως BCL2, BCL2L1 και MCL1, και της δραστηριότητας της τελομεράσης στα μυελωματικά κύτταρα, και εξαρτώμενη από τον NFκB μεταγραφή και έκκριση IL-6 στα κύτταρα του μυελού. Η έκκριση IL-6

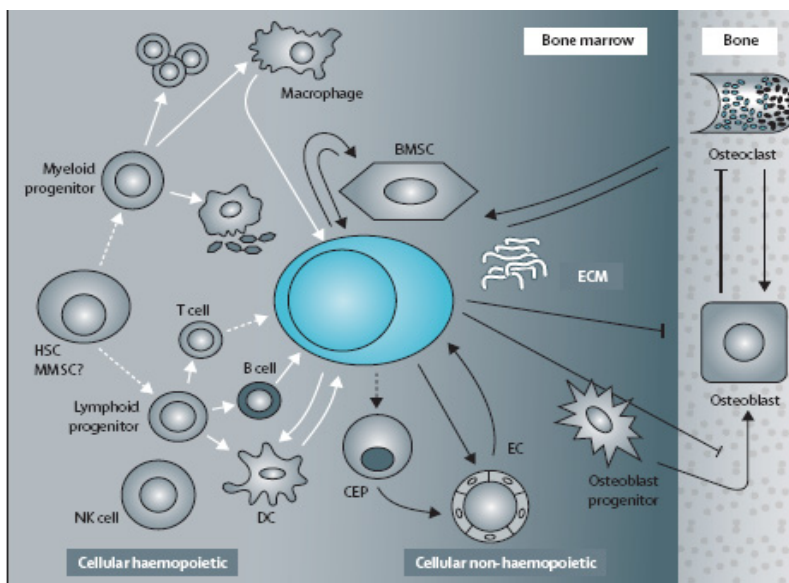
από τα κύτταρα του μυελού ενισχύει την παραγωγή και έκκριση VEGF από τα πλασματοκύτταρα, και αντίστροφα.

Ο VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στη νεοαγγειογένεση των συμπαγών όγκων, προωθώντας έτσι την ανάπτυξη των όγκων και το μεταστατικό τους δυναμικό. Το 1993 διασαφηνίστηκε ο ρόλος του μορίου αυτού και στις αιματολογικές κακοήθειες. Στο ΠΜ, αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα στα δείγματα μυελού των ασθενών συσχετίζεται με την εξέλιξη της ασθένειας και με κακή πρόγνωση. Συγκεκριμένα, το εύρος της αγγειογένεσης συσχετίζεται απευθείας με το δείκτη πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων και συνδέεται αντιστρόφως με την επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον, η μικροαγγειακή πυκνότητα του μυελού των οστών κατά την αρχική διάγνωση αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για τη μέση συνολική επιβίωση και τη μέση ελεύθερη από νόσο επιβίωση σε ασθενείς που υπόκεινται σε αυτόλογη μεταμόσχευση. Εκτός από τη διέγερση της αγγειογένεσης, ο VEGF επάγει απευθείας τη μετανάστευση των μυελωματικών κυττάρων μέσω της φιμπρονεκτίνης, τον πολλαπλασιασμό τους και την επιβίωσή τους μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών. Είναι σημαντικό το ότι ο VEGF μπορεί να έχει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών στόχων εντός του μυελού, καθώς επηρεάζει δραματικά τη διαφοροποίηση πολλών αιμοποιητικών σειρών *in vivo*, αυξάνει την παραγωγή Β κυττάρων και μυελικών κυττάρων, ρυθμίζει την επιβίωση των αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων μέσω αυτοκρινών μηχανισμών, αυξάνει την οστεοκλαστική δραστηριότητα και τη χημειοταξία των οστεοκλαστών και εμποδίζει την ωρίμανση των ΔΚ. Άρα λοιπόν, η απορρύθμιση του VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του ΠΜ και στα κλινικά χαρακτηριστικά του, συμπεριλαμβανομένων των οστικών αλλοιώσεων και της ανοσοκαταστολής. Η αναστολή του VEGF μπορεί λοιπόν να στοχεύσει όχι μόνο τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και τα μυελωματικά κύτταρα, αλλά και ένα μεγάλο εύρος κυττάρων που συμβάλλουν στην παθογένεση του ΠΜ (36).

Η IL-6 είναι ο βασικός παράγοντας ανάπτυξης, επιβίωσης και φαρμακολογικής ανθεκτικότητας για τα μυελωματικά κύτταρα. Τα πλασματοκύτταρα πολλαπλασιάζονται κατόπιν διέγερσης από την IL-6 μέσω παρακρινών κυρίως μηχανισμών, ανταποκρινόμενα στην παραγωγή της κυτταροκίνης αυτής από τα κύτταρα του στρώματος του μυελού. Η IL-6 συμβάλλει στην παθογένεση του ΠΜ μέσω νεοαγγειογένεσης, αναστολής της απόπτωσης και καταβολισμού των οστών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η IL-6 και ο VEGF διεγείρουν

αμφίδρομα την παραγωγή τους από τα πλασματοκύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος του μυελού και προωθούν την αγγειογένεση στο μυελό των οστών, η οποία αντικατοπτρίζει την εξέλιξη της ασθένειας. Επιπλέον, η IL-6 αναστέλλει την απόπτωση προωθώντας ταυτόχρονα τη μετάβαση του μυελωματικού κυττάρου από τη φάση G_0/G_1 του κυτταρικού κύκλου στη φάση S (62). Όσον αφορά το μεταβολισμό των οστών, η IL-6 επάγει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών παρουσία του διαλυτού IL-6R, αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης των οστεοκλαστών και αυξάνει τον καταβολισμό των οστών. Εξάλλου η μεγάλη παραγωγή IL-6 και οστεοποντίνης από τους οστεοκλάστες παίζει κεντρικό ρόλο στην επιβίωση και ανάπτυξη των μυελωματικών κυττάρων (52). Η IL-6 ελαττώνει επίσης το σχηματισμό νέων οστών μειώνοντας την παραγωγή οστεοκαλσίνης από τους οστεοβλάστες. Άρα λοιπόν, η ιντερλευκίνη 6 εμπλέκεται σε βάθος στην παθολογία του ΠΜ όχι μόνο σαν αυξητικός παράγοντας, αλλά και σαν θεραπευτικός στόχος.

Στην εικόνα 8 συνοψίζονται οι αλληλεπιδράσεις των μυελωματικών κυττάρων με τα αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών.



Εικόνα 8: αλληλεπιδράσεις των μυελωματικών κυττάρων με τα αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα μυελωματικά κύτταρα διαταράσσουν την ομοιοστάση των κυττάρων του στρώματος του μυελού των οστών (αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα), επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ουσία. Έτσι, τα κύτταρα του όγκου επάγουν άμεσες και έμμεσες αλληλουχίες μεταγωγής σήματος στο μυελό, ο οποίος με τη σειρά του ενισχύει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση και την ανθεκτικότητα των μυελωματικών κυττάρων, τη μη φυσιολογική ανοσορύθμιση, την αγγειογένεση του όγκου και την αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα. BMSC: bone marrow stromal cell. CEP: circulatory endothelial progenitor. DC: dendritic cell. EC: endothelial cell. ECM: extracellular matrix. HSC: haemopoietic stem cell. MMSC: multiple myeloma stem cell. NK: natural killer. [από Lancet (51)]

3. Γενετικοί παράγοντες

Υπάρχει ένα διαρκώς διευρυνόμενο ερευνητικό υπόβαθρο που αφορά στη γενετική βάση του ΠΜ. Η χρήση τεχνικών κυτταρογενετικής και FISH έχουν δείξει την ύπαρξη αριθμητικών ανωμαλιών στα γονίδια των μυελωματικών κυττάρων, τόσο υπερδιπλοειδικών όσο και μη υπερδιπλοειδικών. Οι μη υπερδιπλοειδικές ανωμαλίες συσχετίζονται με μειωμένη επιβίωση εξαιτίας αντιμεταθέσεων υψηλού κινδύνου της περιοχής IGHR (t[4;14] ή t[14;16]), μερική (q14) ή ολική απώλεια του χρωμοσώματος 13 και μερική απώλεια του χρωμοσώματος 17 (p13). Αντιθέτως, οι υπερδιπλοειδικές ανωμαλίες που προκαλούνται από πολλαπλές τρισωμίες και ένα μικρό ποσοστό περιπτώσεων μονοσωμίας ή απώλειας του χρωμοσώματος 13 και αντιμετάθεσης της IGHR t[11;14] συνδέονται με βελτιωμένη έκβαση (παρατεταμένη επιβίωση). Οι περισσότερες πρώιμες χρωμοσωμικές αντιμεταθέσεις συμβαίνουν συχνότερα στην περιοχή IGHR στο χρωμόσωμα 14 (q32.33) και εμπλέκουν συνήθως τα ογκογονίδια CCND1 (t[11;14][q13;q32.33]), CCND3 (t[6;14][p21;q32.33]), MAF (t[14;16][q32.33;q23]), FGFR3 και WHSC1 (t[4;14][p16.3;q32.33]) και MAFB (t[14;20][q32.33;q11.1]). Σημειώνεται ότι αυτές οι 5 αντιμεταθέσεις, οι οποίες προκύπτουν εξαιτίας του ανασυνδυασμού των IgH γονιδίων κατά την ανάπτυξη των B κυττάρων στα βλαστικά κέντρα και έχουν σαν αποτέλεσμα την απορρύθμιση ογκογονιδίων που μετατοπίζονται κοντά σε δυνατούς Ig ενισχυτές, αφορούν περίπου το 40% των περιπτώσεων ΠΜ (51,52). Υπάρχουν και δευτερογενείς αντιμεταθέσεις και γονιδιακές μεταλλάξεις που έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη της ασθένειας.

Οι σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης έχουν επιβεβαιώσει και επεκτείνει τα αποτελέσματα που έδωσαν οι συμβατικές τεχνικές κυτταρογενετικής και FISH. Αυτές οι μέθοδοι επέτρεψαν την προγνωστική κατηγοριοποίηση του ΠΜ με βάση τις γενετικές ανωμαλίες (52,53). Η παθογένεση της ασθένειας επηρεάζεται από την επιγενετική σίγηση και ενεργοποίηση των γονιδίων, και συνεχιζόμενες κλινικές μελέτες εκτιμούν τα υποσχόμενα αποτελέσματα προκλινικών μελετών όπου έγινε χρήση αναστολέων των αποακετυλασών των ιστονών για να μειωθεί η επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων. Η συνεχής

έρευνα αναμένεται να βελτιώσει και να ενσωματώσει τα κυτταρογενετικά, γενετικά και επιγενετικά δεδομένα ώστε να διαλευκανθούν περαιτέρω τα μοριακά γεγονότα που απαιτούνται για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ασθένειας. Επιπλέον, η δημιουργία εύκολα προσβάσιμων βάσεων δεδομένων θα βοηθήσει στην αναγνώριση διαφόρων κατηγοριών ασθενών και στο σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών.

4. Διάγνωση

Το ΠΜ διαγιγνώσκεται με βάση: την παρουσία παραπρωτεΐνης στον ορό και στα ούρα, που ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση ορού και ανοσοκαθήλωση, τη διήθηση του μυελού των οστών από κακοήγη πλασματοκύτταρα, που εκτιμάται με οστεομυελική βιοψία και την παρουσία οστικών αλλοιώσεων που ανιχνεύονται με ακτινολογική εξέταση του σκελετού και μαγνητική τομογραφία.

Η Διεθνής Ομάδα Μελέτης του Μυελώματος έχει καθορίσει κριτήρια διαχωρισμού του ασυμπτωματικού (smoldering) ΠΜ, που δεν έχει άμεση ανάγκη θεραπείας, από την ενεργό ασθένεια όπου η θεραπεία είναι απαραίτητη. Οι κύριες ενδείξεις θεραπείας περιλαμβάνουν βλάβη των οργάνων-στόχων όπως υπερασβεστιαμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία και οστικές αλλοιώσεις. Άλλες εκδηλώσεις είναι η αμυλοείδωση και οι συχνές βακτηριακές λοιμώξεις (περισσότερες από 2 ανα έτος). Μέχρι το 2005, το στάδιο της ασθένειας κατατασσόταν σύμφωνα με το σύστημα Durie-Salmon. Όμως, μεταξύ του 1981 και του 2002, δεδομένα από 10750 ασθενείς με ΠΜ από την Ευρώπη, τις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Ασία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του νέου διεθνούς συστήματος κατάταξης, το οποίο καθορίζει τρία στάδια της ασθένειας με βάση τη συγκέντρωση αλβουμίνης και β2-μικροσφαιρίνης στον ορό. Αυτό το σύστημα παρουσιάζει βελτιωμένη προγνωστική ικανότητα με χρήση των άμεσα διαθέσιμων δοκιμασιών μέτρησης της συγκέντρωσης αλβουμίνης και β2-μικροσφαιρίνης. Έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορες κλινικές μελέτες και η προγνωστική αξία του σε συνδυασμό με άλλους βιολογικούς παράγοντες είναι υπο εκτίμηση (51).

5. Αντιμετώπιση της νόσου

Μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων

Σημαντικές βελτιώσεις στην ελεύθερη νόσου και στη συνολική επιβίωση έχουν επιτευχθεί με την εισαγωγή χημειοθεραπείας υψηλής δόσης που ακολουθείται από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Το 1996, μία τυχαίοποιημένη

μελέτη του Intergroupe Francophone du Myelome έδειξε ότι η αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα καλύτερη συνολική επιβίωση σε σχέση με την συμβατική χημειοθεραπεία (πενταετής συνολική επιβίωση σε ποσοστό 52% έναντι 12%, θνητότητα 3% και για τις δύο ομάδες ασθενών). Η ίδια ομάδα ήταν η πρώτη που απέδειξε ότι η διπλή διαδοχική αυτόλογη μεταμόσχευση οδηγεί σε καλύτερη επταετή ελεύθερη νόσου επιβίωση σε σχέση με μία μεταμόσχευση, τουλάχιστον σε ασθενείς που δεν είχαν επιτύχει πλήρη ύφεση μετά την πρώτη μεταμόσχευση. Η προσέγγιση της ολικής θεραπείας (total therapy) που εφάρμοσε η ομάδα του Arkansas, στην οποία όλες οι διαθέσιμες μέθοδοι αντιμετώπισης της ασθένειας ενσωματώθηκαν στη θεραπεία πρώτης γραμμής, επίσης έδειξε ότι η διπλή διαδοχική αυτόλογη μεταμόσχευση είναι αποτελεσματικότερη από την συμβατική χημειοθεραπεία, ιδίως σε ασθενείς που επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση με μέση ελεύθερη νόσου επιβίωση 50 μηνών και μέση συνολική επιβίωση 7 χρόνων. Η ενσωμάτωση των νέων φαρμακευτικών παραγόντων σε αυτά τα θεραπευτικά πρωτόκολλα έχει επιφέρει περαιτέρω βελτίωση στα αποτελέσματα, όμως η πρώιμη και η όψιμη τοξικότητα της ολικής θεραπείας περιορίζουν τη χρήση της σε μία υποομάδα ασθενών (51,52,53).

Ο ρόλος της αλλογενούς μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων στο ΠΜ είχε παραδοσιακά περιοριστεί σε νέους ασθενείς (ηλικίας κάτω των 55 ετών) με πλήρως HLA συμβατό δότη. Όμως, η σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση θνητότητα ανερχόταν στο πολύ υψηλό ποσοστό του 50%, χωρίς να είναι σαφές εάν αυτό οφείλεται στην προχωρημένη ηλικία των ασθενών ή στη φύση του νοσήματος. Με σκοπό τη μείωση της θνητότητας από τη μεταμόσχευση εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλλογενούς μεταμόσχευσης με μη μυελοαφανιστικό ή μειωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας (non-myeloablative or reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation), η οποία εκμεταλλεύεται την ανοσολογική δράση του μοσχεύματος έναντι του μυελώματος (graft-versus-myeloma, GVM) μειώνοντας ταυτόχρονα την τοξικότητα της μεταμόσχευσης. Καθώς οι υποτροπές ήταν συχνές μετά από τη χρήση τέτοιων σχημάτων μειωμένης έντασης σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα/ανθεκτική νόσο, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε κυρίως μετά από μείωση του φορτίου του όγκου με χημειοθεραπεία υψηλής δόσης και αυτόλογη μεταμόσχευση. Παρ'όλα αυτά, η αλλογενής μεταμόσχευση εξακολουθεί να παρουσιάζει σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα, που οφείλεται κατά κύριο

λόγο στη χρόνια νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (chronic GVHD). Οι μέχρι τώρα τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες δεν έδωσαν σαφή απάντηση για την υπεροχή της αλλογενούς έναντι της αυτόλογης μεταμόσχευσης, για το λόγο δε αυτό η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων ενδείκνυται μόνο στα πλαίσια ερευνητικών μελετών (50,51,53).

Νεότερες θεραπείες στόχευσης

Η πρόσφατη επέκταση των θεραπευτικών επιλογών για το ΠΜ αποδίδεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ανάπτυξη *in vitro* και *in vivo* μοντέλων της ασθένειας, τα οποία διαλεύκαναν το πώς τα μυελωματικά κύτταρα μεταναστεύουν επιλεκτικά στο μυελό των οστών και τους μηχανισμούς με τους οποίους πολλαπλασιάζονται, επιζούν, ανθίστανται στη δράση των συμβατικών φαρμάκων, επάγουν την αγγειογένεση και διαταράσσουν το σχηματισμό νέου οστού δημιουργώντας οστικές αλλοιώσεις. Αυτά τα μοντέλα διευκόλυναν την ανάπτυξη υποσχόμενων θεραπειών που μπορούν να στοχεύσουν το μυελωματικό κύτταρο, να διαταράξουν την αλληλεπίδρασή του με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και να ξεπεράσουν έτσι την κλασική ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Τέτοιοι καινούριοι παράγοντες που έχουν ήδη βρει κλινική εφαρμογή είναι η θαλιδομίδη και τα ισχυρά ανοσοτροποποιητικά ανάλογά της (IMiDs), ο αναστολέας πρωτεασώματος bortezomib (Velcade) και το τριοξειδίο του αρσενικού (As_2O_3). Κλινικές δοκιμές φάσης I, II και III με το bortezomib και τα IMiDs έχουν ήδη δείξει σημαντικά οφέλη ακόμα και σε ασθενείς με ανθεκτική και υποτροπιάζουσα νόσο. Επιπλέον, έχουν αναγνωριστεί και άλλοι παράγοντες που μπορούν να στοχεύσουν το μυελωματικό κύτταρο ή να παρακάμψουν την προστασία που απολαμβάνει από τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών (50,53,62).

Η θαλιδομίδη προτάθηκε αρχικά σαν πιθανή θεραπεία για το ανθεκτικό ΠΜ εξαιτίας της γνωστής αντιαγγειογενετικής της δράσης. Επιπρόσθετα, η θαλιδομίδη και τα IMiDs (λεναλιδομίδη/Revlimid) προκαλούν είτε απόπτωση των μυελωματικών κυττάρων είτε παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G_1 με διάφορους μηχανισμούς. Αναστέλλουν την προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στο στρώμα του μυελού και την επακόλουθη έκκριση παραγόντων όπως

IL-6 και VEGF, κρίσιμων για την επιβίωση και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, ασκούν ανοσοτροποποιητική δράση ενισχύοντας τον αριθμό των NK κυττάρων και τη δράση τους έναντι των μυελωματικών κυττάρων και διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την έκκριση TNFα και IFN-γ από τα CD8 κύτταρα.

Εντός του μυελωματικού κυττάρου, η ενεργοποίηση και η πυρηνική μετατόπιση του NFκB αποτελεί ένα από τα κρίσιμότερα γεγονότα για την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων, που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την αναστολή της απόπτωσης, την εμφάνιση μορίων προσκόλλησης και την παραγωγή κυτταροκινών. Το IκB είναι ένας κυτταροπλασματικός αναστολέας του NFκB, του οποίου η φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα απελευθερώνει και ενεργοποιεί τον NFκB. Οι αναστολείς πρωτεασώματος, όπως το bortezomib, οδηγούν σε συσσώρευση του IκB, η οποία εμποδίζει την απελευθέρωση του NFκB και τη μετατόπισή του στον πυρήνα, γεγονός που έχει άμεση επίδραση στα μυελωματικά κύτταρα και στα κύτταρα του στρώματος. Το bortezomib αναστέλλει το πρωτεάσωμα με τρόπο επιλεκτικό και αντιστρεπτό και μπορεί να προκαλέσει απόπτωση μυελωματικών κυττάρων ανθεκτικών σε γνωστές συμβατικές θεραπείες. Ξεπερνά την προστατευτική δράση της IL-6 και συμπληρώνει την αντινεοπλασματική δράση της δεξαμεθαζόνης. Δρα στο περιβάλλον του μυελού αναστέλλοντας την προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στα κύτταρα του στρώματος, τη μεταγραφή και έκκριση IL-6 που προκαλείται από την προσκόλληση αυτή και την αγγειογένεση. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης του bortezomib περιλαμβάνουν μείωση της ικανότητας των κυττάρων για ανταπόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, της έκκρισης IL-6, της έκφρασης αντιαποπτωτικών γονιδίων και της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και τροποποίηση του κυτταρικού κύκλου στα μυελωματικά κύτταρα και στα κύτταρα του στρώματος.

Το As₂O₃, με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και μέτρια δράση στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, έχει αναγνωρισθεί σαν ένας τρίτος παράγοντας που στοχεύει το μυελωματικό κύτταρο και τις αλληλεπιδράσεις του με το μικροπεριβάλλον του μυελού. Προκαλεί απόπτωση κυτταρικών σειρών και μυελωματικών κυττάρων ασθενών ανθεκτικών σε φαρμακευτικούς παράγοντες μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 9, συμπληρώνει

τη δράση της δεξαμεθαζόνης και μπορεί να παρακάμψει την αντιαποπτωτική δράση της IL-6. Ελαττώνει επίσης την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο στρώμα του μυελού, αναστέλλει την επαγόμενη από αυτήν έκκριση IL-6 και VEGF από τα κύτταρα του στρώματος και μπλοκάρει τον πολλαπλασιασμό ακόμα και αυτών των μυελωματικών κυττάρων που είναι ήδη προσκολλημένα στο κύτταρα του στρώματος του μυελού.

Συνεχιζόμενες μελέτες με χρήση γονιδιακών μικροσυστοιχιών και πρωτεωμικής διασαφηνίζουν τους μοριακούς μηχανισμούς της ευαस्थσίας και της ανθεκτικότητας του ΠΜ στους καινούριους θεραπευτικούς παράγοντες. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών σε δείγματα όγκου, αίματος και μυελού των οστών των ασθενών που μετέχουν σε κλινικές μελέτες με τα νέα φάρμακα θα προσδιορίσουν πιθανώς τους *in vivo* στόχους που σχετίζονται με την ευαस्थσία ή την ανθεκτικότητα και θα δώσουν τη βάση για την ανάπτυξη επιλεκτικότερων, ισχυρότερων και λιγότερο τοξικών στοχευμένων θεραπειών. Τέτοιου είδους μελέτες θα βοηθήσουν επίσης στο συνδυασμό των νέων και των συμβατικών θεραπειών και στην επιλογή των ασθενών που έχουν περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν σε αυτά τα σχήματα.

6. Ανοσοθεραπεία στο ΠΜ

Παρα τον αυξανόμενο αριθμό των θεραπευτικών επιλογών για το ΠΜ, η μόνη ουσιαστική πιθανότητα ίασης προσφέρεται από την αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, την ισχυρότερη αντικαρκινική ανοσοθεραπευτική τεχνική που είναι διαθέσιμη σήμερα. Η αλλογενής μεταμόσχευση αναπτύχθηκε για να αντικαταστήσει το νοσούν αιμοποιητικό σύστημα του ασθενούς με το υγιές αιμοποιητικό σύστημα του δότη, μετά από υψηλών δόσεων μυελοαφανιστική χημειοθεραπεία ή ραδιοθεραπεία. Η ανακάλυψη ότι το GVHD διενεργείται μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος του δότη οδήγησε στη χρήση μοσχευμάτων απαλλαγμένων από τα T κύτταρα. Όμως, απουσία του μεγάλου όγκου του δραστικού T λεμφοκυτταρικού πληθυσμού από τα μοσχεύματα αυτά, τα ποσοστά υποτροπής της νόσου αυξήθηκαν, κάνοντας έτσι σαφές το θεραπευτικό όφελος του φαινομένου graft-versus-myeloma (GVM) (55,57,58).

Το DLI (donor leukocyte infusion) αποτελεί μια προσπάθεια εκμετάλλευσης του GVM φαινομένου και μπορεί να επιφέρει ύφεση της νόσου σε ασθενείς που υποτροπίασαν μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Δυστυχώς, η ειδικότητα της ανοσιακής απάντησης για τα μυελωματικά κύτταρα κατά την αλλογενή μεταμόσχευση και το DLI είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που έχει πιθανώς καταστροφικές παρενέργειες. Υπάρχει στενή σύνδεση μεταξύ του GVHD και του GVM, η οποία υποδηλώνει ότι τα αλλοδραστικά T κύτταρα του δότη κατευθύνονται εναντίον αντιγόνων ελάσσονος ιστοσυμβατότητας, που είναι παρόντα τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα. Παρ'όλα αυτά, η επιτυχημένη αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος μετά από αλλογενή μεταμόσχευση ΠΜ με DLI οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι και άλλες μορφές ανοσοθεραπείας μπορεί να είναι αποτελεσματικές στη νόσο αυτή. Όμως, η T λεμφοκυτταρική δόση που απαιτείται για τον περιορισμό της νόσου είναι υψηλότερη στο ΠΜ σε σχέση με άλλα νοσήματα που ανταποκρίνονται στο DLI, όπως ΧΜΛ, και συνδέεται με αυξημένη εμφάνιση GVHD. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από το γεγονός ότι το ΠΜ συνοδεύεται από αρκετές ελλείψεις στο ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή, καθώς ο κακοήθης κλώνος καταστέλλει τόσο με παθητικό όσο και με ενεργητικό τρόπο τα δραστικά κύτταρα της ανοσίας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το GVM μπορεί να ενισχυθεί με μεταφορά ειδικών για τον ιδιότυπο T λεμφοκυττάρων του δότη στον ασθενή. Παραμένει όμως να διευκρινιστεί το αν το ωφέλιμο GVM μπορεί να διαχωριστεί από την τοξική δράση του GVHD.

Το ότι ένας ασθενής πάσχει από ΠΜ σημαίνει ότι το ανοσοποιητικό του σύστημα και τα ΑΠΚ απέτυχαν να αποτρέψουν την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό, μαζί με τη διαπίστωση ότι το T λεμφοκυτταρικό ρεπερτόριο υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο περιέχει κύτταρα πιθανώς αυτοδραστικά ή ειδικά για τους όγκους (αν και σε χαμηλές συχνότητες), οδήγησε στη χρήση των *ex vivo* επεξεργασμένων ΔΚ για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Η έλλειψη πλήρους ίασης στο ΠΜ και η μεγάλη πιθανότητα για επίτευξη ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (minimal residual disease, MRD), στην οποία η ανοσοθεραπεία έχει τις μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας, καθιστούν το ΠΜ έναν γοητευτικό στόχο για την εφαρμογή τέτοιων ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων με ΔΚ.

Υπάρχουν δύο βασικά προαπαιτούμενα για την επιτυχημένη ανοσοθεραπεία του καρκίνου με ΔΚ: α. τα νεοπλασματικά κύτταρα πρέπει να εκφράζουν αντιγονικούς στόχους που τα διαχωρίζουν από τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Αυτά τα TAAs πρέπει να τα επεξεργάζεται το καρκινικό κύτταρο με τέτοιο τρόπο ώστε οι ανοσογονικοί επίτοποι να παρουσιάζονται στην κυτταρική επιφάνεια πάνω σε μόρια MHC I (ή II). Σε αυτό το πλαίσιο, τα TAAs μπορούν να αποτελέσουν στόχους για τα ενεργοποιημένα T κύτταρα και β. η λειτουργία των ΔΚ, αν και μη φυσιολογική *in vivo* σε πολλούς ασθενείς με καρκίνο, πρέπει να μπορεί να αποκατασταθεί με *ex vivo* χειρισμό, ενεργοποίηση και φόρτιση με αντιγόνα. Αυτά τα τροποποιημένα ΔΚ θα πρέπει να είναι ικανά να επεξεργαστούν τα TAAs και να παρουσιάσουν τους αντιγονικούς επιτόπους στα T κύτταρα με την αντίστοιχη ειδικότητα μετά από επανένεση στον ασθενή, ώστε να διεγείρουν μια αντινεοπλασματική ανοσιακή απάντηση. Το ΠΜ φαίνεται να ικανοποιεί αυτά τα δύο κριτήρια.

Αλληλεπιδράσεις του ΠΜ με το ανοσοποιητικό σύστημα

Τα μυελωματικά κύτταρα παράγουν έναν αριθμό ανοσιακά ενεργών παραγόντων που μπορούν να τροποποιήσουν την ανοσιακή απόκριση, όπως TGFβ, IL-10, FasL, VEGF και MUC1, οι οποίοι είναι συχνά παρόντες σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από αυτές που απαντώνται στον φυσιολογικό μυελό των οστών. Αυτά τα μόρια δίνουν στα κύτταρα του όγκου την ικανότητα να τροποποιούν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ώστε να υποστηρίξει την αύξηση και τη διαφοροποίηση του κακοήθους κλώνου, και μπορούν επίσης να αλλάζουν την τοπική και συστηματική ανοσιακή απόκριση του ξενιστή ώστε να εμποδίζουν την απόρριψη του όγκου. Είναι πολύ σημαντικό να γίνουν κατανοητές οι αλληλεπιδράσεις του όγκου με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή στο μυελό των οστών και αλλού ώστε να σχεδιαστούν στρατηγικές ανοσοθεραπείας που θα βελτιώσουν την επιβίωση στο ΠΜ (58).

Η έκφραση χημειοκινών από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί επίσης να επηρεάζει την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να κινητοποιεί δραστικά κύτταρα έναντι του όγκου. Η “ υπογραφή ” χημειοκινών του όγκου (chemokine signature) μπορεί

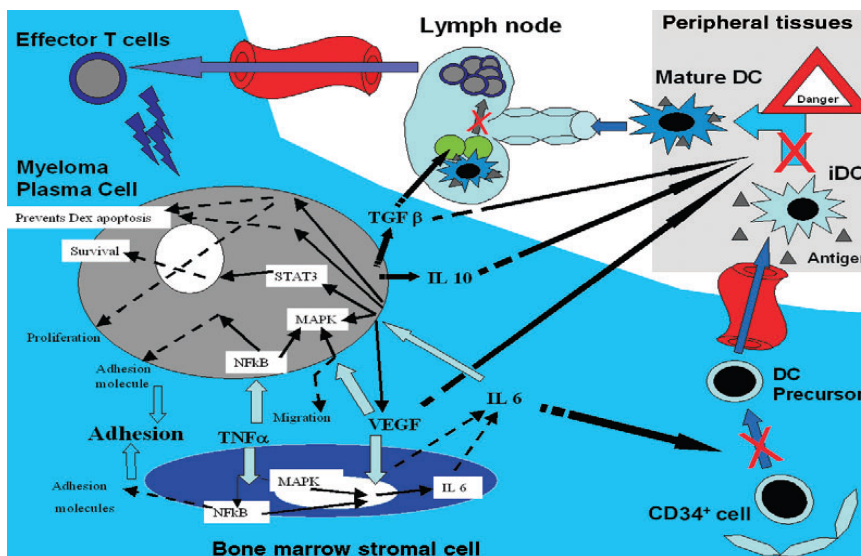
να επηρεάσει τη φύση της ανοσιακής απάντησης, καθορίζοντας εάν θα προκληθεί ανοσία ή ανοχή. Είναι γνωστό ότι το μυέλωμα προκαλεί ανοσοκαταστολή μέσω έκκρισης κυτταροκινών και φαίνεται επίσης να χειραγωγεί το σύστημα των χημειοκινών. Η μετανάστευση των ΔΚ στο εσωτερικό των όγκων συχνά ελέγχεται από την έκφραση επαγόμενων προφλεγμονωδών χημειοκινών, π.χ. CCL3-5, οι οποίες επιστρατεύουν επίσης μονοκύτταρα και μακροφάγα. Εντός του όγκου, τα ΔΚ συναντούν αντιγόνα υπο τη μορφή αποπτωτικών σωματίων, αλλά αυτό φαίνεται να συμβαίνει απουσία σημάτων κινδύνου. Σε αυτόν τον τύπο περιβάλλοντος, τα άωρα ΔΚ μπορούν να αυξήσουν την έκφραση CCR7, όχι όμως και συνδιεγερτικών μορίων. Αυτό το φαινόμενο ενισχύεται από την παραγωγή IL-10 και TGFβ από μακροφάγα που διηθούν τον όγκο, τα οποία εμποδίζουν την ωρίμανση των ΔΚ. Έτσι, αυτά τα ημιώριμα ΔΚ μεταναστεύουν στους λεμφαδένες, επάγουν ανοσιακή ανοχή και διεγείρουν την παραγωγή Tregs. Σε πολλές περιπτώσεις, πιστεύεται ότι αυτά τα Tregs επιστρέφουν στο σημείο του όγκου, πιθανώς υπο την επίδραση χημειοκινών όπως CCL22, όπου συνεισφέρουν περαιτέρω στην καταστολή της αντινεοπλασματικής ανοσίας.

Είναι ενδιαφέρον ότι στο ΠΜ οι επιδράσεις του συστήματος των χημειοκινών δεν περιορίζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα. Για παράδειγμα, οι CCL3 και CCL4 που παράγονται από τα μυελωματικά κύτταρα παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα που ευθύνεται για την οστική νόσο. Οι CCL3 και CCL4 βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό και το μυελό των οστών των ασθενών με ΠΜ και συσχετίζονται με τη βαρύτητα της οστικής νόσου και την πρόγνωση, αυξανόμενες όσο η ασθένεια εξελίσσεται. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα εκφράζουν τους CCR1 και CCR5, οι οποίοι θεωρούνται ότι συμμετέχουν στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση αυτών των κυττάρων και ότι επάγουν την προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στο στρώμα του μυελού των οστών. Αυτές οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν στην παραγωγή οστεολυτικών παραγόντων από τα κύτταρα του στρώματος.

Παρα την ανοσοκατασταλτική δράση των μυελωματικών κυττάρων, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του ασθενούς μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της νόσου. Τα λεμφοκύτταρα ειδικά για αντιγόνα του μυελώματος, όπως τα MUC1(CD227), ιδιότυπος και NY-ESO-1, είναι παρόντα στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ, και

η παρουσία εκπτυγμένων Τ κυτταρικών κλώνων σε οποιοδήποτε στάδιο της ασθένειας συσχετίζεται με παρατεταμένη συνολική επιβίωση. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι οι αποκρίσεις έναντι του μυελώματος που επάγονται από ανοσοτροποποιητικά φάρμακα, όπως η θαλιδομίδη, μπορεί να σχετίζονται με τον αριθμό των CD57⁺ Τ κυτάρων στο μυελό των οστών. Πράγματι, ίσως είναι πιθανό να γίνει απομόνωση, ενεργοποίηση και έκπτυξη ειδικών για τον όγκο Τ κυτάρων από το περιφερικό αίμα ή το μυελό ασθενών με ΠΜ για ανοσοθεραπευτική χρήση (58).

Στην εικόνα 9 φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις του ΠΜ με την κυτταρική ανοσία.



Εικόνα 9: αλληλεπιδράσεις του ΠΜ με την κυτταρομεσολαβητική ανοσία. Στο ΠΜ υπάρχει μία περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ του κακοήθους κλώνου, του στρώματος του μυελού των οστών και του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο όγκος και τα κύτταρα του στρώματος αλληλεπιδρούν μέσω προσκόλλησης και κυτταροκινών, όπως IL-6, VEGF και TNFα, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση και την ανθεκτικότητα των μυελωματικών κυττάρων, όπως επίσης και την αγγειογένεση. Η IL-6 αναστέλλει επίσης τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς άωρα ΔΚ. Οι VEGF, IL-10 και TGFβ αναστέλλουν την ωρίμανση των ΔΚ, και ο TGFβ προκαλεί ανενεργοποίηση των Τ κυττάρων. [από Br. J. Haemat. (57)]

Τα ΔΚ στο ΠΜ

Οι απόψεις δίστανται γύρω από το επίπεδο της δυσλειτουργίας των ΔΚ στους ασθενείς με ΠΜ. Πολλές από τις διαφορές που παρατηρούνται στη βιβλιογραφία μπορεί να οφείλονται στη χρήση ποικίλων τεχνικών, όχι μόνο μέτρησης και ενεργοποίησης, αλλά και ορισμού των ΔΚ σε αυτούς τους ασθενείς(55).

Η IL-6 και ο VEGF είναι κεντρικές κυτταροκίνες στην παθογένεση του ΠΜ οι οποίες προωθούν την ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου. Έχει αποδειχθεί ότι ο ορός από μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ εμποδίζει τη διαφοροποίηση και την επακόλουθη ωρίμανση των moDCs(70), με τρόπο εξαρτώμενο από την IL-6 και το VEGF. Μία παρόμοια δράση έχει παρατηρηθεί στη διαφοροποίηση των CD34DCs, όπου η παρουσία εξωγενούς IL-6 ή ορού ασθενών με ΠΜ κατευθύνει τη διαφοροποίηση των ΔΚ προς CD14 μονοκύτταρα(71). Σημειωτέον ότι η αλληλεπίδραση της IL-6 με τα μονοκύτταρα προωθεί την έκφραση υποδοχέων για τον M-CSF στα μονοκύτταρα και την ακόλουθη διαφοροποίηση προς μακροφάγα(72,73). Σε κάποια *in vitro* συστήματα, η IL-4 και η IL-13 αναστρέφουν αυτή τη δράση, όμως αυτός ο μηχανισμός δεν έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς με ΠΜ(74). Έχει ενδιαφέρον το ότι η προσθήκη υψηλών δόσεων β2-μικροσφαιρίνης σε καλλιέργειες moDCs μειώνει τον αριθμό, την ενεργοποίηση, την αλλοδραστική ικανότητα των παραγόμενων ΔΚ και την επαγωγή Th1 απαντήσεων και αυξάνει την έκκριση IL-6, IL-8 και IL-10 από αυτά(75). Η δράση της β2-μικροσφαιρίνης στα ΔΚ του αίματος δεν εκτιμήθηκε, είναι όμως λογικό να υποθέσει κανείς ότι ένας παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να λειτουργεί και στους ασθενείς με ΠΜ, όπου τα επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης είναι συχνά αυξημένα, ιδιαίτερα σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας.

Έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση των ΔΚ του αίματος μετά από καλλιέργεια σε αυτόλογο ορό είναι μη φυσιολογική στους ασθενείς με ΠΜ, όπως φαίνεται από τη μειωμένη έκφραση HLA-DR, CD40 και CD80 σε σχέση με τους υγιείς δότες και τη μειωμένη δραστηριότητα σε αλλογενείς μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες (MLR) (71). Θα έχει ενδιαφέρον να διαπιστωθεί εάν αυτές οι ελλείψεις αναστρέφονται

από περισσότερο επιθετικά πρωτόκολλα ενεργοποίησης των ΔΚ, απουσία αναστολής από την αυτόλογη IL-6. Σε μία άλλη μελέτη, η αύξηση της έκφρασης του CD80 σε ΔΚ του αίματος από ασθενείς με ΠΜ μετά από διέγερση με CD40-L και IL-2 ήταν μη φυσιολογική(76). Η έκφραση του CD80 ήταν μειωμένη στη σταθερή νόσο και απύσα στην προοδευτική νόσο, ενώ η έκφραση του CD86 ήταν φυσιολογική. Οι δυσλειτουργίες αυτές αναστρέφονταν με αντισώματα έναντι των TGFβ και IL-10.

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες αναφορές, άλλες μελέτες δεν έχουν αναφέρει ανωμαλίες στην ενεργοποίηση και τη λειτουργία των ΔΚ(77,78). Είναι πιθανό ότι αυτές οι διαφορές που αφορούν στη λειτουργία των moDCs και των ΔΚ του αίματος σχετίζονται με την ποικιλότητα των μεθοδολογιών καλλιέργειας, και ειδικότερα με την έκθεση των ΔΚ σε ανασταλτικές κυτταροκίνες του ορού των ασθενών με ΠΜ.

Οι ποσοτικές μετρήσεις των ΔΚ της κυκλοφορίας επίσης παρουσιάζουν αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα. Κάποιες μελέτες βρίσκουν φυσιολογικούς αριθμούς(76), άλλες βρίσκουν μειωμένους αριθμούς των CD11c⁺DCs και των CD123⁺DCs στο αίμα ασθενών με ΠΜ σε σχέση με υγιείς δότες(71), χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με πρώιμη ή προχωρημένη νόσο. Οι αριθμοί των ΔΚ του αίματος στο ΠΜ μπορεί να είναι μη φυσιολογικοί εξαιτίας τόσο της νόσου όσο και θεραπευτικών παραγόντων(55). Έχει φανεί ότι οι αριθμοί των ΔΚ ποικίλλουν σημαντικά μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων και συσχετίζονται με την έναρξη του GVHD. Επιπλέον, τα CD123⁺, και ίσως και τα CD11c⁺ ΔΚ, μπορούν να κινητοποιηθούν ταυτόχρονα με τα CD34 κατά την αυτόλογη μεταμόσχευση στους ασθενείς με ΠΜ. Η χημειοθεραπεία έχει φανεί ότι τροποποιεί το φαινότυπο και τη σύσταση των ΔΚ του αίματος στον καρκίνο του μαστού. Η επίδραση της χημειοθεραπείας και της ραδιοθεραπείας στους αριθμούς των ΔΚ του αίματος στο ΠΜ δεν έχει μελετηθεί, όμως ο αριθμός και η λειτουργία των CD123⁺DCs, η *in vitro* παραγωγή moDCs και διάμεσων ΔΚ από CD34 προγονικά κύτταρα και η παραγωγή κυτταροκινών από ΔΚ των βλεννογόνων αναστέλλονται παρουσία κορτικοστεροειδών.

Όσον αφορά τη ρύθμιση των κυτταροκινών στο ΠΜ, είναι φανερό ότι τα αυξημένα επίπεδα IL-6 που παράγονται από τα πλασματοκύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών μπορούν να επηρεάσουν τη δράση της

προερχόμενης από τα ΔΚ IL-12 και τις επακόλουθες T λεμφοκυτταρικές απαντήσεις. Η IL-1β και η IL-10 μπορούν επίσης να συμβάλλουν στη μη φυσιολογική ρύθμιση της IL-6. Είναι αποδεκτό ότι η IL-12 αποτελεί κρίσιμο συστατικό της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας έναντι των όγκων, κάτι που τονίζει την ανάγκη για μελέτες γύρω από την επίδραση αντισωμάτων έναντι της IL-6 στην ανοσία έναντι του ΠΜ. Είναι, τέλος, πιθανό ότι η κλινική χρήση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών θα τροποποιήσει τη λειτουργία των ΔΚ στους ασθενείς με ΠΜ(55).

Τα T κύτταρα στο ΠΜ και η αναστροφή της επαγόμενης από τον όγκο ανοσοκαταστολής

Η κακή αντινεοπλασματική ανοσιακή απόκριση στο ΠΜ μπορεί να πηγάζει και από ανωμαλίες του T λεμφοκυτταρικού πληθυσμού. Οι ασθενείς με ΠΜ έχουν μη τυπικούς CD4 πληθυσμούς (55). Σε αντίθεση με τους αριθμούς των CD8 λεμφοκυττάρων, τα CD4 είναι μειωμένα, ιδιαίτερα ο παρθένος πληθυσμός CD45RA⁺. Σε ένα μοντέλο πλασματοκυτταρώματος σε ποντίκια, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία υψηλών επιπέδων ελεύθερης πρωτεΐνης M στον ορό μπορεί να προκαλέσει απαλοιφή CD4 κλώνων ειδικών για τον ιδιότυπο. Είναι αβέβαιο το εάν ένας παρόμοιος μηχανισμός, είτε μέσω των CD4 είτε μέσω των CD8, λειτουργεί στην ανθρώπινη ασθένεια.

Οι ασθενείς με ΠΜ έχουν μειωμένη έκφραση του CD28 στα εκπτυγμένα T κύτταρα. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν CD80 και άλλα συνδιεγερτικά μόρια και αυτό, απουσία της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας των ΔΚ, μπορεί να προκαλέσει ανοσιακή ανοχή έναντι του όγκου. Έχουν όμως αναφερθεί εκπτυγμένοι T λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί σε ασθενείς με ΠΜ, οι οποίοι έχουν το φαινότυπο των CTLs. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η έκπτυξη κλώνων με ανασυνδυασμούς του TCR Vβ γονιδίου επιφέρει βελτιωμένη πρόγνωση και δείχνει ένα βαθμό συσχέτισης με την παρουσία T λεμφοκυττάρων ειδικών για τον ιδιότυπο. Ίσως αυτό είναι ενδεικτικό μιας προϋπάρχουσας *in vivo* αντινεοπλασματικής ανοσιακής απόκρισης σε κάποιους ασθενείς με ΠΜ.

Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι οι ασθενείς με ΠΜ είναι ανοσοκατασταλμένοι και πιο επιρρεπείς σε λοιμώξεις και ότι η νόσος αυτή ανταποκρίνεται σε μικρότερο βαθμό στο DLI συγκριτικά με άλλες ασθένειες, π.χ. ΧΜΛ, όπως αναφέρθηκε και πριν. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην έκκριση ανοσιακά ενεργών μορίων από τα μυελωματικά κύτταρα, όπως IL-6, IL-10, VEGF και TGFβ μεταξύ άλλων. Έχει αποδειχθεί ότι κυτταρικές σειρές και προσφάτως απομονωθέντα μυελωματικά κύτταρα από ασθενείς παράγουν μεγάλες ποσότητες TGFβ, και ότι αυτός ο παράγοντας είναι υπεύθυνος, εν μέρει τουλάχιστον, για την καταστολή των T απαντήσεων έναντι των κυττάρων του όγκου. Με χρήση του φυσικού αναστολέα του TGFβ, του LAP (latency-associated peptide), έχει φανεί ότι η κατασταλτική δράση του TGFβ στα T κύτταρα είναι ειδική και διενεργείται μέσω της αναστολής των αυτοκρινών μονοπατιών της IL-2. Η *ex vivo* ενεργοποίηση με χρήση αντι-CD3 μονοκλωνικού αντισώματος και παρουσία εξωγενούς IL-15 μπορεί να ξεπεράσει αυτή την αναστολή και να επαναφέρει τα αυτοκρινή μονοπάτια της IL-2 στα T κύτταρα, κάνοντάς τα ανθεκτικά σε περαιτέρω καταστολή μέσω TGFβ. Μια τέτοια στρατηγική θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να επαναφέρει τις δραστικές λειτουργίες των T κυττάρων στους ασθενείς με ΠΜ, υπάρχει όμως ο κίνδυνος να αναπτύξουν τα κύτταρα αυτά εξάρτηση από τις κυτταροκίνες και να μη μπορούν να ανταποκριθούν σε αντιγόνα που παρουσιάζονται από ΔΚ απουσία IL-2/IL-15(57,58).

Άλλες ομάδες έχουν δείξει ότι το T λεμφοκυτταρικό ρεπερτόριο στους ασθενείς με ΠΜ είναι σημαντικά αλλαγμένο μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση και ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της επιβίωσης και της ανάκτησης των λεμφοκυττάρων μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση. Στην Xcellerate κλινική δοκιμή, τα T κύτταρα ενεργοποιούνται με αντι-CD3 και αντι-CD28 μονοκλωνικά αντισώματα και χορηγούνται στον ασθενή ενδοφλέβια 3 ημέρες μετά την έγχυση των αιμοποιητικών κυττάρων. Τα αρχικά αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτή η διαδικασία διορθώνει εν μέρει το TCR Vβ ρεπερτόριο και βελτιώνει γρήγορα τους αριθμούς των λεμφοκυττάρων μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση. Προς το παρόν, υπάρχουν λίγες αποδείξεις ότι τα κύτταρα που προκύπτουν με τη διαδικασία Xcellerate έχουν κάποια ειδική αντινεοπλασματική δράση. Όμως, η παρουσία εκπυγμένων T κυτταρικών κλώνων σχετίζεται με παρατεταμένη συνολική επιβίωση και έχουν αναγνωρισθεί T κύτταρα ειδικά για TAAs του ΠΜ που

κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα ασθενών. Αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν να απομονωθούν από το αίμα με χρήση ανοσομαγνητικών μεθόδων ή τεχνικών κυτταρομετρίας ροής, να εκπτυχθούν *ex vivo* με χρήση κάποιων από τις μεθόδους που περιγράφηκαν προηγουμένως και να επαναχορηγηθούν στον ασθενή(57,58). Είναι γνωστό εδώ και αρκετό καιρό ότι η ανοσοκαταστολή με κυκλοφωσφαμίδιο μπορεί να ενισχύσει τη δραστικότητα των χορηγούμενων T κυττάρων έναντι του όγκου, και πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ειδική απαλοιφή των CD4⁺CD25⁺Tregs με αντι-CD25 αντισώματα αυξάνει την αντινεοπλασματική ανοσιακή απόκριση σε ζώα που φέρουν όγκους, αν και οι όγκοι δεν απορρίπτονται ολοκληρωτικά. Είναι πιθανό να ενισχυθεί αυτό το φαινόμενο με χρήση της απαλοιφής των Tregs πριν από τον εμβολιασμό με ώριμα ΔΚ(57,58).

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα στο ΠΜ

Εκτός από την ανοσογονική βοήθεια που παρέχουν, τα CD4 T κύτταρα είναι επίσης σημαντικοί αρνητικοί ρυθμιστές της ανοσιακής απάντησης. Πολλές από αυτές τις δράσεις διενεργούνται μέσω μιας υποομάδας κυττάρων γνωστής ως φυσικώς απαντώμενα CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs, τα οποία αποτελούν το 5-10% των CD4 κυττάρων της κυκλοφορίας στους ενήλικες. Αυτή η εικόνα περιπλέκεται περαιτέρω από τις αλληλεπιδράσεις των αώρων ΔΚ και των παρθένων T κυττάρων, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν απαλοιφή των T κυττάρων, απενεργοποίηση και επαγωγή άλλων κατηγοριών CD4 και CD8 Tregs που εκκρίνουν IL-10 και TGFβ.

Τα Tregs παράγονται στο θύμο με θετική επιλογή των CD4 των οποίων ο TCR έχει άμεση συγγένεια για συμπλέγματα MHCII/αυτοαντιγόνων, και ασκούν τις ανοσοτροποποιητικές δράσεις τους *in vitro* μέσω κυτταρικής επαφής και έκκρισης κυτταροκινών. Τα Tregs έχουν εμπλακεί στην καταστολή της φυσικής αντινεοπλασματικής ανοσίας και της ανοσοθεραπείας. Ο αριθμός των CD4⁺CD25⁺ Tregs είναι σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με ΠΜ σε σχέση με υγιείς δότες, και αυτά τα κύτταρα μπορεί να αυξάνονται μετά από εμβολιασμό με ΔΚ και θεραπεία με IL-2. Έτσι, και κάτω από ορισμένες συνθήκες, η ανοσοθεραπεία μπορεί να μεγιστοποιήσει την ανοσοκατασταλτική δράση των Tregs στους

ασθενείς με ΠΜ. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι τουλάχιστον κάποιες από αυτές τις ανεπιθύμητες δράσεις μπορούν να μειωθούν απαλοίφοντας τα Tregs από τον αρχικό T λεμφοκυτταρικό πληθυσμό (57,58).

Τα NK κύτταρα στο ΠΜ

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΔΚ και των NK κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής είναι περίπλοκες. Τα ΔΚ ενεργοποιούν τα NK μέσω της IL-12 και ίσως της IL-18. Κατά τη διάρκεια αυτής της αλληλεπίδρασης, η ωρίμανση των ΔΚ διεγείρεται από την έκκριση IFN-α από τα NK. Υπάρχουν αναφορές για φυσική κυτταροτοξικότητα των NK έναντι άωρων ΔΚ της κυκλοφορίας και άωρων ΔΚ φορτισμένων με αυτόλογα αντιγόνα σε ασθενείς με ΠΜ (79). Τα ώριμα ΔΚ φαίνεται ότι προστατεύονται μέσω αύξησης της έκφρασης μορίων HLA I (HLA-E). Άρα λοιπόν, οι αλληλεπιδράσεις ΔΚ-NK έχουν σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή των ΔΚ από τα σημεία της φλεγμονής. Αυτό μπορεί να αποτελεί έναν σημαντικό ελεγκτικό μηχανισμό, που αποτρέπει την υπερβολική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών περιορίζοντας την εισροή άωρων ΔΚ στη δεξαμενή των ώριμων ΔΚ.

Τα μυελωματικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στη λύση από NK κύτταρα (80) και υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ο αριθμός και το επίπεδο ενεργοποίησης των NK είναι αυξημένα στο ΠΜ. Αυτά τα κύτταρα έχουν φυσική αντιμυελωματική κυτταροτοξικότητα και φάρμακα όπως η θαλιδομίδη μπορεί να ενισχύουν αυτή τη δράση. Αντιθέτως, έχει αναφερθεί ότι τα κακοήθη πλάσματοκύτταρα μπορούν να αποφύγουν τη λύση από NK αυξάνοντας την έκφραση των μορίων HLA I κατά την εξέλιξη της ασθένειας. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι υπάρχει μια ενεργή αλληλεπίδραση μεταξύ της φυσικής και της ειδικής ανοσιακής απάντησης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές στρατηγικές ανοσοθεραπείας του ΠΜ βασισμένες στα ΔΚ και τα NK κύτταρα (57,58).

Τα ΝΚΤ κύτταρα στο ΠΜ

Τα ΝΚΤ κύτταρα αναγνωρίζουν λιπιδικά ή γλυκολιπιδικά αντιγόνα που παρουσιάζονται από το μη κλασικό ΜΗC μόριο CD1d των ΔΚ. Έχει αποδειχθεί ότι παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση και εμπλέκονται στην αποτροπή της εξέλιξης του ΠΜ. Επιπρόσθετα, η πρώιμη ανάκτηση των λεμφοκυττάρων και των ΝΚΤ κυττάρων μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων συσχετίζεται με καλύτερη προστασία από υποτροπή της ασθένειας. Υπάρχουν επίσης *in vitro* δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα διεγερμένα από ΔΚ και κυτταροκίνες φονικά κύτταρα, μεταξύ των οποίων και τα ΝΚΤ, έχουν ενισχυμένη αντιμυελωματική δράση. Η χαρακτηριστική ικανότητα των ΝΚΤ να παράγουν άμεσα μεγάλες ποσότητες κυτταροκινών μετά από πρωτογενή διέγερση τα καθιστά πιθανώς κεντρικούς ρυθμιστές της αντινεοπλασματικής ανοσίας και γοητευτικούς στόχους για την ανοσοθεραπεία των όγκων. Η ταυτότητα των φυσικών συνδετών του CD1d *in vivo* παραμένει υπο διερεύνηση, αλλά το συνθετικό α-GalCer μπορεί να επάγει ισχυρές αποκρίσεις έναντι των όγκων μέσω κυτταροκινών όπως η IFN-γ.

Ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες, όπως η θαλιδομίδη και η λεναλιδομίδη, ενισχύουν τη δράση των ΝΚΤ και πιθανώς οδηγούν τόσο σε άμεση λύση των μυελωματικών κυττάρων από τα ΝΚΤ όσο και σε αύξηση των γνωστών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων της ειδικής ανοσίας (ΔΚ και Τ κύτταρα) και της φυσικής ανοσίας (NK και ΝΚΤ κύτταρα). Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΝΚΤ και των ΔΚ είναι απαραίτητες για την επαγωγή αποκρίσεων έναντι του α-GalCer. Τα ΔΚ δεν παρέχουν μόνο το μόριο CD1d για την παρουσίαση του α-GalCer, αλλά και τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86 που απαιτούνται για την πλήρη ενεργοποίηση των ΝΚΤ. Με την ενεργοποίηση του TCR τους, τα ΝΚΤ παράγουν άφθονη IFN-γ και αυξάνουν την επιφανειακή έκφραση του CD40-L, γεγονός που εντείνει την παραγωγή IL-12 από τα ΔΚ και ενεργοποιεί περαιτέρω τα ΝΚΤ. Υπάρχει η δυνατότητα θεραπευτικής εκμετάλλευσης της αλληλεπίδρασης ΝΚΤ κυττάρων και ΔΚ με σκοπό τον έλεγχο του ΠΜ, μέσω της ενίσχυσης της

δραστηριότητας των NKΤ και της στοχευμένης παραγωγής κυτταροκινών έναντι του όγκου, όπως IFN- γ , προωθώντας έτσι ταυτόχρονα τις αντineοπλασματικές δράσεις των NK και των CD8 CTLs (58).

Τα $\gamma\delta$ T κύτταρα στο ΠΜ

Τα $\gamma\delta$ T κύτταρα εμπλέκονται στις δράσεις τόσο του GVM όσο και του GVHD. Εκφράζουν τον $\gamma\delta$ TCR και υποδοχείς των NK, όπως NKG2D και NKp44. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι καλά κατανοητοί, μπορούν να εμφανίσουν σημαντική αντineοπλασματική κυτταροτοξική δράση χωρίς MHC περιορισμούς, η οποία αναστέλλεται με αντισώματα έναντι των NK υποδοχέων. Έχει φανεί ότι τα διφωσφονικά, όπως το ramidronate, ενεργοποιούν τα $\gamma\delta$ T κύτταρα για παραγωγή IFN- γ και ελατώνουν την επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων. Έχουν παρατηρηθεί κάποιες αντineοπλασματικές αποκρίσεις σε ασθενείς μετά από θεραπεία με ramidronate και IL-2. Τέτοιες έρευνες θέτουν τις βάσεις για τη μελέτη της χρήσης των $\gamma\delta$ T κυττάρων στην ανοσοθεραπεία του ΠΜ(58).

Τα Th17 κύτταρα στο ΠΜ

Ο ρόλος των Th17 κυττάρων στην ανοσολογία των όγκων δεν είναι καλά καθορισμένος, όμως δύο σημαντικές για την ανάπτυξη τους κυτταροκίνες, η IL-6 και ο TGF β , εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο ΠΜ. Μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει αυξημένα επίπεδα IL-17 στον ορό ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με τους υγιείς δότες. Αυτή η φλεγμονώδης κυτταροκίνη μπορεί να προωθεί την ανάπτυξη των όγκων μέσω αγγειογένεσης. Παρομοίως, η IL-21, κυτταροκίνη που σχετίζεται με την IL-17, έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την εξέλιξη του ΠΜ και αναστέλλει την εξαρτώμενη από IL-6 απόπτωση μυελωματικών κυτταρικών σειρών(59).

Tumor Associated Antigens (TAAs) στο ΠΜ

Η επιτυχημένη ανοσοθεραπεία απαιτεί την παρουσία TAAs (tumor associated antigens), τα οποία παρέχουν ένα είδος ανοσοθεραπευτικού δείκτη, δεδομένου ότι

η κύρια έκφρασή τους στον όγκο με μικρότερη έκφραση σε άλλους ιστούς επιτρέπει την επιστράτευση ειδικών T λεμφοκυττάρων, ελαχιστοποιώντας έτσι τις αυτοάνοσες παρενέργειες. Πολλά πιθανά TAAs έχουν αναγνωριστεί στους ασθενείς με ΠΜ, μεταξύ των οποίων ο ιδιότυπος, τα MUC1, hTERT, PRAME, CT (cancer-testis) αντιγόνα, N-ras, K-ras, p53 και FGFR3. Η ικανότητα παραγωγής T λεμφοκυτταρικών κλώνων ειδικών για τα TAAs είναι ουσιώδης και υποδηλώνει ότι πρόδρομα λεμφοκύτταρα αυτών των ειδικοτήτων διατηρήθηκαν μέσω μηχανισμών ανοσιακής ανοχής στα νεογέννητα ή μέσω ανοχής προκαλούμενης από τον όγκο (55).

Ιδιότυπος

Στις κακοήθειες των B κυττάρων, ο μοναδικός BCR -το μόριο της ανοσοσφαιρίνης- με τις πολύ ειδικές υπερμεταβλητές περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας που αποτελούν τον ιδιότυπο, αντιπροσωπεύει έναν ιδανικό ειδικό για τον όγκο στόχο. Οι πρώτες αναφορές για ειδική ανοσοθεραπεία των ανθρώπινων κακοηθειών των B κυττάρων επικεντρώθηκαν συνεπώς σε αυτό το μόριο, το οποίο είναι παρόν είτε στην επιφάνεια των κυττάρων, όπως στο οζώδες non-Hodgkin λέμφωμα και στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (ΧΛΛ), είτε είναι κυρίως εκκρινόμενο και παρουσιάζεται μόνο μερικώς στην κυτταρική επιφάνεια με τη μορφή πεπτιδίων, όπως στο ΠΜ(56).

Ο ιδιότυπος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σαν TAA, με ή χωρίς φόρτιση ΔΚ, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* στο οζώδες non-Hodgkin λέμφωμα, όμως οι ανοσιακές και κλινικές ανταποκρίσεις των ασθενών με ΠΜ έχουν υπάρξει μάλλον απογοητευτικές. Υπάρχουν πολλοί πιθανοί λόγοι που εξηγούν αυτό το φαινόμενο, οι οποίοι σχετίζονται με την έλλειψη πρόδρομων T κυττάρων ειδικών για τον ιδιότυπο εξαιτίας αρνητικής επιλογής στο θύμο, ή με την περιφερική ανοχή και την απαλοιφή τους σαν αποτέλεσμα της ανεπαρκούς παροχής συνδιεγερτικών σημάτων από τα κακοήθη πλασματοκύτταρα. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι ο ορός των ασθενών με ΠΜ περιέχει πολύ υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερης ιδιοτυπικής πρωτεΐνης σε σχέση με τον ορό ασθενών με non-Hodgkin λέμφωμα. Αυτό μπορεί να εξηγεί εν μέρει την ανομοιογένεια μεταξύ των δύο ασθενειών όσον αφορά στην ευκολία επαγωγής ανοσιακών αποκρίσεων. Σημειωτέον ότι ο ιδιότυπος είναι ένα μάλλον ασθενές αντιγόνο που περιέχει λίγα ανοσοεπικρατή

πεπτιδία, για το λόγο αυτό περιορισμένος αριθμός ασθενών μπορεί να αναπτύξει ειδικές λεμφοκυτταρικές απαντήσεις(54,55).

Mucin-1

Ίσως ένα από τα πλέον υποσχόμενα TAAs στο ΠΜ είναι το επιφανειακό μόριο MUC1(55). Εκφράζεται στο 100% των μυελωματικών κυτταρικών σειρών και στο 63-92% των δειγμάτων ασθενών. Το MUC1 εκφράζεται επίσης σε πολλούς επιθηλιακούς καρκίνους, σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, σε αιματολογικές κακοήθειες και σε φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ΔΚ. Η έκφραση πεπτιδίων του MUC1 σε MHC μόρια μπορεί να αυξηθεί σημαντικά στα κακοήθη κύτταρα, ίσως επειδή η κύρια μορφή του MUC1 που εκφράζουν τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερη γλυκοζυλιωμένη και, συνεπώς, πιο εύκολη στην επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων. Σε κλινικές δοκιμές εμβολιασμού για άλλες κακοήθειες δεν έχουν παρατηρηθεί αυτοάνοσες αντιδράσεις έναντι υγιών ιστών που εκφράζουν το MUC1, όμως η αυτοάνοση παραμένει ένας θεωρητικός κίνδυνος. Δεν έχουν γίνει μελέτες εμβολιασμού με το αντιγόνο αυτό σε ασθενείς με ΠΜ, αλλά έχουν αναγνωρισθεί CTLs ειδικά για το MUC1 μετά από *in vitro* διέγερση από moDCs φορτισμένα με ολικό RNA πλασματοκυττάρων(81).

Human telomerase reverse transcriptase

Το hTERT υπερεκφράζεται στο 100% των μυελωματικών κυτταρικών σειρών, στο 78% των δειγμάτων ασθενών και στο 100% των πλασματοκυτταρικών λευχαιμιών. Εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα στο MGUS. Η έκφραση του hTERT συσχετίζεται με τη δραστικότητα της τελομεράσης, η οποία είναι σημαντική για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών και την κυτταρική αθανασία, όπως και για την πρόληψη της γήρανσης των κυττάρων. Υψηλά επίπεδα δραστικότητας της τελομεράσης συναντώνται σε φυσιολογικούς διαιρούμενους ιστούς (π.χ. λεμφοκύτταρα και αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα) και σε ένα μεγάλο εύρος κακοηθειών. Δεν έχουν ολοκληρωθεί κλινικές δοκιμές με το αντιγόνο αυτό σε ασθενείς με ΠΜ(55).

Preferentially expressed antigen of melanoma

Το PRAME είναι άλλο ένα TAA που υπερεκφράζεται στο ΠΜ, όπως επίσης και σε ένα μεγάλο εύρος αιματολογικών και συμπαγών κακοηθειών. Εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς. Αν και 80% των μυελωματικών κυτταρικών σειρών υπερεκφράζουν το PRAME, μόνο 22-43% των δειγμάτων από ασθενείς έχουν αυτό το χαρακτηριστικό, περιορίζοντας έτσι τη χρήση αυτού του αντιγόνου για την ανοσοθεραπεία του ΠΜ(55).

Cancer-testis antigens

Τα CT αντιγόνα είναι μία ομάδα φυσιολογικών πρωτεϊνών των όρχεων που εκφράζονται έκτοπα στα καρκινικά κύτταρα και φαίνονται ιδιαίτερα υποσχόμενοι ανοσοθεραπευτικοί στόχοι χάρη στην περιορισμένη έκφρασή τους στους φυσιολογικούς ιστούς και στην παρουσία πρόδρομων CTLs με ειδικότητα για αυτά τα αντιγόνα σε πολλούς αιματολογικούς ασθενείς και υγιείς δότες. Τα MAGE, BAGE, GAGE και LAGE/NY-ESO-1 υπερεκφράζονται στο ΠΜ, ιδιαίτερα στην προχωρημένη νόσο (μέχρι 80-100% των ασθενών για το MAGE, μέχρι 60% για το NY-ESO-1). Η sperm protein17 (Sp17) εκφράζεται στο 89% των μυελωματικών κυτταρικών σειρών και στο 26% των δειγμάτων ασθενών. Υπάρχει προβληματισμός σχετικά με την έκφραση της Sp17 (και των άλλων CT αντιγόνων) και σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς πέραν των όρχεων, σε χαμηλότερα πάντως επίπεδα συγκριτικά με τα καρκινικά κύτταρα. Η χαμηλή έκφραση της Sp17 στους ασθενείς με ΠΜ περιορίζει, ούτως ή άλλως, τη χρησιμότητά της στην ανοσοθεραπεία(40,55).

Άλλα αντιγόνα

Έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια για τα N-ras, K-ras, p53 και FGFR3 φέρουν μεταλλαγές στους κακοήθεις κλώνους πλασματοκυττάρων, όμως η ανάπτυξή τους σαν πιθανοί ανοσοθεραπευτικοί στόχοι βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Τα αντιγόνα ελάσσονος ιστοσυμβατότητας HA-1 και HA-2 έχουν αναγνωρισθεί σαν πιθανά TAAs στην οξεία λευχαιμία και στο ΠΜ και αποτελούν ενδιαφέρουσες εναλλακτικές χάρη στην περιορισμένη έκφρασή τους στον αιμοποιητικό ιστό. Αν και δεν έχουν γίνει μέχρι τώρα κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας με χρήση αυτών των αντιγόνων σε συνδυασμό με ΔΚ, τα αποτελέσματα που έχουν δώσει κλινικές

δοκιμές με DLI και χορήγηση CTLs ειδικών για αυτά τα TAAs είναι ενθαρρυντικά(55).

Αντινεοπλασματικά εμβόλια στο ΠΜ

Ο εμβολιασμός αποτελεί την πιο αποτελεσματική θεραπευτική επέμβαση που έχει αναπτύξει η σύγχρονη ιατρική, και έχει σχεδόν εξαλείψει ασθένειες όπως η ευλογιά και η πολιομυελίτιδα. Το ιδανικό αντικαρκινικό εμβόλιο θα χρησιμοποιούσε ένα TAA ειδικό για τα κύτταρα του όγκου, κοινό μεταξύ ασθενών και διαφορετικών τύπων καρκίνου και ουσιώδες για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, ώστε να μην υπόκειται σε μεταλλαγές ή απαλοιφή. Θα έπρεπε επίσης να είναι ισχυρά ανοσογονικό και να παράγει τόσο κυτταρομεσολαβητικές όσο και χυμικές αποκρίσεις. Δυστυχώς, τέτοια ιδανικά TAAs δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα σε καμία κακοήθεια. Στις κακοήθειες των Β κυττάρων, οι ιδιοτυπικές πρωτεΐνες που παράγονται από τον κακοήθη κλώνο πλησιάζουν πολύ αυτό το ιδανικό. Όμως, είναι ειδικές για τον κάθε κλώνο, απαιτείται δηλαδή εξατομικευμένη παραγωγή του εμβολίου για τον κάθε ασθενή. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο ιδιότυπος είναι ασθενώς ανοσογονικός όταν χορηγείται *in vivo* και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων. Παρόλα αυτά, αντισώματα και Τ κύτταρα έναντι του ιδιοτύπου είναι παρόντα στο αίμα ασθενών με ΠΜ και υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η ανοσιακή απόκριση έναντι του ιδιοτύπου είναι κυτταροτοξική *in vitro* και σε πειραματόζωα.

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες προσεγγίσεις για την παραγωγή ενός αποτελεσματικού ιδιοτυπικού εμβολίου, όπως χρήση DNA, ολικής πρωτεΐνης του ιδιοτύπου, μεταβλητές περιοχές της βαριάς ή της ελαφριάς αλυσίδας (V_H και V_L) οι οποίες μπορεί να συνδεθούν με το KLH ή κυτταροκίνες όπως IL-2, IL-12 και GM-CSF, με σκοπό να ενισχυθεί η ανοσογονικότητα του εμβολίου. Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης και βακτηριακό DNA, καθώς τα υψηλά επίπεδα CpG μοτίβων που περιέχει μπορούν να ενεργοποιήσουν κύτταρα της φυσικής και της ειδικής ανοσίας μέσω του TLR9.

Τέτοιου είδους τεχνικές έχουν φανεί να προωθούν την ανοσιακή απόκριση σε ασθενείς με ΠΜ και Β λέμφωμα, αλλά οι κλινικές ανταποκρίσεις είναι, μέχρι

σήμερα, απογοητευτικές. Υπάρχουν βέβαια και κάποιες ενθαρρυντικές αναφορές εμβολιασμών με ιδιότυπο, μόνο του ή σε συνδυασμό με KLH, στο οζώδες λέμφωμα και στο non-Hodgkin λέμφωμα. Μια διαφορετική προσέγγιση αποτελεί το GVAX[®] εμβόλιο για το ΠΜ (Cell Genesys, Inc., CA, USA). Αυτόλογα, ακτινοβολημένα μυελωματικά κύτταρα μαζί με K562 κύτταρα γενετικά τροποποιημένα για να παράγουν GM-CSF χορηγούνται μετά από χημειοθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Σε κλινικές δοκιμές φάσης I/II, 6 από 17 ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον έναν εμβόλιο έδειξαν πλήρη ανταπόκριση, 5 είχαν μερική ανταπόκριση, 3 είχαν σταθερή νόσο και 2 ασθενείς είχαν εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, 3 ασθενείς με πρώιμη εξέλιξη της ασθένειας μετά τη μεταμόσχευση έδειξαν σημαντική μείωση της παραπρωτεΐνης στην κυκλοφορία μετά τους εμβολιασμούς. Το GVAX[®] εμβόλιο φαίνεται καλά ανεκτό, με μόνες αναφερθείσες παρενέργειες τα δερματικά εξανθήματα (δύο ασθενείς) και κολίτιδα (ένας ασθενής) (57,58).

Εμβολιασμός με ΔΚ στο ΠΜ

Η ανοσοθεραπεία του ΠΜ μπορεί να γίνει πιο αποτελεσματική εάν τα αντιγόνα μεταφέρονται μέσω επαγγελματικών ΑΠΚ, όπως τα ΔΚ. Η πρώτη κλινική δοκιμή εμβολιασμού με ΔΚ στο ΠΜ δημοσιεύτηκε το 1998 και αφορούσε έναν μόνο ασθενή, στον οποίο χορηγήθηκαν ΔΚ φορτισμένα με τον αυτόλογο ιδιότυπο(82). Από τότε έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ΔΚ απομονωμένα από το περιφερικό αίμα των ασθενών, άωρα ή ώριμα *ex vivo* παραχθέντα moDCs και CD34DCs, με τα moDCs να αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία. Αρκετές ομάδες έχουν αποδείξει ότι τα moDCs, φορτισμένα με την αυτόλογη ιδιοτυπική πρωτεΐνη, μπορούν να χρησιμεύσουν σαν κυτταρικό εμβόλιο για το ΠΜ. Έχουν χρησιμοποιηθεί και συνδυασμοί όπως ΔΚ φορτισμένα με ιδιότυπο/KLH ή ταυτόχρονη χορήγηση βοηθητικών παραγόντων, π.χ. GM-CSF και IL-2, προκειμένου να ενισχυθεί η ανοσογονικότητα των εμβολιασμών.

Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η οδός χορήγησης των ΔΚ μπορεί να επηρεάσει και την ικανότητά τους να μεταναστεύουν στους τοπικούς λεμφαδένες.

Όταν χορηγούνται με ενδοδερμική ένεση, τα ΔΚ είναι 3 φορές περισσότερο αποδοτικά στη μετανάστευση στους λεμφαδένες σε σχέση με εκείνα που χορηγούνται με υποδόρια ένεση, και τα ώριμα ΔΚ είναι 8 φορές αποδοτικότερα

συγκριτικά με τα άωρα ΔΚ, ενώ η ένεση των ΔΚ εντός του όγκου μπορεί να οδηγήσει στην τοπική παρακράτησή τους μέσω της CXCL8. Μία καινούρια προσέγγιση του εμβολιασμού με ΔΚ αποτελεί και το MylovengeTM (Dendreon Corporation, WA, USA), το οποίο χρησιμοποιεί τον ιδιότυπο συνδεδεμένο με GM-CSF σαν αντιγόνο και βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης II.

Ο εμβολιασμός με ΔΚ φορτισμένα με τον ιδιότυπο μπορεί να προκαλέσει ειδικές ανοσιακές απαντήσεις στους ασθενείς με ΠΜ. Όμως, η κλινική τους αποτελεσματικότητα παραμένει αβέβαιη και αναμένεται ότι η επόμενη γενιά μελετών γύρω από τα εμβόλια ΔΚ θα δώσει τις απαντήσεις. Ένας αριθμός μορίων που μπορούν να προκαλέσουν ισχυρές *in vitro* ανοσιακές δράσεις έναντι του μυελώματος βρίσκεται σε προκλινική εξέλιξη, συμπεριλαμβανομένων των HM1.24, WT1, NY-ESO-1 και RHAMM, το οποίο υπερεκφράζεται στο ΠΜ και σχετίζεται με επιθετική νόσο και κακή επιβίωση. Ελπίζεται ότι τα ενθαρρυντικά προκλινικά αποτελέσματα που έδωσαν αυτά τα αντιγόνα θα επαληθευτούν στις *in vivo* μελέτες(26,27,41,54,55,56,57,58,59).

Ανοσογονιακή θεραπεία στο ΠΜ

Είναι γνωστό ότι τα μυελωματικά κύτταρα τείνουν να δραπέτεύσουν από την ανοσιακή επιτήρηση. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω μείωσης της έκφρασης των TAAs, των μορίων MHC και των συνδιεγερτικών μορίων, είτε μέσω έκκρισης ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, π.χ. TGFβ. Οι προσεγγίσεις ανοσογονιακής θεραπείας που έχουν εφαρμοστεί στο ΠΜ περιλαμβάνουν: α. μεθόδους ενίσχυσης της ανοσογονικότητας των μυελωματικών κυττάρων β. μεθόδους ενεργοποίησης των ΑΠΚ και γ. μεθόδους ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων έναντι του όγκου(62).

α. κυτταροκίνες όπως IL-2, IL-12 και GM-CSF μπορούν να ενισχύσουν την ανοσογονικότητα των μυελωματικών κυττάρων, με *ex vivo* διαμόλυση των γονιδίων αυτών των κυτταροκινών και ακόλουθη επαναχορήγηση των ακτινοβολημένων καρκινικών κυττάρων στον ασθενή. Μια δοκιμή φάσης I σε 8 ασθενείς με ΠΜ έγινε με χρήση αδενοϊικού φορέα για τη μεταφορά του γονιδίου της IL-2 στα μυελωματικά κύτταρα του ασθενούς, τα οποία επανενέθηκαν

υποδόρια. Το εμβόλιο έγινε καλά ανεκτό με ελάχιστες παρενέργειες, αλλά δεν έδωσε σαφείς κλινικές ανταποκρίσεις. Πειράματα σε ποντίκια με χρήση της μυελωματικής κυτταρικής σειράς MCP11, διαμολυσμένης με τα γονίδια των GM-CSF και IL-12, είχαν σαν αποτέλεσμα την απόρριψη του όγκου στο 60% των πειραματοζώων. Εκτός από τα γονίδια κυτταροκινών, συνδιεγερτικά μόρια όπως τα CD80(B7-1) και CD86(B7-2) έχουν χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσουν την ανοσογονικότητα των μυελωματικών κυττάρων. Μεταφορά των γονιδίων των CD80 και CD86 έδειξε αντινεοπλασματική δράση σε διάφορα μοντέλα όγκων. Στο ΠΜ, η χαμηλή έκφραση των B7 μορίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν θεραπευτικός στόχος. Έχει αναφερθεί ότι η διαμόλυνση μυελωματικών κυττάρων με το CD80 μέσω ρετροϊκού φορέα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό αλλογενών CD8 κυττάρων.

Ένα από τα προβλήματα που αφορούν στη μεταφορά γονιδίων στα μυελωματικά κύτταρα είναι η επιλογή του κατάλληλου φορέα. Οι ρετροϊκοί φορείς δεν εμφανίζουν μεγάλη συχνότητα διαμόλυνσης των μυελωματικών κυττάρων, καθώς τα περισσότερα από αυτά δεν πολλαπλασιάζονται. Σύμφωνα με κάποιες αναφορές, η συχνότητα μετασχηματισμού πρωτογενών καλλιιεργειών ανθρώπινων μυελωματικών κυττάρων με χρήση ρετροϊού ήταν μόλις 1,5-3,8%. Αντιθέτως, έχει αναφερθεί υψηλής αποδοτικότητας μεταφορά γονιδίων με χρήση αδενοϊκών φορέων, αλλά η αντιγονικότητα του αδενοϊού αποτελεί πρόβλημα στους επαναλαμβανόμενους εμβολιασμούς. AAV (adeno-associated virus) φορείς έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί, με ποσοστό διαμόλυνσης μέχρι και 80% στις ανθρώπινες μυελωματικές κυτταρικές σειρές LP-1 και RPMI 8226. Φορείς lentivirus έχουν επίσης δώσει υψηλού επιπέδου έκφραση του διαγονιδίου σε μυελωματικά κύτταρα. Οι μη ιικοί φορείς δεν έχουν μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό στο ΠΜ, και ο ιδανικός φορέας είναι ακόμα υπο διερεύνηση.

β. υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ενεργοποίησης των ΑΠΚ, και ειδικότερα των ΔΚ, προκειμένου να ενισχυθεί η παρουσίαση των TAAs στα Τ κύτταρα. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν επιτυχημένη ενεργοποίηση αντινεοπλασματικών CTLs με απομόνωση των ΔΚ από το περιφερικό αίμα ή το μυελό των οστών, ακόλουθη μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν TAAs σε συνδυασμό είτε με κυτταροκίνες είτε με μόρια μεταγωγής σήματος και επαναχορήγηση στον ασθενή. Επιπλέον, η μεταφορά γονιδίων κυτταροκινών όπως η IL-12 και η IL-4 έχει σκοπό να

προωθήσει την ειδική αντινεοπλασματική ανοσία μέσω των T κυττάρων. Τέλος, αναφέρθηκε πρόσφατα ότι η σίγηση του καταστολέα της σήμανσης κυτταροκινών (SOCS)1 στα ΔΚ ενισχύει την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα και αυξάνει την αντινεοπλασματική τους δράση.

γ. η ανοσοθεραπεία με χορήγηση CTLs είναι μία μέθοδος στην οποία τα δραστικά έναντι των όγκων λεμφοκύτταρα συλλέγονται από τους ασθενείς, τροποποιούνται *ex vivo* με μεταφορά γονιδίων, όπως κυτταροκινών, για ενεργοποίηση της αντινεοπλασματικής ανοσίας και επαναχορηγούνται στον ασθενή. Εξαιτίας της χαμηλής αποδοτικότητας της μεταφοράς γονιδίων στα λεμφοκύτταρα και της δυσκολίας της στόχευσης των μετασχηματισμένων κυττάρων στα καρκινικά κύτταρα, αυτή η τεχνική δεν έχει υπάρξει επιτυχής.

Εκτός από τα προαναφερθέντα, υπάρχουν και άλλα γονίδια με πιθανή θεραπευτική χρήση(62): α. φυσικού τύπου (wild type) γονίδια καταστολής του όγκου β. antisense θεραπεία για αναστολή της δραστηριότητας του ογκογονιδίου και γ. μετασχηματισμός με γονίδια αυτοκτονίας. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει μεταφορά εντός του όγκου ενός wild type ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπως το p53, το οποίο είναι μεταλλαγμένο σε 5-10% των περιπτώσεων ΠΜ και 80% των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών ΠΜ. Η εμφάνιση των μεταλλαγών του p53 είναι ένα όψιμο γεγονός που συνδέεται με την επιθετική πορεία της νόσου. Μέχρι τώρα, η αντινεοπλασματική δράση του p53 στο ΠΜ είναι μάλλον ασθενής. Στη δεύτερη προσέγγιση, η έκφραση γονιδίων βασικών για την ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων αναστέλλεται με πρόσδεση antisense ολιγονουκλεοτιδίων στο συμπληρωματικό τους mRNA. Έχει αναφερθεί antisense θεραπεία σε ποντίκια όπου στόχος ήταν η MIP -1α πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από τα μυελωματικά κύτταρα και σχετίζεται με την οστική νόσο. Η θεραπεία οδήγησε σε αναστολή της οστικής βλάβης και αύξηση των ποσοστών επιβίωσης. Επιπλέον, η χρήση antisense μορίων έναντι της πρωτεΐνης survivin, που αναστέλλει την απόπτωση στα μυελωματικά κύτταρα, προκαλεί απόπτωση και αυξάνει την ανταπόκριση στους συμβατικούς θεραπευτικούς παράγοντες. Βελτίωση της ανταπόκρισης στα αντικαρκινικά φάρμακα έχει επίσης αναφερθεί με antisense θεραπεία έναντι του Bcl-2. Η τελευταία προσέγγιση περιλαμβάνει τη μεταφορά γονιδίων αυτοκτονίας, όπως της κινάσης της θυμιδίνης του ιού herpes (HSV-*tk*), στο καρκινικό κύτταρο. Όταν η ουσία ganciclovir (GCV) χορηγείται

ενδοφλέβια μετά τη μεταφορά του HSV-*tk* γονιδίου στα καρκινικά κύτταρα, φωσφορυλιώνεται από την κινάση της θυμιδίνης που εκφράζουν τα κύτταρα του όγκου. Το φωσφορυλιωμένο GCV αυξάνει τη δραστικότητα των φαρμάκων και προκαλεί τη θανάτωση του καρκινικού κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με GCV δεν φονεύονται μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν το HSV-*tk* γονίδιο, αλλά και γειτονικά κύτταρα του όγκου που δεν έχουν τροποποιηθεί γενετικά (bystander effect).

Χυμική ανοσοθεραπεία στο ΠΜ

Η θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των όγκων, όπως το rituximab (anti-CD20), το campath-1H (anti-CD52) και το myelotarg (anti-CD33) αποτελούν βιώσιμες θεραπευτικές επιλογές για το λέμφωμα και τη λευχαιμία. Αυτή η μορφή ανοσοθεραπείας αρχίζει να μελετάται για το ΠΜ, όμως η αναγνώριση κατάλληλων επιφανειακών αντιγόνων που θα επέτρεπαν την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων με ικανοποιητική ειδικότητα και ευαισθησία για τα μυελωματικά κύτταρα έχει υπάρξει προβληματική. Έχει εξεταστεί η χρήση των CD38, CD138 (syndecan-1), CD54 (ICAM), CD40, VEGF και HM1.24 σαν θεραπευτικοί στόχοι με περιορισμένη επιτυχία. Μέχρι τώρα, η εμπειρία με τη χρήση του rituximab στο ΠΜ είναι μικρή. Αν και λιγότερο από το 20% των κλώνων κακοήθων πλασματοκυττάρων εκφράζουν το CD20, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να έχει κάποιο ρόλο εναντίον του αρχέγονου κυττάρου του ΠΜ. Τα μυελωματικά κύτταρα θεωρούνται παραδοσιακά σαν ώριμα πλασματοκύτταρα (CD45⁻, CD19⁻, CD56⁺, CD138⁺, CD38⁺) με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού. Όμως, όπως και σε άλλες λευχαιμίες, μπορεί να υπάρχει ένας μικρός πληθυσμός "προγονικών κυττάρων του όγκου" (CD45⁺ CD19⁺ CD22⁺ CD138⁻), τα οποία διατηρούν την ικανότητα της αυτοανανέωσης και του πολλαπλασιασμού. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε ποντίκια NOD/SCID και, αν απομακρυνθούν με rituximab, δεν μπορεί να εγκατασταθεί το ΠΜ. Αυτή η παρατήρηση έδωσε τη βάση για τη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών που εξέταζαν το ρόλο της χορήγησης rituximab σαν θεραπεία συντήρησης μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση, οι οποίες οδήγησαν σε αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων χωρίς βελτίωση στην άνευ νόσου

επιβίωση. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν αναφερθεί μελέτες με χρήση του rituximab ως *in vitro* παράγοντα "εκκαθάρισης" των μοσχευμάτων κατά την αυτόλογη μεταμόσχευση (57,58).

Προοπτικές βελτίωσης των στρατηγικών ανοσοθεραπείας του ΠΜ

Το πεδίο της ανοσοθεραπείας των όγκων βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Γίνεται όλο και πιο σαφές ότι η ανθρώπινη ανοσιακή απόκριση είναι το αποτέλεσμα εξαιρετικά περίπλοκων και συνεχώς εξελισσόμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας, του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος και των φυσιολογικών και μη φυσιολογικών κυττάρων. Παρά την πολύ σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία 30 χρόνια, δεν έχει κατανοηθεί παρα μονάχα η επιφάνεια της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με την κακοήγη νόσο. Δεν αποτελεί, λοιπόν, έκπληξη το ότι τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών ανοσοθεραπείας είναι, μέχρι στιγμής, μάλλον απογοητευτικά. Αν και έχουν παραχθεί δραστικά κύτταρα με ειδική αντινεοπλασματική δράση *in vitro*, αυτό δεν έχει οδηγήσει σε βελτιωμένη έκβαση στους ασθενείς με κακοήθειες γενικά και με ΠΜ ειδικά που συμμετείχαν στις κλινικές δοκιμές ανοσοθεραπείας. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που σχετίζονται με αυτό το αποτέλεσμα (57,58).

Το στάδιο της νόσου στο οποίο εφαρμόζονται οι ανοσοθεραπευτικές τεχνικές αποτελεί μία παράμετρο κρίσιμη για την έκβαση των εμβολιασμών. Θα είναι σαφώς προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί η ανοσοθεραπεία στο ΠΜ σε φάση όπου το φορτίο του όγκου θα είναι στο χαμηλότερο επίπεδο, όπως μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση. Άλλοι προβληματισμοί σχετίζονται με την ταυτοποίηση αντιγονικών επιτόπων ειδικών για το ΠΜ, αλλά και με την αναγνώριση των προγονικών κυττάρων του ΠΜ, καθώς η ανάλυση των φαινοτυπικών και γενετικών χαρακτηριστικών τους μπορεί να αναγνωρίσει νέους ανοσοθεραπευτικούς στόχους. Εξάλλου, υπάρχει ακόμη διαφωνία γύρω από την καταλληλότερη για εμβολιασμούς υποομάδα ΔΚ και την ικανότητά τους για μετανάστευση προς τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Η κατανόηση του συστήματος των χημειοκινών και των υποδοχέων τους (CCR7, CCR8) θα συνεισφέρει σημαντικά προς αυτήν την

κατεύθυνση. Επιπλέον, η *in vivo* καταστολή των Tregs πριν τη χορήγηση ΔΚ, π.χ. με κυκλοφωσφαμίδιο, θα μπορούσε να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας. Τέλος, η εφαρμογή τεχνικών *in vivo* στόχευσης και ενεργοποίησης των ΔΚ αποτελεί μία υπο διερεύνηση θεραπευτική προσέγγιση (23), αν και φαίνεται δύσκολα εφαρμόσιμη για κακοήθειες όπως το ΠΜ, που συνοδεύονται από έντονη ανοσοκαταστολή.

Συμπερασματικά, είναι αποδεκτό ότι οι συνδυασμένες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις, όταν χορηγηθούν σε φάση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου και έλλειψης Tregs, μπορούν να διεγείρουν χρήσιμες ανοσιακές απαντήσεις στους ασθενείς με ΠΜ. Άρα λοιπόν, η χρονική στιγμή στην οποία γίνεται η ανοσοθεραπευτική επέμβαση μπορεί να είναι το ίδιο κρίσιμη για την παραγωγή κλινικών ανταποκρίσεων όσο και η επιλογή του αντιγόνου έναντι του οποίου κατευθύνεται η ανοσιακή απόκριση ή ο τρόπος χορήγησής του (57,58).

7. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι κλινικές δοκιμές ανοσοθεραπείας που έχουν γίνει μέχρι σήμερα για το ΠΜ έχουν δώσει έμφαση στον ιδιότυπο, ο οποίος θεωρείται ιδανικό ΤΑΑ εφόσον εκφράζεται αποκλειστικά από τον κακοήθη κλώνο των πλασματοκυττάρων. Η εμπειρία όμως έδειξε ότι η παραπρωτεΐνη του μυελώματος είναι ένα μάλλον ασθενές αντιγόνο με λίγα ανοσοεπικρατή πεπτιδία και ότι οι ανοσιακές απαντήσεις που παρατηρούνται στους ασθενείς με ΠΜ μετά από εμβολιασμό με φορτισμένα με τον ιδιότυπο ΔΚ δεν συνοδεύονται από σημαντικές κλινικές ανταποκρίσεις, σε αντίθεση με το Β λέμφωμα, όπου οι αντίστοιχοι εμβολιασμοί έχουν δώσει ενθαρρυντικά κλινικά αποτελέσματα. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι που πιθανώς εξηγούν αυτό το φαινόμενο. Σε αντίθεση με το non-Hodgkin λέμφωμα, όπου ο ιδιότυπος εκφράζεται στην επιφάνεια των Β κυττάρων, στο ΠΜ είναι κυρίως εκκρινόμενος, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ιδιοτυπικής πρωτεΐνης στον ορό τους, πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των ασθενών με λέμφωμα. Είναι λοιπόν πιθανό ο στόχος των ανοσιακών αποκρίσεων που επάγονται *in vivo* να είναι κυρίως η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη της κυκλοφορίας και όχι το μυελωματικό κύτταρο. Επιπλέον, μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η ελεύθερη ιδιοτυπική πρωτεΐνη μπορεί να αναστείλει την ειδική για τον ιδιότυπο ανοσία. Βέβαια, αυτοί οι προβληματισμοί αφορούν κυρίως τη χυμική ανοσία, καθώς τα αντισώματα μπορεί να προσδεθούν στον ιδιότυπο του ορού και έτσι να μην φτάσουν στα μυελωματικά κύτταρα-στόχους σε τέτοια συγκέντρωση ώστε να είναι αποτελεσματικά. Δεδομένου ότι τα Τ κύτταρα δεν αναγνωρίζουν την άθικτη πρωτεΐνη, η κυτταρική ανοσία μπορεί να μείνει ανεπηρέαστη από την παραπρωτεΐνη της κυκλοφορίας και να αναγνωρίσει ειδικά για τον ιδιότυπο πεπτιδία παρόντα στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων. Όμως, έχει περιγραφεί απενεργοποίηση των CD4⁺ Τ κυττάρων σαν αποτέλεσμα της χορήγησης υψηλών δόσεων ιδιοτύπου σε πειραματόζωα. Άρα λοιπόν, η επαγωγή περιφερικής ανοχής των Τ κυττάρων εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων ιδιοτύπου μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό διαφυγής του όγκου

σε ασθενείς με ΠΜ (33). Για τους λόγους αυτούς, η ανάγκη αναγνώρισης επιπλέον αντιγόνων ειδικών για το ΠΜ είναι επιτακτική.

Η χρήση αντιγόνων ειδικών για τον όγκο του κάθε ασθενούς θα ήταν σαφώς ιδανική, είναι όμως προβληματική εξαιτίας της δυσκολίας στην αναγνώριση και το χαρακτηρισμό τέτοιων μοναδικών αντιγόνων. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι αυτή της χρήσης κοινών, ήδη αναγνωρισμένων αντιγόνων, όπως η BCR/ABL χιμαιρική πρωτεΐνη στη ΧΜΛ, το PSA στον καρκίνο του προστάτη και το CEA στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Όμως, αντιγόνα με αποκλειστική έκφραση για το ΠΜ δεν έχουν αναγνωρισθεί ακόμα. Υπάρχουν αντιγόνα που είναι κοινά για αρκετούς τύπους όγκων (universal TAAs), π.χ. WT1 και hTERT. Αν και αυτά τα κοινά αντιγόνα αποτελούν ιδανική πηγή για την παραγωγή τυποποιημένων εμβολίων, τα περισσότερα από αυτά είναι αυτοαντιγόνα που εκφράζονται και από φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχει αναπτυχθεί ανοσιακή ανοχή για αυτά τα αντιγόνα. Έχουν συχνά εφαρμοστεί στρατηγικές φόρτισης των ΔΚ με συνθετικά πεπτιδία προερχόμενα από τις παραπάνω κατηγορίες αντιγόνων. Όμως, οι τεχνικές αυτές εξαρτώνται από τα HLA αντιγόνα του ασθενούς (τα περισσότερα γνωστά πεπτιδία έχουν χαρακτηριστεί σε άτομα με HLA*A0201) και προϋποθέτουν γνώση των αντιγόνων που εκφράζει ο όγκος. Εξαιτίας αυτών των περιορισμών, η παραγωγή τέτοιων εμβολίων ΔΚ με χρήση πεπτιδικών επιτόπων δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους ασθενείς. Επιπλέον, η στόχευση των ανοσιακών αποκρίσεων έναντι ενός ή περιορισμένων αντιγόνων θα έχει ως αποτέλεσμα την κλωνική διαφυγή των όγκων, μέσω μείωσης της έκφρασης ή απαλοιφής των αντιγονικών στόχων (41).

Οι προαναφερθείσες δυσκολίες θα μπορούσαν να παρακαμφθούν σε μεγάλο βαθμό με την εφαρμογή τεχνικών που χρησιμοποιούν ολόκληρο το αντιγονικό φορτίο του καρκινικού κυττάρου για τη διέγερση των ΔΚ. Τέτοιες στρατηγικές μπορούν να εφαρμοστούν σε περιπτώσεις όπου δεν έχουν αναγνωρισθεί συγκεκριμένα αντιγόνα του όγκου. Δεν έχουν τους HLA περιορισμούς που συνοδεύουν τα πεπτιδικά εμβόλια και μειώνουν τον κίνδυνο διαφυγής του όγκου, εφόσον τα ΔΚ παρουσιάζουν πολλαπλούς επιτόπους, διεγείροντας έτσι την παραγωγή Τ λεμφοκυττάρων με διάφορες αντιγονικές ειδικότητες και αφήνοντας το ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίσει μόνο του τους πλέον ανοσοεπικρατείς επιτόπους. Τέτοιου είδους τεχνικές χρησιμοποιούν αποπρωτικά σωματίδια

καρκινικών κυττάρων, λυθέντα κύτταρα του όγκου, υβρίδια ΔΚ/καρκινικών κυττάρων και ολικό RNA ή mRNA του όγκου. Το μειονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι η απαίτηση για διαθεσιμότητα επαρκούς ποσότητας αυτόλογων νεοπλασματικών κυττάρων για την παραγωγή των εμβολίων. Η χρήση ολικού mRNA του όγκου μπορεί να παρακάμψει αυτή τη δυσκολία, δεδομένης της δυνατότητας μη ειδικού πολλαπλασιασμού του mRNA με μοριακές τεχνικές (41,55).

Το ΠΜ αποτελεί νόσημα ιδανικό για την εφαρμογή τέτοιων προσεγγίσεων χάρη στην ευκολία συλλογής ικανοποιητικών αριθμών μυελωματικών κυττάρων από δείγματα αναρρόφησης μυελού των οστών των ασθενών. Υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες *in vitro* διέγερσης ΔΚ και επαγωγής ειδικών για το ΠΜ CTLs με χρήση αυτών των τεχνικών. Το υλικό από λυμένα, μετά από διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης, πλασματοκύτταρα έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί υποσχόμενη πηγή αντιγόνου για την ανοσοθεραπεία του ΠΜ (61,83,84). Υπάρχουν όμως και αναφορές σύμφωνα με τις οποίες η πρόσληψη αντιγόνων από τα ΔΚ υπο τη μορφή λυθέντων μυελωματικών κυττάρων έχει αποτέλεσμα την επαγωγή T ρυθμιστικών κυττάρων (85). Σε μεγαλύτερο βαθμό έχουν χρησιμοποιηθεί αποπτωτικά σωματίδια μυελωματικών κυττάρων για την *in vitro* έκπτυξη ειδικών για το ΠΜ CTLs, καθώς είναι ευρέως αποδεκτό ότι η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων νεοπλασματικών κυττάρων αποτελεί βασική λειτουργία των ΔΚ που οδηγεί σε αποδοτική διασταυρούμενη παρουσίαση (cross presentation) αντιγόνων του όγκου σε CD8 κυτταροτοξικά κύτταρα του ξενιστή. Η ικανότητα των ΔΚ για φαγοκυττάρωση αποπτωτικών νεοπλασματικών κυττάρων έχει επαληθευτεί σε αρκετές μελέτες (70,86,87,88), όπως επίσης και η ανωτερότητα της χρήσης αποπτωτικών σωματίων συγκριτικά με τα προϊόντα λύσης καρκινικών κυττάρων (70,87). Στο ΠΜ, υπάρχουν αρκετές αναφορές για την *in vitro* έκπτυξη ειδικών CTLs από ΔΚ διεγερμένα με αποπτωτικά μυελωματικά κύτταρα (70,89,90,92). Τελευταίες μελέτες δείχνουν την ανωτερότητα αυτής της μεθόδου φόρτισης των ΔΚ για την ανοσοθεραπεία του ΠΜ που παράγει λ αλυσίδες σε σχέση με τη χρήση ιδιοτύπου/KLH (91), και την ικανότητα των διεγερμένων με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων ΔΚ να εκπύσσουν ειδικούς για το ΠΜ T κυτταρικούς κλώνους, των οποίων η παρουσία συσχετίζεται με την κλινική έκβαση των ασθενών (93). Άλλη μία μέθοδος φόρτισης των ΔΚ με

το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών κυττάρων που έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα *in vitro* είναι η σύντηξη ΔΚ/πλασματοκυττάρων (94,95). Υπάρχουν όμως μελέτες που αφορούν στον καρκίνο του παχέος εντέρου (160) και στο γλοίωμα (161) και οι οποίες περιγράφουν μειωμένη *in vitro* απόδοση των τεχνικών σύντηξης σε σχέση με τις άλλες μεθόδους φόρτισης των ΔΚ με το ολικό αντιγονικό φορτίο των όγκων. Τέλος, η διέγερση των ΔΚ με το ολικό RNA ή mRNA των καρκινικών κυττάρων έχει δοκιμαστεί σε αρκετές κακοήθειες και έχει αποδειχθεί η ανωτερότητα της ηλεκτρικής διάτρησης των μεμβρανών (electroporation) σε σχέση με τη χρήση λιπιδικών βοηθημάτων και την παθητική πρόσληψη του RNA όσον αφορά το ποσοστό διαμόλυνσης των ΔΚ με τα επιθυμητά RNA μόρια (96). Για το ΠΜ υπάρχει μόνο μία δημοσιευμένη μελέτη *in vitro* διέγερσης ΔΚ με ολικό RNA μυελωματικών κυτταρικών σειρών με την τεχνική του electroporation (81), η οποία έδειξε την επαγωγή ειδικών για το ΠΜ CTLs από αυτά τα ΔΚ.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με ΠΜ με χρήση αυτών των στρατηγικών φόρτισης των ΔΚ με το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών κυττάρων. Το 2007 αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία (59) μία εν εξελίξει κλινική δοκιμή με χρήση υβριδίων ΔΚ/μυελωματικών κυττάρων και ταυτόχρονη χορήγηση GM-CSF, δεν υπάρχουν όμως δημοσιευμένα αποτελέσματα αυτής. Άρα λοιπόν, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση όλων αυτών των προκλινικών δεδομένων και η κλινική εφαρμογή τους.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εφαρμογή δύο διαφορετικών μεθόδων *ex vivo* διέγερσης των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών κυττάρων: φαγοκυττάρωση αυτόλογων αποπτωτικών σωματίων και φόρτιση με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων με την τεχνική του electroporation. Η χρήση ΔΚ διεγερμένων με αποπτωτικά σωματίδια για την παραγωγή αντινεοπλασματικών T λεμφοκυτταρικών απαντήσεων είναι αρκετά καλά μελετημένη στο ΠΜ, τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε πρωτογενή καρκινικά κύτταρα ασθενών. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για την φόρτιση των ΔΚ με ολικό RNA μυελωματικών κυττάρων, για την οποία υπάρχει μέχρι στιγμής μόνο μία δημοσιευμένη μελέτη (81), η οποία μάλιστα χρησιμοποίησε μυελωματικές κυτταρικές σειρές και όχι πρωτογενές ανθρώπινο υλικό. Πρόκειται λοιπόν για ένα πεδίο ουσιαστικά ανεξερεύνητο. Επιπλέον, όσον αφορά το ΠΜ, παρα το ότι η *in*

in vitro αποτελεσματικότητα των αποπτωτικών σωματίων μυελωματικών κυττάρων ως πηγή αντιγόνων για την ανοσοθεραπεία είναι καλά τεκμηριωμένη, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής μελέτες που να τη συγκρίνουν απευθείας με τη φόρτιση των ΔΚ των ασθενών με το ολικό RNA των αυτόλογων νεοπλασματικών κυττάρων.

Υπάρχουν τρεις δημοσιευμένες αναφορές σύγκρισης αυτών των δύο τεχνικών διέγερσης των ΔΚ με το ολικό αντιγονικό φορτίο των καρκινικών κυττάρων. Οι δύο πρώτες δημοσιεύθηκαν το 2005 από την ίδια ομάδα και αφορούν την παιδική λευχαιμία (97) και το νευροβλάστωμα υψηλού κινδύνου στα παιδιά (98). Και στις δύο *in vitro* μελέτες χρησιμοποιήθηκαν ΔΚ από υγιείς δότες και αντιγονικό υλικό από τις αντίστοιχες καρκινικές κυτταρικές σειρές για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι τόσο η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων όσο και η φόρτιση των ΔΚ με το ολικό mRNA του όγκου με την τεχνική του *electroporation* αποτελούν υποσχόμενες στρατηγικές για την παραγωγή αντινεοπλασματικών εμβολίων, αν και η χρήση ολικού mRNA φαίνεται ίσως να παράγει ισχυρότερες T λεμφοκυτταρικές απαντήσεις. Η τρίτη μελέτη (99) δημοσιεύθηκε το 2008 και αφορά ένα μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα σε ποντίκια, στο οποίο και οι δύο τεχνικές *ex vivo* διέγερσης των ΔΚ ήταν αποτελεσματικές στην επαγωγή ανοσιακών απαντήσεων, αλλά τα φορτισμένα με το ολικό RNA του όγκου ΔΚ αποδείχθηκαν σαφώς ισχυρότερα αντινεοπλασματικά εμβόλια σε σχέση με τα ΔΚ που είχαν φαγοκυτταρώσει αποπτωτικά σωματίδια, τουλάχιστον κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.

Είναι πλέον γνωστό και ευρέως αποδεκτό ότι για την επαγωγή και τη διατήρηση μιας επιτυχημένης ανοσιακής απόκρισης δεν επαρκούν τα CD8 κυτταροτοξικά CTLs, αλλά είναι κρίσιμη και η βοήθεια που παρέχουν τα CD4 T κύτταρα (100-103), κάτι που πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν κατά το σχεδιασμό πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας. Με τη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων από τα ΔΚ, οι αντιγονικοί επίτοποι παρουσιάζονται στην κυτταρική επιφάνεια σε σύμπλοκα με μόρια HLA τάξης II, μέσω της κλασικής οδού επεξεργασίας των εξωγενών αντιγόνων, αλλά και με μόρια HLA τάξης I, χάρη στην ικανότητα των ΔΚ για διασταυρούμενη παρουσίαση εξωγενών αντιγόνων, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τόσο CD4⁺ όσο και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως, η φόρτιση των ΔΚ με το ολικό RNA των μυελωματικών κυττάρων οδηγεί στην

κυτταροπλασματική έκφραση των αντιγόνων και στην επεξεργασία τους μέσω της κλασικής ενδογενούς οδού, με αποτέλεσμα οι αντιγονικοί επίτοποι να παρουσιάζονται στην επιφάνεια των ΔΚ σε σύμπλοκα με μόρια HLA τάξης I και να κατευθύνουν την ενεργοποίηση CD8 λεμφοκυττάρων. Παρόλα αυτά, η διέγερση ειδικών CD4⁺ T κυττάρων από ΔΚ φορτισμένα με RNA καρκινικών κυττάρων δεν μπορεί να αποκλειστεί, και υπάρχουν σχετικές δημοσιευμένες αναφορές για διάφορες κακοήθειες (97,98,121,122,159). Η παρούσα μελέτη θα διερευνήσει την αποδοτικότητα της φόρτισης των ΔΚ με ολικό RNA μυελωματικών κυττάρων ως προς την έκπτυξη CD4⁺ T βοηθητικών κυττάρων ειδικών για το ΠΜ. Στο βαθμό που κάποια από τις δύο ανωτέρω μεθόδους αποδειχθεί αποτελεσματικότερη για τη διέγερση ισχυρών, ειδικών αντινεοπλασματικών απαντήσεων, μπορεί να εξεταστεί η εφαρμογή της σε ασθενείς με ΠΜ με σκοπό τη βελτίωση της ύφεσης ή την πρόληψη της υποτροπής μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή ασθενών

Στη μελέτη συμμετείχαν 20 ασθενείς με ΠΜ, 10 άνδρες και 10 γυναίκες, ηλικίας 43-78 χρόνων, σε στάδιο II/III της νόσου κατά Durie-Salmon. Οι δειγματοληψίες μυελού των οστών έγιναν στην πρώτη διάγνωση της ασθένειας, ενώ οι αιμοληψίες έγιναν σε διάφορα στάδια της νόσου, κατόπιν χορήγησης θεραπευτικής αγωγής στους περισσότερους ασθενείς. Σε 6 από αυτούς η συλλογή μονοπύρηνων κυττάρων δεν έγινε με λήψη περιφερικού αίματος, αλλά από το προϊόν της λευκαφαίρεσης, κατά τη συλλογή αιμοποιητικών κυττάρων του περιφερικού αίματος για αυτόλογη μεταμόσχευση. Όλες οι δειγματοληψίες έγιναν κατόπιν ενημέρωσης των ασθενών και συναίνεσής τους.

Συλλογή μυελωματικών κυττάρων

Η συλλογή μυελωματικών κυττάρων των ασθενών έγινε κατά την πρώτη διάγνωση της νόσου από δείγματα αναρρόφησης μυελού των οστών όγκου 10ml. Τα πλάσματοκύτταρα απομονώθηκαν με χρήση στηλών διαχωρισμού και μαγνητικών μικροσφαιριδίων σημασμένων με αντι-CD138 μονοκλωνικό αντίσωμα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (CD138 microbeads και MACS LS separation columns, Miltenyi Biotec, Germany). Μετά την απομόνωση, τα μυελωματικά κύτταρα ελέγχονταν με κυτταρομετρία ροής με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων CD138 FITC(κλώνος MI15), CD38 PE(κλώνος HB-7), CD45 FITC(κλώνος 2D1) και CD56 PE(κλώνος MY31), όλα της BD Biosciences, San Jose, CA, USA σε κυτταρομετρητή ροής FACSort της BD Biosciences. Τα CD138 θετικά κύτταρα είτε κρυοκαταψύχονταν σε υγρό άζωτο για μελλοντική χρήση είτε χρησιμοποιούνταν άμεσα για απομόνωση ολικού RNA.

Καλλιέργεια ΔΚ

Η παραγωγή ΔΚ έγινε με απομόνωση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, σύμφωνα με τη διαδικασία που πρωτοπεριγράφηκε από τους Sallusto και Lanzavecchia(66,67), με μικρές τροποποιήσεις. Για το σκοπό αυτό, έγιναν λήψεις περιφερικού αίματος όγκου 50-100ml από 15 υγιείς δότες και από τους ασθενείς με ΠΜ σε διάφορα στάδια της νόσου. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση του αίματος στα 200xg για 10 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί το πλάσμα και αραιώσή του x4 με D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco BRL, Invitrogen). Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) γινόταν με επιστοίβαση σε φυκόλη (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB) σε σωληνάρια των 50ml σε αναλογία φυκόλη:αίμα 15:35 και φυγοκέντρηση στα 750xg για 25 λεπτά. Ακολουθούσε πλύσιμο των ΜΚΠΑ με D-PBS, φυγοκέντρηση στα 300xg για 10 λεπτά και λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με προσθήκη διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου και επώαση 15 λεπτών. Μετά από άλλα δύο πλυσίματα με D-PBS, τα ΜΚΠΑ χρησιμοποιούνταν για τη θετική επιλογή των μονοκυττάρων είτε απευθείας, είτε την επόμενη μέρα μετά από φύλαξη στους 4°C. Η θετική επιλογή των μονοκυττάρων γινόταν με επίστρωση των ΜΚΠΑ σε 6-well plates (Costar), σε θρεπτικό υλικό RPMI (RPMI+L-Glutamine+25mM HEPES, Gibco BRL, Invitrogen), σε όγκο 3ml ανα well και με 10⁷ ΜΚΠΑ ανα well. Μετά από 2 ώρες επώασης στους 37°C, σε συνθήκες 5% CO₂ και 90% υγρασία, τα μονοκύτταρα προσκολλώνταν στον πυθμένα του καλλιεργητικού δοχείου, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα (κυρίως λεμφοκύτταρα) αιωρούνταν στο θρεπτικό μέσο. Τα μη προσκολλημένα λεμφοκύτταρα συλλέγονταν και κρουοκαταψύχονταν σε υγρό άζωτο για μελλοντική χρήση, ενώ τα μονοκύτταρα καλλιεργούνταν για 6 ημέρες σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% ανθρώπινη αλβουμίνη και 1% αντιβιοτικά (Penicillin/Streptomycin, Gibco BRL, Invitrogen) και με προσθήκη των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων κυτταροκινών GM-CSF (R&D Systems) και IL-4 (R&D Systems) σε συγκεντρώσεις 1000U/ml και 800U/ml αντιστοίχως, για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς άωρα ΔΚ. Το θρεπτικό υλικό και οι αυξητικοί παράγοντες

ανανεώνονταν κατά το ήμισυ κάθε δύο ημέρες. Την έκτη ημέρα της καλλιέργειας τα άωρα ΔΚ συλλέγονταν, γινόταν μέτρηση του αριθμού τους και της βιωσιμότητας σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04% και είτε χρησιμοποιούνταν άμεσα είτε κρυοκαταψύχονταν σε υγρό άζωτο για μελλοντική χρήση.

Κρυοκαταψύξεις και αποψύξεις κυττάρων

Για την κρυοκατάψυξη, τα κύτταρα (ΔΚ, λεμφοκύτταρα ή CD138 θετικά επιλεγμένα πλασματοκύτταρα) πλένονταν με D-PBS και φυγοκέντρηση στα 300xg για 10 λεπτά και αναδιαλύονταν σε θρεπτικό υλικό 45%RPMI+45%FBS(fetal bovine serum heat inactivated, Gibco BRL, Invitrogen)+10%DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma). Μοιράζονταν σε κρυοφιαλίδια όγκου 2ml σε συγκέντρωση $0,5-5 \times 10^6$ κύτταρα/ml και ανα φιαλίδιο και τοποθετούνταν στο δοχείο κρυοκατάψυξης (Nalgene™ Cryo1CFreezing Container), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το δοχείο μεταφερόταν σε καταψύκτη -80°C , όπου η θερμοκρασία των κυττάρων μειωνόταν με ρυθμό $1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$, για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 5 ωρών. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, τα κύτταρα είτε παρέμεναν στους -80°C , εφόσον θα χρησιμοποιούνταν σύντομα, είτε μεταφέρονταν στο υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη αποθήκευση.

Για την απόψυξη, τα κύτταρα μεταφέρονταν από τους -80°C ή το υγρό άζωτο απευθείας σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 37°C , μέχρις ότου παραμείνει ένα μικρό κομμάτι πάγου στο κρυοφιαλίδιο. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη κρύου RPMI στάγδην στα αποψυγμένα κύτταρα σε τελικό όγκο 15ml και φυγοκέντρηση στα 200xg για 10 λεπτά, για να αφαιρεθεί το DMSO. Τέλος, τα κύτταρα αναδιαλύονταν σε θρεπτικό υλικό ανάλογο με τη μετέπειτα χρήση τους και γινόταν μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητας σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04%.

Προετοιμασία κυττάρων για κυτταρομετρία ροής

Για την ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής, τα ΔΚ, άωρα και ώριμα, αναδιαλύονταν σε RPMI ή D-PBS σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml και

μοιράζονταν ανα 1×10^5 σε φιαλίδια. Εκεί γινόταν σήμανση των ΔΚ με μονοκλωνικά αντισώματα CD14 FITC(κλώνος MøP9), CD3 FITC (κλώνος SK7), CD45 FITC(κλώνος 2D1), HLA-DR PE(κλώνος L243), CD123(anti-IL-3Rα) PE(κλώνος 7G3), CD1α PE(κλώνος SK9), CD11c PE(κλώνος S-HCL-3), όλα της BD Biosciences, και CD80(B7-1) FITC(κλώνος BB1), CD83 FITC(κλώνος HB15e) και CD86(B70/B7-2) PE[κλώνος 2331(FUN-1)], όλα της BD Pharmingen™. Η σήμανση των λεμφοκυττάρων έγινε με τα μονοκλωνικά αντισώματα Simultest™ CD3 FITC/CD19 PE(κλώνοι SK7/4G7), CD3 FITC/CD4 PE(κλώνοι SK7/SK31), CD3 FITC/CD8 PE(κλώνοι SK7/SK1) και CD3 FITC/CD16+56 PE(κλώνοι SK7/B73.1,MY31), όλα της BD Biosciences. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το ισοτυπικό control Simultest™ control $\gamma 1/\gamma 1$ (IgG1 FITC/IgG1 PE, κλώνοι X40/X40) της BD Biosciences για τον αποκλεισμό του μη ειδικού φθορισμού. Τα κύτταρα επωάζονταν μαζί με τα μονοκλωνικά αντισώματα στους 4°C στο σκοτάδι για 20 λεπτά και ακολουθούσε πλύσιμο με D-PBS με φυγοκέντρηση στα 400xg για 5 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα αναδιαλύονταν σε 0,5ml 1% παραφορμαδεύδης και είτε αναλύονταν την ίδια ημέρα είτε φυλάσσονταν στους 4°C και αναλύονταν την επόμενη ημέρα. Η ανάλυση γινόταν σε κυτταρομετρητή ροής FACSsort της BD Biosciences με χρήση του λογισμικού BD CellQuest.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης κυτταροκινών

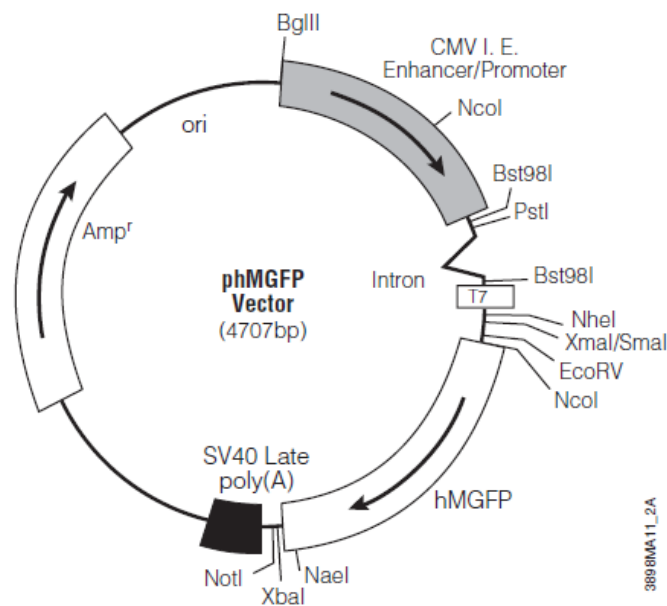
Για την ανάλυση των κυτταροκινών που παράγουν τα άωρα και ώριμα ΔΚ υγιών δοτών και ασθενών με ΠΜ, συλλεγόταν το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό μετά το πέρας των 6 ημερών της καλλιέργειας για τα άωρα ΔΚ ή 24-48 ώρες μετά την προσθήκη TNFα για τα ώριμα ΔΚ, μοιρασόταν σε φιαλίδια και φυλασσόταν στους -80°C. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των κυτταροκινών IL-8, IL-1β, IL-6, TNF, IL-10 και IL-12p70 χρησιμοποιήθηκε το BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines kit της BD Biosciences σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέτρηση των δειγμάτων έγινε σε κυτταρομετρητή ροής FACSsort της BD Biosciences με χρήση του λογισμικού BD CellQuest, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού FCAP Array.

In vitro μεταγραφή του GFP mRNA

Για την εκτίμηση της απόδοσης της ηλεκτρικής διάτρησης των μεμβρανών (electroporation) και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών διαμόλυνσης των κυττάρων, είναι απαραίτητη η χρήση ενός γονιδίου-δείκτη. Για τον υπολογισμό του ποσοστού διαμόλυνσης των ΔΚ με τη διαδικασία του electroporation χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), η έκφραση της οποίας από τα κύτταρα-στόχους μπορεί να εκτιμηθεί τόσο με μικροσκόπιο φθορισμού όσο και με κυτταρομετρία ροής. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο πλασμίδιο (Monster Green[®] Fluorescent Protein pMGFP Vector, Promega Corporation), το οποίο περιέχει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για τη Monster Green[®] Fluorescent Protein κλωνοποιημένο σε έναν φορέα έκφρασης βελτιστοποιημένο για κύτταρα θηλαστικών. Το συνθετικό hMGFP γονίδιο εκφράζει μια πρωτεΐνη 26kDa που δείχνει βελτιωμένη ένταση φθορισμού σε σχέση με το φυσικό γονίδιο. Επιπλέον, το hMGFP γονίδιο έχει τροποποιήσεις που εξασφαλίζουν αξιόπιστη και υψηλό επιπέδου έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Στην εικόνα 1 φαίνεται ο χάρτης του pMGFP πλασμιδιακού φορέα.

Αρχικά έγινε μετασχηματισμός κυττάρων E.coli (στέλεχος DH5a) με το πλασμίδιο με τη μέθοδο του θερμικού σοκ και φύλαξη σε στοκ γλυκερόλης στους -80°C, ώστε να εξασφαλιστούν επαρκείς διαθέσιμες ποσότητες του pMGFP φορέα. Για την *in vitro* μεταγραφή του hMGFP γονιδίου έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (NucleoSpin[®] Plasmid Kit, Clontech Laboratories, Inc.) από τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PstI και NotI (New England Biolabs[®] INC) ώστε να απομονωθεί το προς μεταγραφή τμήμα του φορέα, δεδομένου ότι η *in vitro* μεταγραφή γονιδίων από πλασμιδιακούς φορείς μπορεί να καταλήξει σε μεγαλύτερα από το επιθυμητό και ετερογενή μόρια mRNA. Ακολουθούσε καθαρισμός του προϊόντος της πέψης και *in vitro* μεταγραφή του hMGFP γονιδίου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (mMessage mMachine[®] T7 kit, Ambion Inc, Applied Biosystems), με τη διαφορά ότι ο χρόνος της αντίδρασης επεκτάθηκε

στις 2 ώρες αντί για τη 1 ώρα που συνηθίζεται. Ακολουθούσε προσθήκη poly-A ουράς στα νεοπαραχθέντα hMGFP mRNA μόρια, ώστε να αυξηθεί η διάρκεια ζωής τους εντός των ΔΚ, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [Poly(A) Tailing kit, Ambion Inc, Applied Biosystems] και καθαρισμός τους από τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων είτε με τη χρήση φίλτρων (MEGAclear™ kit, Ambion Inc, Applied Biosystems) είτε με κατακρήμνιση με χλωριούχο λίθιο. Τέλος, η συγκέντρωση των mRNAs προσδιοριζόταν με φωτομέτρηση στα 260nm και η ποιότητά τους με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα 1% αγαρόζης, με χρήση πρότυπων RNA δεικτών (RNA Millenium™ Markers-Formamide, Ambion Inc, Applied Biosystems), για τον προσδιορισμό της ακεραιότητας και του μεγέθους των hMGFP μεταγράφων. Τα mRNAs φυλάσσονταν στους -80°C σε κατάλληλο διάλυμα (The RNA Storage Solution, Ambion Inc, Applied Biosystems).



Εικόνα 1: χάρτης του pMGFP πλασμιδιακού φορέα. Διακρίνονται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του hMGFP γονιδίου, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^r), με βάση το οποίο γίνεται η επιλογή των μετασηματισμένων *E.coli* κυττάρων, το σημείο έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδιακού DNA στην *E.coli* (*ori*), ο T7 υποκινητής υπό τον έλεγχο του οποίου γίνεται η *in vitro* μεταγραφή του hMGFP γονιδίου και οι θέσεις περιορισμού των ενδονουκλεασών PstI και NotI, εκατέρωθεν του hMGFP γονιδίου. Τα βέλη στο εσωτερικό των hMGFP και Amp^r γονιδίων υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταγραφής.

Διέγερση των ΔΚ με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων

Για την παραγωγή αποπτωτικών σωματίων, τα αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο μυελωματικά κύτταρα των ασθενών αποψύχονταν, γινόταν μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητάς τους σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04% και ακτινοβολούνταν σε μονάδα Gammacell 1000 για χρονικό διάστημα 10,6 λεπτών (281,8 rad/min, συνολική χορήγηση 3000 rad). Τα ακτινοβολημένα πλασματοκύτταρα τοποθετούνταν στους 37°C σε θρεπτικό υλικό RPMI+10%FBS και συλλέγονταν 6 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Το εύρος της απόπτωσης ελεγχόταν με κυτταρομετρία ροής, με χρήση Annexin V FITC/Propidium Iodide (Apoptosis Detection kit I, BD Pharmingen™) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε κυτταρομετρητή ροής FACSsort της BD Biosciences.

Τα άωρα ΔΚ των ασθενών συλλέγονταν την έκτη ημέρα της καλλιέργειας, γινόταν μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητάς τους σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04% και ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος με κυτταρομετρία ροής. Στη συνέχεια, τα άωρα ΔΚ συγκαλλιεργούνται με αυτόλογα αποπτωτικά σωματίδια των μυελωματικών κυττάρων σε αναλογία ΔΚ:πλασματοκύτταρα 1:1 σε 96-well plates με επίπεδο πυθμένα (Costar), σε συνολικό όγκο 200μl και σε θρεπτικό μέσο RPMI+10%FBS+1%Pen/Strep για 12-18 ώρες, προκειμένου να λάβει χώρα η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών σωματίων από τα άωρα ΔΚ. Τέλος, γινόταν προσθήκη 1600U/ml TNFα στα ΔΚ για 24-48 ώρες ώστε να επέλθει η ωρίμανσή τους. Τα διεγερμένα με αυτόλογα αποπτωτικά σωματίδια μυελωματικών κυττάρων ώριμα ΔΚ είτε χρησιμοποιούνταν άμεσα για την επαγωγή ειδικών T λεμφοκυττάρων είτε κρυοκαταψύχονταν στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Διέγερση των ΔΚ με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων

Για την απομόνωση του ολικού RNA των μυελωματικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα CD138 θετικά πλασματοκύτταρα αμέσως μετά την επιλογή

τους. Η εκχύλιση του RNA έγινε με χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (RNeasy midi kit, Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του RNA γινόταν με φωτομέτρηση στα 260nm και της καθαρότητάς του με φωτομέτρηση στα 260/280nm. Γινόταν επίσης ηλεκτροφόρηση του RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα 1,2% αγαρόζης με χρήση πρότυπων RNA δεικτών (RNA Millenium™ Markers-Formamide, Ambion Inc, Applied Biosystems), για τον προσδιορισμό της ακεραιότητας και της ποσότητάς του. Τα ολικά RNAs φυλάσσονταν στους -80°C σε κατάλληλο διάλυμα (The RNA Storage Solution, Ambion Inc, Applied Biosystems).

Τα άωρα ΔΚ υγιών δοτών και ασθενών συλλέγονταν την έκτη ημέρα της καλλιέργειας, γινόταν μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητάς τους σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04% και ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος με κυτταρομετρία ροής. Η φόρτισή τους με RNA έγινε με την τεχνική της ηλεκτρικής διάτρησης των μεμβρανών (electroporation), με χρήση της συσκευής BTX ECM 830 square wave electroporator (Harvard Apparatus). Για το σκοπό αυτό, τα ΔΚ πλένονταν δύο φορές με RPMI σε θερμοκρασία δωματίου, με φυγοκέντρηση στα 300xg για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, αναδιαλύονταν $0,5-2 \times 10^6$ ΔΚ σε RPMI σε θερμοκρασία δωματίου και γινόταν προσθήκη 5-15μg RNA, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος να μην ξεπερνά τα 350μl. Τα ΔΚ αφήνονταν με το RNA σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά και τοποθετούνταν σε κυψελίδα διαμέτρου 4mm (Harvard Apparatus), με χρήση ειδικής πιπέτας (Harvard Apparatus). Η κυψελίδα μεταφερόταν στον ειδικό θάλαμο της συσκευής electroporation, όπου τα ΔΚ δέχονταν ηλεκτρικό παλμό.

Δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες χορήγησης του ηλεκτρικού παλμού στα ΔΚ υγιών δοτών με χρήση του hMGFP mRNA. Κάθε πείραμα συνοδευόταν και από έναν πληθυσμό mock transfected ΔΚ, δηλαδή κυτάρων που δέχονταν ηλεκτρικό παλμό απουσία mRNA στην κυψελίδα, ώστε να λειτουργήσουν σαν ένα είδος baseline όσον αφορά τον πράσινο φθορισμό και να απεικονιστεί η καθαρή επίδραση του electroporation στη βιωσιμότητα των ΔΚ. Η εκτίμηση του ποσοστού διαμόλυνσης των ΔΚ υγιών δοτών με το hMGFP mRNA γινόταν στον κυτταρομετρητή ροής (FACSort, BD Biosciences), όπως επίσης και ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των ΔΚ μετά το electroporation, με προσθήκη χρωστικής βιωσιμότητας (Propidium Iodide Staining Solution, BD Pharmingen™).

Ο καταλληλότερος συνδυασμός συνθηκών, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των άωρων ΔΚ των ασθενών, ήταν εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 360V (900V/cm) για χρονικό διάστημα 10msec. Αμέσως μετά τη χορήγηση του παλμού, τα ΔΚ μεταφέρονταν απευθείας σε 6-well plate (Costar) που περιείχε 3ml προθερμασμένου θρεπτικού υλικού RPMI+10%FBS+1%Pen/Strep+1600U/ml TNFα και καλλιεργούνταν στους 37°C για 24 ώρες, προκειμένου να ωριμάσουν. Τα διεγερμένα με αυτόλογο RNA μυελωματικών κυττάρων ώριμα ΔΚ χρησιμοποιούνταν άμεσα για την επαγωγή ειδικών Τ λεμφοκυττάρων.

Δοκιμασίες μέτρησης κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η εκτίμηση της ικανότητας των παραγόμενων ΔΚ των ασθενών να επάγουν λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό έγινε με μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες (mixed lymphocyte reactions, MLRs). Για να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των ΔΚ των ασθενών, έγιναν αλλογενείς MLRs, όπου τα άωρα και ώριμα ΔΚ ασθενών με ΠΜ και υγιών δοτών συγκαλλιεργούνταν με αλλογενή ΜΚΠΑ, προκειμένου να συγκριθεί η ικανότητά τους για διέγερση πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων. Για το σκοπό αυτό, τα ΔΚ συγκαλλιεργούνταν με αλλογενή ΜΚΠΑ σε διάφορες αναλογίες σε 96-well plates με επίπεδο πυθμένα (Costar), με $1-2 \times 10^5$ ΜΚΠΑ/well, σε συνολικό όγκο 100-200μl και σε θρεπτικό μέσο RPMI+10%FBS+1%Pen/Strep για χρονικό διάστημα 5-6 ημερών. Μετά το πέρας της καλλιέργειας, ο αριθμός των ζωντανών λεμφοκυττάρων εκτιμήθηκε με χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega Corporation), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παραγωγή έγχρωμου προϊόντος από τις αφυδρογονάσεις των μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Μετά από 4ωρη επώαση, γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 490nm σε φωτόμετρο ειδικό για 96-well plates. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος, όπως προσδιορίζεται από την τιμή της απορρόφησης στα 490nm, είναι άμεσα ανάλογη του αριθμού των ζώντων κυττάρων στην καλλιέργεια και ενδεικτική της ικανότητας των ΔΚ για επαγωγή λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο της ικανότητας των διεγερμένων με αντιγόνα του ΠΜ ΔΚ των ασθενών να επάγουν τον ειδικό

πολλαπλασιασμό αυτόλογων λεμφοκυττάρων. Για το σκοπό αυτό, ώριμα ΔΚ των ασθενών που είχαν φαγοκυτταρώσει αποπτωτικά σωματίδια αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων συγκαλλιεργήθηκαν με αυτόλογα αποψυγμένα ΜΚΠΑ σε διάφορες αναλογίες, στις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν προηγουμένως. Για τον έλεγχο της ειδικότητας της δράσης τους χρησιμοποιήθηκαν και μη διεγερμένα με αντιγόνα ώριμα ΔΚ των ασθενών σε συγκαλλιέργεια με αυτόλογα ΜΚΠΑ. Η εκτίμηση του εύρους του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού έγινε με την ίδια χρωματομετρική μέθοδο μετά από καλλιέργεια 5-6 ημερών.

In vitro διέγερση ειδικών T λεμφοκυττάρων

Για την *in vitro* διέγερση T λεμφοκυττάρων με ειδική δράση έναντι των μυελωματικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα ώριμα ΔΚ των ασθενών φορτισμένα με το ολικό αντιγονικό φορτίο των νεοπλασματικών κυττάρων και με τις δύο εναλλακτικές μεθόδους που περιγράφηκαν. Ως πηγή λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα μη προσκολληθέντα κύτταρα κατά τη θετική επιλογή των μονοκυττάρων για την *in vitro* παραγωγή ΔΚ. Τα μονοκύτταρα που προσκολλώνταν στον πυθμένα του plate καλλιεργούνταν και διαφοροποιούνταν προς άωρα ΔΚ, ενώ τα μη προσκολληθέντα κύτταρα, αποτελούμενα κυρίως από λεμφοκύτταρα, απομακρύνονταν και κρουκαταψύχονταν για μετέπειτα χρήση. Τα ώριμα διεγερμένα ΔΚ των ασθενών συγκαλλιεργούνταν με αυτόλογα αποψυγμένα λεμφοκύτταρα σε αναλογία λεμφοκυττάρων:ΔΚ 5-10:1 σε 12-well plates (Costar) σε συνολικό όγκο 2ml και σε θρεπτικό υλικό RPMI+10%FBS+1%Pen/Strep+50U/ml ανθρώπινη ανασυνδυασμένη IL-2 (BioSourceTM, Invitrogen). Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 2-3 ημέρες. Τα λεμφοκύτταρα επαναδιεγείρονταν εβδομαδιαία με τον ίδιο αριθμό ώριμων ΔΚ, αποψυγμένων στην περίπτωση της φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών σωματίων και φρέσκων στην περίπτωση του electroporation. Έγιναν συνολικά τρεις κύκλοι διέγερσης των λεμφοκυττάρων με αυτόλογα ΔΚ. Τα παραγόμενα λεμφοκύτταρα συλλέγονταν την 17^η-21^η ημέρα της καλλιέργειας, γινόταν έλεγχος του αριθμού και της βιωσιμότητάς τους σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04% και ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος με κυτταρομετρία ροής. Τέλος τα κύτταρα ελέγχονταν

για την ειδική αντιμυελωματική τους δράση με δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και με την τεχνική ELISpot.

Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας

Για την ανίχνευση της ειδικής κυτταροτοξικής δράσης των *in vitro* εκπτυγμένων λεμφοκυττάρων των ασθενών έναντι των αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμη χρωματομετρική μέθοδος (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega Corporation), με την οποία γίνεται ποσοτική μέτρηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), ενός σταθερού κυτταροπλασματικού ενζύμου που απελευθερώνεται κατά τη λύση των κυττάρων, σε αντιστοιχία με την έκλυση ^{51}Cr στις ραδιενεργές δοκιμασίες. Η LDH που έχει εκκριθεί στο κυτταρικό υπερκείμενο μετριέται με μία ενζυμική αντίδραση 30 λεπτών, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή κόκκινου προϊόντος. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος που παράγεται είναι ανάλογη του αριθμού των λυμένων κυττάρων και υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 490nm, σε φωτόμετρο ειδικό για 96-well plates. Η δοκιμασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με μικρές τροποποιήσεις. Τα κύτταρα-στόχοι (αποψυγμένα αυτόλογα μυελωματικά κύτταρα ή αυτόλογα ΔΚ φορτισμένα με το ολικό αντιγονικό φορτίο των πλασματοκυττάρων) τοποθετήθηκαν σε 96-well plates με επίπεδο πυθμένα (Costar), σε συγκέντρωση $0,1-1 \times 10^5$ κύτταρα/well, μαζί με τα δραστικά κύτταρα σε διάφορες αναλογίες, σε συνολικό όγκο 100μl και σε θρεπτικό υλικό RPMI+5%FBS. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 5-7 ώρες, προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής επαφή μεταξύ των δραστικών κυττάρων και των κυττάρων-στόχων. Η ενζυμική αντίδραση και ο προσδιορισμός της απορρόφησης του τελικού προϊόντος στα 490nm έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Εκτός από τα wells που περιείχαν δραστικά κύτταρα και κύτταρα-στόχους (experimental wells), χρησιμοποιήθηκαν και τα εξής controls: wells που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό (culture medium background), wells που περιέχουν μόνο δραστικά κύτταρα (effector cell spontaneous LDH release), wells που περιέχουν μόνο κύτταρα-στόχους (target cell spontaneous LDH release), wells που

περιέχουν κύτταρα-στόχους που λύνονται με διάλυμα λύσης, ώστε να προσδιοριστεί η τιμή της μέγιστης (100%) έκκρισης LDH (target cell maximum LDH release) και wells που περιέχουν θρεπτικό υλικό και διάλυμα λύσης (volume correction control). Το ποσοστό της κυτταροτοξικότητας των δραστικών κυττάρων για κάθε αναλογία δραστικών κυττάρων: κυττάρων στόχων υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{κυτταροτοξικότητα} = \frac{\text{Experimental-Effector spontaneous-Target spontaneous}}{\text{Target maximum-Target spontaneous}} \times 100$$

Σημειώνεται ότι οι τιμές που χρησιμοποιούνται στον τύπο έχουν διορθωθεί ως προς το volume correction control για το target maximum και ως προς το culture medium background για τα υπόλοιπα. Εκτός από τα κύτταρα-στόχους που προαναφέρθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν και αλλογενή μυελωματικά κύτταρα, αυτόλογα ΔΚ μη διεγερμένα με αντιγόνα του ΠΜ και αυτόλογα ΜΚΠΑ σαν στόχοι, προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα της κυτταροτοξικής δράσης των εκπτυγμένων λεμφοκυττάρων των ασθενών έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων. Τέλος, σε κάποια πειράματα έγινε προηγουμένως επώαση των λεμφοκυττάρων με τα αντισώματα anti-human CD4 και monoclonal anti-human CD8α(κλώνος 37006), και τα δύο από R&D Systems, ώστε να ανασταλούν οι αντίστοιχοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί και να επιβεβαιωθεί εάν η μετρούμενη κυτταροτοξική δραστηριότητα οφείλεται όντως σε CD8 CTLs και όχι σε CD4⁺ βοηθητικά ή NK κύτταρα.

Δοκιμασία ELISpot

Για την εκτίμηση της παρουσίας Th1 και Tc1 κυττάρων με αντινεοπλασματική δράση εντός των *in vitro* εκπτυγμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των ασθενών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ELISpot [Human Interferon-γ Enzyme-Linked Immunospot (ELISpot) assay, R&D Systems], η οποία έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση των κυττάρων που εκκρίνουν IFN-γ στο επίπεδο του ενός κυττάρου και τον ποσοτικό προσδιορισμό της συχνότητας των κυττάρων-παραγωγών IFN-γ. Η τεχνική ELISpot είναι ιδανική για την απεικόνιση των ανοσιακών απαντήσεων έναντι διαφόρων ερεθισμάτων και θεραπειών και έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση αντιγονοειδικών CD4 και CD8 αποκρίσεων. Για τους σκοπούς

του πειράματος, τα δραστικά κύτταρα επώαστηκαν μαζί με τα κύτταρα-στόχους στα 96-well plates που παρέχονται από το kit στους 37°C για 12-18 ώρες, με $0,1-2 \times 10^5$ δραστικά κύτταρα/well. Σαν κύτταρα-στόχοι, τα οποία θα διεγείρουν τα δραστικά κύτταρα για παραγωγή IFN- γ , χρησιμοποιήθηκαν αποψυγμένα αυτόλογα μυελωματικά κύτταρα ή αυτόλογα ΔΚ φορτισμένα με το ολικό αντιγονικό φορτίο των πλασματοκυττάρων. Η όλη δοκιμασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τελικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση μπλε-μαύρων κηλίδων στα σημεία παραγωγής της κυτταροκίνης, με τέτοιο τρόπο ώστε η κάθε κηλίδα να αντιπροσωπεύει ένα κύτταρο που παράγει IFN- γ . Η μέτρηση των κηλίδων έγινε με χρήση στερεοσκοπίου. Σαν controls χρησιμοποιήθηκαν wells που περιείχαν δραστικά κύτταρα μη διεγερμένα από κύτταρα-στόχους και wells που περιείχαν μόνο κύτταρα-στόχους. Για τον έλεγχο της αντινεοπλασματικής ειδικότητας της έκκρισης IFN- γ από τα δραστικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από τα προαναφερθέντα, και αυτόλογα ΔΚ μη φορτισμένα με αντιγόνα του ΠΜ σαν κύτταρα-στόχοι. Τέλος, σε κάποια πειράματα έγινε προηγουμένως επώαση των λεμφοκυττάρων με τα αντισώματα anti-human CD4 και monoclonal anti-human CD8 α (κλώνος 37006), και τα δύο από R&D Systems, ώστε να ανασταλούν οι αντίστοιχοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί και να εκτιμηθεί η συνεισφορά των CD4 T_Hs και CD8 CTLs στη συνολική έκκριση IFN- γ .

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS Statistics 17.0. Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών που παρατηρήθηκαν σε πειράματα που αφορούσαν τους ίδιους ασθενείς χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Wilcoxon, ενώ για τις συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ασθενών, ή μεταξύ ασθενών και υγιών δοτών, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney (U test). Ως στάθμη εμπιστοσύνης ορίστηκε το 95% ($p=0,05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

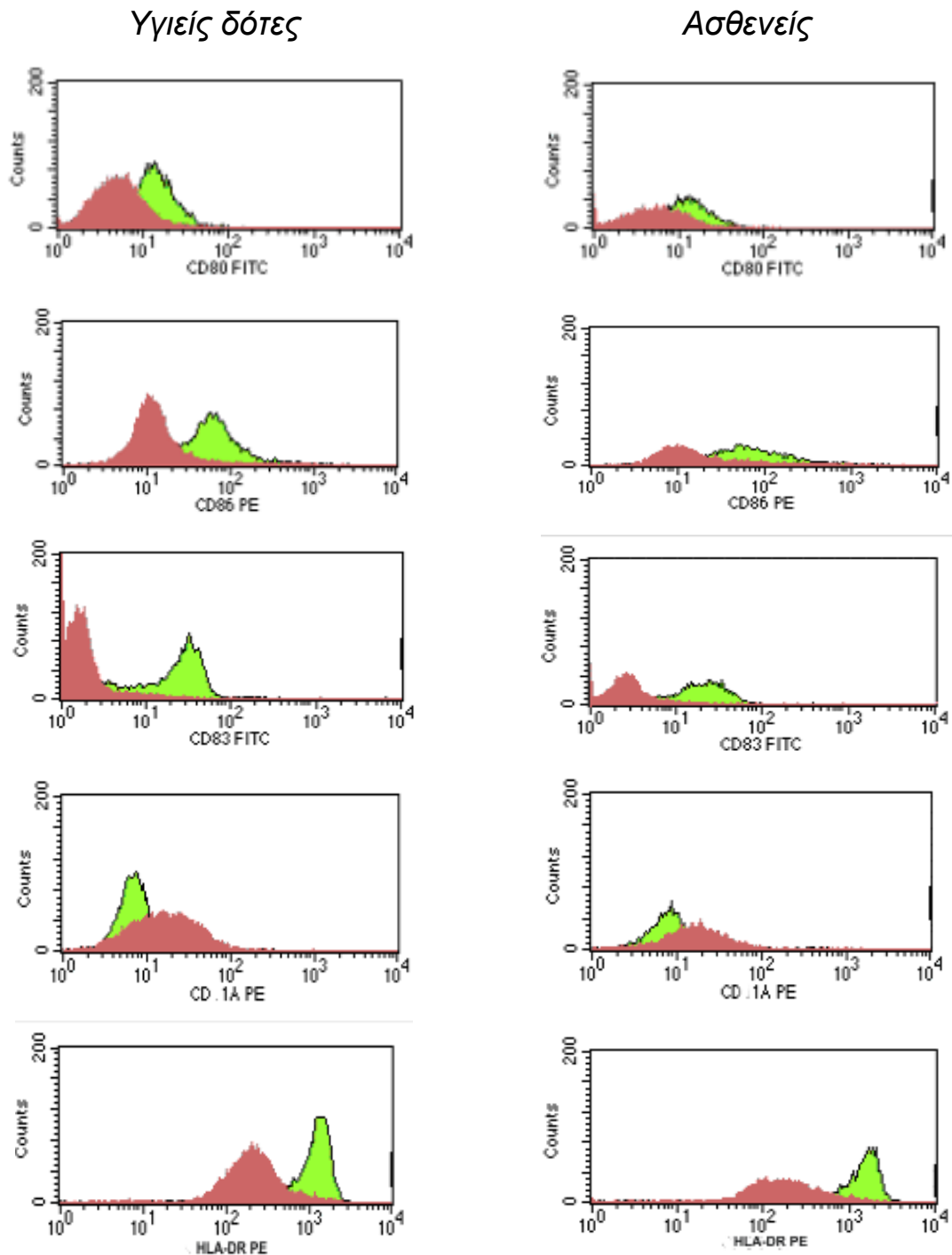
Καλλιέργεια ΔΚ από υγιείς δότες και ασθενείς με ΠΜ

Η *in vitro* παραγωγή ΔΚ από υγιείς δότες και ασθενείς γινόταν, όπως περιγράφεται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι, με λήψη 50-100ml περιφερικού αίματος, απομόνωση των ΜΚΠΑ και θετική επιλογή των μονοκυττάρων, τα οποία καλλιεργούνταν παρουσία GM-CSF και IL-4 και διαφοροποιούνταν προς άωρα ΔΚ. Μετά από καλλιέργεια 6 ημερών σε 6-well plates στους 37°C, τα άωρα ΔΚ συλλέγονταν και γινόταν μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητάς τους σε πλάκα Neubauer με χρώση Trypan blue 0,04%. Τόσο για τους υγιείς δότες όσο και για τους ασθενείς, ο αριθμός των άωρων ΔΚ ανα 10^7 καλλιεργούμενα ΜΚΠΑ (ή ανα well) κυμαινόταν από $0,6 \times 10^6$ έως $1,2 \times 10^6$, με βιωσιμότητες 85-97%, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών δοτών και ασθενών, σύμφωνα με τη δοκιμασία Mann-Whitney ($p=0,105$). Ο ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος των άωρων ΔΚ γινόταν με κυτταρομετρία ροής, με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων επιφανείας CD45, CD14, CD83, CD86, CD80, HLA-DR, CD123, CD1a και CD11c. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, τα *in vitro* παραχθέντα άωρα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ παρουσιάζουν φυσιολογική έκφραση δεικτών επιφανείας, ανάλογη με εκείνη των άωρων ΔΚ υγιών δοτών, με μόνη εξαίρεση το CD83, του οποίου η ποσοστιαία έκφραση βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες.

Την έκτη ημέρα της καλλιέργειας γινόταν προσθήκη TNFα και ωρίμανση των άωρων ΔΚ για 24-48 ώρες. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, τα άωρα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ είναι ικανά για φυσιολογική *in vitro* ωρίμανση, ανάλογη με εκείνη των άωρων ΔΚ υγιών δοτών, χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση κανενός από τους δείκτες επιφανείας που μελετήθηκαν. Η ελλιπής έκφραση του CD83 από τα άωρα ΔΚ των ασθενών αποκαθίσταται μετά από την *in vitro* ωρίμανσή τους και φτάνει σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα των υγιών δοτών. Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται σχηματικά η ωρίμανση των ΔΚ υγιών δοτών και ασθενών όσον αφορά τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86, το

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

χαρακτηριστικό δείκτη ωρίμανσης των ΔΚ CD83, τον τυπικό για τα άωρα ΔΚ δείκτη CD1a και το HLA-DR, που εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά από τα ΑΠΚ.



Εικόνα 1: κυτταρομετρία ροής σε ΔΚ υγιών δωτών και ασθενών με ΠΜ. Στα ιστογράμματα απεικονίζεται η έκφραση των αντίστοιχων αντιγόνων επιφανείας από τα άωρα ΔΚ (με ροζ χρώμα) και από τα ώριμα ΔΚ (με πράσινο χρώμα). Κατά την ωρίμανση αυξάνεται το

ποσοστό των ΔΚ που εκφράζουν τα συνδιεγερτικά μόρια CD80/CD86, τον χαρακτηριστικό δείκτη CD83 και το HLA-DR και μειώνεται το ποσοστό των ΔΚ που εκφράζουν το μόριο CD1a. Τα ιστογράμματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από καλλιέργειες 15 υγιών δοτών και 20 ασθενών.

μέση τιμή % ±SD	ΑΩΡΑ ΔΚ			ΩΡΙΜΑ ΔΚ		
	ΥΓΙΕΙΣ ΔΟΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	P	ΥΓΙΕΙΣ ΔΟΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	P
CD11c	97,2 ± 1,92	98,06 ± 1,17	0,47	98,82 ± 0,72	98,6 ± 1,03	0,79
HLA-DR	96,96 ± 1,5	98,39 ± 1,19	0,063	98,79 ± 1,22	99,1 ± 0,85	0,79
CD14	24,2 ± 10,25	21,78 ± 10,98	0,732	6,86 ± 5,17	4,36 ± 2,58	0,425
CD1a	54,91 ± 8,29	50,82 ± 7,04	0,16	13,9 ± 6,13	17,9 ± 5,23	0,102
CD80	63,51 ± 11,29	68,87 ± 8,51	0,221	86,09 ± 6,16	85,19 ± 9,06	0,849
CD83	25,9 ± 5,58	17,46 ± 10,41	0,003	70,86 ± 9,9	75,04 ± 7,83	0,305
CD86	63,3 ± 12,1	61,09 ± 8,18	0,425	89,18 ± 5,74	87,73 ± 6,59	0,569

Πίνακας 1: έκφραση δεικτών επιφανείας *in vitro* παραχθέντων άωρων και ώριμων ΔΚ υγιών δοτών και ασθενών με ΠΜ. Το ποσοστό των ΔΚ που εκφράζουν τον κάθε δείκτη αποτελεί το μέσο όρο που εξάγεται από καλλιέργειες 15 υγιών δοτών και 20 ασθενών. Η ωρίμανση των ΔΚ εκδηλώνεται με την ελάττωση της έκφρασης των CD14 και CD1a και την αύξηση της έκφρασης των CD80/CD86, CD83 και HLA-DR. Με P σημειώνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατά Mann-Whitney.

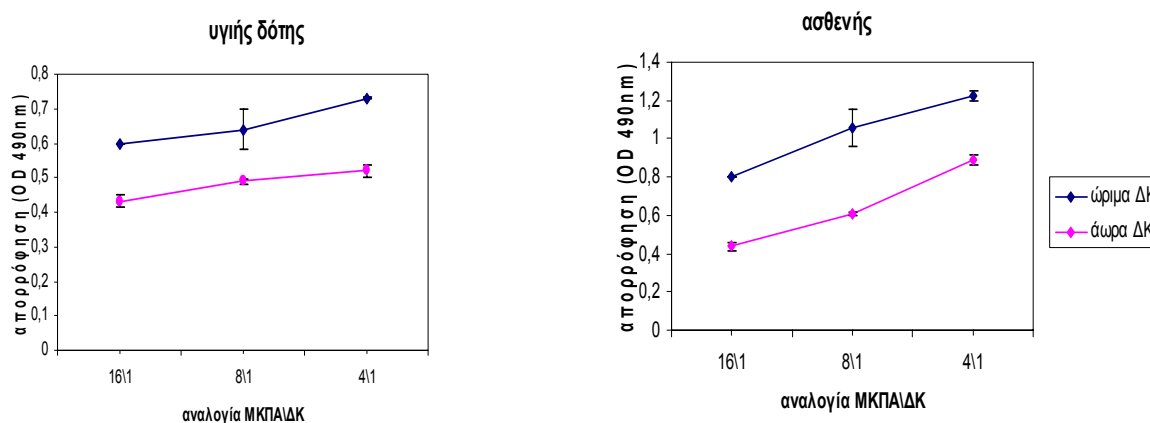
Έλεγχος λειτουργικότητας των ΔΚ ασθενών με ΠΜ

Για τον έλεγχο της λειτουργικότητάς τους, τα *in vitro* παραχθέντα άωρα και ώριμα ΔΚ των ασθενών δοκιμάζονταν σε μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες (ΜΛΚ), προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανότητά τους να προκαλούν τον πολλαπλασιασμό αλλογενών λεμφοκυττάρων. Το εύρος του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού προσδιοριζόταν με χρωματομετρική μέθοδο, η οποία βασίζεται στην παραγωγή έγχρωμου προϊόντος από τις αφυδρογονάσεις των ζωντανών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2 (I), τα *in vitro* παραχθέντα ώριμα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ,

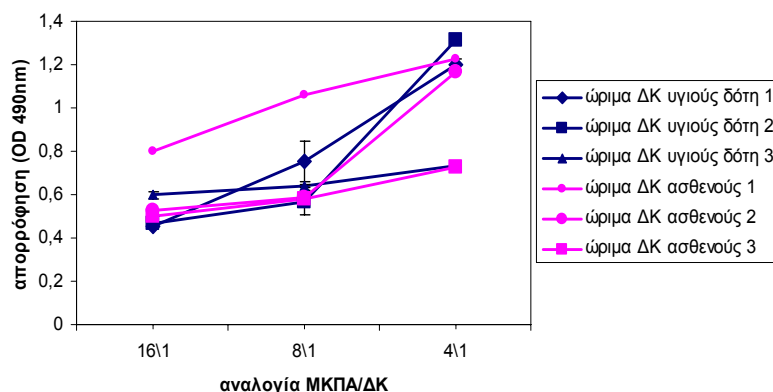
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

όπως και εκείνα των υγιών δοτών, προκαλούν σημαντικότερο πολλαπλασιασμό αλλογενών λεμφοκυττάρων σε σχέση με τα άωρα ΔΚ. Επιπλέον, το εύρος του επαγόμενου από τα ώριμα ΔΚ λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι συγκρίσιμο μεταξύ υγιών δοτών και ασθενών, σύμφωνα με τη δοκιμασία Mann-Whitney [εικόνα 2 (II), πίνακας 2]. Από όλα τα προηγούμενα εξάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα ότι η *in vitro* διαφοροποίηση και ωρίμανση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ παράγει ΔΚ με φυσιολογικό φαινότυπο επιφανείας και λειτουργικότητα.

(I)



(II)



Εικόνα 2: ΜΛΚ ΔΚ ασθενών με ΠΜ και υγιών δοτών με αλλογενή ΜΚΠΑ. Στον άξονα Χ των γραφημάτων αναφέρεται η αναλογία ΜΚΠΑ:ΔΚ στην οποία έγινε η συγκαλλιέργεια, ενώ στον άξονα Ψ αναφέρεται η τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 490nm, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια, και συνεπώς ενδεικτική του εύρους του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η κάθε τιμή απορρόφησης στα γραφήματα αποτελεί το μέσο όρο που εξάγεται από τρεις επαναλήψεις (τρία wells). Τα γραφήματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από τρία ανεξάρτητα πειράματα για τους υγιείς δότες και πέντε ανεξάρτητα πειράματα για τους ασθενείς με ΠΜ.

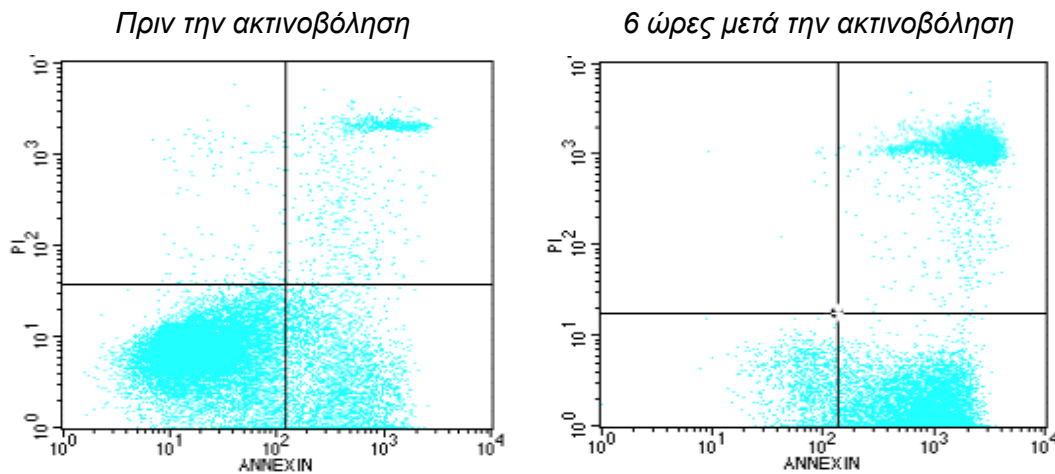
	OD 490nm, μέση τιμή ±SD		
Αναλογία ΜΚΠΑ:ΔΚ	Υγιείς δότες	Ασθενείς	P
16:1	0,507±0,064	0,606±0,135	0,275
8:1	0,652±0,076	0,741±0,223	0,827
4:1	1,080±0,251	1,038±0,222	0,514

Πίνακας 2: διέγερση λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού από τα ώριμα ΔΚ υγιών δοτών και ασθενών με ΠΜ, όπως εκφράζεται από την τιμή της απορρόφησης στα 490nm. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας σε κάθε αναλογία ΜΚΠΑ:ΔΚ αποτελούν το μέσο όρο που εξάγεται από 3 ΜΛΚ για τους υγιείς δότες και 5 ΜΛΚ για τους ασθενείς. Με P σημειώνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατά Mann-Whitney.

Διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων

Για τη φόρτιση των *in vitro* παραχθέντων ΔΚ των ασθενών με το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών τους κυττάρων, τα CD138⁺ κύτταρα αποψύχονταν και ακτινοβολούνταν με σκοπό την επαγωγή απόπτωσης. Τα παραγόμενα αποπτωτικά σωματίδια ελέγχονταν με κυτταρομετρία ροής, με χρήση Annexin V FITC/Propidium Iodide (εικόνα 3). Τα άωρα ΔΚ συγκαλλιεργούνταν με αυτόλογα αποπτωτικά σωματίδια προκειμένου να λάβει χώρα η φαγοκυττάρωση των τελευταίων από τα ΔΚ. Τέλος, γινόταν προσθήκη TNFα στα ΔΚ για 24-48 ώρες, ώστε να επέλθει η ωρίμανσή τους. Τα διεγερμένα με αυτόλογα αποπτωτικά

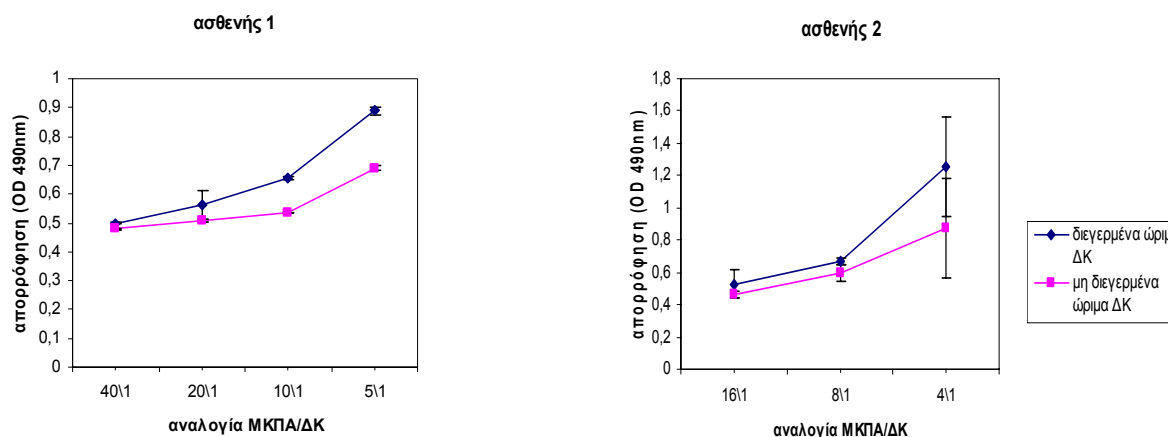
σωμάτια ώριμα ΔΚ των ασθενών χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια για την επαγωγή ειδικών Τ λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 3: κυτταρομετρία ροής σε CD138⁺ μυελωματικά κύτταρα με χρήση annexin/propidium iodide (PI) για τον προσδιορισμό της απόπτωσης. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης παρατηρείται αναστροφή των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα η φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία βρίσκεται φυσιολογικά στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, να μετακινείται στην κυτταρική επιφάνεια. Στο λιπίδιο αυτό προσδένεται η annexin V, η οποία ανιχνεύει κατ'αυτόν τον τρόπο τα αποπτωτικά κύτταρα. Το PI προσδένεται στο DNA των νεκρών κυττάρων, τα οποία έχουν υποστεί διάρρηξη της κυτταρικής τους μεμβράνης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα θετικά για annexin V κύτταρα, που εντοπίζονται στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο των ιστογραμμάτων, βρίσκονται σε απόπτωση, ενώ τα διπλά θετικά για annexin V και PI κύτταρα, που εντοπίζονται στο άνω δεξιά τεταρτημόριο, έχουν προχωρήσει προς νέκρωση. Όπως φαίνεται στα ιστογράμματα, η ακτινοβόληση των μυελωματικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση απόπτωσης, η οποία οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού τόσο των αποπτωτικών (κάτω δεξιά τεταρτημόριο) όσο και των νεκρωτικών (άνω δεξιά τεταρτημόριο) κυττάρων.

Πρόκληση ειδικού πολλαπλασιασμού αυτόλογων λεμφοκυττάρων από τα διεγερμένα με αποπτωτικά σωματίδια ώριμα ΔΚ των ασθενών

Τα διεγερμένα με φαγοκυττάρωση αυτόλογων αποπτωτικών σωματίων ώριμα ΔΚ των ασθενών δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να προκαλούν *in vitro* ειδικό πολλαπλασιασμό αυτόλογων λεμφοκυττάρων σε ΜΛΚ με αυτόλογα ΜΚΠΑ. Το εύρος του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού προσδιοριζόταν με χρωματομετρική μέθοδο, η οποία βασίζεται στην παραγωγή έγχρωμου προϊόντος από τις αφυδρογονάσεις των ζωντανών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, τα διεγερμένα με αποπτωτικά σωματίδια ώριμα ΔΚ των ασθενών τείνουν να επάγουν σημαντικότερο πολλαπλασιασμό αυτόλογων λεμφοκυττάρων σε σχέση με τα ώριμα μη διεγερμένα ΔΚ. Τα δεδομένα αυτά δίνουν μια πρώτη ένδειξη για την ικανότητα των *in vitro* διεγερμένων ΔΚ των ασθενών για πρόκληση ειδικού πολλαπλασιασμού αυτόλογων λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 4: πρόκληση ειδικού πολλαπλασιασμού αυτόλογων λεμφοκυττάρων από ώριμα ΔΚ ασθενών διεγερμένα με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων. Ο άξονας X των γραφημάτων παρουσιάζει τις αναλογίες στις οποίες συγκαλλιεργήθηκαν τα αυτόλογα ΜΚΠΑ με τα διεγερμένα ή μη ώριμα ΔΚ, ενώ ο

άξονας Ψ παρουσιάζει την τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 490nm, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια και συνεπώς ενδεικτική του εύρους του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η κάθε τιμή απορρόφησης στα γραφήματα αποτελεί το μέσο όρο που εξάγεται από τρεις επαναλήψεις (τρία wells). Τα γραφήματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από 7 ανεξάρτητα πειράματα.

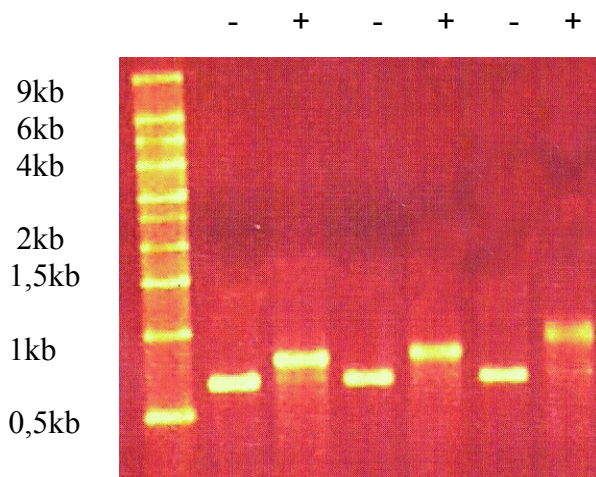
Βελτιστοποίηση των συνθηκών του electroporation

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της ηλεκτρικής διάτρησης (electroporation) των μεμβρανών των ΔΚ, έγιναν δοκιμές σε άωρα ΔΚ υγίων δοτών με χρήση *in vitro* παραχθέντων GFP μεταγράφων, των οποίων η έκφραση από τα διαμολυσμένα κύτταρα μπορεί να ανιχνευθεί με κυτταρομετρία ροής. Η ποιότητα των mRNAs προσδιοριζόταν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να ελεγχθεί το μέγεθος και η ακεραιότητα των GFP μεταγράφων (εικόνα 5).

Είναι γνωστό ότι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που απαιτείται για τη δημιουργία πόρων στην πλασματική μεμβράνη είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κυττάρων. Τα κύτταρα φυτών και θηλαστικών απαιτούν συνήθως χαμηλής έντασης πεδίο, της τάξης των 0,25-3kV/cm. Δεδομένου ότι τα ΔΚ είναι σχετικά μεγάλου μεγέθους κύτταρα, η διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών για το electroporation προσανατολίστηκε, σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, σε χαμηλής έντασης ηλεκτρικά πεδία ξεκινώντας από τα 2kV/cm με παλμό διάρκειας 200μsec μέχρι τα 1,25kV/cm με παλμό διάρκειας 1msec. Όμως σε αυτές τις συνθήκες σημειώθηκε μηδενική έκφραση της GFP πρωτεΐνης, αν και τα ΔΚ διατήρησαν άριστη βιωσιμότητα μετά τη χορήγηση του ηλεκτρικού παλμού. Έτσι η διερεύνηση συνεχίστηκε σε χαμηλότερης έντασης ηλεκτρικά πεδία και μεγαλύτερης διάρκειας παλμούς, με τα καλύτερα αποτελέσματα να σημειώνονται σε συνθήκες: (i). 0,9kV/cm (360V σε κυψελίδα διαμέτρου 4mm) και παλμό διάρκειας 10msec και (ii). 0,75kV/cm (300V σε κυψελίδα διαμέτρου 4mm) και παλμό διάρκειας 15msec. Η χορήγηση ηλεκτρικού παλμού στις συνθήκες αυτές απουσία mRNA δεν φάνηκε ιδιαίτερα βλαπτική για τα ΔΚ, των οποίων η βιωσιμότητα διατηρούνταν στο 70% μία εβδομάδα μετά το electroporation. Παρουσία mRNA, το ποσοστό διαμόλυνσης των ΔΚ άγγιζε το 80% στις 48 ώρες μετά το electroporation, ενώ η έκφραση της

GFP πρωτεΐνης διατηρούνταν σε υψηλά επίπεδα για μία εβδομάδα τουλάχιστον. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (I) και (II), και στις δύο περιπτώσεις τα ποσοστά διαμόλυνσης των ΔΚ είναι συγκρίσιμα, όμως τα 360V υπερέχουν των 300V αφενός ως προς τη μέση ένταση φθορισμού των διαμολυσμένων ΔΚ, δηλαδή την ποσότητα του GFP mRNA που έχει μεταφραστεί ανα κύτταρο, και αφετέρου ως προς τη βιωσιμότητα των διαμολυσμένων ΔΚ. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η χορήγηση ηλεκτρικού παλμού 360V διάρκειας 10msec για τη διεξαγωγή των πειραμάτων στους ασθενείς με ΠΜ. Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση της κατάλληλης συγκέντρωσης mRNA για τις επιλεγμένες συνθήκες electroporation. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (III) και (IV), οι μεγαλύτερες ποσότητες mRNA καταλήγουν σε μικρότερα ποσοστά διαμόλυνσης, προφανώς εξαιτίας της δυσμενούς επίδρασης που έχουν στη βιωσιμότητα των ΔΚ. Για το λόγο αυτό, τα πειράματα στους ασθενείς έγιναν με ποσότητες ολικού RNA που δεν ξεπερνούσαν τα 20μg.

Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται σχηματικά η έκφραση GFP από τα διαμολυσμένα ΔΚ.

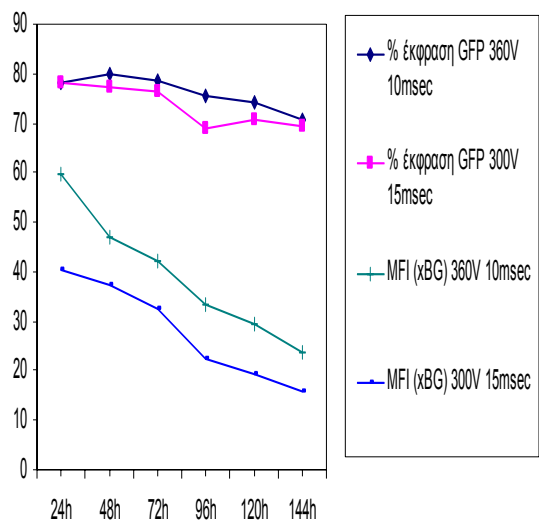


Εικόνα 5: ηλεκτροφόρηση των *in vitro* παραχθέντων GFP μεταγράφων σε αποδιατακτικό πήκτωμα 1% αγαρόζης, μαζί με πρότυπο RNA δείκτη. Διακρίνονται τρεις αντιδράσεις *in vitro* μεταγραφής του GFP mRNA, με (-) σημειώνονται τα μετάγραφα πριν την προσθήκη poly-A ουράς, με (+) τα μετάγραφα μετά την αντίδραση poly-A tailing. Το μήκος των (-)

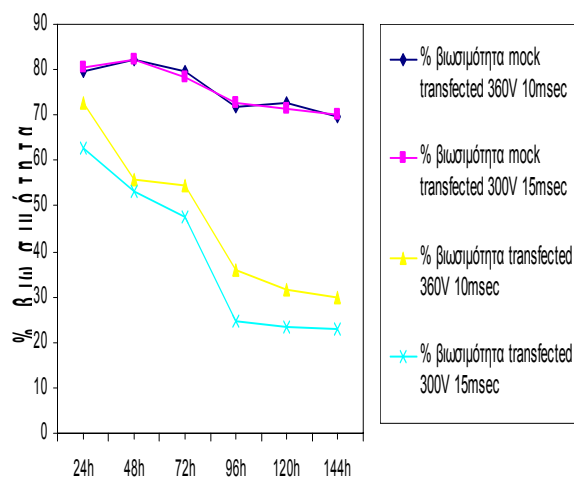
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

GFP μεταγράφων είναι ~0,7kb, ενώ είναι εμφανής η αλλαγή του μεγέθους μετά την προσθήκη της poly-A ουράς.

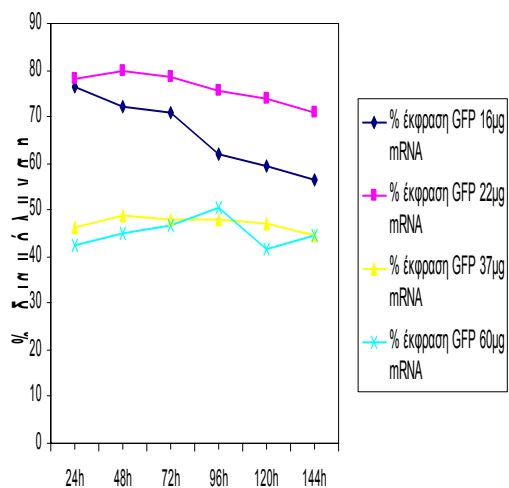
(I)



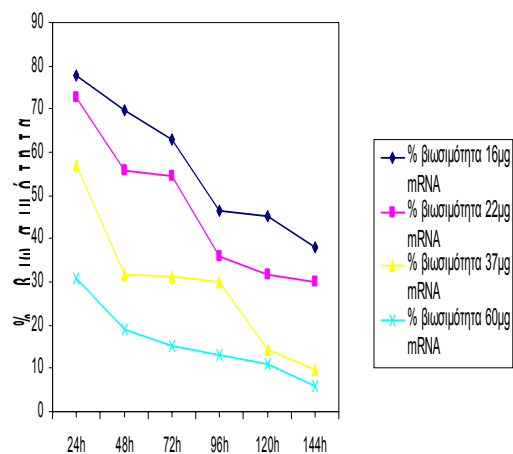
(II)



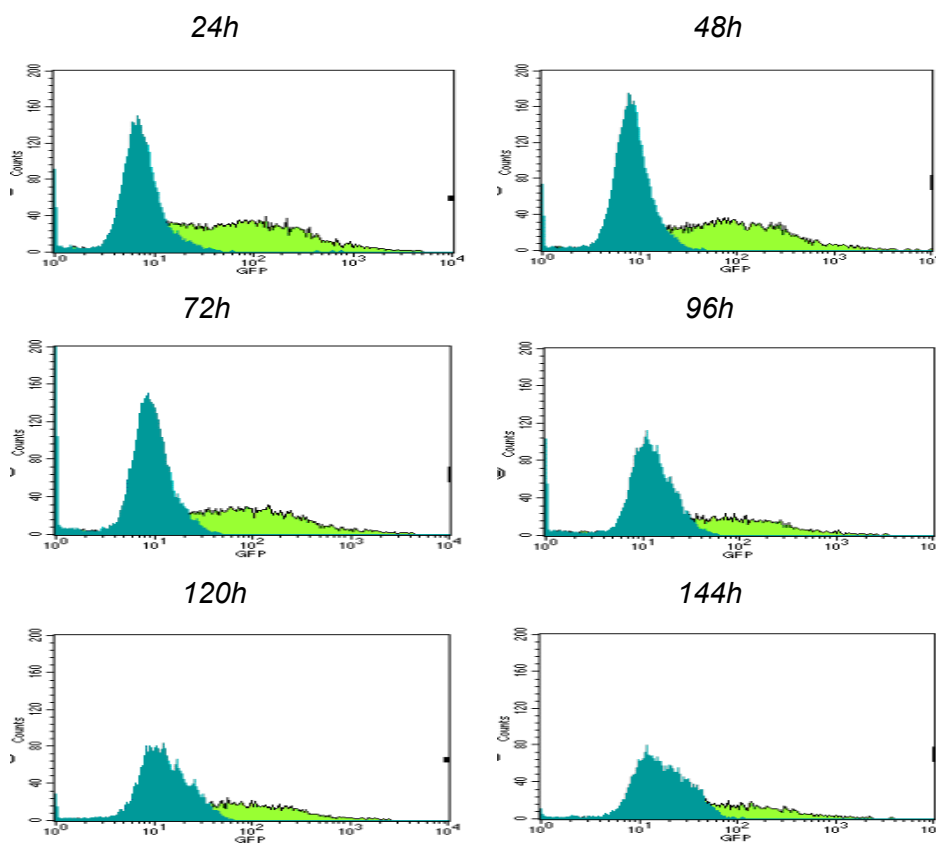
(III)



(IV)



Εικόνα 6: στα γραφήματα (I) και (II) γίνεται σύγκριση δύο διαφορετικών συνδυασμών συνθηκών electroporation σε άωρα ΔΚ υγίων δοτών με 22μg GFP mRNA. Στο γράφημα (I) απεικονίζεται το ποσοστό διαμόλυνσης των ΔΚ και η μέση ένταση φθορισμού [mean fluorescence intensity (MFIxBG) ως πολλαπλάσιο του MFI των μη διαμολυσμένων ΔΚ (background-BG)]. Στο γράφημα (II) απεικονίζεται η βιωσιμότητα των mock transfected ΔΚ, που δέχτηκαν ηλεκτρικό παλμό απουσία mRNA, και των transfected ΔΚ, που διαμολύνθηκαν με το GFP mRNA. Στον άξονα X αναφέρονται οι χρονικές στιγμές μετά το electroporation στις οποίες έγιναν οι μετρήσεις, από 24 ώρες μέχρι 144 ώρες (περίπου μία εβδομάδα). Στα γραφήματα (III) και (IV) γίνεται σύγκριση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων GFP mRNA σε συνθήκες 360V 10msec ως προς το ποσοστό διαμόλυνσης των ΔΚ (III) και τη βιωσιμότητα των transfected ΔΚ (IV). Οι μετρήσεις του ποσοστού έκφρασης GFP και της βιωσιμότητας των ΔΚ έγιναν με κυτταρομετρία ροής. Για την εκτίμηση της βιωσιμότητας χρησιμοποιήθηκε η χρωστική propidium iodide.

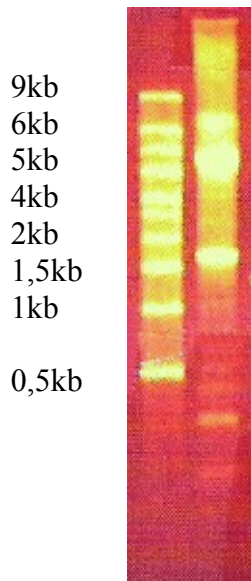


Εικόνα 7: κυτταρομετρία ροής σε άωρα ΔΚ υγίων δοτών που δέχτηκαν ηλεκτρικό παλμό απουσία mRNA (γαλάζιο χρώμα) ή διαμολύνθηκαν με GFP mRNA (πράσινο χρώμα). Στα

ιστογράμματα απεικονίζεται η έκφραση της GFP πρωτεΐνης από τα διαμολυσμένα ΔΚ σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα ΔΚ. Το electroporation έγινε με χρήση ηλεκτρικού πεδίου έντασης 0,9kV/cm και παλμό διάρκειας 10msec, με 16μg mRNA. Μετά το electroporation, τα ΔΚ διατηρούνταν σε θρεπτικό υλικό στους 37°C. Οι μετρήσεις έγιναν στις αναφερόμενες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση του ηλεκτρικού παλμού.

Διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων

Για τη φόρτιση των άωρων ΔΚ ασθενών με ΠΜ με το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών τους κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και μια εναλλακτική μέθοδος: διαμόλυνση με το ολικό RNA αυτόλογων πλασματοκυττάρων με την τεχνική του electroporation. Για το σκοπό αυτό, γινόταν εκχύλιση ολικού RNA από τα CD138⁺ κύτταρα όπως περιγράφεται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι. Για την απομόνωση ολικού RNA επιλέχθηκαν δείγματα που περιείχαν συνολικό αριθμό CD138⁺ κυττάρων μεγαλύτερο από 7×10^6 , ώστε να υπάρχει περιθώριο κρουκατάψυξης μέρους αυτών για τις μετέπειτα δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και ELISpot. Για τον έλεγχο της ακεραιότητας των RNAs γινόταν ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 8). Η διαμόλυνση των άωρων ΔΚ των ασθενών με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων γινόταν την ημέρα 6 της καλλιέργειας. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν ηλεκτρικό πεδίο έντασης 0,9kV/cm (360V σε κυψελίδα διαμέτρου 4mm) με παλμό διάρκειας 10msec και 5-20μg RNA. Μετά τη χορήγηση του ηλεκτρικού παλμού, τα ΔΚ επωάζονταν για 24 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό που περιείχε TNFα προκειμένου να ωριμάσουν. Τα διεγερμένα με RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων ώριμα ΔΚ των ασθενών χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια για την επαγωγή ειδικών T λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 8: ηλεκτροφόρηση ολικού RNA μυελωματικών κυττάρων ενός ασθενούς με ΠΜ σε αποδιατακτικό πήκτωμα 1,2% αγαρόζης, μαζί με πρότυπο RNA δείκτη. Διακρίνονται το 28s rRNA, μεγέθους ~5kb, και το 18s rRNA, μεγέθους ~1,7kb. Σημειώνεται ότι η διαδικασία εκχύλισης ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε παρέχει έναν εμπλουτισμό για τα mRNAs, δεδομένου ότι αποκλείει τα <0,2kb μόρια, όπως τα μικρά rRNAs και τα tRNAs, που αποτελούν το 15-20% του ολικού RNA.

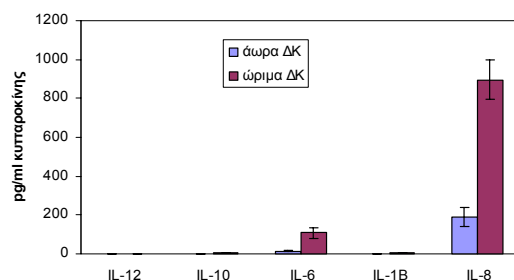
Παραγωγή κυτταροκινών από τα ώριμα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ

Η ανάλυση των κυτταροκινών που παράγουν τα ΔΚ υγιών δότην και ασθενών έγινε με χρήση τεχνικών κυτταρομετρίας ροής. Για τον κάθε υγιή δότη, οι μετρήσεις έγιναν σε υπερκείμενο θρεπτικό υλικό από την ημέρα 6 της καλλιέργειας για τα άωρα ΔΚ και 24-48 ώρες μετά την προσθήκη TNFα για τα ώριμα ΔΚ. Για τον κάθε ασθενή, οι μετρήσεις έγιναν σε υπερκείμενο θρεπτικό υλικό από ΔΚ που είχαν ωριμάσει με προσθήκη TNFα και από ΔΚ που είχαν πρώτα διεγερθεί με το ολικό αντιγονικό φορτίο αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων και κατόπιν ωρίμασαν με προσθήκη TNFα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9 (I), η ωρίμανση των ΔΚ στους υγιείς δότες έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική ενίσχυση της έκκρισης IL-6 και IL-8, σύμφωνα με τη δοκιμασία Wilcoxon ($p=0,048$ και $p=0,039$ αντιστοίχως). Οι υπόλοιπες κυτταροκίνες (IL-12, IL-10, IL-1β) δεν ανιχνεύονται σε σημαντικά επίπεδα. Δεδομένων των αποτελεσμάτων αυτών, οι μετρήσεις στους ασθενείς επικεντρώθηκαν στα ώριμα ΔΚ, προκειμένου να διερευνηθεί το αν η φόρτισή τους με αποπτωτικά σωμάτια ή ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων έχει κάποια επίδραση στο εύρος των κυτταροκινών που εκκρίνουν. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 9 (II) και (III), το ρεπερτόριο των κυτταροκινών που παράγουν τα ώριμα ΔΚ των ασθενών, είτε κατόπιν αντιγονικής διέγερσης είτε όχι, δεν διαφέρει

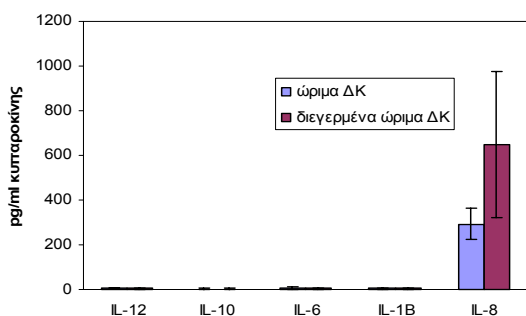
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

από εκείνο των ώριμων ΔΚ υγιών δοτών. Είναι αξιοσημείωτο το ότι η αντιγονική διέγερση τείνει να αυξήσει περαιτέρω την έκκριση IL-8 από τα ώριμα ΔΚ, χωρίς όμως οι παρατηρούμενες διαφορές να φτάνουν σε στατιστικά σημαντικά -κατα Wilcoxon- επίπεδα ($p=0,109$ για τη φόρτιση με ολικό RNA, $p=1,000$ για τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια). Επιπλέον, είναι χαρακτηριστικά τα πολύ χαμηλά επίπεδα IL-10 που παράγονται από τα διεγερμένα ή μη ώριμα ΔΚ των ασθενών, σε αντιστοιχία με τα ώριμα ΔΚ υγιών δοτών. Τέλος, όσον αφορά στη φόρτιση με ολικό RNA, τα πολύ χαμηλά επίπεδα IL-6 οφείλονται πιθανότατα σε τεχνικούς παράγοντες, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις αυτές αφορούν μικρότερο αριθμό ΔΚ (λόγω μειωμένης βιωσιμότητας) και μεγαλύτερο όγκο θρεπτικού υλικού συγκριτικά με τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια.

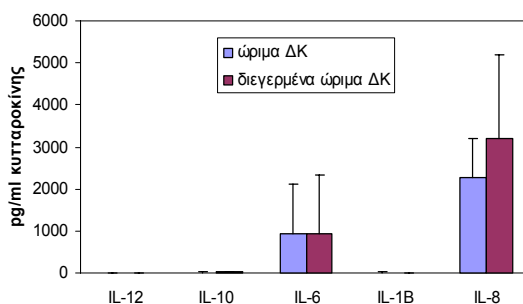
(I) Υγιείς δότες



(II) Ασθενείς ολικό RNA



(III) Ασθενείς αποπτωτικά σωμάτια



Εικόνα 9: παραγωγή κυταροκινών από τα άωρα (γαλάζιο χρώμα) και ώριμα (μωβ χρώμα) ΔΚ υγιών δοτών (I) και από τα ώριμα ΔΚ ασθενών με ΠΜ [(II) και (III)] είτε κατόπιν αντιγονικής διέγερσης (μωβ χρώμα) είτε όχι (γαλάζιο χρώμα). Τα γραφήματα απεικονίζουν τη συγκέντρωση (σε pg/ml) των κυταροκινών IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-1B και IL-8 σε

υπερκείμενο θρεπτικό υλικό από 1.5×10^6 ΔΚ (I), 0.5×10^6 ΔΚ (II) και 1×10^6 ΔΚ (III). Οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στα γραφήματα αποτελούν το μέσο όρο που εξάγεται από 5 καλλιέργειες ΔΚ (I) , από 7 καλλιέργειες ΔΚ (II) και από 10 καλλιέργειες ΔΚ (III).

In vitro διέγερση ειδικών T Λεμφοκυττάρων

Για την *in vitro* έκπτυξη ειδικών T κυττάρων, τα ώριμα διεγερμένα ΔΚ των ασθενών συγκαλλιεργούνταν με αυτόλογα αποψυγμένα λεμφοκύτταρα παρουσία IL-2. Τα εκπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα συλλέγονταν την 17^η-21^η ημέρα της καλλιέργειας και γινόταν ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3, τα διεγερμένα με το ολικό αντιγονικό φορτίο αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων ώριμα ΔΚ των ασθενών επάγουν τόσο CD3⁺/4⁺ όσο και CD3⁺/8⁺ λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο εναλλακτικών μεθόδων φόρτισης των ΔΚ. Επιπλέον, οι επαγόμενοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί περιέχουν μικρά ποσοστά NK και NKT κυττάρων. Τα διεγερμένα με ολικό RNA ΔΚ τείνουν να επάγουν υψηλότερα ποσοστά NKT κυττάρων σε σχέση με τα διεγερμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ, χωρίς όμως η παρατηρούμενη διαφορά να φτάνει τελικά σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα.

Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται σχηματικά η σύσταση των *in vitro* εκπτυσσόμενων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των ασθενών με ΠΜ.

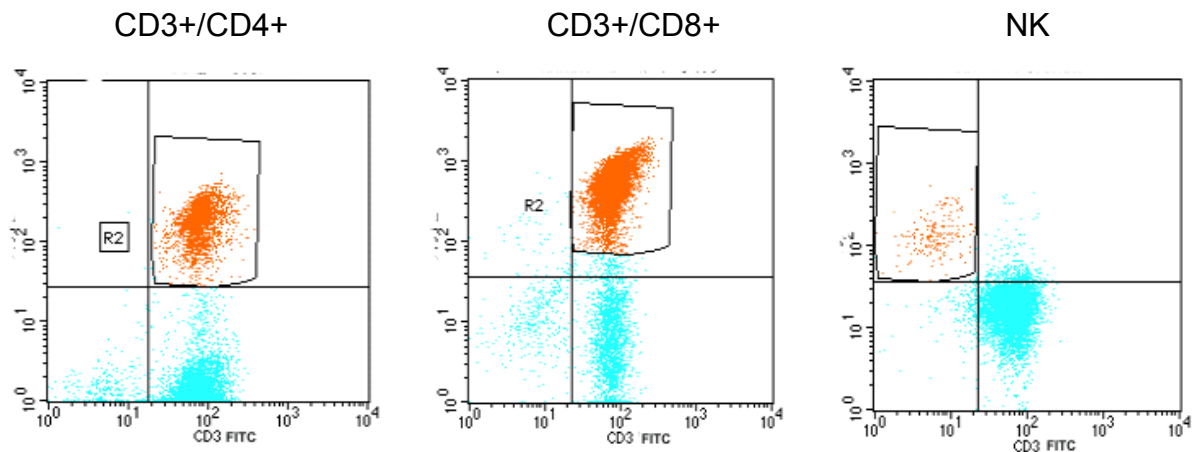
	αποπτωτικά σωμάτια		ολικό RNA		P
	εύρος	μέση τιμή ±SD	εύρος	μέση τιμή ±SD	
% CD3 ⁺ /CD4 ⁺	18,7-75,59	41,97±19,94	4,41-74,38	36,41±22,96	0,618
% CD3 ⁺ /CD8 ⁺	13,4-77,55	34,91±22,3	12,27-58,72	28,667±18,25	0,556
% NK	0,34-15,44	3,226±4,225	1,1-13,91	4,138±4,44	0,480
% NKT	0,19-6,06	1,78±1,69	1,2-7,98	3,3±2,285	0,063

Πίνακας 3: ποσοστιαία σύσταση των *in vitro* εκπτυσσόμενων λεμφοκυττάρων των ασθενών. Τα ποσοστά έκφρασης των δεικτών επιφανείας αποτελούν το μέσο όρο που εξάγεται από 11 ασθενείς για τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια και από 7 διαφορετικούς ασθενείς για

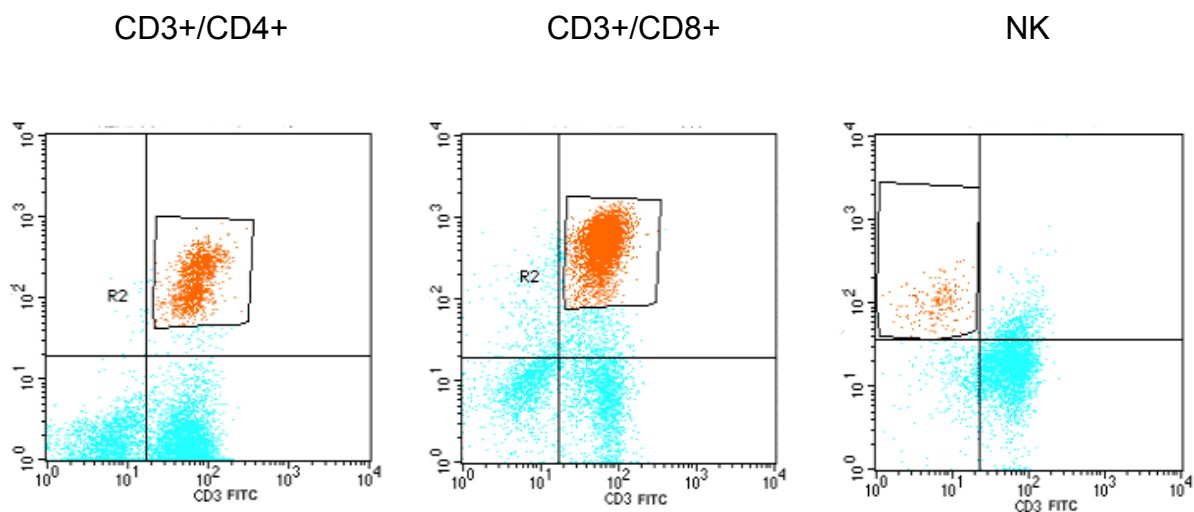
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

τη φόρτιση με ολικό RNA. Με P σημειώνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατά Mann-Whitney.

Διέγερση με αποπτωτικά σωμάτια



Διέγερση με ολικό RNA



Εικόνα 10: κυτταρομετρία ροής σε *in vitro* εκπυγμένους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών με ΠΜ. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στους πληθυσμούς των CD3⁺/CD4⁺ Ths, CD3⁺/CD8⁺ CTLs και στον CD3⁺/CD16⁺56⁺ πληθυσμό των NK κυτάρων. Τα ιστογράμματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από 11 ασθενείς για τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια και από 7 διαφορετικούς ασθενείς για τη φόρτιση με ολικό RNA.

Ειδική κυτταροτοξική δράση των *in vitro* διεγερμένων CD8 CTLs των ασθενών

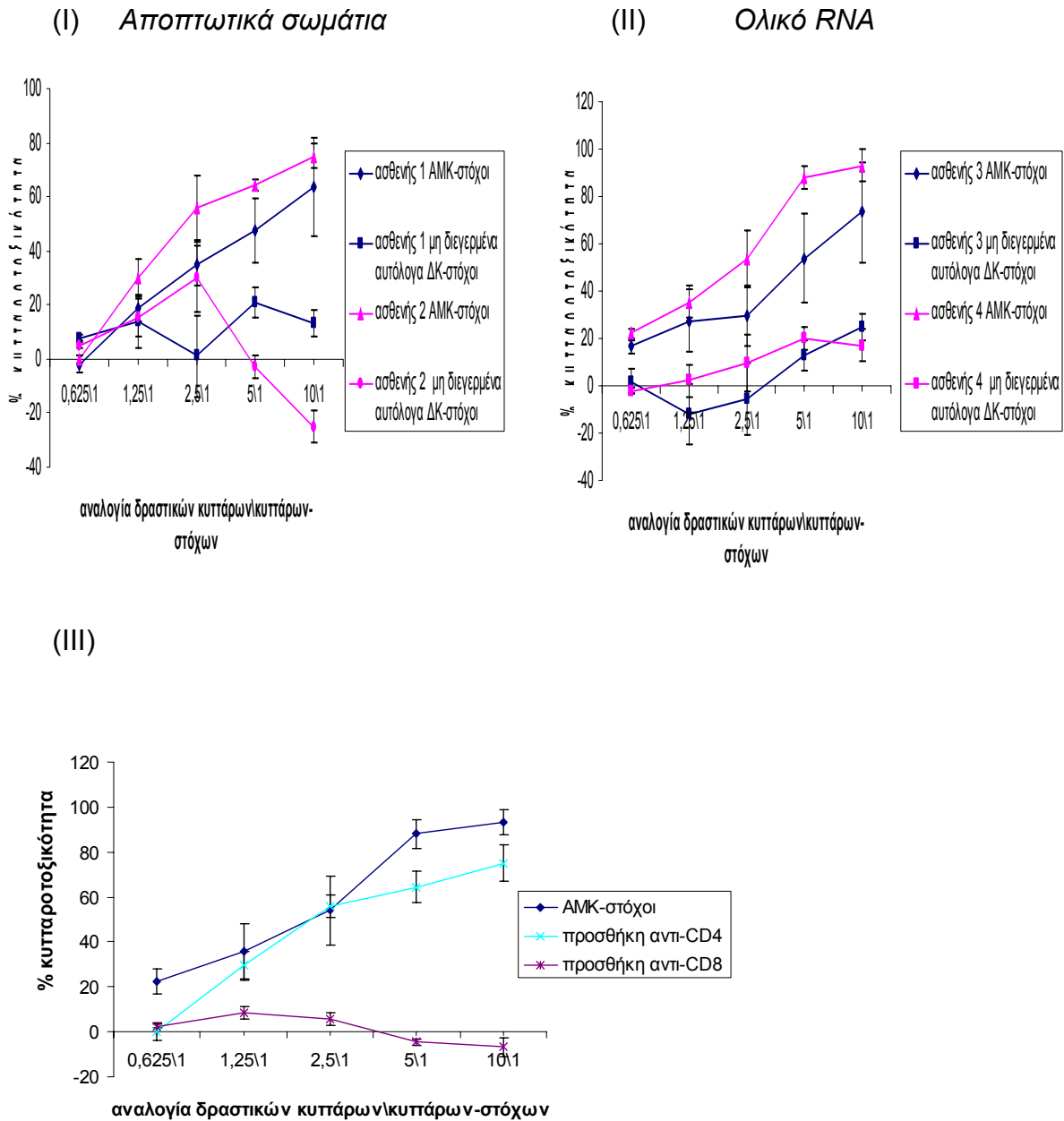
Για τον έλεγχο της ειδικότητας των εκπυγμένων λεμφοκυτταρικών κλώνων εφαρμόστηκε χρωματομετρική μέθοδος προσδιορισμού της κυτταροτοξικής δράσης, όπως περιγράφεται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι. Σαν κύτταρα-στόχοι χρησιμοποιήθηκαν αυτόλογα μυελωματικά κύτταρα (AMK). Όπως φαίνεται στην εικόνα 11 (I) και (II), τόσο στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που διεγείρονται από ΔΚ φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια όσο και στους πληθυσμούς που διεγείρονται από ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA ανιχνεύονται κύτταρα με ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι των AMK-στόχων. Έγιναν 11 δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας (σε 11 ασθενείς) για τη διέγερση με αποπτωτικά σωμάτια και 5 δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας (σε 5 διαφορετικούς ασθενείς) για τη διέγερση με ολικό RNA. Συνολικά, στο 81,8% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε *in vitro* ανταπόκριση στη διέγερση των ΔΚ με αποπτωτικά σωμάτια και στο 80% στη διέγερση με ολικό RNA.

Στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας που αφορούσαν στη διέγερση με αποπτωτικά σωμάτια, 6 ασθενείς ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά (παρουσίασαν δηλαδή σταθερή αύξηση της κυτταροτοξικότητας σε αυξανόμενες αναλογίες δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων), 3 ασθενείς ανταποκρίθηκαν σε μία μόνο αναλογία δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων και 2 ασθενείς δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση. Αντιστοίχως, στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας που αφορούσαν στη διέγερση με ολικό RNA, 4 ασθενείς ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά και ένας ασθενής δεν επέδειξε μετρήσιμη κυτταροτοξική δραστηριότητα. Οι 6 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν μερικώς ή καθόλου στις δοκιμασίες *in vitro* ήταν ηλικίας 47-71 χρονών, ενώ οι υπόλοιποι 10 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά ήταν 43-78 χρονών. Άρα λοιπόν, η προχωρημένη ηλικία δεν φάνηκε να διαφοροποιεί την ανοσιακή ανταπόκριση των ασθενών *in vitro*. Το ίδιο ισχύει και για το στάδιο της νόσου κατά τη δειγματοληψία, καθώς οι ασθενείς και των δύο ομάδων βρίσκονταν σε στάδιο II/III κατά Durie-Salmon. Συγκεκριμένα, από τους 6 ασθενείς που επέδειξαν μερική ή καμία ανταπόκριση, 3

ήταν σε στάδιο II και 3 σε στάδιο III, ενώ από τους υπόλοιπους 10 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά, 5 ήταν σταδίου II και 5 ήταν σταδίου III. Χαρακτηριστικό της ομάδας των 6 ασθενών που επέδειξαν μειωμένη ανοσιακή απόκριση ήταν ο αυξημένος αριθμός κύκλων θεραπείας που είχαν προηγηθεί της λήψης περιφερικού αίματος για απομόνωση των ΜΚΠΑ. Συγκεκριμένα, 4 από αυτούς τους ασθενείς είχαν λάβει 4-8 κύκλους bortezomib/δεξαμεθαζόνης και οι υπόλοιποι 2 είχαν λάβει 4 κύκλους PAD (bortezomib, doxorubicin και δεξαμεθαζόνης). Αντιθέτως, από τους 10 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά, μόνο 2 είχαν λάβει 4 κύκλους PAD, ενώ οι υπόλοιποι 8 είχαν λάβει 1-3 κύκλους bortezomib/δεξαμεθαζόνης ή άλλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας.

Η ειδικότητα της κυτταροτοξικής δράσης έναντι του ΠΜ επαληθεύτηκε σε δοκιμασίες με αυτόλογα ΔΚ-στόχους, μη διεγερμένα με αντιγόνα του ΠΜ, των οποίων η λύση από τα δραστικά κύτταρα κινήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα [εικόνα 11 (I) και (II)]. Ο περιορισμός της κυτταροτοξικής δραστηριότητας στον υποπληθυσμό των CD8 CTLs αποδείχτηκε σε δοκιμασίες αναστολής των CD4 και CD8 λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με χρήση των αντίστοιχων μονοκλωνικών αντισωμάτων, στις οποίες φάνηκε ότι η προσθήκη αντι-CD4 αντισώματος δεν έχει καμία επίδραση στη λύση των κυττάρων-στόχων, ενώ η προσθήκη αντι-CD8 αντισώματος σχεδόν καταργεί κάθε κυτταροτοξική δράση [εικόνα 11 (III)]. Άρα, η παρατηρηθείσα κυτταροτοξική δράση οφειλόταν σε CD8 CTLs και όχι σε μη ειδική λύση των κυττάρων-στόχων από NK κύτταρα.

Συγκρίνοντας τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας που σημειώθηκαν στις δύο ομάδες ασθενών για την κάθε αναλογία δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων, φαίνεται ότι τα φορτισμένα με ολικό RNA ΔΚ επάγουν CD8 CTLs με ισχυρότερη δράση έναντι των AMK σε σχέση με τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωματίδια ΔΚ. Στις μεγαλύτερες αναλογίες, οι παρατηρούμενες διαφορές φτάνουν σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα, σύμφωνα με τη δοκιμασία Mann-Whitney (πίνακας 4).



Εικόνα 11: κυτταροτοξική δράση των *in vitro* εκπτυγμένων λεμφοκυττάρων των ασθενών. Στο γράφημα (I) απεικονίζονται 2 αντιπροσωπευτικές (από 6) καμπύλες κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων που εκπτύχθηκαν από ΔΚ φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια έναντι AMK-στόχων και έναντι μη διεγερμένων αυτόλογων ΔΚ-στόχων. Στο γράφημα (II) απεικονίζονται 2 αντιπροσωπευτικές (από 4) καμπύλες κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων που εκπτύχθηκαν από ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA έναντι AMK-στόχων και έναντι μη διεγερμένων αυτόλογων ΔΚ-στόχων. Στο γράφημα (III) απεικονίζονται τα αποτελέσματα της προσθήκης αντι-CD4 ή αντι-CD8 αντισώματος στην κυτταροτοξικότητα των *in vitro* εκπτυγμένων λεμφοκυττάρων έναντι AMK-στόχων. Οι

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

καμπύλες που παρουσιάζονται στο γράφημα (III) είναι αντιπροσωπευτικές από 4 πειράματα για τη διέγερση με αποπτωτικά σωμάτια και 2 πειράματα για τη διέγερση με ολικό RNA. Το κάθε ποσοστό κυτταροτοξικότητας στα γραφήματα αποτελεί το μέσο όρο που εξάγεται από τρεις επαναλήψεις (τρία wells).

Αναλογία δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων	Κυτταροτοξικότητα, μέση τιμή %±SD		P
	Αποπτωτικά σωμάτια	Ολικό RNA	
0,625:1	2,9±4,9	6,56±18,37	0,513
1,25:1	20,76±6,59	24,83±10,05	0,827
2,5:1	22,5±5,27	48,33±9,46	0,05
5:1	44,28±2,95	68,76±14,23	0,05
10:1	61,7±11,66	76,1±12,92	0,05

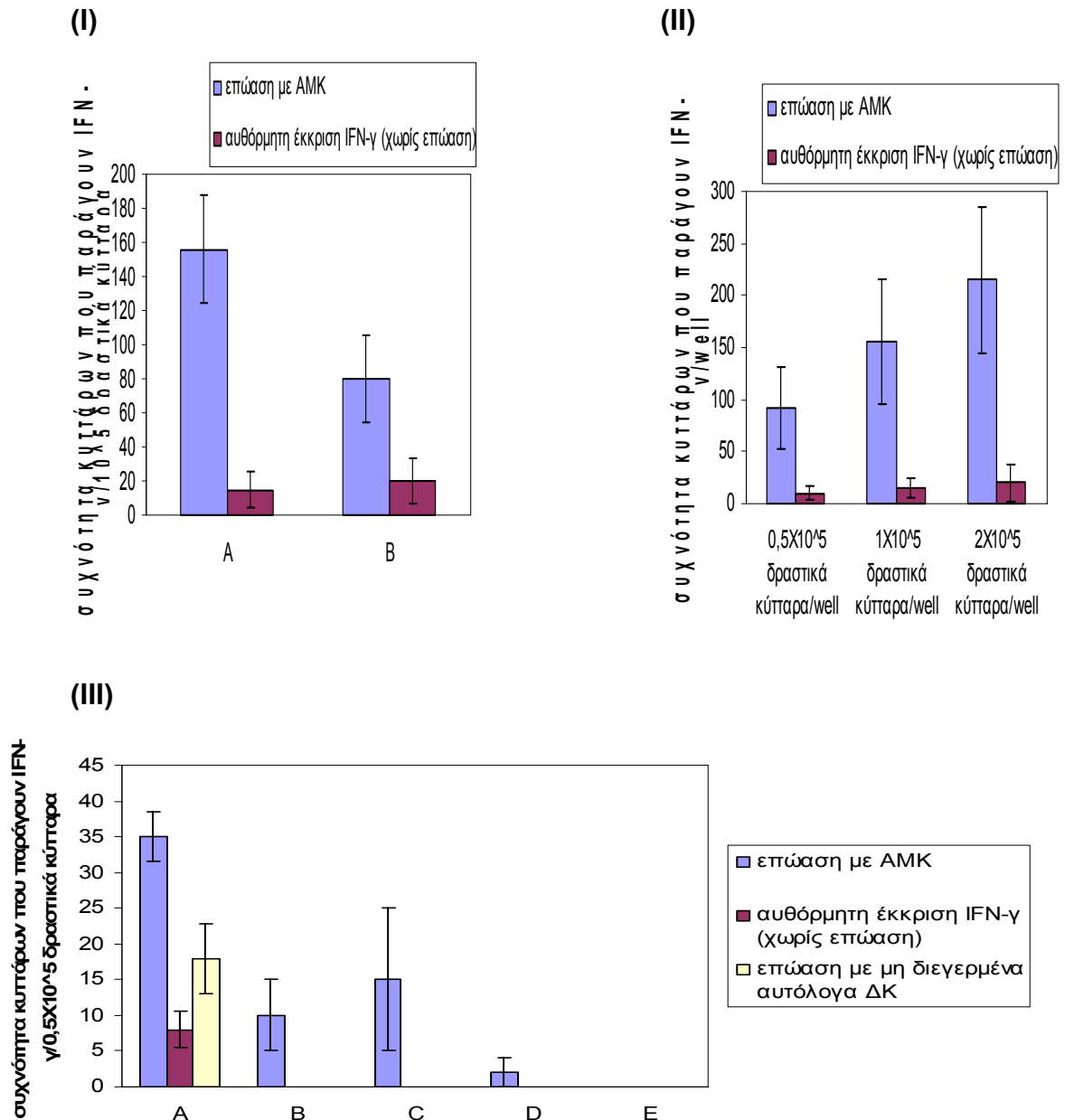
Πίνακας 4: ποσοστά κυτταροτοξικότητας των *in vitro* εκπτυχθέντων CD8 CTLs των ασθενών έναντι AMK-στόχων σε κάθε αναλογία δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων. Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας που αναφέρονται στον πίνακα αποτελούν το μέσο όρο που εξάγεται από 6 ανεξάρτητα πειράματα για τη διέγερση των ΔΚ με αποπτωτικά σωμάτια και από 4 ανεξάρτητα πειράματα για τη διέγερση με ολικό RNA. Με P σημειώνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατά Mann-Whitney.

Ανίχνευση ειδικών Th1/Tc1 κυττάρων εντός των *in vitro* διεγερμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των ασθενών

Όπως έδειξε η κυτταρομετρία ροής, οι *in vitro* εκπτυγμένοι λεμφοκυτταρικοί κλώνοι των ασθενών περιείχαν, εκτός από CD8 CTLs, και μεγάλα ποσοστά CD4 βοηθητικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ELISpot, όπως περιγράφεται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι, προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία Th1 κυττάρων με ειδική δράση, η οποία ανιχνεύεται μέσω της παραγωγής IFN-γ κατόπιν διέγερσης από συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους. Σαν κύτταρα-στόχοι, που θα διεγείρουν την έκκριση IFN-γ από τα δραστικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν AMK. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12(I), τόσο στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που διεγείρονται από ΔΚ φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια όσο και στους πληθυσμούς που διεγείρονται από ΔΚ

φορτισμένα με ολικό RNA ανιχνεύονται κύτταρα με ικανότητα παραγωγής IFN- γ κατόπιν επώασης με AMK. Έγιναν συνολικά 5 δοκιμασίες ELISpot, 3 για τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια και 2 για τη φόρτιση με ολικό RNA, στις οποίες ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά και οι 5 ασθενείς. Η συχνότητα των ειδικών T-κυττάρων ήταν 70-141 και 20-60 ανά 10^5 κύτταρα με τις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ αντίστοιχα. Οι απόλυτοι αριθμοί των κυττάρων με ικανότητα παραγωγής IFN- γ ήταν ανάλογοι του αριθμού των δραστικών κυττάρων που επωάσθηκαν με κύτταρα-στόχους [εικόνα 12 (II)]. Η ειδικότητα της έκκρισης IFN- γ επαληθεύτηκε σε δοκιμασίες με δραστικά κύτταρα που επωάσθηκαν απουσία κυττάρων-στόχων (αυθόρμητη έκκριση IFN- γ) και με κύτταρα-στόχους αυτόλογα ΔΚ, που δεν είχαν φορτισθεί με αντιγόνα του ΠΜ. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 (III), η παραγωγή IFN- γ από τα δραστικά κύτταρα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη μετά την επώαση με AMK συγκριτικά με την αυθόρμητη έκκριση IFN- γ και την επώαση με μη διεγερμένα αυτόλογα ΔΚ.

Η ταυτότητα των κυττάρων με ικανότητα έκκρισης IFN- γ κατόπιν ειδικής διέγερσης ελέγχθηκε σε δοκιμασίες αναστολής των CD4⁺ και CD8⁺ λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με χρήση των αντίστοιχων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12 (III), τόσο η προσθήκη αντι-CD4 αντισώματος όσο και η προσθήκη αντι-CD8 αντισώματος ξεχωριστά έχουν ως αποτέλεσμα τη μερική ελάττωση του αριθμού των κυττάρων-παραγωγών IFN- γ , ενώ η ταυτόχρονη προσθήκη και των δύο αντισωμάτων οδηγεί σε πλήρη αναστολή της παραγωγής IFN- γ . Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την παρουσία CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων με ειδική αντιμυελωματική δράση εντός των *in vitro* διεγερμένων λεμφοκυτταρικών κλώνων των ασθενών.



Εικόνα 12: παρουσία ειδικών Th1/Tc1 κυττάρων εντός των *in vitro* εκπτυγμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των ασθενών. Στο γράφημα (I) απεικονίζεται η συχνότητα των κυττάρων (ανα 10⁵ δραστικά κύτταρα) που παράγουν IFN-γ μεταξύ των λεμφοκυττάρων που εκπύχθηκαν με ΔΚ διεγερμένα είτε με αποπτωτικά σωμάτια (A) είτε με ολικό RNA (B). Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η έκκριση IFN-γ από τα δραστικά κύτταρα κατόπιν επώασής τους με AMK-στόχους και με μωβ χρώμα η αυθόρμητη έκκριση IFN-γ από δραστικά κύτταρα απουσία κυττάρων-στόχων. Στο γράφημα (II) απεικονίζονται οι αριθμοί των κυττάρων με ικανότητα έκκρισης IFN-γ μετά απο επώαση 0,5X10⁵, 1X10⁵ και 2X10⁵ δραστικών κυττάρων που είχαν εκπτυχθεί με ΔΚ διεγερμένα με αποπτωτικά

σωμάτια. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η παραγωγή IFN- γ μετά από επώαση των δραστικών κυττάρων με AMK-στόχους και με μωβ χρώμα η αυθόρμητη παραγωγή IFN- γ από τα δραστικά κύτταρα. Στο γράφημα (III) φαίνεται ο έλεγχος της ειδικότητας της έκκρισης IFN- γ μετά την επώαση δραστικών κυττάρων που είχαν εκπτυχθεί με ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA. Η συγκέντρωση των δραστικών κυττάρων που επωάζονταν ήταν $0,5 \times 10^5$ /well. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η παραγωγή IFN- γ μετά από επώαση των δραστικών κυττάρων με AMK-στόχους, με μωβ χρώμα η αυθόρμητη παραγωγή IFN- γ από τα δραστικά κύτταρα και με λευκό χρώμα η παραγωγή IFN- γ μετά από επώαση των δραστικών κυττάρων με αυτόλογα ΔΚ, που δεν είχαν φορτισθεί με αντιγόνα του ΠΜ (Α). Τα Β, C, D απεικονίζουν τα αποτελέσματα της αναστολής με προσθήκη αντι-CD4, αντι-CD8 ή και τα δύο μαζί, αντιστοίχως, σε $0,5 \times 10^5$ δραστικά κύτταρα. Στο Ε απεικονίζεται η παραγωγή IFN- γ από κύτταρα-στόχους (AMK) απουσία δραστικών κυττάρων. Τα γραφήματα που παρουσιάζονται είναι αντιπροσωπευτικά από 3 πειράματα για τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια και από 2 πειράματα για τη φόρτιση με ολικό RNA. Κάθε τιμή στα γραφήματα αποτελεί το μέσο όρο που εξάγεται από τρεις επαναλήψεις (3 wells).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι δυνατή η παραγωγή λειτουργικών ΔΚ *in vitro* από ασθενείς με ΠΜ

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, πρώτος σκοπός ήταν να παραχθούν ΔΚ *in vitro* από τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων ασθενών με ΠΜ και να ελεγχθεί η λειτουργικότητά τους. Είναι γνωστό ότι το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον που δημιουργεί το νεοπλασματικό αυτό νόσημα επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία των ΔΚ *in vivo*, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσιακής ανοχής παρανοσίας. Έχει βρεθεί ότι τα ΔΚ του περιφερικού αίματος ασθενών με ΠΜ, σε αντίθεση με εκείνα υγιών δοτών, εμφανίζονται σε χαμηλότερους απόλυτους αριθμούς, με μειωμένη ικανότητα ωρίμανσης ως προς την έκφραση αντιγόνων επιφανείας και μειωμένη ικανότητα διέγερσης αλλογενών και αυτόλογων λεμφοκυττάρων, ενώ η *in vitro* καλλιέργεια των ΔΚ από τα μονοκύτταρα των ίδιων ασθενών παρακάμπτει όλες αυτές τις δυσκολίες (71). Ένας από τους παράγοντες που εμπλέκονται στην αναστολή της *in vivo* διαφοροποίησης και λειτουργίας των ΔΚ βρέθηκε ότι είναι η IL-6, βασική κυτταροκίνη στην παθογένεση του ΠΜ (70,71). Επιπλέον, η β2-μικροσφαιρίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τη λειτουργία των *in vitro* παραχθέντων ΔΚ (75). Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι αριθμοί των ΔΚ στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ είναι φυσιολογικοί, αλλά τα κύτταρα εμφανίζουν ελαττωματική ωρίμανση εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης των TGF-β1 και IL-10 (76). Αντιθέτως, τα ΔΚ που παράγονται *in vitro* από τα κύτταρα του αίματος ασθενών με ΠΜ δεν διαφέρουν φαινοτυπικά και λειτουργικά από τα αντίστοιχα ΔΚ υγιών δοτών (77).

Όλα τα παραπάνω ευρήματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου η *in vitro* καλλιέργεια ΔΚ έγινε με απομόνωση των μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα των ασθενών και διαφοροποίηση αυτών προς άωρα ΔΚ παρουσία GM-CSF και IL-4 για 6 ημέρες, με επακόλουθη ωρίμανση με προσθήκη TNFα για 24-48 ώρες. Παρόμοιοι συνδυασμοί συνθηκών έχουν χρησιμοποιηθεί και από άλλες ομάδες για τη διαφοροποίηση μονοκυττάρων

επιλεγμένων είτε με μαγνητικό διαχωρισμό (106) είτε με προσκόλληση στον πλαστικό πυθμένα (68), όπως έγινε και στην παρούσα μελέτη. Υπάρχει και η επιλογή της χρήσης IL-13 αντί για IL-4 (104,111). Είναι επίσης σημαντικό το ότι η καλλιέργεια των ΔΚ των ασθενών έγινε σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με ανθρώπινη αλβουμίνη, απουσία αυτόλογου ορού ή FBS (fetal bovine serum), καθώς υπάρχει προβληματισμός ότι η παρουσία FBS στην καλλιέργεια μπορεί να προκαλέσει ειδική διέγερση των ΔΚ από ξενοαντιγόνα, ενώ ο αυτόλογος ορός είναι πιθανό να περιέχει ανασταλτικές κυτταροκίνες (IL-6, VEGF κ.α.), αντισώματα που μπορούν να τροποποιήσουν την πρόσληψη των αντιγόνων ή και μεγάλες συγκεντρώσεις του ιδιοτύπου και άλλων αντιγόνων του ΠΜ (π.χ. MUC-1) (86). Τα ΔΚ των ασθενών που παράχθηκαν *in vitro* κάτω από αυτές τις συνθήκες βρέθηκαν ότι δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα ΔΚ υγιών δοτών ως προς τον αριθμό, τη βιωσιμότητά τους και την ικανότητά τους για φυσιολογική διαφοροποίηση και ωρίμανση, όπως αυτές εκδηλώνονται με την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 και των δεικτών επιφανείας CD83, CD1a, HLA-DR και CD11c. Η λειτουργικότητα των *in vitro* παραχθέντων ΔΚ των ασθενών επιβεβαιώθηκε σε αλλογενείς μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, όπου τα ώριμα ΔΚ ασθενών και υγιών δοτών προκαλούσαν συγκρίσιμο πολλαπλασιασμό των αλλογενών λεμφοκυττάρων.

Υπάρχουν αναφορές που έχουν αμφισβητήσει τη λειτουργικότητα των *in vitro* παραχθέντων ΔΚ από μοντέλα μυελώματος σε ποντίκια και από ασθενείς με ΠΜ όσον αφορά την έκφραση σημαντικών αντιγόνων επιφανείας, την παραγωγή κυτταροκινών και τη διέγερση αλλογενών και αυτόλογων λεμφοκυττάρων (107,108,109). Πρέπει όμως να τονιστεί ότι η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων έγινε σε διαφορετικές συνθήκες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρουσία FBS και, κυρίως, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές αναφέρουν συγκεντρώσεις GM-CSF 10-50ng/ml και IL-4 10ng/ml, ενώ στην παρούσα μελέτη η καλλιέργεια των ΔΚ έγινε με 70ng/ml GM-CSF και 30ng/ml IL-4. Είναι λοιπόν πιθανό οι παρατηρούμενες ασυμφωνίες να οφείλονται σε αυτή τη διαφορά συγκεντρώσεων των αυξητικών παραγόντων. Η ανεπάρκεια IL-4 για παράδειγμα θα μπορούσε να σχετίζεται με τη χαμηλή παραγωγή ΔΚ και την ελλιπή έκφραση του HLA-DR που αναφέρονται στις

μελέτες, δεδομένου ότι η κυτταροκίνη αυτή είναι κρίσιμη για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς ΔΚ και την αύξηση της έκφρασης των HLA μορίων.

Είναι σαφές ότι δεν υπάρχει προς το παρόν συμφωνία ως προς την πηγή των ΔΚ που είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για την ανοσοθεραπεία του ΠΜ. Οι χαμηλοί αριθμοί των ΔΚ στο αίμα των ασθενών *in vivo* και η επίδραση του νοσήματος στη λειτουργία τους συνηγορούν υπέρ της χρήσης των *in vitro* παραχθέντων ΔΚ (110,111,114). Υπάρχουν όμως και επιφυλάξεις όσον αφορά την καλλιέργεια ΔΚ *ex vivo* εξαιτίας των περιορισμών που υπάρχουν ως προς τον αριθμό των παραγόμενων κυττάρων και την ανομοιογένεια των αποτελεσμάτων ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η χρήση ΔΚ του περιφερικού αίματος των ασθενών απομονωμένων με μαγνητικό διαχωρισμό (112,113). Η παρούσα μελέτη συνηγορεί υπέρ της χρήσης των ΔΚ που παράγονται *in vitro* από τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων ασθενών με ΠΜ. Αφενός τα κύτταρα αυτά φάνηκαν εξίσου λειτουργικά με τα αντίστοιχα ΔΚ υγιών δοτών, τουλάχιστον κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Αφετέρου, είναι αμφίβολο εάν από ασθενείς με ΠΜ είναι δυνατόν να απομονωθούν λειτουργικά ΔΚ, ιδιαίτερα εάν έχει προηγηθεί θεραπεία.

Η διέγερση ΔΚ ασθενών με ΠΜ είναι εφικτή *in vitro* με τη μέθοδο της φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών σωματίων αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων

Για τη διέγερση των άωρων ΔΚ των ασθενών με το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών τους κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές μέθοδοι: φόρτιση των ΔΚ με αποπτωτικά σωματίδια ή με το ολικό RNA αυτόλογων νεοπλασματικών κυττάρων. Η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων είναι μία από τις χαρακτηριστικές λειτουργίες των ΔΚ *in vivo*, που έχει ως αποτέλεσμα την παρουσίαση εξωγενών αντιγόνων τόσο σε αυτόλογα CD4 βοηθητικά κύτταρα μέσω της κλασικής οδού επεξεργασίας των εξωγενών αντιγόνων όσο και σε αυτόλογα CD8 CTLs, μέσω της διασταυρούμενης παρουσίασης. Η διέγερση των ΔΚ με φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων καρκινικών κυττάρων έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε αρκετές κακοήθειες, μεταξύ των οποίων και το ΠΜ

(70,89), τόσο σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές όσο και σε πλασματοκύτταρα ασθενών. Η σχετικά εύκολη συλλογή νεοπλασματικών κυττάρων από το μυελό των οστών των ασθενών και η διαθεσιμότητα μεθόδων για επαγωγή απόπτωσης (π.χ. ακτινοβόληση, χημικοί παράγοντες) διευκόλυνε τη διεξαγωγή αρκετών μελετών στο νόσημα αυτό με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Εντούτοις, έχουν διατυπωθεί επιφυλάξεις ως προς την ικανότητα των αποπτωτικών κυττάρων για επαγωγή αντινεοπλασματικής ανοσίας, δεδομένου ότι η απόπτωση αποτελεί μέρος της φυσιολογικής ομοιόστασης των ιστών και λαμβάνει χώρα απουσία φλεγμονής, γι'αυτό και τα ΔΚ που φαγοκυτταρώνουν αποπτωτικά σωμάτια επάγουν ανοσιακή ανοχή και όχι ανοσία (115). Εξάλλου, έχει βρεθεί ότι η έκθεση των ΔΚ σε νεκρωτικά, αλλά όχι σε αποπτωτικά, κύτταρα προκαλεί ωρίμανση των ΔΚ και επαγωγή των ανοσοδιεγερτικών ικανοτήτων τους, ενώ απαιτούνται επιπλέον σήματα ωρίμανσης κατά τη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων (116). Όμως, έχει αρχίσει να γίνεται σαφές ότι η ανοσογονικότητα δεν είναι αποκλειστικό προνόμιο του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου και ότι η ανομοιογένεια στις χρησιμοποιούμενες τεχνικές και στον ορισμό των εννοιών της απόπτωσης και της νέκρωσης μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ασυμφωνία μεταξύ των ερευνητών (44). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο αποπτωτικός θάνατος είναι ανοσογονικός για τα ΔΚ όταν χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη αλληλουχία μοριακών μεταβολών στα αποπτωτικά κύτταρα, που περιλαμβάνουν την πρώιμη μετατόπιση της καλρετικουλίνης στην κυτταρική επιφάνεια, την απελευθέρωση πρωτεΐνων θερμικού σοκ και την όψιμη απελευθέρωση του HMGB1 (high mobility group box 1) (42,43). Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι τα αποπτωτικά σωμάτια μυελωματικών κυττάρων που παράγονται με τη δράση του bortezomib επάγουν ισχυρότερη αντινεοπλασματική ανοσία σε σχέση με τα αποπτωτικά σωμάτια που παράγονται με γ-ακτινοβόληση. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στην έκθεση της hsp90 στην επιφάνεια των επεξεργασμένων με bortezomib μυελωματικών κυττάρων, η οποία προκαλεί αποτελεσματική ωρίμανση των ΔΚ ασθενών χωρίς την προσθήκη εξωγενών παραγόντων (90).

Στην παρούσα μελέτη, η πρόκληση απόπτωσης έγινε με γ-ακτινοβόληση των μυελωματικών κυττάρων και, όπως έδειξε η κυτταρομετρία ροής, το τελικό προϊόν ήταν ένας πληθυσμός αποτελούμενος από ένα μείγμα αποπτωτικών και

νεκρωτικών κυττάρων. Η παρουσία νεκρωτικών κυττάρων ήταν αναμενόμενη, δεδομένου ότι τα πλασματοκύτταρα είναι ευάλωτα μετά την απομάκρυνσή τους από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και ότι είχε προηγηθεί κρυστατάψυξη και απόψυξη των κυττάρων πριν την ακτινοβολήση. Μετά τη φαγοκυττάρωση τα άωρα ΔΚ αφέθηκαν να ωριμάσουν για 48 ώρες παρουσία TNFα, αντισταθμίζοντας έτσι την ενδεχόμενη ανεπάρκεια των αποπτωτικών σωματίων να προκαλέσουν ωρίμανση των ΔΚ. Είναι όμως πιθανό τα ΔΚ να δέχτηκαν επιπλέον σήματα ωρίμανσης και από τα νεκρωτικά κύτταρα που ήταν παρόντα στους προς φαγοκυττάρωση πληθυσμούς των αποπτωτικών σωματίων. Η παραγωγή κυτταροκινών από τα ΔΚ αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της λειτουργίας τους, ενδεικτικό της ικανότητάς τους για επαγωγή ανοσιακής ανοχής ή ανοσίας. Έγινε πρώτα έλεγχος του ρεπερτορίου των σχετιζόμενων με τη φλεγμονή κυτταροκινών που ανιχνεύονται στα υπερκείμενα καλλιέργειών άωρων και ώριμων ΔΚ υγιών δοτών. Όπως φάνηκε, τα άωρα ΔΚ εκφράζουν IL-6, αν και σε ελάχιστα επίπεδα, και IL-8, ενώ οι υπόλοιπες κυτταροκίνες που εξετάστηκαν (IL-10, IL-12p70, IL-1β) ανιχνεύθηκαν σε ασήμαντες συγκεντρώσεις. Η ωρίμανση των ΔΚ συνοδεύεται από σημαντική αύξηση της παραγωγής IL-6 και θεαματική αύξηση στην παραγωγή IL-8, χωρίς καμία αλλαγή για τις υπόλοιπες κυτταροκίνες. Δεδομένων αυτών των αποτελεσμάτων, οι μετρήσεις στους ασθενείς επικεντρώθηκαν στα ώριμα ΔΚ, προκειμένου να διερευνηθεί το αν η φόρτισή τους με αποπτωτικά σωματία αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων έχει κάποια επίδραση στο εύρος των κυτταροκινών που εκκρίνουν. Όπως φάνηκε, το ρεπερτόριο των κυτταροκινών που παράγουν τα ώριμα ΔΚ των ασθενών, είτε κατόπιν αντιγονικής διέγερσης είτε όχι, δεν διαφέρει από εκείνο των ώριμων ΔΚ υγιών δοτών, με σημαντικά επίπεδα IL-6 και σχεδόν τριπλάσια συγκέντρωση της χημειοκίνης IL-8, βασικής για την προσέλκυση των λευκών αιμοσφαιρίων από τα ΔΚ. Είναι αξιοσημείωτο το ότι η φόρτιση με αποπτωτικά σωματία φαίνεται να αυξάνει περαιτέρω την έκκριση IL-8 από τα ώριμα ΔΚ, αν και οι παρατηρούμενες διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η έκκριση IL-6 από τα *in vitro* παραχθέντα ΔΚ ασθενών με ΠΜ είναι, σύμφωνα με κάποιες αναφορές (107,109), ενδεικτική της δυσλειτουργίας των κυττάρων αυτών, δεδομένου του ρόλου που παίζει η IL-6 στην παθογένεση της νόσου. Όμως, η παραγωγή IL-6 από τα ΔΚ μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα και την αυξημένη διάρκεια ζωής αυτών μέσω

αναστολής της απόπτωσης και, συνεπώς, ενισχυμένη λεμφοκυτταρική διέγερση (1). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα ΔΚ, όπως IL-6 και IL-12, μπορεί να αναστρέψει την κατασταλτική δράση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων (34). Υπάρχει αναφορά αυξημένης έκκρισης IL-10 από τα *in vitro* παραχθέντα ΔΚ ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με εκείνα υγιών δοτών, όπως επίσης και αυξημένης παραγωγής IL-6 από τα διεγερμένα με αντιγόνα του ΠΜ ΔΚ των ασθενών σε σχέση με τα μη διεγερμένα (109). Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στις παρούσες συνθήκες, όπου δεν υπήρχαν διαφορές στην έκκριση IL-6 μεταξύ των διεγερμένων ή μη ώριμων ΔΚ, ενώ η IL-10 κινήθηκε σε πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, κάτι που συνηγορεί υπέρ της ανοσογονικότητας αυτών των ΔΚ, δεδομένου ότι η IL-10 είναι από τις βασικότερες κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην επαγωγή ανοσιακής ανοχής. Τέλος, είναι χαρακτηριστική η απουσία IL-12, κεντρικής κυτταροκίνης για την επαγωγή Th1 ανοσιακών αποκρίσεων, από τα δείγματα υγιών δοτών και ασθενών. Είναι όμως και αναμενόμενη, εφόσον η έκκριση της IL-12 ενισχύεται σημαντικά κατά την αλληλεπίδραση ΔΚ-Τ κυττάρων, με την πρόσδεση του CD40 ligand των CD4 κυττάρων στον CD40 υποδοχέα των ΔΚ, και σηματοδοτεί την τελική ωρίμανση των ΔΚ (1,120).

Τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν αμέσως μετά το 48ωρο της ωρίμανσης για την επαγωγή ειδικών Τ λεμφοκυττάρων. Για τις ανάγκες όμως του πειράματος κρυοκαταψύχθηκαν ΔΚ των πληθυσμών αυτών για μετέπειτα χρήση στην εβδομαδιαία επαναδιέγερση των αυτόλογων λεμφοκυττάρων των ασθενών και σαν κύτταρα-στόχοι στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και ELISpot. Έχει αποδειχθεί από αρκετές ομάδες, τόσο σε πειραματόζωα (117) όσο και στον άνθρωπο (119,124,125), ότι τα φορτισμένα με αντιγόνα ώριμα ΔΚ διατηρούν τις ανοσοφαινοτυπικές και αντιγονοπαρουσιαστικές τους ιδιότητες μετά την κρυοκατάψυξη και ότι ενδείκνυνται και για κλινική χρήση (118). Άρα λοιπόν, η χρήση αποψυγμένων ΔΚ είναι δικαιολογημένη στα πλαίσια αυτής της μελέτης.

Η διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων είναι δυνατή με τη μέθοδο της ηλεκτρικής διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης (electroporation)

Για τη φόρτιση των ΔΚ των ασθενών με το ολικό αντιγονικό φορτίο των μυελωματικών τους κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη εναλλακτική μέθοδος: η ηλεκτρική διάτρηση των μεμβρανών των ΔΚ (electroporation). Το electroporation είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου απευθείας σε ζωντανά κύτταρα. Η αύξηση της διαπερατότητας οφείλεται πιθανότατα στην παροδική δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Όταν ένα κύτταρο εκτίθεται στη δράση ενός ηλεκτρικού πεδίου, τα συστατικά της μεμβράνης του πολώνονται μέχρι τη δημιουργία μιας διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού. Εάν η διαφορά δυναμικού που παράγεται με αυτόν τον τρόπο αγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (που ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου), η κυτταρική μεμβράνη αποδιοργανώνεται ή διασπάται σε διάφορα σημεία, και το κύτταρο γίνεται διαπερατό σε διάφορα εξωγενή μόρια. Ο πλήρης μηχανισμός δεν είναι ακόμα εντελώς κατανοητός (35).

Για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων του electroporation είναι απαραίτητη η χρήση μιας πρωτεΐνης-δείκτη, της οποίας η έκφραση από τα διαμολυσμένα κύτταρα θα είναι εύκολα ανιχνεύσιμη. Στη μεγάλη πλειοψηφία των μελετών έχει χρησιμοποιηθεί η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), της οποίας η έκφραση απεικονίζεται αποτελεσματικά με μικροσκόπιο φθορισμού ή κυτταρομετρία ροής. Με εφαρμογή τέτοιων τεχνικών έχει αποδειχθεί η ανωτερότητα του electroporation για τη διαμόλυνση κυττάρων με συγκεκριμένα γονίδια συγκριτικά με τη χρήση λιπιδικών βοηθημάτων, την ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέα και την παθητική διάχυση των νουκλεϊκών οξέων (96,123,131). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο GFP πλασμίδιο, βελτιωμένο σε σχέση με το wild type γονίδιο ως προς τη φωτεινότητα και τη διάρκεια ημιζωής της πρωτεΐνης και προσαρμοσμένο για έκφραση σε κύτταρα

θηλαστικών. Έγινε *in vitro* μεταγραφή του πλασμιδίου και χρήση του παραγόμενου GFP mRNA για τις δοκιμές του electroporation σε άωρα ΔΚ υγιών δοτών, ώστε να προσδιοριστούν οι καλύτερες συνθήκες για τη διαμόλυνση των άωρων ΔΚ των ασθενών με το ολικό RNA των μυελωματικών τους κυττάρων. Προτιμήθηκε η χρήση RNA -και όχι DNA- καθώς είναι γνωστό ότι η διαμόλυνση των ΔΚ με πλασμιδιακό DNA είναι σαφώς λιγότερο αποδοτική σε σχέση με το mRNA (35,96). Πράγματι, στα αρχικά πειράματα που έγιναν απευθείας με το GFP πλασμίδιο το μέγιστο ποσοστό διαμόλυνσης σημειώθηκε σε ΜΚΠΑ και ήταν της τάξης του 15%, ενώ στα ΔΚ δεν ξεπέρασε το 5%. Μια ακόμη προτιμότερη προσέγγιση θα ήταν ίσως η χρήση mRNA των μυελωματικών κυττάρων, δεδομένου ότι το ολικό RNA απαρτίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό του από τα ριβοσωμικά RNA, γεγονός που θα μπορούσε να έχει συνέπειες στην ειδικότητα των CTLs που επάγονται. Όμως η απομόνωση του mRNA από περιορισμένο αριθμό κυττάρων θα ήταν προβληματική από την άποψη τόσο των απωλειών όσο και της ακεραιότητας των mRNA μορίων, γι' αυτό και δεν εφαρμόστηκε. Εξάλλου, η μέθοδος εκχύλισης ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε παρέχει έναν σχετικό εμπλουτισμό για το mRNA, εφόσον απομακρύνει τα <200bp μόρια, όπως τα μικρά rRNAs και τα tRNAs, που απαρτίζουν το 15-20% του ολικού RNA. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι με τη διαμόλυνση των ΔΚ με ολικό RNA ή mRNA καρκινικών κυττάρων δεν διαπιστώνονται διαφορές ως προς τη δράση των επαγόμενων CD8⁺ T-κυττάρων (121,123).

Για τη χορήγηση του ηλεκτρικού παλμού επιλέχθηκε συσκευή square wave electroporation σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, που αναφέρουν καλύτερα ποσοστά διαμόλυνσης και επιβίωσης των ΔΚ με αυτόν τον τύπο συσκευών (125-127,131) σε σχέση με τις συσκευές exponential decay electroporation (81,96,119,121-124,128-130). Είναι γνωστό ότι κύτταρα μεγάλου μεγέθους, όπως τα ΔΚ, χρειάζονται μικρής έντασης ηλεκτρικό πεδίο για τη διαμόλυνσή τους και ότι για τα κύτταρα φυτών και θηλαστικών η απαιτούμενη ένταση είναι της τάξης των 0,25-3kV/cm. Ξεκινώντας από τα 2kV/cm και μέχρι τα 1,25kV/cm, συνθήκες στις οποίες αναφέρονται άριστα ποσοστά διαμόλυνσης και βιωσιμότητας των ΔΚ με την ίδια συσκευή, της τάξης του 90% (126,127), δεν παρατηρήθηκε στα δικά μας πειράματα ανιχνεύσιμη έκφραση GFP με κυτταρομετρία ροής. Αντιθέτως, τα καλύτερα αποτελέσματα σημειώθηκαν σε χαμηλότερης έντασης ηλεκτρικά πεδία,

0,75-0,9kV/cm, με διαμόλυνση των ΔΚ που κυμαινόταν μεταξύ 70% και 80%. Το μέγιστο ποσοστό διαμόλυνσης σημειώθηκε στις 48 ώρες μετά το electroporation, και η έκφραση GFP διατηρούνταν σε καλά επίπεδα για μία εβδομάδα τουλάχιστον. Η βιωσιμότητα των ΔΚ που δέχτηκαν ηλεκτρικό παλμό απουσία mRNA διατηρείται σε πολύ καλά επίπεδα στις συνθήκες αυτές, ξεκινώντας από 80% στις 24 ώρες και παραμένοντας υψηλότερη από 70% μία εβδομάδα μετά το electroporation. Με άλλα λόγια, η χορήγηση του ηλεκτρικού παλμού στις συνθήκες αυτές δεν είναι ιδιαίτερα βλαπτική για τα κύτταρα. Λιγότερο ικανοποιητική είναι η διατήρηση της βιωσιμότητας για τα διαμολυσμένα ΔΚ, όπου η χρήση 16μg mRNA έχει αποτέλεσμα την πτώση της βιωσιμότητας στο 40% μία εβδομάδα μετά το electroporation, ξεκινώντας από 80% στις 24 ώρες. Είναι ίσως αναμενόμενο ένα τέτοιο ποσοστό θανάτου των ΔΚ, δεδομένου ότι η έκφραση της GFP πρωτεΐνης έχει ένα βαθμό τοξικότητας για τα κύτταρα των θηλαστικών. Όμως, η μείωση της βιωσιμότητας με την πάροδο του χρόνου αντισταθμίζεται από τη διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα, κάτι που έχει σημασία για τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, όπου η επαγωγή των ειδικών λεμφοκυττάρων γίνεται με εβδομαδιαίες επαναδιεγέρσεις από φορτισμένα με ολικό RNA ΔΚ. Σε αντίθεση με τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ, στην περίπτωση του RNA για την επαναληπτική διέγερση των λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα και όχι αποψυγμένα διεγερμένα ΔΚ. Η επίδραση της κρυοκατάψυξης στη βιωσιμότητα των ήδη καταπονημένων από το electroporation ΔΚ θα ήταν σίγουρα αρνητική. Τέλος, είναι ενδιαφέρον το ότι οι μεγάλες ποσότητες mRNA, αντίθετα ίσως από αυτό που θα περίμενε κανείς, δεν διασφαλίζουν υψηλότερα ποσοστά διαμόλυνσης. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στη δυσμενή επίδραση που έχουν στη βιωσιμότητα των ΔΚ, η οποία ήταν αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας mRNA με την οποία γίνεται το electroporation.

Αν και η πλέον συνηθισμένη πειραματική οδός περιλαμβάνει διαμόλυνση των άωρων ΔΚ και επακόλουθη ωρίμανση, έχουν προταθεί και εναλλακτικές οδοί, όπως electroporation σε μονοκύτταρα, προκειμένου να μειωθούν οι χρόνοι της προετοιμασίας των ΔΚ και το κόστος των αναλωσίμων (128) ή electroporation σε ώριμα ΔΚ, το οποίο εμφανίζεται εξίσου αποτελεσματικό, ίσως και αποτελεσματικότερο, στην επαγωγή CTLs (124,125). Στην παρούσα μελέτη η διαμόλυνση με το ολικό RNA έγινε στα άωρα ΔΚ των ασθενών, σε αναλογία με τη

φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Αμέσως μετά τη χορήγηση του ηλεκτρικού παλμού, τα ΔΚ επωάζονταν σε θρεπτικό υλικό παρουσία TNFα για 24 ώρες, προκειμένου να ωριμάσουν, και στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν για την επαγωγή ειδικών T κυττάρων.

Ο έλεγχος του εύρους των παραγόμενων κυτταροκινών φλεγμονής επικεντρώθηκε, όπως και για τη διέγερση με αποπτωτικά σωμάτια, στα ώριμα ΔΚ, ώστε να διαπιστωθούν οι όποιες επιδράσεις της φόρτισης με ολικό RNA. Δεν φάνηκε να υπάρχουν διαφορές στο ρεπερτόριο των εκκρινόμενων κυτταροκινών μεταξύ των δύο μεθόδων αντιγονικής διέγερσης των ΔΚ. Βασική κυτταροκίνη που εκκρίνουν τα ώριμα ΔΚ είναι και πάλι η IL-8, της οποίας η έκφραση αυξάνεται εντυπωσιακά στα διεγερμένα με ολικό RNA ΔΚ σε σχέση με τα μη διεγερμένα ώριμα ΔΚ, χωρίς όμως οι παρατηρούμενες διαφορές να φτάνουν σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Οι υπόλοιπες κυτταροκίνες δεν ανιχνεύονται σε σημαντικά επίπεδα, όπως και στα φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ. Η απουσία IL-6 από τα υπερκείμενα των διεγερμένων με ολικό RNA ΔΚ φαίνεται εκ πρώτης όψεως να τα διαφοροποιεί από τα διεγερμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ. Όμως το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται πιθανότατα σε τεχνικούς παράγοντες, καθώς οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών για την περίπτωση του ολικού RNA αναφέρονται σε μεγαλύτερο όγκο θρεπτικού υλικού και σε μικρότερο αριθμό κυττάρων σε σχέση με την άλλη κατηγορία, δεδομένης της επίδρασης του electroporation στη βιωσιμότητα των ΔΚ. Φαίνεται εξάλλου και στους υγιείς δότες το πόσο χαμηλή είναι η συγκέντρωση της IL-6 σε σχέση με την IL-8. Άρα λοιπόν, τα πολύ χαμηλά επίπεδα IL-6 στα υπερκείμενα ΔΚ διεγερμένων με ολικό RNA δεν έχουν ειδική σημασία.

Η επαγωγή T-λεμφοκυττάρων με ειδική δράση έναντι του ΠΜ επιτυγχάνεται *in vitro* και με τις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ ασθενών με ΠΜ

Για τον έλεγχο της ικανότητας των ώριμων ΔΚ των ασθενών για ειδική διέγερση των λεμφοκυττάρων, εφαρμόστηκαν δοκιμασίες μέτρησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατόπιν 5ήμερης καλλιέργειας των ΜΚΠΑ των ασθενών με αυτόλογα ΔΚ φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια. Οι δοκιμασίες αυτές έδωσαν τις πρώτες ενδείξεις υπέρ της ικανότητας των *ex vivo* διεγερμένων ΔΚ για πρόκληση ειδικού λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το επόμενο βήμα προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι ενδείξεις αυτές ήταν η *in vitro* έκπτυξη λεμφοκυτταρικών κλώνων των ασθενών από τα φορτισμένα με αντιγόνα του ΠΜ ΔΚ και ο έλεγχος της ειδικότητας των κλώνων αυτών με δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και ELISpot. Για το σκοπό αυτό, τα λεμφοκύτταρα των ασθενών συγκαλλιεργήθηκαν με αυτόλογα ώριμα ΔΚ, φορτισμένα είτε με αποπτωτικά σωμάτια είτε με ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων, παρουσία IL-2. Τα λεμφοκύτταρα επαναδιεγείρονταν εβδομαδιαία με ώριμα ΔΚ, με τρεις συνολικούς κύκλους διέγερσης, και συλλέγονταν την 17^η-21^η ημέρα της καλλιέργειας για ανοσοφαινοτυπικό έλεγχο με κυτταρομετρία ροής και για χρήση στις δοκιμασίες ελέγχου.

Η κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι οι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί που επάγονται είτε από ΔΚ φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια είτε από ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA περιέχουν τόσο CD4 βοηθητικά όσο και CD8 κυτταροτοξικά T-κύτταρα σε ποσοστά που δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν μάλλον αναμενόμενο για την περίπτωση της διέγερσης με αποπτωτικά σωμάτια. Είναι γνωστό ότι η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων από τα ΔΚ οδηγεί σε επεξεργασία των αντιγόνων μέσω της κλασικής εξωγενούς οδού και παρουσίασή τους στα CD4 Ths από μόρια HLA τάξης II, αλλά και σε παρουσίαση στα CD8 CTLs από μόρια HLA τάξης I με το μηχανισμό της διασταυρούμενης παρουσίασης. Η τελευταία προϋποθέτει τη διαφυγή των αντιγόνων από τα ενδοσώματα και την έξοδό τους στο

κυτταρόπλασμα, όπου αποκτούν πρόσβαση στο πρωτεάσωμα και στην κλασική ενδογενή οδό επεξεργασίας (23). Αντιθέτως, στην περίπτωση της φόρτισης με ολικό RNA η έκπτυξη CD4 κυτάρων δεν ήταν αναμενόμενη, καθώς τα mRNAs που μεταφέρονται με αυτόν τον τρόπο στα ΔΚ μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθούν την ενδογενή οδό επεξεργασίας και παρουσίασης των αντιγόνων σε μόρια HLA τάξης I, διεγείροντας έτσι CD8 CTLs. Εντούτοις, υπάρχουν και άλλες μελέτες που αναφέρουν την έκπτυξη CD4 πληθυσμών από ΔΚ φορτισμένα με RNA (97,98,121,122,159). Φαίνεται ότι υπάρχει κάποια «διαρροή» των κυτταροπλασματικών αντιγόνων προς τις λυσοσωμικές/ενδοσωμικές περιοχές των ΔΚ, όπου αποκτούν πρόσβαση στην εξωγενή οδό επεξεργασίας και παρουσίασης από μόρια HLA τάξης II. Πιθανολογείται ότι στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται τα αυτοφαγοσώματα, ειδικές δομές του κυτταροπλάσματος, αλλά ο ακριβής μηχανισμός είναι υπο διερεύνηση. Δεδομένου ότι η παρουσία CD4 βοηθητικών κυτάρων είναι κρίσιμη για την επαγωγή και τη διατήρηση ισχυρών αντινεοπλασματικών απαντήσεων *in vivo*, φαίνεται ότι καμία από τις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ δεν υστερεί, τουλάχιστον ως προς τη σύσταση των επαγόμενων T λεμφοκυτταρικών πληθυσμών.

Άλλο ένα ενδιαφέρον εύρημα της κυτταρομετρίας ροής ήταν τα χαμηλά ποσοστά NK και NKT κυτάρων στους εκπτυγμένους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς των δύο ομάδων ασθενών, παρα την προσθήκη IL-2 στην καλλιέργεια, που θα μπορούσε να διεγείρει κύτταρα με φυσική κυτταροκτόνο δράση (lymphokine activated killers, LAK cells). Έχει αναφερθεί ότι τα NK κύτταρα εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση έναντι μυελωματικών κυτταρικών σειρών και δειγμάτων μυελού από ασθενείς με ΠΜ (80), όπως επίσης ότι τα φορτισμένα με τον ιδιότυπο ΔΚ ασθενών αποτελούν στόχους για τα αυτόλογα NK κύτταρα (79). Η μικρή περιεκτικότητα των επαγόμενων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε NK κύτταρα υποδεικνύει την απουσία φυσικής κυτταροκτόνου δράσης και συνηγορεί υπέρ της ειδικότητας της δράσης των κυτάρων αυτών.

Η εκτίμηση της αντιμυελωματικής δράσης των διεγερμένων με τις δύο εναλλακτικές μεθόδους CD8 CTLs έγινε με δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας, οι οποίες έδειξαν ότι τόσο τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια όσο και τα φορτισμένα με ολικό RNA ΔΚ έχουν την ικανότητα επαγωγής CD8 κυτάρων με ισχυρή και ειδική κυτταροτοξική δράση έναντι αυτόλογων μυελωματικών

κυττάρων-στόχων. Η αναστολή των CD8 λεμφοκυττάρων με χρήση του αντίστοιχου μονοκλωνικού αντισώματος σχεδόν καταργεί κάθε κυτταροτοξική δράση, συμπληρώνοντας έτσι τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής που υποδεικνύουν την απουσία φυσικής κυτταροκτόνου δραστηριότητας. Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα φορτισμένα με ολικό RNA ΔΚ επάγουν CD8 CTLs με ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση έναντι των μυελωματικών κυττάρων σε σχέση με τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ. Παρόμοιες αναφορές έχουν γίνει και από τις άλλες τρεις μελέτες που συγκρίνουν αυτές τις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ (97,98,99). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το electroporation εξασφαλίζει καλύτερη πρόσβαση των αντιγονικών πεπτιδίων στην ενδογενή οδό επεξεργασίας και παρουσίασης από τα HLA τάξης I σε σχέση με τη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η διασταυρούμενη παρουσίαση των εξωγενών αντιγόνων, που προϋποθέτει ένα βαθμό «διαρροής» των αντιγόνων στο κυτταρόπλασμα, είναι λιγότερο αποδοτική από την κυτταροπλασματική έκφραση των αντιγόνων που παρέχει το electroporation.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, οι *in vitro* εκπτυγμένοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί και των δύο ομάδων ασθενών περιείχαν σημαντικά ποσοστά CD4 κυττάρων, και μάλιστα τα CD4 Ths ήταν κατά μέσο όρο περισσότερα από τα CD8 CTLs. Εξαιτίας αυτών των δεδομένων ήταν αναγκαία η διερεύνηση της λειτουργίας αυτών των CD4 βοηθητικών κυττάρων, προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητά τους για επαγωγή Th1 ανοσιακών αποκρίσεων. Ως γνωστόν, τα Th1 κύτταρα εκκρίνουν κυρίως IFN- γ , IL-2 και TNF α και εμπλέκονται στην κυτταρική ανοσία, ενώ τα Th2 κύτταρα συνθέτουν IL-4, IL-5, IL-6 και IL-10 και σχετίζονται με τη χυμική ανοσία και τις αλλεργικές αντιδράσεις. Η διέγερση Th1 απαντήσεων, που συνήθως ανιχνεύεται μέσω της παραγωγής IFN- γ , θεωρείται κρίσιμη για την επιτυχία των πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του καρκίνου. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η αναλογία Th1/Th2 κυττάρων είναι μετατοπισμένη υπέρ των Th2 σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες (63), όπως επίσης ότι τα Th1 κύτταρα παρουσιάζουν καταστολή σε ασθενείς με ΠΜ (134,135,136). Άρα λοιπόν, η παρουσία CD4 κυττάρων με ικανότητα επαγωγής αντιμυελωματικών Th1 ανοσιακών αποκρίσεων εντός των *in vitro* διεγερμένων λεμφοκυτταρικών κλώνων των ασθενών είναι επιθυμητή.

Για την ανίχνευση των Th1 κυττάρων με ικανότητα ειδικής έκκρισης IFN- γ χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ELISpot, που θεωρείται ιδανική για την εκτίμηση των ανοσιακών απαντήσεων έναντι αντιγονικών ερεθισμάτων ή μετά από ανοσοθεραπεία. Έχει δε χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των αντιγονοειδικών CD4 και CD8 αποκρίσεων. Διαπιστώθηκε ότι τόσο οι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί που διεγείρονται από ΔΚ φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια όσο και εκείνοι που διεγείρονται από ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA περιέχουν κύτταρα με ικανότητα ειδικής έκκρισης IFN- γ κατόπιν επώασης με αυτόλογα μυελωματικά κύτταρα. Για τον έλεγχο της ταυτότητας των κυττάρων-παραγωγών IFN- γ χρησιμοποιήθηκαν αντι-CD4 και αντι-CD8 μονοκλωνικά αντισώματα, ώστε να ανασταλούν οι αντίστοιχοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί. Όπως φάνηκε από τα πειράματα αυτά, τόσο στον CD4⁺ όσο και στον CD8⁺ πληθυσμό υπάρχουν κύτταρα με ικανότητα ειδικής έκκρισης IFN- γ (Th1 και Tc1 αντιστοίχως). Τέλος, διαπιστώθηκε ότι τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωμάτια ΔΚ επάγουν υψηλότερες συχνότητες κυττάρων-παραγωγών IFN- γ σε σχέση με τα φορτισμένα με ολικό RNA ΔΚ. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις άλλες τρεις μελέτες (97,98,99), οι οποίες αναφέρουν μεγαλύτερες συχνότητες κυττάρων-παραγωγών IFN- γ στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που επάγονται από ΔΚ φορτισμένα με ολικό RNA. Ο περιορισμένος αριθμός δοκιμασιών ELISpot που έγιναν στα πλαίσια αυτής της μελέτης δεν επιτρέπει την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων. Είναι πιθανό όμως το αποτέλεσμα αυτό να υποδηλώνει την ανωτερότητα της φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών σωματίων στην επαγωγή ειδικών CD4⁺ βοηθητικών κυττάρων. Αυτός ο μηχανισμός ενδεχομένως εξασφαλίζει καλύτερη πρόσβαση των αντιγονικών πεπτιδίων στην εξωγενή οδό παρουσίασης από μόρια HLA τάξης II σε σχέση με το electroporation, δεδομένου ότι μικρή μόνο ποσότητα αντιγόνων που παράγονται από την κυτταροπλασματική έκφραση των mRNAs διαφεύγει προς τα ενδοσώματα/λυσosώματα των ΔΚ και το κλασικό εξωγενές μονοπάτι.

Παράγοντες που σχετίζονται με την ανοσιακή ανταπόκριση των ασθενών στη διέγερση των ΔΚ *in vitro*

Όπως έδειξαν οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και ELISpot, οι ανοσιακές απαντήσεις *in vitro* και στις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ ήταν ανιχνεύσιμες σε μεγάλη συχνότητα και ειδικές. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των ασθενών στους οποίους υπήρξε επιτυχής η επαγωγή T κυττάρων με αντιμυελωματική δράση κυμάνθηκε σε συγκρίσιμα επίπεδα μεταξύ των δύο ομάδων, 84,6% για τη φόρτιση με αποπτωτικά σωμάτια και 85,7% για τη φόρτιση με ολικό RNA. Η ισχύς της ανοσιακής απάντησης μπορεί να εκτιμηθεί με βάση το βαθμό ανίχνευσης κυτταροτοξικότητας σε αυξανόμενες αναλογίες δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων. Από τους 16 ασθενείς στους οποίους έγιναν δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας, 10 ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά (παρουσίασαν δηλαδή σταθερή αύξηση της κυτταροτοξικότητας σε αυξανόμενες αναλογίες δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων), 3 ανταποκρίθηκαν μερικώς (ανιχνεύθηκε κυτταροτοξική δραστηριότητα σε μία μόνο αναλογία δραστικών κυττάρων:κυττάρων-στόχων) και 3 δεν είχαν ανιχνεύσιμη κυτταροτοξική απόκριση. Η ηλικία των ασθενών και το στάδιο της νόσου τους δεν είχαν επίδραση στην έκβαση των πειραμάτων. Ο παράγοντας που φάνηκε να διαφοροποιεί τα αποτελέσματα ήταν η χημειοθεραπεία που είχαν λάβει οι ασθενείς πριν από τη δειγματοληψία. Σημειώνεται ότι στην παρούσα ερευνητική εργαστηριακή μελέτη, η λήψη περιφερικού αίματος για την απομόνωση των ΜΚΠΑ έγινε κατόπιν χορήγησης θεραπευτικής αγωγής και όταν το επέτρεπε η κατάσταση των ασθενών, για λόγους ιατρικής δεοντολογίας. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ασθενείς που επέδειξαν μειωμένη ή καμία ανταπόκριση είχαν λάβει 4 ή περισσότερους κύκλους θεραπείας, σε αντίθεση με εκείνους που ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά. Είναι λοιπόν λογικό να υποθέσει κανείς ότι ο βαθμός της προηγηθείσας χημειοθεραπείας μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των αντιμυελωματικών ανοσιακών αποκρίσεων που επάγονται από τα *in vitro* διεγερμένα ΔΚ των ασθενών. Δεδομένου ότι τα ΔΚ ελέγχθηκαν για τη λειτουργικότητά τους, είναι πιθανό τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται σε καταστολή των λεμφοκυττάρων, η

ικανότητα των οποίων για διέγερση από τα ΔΚ μπορεί να επηρεάζεται αρνητικά από τη χημειοθεραπεία. Υπάρχει άλλη μία μελέτη που αναφέρει ανεπαρκή *ex vivo* επαγωγή ειδικών T κυττάρων σε ασθενείς με ΠΜ σταδίου III που είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία με 1-4 κύκλους VAD (vincristine, doxorubicin και δεξαμεθαζόνη) και αυτόλογη μεταμόσχευση (137). Θα ήταν ενδεχομένως χρήσιμο, στα πλαίσια κλινικών πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας, η συλλογή των μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος να γίνεται στην αρχική διάγνωση της νόσου, πριν τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων που ίσως επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των κυττάρων.

Άλλος ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι το ενδεχόμενο της έκπτυξης T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν μερικώς ή καθόλου στην *ex vivo* διέγερση των ΔΚ τους. Είναι γνωστό ότι τα άωρα ΔΚ επάγουν Tg1 ρυθμιστικά κύτταρα, ενώ τα ώριμα ΔΚ επάγουν αποδοτικά τόσο δραστικά T κύτταρα όσο και Tregs (37,38,142,143). Η παράλληλη έκπτυξη T-ρυθμιστικών κυττάρων είναι απαραίτητη για τον έλεγχο του εύρους των ανοσιακών αποκρίσεων, και γίνεται πλέον φανερό ότι η ισορροπία μεταξύ των πληθυσμών των δραστικών T κυττάρων και των Tregs είναι κρίσιμη για την έκβαση των εμβολιασμών με ΔΚ (60). Έχει αναφερθεί η *in vitro* και *in vivo* επαγωγή Tregs σε ασθενείς με ΠΜ από ΔΚ που έχουν ωριμάσει με προσθήκη κυτταροκινών (139). Υπάρχουν δύο μελέτες που αναφέρουν επαγωγή T-ρυθμιστικών κυττάρων από ΔΚ που έχουν διεγερθεί με υλικό προερχόμενο από λύση μυελωματικών κυττάρων (85,138), όπως επίσης και μία αναφορά ελαττωματικής επαγωγής Th1 απαντήσεων και σημαντικής έκπτυξης CD4⁺/CD25⁺ ρυθμιστικών κυττάρων από ΔΚ υγιών δοτών που είχαν ωριμάσει με προσθήκη TNFα ή/και CD40 ligand (140). Αντιθέτως, έχει αναφερθεί από διαφορετική ομάδα ότι η ωρίμανση με TNFα/CD40 ligand μπορεί να μετριάσει την κατασταλτική δράση της IL-10 στη λειτουργία των ΔΚ (141). Στην παρούσα μελέτη, ο ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος των ΔΚ των ασθενών επιβεβαίωσε την ωρίμανσή τους, τουλάχιστον ως προς την έκφραση αντιγόνων επιφανείας. Επιπλέον, η απουσία IL-10 από τα υπερκείμενα των ώριμων διεγερμένων ΔΚ των ασθενών, βασικής κυτταροκίνης για τα T-ρυθμιστικά κύτταρα, συνηγορεί υπέρ της ανοσογονικότητας αυτών των ΔΚ. Εντούτοις, είναι γεγονός ότι οι *in vitro* εκπτυγμένοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί των ασθενών περιείχαν μεγάλα ποσοστά CD4 κυττάρων στα οποία δεν έγινε περαιτέρω

ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος. Δεν μπορεί λοιπόν να αποκλειστεί η έκπτυξη Tregs με κατασταλτική δράση στους 6 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν μερικώς ή καθόλου στην *ex vivo* διέγερση των ΔΚ τους.

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι και οι δύο εναλλακτικές μέθοδοι *ex vivo* διέγερσης των ΔΚ, με αποπτωτικά σωμάτια ή ολικό RNA μυελωματικών κυττάρων, είναι αποδοτικές στην *in vitro* επαγωγή ειδικών ανοσιακών αποκρίσεων στην πλειοψηφία των ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν. Η φόρτιση των ΔΚ με το ολικό αντιγονικό φορτίο των νεοπλασματικών κυττάρων αποτελεί μία υποσχόμενη προσέγγιση που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω στα πλαίσια της ανοσοθεραπείας του ΠΜ, παράλληλα με τις τρέχουσες ερευνητικές προσπάθειες γύρω από τη βελτιστοποίηση των εμβολιασμών με τον ιδιότυπο, την αναζήτηση αντιγονικών στόχων (MUC-1, cancer-testis αντιγόνα, αντιγόνο HM1.24, πρωτεΐνες θερμικού σοκ) και την αξιολόγηση της κλινικής χρήσης των NK και NKT κυττάρων (144-159). Η εφαρμογή αυτής της ανοσοθεραπευτικής μεθόδου σε ασθενείς με ΠΜ μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, όταν το φορτίο της νόσου έχει ελαχιστοποιηθεί και συνεπώς τα διεγερμένα ΔΚ είναι δυνατό να έχουν καλύτερη δράση *in vivo*, αποτελεί μία ενδιαφέρουσα και κλινικά εφικτή προοπτική.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ είναι λειτουργικά ανεπαρκή *in vivo*, αλλά είναι δυνατή η παραγωγή ΔΚ από τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος με τα ανοσοφαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ΔΚ από υγιείς δότες.
- Με τη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων ή τη διαμόλυνση με το ολικό RNA αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων είναι δυνατή η *ex vivo* διέγερση των ΔΚ των ασθενών με ΠΜ με το σύνολο των αντιγόνων του όγκου τους. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την επιλογή των πλέον ανοσοεπικρατών αντιγόνων προς παρουσίαση από τα ίδια τα ΔΚ. Πλεονεκτεί δε συγκριτικά με τη χρήση του ιδιότυπου ή άλλων μεμονωμένων αντιγόνων ή πεπτιδίων, που ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανοσιακής διαφυγής του όγκου ή παρουσιάζουν HLA περιορισμό.
- Τα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ, που έχουν διεγερθεί *ex vivo* με το ολικό αντιγονικό φορτίο αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων, έχουν την ικανότητα να επάγουν ειδικά CD4 βοηθητικά και CD8 κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα έναντι του όγκου. Αν και ειδικές ανοσιακές απαντήσεις επιτυγχάνονται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, είναι δυνατό η ισχύς τους να επηρεάζεται αρνητικά από την επαγωγή T-ρυθμιστικών κυττάρων ή από την ανοσοκατασταλτική δράση της προηγηθείσας θεραπείας του μυελώματος.
- Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, που προέκυψαν *in vitro* από τη διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με το ολικό αντιγονικό φορτίο του όγκου τους, μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό κλινικών μελετών ανοσοθεραπείας του ΠΜ. Η θεραπεία με *ex vivo* διεγερμένα ΔΚ σε κατάλληλη φάση της νόσου, όπως μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση, θα μπορούσε να ελεγχθεί εάν συνεισφέρει στη βελτίωση της ύφεσης και την πρόληψη της υποτροπής του ΠΜ, σε συνδυασμό με τις τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ΔΚ των ασθενών με ΠΜ παρουσιάζουν λειτουργική διαταραχή λόγω της νόσου και δεν κινητοποιούν *in vivo* ανοσιακές απαντήσεις έναντι του όγκου. Μελέτες ανοσοθεραπείας με ΔΚ διεγερμένα *ex vivo* με τον ιδιότυπο του ΠΜ δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Η φόρτιση των ΔΚ με το σύνολο των αντιγόνων του μυελωματικού κυττάρου ενδέχεται να πλεονεκτεί έναντι του ιδιότυπου, που είναι ασθενές αντιγόνο.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διέγερση ΔΚ ασθενών με ΠΜ με αντιγόνα του όγκου τους και ο έλεγχος της επαγωγής ανοσιακής απάντησης των Τ-λεμφοκυττάρων έναντι του ΠΜ. Στη μελέτη εισήχθησαν 20 ασθενείς με ΠΜ κατά τη διάγνωση ή σε φάση υποτροπής της νόσου. Η παραγωγή ΔΚ έγινε με καλλιέργεια μονοκυττάρων περιφερικού αίματος παρουσία GM-CSF και IL-4 για 6 ημέρες. Η απομόνωση αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων έγινε από δείγμα μυελού των οστών με θετική επιλογή με μαγνητικά μικροσφαιρίδια συζευγμένα με CD138 μονοκλωνικό αντίσωμα. Για τη διέγερση των ΔΚ χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών σωματίων από ακτινοβολημένα μυελωματικά κύτταρα σε 14 ασθενείς και η διαμόλυνση με ολικό RNA των κυττάρων αυτών με την τεχνική της ηλεκτρικής διάτρησης της μεμβράνης (electroporation) σε 7 ασθενείς. Μετά τη διέγερση ακολούθησε ωρίμανση των ΔΚ με προσθήκη TNFα για 24-48 ώρες. Τα *ex vivo* διεγερμένα ώριμα ΔΚ των ασθενών ελέγχονταν ως προς το εύρος των κυτταροκινών που παράγουν με τεχνικές κυτταρομετρίας ροής. Στη συνέχεια γινόταν συγκαλλιέργεια αυτών των ΔΚ με αυτόλογα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος παρουσία IL-2 με σκοπό την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων, που συλλέγονταν μετά από 17-21 ημέρες, ελέγχονταν με κυτταρομετρία ροής. Για τον έλεγχο της ειδικής ανοσιακής απάντησης των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων, χρησιμοποιήθηκε χρωματομετρική δοκιμασία κυτταροτοξικότητας έναντι αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων-στόχων (15 ασθενείς) ή μέτρηση των κυττάρων που παράγουν IFNγ μετά από διέγερση με αυτόλογα μυελωματικά κύτταρα με την τεχνική ELISpot (5 ασθενείς).

Σε όλους τους ασθενείς κατέστη δυνατή η παραγωγή ΔΚ μονοκυτταρικής προέλευσης, που εξέφραζαν ισχυρά CD1α, HLA-DR, CD80/86 και CD83 (μετά από ωρίμανση) και ήταν λειτουργικά σε μεικτές καλλιέργειες με αλλογενή T-λεμφοκύτταρα. Από ποσότητα μυελού οστών 10 ml, ήταν δυνατή η απομόνωση ικανού αριθμού CD138+ πλασματοκυττάρων και η παραγωγή αποπτωτικών σωματίων με έκφραση *annexin V* μετά από ακτινοβολήση με 30 Gy. Με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της τεχνικής *electroporation* επιτεύχθηκε διαμόλυνση των ΔΚ σε ποσοστό 80% των βιώσιμων κυττάρων, όπως διαπιστώθηκε σε παράλληλα πειράματα με mRNA πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Τα ώριμα ΔΚ των ασθενών, είτε κατόπιν αντιγονικής διέγερσης είτε όχι, παρήγαγαν υψηλά επίπεδα της χημειοκίνης IL-8 και χαμηλά εως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IL-10. Τα λεμφοκύτταρα που εκπτύσσονταν *in vitro* από τη συγκαλλιέργεια με διεγερμένα ΔΚ αποτελούνταν κυρίως από CD4+ (4,4-75,5%) και CD8+ (12,2-77,5%) T-κύτταρα, ενώ το ποσοστό των NK κυττάρων ήταν χαμηλό (0,5-15%). Στο 80% των περιπτώσεων διαπιστώθηκε μετρήσιμη (>10%) κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι αυτόλογων μυελωματικών κυττάρων, εξαρτώμενη από CD8+ T-κύτταρα που είχαν εκπτυχθεί μετά απο καλλιέργεια με ΔΚ διεγερμένα είτε με αποπτωτικά σωματία (9/11 ασθενείς) είτε με RNA (4/5 ασθενείς) μυελωματικών κυττάρων. Τα φορτισμένα με RNA ΔΚ ήταν ικανά για επαγωγή CD8 CTLs με ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση έναντι του ΠΜ σε σχέση με τα φορτισμένα με αποπτωτικά σωματία ΔΚ. Με την ELISpot ανιχνεύθηκαν ειδικές τόσο CD4 όσο και CD8-εξαρτώμενες T-κυτταρικές απαντήσεις σε ΔΚ διεγερμένα με αποπτωτικά σωματία (3/3 ασθενείς) ή με ολικό RNA (2/2 ασθενείς). Η συχνότητα των ειδικών T-κυττάρων ήταν 70-141 και 20-60 ανά 10^5 κύτταρα με τις δύο μεθόδους διέγερσης των ΔΚ αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, η *ex vivo* διέγερση των ΔΚ ασθενών με ΠΜ με το ολικό αντιγονικό φορτίο του όγκου τους είναι αποτελεσματική στην πρόκληση ειδικών ανοσιακών απαντήσεων και αποτελεί δυνητικά βάση για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του ΠΜ.

ABSTRACT

Immunobiology of dendritic cells - comparative study of in vitro stimulation of dendritic cells derived from multiple myeloma patients with apoptotic bodies or total RNA of myeloma cells.

Spyridoula Vasileiou

The dendritic cells (DCs) of patients with multiple myeloma (MM) are functionally defective and fail to induce tumor-specific immune responses *in vivo*. Immunotherapy trials using DCs stimulated *ex vivo* with the idiotype of MM have met with limited success so far. Loading of DCs with the total antigenic array of myeloma cells is possibly advantageous compared to the idiotype, which is weakly immunogenic.

The aim of the present doctorate thesis was the *ex vivo* stimulation of DCs from MM patients with autologous tumor antigens and the induction of myeloma-specific T-cell responses. 20 MM patients, either at initial diagnosis or at relapse, were enrolled in the study. DCs were produced by culture of peripheral blood monocytes for 6 days, in the presence of GM-CSF and IL-4. Autologous myeloma cells were isolated from bone marrow aspirates, using anti-CD138-conjugated magnetic microbeads. DCs were stimulated using two alternative methods: phagocytosis of apoptotic bodies derived from irradiated myeloma cells in 14 patients, or transfection with the total RNA of these cells by means of the electroporation technique in 7 patients. Stimulated DCs were left to mature for 24-48 hours with the addition of TNF α . The cytokine secretion profile of patients' *in vitro* stimulated mature DCs was assessed using flow cytometric techniques. Myeloma antigen-loaded DCs were subsequently cocultured with autologous peripheral blood mononuclear cells, in the presence of IL-2, in order to induce activation of T cells. Lymphocyte populations were harvested after 17-21 days of culture and were analyzed by flow cytometry. For assessment of the specificity of

ABSTRACT

immune responses of the *in vitro* expanded T-cells, a colorimetric cytotoxicity assay against autologous myeloma target cells was used in 15 patients. In the remaining 5 cases, the ELISpot technique was applied for enumeration of cells that secrete IFN- γ after stimulation by autologous myeloma cells.

Production of monocyte-derived DCs was feasible for all patients enrolled in the study. These cells exhibited significant expression of CD1 α , HLA-DR, CD80/86 and CD83 (after maturation) and were functional in allogeneic mixed lymphocyte reactions. Starting from 10ml volumes of bone marrow aspirates, it was possible to isolate sufficient numbers of CD138⁺ plasma cells and produce apoptotic bodies that expressed annexin V after irradiation with 30 Gy. After optimization of electroporation conditions, the percentage of viable DC transfection reached 80%, as demonstrated in parallel experiments performed with green fluorescent protein mRNA (GFP). Patients' mature DCs, either antigen-loaded or not, produced high levels of the chemokine IL-8 and low or untraceable levels of IL-10. The lymphocytes that were expanded *in vitro* by these stimulated DCs mainly consisted of CD4⁺ (4.4-75.5%) and CD8⁺ (12.2-77.5%) T cells, while the proportion of NK cells was small (0.5-15%). In 80% of cases, it was possible to detect significant (>10%) CD8⁺ cell-mediated cytotoxic activity against autologous myeloma cells. Expansion of anti-MM specific CD8 CTLs was successful in 9 out of 11 patients by the method of DC loading with myeloma cell apoptotic bodies, and 4 out of 5 patients by electrotransfection of DCs with myeloma cell RNA. The latter DCs were found more effective in terms of inducing CD8 CTLs with stronger target lysis compared to apoptotic body-loaded DCs. ELISpot analysis revealed the presence of CD4- and CD8-mediated specific T cell responses, that were induced either by apoptotic body-loaded DCs (3 out of 3 patients) or by RNA-loaded DCs (2 out of 2 patients). The frequency of IFN- γ -producing T-cells with regard to the method of DC stimulation was 70-141 and 20-60 per 10⁵ cells, respectively.

In conclusion, *ex vivo* stimulation of DCs from MM patients by whole-tumor antigen load is effective in the induction of MM-specific immune responses, and may potentially provide a platform for the development of MM immunotherapy protocols.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J. Banchereau, F. Briere, C. Caux et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18:767-811
2. J. Banchereau & R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392:245-252
3. K. Palucka & J. Banchereau. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J. Clin. Immunol.* 1999, 19(1):12-25
4. L. Fong & E.G. Engleman. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18:245-273
5. D.N.J. Hart. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997, 90(9):3245-3287
6. R.M. Steinman & Z.A. Cohn. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973, 137:1142
7. A. Ribas, L.H. Butterfield, J.S. Economou. Genetic immunotherapy for cancer. *The Oncologist* 2000, 5:87-98
8. W.R. Heath & F.R. Carbone. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19:47-64
9. P. Guermonprez, J. Valladeau, L. Zitvogel et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20:621-667
10. R. M. Steinman, D. Hawiger, M.C. Nussenzweig. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003, 21:685-694
11. A.E. Morelli & A.W. Thomson. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Rev. Immunol.* 2007, 7:610-621
12. R. Forster, A.C. Davalos-Misslitz, A. Rot. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Rev. Immunol.* 2008, 8:362-371
13. M. Colonna, G. Trinchieri, Y-J Liu. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunol.* 2004, 5(12):1219-1226

14. M. Gilliet, W. Cao, Y-J Liu. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Rev. Immunol.* 2008, 8:594-606
15. M.A. Degli-Esposti & M.J. Smyth. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Rev. Immunol.* 2005, 5:112-124
16. T. Walzer, M. Dalod, S. Robbins et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005, 106(7):2252-2258
17. M. Terme, E. Ullrich, N.F. Delahaye et al. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nature Immunol.* 2008, 9(5): 486-494
18. R.N. Germain. An innately interesting decade of research in immunology. *Nature Med.* 2004, 10(12):1307-1320
19. V. Cerundolo, J.D. Silk, H. Masri et al. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nature Rev. Immunol.* 2009, 9:28-38
20. V. Cerundolo, I.F. Hermans, M. Salio. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nature Immunol.* 2004, 5(1): 7-10
21. F.J. Hsu, C. Benike, F. Fagnone et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med.* 1996,2:52-58
22. C.G. Figdor, I.J.M. de Vries, W.Joost Lesterhuis et al. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Med.* 2004, 10(5):475-480
23. P.J Tacken, I.J.M. de Vries, R. Torensma et al. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nature Rev. Immunol.* 2007, 7:790-802
24. P. Brossart, S. Wirths, W. Brugger et al. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp. Hematol.* 2001, 29(11):1247-1255
25. J.W. Fay. Hematopoietic growth factors, dendritic cell biology, and vaccine therapy of cancer. *Curr. Op. Hematol.* 2002, 9(3):202-206
26. R.T. Costello, J. Rey, C. Fauriat et al. New approaches in the immunotherapy of haematological malignancies. *Eur. J. Haematol.* 2003, 70:333-345
27. E.R. Kaminski, R.V. Goddard, A.G. Prentice. Dendritic cells and their potential therapeutic role in haematological malignancy. *Leukemia&Lymphoma* 2003, 44(10):1657-1666

28. E.G. Engleman. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Semin. Oncol.* 2003, 30(3 suppl.8):23-29
29. D. Ridgway. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest.* 2003, 21(6):873-886
30. B. Mukherji, N.G. Chakraborty, S. Yamasaki et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells *in situ* in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 9:8078-8082
31. V. L. Reichardt, P. Brossart, L. Kanz. Dendritic cells in vaccination therapies of human malignant disease. *Blood Rev.* 2004, 18:235-243
32. A. Nencioni & P. Brossart. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. *Stem Cells* 2004, 22:501-513
33. S. Mocellin, G. Semenzato, S. Mandruzzato et al. Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. *Lancet Oncol.* 2004, 5:727-737
34. I. Mende & E.G. Engleman. Breaking tolerance to tumors with dendritic-cell based immunotherapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005, 1058:96-104
35. F. Grunebach, M.R. Muller, P. Brossart. RNA transfection of dendritic cells. *Methods Mol. Med.* 2005, 109:47-54
36. K. Podar & K. C. Anderson. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005, 105(4):1383-1395
37. J. Banchereau & A.K. Palucka. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Rev. Immunol.* 2005, 5:296-306
38. C. Reis e Sousa. Dendritic cells in a mature age. *Nature Rev. Immunol.* 2006, 6:476-483
39. R. M. Steinman & J. Banchereau. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007, 449:419-426
40. F. Meklat, Z. Li, Z. Wang et al. Cancer-testis antigens in haematological malignancies. *Br. J. Haemat.* 2007, 136:769-776
41. A.L.R. Van de Velde, Z.N. Berneman, V.F.I. Van Tendeloo. Immunotherapy of hematological malignancies using dendritic cells. *Bull. Cancer* 2008, 95(3):320-326
42. L. Zitvogel & G. Kroemer. Introduction: the immune response against dying cells. *Curr. Op. Immunol.* 2008, 20:501-503

43. A. Tesniere, L. Apetoh, F. Ghiringhelli et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Op. Immunol.* 2008, 20:504-511
44. L. Zitvogel,, N. Casares, M.O. Pequignot et al. Immune response against dying tumor cells. *Adv. Immunol.* 2004, 84:131-179
45. M. Bonmort, M. Dalod, G. Mignot et al. Killer dendritic cells: IKDC and the others. *Curr. Op. Immunol.* 2008, 20:558-565
46. F. D. Batista & N. E. Harwood. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Rev. Immunol.* 2009, 9:15-27
47. J. Epstein, R. Hoover, J. Kornbluth et al. Biological aspects of multiple myeloma. *Baillieres Clin. Haemat.* 1995, 4:721-734
48. Immunotherapy for multiple myeloma - insights and advances. *Semin. Hemat.* 1999, 36(1 suppl.3):1-42
49. P. A. Ruffini & L.W. Kwak. Immunotherapy of multiple myeloma. *Semin. Hemat.* 2001, 38(3):260-267
50. J. Kaufman & S. Lonial. Multiple myeloma: the role of transplant and novel treatment strategies. *Semin. Oncol.* 2004, 31(2 suppl. 4):99-105
51. M.S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz et al. Multiple myeloma. *Lancet* 2009, 374:324-339
52. S. Barille-Nion, B. Barlogie, R. Bataille et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology* 2003:248-278
53. J-L. Harousseau, J. Shaughnessy Jr., P. Richardson. Multiple Myeloma. *Hematology* 2004:237-256
54. Q. Yi. Dendritic cell- based immunotherapy in multiple myeloma. *Leukemia&Lymphoma* 2003, 44(12):2031-2038
55. CJ. Turtle, RD. Brown, DE. Joshua et al. DC in multiple myeloma immunotherapy. *Cytotherapy* 2004, 6(2):128-137
56. VL. Reichardt & P. Brossart. DC-based immunotherapy of B-cell malignancies. *Cytotherapy* 2004, 6(1):62-67
57. S.J. Harrison & G. Cook. Immunotherapy in multiple myeloma-possibility or probability? *Br. J. Haemat.* 2005, 130:344-362
58. S.J. Harrison, G. Cook, R.J.B. Nibbs et al. Immunotherapy of multiple myeloma: the start of a long and tortuous journey. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2006, 6(12):1769-1785

-
59. N.C. Munshi & R.H. Prabhala. Immune therapies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007, 21(6):1217-1221
60. F. van Rhee. Idiotype vaccination strategies in myeloma: how to overcome a dysfunctional immune system. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13(5):1353-1355
61. D.S. Ritchie. Plasma cell lysate as an antigen source in multiple myeloma immunotherapy. *Leukemia&Lymphoma* 2007, 48(10):1894-1895
62. Y. Adachi, N. Yoshio-Hoshino, N. Nishimoto. Gene therapy for multiple myeloma. *Curr. Gene Ther.* 2008, 8:247-255
63. H. Murakami, H. Ogawara, H. Hiroshi. Th1/Th2 cells in patients with multiple myeloma. *Hematology* 2004, 9(1):41-45
64. A.L. Shaffer, N.C. Tolga Emre, P.B. Romesser et al. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin. Cancer Res.* 2009, 15(9):2954-2961
65. D. Chauhan, A.V. Singh, M. Brahmandam et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 2009, 16(4):309-323
66. F. Sallusto & A. Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994, 179:1109-1118
67. N. Romani, D. Reider, M. Heuer et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 1996, 196:137-151
68. LJ Zhou & TF Tedder. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93:2588-2592
69. S.A. Rosenberg, J.C. Yang, N. P. Restifo. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Med.* 2004, 10:909-915
70. T. Hayashi, T. Hideshima, M. Akiyama et al. *Ex vivo* induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2003, 102:1435-1442
71. M. Ratta, F. Fagnoni, A. Curti et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 2002, 100:230-237
72. P. Chomarat, J. Banchereau, J. Davoust et al. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunol.* 2000, 1:510-514

73. C. Caux-Menetrier, G. Montmain, MC Dieu et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998, 92:4778-4791
74. C. Caux-Menetrier, MC Thomachot, L. Alberti et al. IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells . *Cancer Res.* 2001, 61:3096-3104
75. J. Xie, Y. Wang, ME Freeman 3rd et al. Beta 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit the *in vitro* generation of functional dendritic cells. *Blood* 2003, 101:4005-4012
76. RD Brown, B. Pope, A. Murray et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80(B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta(1) and interleukin-10. *Blood* 2001, 98:2992-2998
77. S. Pfeiffer, RP Gooding, JF Apperley et al. Dendritic cells generated from the blood of patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally identical to those similarly produced from healthy donors. *Br. J. Haemat.* 1997, 98:973-982
78. N. Raje, J. Gong, D. Chauhan et al. Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* 1999, 93:1487-1495
79. C. Zheng, M. Ostad, M. Andersson et al. Natural cytotoxicity to autologous antigen-pulsed dendritic cells in multiple myeloma. *Br. J. Haemat.* 2002, 118(3):778-785
80. C. Frohn, M. Hoppner, P. Schlenke et al. Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes. *Br. J. Haemat.* 2002, 119(3): 660-664
81. C. Milazzo, VL Reichardt, MR Muller et al. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood* 2003, 101:977-982
82. Y.J. Wen, M. Ling, R. Bailey-Wood et al. Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4:957-962

83. J. Lee, B. Choi, H. Kang et al. Induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocyte stimulation by dendritic cell pulsing with purified and optimised myeloma cell lysates. *Leukemia&Lymphoma* 2007, 48:2022-2031
84. YJ Wen, R. Min, G. Tricot et al. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 2002, 99:3280-3285
85. F. Fiore, B. Nuschak, S. Peola et al. Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35:1155-1163
86. K. Tarte, G. Fiol, J-F Rossi et al. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation *in vitro*. *Leukemia* 2000, 14:2182-2192
87. T.K. Hoffmann, N. Meidenbauer, G. Dworacki et al. Generation of tumor-specific T lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* 2000, 60:3542-3549
88. J.W.C. Chang, M. Peng, J.E. Vaquerano et al. Induction of Th1 response by dendritic cells pulsed with autologous melanoma apoptotic bodies. *Anticancer Res.* 2000, 20:1329-1336
89. M.V. Dhodapkar, J. Krasovsky, K. Olson. T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99(20):13009-13013
90. R. Spisek, A. Charalambous, A. Mazumder et al. Bortezomib enhances dendritic cell(DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 2007, 109(11):4839-4845
91. S. Cohen, J. Haimovich, N. Hollander. Dendritic cell-based therapeutic vaccination against myeloma: vaccine formulation determines efficacy against light chain myeloma. *J. Immunol.* 2009, 182:1667-1673
92. X. Hong, WU Qiu-ye, HU Hong-gang et al. Enhanced interferon- γ secretion and antitumor activity of T-lymphocytes activated by dendritic cells loaded with glycoengineered myeloma antigens. *Chin. Med. J.* 2007, 120(19):1678-1684

93. J. Michalek, D. Ocadlikova, E. Matejkova et al. Individual myeloma-specific T-cell clones eliminate tumour cells and correlate with clinical outcomes in patients with multiple myeloma. *Br. J. Haemat.* 2010, 148(6):859-867
94. S. Hao, X. Bi, S. Xu et al. Enhanced antitumor immunity derived from a novel vaccine of fusion hybrid between dendritic and engineered myeloma cells. *Exp. Oncol.* 2004, 26(4):300-306
95. B. Vasir, V. Borges, Z. Wu et al. Fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation. *Br. J. Haemat.* 2005, 129:687-700
96. V.F.I. Van Tendeloo, P. Ponsaerts, F. Lardon et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 2001, 98(1):49-56
97. S. Jarnjak-Jankovic, R.D. Pettersen, S. Saboe-Larssen et al. Evaluation of dendritic cells loaded with apoptotic cancer cells or expressing tumour mRNA as potential cancer vaccines against leukemia. *BMC Cancer* 2005, 5:20
98. S. Jarnjak-Jankovic, R.D. Pettersen, S. Saboe-Larssen et al. Preclinical evaluation of autologous dendritic cells transfected with mRNA or loaded with apoptotic cells for immunotherapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Gene Ther.* 2005, 12(8):699-707
99. F. Benencia, M.C. Courreges, G. Coukos. Whole tumor antigen vaccination using dendritic cells: comparison of RNA electroporation and pulsing with UV-irradiated tumor cells. *J. Transl. Med.* 2008, 6:21
100. S.A. Kalams & B. D. Walker. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 1998, 188(12):2199-2204
101. J.P. Ridge, F. Di Rosa, P. Matzinger. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998, 393:474-478
102. S.R. Bennett, F.R. Carbone, F. Karamalis et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998, 393:478-480

103. S.P. Schoenberger, R.E. Toes, E.I. van der Voort et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998, 393:480-483
104. M.A. Morse, H.Kim Lysterly, Y. Li. The role of IL-13 in the generation of dendritic cells *in vitro*. *J. Immunother.* 1999, 22(6):506-513
105. N. Romani, S. Gruner, D. Brang et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 1994, 180:83
106. A. Curti, A. Isidori, E. Ferri et al. Generation of dendritic cells from positively selected CD14⁺ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leukemia&Lymphoma* 2004, 45(7):1419-1428
107. S. Wang, S. Hong, J. Yang et al. Optimizing immunotherapy in multiple myeloma: restoring the function of patients' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK/ERK MAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. *Blood* 2006, 108(13):4071-4077
108. S. Wang, J. Yang, J. Qian et al. Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood* 2006, 107(6):2432-2439
109. D-H Yang, J-S Park, C-J Jin et al. The dysfunction and abnormal signaling pathway of dendritic cells loaded by tumor antigen can be overcome by neutralizing VEGF in multiple myeloma. *Leuk. Res.* 2009, 33:665-670
110. S. J. Harrison, I.M. Franklin, J.D. M. Campbell. Enumeration of blood dendritic cells in patients with multiple myeloma at presentation and through therapy. *Leukemia&Lymphoma* 2008, 49(12):2272-2283
111. H.M. Prince, D.M. Wall, D. Ritchie et al. *In vivo* tracking of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *J. Immunother.* 2008, 31:166-179
112. F. Vari, D.J. Munster, J.L. Hsu et al. Practical blood dendritic cell vaccination for immunotherapy of multiple myeloma. *Br. J. Haemat.* 2008, 143:374-377
113. J.L. Freeman, F. Vari, D.N.J. Hart. CMRF-56 immunoselected blood dendritic cell preparations activated with GM-CSF induce potent antimyeloma cytotoxic T-cell responses. *J. Immunother.* 2007, 30(7):740-748
114. M.K. Brimnes, I.M. Svane, H.E. Johnsen. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin. Exp. Immunol.* 2006, 144:76-84

115. R.M. Steinman, S. Turley, I. Mellman et al. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 2000, 191(3):411-416
116. B. Sauter, M.L. Albert, L. Francisco et al. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2000, 191(3):423-433
117. L. Mendoza, J. Bubenik, M. Indrova et al. Freezing and thawing of murine bone marrow-derived dendritic cells does not alter their immunophenotype and antigen presentation characteristics. *Folia Biologica* 2002, 48:242-245
118. S. Szmania, Q. Yi, M. Cottler-Fox et al. Clinical-grade myeloma Ag pre-loaded DC vaccines retain potency after cryopreservation. *Cytotherapy* 2005, 7(4):374-384
119. P. Ponsaerts, VFI Van Tendeloo, N. Cools et al. mRNA-electroporated mature dendritic cells retain transgene expression, phenotypical properties and stimulatory capacity after cryopreservation. *Leukemia* 2002, 16:1324-1330
120. P.J. Mosca, A.C. Hobeika, T.M. Clay et al. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon- γ treatment. *Blood* 2000, 96(10):3499-3504
121. M.R. Muller, G. Tsakou, F. Grunebach et al. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood* 2004, 103(5):1763-1769
122. M.R. Muller, F. Grunebach, A. Nencioni et al. Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J. Immunol.* 2003, 170:5892-5896
123. F. Grunebach, M.R. Muller, A. Nencioni et al. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther.* 2003, 10:367-374
124. A. Michiels, S. Tuyvaerts, A. Bonehill et al. Electroporation of immature and mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther.* 2005, 12:772-782

125. N. Schaft, J. Dorrie, P. Thumann et al. Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J. Immunol.* 2005, 174:3087-3097
126. L.J. Mu, G. Gaudernack, S. Saboe-Larssen et al. A protocol for generation of clinical grade mRNA-transfected monocyte-derived dendritic cells for cancer vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2003, 58:578-586
127. S. Saboe-Larssen, E. Fossberg, G. Gaudernack. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J. Immunol. Methods* 2002, 259:191-203
128. P. Ponsaerts, G. Van den Bosch, N. Cools et al. Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid *in vitro* differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. *J. Immunol.* 2002, 169:1669-1675
129. S. Zarei, J-F Arrighi, G. Ongaro et al. Efficient induction of CD8 T-associated immune protection by vaccination with mRNA transfected dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 2003, 121:745-750
130. A. Bonehill, C. Heirman, S. Tuyaeerts et al. Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res.* 2003, 63(17):5587-5594
131. M.F. Kalady, M.W. Onaitis, K.M. Padilla et al. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J. Surg. Res.* 2002, 105(1):17-24
132. R.M. Steinman. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1991, 9:271-296
133. M. Cella, F. Sallusto, A. Lanzavecchia. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Op. Immunol.* 1997, 9:10-16
134. Q. Yi, A. Osterborg, S. Bergenbrant et al. Idiotype-reactive T-cell subsets and tumor load in monoclonal gammopathies. *Blood* 1995, 86:3043-3049
135. G. Cook, J.D.M. Campbell, C.E.C. Carr et al. Transforming growth factor beta from multiple myeloma cells inhibits proliferation and IL-2 responsiveness in T lymphocytes. *J. Leuk. Biol.* 1999, 66:981-988

136. M.A. Frassanito, A. Cusmai, F. Dammacco. Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma. Clin. Exper. Immunol. 2001, 125:190-197
137. L. Garderet, C. Mazurier, C. Pellat-Deceunynck et al. Poor *ex vivo* induction of T-cell responses to idiotype or tumor cell lysate-pulsed autologous dendritic cells in advanced pre-treated multiple myeloma. Leukemia&Lymphoma 2006, 47(7):1340-47
138. S. Han, B. Wang, MJ Cotter et al. Overcoming immune tolerance against multiple myeloma with lentiviral calnexin-engineered dendritic cells. Mol. Ther. 2008, 16(2):269-279
139. D.K. Banerjee, M.V. Dhodapkar, E. Matayeva et al. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) *in vitro* and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. Blood 2006, 108(8):2655-2661
140. W.K. Decker, S. Li, D. Xing et al. Deficient T_H-1 responses from TNF- α -matured and α -CD40-matured dendritic cells. J. Immunother. 2008, 31(2):157-165
141. P. Brossart, A. Zobywalski, F. Grunebach et al. Tumor necrosis factor α and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. Cancer Res. 2000, 60:4485-4492
142. S. Yamazaki, K. Inaba, K.V. Tarbell et al. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. Immunol. Rev. 2006, 212:314-329
143. F. Ghiringhelli, P.E. Puig, S. Roux et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell proliferation. J. Exp. Med. 2005, 202(7):919-929
144. M. Bendandi, M. Rodriguez-Calvillo, S. Inoges et al. Combined vaccination with idiotype-pulsed allogeneic dendritic cells and soluble protein idiotype for multiple myeloma patients relapsing after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. Leukemia&Lymphoma 2006, 47(1):29-37
145. A. Curti, P. Tosi, P. Comoli et al. Phase I/II clinical trial of sequential subcutaneous and intravenous delivery of dendritic cell vaccination for refractory multiple myeloma using patient-specific tumour idiotype protein or idiotype (VDJ)-derived class I-restricted peptides. Br. J. Haemat. 2007, 139:415-424

146. W. Song, H.J.J. van der Vliet, Y-T Tai et al. Generation of antitumor invariant natural killer T cell lines in multiple myeloma and promotion of their functions via lenalidomide: a strategy for immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14(21):6955-62
147. S.B. Rew, K. Peggs, I. Sanjuan et al. Generation of potent antitumor CTL from patients with multiple myeloma directed against HM1.24. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11(9):3377-3384
148. A. Jalili, S. Ozaki, T. Hara et al. Induction of HM1.24 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by using peripheral-blood stem-cell harvests in patients with multiple myeloma. *Blood* 2005, 106(10):3538-3545
149. M. Hundemer, S. Schmidt, M. Condomines et al. Identification of a new HLA-A2-restricted T-cell epitope within HM1.24 as immunotherapy target for multiple myeloma. *Exp. Hemat.* 2006, 34:486-496
150. C.S. Mitsiades, N.S. Mitsiades, C.J. McMullan et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 2006, 107(3):1092-1100
151. J. Qian, S. Wang, J. Yang et al. Targeting heat shock proteins for immunotherapy in multiple myeloma: generation of myeloma-specific CTLs using dendritic cells pulsed with tumor-derived gp96. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11(24):8808-8815
152. R.B. Batchu, A.M. Moreno, S.M. Szmania et al. Protein transduction of dendritic cells for NY-ESO-1-based immunotherapy of myeloma. *Cancer Res.* 2005, 65(21):10041-10049
153. D. Atanackovic, J. Arfsten, Y. Cao et al. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2007, 109(3):1103-1112
154. M. Chiriva-Internati, Z. Wang, E. Salati et al. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood* 2002, 100(3):961-965
155. M. Chiriva-Internati, Z. Wang, E. Salati et al. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17- positive multiple myeloma. *Scand. J. Immunol.* 2002, 56:429-433

156. A.R. Dadabayev, Z. Wang, Y. Zhang et al. Cancer immunotherapy targeting Sp17: when should the laboratory findings be translated to the clinics? Am. J. Hemat. 2005, 80:6-11
157. P. Brossart, A. Schneider, P. Dill et al. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. Cancer Res. 2001, 61:6846-6850
158. T. Takahashi, Y. Makiguchi, Y. Hinoda et al. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. J. Immunol. 1994, 153:2102-2109
159. D. Dorfel, S. Appel, F. Grunebach et al. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with *in vitro*-transcribed MUC1 RNA. Blood 2005, 105(8):3199-3205
160. Draube A, Beyer M, Schumer S. et al. Efficient activation of autologous tumor-specific T cells: a simple coculture technique of autologous dendritic cells compared to established cell fusion strategies in primary human colorectal carcinoma. J Immunother. 2007, 30(4):359-69.
161. Parajuli P, Mathupala S, Sloan AE. Systematic comparison of dendritic cell - based immunotherapeutic strategies for malignant gliomas: *in vitro* induction of cytolytic and natural killer-like T cells. Neurosurgery 2004, 55(5):1194-204.
162. Janeway-Travers. Κλινική ανοσοβιολογία-το ανοσολογικό σύστημα στην υγεία και τη νόσο. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1999

